4 Experimenteller Teil

Verwendete Geräte und Materialien

UV/VIS-Spektroskopie

Die Messung der Absorptionsspektren wurde mit den Geräten UV-2102 PC und UV-2401 PC der Fa. Shimadzu vorgenommen. Beide Geräte wurden mit der Software UV 2103/3102 PC, Version 3.0, ebenfalls von der Fa. Shimadzu, gesteuert.

Es wurden Küvetten der Qualität OS (320 - 2500 nm) und der Qualität QS (200 - 2500 nm) verschiedener Abmessungen und Schichtdicken von der Fa. Hellma verwendet.

Die Steuersoftware ermöglicht die automatische Messung von bis zu 100 Spektren in vorgewählten Zeitabständen. Diese Option wurde vor allem zur Bestimmung von langsamen Kinetiken verwendet. Bei der Aufnahme von mehreren Meßsequenzen wurden die Zeitabstände zwischen zwei aufeinanderfolgenden Spektren mit fortschreitender Zeit vergrößert. Die Registriergeschwindigkeit ist zwischen den beiden verwendeten Geräten unterschiedlich: Das Gerät UV-2102 benötigt bei einer Schrittweite von 1 nm ca. 9 s für die Messung von 100 nm. Eine Aufnahme mit derselben Geschwindigkeit gelingt mit dem Gerät UV-2401 nur unter Verwendung einer Schrittweite von 2 nm. Diesem Nachteil des zweiten Gerätes steht allerdings eine bautechnisch bedingte verbesserte Streuungsunterdrückung gegenüber. Bei den vermessenen Proteinsuspensionen trug die Streuung einen erheblichen Teil zur Extinktion bei, so daß die geringere Registriergeschwindigkeit von untergeordneter Bedeutung war und bevorzugt das Gerät UV-2401 zur Bestimmung von Kinetiken eingesetzt wurde. In der Regel wurde ein Bereich von 500 nm gemessen (Bacteriorhodopsin 300 bis 800 nm und Rhodopsin 200 bis 700 nm). Die breiten Absorptionsbanden der Chromophore bzw. Chromoproteine wurden durch eine Schrittweite von 2 nm in ausreichender Genauigkeit aufgenommen, so daß das kleinste Intervall zwischen zwei Spektren ca. 45 s betrug. Für die genaue Bestimmung von Absorptionsmaxima wurde allerdings eine Schrittweite von 1 nm gewählt.

Die weitere Datenverarbeitung der Absorptionsspektren wurde mit Hilfe des Programms *Origin* (Version 5.0 Professional, Fa. Microcal) vorgenommen. Zur Unterstützung der Auswertungen wurden verschiedene Programme (worksheet-scripts) mit der implementierten Programmiersprache *LabTalk* erstellt.

FT-IR-Spektroskopie

Zur Aufnahme von Infrarotspektren wurde das FT-IR-Gerät *PE 1600* (Fa. Perkin Elmer) verwendet, welches mittels des Programms *IR data manager* (Version 3.30, Perkin Elmer) gesteuert wurde. Zur Analyse der Spektren wurde zusätzlich das Programm *Spectrafile Plus* (Fa. Lab Control) eingesetzt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte jeweils anhand eines Films der Substanz auf Natriumchlorid-Fenstern. Dazu wurde die Substanz entweder pur auf die Probenhalterung aufgebracht oder als Lösung, wobei das Lösungsmittel im Argonstrom verdampft wurde. Die Lage der Banden in den IR-Spektren sind in Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben. Für die Form und Intensität der Banden werden folgende Abkürzungen verwendet: vs = very strong, s = strong, m = middle, w = weak, vw = very weak, br = broad und sh = shoulder. Die Art der Schwingung wird wie folgt bezeichnet: ν = Valenzschwingung, δ = Deformationsschwingung *in plane* und γ = Deformationsschwingung *out of plane*.

NMR-Spektroskopie

Für die Messung der Kernresonanzspektren wurden Geräte der Fa. Bruker mit verschiedenen Magnetfeldstärken eingesetzt: DRX 500 (500 MHz ^{1}H; 126 MHz ^{13}C), DRX 400 (400 MHz ^{1}H; 101 MHz ^{13}C) und ARX 250 (250 MHz ^{1}H; 63 MHz ^{13}C). Bei den ^{1}H-NMR-Messungen diente der undeuterierte Anteil der Lösungsmittel als interner Standard. Entsprechend erfolgte die Kalibration bei den ^{13}C-NMR-Messungen anhand des im Lösungsmittel vorhandenen Anteils an ^{13}C-Isotop. Die in dieser Arbeit dargestellten Spektren sind mit dem Programm *WINNMR* (Version 5.1) der Fa. Bruker bearbeitet worden. Die Verschiebungswerte beziehen sich auf die δ-Skala (in ppm). Aufspaltungsmuster werden mit s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, sep = Septett und m = Multiplett abgekürzt. Die Kopplungskonstante J trägt die Einheit Hertz (Hz). Treten Aufspaltungen von Signalen auf, ohne daß der Kopplungspartner zu identifizieren ist, so ist dieser durch ein "X" symbolisiert.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit den Spektrometern MAT8200 und 311A (Fa. Finnigan) gemessen. Zur Ionisation wurde die Elektronen-Ionisation (EI) mit einer Anregungsenergie von 70 eV eingesetzt.

HPLC

Alle angegebenen Mischungsverhältnisse von Lösungsmitteln beschreiben Volumenkonzentrationen (v/v).

a) Analytische HPLC

- Säule: Kromasil Si-100-5µ, 25 x 0.2 cm
- Pumpe: Einkolbenpumpe, Fa. Beckmann
- Detektor: Photodiodenarraydetektor SPD-M6A, Fa. Shimadzu
- Auswertungs- und Steuersoftware: Class M10-A, Version 1.4, Fa. Shimadzu

Die Aufgabe einer Substanzlösung auf die Säule erfolgte mit einem Sechs-Wege-Ventil und einer 10 µl Probenschleife. Als mobile Phase wurde n-Hexan/ Diethylether 90/10 mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 2 ml/min verwendet.

b) Präparative HPLC

- Säule: Kromasil Si-100-5µ, 25 x 2 cm
- Pumpe: LC8A, Fa. Shimadzu (Doppelkolbenpumpe)
- Detektor: SPD-6AV, Fa. Shimadzu (Einwellenlängendetektor)
- Aufzeichnung: C-R5A, Fa. Shimadzu

Zur Injektion der Substanzlösungen auf die Säule wurde ein Sechs-Wege-Ventil mit einer 1 ml Probenschleife verwendet. Die Elution erfolgte isokratisch mit n-Hexan/Diethylether 93/7 und einer Durchflußgeschwindigkeit von bis zu 10 ml/min.

Die Bestimmung eines Isomerenverhältnisses mit der HPLC erfolgte anhand der Peakflächen der einzelnen Isomere in einem Chromatogramm, welches bei *einer* Detektionswellenlänge aufgezeichnet wurde. Soweit nicht anders vermerkt, sind die aufgeführten Verhältnisse der Isomere nicht bezüglich ihrer unterschiedlichen relativen Signale (*Response*) korrigiert, d. h. die Unterschiede der Extinktionskoeffizienten der Isomere bei der Detektionswellenlänge bleiben unberücksichtigt.

Präparative Säulenchromatographie

Für die Trennung im präparativen Maßstab wurde als stationäre Phase ausschließlich *Kieselgel 60* mit Korngröße 40-63 µm der Fa. Merck verwendet. Die Flash-Säulenchromatographie wurde mit geringem Überdruck durchgeführt. Alle aufgeführten Konzentrationsangaben der mobilen Phasen sind Volumenverhältnisse.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden *Kieselgel 60* Aluminiumplatten mit Fluoreszenzindikator (254 nm) der Schichtdicke 0.25 mm verwendet (Fa. Merck).

Zentrifugen und Rotoren

- Kühlzentrifuge: Model J2-21, Fa. Beckmann
- Ultrazentrifuge: Model 18-55, Fa. Beckmann
- Rotoren: JA-10, JA-20, Ti60 und SW-28, alle von der Fa. Beckmann

Lichtfilter

- Kantenfilter KG5 ("Wärmefilter"), Fa. Schott
- Farbglasfilter (cut off-Filter), Fa. Schott.
- Interferenzfilter (Bandenfilter), Fa. Schott:
  473 nm (gem. 472 nm), Halbwertsbreite 11 nm, Transmission am Maximum: 52 %
  487 nm (gem. 486 nm), Halbwertsbreite 5 nm, Transmission am Maximum: 39 %
- Graufilter, metallbedampft (UV-durchlässig), verschiedene Transmissionswerte (1 bis 90 %), alle von der Fa. Laser Components, Olching

Weitere verwendete Geräte

- Rotationsschüttler, Fa. Vortex
- Schüttler *Certomat R* mit Temperiereinheit *Certomat H*, Fa. B. Braun
- Diaprojektor (Fa. Leitz, Wetzlar), Glühlampe: Osram 250 W, Sockel P28s, 588400E. Zur Vermeidung der Erwärmung der zu belichtenden Proben und ebenfalls zum Schutz verwendeter Filter vor Wärmestrahlung wurde das Licht der Projektorlampe immer zuerst durch einen KG5-Kantenfilter geführt.
- pH-Meter, Typ: Basic, Fa. Denver Instruments
- Mikroglaselektrode, Fa. Mettler Toledo

Chemikalien

[1-^{13}C]- und [2-^{13}C]-Acetonitril, 99 % Isotopenanreicherung mind. 99 %, Fa. Cambridge Isotope Laboratories
1,2-Dichlorethan, z. A., Fa. Merck
1,4-Piperazin-bis-(ethansulfonsäure) (PIPES), 99 %, Fa. Merck
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7en (DBU), z. S., Fa. Merck
2-Butennitril, E/Z-Isomerengemisch, 99 %, Fa. Aldrich
3-Methyl-2-butennitril, 99 %, Fa. Aldrich
4-Dimethylaminopyridin (DMAP), z. A., Fa. Merck

Aceton-d_6, Deuterierungsgrad 99.5 %, Deutero GmbH, Kastellaun
Ammoniumhydrochlorid, z. A., Fa. Merck
Azo-bis-isobuttersäurenitril (AIBN), 98 %, Fa. Aldrich
Calciumchlorid, purum >97 %, Fa. Fluka
Calciumhydrid, z. A. >95 %, Fa. Merck
Chloracetonitril, z. S. >99 %, Fa. Merck
Chloroform-d_1, Deuterierungsgrad 99.8 %, Fa. Merck
Diethylchlorphosphat, 95 %, Fa. Arcos
Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAH), 1 M Lösung in n-Hexan, Fa. Aldrich
Diisopropylamin, z. S., Fa. Merck
Dithiothreitol (DTT), 99 %, Fa. Biomol
DNAse I, Fa. Boehringer
Dodecyl-β-D-maltosid (DDM), 99 %, Fa. Arcos
Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz (EDTA · 2 Na · 2 H_2O), z. A., Fa. Sigma
Hydroxylamin, z. A., Fa. Merck
Kaliumcarbonat, z. A., Fa. Merck
Kaliumchlorid, z. A., Fa. Merck
Lithiumaluminiumhydrid, 95 %, Fa. Chemmetall
Lithiumdiisopropylamid (LDA), 2 M Lösung in THF, Heptan und Ethylbenzol, Fa. Aldrich
Magnesiumchlorid, z. A., Fa. Merck
Mangandioxid, z. S., Fa. Merck
N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid (LDAO), purum, 30%ige Lösung in Wasser, Fa. Fluka
Natriumchlorid, techn., Geb. Overlack GmbH, Mönchengladbach
(Aufzucht *Halobacterium salinarum*)
Natriumhydrid, 60 % in Öl, Fa. Fluka
Natriumhydroxid, z. A., Fa. Merck
Natriumhypochloritlösung, ca. 13 %, Fa. Fluka
Natriumsulfat, z. A., Fa. Merck
N-Bromsuccinimid (NBS), z. S., Fa. Aldrich
n-Butylamin, z. A., Fa. Sigma-Aldrich
n-Butyllithium (n-BuLi), 15 %ige Lösung in n-Hexan, Fa. Fluka
Pepton, Fleischpepton - tryptisch verdaut, Fa. Oxoid
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), > 99 %, Fa. Sigma
Propionitril, z. A., Fa. Merck
Saccharose, research grade, Fa. Serva
Salzsäure, z. A., 37 %, Fa. Merck
Triethylphosphit, 98 %, Fa. Aldrich
Trinatriumcitrat, extra pure, Fa. Merck
β-Cyclocitral, Fa. BASF
β-Ionon, Fa. BASF

Weitere, hier nicht aufgeführte Chemikalien, wurden von der Fa. Merck erworben und waren mindestens von der Reinheit *zur Analyse*. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden unabhängig ihrer Qualität zuvor destilliert. Lösungsmittel für feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wie Toluol, Tetrahydrofuran, Dichlormethan oder Petrolether wurden nach Standardvorschriften[220] getrocknet und destilliert. Entsprechende Reaktionen wurden immer in ausgeheizten Reaktionsgefäßen sowie Argonatmosphäre durchgeführt.

Proteine

Es wurde Bacteriorhodopsin des nativen Stammes S9[187] von *Halobacterium salinarum* und das entsprechende Apoprotein der retinaldefizienten Mutante JW5[186] verwendet.

Rhodopsin wurde aus Rinderaugen isoliert, die am Morgen des Präparationstags aus dem Schlachthof (Frischehof Essen) abgeholt wurden.

Medien, Pufferlösungen und Gradienten

a) "Halo-Medium" (Medium für die Anzucht von *Halobacterium salinarum):*

250 g NaCl (techn.), 20 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 3 g Natriumcitrat, 2 g Kaliumchlorid und 10 g Pepton werden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und mit verd. Natronlauge auf pH 7.2 eingestellt. Die Lösung wird für 20 min bei 120 °C autoklaviert.

b) Basalsalz: "Halo-Medium" ohne Pepton

c) Ringer-Lösung

3.02 g PIPES (10 mM), 7.6 g NaCl (130 mM), 101.6 mg $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (0.5 mM), 147 mg $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1 mM), 186 mg EDTA $\cdot$ 2 Na $\cdot$ 2 H_2O (0.5 mM), 154 mg DTT (1 mM) und 17.4 mg PMSF (0.1 mM) werden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und mit Natriumhydroxidlösung auf pH 7.2 bzw. 7.0 eingestellt.

d) Extraktionspuffer (Zur Extraktion von Rhodopsin)

93 mg EDTA $\cdot$ 2 Na $\cdot$ 2 H_2O (1 mM), 377 mg PIPES (5 mM) und 38 mg DTT (1 mM) werden mit 250 ml Wasser aufgefüllt und mit Natriumhydroxidlösung auf pH 7.0 eingestellt.

e) Saccharosegradient (diskontinuierlich, Rhodopsin)

Es werden drei Zuckerlösungen definierter Dichte aus einer 45 %igen Stammlösung (w/w) angesetzt. Für einen Gradienten mit den Dichten 1.11, 1.13 und 1.15 g/ml werden 255, 304 bzw. 346 ml der Stammlösung mit Ringer-Lösung auf jeweils 400 ml aufgefüllt. Die Dichten werden dann genau mit Hilfe von Spindeln eingestellt. Bis zur Verwendung werden die Zuckerlösungen bei -20 °C eingefroren. Der Gradient wird kurz vor der Verwendung aus je 6 ml Zuckerlösung der Dichte 1.11 und 1.15 g/ml und 10 ml Lösung der Dichte 1.13 g/ml hergestellt. Dazu wird die Lösung mit der geringsten Dichte vorgelegt, mit Lösung der Dichte 1.13 g/ml unterschichtet, welche selbst mit Lösung der größten Dichte unterschichtet wird.

Sicherheitsvorkehrungen für Arbeiten mit lichtempfindlichen Substanzen

Bei der Darstellung bzw. Umsetzung sowie Aufreinigung von lichtempfindlichen Verbindungen wurde unter gedämpftem Licht gearbeitet. Alle Arbeiten mit isolierten Isomeren von Retinal bzw. Retinalderivaten oder deren Lösungen sowie mit den Chromoproteinen wurde unter strengem Ausschluß von Licht der Wellenlänge kleiner als 600 nm durchgeführt. Für die Beleuchtung wurden Leuchtstoffröhren mit einer zweifachen Lage roter Folie abgedunkelt (red cyc silk, Fa. Rasco, einlagig ca. 10 % Transmission oberhalb von 640 nm, cut-off Wellenlänge 610 nm) und rote Lampen (Fa. Radium, 40 W) mit vorgesetztem RG650 Filter (10 x 10 cm, Fa. Schott) verwendet.

Vorbemerkung

Die spektroskopischen Daten der Retinalderivate bzw. ihrer Isomere aus der UV/Vis- und ^{1}H-NMR-Spektroskopie sind unter Punkt 3.1.2 aufgeführt und werden dort gemeinsam diskutiert. Aus diesem Grund werden hier im experimentellen Teil bei den Endprodukten nur die an dortiger Stelle nicht erwähnten spektroskopischen Daten aufgeführt.

Absorptionsmaxima von Vorstufen sind nur in den Fällen angegeben, wenn reine Isomere der Verbindungen isoliert wurden.

Die Bezifferung in den nachfolgenden Konstitutionsformeln der Vorstufen und bei den spektroskopischen Daten nimmt die Bezifferung der Zielverbindungen vorweg und stimmt nicht mit der systematischen Namensgebung überein (siehe auch Fußnote S. 21).

4.1 Chemische Arbeiten

4.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

4.1.1.1 Bromierung mit N-Bromsuccinimid (AAV1)

Es werden 1 Äquivalent (eq) des ungesättigten Nitrils in 40 ml/ 0.1 mol Substrat Tetrachlorkohlenstoff gelöst, mit 1 eq N-Bromsuccinimid (NBS) und einer Spatelspitze AIBN versetzt und zum Sieden erhitzt. Kurze Zeit, nachdem die Mischung zu sieden begonnen hat, springt die exotherme Reaktion an, begleitet von Dunkelfärbung und dem Aufschwimmen des Succinimids. Nach ca. 90 min ist die Reaktion beendet.

Zur Aufarbeitung läßt man die Suspension abkühlen, filtriert den Rückstand ab und wäscht diesen gründlich mit CCl_4. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und das zurückbleibende Öl wird im Hochvakuum über eine Vigreuxkolonne destilliert.

4.1.1.2 Michaelis-Arbusov Reaktion (AAV2)

In einem Zweihalskolben mit Vigreuxkolonne und aufgesetztem Liebigkühler werden 1 eq der halogenierten Verbindung mit 1 eq Triethylphosphit langsam erhitzt. Ab ca. 60 °C Badtemperatur setzt eine starke Ethylhalogenidbildung ein. Nach einigen Minuten verlangsamt sich die Reaktion, so daß zur Vervollständigung des Umsatzes für ca. 1 h auf 150 °C erhitzt werden kann. Der Rückstand wird zur Reinigung direkt aus der Apparatur im Hochvakuum destilliert.

4.1.1.3 Wittig-Horner-Reaktion

a) Natriumhydrid als Base (AAV3a)

Es wird die entsprechende Menge Natriumhydrid (60 % in Öl) dreifach mit trockenem Petrolether 40/60 gewaschen, in einen ausgeheizten Dreihalskolben mit Tropftrichter, Gaseinleitung und Blasenzähler überführt und mit absolutem Tetrahydrofuran (THF) überschichtet. Die Aufschlämmung wird im Eisbad gekühlt und unter Argonspülung sowie Rühren innerhalb von 15 min mit einer Lösung des Phosphonats in absolutem THF (1 ml THF/mmol Phosphonat) versetzt. Sollte während der Phosphonatzugabe keine

Wasserstoffentwicklung zu beobachten sein, muß die Reaktionslösung soweit erwärmt werden, bis ein Einsetzen der Reaktion zu beobachten ist. Nach beendeter Zugabe läßt man die sich verfärbende Lösung für 30 min bei Raumtemperatur rühren. Anschließend kühlt man wiederum im Eisbad und tropft innerhalb von 30 min eine Lösung von 1 eq der Carbonylverbindung in abs. THF (1 ml THF/ mmol Substrat) zu. Nach Beendigung der Zugabe läßt man die Reaktionsmischung für 3 h bei Raumtemperatur rühren, währenddessen sich im Reaktionsgefäß ein zäher Phosphorsäureester-Niederschlag abscheidet.

Zur Aufarbeitung wird durch Zugabe gesättigter Ammoniumhydrochlorid-Lösung hydrolisiert (oder auf gekühlte NH_4Cl-Lösung gegossen), 15 min gerührt und anschließend mit verdünnter Salzsäure auf pH 4 bis 5 eingestellt. Die wäßrige Phase wird abgetrennt und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser bis zur Neutralität und dann zweimal mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wird über eine mit Kieselgel gefüllte Glasfilternutsche filtriert und gründlich mit Diethylether nachgewaschen. Nach Abziehen des Lösungsmittels kann die weitere Reinigung chromatographisch erfolgen. Meist reicht die Reinheit für die weitere Umsetzung (d. h. für die Reduktion zum Aldehyd) bereits aus.

b) n-Butyllithium als Base (AAV3b)

In einem ausgeheizten Dreihalskolben mit Septum, Gaseinleitung und Blasenzähler werden 1.5 eq des Phosphonats in absolutem THF (2 ml THF/mmol Phosphonat) vorgelegt und in einem 2-Propanol-Trockeneis-Bad unter Argonspülung auf -70 °C gekühlt. Innerhalb von 15 min werden unter Rühren 1.55 eq einer 1.6 M Lösung von n-Butyllithium in n-Hexan mit einer Spritze zugegeben. Nach 30 min Rühren bei der gleichen Temperatur wird innerhalb von 15 min eine Lösung von 1 eq der Carbonylverbindung in abs. THF (1 ml THF/mmol Substrat) ebenfalls mit einer Spritze zugegeben. Nach beendeter Zugabe läßt man die Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und rührt für 2 h.

Zur Aufarbeitung wird vorsichtig mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung hydrolisiert und mit verdünnter Salzsäure auf pH 4 bis 5 eingestellt. Die wäßrige Phase wird abgetrennt und zweifach mit Diethylether gewaschen. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit Wasser bis zur Neutralität und anschließend mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird über eine mit Kieselgel gefüllte Glasfilternutsche filtriert, gründlich mit Diethylether nachgewaschen und das

Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt chromatographisch über Kieselgel mit Diethylether/n-Hexan als mobile Phase.

4.1.1.4 Reduktion mit DIBAH (AAV4)

In einem ausgeheizten Dreihalskolben mit Septum und Gaseinleitung sowie Argonballon werden 1 eq des Nitrils in trockenem Dichlormethan (4 ml CH_2Cl_2/mmol Nitril) gelöst und in einem 2-Propanol-Trockeneis-Bad auf -70 °C gekühlt. Unter Rühren werden 1.4 eq einer 1 M DIBAH-Lösung in n-Hexan so zugegeben, daß die Temperatur nicht über -60 °C steigt. Nach beendeter Zugabe läßt man die Reaktionslösung innerhalb von einer Stunde auf -20 °C erwärmen und rührt für eine weitere Stunde bei dieser Temperatur.

Zur Hydrolyse des Imins wird unter Eiskühlung vor allem zu Beginn vorsichtig eine Aufschlämmung von feuchtem Kieselgel in Diethylether (5 Teile Kieselgel, 1 Teil Wasser in 10 Teilen Diethylether) zugesetzt und für 2 h gerührt. Anschließend wird durch Zugabe von Kaliumcarbonat und Natriumsulfat getrocknet, über eine mit Kieselgel gefüllte Glasfilternutsche filtriert und gründlich mit Diethylether nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und das verbleibende Öl über Kieselgel mit n-Hexan/Diethylether als mobile Phase chromatographisch getrennt.

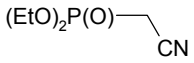
4.1.2 Synthese der Phosphonate

Diethylcyanmethylphosphonat *(C_2-Phosphonat, **17**)*

In einem 500 ml Dreihalskolben mit Rückflußkühler werden 72 g (0.95 mol) Chloracetonitril (**16**) für die Reaktion mit 159 g (0.95 mol) Triethylphosphit vorgelegt. Es wird etwas Phosphit zugegeben und erhitzt. Ab ca. 130 °C Badtemperatur springt die Reaktion an, so daß der restliche Phosphonsäureester zugetropft werden kann. Nach beendeter Zugabe wird die Mischung für weitere 5 h auf 150 °C erhitzt. Zur Reinigung der gelben Flüssigkeit wird im Hochvakuum über eine Vigreuxkolonne destilliert. Es werden 146 g (0.82 mol, 87 %) an Produkt erhalten; $Kp_{2\ Torr}$ 120-122°C.

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

4.16 m	$-CH_2-O-$			
2.82 m	$-CH_2-CN$	20.93	J(**P**, $-C\mathbf{H}_2-CN$)	
1.30 t	CH_3-	1.30	J($C\mathbf{H}_3-C\mathbf{H}_2-$)	



Diethyl-(3-cyano-2-propenyl)-phosphonat *(C_4-Phosphonat, **12**)*

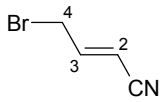
*i) 4-Brom-2-butennitril (**11**)*

44 g (0.27 mol) NBS werden mit 18.1 g (0.27 mol) 2-Butennitril (**10**) entsprechend AAV1 umgesetzt, wobei die Reaktionszeit auf 5 h verlängert und nach einer und zwei Stunden eine weitere Spatelspitze AIBN zugesetzt wird. Es werden 19.7 g (0.14 mol, 50 %) einer leicht gelben Flüssigkeit erhalten; $Kp_{8\ Torr}$ 78-84 °C, Verhältnis *Z*- zu *E*-Isomer 1:1.4 (Lit.[150]: Kp_{10} 73.5-75.5 °C, *Z*-Isomer; $Kp_{10\ Torr}$ 87-89 °C, *E*-Isomer)

IR (Film): (Isomerengemisch) 2226 vs, ν(C≡N); 1632 m, ν(C=C); 963 vs, γ(=C-H); 613 s, ν(C-Br)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

	Z-Isomer	E-Isomer	Z-Isomer	E-Isomer	
2-H	5.40 dt	5.59 dt	1.55	1.10	J(2,3)
3-H	6.62 dt	6.75 dt	0.62	1.38	J(2,4)
4-H_2	4.11 dd	3.96 dd	8.14	7.08	J(3,4)



*ii) Diethyl-(3-cyano-2-propenyl)-phosphonat (**12**)*

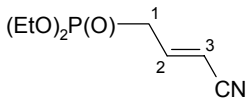
Aus der Reaktion von 19.5 g (0.13 mol) 4-Brom-2-butennitril (**11**) mit 21.0 g (0.13 mol) Triethylphosphit nach AAV2 werden 18.5 g (0.09 mol, 68 %) einer farblosen Flüssigkeit erhalten; $Kp_{0.2\ Torr}$ 120-123 °C.

IR (Film): (Isomerengemisch) 2220 s, ν(C≡N); 1635 s, ν(C=C); 1260 vs, ν(P=O); 1050, 964 br, vs, ν(P-O-Alkyl)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$):

Z-Isomer	*E*-Isomer	
5.44 m		3-H
6.46 m	6.57 m	2-H
2.96 dd	2.91 dd	1-H_2
4.07 m		-CH_2-O-
1.27 m		CH_3-

Z-Isomer	*E*-Isomer	
23.07	23.27	J(P,1)
7.77	7.46	J(1,2)



*<u>Diethyl-(3-cyano-2-methyl-2-propenyl)-phosphonat</u> (C_5-Phosponat, **15**)*

*i) 4-Brom-3-methyl-2-butennitril (**14**)*

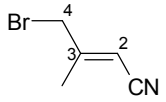
Es werden 11.0 g (0.13 mol) 3-Methyl-2-butennitril (**13**) mit 21.0 g (0.13 mol) N-Bromsuccinimid nach AAV1 umgesetzt. Ausbeute: 13.3 g (83 mmol, 65 % d. Th.) gelbe, tränenreizende Flüssigkeit; $Kp_{0.2}$ 50-58 °C, Verhältnis *Z*- zu *E*-Isomer 1:2 (Lit.[148]: $Kp_{0.3}$ 50-54 °C, E/Z-Gemisch)

IR (Film): (Isomerengemisch) 2200 vs, ν(C≡N); 1628 s, ν(C=C); 819 s, γ(=C-H); 625 s, ν(C-Br)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

Z-Isomer	*E*-Isomer	
5.23 m	5.45 m	2-H
4.09 s	3.92 d	3-CH_3
2.03 d	2.13 d	4-H_2

Z-Isomer	*E*-Isomer	
1.55	1.10	J(4,2)
	0.88	J(3-CH_3,2)



*ii) Diethyl-(3-cyano-2-methyl-2-propenyl)-phosphonat (**15**)*

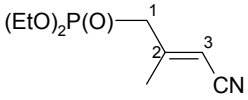
13.0 g (81 mmol) 4-Brom-3-methyl-2-butennitril (**14**) und 13.5 g (81 mmol) Triethylphosphit werden gemäß AAV2 miteinander umgesetzt. Ausbeute: 14.3 g (66 mmol, 81 %) einer leicht gelben Flüssigkeit. $Kp_{8\ Torr}$ 78-84 °C, Verhältnis *Z*- zu *E*-Isomer 1:1.4 (Lit.[152]: $Kp_{1\ Torr}$135-136 °C).

IR (Film): (Isomerengemisch) 2210 vs, ν(C≡N); 1620 s, ν(C=C); 1247 vs, ν(P=O); 835 vs, γ(=C-H)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

Z-Isomer	*E*-Isomer	
5.20 d	5.21 d	3-H
2.03 dd	2.12 dd	2-CH_3
2.90 d	2.65 d	1-H_2
4.06 m	4.06 m	-CH_2-O-
1.26 t	1.27 t	C**H**$_3$-CH_2-

Z-Isomer	*E*-Isomer	
5.28	5.33	J(P,3)
23.90	23.54	J(P,1)
3.66	3.29	J(P,2-CH_3)
7.07	7.06	J(C**H**$_3$-C**H**$_2$-)



4.1.3 Synthese von 9-Demethylretinal (2)

*i) 3-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-propensäure (**20**)*

Es werden 47 g (0.24 mol) β-Ionon (**8**) vorgelegt und im Eisbad gekühlt. Innerhalb von 30 min werden 200 ml (0.82 mol, 3.4 eq) gekühlte 13 %ige Natriumhypochloritlösung zugetropft. Anschließend werden innerhalb von 20 min 60 ml Methanol zugegeben und es wird für 2 h im Eisbad gerührt. Die Reaktionsmischung wird zur Aufarbeitung mit halbkonzentrierter Phosphorsäure sauer gestellt und mehrmals ausgeethert. Die vereinigten organischen Phasen werden viermal mit 10 %iger Natronlauge extrahiert, wobei die Säure als Salz in die wäßrige Phase übergeht. Zur Entfernung von nicht umgesetztem Ionon extrahiert man die wäßrige Phase zweimal mit Diethylether. Durch Ansäuern mit halbkonz. Phosphorsäure setzt man die Säure wiederum frei und extrahiert diese mit Diethylether, trocknet über Natriumsulfat und zieht das Lösungsmittel im Vakuum ab. Es werden 16.5 g an leicht gelblichem Rohprodukt erhalten, das zur Reinigung aus Ethanol/Wasser kristallisiert wird. Es werden 12.3 g (64 mmol, 27 %) an Produkt (**20**) in Form farbloser Nadeln isoliert (ausschließlich 7*E*-Isomer).

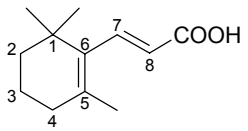
UV (Ethanol): (7*E*) λ_{max} = 277 nm

IR (Film): (7*E*) 3400-2200 br, ν(O-H); 1687 vs, ν(C=O); 1631 s, ν(C=C)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$): (7*E*)

1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	7-H	8-H	-OH
1.06 s	1.46 m	1.60 m	2.06 t	1.77 d	5.83 d	7.54 d	~ 11.6

J(3,4)	J(5-CH_3,7)	J(7,8)	J(8,OH)
6.13	0.45	16.15	0.65



*ii) 3-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-propenol (**21**)*

12.2 g (63 mmol) von Verbindung **20** werden in 100 ml trockenem Diethylether gelöst und unter Eiskühlung zu einer Suspension von 3.8 g (95 mmol, 1.5 eq) Lithiumaluminiumhydrid in 15 ml Diethylether getropft. Nach beendeter Zugabe erhitzt man für 2 h zum Rückfluß. Zur Aufarbeitung wird mit konz. Ammoniumchlorid-Lösung hydrolysiert und filtriert. Die Etherphase wird über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel abgezogen und anschließend wird der Rückstand bei 96 °C (0.4 Torr) in einer Kugelrohrdestillation gereinigt. Es werden 6.3 g (34 mmol, 54 %) des Alkohols **21** als farblose Flüssigkeit erhalten (reines 7*E*-Isomer).

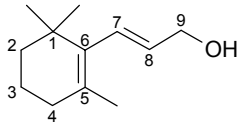
UV (Ethanol): (7*E*) λ_{max} = 234 nm

IR (Film): (7*E*) 3321 vs, br, ν(O-H); 1643 w, ν(C=C); ~1400 br, δ(O-H); 1011 vs, ν(C-0)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): (7*E*)

1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	7-H	8-H	9-H_2
0.98 s	1.43 m	1.58 m	1.96 t	1.66 d	6.10 d	5.59 dt	4.18 d

J(3,4)	J(5-CH_3,7)	J(7,8)	J(8,9)
6.15	0.79	15.90	15.97



*iii) 3-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-propenal (**22**)*

Zu einer im Eisbad gekühlten Lösung von 6.2 g (34 mmol) **21** in 150 ml Dichlormethan werden auf einmal 59 g (680 mmol, 20 eq) aktiviertes Mangandioxid (3 h bei 105 °C und 0.2 Torr) gegeben. Die Reaktionskontrolle per DC (n-Hexan/ Ethylacetat 85/15) zeigt nach 50 min die vollständige Umsetzung des Alkohols. Die schwarze Suspension wird durch eine mit Kieselgel gefüllte Glasfilternutsche gesaugt und gründlich mit Diethylether und Dichlormethan gewaschen. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum verbleiben 5.6 g einer leicht gelben Flüssigkeit, die zur Reinigung bei 110 °C und 0.2 Torr in einer Kugelrohrdestille destilliert wird. Es werden 5.0 g (28 mmol, 82 %) von **22** als farblose Flüssigkeit erhalten (reines 7*E*-Isomer).

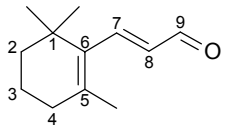
UV (Ethanol): (7*E*) λ_{max} = 292 nm

IR (Film): (7*E*) 2725 m, Kombinationsschw.[o]; 1688 vs, ν(C=O); 1605 vs, ν(C=C)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$): (7*E*)

1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	7-H	8-H	9-H
1.09 s	1.49 m	1.61 m	2.09 t	1.79 s	7.25 d	6.17 dd	9.51 d

J(3,4)	J(7,8)	J(8,9)
6.10	16.10	7.80



*iv) 5-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4-pentadiennitril (**23**)*

Es werden 1.6 g (40 mmol, 1.4 eq, 60 % in Öl) Natriumhydrid und 6.0 g (34 mmol, 1.2 eq) C_2-Phosphonat **24** mit 5.0 g (28 mmol, 1 eq) der Verbindung **22** nach AAV3a umgesetzt. Nach der Reinigung über Kieselgel mit n-Hexan/Diethylether 90/10 werden

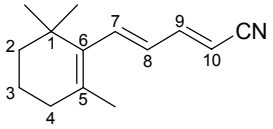
[o] Das für Aldehyde charakteristische Bandendoppel entsteht durch das Zusammenfallen der ersten Oberschwingung δ(O=C-H) (Winkeldeformationsschwingung) und ν(C-H), wodurch ν(C-H) zu einer Doppelbande aufspaltet [234]. Meist ist allerdings nur die Bande bei kleinerer Wellenzahl sichtbar, während die zweite von weiteren ν(C-H)-Banden überlagert wird.

4.9 g (24 mmol, 86 %) der Verbindung **16** als farblose Kristalle erhalten (9*Z*- und all-*E*-Isomer im Verhältnis 1:2).

IR (Film): (Isomerengemisch) 2211 vs, ν(C≡N); 1606 vs, ν(C=C)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

	1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	7-H	8-H	9-H	10-H
9*Z*	1.03 s	1.45 m	1.58 m	2.03 t	1.75 s	6.58 d	6.84 m	6.58 d	5.09 d
all-*E*	1.01 s				1.71 s	6.54 d	6.16 dd	7.02 dd	5.24 d



	J(3,4)	J(7,8)	J(8,9)	J(9,10)
9*Z*	~5.9	5.97	*	10.67
all-*E*		15.63	10.92	15.91

** Signal nicht aufgelöst*

*v) 5-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4-pentadienal (**19**)*

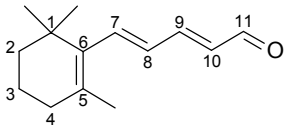
4.8 g (24 mmol, 1 eq) Nitril **23** werden mit 34 ml (34 mmol, 1.4 eq) 1 M DIBAH-Lösung nach AAV4 zum Aldehyd **19** reduziert. Als Rohprodukt werden 5.2 g eines braun-roten viskosen Öls erhalten. Nach der chromatographischen Reinigung über Kieselgel (n-Hexan/Diethylether 90/10) werden 4.0 g (20 mmol, 83 %) an Produkt erhalten (9*Z*/all-*E* 1:4).

UV (Ethanol): (all-*E*) λ_{max} = 326 nm

IR (Film): (all-*E*) 2826 w, sh, 2729 w, Kombinationsschw.; 1682 vs, ν(C=O); 1610 vs, ν(C=C)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

	1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	7-H	8-H	9-H	10-H	11-H
9*Z*	1.05 s	~1.47 m	~1.60 m	~2.05 t	1.75 s	6.59 d	6.93-7.08 *		5.82 dd	10.15 d
all-*E*	1.05 s	1.46 m	1.59 m	2.05 t	1.75 d	6.71 d	6.35 dd	7.15 dd	6.11 dd	9.55 d



	J(3,4)	J(5-CH_3,7)	J(7,8)	J(8,9)	J(9,10)	J(10,11)
9*Z*	**	**	14.4	*	9.80	8.00
all-*E*	6.2	0.69	15.63	10.89	15.22	8.00

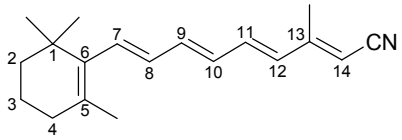
* *Signal nicht aufgelöst*

** *Das 9Z-Isomer wurde nur in Mischung mit dem* all-*E-Isomer vermessen. Aufgrund der Überlagerung der Signale ließen sich die Kopplungskonstanten nicht berechnen.*

*vi) 3-Methyl-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraennitril (**24**)*

Es werden 1.1 g (28 mmol, 1.4 eq, 60 % in Öl) Natriumhydrid und 5.1 g (24 mmol, 1.2 eq) C_5-Phosphonat **15** umgesetzt und anschließend mit 4.0 g (20 mmol, 1 eq) Aldehyd **19** nach AAV3a zur Reaktion gebracht. Nach der chromatographischen Reinigung

(n-Hexan/Diethylether 95/5) liegen 3.9 g (14.6 mmol, 74 %) einer Isomerenmischung von Verbindung **24** in Form eines roten Öls vor.

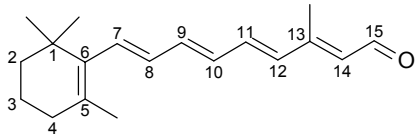


IR (Film): (Isomerengemisch) 2007 vs, ν(C≡N); 1582 s, br, ν(C=C)

^{1}**H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): Isomerengemisch nicht aufgetrennt. Signifikant für die erfolgreiche Umsetzung ist das Auftreten des Singuletts des 14-H, z. B. bei 5.14 ppm vom Hauptisomer all-*E*.

vii) 3-Methyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenal (9-Demethylretinal, 2)

Mit 20 ml (20 mmol, 1.4 eq) einer 1 M DIBAH-Lösung werden 3.8 g (14.2 mmol, 1 eq) es Nitrils 24 nach AAV4 zum Aldehyd 2 reduziert. Nach der Reinigung (Kieselgel, n-Hexan/Ethylacetat 90/10) verbleiben 2.8 g (10 mmol, 73 %) eines dunkelroten, viskosen Öls. Es wird eine Mischung aus mindestens vier Isomeren der Zielverbindung erhalten.



IR (Film): (all-*E*) 1654 vs, ν(C=O); 1577 s, ν(C=C)

Massenspektrum (EI, 85 °C), m/z (%): (all-*E*) 270 (100, M^+, $C_{21}H_{26}O$), 255 (22, $[M - CH_3]^+$)

(Hochauflösung, EI): (all-*E*) ber.: 270.198365, gef.: 270.198399

^{13}**C-NMR** (101 MHz, BB-Entkopplung, Aceton-d_6): (all-*E*) 191.22 (C-15); 154.89 (C-13); 139.40 (C-9); 138.17 (C-6); 137.37 (C-11); 135.21 (C-7); 135.14 (C-12); 134.07 (C-8); 131.92 (C-5); 131.62 (C-10); 129.82 (C-14); 40.47 (C-2); 34.75 (C-1); 33.82 (C-4); 28 (1,1-CH_3); 21.90 (5-CH_3); 19.77 (C-3); 12.91 (13-CH_3)

4.1.4 Synthese von 9-Ethylretinal (3)

*i) 5-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-4-penten-3-on (**28**) und (2-Methyl-5-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-4-penten-3-on **33**)*

30 ml (60 mmol) 2 M Lithiumdiisopropylamin-Lösung werden in 50 ml absolutem THF vorgelegt und bei -60 °C innerhalb von 15 min mit einer Lösung von 11.5 g (60 mmol) β-Ionon (**8**) in THF versetzt. Nach 15 min Rühren wird ebenfalls innerhalb von 15 min eine Lösung von 8.5 g (60 mmol) Methyliodid in 20 ml abs. THF zugegeben. Nach beendeter Zugabe erwärmt man auf 0 °C und rührt bei dieser Temperatur für 3 h. Zur Aufarbeitung werden 30 ml gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung zugesetzt, die wäßrige Phase wird abgetrennt und dreifach mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser bis zur Neutralität und anschließend zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum von Lösungsmitteln befreit. Das zurückbleibende rote Öl wird zweifach über Kieselgel (n-Hexan/Diethylether 90/10) gereinigt. Es verbleiben 3.65 g (18 mmol, 30 %) in Form eines orangefarbenen Öls von **28** (nur 7*E* -Isomer). Zusätzlich werden 2.06 g (9.4 mmol) doppelalkyliertes Ionon **33** isoliert (ebenfalls nur 7*E*-Isomer).

a) Verbindung 28 (monoalkyliertes Produkt)

UV (Ethanol): (7*E*) λ_{max} = 295 nm

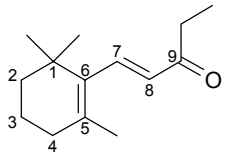
IR (Film): (7*E*) 1716 w, sh, 1694 s, sh, 1673 vs, ν(C=O); 1609 s, ν(C=C)

Massenspektrum (EI, -20°C), m/z (%): (7*E*) 206 (13, M^+, $C_{14}H_{22}O$), 191 (100, $[M - CH_3]^+$), 177 (7, $[M - C_2H_5]^+$), 149 (13, $[M - COC_2H_5]^+$)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$): (7*E*)

1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	7-H	8-H	9-CH_2	9-CCH_3
1.08 s	1.45 m	1.59 m	2.04 t	1.74 d	7.29 d	6.11 d	2.59 q	1.11 t

J(3,4)	J(5-CH_3,7)	J(7,8)	J(9-CH_2,9-CCH_3)
6.2	0.74	16.35	7.35



b) Verbindung 33 (doppeltalkyliertes Produkt)

UV (Ethanol): (7*E*) λ_{max} = 295 nm

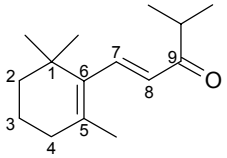
IR (Film): (7*E*) 1716 w, sh, 1694 s, sh, 1673 vs, ν(C=O); 1609 s, ν(C=C)

Massenspektrum (EI, -20°C), m/z (%): (7*E*) 220 (17, M^+,$C_{15}H_{24}O$), 205 (100, $[M - CH_3]^+$), 177 (55, $[M - C_3H_7]^+$), 149 (18, $[M - COC_3H_7]^+$)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$): (7*E*)

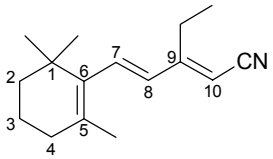
1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	7-H	8-H	9-CH	9-CCH_3
1.05 s	1.46 m	1.60 m	2.04 t	1.75 d	7.33 dd	6.17 d	2.82 sep	1.12

J(3,4)	J(7,8)	J(5-CH_3,7)	J(9-CH,9-CCH_3)
6.4	16.18	0.80	6.90



*ii) 3-Ethyl-5-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4-pentadiennitril (**30**)*

Es werden 4.3 g (25 mmol, 1.4 eq) C_2-Phosphonat (**17**) und 1.13 g (28 mmol, 1.6 eq, 60 % in Öl) Natriumhydrid mit 3.6 g (18 mmol, 1 eq) Keton **28** nach AAV3a umgesetzt. Nach der Reinigung (Kieselgel, n-Hexan/Diethylether 90/10), werden 3.6 g (16 mmol, 90 %) des Nitrils **30** in Form eines gelben Öls erhalten. Aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum läßt sich ein 9*Z*/all-*E*-Verhältnis von 1:1 ablesen.



IR (Film): (Isomerengemisch) 2210 vs, ν(C≡N)

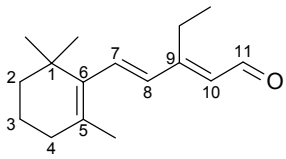
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$):

	1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH_2	9-CCH_3	7-H	8-H	10-H
9*Z*	1.02 s	1.46 m	1.60 m	2.03 t	1.73 s	2.42 dq	1.14 t	6.61 s		5.08 s
all-*E*	1.00 s	1.46 m	1.60 m	2.00 t	1.68 d	2.61 q	1.18 t	6.58 d	5.99 d	5.08 s

	J(3,4)	J(5-CH_3,7)	J(9-CH_2,X)	J(9-CH_2,9-CCH_3)	J(7,8)
9*Z*	5.8	-	1.17	7.45	0
all-*E*	6.0	0.81	-	7.60	16.19

*iii) 3-Ethyl-5-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4-pentadienal (**31**)*

Zur Reduktion zum Aldehyd **31** werden 3.5 g (15 mmol, 1 eq) des Nitrils **30** mit 21 ml (21 mmol, 1.4 eq) 1 M DIBAH-Lösung nach AAV4 zur Reaktion gebracht. Die Reinigung erfolgt chromatographisch über Kieselgel mit n-Hexan/Diethylether 85/15. Ausbeute: 2.65 g (11.4 mmol, 76 %); 9*Z*- und all-*E*-Isomer im Verhältnis 2:3.



IR (Film): (Isomerengemisch) 1668 vs, ν(C=O); 1609 s, ν(C=C)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$)*:

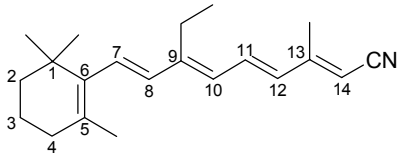
	1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH_2	9-CCH_3	7-H	8-H	10-H	11-H
9*Z*	1.02 s	~1.45 m	~1.60 m	~2.03 t	1.73 d	1.16 dq	2.45 t	6.58 d	6.87 d	5.86 d	10.13 d
all-*E*	1.03 s				1.70 d	1.24 q	2.79 t	6.80 d	6.06 d	5.85 d	10.08 d

	J(3,4)	J(5-CH_3,7)	J(9-CH_2 ,X)	J(9-CH_2,9-CCH_3)	J(7,8)	J(10,11)
9*Z*	6.1	0.83	0.92	7.46	16.09	8.04
all-*E*	6.1	0.84	-	7.64	16.27	8.21

** Es wurde ein Spektrum der Isomerenmischung vermessen, wobei die Signale der Protonen an den Positionen 2, 3 und 4 nicht dem jeweiligen Isomer zugeordnet werden konnten.*

*iv) 7-Ethyl-3-methyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraennitril (**32**)*

Die Kettenverlängerung zur Verbindung **32** erfolgt nach AAV3a in der Umsetzung von 0.63 g (15.7 mmol, 1.4 eq, 60 % in Öl) Natriumhydrid und 2.92 g (13.4 mmol, 1.2 eq) C_5-Phosphonat **15** mit 2.6 g (11.2 mmol, 1 eq) Aldehyd **31**. Aus der chromatographischen Reinigung (Kieselgel, n-Hexan/Diethylether 90/10) werden 3.08 g (10.4 mmol, 93 %) des Nitrils **32** als hellrotes Öl erhalten (Mischung aus mind. vier Isomeren).

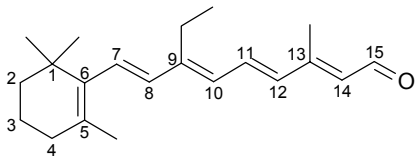


IR (Film): (Isomerengemisch) 2207 vs, ν(C≡N); 1583 s, ν(C=C)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): Isomerengemisch nicht aufgetrennt. Signifikant für die erfolgreiche Umsetzung ist das Auftreten des Signals des Protons an Position 14 in Form eines Singuletts bei 5.15 ppm (all-*E*, Hauptisomer)

*v) 7-Ethyl-3-methyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenal (9-Ethylretinal, **3**)*

Es werden 3.0 g (10.2 mmol, 1 eq) des Nitrils **32** mit 14 ml (14 mmol, 1.4 eq) 1 M DIBAH-Lösung gemäß AAV4 reduziert. Daraus resultieren 2.45 g (8.5 mmol, 83 %) eines Isomerengemischs von 9-Ethylretinal (**3**).



^{13}C-NMR (101 MHz, BB-Entkopplung, Aceton-d_6): (all-*E*) 191.22 (C-15); 155.13 (C-13); 147.88 (C-9); 138.56 (C-6); 136.69 (C-8); 136.05 (C-12); 132.81 (C-11); 130.41 (C-5); 129.83, 129.76, 129.53 (C-7/ C-10/ C-14); 40.27 (C-2); 34.93 (C-1); 33.54 (C-4); 29 (1,1-CH_3); 20.71 (9-CH_2); 19.88 (C-3); 14.90 (9-CCH_3); 13.03 (13-CH_3)

Massenspektrum (EI, 80 °C), m/z (%): (all-*E*) 298 (100, M^+, $C_{21}H_{30}O$), 283 (12, $[M - CH_3]^+$), 269 (20, $[M - C_2H_5]^+$)

(Hochauflösung, EI): (all-*E*) ber.: 298.2297, gef.: 298.2298

4.1.5 Synthese von 9-Isopropylretinal (4)

*i) 2-Methyl-5-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-4-penten-3-on (**33**)*

siehe Punkt 4.1.4 (S. 239).

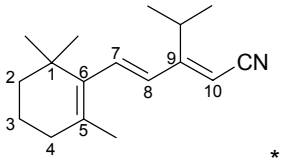
*ii) 3-(1-Methylethyl)-5-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4-pentadiennitril (**34**)*

0.3 g (13 mmol, 1.4 eq, 60 % in Öl) Natriumhydrid werden mit 1.9 g (5.4 mmol, 1.2 eq) C_2-Phosphonat **17** und 2.0 g (9 mmol) Keton **33** nach AAV3a zum Nitril **34** umgesetzt. Nach der chromatographischen Reinigung (Kieselgel, n-Hexan/Diethylether 90/10) verbleiben 1.71 g (7.03 mmol, 78 %) an Produkt.

IR (Film): (Isomerengemisch) 2211 vs, ν(C≡N); 1607 s, 1575 s, ν(C=C)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$)*:

	1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH	9-CCH_3	7-H	8-H	10-H
9*Z*	1.00	~1.46m	~1.54 m	~2.02 t	1.73 d	2.86 sep	1.14 d	6.65 d	6.53 d	5.08 s
all-*E*	1.00				1.67 d	3.17 sep	1.18 d	6.58 d	5.44 d	5.22 s



	J(3,4)	J(5-CH_3,7)	J(9-CH,9-CCH_3)	J(7,8)
9*Z*	5.8	0.71	6.89	16.04
all-*E*	5.8	0.65	6.93	16.32

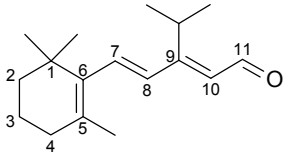
** Die Verschiebungswerte wurden aus der Messung einer Isomerenmischung erhalten; dabei war eine Zuordnung der Signale der Protonen an Position 2, 3 und 4 zu den einzelnen Isomeren nicht möglich.*

*iii) 3-(1-Methylethyl)-5-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4-pentadienal (**35**)*

Zur Reduktion von 1.7 g (7 mmol, 1 eq) des Nitrils **34** werden 10 ml (10 mmol, 1.4 eq) 1 M DIBAH-Lösung nach AAV4 eingesetzt. Aus der Aufreinigung (Kieselgel, n-Hexan/Diethylether 90/10) werden 1.09 g (4.4 mmol, 63 %) des Aldehyds **35** als rotes Öl erhalten. Dieses setzt sich aus einer Mischung von all-*E* und 9*Z*-Isomer zusammen, mit einem Anteil von 60 % 9*Z*-Isomer.

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

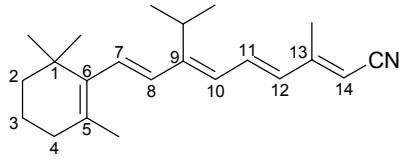
	1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH	9-CCH_3	7-H	8-H	10-H	11-H
9*Z*	1.02 s	1.46 m	1.60 m	2.02 t	1.73 d	2.74 sep	1.14 d	6.44 d	6.53 d	5.91 d	10.02 d
all-*E*	1.01 s	1.46 m	1.61 m	2.01 t	1.70 d	3.62 sep	1.19 d	6.71 d	6.06 d	6.09 d	10.09 d



	J(3,4)	J(5-CH_3,7)	J(9-CH,9-CCH_3)	J(7,8)	J(10,11)
9*Z*	6.3	0.35	6.84	15.98	7.88
all-*E*	6.3	0.75	6.90	16.05	8.20

*iv) 7-(1-Methylethyl)-3-methyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetrennitril (**36**)*

Es werden 1.0 g (4.06 mmol, 1 eq) Aldehyd **35** mit dem Phosphonsäure-Ylid aus 1.3 g (5.7 mmol, 1.4 eq) C_5-Phosphonat **15** und 0.16 g (6.5 mmol, 1.6 eq, 60 % in Öl) Natriumhydrid gemäß AAV3a umgesetzt. Nach der Reinigung (n-Hexan/ Diethylether 90/10) verbleiben 1.25 g (4.05 mmol, 99 %) an Nitril **36** als Mischung aus mindestens drei Isomeren.



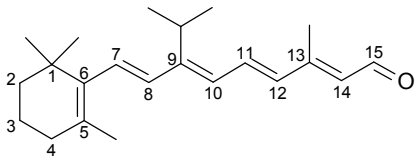
IR (Film): (Isomerengemisch) 2207 vs, ν(C≡N); 1568 s, ν(C=C)

^{1}**H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): Nicht aufgetrenntes Isomerengemisch. Signifikant für die erfolgreiche Umsetzung ist das Singulett des 14-H: Bei 5.14 ppm erscheint das Signal des Hauptisomers 9Z-9-Isopropylretinal.

*v) 7-(1-Methylethyl)-3-methyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenal (9-Isopropylretinal, **4**)*

Zur Reduktion des Nitrils **36** (AAV4) werden 1.2 g (3.9 mmol, 1 eq) der Verbindung mit 5.4 ml (5.4 mmol, 1.4 eq) 1 M Diisobutylaluminiumhydrid-Lösung zur Reaktion gebracht.

Nach der Aufarbeitung erfolgte die erste Aufreinigung des Produkts über Kieselgel mit n-Hexan/Diethylether 90/10. Daraus wurden 1.13 g (3.6 mmol, 93 %) eines dunkelroten, viskosen Öls erhalten, welches sich aus 9*Z*,13*Z* (12 %), 13*Z* (6%), 9*Z* (53 %) und all-*E*-Isomer (29 %) zusammensetzt.



Massenspektrum (EI, 75 °C), m/z (%): (all-*E*) 312 (100, M^+, $C_{22}H_{32}O$), 297 (10, $[M - CH_3]^+$), 269 (34, $[M - C_3H_7]^+$)

(Hochauflösung, EI): (all-*E*) ber.: 312.2453, gef.: 312.2451

^{13}**C-NMR** (101 MHz, BB-Entkopplung, $CDCl_3$): (all-*E*) 191.25 (C-15); 155.30 (C-13); 151.54 (C-9); 138.76 (C-6); 136.02 (C-12); 133.60 (C-8); 132.58 (C-11); 130.28 (C-7); 130.22 (C-5); 129.72 (C-14); 125.21 (C-10); 40.23 (C-2); 34.87 (C-1); 33.46 (C-4); 29 (1,1-CH_3); 21.97, 21.88 (5-CH_3/ 9-**C**H_2/ 9-C**C**H_3); 19.90 (C-3); 13.06 (13- CH_3)

4.1.6 Synthese von 10-Methyl-13-demethylretinal (6)

*i) 2,3-Dimethyl-5-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4-pentadiennitril (**41**)*

In einem ausgeheizten 500 ml Dreihalskolben mit Innenthermometer, Gaseinleitung und Tropftricher mit Blasenzähler werden 13.7 ml (98 mmol, 1.95 eq) über Calciumhydrid getrocknetes Diisopropylamin in 100 ml trockenem THF (frisch über $LiAlH_4$ destilliert) vorgelegt und unter Argon im Aceton-Trockeneis-Bad auf -20 °C gekühlt. Unter Rühren werden 59.4 ml (95 mmol, 1.9 eq) einer 1,6 molaren n-Butyllithium-Lösung in n-Hexan innerhalb von 15 min zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird die gelbe Lösung auf -70 °C gekühlt und innerhalb von weiteren 15 min mit einer Lösung von 3.4 ml (48 mmol, 0.95 eq) trockenem Propionitril (**40**) in 10 ml abs. THF versetzt. Es entsteht eine weiße Suspension, zu der nach 15 min Rühren bei -70 °C innerhalb von 45 min eine Lösung von 6.9 ml (48 mmol, 0.95 eq) Diethylchlorphosphat, ebenfalls in 10 ml THF, zugetropft wird. Nach beendeter Zugabe erwärmt man die nun wieder gelbe Lösung im Eisbad auf 0 °C, versetzt innerhalb von 60 min mit einer Lösung von 10.2 ml (50 mmol, 1 eq) β-Ionon (**8**) in 10 ml abs. THF und rührt anschließend für 2 h bei Raumtemperatur.

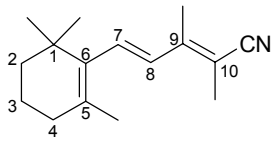
Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung vorsichtig mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung (ca. 50 ml) hydrolisiert. Nach Abtrennen der wäßrigen Phase wird diese dreifach mit Diethylether gewaschen. Die organischen Phasen werden vereinigt, je dreifach mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und anschließend im Vakuum eingeengt. Das rötliche, leicht viskose Öl wird über eine Flash-Säule (8 x 30 cm, Kieselgel, n-Hexan/Diethylether 90/10) gereinigt. Es verbleiben 8.96 g (39.1 mmol, 78 %) des Nitrils **41** mit ca. 90 % all-*E*-Isomer. Eine Aufreinigung der Isomere wurde nicht vorgenommen. Aufgrund der Überlappung der Signale des 9*Z*- durch die wesentlich intensiveren Signale des all-*E*-Isomers im ^{1}H-NMR-Spektrum werden nur die Verschiebungswerte von letzterem angegeben.

IR (Film): (all-*E*) 2204 vs, ν(C≡N); 1612 s, ν(C=C)

^{1}H-NMR (500 MHz, Aceton-d_6): (all-*E*)

1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH_3	10-CH_3	7-H	8-H
1.02 s	1.47 m	1.61 m	2.02 t *	1.71 d	2.18 q	1.97 q	6.59 d	6.50 d

J(5-CH_3,7)	J(9-CH_3,10-CH_3)	J(7,8)
0.61	~1.35	16.09



** Das Signal ist durch einen weiteren Peak überlagert, so daß die Kopplungskonstante nicht berechnet werden kann.*

*ii) 2,3-Dimethyl-5-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4-pentadienal (**38**)*

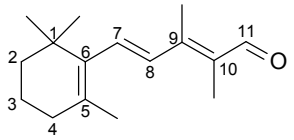
8.9 g (39 mmol, 1 eq) des Nitrils **41** werden nach AAV4 mit 62 ml (62 mmol, 1.6 eq) 1 M DIBAH-Lösung in n-Hexan zum Aldehyd **38** reduziert. Nach der chromatographischen Reinigung mit n-Hexan/Diethylether 80/20 verbleiben 7.6 g (33 mmol, 84 %) an Produkt (Mischung aus 9*Z*- und all-*E*-Isomer im Verhältnis 9:1).

IR (Film): (all-*E*) 2204 vs, ν(C≡N); 1612 s, ν(C=C)

Massenspektrum (EI, 30°C), m/z (%): (all-*E*) 232 (77, M^+, $C_{16}H_{24}O$); 217 (21, $[M - CH_3]^+$); 123 (45, $[M - C_9H_{15}]^+$, Ionon-Ring); 107 (100, $[M - C_7H_9O]^+$, Kette ohne Ring -2 H^+)

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$):

	1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH_3	10-CH_3	7-H	8-H	11-H
9*Z*	1.02 s	1.47 m	1.61 m	2.02 t	1.71 s	2.09 q	1.85 q	6.45 d	6.96 d	10.26 s
all-*E*	1.03 s	1.47 m	1.61 m	2.02 t	1.75 s	2.29 q	1.85 q	6.71 d	6.65 d	10.26 s



	J(3,4)	J(5-CH_3,7)	J(9-CH_3,10-CH_3)	J(7,8)
9*Z*	6.26	0.83	0.8	15.90
all-*E*	6.55	-	1.15	16.12

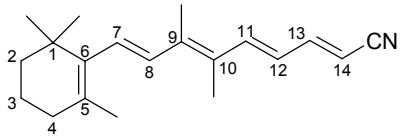
^{13}C-NMR (126 MHz, BB-Entkopplung, $CDCl_3$): (all-*E*) 191.75 (C-11); 149,37 (C-9); 137.72 (C-6); 134.61 (C-7); 132.37 (C-8); 132.28 (C-5 und C-10); 39.51 (C-2); 34.20 (C-1); 33.21 (C-4); 28.95 (1,1-CH_3); 21.81 (5-CH_3); 19.05 (C-3); 12.58 (9-CH_3); 10.62 (10-CH_3)

*iii) 6,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraennitril (**42**)*

Es werden 2.0 g (8.4 mmol, 1 eq) des Aldehyds **38** mit 2.54 g (12.5 mmol, 1.5 eq) C_4-Phosphonat **12** und 8.2 ml (13.1 mmol, 1.55 eq) 1.6 M n-BuLi-Lösung nach AAV3b umgesetzt. Aus der Reinigung des Rohproduktes über eine Flash-Säule (Kieselgel, n-Hexan/Diethylether 80/20) wird eine Fraktion, bestehend aus mindestens drei Isomeren, isoliert. Ausbeute: 1.15 g (4.1 mmol, 49 %).

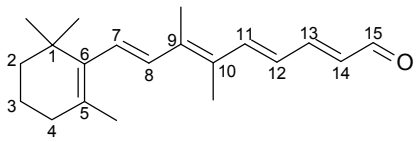
IR (Film): (Isomerengemisch) 2209 vs, ν(C≡N)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$): Isomerengemisch, signifikant für eine erfolgreiche Umsetzung: 5.31 d und 5.09 d (jeweils 14-H)



*iv) 6,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenal (10-Methyl-13-demethylretinal **6**)*

1.15 g (4.1 mmol, 1 eq) Nitril **42** werden mit 8.2 ml (8.2 mmol, 2 eq) 1 M DIBAH-Lösung nach AAV4 zur Verbindung **6** reduziert. Nach der chromatographische Reinigung (Kieselgel, n-Hexan/Diethylether 90/10) verbleiben 1.11 g (3.9 mmol, 95 %) einer Mischung aus vier Isomeren.



Massenspektrum (EI, 70 °C), m/z (%): (all-*E*) 284 (100, M^+, $C_{20}H_{28}O$), 269 (19, $[M - CH_3]^+$)

(Hochauflösung, EI): (all-*E*) ber.: 284.2140, gef.: 284.2143

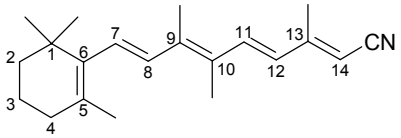
^{13}**C-NMR** (126 MHz, BB-Entkopplung, $CDCl_3$): (all-*E*) 193.59 (C-15); 153.55 (C-13); 142.60 (C-11); 138.40, 138.27 (C-6/C-9); 132.51 (C-8); 131.21 (C-7); 130.51 (C-5); 130.15 (C-14); 129.60 (C-10); 125.78 (C-12); 39.59 (C-2); 34.23 (C-1); 33.16 (C-4); 28.99 (1,1-CH_3); 21.84 (5-CH_3); 19.16 (C-3); 14.16 (9-CH_3); 13.79 (10-CH_3)

4.1.7 Synthese von 10-Methylretinal (7)

*i) 3,6,7-Trimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraennitril (**43**)*

Es werden 2.0 g (8.4 mmol, 1 eq) 2,3-Dimethyl-5-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4-pentadienal (**38**) mit 2.74 g (12.5 mmol, 1.5 eq) C_5-Phosphonat **15** und 8.2 ml (13.1 mmol, 1.55 eq) 1.6 molarer n-BuLi-Lösung entsprechend AAV3b umgesetzt.

3.17 g Rohprodukt werden über eine Flash-Säule (Kieselgel, n-Hexan/Diethylether 80/20) gereinigt. Es verbleiben 2.21 g (7.53 mmol, 89 %) von Verbindung **43** als Gemisch von zwei Isomeren mit über 90 % all-*E*.



IR (Film): (> 90 % all-*E*) 2209 s, ν(C≡N)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): (all-*E*)

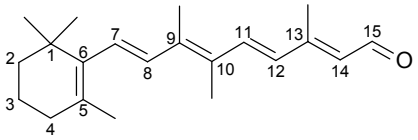
1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH_3	10-CH_3	13-CH_3	7-H	8-H	11-H	12-H	14-H
1.02 s	~2 t	1.61 m	1.47 m	1.73 s	1.92 s	2.00 s	2.21 s	6.25 d	6.67 d	7.28 d	6.28 d	5.19

J(7,8)	J(11,12)
15.93	15.55

*ii) 3,6,7-Trimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenal, (10-Methylretinal, **7**)*

Zur Darstellung von 10-Methylretinal werden 2.21 g (7.53 mmol, 1 eq) des Nitrils **43** mit 15 ml (15 mmol, 2 eq) 1 M DIBAH-Lösung nach AAV4 umgesetzt.

Aus der Reinigung des Rohprodukts (Kieselgel, n-Hexan/Diethylether 85/15) werden 1.62 g (5.4 mmol, 72 %) der Verbindung **7** erhalten, wobei über 80 % als all-*E*-Isomer vorliegt.



Massenspektrum (EI, 85 °C), m/z (%): (all-*E*) 298 (100, M^+, $C_{21}H_{30}O$), 283 (21, $[M - CH_3]^+$)

(Hochauflösung, EI): (all-*E*) ber.: 298.2297, gef.: 298.2303

^{13}C-NMR (126 MHz, BB-Entkopplung, Aceton-d_6): (all-*E*) 181.5 (C-15); 146.28 (C-13); 129.70 (C-6); 127.82 (C-9); 126.41 (C-11); 124.37 (C-8); 122.63 (C-12); 121.39 (C-7); 121.17, 121.04 (C-5/ C-10); 120.70 (C-14); 30.89 (C-2); 25.43 (C-1); 24.21 (C-4); 20 (1,1-CH_3); 12.63 (5-CH_3); 10.45 (C-3); 4.90, 4.61 (9-CH_3/ 10-CH_3); 3.67 (13-CH_3)

4.1.8 Synthese von Retinal (1)

4.1.8.1 Darstellung der ^{13}C-markierten Retinale

*i) 3-Methyl-5-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4-pentadiennitril (**44**)*

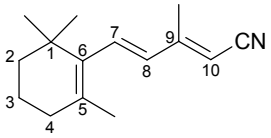
Es werden 2.2 g (55 mmol, 1.1 eq, 60 % in Öl) Natriumhydrid mit 8.86 g (50 mmol, 1 eq) C_2-Phosphonat **17** und 9.6 g (50 mmol, 1 eq) β-Ionon (**8**) entsprechend der AAV3a umgesetzt. Aus der Reaktion gehen nach der Reinigung (Kieselgel, n-Hexan/Diethylether 85/15) 8.8 g (41 mmol, 81 %) gelblich, viskoses Produkt (**44**) hervor (9*Z*- und all-*E* Isomer im Verhältnis 1:3).

IR (Film): (Isomerengemisch) 2208 vs, ν(C≡N)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$):

	1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH_3	7-H	8-H	10-H
9*Z*	1.01 s	*	*	*	1.72 d	2.02 d	6.57 d	6.68 d	5.06 s
all-*E*	0.99 s	1.44 m	1.59 m	2.00 t	1.67 d	2.17 d	6.53 d	6.11 d	5.12 s

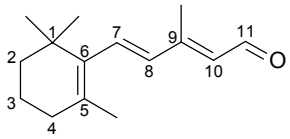
	J(3,4)	J(5-CH_3,7)	J(9-CH_3,X)	J(7,8)
9*Z*	*	0.50	1.28	16.05
all-*E*	6.30	0.50	0.62	16.08



** Die Verschiebungswerte bzw. Kopplungskonstanten können nicht angeben werden, da die Peaks durch die Signale von ebenfalls anwesendem all-E-Isomer überlagert waren*

*ii) 3-Methyl-5-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4-pentadienal (**45**)*

8.0 g (37 mmol, 1 eq) des Nitrils **44** werden nach der AAV4 mit 52 ml (52 mmol, 1.4 eq) 1 M DIBAH-Lösung reduziert. Die Reinigung über Kieselgel (n-Hexan/Diethylether 85/15) ergeben 1.4 g des 9*Z*- und 4.3 g des all-*E*-Isomers der Verbindung **45** (Gesamtausbeute: 26 mmol, 70 %).



IR (Film): (9Z) 1666 vs, ν(C=O); 1611 s, ν(C=C); 965 s, γ(=C-H)
(all-*E*) 1669 vs, ν(C=O); 1607 s, ν(C=C); 965 s, γ(=C-H)

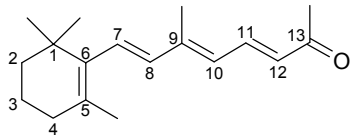
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$):

	1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH_3	7-H	8-H	10-H	11-H
9*Z*	1.01 s	1.45 m	1.59 m	2.02 t	1.71 s	2.09 d	6.59 d	7.05 d	5.83 d	10.13 d
all-*E*	1.02 s	1.44 m	1.58 m	2.02 t	1.60 s	2.28 d	6.70 d	6.18 d	5.91 d	10.10 d

	J(3,4)	J(9-CH_3,X)	J(7,8)	J(10,11)
9*Z*	6.24	1.06	15.98	8.08
all-*E*	6.18	0.87	16.17	8.16

*iii) 6-Methyl-8-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-3,5,7-octatrien-2-on (**46**)*[p]

Es werden 3.75 g (17.2 mmol, 1 eq) des Aldehyds **45** in 75 ml Aceton gelöst und mit 30 ml 10 %iger Natronlauge versetzt. Anschließend wird für 18 h bei Raumtemperatur gerührt, währenddessen sich die Lösung bräunlich verfärbt. Zur Aufarbeitung wird 30 ml gesättigte Kochsalzlösung zugegeben und dreifach mit Ether extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum von den Lösungsmitteln befreit. Das braune, ölige Rohprodukt wird chromatographisch gereinigt (Kieselgel, n-Hexan/Diethylether 85/15). Es werden 3.4 g (13.3 mmol, 77 %) des Ketons **46** als rotes, viskoses Öl erhalten.



IR (Film): (> 90 % all-*E*) 1683 m, sh, 1662 vs, ν(C=O); 1589, 1568 vs, ν(C=C); 971 s, γ(=C-H)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$): (all-*E*)

1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH_3	13-CH_3	7-H	8-H	10-H	11-H	12-H
1.01 s	1.45 m	1.59 m	2.01 t	1.69 s	2.04 s	2.27 s	6.41 d	6.16 d		7.55 dd	6.16 d

J(3,4)	J(7,8)	J(10,11)	J(11,12)
6.26	15.91	11.58	15.46

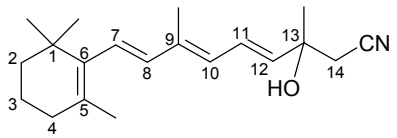
iv) 3,7-Dimethyl-3-hydroxy-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-4,6,8-nonatriennitril

*a) Darstellung von **47a** (Hydroxynitril)*

63 mg (1.6 mmol, 1 eq) absolutes Acetonitril werden in 3.5 ml trockenem THF vorgelegt und bei -60 °C innerhalb von 15 min mit 0.75 ml (1.6 mmol, 1 eq) 15 %iger n-BuLi-Lösung versetzt. Die entstehende farblose Suspension rührt man für 15 min und tropft dann wiederum innerhalb von 15 min eine Lösung von 400 mg (1.6 mmol, 1 eq) des Ketons **46** in 1.5 ml THF zu. Die nun tiefbraune Lösung wird für 1 h unter Eiskühlung gerührt. Zur Aufarbeitung wird mit 20 ml Eiswasser hydrolisiert und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dann jeweils zweimal mit ges. NH_4Cl-Lösung und ges. Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt (435 mg) wird mit Flash-Chromatographie

[p] Zur Darstellung des Ketons kam kein reines all-*E*-Isomer des Aldehyds **45** zum Einsatz, sondern ein Isomerengemisch mit einem Anteil von ca. 10 % 9*Z*-Isomer. Bei den weiteren Umsetzungen (Darstellung von **47a-c**, **48a-c**, **49a-c**) konnte dann zwar ebenfalls die jeweilige 9*Z* konfigurierte Verbindung identifiziert werden, der Anteil war jedoch zu gering, um bei der spektroskopischen Charakterisierung verwertbare Signale zu ergeben. Mit der besseren Auftrennbarkeit bei den Zielverbindungen (**1a-c**) wurde es dann möglich, durch die Analyse von Fraktionsteilen bei der chromatographischen Reinigung auch die entsprechenden Isomere zu berücksichtigen.

(Kieselgel, n-Hexan/Diethylether 60/40) gereinigt. Es verbleiben 285 mg (0.95 mmol, 61 %) von Verbindung **47a** in Form eines roten Öls.



IR (Film): (> 90 % all-*E*) 3448 s, br, ν(O-H); 2255 w, ν(C≡N)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$): (all-*E*) Das Signal der Hydroxy-Gruppe konnte nicht detektiert werden, die Signale von 14-H_2 sind isochron.

1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH_3	13-CH_3	7-H	8-H	10-H	11-H	12-H	14-H_2
0.99 s	1.44 m	1.58 m	1.99 t	1.67 s	1.93 s	1.46 s	6.19 d	6.05 d	5.99 d	6.73 dd	5.78 d	2.60 s

J(3,4)	J(7,8)	J(10,11)	J(11,12)
6.34	16.24	11.25	15.23

*b) Darstellung von **47b** ([15-^{13}C]-Hydroxynitril)*

1.54 g (5.95 mmol) **46** werden mit 0.25 g (5.95 mmol) [1-^{13}C]-Acetonitril und 2.6 ml (5.95 mmol) 15 %iger n-BuLi-Lösung entsprechend der Darstellung von **47a** miteinander zur Reaktion gebracht. Nach der Reinigung des Rohprodukts werden 1.01 g (3.34 mmol, 56 %) der isotopenmarkierten Verbindung **47b** erhalten.

IR (Film): (> 90 % all-*E*) 2199 w, ν(^{13}C≡N)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): (all-*E*) Identisch mit **47a** bis auf: J(^{13}C-15,14-H_2) 9.36

*c) Darstellung von **47c** ([14-^{13}C]-Hydroxynitril)*

1.54 g (5.95 mmol, 1 eq) **46** werden mit 0.25 g (5.95 mmol, 1 eq) [2-^{13}C]-Acetonitril und 3.8 ml (8.9 mmol, 1.5 eq) 15 %iger n-BuLi-Lösung analog zur Darstellung von **47a** umgesetzt. Es verbleiben nach der Reinigung 1.39 g (4.6 mmol, 77 %) des ^{13}C-markierten Produktes **47c**.

IR (Film): (> 90 % all-*E*) 2251 w, ν(C≡N)

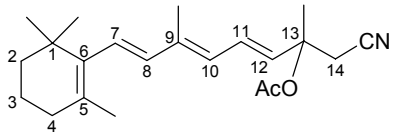
^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$): (all-*E*) Identisch mit **47a** bis auf: J(^{13}C-14,12-H) 2.04; J(^{13}C-14,13-CH_3) 1.90; J(^{13}C-14,14-H_2) 136.04

v) 3-Acetoxy-3,7-dimethyl -9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-4,6,8-nonatriennitril

*a) Darstellung von **48a** (Acetoxynitril)*

270 mg (0.9 mmol, 1 eq) **47a** werden in 5 ml abs. Toluol gelöst und zuerst mit 143 mg (1.17 mmol, 1.3 eq) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und dann mit 110 mg (1.08 mmol, 1.2 eq) Essigsäureanhydrid versetzt und für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur

Aufarbeitung wird der farblose Feststoff abgenutscht und gründlich mit Diethylether gewaschen. Das Filtrat wird mit Wasser bis zur Neutralität und anschließend nochmals zweimal mit ges. Kochsalzlösung ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum von den Lösungsmitteln befreit. Es verbleiben 301 mg (0.88 mmol, 98 %) eines braun-roten Öls von **48a**, welches ohne weitere Reinigung eingesetzt wird.



IR (Film): (> 90 % all-*E*) 2250 vw, ν(C≡N)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): (all-*E*)

1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH_3	13-CH_3	OC(O)CH_3	7-H	8-H	10-H	11-H
0.98 s	1.44 m	1.60 m	1.99 m	1.71 s	1.92 s	1.66 s	2.04 s	6.18 d	6.04 d	5.99 d	6.64 dd

12-H	14-H_2
5.87 d	2.93 d, 3.07 d

J(3,4)	J(7,8)	J(10,11)	J(11,12)	J_{AB} 14-H_2
6.41	16.02	11.00	15.40	16.60

*b) Darstellung von **48b** ([15-^{13}C]-Acetoxynitril)*

Analog zur Darstellung von **48a** werden 1.01 g (3.34 mmol, 1 eq) der Verbindung **47b** mit 0.41 g (4.0 mmol, 1.2 eq) Essigsäureanhydrid und 0.53 g (4.34 mmol, 1.3 eq) DMAP umgesetzt. Ausbeute: 1.1 g (3.2 mmol, 69 %) eines braunen Öls von **48b**.

IR (Film): (> 90 % all-*E*) 2169 vw, ν(^{13}C≡N)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): (all-*E*) Identisch mit **48a**, das Aufspaltungsmuster des ABX-Systems von 14-H_2 in Kopplung mit ^{13}C-15 konnte nicht aufgelöst werden

*c) Darstellung von **48c** ([14-^{13}C]-Acetoxynitril)*

1.38 g (4.6 mmol) des Hydroxynitrils **47c** werden mit 0.7 g (6.9 mmol, 1.5 eq) Essigsäureanhydrid und 0.9 g (7.36 mmol, 1.6 eq) DMAP umgesetzt. Die Reaktion wird bereits nach 4 h entsprechend der Darstellung von **47a** aufgearbeitet. Es verbleiben 1.54 g (4.5 mmol, 98 %) der an Position 14 markierten Verbindung **48c**.

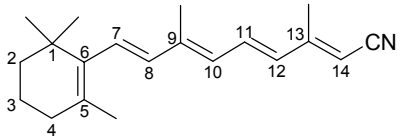
IR (Film): (> 90 % all-*E*) 2253 vw, ν(C≡N)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): (all-*E*) Identisch mit **48a** bis auf die zusätzliche ABX-Aufspaltung $^2J_{AB}$ 16.60 und $^1J_{AX}$=$^1J_{BX}$ 137.15

vi) 3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraennitril

*a) Darstellung von **49a** (Nitril)*

Eine Lösung von 300 mg (0.88 mmol, 1 eq) **48a** in 5 ml abs. Toluol werden mit 268 mg (1.76 mmol, 2 eq) DBU versetzt und für 2 h auf 90 °C Badtemperatur erhitzt, währenddessen sich die Reaktionslösung bräunlich verfärbt. Im Anschluß wird die erkaltete Lösung auf 15 ml Wasser gegeben, die organische Phase abgetrennt und die wäßrige zweimal mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das dunkle Rohprodukt wird mittels Flash-Chromatographie (n-Hexan/Diethylether 90/10) gereinigt, wobei 109 mg (0.39 mmol, 44 %) tiefrotes, viskoses Produkt (**49a**) isoliert werden (Verhältnis 13*Z*- und all-*E*-Isomer ca. 2:8, zusätzlich noch eine geringe Menge 9*Z* konfigurierte Verbindung; s. Fußnote S. 249)



IR (Film): (all-*E*) 2206 w, ν(C≡N)

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

	1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH_3	13-CH_3	7-H	8-H	10-H	11-H	12-H	14-H
13*Z*	1.01 s	*	*	2.02 t*	1.70 s	1.99 s	2.05 s	6.31 d	6.15 d	6.20 d	6.96 dd	6.79 d	5.05 d
all-*E*	1.01 s	1.45 m	1.60 m	2.00 t**	1.69 s	1.99 s	2.19 s	6.30 d	6.12 d	6.09 d	6.93 dd	6.27 d	5.16 d

(13-CH_3,X)	J(7,8)	J(10,11)	J(11,12)
-	16.01	11.50	15.02
0.59	16.21	11.46	15.24

** Es kann kein Verschiebungswert bzw. keine Kopplungskonstante angegeben werden, da diese Signale des 13Z-Isomers durch die Peaks des ebenfalls anwesenden all-E-Isomers überlagert wurden.*

*** Die Kopplungskonstante konnte infolge der Überlagerung durch die 9-Methylgruppe nicht berechnet werden*

*b) Darstellung von **49b** ([15-^{13}C]-Nitril)*

In Anlehnung an die Darstellung von **49a** werden 1.1 g (3.2 mmol, 1 eq) **48b** mit Hilfe von 1.0 g (6.4 mmol, 2 eq) DBU in das Nitril **49b** überführt. Die Reaktion wird für 2 h allerdings nur auf 60 °C Badtemperatur erhitzt. Nach der Flash-Säule verbleiben 0.61 g (2.2 mmol, 68 %) an [15-^{13}C]-Nitril.

IR (Film): (Isomerengemisch) 2155 vs, ν(^{13}C≡N)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): Relative Verschiebungen der Signale identisch mit **49a**

*c) Darstellung von **49c** ([14-^{13}C]-Nitril)*

Analog zur Synthese von **49b** werden 1.53 (4.47 mmol, 1 eq) der Verbindung **48c** mit 1.36 g (8.93 mmol, 2 eq) DBU umgesetzt. Ausbeute: 1.03 g (3.65 mmol, 82 %) an [15-^{13}C]-Nitril **49c**.

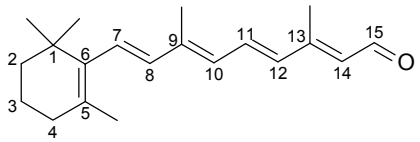
IR (Film): (Isomerengemisch) 2205 vs, ν(C≡N)

^{1}**H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): Identisch mit **49a**, zusätzlich (all-*E*): J(^{13}C-14,12-H) 6.06; J(^{13}C-14,13-C**H**$_3$) 6.36; (^{13}C-14,14-H) 171.95

vii) 3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenal

*a) Darstellung von **1a** (Retinal)*

Es werden 100 mg (0.36 mmol, 1 eq) des Nitrils **49a** durch die Einwirkung von 0.5 ml (0.5 mmol, 1.4 eq) 1 M DIBAH-Lösung nach AAV4 zum Aldehyd **1a** reduziert. Nach der Reinigung über Kieselgel mit n-Hexan/Diethylether 90/10 werden 80 mg (0.28 mmol, 78 %) des Produktes in Form eines dunkelroten, viskosen Öls erhalten (Mischung aus vier Isomeren**).



^{1}**H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$):

	1,1-CH_3	2-H_2	3-H_2	4-H_2	5-CH_3	9-CH_3	13-CH_3	7-H	8-H	9-H	11-H	12-H	14-H	15-H
13*Z*	1.02 s	1.46 m	1.61 m	2.01 t	1.70 s	2.01 s	2.12 d	6.33 d	6.15 d	6.20 d	7.01 dd	7.26 d	5.82 d	10.18 d
9*Z*	1.03 s	1.48 m	1.62 m	2.13 t	1.74 s	2.04 s	2.29 s	6.31 d	6.64 d	6.07 d	7.20 dd	6.28 d	5.95 d	10.08 d
all-*E*	1.02 s	1.45 m	1.58 m	2.00 t	1.70 s	2.01 d	2.31 d	6.32 d	6.14 d	6.17 d	7.12 dd	6.35 d	5.95 d	10.09 d

	J(3,4)	J(9-CH_3,X)	J(13-CH_3,X)	J(7.8)	J(10,11)	J(11,12)	J(14,15)
13*Z*	*	-	0.72	16.13	11.50	14.88	7.94
9*Z*	*	-	-	16.00	11.74	15.01	8.04
all-*E*	6.79	0.70	0.98	15.97	11.56	15.02	8.15

** Die Kopplungskonstante konnte nicht berechnet werden, da die Zuordnung anhand des Spektrums einer Mischung der 9Z- und 13Z-Isomere erfolgte und die entsprechenden Peaks durch andere Signale überlagert wurden.*

*** Es konnte zwar eine Identifizierung und Quantifizierung des 9Z,13Z-Isomers vorgenommen werden, der Großteil der Signale wurde aber durch das in der NMR-Probe ebenfalls anwesende 13Z-Isomer überdeckt. Das Isomerenverhältnis bei den Produkten **1a-c** war jeweils ca.: 9Z,13Z:13Z:9Z:all-E 1: 17:12:70.*

*b) Darstellung von **1b** ([15-^{13}C]-Retinal)*

Die Reduktion von 600 mg (2.1 mmol, 1 eq) der Verbindung **49b** mit 3 ml (3.0 mmol, 1.4 eq) 1 M DIBAH-Lösung entsprechend der Darstellung von **1a** ergeben 554 mg (1.94 mmol, 92 %) an [15-^{13}C]-Retinal (**1b**).

^{1}**H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): Verschiebungswerte der Isomere (9*Z*, 13*Z* und all-*E*) identisch mit **1a** bis auf J(^{13}C-15,15-H) 169.7

*c) Darstellung von **1c** ([14-^{13}C]-Retinal)*

Analog zur Darstellung von **1a** werden 1.02 g (3.61 mmol, 1 eq) des Nitrils **49c** mit 5.1 ml (5.1 mmol, 1.4 eq) 1 M DIBAH-Lösung zur Reaktion gebracht. Es verbleiben 920 mg (3.23 mmol, 90 %) an [14-^{13}C]-Retinal (**1c**).

^{1}**H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): Identisch mit **1a** bis auf folgende zusätzliche Aufspaltungen

	(^{13}C-14,13-C**H**$_3$)	(^{13}C-14,12-H)	(^{13}C-14,14-H)	(^{13}C-14,15-H)
13*Z*	5.76	*	158.67	24.59
9*Z*	4.04	5.17	157.30	24.59
all-*E*	4.07	5.24	156.70	24.51

**Signal konnte nicht aufgelöst werden*

4.1.8.2 Darstellung von Retinal durch die Oxidation von Retinol

*3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenal (Retinal, **1a**)*

Es werden 12 g (42 mmol) Vitamin-A (**50**) in 150 ml Dichlormethan gelöst, im Eisbad gekühlt und auf einmal mit 73 g (840 mmol, 20 eq) aktiviertem Mangandioxid (3 h, 105 °C im Hochvakuum) versetzt. Der Verlauf der Reaktion wird mittels Dünnschicht-chromatographie (n-Hexan/Diethylether 50/50) verfolgt. Nach 50 min ist die Reaktion beendet und die Reaktionsmischung wird über eine mit Kieselgel gefüllte Glasfilternutsche filtriert und gründlich mit Diethylether nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und das Rohprodukt wird chromatographisch über Kieselgel mit n-Hexan/Diethylether 60/40 gereinigt. Die erste Fraktion besteht aus einer Isomerenmischung, während die zweite Fraktion reines all-*E* - Isomer beinhaltet.

Ausbeute 6.7 g (23 mmol, 55 %)

^{1}**H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): (all-*E*) Identisch mit den Daten aus der Synthese von Retinal unter Punkt 4.1.8.1

Massenspektrum (EI, 85 °C), m/z (%): (all-*E*) 284 (100, M^+, $C_{20}H_{28}O$), 269 (15, $[M - CH_3]^+$)

(Hochauflösung, EI): (all-*E*) ber.: 284.2140, gef.: 284.2141

^{13}**C-NMR** (126 MHz, BB-Entkopplung, Aceton-d_6): (all-*E*) 191.21 (C-15); 155.15 (C-13); 141.43 (C-9); 138.52 (C-6); 138.30 (C-8); 135.86 (C-12); 133.21 (C-11); 130.74 (C-10); 130.59 (C-5); 129.81 (C-14/C-7); 40.35 (C-2); 34.87 (C-1); 33.63 (C-4); 21.91 (5-CH_3); 19.87 (C-3); 13.02 (13-CH_3); 12.95 (9-CH_3)

4.1.9 Photoisomerisierung der Chromophore

a) Zeitverlauf der Photoisomerisierung

Für die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Photoisomerisierung werden 1 mg des jeweiligen Retinalderivats in seiner all-*E* Konfiguration in 1 ml Ethanol gelöst. Die Belichtung der Probe erfolgt in einer QS-Küvette (1 x 0.4 cm) mittels eines Diaprojektors, dessen Licht nur durch einen Wärmefilter geführt wird. Mit fortschreitender Belichtungszeit werden in größeren Zeitabständen wenige Mikroliter der Lösung entnommen und entweder sofort mit der analytischen HPLC aufgetrennt oder bis zur Analyse auf Trockeneis gelagert. Die Photoisomerisierung wird solange fortgeführt, bis keine Veränderung der Isomerenzusammensetzung mehr zu beobachten ist.

b) Photoisomerisierung zur präparativen Trennung

Die Photoisomerisierung im präparativen Maßstab hat einerseits zum Ziel, Isomere der Verbindungen spektroskopisch charakterisieren zu können oder andererseits, Isomere der Verbindungen zu erhalten, die über den gewählten Syntheseweg nicht entstehen. Dazu werden Lösungen des reinen all-*E*-Isomers von Retinal (**1**) oder den Retinalderivaten **2**-**7** in Ethanol oder Acetonitril belichtet. Die Belichtung der Lösungen mit einer Konzentration von ca. 1 mg Substanz pro Milliliter Lösungsmittel erfolgt unter Rühren mit dem Licht eines Diaprojektors in Gefäßen aus Normalglas (Transmission >300 nm). Der Verlauf der Isomerisierung wird mit der analytischen HPLC überwacht. Zur Vermeidung hoher Konzentrationen an di-*cis*-Isomeren, die die Auftrennung der erwünschten mono-*cis* konfigurierten Verbindungen erschweren und zumeist mit längerer Belichtungszeit entstehen, werden die Belichtungen nicht bis zum Photogleichgewicht durchgeführt, sondern je nach Derivat nach 15 bis 60 min beendet. Im Falle von 9-Isopropylretinal (**4**) entsteht in der Synthese zu wenig an all-*E* konfiguriertem Aldehyd, so daß für die präparative Photoisomerisierung bereits ein Isomerengemisch eingesetzt werden muß. In diesem Fall wird der Verlauf der Isomerisierung mit der analytischen HPLC in kürzeren Zeitabständen überwacht als dieses im Falle der Belichtung von reinem all-*E* konfiguriertem Chromophor notwendig wäre.

Nach beendeter Belichtung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der verbleibende Rückstand in Diethylether aufgenommen und über eine mit Kieselgel gefüllte Pasteurpipette filtriert. Anschließend wird der Ether abgezogen, die isomerisierte Substanz

wiederum mit wenig Diethylether angelöst und dann im Lösungsmittelgemisch der mobilen Phase aufgenommen. Für eine Trennung werden bis zu 30 mg Substanz in 0.5 bis 0.8 ml der mobilen Phase auf die Säule aufgebracht. Die abgetrennten Fraktionen werden sofort bei Raumtemperatur am Rotationsverdampfer eingeengt und in 5 ml Braunglasbehältnisse überführt. Nach der Überprüfung der Reinheit mittels analytischer HPLC werden die Lösungen im Argonstrom eingedampft und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

Bei Lagerzeiten länger als 3 Monate werden die isolierten Isomere vor der Verwendung erneut auf ihre Reinheit mit Hilfe der analytischen HPLC überprüft.

4.1.10 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Die zur Berechnung der Extinktionskoeffizienten notwendigen Konzentrationen der Retinalderivat-Isomerenlösungen werden mit Hilfe der ^{1}H-NMR-Spektroskopie unter Verwendung eines internen Standards bestimmt. Dazu wird eine in der präparativen HPLC abgetrennte Fraktion eines Derivats in Deuterochloroform oder deuteriertem Aceton gelöst und in ein NMR-Probenröhrchen überführt. Dann wird mit einer 2.5 µl Hamilton-Spritze 1 µl des internen Standards 1,2-Dichlorethan (abs.) zugesetzt, das Probenröhrchen sofort verschlossen und kurz durchmischt. Bis zur Vermessung wird die Probe bei -70 °C aufbewahrt. Die Messung wird *spätestens* 24 h nach Ansetzen der Probe durchgeführt.

Im Anschluß wird die Lösung des Isomers mit Diethylether quantitativ in eine 3 ml Braunglasflasche mit Septum überführt, im Argonstrom eingedampft und wiederum in 250 µl 2-Propanol gelöst (Abmessung mit einer 250 µl Hamilton-Spritze). Dann werden mit einer 10 µl Hamilton-Spritze mehrmals ein bzw. je nach Konzentration der Lösung mehrere Mikroliter dieser Lösung in eine QS-Küvette mit 3 ml 2-Propanol (Abmessung mit 3 ml Vollpipette, Referenz QS-Küvette mit 2-Propanol) überführt und nach jeder Zugabe wird ein Absorptionsspektrum gemessen. Vor der ersten Zugabe von Aldehyd wird zur Korrektur ein Spektrum der Küvette nur mit Lösungsmittel aufgenommen und zur Auswertung von den Substanzspektren abgezogen. Zu beachten ist, daß die Entnahme der Chromophorlösung mit der Spritze durch das Septum erfolgt, da ansonsten Lösungsreste an der Kanüle zu einer zusätzlichen Überführung von Substanz in die Küvette und somit einer deutlichen Verfälschung der Meßergebnisse führen.

Bei sehr empfindlichen Isomeren wird die umgekehrte Vorgehensweise beschritten: Die HPLC-Fraktion wird in Methanol-d_4 gelöst, um wie zuvor zuerst die Absorptionsspektren zu messen. Anschließend werden 500 µl (Abmessung 250 µl Hamilton-Spritze) dieser

Lösung in ein NMR-Röhrchen überführt, mit 1 µl des internen Standards versetzt und ein ^{1}H-NMR-Spektrum aufgenommen.

Zur Auswertung werden die erhaltenen Absorptionswerte gegen das Volumen an zugegebener Lösung aufgetragen. Nach einem linearen Fit erhält man mit der Steigung die auf einen Mikroliter zurückgehende Absorptionsänderung. Aus den NMR-Spektren läßt sich mit Gl. 2 die Absolutmenge der Substanz in der entsprechenden Probe und damit die Konzentration dieser Substanz in der 2-Propanol-Lösung berechnen.

$$G_A = G_B \frac{N_B}{N_A} \cdot \frac{F_A}{F_B} \cdot \frac{M_A}{M_B} \qquad \textbf{Gl. 2}$$

G = Masse [g]
N = Protonenzahl
F = Fläche der Signale im NMR-Spektrum der mit N berücksichtigten Protonen
M = Molekulargewicht der Substanzen [g mol^{-1}]
Index A = Probensubstanz
Index B = interner Standard

Die Extinktionskoeffizienten werden dann nach Einsetzten der entsprechenden Werte in das Lambert-Beersche Gesetz erhalten.

4.1.11 Darstellung der Schiff-Basen

Zur Bestimmung der Absorptionsmaxima der Schiff-Basen der all-*E* konfigurierten Retinalderivate mit n-Butylamin werden die für die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten hergestellten Lösungen verwendet (siehe Punkt 4.1.10). In eine QS-Küvette (1 x 1 cm) mit 3 ml Methanol (Referenz QS-Küvette mit Methanol) wird nach Aufnahme eines Leerspektrums der Aldehyd in gelöster Form (2-Propaonol) zugegeben. Nach Messung eines Absorptionsspektrums werden 30 µl einer 1 M Lösung von n-Butylamin in 2-Propanol zugesetzt. Die Konstanz der Absorptionsspektren nach 45 min und 2 h zeigt die Vollständigkeit der Reaktion zwischen dem Amin und dem Aldehyd.

Zur Bestimmung der Absorptionsmaxima der protonierten Schiff-Basen wird zu den Lösungen der entsprechenden Verbindungen in 20 µl - Schritten 1 M Salzsäure zugesetzt, bis keine Veränderung des Absorptionsverhaltens, d. h. keine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums bzw. kein Anstieg der Absorption, mehr zu beobachten ist.

4.2 Biologische und biochemische sowie physikalische Arbeiten

4.2.1 Bacteriorhodopsin

4.2.1.1 Aufzucht von Halobacterium salinarum, Isolierung von Bacteriorhodopsin (BR) bzw. Bacterioopsin (BO)

Die Stammhaltung von Halobakterien (Wildtyp S9 und Mutante JW5) kann auf Agarplatten oder sog. Standkulturen erfolgen. Standkulturen sind Kulturen, die sich in der stationären Phase befinden und bei 4 °C gelagert werden. Eine langfristige Haltung der Stämme ist in Glycerinkulturen möglich, die bei -20 °C aufzubewahren sind. Mit der Einzelkolonie einer Agarplatte oder aus 1 ml einer Standkultur werden 35 ml Vorkultur angeimpft.[221]

Für die Zellzucht werden vier 2 l Erlenmeyerkolben mit jeweils 800 ml des "Halo-Mediums" befüllt und mit einem Viertel der Vorkultur versetzt. Die Kulturen läßt man in einem Schüttler bei 100 rpm und 37 °C fünf Tage wachsen.

Zur Ernte werden die Kulturen in JA-10 Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 8500 rpm (7900 *g*) und 10 °C für 30 min zentrifugiert. Die Pellets werden in ca. 30 ml Basalsalz-Lösung überführt, mit einer Spatelspitze DNAse versetzt und für eine Stunde gerührt. Anschließend werden die Suspensionen über Nacht gegen Wasser (destilliert und steril filtriert) dialysiert (Dialyseschlauch, Fa. Medicell; Porengröße 10 kD). Am nächsten Tag werden die Proben bei 45000 rpm (144000 *g*) und 10 °C für 30 min in der Ultrazentrifuge pelletiert (Rotor: Ti60). Das Pellet wird in ca. 7 ml Wasser resuspendiert und homogenisiert. Mittels eines automatischen Gradientengießers werden aus jeweils 20 ml 25 und 45 %iger Saccharoselösung vier kontinuierliche Gradienten gegossen. Die homogenisierte Suspension wird auf die Gradienten verteilt, welche anschließend im SW-28-Ausschwingrotor bei 15000 rpm (29800 *g*) und 10 °C für 14 h zentrifugiert werden. Die mittlere Bande der Gradienten wird vorsichtig mit einer Spritze abgenommen und über Nacht gegen dest. Wasser zur Entfernung des Zuckers dialysiert. Das Dialysat wird bei 45000 rpm und 10 °C für 30 min im Ti60-Rotor pelletiert und im Anschluß in möglichst wenig Wasser resuspendiert. Bis zur Verwendung wird das Protein im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

4.2.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Konzentration des Apoproteins der retinaldefizienten Mutante JW5 werden 100 µl der Proteinsuspension entnommen und in einer Küvette mit 900 µl dest. Wasser verdünnt. Nach Messung eines Spektrums werden 2 µl einer 5 mM all-*E*-Retinal-Lösung (in 2-Propanol) zugesetzt. Die Assemblierung des Proteins wird mittels der Messung weiterer Absorptionsspektren verfolgt: Aufgrund der Inkorporation des Chromophors in das Protein verringert sich um 380 nm die Absorption des frei in Lösung vorliegenden Aldehyds, während die Absorption des Chromoproteins um 560 nm ansteigt. Verbleibt nach ca. 30 min keine Absorption des freien Aldehyds, d. h. wurde die gesamte zugegebene Menge an Chromophor in das Protein eingebaut, so wird weitere Retinal-Lösung zugesetzt, bis eine deutliche Restabsorption bei 380 nm verbleibt. Nach Abzug des Spektrums der reinen Proteinlösung von dem Spektrum, welches 1 h nach der letzten Retinalzugabe gemessen wurde, kann anhand des Extinktionswerts des Differenzspektrums bei 560 nm die Konzentration berechnet werden: Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht dabei einer Konzentration von ca. 19 nmol/ml (ε_{max} = 51800 l mol^{-1} cm^{-1}).

4.2.1.3 Assemblierung - Bestimmung der Einbaukinetik

Für die Bestimmung der Einbaukinetiken wird der Protein-Stammlösung ein 10 nmol Bacterioopsin enthaltendes Aliquot entnommen und mit Wasser (destilliert und steril filtriert) auf 1 ml verdünnt. Vor der Zugabe der Chromophorlösung wird ein Absorptionsspektrum der reinen Proteinsuspension gemessen, um nach dem Ende des Einbaus die Eigenabsorption des Proteins und vor allem die Streuung der Proteinsuspension korrigieren zu können. Nach der Zugabe der Chromophorlösung wird die Mischung *vorsichtig* (um ein Aufschäumen zu verhindern) durchmischt und die automatische Aufnahme der Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich 300 bis 800 nm gestartet. Das erste Spektrum nach der Zugabe des Chromophors wird in der Regel nach maximal 10 s aufgenommen. Je nach Retinalderivat benötigt die vollständige Inkorporation zwischen einer Stunde und einer Woche. Die für die Assemblierung verwendeten Lösungen enthalten den jeweiligen Chromophor zu mind. 95 % in der all-*E*-Konfiguration. Die Lagerung der Lösungen erfolgt bei -40 °C. Bei längeren Lagerzeiten wird die Isomerenreinheit mittels der analytischen HPLC überprüft. Die Zugabe der Chromophorlösungen wird mit einer 10 µl Hamilton-Spritze vorgenommen. Bei allen Rekonstitutionen

wird dabei ein ca. 10 %iger Unterschuß an Chromophor eingesetzt, um einen störenden Einfluß überschüssigen Chromophors zu vermeiden. Alle Bestimmungen der Einbaukinetiken werden bei 20 °C mit Hilfe einer thermostatisierbaren Küvettenhalterungen vorgenommen (Temperaturstabilität ±0.5 °C).

Für die Auswertung werden die streuungskorrigierten Absorptionswerte verschiedener Wellenlängen jeweils gegen die Assemblierungszeit aufgetragen und mit Hilfe des Globalfit-Programms analysiert (s. Punkt 4.2.4).

4.2.1.4 Licht-/Dunkeladaption

Zur Lichtadaption der Chromoproteine werden die Proben dem weißen Licht eines Diaprojektors ausgesetzt. Dabei wird die Belichtung in Intervallen durchgeführt, zwischen denen jeweils Absorptionsspektren gemessen werden (s. auch Punkt 3.2.1.2).

Für die Bestimmung der Kinetik der Dunkeladaption wird die vollständig lichtadaptierte Probe nach der letzten Belichtung sofort in die Küvettenhalterung des Spektrometers gestellt und die automatische Messung der Absorptionsspektren gestartet (in der Regel nach spätestens 10 s). Die Adaptionsreaktion wird solange aufgezeichnet, bis keine Veränderung der Absorptionsspektren mehr zu beobachten ist. Alle Messungen werden in der temperierbaren Küvettenhalterung, soweit nicht anders aufgeführt, bei 20 °C durchgeführt. Zur Auswertung wird das Spektrum des dunkeladaptierten Chromoproteins als Referenz von den Absorptionsspektren der Dunkelreaktion subtrahiert. Die Auftragung der Absorptionswerte verschiedener Wellenlängen gegen die Adaptionszeit ermöglicht wiederum die Ermittlung der Kinetiken mit Hilfe der Globalanalyse (s. Punkt 4.2.4).

4.2.1.5 pH-Titration

Für die Bestimmung der Säurekonstanten bei den Bacteriorhodopsinen werden ausschließlich dunkeladaptierte Proben verwendet. Die Pigmentsuspensionen werden in 1 x 0.4 cm QS-Küvetten zur Titration mit Mikrolitermengen von 0.01 oder 0.001 M Salzsäure oder Natronlauge versetzt. Direkt nach der Zugabe von Säure oder Base und Durchmischung wird ein Absorptionsspektrum aufgezeichnet. Dann wird mit einer Mikroglaselektrode der pH-Wert bestimmt und erneut ein Absorptionsspektrum gemessen, um zu gewährleisten, daß die durch die pH-Wert Variation erfolgte Veränderung des Chromoproteins vollständig war.

Zur Auswertung werden die erhaltenen Spektren zuerst mittels eines Faktors entsprechend der jeweils zugesetzten Flüssigkeitsmenge korrigiert. Ein Absorptionsspektrum bei neutralem pH-Wert wird als Referenzspektrum von den anderen Spektren abgezogen. Dann werden die Differenzwerte verschiedener Wellenlängen jeweils gegen den pH-Wert aufgetragen und zur Ermittlung der den Äquivalenzpunkten zugrundeliegenden pK_a-Werten wird die durch Gl. 3 gegebene Funktion[222] an die Daten angepaßt.

$$\Delta A = \sum_i \left[a_{i0} + \Delta a_i \cdot \frac{10^{n_i(pH - pK_{a_i})}}{1 + 10^{n_i(pH - pK_{a_i})}} \right] \qquad \textbf{Gl. 3}$$

ΔA_λ	=	gemessene Absorptionsänderung bei Wellenlänge λ
a_{i0}	=	Ausgangsabsorption
Δa_i	=	Absorptionsdifferenz, die durch die Protonierung/Deprotonierung hervorgerufen wird
pH	=	gemessener pH-Wert
pK_{ai}	=	dem Äquivalenzpunkt zugehöriger pK_a-Wert
n_i	=	Anhaltspunkt für die Anzahl der am Prozeß beteiligten Protonen
Index i	=	Anzahl der titrierbaren Spezies

4.2.1.6 Extraktion der Chromophore

Für die Extraktion eines Chromophors aus Bacteriorhodopsin oder analogen Chromoproteinen in den verschiedenen adaptierten Zuständen wird eine Stammlösung für alle Extraktionen angesetzt. Hinsichtlich der Empfindlichkeit des Detektionssystems der analytischen HPLC ist für die Aufnahme eines Chromatogramms eine Menge von ca. 5 nmol Chromophor notwendig. Ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis ergibt sich bei einer Menge von ca. 10 nmol Ausgangsmaterial für eine Analyse, wobei der eventuell geringere Extinktionskoeffizient eines Retinalderivats berücksichtigt ist.

Ein Aliquot der Stammlösung wird jeweils für die Extraktion aus dunkel- (DA) und lichtadaptiertem (LA) Chromoprotein entnommen und nochmals in zwei Aliquote geteilt, welche getrennt voneinander extrahiert werden. Von jeder Extraktion werden zwei Chromatogramme aufgenommen.

Zur Extraktion des Chromophors wird die Probe mit der gleichen Menge eisgekühltem 2-Propanol versetzt und mind. 15 min im gekühlten Ultraschallbad behandelt. Anschließend wird die Suspension in einen 10 ml Spitzkolben überführt, das enthaltene Wasser mit Natriumsulfat entfernt, über eine mit Kieselgel und Natriumsulfat gefüllte Pasteur-Pipette filtriert, mit gekühltem Dichlormethan und n-Hexan nachgewaschen und bei Raumtemperatur im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird in ca. 100 µl n-Hexan und

ca. 10 µl 2-Propanol aufgenommen und auf ca. 20 µl eingeengt, von denen 10 µl sofort injiziert werden. Die restliche Lösung wird bis zur weiteren Analyse auf Eis gekühlt. Das zweite Aliquot der aufgeteilten Probe wird zur gleichen Zeit wie das erste mit 2-Propanol versetzt, aber erst nach beendeter Analyse des ersten Aliquots extrahiert.

Für die Extraktion der Chromophore aus den lichtadaptierten Chromoproteinen wird das entsprechende Aliquot in eine Küvette (10 x 4 cm) überführt und bis zur Photostationarität mit dem Licht einer 250 W Projektorlampe belichtet (nur KG 5 Wärmefilter). Die Kontrolle der Adaption erfolgt durch Absorptionsspektren. Anschließend wird die Probe aufgeteilt und entsprechend zu der obigen Vorgehensweise extrahiert.

4.2.1.7 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Die Assemblierung des Opsins JW5 erfolgt mit Chromophorlösungen definierter Konzentrationen. Zur Abmessung der Lösungen wird eine 10 µl Hamilton-Spritze verwendet. Die prosthetische Gruppe wird dabei immer in einem mind. 10 %igen Unterschuß im Verhältnis zur Konzentration der vorgelegten Proteinsuspension zugesetzt. Nach der Assemblierung verbleibt bei den jeweiligen Retinalderivaten keine Restabsorption freien Aldehyds, so daß von einer vollständigen Inkorporation ausgegangen werden kann.

Aus dem Verhältnis der zugesetzten Menge an Aldehyd kann somit der Extinktionskoeffizient von Bacteriorhodopsin bzw. analogen Chromoproteinen in den verschiedenen adaptierten Zuständen bestimmt werden. Die Assemblierungen werden jeweils mehrmals durchgeführt, so daß ein Mittelwert angegeben werden kann.

4.2.2 Rhodopsin

4.2.2.1 Präparation der Rinderaugen, Isolierung des Rhodopsins

Die Rinderaugen werden jeweils am Morgen des Präparationstags aus dem Schlachthof abgeholt, so daß zwischen der Schlachtung und dem Beginn der Präparation maximal 3 h liegen. Das Sammeln der Augen im Schlachthof erfolgt in einem speziellen Behälter, der die Augen nach der Schlachtung unter Ausschluß von Licht hält. Während des Transportes und bis zur Präparation der Augen wird dieser Behälter auf Eis gekühlt.

Alle Arbeiten der Präparation der Rinderaugen und der Aufreinigung des Rhodopsins werden unter strengem Ausschluß von Licht der Wellenlängen kleiner als ca. 650 nm vorgenommen (s. S. 229).

Für die Präparation einer Retina wird das Rinderauge am Rande des Ringmuskels mit einem Skalpell eingestochen und um die Iris wird ein kreisförmiger Schnitt vorgenommen, der mit zwei weiteren kleinen Schnitten in Richtung Sehnerv erweitert wird. Der Augenbecher wird dann umgestülpt und die Linse sowie der Glaskörper entfernt. Die Netzhaut wird vorsichtig mit einem Skalpell von allen Seiten zur Austrittsstelle des Sehnervs hin zusammengeschoben. Dann wird die Retina über einem eisgekühlten Polyethylengefäß mit 42 %iger Saccharose-Ringer-Lösung (pH 7.2) abgeschnitten. Die Menge der Lösung wird vor Beginn so gewählt, daß pro Retina ca. 1 ml Lösung vorliegt.

Zur Isolierung des Rhodopsins werden die Retinae in der Saccharose-Ringer-Lösung für mindestens 3 min kräftig von Hand geschüttelt, wobei die Rhodopsin-enthaltenden Außensegmente (rod outer segments, ROS) der Stäbchenzellen abbrechen. Die Aufschlämmung wird auf JA-20 Zentrifugenbehältnisse verteilt und für 5 min bei 4 °C und 7000 rpm (3800 *g*) zentrifugiert. Der Überstand, welcher die ROS enthält, wird durch Gaze (Gazin, Fa. Lohmann) filtriert. Die Pellets werden in die Gaze ausgeschlagen und vorsichtig ein wenig ausgepreßt. Das Filtrat wird wiederum in JA-20 Behältnisse verteilt, mit dem gleichen Volumen an Ringer-Lösung (pH 7.2) aufgefüllt, gut durchmischt und für 20 min bei 4 °C und 12000 rpm (11300 *g*) pelletiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets werden in ca. 5 ml Ringer-Lösung aufgenommen. Die Suspension wird auf vier diskontinuierliche Saccharose-Gradienten verteilt (Dichten 1.11, 1.13 und 1.15 g/ml) und in der Ultrazentrifuge im SW-28 - Schwingrotor für 1 h bei 4 °C und 25000 rpm (82700 *g*) zentrifugiert. Anschließend wird die mittlere Bande des Gradienten mittels einer Spritze mit

abgeflachter Kanüle abgenommen und auf zwei JA-20 Zentrifugenbehältnisse verteilt, mit Ringer-Lösung aufgefüllt, gut durchmischt und für 20 min bei 10000 rpm (7800 *g*) und 4 °C pelletiert.

Die Pellets enthalten nun die gereinigten Stäbchenaußensegmente. Zur Abtrennung der Rhodopsin-enthaltenden Membranscheiben (washed membranes, WM) von weiteren Zellbestandteilen wie Transducin, Phosphodiesterase u. a. werden die Segmente in eine hypotone Lösung (Extraktionspuffer) eingebracht, in der sie infolge des entstehenden osmotischen Druckes platzen und in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt werden können. Demzufolge werden die oben erhaltenen Pellets in Extraktionspuffer resuspendiert, gut durchmischt und für 30 min bei 20000 rpm (31400 *g*) und 4 °C zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets werden erneut in Extraktionspuffer aufgenommen, gut durchmischt und unter gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Anschließend werden die Pellets wiederum in Ringer-Lösung aufgenommen. Die Suspension der washed membranes wird nach der Konzentrationsbestimmung (siehe Punkt 4.2.2.2) bis zur weiteren Verwendung (innerhalb der nächsten 12 h) bei 4 °C aufbewahrt oder für eine spätere Verwendung bei -40 °C eingefroren.

Während der Präparation der Rinderaugen werden die Retinae jeweils in zwei Behältern gesammelt, welche getrennt voneinander aufgearbeitet werden. Jede Charge enthält dabei ca. 50 Retinae, aus denen im Durchschnitt 25 mg Rhodopsin in Form der washed membranes isoliert werden können. Bei den durchgeführten Präparationen werden die Retinae in Zuckerlösung anfangs bis zur weiteren Aufarbeitung bei -40 °C eingefroren. Dieses Einfrieren der Retinae hat keinen Einfluß auf die Eigenschaft des Rhodopsins in den vorgenommenen Messungen, verursacht allerdings z. T. eine deutliche Verringerung der Menge intakten Proteins. Das nicht mehr intakte, degenerierte Rhodopsin wird dann während der Zentrifugation im Zuckergradienten abgetrennt. Um diese Ausbeuteverluste zu vermeiden, wird für den Großteil der Messungen eine direkte Weiterverarbeitung der präparierten Retinae zu den washed membranes ohne eine zwischenzeitliche Lagerung bei -40 °C vorgenommen.

4.2.2.2 Bestimmung der Rhodopsin-Konzentration

Zur Bestimmung der Rhodopsin-Konzentration in den Ringer-Suspensionen werden 50 µl in eine Küvette (QS, 1 x 0.4 cm, Volumen: 1 ml) überführt und mit 100 µl 30 %iger LDAO-Lösung (pH 7.0), 840 µl Ringer-Lösung (pH 7.2) und 10 µl 1 M Hydroxylaminlösung

(pH 6.8) versetzt. Nach der Aufnahme eines Absorptionsspektrums wird die Probe durch einen Diaprojektor mit OG470-Filter in Intervallen solange belichtet, bis bei 500 nm keine Absorptionsänderung mehr zu beobachten ist. Aus der Absorptionsdifferenz zwischen dem Spektrum der unbelichteten und der vollständig gebleichten Probe läßt sich die Konzentration der Probe berechnen: Mit einem Extinktionskoeffizienten des Rhodopsins von ca. 40000[211] $l\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ und dem Molekulargewicht des Proteins von 40 kD ergibt sich bei einer Extinktionsdifferenz von 1 eine Konzentration von 1 mg/ml Probe bzw. aufgrund der vorgenommenen Verdünnung, von 20 mg/ml der resuspendierten Pellets.

4.2.2.3 Bleichung

Für die Bleichung wird die Suspension der washed membranes in Ringer-Lösung verwendet, der Hydroxylamin zu einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt wird. Die Bleichung wird unter Rühren in einem ummantelten Becherglas vorgenommen, welches, an einen Kryostaten angeschlossen, auf 10 °C gekühlt wird. Zur Bleichung wird das Licht eines Diaprojektors mit einem 487 nm Interferenzfilter verwendet. Die Bleichung wird mittels Absorptionspektren verfolgt, welche vor Beginn und im Abstand von 10 min aufgenommen werden. Insgesamt benötigt die Bleichung unter den gegebenen Bedingungen rund 45 min. Nach Beendigung der Belichtung muß das überschüssige Hydroxylamin mittels mehrerer Waschvorgänge entfernt werden. Dazu wird die Proteinsuspension in JA-20 Zentrifugenbehältnisse überführt und mit Ringerlösung (pH 7.2) aufgefüllt, gut durchmischt und bei 20000 rpm (31400 *g*) und 4 °C für 30 min pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird wiederum in Ringer-Lösung resuspendiert und unter den zuvor verwendeten Bedingungen erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wird noch zweimal wiederholt. Das letzte Pellet wird in Ringer-Lösung (pH 7.0) aufgenommen.

4.2.2.4 Bestimmung der Einbaukinetik

Für die Bestimmung der Einbaugeschwindigkeit der Chromophore wird die Opsin-Suspension in Ringer-Lösung mit pH 7.0 verwendet. Ein Aliquot dieser Suspension mit einem Opsin-Gehalt von 5 nmol wird in einer QS-Küvette mit Ringer-Lösung (pH 7.0) auf 1 ml aufgefüllt. Der zu inkorporierende Chromophor wird als Lösung seines 11*Z*-Isomers in 2-Propanol im mindestens dreifachem molaren Überschuß mit Hilfe einer 10 µl Hamilton-Spritze zugesetzt. Die Konzentration der Chromophorlösungen wird so gewählt, das die

notwendige zuzugebende Menge an Lösung nicht mehr als 0.5 % des Volumens der Opsin-Suspension beträgt, um eine Degeneration des Proteins in Gegenwart zu hoher Alkoholkonzentration zu verhindern. Es werden die Chromophorlösungen verwendet, die auch für die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten angesetzt wurden und eine definierte Konzentration besitzen. Der Verlauf der Inkorporation der Aldehyde und der Bildung des Chromoproteins wird mittels der Aufnahme von Absorptionsspektren beobachtet, welche automatisch in bestimmten Zeitabständen aufgenommen werden. Nach der Zugabe der Chromophorlösung wird die Küvette kurz geschüttelt, um eine möglichst homogene Durchmischung zu gewährleisten. Die automatische Messung der Absorptionsspektren wird spätestens 10 s nach der Zugabe gestartet. Je nach der Geschwindigkeit des Einbaus werden die Absorptionsspektren über einen Zeitraum von bis zu 7 h aufgenommen.

Um die Kinetiken der analogen Chromoproteine untereinander vergleichen zu können, die zum Teil mit unterschiedlichen Chargen von Opsin durchgeführt werden, wird zur Kontrolle jedesmal ein Aliquot mit dem nativen Chromophor Retinal rekonstituiert. Alle Rekonstitutionen werden Temperatur-kontrolliert bei 20 °C vorgenommen. Die Berechnung der Einbaukinetiken wird in derselben Vorgehensweise wie bei der Assemblierung von Bacterioopsin mit Hilfe der Globalanalyse durchgeführt (s. Punkt 4.2.4.1)

Um im Vergleich zu dem mit Retinal rekonstituierten Opsin die inkorporierte Menge analogen Chromophors bestimmen zu können (Rekonstitutionsrate) werden die Suspensionen nach beendeter Rekonstitution mit Hydroxylaminlösung (10 mM Endkonzentration) versetzt und gebleicht. Vor der Belichtung wird eine Wartezeit von ca. 15 min eingehalten, damit der im Überschuß zugesetzte Chromophor zum Oxim abreagiert.

4.2.2.5 Vorbereitung der Proben für die Flash-Photolyse

Die Proben für die Flash-Photolyse werden aus dem Opsin in Ringer-Lösung mit pH 7.0 hergestellt, welches aus der Bleichung erhalten wurde (s. Punkt 4.2.2.3). Unter Berücksichtigung der Einbaurate, d. h. der nicht vollständigen Rekonstitution durch die analogen Chromophore, deren gegenüber dem nativen System geringeren Extinktionskoeffizienten und der irreversiblen Reaktion infolge der Belichtung ist für eine Messung die Menge von ca. 15 mg Opsin zu rekonstituieren. Ein Aliquot der Opsin-Suspension wird mit Ringer-Lösung (pH 7.0) auf 10 ml aufgefüllt und mit dem zweifachen Überschuß an Chromophor versetzt. Das Volumen der Lösung mit dem Chromophor in der 11*Z*-

Konfiguration wird wiederum so gewählt, daß die Alkoholkonzentration 1 % nicht überschreitet. Es werden ebenfalls die Lösungen der Chromophore verwendet, welche für die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten angesetzt wurden. Nach der Aldehydzugabe wird die Probe bei Raumtemperatur im Schüttler bei 80 rpm durchmischt. Nach vier Stunden wird die Rekonstitution durch die Zugabe von Hydroxylamin (Endkonzentration 10 mM) beendet. Die Proben werden gut durchmischt und nach 5 min Wartezeit in JA-20 Zentrifugenbehältnisse überführt und bei 20000 rpm (31400 *g*) und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das erhaltene Pellet wird erneut in Ringer-Lösung (pH 7.0) resuspendiert und wie zuvor pelletiert. Dieser Waschvorgang wird noch zweimal wiederholt. Das letzte Pellet wird in Ringer-Lösung pH 7.0 aufgenommen, welche 1 % Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) enthält (0.5 ml/mg Rhodopsin). Die nun vorliegende Lösung des Proteins wird zur Entfernung von nicht solubilisierten Bestandteilen im Ti60-Rotor bei 40000 rpm (113000 *g*) und 4 °C für eine Stunde zentrifugiert. Es verbleibt teilweise ein sehr kleines Pellet, das verworfen wird.

Zur Bestimmung der Konzentration des rekonstituierten Rhodopsins werden 50 µl der DDM-Ringer-Lösung mit 10 µl 1 M Hydroxylaminlösung und 940 µl Ringer-Lösung versetzt und wie unter Punkt 4.2.2.2 beschrieben gebleicht. Die Proben werden mit Ringer-Lösung (pH 7.0) so verdünnt, daß die auf das Chromoprotein zurückgehende Extinktion zwischen 0.2 und 0.25 liegt (Verdünnungen je nach Chromoprotein zwischen Faktor 4 und 7). Somit liegt die Konzentration an Detergenz zwischen 5 und 3 mM bzw. 0.25 und 0.14 % (w/w).

In dieser Lösung ist das Protein ohne merkliche Degeneration über 2 Wochen bei 4 °C lagerbar.

4.2.2.6 Bestimmung der Quantenausbeuten

Die Quantenausbeuten wurde nach der von *Dartnall et al.*[68,104,105] entwickelten Theorie der photometrischen Kurven bestimmt (siehe auch: Ergebnisse und Diskussion, Punkt 3.2.2.3). Demnach ergibt sich für den Verlauf der Bleichung eines Chromoproteins mit annähernd monochromatischem Licht der in Gl. 4 aufgeführte mathematische Zusammenhang.

$$\ln\left(\frac{I_t}{I_f - I_t}\right) = \frac{\phi \cdot \varepsilon \cdot \gamma \cdot I_0}{a} \qquad \textbf{Gl. 4}$$

I_0 = Intensität des Lichts auf der Seite der Küvette, die der Lichtquelle zugewandt ist
I_t = transmittierte Lichtintensität nach der Gesamtbelichtungszeit t
I_f = transmittierte Lichtintensität nach vollständiger Bleichung
ε = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient [$l\ mol^{-1}\ cm^{-1}$]
ϕ = Korrekturfaktor zur Berücksichtigung photochemisch inerter, aber absorbierender Verunreinigungen in der Probe und eventuell Ansammlungen stabiler Photoprodukte im Verlauf der Bleichung

$$\phi = \frac{I_f}{I_f - I_t} \cdot \frac{I_0 - I_t}{I_0} \cdot \frac{\log(I_f / I_t)}{\log(I_0 / I_t)} \qquad \textbf{Gl. 5}$$

γ = Quantenausbeute: Verhältnis zwischen dem Anteil der reagierenden Moleküle bezogen auf die Gesamtmenge der angeregten Moleküle; hier Anteil der isomerisierten Moleküle zu der Anzahl absorbierter Quanten.
a = Bestrahlte Fläche der Probe
t = Gesamtbelichtungszeit [s]
C = Konstante

In der Auftragung von $\ln[I_t/I_f - I_t]$ gegen die Zeit ergibt sich eine Gerade mit dem Achsenabschnitt C, da ε, γ, I_0 und a Konstanten sind. Die Steigung dieser Geraden sei mit *m* bezeichnet ($m=\phi\varepsilon\gamma I_0/a$). Da in der hier gewählten Vorgehensweise keine Intensitäten, sondern Extinktionen gemessen werden, muß eine Umrechnung vorgenommen werden. Durch Einsetzen von Gl. 6 in Gl. 4 folgt Gl. 7.

$$I_f / I_0 = 10^{-A_f} \quad \text{bz} \quad I_t / I_0 = 10^{-A_t} \qquad \textbf{Gl. 6}$$

$$\ln\left(\frac{I_t}{I_f - I_t}\right) = -\ln\left[10^{(A_f - A_t)} - 1\right] \qquad \textbf{Gl. 7}$$

In der gleichen Weise kann die Gleichung des Korrekturfaktors umgeformt werden (Gl. 8).

$$\phi = \frac{1 - 10^{-A_t}}{1 - 10^{A_f - A_t}} \cdot \frac{A_t - A_f}{A_t} \qquad \textbf{Gl. 8}$$

Verbleiben keine zusätzlichen Absorptionen, so wird der Wert von A_f gleich 0 und der Wert des Korrekturfaktors ϕ gleich 1. In den hier durchgeführten Bleichungen von analogen Chromoproteinen kommt es z. T. zur Ansammlung von Photoprodukten, die allerdings nicht stabil gegen die Belichtung, sondern aufgrund ihrer geringeren Photosensitivität (Produkt aus Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient) langsamer mitgebleicht werden. Somit verbleibt nach der vollständigen Bleichung des Pigments keine Restabsorption. Diese Art von Störung des Bleichungsverlaufs kann mittels des von *Dartnall et al.* verwendeten Korrekturfaktors nicht ausgeglichen werden. Aus diesem

Grund wird der Korrekturfaktor bei allen durchgeführten Bleichungen und der daraus folgenden Berechnung der Quantenausbeute mit dem Wert 1 versehen und bleibt somit unberücksichtigt.

Wird nun in der Bleichung eines Chromoproteins ein Quantenzähler verwendet, der unter denselben Bedingungen wie die zu untersuchende Probe belichtet wird, so sind die eingestrahlte Lichtabsorption I_0 und die bestrahlte Fläche a bei Probe und Quantenzähler identisch. Werden die Steigungsgleichungen für die Probe und den Quantenzähler bezüglich dieser beiden Werte umgeformt, können sie gleichgesetzt werden. Mit der erhaltenen Gleichung (Gl. 9) ist es dann möglich, die Quantenausbeute einer Probe zu bestimmen, wenn parallel und unter identischen Bedingungen eine Referenz gebleicht wird. Hier wird als Quantenzähler natives Rhodopsin verwendet.

$$\gamma_x = \frac{m_x}{m_R} \cdot \frac{\phi_R}{\phi_x} \frac{\varepsilon_R}{\varepsilon_x} \cdot \gamma_R \qquad \textbf{Gl. 9}$$

γ = Quantenausbeuten
m = Steigung aus der Auftragung von Gl. 7 gegen die Zeit
ε = Extinktionskoeffizient bei der zur Bleichung verwendeten Wellenlänge
ϕ = Korrekturfaktor (hier ϕ = 1; siehe Text)
Index x = Probe
Index R = Referenz

Die Bleichungen für die Bestimmungen der Quantenausbeuten werden immer im Anschluß an die Flash-Photolyse-Messungen durchgeführt. Dort werden die Proben im Durchschnitt zu 10 % gebleicht, so daß jeweils noch eine bei weitem ausreichende Menge an aktivem Chromoprotein vorliegt, um weitere Messungen durchführen zu können. Sind Wiederholungen von Messungen ausschließlich für die Bestimmung der Quantenausbeute vorzunehmen, so werden entsprechende Mengen des analogen Chromoproteins in identischer Vorgehensweise wie zur Bereitung der Proben für die Flash-Photolyse präpariert. Die Proben werden in einer Konzentration eingesetzt, bei der die auf das Chromoprotein zurückgehende Absorption 0.1 bis 0.2 beträgt. Bei allen Messungen analoger Pigmente wird als Referenz natives und rekonstituiertes Rhodopsin als Quantenzähler mitgebleicht.

Den zu untersuchenden Proben wird vor Beginn der Bleichung zur Beschleunigung und Vervollständigung vor allem der letzten Reaktionen im Photoprozeß Hydroxylamin zugesetzt. Die Belichtung der Proben erfolgt in einer fest positionierten Küvettenhalterung vor einem Diaprojektor. Der Abstand zur Glühbirne beträgt ca. 30 cm. Die Küvetten besitzen die Abmessung von 1 x 0.4 cm, womit eine homogene und vollständige

Ausleuchtung der Probe während der Belichtung gewährleistet wird. Das Licht des Projektors wird zum einen durch den KG5-Filter vor Wärmestrahlung geschützt und anschließend durch einen metallbedampften 10 % Graufilter abgeschwächt. Aus diesem Weißlicht wird dann mit Hilfe eines 487 nm Interferenzfilters die gewünschte Wellenlänge selektiert. Die Belichtungszeiten (Zeitmessung ± 0.1 s) werden mit fortschreitender Bleichung verlängert. Nach der Belichtung und der zuvor ermittelten notwendigen Wartezeit wird ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Zur vollständigen Bleichung der Chromoproteine wird zum Ende der Messung der Graufilter entfernt. Teilweise reicht diese Lichtintensität nicht aus, so daß mit dem transmittierten Licht eines 470 nm cut off-Filters belichtet werden muß.

Zur Auswertung der Daten werden die Absorptionswerte entsprechend Gl. 7 verrechnet und die erhaltenen Werte gegen die jeweilige Gesamtbelichtungszeit aufgetragen. Zur Berechnung der Quantenausbeuten aus den ermittelten Steigungen (den Photosensitivitäten) nach Gl. 9 muß noch der Extinktionskoeffizient bei der zur Bleichung verwendeten Wellenlänge bestimmt werden (siehe Punkt 4.2.2.7).

4.2.2.7 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Die Extinktionskoeffizienten der analogen Rhodopsine werden aus dem Verhältnis der Absorption des jeweiligen Chromoproteins zur Absorption des korrespondierenden Oxims des Aldehyds bestimmt. Dazu muß zum einen der Extinktionskoeffizient des Oxims in der Matrix des Pigmentes ermittelt und zum anderen das Verhältnis zwischen der Absorption des Oxims und der des Pigments berechnet werden (siehe auch: Ergebnisse und Diskussion Punkt 3.2.2.2).

Für die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Oxims wird die Lösung des all-*E*-Isomers verwendet, die für die Ermittlung des Koeffizienten in alkoholischer Lösung hergestellt (siehe Punkt 4.1.10) und deren Konzentration via NMR-Spektrum genau bestimmt worden ist. Zur Bildung des Absorptionsverhältnisses werden die in der Bleichung erhaltenen Spektren herangezogen (s. Punkt 4.2.2.6). Da die Pigmente solubilisiert in Dodecylmaltosid-Ringer-Lösung gebleicht wurden, die einen pH-Wert von 7.0 besaß, müssen auch die Bestimmungen der Extinktionskoeffizienten der Oxime in diesem Medium erfolgen. Um den Einfluß des anwesenden Proteins zu berücksichtigen, wird eine Lösung nativen Rhodopsins in Dodecylmaltosid-Ringer-Medium verwendet. Von dieser Lösung werden 3 ml in einer QS-Küvette vorgelegt (Abmessung mit 3 ml

Vollpipette) und mit 30 µl 1 M Hydroxylaminlösung versetzt (Endkonzentration 10 mM). Zu dieser Lösung wird mit einer 10 µl Spritze eine definierte Menge an Aldehydlösung zugesetzt. Das Ende der Reaktion zwischen Aldehyd und Hydroxylamin wird anhand der Konstanz der Absorptionspektren über einen Zeitraum von mehreren Stunden überprüft. Der Extinktionskoeffizient des Oxims ist dann anhand seines Absorptionswerts und der bekannten Konzentration der zugesetzten Aldehydlösung zu berechnen.

Für die Bestimmung des Absorptionsverhältnisses zwischen Chromprotein und Oxim aus den Absorptionsspektren der Bleichungen wurden verschiedene Berechnungsmethoden getestet (s. Punkt 3.2.2.2). Dabei hat sich die folgende als die beste erwiesen: Am Absorptionsmaximum des Oxims bzw. des Pigments werden die Differenzen zwischen den aufeinanderfolgenden Spektren zueinander ins Verhältnis gesetzt. Der Mittelwert aus diesen Werten ergibt das Verhältnis zwischen der Absorption des Chromoproteins zur Absorption des Oxims. Dieses kann als Faktor für die Berechnung des Extinktionskoeffizienten des Pigments verwendet werden.

4.2.3 Flash-Photolyse

4.2.3.1 Aufbau des Meßsystems

Die Flash-Photolyse wird mit dem von Peter Schmidt[223] modifizierten System durchgeführt (Abb. 4-1). Das Meßsystem ermöglicht die zeitaufgelöste Messung von Absorptionsänderungen photoinduzierter Reaktionen innerhalb von 0.1 µs bis hin zu 100 s. Zur Beobachtung kann Licht mit der Bandbreite von 5 nm über einen Wellenlängenbereich von 390 bis 850 nm eingesetzt werden. Die Anregung der Proben ist über einen Wellenlängenbereich von 308 bis hin zu 800 nm möglich.

Der Aufbau des Systems kann entsprechend der Funktionsweise grob in zwei Teilen betrachtet werden. Einerseits dem Anregungsteil, mit dessen Hilfe die Photoreaktion initiiert wird und andererseits dem Beobachtungsteil, mittels dessen die durch die Reaktionen auftretenden Absorptionsänderungen detektiert werden können. Die rechtwinklige Versuchsanordnung von Anregung und Beobachtung (s. Abb. 4-1) hat den Vorteil, daß eine gleichmäßige Ausleuchtung des Probenvolumens durch den Laserpuls gewährleistet werden kann, während Laserstreulicht in Richtung des Detektors minimal bleibt.

Anregungsarm

Für die Anregung über den Wellenlängenbereich von 550 bis 800 nm steht ein Farbstofflaser zur Verfügung, der mit dem frequenzverdoppelten Licht eines Nd:YAG-Lasers von 532 nm gepumpt wird (J. K. Laser System 2000). Der Bereich unterhalb der Wellenlänge des Nd:YAG-Lasers wird durch die Einkopplung eines Excimer-Lasers (EMG 101 MSG, Lambda Physik, Göttingen, mit XeCl, Wellenlänge 308 nm) abgedeckt, der ebenfalls einen Farbstofflaser pumpt (FL 2000, Lambda Physik). Die Pulsbreite des Nd:YAG-Systems beträgt ca. 15 ns, die des Excimer-Lasers ca. 20 ns.

Nach dem Austritt aus dem Farbstofflaser durchläuft das Lichts zuerst einen Shutter mit einer Bohrung, deren Durchmesser ca. 4 mm beträgt. Der Shutter hat die Aufgabe, das Licht nur zu definierten Zeitpunkten auf die Probe fallen zu lassen, während die kleine Bohrung Streulicht des Lasers reduziert, das nicht koaxial mit der Strahlachse verläuft. Anschließend wird das Licht über zwei dichroitische Spiegel (Nd:YAG-Farbstofflaser) oder zwei Prismen (Excimer-Farbstofflaser) senkrecht auf das Probenvolumen gelenkt. Ein

zwischen den Spiegeln bzw. Prismen angebrachter Graukeil ermöglicht die Kontrolle der Pulsintensität. Bei Verwendung des Excimer-Lasers wird die Umlenkung des Strahls mit 2 Prismen aus optischem Glas vorgenommen, um eventuell vorhandene Reste des 308 nm Lichts des Excimers zu unterdrücken. Vor dem Auftreffen des Laserstrahls auf den Polarisator, der nichtlineares Licht herausfiltert, wird ein kleiner Teil des Strahls abgetrennt und auf ein pyroelektrisches Energiemeßgerät (Meßkopf RJP735 verbunden mit Energiemeter RJ7100, Fa. Laser Precison) gelenkt. Somit wird während der Messung die Energie der Pulse überprüft. Bei Abweichung vom Sollwert kann die Energie über den Graukeil nachgeregelt werden. Die Leistung des Excimer-Lasers ist im Vergleich zum Nd:YAG-System geringer, so daß bei Verwendung des Excimer-Lasers zum Ausgleich der Polarisationsfilter nicht verwendet wird.

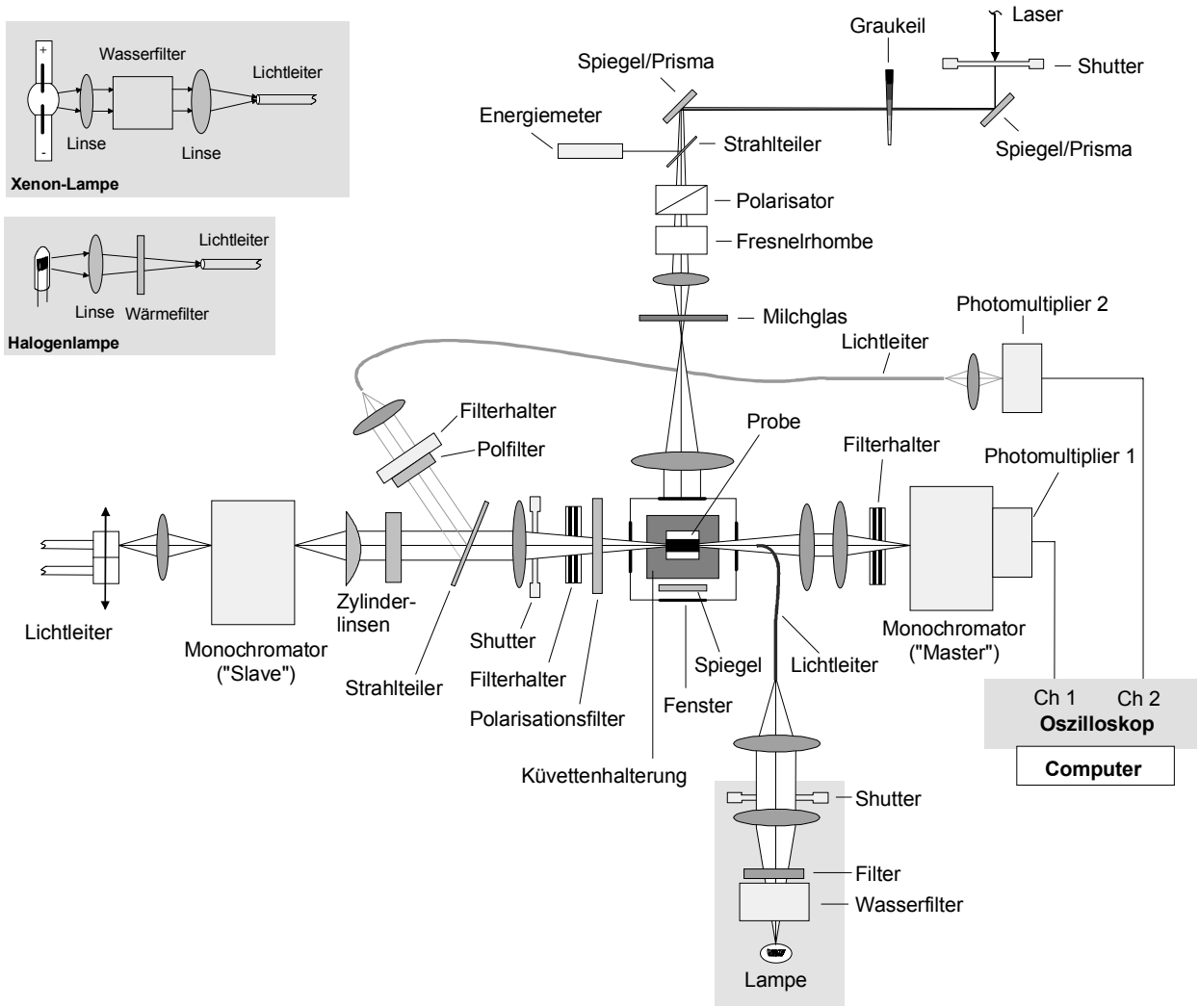


Abb. 4-1 Schematische Darstellung des Aufbaus der Flash-Photolyse; die verschiedenen Beobachtungslichtquellen sind in der oberen linken Ecke im Detail wiedergegeben.

Die Fresnelrhombe (λ/2) überführt das linear polarisierte Licht des Lasers in circular polarisiertes. Für die Pulsdauer der Anregung können die hier untersuchten Proteine hinsichtlich der Rotationsdiffusion als statisch angesehen werden. So wird für in Detergenz solubilisiertes Rhodopsin die Rotationsdiffusion mit einer Zeit von mehr als 100 ns angegeben [224] und für Bacteriorhodopsin eine Diffusionszeit im Bereich von Millisekunden [225]. Mit linear polarisiertem Licht kann somit nur 1/3 der Probenmoleküle angeregt werden, während circular polarisiertes Licht die Anregung von zwei Polarisationsrichtungen und somit die Verdopplung der linearen Signalamplitude und des Signal/Rausch-Verhältnisses ermöglicht. Die Funktion der Fresnelrhombe wird mit einer Energiemeßgerät und vorgesetztem linearem Polarisationsfilter überprüft. Bei einer Abweichung zwischen der linearen zur vertikalen Polarisation des Anregungslichts von über 5 % wird die Überführung des linear polarisierten Laserlichts in die circulare Polarisation mittels der Fresnelrhombe über eine Verstellung des Winkels des im Strahlengang befindlichen Polarisationsfilters korrigiert.

Nach dem Gang durch die Fresnelrhombe wird das Laserlicht zuerst mit einer Linse fokussiert, dann vor dem Brennpunkt mittels eines Streuers homogenisiert und im Anschluß durch eine weitere Linse parallel ausgerichtet. Infolge dieser Anordnung trifft der Anregungsstrahl über das Probenvolumen homogen geweitet auf die Küvettenhalterung, wobei dessen Mittelpunkt auf die Mitte des orthogonal verlaufenden Beobachtungslichts gerichtet ist.

Probenraum

An der Rückseite der Küvettenhalterung befindet sich ein dichroitischer Spiegel, der das Laserlicht reflektiert und erneut durch das Probenvolumen führt, so daß der Entstehung eines Anregungsgradienten entgegengewirkt wird. Außerdem ergibt sich eine nahezu "doppelte" Ausnutzung des Anregungslichts. Um die Ausbildung eines Gradienten noch weiter einzuschränken, werden die Proben nur in eingeengten Küvetten vermessen, wobei die Weglänge des Anregungslichts 0.4 cm und die des Beobachtungslichts 1.0 cm beträgt. In der Vermessung der Rhodopsin-Proben wird infolge der irreversiblen Reaktion dieses Systems eine Durchflußküvette verwendet. Die Rückseite der Küvette ist für die Hinführung der Probe zum Beobachtungsvolumen zum Schutz vor Licht geschwärzt, so daß bei diesen Messungen eine Reflexion des Laserlichts verhindert wird. Die Weglänge der Küvette in Anregungsrichtung beträgt allerdings nur 0.2 cm, so daß mit den geringen

Konzentrationen der verwendeten Proben, die Auswirkung eines möglichen Gradienten auf die Meßergebnisse weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Der Probenraum besteht aus einem Messinghalter für Küvetten mit 1 cm dicken Wandungen als Wärme- bzw. Kältespeicher und Aussparungen von ca. 2.5 x 1 cm für das Anregungs- bzw. Beobachtungslicht. Umgeben ist die Halterung durch eine Kunststoffhaube, die ebenfalls für den Lichtdurchlaß zu allen vier Richtungen Glasfenster besitzt. Die Küvettenhalterung wird durch ein Peltierelement mit Feedbackelektronik temperiert, dessen Kälte oder Wärme mittels eines angeschlossenen Kryostaten abgeführt wird. Die Fenster der Küvette in der Probenhalterung können mit Stickstoff begast werden, um bei Temperaturen unterhalb der Raumtemperatur die Kondensation von Wasser zu verhindern.

Beobachtungsarm

Für die Beobachtung stehen zwei Lichtquellen zur Verfügung: Messungen von Zeitfenstern kleiner als 2 ms werden mit einer gepulsten 150 W Bogenlampe (XBO150, Fa. Osram) durchgeführt und längere Zeitfenster mittels einer 100 W Wolfram-Halogen Lampe (HLX 64625, 12 V, Fa. Osram). Bei der Messung sehr kurzer Zeiten wird das Rauschen des Signals durch die Anzahl der Photonen bestimmt, die für die Detektion zur Verfügung stehen. Die Bogenlampe emittiert im gepulsten Modus (Pulslänge ca. 4 ms) eine bis zu 100fach höhere Photonenzahl als eine Lampe im kontinuierlichen Betrieb und ist damit für die Messung kleiner Zeitfenster im Vorteil. Für die Messung längerer Zeitfenster ist die Halogenlampe geeigneter, da sie eine höhere Langzeitstabilität besitzt und bei ihr keine Bewegung der Lichtquelle auftritt, wie sie bei der Xenon-Lampe durch die Wanderung des Bogens entsteht. Schwankungen der Helligkeit bei der Wolframlampe treten nur durch Änderungen des Widerstandes der Glühwendel oder durch Fluktuationen der Gleichspannung des Netzgeräts auf.

Die Einkopplung der Lichtqellen in die Geometrie des Meßsystems gelingt mit Hilfe von fiberoptischen Bündeln. Zuvor werden UV- und Infrarotstrahlung mit Hilfe eines Wasserfilters bzw. eines UV-/Wärmefilters aus dem Spektrum der Lichtquellen entfernt. Der Querschnitt der Lichtleiter ist auf der Eintrittsseite rund und auf der Seite des Austritts rechteckig. Damit ist nach einer Kollimation des Lichts eine bessere Anpassung an den ebenfalls rechteckigen Eintrittsspalt des Monochromators möglich. Die Fiberenden sind horizontal verschiebbar angebracht, so daß die Verwendung der unterschiedlichen

Lichtquellen erfolgen kann, ohne daß eine Neujustage des Anregungsarms notwendig ist. Dieser erste Monochromator ("Slave", f/3.4, Fa. Applied Photophysics) ist bezüglich der zu selektierenden Wellenlänge auf die Einstellungen des zweiten Monochromators ("Master", f/4.2, Fa. Photon Technology International) kalibriert. Aufgabe des ersten Monochromators ist die Selektion der Beobachtungswellenlänge mit einer Bandbreite von 5 nm, um die Lichtbelastung der Probe zu verringern. Ein vor der Probe angebrachter Shutter, der nur für den Aufzeichnungszeitraum geöffnet wird, reduziert diese Belastung weiter. Zusätzlich werden je nach der Länge des Zeitfensters unterschiedliche Graufilter in den Strahl des Beobachtungslichts eingebracht - bei Zeitfenstern größer 1 s ein 10 % Graufilter und größer 10 s ein 1 % Graufilter.

Zur Konditionierung des Beobachtungslichts dient eine horizontal und eine vertikal kollimierende Zylinderlinse sowie eine weitere Linse vor dem Probenraum. Mit dieser Anordnung wird das Licht mit einer Breite von 0.4 cm und einer Höhe von 1 cm auf den Mittelpunkt des Probenvolumens fokussiert. Nach dem Gang durch die Probe wird das Licht mit zwei weiteren Linsen kollimiert und fällt auf den Eintrittsspalt des zweiten Monochromators ("Master"). Die Aufgabe dieses zweiten Monochromators ist die Abtrennung von Restlicht des Labors, Laserstreulicht und Fluoreszenz vom Absorptionssignal. Dieses ist notwendig da das Probenvolumen direkt auf den Eingangsspalt des zweiten Monochromators abgebildet wird. Eine zusätzliche Unterdrückung von störendem Licht wird durch den Einsatz von Filtern vorgenommen: Unterhalb der Anregungswellenlänge des Lasers mittels short-pass Filter (Fa. Laser Components) und oberhalb mit cut-off bzw. long-pass Filter (Fa. Schott). Eine weitere Linse hinter dem zweiten Monochromator fokussiert ein Abbild des Ausgangsspalts auf dem Photomultiplier.

Während die vermessenen Proben innerhalb der Pulsbreite der Anregung als statisch anzusehen sind, entsteht während der Messung der Transienten eine Beeinflussung der Kinetiken durch Änderung des Übergangsdipolmomentvektors und Rotationsdiffusion. Zur Kompensation dieser Einflüsse gibt es zwei Möglichkeiten: Die erste besteht in der Messung der Transienten mit paralleler und mit orthogonaler Ausrichtung von Beobachtungs- und Anregungslicht und der anschließenden Verrechnung der erhaltenen Signale. Die zweite Möglichkeit besteht darin, die Messung mit der sogenannten *magic-angle* Anordnung von Beobachtungs- und Laserlicht durchzuführen. Da bei Wahl der ersten Möglichkeit ein großer Zeitaufwand vor allem bei Messung von sehr langen Kinetiken entstünde und desweiteren in der Vermessung von Rhodopsin der Bedarf an Protein

wesentlich höher wäre, wird die *magic-angle* Anordnung gewählt. Dazu kann ein Polarisationsfilter in den Strahlengang des Beobachtungslichts vor oder hinter die Probenhalterung angebracht werden. Da mit der Positionierung des Filters vor der Halterung eine weitere Reduzierung der Lichtbelastung der Probe stattfindet, wird diese Position gewählt. Aufgrund der orthogonalen Anordnung von Anregungs- zu Beobachtungsarm ist der am Polarisationsfilter einzustellende Winkel nach Gl. 10[226]zu berechnen.

$$\theta = \arccos\left(\sqrt{\frac{I_V + I_h}{3 \cdot I_V}}\right) \qquad \textbf{Gl. 10}$$

I_v = Intensität der Anregung vertikal
I_h = Intensität der Anregung horizontal

Mit vollständig circularer Polarisierung des Anregungslichts (I_v und I_h gleich 1) ergibt sich für den Polarisationsfilter ein Winkel von 35.3° zur Normalen auf die durch Anregungs- und Beobachtungslicht gebildete Fläche.

Referenzarm

Zur Korrektur von Intensitätsschwankungen des Beobachtungslichts vor allem bei größeren Zeitfenstern ist die verwendete Flash-Photolyse als Zweistrahlsystem aufgebaut. Wie in Abb. 4-1 zu ersehen, befindet sich hinter den zwei Zylinderlinsen der Strahlteiler für den Referenzarm. Dieser teilt ca. 10 % des vom ersten Monochromator kommenden Lichts für die Referenzmessung ab. Die Abtrennung monochromatischen Lichts für den Referenzarm hat den Vorteil, daß spektrale Schwankungen des Beobachtungslichts bei der Korrektur vernachlässigt werden. Das Referenzlicht wird mit einer Linse auf ein Fiberbündel fokussiert und am Fiberende wiederum mit einer Linse auf den zweiten Photomultiplier kollimiert. Ein zweiter Monochromator ist hier nicht vorhanden, um den Verlust an Referenzlicht gering zu halten. Die Geometrie der Anordnung verhindert außerdem die direkte Abbildung der Fluoreszenz und des Laserstreulichts auf dem Detektor des Referenzarms. Trotzdem müssen auch hier bei streuenden Proben und starker Fluoreszenz long- und short-pass Filter eingesetzt werden. Licht, das nicht dem Strahlengang folgt, wird zusätzlich durch Abschirmung der Linsen und dem Einsatz des Fiberbündels von der Detektion ferngehalten.

Detektion

Zur Detektion des Beobachtungs- und des Referenzlichts werden Photomultiplier (R3896, Fa. Hamamatsu) verwendet, deren ursprünglich 9 Verstärkerstufen auf 5 reduziert worden sind. Wie bereits erwähnt, wird das Rauschen vor allem bei kleinen Zeitfenstern von der Anzahl der Photonen beeinflußt, die den Detektor erreichen. Mit der Reduzierung der Verstärkerstufen können mit einer höheren Intensität des Beobachtungslichts mehr Photonen auf die Kathode auftreffen, ohne daß es zu hohen Strömen und einer Zerstörung der Dynodenbeschichtungen kommt, als dies mit der ursprünglichen Zahl von Dynoden der Fall wäre.

Die Intensität des Beobachtungslichts ist dabei hinsichtlich der Vermeidung von sekundären Photoreaktionen limitiert. Die gewählte Anordnung ist somit ein Kompromiß in der Reduzierung der Empfindlichkeit des Detektors zur Verbesserung des Signal/Rausch Verhältnisses. Zusätzlich wird mit dieser Vorgehensweise eine möglichst große Linearität der Photomultiplier gewährleistet. Die Betriebsspannung der Photomultiplier beträgt 600 V bei Verwendung der gepulsten Lampe und 620 V bei Verwendung der Halogenlampe. Im ersten Fall werden die Ausgänge der Detektoren direkt mit dem 50 Ω Widerstand des Oszilloskops verbunden. Im zweiten Fall wird beim Oszilloskop ein Innenwiderstand von 1 MΩ gewählt und parallel ein variabler Widerstand (11 Stufen von 500 Ω bis 1 MΩ und eine weitere Einstellung mit unendlichem Wert) zwischen Detektor und Eingang des Oszilloskops geschaltet. Dieser Widerstand hat die Aufgabe den Gesamtwiderstand im Oszilloskop zu reduzieren. Ist der Widerstand zu groß, so kann es durch die Kinetik des Spannungsabfalls am Widerstand zu einer Verfälschung des Signals kommen. Dieses ist um so stärker der Fall, je kleiner das verwendete Zeitfenster ist. Aus diesem Grund wird für die Messung der kurzen Zeitfenster nur der 50 Ω Innenwiderstand des Oszilloskops verwendet.

Bei den eingesetzten Geräten handelt sich um ein digitales Zwei- und ein Vierkanal-speicheroszilloskop (TDS 520A bzw. TDS 744A, Fa. Tektronix). Ersteres wird bei der Messung von Bacteriorhodopsin-Proben eingesetzt, während bei den Rhodopsin-Messungen beide Oszilloskope verwendet werden; beide Meßgeräte sind identisch konfigurierbar. Bei der Verwendung von zwei Oszilloskopen wird das von den Photomultiplieren kommenden Signal auf beide Oszilloskope über eine Verzweigung und mit Kabel identischer Bauart und Länge aufgeteilt. Für die Messung kurzer Zeitfenster wird vor der Verzweigung ein 25 Ω Widerstand geschaltet, um in der parallelen Anordnung den

für die Detektoren "sichtbaren" Widerstand auf 50 Ω zu belassen. In gleicher Weise wird bei der Messung langer Zeitfenster der variable Widerstand jeweils vor der Verzweigung angebracht. Das von der Delay-Box kommende Signal und das Triggersignal der Photodiode werden ebenfalls auf beide Oszilloskope mit Kabeln gleicher Länge verteilt (s. u. "Elektronische Steuerung").

Mit den Oszilloskopen ist eine simultane Aufzeichnung von Signal und Referenzsignal möglich. Die maximale Samplingrate beträgt 500MS/s (2 ns/Punkt, MS = mega samples). Durch eine besondere Hardware Implementierung ("High Resolution") ist es möglich, diese Samplingrate auch bei großen Zeitfenstern zu benutzen. Jede Aufzeichnung wird in 5000 Datenpunkte digitalisiert und im Anschluß mittels eines Computers ausgelesen.

Jede Datenaufzeichnung des Oszilloskops setzt sich dabei aus zwei verschiedenen Teilen zusammen. Zum einen dem sogenannten pretrigger und zum anderen den eigentlichen Meßwerten. Der pretrigger enthält die Daten vor der eigentlichen Aufzeichnung. Der Meßbeginn wird durch den Laserpuls gegeben, der die Probe anregt. Dieser pretrigger wird möglich, weil das Oszilloskop die von den Photomultipliern kommenden Signale kontinuierlich aufzeichnet. Erhält es nun die Triggerung zum Beginn der Datenaufnahme, so werden die unmittelbar vor dem Triggerzeitpunkt aufgezeichneten Daten als pretrigger eingesetzt. Die Länge des pretriggers richtet sich nach der Länge des zu messenden Zeitfensters. Bei Messungen in kurzen Zeitfenstern mit der gepulsten Bogenlampe besteht das vom Computer ausgelesene Gesamtsignal aus 30 % und bei der Messung von langen Zeitfenstern mit der Wolfram-Halogenlampe aus 10 % pretrigger-Daten.

Die Aufnahme des pretriggers ist notwendig, um für die einzelnen Messungen einen Referenzwert zu erhalten, der den Ausgangswert des Signals darstellt und somit einen Vergleich der verschiedenen Messungen untereinander ermöglicht.

Elektronische Steuerung

Die Steuerung der einzelnen Bauteile und deren Funktion in der zeitlichen Abfolge wird durch die sog. Delay-Box (U. Paul, MPI für Strahlenchemie, Auflösung 10 ms, steuerbarer Zeitbereich 1000 s) koordiniert, die über eine serielle Schnittstelle mit einem PC programmiert werden kann. In der Abb. 4-2 ist die Steuerung schematisch dargestellt.

Die Delay-Box gibt den Haupttakt für die Abfolge aller zeitlichen Funktionen vor. Aus Gründen der Stabilität werden die Laser mit einer vorgewählten festen Frequenz getriggert

(X). Im Falle des Nd:YAG-Lasers geschieht dies über die Vorgabe zur Zündung der Blitzlampen und dann für die Emission des Laserstrahls über die Öffnung des Q-Switchs. Im Falle des Excimer-Lasers triggert die Delay-Box die elektrische Entladung in der Gasmischung.

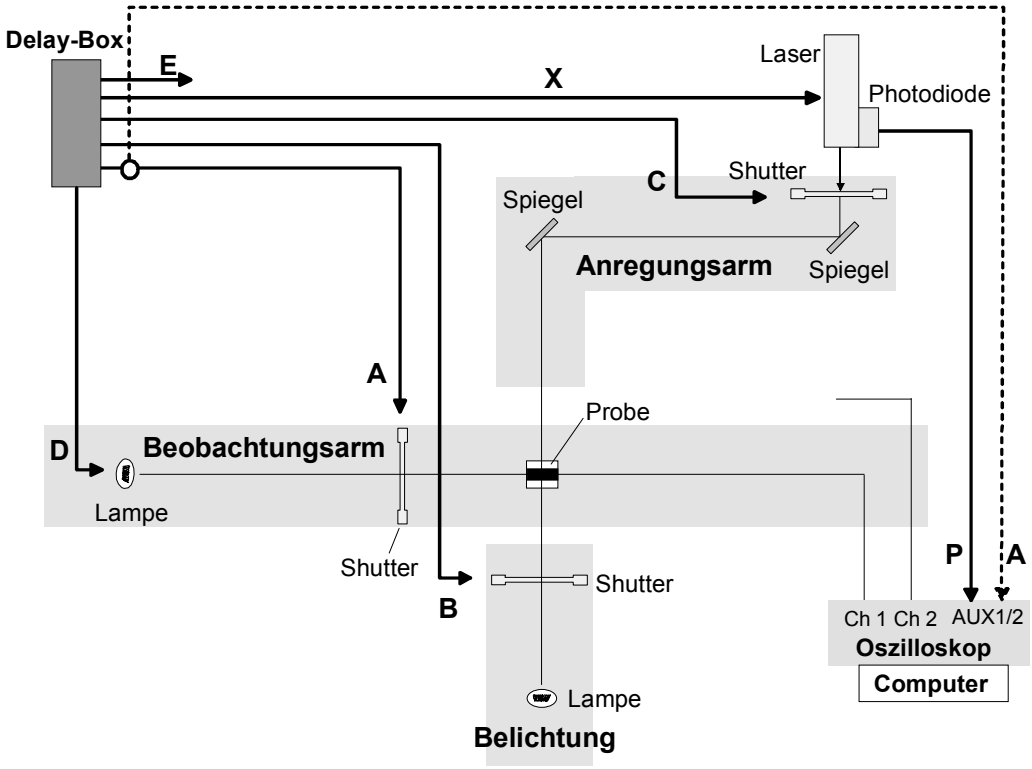


Abb. 4-2 Schematische Darstellung der elektronischen Steuerung der Flash-Photolyse mit Hilfe der "Delay-Box". Die Großbuchstaben markieren einzelne Signalwege zu Bauteilen des Systems (Erläuterungen siehe Text).

Für die Aufnahme eines Signals wird zuerst der Shutter für das Beobachtungslicht geöffnet (A). Gleichzeitig erhält das Oszilloskop ein Signal, welches in einer UND-Verknüpfung mit dem Signal der im Laser angebrachten Photodiode verknüpft ist (P), so daß der nächste Puls des Lasers die Datenaufnahme durch das Oszilloskop startet. In Abhängigkeit von der Pulsfrequenz des Lasers wird der davor angebrachte Shutter geöffnet (C), um den zeitlich gewünschten Laserstrahl auf die Probe gelangen zu lassen. Hat die Anregung der Probe stattgefunden, wird der Lasershutter geschlossen, damit bei der Messung eines Zeitfensters, welches größer als die Taktfrequenz des Lasers ist, kein zweiter Laserpuls auf die Probe gelangen kann. Ist die Aufzeichnung durch das Oszilloskop beendet, so wird der Beobachtungsshutter (A) geschlossen und das Signal der Delay-Box an das Oszilloskop erlischt, so daß ein weiterer Laserpuls und somit ein

erneutes Triggersignal durch die Photodiode keine weitere Messung mehr starten kann. Eine Triggerung des Oszilloskop durch die Photodiode während der Aufnahme eines Signals wird von diesem ignoriert. Nach einer Wartezeit, die nach Ablauf des Experiments und dessen Gesamtlänge zur Synchronisation mit einem vielfachen des Haupttakts notwendig ist, befindet sich das System wieder am Ausgangszustand und es kann eine weitere Messung gestartet werden. Bei Verwendung der Bogenlampe wird dieser kurz vor Öffnung des Q-switchs des Lasers das Triggersignal zur Zündung des Pulses gegeben (D). Im Falle einer notwendigen Belichtung der Probe nach einer Messung kann dieser Vorgang über einen weiteren Kanal der Delay-Box in die zeitliche Steuerung mit eingebunden werden (B). Im Falle der Rhodopsin-Messungen wird der Ausgang E für die zeitliche Steuerung der Pumpe verwendet (siehe Punkt 4.2.3.4).

Datenaufnahme und -verrechnung

Jeder Datensatz besteht aus drei verschiedenen Messungen:

(1) Aufnahme des Signals: Der Laserpuls startet die Photoreaktion und das Beobachtungslicht verfolgt die Absorptionsänderungen.

(2) Messung der Basislinie: Nur das Beobachtungslicht trifft Probe und Detektor. Somit wird die Grundabsorption der Probe und das Intensitätsprofil des Lichts gemessen.

(3) Aufnahme des Laserstreulichts (Scatter): Das Beobachtungslicht wird ausgeblendet und nur der Laserstrahl trifft auf die Probe. So wird für den Anfang der Kinetiken der Einfluß des Laserstreulichts und der Fluoreszenz bestimmt und kann zur Korrektur des Signals verwendet werden.

Zur Verbesserung des Signal/Rausch - Verhältnisses und zum Ausgleich von Schwankungen sowie Störungen werden bei der Messung von Signal, Basislinie und Scatter jeweils mehrere Messungen durchgeführt, im Computer aufsummiert und gemittelt. Zum Ausgleich von langsamen Prozessen, die einen Einfluß auf das Signal ausüben (z. B. die Licht-/Dunkeladaption bei Bacteriorhodopsin), ist die Aufnahme eines Datensatzes in der Abfolge Signal, Basislinie, Basislinie, Signal und Laserscatter hilfreich. In der Messung mehrerer Bacteriorhodopsin-Proben wird diese Vorgehensweise gewählt. Einige Proben besitzen allerdings sehr langsame Kinetiken und z. T. gleichzeitig eine geringere Stabilität, so daß nur die einfache Abfolge von Signal, Basis und Scatter gemessen werden kann. Im Falle der Rhodopsin-Proben wird bei allen Messungen aufgrund der Irreversiblität der Photoreaktion und der damit bereits verbundenen Notwendigkeit großer Probenmengen in der einfachen Abfolge gemessen.

Aus der Verrechnung der Datensätze nach Gl. 11 wird die beobachtete Absorptions-änderung innerhalb eines Zeitfensters bei einer Wellenlänge erhalten. Die Messung erfolgt immer in Referenz zur Basislinie, so daß die erhaltenen Absorptionen immer die Differenz zum Ausgangs- bzw. Grundzustand darstellen. Die in der Gleichung aufgeführte Konstante hat die Aufgabe, nach der Verrechnung der Daten eine Abweichung des pretriggers vom Wert Null zu korrigieren.

$$\Delta A = -\log\left(\frac{\dfrac{Sig(t) - Las(t)}{Sig_{ref}(t) - Las_{ref}(t)}}{C \cdot \dfrac{Bas(t)}{Bas_{ref}(t)}}\right) \qquad \textbf{Gl. 11}$$

ΔA = Extinktionsänderung
Sig(t) = Im Beobachtungsarm gemessenes Signal
Las(t) = Im Beobachtungsarm gemessenes Laserstreulicht
Bas(t) = Im Beobachtungsarm gemessene Basislinie
C = Konstante

Variablen mit Index *ref*: entsprechen im Referenzarm gemessenen Daten

Bei der Bildung des Mittelwerts aus den aufsummierten Daten wird ebenfalls die Standardabweichung eines jeden Datenpunkts berechnet. Die Standardabweichung aus der Mittelung von Signal und Basisline wird bei der Durchführung der oben beschriebenen Verrechnung der Datensätze ebenfalls berücksichtigt. Die so erhaltene Standard-abweichung dient in der Auswertung der Messung zur Beurteilung der Qualität des Absorptionsverlaufs eines Zeitfensters einer Wellenlänge zu den anderen Zeitfenstern der gleichen Wellenlänge.

Ein Datensatz mit Signal, Basis und Laserscatter enthält die Information für die Absorptionsänderungen bei einer Wellenlänge innerhalb eines Zeitfensters. Für eine vollständige Charakterisierung einer Probe mit der Flash-Photolyse werden die Absorptionsänderungen bei bis zu 14 Wellenlängen innerhalb von bis zu vier Zeitfenstern aufgezeichnet.

4.2.3.2 Vorbereitung der Messungen

Bestimmung der Energieabhängigkeit

Das Signal/Rausch-Verhältnis wird um so besser, je größer die auftretende Absorptions-änderung ist, d.h., je mehr Moleküle durch die Anregung zur Reaktion

gebracht werden können. Dieses kann durch eine möglichst hohe Laserenergie erreicht werden. Wird diese Energie aber zu groß gewählt, dann können die Moleküle von mehr als einem Photon getroffen werden und Multiphotonenprozesse auslösen. Außerdem kann ein während der Dauer des Laserblitzes entstandenes Intermediat angeregt werden. In Folge dieser Prozesse werden die Kinetiken der zu beobachtenden Photoreaktion beeinflußt. Um auf der einen Seite ein möglichst gutes Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten, aber auf der anderen Seite Mehrfachanregung möglichst zu vermeiden, wird die für die Messung einer Probe zu verwendende Anregungsenergie mit der Bestimmung der sogenannten Energieabhängigkeit festgelegt. Dazu wird bei einer Beobachtungswellenlänge, bei der die Photoreaktion eine relativ deutliche Absorptionsänderung verursacht, die Amplitude der Absorptionsänderung in Abhängigkeit von verschiedenen Anregungsenergien gemessen. Die Auftragung der Amplitude gegen die Energie liefert zu Beginn eine Gerade, die im weiteren Verlauf abknickt und das Auftreten von Nichtlinearitäten durch Mehrfachanregung der Moleküle anzeigt. Die Energie für ein Experiment wird so gewählt, daß keine Absorptionsänderung auftritt, die mehr als 10 % außerhalb des linearen Bereiches liegt (Abb. 4-3).

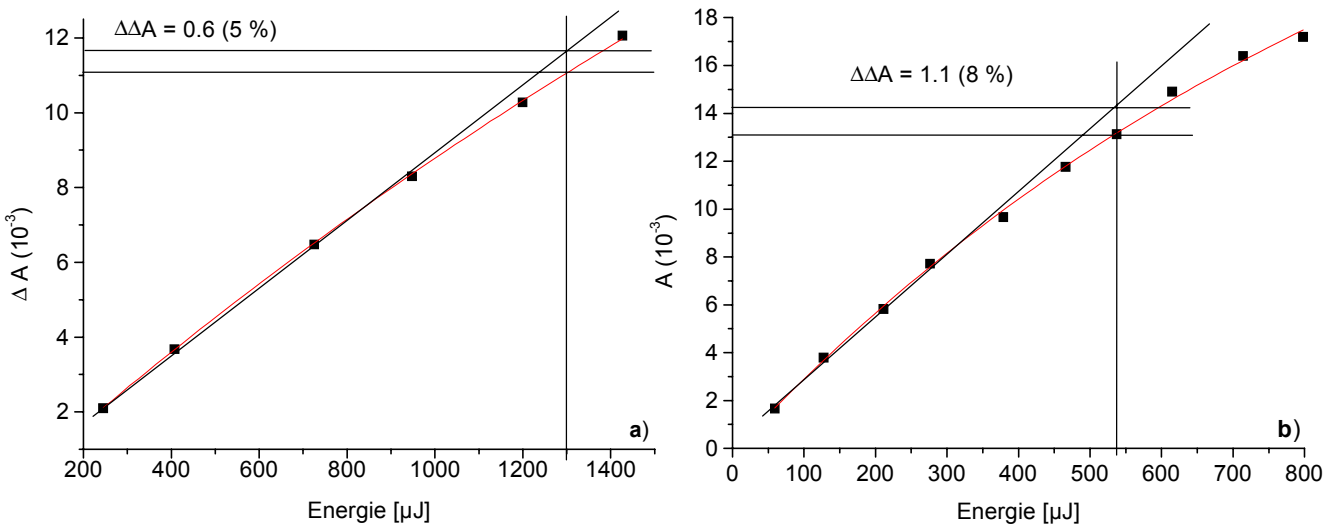


Abb. 4-3 Energieabhängigkeit: Als Beispiel wurde a) natives Rhodopsin und b) 9-Ethylretinal-Bacteriorhodopsin gewählt. Die horizontalen Linien markieren die Differenz zwischen dem linearen (gefitteten) und nichtlinearen Verlauf bei der durch die vertikale Linie markierte Meßenergie.

Sekundäre Photoreaktionen

Zum Ausschluß sekundärer Photoreaktionen durch die Intensität des *Beobachtungslichts* werden bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Chromoproteins

mehrere Basislinien gemessen. Tritt eine Veränderung der Position der Basislinie auf, so wird die Intensität des Beobachtungslichts - im Vergleich zu den oben gemachten Vorgaben - durch den Einsatz eines stärker abschwächenden Graufilters verringert. Im Falle von Bacteriorhodopsin erschwert dabei die Kinetik der Rückreaktion in den dunkeladaptierten Zustand die Untersuchung möglicher sekundärer Photoreaktionen.

4.2.3.3 Messungen an Bacteriorhodopsin

Alle Messungen der Bacteriorhodopsin-Proben werden in Küvetten der Abmessung 1 x 0.4 cm bei einer Temperatur von 20 °C vorgenommen. Die Extinktion der Proben am Absorptionsmaximum beträgt 0.3 bis 0.45, wobei die Absorption nach Abzug der Proteinabsorption und -streuung im Bereich von 0.2 bis 0.3 liegt. Für die Assemblierung der Chromophore wird zur Menge an Protein ein mindestens 10 %iger Unterschuß an Aldehyd zugesetzt, um störende Einflüsse freien Chromophors zu vermeiden.

Die Anregung der Bacteriorhodopsin-Proben erfolgt im lichtadaptierten Zustand der Chromoproteine, abgesehen bei einer Messung von 10-Methyl-13-demethylretinal-JW5. Hierbei ist zu beachten, daß die Intensität der Laseranregung während einer Messung für den Erhalt des lichtadaptierten Zustandes nicht ausreicht. Damit die BR-Proben in einem identischen Ausgangszustand vorliegen, wird vor der Messung untersucht, in welchen Zeitabständen und mit welcher Dauer jede Probe zu belichten ist, um den vollständig lichtadaptierten Zustand zu Beginn einer Meßsequenz zu erhalten. Die Belichtung erfolgt in der Regel manuell mittels einer weiteren Lampe vor der Messung eines Zeitfensters einer Wellenlänge. Das Licht wird nach Filterung durch einen Wasser- und Wärmefilter (KG5) mittels eines Lichtleiters auf die Probe gelenkt, und zwar von einer Seite der Küvettenhalterung, die vom Detektor abgewandt ist (siehe Abb. 4-1).

Bis auf zwei Ausnahmen erfolgt die Initiierung der Photoreaktion bei den Bacteriorhodopsin-Proben mit einer Anregungswellenlänge von 560 nm (Nd:YAG-Farbstofflaser mit Rhodamin-6G). Bei 9-Isopropylretinal-JW5 und lichtadaptiertem 10-Methyl-13-demethylretinal-JW5 wird die Kombination Excimer-Farbstofflaser (Coumarin 102) und eine Wellenlänge von 480 nm verwendet.

Die vollständige Messung einer Bacteriorhodopsin-Probe benötigt zumeist zwei Tage. Vor Beginn und nach Beendigung der Messungen an einem Tag wird der Zustand der Probe mittels Absorptionsspektren überprüft. Für jede Messung wird ein Probenvolumen von 3 ml angesetzt, so daß gegebenenfalls beim Auftreten von Veränderungen infolge von

Degeneration das Meßvolumen von 1 ml durch eine identische Probe ersetzt werden kann.

Das Auslesen der Daten aus dem Oszilloskop erfolgt mit einer VAX-station und dem Programm LMS, die Verrechnung der Datensätze mit dem Programm conv_red (beide Programme: D. Lenk, MPI für Strahlenchemie, Mülheim/Ruhr)

Bedingungen für die Messungen der Bacteriorhodopsin-Proben

Die Anzahl der Mittelungen der Einzelsignale bezieht sich immer auf nur eine Messung, z. B. eines Signals. Bei der zweifachen Messung des Signals wird somit die doppelte Anzahl an Einzelmessungen aufsummiert und gemittelt, als die, die jeweils in Klammern angegeben ist.

<u>9-Demethylretinal-JW5</u>

12 Wellenlängen, 400 bis 660 nm
Zeitfenster (Anzahl Mittelungen) 100 µs (5), 10 ms (5), 1 s (5) und 100 s (3)
Meßsequenz: Signal, Basis, Scatter
Anregung: alle 108 s
Belichtung: 60 s Weißlicht vor jeder Meßsequenz über Lichtleiter
Energie ca. 730 µJ/cm^2

<u>Retinal-JW5</u>

13 Wellenlängen, 400 bis 680 nm
Zeitfenster (Anzahl Mittelungen) 20 µs (30), 1 ms (20), 50 ms (10) und 5 s (10)
Meßsequenz: Signal, Basis, Basis, Signal, Scatter
Anregung: alle 6 s
Belichtung: 15 s Weißlicht vor jeder Meßsequenz über Lichtleiter
Energie: ca. 540 µJ/cm^2

<u>Natives Bacteriorhodopsin (Stamm S9)</u>

13 Wellenlängen, 400 bis 680 nm
Zeitfenster (Anzahl Mittelungen) 20 µs (40), 1 ms (15), 50 ms (15) und 5 s (10)
Meßsequenz: Signal, Basis, Basis, Signal, Scatter
Anregung: alle 6 s
Belichtung: 20 s Weißlicht vor jeder Meßsequenz über Lichtleiter
Energie: ca. 580 µJ/cm^2

<u>9-Ethylretinal-JW5</u>

12 Wellenlängen, 400 bis 660 nm
Zeitfenster (Anzahl Mittelungen) 20 µs (30), 1 ms (20), 50 ms (10) und 5 s (10)
Meßsequenz: Signal, Basis, Basis, Signal, Scatter
Anregung: alle 6 s
Belichtung: 30 s Weißlicht vor jeder Meßsequenz über Lichtleiter
Energie: ca. 540 µJ/cm^2

10-Methylretinal-JW5

11 Wellenlängen, 410 bis 690 nm
Zeitfenster (Anzahl Mittelungen) 20 µs (30), 1 ms (20), 50 ms (10) und 5 s (10)
Meßsequenz: Signal, Basis, Basis, Signal, Scatter
Anregung: alle 6 s
Belichtung: 60 s Weißlicht vor jeder Meßsequenz über Lichtleiter
Energie: ca. 1050 µJ/cm^2

9-Isopropylretinal -JW5

11 Wellenlängen, 400 bis 600 nm
Zeitfenster (Anzahl Mittelungen) 20 µs (30), 2 ms (10), 200 ms (5) und 20 s (5)
Meßsequenz: Signal, Basis, Scatter
Anregung: alle 26 s
Belichtung: 30 s Weißlicht vor jeder Meßsequenz über Lichtleiter
Energie: ca. 550 µJ/cm^2

10-Methyl-13-demethylretinal-JW5 (vollständig assembliert)

15 Wellenlängen, 400 bis 750 nm
Zeitfenster (Anzahl Mittelungen) 1 ms (20), 100 ms (10) und 10 s (10)
Meßsequenz: Signal, Basis, Scatter
Anregung: alle 18 s
Belichtung: Nach jeder Anregung 5 s Rückbelichtung mit 473 nm Interferenzfilter ohne Lichtleiter direkt von der Rückseite der Küvettenhalterung
Energie: ca. 640 µJ/cm^2

10-Methyl-13-demethylretinal-JW5 (lichtadaptiert)

11 Wellenlängen, 420 bis 710 nm
Zeitfenster (Anzahl Mittelungen Signal/ Basis und Scatter):
10 ms (10/20), 1 s (5/20) und 100 s (3/3)
Aufgrund der langsamen Kinetik wurden in der Messung des Signals die Probe alle 106 s angeregt und die Daten ausgelesen. Für die Messung von Basislinie und Scatter wurde alle 8 s gemessen. Somit konnten für die Basislinie und den Laserscatter mehr Messungen gemittelt werden.
Meßsequenz: Signal, Basis, Scatter
Belichtung: Nach jeder Messung eines Zeitfensters bei einer Wellenlänge wurde die Probe für 30 s direkt mit dem Diaprojektor belichtet (250 W, nur KG-Filter)
Energie: ca. 550 µJ/cm2

4.2.3.4 Messungen an Rhodopsin

Die irreversible Photoreaktion von Rhodopsin bzw. analogen Rhodopsinen erfordert den Austausch der Probe nach jedem Laserschuß. Dieses gelingt unter Verwendung einer Durchflußküvette, die an eine Peristaltikpumpe angeschlossen wird. Die Apertur der Küvette hat die Abmaße 0.2 x 1 cm (Schichtdicke 1 cm). Das dritte Fenster für das Anregungslicht erstreckt sich über das gesamte Probenvolumen (1 x 1 cm). Der Probenzulauf erfolgt von oben durch den geschwärzten Rückteil der Küvette und fächert

unterhalb des Beobachtungsvolumens auf. Der Ablauf der Küvette erfolgt oberhalb des Probenvolumens, ebenfalls verjüngend, nach oben. Als Vorratsgefäß für die Probe wird ein doppelwandiges Glaßgefäß verwendet, das im Boden einen Ablauf und am oberen Rand einen Zulauf besitzt (Eigenbau, Glasbläserei). Die Verbindung vom Vorratsgefäß über die Pumpe zur Probenküvette wird mit schwarzem Pumpenschlauch vorgenommen. Der Abfluß der Küvette erfolgt ebenfalls mit schwarzem Schlauch zum Zulauf des Vorratsbehältnisses. Zur Kühlung der Probe wird der Vorratsbehälter an den Kryostaten angeschlossen, der auch für die Abführung der Wärme vom Peltierelement verwendet wird. Für die Messung werden die Probenschläuche entlang der Kühlschläuche geführt, um eine konstante Temperierung der Probe zu gewährleisten. Die Peristaltikpumpe wird über ein Schaltrelais mit der Delay-Box verbunden und somit in die Gesamtsteuerung der Flash-Photolyse eingebunden.

Zur Charakterisierung der Rhodopsin-Proben mit der Flash-Photolyse werden jeweils 11 Wellenlängen über 4 Zeitfenster gemessen (Ausnahme: 10-Methylretinal-Rhodopsin mit 12 Wellenlängen). Dabei werden die Absorptionsänderungen innerhalb von zwei aufeinanderfolgenden Zeitfenstern gleichzeitig mit zwei Oszilloskopen gemessen. Das Probenvolumen der Küvette umfaßt 200 µl. Zur Limitierung der notwendigen Probenmenge werden die Wiederholungen der Einzelmessungen auf 10 (bei kurzen Zeitfenstern) und 5 (bei langen Zeitfenstern) beschränkt. Es wird jeweils nur die Meßsequenz von Signal, Basislinie und Laserscatter gemessen. Zur Messung des Signals wird das Probenvolumen nach jeder Anregung ausgetauscht. Bei der Aufzeichnung der Basislinie in einem Bereich 40 nm ober- und unterhalb des Absorptionsmaximums des Grundzustands wird die Probe jeweils nach 5 Messungen ersetzt. Außerhalb dieses Wellenlängenbereichs ist eine geringfügige Bleichung der Probe nicht zu beobachten und die Aufzeichnung der Basislinie erfolgt mit einem Probenvolumen. Die Aufnahme des Laserscatters wird mit dem Probenvolumen der Basislinie durchgeführt. Mit diesen limitierten Versuchsbedingungen sind für eine vollständige Messung inklusive Vorversuche, Messung der Energieabhängigkeit und Wiederholungen von Einzelmessungen ca. 50 ml Probenvolumen notwendig. Die Konzentration der Probe wird mit einer auf das Chromoprotein zurückgehenden Absorption von ca. 0.2 gewählt (Absorptionsmaximum des jeweiligen Chromoproteins), womit sich eine Gesamtextinktion von ca. 0.3 ergibt. Die notwendige Gesamtmenge *aktiven* Proteins beträgt somit 10 mg pro Messung. Für die meisten Messungen kann infolge der geringeren Rekonstitutionsrate nur ein Probenvolumen kleiner als 50 ml erhalten werden. Für eine vollständige Charakterisierung wird

die Probe somit im "Kreis" gepumpt, d. h. nach der Messung wiederum in den Vorratsbehälter zurückgeführt und nach dem Durchlaufen des vorhanden Volumens nochmals vermessen. Aufgrund der Viskosität der Lösung und der langsamen Zurückführung der Probe findet im Vorratsbehälter nur eine geringfügige Durchmischung mit der dort vorhandenen Probe statt. Bei einer durchschnittlichen Bleichung der Probe infolge der Laseranregung von 10 % wirkt sich diese zweifache Vermessung eines Volumens nur geringfügig auf die Amplitude der Absorptionsänderungen aus und kann vor der Auswertung der Daten mittels eines Faktors berücksichtigt werden (siehe Punkt 4.2.4)

Alle Messungen der Rhodopsin-Proben werden bei einer Temperatur von 10 °C durchgeführt. Zur Anregung der Proben wird das Excimer-Farbstofflaser-System in die Flash-Photolyse Apparatur eingekoppelt. Bis auf eine Messung wird die Wellenlänge von 480 nm zur Initiierung der Photoreaktion verwendet (Farbstoff: Coumarin 102). Die Anregung von 9-Demethylretinal wird mit Licht der Wellenlänge 450 nm vorgenommen (Farbstoff: Coumarin 2). Bei den einzelnen Proben wurde ebenfalls die Energieabhängigkeit bestimmt. Nach einer Einzelmessung wird das Probenvolumen automatisch innerhalb von 3 s mittels der Peristaltikpumpe vollständig ausgetauscht. Zur Temperierung der Probe erfolgt die nächste Anregung erst nach einer Wartezeit von 8 s. Bei allen Messungen werden zuerst die langen und im Anschluß die kurzen Zeitfenster gemessen.

Das Auslesen und die Mittelung der Daten aus den zwei Oszilloskopen erfolgt im Gegensatz zu den Bacteriorhodopsin-Messungen mit einem PC und dem Programm *FP-Mess2*, die Verrechnung der Datensätze wird ebenfalls mittels eines PC´s und dem Programm *FP-conv* durchgeführt (A. Ockenfels, U. Robben bzw. A. Ockenfels, MPI für Strahlenchemie 1999. Programmierung mit der objektorientierten Oberfläche Testpoint, Fa. Capital Equipment Corporation, Vers. 3.3).

Bedingungen für die Messungen der Rhodopsin-Proben

Die angegebenen Verhältnisse A_{280}/A_{464} können nur als Anhaltspunkte verwendet werden, da sie durch die Absorptionen der anwesenden Oxime beeinflußt werden. Die angegebenen Absorptionen beziehen sich auf die durch Bleichung ermittelten Konzentrationen aktiven Chromoproteins .

Identische Parameter bei allen Messungen:

Zeitfenster (Anzahl der Mittlungen): 20 µs (10), 1 ms (10), 50 ms (5), 5 s (5)
Meßsequenz: Signal, Basis, Scatter
Anregung der Probe: alle 18 s

9-Demethylretinal-Rhodopsin

Anregungswellenlänge: 450 nm
11 Wellenlängen, 390 bis 570 nm
Energie ca. 1800 µJ/cm^2
Probenvolumen: 45 ml, Absorption 0.2, A_{280}/A_{464} 3.3

Natives Rhodopsin

Anregungswellenlänge: 480 nm
11 Wellenlängen, 390 bis 590 nm
Energie: ca. 1900 µJ/cm^2
Probenvolumen: 52 ml, Absorption 0.25, A_{280}/A_{500} 2.2

Rekonstituiertes Rhodopsin

Anregungswellenlänge: 480 nm
11 Wellenlängen, 390 bis 590 nm
Energie: ca. 1320 µJ/cm^2
Probenvolumen: 54 ml, Absorption 0.2, A_{280}/A_{500} 2.5

9-Ethylretinal - Rhodopsin

Anregungswellenlänge: 480 nm
11 Wellenlängen, 400 bis 590 nm
Energie: ca. 1400 µJ/cm^2
Probenvolumen: 29 ml, Absorption 0.2, A_{280}/A_{500} 4.9

13-Demethylretinal - Rhodopsin

Anregungswellenlänge: 480 nm
11 Wellenlängen, 390 bis 590 nm
Energie: ca. 1700 µJ/cm^2
Probenvolumen: 40 ml, Absorption 0.25, A_{280}/A_{500} 4.2

10-Methyl-13-demethylretinal - Rhodopsin

Anregungswellenlänge: 480 nm
11 Wellenlängen, 390 bis 590 nm
Energie: ca. 1300 µJ/cm^2
Probenvolumen: 28 ml, Absorption 0.2, A_{280}/A_{504} 4.3

10-Methylretinal - Rhodopsin

Anregungswellenlänge: 480 nm
11 Wellenlängen, 390 bis 610 nm
Energie: ca. 1700 µJ/cm^2
Probenvolumen: 28 ml, Absorption 0.2, A_{280}/A_{508} 5.3

4.2.3.5 Messung langsamer Kinetiken

Kinetiken, die aufgrund ihrer Dauer nicht mehr mit dem größten Zeitfenster der Flash-Photolyse zu erfassen sind, werden mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Die Aufzeichnung des Prozesses kann entweder analog zur Flash-Photolyse durch die Messung von Transienten bei jeweils einer Wellenlänge ($A_\lambda(t)$) oder durch die Aufnahme von Absorptionsspektren ($A_t(\lambda)$) erfolgen.

Die Anregung der Probe erfolgt bei beiden Vorgehensweisen mit einem Diaprojektor, wobei die notwendige Wellenlänge mit Interferenzfiltern eingestellt wird. Nach der Belichtung wird die Probe sofort in die Küvettenhalterung des Spektrometers gestellt und die automatische Messung gestartet (in der Regel spätestens 10 s nach dem Ende der Anregung). Die Aufzeichnung wird solange fortgeführt, bis keine Veränderung der Absorption bzw. der Absorptionsspektren mehr zu beobachten ist.

Bei Anwendung der ersten Methode ($A_\lambda(t)$) - der Aufnahme von Transienten bei verschiedenen Wellenlängen - muß sich die Probe vor jeder Messung in einem identischen Ausgangszustand befinden. Dazu wird sie entweder durch ein Aliquot einer Stammlösung ersetzt (Rhodopsin) oder entsprechend (zurück-) belichtet (Bacterio-rhodopsin). Zur Auswertung werden die Transienten nach Gl. 11 mit der Absorption des Grundzustands verrechnet (ohne Laserscatter und Werte eines Referenzarms) und anschließend mit dem Globalfit-Programm analysiert (s. Punkt 4.2.4).

Die bei der Verwendung der zweiten Methode ($A_t(\lambda)$) erhaltenen Absorptionsspektren werden analog zur Bestimmung der Dunkeladaption bei Bacteriorhodopsin ebenfalls mit Hilfe der Globalanalyse ausgewertet.

4.2.4 Auswertung der kinetischen Daten

4.2.4.1 Globalanalyse (Globalfit)

Die spektralen Eigenschaften der Chromophore und Chromoproteine ermöglichen die Verfolgung von Reaktionen dieser Verbindungen mit Hilfe von Absorptionsmessungen. Um aus den zeitaufgelösten Absorptionsänderungen (Transienten) die zugrundeliegenden Reaktionen eruieren zu können, müssen sie einer mathematischen Analyse unterworfen werden. Dabei wird nicht jeder Transient einer Wellenlänge einzeln betrachtet, sondern alle bei den verschiedenen Wellenlängen beobachteten Absorptionsverläufe werden simultan berücksichtigt; daraus resultiert auch der Name des Verfahrens: Globalanalyse oder Globalfit.

Es ist davon auszugehen, daß die Reaktionen nicht nur rein konsekutiv aufgebaut sind, sondern eventuell Rückreaktionen sowie Verzweigungen beinhalten. Für eine exakte Auswertung der Daten ist es notwendig, den Gleichungssatz anzuwenden, der dem Schema der Reaktion entspricht. Da dieses zu Beginn der Analyse aber nicht bekannt ist, bestünde eine Alternative darin, die Transienten mit den Gleichungssätzen verschiedenster Schemata zu analysieren, und somit den korrekten Gleichungssatz bzw. das zugrundeliegende Reaktionsschema zu erhalten. Dieses beinhaltet aber einen kaum zu bewältigenden Rechenaufwand, da sich insbesondere mit steigender Zahl von Intermediaten die Anzahl möglicher Reaktionsschritte und damit ebenfalls die Anzahl potentieller Reaktionsschemata erhöht. Aus diesem Grund wählt man zur Auswertung ein genähertes Verfahren: Es wird angenommen, daß die beobachteten Prozesse dem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung folgen und verwendet somit für die mathematische Analyse eine Summe von monoexponentiellen Funktionen (Gl. 12).

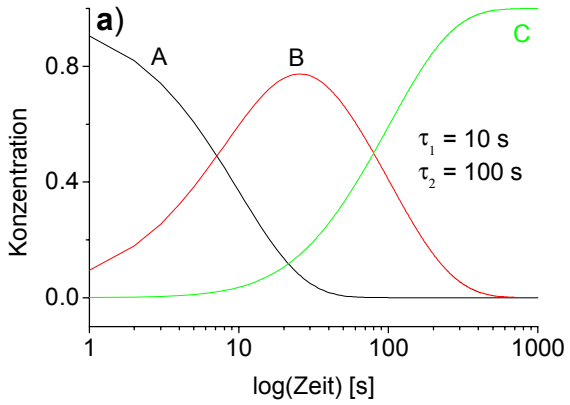
$$\Delta A(t,\lambda) = B(w,\lambda)\left[\sum_{i=1}^{N} A_i(\lambda)\cdot e^{-t/\tau_i} + A_0(\lambda)\right] \qquad \textbf{Gl. 12}$$

$\Delta A(t,\lambda)$ = zeitaufgelöst gemessene Absorptionsänderung bei der Wellenlänge λ
$A_i(\lambda)$ = Amplitude der Absorptionsänderung einer Lebenszeit bei der Wellenlänge λ
τ_i = Lebenszeit des Intermediats i
t = Zeit
$A_0(\lambda)$ = Konstante bei der Wellenlänge λ
$B(w,\lambda)$ = Skalierungsfaktor für jedes Zeitfenster w bei der Wellenlänge λ

Die Auswertung kann beispielsweise anhand der konsekutiven Reaktion einer photoaktiven Verbindung erläutert werden, die über zwei Schritte vom Ausgangszustand A über das Intermediat B zum Produkt C verläuft (Gl. 13).

$$A \xrightarrow{\tau_1} B \xrightarrow{\tau_2} C \qquad \textbf{Gl. 13}$$

Wird für den zweiten Schritt eine um den Faktor 10 langsamere Geschwindigkeit angenommen als für den ersten, so ergeben sich für die Reaktanten nach den Gleichungen konsekutiver Reaktionen die in Abb. 4-4a dargestellten Konzentrationsverläufe. Die Abb. 4-4b zeigt exemplarisch die Absorptionspektren der Verbindungen, die vergleichbar zu den spektralen Eigenschaften von Intermediaten in Reaktionen von Chromoproteinen deutlich überlagert sind. Anhand der Konzentrationsverläufe ist zu erkennen, daß trotz der deutlich unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Übergänge, zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion Anteile aller Intermediate vorzufinden sind. Durch die zusätzliche Überlappung der Absorptionsspektren enthalten die Transienten somit nicht nur die Absorptionsänderungen, die auf den Übergang zwischen zwei Reaktanten zurückzuführen sind, sondern stellen die Summe der Absorptionen von Intermediaten in verschiedenen Reaktionsschritten dar. Für die Beispielreaktion würden durch die Messung der Absorption die in Abb. 4-4c dargestellten Transienten erhalten.



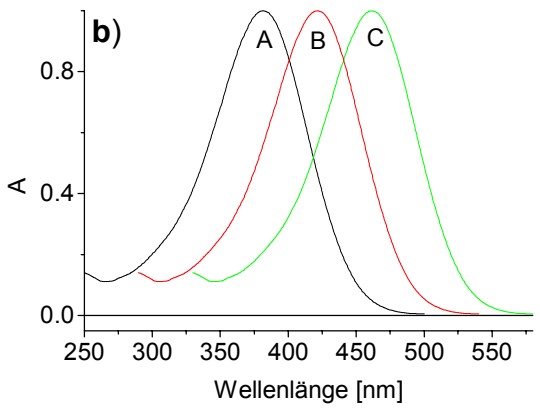
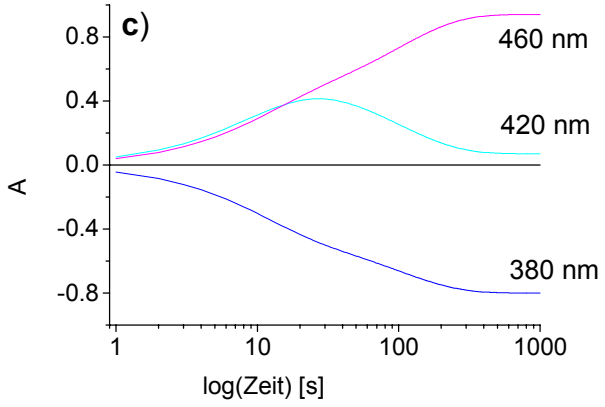


Abb. 4-4 Das Beispiel einer konsekutiven Reaktion:

a) Konzentrationsverlauf der einzelnen Reaktanten, berechnet nach den Gleichungen für konsekutive Reaktionen (Reaktion A nach B mit τ_1 und B nach C mit τ_2)

b) Absorptionsspektrum des Grundzustands A und die Spektren der Intermediate B und C

c) Transienten der Reaktion exemplarisch für drei Wellenlängen (jeweils Maxima der Intermediate).



Die Aufgabe der mathematischen Analyse besteht darin, diese Summe von Absorptionsänderungen in die Beiträge der einzelnen Reaktionen zu separieren. Dieses ist dadurch zu erreichen, indem an die Transienten möglichst genau eine Summe von monoexponentiellen Funktionen angepaßt wird.

Für die Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Absorptionen sind die Exponentialterme der Funktionen verantwortlich. Die "Krümmung" einer Exponentialfunktion wird durch die Größe des Werts τ (der Lebenszeit) bestimmt: Je größer τ, desto geringer ist die Krümmung bzw. umgekehrt, je kleiner τ, um so schneller konvergiert die Funktion gegen einen bestimmten Wert. Am Beispiel der Reaktion bedeutet dieses, je größer z. B. die Lebenszeit τ des Intermediats A, desto langsamer nimmt dessen Konzentration ab (und die des Intermediats B zu), und je kleiner die Lebenszeit τ, um so schneller ist die Zwischenstufe zerfallen (und B entstanden). Im Gegensatz zur Halbwertszeit kennzeichnet die Lebenszeit nicht den Zeitpunkt, an dem nur noch die Hälfte der anfänglichen Konzentration des Substrats vorhanden ist: Betrachtet man die Reaktion zum Zeitpunkt $\tau = t$, dann liegt von der ursprünglichen Konzentration des Substrats noch ca. 40 % vor (e^{-1} bzw. 1/e).

Das Substrat A geht mit der Lebenszeit τ_1 in das Intermediat B über. Somit ist zwei Reaktionsteilnehmern *eine* Zeit zugeordnet: Die Zerfallszeit des einen Intermediats muß auch immer gleichzeitig die Entstehungszeit des nachfolgenden sein. Gleiches gilt für den Zerfall von B in der Zeit τ_2 zum Produkt C. Für die Beschreibung eines Transienten der Beispielreaktion reicht damit insgesamt die Summe von zwei Exponentialfunktionen aus.

Der Wert eines Exponentialterms ($e^{-t/\tau}$) bewegt sich selbst aber nur innerhalb der Grenzen Eins und Null ($\tau \rightarrow 0$ bzw. $\tau \rightarrow \infty$). Zur Berücksichtigung der unterschiedlichen Beiträge der einzelnen Übergänge zur Gesamtabsorption ist deshalb der präexponentielle Faktor A (Amplitude) notwendig. Mit anderen Worten, er bestimmt den Wert eines Summanden in der Summe der monoexponentiellen Funktionen. Die Amplitude besitzt dann einen großen Wert, wenn mit dem Übergang zwischen zwei Intermediaten eine große Änderung in der Absorption verbunden ist. Dieses ist dann der Fall, wenn die Absorptionsspektren der aufeinanderfolgenden Intermediate deutlich verschieden sind und zusätzlich, wenn sich die Geschwindigkeiten der aufeinanderfolgenden Reaktionsschritte deutlich unterscheiden. Verläuft die Entstehung einer Zwischenstufe sehr langsam und der

Zerfall sehr schnell, so tritt nur eine geringe Absorptionsänderung auf und es resultiert nur eine kleine Amplitude.

Wie eingangs erwähnt, zeichnet sich die Globalanalyse durch die gleichzeitige Auswertung von Transienten mehrerer Wellenlängen aus. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsspektren der Zwischenstufen tragen die mit dem Übergang zwischen zwei Intermediaten verbundenen Absorptionsänderungen bei verschiedenen Wellenlängen einen unterschiedlichen Anteil zur Änderung der Gesamtabsorption bei. Damit werden in der Analyse von Transienten verschiedener Wellenlängen auch unterschiedliche Amplituden für eine Lebenszeit erhalten ($A_i(\lambda)$). Trägt man diese Amplituden gegen die entsprechenden Wellenlängen auf, dann erhält man das *lifetime-associated difference spectrum* (LADS). Dieses ist nicht mit dem Differenzspektrum zwischen zwei aufeinanderfolgenden Intermediaten zu verwechseln, da die Amplituden der LADS, wie oben beschrieben, durch die Lebenszeiten der Reaktionen beeinflußt werden.

Die Auswertung der Transienten der Beispielreaktion ergeben die in Abb. 4-5 dargestellten LAD-Spektren.

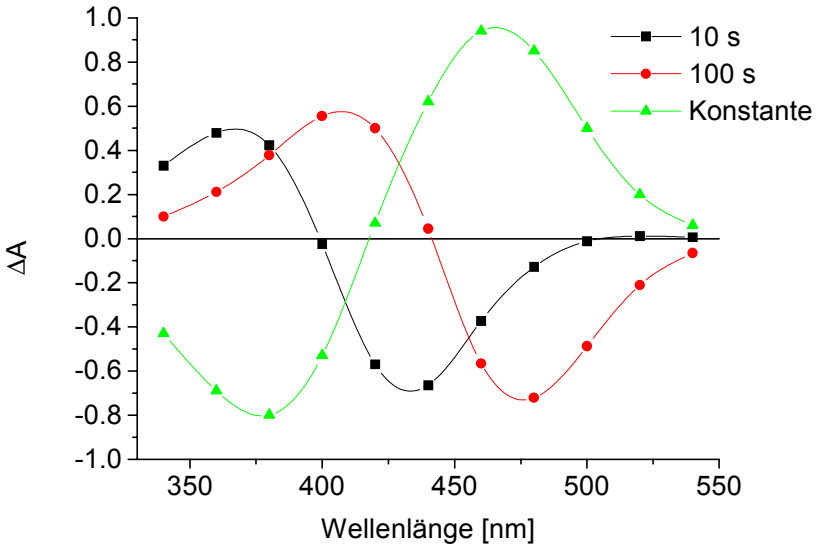


Abb. 4-5 *Lifetime associated difference spectra* aus einem Fit der in Abb. 4-4c dargestellten Absorptionsverläufe

Wie bereits erwähnt, muß die Zerfalls- mit einer Entstehungskomponente übereinstimmen. Diese beiden Schritte sind logischerweise durch gegensätzliche Amplituden gekennzeichnet. Bei den LAD-Spektren ist zu berücksichtigen, daß mit monoexponentiellen Zerfällen (negativer Exponent in der Gl. 12) gefittet wird. Somit bedeutet eine *positive* Amplitude die Beschreibung eines *Zerfalls* und eine *negative* Amplitude die einer *Entstehung*. Demnach zeigen sich die LADS in Abb. 4-5 in Übereinstimmung mit der

in Gl. 13 dargestellten Reaktion: Das LAD-Spektrum mit einer Lebenszeit von 10 s beschreibt den Zerfall eines Reaktanten mit einer hypsochromen Absorption und die Entstehung einer Zwischenstufe, dessen Absorptionsspektrum bathochromer liegt. Dieses entspricht dem Übergang des Ausgangszustands (A) in das Intermediat B. Den gleichen Verlauf zeigt das zweite LADS, das somit dem Schritt vom Intermediat B in das Endprodukt C zugeschrieben werden kann.

Die dritte Kurve in Abb. 4-5 zeigt die Konstante des Globalfits (A_0 in Gl. 12). Diese beinhaltet die Amplituden der Transienten für den Grenzwert $t \rightarrow \infty$ und stellt somit das Differenzspektrum zwischen dem Endprodukt der Reaktion und dem Ausgangszustand dar. Die Reaktion von Rhodopsin führt zu den Endprodukten Opsin und Retinal und somit zu deutlich verschiedenen Absorptionsspektren zwischen dem Ausgangs- und Endzustand: In der Auswertung wird eine große Konstante erhalten. Bei Bacteriorhodopsin ist der Endzustand des Photocyclus auch wieder erneut der Ausgangszustand. Deshalb kann keine Differenz zwischen der Absorption des Grundzustands und dem Endprodukt der Reaktion vorliegen und die Amplituden der Konstanten müssen eine Nullinie bilden. Vorausgesetzt ist aber, daß die Prozesse innerhalb der verwendeten Zeitfenster das Endprodukt aufweisen, andernfalls repräsentiert die Konstante ungefähr das Differenzspektrum zwischen dem letzten im Zeitfenster zu beobachtenden Intermediat und dem Ausgangszustand.

Ein Teil der Gl. 12 blieb bisher unerwähnt: Der Faktor $B(w,\lambda)$. Dieser wird gegebenenfalls benötigt, um die in verschiedenen Zeitfenstern gemessenen Transienten einer Wellenlänge in Übereinstimmung zu bringen, d. h., die letzten Werte des Absorptionsverlaufs eines Zeitfensters an die ersten Werte des nachfolgenden Zeitfensters anzupassen. Diese Korrektur ist aufgrund von experimentellen Gegebenheiten notwendig. Bei der Flash-Photolyse verursacht z. B. die Schwankung der Laserenergie (insbesondere beim Excimer-Farbstoff-Lasersystem) Unterschiede in den Absorptionsdifferenzen aufeinanderfolgender Zeitfenster einer Wellenlänge. Desweiteren führt die oben erwähnte zweifache Verwendung eines Probenvolumens bei Rhodopsin zur Messung von unterschiedlichen Mengen aktiven Chromoproteins, woraus ebenfalls geringe Unterschiede in der Größe der Transienten auftreten. Diese Differenzen werden unter Zuhilfenahme des Faktors $B(w,\lambda)$ korrigiert.

Es ist aber zu beachten, daß nur im Idealfall alle auftretenden Reaktionschritte über die Anpassung der Summe von Exponentialfunktionen separiert werden können, so daß jedes

LAD-Spektrum die Absorptionsdifferenz zwischen zwei Reaktionspartnern repräsentiert. Unter bestimmten Umständen bleiben Intermediate und Reaktionen in der Praxis aber unentdeckt. Die Absorptionsspektren der Chromoproteine und somit auch der Intermediate sind sehr breit. Zusätzlich liegt meist eine deutliche Überlappung der Absorptionen vor. Findet nun ein Übergang zwischen zwei Intermediaten statt, deren Spektren sehr ähnlich sind, so kann die Absorptionsabnahme durch den Zerfall des ersten Intermediats mit der Entstehung und Absorptionszunahme des zweiten Intermediats kompensiert werden. Die von außen zu beobachtende Summe der Absorption bleibt für diesen Fall konstant und der Übergang bleibt unberücksichtigt. Darüber hinaus ist ein Intermediat erschwert zu detektieren, wenn die Geschwindigkeit der Entstehung nur geringfügig schneller ist als die des Zerfalls. Als Resultat ist nur eine sehr geringe Absorptionsänderung zu beobachten. Ein weiteres Problem ergibt sich in der Gegenwart von Gleichgewichtsreaktionen, die bei den thermodynamisch kontrollierten Reaktionen eine erhebliche Rolle einnehmen. Gesetzt dem Falle die Gleichgewichtseinstellung zwischen zwei Intermediaten erfolgt schneller als die kürzeste Entstehungs- oder Zerfallszeit eines der Reaktionspartner, dann kann die zwischen den beiden Intermediaten stattfindende Reaktion nicht aufgelöst werden.

In den vorgenannten Fällen werden die einzelnen Schritte mittels des Globalfits gemeinsam erfaßt und die LAD-Spektren stellen dann Mischspektren der Reaktion von zwei oder mehr Intermediaten dar.

Die Auswertung der Daten wurde hier mit dem von Peter Schmidt (MPI für Strahlenchemie, 1997) geschriebenen Globalfit-Programm durchgeführt. Dieses basiert auf dem von *Müller* und *Plesser*[227] bzw. *Press et al.*[228] entwickelten Algorithmus. Das Kriterium für die Anpassung der monoexponentiellen Funktionen (Gl. 12) an die Transienten ist die Reduzierung der Summe der Fehlerquadrate (χ^2). Konnte durch das Hinzufügen einer weiteren Lebenszeit keine Verbesserung dieses Wertes von mehr als 2 % erreicht werden, dann wurde diese Lebenszeit nicht mehr als signifikant angesehen.

4.2.4.2 Absorptionsspektren der Intermediate

Die Berechnung der Differenzspektren der Intermediate aus den *lifetime-associated difference spectra* wurde mit dem Programm *LADS2* (U. Robben, MPI für Strahlenchemie, 1999), basierend auf der korrigierten Gleichung von *Chizov et al.*[205], vorgenommen (Gl. 14).

$$\Delta\varepsilon_i(\lambda) = \left(A_i(\lambda) - F_c \sum_{j=i+1}^{n} a_{ji} \Delta\varepsilon_j(\lambda) \right) \Big/ F_c a_{ii} \qquad \textbf{Gl. 14}$$

$\Delta\varepsilon_i(\lambda)$, $\Delta\varepsilon_j(\lambda)$ = Differenzspektrum von Intermediat i bzw. j zum Grundzustand
F_c = *fraction cycling;* Anteil der Moleküle, der nach der Anregung in das erste Reaktionsprodukt übergehen
A_i (λ) = Amplitude von Lebenszeit i bei der Wellenlänge λ (Dieser Wert entspricht A_i in Gl. 12)

$$a_{ji} = \prod_{m=1}^{i-1} k_m \Big/ \prod_{\substack{m=1 \\ m \neq j}}^{i} (k_m - k_j) \qquad k = \text{Geschwindigkeitskonstanten } (1/\tau)$$

Der Berechnung der Differenzspektren liegt die Annahme zugrunde, daß die beobachtete Abfolge von Reaktionen *unverzweigt* ist, *konsekutiven* Charakter hat und die einzelnen Schritte dem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung folgen. Dabei werden die Spektren in einer rekursiven Vorgehensweise, ausgehend vom letzten Intermediat, berechnet. Im Falle von irreversiblen Reaktionen (Konstante ungleich Null) müssen vor der Berechnung der Differenzspektren die Amplituden der Konstante zum LADS des letzten Intermediats addiert werden. Die Absorptionsspektren der Intermediate werden durch die Addition des Spektrums des Grundzustands zu den Differenzspektren der Intermediate erhalten.

In der Größe des *fraction cycling* (F_c) liegt eine weitere Unsicherheit bei dieser Methode. Dieser Wert wurde hier nicht empirisch ermittelt, sondern iterativ bestimmt. Nach unten ist die Größe von F_c trivialerweise dadurch begrenzt, daß die Absorptionsspektren keine negativen Absorptionen enthalten dürfen. Darüber hinaus bewirkt ein wachsendes F_c die stärkere Angleichung der Intermediatspektren in Größe und Form.

Aus den LAD-Spektren der Beispielreaktion in Abb. 4-5 ergeben sich die in Abb. 4-6 dargestellten Intermediatspektren. Zusätzlich sind die Absorptionsspektren der Reaktanten abgebildet, auf deren Basis die Transienten für dieses Beispiel berechnet wurden. Der Unterschied zwischen den jeweiligen Spektren zeigt das Ausmaß der Näherung durch die

Verwendung einer Summe von monoexponentiellen Funktionen für die Beschreibung der Reaktion anstelle der Gleichungssätze für eine konsekutive Reaktion.

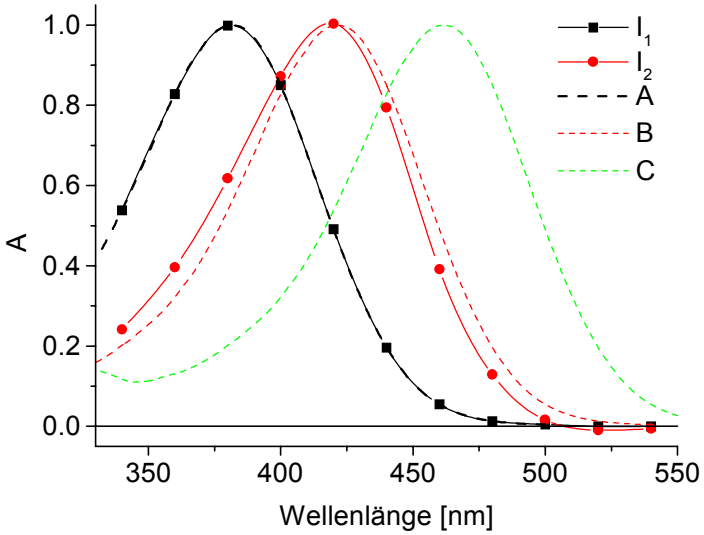


Abb. 4-6 Berechnete Intermediatspektren aus den in Abb. 4-5 dargestellten LADS (I_1 und I_2). Die gestrichelten Linien stellen die Spektren dar, aus denen zuerst die Absorptionsverläufe und dann die LADS berechnet wurden.