3.2 Biochemische und physikalische Versuche

Vorbemerkungen

Die Messung von Reaktionen, wie die Inkorporation der Chromophore in die Apoproteine, die Licht-/Dunkeladaption bzw. langsame Kinetiken der Photoprozesse, wurden mit Hilfe eines UV/Vis-Spektralphotometers durchgeführt. Mit Ausnahme von schnellen Reaktionen stand somit eine Anzahl von Absorptionsspektren zur Verfügung, die eine mathematische Analyse der Kinetiken über den sogenannten Globalfit ermöglichte (s. Experimenteller Teil, Punkt 4.2.4.1). Dabei wird nicht nur der Verlauf der Absorption bei einer Wellenlänge in der Anpassung der Exponentialfunktionen berücksichtigt, sondern gleichzeitig die Absorptionswerte bei verschiedenen Wellenlängen. Mit dieser Vorgehensweise kann die Anzahl und der Wert der Lebenszeiten genauer bestimmt werden. Beispielsweise treten bei den verschiedenen Schritten einer Einbaureaktion Absorptionsänderungen über einen großen Wellenlängenbereich auf: Ausgehend von der abnehmenden Absorption des freien Aldehyds bei kleinen Wellenlängen bis hin zur Absorption des entstehenden Chromoproteins im bathochromen Teil des Absorptionsspektrums. Anhand der resultierenden *lifetime-associated difference spectra* (LADS) des Globalfits werden zusätzlich die Absorptionsänderungen bei verschiedenen Wellenlängen erhalten, die einer Reaktion bzw. Lebenszeit zugrunde liegen. Damit sind die spektralen Eigenschaften der Intermediate zu erkennen, womit eine Hilfestellung für die Interpretation der auftretenden Reaktionen vorliegt. Wie unter Punkt 4.2.4.1 aufgeführt, gelingt es mit der mathematischen Analyse von Reaktionen anhand der Absorptionsverläufe unter bestimmten Umständen nicht, alle Kinetiken des Gesamtprozesses zu separieren. In diesen Fällen repräsentieren die LAD-Spektren und Lebenszeiten nicht nur einen Übergang zwischen zwei Zwischenstufen, sondern von mehreren Reaktionen. Zur Unterstützung der Interpretation wurden bei den im weiteren dargestellten Ergebnissen der kinetischen Analysen, die Absorptionsspektren der Intermediate aus den LAD-Spektren unter der Näherung einer irreversiblen Reaktion erster Ordnung berechnet. Bei nicht separierbaren Kinetiken stellen die Intermediat-spektren somit in gleicher Weise wie die LAD-Spektren gegebenenfalls die Absorption mehrerer Zwischenstufen dar. Die LAD-Spektren wurden immer in der Reihenfolge ihrer Lebenszeiten verrechnet.

Aufgrund der teilweise notwendigen langen Beobachtungszeiträume für die verschiedenen Reaktionen traten bei den Proben geringe Veränderungen der Extinktion durch Aggregation und Degeneration auf, die durch das Protein begründet waren. Eine Ursache für dieses Verhalten war die Verwendung von Suspensionen des Proteins für die Messungen und nicht von homogenen Lösungen. Dieses bedingt, daß sich bei langen Standzeiten im Spektrometer ein Teil des Proteins absetzt, so daß die Verteilung und Konzentration des Proteins im Beobachtungsvolumen und somit die Extinktion beeinflußt wird. Eine weitere Störung war die mit der Zeit verstärkt auftretende Degeneration und Aggregation der Proteine. Damit ändert sich zum einen die Partikelgröße, womit eine Veränderung der Streuung verbunden ist und zum anderen tritt ebenfalls vermehrt ein Absetzen des Proteins auf. Diese störenden Absorptionsänderungen lassen bis zu einem gewissen Ausmaß der auftretenden Extinktionsänderungen korrigieren: Das Absetzen des Proteins verursacht eine gleichmäßige Abnahme der Absorption über den gesamten Wellenlängenbereich und kann über die Normierung der Spektren bei einer Wellenlänge korrigiert werden, bei der keine Veränderung der Absorption stattfindet, die auf die zu beobachtende Reaktion zurückzuführen ist. Die Veränderung der Streuung beeinflußt die Absorption im langwelligen Teil des Absorptionsspektrums stärker als im kurzwelligen. Dieses "Kippen" der Absorptionsspektren kann wie folgt berücksichtigt werden: Die Absorptionsmessung wird über den Bereich hinaus erweitert, innerhalb dessen die Absorptionsänderungen der zu beobachtenden Reaktionen stattfinden. Die an den "Rändern" auftretenden Absorptionsänderungen waren dann nur auf die veränderte Streuung zurückzuführen und konnten für die Berechnung einer Geraden verwendet werden, mit der jedes Absorptionsspektrum individuell zu korrigieren ist. Die Korrekturen der Absorptionsspektren haben dabei keinen Einfluß auf die Lebenszeiten des Globalfits.

3.2.1 Bacteriorhodopsin

Für die Charakterisierung der Retinalderivate als Chromophore in Bacteriorhodopsin wurde das Protein der retinaldefizienten Mutante JW5[186,187] verwendet. Dieser Stamm des *Halobacterium salinarum* hat die Fähigkeit der Biosynthese von Retinal verloren, produziert aber weiterhin Bacterioopsin, so daß die zu untersuchenden Substanzen damit direkt, d. h. ohne vorherige Bleichung, in das Protein inkorporiert werden können[187,188] Es konnte allerdings gezeigt werden, daß die *in vitro* Assemblierung des Opsins der "weißen" Mutante zu einem Bacteriorhodopsin führt, welches sich in einigen Eigenschaften vom Wildtypprotein unterscheidet[189]. Dabei fand sich vor allem eine Differenz bei den pK_a-Werten der Schiff-Basen und zusätzlich in den Kinetiken des Photocyclus, insbesondere bei den M-Intermediaten. Der Unterschied wurde darauf zurückgeführt, daß die Anwesenheit des Retinals *in vivo* die Faltung des Proteins beeinflußt, während bei einem Fehlen der prosthetischen Gruppe geringfügige Konformationsänderungen des Apoproteins auftreten. Diese können durch den Einbau des Retinals *in vitro* nicht so beeinflußt werden, daß sich nachträglich eine zum Wildtyp identische Struktur einstellt. Aus diesem Grund wurde zum direkten Vergleich der analogen Chromoproteine neben dem Wildtypprotein (S9[187]) ebenfalls mit Retinal assembliertes Bacteriorhodopsin in die Messungen einbezogen.

3.2.1.1 Assemblierung

Erstmals wurde die Assemblierung von Bacterioopsin mit Retinal von *Schreckenbach et al.*[190-192] untersucht. Es konnten auf dem Weg zum Endprodukt zwei Reaktionsschritte identifiziert werden, deren Zwischenstufen anhand ihres Absorptionsverhaltens benannt wurden: Nach der Zugabe des Retinals tritt zuerst eine 400 nm-Spezies auf, bei der das Retinal noch ungebunden in der Suspension vorliegt. Als Ursache für die Verschiebung des Absorptionsmaximums wurde eine Planarisierung des Moleküls zwischen Ring und Polyenkette angeführt. Anschließend diffundiert das Retinal in die Bindungstasche des Proteins und infolge der Wechselwirkungen des Moleküls mit den umgebenden Aminosäuren verschiebt sich die Absorption zu 430-460 nm. Die Ausbildung der Schiff-Base findet erst in der darauffolgenden Reaktion statt und das Endprodukt zeichnet sich durch ein Absorptionsmaximum bei 560 nm aus.

Die detaillierte Analyse des Reaktionsschemas und der zugehörigen Kinetiken wurde im Rahmen von Faltungsexperimenten[f] mit Hilfe von Stop-Flow-Messungen vorgenommen[193-195]. Eine vereinfachte Reaktionsabfolge beinhaltet ausgehend vom degenerierten Protein bis zum Endprodukt Bacteriorhodopsin vier Intermediate (Abb. 3-44). Die ersten beiden beruhen auf Faltungen des Proteins. Die Einbindung des Chromophors erfolgt im dritten Schritt nach Erreichen einer zum nativen Zustand vergleichbaren Struktur des Bacterioopsins. Das entstehende Intermediat I_R ist identisch zu der von *Schreckenbach et al.* beschriebenen Zwischenstufe "430-460 nm-Chromophor". In den beiden nächsten Schritten erfolgt die Ausbildung der Schiff-Base und geringe Änderungen in der Konformation des Chromoproteins. Die Diffusion des Retinals in die Bindungstasche erfolgt innerhalb weniger Sekunden (Bildung von I_R). Der Ausbildung der kovalenten Bindung werden zwei Kinetiken von ca. 100 s (I_R zu I_3) und 300 s (I_3 zu BR) zugeordnet (Temperatur: 22 °C).

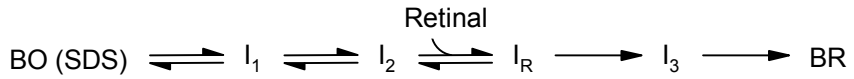


Abb. 3-44 Rückfaltung von degeneriertem Bacterioopsin (BO) in Gegenwart von Retinal. Die beiden ersten Intermediate beruhen auf Faltungen des Proteins und beim dritten Schritt erfolgt der Einbau des Chromophors, so daß über zwei weitere Schritte das Chromoprotein erhalten wird (BR). Darstellung nach *Booth et al.*[195]

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Assemblierungen von Bacterioopsin[g] wurden immer Suspensionen des Apoproteins in Wasser verwendet. Die Chromophore wurden als Lösungen zugesetzt, die mindestens 95 % des jeweiligen all-*E*-Isomers enthielten. Entsprechend des in Abb. 3-44 aufgeführten Reaktionsschemas verläuft die Einbindung des Retinals im ersten Schritt über eine Reaktion zweiter Ordnung. Eine Möglichkeit, diese Reaktion von der Konzentration des Aldehyds unabhängig zu machen und zu einer Reaktion erster Ordnung zu zwingen, ist der Einsatz eines mindestens dreifachen Überschusses an Retinal[196]. Bei den hier durchgeführten Assemblierungen wurde allerdings immer ein ca. 10 %iger Unterschuß an Retinal bzw. Retinalderivat

---

[f] Bacterioopsin wird in Gegenwart von SDS (Natriumdodecylsulfat) soweit degeneriert, daß noch ca. 60 % der Sekundärstruktur vorhanden sind. Durch Zugabe einer Mischung SDS, DMPC und CHAPS (L-α-1,2-Dimyristoylphophatidylcholin, Lipid bzw. 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat, Detergenz) findet eine Rückfaltung des Proteins statt.

[g] Im weiteren Text bezieht sich die Beschreibung Bacterioopsin und Bacteriorhodopsin immer auf das Protein der Mutante JW5. Ergebnisse unter Verwendung des Proteins des Stammes S9 werden gesondert bezeichnet.

eingesetzt, um bei weiteren Messungen einen störenden Einfluß von überschüssigem Chromophor zu vermeiden. Somit können die hier ermittelten Kinetiken durch den Verlauf des ersten Reaktionsschritts beeinflußt worden sein. Da bei allen Assemblierungen dasselbe Verhältnis von Bacterioopsin und Chromophor eingesetzt wurde, sind die Ergebnisse insofern aber untereinander vergleichbar.

Assembliertes Bacteriorhodopsin (Ret-JW5)

Im ersten Absorptionsspektrum nach der Zugabe von Retinal ist eine Absorption bei 425 nm zu detektieren, die auf den 430-460 nm-Chromophor zurückzuführen ist. Der 400 nm-Chromophors ist aufgrund der Registriergeschwindigkeit des Spektrometers nicht mehr zu detektieren (Abb. 3-45). Gleichzeitig ist bereits eine deutliche Absorption um 560 nm vorhanden, die durch die Ausbildung der Schiff-Base verursacht wird. Im nächsten Spektrum ("1.25 min") weist nur noch eine geringe Absorption auf einen Anteil der ersten Zwischenstufe hin und die Absorption oberhalb von 500 nm hat nach dieser kurzen Zeit bereits nahezu den maximalen Wert erreicht, der zum Endpunkt der Reaktion vorliegt. Nach ca. 6 min ist der weitere Verlauf des Einbaus nur noch durch eine geringe hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums geprägt.

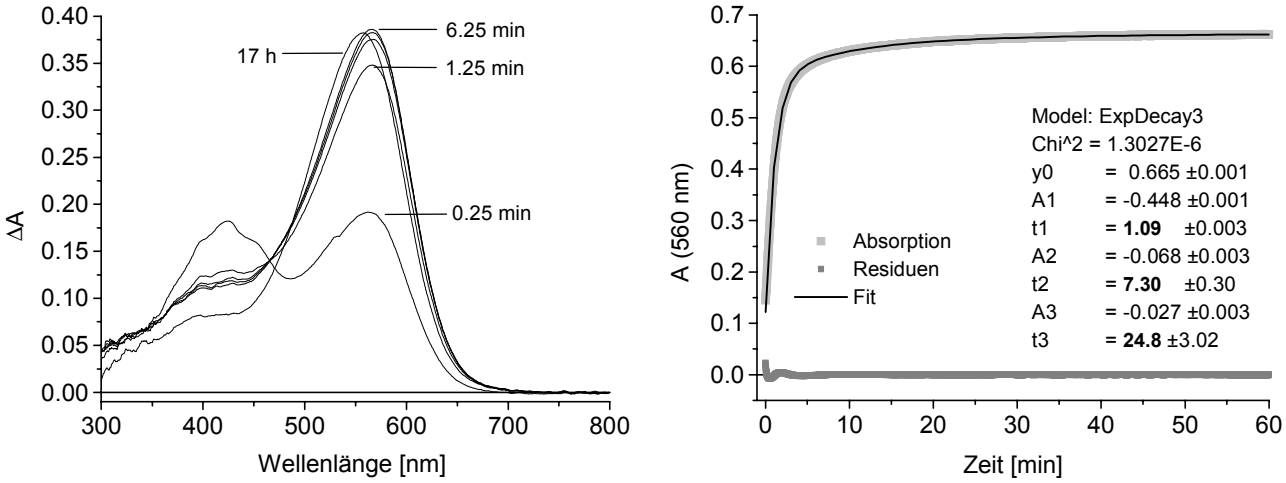


Abb. 3-45 Assemblierung von Bacterioopsin mit all-*E*-Retinal (20 °C). Absorptionsspektren zu verschiedenen Zeitpunkten der Einbaureaktion (links). Absorptionsverlauf der Reaktion bei einer Wellenlänge und eine Anpassung von drei monexponentiellen Funktionen sowie die Residuen (rechts). Die bei den Spektren aufgeführten Zeiten sind die Startzeiten der Messungen nach der Zugabe des Retinals. Das erste dargestellte Spektrum (0.25 min) stellt infolge der Registriergeschwindigkeit die zu diesem Zeitpunkt vorliegende Absorption verfälscht dar. Die Daten entstammen zwei verschiedenen Assemblierungen.

Eine kinetische Analyse der Assemblierung wurde infolge der Geschwindigkeit der Einbaureaktion nur durch die Aufzeichnung der Absorptionsänderungen bei einer

Wellenlänge möglich (Abb. 3-45). Die zeitliche Auflösung dieser Meßmethode beträgt 0.5 s, so daß Reaktionen, die innerhalb von wenigen Sekunden stattfinden, nur noch rudimentär erfaßt werden können. Der Verlauf der Absorptionswerte bei 560 nm ist befriedigend mit einer Summe von drei Exponentialfunktionen zu beschreiben. Die ungenügende Anpassung der Fitkurve im Zeitbereich bis ca. 2 min deutet auf eine weitere Reaktion hin, diese konnte allerdings nicht durch eine zusätzliche Funktion berücksichtigt werden. Möglicherweise wird dieses Verhalten durch die oben erwähnte Reaktion zweiter Ordnung verursacht.

Die ersten beiden Lebenszeiten von 1.09 und 7.3 min repräsentieren die Ausbildung der Schiff-Base und sind in Übereinstimmung mit den von *Booth et al.*[195] gefundenen Werten. Das dort verwendete Zeitfenster umfaßte allerdings nur 1000 s, so daß die hier im weiteren Verlauf der Inkorporation zu beobachtenden Reaktion mit einer Zeit von 24.8 min nicht mehr berücksichtigt werden konnte. Diesem Schritt liegt die Konfigurationsänderung eines Teils des Chromophors von der all-*E*- in die 13*Z*-Konfiguration zugrunde (Dunkeladaptierung des BR). Die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 567 zu 558 nm nach Erreichen des maximalen Absorptionswerts (Abb. 3-45) ist nahezu identisch zur Absorptionsänderung der Dunkeladaption (s. Abb. 3-54 bzw. Abb. 3-55). Das bedeutet, daß die ersten beiden Reaktionsschritte beim Einbau des Retinals mit einer solchen Geschwindigkeit verlaufen, daß dem Molekül nicht ausreichend Zeit für eine thermische Isomerisierung zur Verfügung steht.

9-Demethylretinal-Bacteriorhodopsin (9-dm-JW5)

Die Substitution der Methylgruppe an Position 9 des Chromophors durch ein Wasserstoffatom (9-Demethylretinal) verursacht bereits eine signifikante Verzögerung der Einbaureaktion (Abb. 3-46). Das erste Absorptionsspektrum nach der Zugabe des Aldehyds besitzt ein Maximum bei 420 nm und wie bei Retinal eine Feinstruktur. Die bathochrome Verschiebung des Maximums um 44 nm zur Absorption des all-*E*-9-Demethylretinal in alkoholischer Lösung entspricht ebenfalls dem bei Retinal zu beobachtenden Verhältnis (43 nm).

Anhand der Absorptionsspektren lassen sich ansatzweise zwei isosbestische Punkte erkennen und ein zweistufiger Verlauf der Einbaureaktion wird durch die kinetische Analyse der Daten bestätigt (Abb. 3-46c): Das erste LAD-Spektrum mit einer Lebenszeit von 6.9 min zeigt die Abnahme der Absorption um 420 nm sowie eine Zunahme bei ca.

540 nm. Wie durch die Intermediatspektren in Abb. 3-46d verdeutlicht, kann diese Reaktion dem Zerfall des analogen 430-460-Intermediats und der Entstehung der ersten Zwischenstufe in der Ausbildung der Schiff-Base zugeordnet werden (I_1 nach I_2; Abb. 3-46d). Beim nächsten LAD-Spektrum (34.3 min) liegt ein Zerfall bei ca. 460 nm und eine Entstehungskomponente wie zuvor bei 540 nm vor. Diese Reaktion beschreibt die Vervollständigung der kovalenten Bindung des Chromophors an das Protein. Wie die Differenz des zweiten Intermediatspektrums zur Konstanten des Globalfits zeigt (Abb. 3-46d), ist dieser Schritt mit einem Anstieg des Extinktionskoeffizienten verbunden.

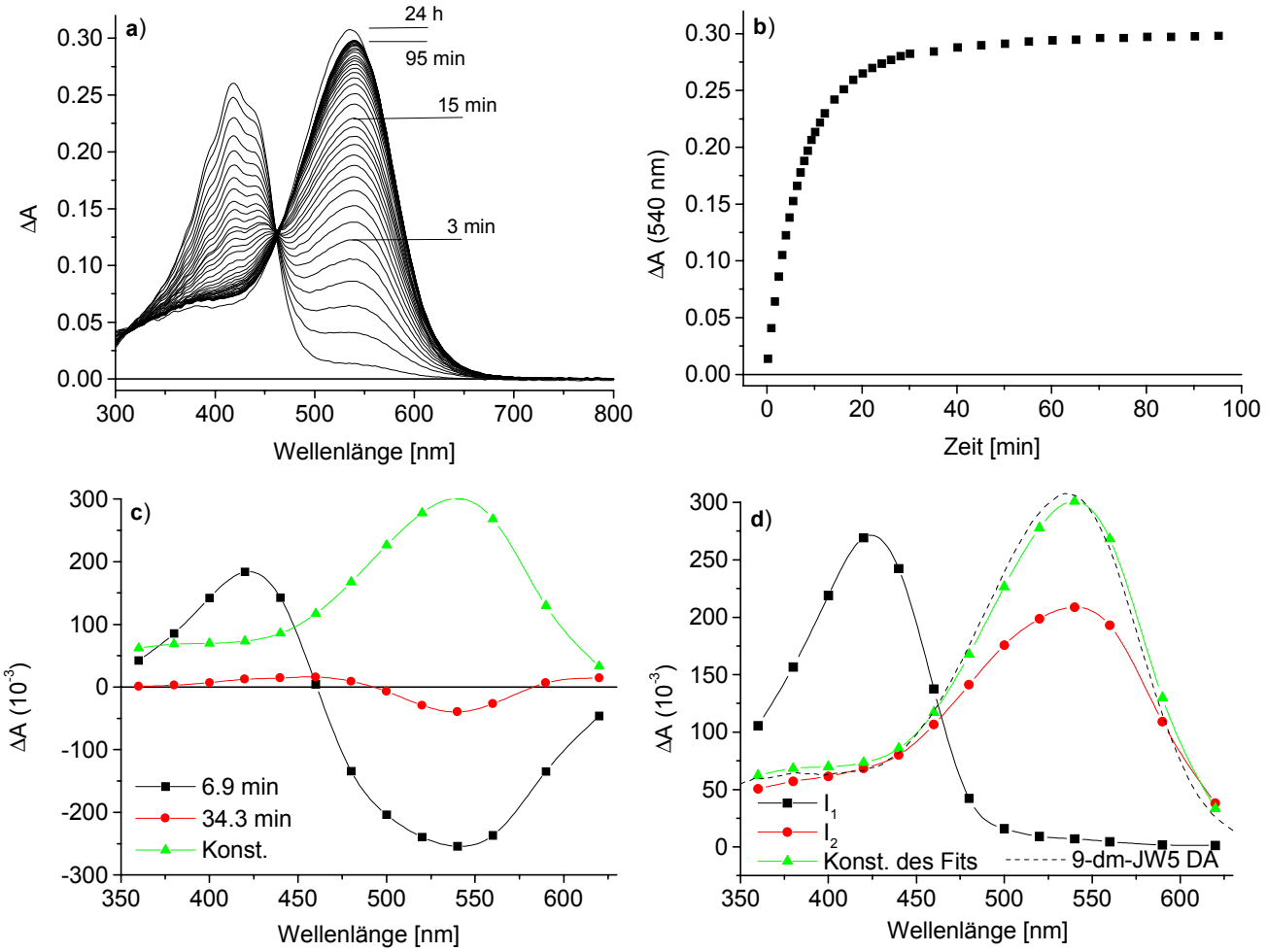


Abb. 3-46 Assemblierung von Bacterioopsin mit all-*E*-9-Demethylretinal (20 °C): a) Absorptionsspektren der Einbaureaktion, b) der Absorptionsverlauf bei 540 nm, c) LADS der Assemblierung von Bacterioopsin mit all-*E*-9-Demethylretinal und d) die aus diesen Daten berechneten Absorptionsspektren der Intermediate; zusätzlich ist die Konstante der LADS abgebildet und das Spektrum des dunkeladaptierten Chromoproteins (9-dm-JW5 DA).

Das Absorptionsmaximum der Konstanten ist nicht in Übereinstimmung mit dem Maximum des dunkeladaptierten 9-Demethylretinal-Bacteriorhodopsin (9-dm-JW5). Somit wurde innerhalb des verwendeten Zeitfensters für die Messung der Assemblierung von

95 min zwar die vollständige Anbindung des Aldehyds an das Protein beobachtet, aber nicht die nachfolgende Isomerisierung des Chromophors. Wie anhand des nach 24 h aufgenommenen Spektrums in Abb. 3-46a zu erkennen ist, enstand nach dem Ende der kinetischen Messung noch ein geringer Anstieg der Absorption und gleichzeitig eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 540 nach 535 nm. Die Analyse der Licht-/Dunkeladaption des analogen Chromoproteins zeigt, daß diese Isomerisierung im Vergleich zu Retinal deutlich langsamer verläuft (siehe Punkt 3.2.1.2). Somit erfolgt bei 9-Demethylretinal analog zu Retinal die Ausbildung der Schiff-Base in der all-*E*-Konfiguration und erst im Anschluß die Geometrieänderung, mit der das Isomerenverhältnis des dunkeladaptierten Pigments erreicht wird.

Ein Vergleich der Lebenszeiten mit den Werten in der Literatur ist nicht direkt vorzunehmen, da dort nur eine Lebenszeit von 2.8 min (25 °C), bzw. eine gegenüber Retinal zweifach längere Reaktionszeit angegeben wird[31]. Wird an die hier gemessenen Absorptionsverläufe jeweils *eine* Lebenszeit angepaßt, dann ergibt sich - allerdings mit einer ungenügenden Beschreibung der Daten - für 9-Demethylretinal im Vergleich zu Retinal eine nahezu fünffach langsamere Reaktionszeit (Lebenszeit 8.6 bzw. 1.8 min).

9-Ethylretinal-Bacteriorhodopsin (9-Et-JW5)

Bei der Zugabe von all-*E*-9-Ethylretinal zu einer Suspension von Bacterioopsin tritt wie bei den zuvor beschriebenen Assemblierungen eine zur Absorption des freien Aldehyds in alkoholischer Lösung bathochrom absorbierende Zwischenstufe (λ_{max} = 396 nm) auf (Abb. 3-47). Im Gegensatz dazu zeigt sich bei dieser aber keine Feinstruktur und das Maximum liegt in Relation bei kürzeren Wellenlängen. Zusätzlich besitzt dieses Intermediat im Vergleich zum letzten Spektrum der Inkorporation einen deutlich geringeren Extinktionskoeffizienten.

Im Verlauf der Assemblierung findet zuerst eine schnelle Reaktion statt und nach ca. 20 min ist keine Absorption der ersten Zwischenstufe mehr zu registrieren. Die weitere Reaktion beinhaltet eine Verschiebung des isosbestischen Punktes von ca. 450 zu 495 nm. Dann wird die Einbaureaktion durch den Anstieg der Absorption bei 545 nm mit zwei unterschiedlichen Geschwindigkeiten geprägt. Dieses wird ebenfalls durch die kinetische Analyse der Transienten bestätigt (Abb. 3-47c und d): Das erste Intermediat I_1 mit dem Absorptionsmaximum von 400 nm geht innerhalb von 2 min in das Intermediat I_2 über, welches neben dem kurzwelligen Maximum zwei weitere Maxima bei ca. 480 und

550 nm besitzt und somit eine Mischung von drei Zwischenstufen darstellt. Beim dritten, innerhalb von 15 min entstehenden Intermediat (I_3) ist keine Absorption bei 400 nm mehr vorhanden, es lassen sich aber ebenfalls die beiden langwelligen Maxima des zweiten Intermediats erkennen, wobei die Absorptionsbande mit einem Maximum von 545 nm dominiert. Das vierte und letzte Intermediat besitzt nur noch ein Absorptionsspektrum mit dem Maximum bei 545 nm. Die beiden letzten Reaktionen weisen eine Lebenszeit von 17 min (I_3 zu I_4) und 375 min (I_4 zur Konstanten) auf.

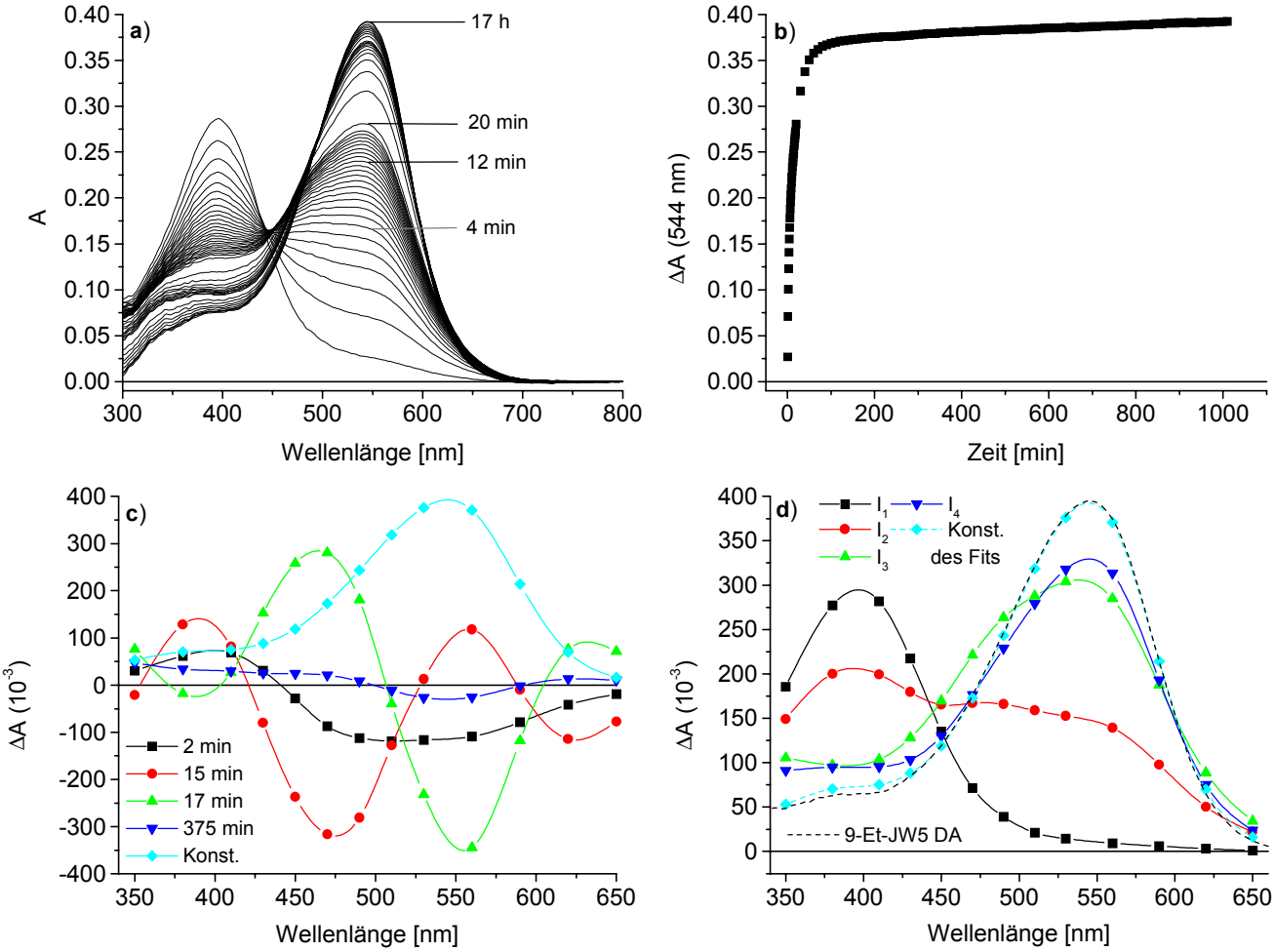


Abb. 3-47 Inkorporation von all-*E*-9-Ethylretinal in Bacterioopsin (20 °C): a) Absorptionsspektren (Auswahl), b) Absorptionsverlauf der Einbaureaktion, c) LADS aus dem Globalfit der Daten und d) Spektren der Intermediate und die Konstante aus dem Globalfit sowie das Spektrum des dunkel-adaptierten Chromoproteins (9-Et-JW5 DA).

Der Verlauf des zweiten und dritten LAD-Spektrums in Abb. 3-47 ist zueinander fast spiegelbildlich, so daß auf die Anwesenheit einer Gleichgewichtsreaktion geschlossen werden könnte; damit wären die daraus berechneten Spektren verfälscht. Da die jeweiligen Entstehungs- bzw. Zerfallskomponenten allerdings geringfügig zueinander verschobene Maxima aufweisen, kann von einer sequenziellen Reaktion ausgegangen

werden. Aufgrund der in den Spektren des zweiten und dritten Intermediats auftretenden drei bzw. zwei Absorptionsmaxima liegt vermutlich ein Übergang zwischen Gleichgewichten mehrerer Intermediate vor.

Die Entstehungszeit von 375 min führt dazu, daß die Reaktion innerhalb des Beobachtungszeitfensters von 1000 min noch nicht vollständig abgeschlossen ist und der Absorptionsverlauf in Abb. 3-47b weiterhin mit einem geringfügigen Anstieg zum maximalen Absorptionswert konvergiert. Anhand der Übereinstimmung des Spektrums des dunkeladaptierten Pigments und der Konstanten des Fits (s. Abb. 3-47c) ist erkennbar, daß der Endpunkt der Reaktion durch den Globalfit jedoch korrekt extrapoliert wurde.

Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der Reaktion kann anhand der Daten wie folgt beschrieben werden: Die hypsochrome Lage des 430-460 nm-Chromophors im Vergleich zu Retinal und auch 9-Demethylretinal, der geringe Extinktionskoeffizient und vor allem die fehlende Feinstruktur des Spektrums deuten darauf hin, daß der Chromophor zu diesem Zeitpunkt eine zu den vorgenannten Verbindungen veränderte Position innerhalb des Proteins einnimmt und sich noch nicht entsprechend in der Bindungstasche befindet. Offensichtlich ist bei 9-Ethylretinal durch den größeren Substituenten die Planarisierung des Moleküls und der damit verbundene Übergang von der 6-s-*cis*- in die 6-s-*trans*-Konformation gestört[197]. Der weitere Verlauf der Einbaureaktion erfolgt über eine Zwischenstufe, deren Absorptionsmaximum bei ca. 480 nm liegt, zu einer weiteren, deren Maximum sich bei 545 nm befindet. Während diese beiden Zwischenstufen in einem ungefähr gleichen Anteil im zweiten Intermediatspektrum zu detektieren sind, ist die bei 480 nm absorbierende Zwischenstufe im dritten Intermediatspektrum nur noch in einer geringen Konzentration und im vierten nicht mehr vorhanden (Das vierte Intermediatspektrum durchläuft nicht mehr den von den drei vorherigen Spektren gebildeten isosbestischen Punkt). Das Auftreten dieser Zwischenstufe beruht vermutlich auf Konformationsänderungen, die für die korrekte Positionierung des Moleküls in der Bindungstasche vonnöten sind. Betrachtet man die zweite und dritte Reaktion (I_2 zu I_3 bzw. I_3 zu I_4) als die kovalente Anbindung des 9-Ethylretinals an das Bacterioopsin, so entspräche der Schritt der vierten Zwischenstufe zum Endprodukt, der Isomerisierung des Chromophors (s. Licht-/Dunkeladaption, Abb. 3-61). Die Bildung der Schiff-Base würde dementsprechend mit den zwei Reaktionszeiten von 15 und 17 min

ablaufen, während die Konfigurationsänderung des Moleküls mit 375 min die längste Zeit benötigte.

9-Isopropylretinal-Bacteriorhodopsin (9-Is-JW5)

Die Assemblierung von Bacterioopsin mit 9-Isopropylretinal zeigt im Vergleich zur Inkorporation von Retinal signifikante Unterschiede (Abb. 3-48). Nach der Zugabe des Aldehyds zur Proteinsuspension tritt eine Absorption mit einem Maximum bei ca. 395 nm auf, welche analog zu 9-Ethylretinal keine Feinstruktur aufweist. In gleicher Weise wie bei der 9-Et-JW5 liegt das Maximum bei 9-Is-JW5 nur um ca. 25 nm vom entsprechenden Wert des Aldehyds in einer alkoholischer Lösung (λ_{max} = 376 nm) entfernt. Die Reaktion über einen isosbestischen Punkt bei ca. 430 nm endet beim Produkt mit einem Absorptionsmaximum von ca. 485 nm. Damit absorbiert 9-Is-JW5 deutlich kurzwelliger als Ret-JW5 und die zuvor beschriebenen analogen Chromoproteine.

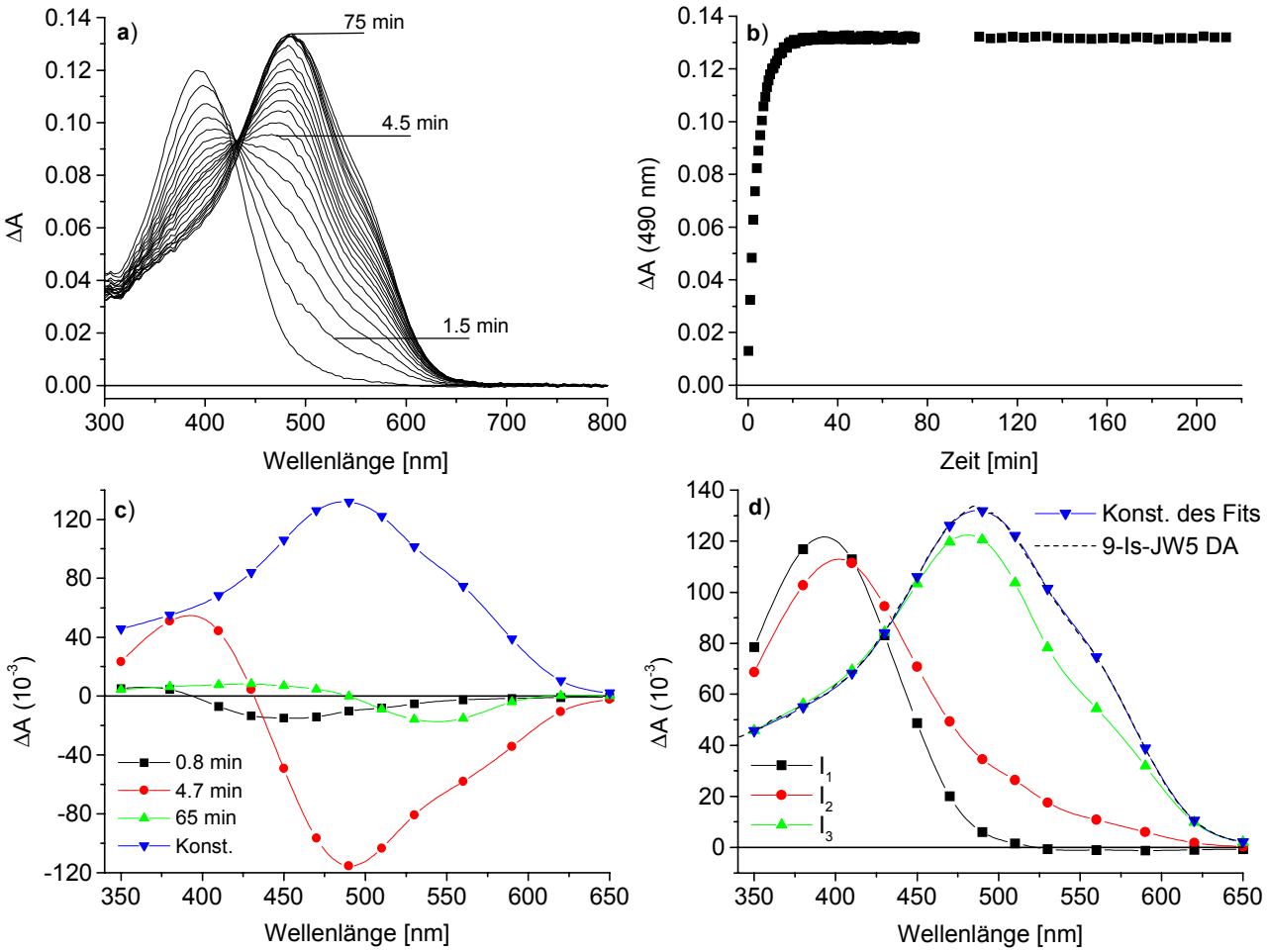


Abb. 3-48 Einbau von all-*E*-9-Isopropylretinal in Bacterioopsin (20 °C): a) Absorptionsspektren der Inkorporation (Auswahl), b) Absorptionsverlauf bei einer Wellenlänge (Unterbrechung der Messung im Zeitbereich von 80 bis ca. 100 min), c) LAD-Spektren aus den Daten der Absorptionsspektren und d) die daraus berechneten Intermediatspektren; Zusätzlich ist das Spektrum der Konstanten des Globalfit und das Spektrum des dunkeladaptierten Proteins abgebildet (9-Is-JW5 DA).

Zur Überprüfung, ob 9-Isopropylretinal angesichts dieses hypsochromen Absorptionsmaximums tatsächlich eine kovalente Bindung zum Protein ausbildet oder sich nur ungebunden im Kanal des Proteins befindet, wurde der Suspension des analogen Chromoproteins Retinal zugesetzt. Dabei war zu beobachten, daß das Retinal nach der Reaktion mit dem überschüssigen Anteil des Bacterioopsins, über einen Zeitraum von 20 h nur einen geringen Teil des 9-Isopropylretinals verdrängen konnte. Somit ist von einer kovalenten Anbindung des Retinalderivats an das Protein auszugehen.

Zur Beschreibung der Assemblierungsreaktion sind drei Lebenszeiten notwendig, aus denen drei Intermediatspektren zu berechnen sind (Abb. 3-48c und d). Die erste Lebenszeit von 0.8 min und die hypsochrome Lage des Absorptionsmaximums des Intermediatspektrums (I_1, λ_{max} = 394 nm) lassen wiederum auf einen Chromophor schließen, der sich in der Bindungstasche noch nicht in der korrekten Position befindet. Der Übergang in das zweite Intermediat könnte einer Konformationsänderung des Moleküls entsprechen, die mit einer geringen Verschiebung des Maximums von 394 zu 402 nm verbunden ist. Die im Ansatz erkennbare langwellige Absorptionsbande im gleichen Spektrum deutet auf die Anbindung des Chromophors an das Protein (I_2, Abb. 3-48d). Im Falle des dritten Intermediats (I_3) ist die Schiff-Base vollständig ausgebildet und im weiteren findet nur noch eine Isomerisierung des Chromophors statt, wobei der Extinktionskoeffizient geringfügig ansteigt (s. Licht-/Dunkeladaption, Abb. 3-64).

Der Ausbildung der kovalenten Bindung kann somit nur eine Reaktionszeit von 4.7 min zugeordnet werden, und die Konfigurationsänderung des 9-Isopropylretinals findet mit einer Zeitkonstanten von 65 min statt. Die Vollständigkeit der Reaktion kann wiederum anhand der Übereinstimmung der Konstanten des Globalfits und des Absorptionsspektrums des dunkeladaptierten Chromoproteins abgelesen werden. Der in Abb. 3-48b dargestellte Verlauf der Absorption bei 490 nm erreicht nach spätestens 120 min einen konstanten Wert und zeigt somit ebenfalls das Ende der Reaktion innerhalb des Meßzeitraums an. Die unsymmetrische Bande des Absorptionsspektrums von 9-Is-JW5 deutet auf die Anwesenheit von verschiedenen Konfigurationen des Chromophors in der Bindungstasche hin.

10-Methyl-13-demethylretinal-Bacteriorhodopsin (MD-JW5)

Die sterischen Modifikationen an der Polyenkette von MD führen zu einer dramatischen Verzögerung der Assemblierung. Entsprechend ist zur Vervollständigung der Reaktion ein

Zeitraum von über einer Woche notwendig (Abb. 3-49). Ein entscheidender Faktor für die langsame Reaktion ist offensichtlich das Fehlen der Methylgruppe an Position 13 des Moleküls, die für die Orientierung der funktionellen Gruppe zum Lysinrest bedeutend ist. Bei der Verbindung 13-Demethylretinal benötigt die vollständige Inkorporation des Chromophors[h] bereits mindestens zwei Tage, so daß die demgegenüber zu beobachtende Verlängerung der Reaktion im Falle von 10-Methyl-13-demethylretinal auf die 10-Methylgruppe zurückzuführen ist. Die Vollständigkeit der Reaktion innerhalb des Beobachtungszeitraums ist anhand des Absorptionsverlaufs in Abb. 3-49b zu erkennen. Der geringe Unterschied zwischen der Konstanten des Globalfits und dem Spektrum des vollständig assemblierten Pigments ist durch eine teilweise Degeneration des Proteins infolge der langen Reaktionszeit bedingt.

Nach der Zugabe der Chromophorlösung ist wie bei Retinal ein Absorptionsspektrum zu registrieren, dessen Maximum bei 430 nm liegt und eine Feinstruktur aufweist. Der Absorptionswert liegt um 46 nm bathochromer als das Absorptionsmaximum des Chromophors in alkoholischer Lösung und ist diesbezüglich ebenfalls zur nativen prosthetischen Gruppe zu vergleichen (Differenz bei Retinal ca. 53 nm). Signifikant ist der große Extinktionskoeffizient dieser Zwischenstufe im Vergleich zum Endprodukt der Assemblierung. Im weiteren verlaufen die Absorptionsspektren der Einbaureaktion über einen isosbestischen Punkt und es entsteht das Pigment mit einem Absorptionsmaximum von 576 nm. Dabei ist insbesondere die Anwesenheit eines relativ intensiven Nebenmaximums bei ca. 410 nm interessant, das durch eine starke Verdrillung der Moleküls in der Bindungstasche verursacht werden könnte. Denkbar ist allerdings auch, daß während der langen Inkubationszeit teilweise eine Isomerisierung zu einer Konfiguration des MD erfolgt, die nicht assembliert werden kann.

Aus der kinetischen Analyse der Absorptionsspektren können drei Lebenszeiten ermittelt werden, wobei die Amplituden des ersten und dritten LAD-Spektrums relativ klein sind (Abb. 3-49c). Das erste Intermediatspektrum in Abb. 3-49d zeigt deutlich den analogen 430-460 nm-Chromophor. Die zweite Stufe der Reaktion wird mit einer Lebenszeit von 353 min erreicht. Dabei ist einerseits eine geringe Abnahme der Absorption bei der kurzwelligen Bande und andererseits eine kleine Absorptionsbande bei

[h] Eine Assemblierung von Bacterioopsin mit 13-Demethylretinal wurde im Rahmen der Arbeit durchgeführt, die Ergebnisse sind hier aber nicht im einzelnen aufgeführt. Zur Beschreibung der Einbaureaktion zu diesem Pigment ist mindestens eine Lebenszeit von 28 h notwendig (Lit.[31]: 23 h).

ca. 570 nm Bande zu registrieren. Dieses Intermediatspektrum (I_2) stellt eine Mischung aus zwei Zwischenstufen dar, deren Reaktion mit dem Globalfit nicht aufgelöst werden konnte. Grundlage dieser beiden Stufen könnte einerseits eine Konformationsänderung des Chromophors sein, die zu einer Verringerung der kurzwelligen Absorption im Vergleich zum ersten Intermediatspektrum führt und andererseits die Ausbildung der Schiff-Base, durch die die langwelligen Absorptionsbande hervorgerufen wird.

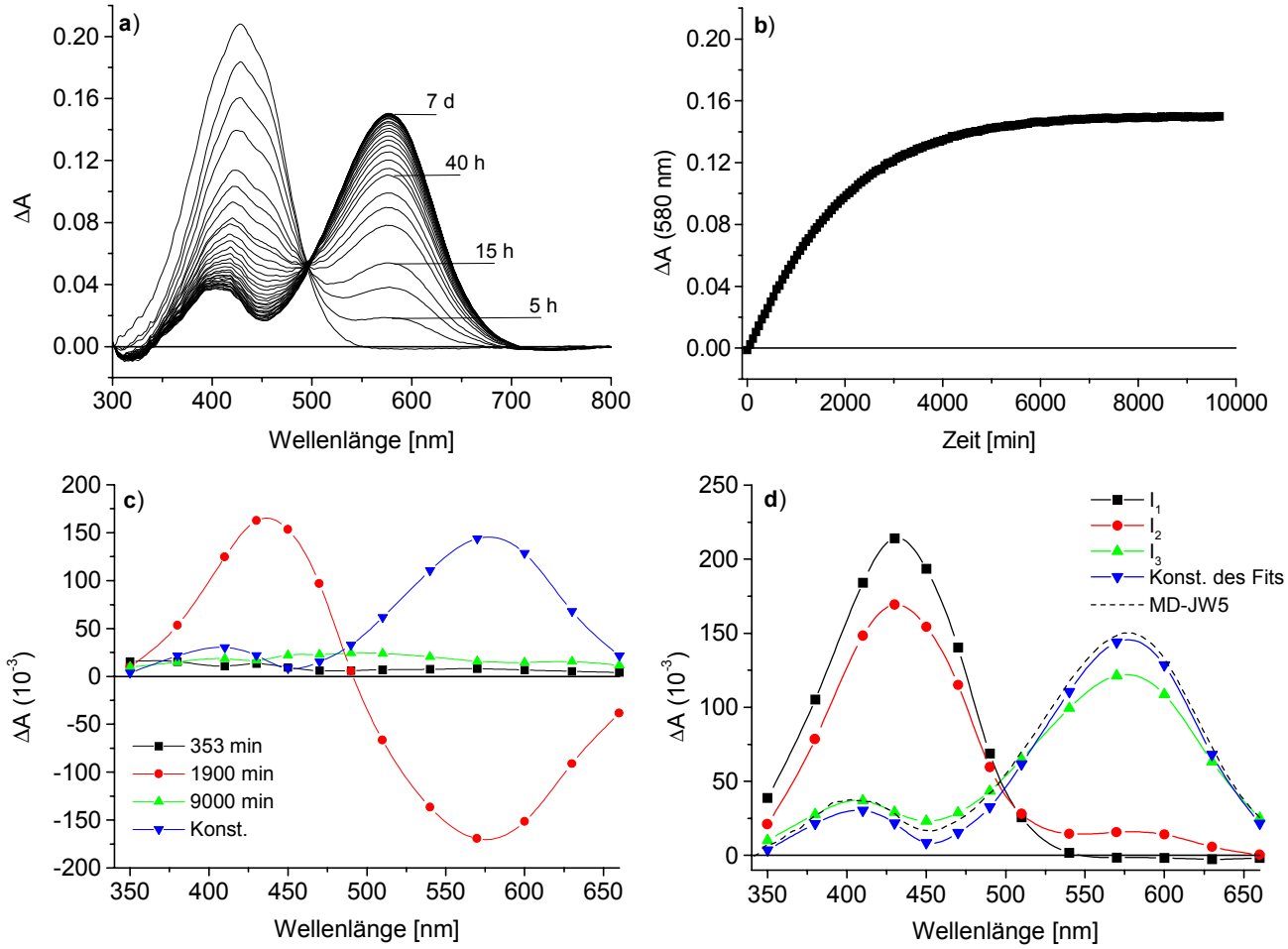


Abb. 3-49 Assemblierung von Bacterioopsin mit 10-Methyl-13-demethylretinal (20 °C): a) Auswahl der Absorptionsspektren der Einbaureaktion, b) Absorptionsverlauf bei 580 nm, c) Ergebnis der kinetischen Analyse der Absorptionsverläufe bei verschiedenen Wellenlängen (LADS) und d) die aus den LAD-Spektren berechneten Intermediatspektren sowie die Konstante des Globalfits und das Absorptionsspektrum des vollständig assemblierten Pigments (MD -JW5).

Das dritte Intermediatspektrum ist in der Form bereits mit dem Spektrum des Endproduktes zu vergleichen, die Absorptionsbande oberhalb von 500 nm besitzt noch einen geringeren Extinktionskoeffizienten als dieses. Somit kann die letzte Reaktion mit einer Zeit von 9000 min (6.25 d) der Isomerisierung des Chromophors in der Bindungstasche zugeordnet werden (s. Licht-/Dunkeladaption, Abb. 3-68). Es ist davon

auszugehen, daß das Substitutionsmuster von MD ebenfalls die Geometrieänderungen des Chromophors innerhalb des Proteins behindert und die Reaktion somit drastisch verzögert ist.

10-Methylretinal-Bacteriorhodopsin (10-Me-JW5)

Bei der Assemblierung von Bacterioopsin mit 10-Methylretinal zeigt sich, daß die an Position 10 vorhandene Methylgruppe gegenüber Retinal eine Verlangsamung der Reaktionszeit verursacht (Abb. 3-50). Gleichzeitig wird die oben vorgenommene Aussage bestätigt, daß die 13-Methylgruppe für die Inkorporation des Chromophors eine wesentliche Rolle spielt und ihr Fehlen im Falle von 10-Methyl-13-demethylretinal hauptverantwortlich für die bei dieser Verbindung außerordentlich langsamen Einbaukinetik ist. Wie anhand des Absorptionsverlaufs in Abb. 3-50b zu erkennen, ist die Inkorporation von 10-Methylretinal nach etwas über 12 h vollständig abgeschlossen. Dieses ist somit um ein vielfaches schneller als im Falle des entsprechenden 13-Demethylanalogen.

Das erste Absorptionsspektrum nach Zugabe der Chromophorlösung besitzt ein Absorptionsmaximum von 405 nm und die Differenz zu der alkoholischen Lösung des 10-Methylretinal beträgt somit nur 18 nm. Mit der fehlenden Feinstruktur liegt dieses Erscheinungsbild des Spektrums in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Inkorporation von 9-Ethylretinal und im Gegensatz zu den Beobachtungen die beim Einbau von 10-Methyl-13-demethylretinal gemacht werden konnten. Damit kann angenommen werden, daß der Chromophor mit der zusätzlichen Methylgruppe einen Raumanspruch besitzt, der eine korrekte Positionierung des Moleküls in der Bindungstasche nicht zuläßt.

Der Globalfit der Absorptionswerte fördert nur zwei Lebenszeiten zutage. Entsprechend zu den in Abb. 3-50d dargestellten Spektren der Intermediate ist dabei vor allem nur eine Änderung der Absorption bei 405 nm zu erkennen. Beim zweiten Intermediatspektrum erscheint zusätzlich eine sehr kleine Absorptionsbande um 570 nm. Die Reaktion von der ersten zur zweiten Zwischenstufe kann wiederum als eine Konformationsänderung des Chromophors betrachtet werden, die mit einer Zeit von 28 min verläuft.

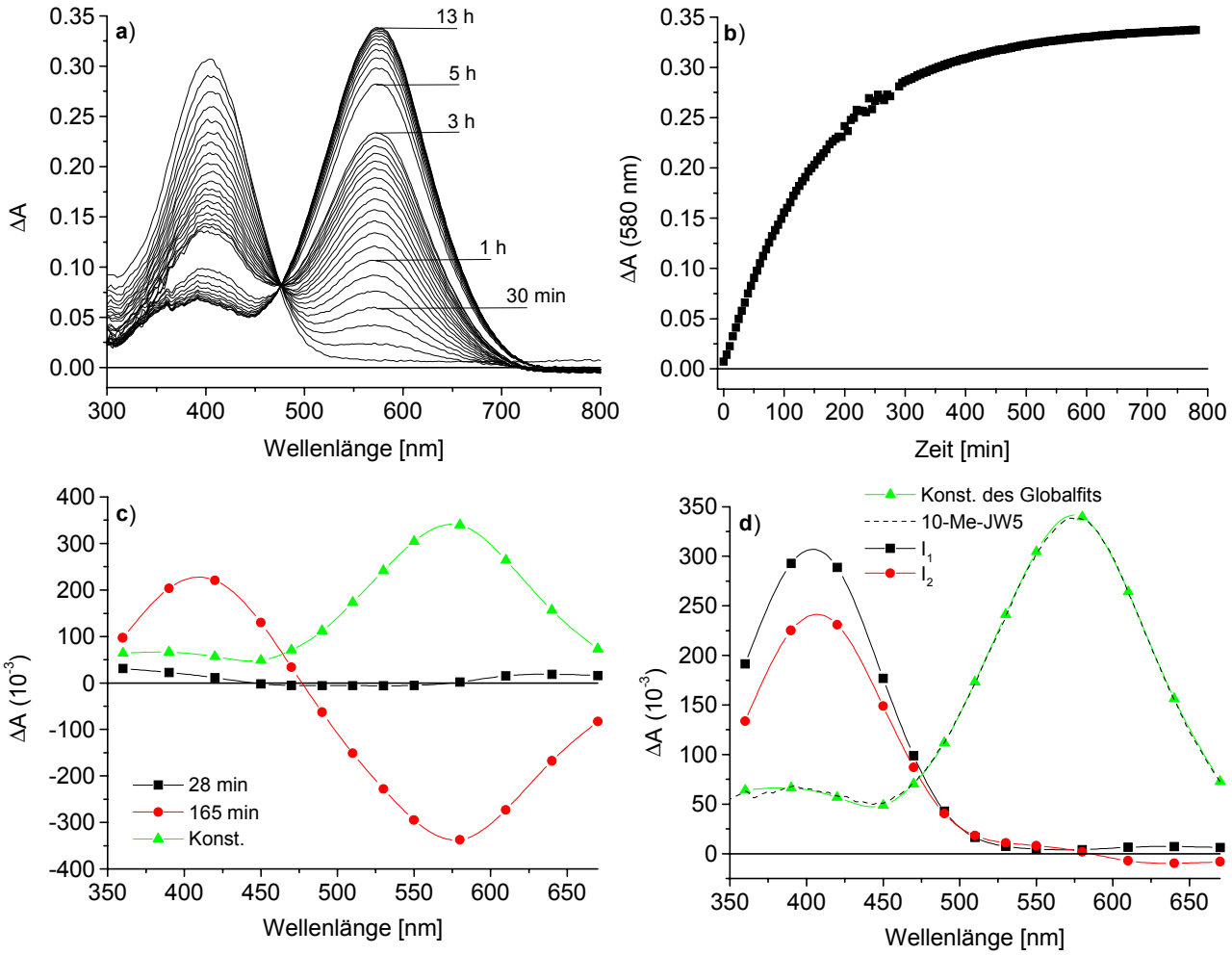


Abb. 3-50 Inkorporation von 10-Methylretinal in Bacterioopsin (20 °C): a) Absorptionsspektren (Auswahl) , b) Verlauf der Absorptionswerte bei 580 nm (Die Streuung der Werte zwischen 200 und 300 min wurde durch Spannungsschwankungen während der Messung verusacht), c) LADS der Assemblierungsreaktion und d) aus den LADS berechnete Intermediatspektren sowie die Konstante des Globalfits und das Absorptionsspektrum des vollständig assemblierten 10-Methyl-retinal-Bacteriorhodopsins (10-Me-JW5).

Anhand der Assemblierungsdaten ist kein Reaktionsschritt zu detektieren, dem eine Isomerisierung des 10-Methylretinals in der Bindungstasche zuzuordnen wäre. Somit ist davon auszugehen, daß die Geometrieänderung und die Anbindung des Moleküls an das Protein gleichzeitig mit einer Reaktionszeit von 165 min stattfinden. Diese Annahme würde auch durch den relativ scharfen isosbestischen Punkt der Absorptionsspektren bestätigt, welcher in dieser Form dem Übergang in einem einzigen Schritt, ausgehend von einer Zwischenstufe mit einem Absorptionsmaximum von ca. 400 nm, zum Pigment mit dem Maximum von 578 nm entspricht. Zusätzlich besitzt die langwellig entstehende Absorption bei den Inkorporationsspektren der Abb. 3-50a bereits zu Beginn der Assemblierung das Maximum bei 578 nm und im weiteren Verlauf der Reaktion ist keine Verschiebung zu beobachten.

Zusammenfassung der Assemblierungs-Versuche

Die Tab. 3-16 faßt die Reaktionszeiten zusammen, die bei der Assemblierung von Bacterioopsin mit Retinal und den Retinalderivaten in der Analyse der Absorptionswerte verschiedener Wellenlängen erhalten wurden. In der Abb. 3-51 sind die Absorptionsverläufe der Inkorporationen gegeneinander aufgetragen; jeweils vom Absorptionsmaximum des jeweils entstehenden Pigments.

Tab. 3-16 Zusammenfassung der Reaktionszeiten der Assemblierung von Bacterioopsin mit Retinal und den Retinalderivaten (20 °C) [min].

	9-dm	Retinal	9-Et	9-Is	MD	10-Me
τ_1	6.9	1.1	2	0.8	350	28
τ_2	34.3	7.3	15	5	1900	165
τ_3	-	24.8	17	65	9000	-
τ_4	-	-	375	-	-	-

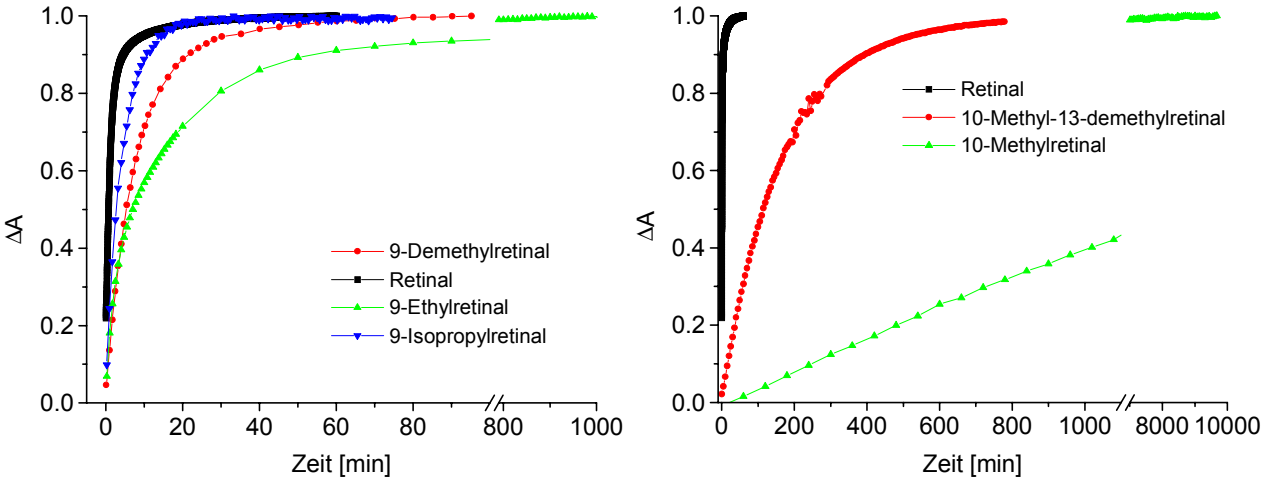


Abb. 3-51 Normierte Absorptionsverläufe am Maximum des jeweiligen Pigments bei der Assemblierung von Bacterioopsin mit Retinal und den Retinalderivaten.

Anhand der zusammengefaßten Werte ist deutlich zu erkennen, daß der Einbau von Retinal von allen Derivaten die geringste Zeit benötigt. Demnach ist die Struktur des nativen Chromophors und die Anordnung der Aminosäuren zur Ausbildung der Bindungstasche in Bacterioopsin optimal aufeinander ausgerichtet. Bereits die Substitution der Methylgruppe an Position 9 durch ein Proton im Fall von 9-Demethylretinal führt zu einer deutlichen Verlangsamung der Einbaugeschwindigkeit. Die Erhöhung des sterischen Anspruches an der gleichen Position behindert den Verlauf des Einbaus in noch stärkerem Ausmaß. Interessant ist die schnelle Inkorporation von 9-Isopropylretinal trotz des

gegenüber 9-Ethylretinal weiter erhöhten Raumbedarfs. Allerdings erscheint das Absorptionsmaximum dieses analogen Pigments im Vergleich zu allen Retinalderivaten deutlich hypsochrom, so daß eine nicht zu vergleichende Lage des Chromophors in der Bindungstasche zu vermuten ist.

Der Vergleich der Retinalderivate 10-Methyl-13-demethylretinal und 10-Methylretinal zeigt die signifikante Funktion der Methylgruppe an Position 13 für die Anbindung des Chromophors an das Protein. Die Anwesenheit der 10-Methylgruppe führt ebenfalls zu einer deutlichen Verzögerung der Einbaureaktion, aber nicht in dem Maße, wie es bei der 13-Methylgruppe der Fall ist.

3.2.1.2 Licht- und Dunkeladaption

Für die Untersuchung der Licht/Dunkeladaption ist das Absorptionsverhalten des Pigments im jeweils adaptierten Zustand relevant. Die für die Veränderung der Absorption verantwortliche Isomerenverteilung in der Bindungstasche kann nach der Degeneration des Proteins und der Extraktion des Chromophors, mit Hilfe der analytischen HPLC bestimmt werden.

Insbesondere bei der Belichtung von analogen und im Vergleich zum nativen System weniger stabilen Pigmenten ist der Zustand der vollständigen Lichtadaptierung teilweise schwierig zu bestimmen: Eine zu kurze Belichtungszeit führt nicht zum vollständig lichtadaptierten Zustand, eine zu lange Belichtung kann zu einer photochemischen Zerstörung der Verbindung von Chromophor und Protein führen. Die Assemblierung von Bacterioopsin mit all-*E*-Retinal führt zu einem Zustand des Chromoproteins, der mit dem des dunkeladaptierten Pigments identisch ist. Im Falle von analogen Verbindungen muß dieses in Abhängigkeit von der jeweiligen Modifikation der prosthetischen Gruppe nicht der Fall sein, so daß ein Unterschied zwischen dem vollständig inkorporierten und dem dunkeladaptierten Zustand vorliegt. In diesen Fällen wird die Isomerenverteilung des entsprechenden dunkeladaptierten Pigments erst über den Weg der Lichtadaption erhalten. Aus diesem Grund ist in den nachfolgenden Abbildungen neben den Absorptionsspektren der adaptierten Zustände auch das Spektrum des "vollständig assemblierten" Pigments dargestellt. Zusätzlich ist jeweils das Absorptionsspektrum des freien Aldehyds in alkoholischer Lösung abgebildet, wobei die Absorptionen entsprechend der Extinktionskoeffizienten normiert sind.

Natives Bacteriorhodopsin (WT)

Die Licht-/Dunkeladaption des nativen Bacteriorhodopsins ist, wie eingangs erwähnt, als Referenz zum assemblierten Protein untersucht worden. Bei diesem Pigment kann ein Spektrum des Apoproteins nur nach einer Bleichung erhalten werden, welche hier nicht vorgenommen wurde, so daß die Absorptionsspektren in Abb. 3-52 nicht streuungs-korrigiert sind.

Als Folge der Belichtung des nativen Bacteriorhodopsins kann eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 562 zu 569 nm beobachtet werden; dieses entspricht einem Anstieg des Opsin-shifts um 219 cm^{-1} von 4729 zu 4984 cm^{-1}. Gleichzeitig wächst der

Wert des Extinktionskoeffizienten von 54000[i] zu 59600 l mol^{-1} cm^{-1} und ist somit um mehr als 40 % größer als der Wert des all-*E*-Retinals in 2-Propanol.

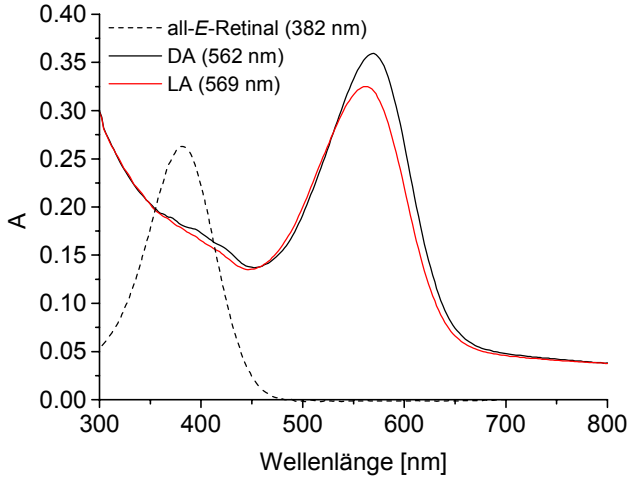


Abb. 3-52 Absorptionsspektren von licht- und dunkeladaptiertem Bacteriorhodopsin des Wildtyps (S9) sowie das bezüglich der Extinktionskoeffizienten normierte Spektrum des all-*E*-Retinals in 2-Propanol.

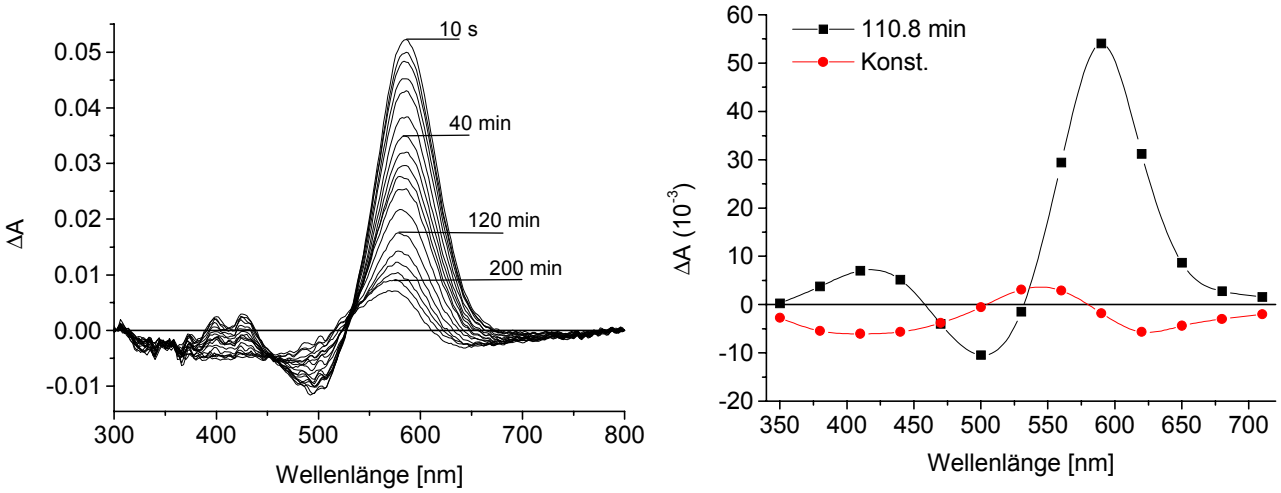


Abb. 3-53 Dunkeladaption von Bacteriorhodopsin (WT; 20 °C): Differenzspektren (Auswahl) zum dunkeladaptierten Zustand (links) und die kinetische Analyse der Absorptionswerte mittels des Globalfits.

Der Absorptionsverlauf der Dunkeladaption des nativen Bacteriorhodopsin kann mit einer Lebenszeit von 110.8 min beschrieben werden (Abb. 3-53). Die Absorptionsspektren der Reaktion und die Konstante des Globalfits zeigt, daß die Rückkehr des Systems in den Dunkelzustand innerhalb des Beobachtungszeitraums noch nicht vollständig abgeschlossen war. Dieses verursacht aber keine Beeinflussung des Ergebnisses, da die

[i] Der Extinktionskoeffizient des lichtadaptierten Zustands wurde basierend auf dem Literaturwert[187] des dunkeladaptierten Pigments berechnet

gemessenen Absorptionswerte für die kinetische Analyse ausreichen. In der Literatur wird für die Dunkeladaption bei 25 °C ebenfalls ein monoexponentieller Verlauf, allerdings mit einer Lebenszeit von ca. 33 min angegeben[32]. Dieses entspricht auch unter Berücksichtigung der höheren Temperatur einer signifikant schnelleren Reaktion.

Assembliertes Bacteriorhodopsin

Bei der Untersuchung der Lichtadaption von Ret-JW5 treten einige Unterschiede zum nativen System in Erscheinung (Abb. 3-54). Bereits beim dunkeladaptierten Protein liegt mit 559 nm eine Differenz des Absorptionsmaximums von 3 nm vor (WT λ_{max} = 562 nm), die nicht mehr durch die Meßtoleranz begründet werden kann. Dieses ist hingegen beim Wert des lichtadaptierten Zustands möglich, in dem das Ret-JW5 ein Absorptionsmaximum von 568 nm besitzt, im Vergleich zu 569 nm beim nativen System. In gleicher Weise ist ein geringer Unterschied in den Extinktionskoeffizienten des Dunkelzustands festzustellen (51800 bei Ret-JW5 gegen 54000 l mol^{-1} cm^{-1} beim Wildtyp), während die entsprechenden Werte nach der Belichtung nahezu identisch sind (59000 bzw. 59600 l mol^{-1} cm^{-1}).

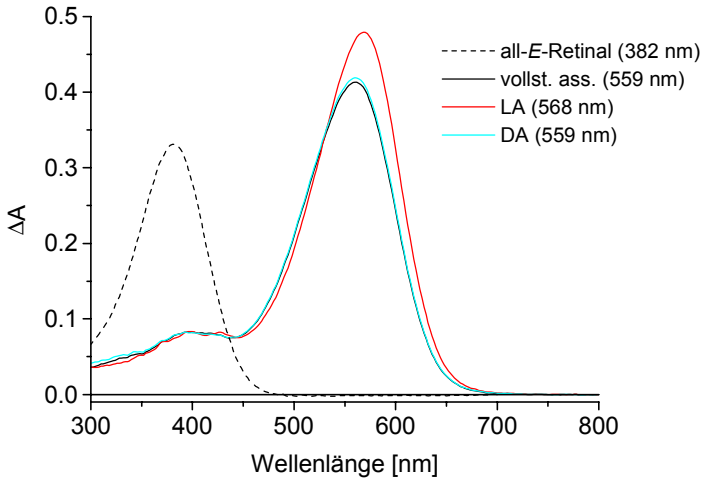


Abb. 3-54 Absorptionsspektren von vollständig assembliertem sowie licht- und dunkeladaptiertem Bacteriorhodopsin (Ret-JW5). Zusätzlich ist das bezüglich der Extinktionskoeffizienten normierte Spektrum von all-*E*-Retinal in 2-Propanol abgebildet.

Die Absorptionsspektren des vollständig assemblierten und dunkeladaptierten Proteins sind nahezu identisch. Dieses zeigt, daß der Chromophor im Verlauf der Inkorporation das Isomerenverhältnis des Dunkelzustandes erreicht. Eine Ursache für die Unterschiede zwischen dem nativen Bacteriorhodopsin und dem assemblierten der Mutante JW5 könnte eben in der Isomerenverteilung des Retinals zu suchen sein. Während mit der Extraktion des Ret-JW5 im dunkeladaptierten Zustand 41 % und im lichtadaptierten 13 % 13*Z*-Isomer

nachzuweisen ist (Abb. 3-55), werden in der Literatur für das native System 51 bis 66 % bzw. 0 bis 7 % 13*Z*-Retinal aufgeführt[28,32,34,198,199].

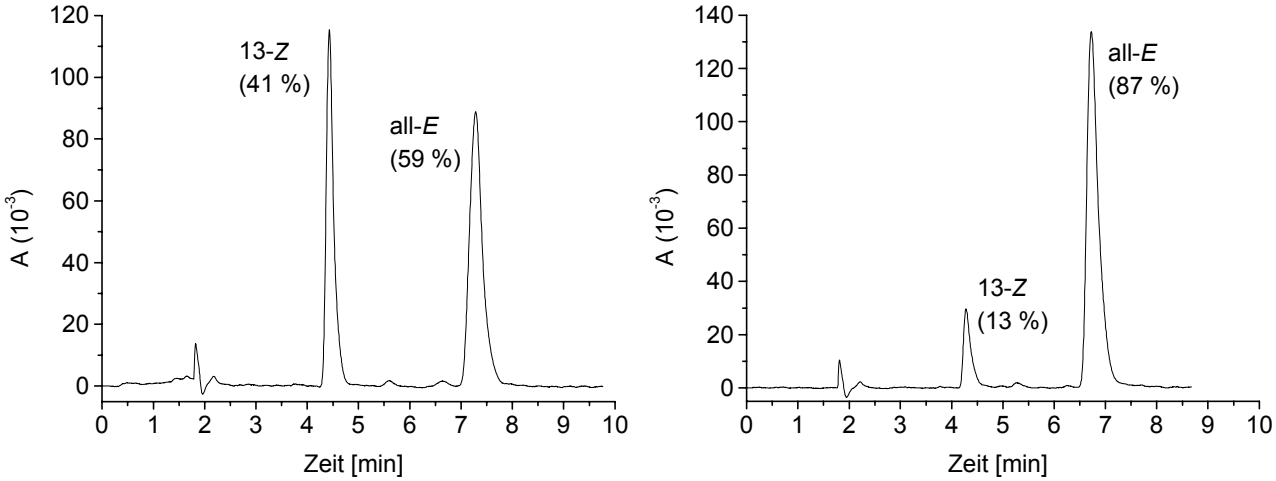


Abb. 3-55 Analytische Chromatogramme von Retinal nach der Extraktion aus dem dunkeldadaptierten (links) und dem lichtadaptierten (rechts) Ret-JW5

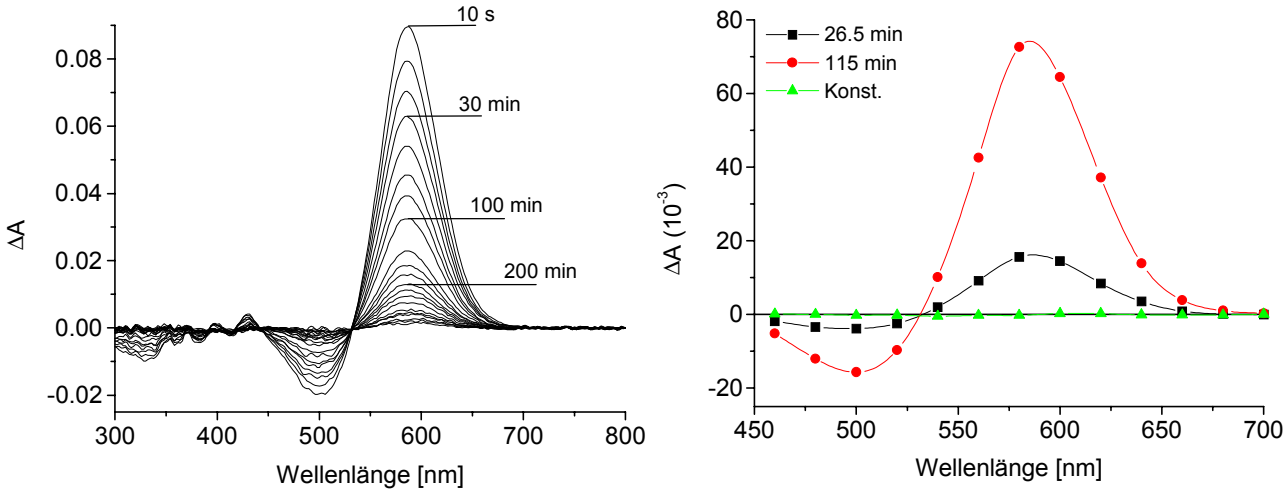


Abb. 3-56 Dunkeladaption von Ret-JW5 (20 °C): Differenzspektren (Auswahl) zum dunkeladaptierten Zustand (links) und die kinetische Analyse der Absorptionswerte mittels des Globalfits (rechts).

Darüber hinaus sind in der kinetischen Analyse der Dunkelreaktion zwei Lebenszeiten für die Beschreibung des Absorptionsverlaufs notwendig (Abb. 3-56). Neben einer Zeit von 111 min, die der beim nativen System detektierten vergleichbar ist, muß für die Anpassung noch eine kurze Lebenszeit von 27 min verwendet werden. Das Erscheinungsbild der Differenzspektren bei den beiden Systemen ist sehr vergleichbar und gibt keinen Hinweis auf einen Unterschied hinsichtlich des kinetischen Verlaufs.

9-Demethylretinal-JW5

Die Belichtung des im Dunkeln assemblierten 9-dm-JW5 führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums um 7 nm von 535 zu 542 nm (Abb. 3-57). Der Unterschied ist vergleichbar mit Ret-JW5, die Lage beider Maxima ist aber deutlich hypsochromer. Dementsprechend ist der Opsin-shift in beiden Zuständen um nahezu 400 cm^{-1} kleiner und zeigt somit eine geringere Wechselwirkung des Chromophors mit der Bindungstasche des Proteins. Das Ausmaß der Veränderung des Isomerenverhältnisses entspricht ebenfalls dem nativen System, insgesamt ist aber mit 63 % im dunkeladaptierten und 29 % im lichtadaptierten Zustand ein deutlich höherer Anteil an 13*Z*-Isomer zu detektieren (Abb. 3-58). Der Extinktionskoeffizient wird durch die Lichtadaption nicht erhöht, sondern bleibt unter Berücksichtigung einer Fehlertoleranz von ± 5 % unverändert (DA: 43850 und LA: 43570 l mol^{-1} cm^{-1}). Somit liegt er nur um ca. 10 % über dem Wert des all-*E* konfigurierten Aldehyds in alkoholischer Lösung. Nach der Rückkehr in den dunkeladaptierten Zustand ist das Absorptionsspektrum in Übereinstimmung mit dem Spektrum des vollständig assemblierten Pigments, so daß analog zum nativen System mit der Inkorporation das Isomerenverhältnis des Dunkelzustands erreicht wird.

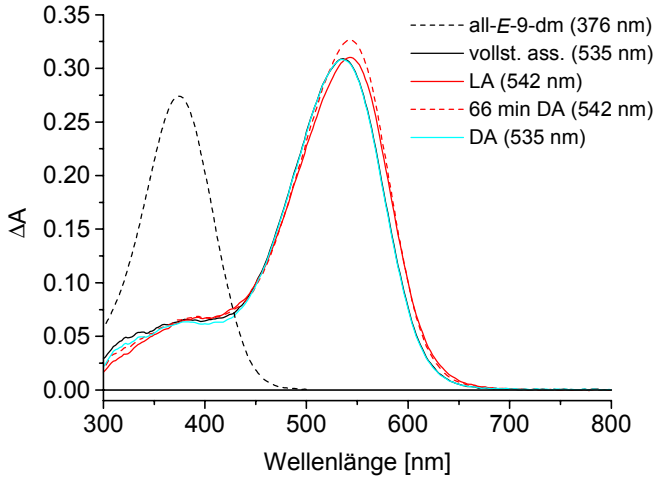


Abb. 3-57 Absorptionsspektren von vollständig assembliertem, licht- und dunkeladaptiertem 9-dm-JW5 und eines Spektrums während der Dunkeladaption. Zusätzlich ist das bezüglich der Extinktionskoeffizienten normierte Spektrum von all-*E*-9-dm (2-Propanol) abgebildet.

Für die Beschreibung des Absorptionsverlaufs der Dunkeladaption sind drei Lebenszeiten notwendig (Abb. 3-59). Interessanterweise ist nach dem Ende der Belichtung zuerst ein Anstieg der Extinktion mit einer Entstehungszeit von 12 min zu verzeichnen. Wie anhand des Spektrums in Abb. 3-57 (Spektrum: 66 min DA) zu ersehen, befindet sich das Absorptionsmaximum dieser Zwischenstufe an der gleichen Stelle wie

das des lichtadaptierten Zustands. Im weiteren Verlauf der Reaktion nimmt die Extinktion mit zwei unterschiedlichen Zerfallszeiten von 169 und 1054 min ab. Insgesamt benötigt die Rückkehr in den dunkeladaptierten Zustand im Vergleich zu Ret-JW5 ein vielfaches der Zeit und zeigt somit die Bedeutung der Methylgruppe an Position 9 der Polyenkette für die Geometrieänderung des Chromophors.

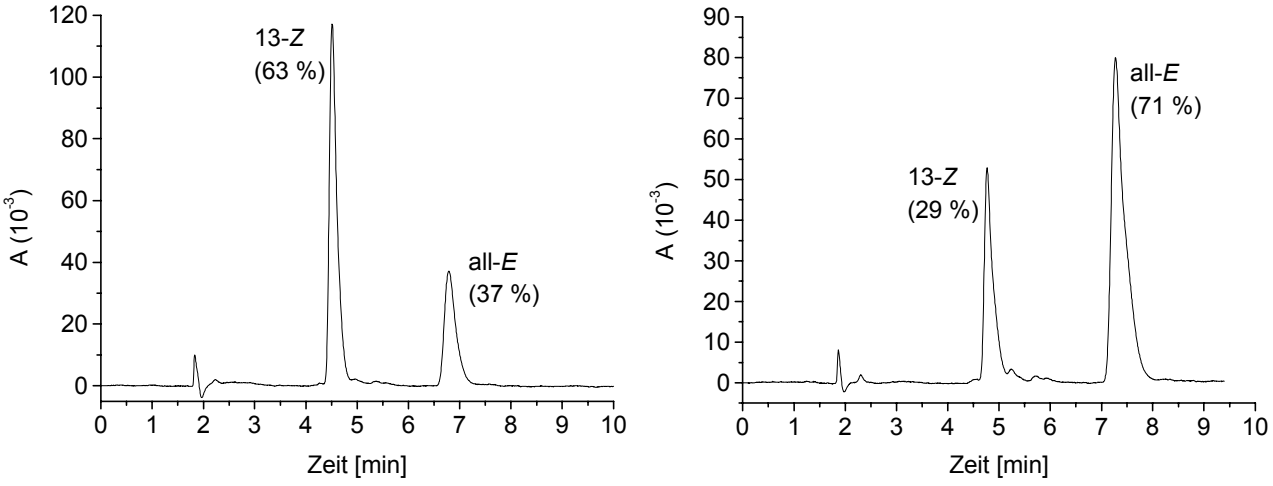


Abb. 3-58 Analytische Chromatogramme von 9-Demethylretinal nach der Extraktion aus dem dunkeladaptierten (links) und dem lichtadaptierten (rechts) Pigment.

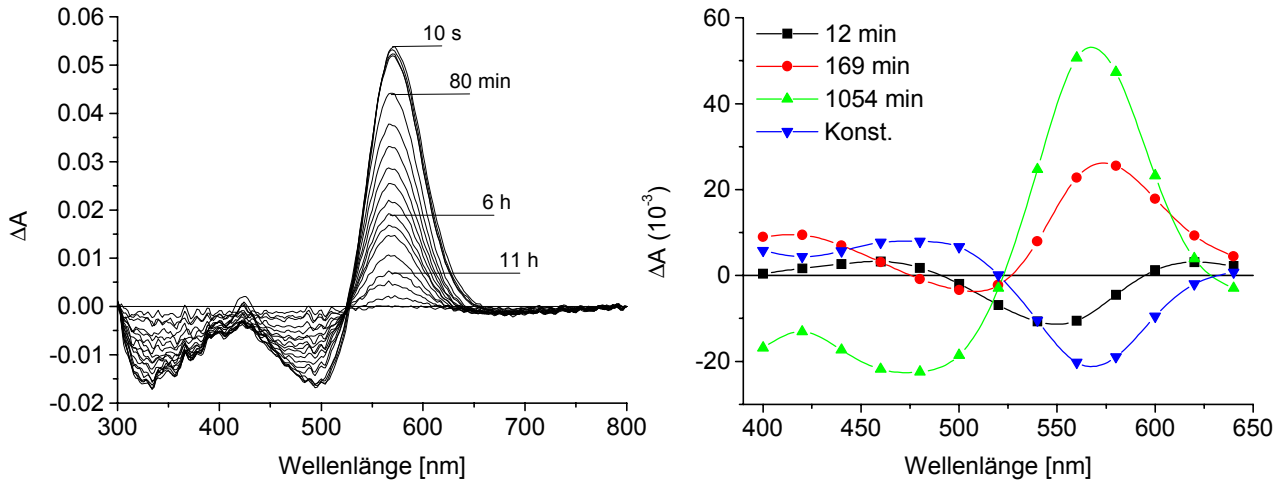


Abb. 3-59 Dunkeladaption von 9-dm-JW5 (20 °C): Differenzspektren (Auswahl) zum dunkeladaptierten Zustand (links) und die kinetische Analyse der Absorptionswerte mittels des Globalfits (rechts).

Zu beachten ist, daß die Konstante des Globalfits eine teilweise Degeneration des Proteins im Verlauf der Dunkelreaktion anzeigt, die aus den abgebildeten Differenzspektren nicht hervorgeht (s. Abb. 3-59). Wie eingangs erwähnt, wurden die Spektren zur Kompensation von Degeneration und Aggregation des Proteins und der damit

verbundenen Veränderung der Untergrundstreuung korrigiert (hier bei 300 und 800 nm). In diesem Fall gelingt damit nur eine teilweise Korrektur der auftretenden Störungen. Die Amplituden des Globalfits werden durch die Störung beeinflußt, die Lebenszeiten hingegen nicht.

Insgesamt liegen die hier ermittelten Absorptionsmaxima der verschiedenen adaptierten Zustände des 9-dm-JW5 innerhalb der Literaturwerte: Für den dunkeladaptierten Zustand des Pigments wird ein Absorptionsmaximum von 530[85,86] bzw. 540 nm[31] und für das lichtadaptierte von 540[86] bzw. 548 nm[31] angegeben. Die Unterschiede sind auf die Verwendung von Bacteriorhodopsin verschiedener Mutanten des *Halobacterium salinarum*, einer veränderten Vorbehandlung des Proteins (z. B. einer Bleichung) oder der Verwendung unterschiedlicher Medien zuzuschreiben. Eine gute Übereinstimmung besteht zur publizierten Isomerenverteilung: Verhältnis 13*Z*- zu all-*E*-Isomer 56 zu 44 für das dunkeladaptierte und 30/70 für das lichtadaptierte Pigment[31].

9-Ethylretinal-JW5

Die Lichtadaptierung von 9-Et-JW5 verschiebt das Absorptionsmaximums von 545 nach 559 nm (Abb. 3-60). Die Differenz von 14 nm entspricht einer Erhöhung des Opsin-shifts um 459 cm^{-1} und zeigt, daß die Belichtung eine größere Veränderung der spektralen Eigenschaften verursacht als dieses bei Ret-JW5 zu beobachten ist (Differenz dort 9 nm bzw. 284 cm^{-1}). Dieser Unterschied wird nicht durch eine größere Verschiebung der Isomerenverhältnisse in der Bindungstasche von 9-Et-JW5 verursacht (Abb. 3-61): Mit der Extraktion sind wie bei Ret-JW5 nur das 13*Z*- und das all-*E*-Isomer nachzuweisen und die Lichtadaption führt in einem vergleichbaren Ausmaß zu einer Verschiebung des Isomerenverhältnisses zugunsten des *trans* konfigurierten Chromophors (9-Et-JW5 +33 %, Ret-JW5 +28 %). Die größere Differenz in den spektralen Eigenschaften ist somit darauf zurückzuführen, daß sich bei 9-Ethylretinal die Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der Bindungstasche bei den verschiedenen Geometrien des Chromophors stärker unterscheiden. Die Isomerisierung von 9-Ethylretinal von der 13*Z*- in die all-*E*-Konfiguration verursacht demnach durch die zusätzliche Methylgruppe eine größere bathochrome Verschiebung der Absorption, als dieses bei Retinal der Fall ist. Dementsprechend ist der Opsin-shift des dunkeladaptierten analogen Pigments im Vergleich zu Ret-JW5 um 254 cm^{-1} und der des lichtadaptierten Zustands nur um 79 cm^{-1} kleiner. Eine Ursache für die insgesamt kurzwelligeren Absorption des analogen Pigments

ist die gegenüber Ret-JW5 sowohl im dunkeladaptierten (58 %) als auch lichtadaptierten Zustand (25 %) größere Konzentration des 13*Z*-Isomers.

Angesichts dieser Isomerenkonzentrationen bei 9-Et-JW5 ist im Vergleich zu 9-dm-JW5 kein Zusammenhang zwischen dem sterischen Anspruch an der Position 9 des Chromophors und der Isomerenverteilung in der Bindungstasche zu finden. Auch das Ausmaß der Verschiebung der Isomerenverhältnisse infolge der Belichtung ist bei beiden analogen Pigmenten nahezu identisch. Eine weitere Übereinstimmung besteht in der geringen Änderung des Extinktionskoeffizienten durch die Lichtadaption. Bei 9-Et-JW5 beträgt der Wert des dunkeladaptierten Zustands 32900 und der des lichtadaptierten 31400 l mol^{-1} cm^{-1}. Damit liegt desweiteren nur ein geringer Unterschied zum Extinktionskoeffizienten des 9-Ethylretinals in alkoholischer Lösung (31500 l mol^{-1} cm^{-1}), aber eine deutliche Differenz zu den entsprechenden Koeffizienten bei Ret-JW5 vor (s. Tab. 3-17).

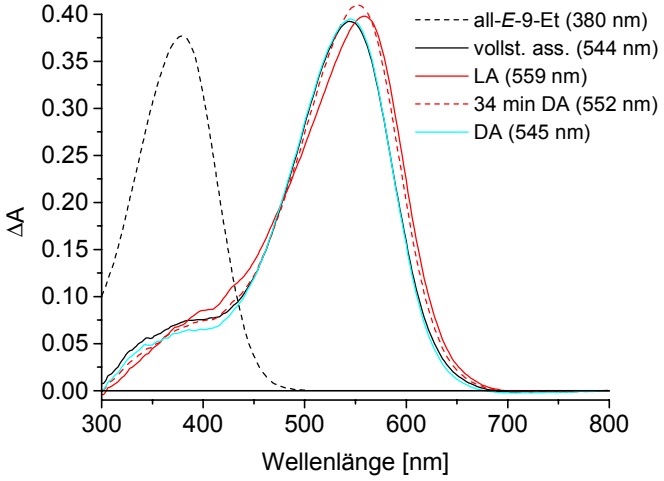


Abb. 3-60 Absorptionsspektren von vollständig assembliertem, licht- und dunkeladaptiertem 9-Et-JW5 sowie ein Spektrum des Pigments während der Dunkeladaption. Zusätzlich ist das bezüglich der Extinktionskoeffizienten normierte Spektrum des all-*E*-9-Et (2-Propanol) abgebildet.

Die Dunkelreaktion von 9-Et-JW5 verläuft über zwei Zwischenstufen (Abb. 3-62). Das Absorptionsspektrum des dunkeladaptierten Zustands zeigt nur einen geringen Unterschied zum Spektrum des vollständig assemblierten Pigments (Abb. 3-60), so daß auch bei dieser Verbindung im Verlauf der Inkorporation die Isomerenverteilung des Dunkelzustands erreicht wird. Bei 9-Et-JW5 ist in gleicher Weise wie bei 9-dm-JW5 im Verlauf der Dunkelreaktion zuerst ein Anstieg der Absorption zu beobachten. Die Lebenszeit von 9.1 min ist ebenfalls vergleichbar zur entsprechenden Reaktion bei 9-dm-JW5 (11 min). Das Absorptionsmaximum dieser Zwischenstufe ist aber im Gegensatz zur

demethylierten Verbindung vom Maximum des lichtadaptierten Zustands verschieden und liegt zwischen den Werten des licht- und dunkeladaptierten Pigments (s. Spektrum "34 min DA" in Abb. 3-60). Das zweite Intermediat zerfällt mit einer Zeit von 70 min und beinhaltet die Abnahme der Absorption zum Dunkelzustand. Die Konstante des Globalfits zeigt auch hier eine geringe Degeneration des Proteins im Verlauf der Reaktion.

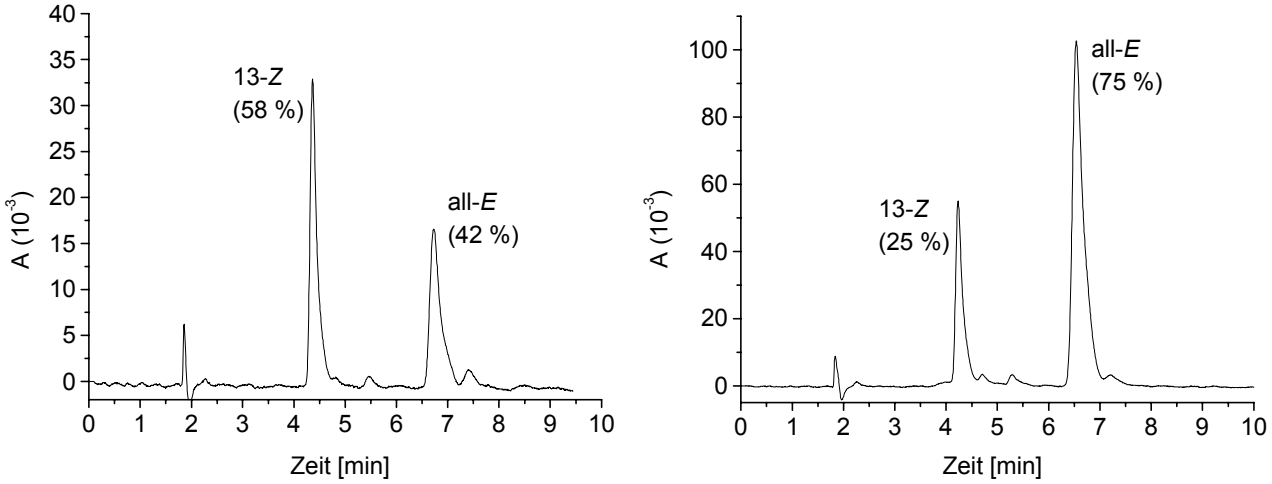


Abb. 3-61 Analytische Chromatogramme von 9-Ethylretinal nach der Extraktion aus dem dunkeladaptierten (links) und dem lichtadaptierten Pigment (rechts).

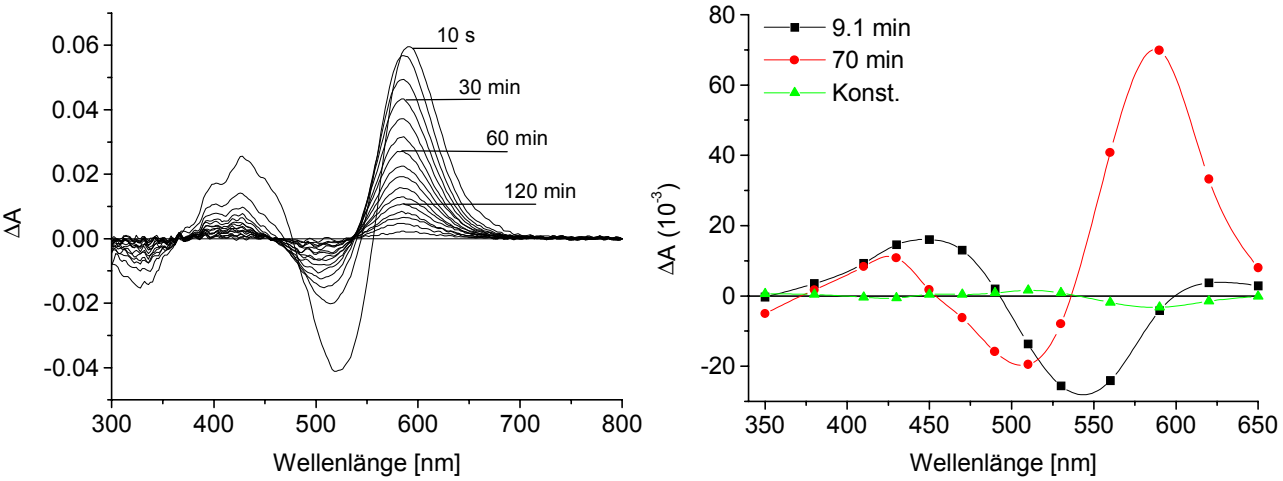


Abb. 3-62 Dunkeladaption von 9-Et-JW5 (20 °C): Differenzspektren (Auswahl) zum dunkeladaptierten Zustand (links) und die kinetische Analyse der Absorptionswerte mittels des Globalfits (rechts).

Insgesamt verläuft die Kinetik der Dunkelreaktion bei 9-Et-JW5 (im Gegensatz zur Assemblierung) nahezu um den Faktor zwei schneller als bei Ret-JW5 und um ein vielfaches schneller als bei 9-dm-JW5. Somit wird die Reisomerisierung des Chromophors von der all-*E*- in die 13*Z*-Konfiguration durch den an Position 9 des Chromophors erhöhten sterischen Anspruch beschleunigt.

9-Isopropylretinal-JW5

Die Belichtung von 9-Is-JW5 führt nicht zu einer bathochromen, sondern im Gegenteil zu einer geringfügig hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums um 2 nm von 481 zu 479 nm (Abb. 3-63). Die Einbindung des Chromophors in die Bindungstasche des Proteins bewirkt somit in beiden Zuständen nur einen Opsin-shift von ca. 2000 cm^{-1}. Dieser Wert ist im Vergleich zum dunkel- und zum lichtadaptierten Zustand von Ret-JW5 um 2688 cm^{-1}, bzw. um 2963 cm^{-1} kleiner. Der Extinktionskoeffizient des lichtadaptierten 9-Is-JW5 ist unter Berücksichtigung der Meßtoleranz (± 5 %) mit 16800 l mol^{-1} cm^{-1} identisch mit dem Wert des dunkeladaptierten Pigments und beträgt somit weniger als ein Drittel des entsprechenden Werts bei Retinal. Beim Vergleich des freien Aldehyds in Lösung und dem entsprechenden Pigment zeigt sich, daß der Extinktionskoeffizient durch die Einbindung in das Protein auf die Hälfte reduziert wird (s. Einschub in Abb. 3-63).

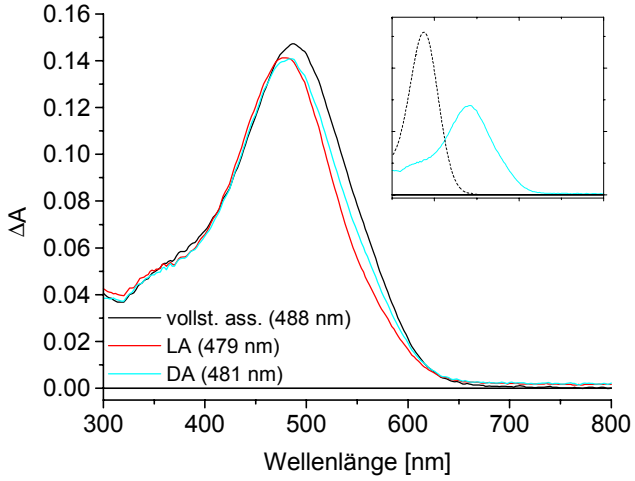


Abb. 3-63 Absorptionsspektren von licht- und dunkeladaptiertem 9-Is-JW5 und das Spektrum des vollständig assemblierten Pigments. Die kleine Abbildung zeigt das bezüglich der Extinktionskoeffizienten normierte Spektrum von all-*E*-9-Is (2-Propanol) und das Spektrum des dunkeladaptierten 9-Is-JW5.

Das Absorptionsspektrum des vollständig assemblierten Chromoproteins ist deutlich vom Spektrum des dunkeladaptierten Pigments verschieden. Somit liegt hier bei 9-Is-JW5 der Fall vor, daß die sterische Wechselwirkung mit der Bindungstasche eine Isomerisierung des Chromophors behindert und die Isomerenverteilung des dunkeladaptierten Zustands erst über den Weg des lichtadaptierten eingestellt werden kann.

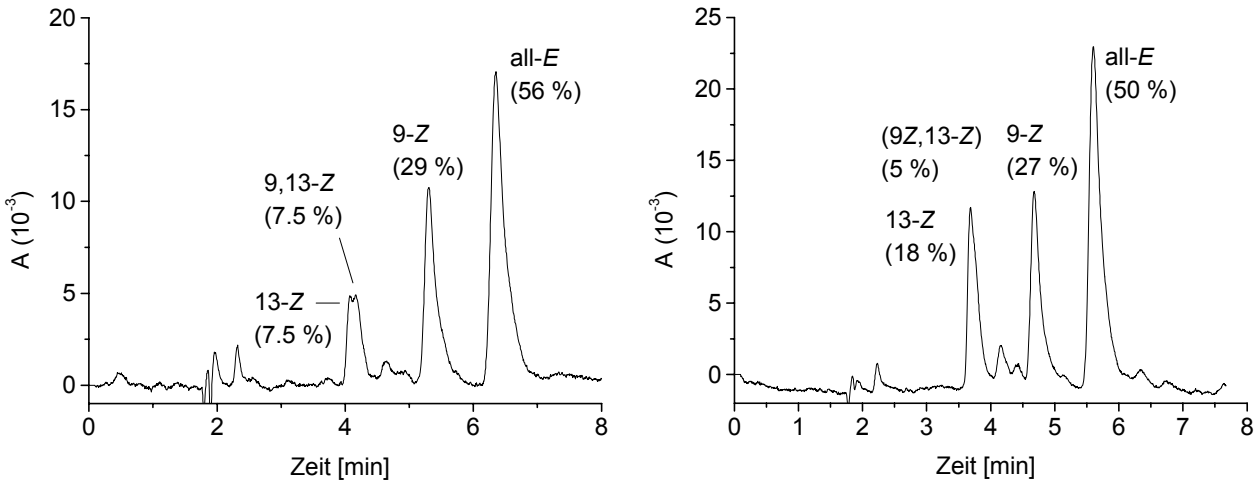


Abb. 3-64 Analytische Chromatogramme von 9-Isopropylretinal nach der Extraktion aus dem dunkeladaptierten (links) und dem lichtadaptierten Pigment (rechts).

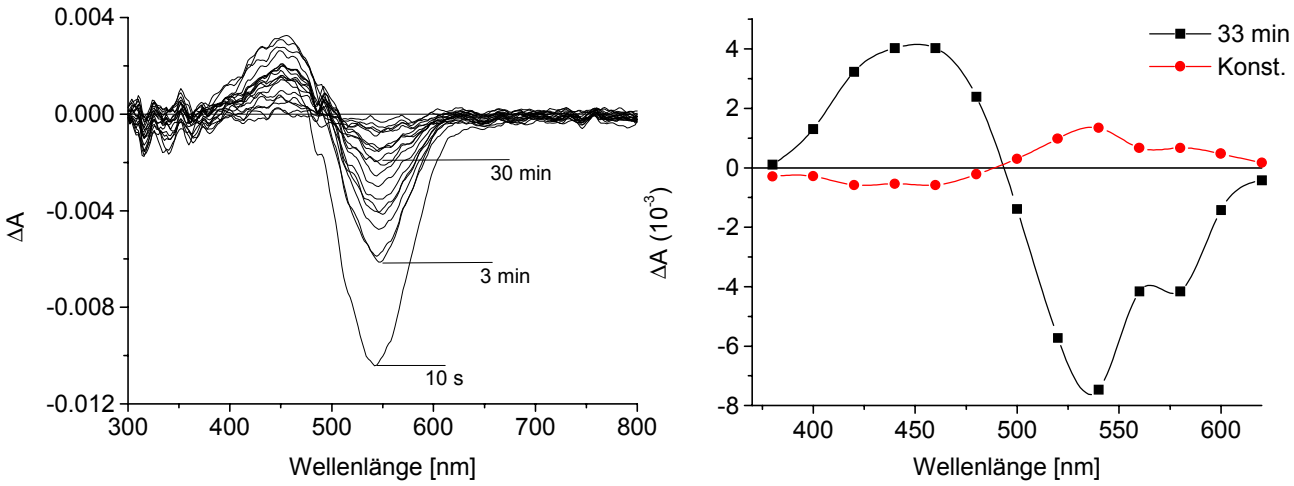


Abb. 3-65 Dunkeladaption von 9-Is-JW5 (20 °C): Differenzspektren (Auswahl) zum dunkeladaptierten Zustand (links) und die kinetische Analyse der Absorptionswerte mittels des Globalfits (rechts). Die Amplitude bei 580 nm in den LAD-Spektren ist verfälscht und nicht signifikant.

Der große sterische Anspruch des Chromophors innerhalb der Bindungstasche ist auch anhand der vorliegenden Isomere und deren Verteilung zu erkennen. Mit der Extraktion sind neben dem 13*Z*- und all-*E*-Isomer auch die 9*Z*,13*Z* sowie 9*Z* konfigurierte Verbindung zu detektieren (Abb. 3-64). Die Belichtung des Chromoproteins führt vor allem zu einer Abnahme des Anteils von all-*E*- und 9*Z*,13*Z*-Isomer zugunsten der 13*Z*-Konfiguration; die Konzentration des 9*Z*-Isomers bleibt nahezu konstant. Diese geringe Veränderung in der Isomerenverteilung hat nur einen kleinen Einfluß auf die spektralen Eigenschaften des Chromoproteins und führt somit zum geringen Unterschied zwischen den Absorptionsspektren des licht- und dunkeladaptierten Zustands. Der kinetische Verlauf der Dunkelreaktion ist dabei mit einer Lebenszeit von 33 min befriedigend zu beschreiben

(Abb. 3-65). Diese Reaktion ist somit zwar deutlich schneller als bei Ret-JW5, da aber in der Isomerisierung andere Konfigurationen des Chromophors involviert sind, ist ein Vergleich der Reaktionszeiten nur sehr bedingt möglich. Die Konstante des Globalfits zeigt auch bei diesem Pigment eine geringe durch die Belichtung verursachte Degeneration des Proteins.

10-Methyl-13-demethylretinal-Bacteriorhodopsin

Das analoge Chromoprotein MD-JW5 zeigt keine klassische Licht-/Dunkeladaption. Die Belichtung des vollständig assemblierten Pigments verursacht eine drastische hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um 109 nm von 576 zu 467 nm (Abb. 3-66). Beim Absorptionsspektrum dieses Zustands liegt neben der Hauptbande eine weitere kleine Absorptionsbande bei ca. 580 nm vor. Verbleibt das Protein unter Lichtausschluß, so tritt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums auf und die Absorption verringert sich zugunsten der langwelligen Bande. Die thermodynamisch kontrollierte Rückkehr des Systems zu einem Zustand, mit einem dem assemblierten Protein vergleichbaren Absorptionsverhalten findet nur teilweise statt (Abb. 3-69). Dieses kann aber photochemisch erzwungen werden, wenn der lichtadaptierte Zustand des Proteins dem Licht eines 473 nm-Interferenzfilters ausgesetzt wird (Abb. 3-67). Das Absorptionsspektrum des rückbelichteten Zustands ist dabei mit dem Spektrum des vollständig assemblierten Chromoproteins identisch. Interessanterweise ist der Prozeß der "Lichtadaption" und Rückbelichtung reversibel und kann mehrfach durchgeführt werden. Die während der verschiedenen Belichtungen registrierten Absorptionsspektren durchlaufen dabei einen isosbestischen Punkt bei 507 nm.

Insgesamt sind die Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Zustände des Chromoproteins in Relation zu Ret-JW5 und auch zum freien Chromophor sehr klein. Der Wert des vollständig assemblierten Proteins ist mit 21480 l mol^{-1} cm^{-1} bereits um nahezu 50 % kleiner als der Extinktionskoeffizient einer Lösung des all-*E* konfigurierten Aldehyds in 2-Propanol. Im lichtadaptierten Zustand beträgt der entsprechende Wert nur 17920 und im dunkeladaptierten 10500 l mol^{-1} cm^{-1}. Der Opsin-shift im vollständig assemblierten Protein ist um 427 cm^{-1} größer als beim dunkeladaptierten Ret-JW5, aber wesentlich kleiner im licht- und dunkeladaptierten Zustand (1008 bzw. 1803 cm^{-1}).

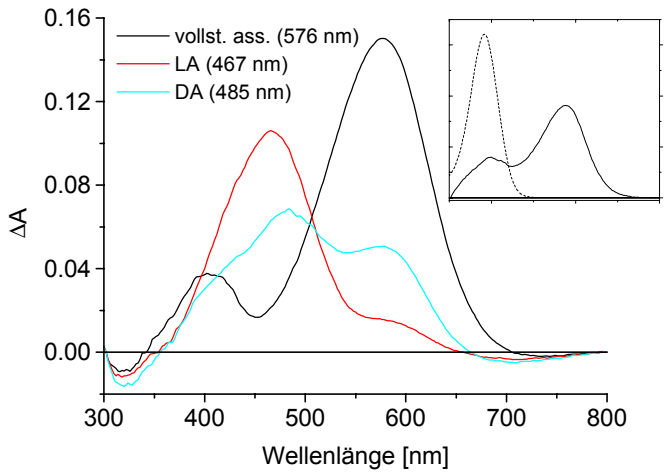


Abb. 3-66 Absorptionsspektren von licht- und dunkeladaptiertem MD-JW5 und das Spektrum des vollständig assemblierten Pigments. Die kleine Abbildung zeigt das bezüglich der Extinktionskoeffizienten normierte Spektrum des all-*E*-MD in 2-Propanol im Vergleich zum Spektrum des vollständig assemblierten Chromoproteins.

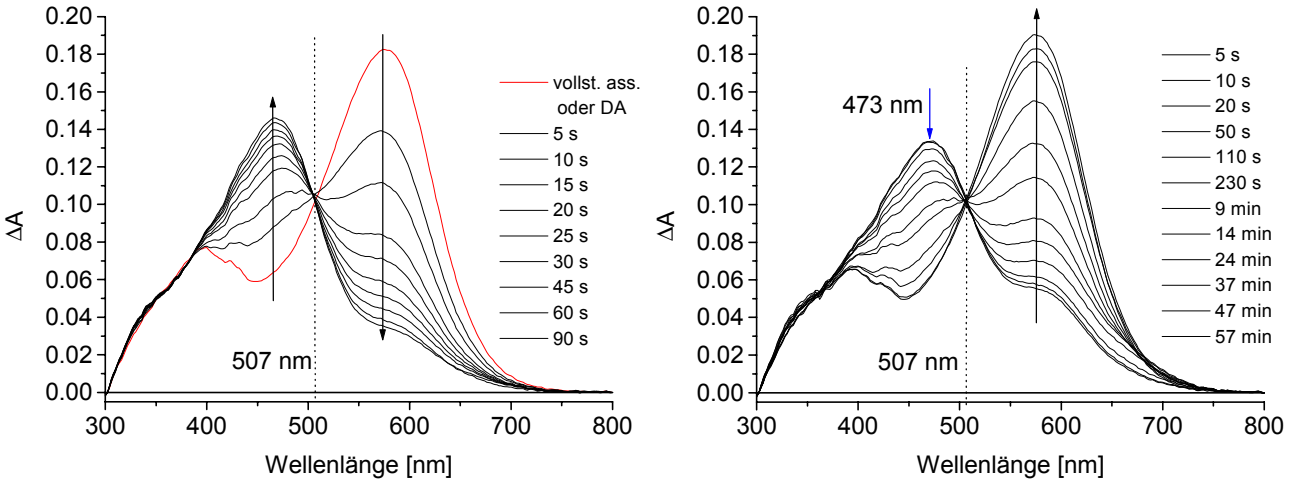


Abb. 3-67 Absorptionsspektren der Lichtadaption von MD-JW5 (links) und die "Rückbelichtung" dieses Zustands mit einem 473 nm Interferenzfilter (rechts).

Erstaunlich ist, daß diesen verschiedenen Zuständen des analogen Pigments nur eine relativ geringfügige Verschiebung der Isomerenverteilung in der Bindungstasche zugrunde liegt (Abb. 3-68). Mit der Extraktion des Chromophors konnte neben dem 13*Z*- und all-*E*-Isomer desweiteren das 11*Z*- und 9Z-Isomer des 10-Methyl-13-demethylretinals nachgewiesen werden (Abb. 3-68). Zwischen dem lichtadaptierten und dem vollständig assemblierten Pigment ist vor allem eine Veränderung der Konzentration zwischen dem 13*Z*- und dem 9*Z*-Isomer festzustellen, wobei die Lichtadaption den Anteil des 9*Z*-Isomers erhöht. Eine Extraktion des dunkeladaptierten Pigments wurde ebenfalls durchgeführt

(Chromatogramme nicht dargestellt), es konnte aber kein signifikanter Unterschied zur Isomerenverteilung des lichtadaptierten Zustands gefunden werden.

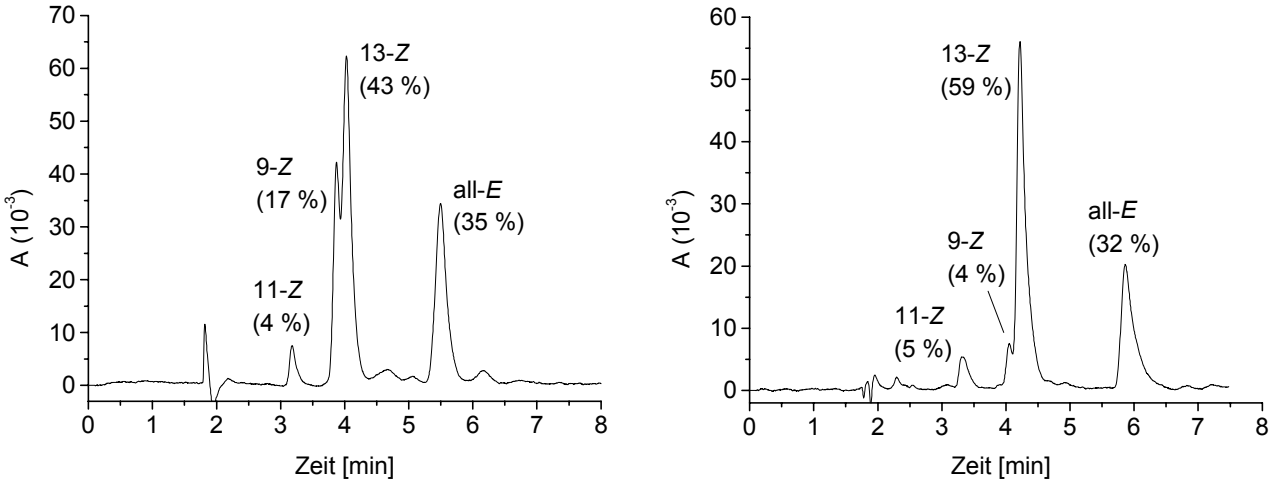


Abb. 3-68 Analytische Chromatogramme von 10-Methyl-13-demethylretinal nach der Extraktion aus dem vollständig assemblierten (links) und dem lichtadaptierten Pigment (rechts).

Für die detaillierte Untersuchung der Dunkelreaktion war ein sehr langer Beobachtungszeitraum notwendig. Mit Fortschreiten der Messung trat aber eine deutliche Degeneration des Proteins und dementsprechend eine Zunahme der Streuung in den Absorptionsspektren auf, was sich erschwerend auf die kinetische Analyse der Reaktion mittels des Globalfits auswirkte. Wie in Abb. 3-69 dargestellt, wurden drei Lebenszeiten an die Daten angepaßt, wobei die dritte Zeit 150 Tage (!) beträgt. Diese unrealistische Zeit ist für die Berücksichtigung der großen Absorptionsänderungen infolge der Degeneration notwendig. Wird diese Zeit nicht verwendet, so führt dieses zu einer Beeinflussung der anderen Kinetiken, da das Programm versucht, die Streuungsänderung zusammen mit den anderen Lebenszeiten in Übereinstimmung zu bringen.

Die Amplituden der LAD-Spektren mit den Lebenszeiten von 68 und 2950 min (49.2 h) sind relativ klein. Angesichts der geringen Differenz in der Isomerenverteilung des assemblierten und lichtadaptierten Pigments, die zu einer großen Änderung der spektralen Eigenschaften führt, könnte geschlossen werden, das der Dunkelreaktion ebenfalls nur eine geringe Verschiebung des Isomerenverhältnisses zugrunde liegt. Damit wäre auch das Ergebnis der Extraktion zu erklären: Der geringe Unterschied in der Isomerenkonzentration beim licht- und dunkeladaptierten Chromoprotein liegt innerhalb der Meßtoleranz der Extraktion bzw. HPLC und führt somit nicht zu einem signifikanten Ergebnis. Möglicherweise sind an der Dunkelreaktion nicht das 9*Z*- bzw. 13*Z*-Isomer

beteiligt, deren Konzentrationen sich durch die Belichtung verändern, sondern das 11*Z*- bzw. aufgrund des höheren Anteils wahrscheinlicher das all-*E*-Isomer. Denkbar wäre auch eine anderen Konformation des Chromophors, die durch die Extraktion nicht fixiert werden kann. Insgesamt entspricht dieses keiner eigentlichen Dunkeladaption.

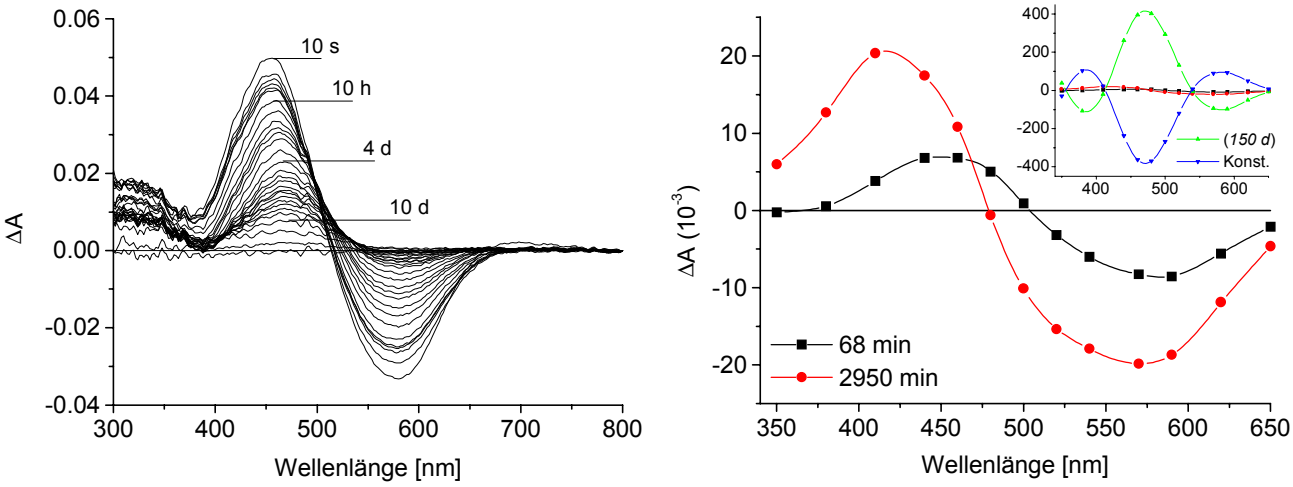


Abb. 3-69 Dunkeladaption von MD-JW5 (20 °C): Differenzspektren (Auswahl) zum dunkeladaptierten Zustand (links) und die ersten beiden LAD-Spektren der kinetischen Analyse der Absorptionswerte mittels des Globalfits. Die kleine Abbildung zeigt alle erhaltenen LAD-Spektren (rechts).

10-Methylretinal-Bacteriorhodopsin

Bei der Lichtadaption von 10-Me-JW5 ist im Gegensatz zu MD-JW5 eine Licht-/Dunkeladaption zu beobachten, wobei die Rückkehr in den Dunkelzustand nur wenige Minuten benötigt (Abb. 3-70). Mit der Belichtung erfolgt eine geringe Verschiebung des Absorptionsmaximums um 2 nm von 569 zu 571 nm. Der Opsin-shift des dunkeladaptierten Systems ist mit einem Wert von 4808 cm^{-1} wenig größer als der entsprechende Wert von Ret-JW5 (4633 cm^{-1}). Das gleiche gilt für den lichtadaptierten Zustand des analogen Pigments, beim dem der Opsin-shift um 212 cm^{-1} größer ist als im Dunkelzustand und somit um 103 cm^{-1} im Vergleich zu Retinal (4917 cm^{-1}). Die Lichtadaption führt nur zu einer geringen Veränderung des Extinktionskoeffizienten von 10-Me-JW5 (DA: 28000 und LA: 27100 l mol^{-1} cm^{-1}). Damit besitzt der Chromophor in der Bindungstasche einen um ca. 40 % kleineren Wert das all-*E*-Isomer in 2-Propanol.

Angesichts des deutlichen Unterschieds zwischen dem Spektrum des vollständig assemblierten Pigments und des dunkeladaptierten Zustands zeigt sich auch in diesem Fall, daß die "Einstellung" des Isomerenverhältnisses erst durch die Belichtung des Chromoproteins möglich wird.

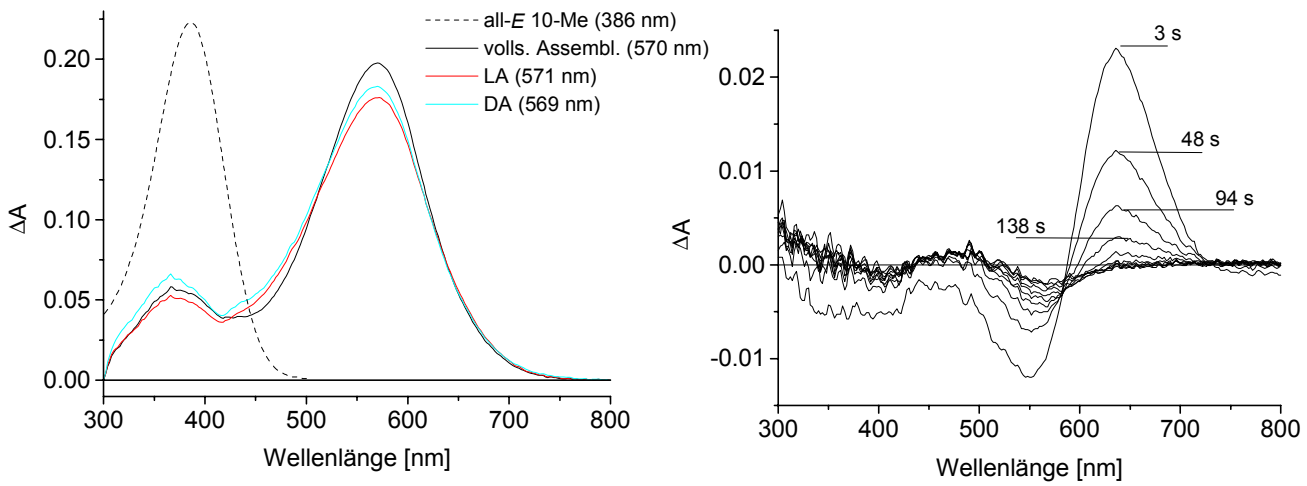


Abb. 3-70 Absorptionsspektren von licht- und dunkeladaptiertem 10-Me-JW5, das Spektrum des vollständig assemblierten Pigments und das bezüglich der Extinktionskoeffizienten normierte Spektrum von all-*E*-10-Me in 2-Propanol (links). Differenzspektren der Reaktion zum dunkeladaptierten Zustand (rechts).

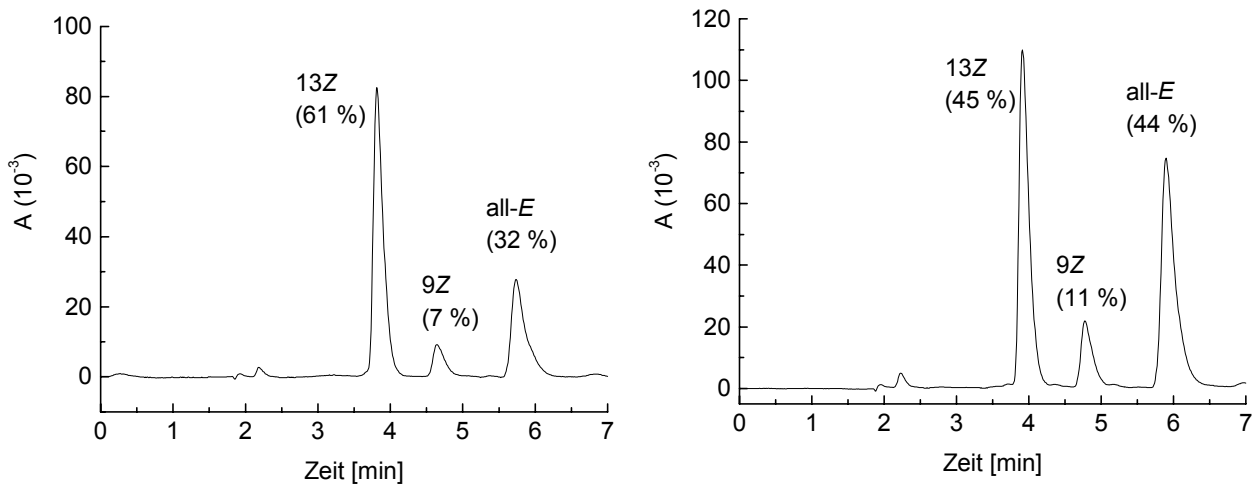


Abb. 3-71 Analytische Chromatogramme von 10-Methylretinal nach der Extraktion aus dem dunkeladaptierten (links) und dem lichtadaptierten (rechts) Pigment

Der Adaptionsprozeß des 10-Me-JW5 beruht analog zu Ret-JW5 hauptsächlich in der Verschiebung des Verhältnisses zwischen dem 13*Z*- und dem all-*E*-Isomer (Abb. 3-71). Im lichtadaptierten Pigment ist der Anteil der all-*E*-Konfiguration aber mit 44 % nur um 12 % größer als beim dunkeladaptierten, während die Konzentration des 13*Z*-Isomers um 16 % von 61 auf 45 % absinkt. Dieses Mißverhältnis wird durch den zusätzlich vorhandenen kleinen Anteil des 10-Methylretinals in der 9*Z*-Konfiguration verursacht, dessen Konzentration sich im Verlauf der Belichtung von 7 zu 11 % auf Kosten der all-*E*-Form erhöht. Bei den ermittelten Isomerenverhältnissen ist allerdings zu beachten, daß die Extraktion des Chromophors aus der Bindungstasche einen Zeitraum benötigt innerhalb

dessen die auch die Dunkelreaktion von 10-Me-JW5 verläuft. Damit geben die erhaltenen Werte der relativen Isomerenkonzentrationen nur einen Trend der ablaufenden Isomerisierungen wider.

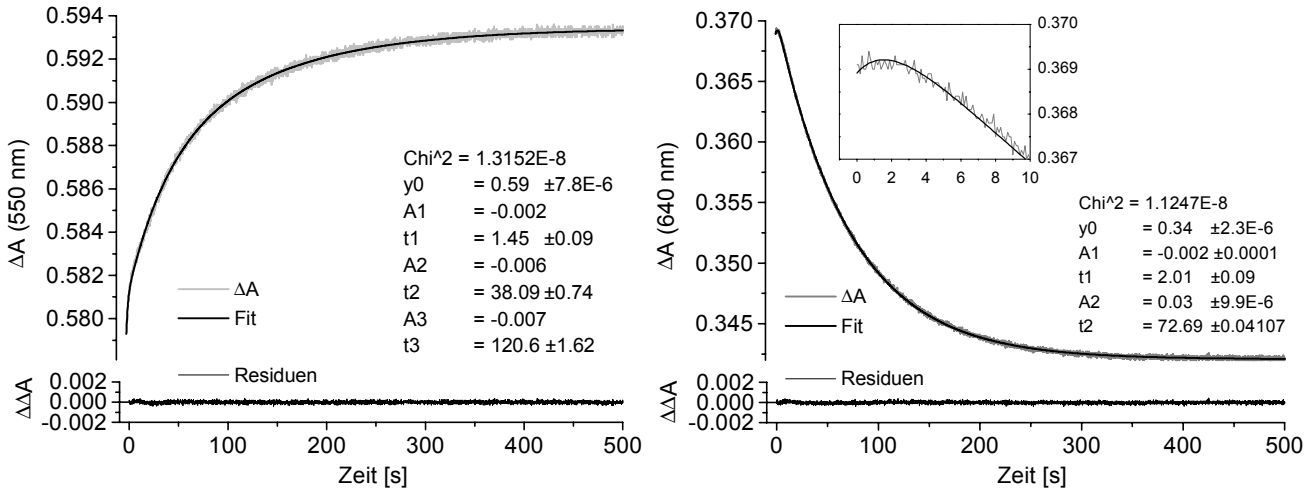


Abb. 3-72 Absorptionsverlauf der Dunkeladaption (20 °C) von 10-Me-JW5 bei 550 nm (links) und 640 nm (rechts) sowie die Anpassung von einer Summe von drei bzw. zwei Exponentialfunktionen und die Differenzen zu den angepassten Funktionen (Residuen, ΔΔA).

Aufgrund der Geschwindigkeit der Dunkelreaktion konnte diese nicht mit Absorptionsspektren verfolgt werden, so daß die kinetische Analyse anhand des Absorptionsverlaufs bei zwei Wellenlängen vorgenommen werden mußte (Abb. 3-72). Für die Beschreibung des Verlaufs bei 550 nm sind drei Lebenszeiten von 1.5, 38.1 und 121 s notwendig, während für die Werte bei 640 nm nur zwei Lebenszeiten von 2 und 72.7 s anzupassen sind. Die unterschiedliche Anzahl der Zeiten beruht vermutlich darin, daß ein Prozeß vorliegt, der bei 550 nm zu einer für den Fit relevanten und bei 640 nm nur zu einer geringfügigen Absorptionsänderung führt. Infolgedessen findet bei der Anpassung der Funktionen an den Verlauf bei 640 nm eine Mittelung der zwei längeren Zeiten statt, während sie anhand der Werte bei 550 nm differenziert werden können. Die Extraktion des Chromophors aus dem Protein zeigt, daß dieser sowohl im licht- als auch dunkeladaptierten Zustand nicht wie bei Ret-JW5 in zwei, sondern drei verschiedenen Geometrien vorliegt. Wie bereits angesprochen, ist somit ein Übergang zwischen diesen drei isomeren Formen anzunehmen. Dementsprechend könnten bei den zwei Wellenlängen zwei unabhängige Reaktionen in unterschiedlichem Maße zu beobachten sein.

Insgesamt verläuft die Dunkelreaktion mit einer Geschwindigkeit, daß sie möglicherweise das Ende eines verzögerten Photocyclus darstellt und nicht auf einer klassischen Licht-/Dunkeladaption beruht.

Zusammenfassung Licht-/Dunkeladaption

Das assemblierte Bacteriorhodopsin der Mutante JW5 weist geringe Unterschiede zum nativen System auf: So befindet sich das Absorptionsmaximum des dunkeladaptierten Ret-JW5 bei kürzeren Wellenlängen und der Extinktionskoeffizient ist etwas geringer, während die lichtadaptierten Zustände der beiden Pigmente vergleichbar sind (Tab. 3-17). Zur Beschreibung der Dunkelreaktion sind beim BR des Wildtyps eine Lebenszeit und beim assemblierten Protein zwei Zeiten notwendig (Tab. 3-19). Darüber hinaus ist ein Unterschied in der Isomerenverteilung des Chromophors in der Bindungstasche vorhanden (Tab. 3-18).

Tab. 3-17 Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten von Retinal und den Retinalderivaten in alkoholischer Lösung (2-Propanol) sowie die entsprechenden Werte der Pigmente im licht- und dunkeladaptierten Zustand und der Opsin-shift in den jeweiligen Zuständen (# Literaturwert[187])

	λ_{max} [nm] (ε [l mol^{-1} cm^{-1}])			Opsin-shift [cm-^{1}]	
	Lösung	DA	LA	DA	LA
9-dm	376 (39´000)	535 (43850)	542 (43570)	4244	4486
Retinal	382 (41´600)	559 (51800)	568 (59000)	4633	4917
Retinal (WT)	"	562 (54000#)	569 (59600)	4729	4948
9-Et	380 (31´500)	545 (32900)	559 (31400)	4379	4838
9-Is	376 (30´400)	481 (16700)	479 (16800)	2041	1954
10-Me	386 (34´200)	571 (28000)	578 (27100)	4808	5020
MD*	384 (38´100)	485 (~10500)	467 (17920)	1803	1008

* Chromoprotein nach beendeter Assemblierung: λ_{max} = 576 nm (ε =21480 l mol^{-1} cm^{-1}); Opsin-shift: 5060 cm^{-1}.

Bei 9-dm-JW5 zeigt der relativ kleine Opsin-shift, daß der verringerte sterische Anspruch des Moleküls zu einer kleineren Wechselwirkung mit der Bindungstasche führt (Tab. 3-17). Dementsprechend finden sich die Absorptionen des Pigments bei kürzeren Wellenlängen. Die Absorptionswerte von 9-Et-JW5 liegen zwischen denen von 9-dm-JW5 und Ret-JW5. Der Übergang in den lichtadaptierten Zustand ist bei diesem Chromoprotein mit einer größeren bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums verbunden. Die Restriktionen der Bindungstasche verursachen bei 9-Is-JW5 eine deutliche hypsochrome Position der Absorptionsmaxima. Das Pigment Ret-JW5 hat von allen analogen Verbindungen den höchsten Extinktionskoeffizienten. In der homologen Reihe nehmen die Werte über 9-dm- und 9-Et- zu 9-Is-JW5 hin ab. Es ist keine Korrelation zwischen der Größe des Substituenten an der Position 9 des Chromophors und der Isomerenverteilung vorzunehmen (Tab. 3-18). Sowohl bei 9-dm-JW5 als auch 9-Et-JW5 kann gegenüber Ret-JW5 eine höhere Konzentration des 13*Z*-Isomers nachgewiesen

werden. Die Belichtung führt bei allen drei Pigmenten zu einer vergleichbaren Verschiebung des Isomerenverhältnisses, jeweils zugunsten der all-*E* konfigurierten Verbindung. Im Gegensatz dazu ist ein Zusammenhang zwischen der Größe des Substituenten und der Kinetik der Dunkelreaktion festzustellen (Tab. 3-19): Bei 9-dm-JW5 verläuft die Reaktion wesentlich langsamer als bei Ret-JW5, 9-Et-JW5 besitzt in dieser Reihe die kürzesten Lebenszeiten. Im Falle von 9-Is-JW5 erfolgt die Reaktion zwar noch schneller als bei 9-Et-JW5, die dem Prozeß zugrundeliegende Isomerenverteilung ist aber zu den homologen Verbindungen so verschieden, daß ein Vergleich nicht vorgenommen werden kann (Tab. 3-18).

Tab. 3-18 Mittels der Extraktion der verschiedenen Bacteriorhodopsine in unterschiedlichen Zuständen vorgefundenen Isomere von Retinal und den Retinalderivaten sowie deren prozentuale Verteilung. Zusätzlich sind die Literaturwerte für die Isomerenverteilungen beim Wildtyp-Protein zusammenfassend aufgeführt[28,32,34,199,200].

	9-dm		WT		Retinal		9-Et		9-Is		10-Me		MD	
	DA	LA	DA	LA	DA	LA	DA	LA	DA	LA	DA	LA	Ass.	LA
13*Z*	63	29	51-66	0-7	41	13	58	25	7.5	18	61	45	17	4
9*Z*,13*Z*	-	-			-	-	-	-	7.5	5	-	-	-	-
11*Z*	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	4	5
9*Z*	-	-			-	-	-	-	29	27	7	11	43	59
all-*E*	37	71	34-49	93-100	59	87	42	75	56	50	32	44	35	32

Tab. 3-19 Kinetiken der Dunkeladaption bei nativen Bacteriorhodopsin und den mit Retinal und den Retinalderivaten assemblierten Bacterioopsin (20 °C) [min].

	9-dm	Retinal	WT	9-Et	9-Is	MD	10-Me
τ_1	12	27	111	11	33	68	0.02
τ_2	169	115	-	80	-	2950	0.63
τ_3	1050	-	-	-	-	150 d	2.01

Bei beiden 10-Methylderivaten ist in der Bindungstasche das 9*Z*-Isomer zu detektieren (Tab. 3-18). Diese Konfiguration ist im Falle des MD-JW5 zusammen mit dem 13*Z*-Isomer für ein ungewöhnliches Hell/Dunkel-Verhalten verantwortlich: Die Belichtung des vollständig assemblierten Pigments führt zu einer dramatischen hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums (Tab. 3-17). Vermutlich findet keine dem nativen System vergleichbare Rückkehr zum Ausgangszustand statt. Dieses kann aber photochemisch erzwungen werden. Somit liegen mit dem vollständig assemblierten und lichtadaptierten Pigment zwei unterschiedliche Zustände vor, die reversibel ineinander überführt werden können. Im Gegensatz dazu ist bei 10-Me-JW5 infolge der Belichtung nur eine geringe

Veränderung des Absorptionsmaximums zu beobachten (Tab. 3-17), und die Dunkelreaktion erfolgt innerhalb sehr kurzer Zeit (Tab. 3-19). Die Adaption beruht analog zum nativen System auf der Verschiebung des Verhältnisses zwischen dem 13*Z*- und all-*E*-Isomer unter Beteiligung der 9*Z*-Konfiguration (Tab. 3-18). Der Extinktionskoeffizient beider analoger Pigmente ist deutlich geringer als bei Ret-JW5 bzw. dem nativen System (Tab. 3-17).

3.2.1.3 pH-Titration

Die Bestimmung der pK_a-Werte kann über eine spektroskopisch kontrollierte Säure/Base-Titration der Chromoproteine vorgenommen werden. Eine Änderung des pH-Werts hat einen deutlichen Einfluß auf die Absorptionseigenschaften des Bacteriorhodopsins bzw. der analogen Pigmente: Beim Übergang zu hohen pH-Werten tritt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu kleineren Wellenlängen auf, die durch die Deprotonierung der Schiff-Base erklärt wird[201,202]. Im Gegensatz dazu ist bei niedrigen pH-Werten eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums zu beobachten, der die Protonierung des Asp85 zugrunde gelegt wird[201]. Nach der Auftragung der Absorptionswerte gegen den pH-Wert können die pK_a-Werte durch die Anpassung einer entsprechenden Funktion berechnet werden (s. Punkt 4.1.2.5).

Um eine Beeinflussung der Absorptionswerte durch die bei den lichtadaptierten Zuständen auftretenden Dunkelreaktion zu vermeiden wurden hier für die Titrationen die dunkeladaptierten Pigmente verwendet. Insgesamt ist zu beachten, daß der pk_a-Wert eines Pigments von der Konfiguration des Chromophors in der Bindungstasche abhängt, so daß die bestimmten pk_a-Werte einen Mittelwert darstellen. Zusätzlich können sich somit die pk_a-Werte des lichtadaptierten von denen des dunkeladaptierten Chromoproteins unterscheiden.

Assembliertes Bacteriorhodopsin

Die Titration von Ret-JW5 führt im Sauren zu einer Abnahme der Absorption und das Maximum verschiebt sich zu 596 nm (Abb. 3-73). Bei der Zugabe von Base nimmt der Extinktionskoeffizient ebenfalls ab und es wird ein Spektrum registriert, dessen Maximum sich bei 547 nm befindet. Die Differenzspektren zur Absorption im neutralen Medium durchlaufen jeweils einen isosbestischen Punkt: Zum einen bei 580 nm mit der Erniedrigung und zum anderen bei 520 nm mit der Erhöhung des pH-Werts. Mit der Auftragung der Absorptionswerte kann ein pK_a-Wert von 9.0 für die Schiff-Base und von 5.7 für das Asp85 ermittelt werden (Abb. 3-74).

Wie eingangs erwähnt, konnte bei einer früheren Untersuchung ein Unterschied zwischen dem Bacteriorhodopsin des Wildtyps und dem Protein der Mutante JW5 festgestellt werden. So wurde für das Protein des Wildtyps für die Schiff-Base ein pK_a-Wert von 13.3[202] bzw. 11.5[189] und für das *in vitro* assemblierte Protein der Mutante ein

Wert von 8.5[189] gefunden. Mit dem hier ermittelten Wert von 9.0 kann der Literaturwert für das Protein der Mutante bestätigt werden.

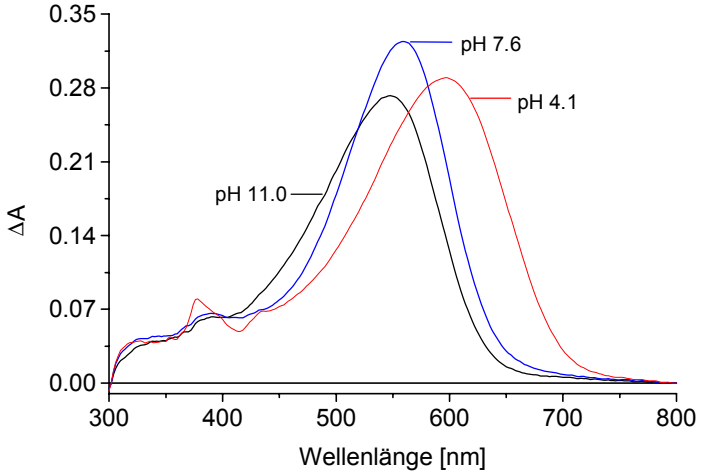


Abb. 3-73 Absorptionsspektren von assemblierten Bacteriorhodopsin in Abhängigkeit vom pH-Wert

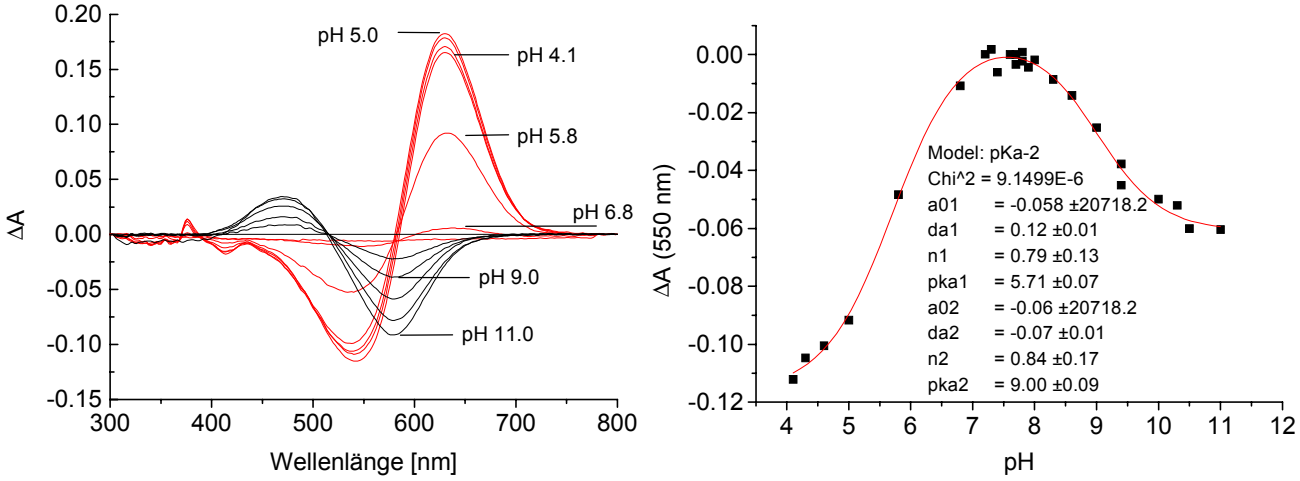


Abb. 3-74 Titration von Ret-JW5: Differenzspektren bei verschiedenen pH-Werten zum Referenzspektrum bei neutralem pH-Wert (links) sowie die Auftragung der Absorptionswerte bei 550 nm gegen den pH-Wert und die angepasste Funktion zur Bestimmung der pK_a-Werte (rechts).

Desweiteren ist auch die geringere Stabilität des Proteins zu beobachten, von der berichtet wird[189]. Die Titration von Bacteriorhodopsin der Mutante JW5 ist je nach Retinalderivat auf den pH-Bereich von ca. 4 bis 11 beschränkt. Außerhalb dieses Bereichs tritt eine verstärkte Degeneration des Proteins auf und die Absorptionswerte sind aufgrund der deutlich zunehmenden Streuung in der Auswertung nicht mehr zu verwenden. Das Protein des Wildtyps hingegen ist resistenter gegenüber den pH-Wert-Änderungen und kann über einen größeren Bereich titriert werden[189]. Aus diesem Grund sind hier ermittelte pK_a-Werte für das Asp85 zum Teil mit Unsicherheiten behaftet, wenn der durch die

Protonierung auftretende Äquivalenzpunkt an der Grenze des verwendbaren Bereiches liegt und somit durch die Degeneration beeinflußt wird. Wie in Abb. 3-74 zu erkennen, kann der Äquivalenzpunkt der Protonierung des Asp85 abgedeckt werden, so daß der Wert von 5.7 relativ sicher ist. In der Literatur wird für das Protein des Wildtyps ein pK_a-Wert von 2.5 angegeben[201], so daß ein weiterer Unterschied zu dem Protein der Mutante zu verzeichnen ist. Darüber hinaus findet sich eine Differenz zu den Absorptionsmaxima der Pigmente: Für den Wildtyp wird nach der Deprotonierung der Schiff-Base das Maximum bei 605 nm und nach der Protonierung des Aspartats von 570 nm registriert[203], im Gegensatz zu den hier gefundenen Werten von 596 bzw. 547 nm.

9-Demethylretinal-Bacteriorhodopsin

Die Abhängigkeit der Absorptionsspektren vom pH-Wert sind bei 9-dm-JW5 ähnlich wie bei Ret-JW5, nur ist das Ausmaß der Verschiebung deutlich geringer ausgeprägt. Im Sauren findet sich das Maximum des Spektrums bei 540 nm und im basischen bei 509 nm (Abb. 3-75). Dementsprechend liegen die isosbestischen Punkte der Differenzspektren bei 509 und 540 nm (Abb. 3-76).

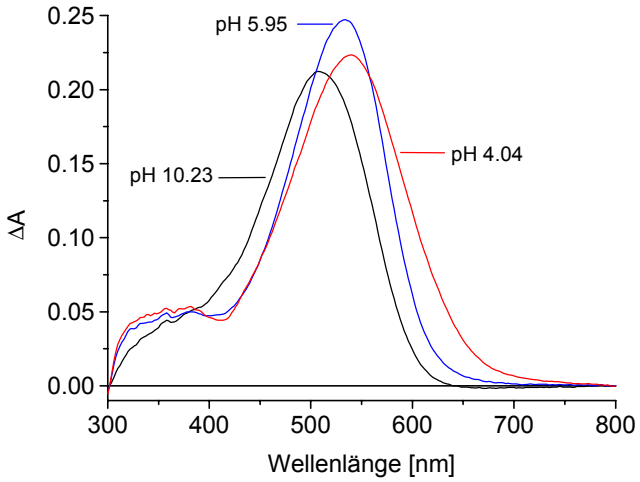


Abb. 3-75 Absorptionsspektren von 9-Demethylretinal-Bacteriorhodopsin in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Auftragung der Absorptionswerte ermöglicht eine sichere Berechnung des pK_a-Werts der Schiff-Base zu 8.7, der somit nur geringfügig unter dem Wert von Ret-JW5 liegt. Der Verlauf der Absorptionsänderungen bei kleinerem pH-Wert deckt nicht vollständig den dort stattfindenden Prozeß ab, so daß der pK_a-Wert von 4.7 für das Asp85 relativ unsicher ist und eventuell auch kleiner sein könnte (Abb. 3-76). Damit ist dieser Wert auf jeden Fall geringer als der entsprechende bei Ret-JW5.

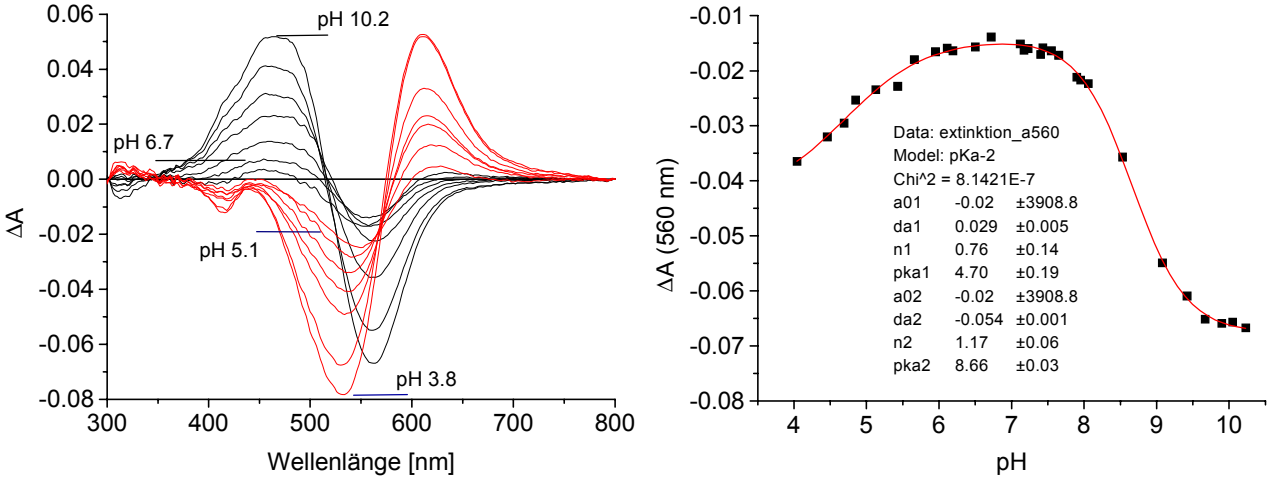


Abb. 3-76 Titration von 9-dm-JW5: Differenzspektren bei verschiedenen pH-Werten zum Referenzspektrum bei neutralem pH-Wert (links) sowie die Auftragung der Absorptionswerte bei 560 nm gegen den pH-Wert und die angepasste Funktion zur Bestimmung der pK_a-Werte (rechts).

9-Ethylretinal-Bacteriorhodopsin

In der Titration zeigt das analoge Chromoprotein 9-Et-JW5 ein untypisches Verhalten. Das Absorptionsspektrum des analogen Chromoproteins erfährt bei Erniedrigung des pH-Werts im Gegensatz zu Ret-JW5 keine bathochrome, sondern eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 519 nm. Dabei ist die auftretende Bande unsymmetrisch und läßt auf die Anwesenheit einer zum Neutralspektrum rotverschobenen kleinen Absorptionsbande schließen. Somit liegt nur ein kleiner Unterschied zu dem maximalen Wert der Absorptionsbande des Chromoproteins im basischen Milieu vor (515 nm), die selbst ein ungewöhnlich flaches Maximum aufweist (Abb. 3-77). Die hypsochrome Verschiebung der Absorption beim Übergang ins basische Medium entspricht aber dem von Ret-JW5 gewohnten Verhalten.

Bei den Differenzspektren liegen wiederum isosbestische Punkte vor, wobei die Spektren zwischen pH 4.0 und 3.2 bereits aufgrund der Degeneration und Streuungszunahme des Proteins abweichen (Abb. 3-78). Die Position der isosbestischen Punkte bei 510 und 590 nm ist vergleichbar zu Ret-JW5. Gleiches gilt für den pK_a-Wert der Schiff-Base, der aus der Auftragung der Absorptionswerte zu 8.5 berechnet werden kann. Eine Abweichung zeigt sich dagegen für den pK_a-Wert des Asp85 mit 4.5. Allerdings ist die Differenz nicht so groß, wie anhand der ungewöhnlich hypsochromen Lage der Absorptionsbanden im sauren Medium hätte erwarten werden können. Der Verlauf der Absorptionswerte läßt in beiden Fällen eine sichere Berechnung zu.

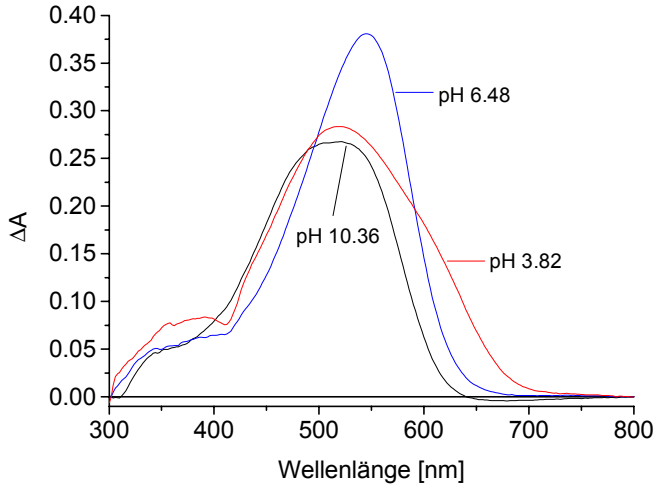


Abb. 3-77 Absorptionsspektren von 9-Ethylretinal-Bacteriorhodopsin in Abhängigkeit vom pH-Wert

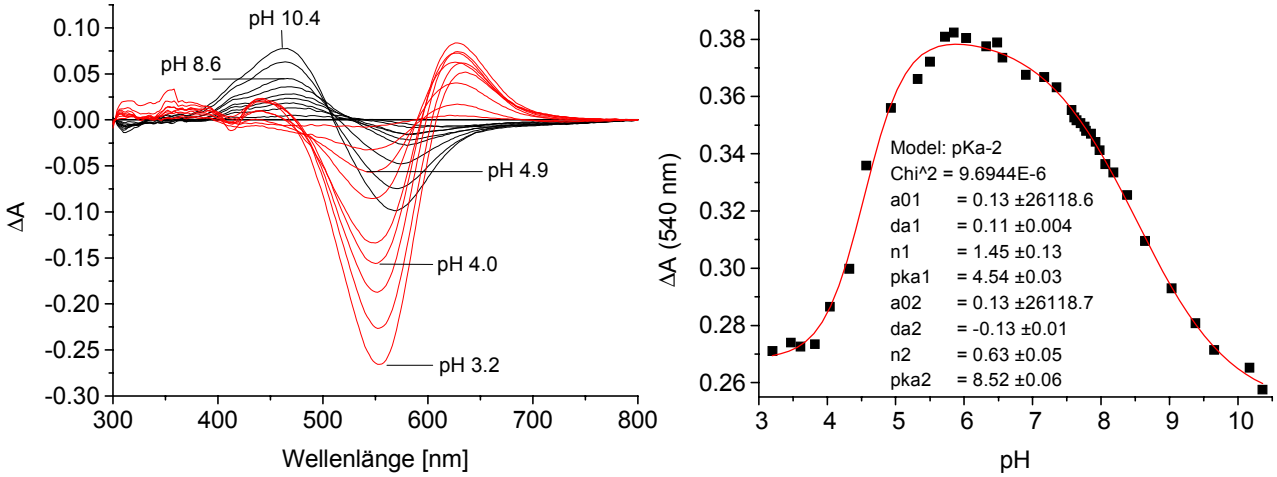


Abb. 3-78 Titration von 9-Et-JW5: Differenzspektren bei verschiedenen pH-Werten zum Referenzspektrum bei neutralem pH-Wert (links) sowie die Auftragung der Absorptionswerte bei 540 nm gegen den pH-Wert und die angepasste Funktion zur Bestimmung der pK_a-Werte (rechts).

9-Isopropylretinal-Bacteriorhodopsin

Der Zusatz von Säure zu einer Suspension von 9-Is-JW5 verursacht eine geringfügige Verschiebung des Absorptionsmaximums zu größeren Wellenlängen (488 nm) und der Extinktionskoeffizient steigt signifikant an. Im basischen Medium liegt das Maximum nur wenig hypsochrom bei 462 nm (Abb. 3-79).

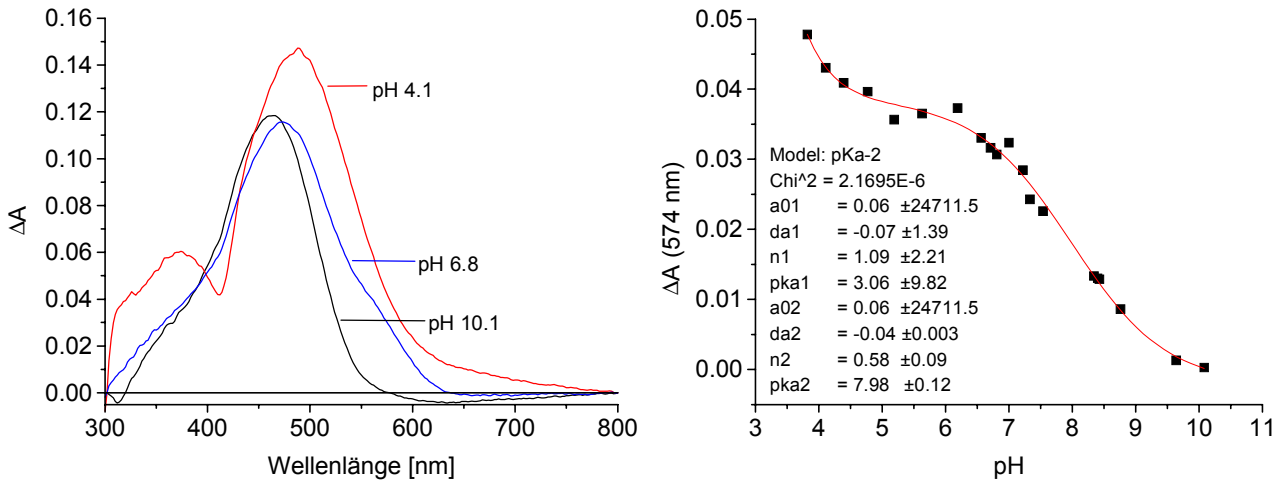


Abb. 3-79 Absorptionsspektren von 9-Is-JW5 in Abhängigkeit vom pH-Wert (links) sowie die Auftragung der Absorptionswerte bei 574 nm gegen den pH-Wert und die angepasste Funktion zur Bestimmung der pK_a-Werte (rechts).

Aus den Absorptionsspektren ergeben sich bei den verschiedenen Wellenlängen allerdings nur schlecht auszuwertende Titrationskurven. Eine Anpassung kann anhand der Absorptionswerte bei 574 nm vorgenommen werden. Dabei ist innerhalb des titrierbaren Bereichs nur der Äquivalenzpunkt der Schiff-Base-Deprotonierung genau zu bestimmen. Zur Berücksichtigung des unvollständigen Überganges bei niedrigem pH-Wert wurde trotzdem die Funktion bezüglich zweier pK_a-Werte angepaßt. Daraus ergibt sich für die Schiff-Base ein Wert von rund 8.0, der damit deutlich vom nativen System verschieden ist. Fraglich bleibt, ob bei niedrigerem pH-Wert überhaupt noch die Protonierung des Aspartats zu beobachten wäre. Möglicherweise verursacht die sterische Modifikation bei 9-Isopropylretinal eine derartige Veränderung des Netzwerks innerhalb des Proteins, daß das Aspartat bereits protoniert vorliegt. Damit könnte die deutlich hypsochrome Lage des Absorptionsmaximums bei diesem analogen Chromoprotein erklärbar werden. Dagegen spricht allerdings die Beobachtung, daß das Absorptionsmaximum bei einer Mutante des BR bathochrom verschoben zum nativen System erscheint, wenn das Asp85 gegen das ungeladene Asparagin ausgetauscht wird[26].

10-Methyl-13-demethylretinal-Bacteriorhodopsin

Die Titration von MD-JW5 wurde nicht mit dem dunkeladaptierten, sondern mit dem nach der Assemblierung unbelichteten Pigment durchgeführt. Das Absorptionsspektrum dieses Zustands wird beim Übergang zu niedrigen pH-Werten geringfügig bathochrom zu 583 nm verschoben. Der Zusatz von Base verursacht im Vergleich zum Neutralspektrum

die Verschiebung der Absorption um 12 nm zu kürzeren Wellenlängen (564 nm). Der Extinktionskoeffizient bleibt vom pH-Wert in beiden Fällen relativ unbeeinflußt (Abb. 3-80).

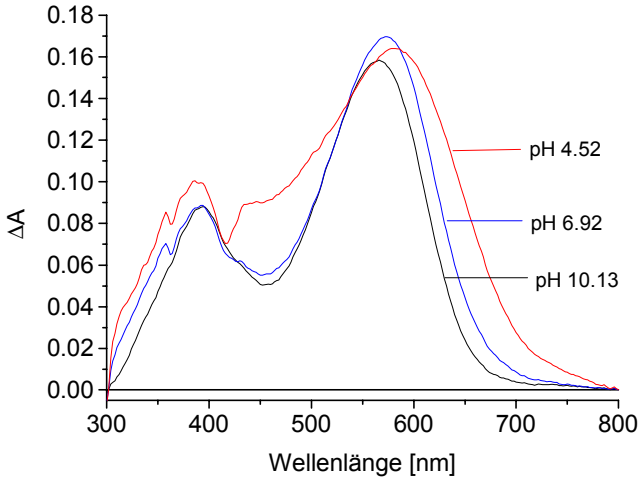


Abb. 3-80 Absorptionsspektren von MD-JW5 in Abhängigkeit vom pH-Wert

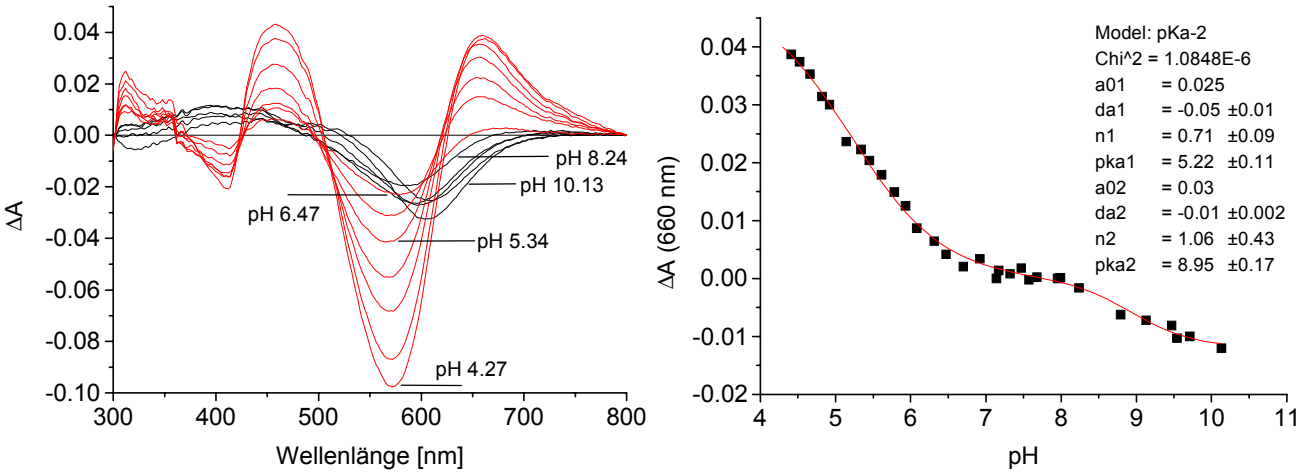


Abb. 3-81 Titration von MD-JW5: Differenzspektren bei verschiedenen pH-Werten zum Referenzspektrum bei neutralem pH-Wert (links) sowie die Auftragung der Absorptionswerte bei 660 nm gegen den pH-Wert und die angepasste Funktion zur Bestimmung der pK_a-Werte (rechts).

Bei den Differenzspektren im sauren Medium treten interessanterweise zwei isosbestische Punkte bei 500 und 620 nm auf, während die Spektren beim Übergang zum basischen Milieu keinen solchen Punkt bilden (Abb. 3-81). Die Auftragung der Absorptionswerte gegen den pH-Wert läßt deutlich den Äquivalenzpunkt der Deprotonierung der Schiff-Base erkennen. Mit der Anpassung der Funktion läßt sich daraus deren pK_a-Wert mit rund 9.0 bestimmen. Die Protonierung der Schiff-Base wird durch die Titrationskurve nicht vollständig erfaßt, so daß deren pK_a-Wert von 5.2 mit einem etwas größeren Fehler behaftet ist.

10-Methylretinal-Bacteriorhodopsin

Die Absorptionsspektren von 10-Methylretinal-Bacteriorhodopsin zeigen bei der Veränderung des pH-Werts ein Verhalten ähnlich dem nativen System: Bei Zugabe von Säure verschiebt sich das Absorptionsmaximum bathochrom zu 584 nm und mit Base hypsochrom zu 557 nm. Der Extinktionskoeffizient wird mit dem pH-Wert allerdings nur wenig verändert (Abb. 3-82). Die Differenzspektren im sauren Medium durchlaufen einen isosbestischen Punkt bei 580 nm und die Spektren im basischen bei 530 nm (Abb. 3-83). Die Titrationskurve zeigt deutlich die beiden pK_a-Werte, die mit 8.8 für die Schiff-Base und 5.7 für das Asp85 bestimmt werden können. Bezüglich dieser Wert zeigt sich ebenfalls eine relativ gute Übereinstimmung des analogen Chromoproteins zum assemblierten Bacteriorhodopsin.

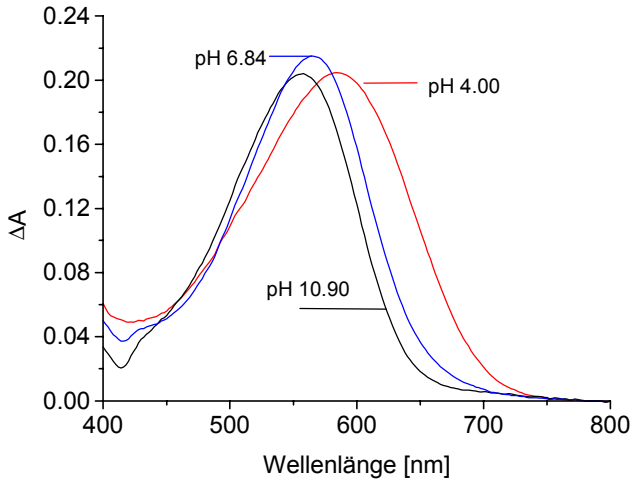


Abb. 3-82 Absorptionsspektren von 10-Methylretinal-Bacteriorhodopsin in Abhängigkeit vom pH-Wert

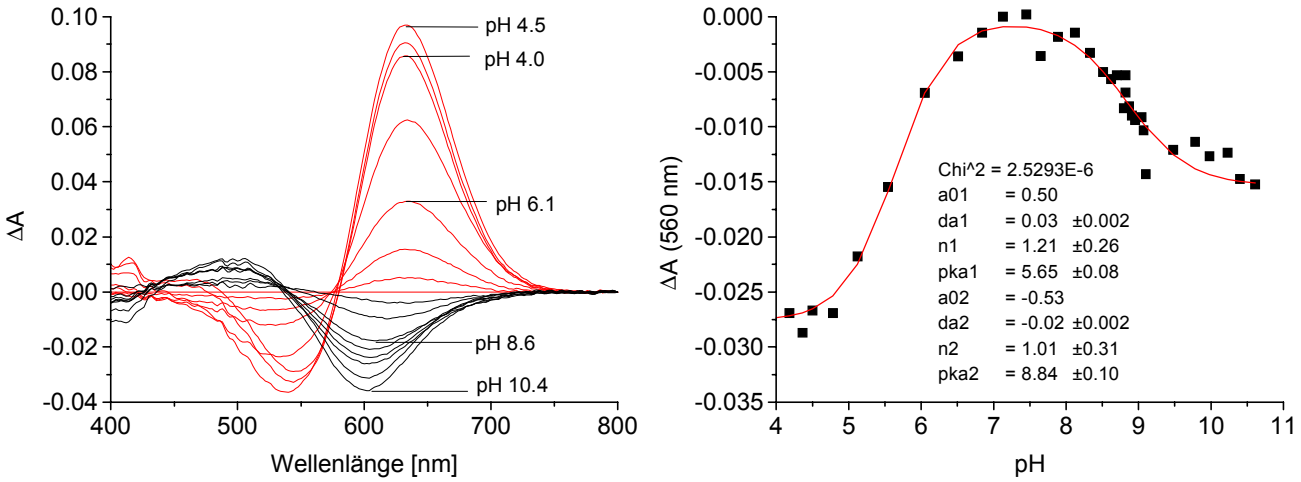


Abb. 3-83 Titration von 10-Me-JW5: Differenzspektren bei verschiedenen pH-Werten zum Referenzspektrum bei neutralem pH-Wert (links) sowie die Auftragung der Absorptionswerte bei 560 nm gegen den pH-Wert und die angepasste Funktion zur Bestimmung der pK_a-Werte (rechts).

Zusammenfassung der Titrationen

Mit der Titration des assemblierten Bacteriorhodopsins kann der gegenüber dem Protein des Wildtyps geringere pK_a-Wert der Schiff-Base bestätigt werden. Zusätzlich ist eine deutliche Abweichung beim pK_a-Wert des Asp85 und der Absorptionsmaxima im sauren sowie basischen Medium festzustellen (Tab. 3-20).

Tab. 3-20 Ermittelte pK_a-Werte von assembliertem Bacteriorhodopsin und den analogen Chromoproteinen sowie die Absorptionsmaxima der Pigmente an den Endpunkten der Titration im basischen und sauren Medium. Die Literaturwerte für das Pigment des Wildtyps sind ebenfalls aufgeführt.

	pK_a1	pK_a2	pH<4.1	pH>10
			[nm]	
9-dm	~4.7	8.7	540	509
Retinal	5.7	9.0	596	547
WT	2.5[204]	13.3[202]	605[203]	565[203]
9-Et	4.5	8.5	519	515
9-Is	~3	8.0	488	462
10-Me	5.7	8.8	584	557
MD	5.2	9.0	583	564

Insgesamt hat die Änderung des pH-Werts beim assemblierten Bacteriorhodopsin im Vergleich zu allen analogen Chromoproteinen die größte Auswirkung auf die spektralen Eigenschaften. Die sterische Modifikation bei 9-Isopropylretinal verursacht die größte Änderung des pK_a-Werts der Schiff-Base, während deren Wert bei den anderen analogen Verbindungen relativ ähnlich zum assemblierten Bacteriorhodopsin bleibt. Die deutlichste Beeinflussung durch die Modifikationen zeigt sich beim pK_a-Wert des Asp85. Insbesondere durch die Anwesenheit von 9-Demethyl- und 9-Ethylretinal in der Bindungstasche des Proteins wird eine Erniedrigung dieses Werts verursacht. Im Fall von 9-Isopropylretinal scheint der Wert noch kleiner zu sein, infolge der Degeneration des Proteins ist eine Bestimmung des Übergangs aber nicht genau möglich.

3.2.1.4 Photocyclus

Die Untersuchung der Photocyclen bei den Chromoproteinen wurde mit Hilfe der Flash-Photolyse durchgeführt (s. Experimenteller Teil, Punkt 4.2.3). Mit dem Meßsystem gelingt die Detektion von Intermediaten, deren Lebenszeit minimal 0.2 µs und maximal 10 s beträgt. Der Photocyclus des Bacteriorhodopsins kann somit vollständig ab dem Zeitpunkt beobachtet werden, an dem der Zerfall des K-Intermediats beginnt.

Wie eingangs für die kinetische Analyse von Reaktionen anhand der Absorptionsspektren erwähnt, besteht auch bei den Meßdaten der Flash-Photolyse die Problematik, daß Übergänge zwischen Intermediaten durch die Absorptionsmessung und der mathematischen Anpassung nicht vollständig separiert werden können. Dieses ist insbesondere bei Gleichgewichtsreaktionen der Fall, die in der thermodynamisch kontrollierten Abfolge von Intermediaten im Verlauf des Photocyclus eine nicht unerhebliche Rolle einnehmen. Somit werden wiederum LAD-Spektren und Lebenszeiten erhalten, die nicht nur eine Reaktion zwischen zwei Intermediaten beschreiben, sondern die Summe von zwei oder mehr Übergängen. Die Analyse des Photocyclus und die Einordnung der Intermediate wird durch diese Überlagerung deutlich erschwert. *Chizhov et al.*[205] entwickelten ein Modell, mit dessen Hilfe die Interpretation von Daten aus spektroskopischen Messungen unter Berücksichtigung dieses Aspektes möglich ist. Diesem Modell liegt die Annahme eines sequenziellen Photocyclus mit irreversiblen Einzelschritten zugrunde. Die mit Hilfe des Global-Fits erhaltenen Lebenszeiten sind dabei nicht alleine der Entstehung und dem Zerfall einzelner Intermediate zugeordnet, sondern beschreiben zum Teil den Übergang zwischen Gleichgewichten ("quasi equilibria"[205]). Voraussetzung für eine solche Beschreibung der empirischen Daten ist, daß die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung größer sein muß, als die kleinste Entstehungs- bzw. Zerfallszeit eines solchen "Komplexes". Infolgedessen bleiben die Übergänge zwischen diesen Intermediaten spektroskopisch unerkannt. Die Absorptionsänderungen können dann nicht mehr einzelnen LAD-Spektren von Intermediaten zugeordnet werden, sondern es werden Mischspektren mit veränderten Anteilen einer Zwischenstufe erhalten; dieses trifft auf die in Abb. 3-84 dargestellten Gleichgewichte P_3, P_4, P_7 und P_6 zu.

Das Modell basiert auf einer sehr umfangreichen Messung nativen Bacteriorhodopsins über 101 Wellenlängen und 11 Temperaturen und soll als Anhaltspunkt für die

Interpretation der hier durchgeführten Messungen dienen. Als Referenz zu diesem Modell und den Literaturdaten wurde neben dem assemblierten Bacteriorhodopsin auch das native Protein des Wildtyps in der Flash-Photolyse untersucht.

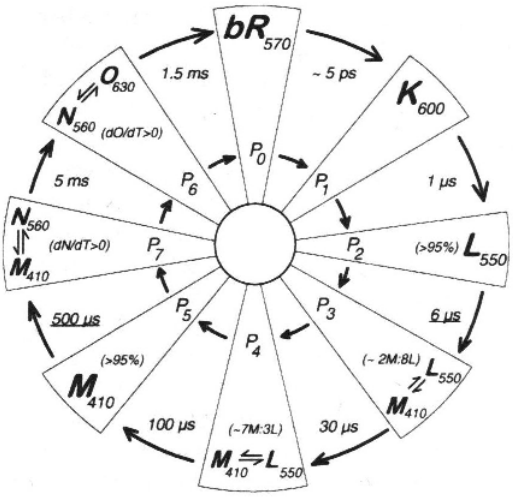


Abb. 3-84 Photocyclus von nativem Bacteriorhodopsin nach *Chizhov et al.* Der Photocyclus wird sequenziell mit acht irreversiblen Einzelschritten beschrieben. Einzelne Lebenszeiten sind "Quasi-Gleichgewichten" zugeordnet.

Im folgenden sind einzelne Ergebnisse der Flash-Photolyse wiederum nicht nur anhand der LAD-Spektren des Globalfits dargestellt, sondern auch durch die daraus berechneten absoluten Absorptionsspektren der Intermediate. Der verwendete Wert des *Fraction cyclings* (F_c), d. h., der mit der Anregung zur Reaktion gebrachte Anteil der Probe, ist jeweils in der Abbildung angegeben (s. Punkt 4.2.4.2).

Natives Bacteriorhodopsin (WT)

Aus der Flash-Photolyse von nativem Bacteriorhodopsin wurden Absorptionsverläufe erhalten, die durch eine Summe von sieben Exponentialfunktionen zu beschreiben sind (Abb. 3-85). Von diesen Lebenszeiten sind sechs dem "*trans*-Cyclus" des Chromoproteins zuzuordnen. Die siebte und längste Lebenszeit ist auf den "*cis*-Cyclus" zurückzuführen. Wie unter Punkt 3.2.1.2 (S. 118ff) ausgeführt, kann aus dem lichtadaptierten Bacteriorhodopsin neben einem überwiegenden Anteil von all-*E*-Retinal mit der Extraktion zusätzlich der 13*Z* konfigurierte Chromophor nachgewiesen werden. Das Chromoprotein mit Retinal in dieser Konfiguration ist ebenfalls in der Lage, einen Photocyclus zu durchlaufen, der vermutlich nur aus zwei Schritten mit Lebenszeiten von 4 µs und 35 ms besteht[206]. Aufgrund der geringen Konzentration des *cis*-Isomers treten nur kleine Absorptionsänderungen auf und die erste Reaktion des entsprechenden Cyclus ist in Gegenwart des *trans*-Cyclus nicht zu detektieren. Die Geschwindigkeit der zweiten Reaktion ist um den Faktor vier größer als die längste Lebenszeit des *trans*-Cyclus. Damit

tritt deren Absorptionsänderung relativ isoliert auf und kann in der mathematischen Anpassung berücksichtigt werden.

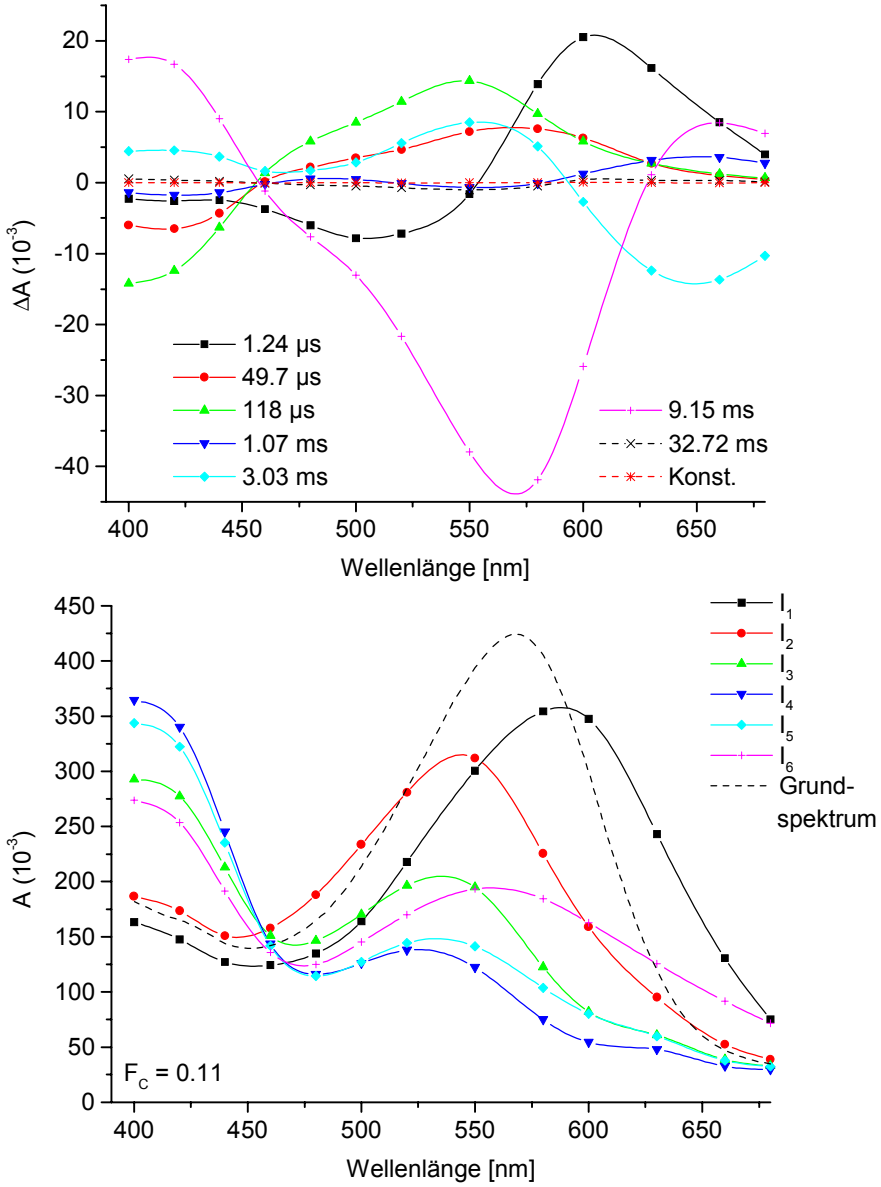


Abb. 3-85 Flash-Photolyse von nativem Bacteriorhodopsin des Wildtyps S9 (20 °C): LAD-Spektren (oben) und die daraus berechneten Intermediatspektren (unten); das LADS mit der längsten Lebenszeit (32.72 ms) wurde bei der Berechnung nicht berücksichtig (siehe Text).

Im Vergleich zu den hier gefundenen sechs fanden *Chizhov et al.* in der Untersuchung des Photocyclus von nativem Bacteriorhodopsin insgesamt acht Lebenszeiten, von denen sieben dem *trans*-Cyclus zugesprochen wurden. Wie oben erwähnt, basiert deren Ergebnis auf Messungen über einen weiten Temperaturbereich. Infolge der starken Temperaturabhängigkeit der thermodynamisch kontrollierten Reaktionsschritte im Photocyclus treten die Intermediate bei den verschiedenen Temperaturen in unterschiedlichen

Konzentrationen auf. Im Gegensatz zu der hier bei einer Temperatur durchgeführten Messung wurde damit der Nachweis einer weiteren Reaktion möglich (5.9 µs). Dieser Übergang zeigt sich mit einer geringen Amplitude und ist hier in den ersten beiden LAD-Spektren enthalten (1.24 und 49.7 µs). Das Einfügen einer zusätzlichen Lebenszeit führt vor allem zu einer Veränderung der Lebenszeiten der vorangehenden und der nachfolgenden Reaktion, die weiteren Zeiten werden durch die zusätzliche Lebenszeit ebenfalls beeinflußt, aber in einem wesentlich geringerem Ausmaß. Dementsprechend weisen hier die ersten beiden Reaktionen eine Lebenszeit von 1.24 und 49.7 µs auf, während *Chizhov et al.*[205] durch die zusätzliche Lebenszeit drei Übergänge mit 0.8, 5.9 und 35 µs beschreiben.

Die Absolutspektren der Intermediate wurden basierend auf den sechs Lebenszeiten des *trans*-Cyclus berechnet. Das Ergebnis der Messung kann in Anlehnung an das obige Modell wie folgt interpretiert werden (Abb. 3-85): Die Absorptionsspektren der ersten beiden Zwischenstufen (I_1 und I_2) entsprechen im Vergleich zu den Ergebnissen von *Chizhov et al.* infolge der nicht detektierbaren Lebenszeit einer Mischung aus dem Zustand P_1 und P_2 bzw. P_2 und P_3. Aufgrunddessen ist das erste Absorptionsspektrum (I_1) relativ breit und die Position des Absorptionsmaximums ist im Gegensatz zum reinen K-Intermediat weniger bathochrom bei 580 nm anstelle von 600 nm. Das zweite Intermediatspektrum (I_2) repräsentiert dementsprechend eine Mischung aus dem L-Intermediat und dem L/M-Gleichgewicht mit einem großen Überschuß des L-Zustands. Die Anwesenheit des M-Intermediats ist anhand der geringen Absorption bei ca. 410 nm zu erkennen. Der Übergang vom ersten zum zweiten Zustand erfolgt mit einer Lebenszeit von 1.24 µs.

Die dritte Stufe (I_3) wird mit einer Lebenszeit von 49.7 µs erreicht und stellt ebenfalls ein Gleichgewicht zwischen dem L- und M-Zustand dar, wobei in diesem Fall die Konzentration des M-Intermediats deutlich größer ist, wie anhand der Absorption bei 410 nm im Verhältnis zur Absorption bei 530 nm zu erkennen ist. Die nächste Reaktion mit einer Zeit von 118 µs zeigt die weitere Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten des M-Intermediats. *Chizhov et al.* ordneten diesen Übergang dem switch zu, d. h. dem Wechsel der Zugänglichkeit der Schiff-Base von der extrazellulären zur cytoplasmatischen Seite des Bacteriorhodopsins (M_1- zum M_2-Intermediat; s. Einleitung, Punkt 1.1.2). Zusätzlich erhalten sie bei diesem Zustand nur noch eine Absorptionsbande des M-Intermediats mit dem Maximum bei 410 nm, während hier noch eine weitere Bande bei

530 nm zu erkennen ist. Allerdings kann hier beim vierten Spektrum (I_4) mit dem Erreichen der maximalen Absorption bei 410 nm im Vergleich zu den anderen Zuständen auf die größte Konzentration des M-Intermediats geschlossen werden. Der Zerfall des M-Zustands erfolgt mit einer Lebenszeit von 1.07 ms. Entsprechend ist damit eine Abnahme der Absorption bei 410 und Zunahme bei ca. 540 nm verbunden, so daß ein Hinweis auf das N-Intermediat vorliegt und das Spektrum I_5 eine Mischung aus M- und N-Zustand repräsentiert. Anhand des LAD-Spektrums mit einer Lebenszeit von 3.03 ms ist einerseits eine Abnahme der Absorption bei 410 und ca. 550 nm zu ersehen und gleichzeitig eine Zunahme bei ca. 640 nm. Damit zeigt sich der Übergang vom M/N- zum N/O-Gleichgewicht. Der Ausgangszustand des Photocyclus wird in der letzten Reaktion mit einer Zeit von 9.15 ms erreicht. Das letzte Absorptionsspektrum I_6 beinhaltet neben der Absorption des N- und O-Intermediats ebenfalls eine Absorptionsbande bei 410 nm und somit des M-Zustands. Deutlicher ist dieses noch anhand des LAD-Spektrums mit der entsprechenden Lebenszeit zu erkennen, das eine Absorptionsabnahme bei 410 und 640 nm und eine Zunahme bei 570 nm zeigt. Damit sind die letzten Reaktionsschritte des Photocyclus nicht eindeutig den Übergängen M/N zu N/O und letztendlich zum Grundzustand zuzuordnen, sondern es ist von einem ausgeprägten Gleichgewicht zwischen den drei Intermediaten auszugehen, in dessen Folge nur ein Mischspektrum dieser Intermediate erhalten werden kann. Für diesen Zeitbereich beschritten *Chizhov et al.* zur Berechnung der Absolutspektren zwei alternative Wege. Einerseits die Einordnung der längsten Lebenszeit zum letzten Reaktionsschritt und andererseits, wie in Abb. 3-84 dargestellt, in den vorletzten Schritt. Im ersten Fall wird ebenfalls eine Mischung der drei Intermediate M, N und O erhalten, während im zweiten Fall eine Auftrennung in die Gleichgewichte M/N und N/O gelingt. Eine entsprechende Variation der Lebenszeiten mit den hier erhaltenen Daten zur Berechnung der Intermediatspektren führte zu keinem brauchbaren Ergebnis, so daß nur die Mischung der drei Intermediate angenommen wird.

Insgesamt sind die Ergebnisse unter Berücksichtigung der Differenz in der Anzahl der Lebenszeiten in guter Übereinstimmung mit den Daten von *Chizhov et al.*, sowohl bezüglich der LAD-Spektren bzw. Absolutspektren der Intermediate als auch der Lebenszeiten (s. auch Tab. 3-21, S. 167). Geringe Abweichungen in den Zeiten sind zum Teil auf die Verwendung verschiedener Medien für die Probe zurückzuführen. So wurden die Messungen im Rahmen dieser Arbeit mit Proteinsuspensionen in reinem Wasser durchgeführt, die einen pH-Wert von 6.8 besaß, während *Chizhov et al.* eine auf pH 7.0 gepufferte Bacteriorhodopsin-Probe verwendeten. Der unterschiedliche pH-Wert

beeinflußt somit die Kinetiken an den Stellen des Photocyclus, bei denen der Austausch von Protonen mit dem umgebenden Medium stattfindet.

Assembliertes Bacteriorhodopsin

Die Ergebnisse aus der Flash-Photolyse von assembliertem Bacteriorhodopsin sind prinzipiell identisch mit denen des nativen Systems (Abb. 3-86): Die Absorptionsverläufe sind mit einer Summe von sieben Exponentialfunktionen zu beschreiben, das Erscheinungsbild der LAD-Spektren ist sehr ähnlich und die Zuordnung der Reaktionsschritte des Photocyclus kann in gleicher Weise vorgenommen werden.

Das mit der längsten Lebenszeit erscheinende LAD-Spektrum des *cis*-Cyclus besitzt eine etwas größere Amplitude als es beim Wildtyp-Protein zu beobachten ist. Dieses ist in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Extraktionen (s. Seite 121), bei der im Falle des lichtadaptierten Zustands des assemblierten Proteins eine höhere Konzentration an 13*Z*-Retinal nachgewiesen werden konnte als beim Wildtyp, so daß ein entsprechend größerer Anteil des Chromoproteins den *cis*-Cyclus durchlaufen kann.

Die Lebenszeiten des *trans*-Cyclus stimmen angesichts einer Fehlertoleranz von ca. 20 % mit den Werten des nativen Systems überein. Eine Ausnahme stellt die vierte Lebenszeit mit 1.98 ms dar, die eine Differenz von mehr als 85 % aufweist (WT: 1.07 ms). Nach der oben vorgenommenen Zuordnung der Lebenszeiten zu den jeweiligen Schritten des Photocyclus entspricht diese Zeit dem Zerfall des M-Intermediats und ist verbunden mit der Reprotonierung der Schiff-Base beim Übergang zum M/N-Gleichgewicht. Wie im Rahmen der Titrationen gezeigt werden konnte, besitzt die Schiff-Base von Ret-JW5 mit 9.0 einen kleineren pK_a-Wert als beim Wildtyp-Protein (pK_a-Wert 13.3) und somit eine höhere Azidität (s. Tab. 3-20, Seite 146). Diese bewirkt, daß das Gleichgewicht zwischen der Schiff-Base und dem Protonen-Donor mehr zugunsten Letzterem verschoben ist. Die signifikante Differenz der Lebenszeit bei diesem Schritt des Photocyclus zeigt demzufolge, daß die Reprotonierung der Schiff-Base beim assemblierten Protein der Mutante langsamer erfolgt als beim nativen System.

Darüber hinaus wurde für den pK_a-Wert des Asp85 beim assemblierten Bacteriorhodopsin mit 5.7 im Vergleich zum Wildtyp-Protein mit 2.5 ebenfalls eine deutliche Differenz festgestellt. Die höhere Basizität des Aspartats bei der gleichzeitig höheren Azidität der Schiff-Base sollte die Deprotonierung der Schiff-Base beim Übergang vom L-

zum M-Intermediat beschleunigen. Anhand der Lebenszeiten des Ret-JW5 ist gegenüber den entsprechenden Zeiten beim WT-BR aber kein Unterschied festzustellen.

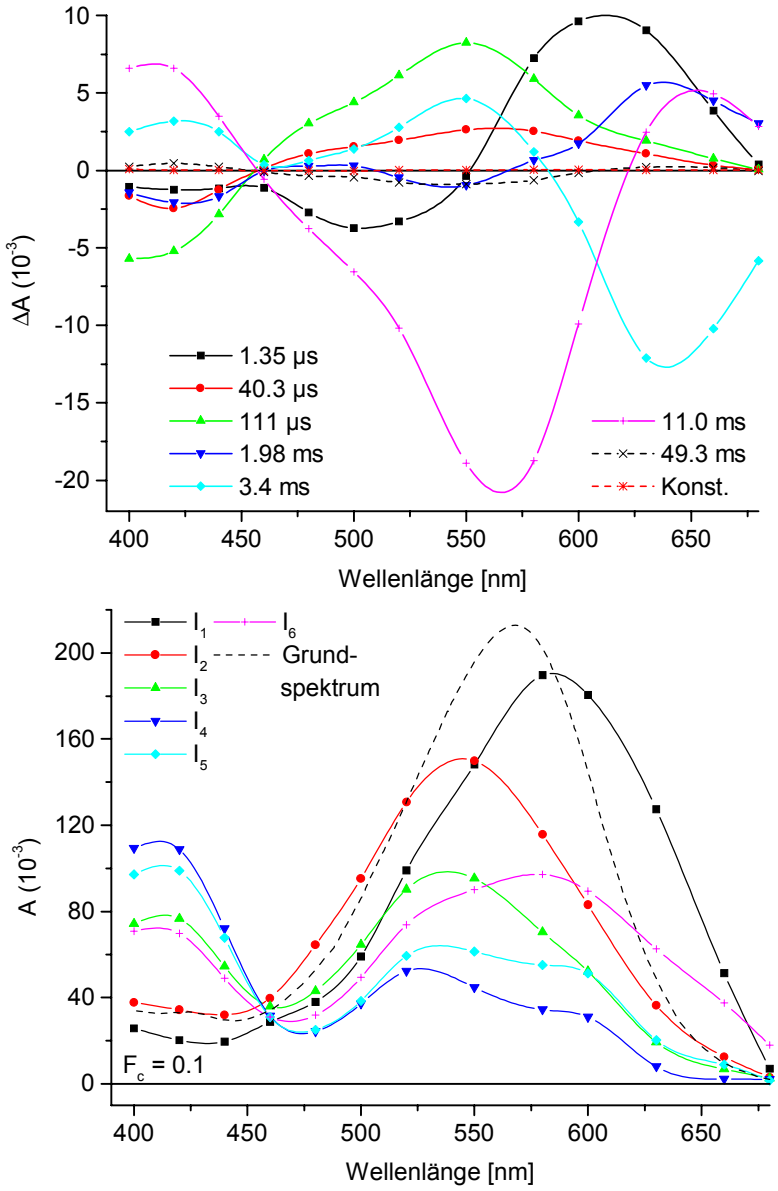


Abb. 3-86 Flash-Photolyse von assemblierten Bacteriorhodopsin (20 °C): LAD-Spektren (oben) und die anhand dieser berechneten Interediatspektren (unten); das LAD-Spektrum mit der größten Lebenszeit wurde in der Berechnung nicht berücksichtigt (siehe Text).

Eine Differenz zwischen den beiden System ist desweiteren bei den LAD-Spektren der Intermediate, insbesondere beim Spektrum mit einer Lebenszeit von 3.4 ms, bezüglich der Amplituden im Bereich zwischen 600 und 660 nm festzustellen. Diese führt bei den Intermediatspektren I_4 und I_5 zu einer Nebenbande mit einem Absorptionsmaximum von 600 nm und verursacht beim Spektrum I_6 eine bathochrome Verschiebung des Maximums zu 580 nm (WT-BR: 560 nm). Die langwellige Position der Absorption deutet auf einen höheren Anteil an O-Intermediat bei Ret-JW5 hin. Möglicherweise liegt zusätzlich ein

verändertes Gleichgewicht zum Ende des Photocyclus zwischen den Intermediaten M, N und O vor, das mittels des Globalfits nicht entsprechend aufgelöst werden kann. Damit müssen die Nebenmaxima bei den Spektren I_4 und I_5 nicht signifikant sein, denn infolge der rekursiven Berechnung der Intermediatspektren bewirkt eine ungenügende Anpassung mit den letzten LAD-Spektren auch eine Veränderung der Absorptionsspektren der vorangehenden Intermediate.

9-Demethylretinal-Bacteriorhodopsin

Im Verlauf des Photocyclus von 9-dm-JW5 zeigt sich deutlich der Einfluß der Chromophormodifikation (Abb. 3-87). Die ersten beiden Reaktionsschritte verlaufen mit einer zum nativen System vergleichbaren Geschwindigkeit, während die nachfolgenden Schritte drastisch verzögert sind. Der vollständige Ablauf des Cyclus ist um Größenordnungen länger als beim assemblierten Bacteriorhodopsin. Während Ret-JW5 das langlebigste Intermediat des *trans*-Cyclus eine Lebenszeit von rund 10 ms besitzt, beträgt die entsprechende Zeit bei 9-dm-JW5 1.1 s. Dieser, der Reisomerisierung des Chromophors in die all-*E*-Konfiguration zugrundeliegende Prozeß, wird analog zur Kinetik der Licht-/Dunkeladaption offensichtlich durch die verringerte sterische Wechselwirkung zwischen dem Chromophor und dem Protein verzögert.

Insgesamt ist das Erscheinungsbild der fünf LAD-Spektren gegenüber Ret-JW5 signifikant verschieden. Deutlich wird dieses auch anhand der Position des isosbestischen Punkts bei 500 nm im Gegensatz zu 460 nm bei Ret-JW5 und dem WT-BR. In die Berechnung der Absolutspektren der Intermediate wurden alle LAD-Spektren einbezogen. Mit der Extraktion des 9-Demethylretinals aus dem analogen Chromoprotein konnte zwar ein höherer Anteil 13*Z*-Isomer gegenüber der all-*E* konfigurierten Verbindung nachgewiesen werden (s. Tab. 3-18, Seite 136), aufgrund der geringen Anzahl der Lebenszeiten und der großen Amplituden der LAD-Spektren scheint ein *cis*-Cyclus allerdings nicht detektierbar in Erscheinung zu treten.

Das erste zu registrierende Intermediat stellt den K-Zustand dar. Interessanterweise besitzt dieser einen größeren Extinktionskoeffizienten als der Grundzustand und das Absorptionsmaximum liegt mit 560 nm im Vergleich zu Ret-JW5 um 20 nm bei kürzeren Wellenlängen. *Weidlich et al.*[83,84] beschrieben für das analoge Chromoprotein eine um den Faktor fünf verringerte Anregungsausbeute bei Verlängerung des Laserpulses von 5 auf 20 ns. Diese Abhängigkeit kann auf das Absorptionsverhalten des K-Intermediats

zurückgeführt werden: Die relativ hypsochrome Position der Absorption führt zu einer stärkeren Überlappung mit der Absorptionsbande des Grundzustands. In Verbindung mit dem erhöhten Extinktionskoeffizienten bewirkt die Verlängerung der Pulsdauer bei dem in wenigen Nanosekunden entstehenden K-Intermediat die "Rückbelichtung" in den Grundzustand.

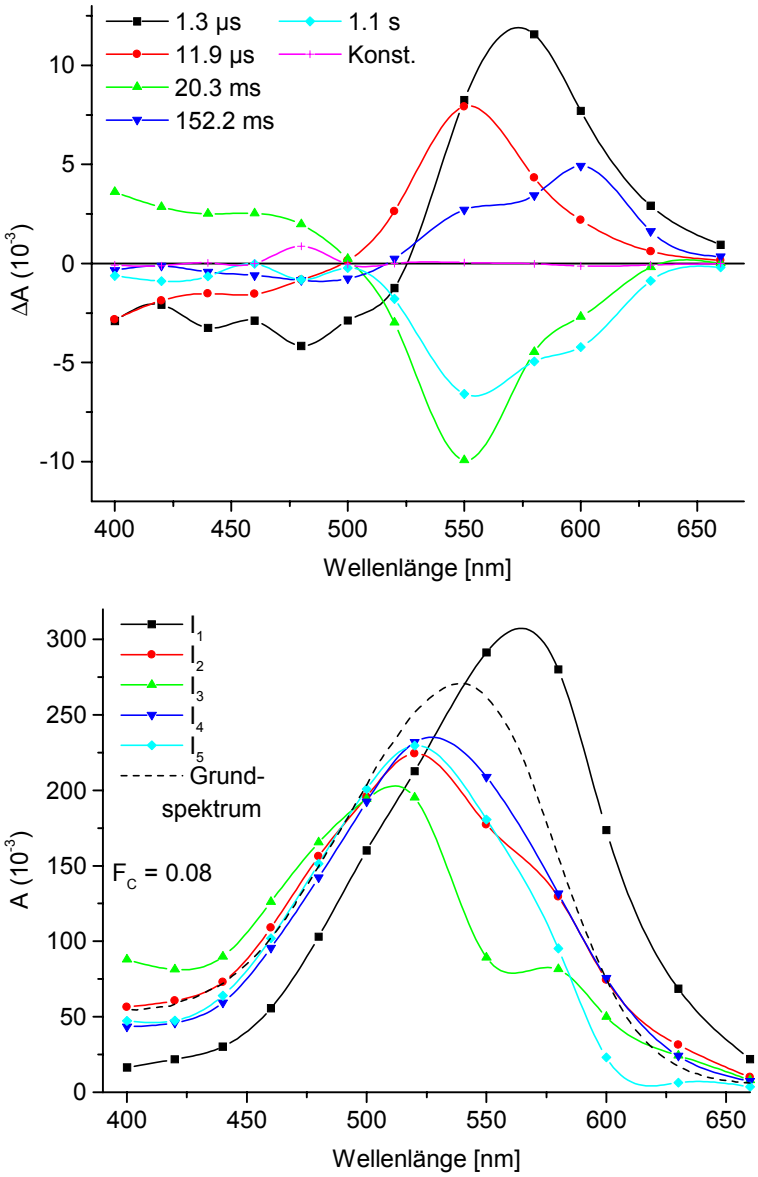


Abb. 3-87 Flash-Photolyse von 9-Demethylretinal-Bacteriorhodopsin (20 °C): LAD-Spektren (oben) und die daraus berechneten Absorptionsspektren der Intermediate (unten).

Der Zerfall des K-Intermediats erfolgt mit einer zu Ret-JW5 vergleichbaren Lebenszeit von 1.3 µs. Das Absorptionsspektrum des nachfolgenden Intermediats zeigt nur eine Absorption bei 550 nm und noch keine unterhalb von 500 nm, die auf die Anwesenheit des M-Intermediats deuten würde. Somit ist nur von der Anwesenheit des L-Intermediats

auszugehen. Das Absorptionsspektrum dieses Zustands (I_2) zeigt neben der Absorptionsbande mit einem Maximum bei 520 nm eine untergeordnete Bande bei ca. 570 nm, die auf eine Beimischung des K-Intermediats zurückgeführt werden könnte. Das LAD-Spektrum mit der Lebenszeit von 11.9 µs besitzt mit dem Maximum bei 550 nm allerdings eine symmetrische Absorptionsbande, so daß die unsymmetrische Bande des zweiten Intermediatspektrums auf die rekursive Berechnung der Spektren infolge einer fehlerhaften Anpassung bei den nachfolgenden Intermediaten zurückgeführt werden kann (s. u.). Der Übergang des zweiten Intermediats erfolgt mit einer Lebenszeit von 11.9 µs zu einem Zustand, der insgesamt eine sehr geringe, aber im Vergleich zu den anderen Intermediatspektren die größte Absorption bei ca. 400 nm aufweist (I_3). Somit ist auf die Anwesenheit des M-Intermediats in Gegenwart des dominierenden L-Zustands zu schließen. Das Auftreten des größten M-Anteils bereits zu diesem Zeitpunkt des Photocyclus von 9-dm-JW5 im Vergleich zu Ret-JW5 ist im Widerspruch zu den Ergebnissen von *Yamazaki et al.*[82]. Diese fanden anhand der Absorptionsverläufe bei 412 nm, daß das Erreichen der maximalen Konzentration des M-Intermediats beim demethylierten Pigment einen vierfach längeren Zeitraum benötigt als beim assemblierten Bacteriorhodopsin. Bei den hier gemessenen Transienten der beiden Pigmente wird die maximale Absorption in diesen Wellenlängenbereich dagegen fast zur gleichen Zeit erreicht.

Das Absorptionsspektrum I_3 weist zusätzlich bei 510 nm noch ein Nebenmaximum bei 580 nm auf, das bereits als die Anwesenheit eines weiteren Intermediats zu deuten ist. Die nächste zu detektierende Lebenszeit von 20.3 ms ist deutlich größer als die des vorangehenden Schritts, so daß womöglich ein zwischen diesen beiden Reaktionen liegender Übergang mittels des Globalfits nicht vollständig aufgelöst werden konnte und hier ein Mischspektrum aus drei Intermediaten vorliegt. Das vierte Intermediatspektrum besitzt nur ein Absorptionsmaximum und es ist keine Absorption des M-Zustands mehr zu erkennen, so daß diese Zwischenstufe überwiegend dem N-Intermediat zuzuordnen ist. Die Reaktion zum fünften Intermediat erfolgt mit einer Lebenszeit von 152.2 ms. Das Intermediatspektrum zeigt zum vorangehenden nur eine geringe Abnahme an der langwelligen Flanke der Absorptionsbande, so daß kein Hinweis auf die Anwesenheit eines zum O-Intermediat vergleichbaren Zustands vorliegt und vorwiegend das N-Intermediat dominiert. Die Rückkehr in den Ausgangszustand dieses Chromoproteins erfolgt mit einer langen Lebenszeit von 1.1 s.

Der geringe Unterschied in den spektralen Eigenschaften der letzten Intermediate des Photocyclus von 9-dm-JW5 ist in Übereinstimmung mit den Untersuchungen dieses Chromoproteins durch *Weidlich et al.*, bei der mittels FT-IR-Spektroskopie die Anwesenheit von insgesamt vier N-Intermediaten postuliert wurde. Infolge der fehlenden Methylgruppe besitzt der Chromophor in der Bindungstasche eine größere Beweglichkeit. Dieses ermöglicht dem Molekül die Einnahme von verschiedenen Positionen innerhalb der Bindungstasche, welches anhand der verschiedenen N-Intermediate zu beobachten ist. Damit verbunden liegt nur ein kleinerer Anteil des Moleküls in der für die Reisomerisierung korrekten Konformation, so daß in Verbindung mit der verringerten Wechselwirkung zum Protein nur eine deutlich verlangsamte Reaktion zum Ausgangszustand erfolgen kann.

Der Übergang vom N zum O-Intermediat ist beim WT-BR, wie eingangs erwähnt, mit der Reprotonierung des Asp85 verbunden. *Weidlich et al.* konnten nachweisen, daß dieser Schritt im Fall des 9-Demethylretinals "entkoppelt" ist und noch einen Zustand darstellt, der dem N-Intermediat zuzuordnen ist. Desweiteren wird ein bathochrom absorbierender Zustand angenommen, dem hier beim dritten Intermediatspektrum das Nebenmaximum bei 580 nm entspräche.

Die fehlende Möglichkeit zur Separation der verschiedenen N-Zustände mittels des Globalfits verursacht in der rekursiven Berechnung der Intermediatspektren, wie bereits oben angedeutet, die unsymmetrische Bande beim zweiten Intermediatspektrum, so daß die zusätzliche Anwesenheit eines bathochrom absorbierenden Zustands dort nicht signifikant ist.

Insgesamt zeigt sich bei 9-dm-JW5 ein sehr kleiner Anteil des M-Zustands, der auf eine geringe Fähigkeit des analogen Chromoproteins zum Pumpen von Protonen deutet. Entsprechende Untersuchungen wiesen eine im Vergleich zum nativen System auf 37 %[86] bzw. ca. 65 %[31,85] reduzierte Aktivität nach. Mit den hier erhaltenen Ergebnissen ist der erste Wert wahrscheinlicher. Die höheren Aktivitätswerte sind vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Messungen mit einer großen Lichtintensität durchgeführt wurden. Dieses verursachte nicht nur die Initiierung der Photoreaktion, sondern auch die teilweise Rückbelichtung der in großer Konzentration vorhandenen N-Intermediate in den Ausgangszustand. Damit würde der Photocyclus verkürzt und es stünde eine größere Konzentration des analogen Chromoproteins im Grundzustand für eine erneute Photoreaktion und den Protonentransport zur Verfügung.

9-Ethylretinal-Bacteriorhodopsin

Interessant sind die Ergebnisse aus der Untersuchung von 9-Et-JW5 (Abb. 3-88). Während das *Fehlen* der Methylgruppe an Position 9 im Falle von 9-Demethylretinal zu einer drastischen Veränderung des Photocyclus führt, zeigen sich die LAD-Spektren von 9-Et-JW5 trotz des vermehrten Raumanspruchs an der gleichen Stelle sehr ähnlich zum nativen System bzw. zu Ret-JW5. Der isosbestische Punkt der LADS bei 450 nm liegt um 10 nm zu kleineren Wellenlängen als bei Ret-JW5. Beim Vergleich der Lebenszeiten ist eine signifikante Beschleunigung der ersten Schritte des Photocyclus vorzufinden, und ab dem fünften Intermediat findet genau im Gegenteil eine deutliche Verzögerung der Reaktionen statt, so daß die Vervollständigung des Photocyclus mehr als die doppelte Zeit benötigt wie bei Ret-JW5.

Insgesamt ist für die Beschreibung der Absorptionsverläufe eine Summe von acht Exponentialfunktionen notwendig. Es ist davon auszugehen, daß die vorletzte Zeit von 106.7 ms wie bei Ret-JW5 auf einen *cis*-Cyclus zurückzuführen ist. Die Amplitude des entsprechenden LAD-Spektrums ist in Übereinstimmung mit dem gegenüber Ret-JW5 erhöhten Anteil des 13Z-Isomers (s. Tab. 3-18, Seite 136). Die längste zu detektierende Lebenszeit von 554 ms ist vermutlich bereits Teil der relativ schnellen Dunkelreaktion von 9-Et-JW5. Somit verbleiben sechs Intermediate, deren LAD-Spektren in die Berechnung der Absolutspektren einbezogen wurden.

Die Zuordnung der LAD- bzw. Absolutspektren zu den einzelnen Schritten des Photocyclus kann vergleichbar zu Ret-JW5 bzw. dem nativen System vorgenommen werden, so daß im folgenden nur die Unterschiede diskutiert werden:

Das zweite Intermediatspektrum (I_2) weist im Vergleich zum Absorptionsspektrum des Grundzustands keine relevante Differenz bei 410 nm auf, womit auf die Anwesenheit des M-Intermediats geschlossen werden könnte. Das Spektrum weicht allerdings geringfügig vom isosbestischen Punkt ab, so daß auf eine kurzwellig absorbierende Spezies geschlossen werden könnte. Im nachfolgenden Intermediatspektrum (I_3) zeigt sich deutlich die Anwesenheit des M-Zustands und das Absorptionsspektrum besitzt ein breites Absorptionsmaximum bei 520 nm. Beim vierten und fünften Intermediatspektrum tritt bei ca. 520 nm im Vergleich zu Ret-JW5 nur eine geringere Absorptionsbande auf. Desweiteren zeigt sich bei den beiden Zuständen (I_4 und I_5) kein Unterschied in der Konzentration des M-Intermediats. Auf die Entstehung des N-Zustands deutet nur der geringe Absorptionszuwachs um 540 nm beim fünften Spektrum hin. Das

Absorptionsspektrum des sechsten Intermediats setzt sich wiederum wie bei Ret-JW5 aus der Absorption des M, N und O-Zustands zusammen, wobei der O-Zustand einen deutlich höheren Anteil aufweist.

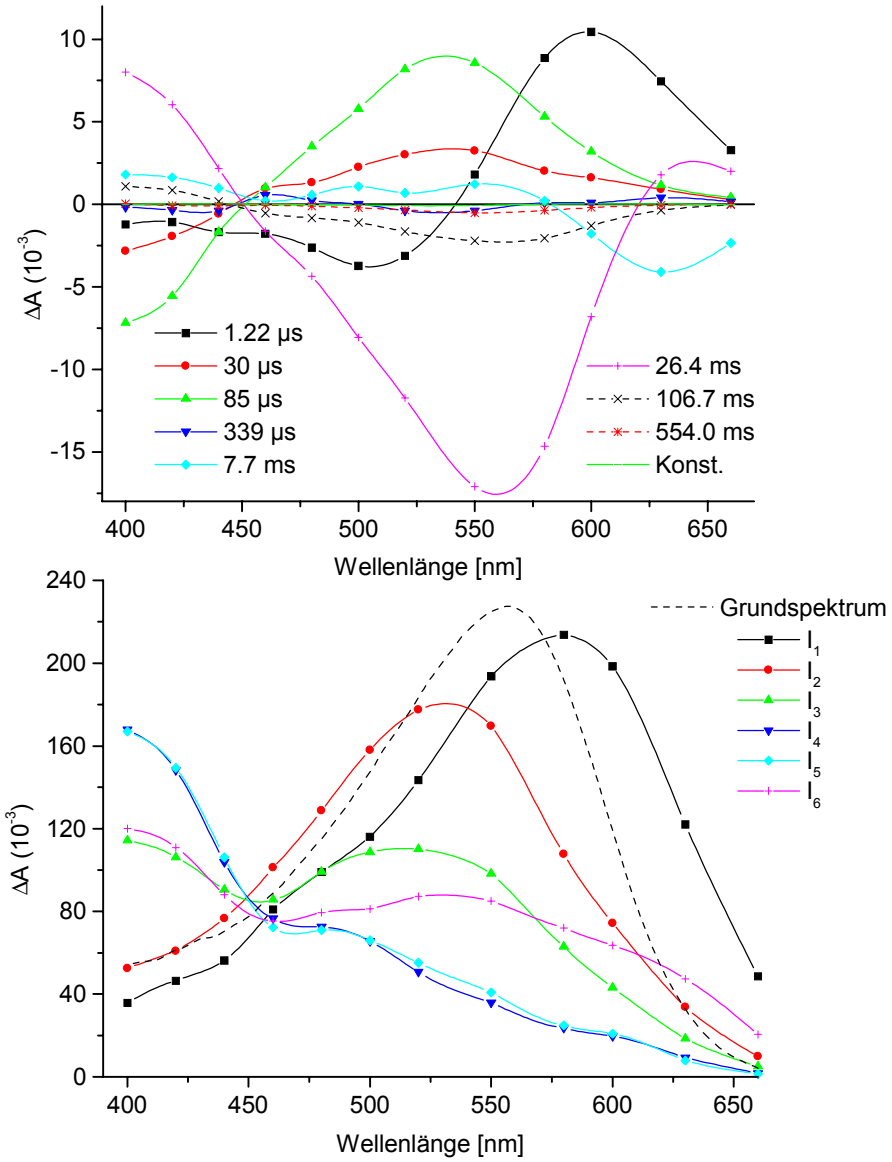


Abb. 3-88 Flash-Photolyse von 9-Ethylretinal-Bacteriorhodopsin (20 °C): LAD-Spektren (oben) und die daraus berechneten Intermediatspektren (unten).

Die Unterschiede zwischen den Lebenszeiten des Photocyclus von 9-Et-JW5 im Vergleich zu denen des Ret-JW5 sind in der Hauptsache auf die Veränderung der sterischen Aspekte zurückzuführen. Die Verzögerung in der zweiten Hälfte des Photoprozesses kann zusätzlich durch die erhöhte Azidität des Aspartats beeinflußt werden, dessen Wert bei 9-Et-JW5 mit 4.5 bestimmt wurde und somit um 1.2 pk_a-Einheiten niedriger ist als bei Ret-JW5. Dieses spricht für eine "erschwerte" Reprotonierung des Asp85 im Übergang zum O-Intermediat. Anhand der Ergebnisse ist

davon auszugehen, daß die geringfügig höhere Azidität der Schiff-Base bei diesem analogen Chromoprotein nur einen kleinen Beitrag in der Beschleunigung der Deprotonierung und dem Übergang zum M-Intermediat liefert.

9-Isopropylretinal-Bacteriorhodopsin

Im Falle von 9-Is-JW5 zeigen die aus dem Globalfit der Daten erhaltenen LAD-Spektren keine Übereinstimmung mehr zu den entsprechenden Spektren von Ret-JW5 (Abb. 3-89). An die insgesamt sehr geringen Absorptionsänderungen können fünf Lebenszeiten angepaßt werden. Die Gesamtdauer des Prozesses ist außergewöhnlich lang: So besitzt das letzte in Erscheinung tretende Intermediat eine Lebenszeit von 6.8 s.

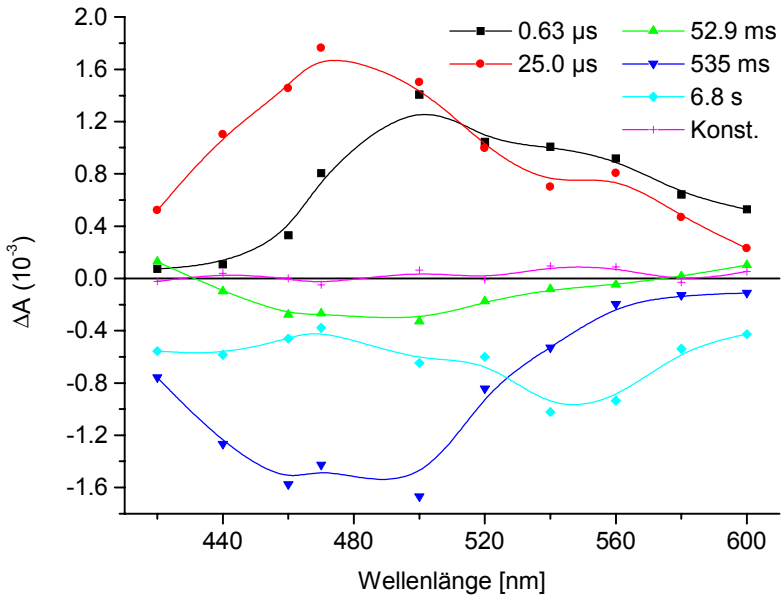


Abb. 3-89 LAD-Spektren der Flash-Photolyse von 9-Isopropylretinal-Bacteriorhodopsin (20 °C).

Eine Berechnung von Absolutspektren der Zwischenstufen aus den erhaltenen LADS ist nicht in gleicher Weise wie zuvor bei den analogen Chromoproteinen möglich. Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, daß die den LAD-Spektren zugrundeliegenden Prozesse nicht mit einer Abfolge von irreversiblen Reaktionen erster Ordnung angenähert werden können, sondern zwei oder mehr parallel verlaufenden Cyclen stattfinden. Mit der Extraktion des Chromophors aus der Bindungstasche konnten vier Isomere nachgewiesen werden, von denen jedes potentiell einen eigenen Photocyclus eingehen könnte (s. Tab. 3-18, Seite 136). Unter Berücksichtigung der Verschiebung der Isomerenverhältnisse zwischen dem licht- und dunkeladaptierten Zustand (signifikant ist die Abnahme des all-*E*- und die Zunahme des 13*Z*-Isomers) wäre bei diesem analogen Chromoprotein die 13*Z*-

Konfiguration als Ausgangspunkt für die in der Flash-Photolyse initiierten Reaktionen denkbar. Das könnte bedeuten, daß der bei 9-Isopropylretinal eingeführte sterische Anspruch keinen regulären Photocyclus mehr zuläßt. Eventuell ist nur noch eine Geometrieänderung des Moleküls in der Nähe der Schiff-Base möglich. Dieses würde das Ausmaß und die Art der Verschiebung der Isomerenverhältnisse im Verlauf der Licht-/Dunkeladaption und desweiteren die geringen Absorptionsänderungen in der Flash-Photolyse erklären. Die ermittelten LAD-Spektren könnten demzufolge nur als Isomerisierung und Reisomerisierung eines Teils der vorhandenen Chromophorisomere zu interpretieren sein.

10-Methyl-13-demethylretinal-Bacteriorhodopsin

Aufgrund des deutlich unterschiedlichen Absorptionsverhaltens des MD-JW5 im lichtadaptierten (LA-MD-JW5) und vollständig assemblierten Zustand (vaMD-JW5) wurde das analoge Chromoprotein in beiden Zuständen mit der Flash-Photolyse untersucht. Da die beiden Erscheinungsformen des MD-JW5 mit entsprechender Belichtung ineinander überführt werden konnten, kehrten die Proben nach der Anregung mit dem Laserlicht ebenfalls nicht vollständig in den jeweiligen Ausgangszustand zurück. Um definierte Anfangsbedingungen für die Untersuchungen zu erhalten, wurde die lichtadaptierte Form durch die Belichtung mit dem weißen Licht eines Diaprojektors sichergestellt und der vollständig assemblierte Zustand durch die Belichtung mit dem Licht eines 473 nm-Interferenzfilters. Wie anhand der Abb. 3-90 zu erkennen, zeigt die lichtadaptierte Form des MD-JW5 eine deutlich verschiedene Reaktion zum vaMD-JW5 (Abb. 3-91). Während im ersten Fall vier Lebenszeiten an die Transienten anzupassen sind, werden für das vaMD-JW5 sieben Lebenszeiten benötigt. Zusätzlich zeigt die Konstante des Globalfits von vaMD-JW5, daß die Reaktion innerhalb des Zeitfensters der Flash-Photolyse noch nicht beendet ist. Die Vervollständigung des Prozesses konnte unter Verwendung eines größeren Zeitfensters im UV/Vis-Spektralphotometer beobachtet werden und in der Auswertung der Daten wurden drei weitere Lebenszeiten erhalten (Abb. 3-92). Das LAD-Spektrum der ersten so bestimmten Lebenszeit ist in der Form übereinstimmend mit der Konstanten aus dem Globalfit der Flash-Photolyse-Daten. Die Konstante der langsamen Kinetiken besitzt keine Amplitude und zeigt damit an, daß die Reaktion vollständig abgeschlossen ist. Während der Flash-Photolyse wurden die langsamen Reaktionen demnach durch den Einsatz des blauen Lichtes unterbrochen und die entsprechenden Intermediate zur Rückreaktion in den Ausgangszustand gezwungen.

Das analoge Chromoprotein MD-JW5 stellt sich insgesamt als äußerst komplex dar und eine Interpretation der gemessenen Photoreaktionen ist kaum möglich. Die Berechnung der Intermediatspektren mit verschiedenen Abfolgen der Lebenszeiten ergeben dabei ein wenig sinnvolles Ergebnis. Anhand der Anzahl der durch die Extraktion nachgewiesenen Isomere ist analog zu 9-Is-JW5 anzunehmen, daß mehrere Photocyclen zeitgleich ablaufen. Die aus der Messung des LA-MD-JW5 erhaltenen LAD-Spektren lassen sich nicht mit den LAD-Spektren des vaMD-JW5 korrelieren. Wäre dieses möglich, so könnte einer der Photocyclen "extrahiert" werden und die Analyse der verbleibenden Kinetiken würde wesentlich erleichtert.

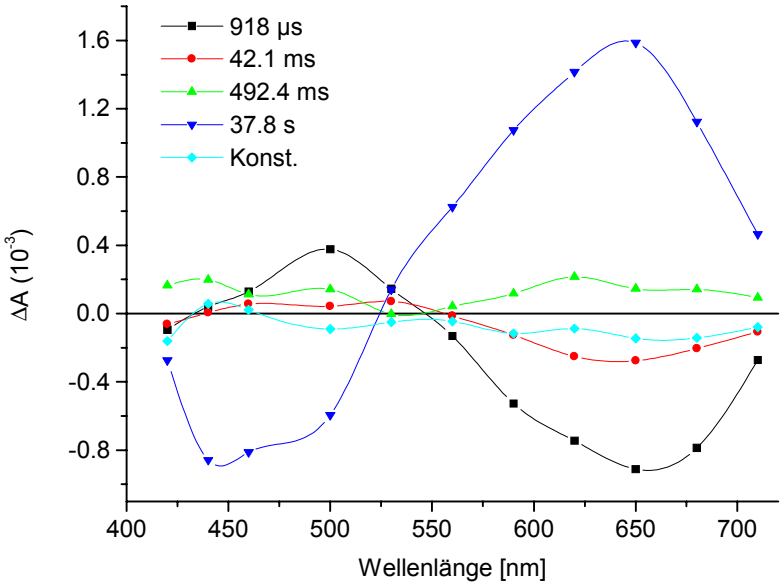


Abb. 3-90 LAD-Spektren der Flash-Photolyse von lichtadaptiertem 10-Methyl-13-demethylretinal-Bacteriorhodopsin (20 °C).

Es ist daher fraglich, welches Isomer des Chromophors den jeweiligen Photoprozeß dominiert. Die Lichtadaption beeinflußt am deutlichsten die Konzentration des 13*Z*- und 9*Z*-Isomers (s. Tab. 3-18, Seite 136). Während sowohl im vollständig assemblierten als auch im lichtadaptierten Zustand ein erheblicher Anteil an 9*Z*- und all-*E*-Isomer vorliegt, verringert sich die Konzentration des 13*Z*-Isomers mit der Belichtung von 17 auf 4 %. Dieser kleine Anteil, und ebenfalls die geringe Menge des 11*Z*-Isomers (in beiden Zuständen ca. 5 %) reicht nicht aus, um eine detektierbare Photoreaktion zu verursachen. Somit ist der Photocyclus des vaMD-JW5 nur auf das 13*Z*-Isomer zurückzuführen, während die Reaktion des LA-MD-JW5 durch das 9*Z*- oder all-*E*-Isomer verursacht werden kann.

Die Zuordnung der in Abb. 3-90 dargestellten LADS des lichtadaptierten Chromoproteins zu bekannten Intermediaten des nativen Bacteriorhodopsins kann nicht vorgenommen werden. Vermutlich stellen die Spektren, analog zu 9-Is-JW5 nur die Isomerisierung und Reisomerisierung des 9*Z*- und/oder all-*E*-Isomers dar.

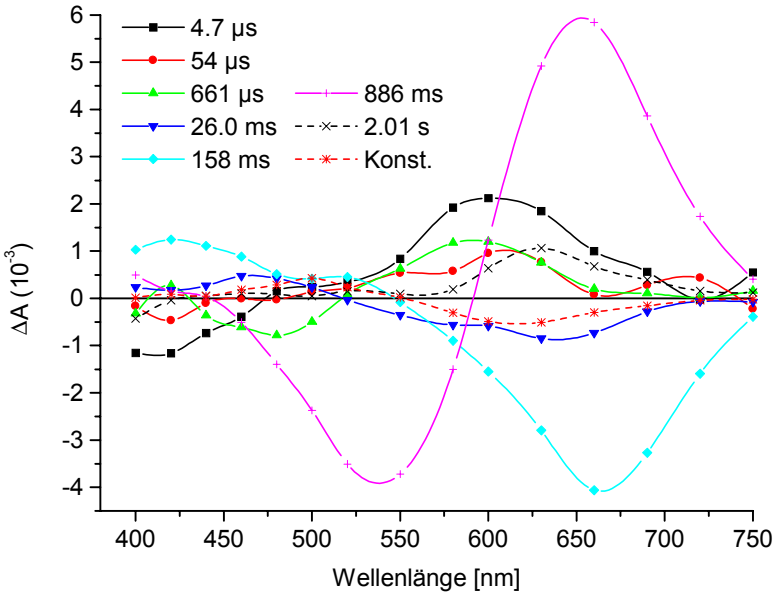


Abb. 3-91 LAD-Spektren der Flash-Photolyse von assembliertem 10-Methyl-13-demethylretinal-Bacteriorhodopsin (vaMD-JW5, 20 °C).

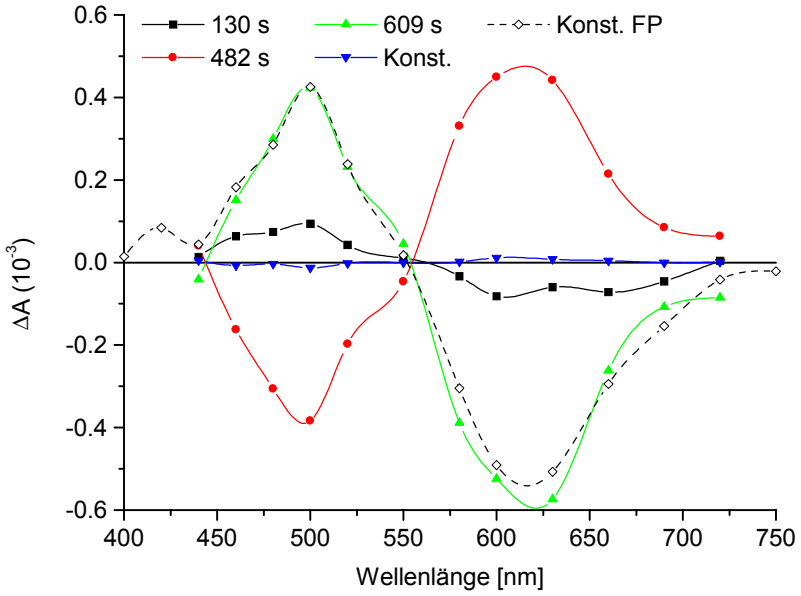


Abb. 3-92 LAD-Spektren der langsamen Kinetiken von assembliertem 10-Methyl-13-demethylretinal-Bacteriorhodopsin (20 °C). Die Messung der Absorptionsverläufe erfolgte mittels eines UV/Vis-Spektralphotometers.

Anhand der LAD-Spektren des vaMD-JW5 können folgende Aussagen gemacht werden (Abb. 3-91): Das erste LADS (4.7 µs) weist einen Zerfall in der Nähe des Absorptionsmaximums des Grundzustandes bei 600 nm und die Entstehung eines Intermediats mit einem Maximum bei ca. 410 nm auf. Die hypsochrom liegende Absorption könnte auf einen Zustand hinweisen, bei dem der Chromophor in Anlehnung zum M-Intermediat des nativen Systems deprotoniert vorliegt. Die nächste Reaktion (54 µs) beinhaltet nur eine Zerfallskomponente mit dem Maximum der Absorptionsdifferenz bei ca. 600 nm (Die Amplituden dieses LADS bei 420 nm und oberhalb von 660 nm sind nicht signifikant). Da keine Absorptionsänderung einer Entstehung zu erkennen ist, kann dieser Schritt kaum eingeordnet werden und steht entweder im Zusammenhang mit dem ersten Intermediat oder ist Teil eines separaten Prozesses.. Der nächste Übergang mit einer Lebenszeit von 661 µs zeigt ebenfalls einen Zerfall bei 600 nm und eine Entstehung um 470 nm. Letztere korreliert nicht mit der oben beschriebenen hypsochromen Komponente bei 410 nm. Eventuell stellt diese Reaktion zusammen mit der nachfolgenden (26 ms) aufgrund des spiegelbildlichen Verlaufs die Übergänge in einem Gleichgewicht dar.

Das fünfte LAD-Spektrum (158 ms) besitzt eine Übereinstimmung mit dem ersten Intermediat: Der Zustand mit λ_{max} = 410 nm zerfällt und es entsteht eine deutlich bathochrom absorbierende Komponente oberhalb von 650 nm. Der nächste Schritt mit einer Lebenszeit von 886 ms paßt ebenfalls in dieses Bild und zeigt den Zerfall des zuvor beschriebenen Zustands und die Verschiebung des Absorptionsmaximums zu kleineren Wellenlängen. Die letzte Reaktion (2.01 s) weist wiederum nur einen Zerfall bei 620 nm auf. Dieses Maximum ist identisch mit den langsamen Reaktionen, die mittels des Spektralphotometers aufgezeichnet wurden (Abb. 3-92). Somit könnte dieses Intermediat der Flash-Photolyse bereits ein Teil der nachfolgenden langsamen Kinetiken sein. Aufgrund der spiegelbildlichen Form entsprächen diese insgesamt einer Gleichgewichts-reaktion zwischen zwei Komponenten, mit einem Maximum der Absorptionsdifferenz bei 620 und 490 nm. Die letzten Reaktionsschritte verlaufen äußerst langsam, so daß der Gesamtprozeß erst nach über 30 min als annähernd abgeschlossen angesehen werden kann.

10-Methylretinal-Bacteriorhodopsin

Im Gegensatz zum Ergebnis von *Schiffmiller et al.*[119], die in einer Untersuchung des 10-Methylretinals als Chromophor in BR keine Reaktionen beobachteten, konnte mit der hier durchgeführten Messung ein photoinduzierter Prozeß detektiert werden (Abb. 3-93).

Die LAD-Spektren des Photocyclus von 10-Me-JW5 zeigen im Vergleich zu Ret-JW5 deutlich den Einfluß der zusätzlich vorhandenen Methylgruppe. An die insgesamt geringen Absorptionsänderungen können nur vier Lebenszeiten angepaßt werden. Auffällig ist das Fehlen von Absorptionsänderungen bei 400 nm, so daß im Photocyclus keine deprotonierte Form des Chromophors, d. h., kein zum M-Intermediat des nativen Systems vergleichbarer Zustand zu entstehen scheint.

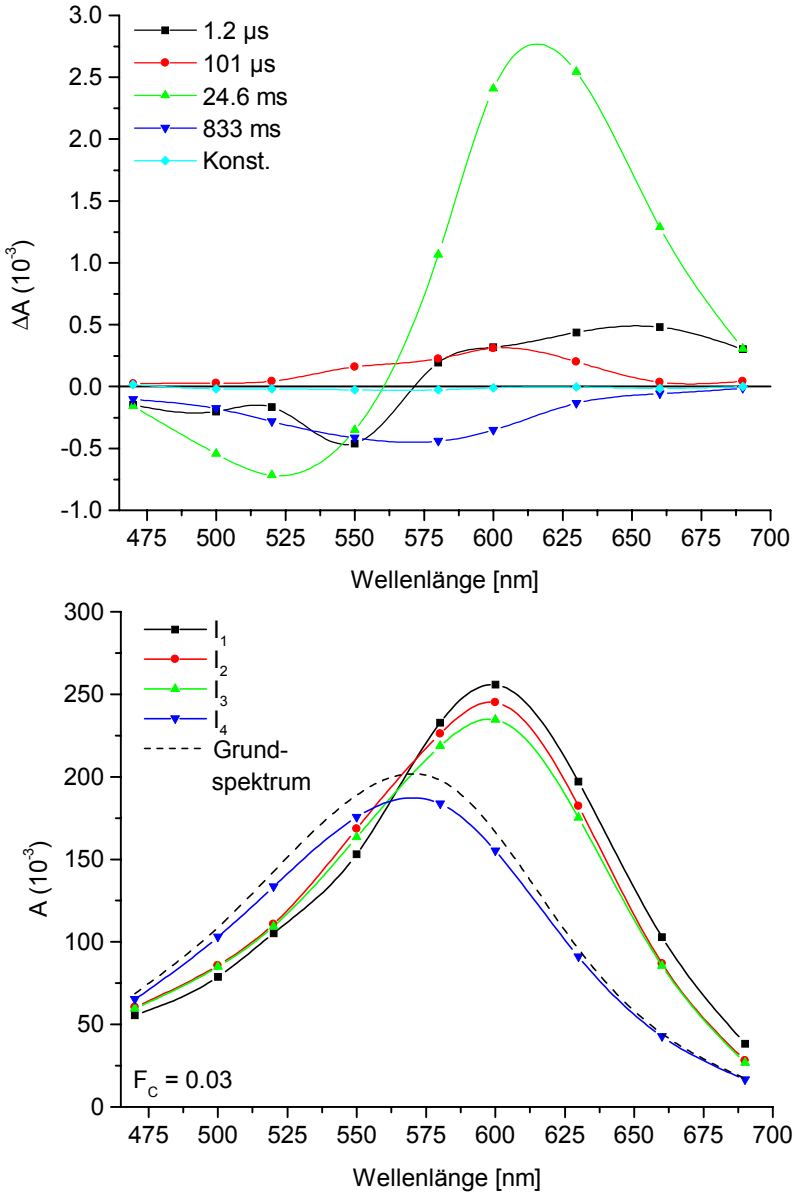


Abb. 3-93 Flash-Photolyse von 10-Methylretinal-Bacteriorhodopsin (20 °C): LAD-Spektren (oben) und die daraus berechneten Absorptionsspektren der Intermediate (unten).

In die Berechnung der Absolutspektren der Intermediate wurden alle LADS einbezogen. Aufgrund der geringen Amplituden der LADS weisen die Absorptionsspektren nur sehr geringe Unterschiede auf. Das Absorptionsmaximum der ersten drei Intermediate ist

identisch und ein Unterschied ist nur in den Extinktionskoeffizienten sowie geringfügig in der jeweiligen Bandenform vorhanden; allerdings sind die Extinktionskoeffizienten dieser Intermediate alle größer als der des Grundzustands. Die Lebenszeiten der Übergänge erstrecken sich mit 1.2 µs, 101 µs und 24.6 ms über einen großen Zeitbereich. Mit dem Übergang vom dritten zum vierten Intermediat tritt eine deutlich hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums auf, dessen Position identisch mit der des Grundzustands ist, allerdings besitzt das letzte Intermediat einen etwas geringen Extinktionskoeffizienten. Damit besteht eine Übereinstimmung zu den Absorptionsspektren der Licht-/Dunkeladaption, so daß der letzte Schritt bereits ein Teil der Dunkelreaktion darstellen könnte.

Insgesamt ist festzustellen, daß kein zum nativen System vergleichbarer Photocyclus abläuft. Vermutlich wird durch die Anregung wiederum nur eine Verschiebung des Isomerenverhältnisses verursacht, das im weiteren Verlauf über die zu beobachtenden Intermediate in den Ausgangszustand zurückkehrt, ohne funktionelle Zwischenstufen des Gesamtsystems zu induzieren.

Zusammenfassung der Flash-Photolyse

Die Charakterisierung des nativen Bacteriorhodopsins (Wildtyp S9) mit der Flash-Photolyse ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Chizhov et al.*[205], sowohl bezüglich der Lebenszeiten als auch der LADS und der berechneten Absorptionsspektren der Intermediate. Das Ergebnis der Flash-Photolyse von assembliertem Bacteriorhodopsin zeigt einen signifikanten Unterschied zum nativen System: Die Reprotonierung der Schiff-Base im Übergang vom M- zum N-Intermediat findet aufgrund von Unterschieden in der Konformation des Proteins und des pK_a-Werts der Schiff-Base verzögert statt.

Tab. 3-21 Ermittelte Lebenszeiten von nativem und assembliertem Bacteriorhodopsin sowie von den analogen Chromoproteinen (20 °C). Zusätzlich sind die von *Chizov et al.* publizierten Lebenszeiten des nativen Bacteriorhodopsins aufgeführt. Die kursiv geschriebenen Zeiten wurden nicht mit der Flash-Photolyse, sondern mit einem Spektralphotometer bestimmt.

	9-dm	WT (S9)	WT[205]	Retinal	9-Et	9-Is	10-Me	MD	MD (LA)
τ_1	1.3 µs	1.24 µs	0.8 µs	1.35 µs	1.22 µs	0.63 µs	1.2 µs	4.7 µs	918 µs
τ_2	11.9 µs	49.7 µs	5.9 µs	40.3 µs	30 µs	25 µs	101 µs	54 µs	42.1 ms
τ_3	20.3 ms	118 µs	35 µs	111 µs	85 µs	52.9 µs	24.6 ms	661 µs	492 ms
τ_4	152 ms	1.07 ms	91 µs	1.98 ms	339 µs	535.0	834 ms	26.0 ms	37.8 s
τ_5	1.1 s	3.03 ms	478 µs	3.4 ms	7.7 ms	6.8 s		158 ms	
τ_6		9.15 ms	1.69 ms	11.0 ms	26.4 ms			886 ms	
τ_7		32.72	4.95 ms	49.3 ms	106.7			2.01 s	
τ_8			23.1 ms		554.0			*130 s*	
τ_9								*482 s*	
τ_{10}								*609 s*	

In der homologen Reihe der an Position 9 modifizierten Substanzen ergibt sich folgende Korrelation: Die Substitution der Methylgruppe beim Retinal durch eine Proton (9-Demethylretinal) hat einen drastischen Einfluß auf den Ablauf des Photocyclus. Eine Zuordnung der Intermediate zu den entsprechenden Zuständen beim nativen System kann vorgenommen werden, es treten aber deutliche Unterschiede im Absorptionsverhalten der Intermediate zum Ende der Photoreaktion auf. Während die ersten beiden Schritte des Prozesses in der Geschwindigkeit ähnlich zum nativen System verlaufen, sind die Übergänge in den nachfolgenden Reaktionsschritten drastisch verlangsamt.

Die Erhöhung des sterischen Anspruchs an der Position 9 des Chromophors (9-Ethylretinal) führt zu einer signifikanten Beschleunigung in der ersten Hälfte des Photocyclus und zu einer deutlichen Verzögerung der Reaktionen in der zweiten Hälfte. Das Erscheinungsbild der LADS und der berechneten Spektren ist sehr ähnlich dem des

nativen Systems. Unterschiede zeigen sich in den Konzentrationen der verschiedenen Zustände bei einzelnen Intermediaten, so z. B. im Fall des M-Intermediats und beim Übergang zum N-Intermediat. Darüber hinaus ist ein deutlicherer Anteil des O-Zustands zu detektieren.

Eine weitere Erhöhung des sterischen Anspruchs bei 9-Isopropylretinal wird vom Protein nicht mehr toleriert. Es kann nur noch eine erheblich veränderte Photoreaktion beobachtet werden, bei der eine Zuordnung zu den Intermediaten des nativen Systems nicht mehr möglich ist. Das Absorptionsverhalten der Intermediate läßt auf eine Reduktion des Prozesses auf Isomerisierungs-/Reisomerisierungs-Reaktionen, eventuell sogar unter Einbeziehung mehrerer isomerer Formen des Chromophors schließen.

Bei der an gegenüber Retinal an Position 10 und 13 modifizierten Verbindung 10-Methyl-13-demethylretinal wurde aufgrund des deutlich verschiedenen Absorptionsverhaltens sowohl die lichtadaptierte Form als auch der vollständig assemblierte Zustand des Chromoproteins in der Flash-Photolyse untersucht. Die LAD-Spektren aus der jeweiligen Messung sind untereinander nicht zu vergleichen. Die Reaktionen des lichtadaptierten Zustands sind von denen des nativen Bacteriorhodopsins völlig verschieden und es kann keine Zuordnung vorgenommen werden. Basis der Reaktion des vollständig assemblierten Zustands ist vermutlich das 13*Z*-Isomer. Insgesamt können bei der Photoreaktion dieser Erscheinungsform des analogen Chromoproteins zehn Lebenszeiten gefunden werden. Eine Zuordnung der Intermediate im Vergleich zu nativen Bacteriorhodopsin ist ebenfalls nicht möglich.

Die analoge Verbindung 10-Methylretinal führt als Chromophor in Bacterioopsin nicht zu einem funktionierenden Chromoprotein. Der Photoprozeß weist keine vom nativen System bekannten Zwischenstufen auf, so daß die Methylgruppe an Position 10 des Chromophors vermutlich nur eine reine Isomerisierungsreaktion zuläßt.

3.2.2 Rhodopsin

Für die Charakterisierung der Retinalderivate als prosthetische Gruppen im Protein des visuellen Systems ist zuerst die Entfernung des nativ vorhandenen Chromophors notwendig. Zu diesem Zweck wird das Rhodopsin in Gegenwart von Hydroxylamin gebleicht, so daß der am Ende des Photoprozesses frei werdende Chromophor in das entsprechende Oxim überführt wird. Dieses Oxim wird damit im wäßrigen Medium besser löslich wird und ist außerdem nicht mehr in der Lage, erneut in das Protein einzubauen (s. Punkt 4.2.2.3). Durch die sich an die Bleichung anschließenden Waschvorgänge wird die Konzentration des zugesetzten Hydroxylamins erheblich erniedrigt, allerdings gelingt es so nicht, das vorliegende Chromophor-Oxim vollständig aus der Probe zu entfernen, da dieses vermutlich an die Oberfläche vorhandener Proteine und mit der Membran assoziiert ist und nicht in die Lösung übergeht. Somit verbleibt nach der Bleichung unterhalb von 400 nm eine deutliche Absorption des jeweiligen Oxims. Allerdings hat die Anwesenheit dieser Verbindung während der vorzunehmenden Messungen keinen Einfluß auf die Reaktionen des Opsins. Erschwerend kommt hinzu, daß nach der Rekonstitution des Proteins mit einem Überschuß an Chromophor dieser wiederum mit Hydroxylamin zur Reaktion gebracht und erneut Oxim erzeugt wird. Somit liegt in der zu vermessenden Probe eine nochmals erhöhte Absorption bei kurzen Wellenlängen vor.

Alle Untersuchungen erfolgten hier unter Verwendung der "washed membranes", d. h. der Rhodopsin-enthaltenden Membranscheiben der äußeren Segmente der Stäbchenzellen, von denen die Proteine der Enzymkaskade abgetrennt wurden.

3.2.2.1 Rekonstitution

Für die Inkorporation von 11*Z*-Retinal in Opsin wird ein zweistufiger Prozeß angenommen[207]. Der erste Schritt der Reaktion wird der Entstehung der Einfachbindung zum Lys296 und der zweite der Wasserabspaltung zur Ausbildung der Schiff-Base zugeschrieben. Die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion ist dabei deutlich von der Konzentration der beiden Reaktionspartner abhängig[208].

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inkorporationen wurde jeweils ein ungefähr dreifach molarer Überschuß an Chromophor zur Suspension des Opsins in Ringer-Lösung (pH 7.0) zugesetzt. Es wurde die Suspension des Proteins und keine

Lösung in einem Detergens verwendet, um dessen eventuell störenden Einfluß auf die Kinetik der Rekonstitution zu vermeiden. Darüber hinaus hat die Qualität des Apoproteins ebenfalls einen erheblichen Einfluß auf die Kinetiken der Reaktionen. Die im weiteren aufgeführten Rekonstitutionen und deren Einbaukinetiken basieren auf zwei Protein-präparationen, die eine vergleichbare Qualität besaßen. Als Anhaltspunkt für die Qualität wurde jeweils ein Aliquot mit 11*Z*-Retinal rekonstituiert. Insgesamt besteht nur eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Kinetiken, so daß diese weniger eine quantitative und mehr eine qualitative Aussagekraft besitzen.

Vorab ist zu erwähnen, daß die Charakterisierung der Verbindung 9-Isopropylretinal als prosthetische Gruppe in Rhodopsin nicht vorgenommen werden konnte, da das 11*Z*-Isomer nur in einer sehr geringen Menge in das Opsin eingebaut wird. In der Abb. 3-100 sind die bei der Rekonstitution und anschließenden Bleichung erhaltenen Absorptions-spektren abgebildet.

Interessanterweise ist bei der Inkorporation der analogen Verbindungen (Abb. 3-95 bis Abb. 3-99) ein sehr vergleichbares Reaktionsschema zur Rekonstitution des nativen Chromophors (Abb. 3-94) zu beobachten: Nach der Zugabe der Chromophorlösung tritt zunächst ein Intermediat in Erscheinung, das im Vergleich zum freien Aldehyd in alkoholischer Lösung ein bathochrom verschobenes Absorptionsmaximum bei 400 nm aufweist. Die Ursache dieser Zwischenstufe könnte in der Assoziation des noch freien Aldehyds an die Oberfläche des Proteins oder auch der Membran und einer Beeinflussung des Extinktionskoeffizienten des Chromophors zu suchen sein. Möglicherweise befindet sich der Chromophor in Analogie zum 430-460 nm-Chromophor bei der Assemblierung von Bacterioopsin bereits in der Bindungstasche des Proteins, ohne daß allerdings eine kovalente Anbindung zum Protein besteht. Mit der weiteren Reaktion ist eine Absorptions-änderung bei kurzen Wellenlängen und eine Zunahme der Absorption in der Nähe des Absorptionsmaximums des jeweiligen Chromoproteins festzustellen. Diese Reaktion könnte einer Positionsänderung des Chromophors und der beginnenden Ausbildung der Einfachbindung zum Protein zugeschrieben werden. Beim zweiten Reaktionsschritt ist insbesondere die weitere Zunahme der langwelligen Absorption zu beobachten, so daß vom zweiten Schritt in der Entstehung der Schiff-Base ausgegangen werden kann. Die dritte Reaktion beinhaltet dann die korrekte Positionierung des Chromophors in der Bindungstasche und entsprechende Änderungen in der Konformation des Proteins. Diese Zuordnung würde die zu beobachtende Zunahme der Absorption bzw. des Extinktions-

koeffizienten am Maximum des entstehenden Chromoproteins erklären. Für die Verdeutlichung des letzten Reaktionsschritts ist bei den nachfolgend dargestellten Intermediatspektren zusätzlich immer die Konstante des Globalfits in die Abbildung aufgenommen worden, da deren Verlauf mit dem Absorptionspektrum des Endprodukts der Rekonstitution übereinstimmt.

Bei der Rekonstitution von Opsin mit 11Z-Retinal konnte eine erneute Besetzung der Bindungsstelle des Proteins (Rekonstitutionsrate) mit einer Ausbeute von über 90 % erreicht werden (Abb. 3-94).

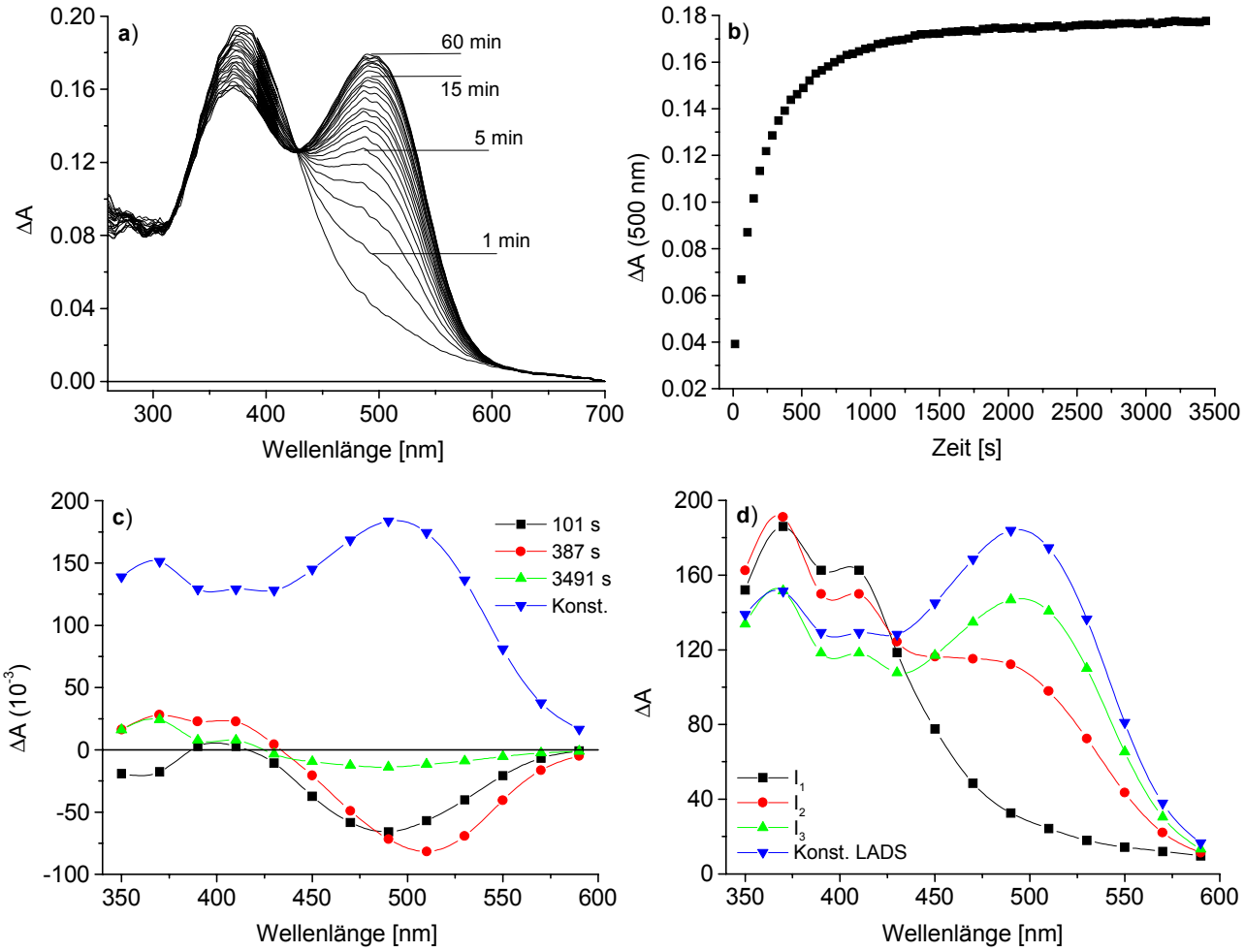


Abb. 3-94 Rekonstitution von Opsin mit 11Z-Retinal in Ringer-Lösung bei pH 7.0 (20 °C): a) Differenzspektren (Auswahl) zur Opsinsuspension, b) der Absorptionsverlauf am Absorptionsmaximum, c) LADS der Einbaureaktion und d) die daraus berechneten Absorptionsspektren der auftretenden Zwischenstufen sowie die Konstante des Globalfits.

Die Inkorporation von 11Z-9-Demethylretinal zeigt in den ersten beiden Schritten eine zum nativen Chromophor vergleichbare Geschwindigkeit (Abb. 3-95). Die letzte Reaktion benötigt aber eine deutlich längere Zeit, so daß die Gesamtreaktion erst nach mehr als

sechs Stunden abgeschlossen ist. Das Erscheinungsbild der Intermediatspektren ist in guter Übereinstimmung mit der oben vorgenommenen allgemeinen Beschreibung. Die Rekonstitutionsrate von 11*Z*-9-Demethylretinal betrug ca. 60 % und entspricht damit den bisherigen Ergebnissen[87,88].

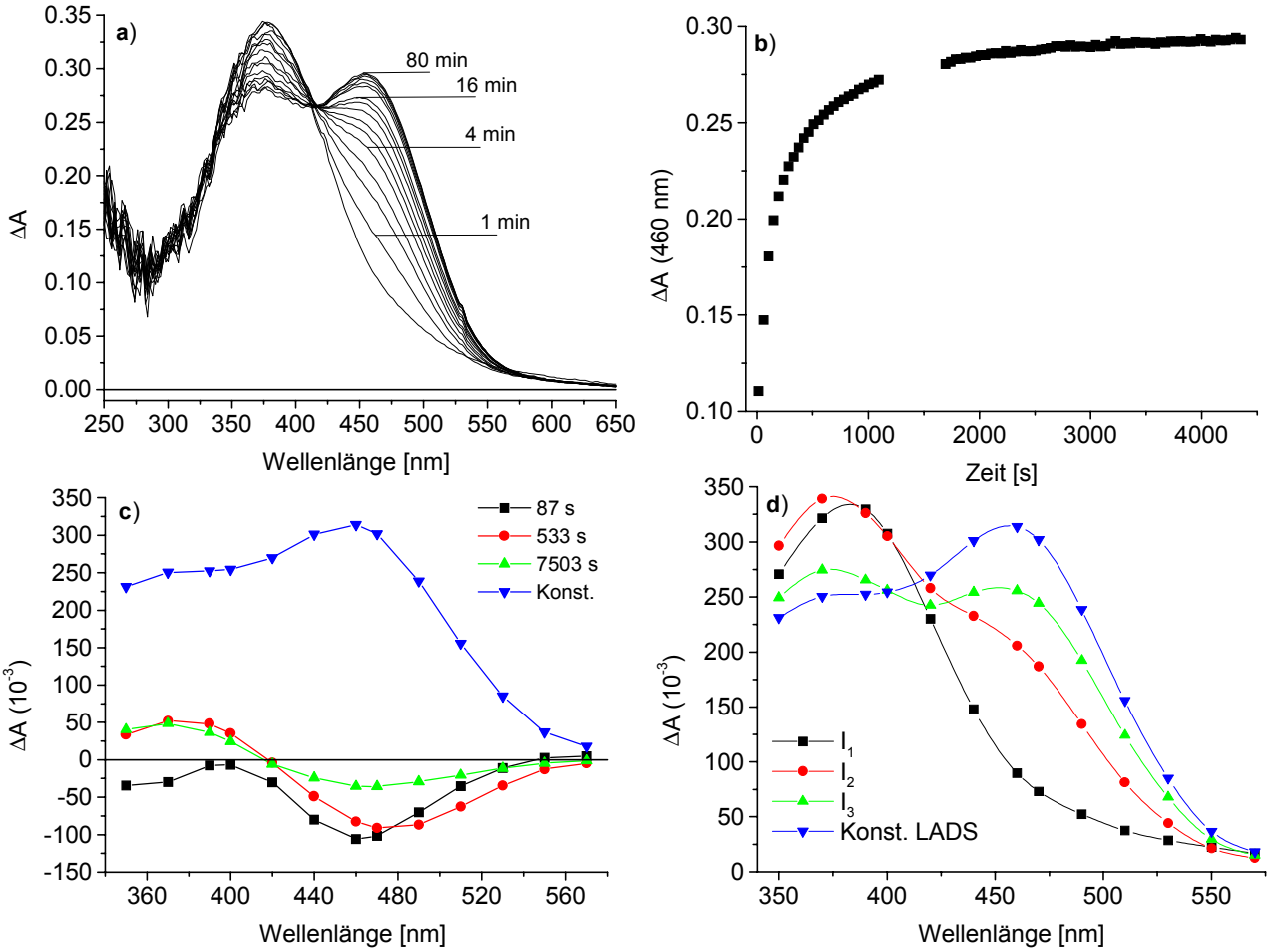


Abb. 3-95 Rekonstitution von Opsin mit 11*Z*-9-Demethylretinal in Ringer-Lösung bei pH 7.0 (20 °C): a) Differenzspektren zur Opsinsuspension (Intervall 45 s, zwischen 1100 und 1700 s Messungsunterbrechung), b) der Absorptionsverlauf am Absorptionsmaximum, c) LADS der Einbaureaktion und d) die daraus berechneten Absorptionsspektren der auftretenden Zwischenstufen sowie die Konstante des Globalfits.

Im Fall von 9-Ethylretinal ist in der Auswertung der Absorptionsverläufe eine vierte relativ große Lebenszeit von ca. 15 h notwendig (Abb. 3-96). Die dieser Zeit zugrunde liegende Reaktion ist allerdings nicht mehr als Teil der Rekonstitution zu betrachten, sondern kann auf das Absetzen eines Teils des Proteins aus der Suspension zurückgeführt werden; darauf weist auch die Abnahme der Absorption am Maximum des Chromoproteins hin (Abb. 3-96b). Somit wird der Endpunkt der Reaktion nicht durch die Konstante des Globalfits beschrieben (Abb. 3-96d). Aufgrund der geringen Einbaurate von

ca. 40 % werden die Absorptionsspektren im wesentlichen durch die Absorption des Chromophors dominiert, die LAD-Spektren sind aber trotzdem in Übereinstimmung mit denen der anderen analogen Pigmente. Die Geschwindigkeit des Einbaus verläuft im Vergleich zu Retinal insbesondere im zweiten Schritt signifikant langsamer, so daß die Inkorporation der Verbindung erst nach ca. 4 h vollständig abgeschlossen ist.

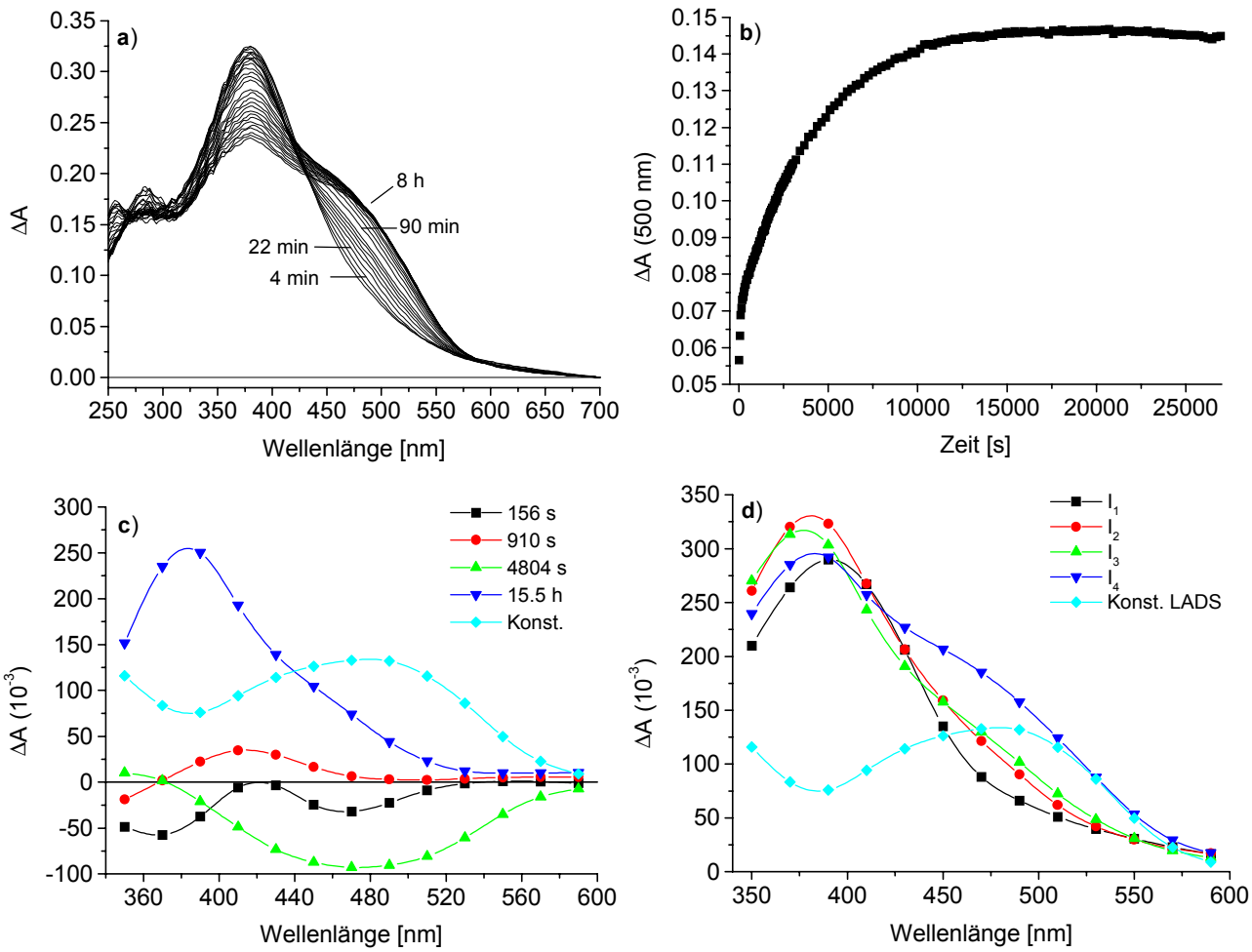


Abb. 3-96 Rekonstitution von Opsin mit 11*Z*-9-Ethylretinal in Ringer-Lösung bei pH 7.0 (20 °C): a) Differenzspektren (Auswahl) zur Opsinsuspension, b) der Verlauf der Absorption am Maximum, c) LADS der Einbaureaktion und d) die daraus berechneten Absorptionsspektren der auftretenden Zwischenstufen sowie die Konstante des Globalfits.

Bei der Rekonstitution von Opsin mit 11*Z*-13-Demethylretinal ist das gleiche Verhalten zu beobachten wie bei 9-Ethylretinal (Abb. 3-97): Der erste und dritte Reaktionsschritt besitzt eine zu Retinal vergleichbare Geschwindigkeit, während der zweite Übergang deutlich verlangsamt ist. Für die vollständige Einbaureaktion sind insgesamt mehr als 5 h notwendig. Mit dem verwendeten Beobachtungszeitraum wurde die Rekonstitution nicht vollständig verfolgt, die komplette Reaktion wird allerdings durch den Globalfit

berücksichtigt. Die LAD-Spektren sind auch bei diesem Derivat vergleichbar zu Retinal und in Übereinstimmung mit der allgemeinen Beschreibung. Der Einbau erfolgt ähnlich wie *Lin et al.*[87] beschrieben, mit einer Rekonstitutionsrate von ca. 50 %.

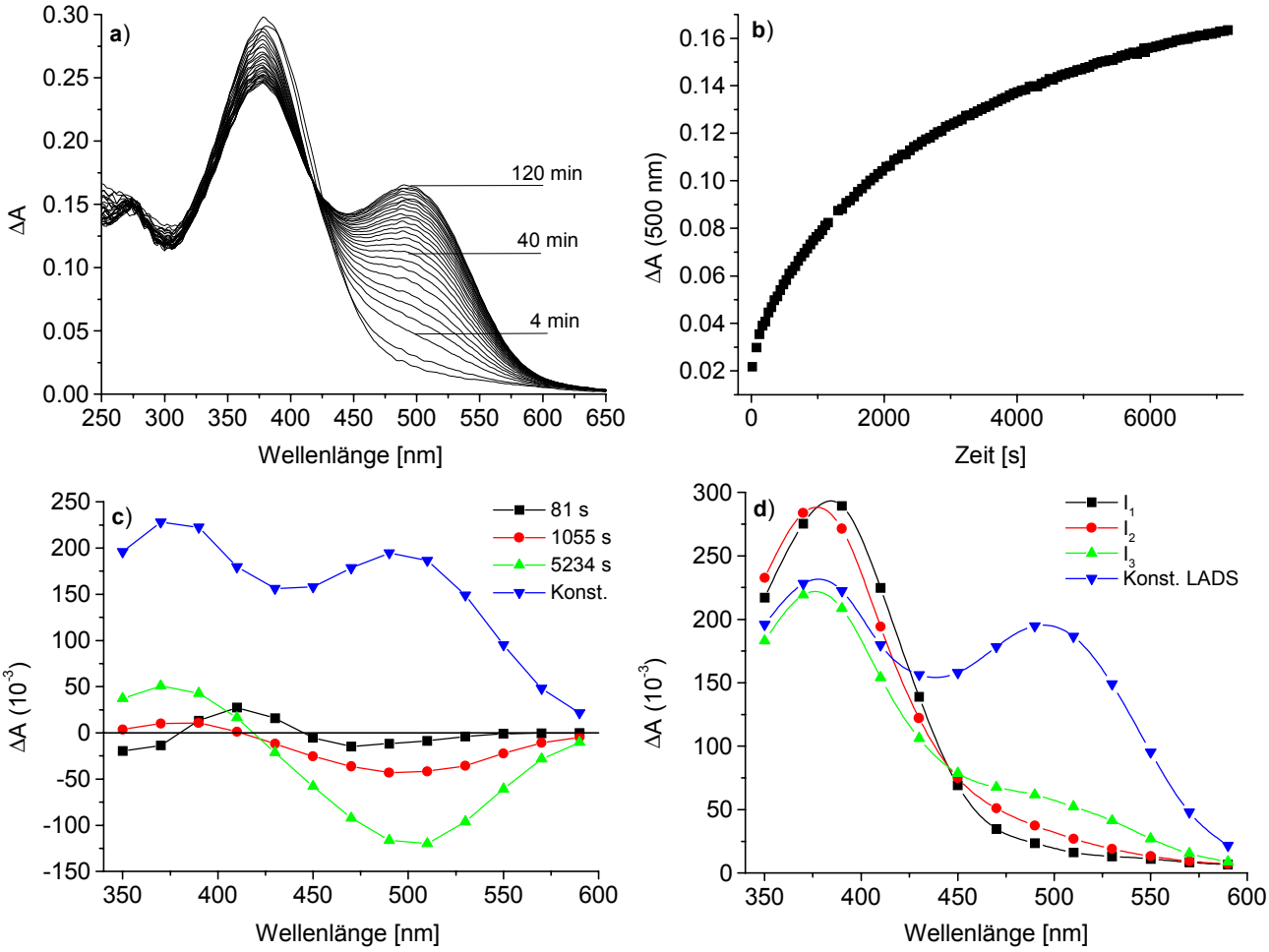


Abb. 3-97 Rekonstitution von Opsin mit 11*Z*-13-Demethylretinal in Ringer-Lösung bei pH 7.0 (20 °C): a) Differenzspektren (Auswahl) zur Opsinsuspension, b) der Verlauf der Absorption am Maximum, c) LADS der Einbaureaktion und d) die daraus berechneten Absorptionsspektren der auftretenden Zwischenstufen sowie die Konstante des Globalfits.

Die Rekonstitution von Opsin mit 11*Z*-10-Methyl-13-demethylretinal benötigt insgesamt eine Zeit von mindestens 6 h (Abb. 3-98). Der Gesamtprozeß wird vor allem durch die lange Lebenszeit der zweiten Reaktion verzögert, während die erste und dritte Lebenszeit wiederum vergleichbar zu den entsprechenden Zeiten von Retinal sind. Wie anhand des abknickenden Absorptionsverlaufs zu erkennen ist, wird die Mesung der Einbaureaktion über diesen langen Zeitraum analog zu 9-Ethylretinal durch das Ausfallen des Proteins und der damit verbundenen Abnahme der Absorption beeinflußt. Dieses kann aber nicht mit einer weiteren Lebenszeit berücksichtigt werden und führt somit insbesondere zur

Verfälschung der Amplitude der längsten Lebenszeit. Zusätzlich beträgt die Rekonstitutionsrate nur ca. 30 %, so daß die Absorptionsspektren einen großen Anteil des ungebundenen Aldehyds zeigen. Beim Übergang vom ersten zum zweiten Intermediat ist die bekannte hypsochrome Absorptionsabnahme um 400 nm zu beobachten, während beim dritten Intermediatspektrum keine langwellige Zunahme der Absorption zu erkennen ist.

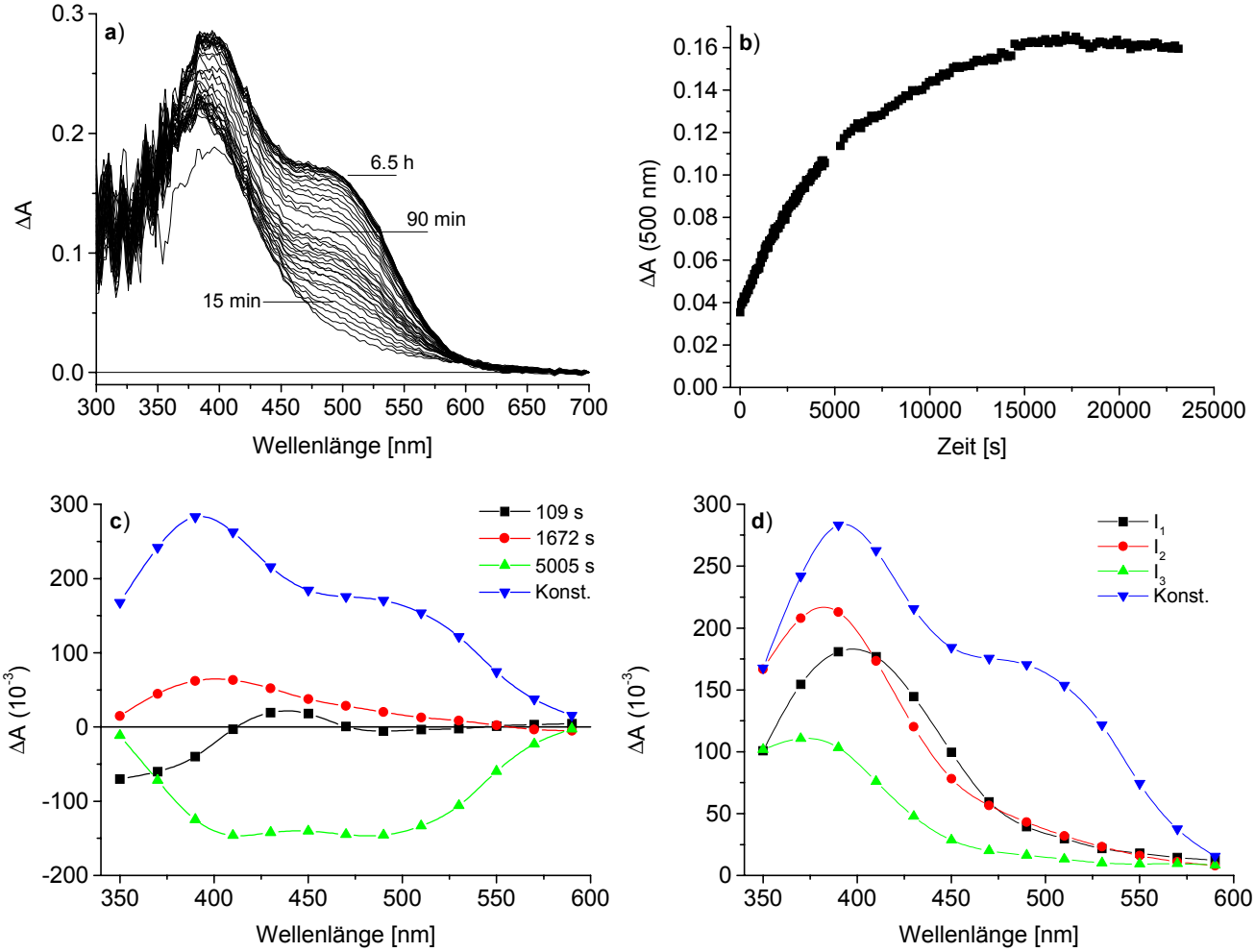


Abb. 3-98 Rekonstitution von Opsin mit 11*Z*-10-Methyl-13-demethylretinal in Ringer-Lösung bei pH 7.0 (20 °C): a) Differenzspektren zur Opsinsuspension (Auswahl), b) der Absorptionsverlauf am Absorptionsmaximum, c) LADS der Einbaureaktion und d) die daraus berechneten Absorptionsspektren der auftretenden Zwischenstufen sowie die Konstante des Globalfits.

Die Inkorporation von 11*Z*-10-Methylretinal konnte nur bei Wellenlängen größer 350 nm beobachtet werden, da das verwendete Spektralphotometer eine geringere Streuungsunterdrückung besaß als das bei den anderen Messungen eingesetzte Gerät (s. Experimenteller Teil, Punkt 4). Beim Vergleich vom ersten und zweiten Intermediatspektrum ist im Gegensatz zur Rekonstitution von Opsin mit Retinal eine deutliche Abnahme der Absorption über den gesamten Wellenlängenbereich zu erkennen. Darüber

hinaus zeigt sich eine Entstehung des Chromoproteins beim zweiten Spektrum nur anhand einer sehr kleinen Zunahme der Absorption; diese ist allerdings beim dritten Intermediatspektrum deutlich zu erkennen. Insgesamt verläuft die Einbaureaktion erheblich langsamer als mit Retinal. Verantwortlich ist vor allem die lange Lebenszeit der zweiten Zwischenstufe, die vergleichbar zu der des 13-Demethylanalogs ist. Die Rekonstitutionsrate des 11*Z*-10-Methylretinal wurde zu ca. 40 % bestimmt.

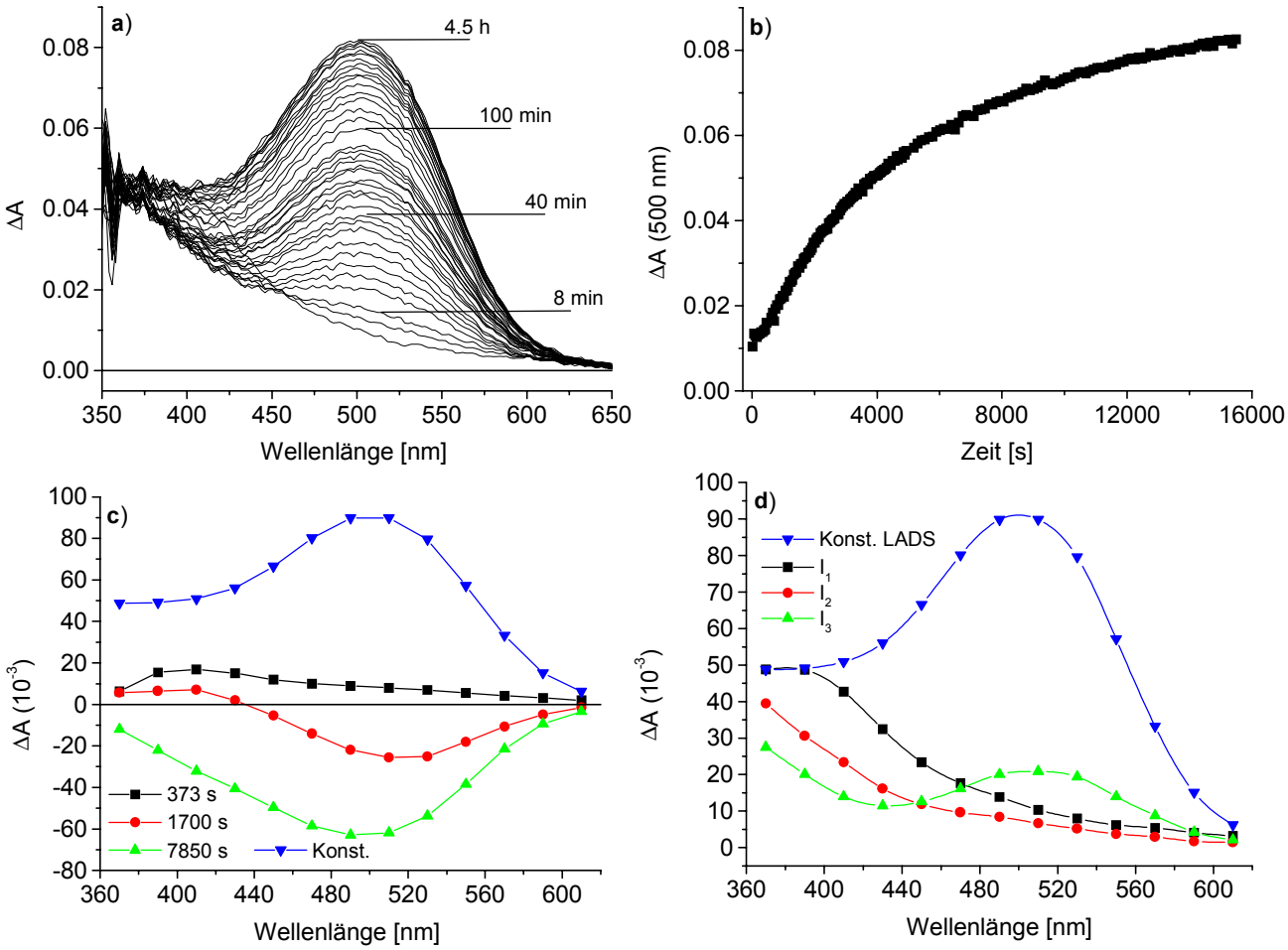


Abb. 3-99 Rekonstitution von Opsin mit 11*Z*-10-Methylretinal in Ringer-Lösung bei pH 7.0 (20 °C): a) Differenzspektren zur Opsinsuspension (Auswahl), b) der Verlauf der Absorption am Maximum, c) LADS der Einbaureaktion und d) die daraus berechneten Absorptionsspektren der auftretenden Zwischenstufen sowie die Konstante des Globalfits.

Zusammenfassung Rekonstitution von Opsin

Insgesamt führen die Modifizierungen der Retinalanaloga bei der Rekonstitution von Opsin im Gegensatz zu den Assemblierungen von Bacterioopsin zu einer geringeren Beeinflussung des Reaktionschemas der Einbaureaktion. Der Gesamtprozeß der Rekonstitution ist in allen Fällen mit drei Lebenszeiten zu beschreiben (Tab. 3-22); die vierte Lebenszeit bei 9-Ethylretinal ist auf die Aggregation des Proteins zurückzuführen und somit nicht mehr als Teil der Einbaureaktion zu betrachten. Die LAD-Spektren der auftretenden Zwischenstufen zeigen ebenfalls bei allen Verbindungen ein vergleichbares Erscheinungsbild. Die schnellste Rekonstitution erfolgt mit 11*Z*-Retinal und zeigt somit wie auch bei Bacteriorhodopsin die optimale Ausrichtung der Bindungstasche auf die Struktur der prosthetischen Gruppe. Die sterischen Restriktionen des Proteins gegenüber der Position 9 des Chromophors zeigen sich deutlich an der geringen Einbaurate von 9-Ethylretinal (40 %) und insbesondere von 9-Isopropylretinal (ca. 3 %).

Tab. 3-22 Kinetiken der Rekonstitution von Opsin mit 11*Z*-Retinal und den 11*Z* konfigurierten Retinalderivaten [s].

	9-dm	Retinal	9-Et	13-dm	MD	10-Me
τ_1	87	101	156	81	109	373
τ_2	533	387	910	1055	1672	1700
τ_3	7503	3491	4804	5234	5005	7850
τ_4			15.5 h			

Eine Korrelation zwischen den Substitutionsmustern der Derivate und den Geschwindigkeiten der einzelnen Reaktionen kann bedingt mit dem Raumbedarf einer Verbindung und der entsprechenden Beweglichkeit innerhalb des Proteins vorgenommen werden. Der erste Reaktionsschritt, die Positionierung des Chromophors in der Bindungstasche und die Ausbildung der Einfachbindung, ist vor allem bei den sterisch anspruchsvollen Verbindungen 9-Ethylretinal und 10-Methylretinal verzögert, während dieser Schritt bei 9-Demethylretinal und 13-Demethylretinal gegenüber Retinal schneller verläuft. Der Raumbedarf der Verbindung 10-Methyl-13-demethylretinal ist vergleichbar zu Retinal, und dementsprechend sind auch die Lebenszeiten ähnlich. Eine deutlichere Differenz kann bei den Derivaten in der Geschwindigkeit der zweiten Reaktion beobachtet werden. Dieser Übergang benötigt bei Retinal im Vergleich zu den analogen Verbindungen die geringste Zeit. Für den zweiten Schritt in der Ausbildung der Schiff-Base wird für die dabei notwendige Wasserabspaltung die Mitwirkung eines Protonendonors in

Erwägung gezogen[207]. Die veränderte Position der Retinalderivate in der Bindungstasche könnte dazu führen, daß die katalytische Funktion dieses Aminosäurerests verringert wird, womit die Geschwindigkeit der Reaktion abnähme. Wie anhand der entsprechenden Lebenszeiten für 10-Methylretinal und 10-Methyl-13-demethylretinal zu erkennen ist, scheint die bei diesen Verbindungen zusätzlich vorhandene 10-Methylgruppe die Reaktion am deutlichsten zu verzögern. Die Geschwindigkeit des letzten Schritts der Rekonstitution ist bei den Derivaten wiederum vergleichbarer, wobei 9-Demethylretinal und 10-Methyl-13-demethylretinal die größte Lebenszeiten aufweisen. Vermutlich verursacht der verringerte sterische Anspruch bei 9-Demethylretinal eine Verzögerung der notwendigen Konformationsänderung des Chromoproteins, während dieses bei 10-Methyl-13-demethylretinal einerseits durch das Fehlen der 13-Methylgruppe und andererseits infolge der zusätzlichen 10-Methylgruppe verursacht wird. Dafür spricht die ebenfalls relativ große dritte Lebenszeit bei den Verbindungen 13-Demethylretinal und 10-Methylretinal. Allgemein ist die 13-Methylgruppe für die Anbindung des Chromophors weniger von Bedeutung als dieses beim bakteriellen Protein zu beobachten ist.

3.2.2.2 Spektrale Eigenschaften

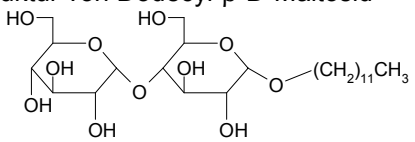
3.2.2.2.1 Absorptionsmaxima

Die Rekonstitutionen des Opsins im präparativen Maßstab wurden alle in Ringer-Lösung durchgeführt, um, wie eingangs erwähnt, mittels der anschließenden Waschvorgänge das überschüssige Hydroxylamin entfernen zu können. Zur Ermittlung der notwendigen Rekonstitutionszeiten für die verschiedenen Retinalderivate erfolgten die Messungen der Einbaukinetiken unter identischen Bedingungen. Für die weiteren Untersuchungen wurde das Protein dann mit Hilfe des Detergens Dodecyl-β-D-maltosid (DDM)[j] gelöst. Durch die Verwendung eines Detergens ist insbesondere die Streuung der Proben für die weiteren spektroskopischen Charakterisierungen deutlich zu reduzieren. Unter den verschiedenen für Membranproteine zur Verfügung stehenden Detergenzien besitzt DDM mehrere Vorteile[209]: Es ist nicht ionisch und besitzt eine große Eigenschaft zur Stabilisierung des Proteins. Durch die Verhinderung von Aggregation und Degeneration können die rekonstituierten Rhodopsine somit über einen Zeitraum von ca. zwei Wochen im Kühlschrank gelagert werden, ohne daß die Funktionalität und die spektralen Eigenschaften beeinflußt werden. Zusätzlich weist DDM eine gute Löslichkeit in wäßrigen Medien auf und besitzt keine kurzwellige Absorption, die sich auf die Absorptionsspektren der Verbindungen auswirken würde. Nicht zu vernachlässigen ist der ungiftige Charakter dieser Substanz.

Aufgrund des Problems, daß die Oxime der Chromophore nicht aus den rekonstituierten Proben entfernt werden konnten, wurden die Absorptionsmaxima der Chromoproteine nur anhand der Differenzspektren der Bleichung bestimmt (Abb. 3-100). Das Absorptionsmaximum des jeweils entstehenden Oxims liegt allerdings vom Maximum des entsprechenden Chromoproteins soweit entfernt, daß der auf diesem Weg erhaltene Wert mit dem einer aufgereinigten Probe sehr gut übereinstimmt. Dieses kann auch durch das native Rhodopsin bestätigt werden, dessen Absorptionsmaximum sowohl im Absorptions- als auch im Differenzspektrum bei 500 nm vorzufinden ist.

---

[j] Struktur von Dodecyl-β-D-Maltosid



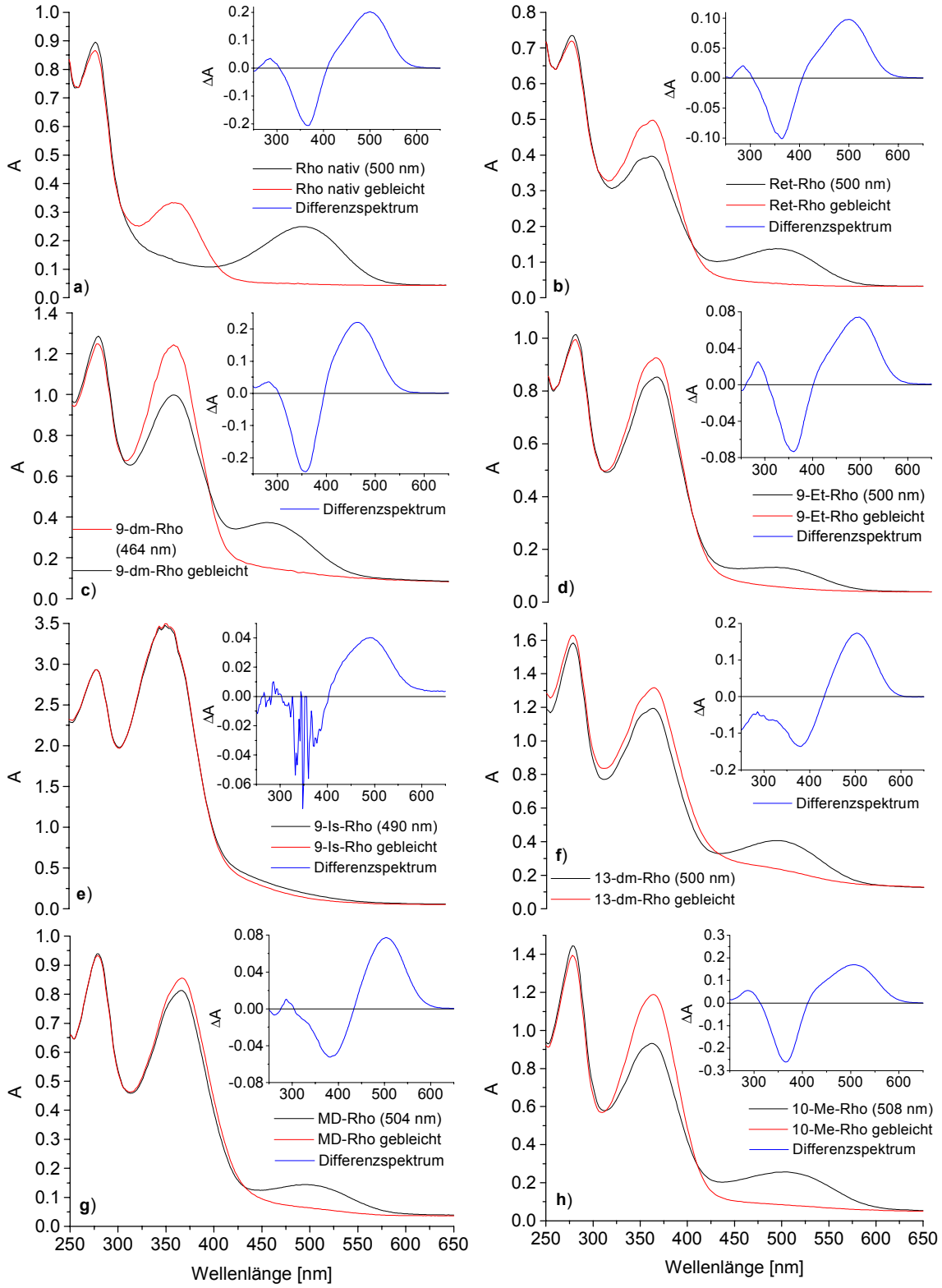


Abb. 3-100 Vollständige Bleichung von nativem und rekonstituiertem Rhodopsin sowie der analogen Chromoproteine. Die kleinen Abbildungen zeigen jeweils das Differenzspektrum zwischen dem Protein vor und nach der Belichtung: a) natives Rhodopsin, b) rekonstituiertes Rhodopsin, c) 9-Demethylretinal-Rhodopsin, d) 9-Ethylretinal-Rhodopsin, e) 9-Isopropylretinal-Rhodopsin, f) 13-Demethylretinal-Rhodopsin, g) 10-Methyl-13-demethylretinal-Rhodopsin, h) 10-Methylretinal-Rhodopsin (Ringer-Lösung pH 7.0, Detergenz DDM, Ausnahme 9-Isopropylretinal-Rhodopin mit 3 % LDAO). Durch den für die Rekonstitution verwendeten Überschuß an Chromophor beinhalten die jeweiligen Spektren eine deutliche Absorption des Oxims.

3.2.2.2.2 Extinktionskoeffizienten

Wie in der Einleitung angeführt, finden sich in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben zu den Extinktionskoeffizienten der Chromoproteine und in Folge ebenfalls sehr verschiedene Werte für die Quantenausbeuten. Aus diesem Grund wurde die hier vorgenommene Bestimmung der Extinktionskoeffizienten besonders sorgfältig durchgeführt. Der Grund für die Variation der Literaturwerte ist zum Teil in der Verwendung unterschiedlicher Vorgehensweisen in der Bestimmung der Werte zu suchen. Eine Methode besteht in der Rekonstitution von identischen Opsin-Mengen zum einen mit Retinal und zum anderen mit dem Derivat. Durch den Vergleich der Absorptionen nach vollständigem Einbau, kann dann anhand des bekannten Extinktionskoeffizienten des Rhodopsins der Wert für das analoge Chromoprotein berechnet werden[210]. Wie bei den Ergebnissen der Rekonstitutionen von Opsin mit den hier verwendeten Retinalderivaten aufgeführt (s. Punkt 3.2.2.1), besteht aber ein deutlicher Unterschied in den Rekonstitutionsraten der verschiedenen Verbindungen. Dieses hat zur Folge, daß ein Vergleich der Absorptionen von rekonstituiertem und analogem Rhodopsin auf sehr unterschiedlichen Mengen von Chromoproteinen basiert und die damit berechneten Extinktionskoeffizienten einen sehr großen Fehler beinhalten. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten kann unter Ausnutzung von zwei Aspekten vorgenommen werden: Häufig ist die Anbindung eines Retinalderivats an das Protein weniger stabil als die des nativen Chromophors, so daß nach Zusatz von 11*Z*-Retinal zum analogen Chromoprotein das Derivat aus der Bindungstasche verdrängt werden kann. Desweiteren besitzen einige artifiziellen Rhodopsine gegenüber Hydroxylamin eine verringerte Stabilität als das native Pigment, so daß sie durch den Zusatz oberhalb einer bestimmten Aminkonzentration in einer Dunkelreaktion gebleicht werden, während das native System erhalten bleibt. Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten wird nun die Probe des vollständig rekonstituierten analogen Rhodopsins mit 11*Z*-Retinal versetzt und die Veränderung der Absorption infolge des Austausches registriert. Durch den Zusatz von Hydroxylamin wird dann der nicht ausgetauschte Teil der analogen Verbindung gebleicht und anhand der Absorptionsabnahme kann die verbliebene Menge des Retinalderivats in der Bindungstasche ermittelt werden. Damit ergibt sich der Faktor, mit dem die nach der Retinalzugabe erhaltene Absorptionsänderung multipliziert werden muß, um die nur unvollständige Verdrängung des Derivats zu berücksichtigen. Das Verhältnis des korrigierten Absorptionswerts für einen vollständigen Austausch zur ursprünglichen Absorption des analogen Chromoproteins repräsentiert dann das Verhältnis zum Extinktionskoeffizienten des

nativen Systems[70]. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß sie nur bei analogen Chromoproteinen angewendet werden kann, die gegenüber Hydroxylamin deutlich instabiler sind als natives Rhodopsin und deren Chromophor in einem ausreichenden Maße gegen Retinal auszutauschen ist. Andernfalls sind die zu beobachtenden Absorptionsänderungen nur gering und in der Dunkelreaktion wird ebenfalls nativer Chromophor aus der Bindungstasche entfernt.

Da die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Retinalderivate diesbezüglich ein sehr unterschiedliches Verhalten besitzen, wurden die Extinktionskoeffizienten nach einer weiteren, vielfach verwendeten Methode bestimmt[211]: Dabei wird das Verhältnis der Absorption des Chromoproteins vor und der Absorption des Oxims, das quantitativ gebildet wird, nach der Belichtung ermittelt. Bei einem bekannten Extinktionskoeffizienten des Oxims kann dann der Wert des entsprechenden Rhodopsins berechnet werden.

Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Oxime erfolge mit Hilfe der Lösungen, die für die Ermittlung der Extinktionskoeffizienten der freien Aldehyde hergestellt worden waren und die eine definierte Konzentration besaßen (s. Punkt 3.1.2.3 bzw. 4.1.1.10). Zur Berücksichtigung der Matrix des Mediums, in der das Oxim nach der Bleichung des Chromoproteins vorliegt, wurden die Extinktionskoeffizienten der Oxime unter identischen Bedingungen bestimmt (Ringer-Lösung mit Detergens in Gegenwart von Opsin; s. Punkt 4.2.2.7). Mit der Durchführung der Bleichungen zur Ermittlung der Quantenausbeuten (s. Punkt 3.2.2.3) stand eine große Anzahl von Absorptionsspektren zur Bestimmung der Absorptionsverhältnisse zur Verfügung. Allerdings konnte die Verhältnisbildung aufgrund von zwei störenden Effekten nicht direkt anhand der Differenzspektren erfolgen, die für die Berechnung der Quantenausbeute zu verwenden sind: Während die Photoreaktion von nativem Rhodopsin in Gegenwart von 10 mM Hydroxylamin innerhalb von einer Minute abgeschlossen und der Chromophor zum Oxim abreagiert ist, benötigt dieser Prozeß bei den analogen Chromoproteinen teilweise eine erheblich längere Zeit (s. Tab. 3-24, S. 199). Zusätzlich ist die Stabilität gegen Hydroxylamin zum Teil deutlich geringer, so daß dessen Konzentration zur Beschleunigung der Reaktion nicht erhöht werden kann, ohne bereits eine Dunkelreaktion zu induzieren. Je länger nun die notwendige Wartezeit, desto mehr ist eine Abnahme der Absorption des Oxims zu beobachten, die zu einer Verfälschung in der Berechnung des Absorptionsverhältnisses führt. Die Ursache dieses Effekts liegt vermutlich in der Reaktion des Oxims mit Bestandteilen der komplexen Matrix der Probe, wie der Membran oder dem Detergens, in deren Folge die Absorption des

Oxims abnimmt. Die Abnahme der Absorption war ebenfalls bei der Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Oxime zu beobachten. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Nebenreaktion konnte aber dadurch vermieden werden, daß die Bildung des Oxims ständig mittels Absorptionsspektren kontrolliert wurde.

Die zweite Störung hatte folgende Ursache: Für die Ermittlung der Quantenausbeuten sind die Differenzspektren aus den Absorptionsspektren nach jeder Belichtung und dem Spektrum des vollständig gebleichten Rhodopsins zu berechnen. Aufgrund der teilweise geringen Photosensitivitäten (Produkt aus Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient, s. Tab. 3-24) der Verbindungen, konnte die vollständige Bleichung nur durch Belichtung mittels eines cut-off-Filters anstelle des Interferenzfilters erreicht werden. Dieses verursachte dann neben der Bleichung des Proteins auch eine Abnahme der Absorption des Oxims, obwohl das transmittierte Licht des cut-off-Filters (470 nm) oberhalb der Absorption des Oxims lag. In Folge wird bei den Differenzspektren der isosbestische Punkt verschoben, so daß die Berechnung des Absorptionsverhältnisses und der Quantenausbeuten mit einem Fehler behaftet ist.

Es konnte zwar ein Weg zur Korrektur der Absorptionsspektren gefunden werden, der eine sicherere Bestimmung der Quantenausbeuten ermöglichte, zur Ermittlung der Absorptionsverhältnisse waren diese Spektren jedoch nicht geeignet (s. u. Punkt 3.2.2.3). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Absorptionswerte der Differenzspektren zu verwenden, die aus den Spektren der verschiedenen Bleichungsschritte jeweils zum *unbelichteten* Absorptionsspektrum berechnet wurden. Somit werden Differenzspektren erhalten, die nicht mehr vom Spektrum des vollständig gebleichten Proteins abhängig sind. Es besteht aber wiederum ein Bezug zu einer Referenz, so daß auch die Absorptionswerte erneut nur so gut sein können, wie die Qualität dieses Spektrums. Darüber hinaus beinhaltet diese Vorgehensweise noch keine Berücksichtigung der im Verlauf der Bleichung abnehmenden Oximabsorption. Ein Ausweg ergab sich, indem anstatt der Differenzspektren die Absorptionsspektren der Bleichung verwendet wurden. Zusätzlich wurden nicht die Absolutwerte der Spektren zur Berechnung herangezogen, sondern die jeweilige Differenz zwischen zwei (oder mehr) aufeinanderfolgenden Absorptionsspektren. Somit konnte zusätzlich die abnehmende Absorption des Oxims am besten berücksichtigt werden, da diese mit dem Anstieg der Oximkonzentration im Verlauf der Bleichung auch stärker in Erscheinung tritt. Auf diesem Weg war dann die Berechnung der Absorptionsverhältnisse anhand der bei den jeweiligen Chromoproteinen mehrmals

durchgeführten Bleichungen reproduzierbar zu ermitteln und die Extinktionskoeffizienten der Chromoproteine sicher zu bestimmen. Diese Methode ist anwendbar sowohl am Absorptionsmaximum als auch bei der Anregungswellenlänge, die für die Bleichung der Proteine zur Ermittlung der Photosensitivität zu verwenden ist (s. Punkt 3.2.2.3).

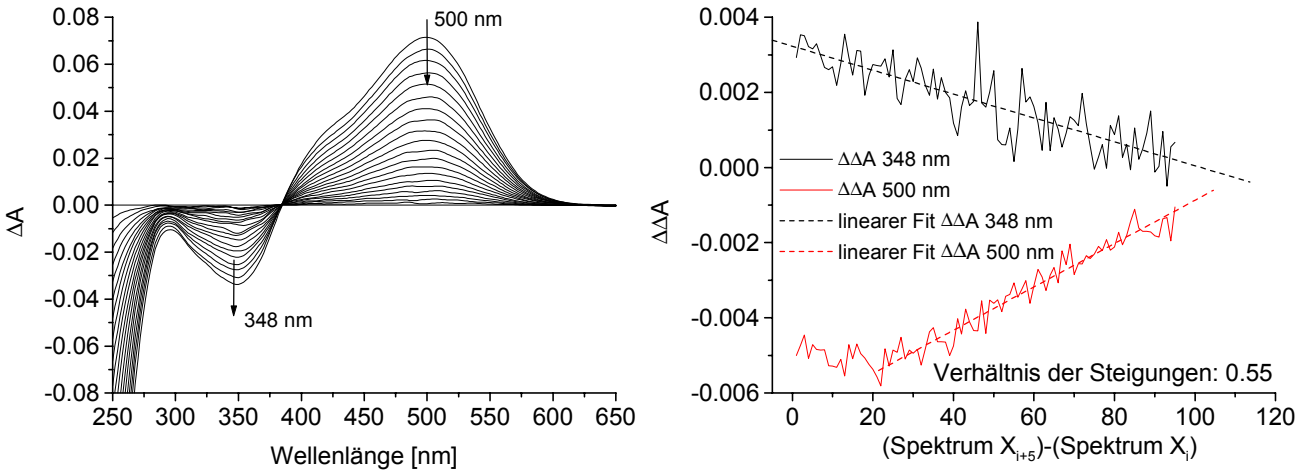


Abb. 3-101 Dunkelreaktion von 10-Methyl-13-demethylretinal-Rhodopsin in Gegenwart von 10 mM Hydroxylamin: Differenzspektren (Auswahl) zum gebleichten Chromoprotein (links) und die Absorptionsdifferenz zwischen aufeinanderfolgenden Spektren (ΔΔA) bei 500 und 348 nm sowie der lineare Fit der jeweiligen Differenwerte zur Bestimmung des Steigungsverhältnisses (rechts).

Allerdings gelang dieses nicht im Falle von 10-Methyl-13-demethylretinal-Rhodopsin. Die Stabilität dieses artifiziellen Rhodopsins gegenüber Hydroxylamin ist so gering, daß bei den Bleichungen das Amin nur in einer Konzentration von 5 µM zugesetzt werden konnte und nach jeder Belichtung eine Wartezeit von mind. 40 min einzuhalten war. Infolge der geringen Aminkonzentration wurde der frei werdende Chromophor nicht mehr vollständig abgefangen und es entstand ein deutliches Mißverhältnis zwischen der Absorption des Oxims und der des Chromoproteins. Das so ermittelte Verhältnis von 0.6 ergäbe einen Extinktionskoeffizienten von ca. 70000 l mol^{-1} cm^{-1}, der für ein analoges Rhodopsin viel zu groß ist. Aus diesem Grund wurde der folgende Weg beschritten: Durch den Zusatz von Hydroxylamin in einer Konzentration von 10 mM wurde die Dunkelreaktion des analogen Chromoproteins herbeigeführt. Anhand der Absorptionsspektren konnte das Verhältnis der Absorption des Chromoproteins zur Absorption des entstehenden 11*Z* konfigurierten Chromophoroxims, analog wie zuvor über die Differenz aufeinanderfolgender Spektren, berechnet werden (Abb. 3-101). Mit der Ermittlung des Extinktionskoeffizienten des 11*Z*-10-Methyl-13-demethylretinal-Oxims war dann der entsprechende Wert des analogen Rhodopsins zu erhalten.

In der Tab. 3-23 sind die ermittelten Absorptionsmaxima der Oxime und Chromoproteine sowie die Extinktionskoeffizienten und der Opsin-shift aufgelistet.

Tab. 3-23 Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten von Retinal und den Retinalderivaten (jeweils all-*E*-Isomer, im Fall von 10-Methyl-13-demethylretinal auch vom 11*Z*-Isomer, siehe Text), von nativem und rekonstituiertem Rhodopsin sowie den analogen Rhodopsinen in Ringer-Lösung mit Dodecylmaltosid bzw. bei 9-Isopropylretinal mit LDAO. Das Absorptionsmaximum der Chromoproteine wurde anhand der Differenzspektren nach der Bleichung ermittelt. Die Werte der Oxime wurden ebenfalls in Ringer-Lösung mit Detergenz und zusätzlich in Gegenwart von Opsin bestimmt. Zusätzlich ist der Opsin-shift aufgeführt.

	λ_{max} [nm]		ε [l mol^{-1}cm^{-1}]		Opsin-shift
	Oxim	Chromoprotein	Oxim	Chromoprotein	[cm^{-1}]
9-dm	358	464	45900	39800	1384
Retinal	364	500	50500	49300	2522
WT	"	500	"	49600	"
9-Et	364	500	40400	39500	2727
9-Is	354	490	37000	-	2422
13-dm	364	500	43900	39000	2727
MD	364	504	44300		2580
	348 (11*Z*)		25600 (11*Z*)	46700	
10-Me	366	508	40900	26700	2636

Bei nativem und rekonstituiertem Rhodopsin besteht hinsichtlich der Lage der Maxima kein Unterschied, die Differenz zwischen den Extinktionskoeffizienten beträgt geringe 0.4 % und ist angesichts einer Meßtoleranz als identisch anzusehen. Erstaunlich ist allerdings der hohe Wert des Extinktionskoeffizienten von 49600 l mol^{-1} cm^{-1}, der in der Literatur immer mit ca. 41000 l mol^{-1} cm^{-1} (s. z. B. *Hargrave*[62]) verwendet wird (Tab. 3-23). Die Extinktionskoeffizienten der Oxime wurden, wie oben aufgeführt, mit Lösungen der Aldehyde definierter Konzentration in der identischen Matrix der Rhodopsinbleichung bestimmt, so daß deren Werte als korrekt anzusehen sind. Möglicherweise ist ein Grund für die Abweichung beim Detergens zu suchen, mit dessen Anwesenheit sowohl der Extinktionskoeffizient des Rhodopsins als auch der des Oxims derart beeinflußt werden könnte, daß die vorhandene Abweichung auftritt. Die Auswirkung unterschiedlicher Detergenzien zeigt sich z. B anhand des Extinktionskoeffizienten des Oxims im Detergens LDAO[k], der hier zu 54200 l mol^{-1}cm^{-1} ermittelt wurde, und somit um mehr als 7 % größer ist als der entsprechende Wert in DDM. Gleichermaßen finden sich in der Literatur

[k] LDAO = N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid

unterschiedliche Extinktionskoeffizienten für Rhodopsin: 35200 l $mol^{-1}cm^{-1}$ in CHAPSO[212, l] und 42800 l $mol^{-1}cm^{-1}$ in Digitonin[213].

Eine weitere Ursache könnte darin liegen, daß die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten über die Differenz zwischen den Absorptionsspektren erfolgte: Rhodopsin und die analogen Chromoproteine weisen in der Nähe des Absorptionsmaximums der Oxime, vergleichbar zu den freien Aldehyden, in unterschiedlichem Ausmaß einen *cis*-Peak auf. Mit der Bleichung nimmt die Absorption des *cis*-Peaks ab und die des Oxims zu. Damit wird bei der Differenz die auf das Oxim zurückzuführende Absorptionsänderung reduziert und das Ergebnis so beeinflußt, daß der Extinktionskoeffizient des Chromoroteins zu groß berechnet wird. Dieses könnte bei MD-Rho als Ursache dafür in Betracht gezogen werden, daß der Extinktionskoeffizient nicht aus den Bleichungsspektren zu bestimmen war: Beim Absorptionsspektrum des 11*Z*-MD in Lösung liegt das Absorptionsmaximum bei 256 nm, d. h., der *cis*-Peak, der i. a. ein Nebenmaximum darstellt, bildet hier die größte Absorptionsbande aus. Es kann also im Vergleich zum nativen System ein ebenfalls relativ großer *cis*-Peak beim Pigment dieser Verbindung angenommen werden, der zur Verfälschung der Absorptionsdifferenz des Oxims führt. Dieses Verhalten müßte dann allerdings auch bei der vorgenommenen alternativen Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von MD-Rho auftreten. Da aber über das Absorptionsverhältnis der Bleichungsspektren ein Wert von ca. 70000 l mol^{-1} cm^{-1} und über die Dunkelreaktion ein Wert von 46700 l mol^{-1} cm^{-1} erhalten wurde, muß dieser Abweichung eine andere Ursache zugrunde liegen, z. B. die oben aufgeführte Absorptionsabnahme des Oxims durch die Reaktion mit Bestandteilen der Proben.

Ein wichtiger Punkt spricht allerdings für die korrekte Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von nativem Rhodopsin unter den verwendeten Bedingungen: Würde der niedrigere, vielfach verwendete Wert angenommen, dann wären die Quantenausbeuten der analogen Chromoproteine (s. Tab. 3-24) alle um ca. 20 % zu erhöhen und es ergäben sich wenig sinnvolle große Werte. Darüber hinaus wird in der Literatur zumeist der Wert des Extinktionskoeffizienten eingesetzt der von *Wald* und *Brown*[211] 1954 wie hier über den Vergleich der Absorptionen des Oxims und des Rhodopsins bestimmt wurde. Von den Autoren wurde der Extinktionskoeffizient des Retinaloxims im Detergens Digitonin zu 51600 l mol^{-1} cm^{-1} ermittelt, der mit dem hier bestimmten Wert des Oxims relativ gut

[l] CHAPSO = 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-propansulfonat

übereinstimmt. Da in der hier vorgelegten Arbeit das Verhältnis zwischen Oxim und Chromoprotein aber auf einer großen Anzahl von Absorptionsspektren unter Berücksichtigung von störenden Einflüssen basiert, im Gegensatz zu der Messung bei einzelnen Wellenlängen eines Bleichungsspektrums von *Wald* und *Brown*, kann die Bestimmung der Werte im Rahmen dieser Arbeit als sicherer angesehen werden.

Die Position der Absorptionsmaxima der verschiedenen Oxime kann mit den entsprechenden Werten der all-*E* konfigurierten freien Aldehyde in einem polaren Lösungsmittel korreliert werden. In gleicher Weise gilt dieses für die Extinktionskoeffizienten der Oxime, die im Durchschnitt um 20 % größer sind als die der freien Aldehyde in alkoholischer Lösung. Ausnahmen sind das Oxim von 9-Ethylretinal, dessen Wert um fast 30 % höher liegt, und das von 13-Demethylretinal, bei dem der Wert in der Reaktion zum Oxim nur um ca. 10 % ansteigt.

Das Absorptionsmaximum von 9-dm-Rho ist in Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Werten[87-94]. Die hypsochrome Lage von 464 nm und der dementsprechend geringe Opsin-shift von 1384 cm^{-1} im Vergleich zum nativen System (λ_{max} = 500 nm; Opsin-shift: 2522 cm^{-1}) zeigt die veränderte Wechselwirkung mit den Aminosäuren der Bindungstasche des Proteins. Der Extinktionskoeffizient des 9-dm-Rho bildet mit 39800 l mol^{-1} cm^{-1} den Mittelwert des Ergebnisses von *Kropf et al.*[92] (41000 l mol^{-1} cm^{-1}) und der Schätzung von *Vogel et al.*[94] (38000 l mol^{-1} cm^{-1}).

Für 9-Et-Rho wird interessanterweise mit 500 nm dasselbe Absorptionsmaximum gefunden wie von *Lewis et al.*[102] für die Isoform (9*Z*-9-Et-Rho) dieses analogen Chromoproteins. Insgesamt ist der Wert identisch mit dem des nativen Systems, aufgrund der hypsochromeren Position der protonierten Schiff-Base (PSB) von 9-Ethylretinal ist der Opsin-shift aber geringfügig um 205 cm^{-1} größer als bei diesem. Weiterhin ist der Extinktionskoeffizient von 9-Et-Rho um 20 % geringer als der des nativen Systems.

Aus dem Bleichungsspektrum von 9-Isopropylretinal-Rhodopsin (Abb. 3-100) kann ein Absorptionsmaximum von 490 nm bestimmt werden. Dieses liegt wie beim entsprechenden bakteriellen Protein hypsochrom, die Differenz zum nativen System ist aber deutlich geringer. Aufgrund der bereits kurzwelligen Absorption der PSB von 9-Is ist der Opsin-shift im Vergleich zum nativen Rhodopsin somit nur 100 cm^{-1} kleiner.

Wie in der Einleitung erwähnt, werden in der Literatur für das Absorptionsmaximum von 13-dm-Rho Werte im Bereich von 495 bis 500 nm angegeben, so daß der hier gefundene

Wert von 500 nm am langwelligen Ende angesiedelt ist. Der Opsin-shift ist analog zu 9-Et-Rho infolge der hypschromeren Absorption der PSB um 205 cm^{-1} größer als der des nativen Systems. Für den Extinktionskoeffizienten dieser bereits relativ ausführlich untersuchten Verbindung finden sich in der Literatur Angaben von 38000[106], 40000[70] und 49000[107] l mol^{-1} cm^{-1}, so daß der ermittelte Wert von 39000 l mol^{-1} cm^{-1} zwischen den ersten beiden Literwerten von *Nelson et al.* und *Kochendoerfer et al.* liegt. Allerdings trat bei der Bleichung von 13-dm-Rho ein stabiles Photoprodukt in Erscheinung, womit die Bestimmung des Koeffizienten erschwert wurde und diesem Wert ein größerer Fehler zugeordnet werden muß (± 10 %; s. Punkt 3.2.2.3 bzw. Abb. 3-106).

Das Absorptionsmaximum von MD-Rho liegt auch hier mit 504 nm zwischen den bis dato publizierten Werten von 500[70] und 505[117] nm. An gleicher Stelle wird der Extinktionskoeffizient mit 40000[70] bzw. 44800[117] l mol^{-1} cm^{-1} angegeben, wobei beide Arbeitsgruppen ebenfalls von Schwierigkeiten bei der Bestimmung berichten. Der hier ermittelte Wert von 46700 l mol^{-1} cm^{-1} liegt somit oberhalb der Literaturwerte und ist geringfügig kleiner als der des nativen Systems. Trotz der bathochromen Position des Absorptionsmaximums ist der Opsin-shift mit 2580 cm^{-1} nur um 58 cm^{-1} größer als bei Rhodopsin.

Ein ähnliches Bild findet sich bei 10-Me-Rho: Das Absorptionsmaximum liegt mit 508 nm im Vergleich zu den untersuchten Chromoproteinen bei der größten Wellenlänge, der Opsin-shift ist jedoch gegenüber Retinal nur um 114 cm^{-1} größer. Im Vergleich zur Literatur ergibt sich mit diesem Wert eine gute Übereinstimmung: 506[114] bzw. 508[115] nm. Sehr niedrig zeigt sich der Extinktionskoeffizient dieses artifiziellen Rhodopsins mit 26000 l mol^{-1} cm^{-1}, der von *Asato et al.*[115] mit 30000 und von *De Lange et al.*[114] mit 24000 l mol^{-1} cm^{-1} angegeben wird.

Insgesamt ist festzustellen, daß die Modifikationen bei den Retinalderivaten im Vergleich zum nativen System, mit Ausnahme von 9-Demethylretinal, nur einen geringen Einfluß auf die Position des Absorptionsmaximums ausüben. Die Extinktionskoeffizienten der analogen Chromoproteine sind alle kleiner als der von Rhodopsin: Mit einer untereinander vergleichbaren Größe bei 9-dm-, 9-Et- und 13-dm-Rho beträgt die Differenz ca. 20 %, während der Wert des 10-Me-Rho um über 50 % niedriger ist. Dagegen ist der Extinktionskoeffizient von MD-Rho nur um 5 % geringer als bei Rhodopsin.

3.2.2.3 Quantenausbeuten

Die Quantenausbeuten wurden nach dem von *Dartnall et al.*[68,104,105] entwickelten Verfahren der photometrischen Kurven ermittelt. Dazu wird Rhodopsin bzw. das analoge Pigment in Gegenwart von Hydroxylamin sukzessiv mit annähernd monochromatischem Licht gebleicht (s. Experimenteller Teil, Punkt 4.2.2.6). Die Differenzwerte zwischen den Absorptionsspektren der verschiedenen Belichtungsschritte zum Spektrum des vollständig gebleichten Chromoproteins werden verrechnet und gegen die jeweilige Gesamtbelichtungszeit aufgetragen. Mit der Anpassung einer Geraden an die Funktionswerte wird die Steigung erhalten, welche die Photosensitivität darstellt. Diese repräsentiert das Produkt aus Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient, so daß die Quantenausbeute berechnet werden kann, wenn bei der Bleichung ein Quantenzähler mit bekannter Quantenausbeute verwendet wird und die Extinktionskoeffizienten (bei der Anregungswellenlänge) der Proben ebenfalls bekannt sind. Zu diesem Zweck wurde bei den hier durchgeführten Bleichungen natives Rhodopsin verwendet, dessen Quantenausbeute von *Dartnall et al.* zu 0.67 bestimmt worden ist.

Wie oben angeführt (s. Punkt 3.2.2.2, spektrale Eigenschaften), wurde durch die hohe Lichtintensität bei den letzten Belichtungsschritten das Absorptionsspektrum des vollständig gebleichten Proteins verfälscht. Dieses Opsinspektrum hat als Referenzspektrum für die Differenzbildung eine große Bedeutung: Ein fehlerhafter Verlauf verursacht eine Verschiebung des isosbestischen Punktes bei den Differenzspektren. Damit wird die Größe der Absorptionswerte beeinflußt und dieses führt bei den Funktionswerten zu einer Veränderung der Steigung sowie zu einer Abweichung von der Linearität. Eine relativ gute Korrektur konnte wie folgt vorgenommen werden: Nach der vollständigen Bleichung des Proteins wurden weitere Belichtungsschritte durchgeführt. Die so erhaltenen Absorptionsspektren unterschieden sich nur in der Abnahme der Absorption des Oxims und konnten somit nach einer Skalierung zur Korrektur des Referenzspektrums verwendet werden. Darüber hinaus ist ein nichtlineares Verhalten in der Regel bei den Funktionswerten der letzten Bleichungsschritte zu beobachten. Verursacht wird dieses durch die Anhäufung von Neben- oder Abbauprodukten im Verlauf der Messung, deren Absorptionen die Differenzwerte der Photoreaktion beeinflussen. Somit wurden bei der Anpassung der Geraden die letzten Funktionswerte vernachlässigt und nur die linear verlaufenden Werte berücksichtigt.

Schwieriger wird die Bestimmung der Quantenausbeute, wenn im Verlauf der photoinduzierten Reaktion relativ langlebige Zwischenstufen auftreten. So ist bei der Bleichung von 13-dm-Rho eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums beim Spektrum des Chromoproteins zu beobachten, das auf die Anwesenheit eines stabilen, kurzwellig absorbierenden Photoprodukts schließen läßt (Abb. 3-106). Da zum Ende der Messung keine entsprechende Absorption mehr vorhanden ist, wird auch das Photoprodukt vermutlich durch die weitere Belichtung gebleicht. Die mit Rhodopsin ermittelte Anzahl von Quanten ist somit bei 13-dm-Rho nicht nur zur Initiierung des Photoprozesses, sondern auch zur Weiterreaktion des Photoprodukts notwendig. Für die Auswertung bedeutet dieses, daß die Entstehung der absorbierenden Zwischenstufe einen Teil der auf das Chromoprotein zurückgehenden Abnahme der Absorption kompensiert und als Resultat eine verringerte Steigung der Funktionswerte bzw. der Photosensitivität erhalten wird (Filtereffekt). So wird mit den Werten am Maximum des Chromoproteins eine um 11 % kleinere Steigung als bei 550 nm erhalten. Da die Zwischenstufe bei kürzeren Wellenlängen absorbiert, ist der bathochrome Teil der Differenzspektren weniger beeinflußt und kann somit zur Berechnung der Quantenausbeute verwendet werden[107]. Die Steigung der Geraden ist infolge der Umrechnung der Differenzwerte unabhängig von der Wellenlänge und ein Unterschied liegt nur bei den Achsenabschnitten vor. Dementsprechend wurde das Auftreten von stabilen Photoprodukten bei allen Bleichungsexperimenten über den Vergleich der Steigungen bei verschiedenen Wellenlängen überprüft.

Vor der Durchführung einer Messung mit einem artifiziellen Rhodopsin wurde zur Gewährleistung eines vollständig abgeschlossenen Photoprozesses die jeweils notwendige Wartezeit nach einer Belichtung ermittelt (Tab. 3-24). Im Falle von langsamen Prozessen wurde die Konzentration an Hydroxylamin zur Beschleunigung der Reaktion soweit erhöht, daß über einen Zeitraum von mehreren Stunden keine signifikante Dunkelreaktion zu beobachten war. Diese Wartezeit war auch vor Beginn der Messung nach dem Zusatz des Hydroxylamins einzuhalten. Dieses vor allem, da die Messungen mit Proben durchgeführt wurden, die zuvor mittels der Flash-Photolyse untersucht worden waren und somit bereits einen geringen Anteil freien Aldehyds oder infolge von sehr langsamen Kinetiken zum Teil noch Intermediate des Photocyclus enthielten. Zur Überprüfung, ob die verschiedenen Schritte der Probenpräparation eine Auswirkung auf die Bestimmung haben, wurde bei jeder Meßreihe ebenfalls eine Probe rekonstituierten Rhodopsins mitgebleicht.

Natives und rekonstituiertes Rhodopsin

In der Abb. 3-102 sind die mit der Bleichung von nativem Rhodopsin erhaltenen Daten dargestellt. Die Auftragung der Funktionswerte verläuft nahezu über den gesamten Belichtungszeitraum linear. Im Fall von rekonstituiertem Rhodopsin (Ret-Rho) ist eine geringfügig größere Abweichung der Funktionswerte von der angepaßten Geraden zu beobachten (Abb. 3-103). Das Auftreten einer stabilen Zwischenstufe kann bei beiden Pigmenten ausgeschlossen werden, da die Steigungen am Absorptionsmaximum jeweils nur um ca. 4 % größer sind als bei 550 nm.

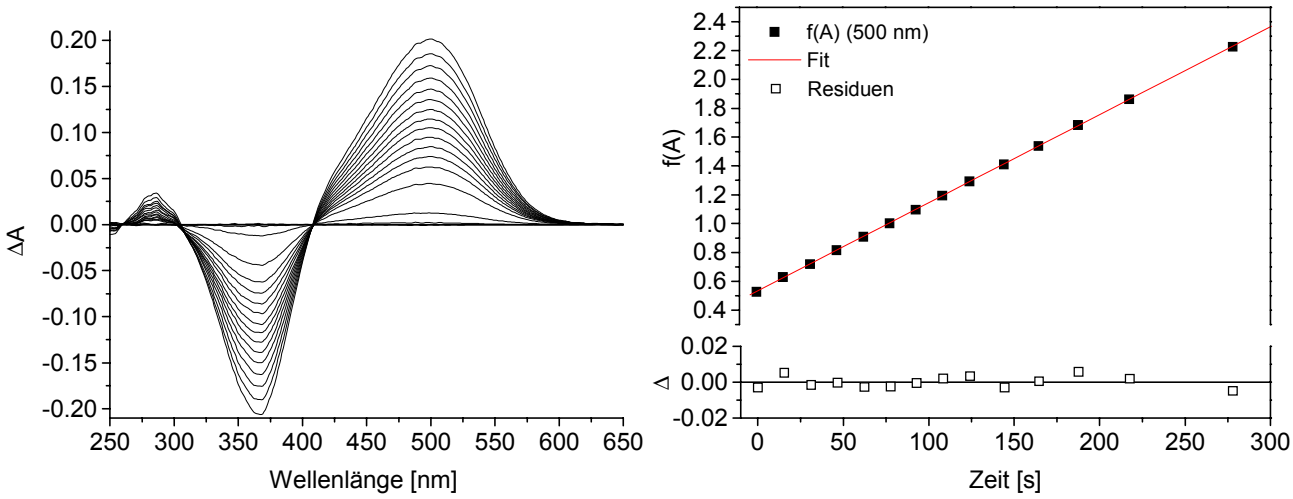


Abb. 3-102 Bleichung von nativem Rhodopsin (10 mM NH_2OH, Reaktionszeit nach jeder Belichtung: 5 min, λ_{exc} 486 nm): Differenzspektren zum vollst. gebleichten Protein (links), linearer Fit der Funktionswerte, die basierend auf den Absorptionswerten der Differenzspektren bei 500 nm berechnet wurden ($f(A_{500\ nm})$) sowie die Residuen (rechts).

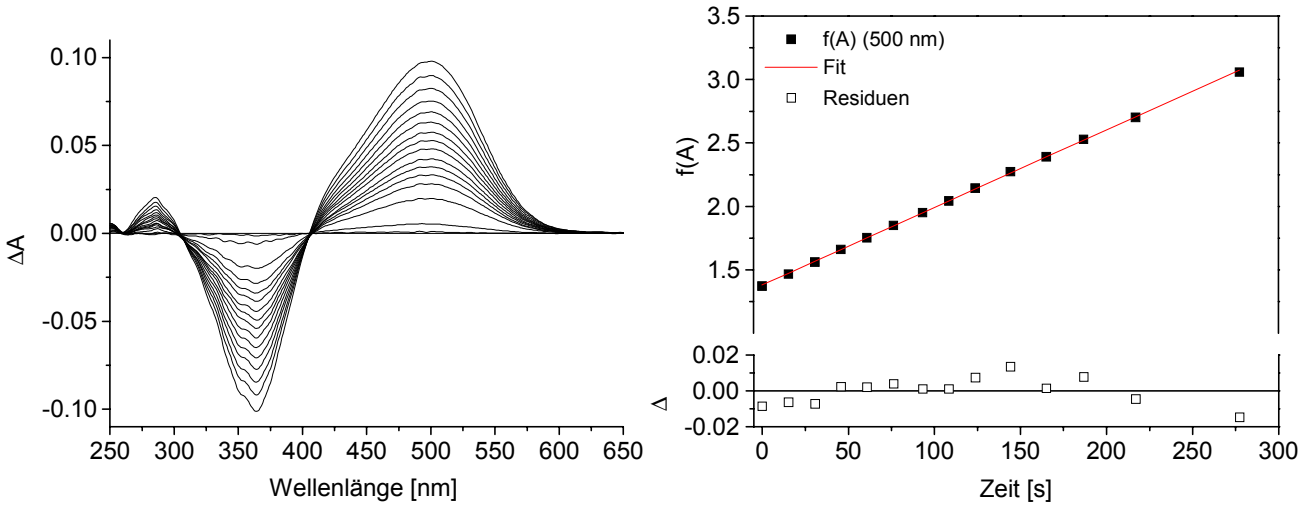


Abb. 3-103 Bleichung von rekonstituiertem Rhodopsin (10 mM NH_2OH, Reaktionszeit nach jeder Belichtung: 5 min, λ_{exc} 486 nm): Differenzspektren zum vollst. gebleichten Protein (links), linearer Fit von $f(A_{500\ nm})$ sowie die Residuen (rechts).

Beim Vergleich der Photosensitivitäten[m] des rekonstituierten und nativen Rhodopsins wurde nur eine Abweichung von 0.5 % gefunden, so daß die Quantenausbeuten innerhalb der Meßtoleranz als identisch anzusehen sind. Somit haben die verschiedenen Schritte zur Präparation des rekonstituierten Systems keine Auswirkungen auf die Quantenausbeute des rekonstituierten Rhodopsins.

9-Demethylretinal-Rhodopsin

Im Fall von 9-dm-Rho (Abb. 3-104) verläuft die Bleichungsreaktion sehr langsam und benötigt in Gegenwart von 10 mM Hydroxylamin über eine Stunde bis zur Vollständigkeit. Die Stabilität dieses analogen Chromoproteins ermöglicht die Verwendung von Hydroxylamin bis zu einer Konzentration von 50 mM, womit sich die notwendige Wartezeit auf 20 min reduziert. Trotz dieser langen Reaktionszeit folgen die berechneten Werte der Linearität bis zu einer Gesamtbelichtungszeit von 100 s. Darüber hinaus weicht die Steigung der Funktionswerte am Maximum des Chromoproteins nur um 2 % von der Steigung ab, die auf den bei 520 nm bestimmten Werten basiert. Die Quantenausbeute von 9-dm-Rho errechnet sich zu 0.69. Damit kann die Annahme von *Corson et al.* nicht bestätigt werden, die für 9-dm-Rho im Vergleich zum nativen System einen deutlich kleineren Wert vermuteten[95].

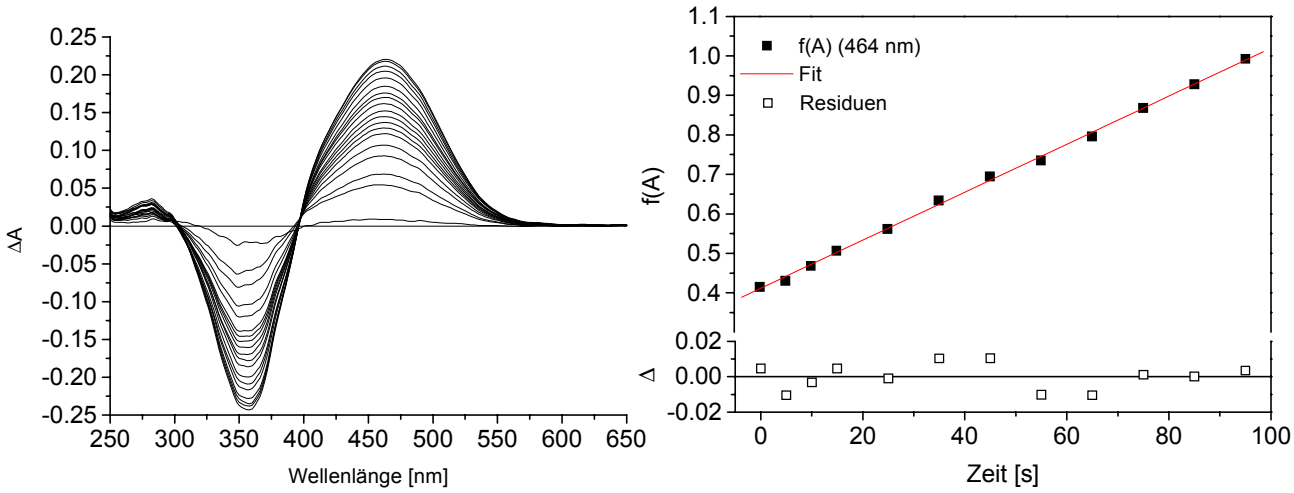


Abb. 3-104 Bleichung von 9-Demethylretinal-Rhodopsin (50 mM NH_2OH, Wartezeit nach jeder Belichtung: mind. 20 min, λ_{exc} 486 nm): Differenzspektren zum vollst. gebleichten Protein (links), linearer Fit von $f(A_{464\ nm})$ sowie die Residuen (rechts).

[m] Die hier dargestellten Photosensitivitäten basieren auf verschiedenen Meßreihen und sind somit untereinander nicht *direkt* zu vergleichen

9-Ethylretinal-Rhodopsin

Beim analogen Chromoprotein 9-Ethylretinal-Rhodopsin (9-Et-Rho) verläuft die Bleichung in einer zum nativen System vergleichbaren Zeit, so daß eine Konzentration des Hydroxylamins von 10 mM für das Abfangen des frei werdenden Aldehyds ausreichte (Abb. 3-105). Die Differenzwerte verlaufen bis zu einer Gesamtbelichtungszeit von 180 s linear und die Steigung der Geraden bei 500 nm unterscheidet sich von der Steigung bei 550 nm nur um 2 %. Die Photosensitivität von 9-Et-Rho ist um 20 % kleiner als bei nativem Rhodopsin, aufgrund des geringeren Extinktionskoeffizienten beträgt die Quantenausbeute aber vergleichbar zu diesem 0.66.

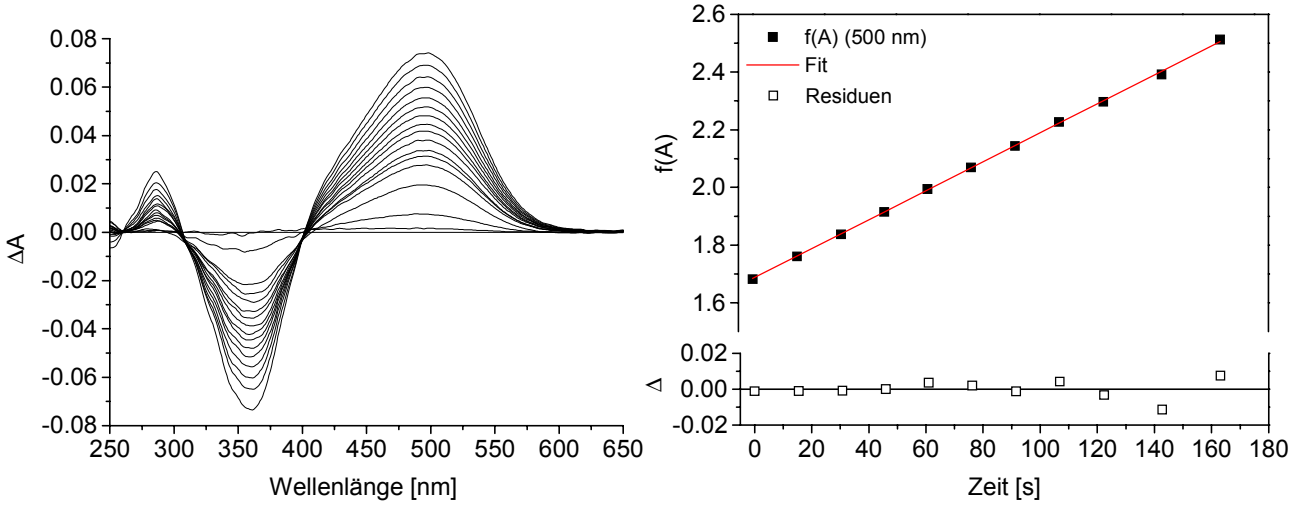


Abb. 3-105 Bleichung von 9-Ethylretinal-Rhodopsin (10 mM NH_2OH, Reaktionszeit nach jeder Belichtung: 5 min, λ_{exc} 486 nm): Differenzspektren zum vollst. gebleichten Protein (links), linearer Fit von $f(A_{500\ nm})$ sowie die Residuen (rechts).

13-Demethylretinal-Rhodopsin

Wie bereits angeführt, ist die Bestimmung der Quantenausbeute bei 13-Demethylretinal-Rhodopsin (13-dm-Rho) mit größeren Unsicherheiten behaftet (Abb. 3-106). Zusätzlich konnte bei diesem Chromoprotein, vermutlich infolge des auftretenden Photoprodukts, nicht die Korrektur des Referenzspektrums hinsichtlich der Abnahme der Oximabsorption vorgenommen werden, so daß die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten dieses Chromoproteins unsicherer und der Fehler der Quantenausbeute weiter vergrößert wird. Unter Einbeziehung einer Toleranz von ± 10 % ist die Quantenausbeute von 0.62 damit aber noch signifikant größer als die in der Literatur angegebenen Werte: *Nelson et al.*[106] fanden mit der gleichen Methodik wie bei den hier durchgeführten Versuchen eine

Quantenausbeute von 0.3 basierend auf einem Extinktionskoeffizienten von 38000 l mol^{-1} cm^{-1}. Über den gleichen Weg ermittelten *Gärtner et al.*[107] mit einem Extinktionskoeffizienten von 49000 l mol^{-1} cm^{-1} einen Wert von 0.28. Darüber hinaus findet sich ein Wert von 0.47 bei *Kochendoerfer et al.*[70], dem ein Extinktionskoeffizient von 40000 ±5000 l mol^{-1} cm^{-1} zugrunde liegt. Die Bestimmung der Quantenausbeute erfolgte dabei über die Messung der Zerfallsrate des Chromoproteins im Vergleich zum nativen System, wobei in einem Spektrometer die Beobachtungslichtquelle gleichzeitig als Anregungsquelle verwendet wurde. Aus dem Verhältnis der Zerfallsrate bei zwei verschiedenen Wellenlängen und Spaltbreiten der Lichtquelle wurde dann die Quantenausbeute berechnet.

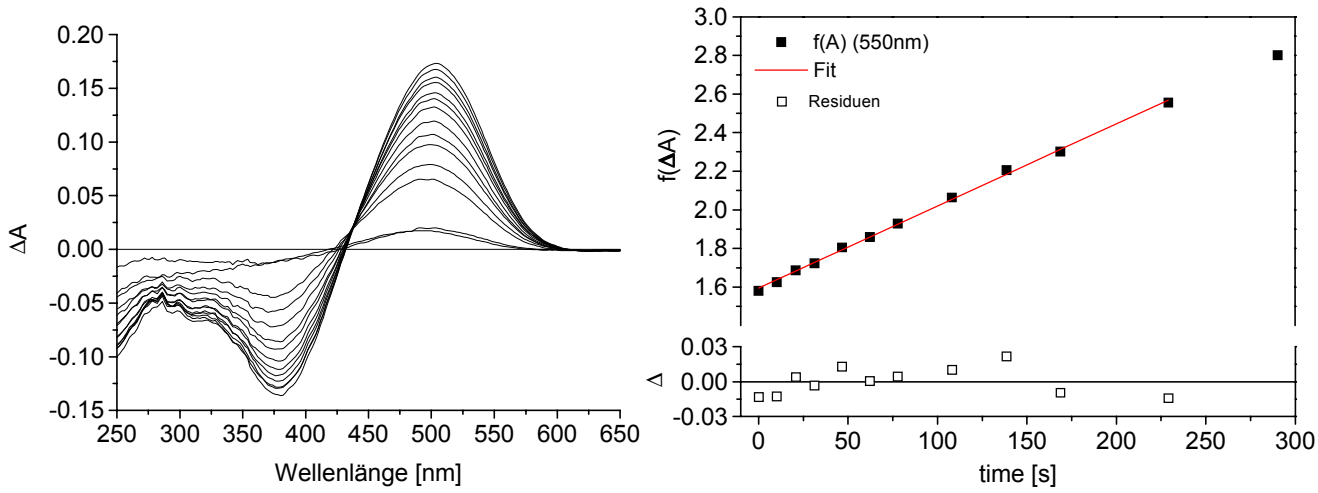


Abb. 3-106 Bleichung von 13-Demethylretinal-Rhodopsin (5 mM NH_2OH, Reaktionszeit nach jeder Belichtung: mind. 10 min, λ_{exc} 486 nm): Differenzspektren zum vollst. gebleichten Protein (links), linearer Fit von f($A_{500\ nm}$) sowie die Residuen (rechts).

Als Ursache für die Abweichung des hier ermittelten Werts der Quantenausbeute zu den Daten früherer Untersuchungen können mehrere Punkte verantwortlich sein, wie die Werte der verwendeten Extinktionskoeffizienten (für Rhodopsin wurde jeweils ein Wert von 40000 l mol^{-1} cm^{-1} angenommen) oder die ungenügende Berücksichtigung des stabilen Photoprodukts. Bei *Nelson et al.* ist keine detaillierte Beschreibung der Bestimmung der Quantenausbeute zu finden, so daß von der ungenügenden Berücksichtigung des Intermediats ausgegangen werden kann. Dieses wurde hingegen bei den Messungen von *Gärtner et al.* in gleicher Weise wie hier, über die Verwendung der Absorptionswerte der Bleichungsspektren bei 550 nm einkalkuliert. Zusätzlich kann die Differenz nicht alleine durch den dort verwendeten hohen Extinktionskoeffizienten für 13-dm-Rho erklärt werden. Übereinstimmend bei beiden Untersuchungen ist, daß im Vergleich zum nativen System

für das analoge Pigment eine auf 50 % reduzierte Photosensitivität gefunden wurde, die deutlich niedriger ist als die hier zu 70 % ermittelte.

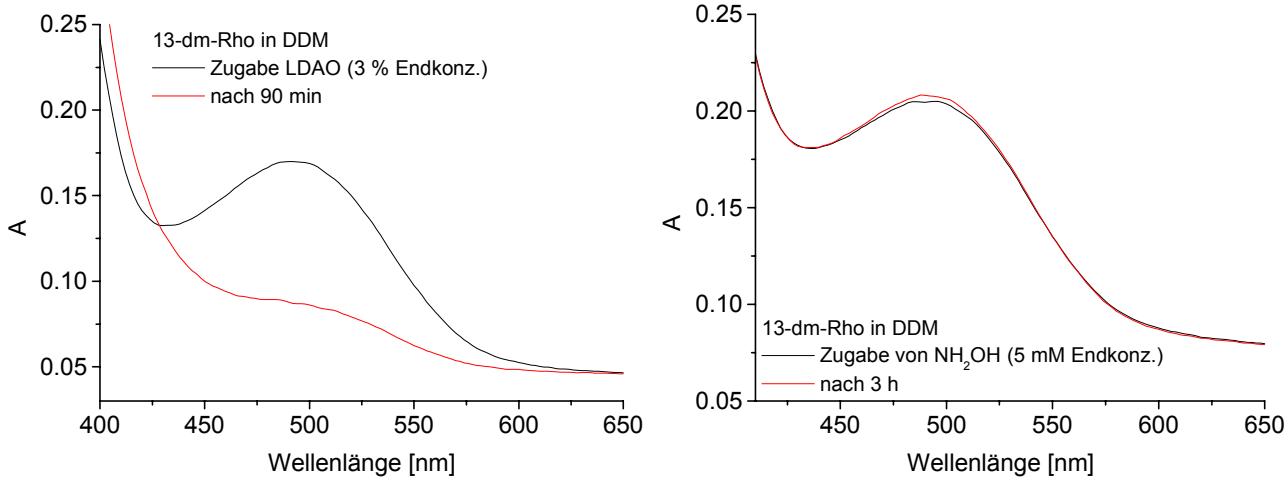


Abb. 3-107 Stabilität von 13-Demethylretinal-Rhodopsin in verschiedenen Detergentien: In DDM nach Zusatz von LDAO (links) und DDM in Gegenwart von Hydroxylamin (rechts).

Im Gegensatz dazu errechnet sich die Photosensitivität von 13-dm-Rho mit den Ergebnissen von *Kochendoerfer et al.* zu 70 % und ist damit identisch mit dem hier gefundenen Wert. Allerdings wird dabei angeführt, daß sie das Auftreten des stabilen Photoprodukts unter Verwendung des Detergens LDAO vermieden hätten, da dessen degenerierende Wirkung eine vollständige Bleichung des Pigments herbeiführen würde. Dieses konnte hier jedoch nicht reproduziert werden, da der Zusatz von LDAO zur Probe bereits ohne den Zusatz von Hydroxylamin innerhalb von 90 min nahezu eine vollständige Bleichung des Pigments in einer Dunkelreaktion verursachte; das gleiche Verhalten fanden *Einterz et al.*[111] mit einer 1 %igen LDAO Lösung von 13-dm-Rho. Im Gegensatz dazu ist mit 13-dm-Rho in Dodecylmaltosid auch in Gegenwart von 5 mM Hydroxylamin über einen Zeitraum von drei Stunden keine signifikante Veränderung des Absorptionsverhaltens zu beobachten (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Inwieweit sich dann die Degeneration des Proteins in Gegenwart von LDAO von der eigentlichen Bleichungsreaktion mit der Beobachtungslichtquelle separieren läßt ist sehr fraglich. Eine weitaus größere Unsicherheit ergibt sich darüber hinaus durch Unterschiede beim Photocyclus des 13-dm-Rho im Vergleich zum nativen System (s. u. Punkt 3.2.2.4). In diesem Fall wird das permanente Licht der Anregungsquelle nicht nur vom Grundzustand des Pigments absorbiert, sondern in einem unterschiedlichen Ausmaß ebenfalls durch die hier langsam zerfallenden Intermediate. Damit ist die Anzahl der mit Rhodopsin detektierten Quanten nicht mehr äquivalent auf das analoge Chromoprotein zu

übertragen. Bei der hier sukzessiv durchgeführten Bleichung der Pigmente war die Dauer der Belichtung zwar ebenfalls deutlicher länger als die ersten im Photoprozeß verlaufenden Reaktionen, aber mit der nur wenige Sekunden dauernden Belichtung wurden im Gegensatz zur permanenten Bleichung sehr langlebige Intermediate, die insbesondere bei den analogen Pigmenten auftreten, nicht angeregt.

10-Methyl-13-demethylretinal-Rhodopsin

10-Methyl-13-demethylretinal-Rhodopsin (MD-Rho) ist, wie unter Punkt 3.2.2.2 bereits beschrieben, gegenüber Hydroxylamin sehr instabil. Entsprechend wurde die Bleichung nur in Gegenwart einer Konzentration von 50 µM mit einer Wartezeit von 40 min zwischen jedem Bleichungsschritt durchgeführt (Abb. 3-108). Der Verlauf der Funktionswerte zeigt sich in der Auftragung über eine Belichtungszeit von 220 s linear und die mit den Differenzwerten bei 550 nm erhaltene Steigung ist mit einer Abweichung von 4 % in guter Übereinstimmung mit der Photosensitivität am Absorptionsmaximum des Chromoproteins. Die Photosensitivität des MD-Rho beträgt 70 % von Rhodopsin und die Quantenausbeute errechnet sich zu 0.52.

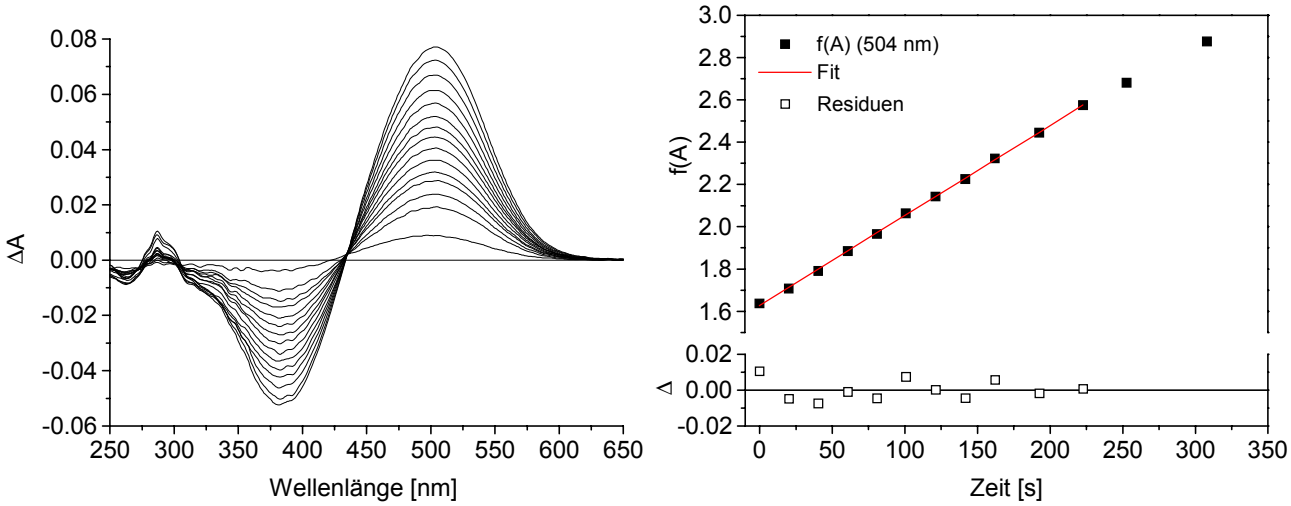


Abb. 3-108 Bleichung von 10-Methyl-13-demethylretinal-Rhodopsin (50 µM NH_2OH, Reaktionszeit nach jeder Belichtung: mind. 40 min, λ_{exc} 486 nm): Differenzspektren zum vollst. gebleichten Protein (links), linearer Fit von $f(A_{504\ nm})$ sowie die Residuen (rechts).

Auf den ersten Blick ist die Quantenausbeute mit dem von *Koch et al.*[117] gefundenen Wert von 0.59 vergleichbar. Allerdings fanden sie eine identische Photosensitivität für MD-Rho und rekonstituiertes Rhodopsin. Der niedrige Wert der Quantenausbeute resultiert aus der Verwendung des Extinktionskoeffizienten von 40000 für Rhodopsin und

44800 l mol^{-1} cm^{-1} für das analoge Pigment. Mit den hier ermittelten Koeffizienten errechnet sich aus dem Ergebnis von *Koch et. al.* für MD-Rho eine Quantenausbeute von 0.71. Der Unterschied in den Ergebnissen könnte darin begründet liegen, daß für die Bleichung des MD-Rho von *Koch et al.* eine Hydroxylamin-Konzentration von 2 mM verwendet wurde, die innerhalb der eingehaltenen Wartezeit von 15 min zu einer signifikanten Dunkelreaktion und somit erhöhten Photosensitivität führte.

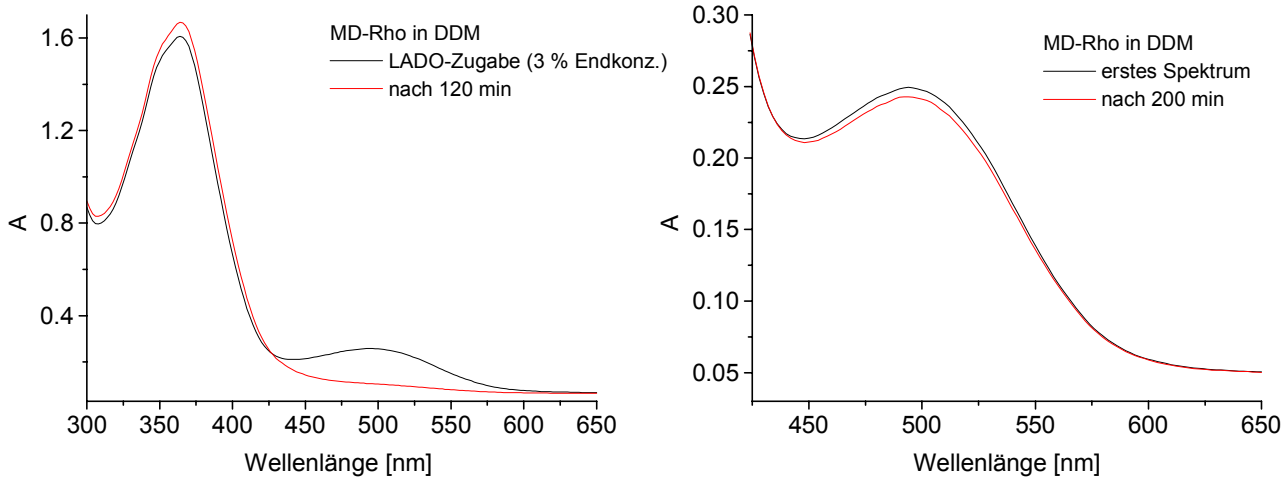


Abb. 3-109 Stabilität von 10-Methyl-13-demethylretinal-Rhodopsin in verschiedenen Detergenzien: in DDM nach Zusatz von LDAO (links) und DDM (rechts).

Ebenfalls keine Übereinstimmung ergibt sich zum Ergebnis von *Kochendoerfer et al.*[70], die in der gleichen Vorgehensweise, wie oben aufgeführt, die Quantenausbeute von MD-Rho über die Messung der Zerfallsrate zu 0.35 bestimmten. Anhand der dort verwendeten Extinktionskoeffizienten (Rhodopsin 40600 und MD-Rho 44000 l mol^{-1} cm^{-1}) läßt sich eine gegenüber Rhodopsin auf 57 % reduzierte Photosensitivität errechnen; dieses entspräche mit den hier ermittelten Extinktionskoeffizienten einer Quantenausbeute von 0.40. Als Ursachen für die Differenz kommen die bereits bei 13-dm-Rho angesprochenen Punkte in Betracht: In gleicher Weise wie dort führte der Zusatz des Detergens LDAO zu einer Lösung von MD-Rho in DDM zu einer deutlichen Dunkelreaktion, so daß das nach 120 min keine Absorption des analogen Pigments mehr zu beobachten war (Abb. 3-109). Zusätzlich wurde die Messung von *Kochendorfer et al.* bei 10 °C ohne Zusatz von Hydroxylamin vorgenommen, einer Bedingung, bei der die eigentliche Bleichungsreaktion bei MD-Rho äußerst langsam verläuft, so daß die zu detektierte Absorptionsänderung wiederum im wesentlichen durch die Dunkelreaktion verursacht wird. Darüber hinaus unterscheidet sich der Photocyclus von MD-Rho noch deutlicher als 13-dm-Rho von dem des nativen Systems (s. u. Punkt 3.2.2.4), womit der Vergleich zum Quantenzähler

Rhodopsin weiter an Aussagekraft verliert. Während die Messung bei 13-dm-Rho einen ähnlichen Wert ergab wie hier ermittelt, zeigt sich eventuell die Schwäche der von *Kochendoerffer et. al.* verwendeten Methodik anhand der größeren Differenz bei der Quantenausbeute von MD-Rho.

10-Methylretinal-Rhodopsin

Die Bleichung von 10-Methylretinal-Rhodopsin (10-Me-Rho) konnte mit einer Hydroxylamin-Konzentration von 10 mM erfolgen und die Geschwindigkeit der Photoreaktion erlaubte eine erneute Belichtung jeweils nach 5 min (Abb. 3-110). Der Verlauf der Funktionswerte ist bis zu einer Belichtungszeit von 120 s linear, die Steigung der Auftragung ist bei 550 nm nur um ca. 5 % größer als am Absorptionsmaximum. Die Photosensitivität des Systems beträgt im Vergleich zu nativem Rhodopsin 55 %, aus der mit den Extinktionskoeffizienten eine Quantenausbeute von 0.71 berechnet werden kann.

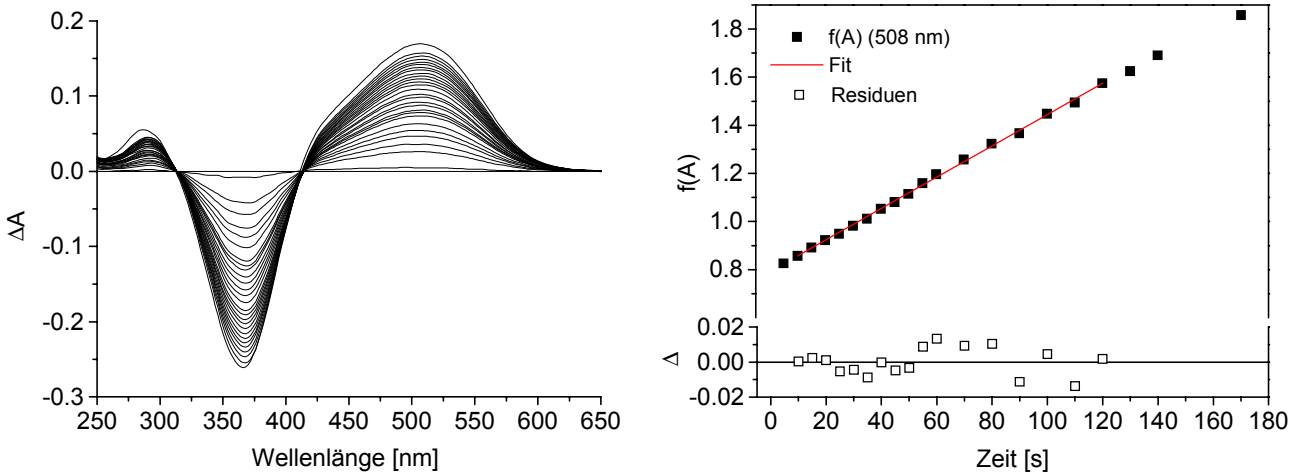


Abb. 3-110 Bleichung von 10-Methylretinal-Rhodopsin (10 mM NH_2OH, Reaktionszeit nach jeder Belichtung: 5 min, λ_{exc} 486 nm): Differenzspektren zum vollst. gebleichten Protein (links), linearer Fit von $f(A_{508\ nm})$ sowie die Residuen (rechts).

Die Größe der Photosensitivität ist in guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis von *De Lange et al.*[114] (49 ± 6 % im Vergleich zu Rhodopsin), während sich hingegen bei der Quantenausbeute (0.55) eine Abweichung ergibt. Verursacht wird dieses insbesondere durch den dort verwendeten Extinktionskoeffizienten für Rhodopsin (40600 l mol^{-1} cm^{-1}), da der Extinktionskoeffizient für 10-Me-Rho mit 24000 l mol^{-1} cm^{-1}, wie bereits erwähnt, vergleichbar zu dem hier bestimmten Wert ermittelt wurde (26700 l mol^{-1} cm^{-1}). Ein deutlicher Unterschied liegt zur Größe der Quantenausbeute von *Liu et al.*[210] vor, die einen Wert von 0.32 bei einer Photosensitivität von 75 % im Vergleich zum nativen System

fanden. Die Bestimmung erfolgte analog zu *Kochendoerfer et al.* bei 13-dm- und MD-Rho, allerdings unter Zusatz von Hydroxylamin und ohne Verwendung von LDAO. Die Abweichung ist hier nicht auf das Auftreten einer Dunkelreaktion zurückzuführen, sondern könnte durch den Unterschied des Photoprozesses bei 10-Me-Rho im Vergleich zum Quantenzähler Rhodopsin verursacht werden (s. u. Punkt 3.2.2.4) obwohl beide Systeme in Anwesenheit von Hydroxylamin vergleichbar schnell in die Endprodukte der Belichtung überführt werden. Zusätzlich übernahmen *Liu et. al.* für 10-Me-Rho den zu großen Extinktionskoeffizienten von *Asato et. al.*[115] (s. S. 188).

Zusammenfassung Quantenausbeute

In der Tab. 3-24 sind die relativen Photosensitivitäten und die zur Referenz Rhodopsin berechneten Quantenausbeuten der artifiziellen Pigmente zusammengefaßt.

Tab. 3-24 Quantenausbeute von rekonstituiertem Rhodopsin und den analogen Chromoproteinen sowie der von *Dartnall et al.* für natives Rhodopsin ermittelte Wert. Der Extinktionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge und die Photosensitivität sind ebenfalls aufgeführt. Zusätzlich ist die Wartezeit angegeben, die zur Vervollständigung der Photoreaktion bei der gegebenen Konzentration an Hydroxylamin eingehalten wurde.

	ε bei 486 nm [l mol^{-1} cm^{-1}]	Reaktionszeit (Konz. NH_2OH)	Photosensitivität [%]	Quantenausbeute
9-dm	34500	mind. 20 min (50 mM)	74	0.69
Retinal (WT)	47300	5 min (10 mM)	100	0.67[68]
Retinal	"	5 min (10 mM)	99.5	0.67
9-Et	38800	5 min (10 mM)	80	0.66
13-dm	35700	mind. 10 min (5 mM)	70	0.62
MD	42600	mind. 40 min (50 µM)	70	0.52
10-Me	24600	5 min (10 mM)	55	0.71

In der homologen Reihe der an Position 9 modifizierten Retinalderivate läßt sich keine Korrelation zwischen der Größe des Substituenten und der Quantenausbeute vornehmen. Der Wert des Chromoproteins mit 9-Demethylretinal ist zwar etwas größer als beim nativen Rhodopsin, und ebenfalls im Vergleich zu 9-Ethylretinal-Rhodopsin, allerdings befinden sie sich alle innerhalb einer anzunehmenden Meßtoleranz von ± 5 %. Die Toleranz wird dabei weniger durch die direkte Bestimmung der Photosensitivität verursacht, als durch die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Chromoproteine. Die Übereinstimmung der Quantenausbeuten von 9-Demethylretinal- und 9-Ethylretinal-Rhodopsin zu Rhodopsin zeigt somit aber signifikant, daß die 9-Methylgruppe für die Effektivität der Isomerisierung des Chromophors unbedeutend ist.

Deutlicher sind die Differenzen bei den Quantenausbeuten der an Position 10 und/oder 13 modifizierten Retinalderivate. Eine Korrelation zwischen der intramolekularen sterischen Hinderung in der 11Z-Konfiguration des Chromophors und der Quantenausbeute kann unter Vernachlässigung der Verbindung 10-Methyl-13-demethylretinal vorgenommen werden: Im Vergleich zum nativen System verringert sich die Quantenausbeute des Proteins unter Einbindung von 13-Demethylretinal, während sie mit 10-Methylretinal erhöht wird. In Anbetracht der Meßtoleranz von ± 10 % bei 13-dm-Rho und ± 5 % bei 10-Me-Rho ergibt sich eine Unsicherheit, mit der die Quantenausbeuten der Verbindungen in den Bereich des Werts von Rhodopsin gelangen. Das artifizielle Rhodopsin mit 10-Methyl-13-demethylretinal zeigt unter allen Verbindungen die geringste Effektivität während der Photoreaktion. Als Ursache könnte zum einen angenommen werden, daß infolge einer Interaktion der zusätzlichen Methylgruppe mit der Bindungstasche die Isomerisierung behindert wird, oder zum anderen, daß der Chromophor durch den erhöhten sterischen Anspruch innerhalb des Proteins eine Konformation einnehmen muß, die einer effektiven Isomerisierung entgegenwirkt. Werden für die Verbindung 10-Methylretinal vergleichbare Verhältnisse angenommen, dann weist die hohe Quantenausbeute des analogen Proteins darauf hin, daß die Hinderung der Isomerisierungsreaktion infolge der 10-Methylgruppe durch die gegenüber MD-Rho erhöhte intramolekulare Wechselwirkung zwischen der Position 10 und 13 kompensiert wird. Mit dieser Annahme könnte die Bedeutung der intramolekularen Wechselwirkung für die äußerst schnelle und effiziente Isomerisierungsreaktion verdeutlicht werden.

3.2.2.4 Photoprozeß

Die zeitaufgelöste Messung der photoinduzierten Prozesse bei Rhodopsin und den analogen Pigmenten wurde wie beim bakteriellen Protein mit Hilfe der Flash-Photolyse durchgeführt. Aufgrund der irreversiblen Bleichung des visuellen Systems mußte der Aufbau der Flash-Photolyse aber dahingehend geändert werden, daß nach jeder Anregung der Probe mittels des Laserlichtes reproduzierbar ein vollständiger Austausch des Probenvolumens gewährleistet werden konnte. Wie im experimentellen Teil unter Punkt 4.2.3.4 beschrieben, gelang dieses unter Zuhilfenahme einer Durchflußküvette in Verbindung mit einer Peristaltikpumpe, die in die elektronische Steuerung der Meßanlage eingebunden wurde. Aufgrund des Austauschs war für eine vollständige Messung ein sehr großes Probenvolumen notwendig, so daß bei einigen analogen Verbindungen mit geringen Rekonstitutionsraten und kleinen Extinktionskoeffizienten ein zweiter Durchlauf der Probe notwendig wurde. Die Volumina wurden aber so kalkuliert, daß maximal eine zweifache Anregung eines Probenteils stattfand. Zusätzlich verhinderte die Viskosität der Lösung eine Durchmischung der zurückgeführten mit der im Vorratsgefäß befindlichen Probe, so daß eine erneute Belichtung eines Volumens minimal vier Stunden nach der ersten Anregung erfolgte. Der Umsatz durch eine Belichtung betrug maximal 10 %, womit eine ausreichende Menge aktiven Pigments für eine zweite Anregung zur Verfügung stand. In der Auswertung wurden die infolge der zweimaligen Anregung verringerten Amplituden mittels eines Faktors korrigiert.

Vergleichbar zu Bacteriorhodopsin beinhaltet die Abfolge der thermodynamisch kontrollierten Reaktionsschritte im Photoprozeß des Rhodopsins (s. Einleitung, Punkt 1.2.2), insbesondere zum Ende Gleichgewichte zwischen den auftretenden Intermediaten. Die Möglichkeit zur Separation der Übergänge bei Rhodopsin ist gleichermaßen wie beim bakteriellen System begrenzt, so daß die LADS des Globalfits der Absorptionsverläufe wiederum zwei oder mehrere Intermediate repräsentieren können. Desweiteren mußte zur Eingrenzung der notwendigen Probenmenge in einer Meßsequenz die Anzahl der Mittelungen niedrig gehalten werden, wodurch sich eine Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses ergab.

Es ist noch darauf hinzuweisen, daß eine Abhängigkeit zwischen der Art des Detergens und einzelner Kinetiken des Photoprozesses bestehen kann. Bei der Verwendung von Dodecylmaltosid konnte für Rhodopsin z. B. eine bevorzugte Stabilisierung des Meta-II-

Zustands nachgewiesen werden, in dessen Folge der Zerfall des Meta-I-Intermediats beschleunigt wird[214]. Dieses muß nicht in gleicher Weise für die analogen Pigmente gelten. So ist im Falle von 9-Demethylretinal-Rhodopsin keine entsprechende Abhängigkeit zu beobachten[89]. Auch vor diesem Hintergrund wurde wie zuvor das native Rhodopsin bei der Flash-Photolyse mituntersucht. Zusätzlich diente diese Messung zur Überprüfung von Auswirkungen der Probenpräparation auf die Eigenschaften des rekonstituierten Systems und als Referenz zu den Ergebnissen der Literatur (z. B. Übersichtsartikel von *Ottolenghi et al.*[215] und *Kliger et al.*[71]).

Natives Rhodopsin

Die Transienten des Photoprozesses von nativem Rhodopsin lassen sich durch sechs Lebenszeiten beschreiben (Abb. 3-111). Das erste LAD-Spektrum mit einer Lebenszeit von 0.43 µs beschreibt den Zerfall des Batho- und BSI- und gleichzeitig die Entstehung des Lumi-Intermediats. Das BSI-Produkt kann infolge des begrenzten Auflösungsvermögens des Meßsystems und des geringen Signal/Rausch-Verhältnisses nicht separiert werden. Somit repräsentiert das erste Intermediatspektrum (I_1) sowohl das Batho- als auch das im Gleichgewicht stehende BSI-Intermediat. Aufgrund dieser Mischung findet sich das Absorptionsmaximum des Spektrums bei 520 nm und nicht wie für das Batho-Intermediat allgemein angenommen bei ca. 540 nm[216]. Charakteristisch für das Batho-Produkt ist entsprechend seines Namens das bathochrom zum Grundzustand liegende Absorptionsmaximum, während das BSI-Intermediat (*b*lue *s*hifted *i*ntermediate) zu diesem hypsochrom absorbierend gefunden werden kann (ca. 477 nm[93]). Ein Anteil der BSI-Zwischenstufe findet sich vermutlich auch noch im nachfolgenden Absorptionsspektrum (I_2), das aber im wesentlichen durch das Lumi-Intermediat dominiert wird. Die nächste Reaktion mit einer Zeit von 124 µs ist nur mit einer geringen Veränderung der spektralen Eigenschaften des Chromoproteins verbunden, so daß nur eine kleine Amplitude des LAD-Spektrums zu verzeichnen ist. Dieser Übergang beruht auf dem Zerfall des Lumi- und der Entstehung des Meta-I-Intermediats (I_2 nach I_3). Im darauffolgenden LADS mit der Lebenszeit von 815 µs ist eine Absorptionsabnahme bei ca. 510 nm und -zunahme um 400 nm zu erkennen. Erstere zeigt den Zerfall des Meta-I-Zustands, während die hypsochrome Absorption die Entstehung des Meta-II-Intermediats andeutet, das durch die Deprotonierung der Schiff-Base signifikant hypsochrom verschoben ist. Das vierte Intermediatspektrum (I_4) zeigt dabei ein Gleichgewicht zwischen den beiden Meta-Zuständen. Dem nächsten Übergang wird eine Lebenszeit von 4.2 ms zugeschrieben. Die

Zerfallskomponente dieses LAD-Spektrums bei ca. 470 nm und die Entstehungskomponente bei ca. 410 nm zeigt deutlich die Verschiebung der Konzentration des Meta-I-Intermediats zum Meta-II-Produkt[n]. Dementsprechend ist beim fünften Intermediatspektrum (I_5) die langwellige Absorption kaum noch zu erkennen.

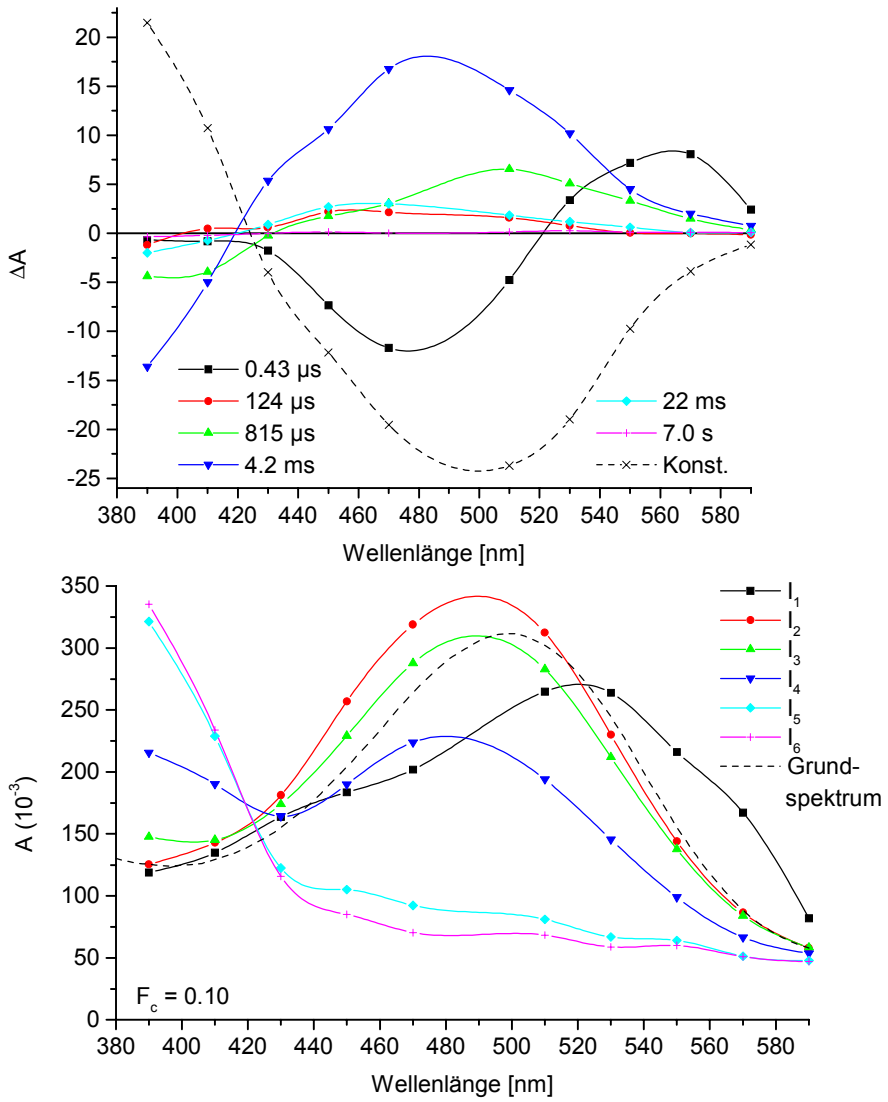


Abb. 3-111 Flash-Photolyse von nativem Rhodopsin (10 °C): LAD-Spektren des Globalfits (oben) und die daraus berechneten Intermediatspektren (unten).

Aufgrund der zum Ende des Photoprozesses auftretenden ausgeprägten Gleichgewichtsreaktionen[71] ist eine Interpretation der weiteren LAD-Spektren nur schwierig möglich. Gleichzeitig wird die Aussagekraft der berechneten Absorptionsspektren der

[n] Das Absorptionsmaximum des Meta-II-Produkts liegt bei 380 nm und konnte aufgrund der verringerten Empfindlichkeit der Flash-Photolyse unterhalb von 400 nm nicht mehr vollständig erfasst werden.

Intermediate geringer. Das LAD-Spektrum mit einer Lebenszeit von 22 ms zeigt einen Zerfall bei 460 nm und eine sehr kleine Entstehungskomponente bei 410 nm. Diesem Schritt entspricht der Übergang zwischen den Intermediatspektren I_5 und I_6, der mit den gleichen Absorptionsänderungen verbunden ist wie durch das LAD-Spektrum beschrieben. Somit könnte dieser Reaktion die weitere Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den Meta-Intermediaten zugunsten des Meta-II-Zustands zugeordnet werden. Das letzte LAD-Spektrum mit einer Lebenszeit von 7 s besitzt über den gesamten Wellenlängenbereich eine sehr kleine Amplitude und die Kinetik wurde mit dem größten verwendeten Zeitfenster von 5 s nicht mehr vollständig erfaßt. Möglicherweise liegt an dieser Stelle des Photoprozesses ein Gleichgewicht mit dem Meta-III-Intermediat vor, dessen Absorptionsmaximum bei ca. 465 nm liegt[216-218]. Andererseits kann auch bereits der Zerfall des Rhodopsins in Opsin und all-*E*-Retinal angenommen werden.

Rekonstituiertes Rhodopsin

Die Ergebnisse aus der Untersuchung des rekonstituierten Rhodopsins zeigen eine große Übereinstimmung zu den Daten des nativen Systems (Abb. 3-112). Zur Beschreibung der Absorptionsverläufe sind gleichermaßen sechs Exponentialfunktionen anzupassen und die erhaltenen LAD-Spektren sind nahezu identisch. Das Erscheinungsbild der Intermediatspektren ist hier allerdings durch die Absorption des anwesenden Retinaloxims beeinflußt. Bei den Lebenszeiten von Ret-Rho zeigt sich ebenfalls eine große Übereinstimmung. Eine Abweichung ist nur bei der zweiten Lebenszeit festzustellen, die bei Ret-Rho halb so groß ist wie beim nativen System. Dieser Übergang entspricht nach der oben vorgenommenen Zuordnung dem Zerfall des Lumi-Intermediats in den Meta-I-Zustand. Angesichts des geringen Signal/Rausch-Verhältnisses muß diese Differenz kein signifikanter Hinweis auf einen Unterschied zwischen den beiden Systemen darstellen. Verschieden zwischen den beiden Proteinen ist, daß das Ret-Rho Präparationsschritte wie die Bleichung und Rekonstitution sowie mehrere Waschvorgänge durchlaufen hat. Zusätzlich sind in der Probe Reste von Retinaloxim vorhanden. Ein Einfluß dieser vermutlich an der Peripherie des Proteins befindlichen Verbindungen auf die Reaktionskinetik ist relativ unwahrscheinlich. In der Literatur ist im übrigen auch kein Hinweis auf einen Unterschied zwischen nativem und rekonstituiertem Rhodopsin, z. B. bezüglich einer veränderten Position des Chromophors in der Bindungstasche, zu finden.

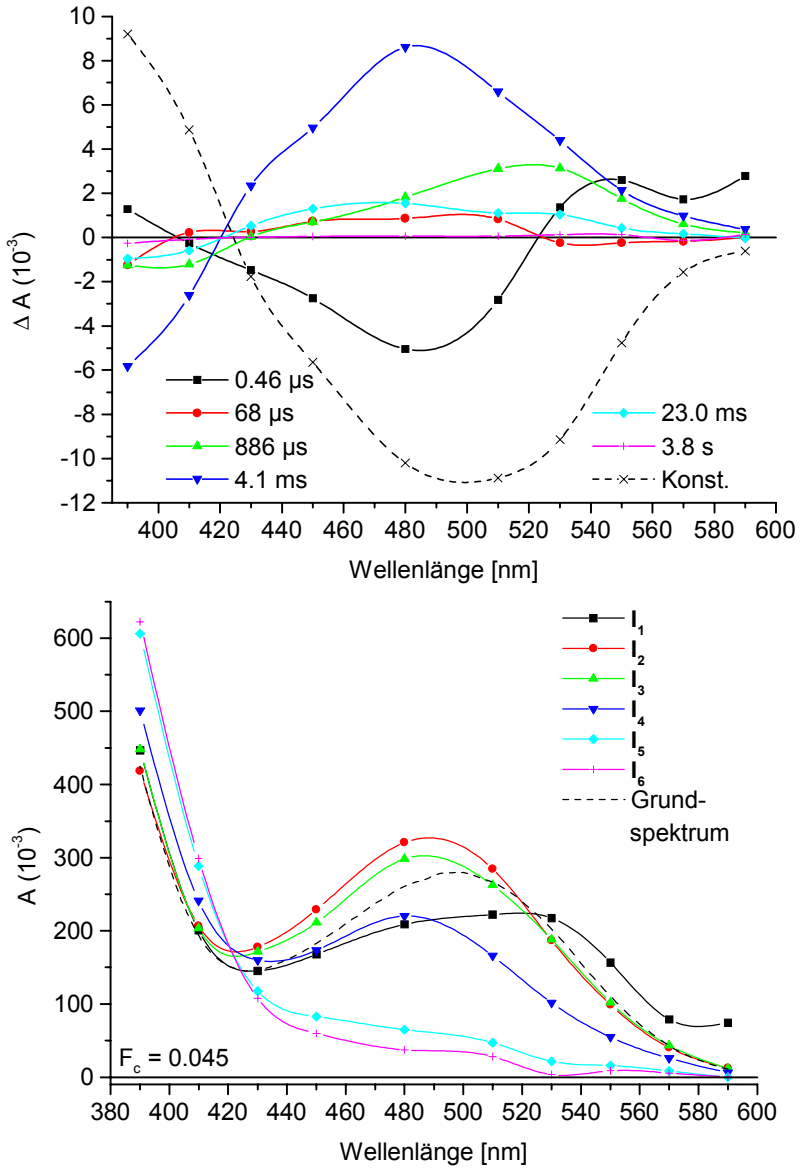


Abb. 3-112 Flash-Photolyse von rekonstituiertem Rhodopsin (10 °C): LAD-Spektren des Globalfits (oben) und die daraus berechneten Intermediatspektren (unten).

9-Demethylretinal-Rhodopsin

Der Photoprozeß von 9-Demethylretinal-Rhodopsin zeigt sich gegenüber dem nativen System drastisch verändert (Abb. 3-113). An die Absorptionsverläufe der Flash-Photolyse sind nur zwei Lebenszeiten anzupassen, und die Konstante des Globalfits besitzt eine positive Amplitude, die auf einen noch nicht abgeschlossenen Photoprozeß hinweist. Dementsprechend konnten mittels eines Spektralphotometers weitere Reaktionsschritte beobachtet werden (Abb. 3-114).

Die sich ergebenden LAD-Spektren der Flash-Photolyse-Daten besitzen trotz des großen Unterschieds in den Lebenszeiten eine geringe Amplitude. Dieses deutet darauf

hin, daß die Konfigurations- und Konformationsänderungen des Chromophors nur zu geringfügig veränderten Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der Bindungstasche führen und somit das spektrale Verhalten wenig beeinflußt wird. Die Existenz des Batho-Intermediats im Photoprozeß von 9-dm-Rho konnte durch *Eyring et al.*[88] nachgewiesen werden. Somit kann das erste LAD-Spektrum dem Zerfall des Batho- und eventuell BSI-Intermediats und der Entstehung des Lumi-Zustands zugeordnet werden. Die Geschwindigkeit dieses Überganges mit 0.68 µs ist vergleichbar zu Rhodopsin. Das zweite LAD-Spektrum zeigt nur einen Zerfall mit einem Maximum der Komponente bei ca. 480 nm. Dieser Übergang könnte dem Zerfall des Lumi-Intermediats in den Meta-I-Zustand entsprechen, der allerdings mit 352 ms im Vergleich zu Rhodopsin deutlich langsamer verläuft (68 µs Ret-Rho). Ist die Zuordnung korrekt, dann stellt die Konstante das Spektrum des Meta-I-Intermediats dar (λ_{max} = 485 nm). Erstaunlich ist die zum Grundzustand bathochrome Absorption dieses Intermediats. Der Meta-I-Zustand bei Rhodopsin absorbiert bei ca. 480 nm hypsochrom zum Dunkelzustand bei 500 nm.

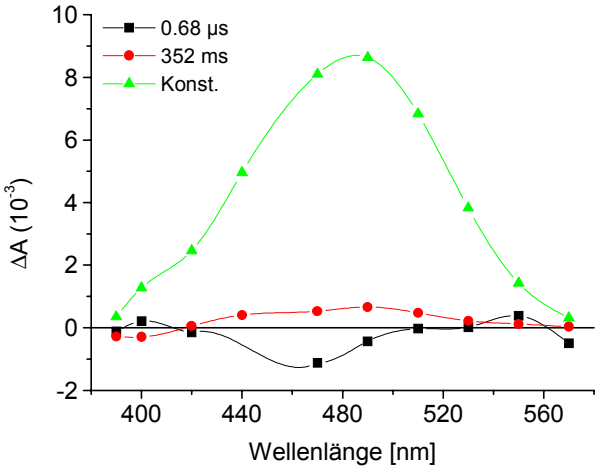


Abb. 3-113 LAD-Spektren des Globalfits der Flash-Photolyse-Daten von 9-Demethylretinal-Rhodopsin (10 °C).

Bei der Messung der langsamen Kinetiken ist nach der Belichtung der Probe mit einem Interferenzfilters zuerst ein Absorptionsspektrum zu detektieren, das im Vergleich zum Grundzustand eine höhere Absorption aufweist (Abb. 3-114). Das Absorptionsmaximum dieses Spektrums ist in der Position vergleichbar mit dem Maximum der Konstanten, dem Meta-I-Intermediat des 9-dm-Rho. Der dargestellte Absorptionsverlauf bei 500 nm zeigt, daß die Gesamtreaktion erst nach über 10 Stunden vollständig abgeschlossen ist. Insgesamt lassen sich an die Absorptionsverläufe drei Lebenszeiten anpassen. Das erste LAD-Spektrum mit einer Lebenszeit von 31 min zeigt eine Entstehung bei 480 nm und

einen Zerfall bei 380 nm. Aufgrund der hypsochromen Zerfallskomponente kann dieser Übergang nicht direkt an die letzte, in der Flash-Photolyse zu beobachtende Reaktion angefügt werden. Demnach ist anzunehmen, daß die durch die Konstante der Flash-Photolyse beschriebene Komponente innerhalb des Zeitraums, der zwischen den beiden Messungen liegt, in das kurzwellig absorbierende Intermediat zerfällt. Die Absorption bei 380 nm kann dabei nur auf einen Meta-II ähnlichen Zustand zurückzuführen sein, bei dem die Schiff-Base des 9-dm-Rho deprotoniert vorliegt.

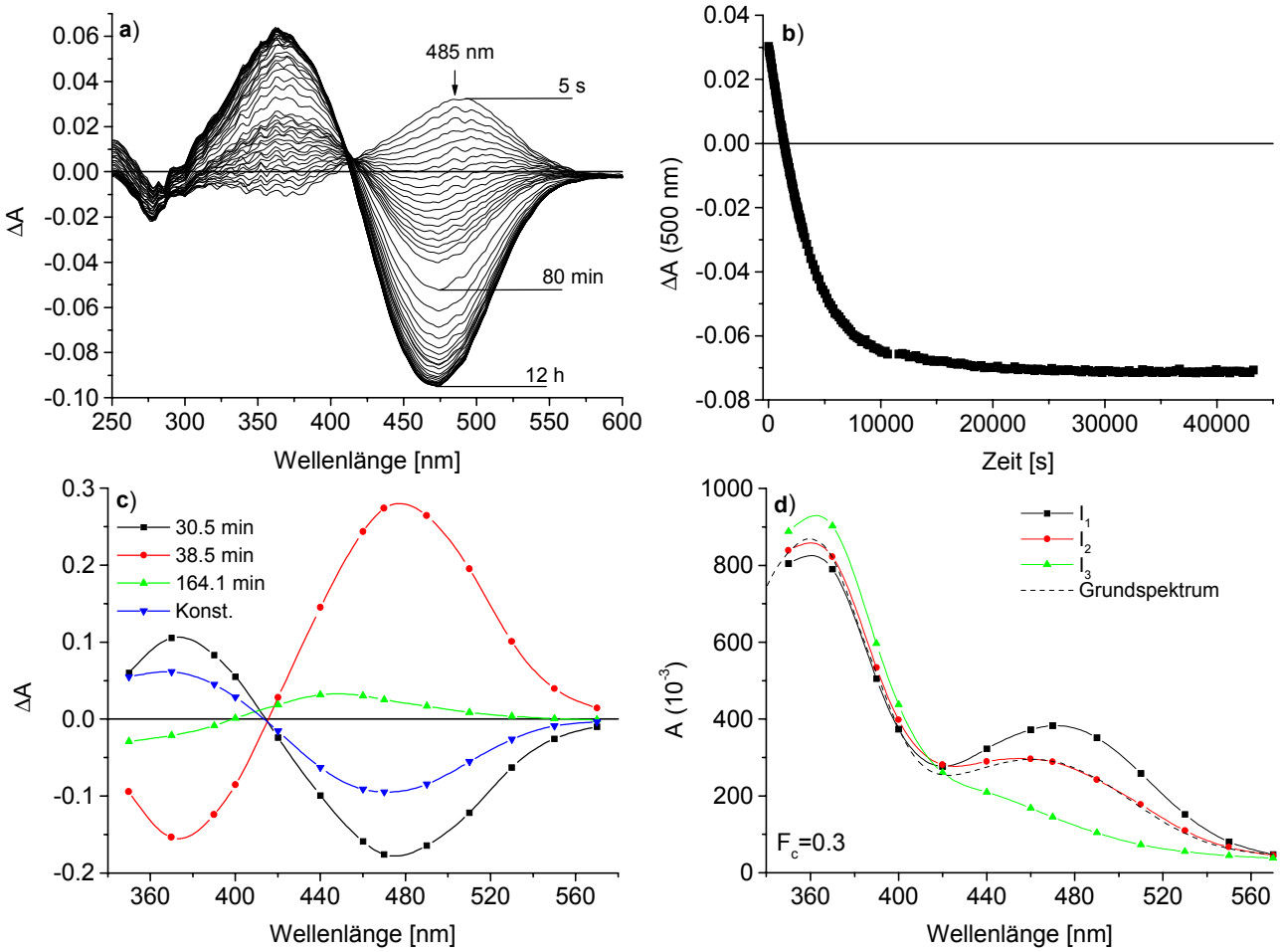


Abb. 3-114 Langsame Kinetiken von 9-Demethylretinal-Rhodopsin bei 20 °C nach der Belichtung mit 486 nm (Interferenzfilter): a) Differenzspektren zum Dunkelzustand (Auswahl), b) Absorptionsverlauf bei 500 nm, c) LAD-Spektren des Globalfits der Diffenzspektren und d) die aus den LADS berechneten Intermediatspektren (Die LAD-Spektren wurden in der Reihenfolge ansteigender Lebenszeiten verrechnet).

Allerdings muß das LAD-Spektrum mit der kürzeren Lebenszeit nicht unbedingt den ersten Übergang repräsentieren. Wird dem zweiten LAD-Spektrum mit der Lebenszeit von 39 min die Beschreibung der ersten Reaktion zugeordnet, könnte diese direkt an die Ergebnisse der Flash-Photolyse angeschlossen werden. Damit würde das Meta-I-

Intermediat mit einer Zeit von 39 min in das Meta-II-Intermediat übergehen. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion wäre damit außerordentlich langsam. In einer kürzlich publizierten Untersuchung von 9-dm-Rho durch *Vogel et al.*[94] wurden Kinetiken bei einem pH-Wert von 4.5 gemessen, bei dem im Falle des analogen Pigments die Entstehung des Meta-II-Zustands favorisiert ist[89]. Dabei wurde der Entstehung des Meta-II-Intermediats bei 6 °C anhand der Absorptionsänderung bei 480 nm eine Zeit von 0.9 s zugeordnet. Dieses würde der hier zuerst vorgenommenen Annahme entsprechen, daß innerhalb des Zeitraums zwischen den Messungen (Flash-Photolyse und Spektralphotometer) eine bzw. mehrere Reaktionen stattfinden, so daß das LAD-Spektrum mit der kürzesten Zeit (31 min) an die erste Stelle des Reaktionsschemas zu stellen wäre. Allerdings ist die von *Vogel et al.* gemessene Absorptionsabnahme in guter Übereinstimmung mit dem hier beobachteten Zerfall des Lumi-Intermediats.

Unabhängig davon ist der spiegelbildliche Verlauf des ersten und zweiten Intermediats ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen eines Gleichgewichts. Folgt man der Argumentation der zweiten Annahme, daß die kürzere Lebenszeit (31 min) den *zweiten* Übergang beschreibt, dann stellt diese die Rückreaktion des Meta-II-Zustands in das Meta-I-Intermediat dar (oder eine vergleichbar absorbierenden Zwischenstufe). Das dritte LAD-Spektrum (164.1 min) durchläuft nicht den isosbestischen Punkt der vorhergehenden und könnte so dem Schritt aus dem Gleichgewicht, und Zerfall des Meta-II-Intermediats in Opsin und all-*E*-9-Demethylretinal entsprechen.

Die Ergebnisse demonstrieren deutlich, daß der verringerte sterische Anspruch an der Position 9 des Chromphors die letzten Reaktionsschritte des Photoprozesses dramatisch verzögert. Die bei 20 °C über einen Zeitraum von Stunden zu detektierenden Kinetiken (Abb. 3-114) werden dabei vor allem einem gegenüber nativem Rhodopsin veränderten Protonierungs-Gleichgewicht der Schiff-Base zugeordnet. In Folge ist bei 9-dm-Rho eine verringerte Fähigkeit zur Aktivierung der Enzymkaskade zu beobachten[89,91,94,96,97]. Frühere Untersuchungen machten dafür die *direkte* Interaktion der Position 9 des Chromophors mit der Aminosäure Gly121 verantwortlich, die insbesondere die zur Aktivierung der Kaskade notwendigen Konformationsänderungen des Proteins zum Meta-II-Zustand bewirken sollte[57,79,91,100,101,219]. Die Röntgenstruktur[56] von Rhodopsin (s. Einleitung) zeigt hingegen, daß das Gly121 nicht in der Nähe der Position 9 des Chromophors lokalisiert ist, sondern am Iononring. Unter der Voraussetzung, daß die Röntgenstruktur eine ausreichende Genauigkeit aufweist, dann besteht demnach die Aufgabe des Glycins in der

Positionierung des Chromophors innerhalb der Bindungstasche über die sterische Interaktion mit dem Ring des Moleküls. Denkbar ist aber auch, daß es zu einer direkten sterische Wechselwirkung zwischen der Aminosäure und der Position 9 nach der Isomerisierung des Chromophors kommt.

9-Ethylretinal-Rhodopsin

Die Erhöhung der Größe des Substituenten an der Position 9 des Chromophors bei 9-Ethylretinal läßt im Gegensatz zu 9-dm-Rho wiederum einen zum nativen Rhodopsin vergleichbareren Photoprozeß zu (Abb. 3-115). Dementsprechend sind außerhalb des Zeitfensters der Flash-Photolyse keine Reaktionen mehr zu beobachten. Allerdings werden zur Beschreibung der Transienten des Photoprozesses von 9-Et-Rho nur vier Exponentialfunktionen benötigt.

Das erste LAD-Spektrum repräsentiert den Zerfall des Gleichgewichts zwischen dem Batho- und dem BSI- zum Lumi-Intermediat. Die im Vergleich zum nativen System geringere Lebenszeit dieses Übergangs von 1.6 µs ist übereinstimmend mit den Ergebnissen von *Lewis et al.*[102], die in einer Untersuchung dieses analogen Pigments bei Raumtemperatur für diese Reaktion eine Lebenszeit von 0.77 µs fanden. Für das Batho-Produkt wird an gleicher Stelle ein Absorptionsmaximum von 540 nm angegeben. Infolge des Mischung aus Batho- und BSI-Intermediat zeigt sich hier das Maximum der ersten zu detektierenden Zwischenstufe bei ca. 530 nm. Die nächste Reaktion verläuft mit einer zu Rhodopsin vergleichbaren Lebenszeit von 91 µs (Ret-Rho 68 µs). Erstaunlich ist allerdings, daß anhand des LAD-Spektrums bereits eine deutliche Entstehungskomponente unterhalb von 430 nm zu beobachten ist. Somit beinhaltet das zweite LAD-Spektrum nicht nur den Zerfall des Lumi-Intermediats, sondern auch den des Meta-I-Zustands zum Meta-II-Intermediat. Das zweite Intermediatspektrum (I_2) stellt demnach eine Mischung aus dem Lumi- und dem Meta-I-Zustand dar, wobei der Übergang zwischen beiden Intermediaten im Gegensatz zu Rhodopsin kinetisch nicht aufgelöst werden kann. Dem LAD-Spektrum mit einer Lebenszeit von 7.6 ms liegt die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen dem Meta-I- und Meta-II-Intermediat zugunsten letzterem zugrunde. (Die Amplitude dieses LADS ist bei 450 und 460 nm durch das Anregungslicht geringfügig verfälscht.) Das vierte LAD-Spektrum zeigt im Anschluß den vollständigen Zerfall des Meta-I-Intermediats. Die Lebenszeiten des dritten und vierten Übergangs sind mit 7.6 und 39.5 ms in der Geschwindigkeit vergleichbar zu den entsprechenden bei Rhodopsin ablaufenden

Reaktionsschritten (4.1 bzw. 23 ms). Eine langsame Kinetik mit einer Lebenszeit von Sekunden ist bei diesem analogen Pigment nicht zu beobachten.

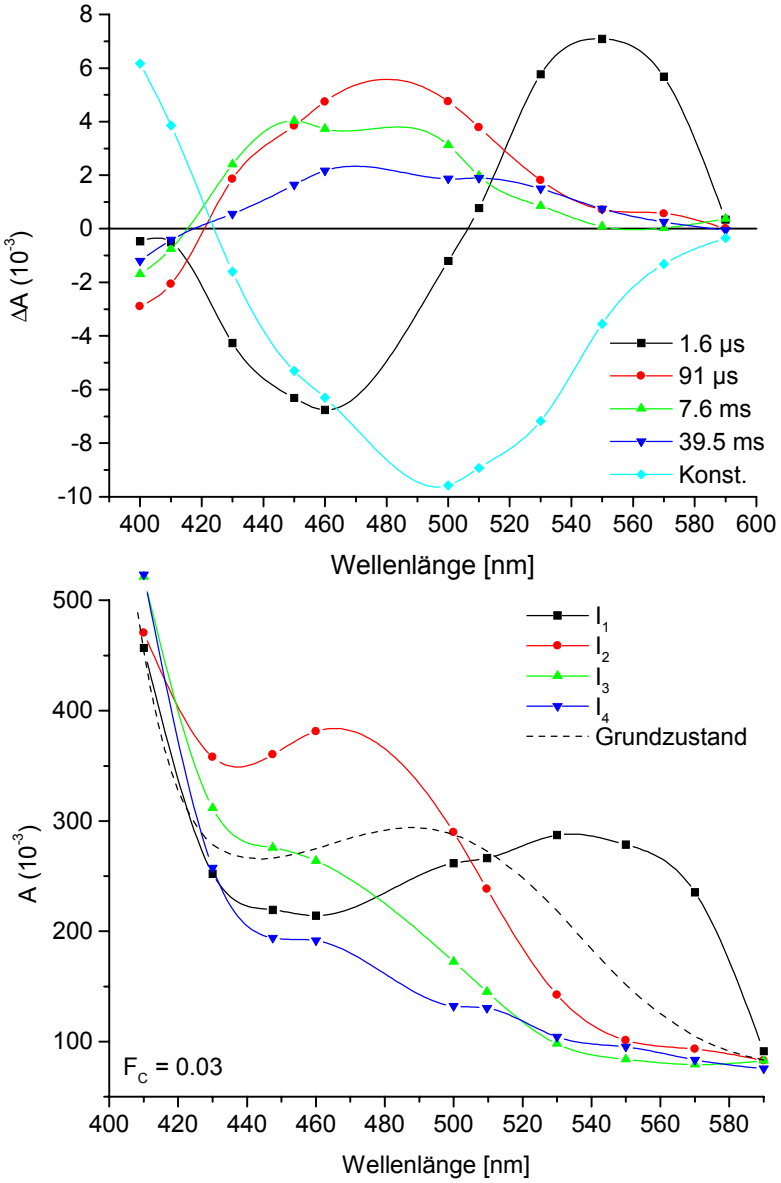


Abb. 3-115 Flash-Photolyse von 9-Ethylretinal-Rhodopsin (10 °C): LAD-Spektren des Globalfits (oben) und die daraus berechneten Intermediatspektren (unten).

Insgesamt verursacht die bei 9-Ethylretinal gegenüber Retinal erhöhte sterische Wechselwirkung mit der Bindungstasche des Proteins insbesondere eine Beschleunigung des Übergangs zwischen dem Lumi- und dem Meta-I- sowie dem Meta-I zum Meta-II-Zustand. Während bei nativem Rhodopsin beim LAD-Spektrum mit einer Lebenszeit von 815 µs ein erster Hinweis auf das Meta-II-Intermediat vorhanden ist, tritt dieser Zustand bei 9-Et-Rho bereits im LAD-Spektrum mit einer Lebenszeit von 91 µs hervor. Die nachfolgenden Schritte, wie der Zerfall des Meta-II-Intermediats, werden durch die Modifikation weniger stark beeinflußt. Dieses Bild ist in relativ guter Übereinstimmung mit

einer Untersuchung des analogen Pigments, bei der eine relativ mäßige Verringerung der Transducin-Aktivierung auf 80.2 ±19.5 % im Vergleich zu rekonstituiertem Rhodopsin festgestellt wurde[100].

13-Demethylretinal-Rhodopsin

Aus der Analyse der Absorptionsverläufe von 13-Demethylretinal-Rhodopsin sind fünf Lebenszeiten abzuleiten (Abb. 3-116). Darüber hinaus finden sich unter Verwendung eines größeren Zeitfenster zwei weitere Kinetiken (Abb. 3-117).

Beim ersten LAD-Spektrum (2 µs) fällt im Vergleich zu den LADS von Rhodopsin insbesondere die geringe Amplitude oberhalb von 520 nm auf. Damit wird das Ergebnis von *Einterz et al.*[111] bestätigt, daß das Gleichgewicht zwischen dem Batho- und BSI-Intermediat durch einen relativ großen Anteil des hypsochrom absorbierenden Intermediats dominiert wird. Das LAD-Spektrum repräsentiert somit über den Zerfall bei ca. 420 nm und der Entstehung bei ca. 500 nm vor allem das Differenzspektrum zwischen dem BSI- und dem Lumi-Zustand. Entsprechend ist das erste Intermediatspektrum (I_1) durch die Absorption des BSI-Zustands geprägt und das Absorptionsmaximum findet sich bei ca. 470 nm. Das Nebenmaximum bei 530 nm ist nicht signifikant. Wird der Verlauf des Spektrums extrapoliert, so ergibt sich eine flach abfallende bathochrome Flanke, unter der sich die Absorption des Batho-Intermediats verbirgt. Der große Anteil des BSI-Intermediats verursacht vermutlich auch die mit 2 µs relativ lange Lebenszeit des Übergangs zum Lumi-Intermediat. Allerdings verläuft dessen Zerfall im nächsten Schritt mit einer Lebenszeit von 184 µs ebenfalls langsamer als bei Rhodopsin (68 µs). Das LAD-Spektrum zeigt keine Absorptionsänderung unterhalb von 420 nm, so daß nur der Übergang zum Meta-I-Intermediat angenommen werden kann. Somit entspricht das Intermediatspektrum I_3 ebenfalls nur dem Meta-I-Zustand. Die Entstehung des Meta-II-Zustand unterscheidet sich bei 13-dm-Rho ebenfalls von Rhodopsin. Während dort für die Gleichgewichtsreaktionen zwischen dem Meta-I und Meta-II-Zustands drei Schritte zu detektieren sind (886 µs, 4.1 und 23 ms), finden sich bei 13-dm-Rho nur zwei Übergänge mit deutlich längeren Lebenszeiten von 76.4 und 217 ms. Bei den Intermediatspektren ist dieses daran zu erkennen, daß das Spektrum des ausgeprägten Meta-I/Meta-II-Gleichgewichts fehlt (I_4 bei Ret-Rho). Übereinstimmend sind die Spektren I_4 und I_5 bei 13-dm-Rho mit I_5 und I_6 bei Ret-Rho (s. Abb. 3-112, S. 205). Der Unterschied könnte ein Hinweis auf ein verändertes Reaktionsschema des Photoprozesses zum Zeitpunkt der Meta-Intermediate sein, wobei die Geschwindigkeiten der Gleichgewichtsreaktionen durch den verringerten sterischen

Anspruch des 13-Demethylretinal und somit einer größeren Bewegungsfreiheit in der Bindungstasche insgesamt verzögert werden. Die letzte mit der Flash-Photolyse zu detektierende Lebenszeit des 13-dm-Rho verläuft vergleichbar zu Ret-Rho mit 3.5 s.

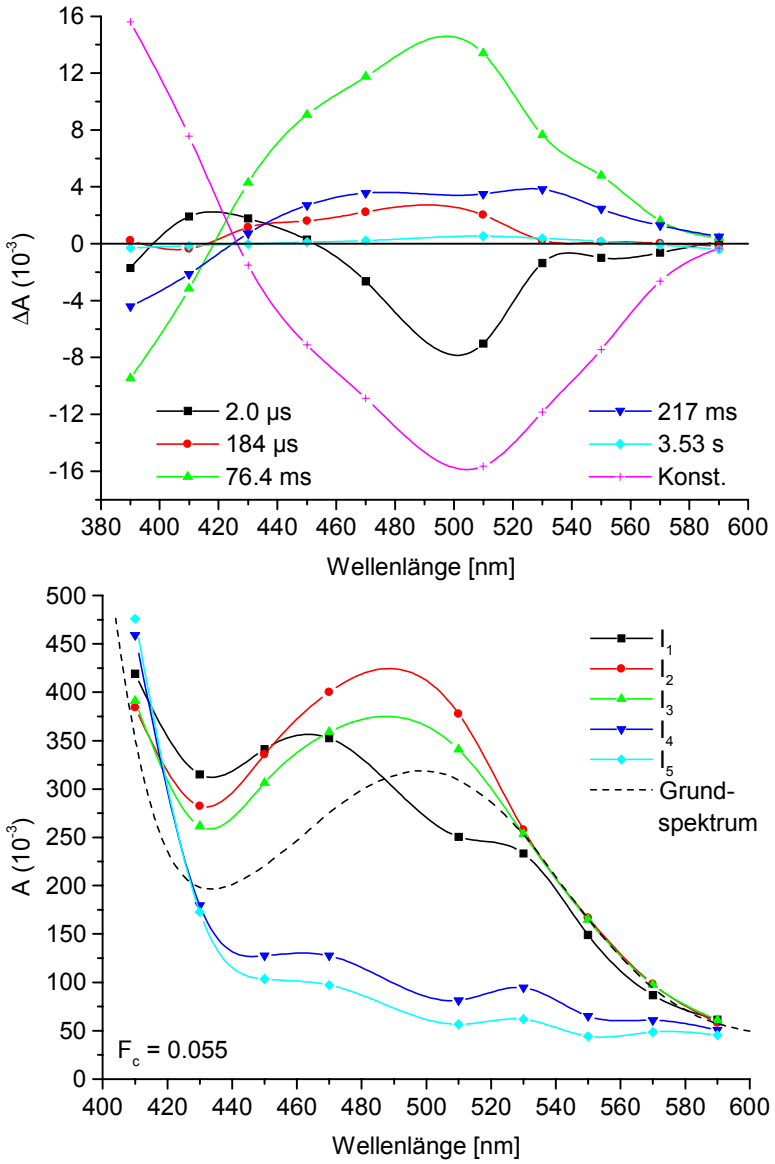


Abb. 3-116 Flash-Photolyse von 13-Demethylretinal-Rhodopsin (10 °C): LAD-Spektren des Globalfits (oben) und die daraus berechneten Intermediatspektren (unten). Die Amplituden der LAD-Spektren bei 510 nm sind geringfügig verfälscht. Somit werden auch die Nebenmaxima bei den Intermediatspektren I_4 und I_5 nicht durch eine bei 530 nm absorbierende Spezies verursacht.

Der Absorptionsverlauf bei 500 nm in Abb. 3-117 zeigt, daß die letzten Reaktionen des Photoprozesses von 13-dm-Rho nach ca. einer Stunde vollkommen abgeschlossen sind. Das LAD-Spektrum mit der Lebenszeit von 720 s entspricht mit einer Zerfallskomponente bei 380 nm und einer Absorptionszunahme bei ca. 460 nm, die möglicherweise dem Übergang vom Meta-II- in den Meta-III-Zustand zuzuordnen ist. Im darauffolgenden LADS wäre dann mit einer Lebenszeit von ca. 50 min der Zerfall des Meta-III-Produkts in Opsin

und 13-Demethylretinal zu beobachten. Dementsprechend ist das Erscheinungsbild der Intermediatspektren: Das erste besitzt nur die Absorption des Meta-II-Zustands bei 380 nm, während das zweite ein deutliche Absorption oberhalb von ca. 430 nm aufweist.

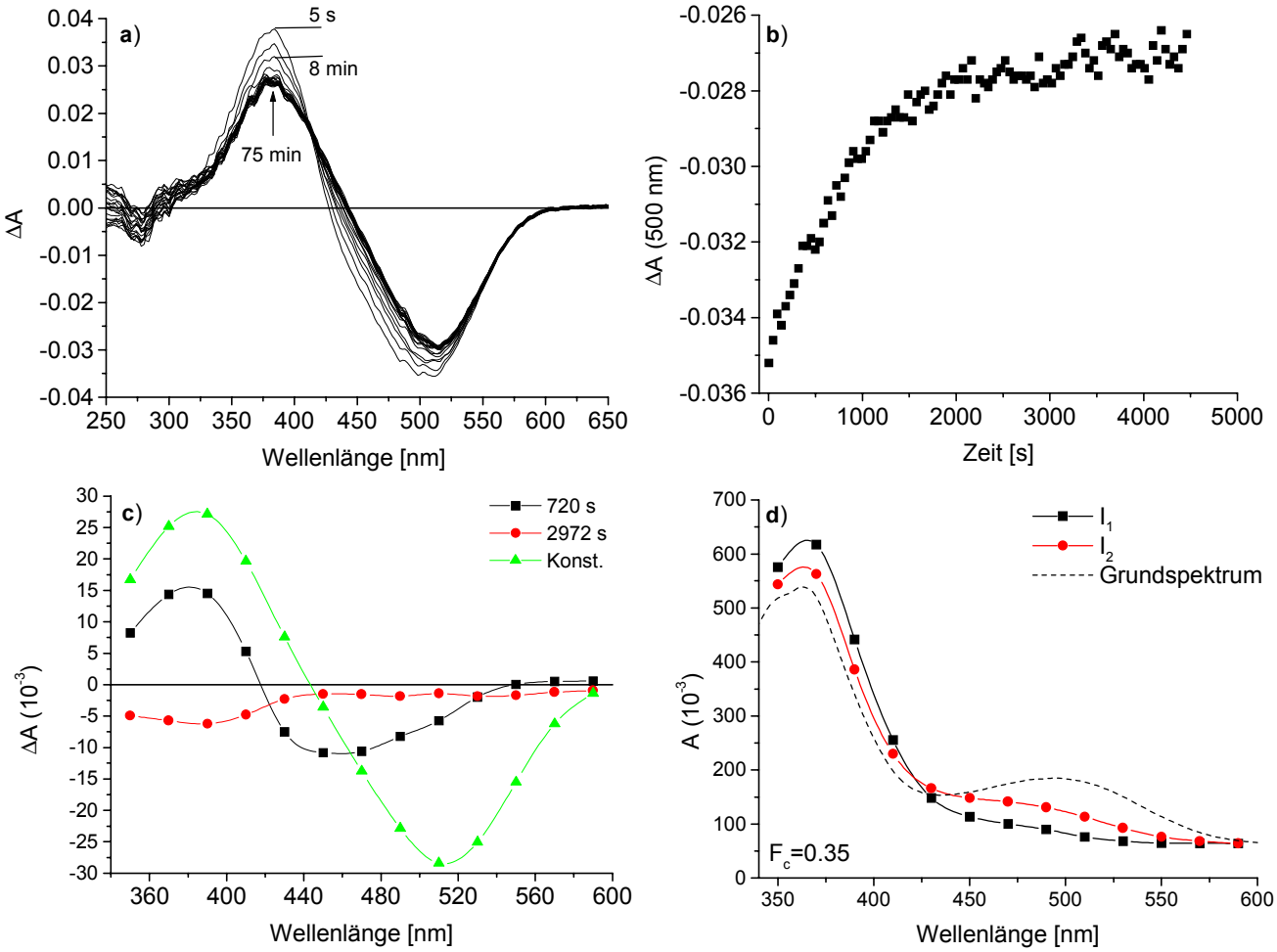


Abb. 3-117 Langsame Kinetiken von 13-Demethylretinal-Rhodopsin bei 20 °C nach der Belichtung mit 486 nm (Interferenzfilter): a) Differenzspektren zum Dunkelzustand, b) Absorptionsverlauf bei 500 nm, c) LAD-Spektren des Globalfits der Diffenzspektren und d) die aus den LADS berechneten Intermediatspektren.

Die Ergebnisse von 13-dm-Rho zeigen, daß die Verringerung des sterischen Anspruchs an Position 13 des Chromophors zu einer deutlichen Verzögerung des gesamten Photoprozesses führt; das Ausmaß ist aber gegenüber 9-Demethylretinal-Rhodopsin weniger dramatisch. So kann bei 13-dm-Rho im Gegensatz zu 9-dm-Rho mit der Flash-Photolyse noch eine zu Rhodopsin vergleichbare Abfolge von Intermediaten detektiert werden. Signifikant ist dabei die hohe Konzentration des BSI-Intermediats im Gleichgewicht mit dem Batho-Zustand. Insgesamt können die Eigenschaften des 13-dm-Rho

vorwiegend mit der bereits angesprochenen höheren Flexibilität des Chromophors in der Bindungstasche des Proteins begründet werden.

10-Methyl-13-demethylretinal-Rhodopsin

Mit der Flash-Photolyse kann beim analogen Pigment MD-Rho kein regulärer Photoprozeß beobachtet werden (Abb. 3-118). Aus der Analyse der Absorptionsverläufe ergeben sich zwei Lebenszeiten, deren LAD-Spektren eine sehr geringe Amplitude aufweisen. Eine Interpretation und Zuordnung von Intermediaten im Vergleich zu Rhodopsin ist somit kaum möglich. Die Lebenszeit des ersten LADS ist mit 236 µs zu lang, als daß es einem Übergang zugeordnet werden könnte, an dem das Batho-Intermediat beteiligt ist. Das zweite LAD-Spektrum könnte eventuell auf ein Lumi-Intermediat zurückgeführt werden, es besitzt allerdings ebenfalls eine sehr lange Lebenszeit von 0.54 s.

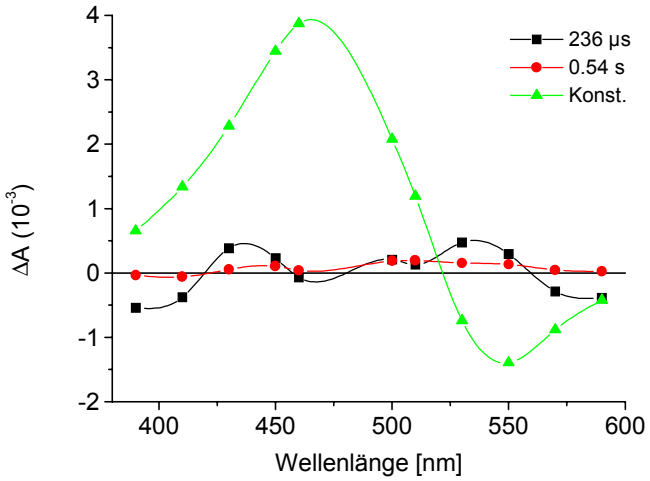


Abb. 3-118 LAD-Spektren des Globalfits der Flash-Photolyse-Daten von 10-Methyl-13-demethylretinal-Rhodopsin (10 °C).

Die Konstante des Globalfits entspricht nicht dem Differenzspektrum zwischen dem Oxim des Chromophors und dem Ausgangszustand und zeigt somit, daß die Gesamtreaktion innerhalb des Zeitfensters der Flash-Photolyse noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Zwar lassen sich unter Verwendung eines größeren Beobachtungszeitraums bei 20 °C weitere Reaktionen detektieren (Abb. 3-119), der Absorptionsverlauf bei 500 nm (Abb. 3-119b) konvergiert aber selbst nach 20 h noch nicht gegen einen konstanten Wert, so daß auch mit diesem großen Zeitfenster der Endpunkt des Prozesses nicht beobachtet werden konnte.

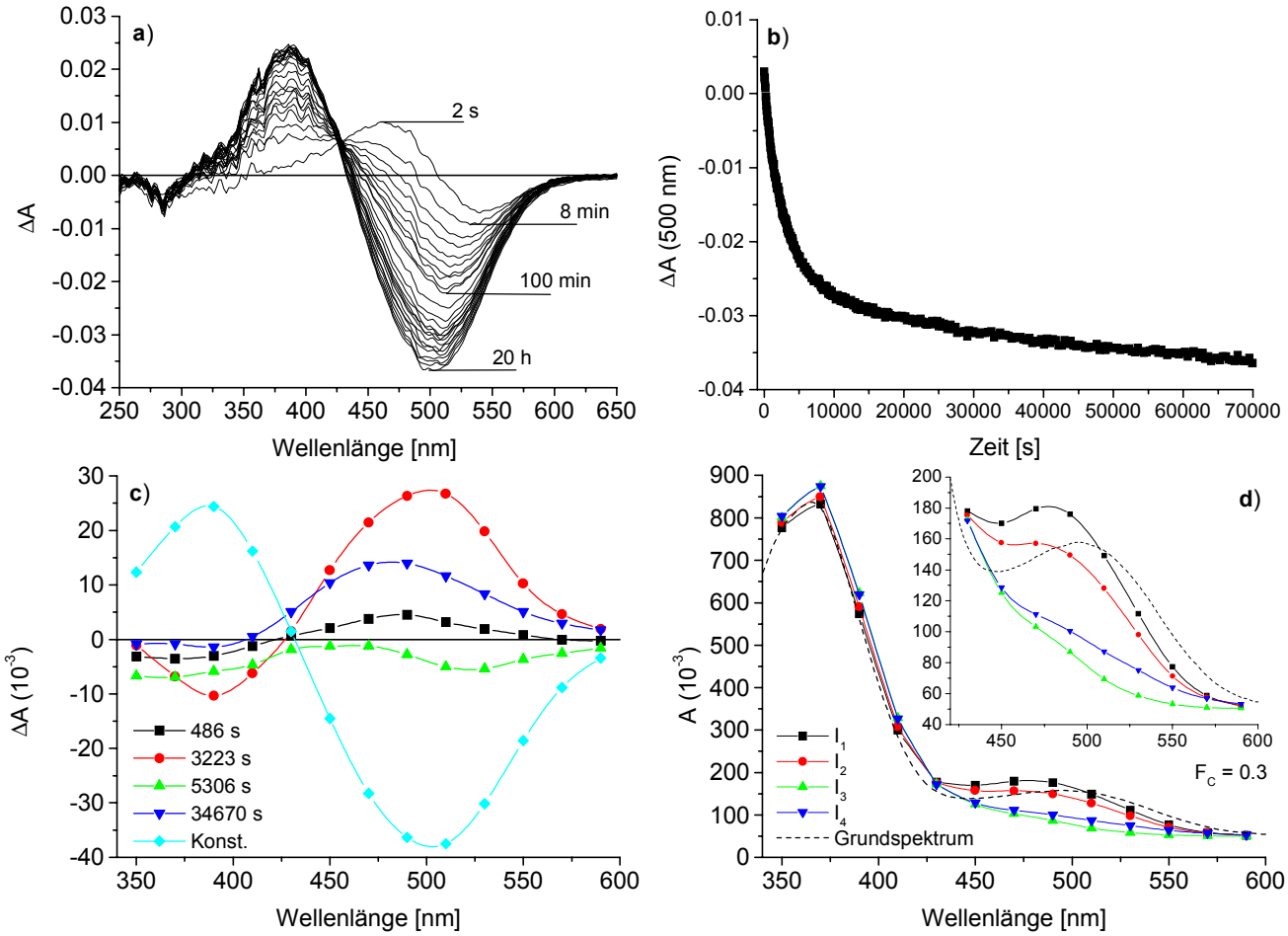


Abb. 3-119 Langsame Kinetiken von 10-Methyl-13-demethylretinal-Rhodopsin bei 20 °C nach der Belichtung mit 486 nm (Interferenzfilter): a) Differenzspektren zum Dunkelzustand, b) Absorptionsverlauf bei 500 nm, c) LAD-Spektren des Globalfits der Diffenzspektren und d) die aus den LADS berechneten Intermediatspektren.

Die ersten beiden LAD-Spektren (486 und 3223s) der langsamen Kinetiken beinhalten eine Absorptionsabnahme bei ca. 490 nm und eine Zunahme unterhalb von 430 nm. Damit könnte diesen Schritten die Deprotonierung der Schiff-Base und eine Reaktion vom Meta-I- zum Meta-II-Intermediat zugeordnet werden. Möglicherweise enthält das erste LAD-Spektrum dabei noch einen Anteil des Lumi-Intermediats. Allerdings könnte dieses Intermediat auch innerhalb des Zeitraums auftreten, der zwischen dem größten Zeitfenster der Flash-Photolyse und dem Beginn des Zeitfensters des Spektralphotometers liegt. Die dritte Reaktion mit einer Lebenszeit von 5306 s kennzeichnet sowohl eine Zunahme der Absorption unterhalb von 430 nm als auch bei ca. 530 nm, so daß die Beteiligung des Meta-III-Intermediats am Gleichgewicht mit den anderen beiden Meta-Intermediaten denkbar wäre. Beim vierten LADS (34670 s) ist eine Zerfallskomponente mit einem Maximum bei ca. 480 nm und hypsochrom eine Absorptionszunahme mit deutlich kleinerer

Amplitude zu erkennen. In Anlehnung an die obige Zuordnung würde dieser Übergang den Zerfall des Meta-III-Intermediats darstellen.

Insgesamt führt die gegenüber 13-dm-Rho zusätzlich vorhande 10-Methylgruppe bei MD-Rho zu einer drastischen Veränderung des Photocyclus. Innerhalb des Zeitfensters der Flash-Photolyse kann eine vergleichbare Abfolge von Intermediaten nicht detektiert werden und die Reaktionen zwischen den Meta-Intermediaten sind im Vergleich zu 13-dm-Rho weiter verzögert. Dieses Verhalten wird durch die bereits bei 13-Demethylretinal infolge der fehlenden Methylgruppe zu beobachtenden höheren Flexibilität des Chromophors innerhalb des Proteins, in Verbindung mit einer zusätzlichen Wechselwirkung der 10-Methylgruppe und der Bindungstasche verursacht. Damit wird die bei der Quantenausbeute gemachte Annahme der sterischen Hinderung bestätigt.

10-Methylretinal-Rhodopsin

Aus den Daten der Flash-Photolyse lassen sich fünf Lebenszeiten erhalten und zusätzlich können drei langsame Kinetiken mit dem Spektralphotometer registriert werden (Abb. 3-120 bzw. Abb. 3-121). Das erste LAD-Spektrum der Flash-Photolyse-Daten zeigt den Zerfall vom Batho- in das Lumi-Intermediat. Ein eventuell vorhandenes BSI-Intermediat kann kinetisch nicht aufgelöst werden und ist aufgrund des leicht verfälschten Verlaufs des LADS durch die Amplitude bei 470 nm nicht erkennen. Das Absorptionsmaximum des Batho-Produkts findet sich nach dem ersten Intermediatspektrums bei ca. 530 nm. Das zweite Spektrum entspricht dem Lumi-Intermediat mit einem Maximum bei ca. 500 nm. Interessanterweise zeigt dieses und alle weiteren Intermediatspektren eine höhere Absorption als der Grundzustand. Während die Lebenszeit des ersten Übergangs mit 0.33 µs vergleichbar zum nativen System ist, verläuft der Zerfall des Lumi-Intermediats zum Meta-I-Zustand mit 217 µs mit einer langsameren Geschwindigkeit (Ret-Rho 68 µs). Bei diesem LAD-Spektrum ist keine Absorptionsänderung vorhanden, die bereits auf die Anwesenheit des Meta-II-Zustands schließen läßt. Somit repräsentiert das dritte Intermediatspektrum (I_3) nur das Meta-I-Intermediat. Im Unterschied zu Rhodopsin liegt dieses geringfügig hypsochrom verschoben zum Spektrum des Lumi-Zustands.

Nicht eindeutig zuzuordnen ist die Reaktion, die durch das dritte LAD-Spektrum mit einer Lebenszeit von 17.6 ms beschrieben wird; das LADS ist analog zum vorherigen auf eine kleine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums zurückzuführen (I_2, I_3 und I_4). Möglicherweise liegt beim 10-Me-Rho ein Gleichgewicht zwischen dem Lumi- und

Meta-I-Intermediat vor, welches die Reaktionen mit einer Lebenszeit von 217 µs und 17.6 ms verursacht. Das nächste LAD-Spektrum (182 ms) weist eine Zerfallskomponente bei 490 und eine Entstehungskomponente bei ca. 400 nm auf und ist dem Übergang vom Meta-I- zum Meta-II-Intermediat zuzuordnen. Im Absorptionsspektrum dieser Zwischenstufe (I_5) ist dabei noch eine relativ große Konzentration des Meta-I-Zustands zu erkennen. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den beiden Meta-Zuständen zugunsten des Meta-II-Intermediats wird durch das fünfte LAD-Spektrum mit einer Lebenszeit von 573 ms beschrieben.

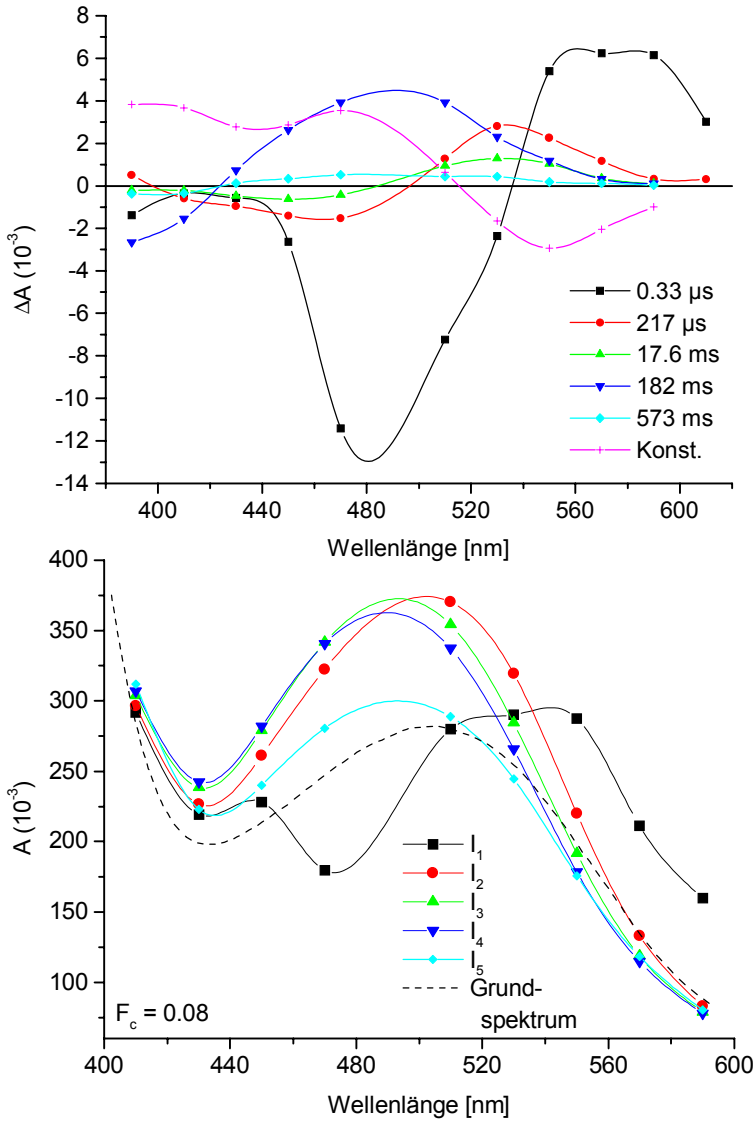


Abb. 3-120 Flash-Photolyse von 10-Methylretinal-Rhodopsin (10 °C): LAD-Spektren des Globalfits (oben) und die daraus berechneten Intermediatspektren (unten). Aufgrund der kurzen Lebenszeit ist die Amplitude des ersten LADS bei 470 nm durch das Anregungslicht verfälscht. Gleiches gilt für das erste Intermediatspektrum.

Die Konstante des Globalfits der Flash-Photolyse-Daten zeigt als Differenzspektrum zum Ausgangszustand bathochrom eine geringere Absorption sowie bei 480 nm das Maximum des Meta-I- und bei ca. 400 nm das des Meta-II-Intermediats in einer ungefähr vergleichbaren Konzentration.

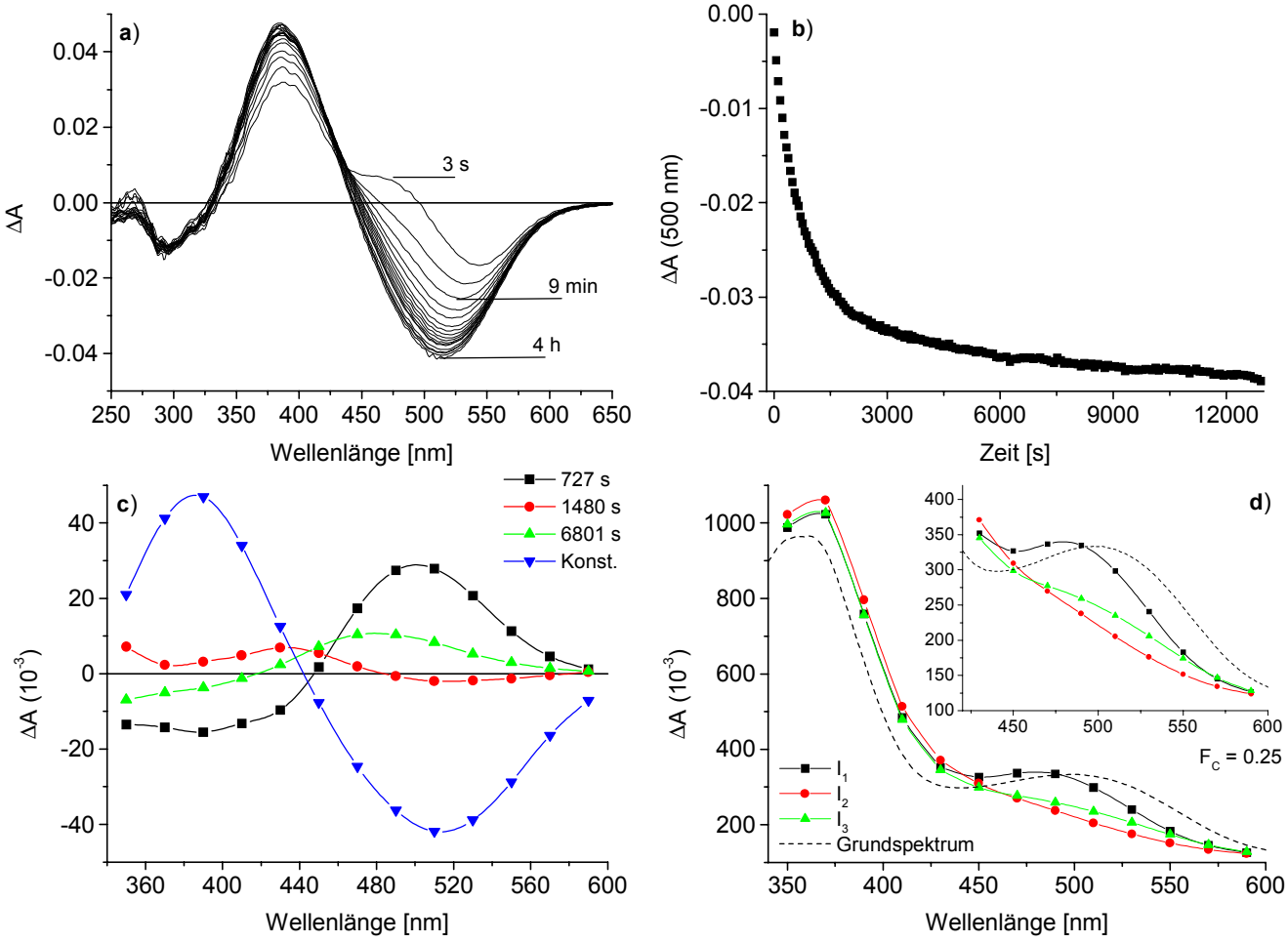


Abb. 3-121 Langsame Kinetiken von 10-Methylretinal-Rhodopsin bei 20 °C nach der Belichtung mit 486 nm (Interferenzfilter): a) Differenzspektren zum Dunkelzustand, b) Absorptionsverlauf bei 500 nm, c) LAD-Spektren des Globalfits der Diffenzspektren und d) die aus den LADS berechneten Intermediatspektren.

Der Verlauf des ersten Absorptionspektrums der langsamen Kinetiken ist in Übereinstimmung mit der Konstanten des Globalfits und zeigt noch eine geringe Absorption des Meta-I-Intermediats, aber infolge des Zeitabstands eine höhere Konzentration des Meta-II-Zustands. Bei den weiteren Spektren ist eine zum Meta-I-Zustand bathochrome Abnahme der Absorption und gleichzeitig eine Zunahme bei 390 nm zu erkennen. Identisch dazu zeigt sich das erste LAD-Spektrum mit der Lebenszeit von 727 s. (Die Kinetik des Meta-I-Zerfalls ist im Verhältnis zur Aufzeichnungsgeschwindigkeit des Spektralphotometers zu schnell und kann nicht mehr berücksichtigt werden.) Aufgrund der bathochromen

Absorption der Zerfallskomponente könnte es sich dabei um einen Meta-III ähnlichen Zustand handeln, die sich mit dem Meta-II-Zustand im Gleichgewicht befindet. Dieser Reaktion ist auch das zweite LAD-Spektrum (1480 s) zuzuordnen. Das LADS des letzten Übergangs (6801 s) beschreibt dann den Zerfall des Meta-III-Intermediats in Opsin und all-*E*-10-Methylretinal.

Insgesamt kann für das analoge Pigment 10-Me-Rho festgestellt werden, daß die gegenüber 10-Methyl-13-demethylretinal verringerte Flexibilität des Chromophors bei 10-Me-Rho wiederum zu einem Photoprozeß führt, der ein zu Rhodopsin etwas besser vergleichbares Erscheinungsbild besitzt. Allerdings beeinflußt die 10-Methylgruppe des Chromophors aber sichtlich den Reaktionsverlauf zwischen dem Lumi- und Meta-I-Intermediat, so daß vergleichbar zu 13-dm- und MD-Rho eine drastische Verzögerung der letzten Reaktionsschritte unter Beteiligung der verschiedenen Meta-Intermediate zu beobachten ist.

Zusammenfassung Flash-Photolyse

Die Ergebnisse aus der Untersuchung des rekonstituierten Rhodopsins mit der Flash-Photolyse sind mit Ausnahme einer Lebenszeit identisch zum nativen System (Tab. 3-25). Diese Kinetik beschreibt die Reaktion vom Lumi- zum Meta-I-Intermediat und benötigt beim rekonstituierten System nur die Hälfte der Zeit wie beim nativen Rhodopsin. Da die übrigen Lebenszeiten sehr vergleichbar sind, könnte die Differenz ein Hinweis auf einen Unterschied zwischen den beiden Systemen darstellen. Vor dem Hintergrund des geringen Signal/Rausch-Verhältnisses ist diese Annahme aber mit Unsicherheiten behaftet.

Tab. 3-25 Lebenszeiten von nativem und rekonstituiertem Rhodopsin sowie der analogen Chromoproteine. Die kursiv geschriebenen Lebenszeiten wurden mittels des Spektralphotometers bestimmt.

	9-dm	WT	reconst.	9-Et	13-dm	MD	10-Me
τ_1	0.68 µs	0.43 µs	0.46 µs	1.6 µs	2.0 µs	236 µs	0.33 µs
τ_2	352 ms	124 µs	68 µs	91 µs	184 µs	0.54 s	217 µs
τ_3	*1860s*	815 µs	886 µs	7.6 ms	76.4 ms	*486 s*	17.6 ms
τ_4	*2340 s*	4.2 ms	4.1 ms	39.5 ms	217 ms	*3223 s*	182 ms
τ_5	*9840 s*	22 ms	23 ms		3.53 s	*5306 s*	573 ms
τ_6		7.0 s	3.8 s		*720 s*	*34670 s*	*727 s*
τ_7					*2972 s*		*1480 s*
τ_8							*6801 s*

In der homologen Reihe der an Position 9 modifizierten Chromophore zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Größe des Substituenten und dem Verlauf des Photoprozesses. Der verringerte Raumanspruch bei 9-Demethylretinal verzögert den Übergang vom Lumi- zum Meta-I-Intermediat und es entsteht ein Gleichgewicht zwischen verschiedenen Meta-Zuständen mit sehr langsamen Reaktionsgeschwindigkeiten. Im Gegensatz dazu verursacht die Erhöhung des Raumbedarfs (9-Ethylretinal) insbesondere eine Beschleunigung des Übergangs vom Lumi- zum Meta-I-Intermediat. Während beim nativen System nach 815 µs ein erster Hinweis auf das Meta-II-Intermediat beobachtet werden kann, ist dieses bei 9-Et-Rho bereits nach 91 µs der Fall. Die Geschwindigkeit der weiteren Reaktionen wird durch die Modifikation des Chromophors weniger beeinflußt und die Kinetiken sind vergleichbar zu Rhodopsin.

Die an Position 10 und/oder 13 modifizierten Chromophore führen alle zu einer drastischen Verzögerung der Übergänge ab dem Zeitpunkt des Photoprozesses, an dem

die Meta-Zustände vorliegen. Im Fall von 13-Demethylretinal verlaufen die Reaktionen noch schneller als bei 10-Methylretinal, und von diesen beiden analogen Pigmenten kann das Endprodukt in einer kürzeren Zeit erreicht werden als bei 9-Demethylretinal. Die Verbindung 10-Methyl-13-demethylretinal hingegen benötigt von allen Verbindungen die längste Zeit bis zur Beendigung der thermodynamischen Reaktionen. Darüber hinaus ist mit 13-Demethylretinal insbesondere eine hohe BSI-Konzentration im Gleichgewicht mit dem Batho-Intermediat zu verzeichnen. Zusätzlich verläuft der Übergang vom Lumi- zum Meta-I-Intermediat langsamer. Die Einbindung von 10-Methyl-13-demethylretinal läßt den Ablauf eines zu Rhodopsin vergleichbaren Photoprozesses innerhalb des Zeitfensters der Flash-Photolyse nicht mehr zu und es können nur zwei Reaktionen ansatzweise detektiert werden, deren LAD-Spektren aber kaum zu interpretieren sind. Durch das Retinalderivat 10-Methylretinal ist gegenüber Rhodopsin insbesondere eine deutliche Beeinflussung des Reaktionsschemas zwischen dem Lumi- und Meta-I-Intermediat festzustellen.

Die Ursache für die Veränderungen des Photoprozesses sind bei 13-Demethylretinal in der erhöhten Flexibilität des Chromophors in der Bindungstasche zu suchen. Zusätzlich zu der vermehrten Beweglichkeit entsteht bei 10-Methyl-13-demethylretinal eine sterische Wechselwirkung der 10-Methylgruppe mit den umliegenden Aminosäuren. Im Fall von 10-Methylretinal ist die Flexibilität wiederum eingeschränkt und es kommt nur die sterische Interaktion mit der Bindungstasche zu tragen.