5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Synthese von fünf Retinalderivaten mit Modifikationen an der Position 9, 10 und 13, deren Charakterisierung als prosthetische Gruppen im bakteriellen Protein Bacteriorhodopsin und unter Einbeziehung eines weiteren an Position 13 modifizierten Derivats (13-Demethylretinal, **5**), im visuellen System Rhodopsin. Zusätzlich konnten zwei Isotopomere des Retinals dargestellt werden.

Die Synthese der Retinalderivate basierte auf der gemeinsamen Vorstufe β-Ionon. Zentraler Punkt für die an Position 9 und 10 modifizierten Verbindungen war die Einführung der gewünschten Substitution in die Ausgangsverbindung: Für 9-Demethylretinal (9-dm, **2**) gelang dieses in Anlehnung an den Syntheseweg von *van den Tempel et al.*[153]. Zur Darstellung der Verbindungen 9-Ethylretinal (9-Et, **3**) und 9-Isopropylretinal (9-Is, **4**) erbrachte die Einfach- und Doppelmethylierung der Methylgruppe des Ketons den gewünschten Erfolg. Für die Verbindungen 10-Methyl-13-demethylretinal (MD, **6**) und 10-Methylretinal (10-Me, **7**) konnte die 10-Methylgruppe in einer Eintopfreaktion mit Propionitril eingebracht werden. Die im weiteren jeweils notwendige Verlängerung der Polyenkette zur Zielverbindung konnte effizient durch die mehrfache Verwendung von Phosphonaten in Wittig-Horner-Reaktionen erfolgen. Im Rahmen der Kettenverlängerung war es für 10-Methyl-13-demethylretinal desweiteren möglich, die an Position 13 notwendige Modifikation einzuführen. Das Retinalderivat 13-Demethylretinal (13-dm, **5**) lag noch in ausreichender Menge vor und mußte somit nicht synthetisiert werden.

Die Darstellung der Isotopomere [14-^{13}C]- und [15-^{13}C]-Retinal gelang mit geringen Veränderungen nach dem von *Pardoen et al.*[171] vorgestellten Weg.

Die Auswirkungen des Substitutionsmusters auf die Eigenschaften der Retinalderivate in Lösung wurde durch die photochemische Isomerisierung der Verbindungen untersucht. Der Verlauf der Isomerenverhältnisse während der Belichtung in Ethanol wurde dabei mittels der analytischen HPLC verfolgt. In den photostationären Gleichgewichten zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit von den vorgenommenen Modifikationen. Mit wachsender Größe des Substituenten an Position 9 ist z. B. eine höhere Konzentration an 9Z-Isomer zu verzeichnen. Während bei 9-dm (**2**) nur ein geringer Prozentsatz vorliegt, ist bei 9-Et (**3**) gegenüber Retinal eine vergleichbare und bei 9-Is (**4**) die zweifache Konzentration des

Isomers zu detektieren. Das Fehlen der Methylgruppe bei 13-dm (**5**) läßt kein 13*Z*-Isomer entstehen. Gleiches gilt für die Verbindung MD (**6**), bei der zusätzlich wie bei 10-Me (**7**) eine relativ große Konzentration des 11*Z*-Isomers registriert werden kann.

Die im Rahmen der Belichtung entstandenen Hauptisomere wurden jeweils mit Hilfe der präparativen HLPC isoliert und mittels UV/Vis- und ^{1}H-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Zusätzlich wurden die Extinktionskoeffizienten der Isomere in alkoholischer Lösung bestimmt. Bei den Absorptionsspektren zeigte sich durch das veränderte Substitutionsmuster an der Position 9 nur ein geringfügiger Einfluß. Eingeschränkt kann eine Korrelation zwischen der Größe des Substituenten und der Lage der Absorptionsmaxima bei den verschiedenen Isomeren vorgenommen werden. Dieses gilt in gleicher Weise für die Extinktionskoeffizienten und die Verschiebungswerte der Signale in den ^{1}H-NMR-Spektren. Bei den an Position 10 und/oder 13 modifizierten Verbindungen ist insbesondere eine Abhängigkeit von der intramolekularen Wechselwirkung bei den 11*Z*-Isomeren festzustellen: Das Absorptionsmaximum von 13-dm (**5**) ist vergleichbar zu Retinal (**1**), wobei der Extinktionskoeffizient des Derivats geringfügig größer ist. Bei den Absorptionsspektren der entsprechenden Isomere von MD (**6**) und 10-Me (**7**) ist hingegen eine drastische hypsochrome Verschiebung der Maxima zu beobachten, und die Extinktionskoeffizienten sind deutlich niedriger als bei Retinal. Wie auch durch die ^{1}H-NMR-Spektren zu erkennen, ist dieses Verhalten auf eine stärkere Verdrillung der Polyenkette mit zunehmender sterischer Hinderung zurückzuführen.

Zur Charakterisierung der Retinalderivate als prosthetische Gruppen in Bacteriorhodopsin wurde das Apoprotein der retinaldefizienten Mutante JW5 des *Halobacterium salinarum* verwendet. Die so erhaltenen analogen Chromoproteine wurden hinsichtlich der Kinetiken des Einbaus und der Licht-/Dunkeladaption, der Isomerenverteilung in den verschiedenen adaptierten Zuständen, der Bestimmung des pK_a-Werts der Schiff-Base und des Asp85 sowie hinsichtlich der Photocyclen untersucht. Als Referenz wurde mit Retinal assembliertes Bacteriorhodopsin (Ret-JW5) sowie das Protein des Wildtyps S9 (WT) in die Messungen eingebunden. Dabei konnten neben der bereits bekannten Differenz in den pK_a-Werten weitere Unterschiede in den Eigenschaften dieser beiden Systeme festgestellt werden: So befindet sich das Absorptionsmaximum des dunkeladaptierten Ret-JW5 bei kürzeren Wellenlängen und der Extinktionskoeffizient ist geringfügig kleiner, während die lichtadaptierten Zustände der beiden Pigmente vergleichbar sind. Zur Beschreibung der Dunkelreaktion sind beim WT nur eine

Lebenszeit, beim Ret-JW5 hingegen zwei notwendig. Beim assemblierten System ist mit der Extraktion des Chromophors ein größerer Anteil des 13*Z*-Isomers in der Bindungstasche nachzuweisen. Die Ergebnisse der Flash-Photolyse lassen darauf schließen, daß die Reprotonierung der Schiff-Base beim Übergang vom M- zum N-Intermediat im Falle des assemblierten Proteins verzögert stattfindet. Als wesentliche Ursache ist neben Unterschieden in der Konformation der Proteine die Differenz in den pK_a-Werte anzusehen.

Es konnte gezeigt werden, daß die an Position 9 modifizierten Retinalderivate zu einer systematischen Beeinflussung der Eigenschaften des jeweiligen Bacteriorhodopsin führen. Die Erniedrigung des sterischen Anspruchs (9-dm, **2**) führt zu einer deutlichen Verzögerung der Einbaugeschwindigkeit, eine Erhöhung (9-Et, **3**) behindert die Assemblierung in einem noch größeren Ausmaß. Erstaunlich ist die Inkorporation von 9-Is (**4**), die gegenüber Retinal langsamer, aber schneller als bei den beiden anderen homologen Verbindungen verläuft. Allerdings besitzt das entsprechende Pigment ein deutlich hypsochromes Absorptionsmaximum, so daß eine veränderte Positionierung des Chromophors in der Bindungstasche des Proteins angenommen werden kann. Bei den Kinetiken der Licht-/Dunkeladaption ist eine direkte Korrelation zur Substituentengröße zu finden: Bei 9-Demethylretinal-Bacteriorhodopsin (9-dm-JW5) verläuft die Reaktion wesentlich langsamer als bei Ret-JW5. Demgegenüber ist sie im Fall von 9-Ethylretinal-Bacteriorhodopsin (9-Et-JW5) schneller und bei 9-Isopropylretinal-Bacteriorhodopsin (9-Is-JW5) ist die Reaktion nochmals beschleunigt. Das Verhalten von 9-Is-JW5 ist aber auch bei dieser Untersuchung insofern nicht zu vergleichen, da mit der Extraktion neben den bei den anderen Pigmenten vorhandenen 13*Z*- und all-*E*-Konfigurationen, zwei weitere isomere Formen des Chromophors (9*Z*,13*Z* und 9*Z*) nachgewiesen wurden. Damit ist auch der Extinktionskoeffizient von 9-Is-JW5 zu begründen, der unter den analogen Proteinen den kleinsten Wert besitzt. Bei den anderen Pigmenten nimmt der Extinktionskoeffizient in der Reihenfolge von Ret-JW5 über 9-dm-JW5 zu 9-Et-JW5 ab. Eine identische Abfolge ergibt sich durch die Modifikationen bei den pK_a-Werten der Schiff-Base und der Aminosäure Asp85.

Die Bedeutung der Wechselwirkung zwischen der Position 9 des Chromophors und dem Protein für den Photocyclus zeigt sich deutlich anhand der Ergebnisse der Flash-Photolyse: 9-dm-JW5 beeinflußt den Ablauf des Photocyclus drastisch, es treten zu Ret-JW5 analoge Intermediate in Erscheinung, allerdings bestehen deutliche Unterschiede im

Absorptionsverhalten der Zustände zum Ende der Photoreaktion. Vergleichbar sind desweiteren die Geschwindigkeiten der ersten Schritte des Photocyclus, die Übergänge in den nachfolgenden Reaktionen sind aber drastisch verzögert. Im Gegensatz dazu führt 9-Et-JW5 zu einer signifikanten Beschleunigung in der ersten Hälfte des Photocyclus und zu einer deutlichen Verlangsamung der Reaktionen in der zweiten. Die Amplituden der LADS sind vergleichbar zu Ret-JW5, Unterschiede zeigen sich aber z. B. beim M-Intermediat und beim Übergang zum N-Zustand. Zusätzlich kann ein deutlicher Anteil des O-Zustands detektiert werden. Eine weitere Erhöhung der Wechselwirkungen (9-Is-JW5) verhindert den Ablauf eines normalen Photocyclus, bei dem eine Zuordnung zu den Intermediaten des nativen Systems nicht mehr vorgenommen werden kann. Das Absorptionsverhalten der Intermediate läßt auf eine Reduzierung des Prozeß dahingehend schließen, daß nur noch Isomerisierungs-/Reisomerisierungs-Reaktionen, eventuell unter Mitwirkung verschiedener isomeren Formen des Chromophors, erfolgen.

Eine geringe Toleranz der Bindungstasche des Proteins zeigen die Ergebnisse aus der Untersuchung der an Position 10 modifizierten Verbindungen. Die im Vergleich zu Retinal zusätzliche Methylgruppe verursacht bei 10-Me (**7**) bereits eine signifikante Verzögerung der Einbaureaktion. Zusätzlich wird die Bedeutung der 13-Methylgruppe für die Anbindung des Chromophors im Fall von MD (**6**) deutlich, dessen Inkorporation noch wesentlich langsamer verläuft. Bei beiden Pigmenten ist mit der Extraktion neben dem 13*Z*- und all-*E*-Isomer auch die 9*Z*-Konfiguration in der Bindungstasche nachzuweisen. Diese Geometrie ist bei 10-Methyl-13-demethylretinal-Bacteriorhodopsin (MD-JW5) zusammen mit dem 13*Z*-Isomer für ein ungewöhnliches Hell/Dunkel-Verhalten verantwortlich: Die Belichtung des vollständig assemblierten Pigments führt zu einer drastischen hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums, und eine Rückkehr in den Ausgangszustand findet nur teilweise und außerordentlich langsam statt. Die Rückreaktion kann aber photochemisch erzwungen werden, so daß mit dem vollständig assemblierten und lichtadaptierten Zustand zwei Zustände vorliegen, die reversibel ineinander überführt werden können. Im Gegensatz dazu ist bei 10-Methylretinal-Bacteriorhodopsin (10-Me-JW5) durch Belichtung nur eine geringe Veränderung des spektralen Verhaltens zu beobachten und die Dunkelreaktion verläuft ungewöhnlich schnell. Die Adaption beruht analog zum nativen System auf der Verschiebung des Verhältnisses zwischen dem 13*Z*- und dem all-*E*-Isomer, allerdings unter Beteiligung der 9*Z*-Konfiguration. Der Extinktionskoeffizient der Systeme ist gegenüber Bacteriorhodopsin deutlich kleiner, während der pK_a-Wert der Schiff-Base nicht signifikant und der pK_a-Wert des Asp85 nur

bei MD-JW5 geringfügig kleiner ist. Aufgrund der unterschiedlichen adaptierten Formen des MD-JW5 wurde sowohl der vollständig assemblierte als auch der lichtadaptierte Zustand in der Flash-Photolyse untersucht. Die jeweiligen LAD-Spektren der beiden Zustände sind völlig verschieden, so daß auch eine teilweise Zuordnung von Kinetiken untereinander nicht vorgenommen werden konnte. In gleicher Weise ist ein Vergleich zu den Reaktionen des nativen Systems nicht möglich. Ausgangspunkt beim Photocyclus des vollständig assemblierten Systems ist vermutlich das 13*Z*-Isomer und im Falle des lichtadaptierten Zustands entweder das 9*Z*- oder das all-*E*-Isomer. Bei 10-Me (**7**) verhindern die sterischen Restriktionen der Bindungstasche den Ablauf eines vollständigen Photocyclus, und es ist ebenfalls kein Vergleich mit den photoinduzierten Reaktionen des Ret-JW5 möglich. Vermutlich stellen die Photoreaktionen des analogen Pigments wie im Falle von 9-Is-JW5 reine Isomerisierungen ohne Beteiligung der Proteinkomponente dar.

Die Untersuchungen der Retinalderivate hinsichtlich ihrer Funktion als prosthetische Gruppen in Rhodopsin umfaßte die Bestimmung der Einbaukinetik, die spektroskopische Charakterisierung einschließlich der Quantenausbeute und die Messung der Photoprozesse. Für die Rekonstitution der Derivate wurden Suspensionen des Apoproteins in Ringer-Lösung (pH 7.0) verwendet, während die weiteren Untersuchungen unter Verwendung des Detergens Dodecylmaltosid durchgeführt wurden.

In gleicher Weise wie beim bakteriellen Protein wurde neben dem rekonstituierten Pigment das native, ungebleichte System mit in die Messungen einbezogen. Dabei konnte bezüglich der spektralen Eigenschaften und der Quantenausbeuten kein Unterschied festgestellt werden. Die Ergebnisse der Flash-Photolyse sind mit Ausnahme einer Lebenszeit nahezu identisch. Diese Kinetik beschreibt den Übergang vom Lumi- zum Meta-I-Intermediat und dauert im nativen doppelt so lange wie beim rekonstituierten System (Ret-Rho). Inwieweit diese Differenz einen signifikanten Hinweis auf strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Pigmenten gibt, konnte aufgrund eines relativ schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Im Gegensatz zur Assemblierung von Bacterioopsin führt das gegenüber Retinal veränderte Substitutionsmuster der Derivate bei der Rekonstitution von Opsin nicht zu einer signifikanten Beeinflussung des Reaktionsschemas der Einbaureaktion. Die sterischen Restriktionen der Bindungstasche des Rhodopsins zeigen sich jedoch deutlich im Fall von 9-Isopropylretinal, dessen Rekonstitutionsrate nur ca. 3 % beträgt. Diese geringe Ausbeute hatte zur Folge, daß das analoge Pigment nicht weiter detailliert

untersucht werden konnte. Bei der Inkorporation der übrigen 11*Z* konfigurierten Verbindungen (**2**, **3**, **5-7**) sind drei Reaktionsschritte zu beobachten. Die Lebenszeiten der Übergänge können bedingt mit dem Raumbedarf des jeweiligen Derivats und der Flexibilität in der Bindungstasche korreliert werden. So verläuft die Inkorporation von 9-dm (**2**) und 13-dm (**5**) im ersten Schritt, welcher der Positionierung des Moleküls in die Bindungstasche zur Ausbildung der kovalenten Bindung zugeordnet werden kann, schneller als bei Retinal. Die folgenden Prozesse, Ausbildung der Schiff-Base und Konformationsänderungen von Chromophor und Protein, sind hingegen langsamer. Insgesamt benötigt die Inkorporation von Retinal im Vergleich zu den Derivaten die geringste Zeit. Anhand des Opsin-shifts ist zu erkennen, daß die sterischen Modifikationen bei den Retinalderivaten - einschließlich 9-Isopropylretinal - nicht zu einer deutlich veränderten Wechselwirkung zwischen den Aminosäuren der Bindungstasche und den prosthetischen Gruppen führen. Eine Ausnahme stellt 9-dm-Rho dar, dessen Opsin-shift nur halb so groß ist wie bei Rhodopsin. Wesentlich inhomogener erscheinen die Extinktionskoeffizienten der analogen Pigmente, die im Vergleich zu Rhodopsin alle geringer sind: Bei 9-dm-, 9-Et- und 13-dm-Rho beträgt die Differenz ungefähr ein Fünftel und bei MD-Rho nur wenige Prozent. Im Fall von 10-Me-Rho ist der Wert um nahezu die Hälfte kleiner und gibt somit einen Hinweis auf die Verdrillung des Chromophors infolge der intramolekularen Wechselwirkungen.

Für den photochemischen Isomerisierungsprozeß ist die Größe des Substituenten an der Position 9 des Polyenkette unbedeutend. Dieses zeigen die Quantenausbeuten der artifiziellen Verbindungen 9-dm-Rho und 9-Et-Rho, die innerhalb der Meßtoleranz identisch zum Wert des nativen Systems sind. Im Gegensatz dazu ist mit Einschränkungen eine Korrelation zwischen der intramolekularen Wechselwirkung der Positionen 10 und 13 bei den Pigmenten und der Quantenausbeute vorzunehmen: Bei 13-dm-Rho ist die Quantenausbeute durch eine verringerte Wechselwirkung gegenüber Rhodopsin von 0.67 auf 0.62 erniedrigt. Die 10-Methylgruppe beeinflußt bei MD-Rho durch die Wechselwirkung mit Aminosäuren der Bindungstasche die Isomerisierungsreaktion, so daß nicht der identische Wert wie bei Rhodopsin erhalten wird, sondern die Quantenausbeute auf 0.52 verringert ist. Nimmt man die Hinderung auch für 10-Me-Rho an, dann müßte die Isomerisierungsreaktion mit einer noch höheren Effektivität als 0.71 verlaufen.

Die Bedeutung der 9-Methylgruppe des Retinals für das visuelle System zeigt sich deutlich anhand der Ergebnisse der Flash-Photolyse: Das Fehlen der Gruppe bei 9-dm-Rho verzögert den Übergang vom Lumi- zum Meta-I-Intermediat und es entsteht eine Gleichgewicht von Meta-Zuständen mit sehr langsamen Reaktionsgeschwindigkeiten. Die Erhöhung der Substituentengröße bei 9-Et-Rho verursacht hingegen eine deutliche Beschleunigung der Zerfallsreaktion des Lumi-Intermediats. Während beim nativen System nach etwas weniger als einer Millisekunde ein erster Hinweis auf das Meta-II-Intermediat detektiert werden kann, ist dieses bei 9-Et-Rho bereits nach einem Zehntel der Zeit der Fall. Der Zerfall des Meta-II-Intermediats verläuft aber mit einer dem nativen System vergleichbaren Zeitkonstanten.

Für die an Position 10 und/oder 13 modifizierten Verbindungen ist nicht in gleicher Weise ein einfacher Zusammenhang zwischen dem Substitutionsmuster und der Beeinflussung des Photoprozesses zu erkennen. Eine Gemeinsamkeit besteht bei den drei Pigmenten 13-dm-, MD- und 10-Me-Rho in der großen Dauer des Gesamtprozesses, insbesondere durch langsame Geschwindigkeiten bei den thermodynamisch kontrollierten Übergängen zum Ende der Photoreaktion. Bei 13-dm-Rho ist eine hohe Konzentration des BSI-Intermediats im Gleichgewicht mit dem Batho-Zustand zu detektieren, und der Übergang vom Lumi- zum Meta-I-Intermediat erscheint verzögert. Die gegenüber 13-dm-Rho zusätzliche Methylgruppe bei MD-Rho läßt den Ablauf eines regulären Photoprozesses nicht mehr zu. Bei 10-Me-Rho ist eine zum nativen System vergleichbare Abfolge von Intermediaten zu beobachten, wobei allerdings eine veränderte Reaktion zwischen dem Lumi- und Meta-I-Intermediat zu registrieren ist. Als Ursache für dieses inhomogene Verhalten der Pigmente kann folgendes angenommen werden: Bei 13-dm-Rho besteht aufgrund der fehlenden Methylgruppe eine erhöhte Flexibilität des Chromophors in der Bindungstasche. Für MD-Rho ist eine vergleichbare Beweglichkeit des Moleküls anzunehmen, wobei zusätzlich eine Wechselwirkung zwischen der 10-Methylgruppe und der Bindungstasche zu einer Beeinflussung der Eigenschaften führt. Im Fall von 10-Methylretinal ist die Flexibilität wiederum eingeschränkt und es kommt nur die zusätzliche Interaktion mit der Bindungstasche zu tragen.