

REKONSTITUTION DES CHROMOPHORS UND
DER FUNKTION DES BAKTERIORHODOPSIN
IN HALOBACTERIUM HALOBUM

Diplomarbeit
Volker Christoffel
Würzburg 1976

Rekonstitution
des Chromophors und der Funktion von Bakteriorhodopsin
in Halobacterium halobium

Diplomarbeit
zur Diplom- & Hauptprüfung für Chemiker
von
Volker Christoffel

Würzburg 1976

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung und Aufgabenstellung	
	I. Klassifizierung, Wachstum und Zellwand- bestandteile von Halobakterien	3
	II. Purpurmembran und Bakteriorhodopsin	4
	III. Photochemischer Zyklus des Bakterio- rhodopsins	5
	IV. Physiologische Funktion des Lichtzyklus	6
	V. Chemie des Chromophors	8
	VI. Aufgabenstellung	12
B.	Material und Methoden	
	I. Chemikalien	13
	II. Geräte	13
	III. Retinalsynthesen	
	a) 5,6-Epoxy-Retinal	
	1. Epoxidierung	16
	2. Hydrolyse des 5,6-Epoxy - Vitamin A-Acetat	18
	3. Oxidation des 5,6-Epoxy-Retinol	19
	b) 3,4-Dehydro-Retinal	22
	c) 4-Hydroxy-Retinal	
	1. Darstellung von Retinal- Enolacetat	26
	2. Oxidation zum 4-OH-Retinal	27

IV. Bakterien	
a) Verwendeter Stamm und Zuchtbedingungen	30
b) ATP - Bestimmung	31
c) pH - Messungen an Zellsuspensionen	32
V. Rekonstitution	
a) Darstellung der Apomembran	33
b) Lösungen der Retinale	34
c) Rekonstitution	35
C. Ergebnisse	
I. Stöchiometrie der Rekonstitution	36
II. Rekonstitution des Chromophors	
a) Axerophthen	38
b) Retinsäure	39
c) 13-Desmethyl-14-Methyl-Retinal	39
d) β -Apo-8'-Carotinal	39
e) β -Apo-12'-Carotinal	39
f) 5,6-Epoxy-Retinal	40
g) 5,8-Epoxy-Retinal	44
h) 4-Hydroxy-Retinal	46
i) 3,4-Dehydro-Retinal	49
III. Rekonstitution der Funktion	
a) Protonenpumpe	52
b) ATP - Synthese	57
D. Diskussion	
I. Stöchiometrie	59
II. Rekonstitution des Chromophors	59
III. Rekonstitution der Funktion	62
Literatur	65

A. Einleitung und Aufgabenstellung

I. Klassifizierung, Wachstum und Zellwandbestandteile von Halobakterien

Die Familie der Halobacteriaceae gehört zu den gram-negativen Stäbchen und Kokken und umfaßt die beiden Gattungen Halobakterien und Halokokken. Die Gattung der Halobakterien wird von den zwei Arten Hal. salinarium (syn. cutirubrum) und Hal. halobium gebildet(1).

Halobakterien wachsen in 3 molaren NaCl-Lösungen, die noch kleinere Mengen K^+ und Mg^{2+} enthalten müssen.

Sie sind strikt aerobe, chemoorganotrophe Organismen, die auf Aminosäuren als C-Quelle wachsen. Ihre Gestalt ist stäbchenförmig. Bei einem Durchmesser von 0,5 μm schwankt ihre Länge zwischen 3 und 10 μm .

Sie besitzen keinen Mureinsacculus und auch Diaminopimelinsäure und Muraminsäure kommen nicht als Zellwandbestandteile vor. Ihr Zellwall wird hauptsächlich von Protein gebildet.

Auffällig sind ihre Lipide: Statt aus Fettsäuren sind ihre Seitenketten aus Dihydrophythol aufgebaut, das in einer Ätherbindung mit dem Glycerin verknüpft ist(2).

II. Purpurmembran und Bakteriorhodopsin

Läßt man die Spezies *Hal. halobium* unter geringem Sauerstoffpartialdruck und in Gegenwart von Licht wachsen, so synthetisieren die Zellen inselartige Strukturen in der Membran, die wegen ihrer violetten Färbung als Purpurmembran bezeichnet werden. Bringt man die Zellen in destilliertes Wasser, so setzt sofort eine Dissoziation in die Membranbestandteile ein. Durch anschließende Dichtegradientenzentrifugation lassen sich die einzelnen Bestandteile leicht auftrennen(3).

Die Hauptfraktion wird von der Purpurmembran gebildet, die einen Proteinanteil von 75% des Trockengewichtes besitzt(4).

Das darin allein vorkommende Chromoprotein ist in einem hexagonalen Gitter in der Membranebene angeordnet(5).

Das bei 560 nm ($\epsilon_{\text{mol}} = 63\ 000$) absorbierende Protein hat ein Molekulargewicht von 25 000 D.

Als Pigment konnte 1971 Retinal identifiziert werden. In Analogie zum Sehpurpur der Vertebraten wurde für das Protein der Name Bakteriorhodopsin vorgeschlagen(4,6).

III. Photochemischer Zyklus des Bakteriorhodopsins

Durch Reaktion mit Licht wird im Bakteriorhodopsin eine zyklische Abfolge von spektralen und konformationellen Änderungen induziert.

Die 560 nm - Form des Bakteriorhodopsin geht nach Durchlaufen mehrerer kurzlebiger Zwischenprodukte in eine bei 412 nm absorbierende Form über. Bei diesem Prozeß wird ein Proton abgegeben.

In einer Dunkelreaktion wird innerhalb von Millisekunden spontan die 560 nm-Form zurückgebildet. Dabei wird wieder ein Proton aufgenommen (7,8) (Abb. 1). Dieser Zyklus läuft unter physiologischen Bedingungen in der Zelle etwa 200 mal in einer Sekunde ab.

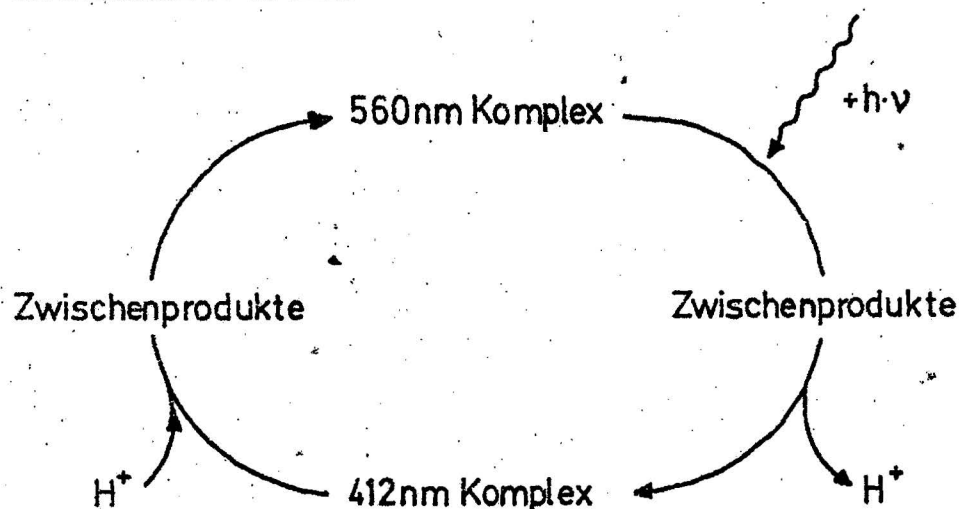


Abb. 1: Lichtzyklus des Bakteriorhodopsins

Da die Hinreaktion nahezu temperaturunabhängig ist, die Rückreaktion aber eine Aktivierungsenergie von 11,4 kcal/Mol erfordert, kann man durch Temperaturerniedrigung das 412 nm Zwischenprodukt anreichern. In ähnlicher Weise verlangsamt Diäthyläther in 3M NaCl-Lösung bei 0°C die Rückreaktion (9).

IV. Physiologische Bedeutung des Lichtzyklus

Die Funktion des Lichtzyklus für die Zelle wird verständlich durch die Beteiligung von Protonen. Der asymmetrische Einbau des Bakteriorhodopsins in die Zellmembran (5) bedingt eine Asymmetrie der Protonenabgabe und -aufnahme. Die Abgabe bei der Lichtreaktion erfolgt ins Medium hinein, die Protonenaufnahme vom Cytoplasma her.

Beim Durchlaufen des photochemischen Zyklus werden ständig Protonen von innen nach außen transportiert, und somit ein Protonengradient über die Membran hinweg aufgebaut. Die Summe aus dem chemischen Potential des Konzentrationsunterschiedes und dem elektrostatischen Potential bezeichnet man als elektro-chemisches Potential:

$$\Delta G = - RT \ln \left[\frac{[H^+]_{\text{außen}}}{[H^+]_{\text{innen}}} \right] - nF \Delta \psi$$

ΔG ist die Änderung der freien Energie für die Hydrolyse von ATP unter zellulären Bedingungen

$\Delta \psi$ bezeichnet die elektrische Potentialdifferenz
n ist die Anzahl der Ladungen

F Faraday-Konstante

Nach Mitchell's chemiosmotischem Modell der ATP - Synthese ist ein elektro - chemischer Gradient verantwortlich für die ATP - Bildung. Der Konzentrationsausgleich erfolgt über eine ATPase in der Zellmembran unter Synthese von ATP: Die Energie des Gradienten wird in die Energieform einer chemischen Bindung überführt (10, 11).

Anaerobe Zellsuspensionen stellen im Dunkeln einen konstanten pH-Wert ein, der beim Belichten absinkt. Hemmt man die H^+ -ATPase, so erhält man größere pH-Änderungen, da die Protonen nur noch passiv in die Zelle zurückdiffundieren. (Abb 2)

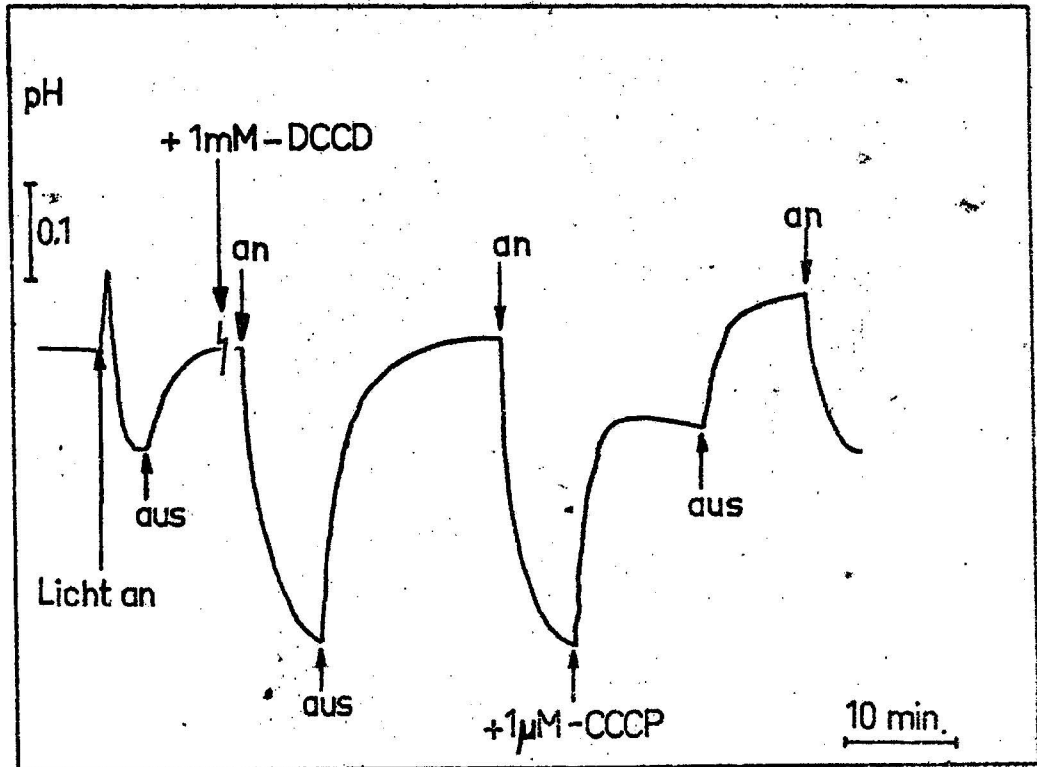


Abb. 2: pH-Spur einer anaeroben Zellsuspension vor und nach Einwirkung von ATPase Hemmern (DCCD) und Entkoppler (CCCP) (12).

Beim Belichten findet man einen Anstieg der ATP-Konzentration.

Halobakterien können demnach ihr ATP über die Atmungskette oder alternativ durch Photophosphorylierung bilden. Die Konkurrenz von Atmungskette und Photophosphorylierung konnte experimentell bestätigt werden. Bestrahlte Zellen verbrauchten 30% weniger Sauerstoff. Aus Quantenabsorption und O_2 -Verbrauch errechnet sich eine Quantenausbeute von 0,3 - 0,5 für das Bakteriorhodopsinsystem in der Zelle (13).

V. Chemie des Chromophors

Alle bekannten Retinal - Protein-Komplexe haben die kovalente Bindung des Retinals an die ϵ -Aminogruppe eines Lysins gemeinsam. Im Gegensatz zum Rhodopsin bleibt beim Bakteriorhodopsin während des Lichtzyklus das Retinal ständig am Protein gebunden. Die Bindungsstelle ist im Dunkelzustand für Reagenzien wie NH_2OH und NaBH_4 nicht zugänglich. Diese molekulare Anordnung des Chromophors kennzeichnet man durch den Ausdruck Purpurkomplex.

Erst nach Zutritt von Licht oder nach Entfalten des Proteins durch ein Detergens geht diese besondere Struktur verloren. Das Retinyliden-Lysin kann jetzt angegriffen werden und liefert mit NH_2OH Retinaloxim oder Retinyl-Lysin nach Reduktion mit NaBH_4 .

Ebenso zerstören organische Lösungsmittel diese spezifische Umgebung des Chromophors irreversibel. Ausnahmen bilden Diäthyläther, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Bei 30 bis 60 % DMSO in Wasser besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Purpurkomplex und einem reaktiveren 460 nm - Komplex. Der Einfluß von Ionen und pH, sowie die thermodynamischen Parameter des Gleichgewichts konnten bestimmt werden. (7).

Mit der Absorptionsverschiebung ist offenbar auch eine konformationelle Änderung erfolgt, denn der 460 nm - Komplex reagiert mit NH_2OH und NaBH_4 !

Bedingt durch die Wechselwirkungen mit dem Protein sind nicht alle Retinalisomere zur Rekonstitution des Chromophors befähigt: Rhodopsin läßt sich nur mit 9-cis und 11-cis Retinal regenerieren, Bakteriorhodopsin rekonstituiert nur mit 13-cis und all-trans-Retinal (14).

Auch die starke Rotverschiebung des Chromophors gegenüber dem freien Retinal wird durch die spezifische Wechselwirkungen zwischen Retinal und Protein verursacht. Spektroskopische Befunde geben Hinweise auf charge-transfer-Übergänge zwischen protonierter Schiff'scher Base als Akzeptor und Tryptophanresten als Elektronendonatoren (15).

Neben der Verschiebung des Absorptionsmaximums fällt die veränderte Gestalt der Absorptionsbanden der am Lichtzyklus beteiligten Produkte auf.

Die Absorptionsbande des freien Retinals besitzt eine Schulter, die bei tiefen Temperaturen auch im Purpurkomplex auftritt.

Dagegen ist die Gestalt des 412 nm-Komplexes dreigipfelig. Ebenso erhält man bei der Reduktion des Chromophors mit NaBH_4 ein dreigipfeliges Produkt. Dabei ist nicht geklärt, ob der 412 nm-Komplex selber oder ein anderes Zwischenprodukt des Lichtzyklus reagiert. (16).

Das Auftreten des dreigipfeligen 412 nm-Komplexes legt die Vermutung nahe, daß durch die Reaktion mit Licht der Purpurkomplex in eine Retro-Form übergeht.

Bei den Retro-Retinalverbindungen, ihre Absorptions-
bande besitzt die gleiche dreigipfelige Gestalt,
ist das Doppelbindungssystem um ein C-Atom in den
Cyclohexenring hinein verschoben. Retro-Retinal
stellt also das Enol-Tautomere des Retinals dar.
Es läßt sich als Ester isolieren. (17).



Retinal

Retro-Retinal

Eine photochemisch bewirkte Umwandlung von Retinal
in Retro-Retinal im Bakteriorhodopsin böte ein an-
schauliches Modell für die direkte Beteiligung des
Chromophors an einer Protonenpumpe.

Bei jedem Übergang Retinal \rightleftharpoons Retro-Retinal
(im Protein als Retinyliden-Protein \rightleftharpoons Retro-
Retinyl-Protein) muß in der 4-Stellung des Cyclo-
hexenringes ein Proton abgegeben, beziehungsweise
aufgenommen werden. Soll mit der Protonenbewegung
ein Transport verknüpft sein, dann muß die Abgabe
und Aufnahme von H^+ in einer gezielten Richtung
erfolgen. Durch das umgebende Protein könnte ein-
derartiger vektorieller Prozeß erzwungen werden.

Die 4-Stellung des Cyclohexenringes könnte in
Sandwich - Art zwischen zwei Carboxylgruppen
mit unterschiedlichen pK_s -Werten liegen. Die
Abgabe des Protons müßte dann immer an die stär-
ker saure und deshalb als Anion vorliegende Gruppe
erfolgen. Diese gibt das Proton an das Außenmedium
ab.

Die Rückbildung der Retinal-Form geschieht dann unter Protonenaufnahme von der schwächer sauren, immer protoniert vorliegenden Carboxylgruppe (Abb.3).

An jede photochemisch induzierte Tautomerisierung des Chromophors wäre somit der Transport eines Protons gekoppelt.

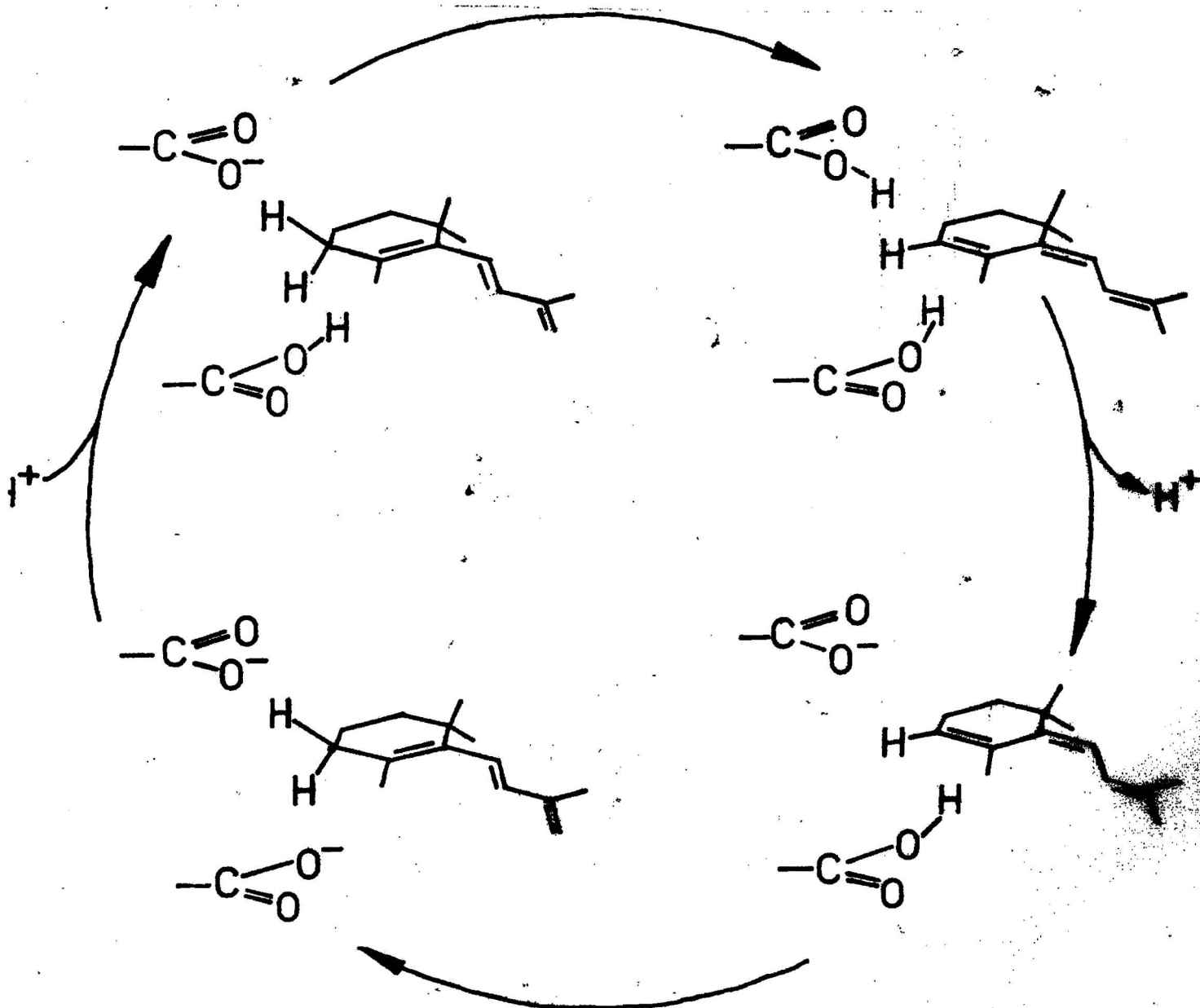


Abb. 3: Modell einer Protonenpumpe; Der Transport erfolgt durch gerichtete Abgabe und Aufnahme der H^+ bei einer Kete-Enol-Tautomerisierung.

VI. Aufgabenstellung

Die Rückbildung des Purpurchromophors aus Bakterio-opsin und Retinal ist spezifisch hinsichtlich der geometrischen Isomerie des eingesetzten Retinals.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Spezifität der Rekonstitution zu untersuchen, wenn man Veränderungen an der Struktur des Retinals vornimmt.

Die interessierenden Retinalanaloga waren teilweise zu synthetisieren.

Mit den modifizierten Retinalen sollte das vorangehend geschilderte Modell einer Protonenpumpe überprüft werden.

Dazu wurden Versuche an der isolierten Membran und an ganzen Zellen durchgeführt.

B. Material und Methoden

I. Chemikalien

Glühwürmchenleuchtorgane und 13-cis Retinal waren von Sigma.

Die Salze für das Kulturmedium waren p.A. Chemikalien von Merck; ebenso Nicotin und N-Äthyl-Morpholin.

Von der Firma Difco stammte das Oxoid Pepton L 37.

Die Firma BASF, Ludwigshafen, stellte dankenswerterweise all-trans Retinal, 13-Desmethyl-14-Methyl-Retinal, Axerophthen, β -Apo-8'-Carotinal, β -Apo-12'-Carotinal und Vitamin A-Acetat zur Verfügung.

Die übrigen Chemikalien und Lösungsmittel waren p.A. oder reinst von der Chemikalienausgabe.

II. Geräte

Die Absorptionsspektren wurden mit einem Aminco DW 2, Hitachi 124 oder einem Beckmann DB-G Spektralphotometer aufgenommen.

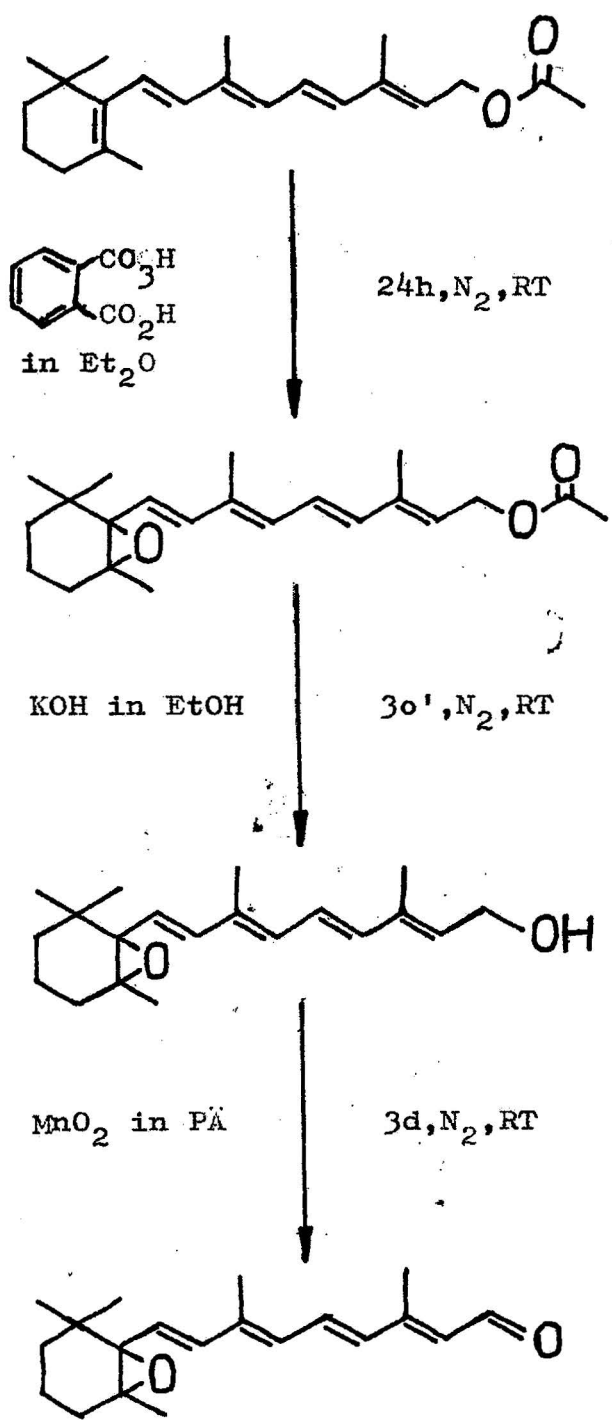
Für die Messung von Differenzspektren standen Tandemküvetten mit 0,475 cm jeweiliger Kammertiefe (Hellma 230 OS) zur Verfügung.

Die Aufzeichnung der Infrarot-Spektren erfolgte mit einem Perkin-Elmer 337 Grating IR- Spektrophotometer.

Frau U. Neumann und Herrn N. Pelz danke ich für die massenspektroskopischen Untersuchungen. Die Massenspektren wurden mit einem Varian CH 7 Massenspektrometer aufgenommen.

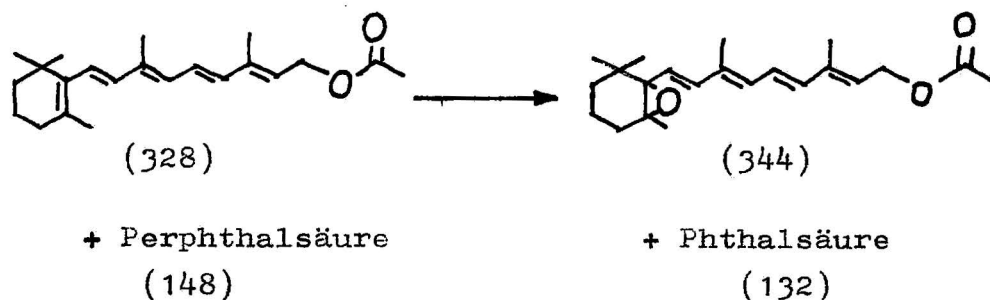
Bakteriensuspensionen wurden mit einem Eppendorf Photometer 1101 M bei 578 nm gemessen.

III. a) Synthese von 5,6-Epoxy-Retinal



1. Epoxydierung von Vitamin A - Acetat (18)

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

1,70 g Vitamin A-Acetat ($\approx 5,1$ Mol)
12,2 ml einer 0,42 n Perphthalsäurelösung in Äther
($\approx 5,1$ Mol) (19)

Durchführung:

Die Umsetzung erfolgt in einer Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur. Wegen der Lichtempfindlichkeit der Substanzen wird das Reaktionsgefäß abgedunkelt. 1,70 g Vitamin A-Acetat werden in 70 ml Äther gelöst und 12,2 ml einer 0,42 normalen ätherischen Perphthalsäurelösung zugegeben. Die Lösung wird magnetisch gerührt.

Um das Fortschreiten der Reaktion zu verfolgen, werden mit einer Spritze Proben entnommen und die UV - Absorption gemessen. Das Produkt hat sein Hauptmaximum bei 310 nm.

Wenn die Absorption bei 310 nm nicht mehr zunimmt (nach ca. 24 Stunden), wird die Reaktion durch Eingießen einer verdünnten NaHCO_3 - Lösung beendet.

Die Ätherphase wird mit Wasser bis zur Neutralreaktion gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration und Einengen wird das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

Reinigung:

stationäre Phase: Al_2O_3 , neutral (Woelm),
mit 5% Wasser desaktiviert

mobile Phase: Petroläther (PÄ) 40 - 60
mit steigendem Gehalt Äther

Fraktion	Eluens	CARR-PRICE	λ_{max}	Verbindung
1.	PÄ	hellblau	389,367,350	?
2.	PÄ	dunkelblau	325	Vitamin A-Acetat
3.	5%Et ₂ O	rosa- gelb	325,310	5,6 - Epoxy - Vitamin A-Acetat
4.	10%Et ₂ O	rosa- gelb	280	5,8 - Epoxy - Vitamin A-Acetat

Die Trennung leidet darunter, daß das Rohprodukt in Petroläther nur wenig löslich ist und nur kleine Substanzmengen aufgetragen werden können. Dies läßt sich verbessern, wenn man Benzol als Laufmittel benützt und die Trennung in zwei Schritten vornimmt.

stationäre Phase: Al_2O_3 neutral mit 5% H_2O desaktiviert
mobile Phase: Benzol

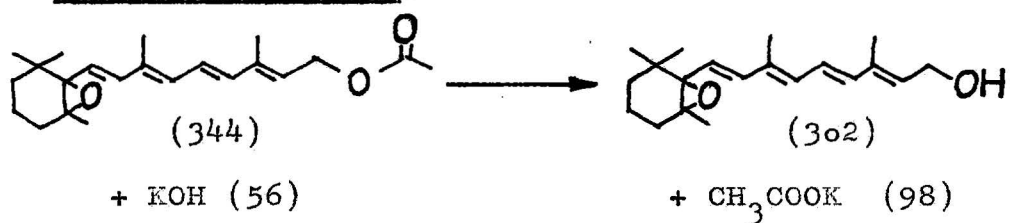
1. Fraktion: Vitamin - A - Acetat
2. Fraktion: 5,6 - Epoxyvitamin - A - Acetat

Die 5,6 - Epoxy - Vitamin - A - Acetat enthaltende Fraktion wird eingeengt und wie oben mit PÄ/Et₂O - Gemischen aufgetrennt.

Ausbeute: 275 mg $\hat{=}$ 15,5% der Theorie

2. Hydrolyse von 5,6-Epoxy-Vitamin A-Acetat (18)

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

240 mg 5,6-Epoxy-Vitamin A-Acetat ($\hat{=}$ 704 μ Mol)
5,7 ml 0,125 n methanolische KOH ($\hat{=}$ 704 μ Mol)

Durchführung:

Das 5,6-Epoxy-Vitamin A-Acetat wird in ca. 30 ml Äthanol und 5,7 ml methanolischer KOH in einer Stickstoffatmosphäre gelöst. Man rührt 30 min bei Raumtemperatur. Nach Ätherextraktion wird alkalifrei gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingeeengt.

Die Maxima im Absorptionsspektrum sind 325nm und 310 nm in PÄ.

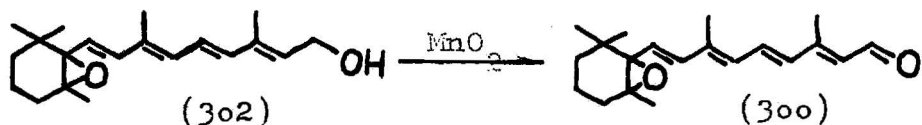
Der Carr-Price-Test ergibt eine Rosafärbung, die rasch gelb wird.

Zur Kontrolle wurde ein Dünnschichtchromatogramm von Verseifungsprodukt und Edukt aufgenommen.

R_f -Wert : Acetat = 0,24 in PÄ/ Et_2O = 4/1
Alkohol = 0,08 an Al_2O_3

3. Oxydation des 5,6-Epoxy-Vitamin A-Alkohols (20,21)

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

40 mg 5,6-Epoxy-Vitamin A-Alkohol ($\hat{=}$ 133 μMol)
130 mg MnO_2 , aktiv gefällt ($\hat{=}$ 1,5 mMol)

Durchführung:

Zu der Lösung des Alkohols in 40 ml Petroläther gibt man 130 mg aktiviertes MnO_2 hinzu und rührt unter Stickstoff bei Raumtemperatur. Den Reaktionsfortgang kontrolliert man durch Messung der Absorption bei 350 nm.

Nach 3 - 5 Tagen ist die Reaktion vollständig abgelaufen; man filtriert ab und engt zur Reinigung ein.

Reinigung:

Zur Reinigung chromatographiert man an Al_2O_3 , neutral, mit 5 % Wasser desaktiviert. Als Eluens dient ein 9:1 PÄ:Et₂O - Gemisch.

R_f -Wert : 5,6-Epoxy-Retinal = 0,15

Die Absorptionsmaxima des erhaltenen 5,6-Epoxy-Retinals sind:

in Petroläther	352 nm
in Äthanol	365 nm

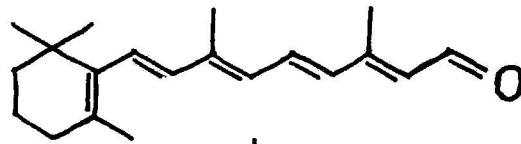
Der Carr-Price-Test ergibt eine grün-blaue Farbe, die nach gelb umschlägt.

Im Massenspektrum erkennt man folgende Fragmente:

m/e 300	=	M ⁺
m/e 285	=	M ⁺ - ·CH ₃
m/e 271	=	M ⁺ - ·CHO
m/e 257	=	M ⁺ - ·CH ₃ , - CO

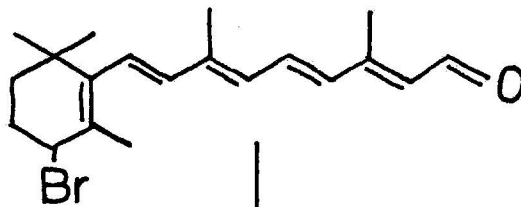
Es treten die bei Retinalen üblichen Abspaltungen auf: Verlust von Methyl- und Aldehydgruppe, sowie Decarbonylierung(22)

b) Synthese von 3,4-Dehydro-Retinal



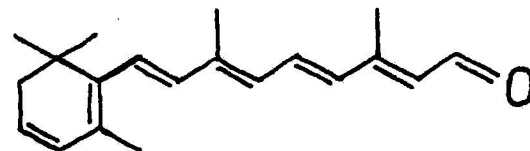
NBS

$\text{CHCl}_3, 0^\circ\text{C}$



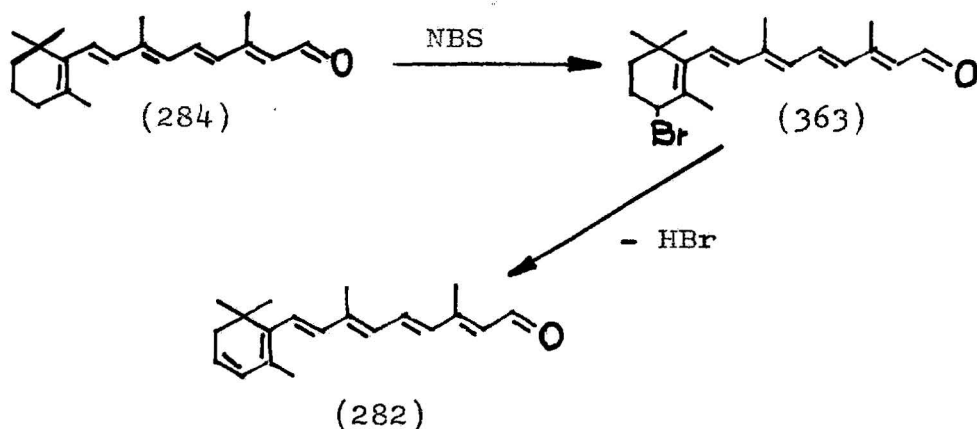
N-Äthyl -
Morpholin

$\text{CHCl}_3, \text{Rückfluß}$



Darstellung von 3,4-Dehydro-Retinal (23,24)

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

830 mg Retinal $\hat{=}$ 2,9 mMol
595 mg NBS $\hat{=}$ 3,3 mMol
840 μ l $\hat{=}$ 760 mg = 6,6 mMol N-Äthylmorpholin, dest.

Durchführung:

Die Allylbromierung von Retinal mit NBS und die anschließende Dehydrobromierung werden im Eintopf-Verfahren durchgeführt.

Das sehr fein verriebene NBS wird in 20 ml CHCl_3 , das Retinal in 10 ml CHCl_3 gelöst. Beide Lösungen werden in einem Eisbad gekühlt, bevor die Retinal-lösung zu der NBS-Lösung gegeben wird. Beim Erwärmen auf Raumtemperatur färbt sich die Reaktionslösung sehr rasch dunkelbraun, dann fast schwarz. Unter schnellem Rühren werden 850 μ l N-Äthylmorpholin bei Raumtemperatur zupipettiert. Nach ca. 5 min kocht man 20 min lang unter Rückfluß. Nach dem

Abkühlen wird die Reaktionsmischung auf kalte, verdünnte HCl gegossen und 5 min geschüttelt. Man gibt Petroläther 40 - 60 zu, bis die organische Phase die Epiphase bildet. Die organische Phase wird bis zur Neutralreaktion gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet.

Reinigung:

Man chromatographiert an Al_2O_3 , neutral, mit 5% Wasser desaktiviert.

Laufmittel: Petroläther 40 - 60 und Et_2O steigend bis 5 %

Die breite orangefarbene Hauptbande wird rechromatographiert und mit einem Fraktionssammler aufgefangen.

R_f -Werte : 0,14 Benzol an SiO_2
0,37 Benzol an Al_2O_3
0,28 Petroläther: Et_2O = 9:1 an Al_2O_3

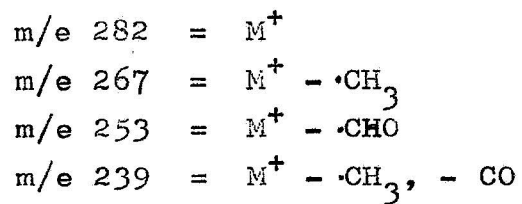
Die Absorptionsmaxima der Substanz sind

in Äthanol : 401 nm, 315 nm (Schulter)
in Petroläther 40-60: 386 nm
in Chloroform: 407 nm

Das Reaktionsprodukt mit SbCl_3 in Chloroform absorbiert bei 732 nm. In Äthanol läßt sich der Aldehyd mit NaBH_4 zum Vitamin A2 mit den Maxima 352nm, 284nm, 276 nm reduzieren.

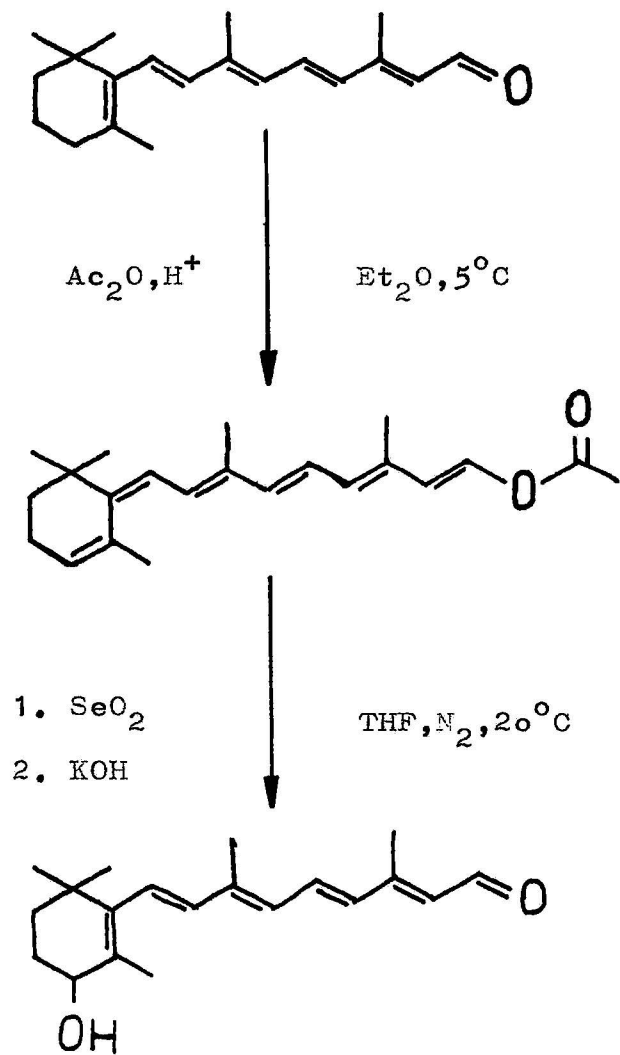
Sämtliche Maxima stimmen mit den Literaturwerten überein(25).

Im Massenspektrum sind neben dem Molpeak $m/e = 282$ folgende Bruchstücke zu erkennen:



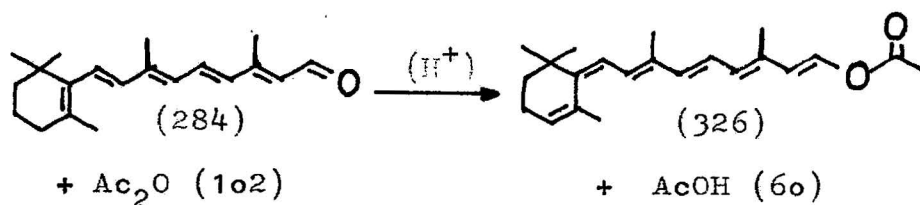
Gegenüber Retinal um 2 Massenzahlen verringert erscheinen die Peaks $m/e = 211, 197, 171$. (22)

c) Synthese von 4-OH-Retinal



1. Darstellung von Retinal-Enolacetat (26)

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

2,0 g Retinal (\approx 7,0 mMol)
10 ml Acetanhydrid (\approx 92 mMol)
4 Tropfen HBr (47 %)

Durchführung:

2,0 g Retinal werden in Äther gelöst und auf 0° C gekühlt. Man mischt 10 ml Acetanhydrid mit 10 ml Äther, kühlt auf 0° C, gibt 4 Tropfen HBr dazu und fügt die gesamte Mischung zu der Retinallösung. Dabei tritt sofort eine Braunfärbung auf. Das Reaktionsgemisch wird drei Tage lang unter Stickstoff und Lichtausschluß bei 5° C aufbewahrt. Man wäscht zweimal mit kaltem Wasser, zweimal mit 0,5 n KOH, zweimal mit Wasser.

Getrocknet wird über Na₂SO₄

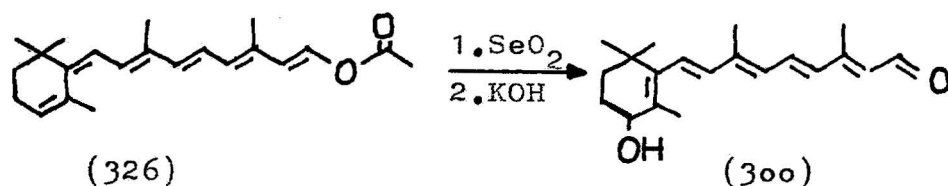
λ_{max} = 355, 373, 394 in Äthanol

Ausbeute:

1,32 g \approx 56 % der Theorie

2. Oxidation von Retinal-Enolacetat mit SeO_2 (26)

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

200 mg Retinal-Enolacetat ($\hat{=}$ 0,6 mmol)

400 mg SeO_2 , pulverisiert ($\hat{=}$ 3,6 mmol)

Durchführung:

200 mg Retinal-Enolacetat werden in 1,5 ml Tetrahydrofuran gelöst, das fein pulverisierte SeO_2 hinzugefügt und die Mischung 18 Std. bei Raumtemperatur in einer Stickstoffatmosphäre gerührt.

Zur Aufarbeitung versetzt man den Reaktionsansatz mit 50 ml Äther und 20 ml 2n KOH. Die wässrige Phase wird mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherphasen werden mit Wasser bis zur Neutralreaktion gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet.

Nach Filtration und Einengen wird das Produkt ($\lambda_{\text{max}} = 375 \text{ nm}$ in Äthanol) säulenchromatographisch gereinigt.

Reinigung:

Zur Abtrennung des ätherlöslichen roten Selens wird zunächst über eine kurze Säule chromatographiert. Man löst das rot gefärbte Rohprodukt in der eben notwendigen Menge Äther, setzt es auf die Säule auf und fügt etwa die gleiche Menge Petroläther 40 - 60 hinzu. Man eluiert mit PÄ : Et₂O = 1 : 1 steigend bis 1 : 3 und sammelt sämtliche Fraktionen. Auf der Säule bleibt das Selen zurück.

Nach dem Einengen wird in PÄ : Et₂O = 1 : 1 aufgenommen und nach der ersten Fraktion mit steigendem Äthergehalt eluiert.

Fraktion	% Äther	Fluoreszenz	Carr-Price-Test
1	50	hellblau	violett
2	60	orange	dunkelblau
3	60	hellgelb	dunkelblau
4	60	gelb	rot
5	70	orange	blaugrau
6	80	orange	blaugrau

Zur weiteren Reinigung wird die fünfte Fraktion nochmals an mit 6 % Wasser desaktiviertem Al₂O₃ chromatographiert. Während der ganzen Elution wird das Verhältnis PÄ : Et₂O = 1 : 1 konstant gehalten. Die Elutionsgeschwindigkeit ist sehr klein, man erhält jedoch unverwischte Banden. Das so gewonnene Produkt erweist sich bei der Dünnschichtchromatographie als einheitlich.

R_F-Werte:

4-OH-Retinal : 0,14 mit PÄ:Et₂O = 1:1 an Al₂O₃
 0,35 mit PÄ:Et₂O = 1:2 an Al₂O₃
 0,46 mit PÄ:Et₂O:EtOH = 48:48:4 an Al₂O₃
4-OH-Retinaloxim : 0,30 mit PÄ:Et₂O:EtOH = 48:48:4 an Al₂O₃

Das Absorptionsmaximum in Äthanol liegt bei 375 nm.
Durch Reduktion mit NaBH₄ erhält man den bei 323 nm
und 310 nm absorbierenden Alkohol.

Der Carr-Price-Test ergibt eine blaugraue Farbe.

Das IR-Spektrum der Substanz wurde in Tetrachlorkohlenstoff aufgenommen.

3620 cm ⁻¹	Valenzschwingung des freien O - H
3545 cm ⁻¹	Valenzschwingung des assoziierten O - H
2770 cm ⁻¹	C - H Valenzschwingung der H -C=O Gruppe

Massenspektrum:

m/e 300 = M ⁺
m/e 282 = M ⁺ - H ₂ O
m/e 267 = M ⁺ - H ₂ O, - •CH ₃
m/e 253 = M ⁺ - H ₂ O, - •CHO
m/e 239 = M ⁺ - H ₂ O, - CO, - •CH ₃

Im Massenspektrum tritt offenbar als erste Reaktion eine Dehydratisierung zum 3,4-Dehydroretinal ein, denn die weiteren Bruchstücke sind nahezu identisch mit denen des 3,4-Dehydroretinals. Höhere Intensitäten haben nur die Peaks m/e = 205 und m/e = 203. (22)

IV. Bakterien

a. Verwendeter Stamm und Zuchtbedingungen

Die Versuche wurden mit dem Stamm Halobacterium halobium NRL R₁M₁ durchgeführt. Dieser unterscheidet sich von dem Wildstamm durch das Fehlen von Gasvakuolen und C₅₀-Carotinoiden (27,28).

Die Zucht der Bakterien erfolgte in einem (New Brunswick Scientific) Inkubationsschüttler bei 105 U/min und 40 °C. Die Kultur wurde kontinuierlich mit 4 Neonleuchtröhren von je 4 Watt Leistung beleuchtet.

Das Medium enthielt

250,0 g NaCl
20,0 g MgSO ₄ · 7 H ₂ O
2,0 g KCl
10,0 g Difco Oxoid-Pepton L 37

je Liter und war auf pH 7,0 eingestellt. Zu 700 ml sterilem Kulturmedium in einem 2 l Erlenmeyerkolben wurden 112 µl Nicotin zugegeben. (±1 mM Nicotin)

Als Inoculum wurden 35 ml purpurmembranfreie Bakterienzellen ("Nicotin-Zellen") eingesetzt.

Die Bakterien wurden nach 90 bis 96 Stunden geerntet.

Die optische Dichte bei 578 nm betrug dann im Durchschnitt 1,0.

Nach Zentrifugation , 10 min x 10 000 g, wurden die Zellen in Basalsalz resuspendiert, das 1 mM an Nicotin war. Bis zur Verwendung wurden die Bakterien im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die Versuche wurden die Zellsuspensionen auf eine optische Dichte von 5,5 - 6,0 und einen pH-Wert von 7,0 eingestellt.

b. ATP-Bestimmung

Bei Untersuchungen der Photophosphorylierung wurden 10 ml Zellsuspension in einem auf 37 °C thermostatisierten Rührgefäß magnetisch gerührt. Während der Messung wurde die Suspension mit Stickstoff gespült. Nach den Messungen wurde Luft durch die Suspension gepumpt und die ATP-Werte bei Atmungskettenphosphorylierung bestimmt. Als Lichtquelle bei der Bestrahlung diente ein 150 W Rollei-Diaprojektor, dessen Abstand zum Rührgefäß 10 cm betrug.

(100 % Licht \approx 60 mW/cm², OG 515)

Zur Probenentnahme wurden mit einer Spritze 0,1 ml der Suspension entnommen und in 0,5 ml eiskalten 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,5 eingespritzt. Dabei erfolgt sofortige Lyse der Zellen. Die erhaltene ATP-Lösung ist bei Eiskühlung mindestens 48 Stunden stabil (29).

Der Gehalt an ATP wurde mittels Luciferin - Luciferase Test ermittelt (30).

In einem Biolumineszenzmeßgerät (SKAN AG, Typ 2 000) wurden 0,5 ml der oben beschriebenen Probelösung mit 0,1 ml Luciferase in 0,4 ml Citratpuffer gemischt. Die auftretende Lumineszenz ist im physiologischen Bereich der ATP-Konzentration direkt proportional. Der in einem PEV durch die Lumineszenz ausgelöste Strom wird mit einem Servogorschreiber aufgezeichnet. Dabei ist die Fläche unter der Kurve der ATP-Konzentration proportional.

c. pH-Messungen an Zellsuspensionen

Um Puffereffekte durch Nicotin auszuschalten, wurden die Zellen in nicotinfreiem Basalsalz resuspendiert. Während der Messung wurde die Suspension wieder mit Stickstoff gespült.

Die Messungen wurden mit einer Glaselektrode durchgeführt, deren Lichtunabhängigkeit in einem Versuch an chromophorfreen Zellen kontrolliert wurde.

Der gesamte Meßbereich wurde mit 0,1 n HCl und 0,1 NaOH geeicht.

Bei Verwendung von Phloretin als ATPase - Hemmer wurden die Zellen 15 min nach Zugabe des Hemmstoffes rekonstituiert. und die lichtinduzierten pH-Änderungen untersucht.

Im Fall von DCCD (Dicyclohexyl-carbodiimid) wurde erst rekonstituiert, dann der Hemmstoff zugegeben und anschließend 2,5 Stunden bei 37°C inkubiert.

V. Rekonstitution

a. Darstellung der Apomembran

Das Bleichen der Purpurmembran mit Licht geeigneter Wellenlänge in Gegenwart von Hydroxylamin wurde wie in (14,31) beschrieben ausgeführt.

Um das überschüssige Hydroxylamin auszuwaschen, wurde die Apomembran zweimal 30 min lang bei 18 000 g zentrifugiert. Mit einem Homogenisator wurde dabei jeweils in 0.05 Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0 resuspendiert.

Die Gehaltsbestimmung wurde auf zwei Arten durchgeführt:

1. Proteinbestimmung nach Folin - Lowry

Zu 1 ml Probelösung gibt man 5 ml Reagenzlösung (2% Na_2CO_3 in 0,1 n NaOH und 0,5 % CuSO_4 in 1% NaK-Tartrat im Verhältnis 50 : 1 gemischt) und, nach 10 min 0,5 ml Folin-Ciocalteu's Reagenz ($\text{NaWO}_4 + \text{NaNbO}_4$ in $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{HCl}$). Man durchmischt rasch und mißt nach 30 min die Extinktion bei 750 nm. Die Eichung erfolgt mit Rinder-Serumalbumin im Bereich von 0,01 bis 0,2 mg/ml. Bei den höheren Konzentrationen ist die Eichkurve schon nicht mehr linear.

2. Optische Konzentrationsbestimmung

Nach 20 min wurde die Extinktionsänderung bei 560 nm nach Zugabe eines Überschusses all-trans Retinal zu einer Apomembransuspension gemessen.

b. Lösungen der Retinale

Für die Retinallösungen wurden iso-Propanol und Äthanol als Lösungsmittel gewählt. Wegen der geringen Löslichkeit in diesen Solventien wurde für Axerophthen und die Carotinale Aceton als Solvens benutzt.

Die Konzentration der Lösungen wurde über den molaren Extinktionskoeffizienten und die Extinktion bestimmt.

$$c = E / \epsilon_{\text{mol}} d \qquad \epsilon_{\text{mol}} = E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ MG} / 10$$

Verbindung	λ_{max} (nm) (Äthanol)	ϵ_{mol}	MG
Axerophthen	325		270,43
3,4-Dehydro-Retinal	401	42 200	282,42
all-trans Retinal	384	43 500	284,42
13-cis Retinal	377	35 500	284,42
13-Desmethyl- 14-Methyl-Retinal	382	35 000	284,42
5,6-Epoxy-Retinal	365	45 300	300,42
5,8-Epoxy-Retinal	331	43 800	300,42
4-OH-Retinal	375	33 000	300,42
Retinsäure	350	45 500	300,42
β -Apo-12'-Carotinal	418	-	360,65 (32)
β -Apo-8'-Carotinal	461	110 000	416,65 (32)

c. Rekonstitution

1. Rekonstitution der Membran

Sämtliche Rekonstitutionen der Membran wurden in 0,05 molarem Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0 durchgeführt.

Zu der im Spektrometer auf 25°C thermostatisierten Apomembranlösung wurde die errechnete Menge des betreffenden Retinals mit einer Mikroliter-Spritze zugegeben. Durch Rühren mit einem Plastikstäbchen wurde für eine homogene Durchmischung gesorgt.

2. Rekonstitution ganzer Zellen

Zu der magnetisch gerührten Zellsuspension wurden 8 bis 10 µl des Retinals (4×10^{-3} molar) gegeben. Im Anschluß an die Versuche wurde das Absorptionsspektrum der Suspension gemessen.

Als Referenz diente eine Küvette mit nicht rekonstituierten Zellen.

C. Ergebnisse

I. Stöchiometrie der Rekonstitution

Um das stöchiometrische Verhältnis von Bakterio-opsin zu Retinal in der Purpurmembran zu überprüfen, wurde Apomembran mit 13-cis und all-trans-Retinal titriert.

Dabei wurde die Konzentration an Apomembran konstant gehalten und die zugegebene Menge an Retinal bekannter Konzentration variiert. Nach 10 min wurde die Absorption bei 560 nm gemessen.

Die Konzentration der Apomembran wurde durch Proteinbestimmung nach Lowry und durch Rekonstitution mit Retinalüberschuß bestimmt.

a) all-trans - Retinal

Die Konzentration der vorgegebenen Apomembran war in jeder Probe $1 \cdot 10^{-6}$ molar. Die entsprechende Extinktion von 0.063 OD_{560} wurde mit einem Äquivalent Retinal erreicht und blieb auch bei überschüssigem Retinal unverändert (Abb. 4).

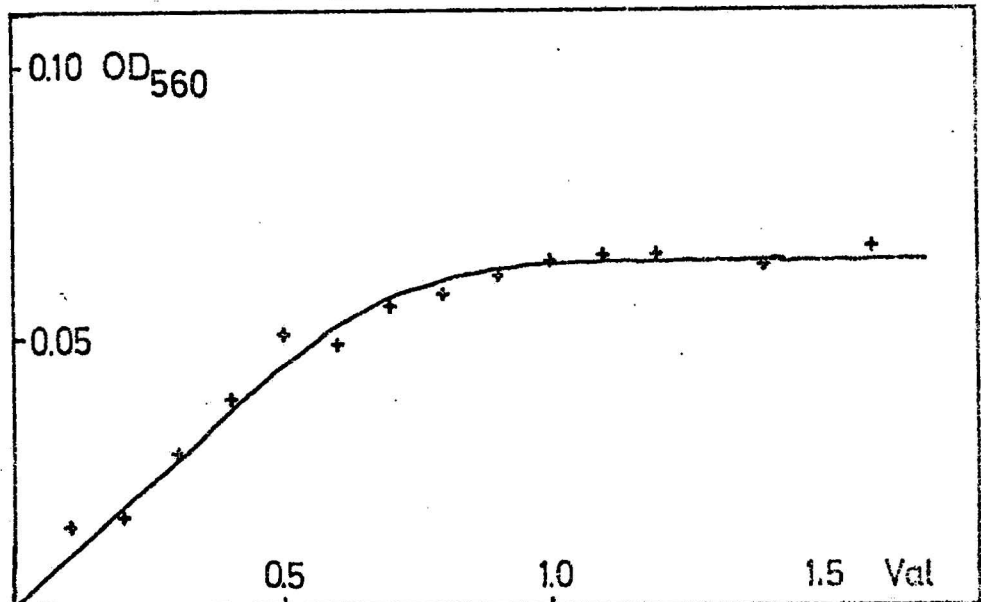


Abbildung 4 : Titration einer Apomembranlösung ($1 \mu\text{molar} \hat{=} 0.063 \text{ OD}_{560}$) mit all-trans Retinal

b) 13-cis - Retinal

Die Probelösungen waren $2,5 \times 10^{-6}$ an Apomembran. Das entspricht einer OD_{560} von 0,158. Auch dieser Wert stellt sich bei einem äquimolaren Verhältnis ein und bleibt ebenfalls bei Steigerung der Retinalmenge konstant. Abb. 5 zeigt den Verlauf der Titrationskurve.

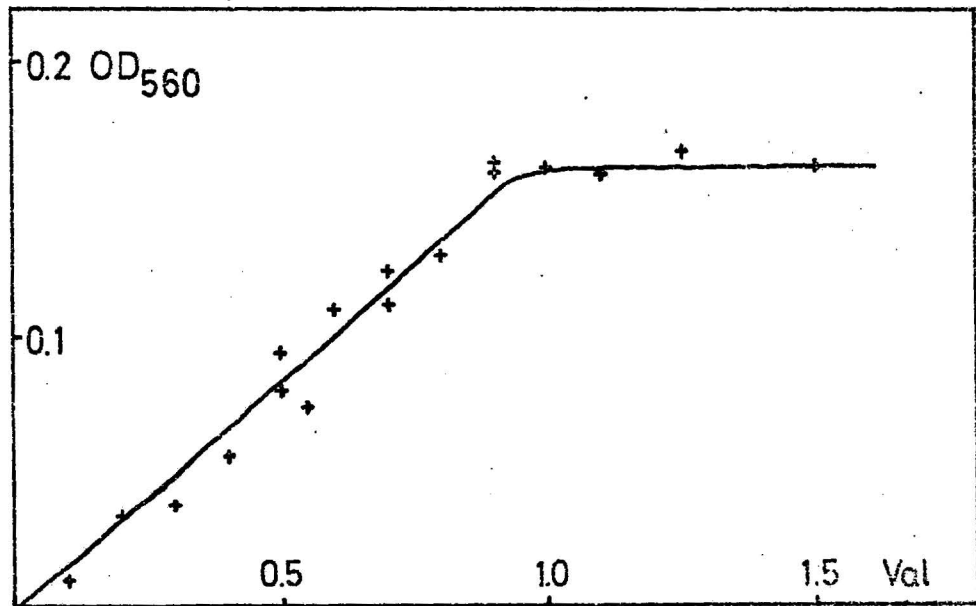


Abbildung 5: Titration einer Apomembranlösung ($2,5 \mu\text{molar}$, entsprechend $0,158 OD_{560}$) mit 13-cis Retinal

II. Rekonstitution des Chromophors

Hydroxylamin spaltet im Licht Retinaloxim von der Purpurmembran ab: Man erhält eine retinalfreie, farblose Apo membran.

Durch Zugabe der prosthetischen Gruppe Retinal zu der gewaschenen Apomembran bildet sich die Purpurmembran zurück. Die räumliche Anordnung des Proteins um die Bindungsstelle im Bakterio-Opsin läßt es aber nicht zu, daß jedes geometrische Isomere des Retinals als "Coenzym" fungieren kann.

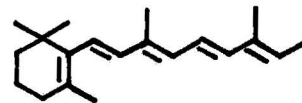
Nur mit 13-cis und all-trans - Retinal findet im Dunkeln eine spontane Regeneration des Chromophors statt.

Bei dem 11-cis Isomeren ist eine thermische oder photochemische Aktivierung notwendig.

9-cis - Retinal reagiert nicht (14).

Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, wie sich Veränderungen an der Struktur des Retinal auf die Fähigkeit zur Rückbildung eines Chromophors auswirken.

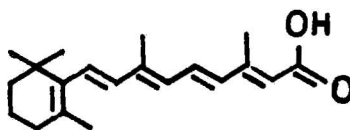
a) Axerophthen



Axerophthen ist der den Verbindungen der Vitamin A-Reihe zugrunde liegende Kohlenwasserstoff. Er besitzt deren π -Elektronensystem, trägt aber keine funktionelle Gruppe.

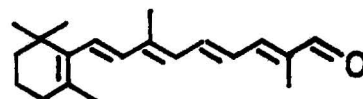
Ein Chromophor wird nicht gebildet.

b) Retinsäure



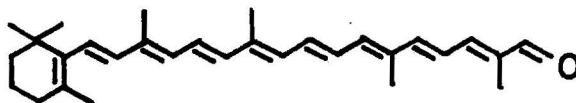
Mit dem Ersatz der Aldehydgruppe durch eine Carboxylfunktion ist die Fähigkeit zur Chromophorbildung verlorengegangen.

c) 13-Desmethyl-14-Methyl-Retinal



Die Verschiebung der Methylgruppe von C-13 nach C-14 verändert die Paßform so stark, daß eine Rekonstitution des Chromophors unmöglich wird.

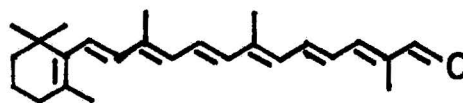
d) β -Apo-8'-Carotinal



Nach der Glover-Redfearn-Hypothese ist das C_{30} -Carotinoid ein Zwischenprodukt bei der β -Oxidation des Carotins. Die Methylgruppe an C-9' sitzt in α -Stellung zur Aldehydgruppe (39).

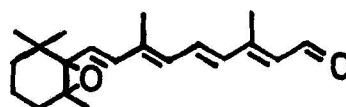
Im Differenzspektrum läßt sich kein Chromophor erkennen.

e) β -Apo-12'-Carotinal



Auch bei diesem Isoprenologen des Retinals ist die Stellung der letzten Methylgruppe an C-13' "falsch". Mit dem C_{25} -Aldehyd läßt sich kein Chromophor bilden.

f) 5,6-Epoxy-Retinal



Durch die Epoxydierung ist das π - System verkürzt.
Die Absorption des freien Retinals verschiebt sich
dadurch von 384 nm (all-trans) nach 365 nm.
Gibt man 5,6-Epoxy-Retinal zu einer Apomembranlö-
sung, so bildet sich bei 440 nm eine Schulter aus,
die der Bande von Retinaloxim (365 nm) aufsitzt (Abb. 6).

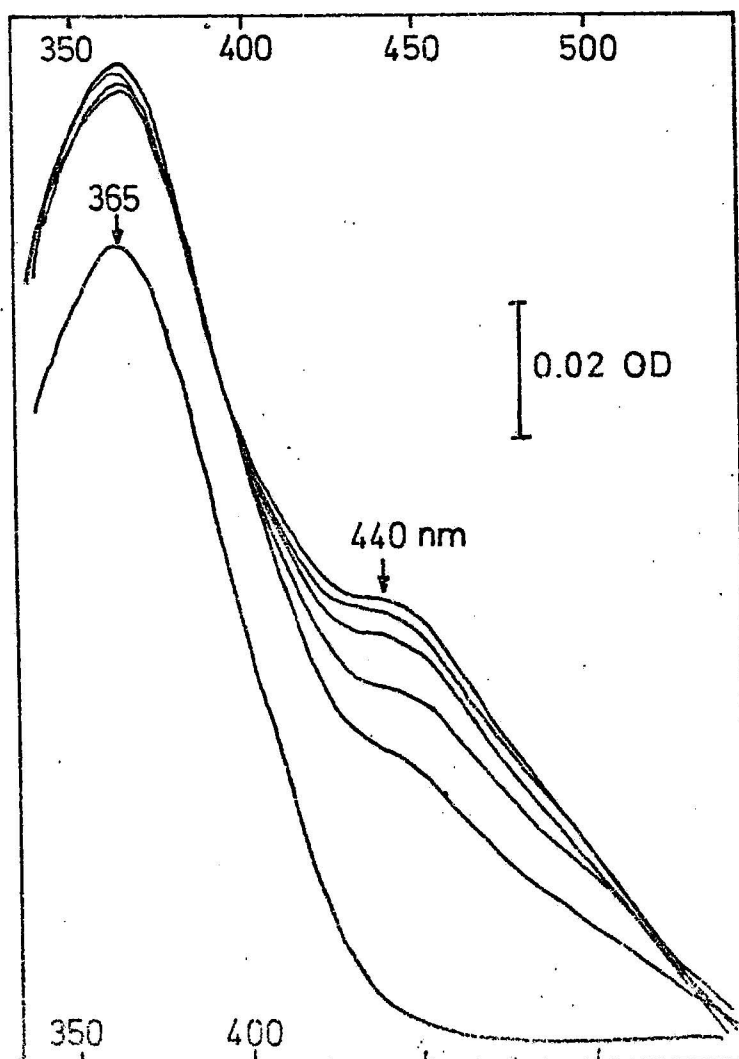


Abbildung 6: Zeitserie des Spektrums von Apomembran
nach Zugabe von 5,6-Epoxy-Retinal nach
0, 2, 4, 20 und 60 Minuten

Deutlicher erscheint das Maximum des Chromophors bei 444 nm, wenn man das Differenzspektrum in Tandemküvetten mißt (Abb. 7).

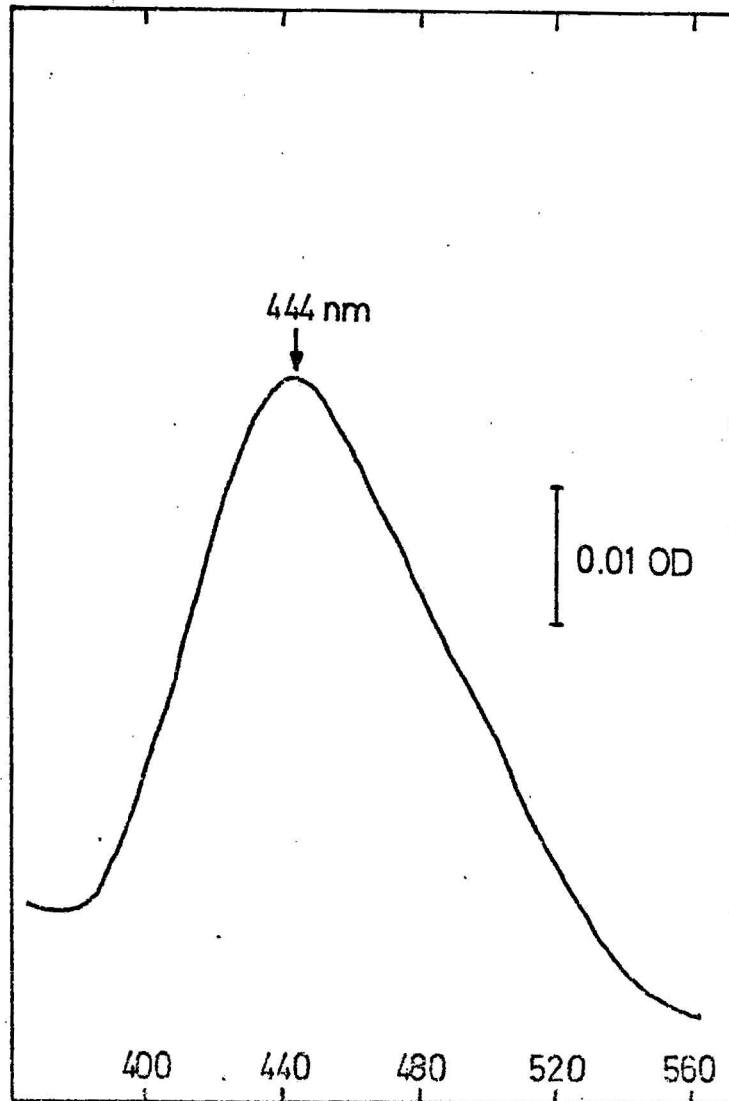


Abbildung 7: Differenzspektrum des Chromophors mit 5,6-Epoxy-Retinal

Behandelt man eine Chromophorsuspension mit HCl, so verschiebt sich nur die Absorption des in der Lösung frei vorliegenden Retinals, wegen des Überganges zum 5,8-Epoxy-Retinal, nach kürzeren Wellenlängen. Die Absorption des Chromophors selbst bleibt unbeeinflusst (Abbildung 8). Offenbar ist der Oxiraning durch das Protein so geschützt, daß er von Protonen nicht angegriffen wird.

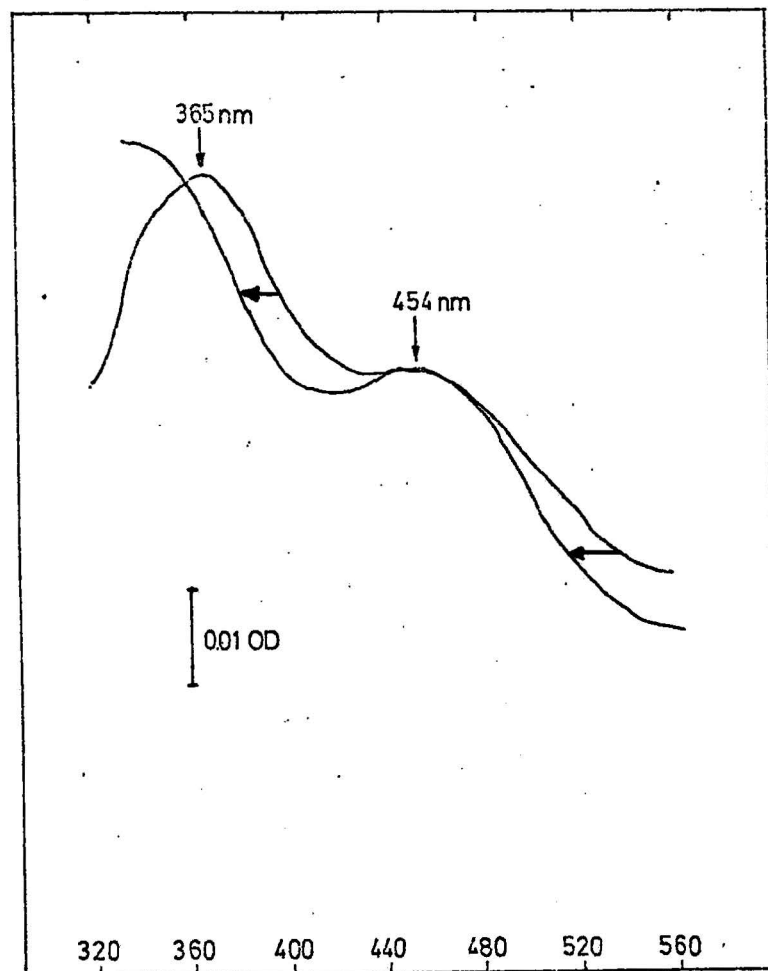


Abbildung 8 : Behandlung des 5,6-Epoxy-Retinal-Chromophors mit HCl

Der Chromophor reagiert beim Belichten (OG 400) mit Hydroxylamin.

In 3 molarer NaCl-Lösung, die mit Diäthyläther gesättigt wurde, findet man nach Belichten mit OG 400 gefiltertem Licht bei 0°C eine Zunahme der Absorption bei 364 nm. Gleichzeitig nimmt die Absorption bei 448 nm ab.

Das System ist jedoch nicht vollständig reversibel, denn es geht in der Dunkelreaktion nicht mehr auf seinen Ausgangswert zurück. (Abbildung 9).

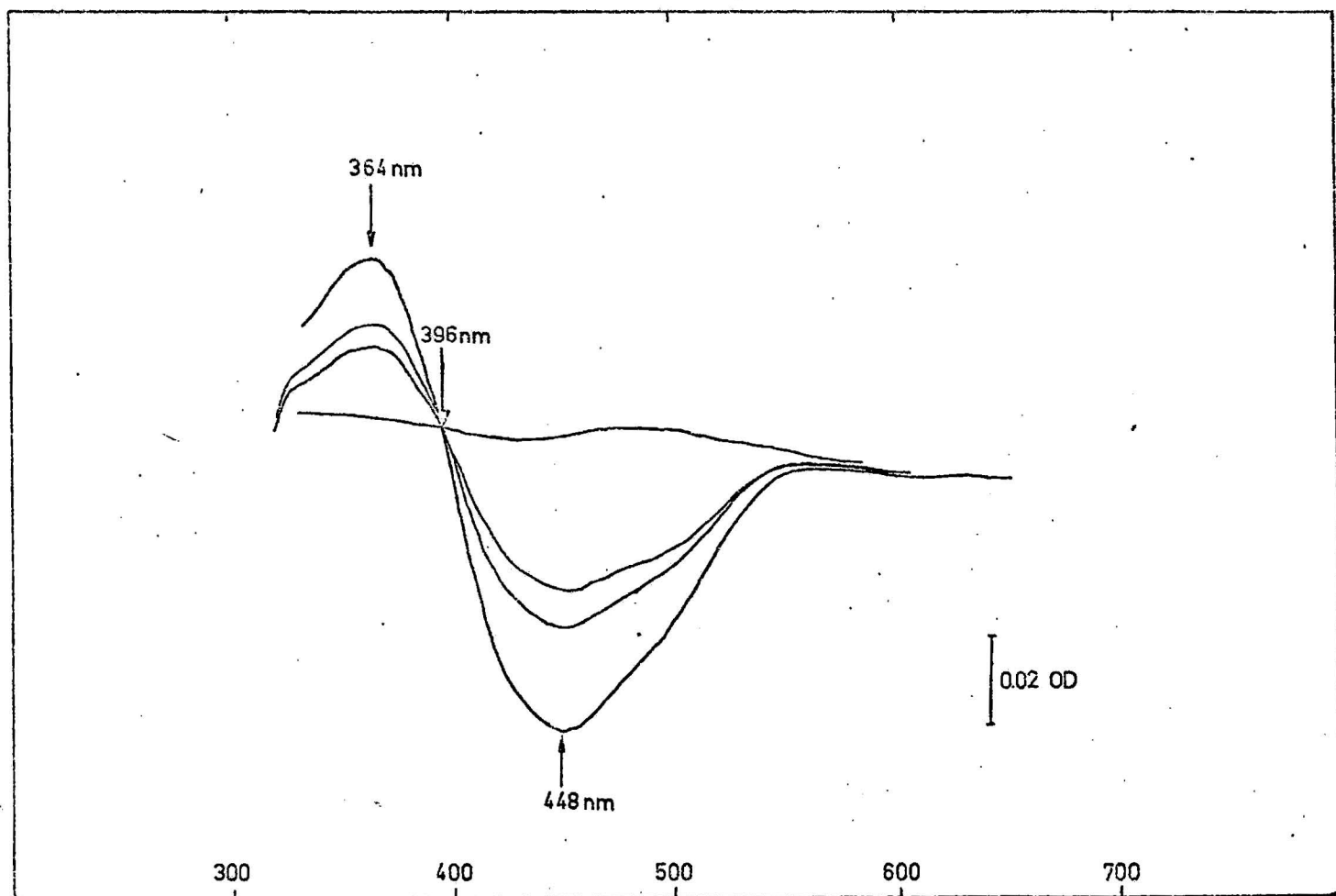
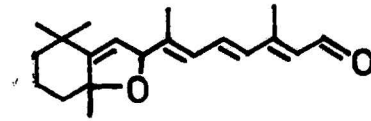


Abbildung 9 : Spektrenserie des 5,6-Epoxy-Retinal-Chromophors nach Belichten in NaCl/Et₂O

g) 5,8-Epoxy-Retinal



Unter Säurekatalyse lagert sich freies 5,6-Epoxy-Retinal in 5,8-Epoxy-Retinal um. Dabei öffnet sich der Oxiranring und addiert sich unter Bildung des weniger gespannten furanoiden Systems an die 7,8-Doppelbindung.

Da hierbei die Konjugation einer Doppelbindung verlorengeht, verschiebt sich das Absorptionsmaximum (in Petroläther) von 350 nm nach 324 nm (Abb. 10).

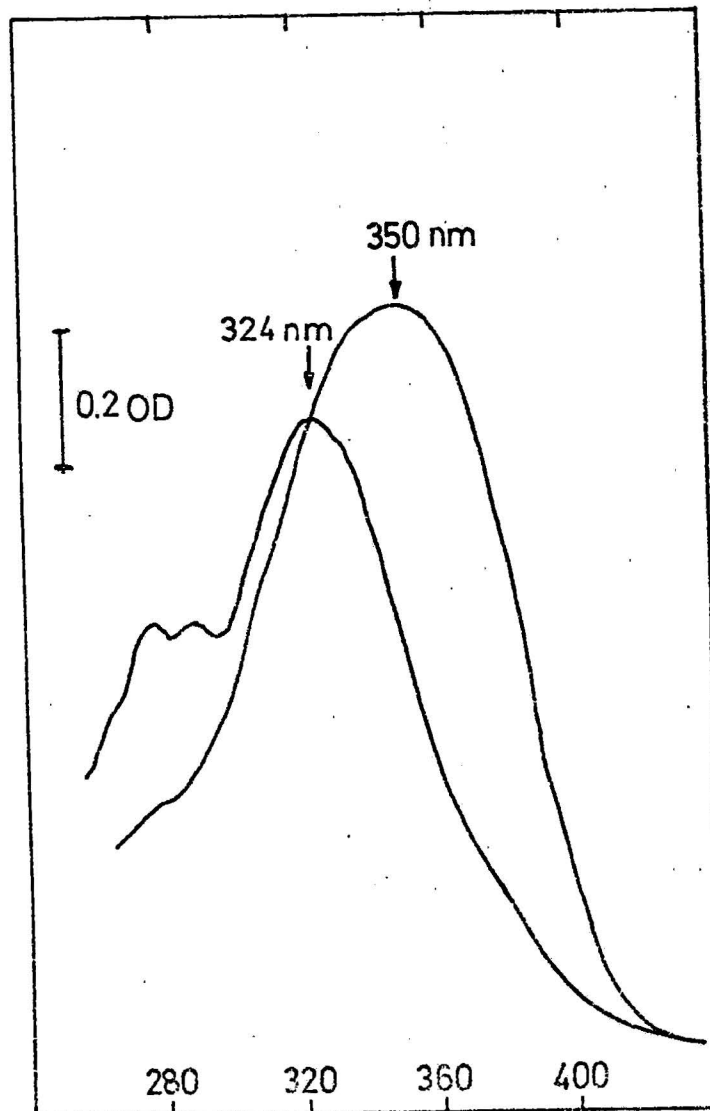


Abbildung 10 : Umlagerung der 5,6-Epoxy- in die 5,8-Epoxy-Retinal-Form (5 μ l 0,1 n HCl)

Gibt man eine Lösung des 5,8-Epoxy-Retinals zu einer Apomembransuspension, so bildet sich ein Absorptionsmaximum bei 404 nm aus (Abb 11).

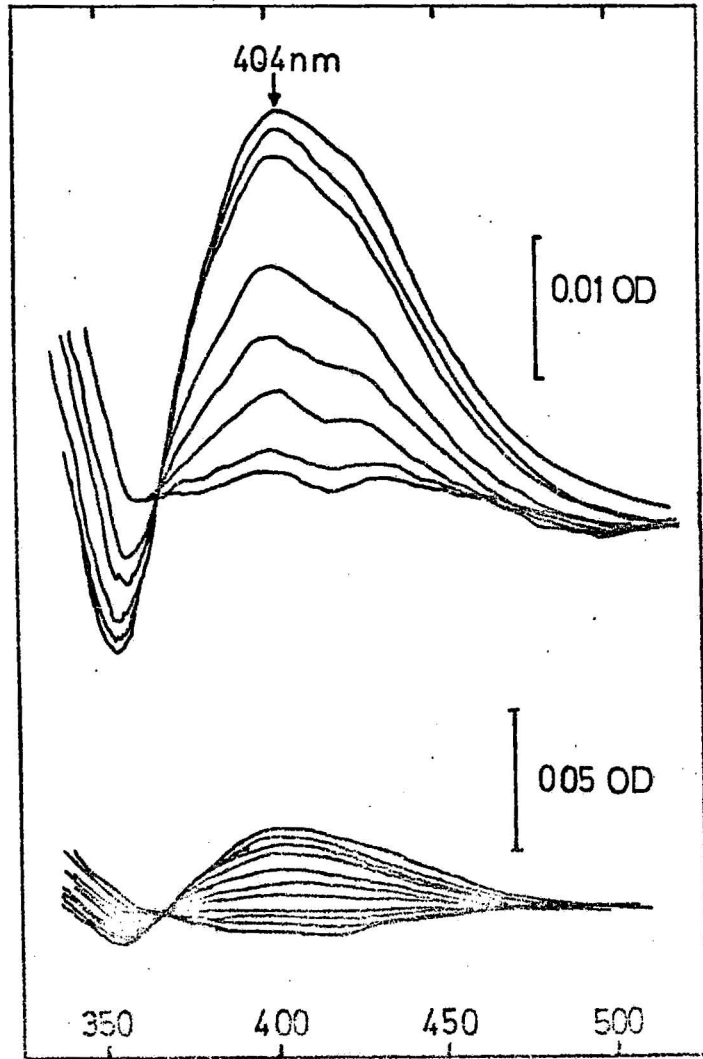
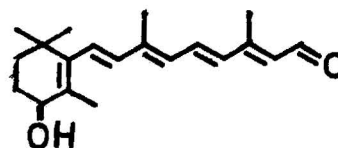


Abbildung 11 : Apomembran nach Zugabe von 5,8-Epoxy-Retinal

h) 4-OH-Retinal



Gibt man bei 0°C 4-OH-Retinal zu einer Apomembran-suspension, so bildet sich ein Chromophor mit den Maxima 500 nm und 540 nm. Die kürzerwellige Bande ist dabei das Hauptmaximum.

Mißt man die gleiche Probe jedoch bei 25°C, so ist die Bande bei 540 nm die Hauptbande geworden. Bei 500 nm tritt nur noch eine Schulter auf (Abb.12).

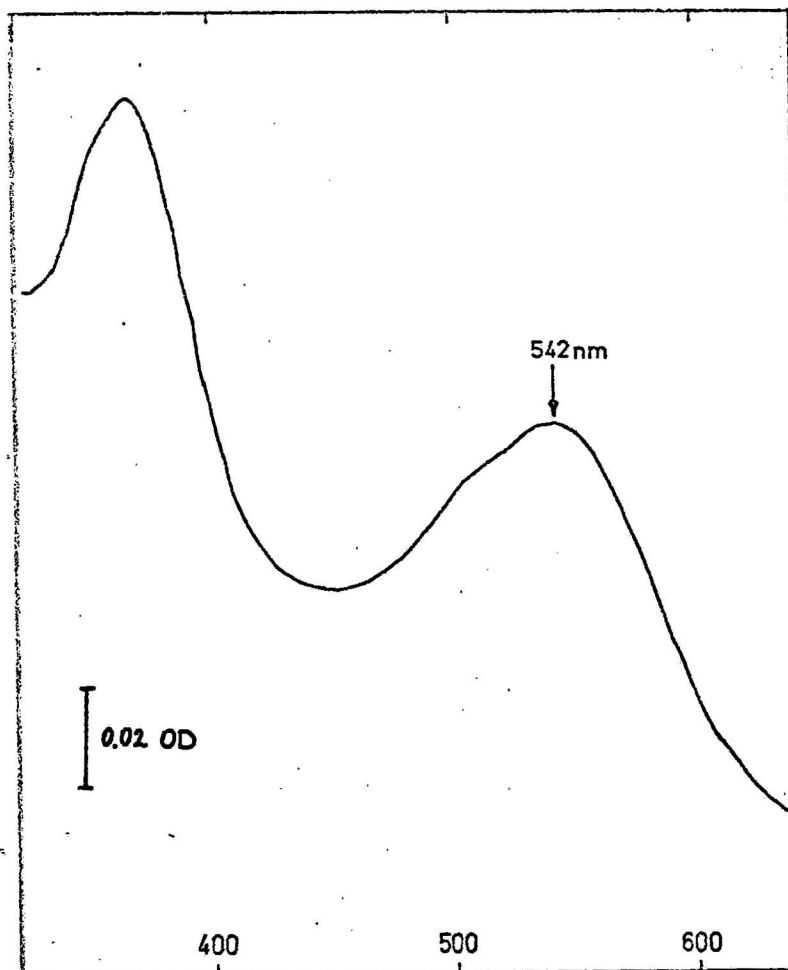


Abbildung 12 : Chromophor mit 4-OH-Retinal

Wie bei der nativen Purpurmembran, so tritt auch mit dem modifizierten Chromophor eine pH-abhängige Verschiebung der Absorption auf.

Bei pH 2,5 liegt das Maximum bei 560 nm; bei pH 11,3 ist die Absorptionsbande nach 520 nm verschoben. (Abb. 13).

Der Chromophor reagiert mit NH_2OH , wenn man mit Licht der Wellenlänge 515 nm einstrahlt.

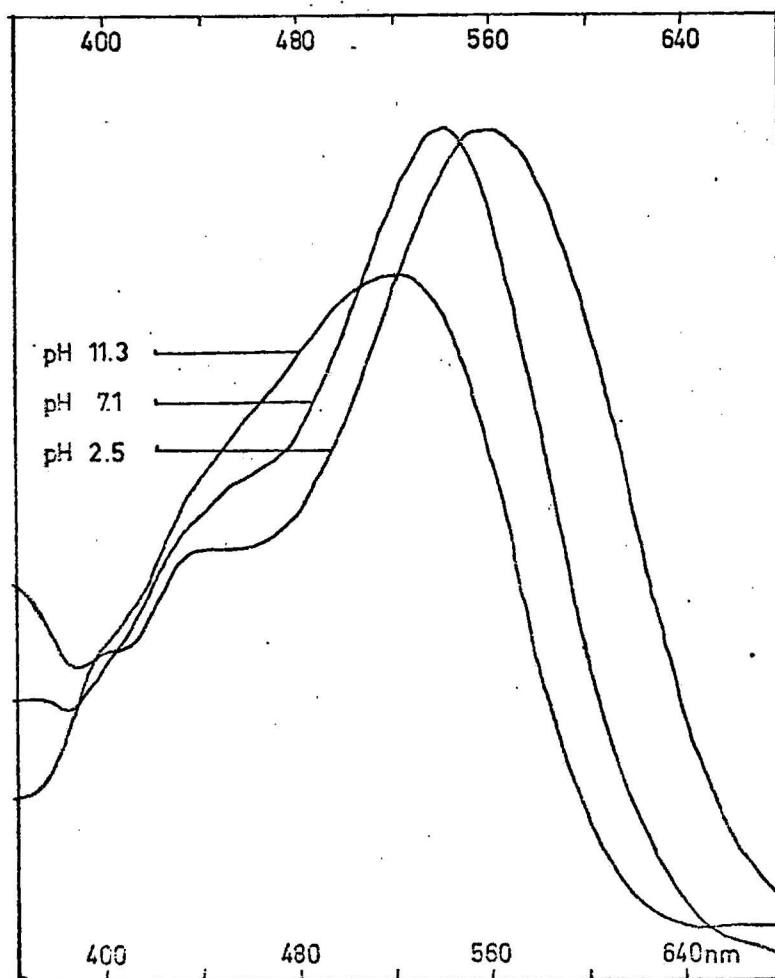


Abbildung 13 : pH-Abhängigkeit des Chromophors mit 4-OH-Retinal bei pH 2,5, 7,0 und 11,3

Das mit 4-OH-Retinal rekonstituierte Bakteriorhodopsin ist in der Lage, einen Lichtzyklus zu durchlaufen. Im Basalsalz/Äther-System bei 0°C bildet sich nach Bestrahlen (OG 515) ein Maximum bei 406 nm, bei gleichzeitigem Absinken der Absorption bei 538 nm. Der isosbestische Punkt liegt bei 446 nm (Abb. 14). Das System ist reversibel.

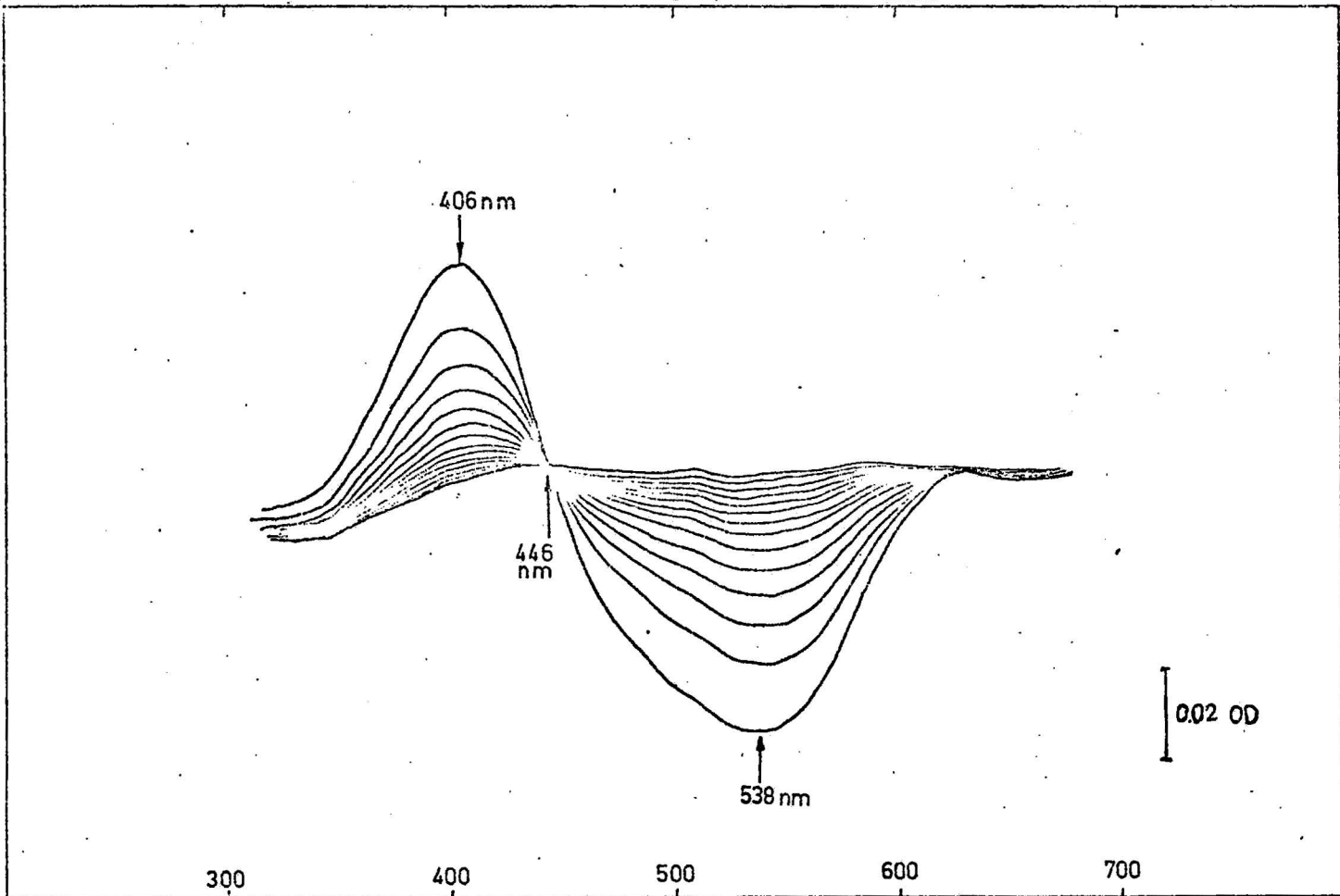
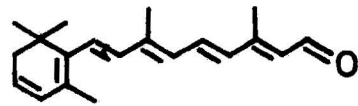


Abbildung 14 : Lichtzyklus des modifizierten Chromophors (4-OH-Retinal) im Basalsalz/Äthersystem bei 0°C (OG 400)

i) 3,4-Dehydro-Retinal



Die Einführung einer zusätzlichen Doppelbindung führt beim freien Retinal zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums um 17 nm (von 384 nm nach 401 nm).

Bei Opsinen, die 3,4-Dehydro-Retinal im Chromophor enthalten (z.B. im Porphyropsin und im Cyanopsin), ist eine Rekonstitution mit Retinal nicht möglich und umgekehrt. Bakterio-Opsin bildet auch mit 3,4-Dehydro-Retinal einen Chromophor, dessen Absorption bathochrom gegenüber dem Retinalchromophor verschoben ist. Das Maximum liegt bei 592 nm (Abb.15).

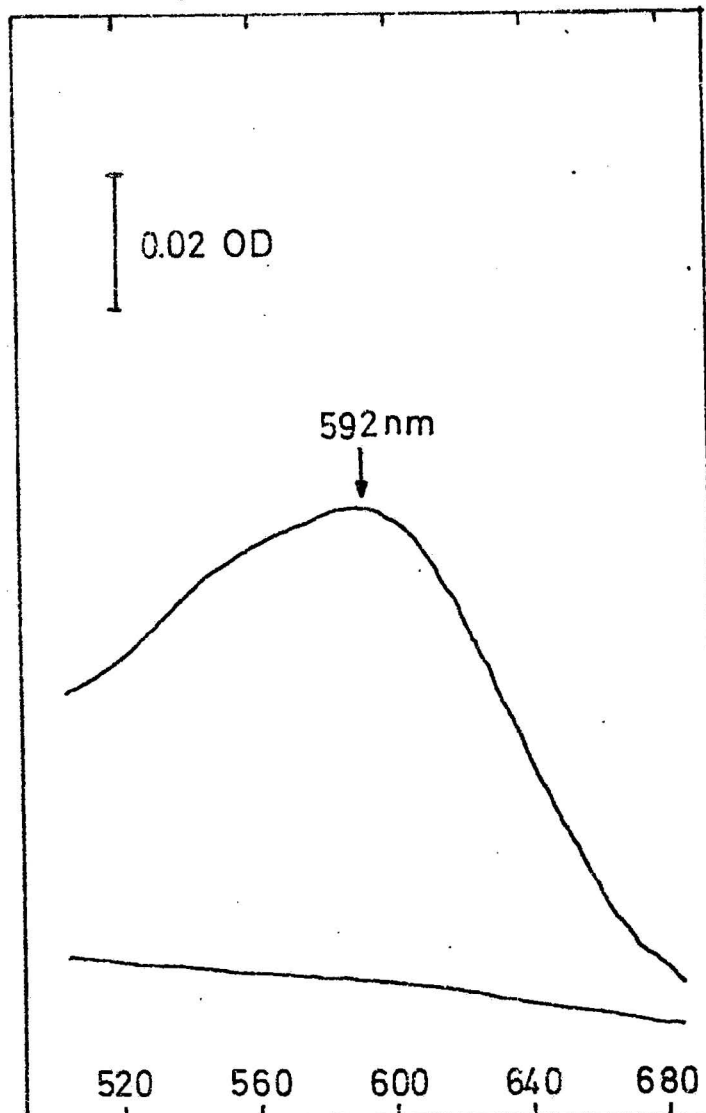


Abbildung 15 :

Modifizierter Chromophor des 3,4-Dehydro-Retinals

Das Zwischenprodukt des Lichtzyklus in Basalsalz/
Äther (0°C , OG 535) absorbiert ebenso länger-
wellig verschoben bei 432 nm.

Der isosbestische Punkt liegt bei 484 nm (Abb. 16).

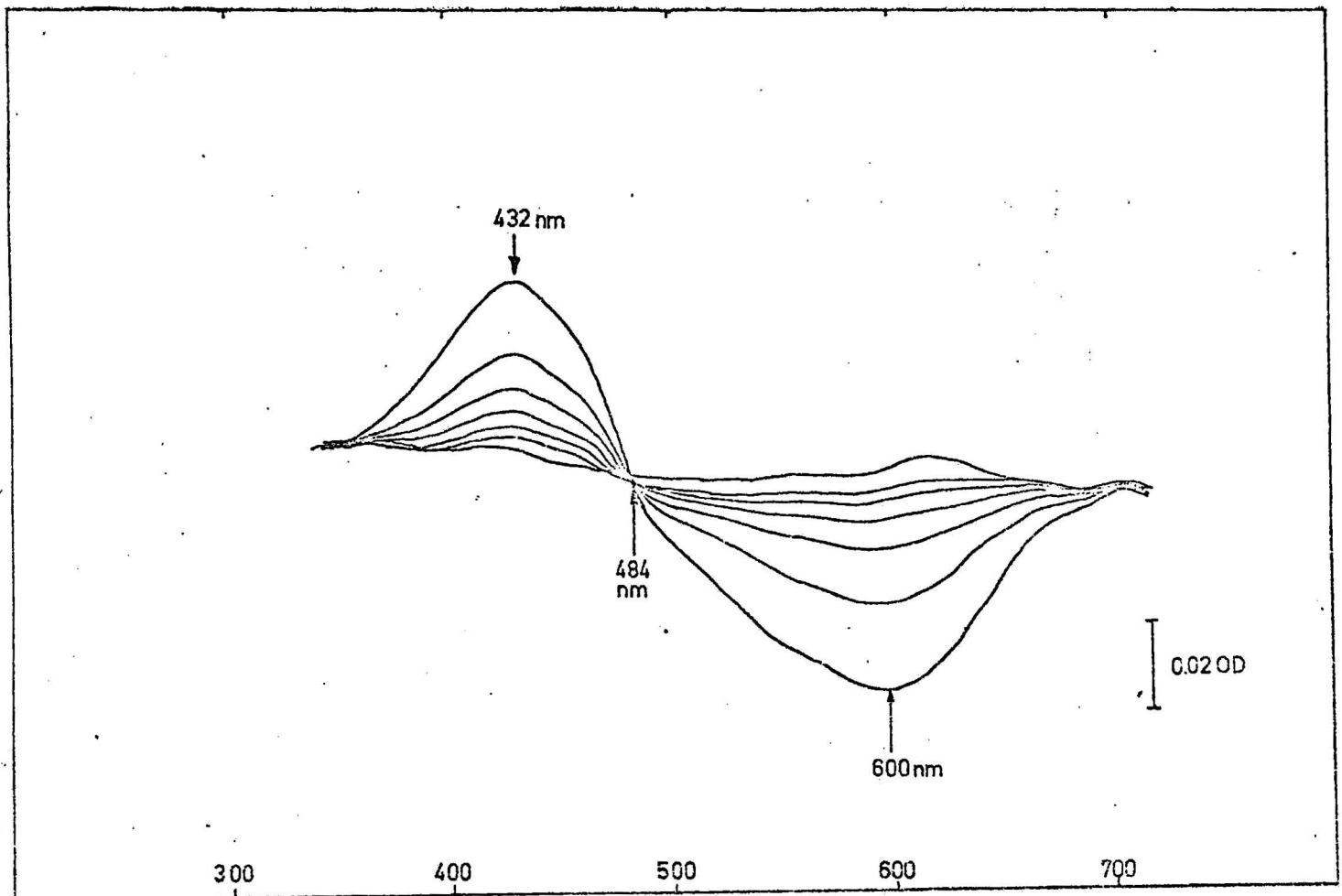


Abbildung 16 : Lichtzyklus des 3,4-Dehydro-Retinal-
Chromophors in 3M NaCl/Et₂O. Das
Zwischenprodukt absorbiert bei 432 nm.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Absorptionsmaxima der gebildeten Chromophore und die Verschiebung von Chromophor und Zwischenprodukt gegenüber den freien Verbindungen.

Tabelle 1 :

Verbindung	frei	Chromophor	Verschiebung	Zwischenprodukt	Verschiebung
Retinal	384	568	184	412	28
3,4-Dehydro	401	595	194	432	31
4-OH-Retinal	375	540	165	406	31
5,6-Epoxy-Ret.	365	445	80	365	0
5,8-Epoxy-Ret.	330	405	75	?	?

III. Rekonstitution der Funktion

a) Protonenpumpe

Anaerobe Zellsuspensionen von Halobakterien säuern bei Belichten das Außenmedium an. Spektrale Veränderungen legen eine direkte Beteiligung des Chromophors an der Protonenpumpe nahe.

Die strukturmodifizierten Retinale sollten geeignet sein, die Hypothese von der 4-Stellung des Cyclohexenringes als Schaltstelle der Pumpe zu überprüfen:

- 5,6-Epoxy-Retinal kann überhaupt keine Retroform bilden.
- Bei 4-OH-Retinal würde in der 4-Stellung ein Proton gepumpt werden können, bevor eine Blockierung durch die Hydroxylgruppe eintritt.
- 3,4-Dehydro-Retinal kann eine Retro-Form bilden, jedoch sind es die Wasserstoffatome an C-Atom 2, die an der Tautomerie beteiligt sind.
Die Methingruppierung in 4-Stellung wird von der Prototropie überhaupt nicht betroffen.

Um die Funktionsfähigkeit am in vivo - System zu untersuchen, mußten die veränderten Chromophore in das Bakterium eingeschleust werden. Dazu wurden Zellen benutzt, die noch keine Purpurmembran besaßen.

Howes und Batra beschrieben 1970 die Hemmung der β -Carotinsynthese durch Nicotin bei *Mycobacterium marinum*. Bei Konzentrationen von 5 mM Nicotin wurde die Cyclisierung vom Lycopin zum β -Carotin nahezu vollständig gehemmt (33).

Es konnte gezeigt werden, daß auch bei Halobakterien Lycopin angehäuft wird, wenn sie in Gegenwart von 0,1 mM Nicotin wachsen.

Da Carotin als Vorstufe des Retinals nicht gebildet wird, sind die Zellen auch nicht imstande, Purpurmembra-
n zu synthetisieren(34).

Solche Zellen besitzen aber noch Bakterio-Opsin, denn nach Zugabe von Retinal zum Medium bilden sie eine sogenannte "Braune Membran". Diese kristallisiert in einem energieabhängigen Schritt zur Purpurmembra-
n aus(35).

Sie kann jedoch wie die Purpurmembra-
n bei Belichtung Protonen pumpen.

Durch Zugabe von modifizierten Retinalen zu der-
artigen "Nicotinzellen" gelingt es, intakte Zellen mit veränderten Chromophoren zu erhalten.

Neuerdings wurde gefunden, daß durch Retinalzugabe zu wachsenden Zellen, die Retinalsynthese in der Zelle unterdrückt wird. So erhält man durch Zugabe von 3,4-Dehydro-Retinal zu nicotinfrei wachsenden Zellen, Bakterien, die nur eine blaue Membran ($\lambda_{\text{max}} = 600\text{nm}$) besitzen(36).

Bei den auf diese Weise zugänglichen Bakterien mit verändertem Chromophor wurden lichtabhängige pH-Änderungen untersucht.

Um größere pH-Effekte zu erzielen, wurde die ATPase mit Di-Cyclohexyl-Carbodiimid (DCCD) gehemmt.

Nach der Rekonstitution von 10 ml Zellsuspension der OD_{578} 4,0 mit dem jeweiligen Retinal wurde DCCD zugegeben (10^{-3} M) und 2,5 Stunden bei 37° C inkubiert. Der pH-Wert der Suspensionen schwankte zwischen 7,02 und 7,05. Das Rührgefäß war auf 25° C thermostatisiert.

Mit einem OG 515 - Filter wurden die kurzwelligeren Anteile des Lichtes herausgefiltert. Lediglich bei den mit 5,6-Epoxy-Retinal rekonstituierten Zellen wurde ein OG 400 - Filter benutzt.

Abbildung 17 zeigt die pH-Spuren der Bakterien-suspensionen.

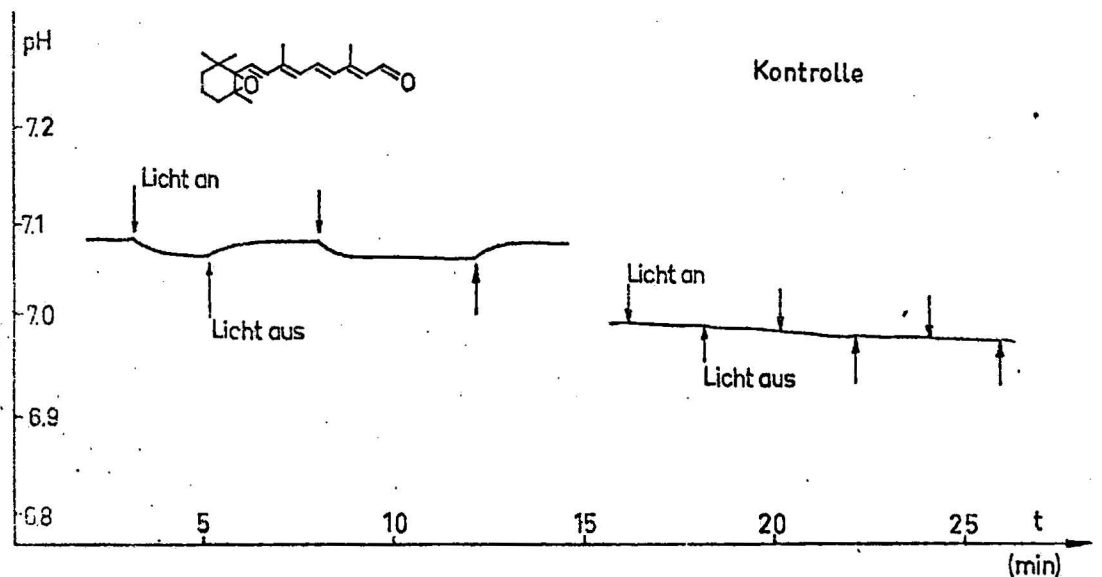
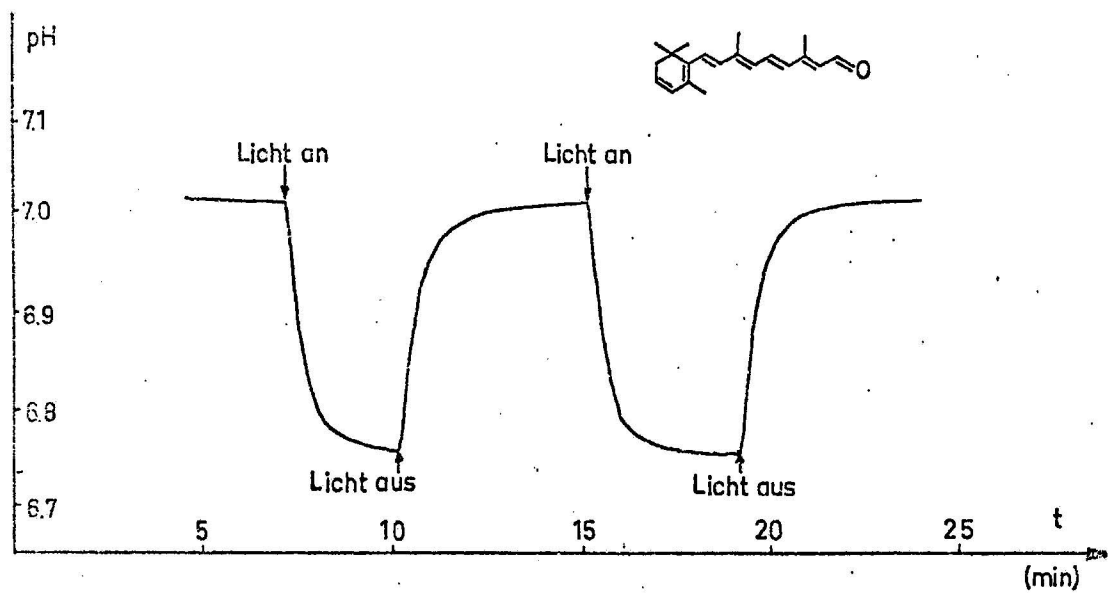
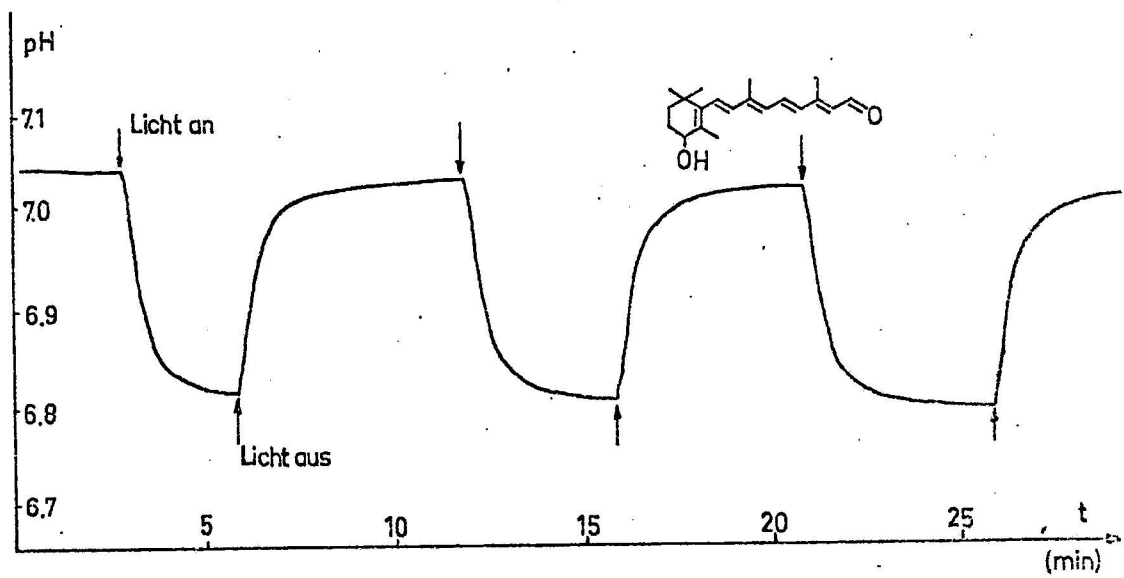
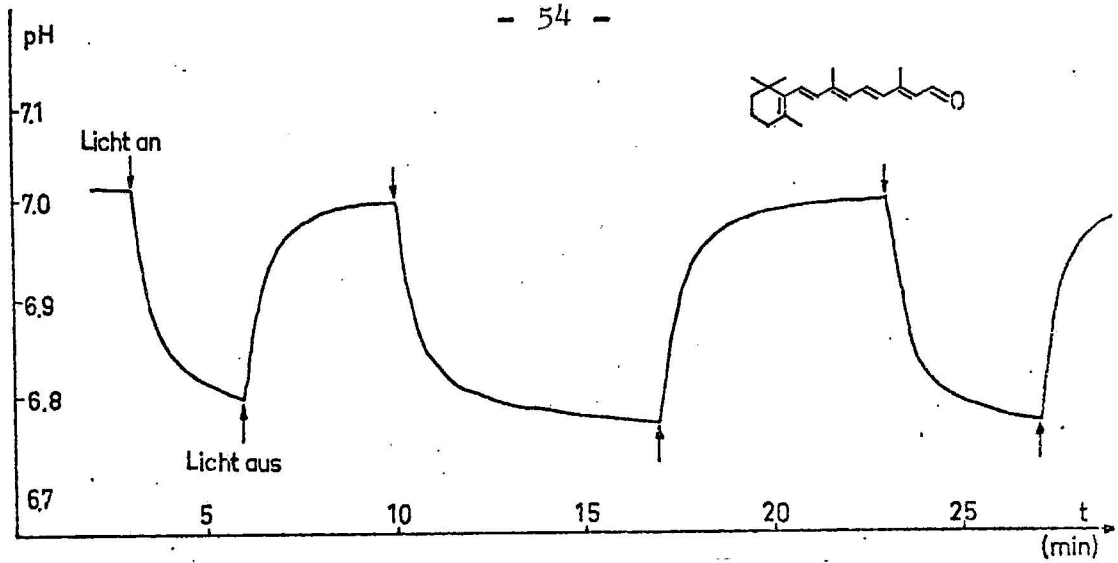


Abbildung 17a : Lichtinduzierte pH-Änderungen bei Zellen, die mit 5,6-Epoxy-Retinal rekonstituiert wurden. Als Kontrolle wurden identisch behandelte Zellen ohne Retinal verwendet.



Abbildungen : pH-Verhalten von rekonstituierten Zellen
17 b,c,d bei Wechsel des Belichtungszustandes

Den abgebildeten pH-Spuren wurde die pH-Differenz entnommen und auf die Gesamtzahl der freigesetzten Protonen umgerechnet.

Weiter wurde die Anfangsgeschwindigkeit des Pumpvorganges nach Einschalten des Lichtes bestimmt.

	5,6-Epoxy	4-Hydroxy	all-trans	3,4-Dehydro
Zeit(min)	pH - Unterschied			
3	0,015	0,234	0,226	0,266
4	0,015	0,234	0,234	0,266
5	-	0,234	-	-
7	-	-	0,240	-
	Insgesamt gepumpte Protonen (ng H ⁺)			
3	30	440	425	500
4	30	440	440	500
5	-	440	-	-
7	-	-	450	-
	Anfangsgeschwindigkeit (ng H ⁺ / min)			
	45	530	485	730
	45	530	515	740
	-	560	560	-

Maximale Pumpgeschwindigkeit und Gesamtausstoß von Protonen sind bei den Chromophoren, die mit all-trans-, 4-Hydroxy- und 3,4-Dehydro-Retinal rekonstituiert wurden von ähnlicher Größenordnung. Die Abweichungen betragen 10% und 7,5% vom jeweiligen Mittelwert.

Deutlich ist der Abfall bei dem 5,6-Epoxy-Retinal-Chromophor: Beide Werte sind hier um einen Faktor 15 kleiner.

Abbildung 18 zeigt die Chromophore in den Zellen.

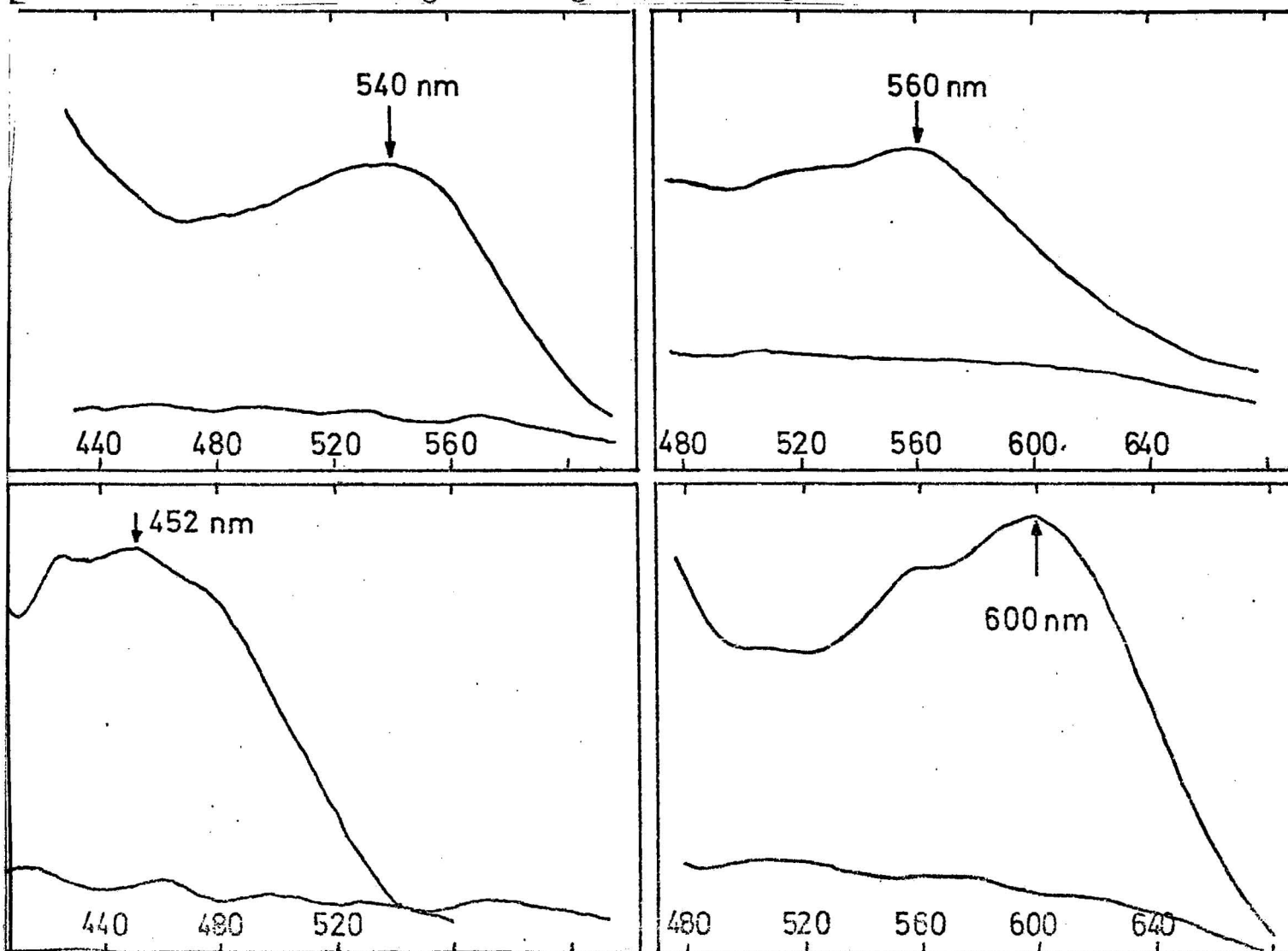


Abb. 18 : Chromophore in ganzen Zellen. Oben: 4-Hydroxy- und all-trans-Retinal. Unten: 5,6-Epoxy- und 3,4-Dehydro-Retinal.

b) ATP - Synthese

Die Bildung eines pH-Gradienten ist die Voraussetzung für die Photophosphorylierung bei nicht atmenden Halobakterien. Mittels ATP-Bestimmung läßt sich aufklären, ob der von modifizierten Chromophoren aufgebaute Gradient ausreicht, ATP-Synthese zu treiben.

Gemessen wurde an Zellsuspensionen der OD 4,0, die 1 mmolar an Nicotin waren. Die Rekonstitution erfolgte im Licht mit $10 \mu\text{l } 4 \times 10^{-3} \text{ M Retinal}$ lösungen. Die Änderung des ATP-Spiegels nach der Rekonstitution zeigt Abbildung 19.

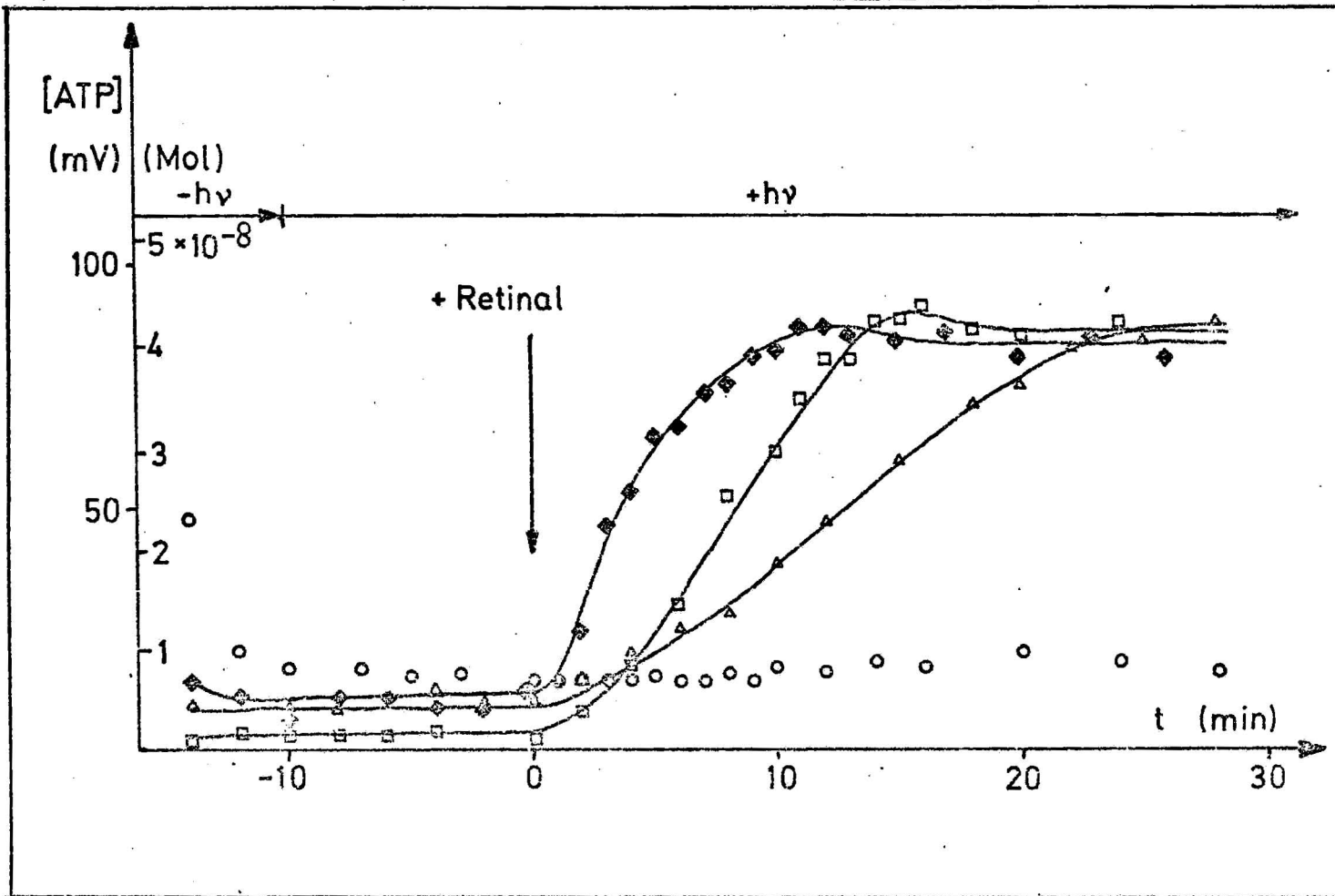


Abb. 19 : Änderung des ATP-Spiegels nach Rekonstitution

- | | |
|------------------|-----------------------|
| ◆ 4-OH-Retinal | □ 3,4-Dehydro-Retinal |
| ▲ 13-cis-Retinal | ○ 5,6-Epoxy-Retinal |

Aus Abbildung 19 geht hervor, daß Zellen, die mit 5,6-Epoxy-Retinal rekonstituiert wurden, nicht in der Lage sind, ATP via Photophosphorylierung zu bilden. Das Dunkelniveau ihres ATP-Spiegels verändert sich nicht nach der Regeneration des Chromophors.

Zellen, die mit den drei übrigen Retinalen rekonstituiert wurden, steigern mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ihren ATP-Spiegel. Letztlich wird jedoch bei allen der gleiche Endwert der ATP-Konzentration erreicht.

D. Diskussion

I. Stöchiometrie

Bei beiden Titrationsen wird der Äquivalenzpunkt mit 1 Val Retinal erreicht. Die gefundene 1:1 - Stöchiometrie steht im Einklang mit dem bei der nativen Purpurmembran gefundenen Retinal:Protein-Verhältnis (4).

II. Rekonstitution des Chromophors

Verbindungen mit der Struktur des Retinals, aber ohne dessen funktionelle Gruppe - wie Axerophthen und Retinsäure - bilden keinen Chromophor. Daraus kann die Unabdingbarkeit der Aldehydgruppe für die kovalente Bindungsbildung gefolgert werden.

Das Ausbleiben eines Chromophors bei der Umsetzung mit Carotinalen muß andere Gründe haben.

Zum einen könnte durch die Länge der beiden Verbindungen die Wechselwirkung mit dem Protein stark reduziert oder gar völlig aufgehoben sein. Die Moleküle wären einfach zu groß, um sich mit der Apomembran umzusetzen.

Die zweite Ursache könnte in dem veränderten Abstand der Aldehydgruppe zur nächsten Methylgruppe liegen. Im Retinal sitzt die benachbarte Methylgruppe an einem C-Atom in β -Stellung zu der Aldehydgruppe. Bei den Carotinalen befindet sich die Methylgruppe an einem α -ständigen C-Atom.

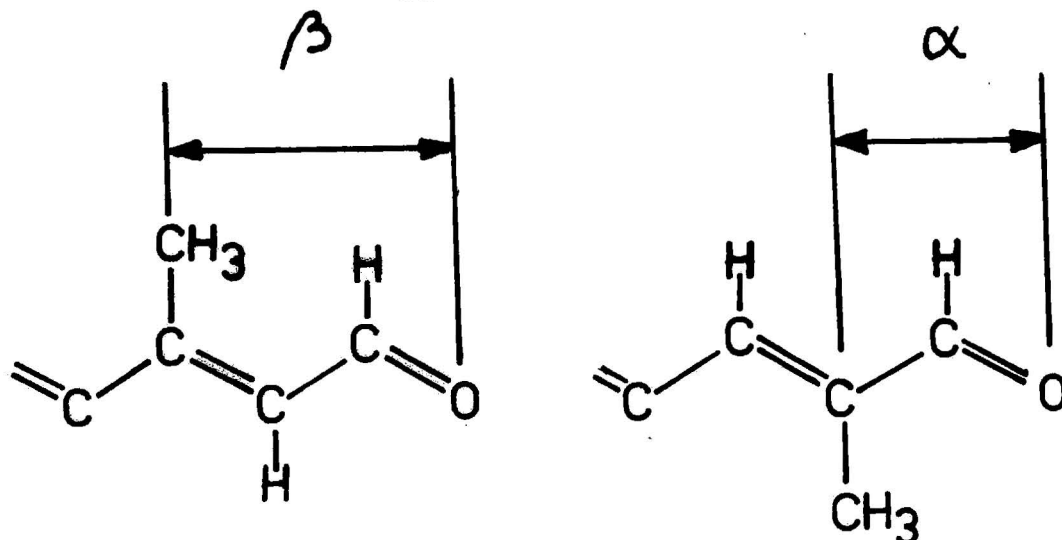


Abb.20: Unterschiedlicher Abstand von α und β -ständiger Methylgruppe zur C=O-Bindung.

Damit könnte die Paßform zu stark verändert sein, als daß noch eine Bindung ausgebildet werden könnte.

Daß der zweiten Deutung der Vorzug zu geben ist, zeigt das Versagen von 13-Desmethyl-14-Methyl-Retinal als Chromophorbildner.

Die Größe des Moleküls sollte hier passend sein, trotzdem unterbleibt eine Bindung. Offen bleibt dann immer noch, ob dies in einer Blockierung durch die C-14-ständige CH₃-Gruppe oder - was weniger, wahrscheinlich ist - durch die fehlende Information an C-13 begründet ist (Abbildung 20).

Die Einführung einer weiteren Doppelbindung in den Cyclohexenring des Retinals führt zu einer stärkeren Planarisierung. Dadurch wird aber die Gesamtstruktur des Retinals nicht wesentlich beeinflusst, und es überrascht nicht, daß 3,4-Dehydro-Retinal einen Chromophor bildet.

Auch das Ausmaß der bathochromen Verschiebung liegt mit ca. 25 nm im erwarteten Bereich. Insgesamt verhält sich das System retinalanalog, nur daß alle Werte entsprechend nach längeren Wellenlängen verschoben sind (Maximum 600 nm, Zwischenprodukt 432 nm und isosbestischer Punkt 484 nm).

Erstaunlicher ist der 445 nm - Chromophor mit 5,6-Epoxy-Retinal, denn die spektrale Verschiebung von der freien Verbindung (365 nm) zur chromophorgebundenen (445 nm) ist mit 80 nm deutlich kleiner als bei all-trans-Retinal (384 nm nach 568 nm).

Mit dem Übergang des C-6 von einem sp^2 - in ein sp^3 - Hybrid ist eine freie Rotation um die 6,7-Bindung möglich, da keine Wechselwirkungen zwischen π -Elektronen existieren.

Einen stärkeren Einfluß hat aber sicher die Raumerfüllung des Sauerstoffs, durch den der Cyclohexanring aus der Ebene des Doppelbindungssystems weggeknickt wird, und der die Paßform wahrscheinlich wesentlich verschlechtert.

Molekülmodelle zeigen, daß die Einführung der Epoxygruppierung die Molekülgestalt des Retinals drastischer verändert als eine Hydroxylgruppe an C-4.

So sind die spektralen Änderungen gegenüber der Purpurmembran bei 4-OH-Retinal auch viel kleiner. Die Werte für das Maximum und den isosbestischen Punkt sind um etwa 25 nm hypsochrom verschoben.

III. Rekonstitution der Funktion

Die Hypothese von der 4-Stellung als dem Ort der H^+ -Pumpe verknüpft den photochemischen Zyklus direkt mit dem Protonentransport.

Sowohl 3,4-Dehydro-Retinal als auch 4-OH-Retinal durchlaufen reversibel einen Lichtzyklus.

Die mit ihnen rekonstituierten Zellen pumpen ebensoviele Protonen ins Medium wie Zellen, die Purpurmembran enthalten.

Der dabei erzeugte Gradient reicht aus ATP-Synthese zu treiben.

Auf beide läßt sich jedoch die Modellvorstellung nicht anwenden.

3,4-Dehydro-Retinal kann eine Retroform bilden und auch Protonen gerichtet abgeben und aufnehmen. Allerdings müßte dann die 2-Stellung die Pumpstelle sein, denn an C-4 bleibt ständig eine Methingruppierung erhalten.

4-OH-Retinal als Pigment könnte durch Protonenabgabe in 4-Stellung eine Retroform bilden. Nach Rückbildung der Retinalform durch Addition eines Protons von der Rückseite würde aber die Position des jetzt zur Abgabe anstehenden Protons von einer Hydroxylgruppe eingenommen.

Damit wäre nach einmaligem Pumpen der weitere H^+ -Transport blockiert.

Die Lebensdauer des Zwischenproduktes und das Ausmaß der freigesetzten Protonen lassen eine solche Hemmung nicht erkennen.

Durch die Epoxygruppe ist es dem 5,6-Epoxy-Retinal garnicht erst möglich, überhaupt eine Retroform zu bilden. Damit bleiben auch die Bindungen an C-4 ständig unverändert.

Die Arbeitshypothese würde das Versagen des Chromophors bei der Prüfung der ATP-Synthese erklären, sie wird aber widerlegt durch die Fähigkeit des Systems einen Lichtzyklus zu durchlaufen, dessen Zwischenprodukt ja keine Retroform sein kann.

Es bedarf aber weiterer Untersuchungen, die Gründe für die nicht vollständige Rückkehr des Zwischenproduktes in der Dunkelreaktion zu klären.

Die festgestellte Pumpwirkung ist sehr viel kleiner als bei den drei übrigen Testsystemen und reicht auch nicht aus, eine ATP-Bildung zu treiben.

Dennoch steht sie nicht im Einklang mit den Modellvorstellungen mit der 4-Position als Pumpstelle, nach denen 5,6-Epoxy-Retinal weder einen Lichtzyklus noch eine Pumpfähigkeit aufweisen sollte.

Bei Versuchen mit 4-Deutero-Retinal wurde nach Durchlaufen des photochemischen Zyklus die unveränderte Substanz als Oxim isoliert.

Umgekehrt konnte in Tritiumwasser keine Aufnahme der Radioaktivität in die Purpurmembraan gefunden werden (37).

Wäre die 4-Stellung die "Pumpstation", so müßte man einen Ausbau des Deuteriums, beziehungsweise einen Einbau von Tritium in der 4-Position feststellen.

Die erhaltenen Befunde lassen folgende Schlüsse zu:

- Die 4-Stellung des Cyclohexenringes ist nicht an der lichtinduzierten Protonenpumpe beteiligt.
- Das Zwischenprodukt des photochemischen Zyklus ist keine Retroform des Chromophors.

In neueren Untersuchungen wird eine andere Deutung der Struktur des Zwischenproduktes gegeben(38). Die Aufhebung des Dihedralwinkels zwischen Polyenkette und Cyclohexenring, führte - bei vergrößerter van-der-Waals - Abstoßung zwischen den Methylgruppen - zu einer Einebnung des gesamten π -Elektronensystems. Dadurch erhielt die 5,6-Doppelbindung ihren vollen spektralen Wert, der vorher durch die Verdrillung um die 6,7-s-cis - Bindung auf etwa 1/3 eingeschränkt war.

Die koplanare Einstellung der 5,6-Doppelbindung sollte eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um 25-30 nm zur Folge haben.

Für Retinal(all-trans), 3,4-Dehydro-Retinal und 4-OH-Retinal trifft diese Voraussage zu. Die Zwischenprodukte sind um 28, 31 und 31 nm gegenüber den freien Verbindungen verschoben.

Bei 5,6-Epoxy-Retinal, bei dem die 5,6-Doppelbindung nicht mehr vorhanden ist, wird diese Verschiebung nicht mehr beobachtet.

Das Zwischenprodukt absorbiert wie die freie Verbindung.

Literatur

- 1 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. ed.
(Eds. R.E. Buchanan, N.E. Gibbons) S. 269, 1974.
Baltimore: Williams and Wilkins.
- 2 Kates, M., Yengoyan, L.S., Sastry, P.S.
Biochim. Biophys. Acta 98, 252-268, (1965)
- 3 Stoeckenius, W., Kunau, W.H.
J. Cell. Biol. 38, 337 - 357, (1968)
- 4 Oesterhelt, D., Stoeckenius, W.
Nature (London), New Biology 233, 149 - 152, (1971)
- 5 Blaurock, A.E., Stoeckenius, W.
Nature (London), New Biology 233, 152 - 154, (1971)
- 6 Oesterhelt, D., Stoeckenius, W.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2853-2857, (1973)
- 7 Oesterhelt, D., Meentzen, M., Schuhmann, L.
Europ. J. Biochem. 40, 453-463, (1973)
- 8 Oesterhelt, D., Hess, B.
Europ. J. Biochem. 37, 316-326, (1973)
- 9 Oesterhelt, D.,
Biochemistry of Sensory Functions, 25. Coll. Ges. Biol. Chem.,
Mosbach, S. 55-77, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1974
- 10 Mitchell, P.
Biol. Rev. 41, 445-502, (1966)

- 11 Mitchell, P.
J. Bioenergetics 3, 5, (1972)
- 12 Oesterhelt, D.
CIBA Foundation Symp. Energy Transformation in Biological Systems, S.147-167, (1975)
- 13 Oesterhelt, D., Krippahl, G.
FEBS-Letters 36, 72-76, (1973)
- 14 Oesterhelt, D., Schuhmann, L.
FEBS-Letters 44, 262-265, (1974)
- 15 Mendelsohn, R.
Nature (London) 243, 22, (1973)
- 16 Oesterhelt, D., Hartmann, R., Fischer, U., Michel, H., Schreckenbach, Th.
Proceedings of the 10. FEBS Meeting 40, 239 -251, (1975)
- 17 Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, Bd. 5/1d (1972)
- 18 Jungalwala, F. B., Cama, H.R.
Biochem. J. 95, 17-26 (1965)
- 19 Boehme, H.
Org. Synthesis Vol. 3, 619-621
- 20 Wald, G.
J. Gen. Physiol. 31, 489-491 (1947-48)
- 21 Ball, S., Goodwin, T.W., Norton, R.A.
Biochem. J. 42, 515-523 (1948)

- 22 Waller, G.R.
Biochemical Applications of Mass Spectrometry, S. 499
Wiley, New York (1975)
- 23 Farrar, K.R., Hamlet, J.C., Henbest, H.B., Jones, E.R.H.
J. Chem. Soc., 2657-2668 (1952)
- 24 Henbest, H.B., Jones, E.R.H., Owen, T.C., Thaller, V.
J. Chem. Soc., 2763-2767 (1955)
- 25 Schwieter, U., v. Planta, C., Rüegg, R., Isler, O.
Helv. Chim. Acta 45, 517-561 (1962)
- 26 Reedy, M.A.
Patent der Eastman Kodak Company, Am. Pat. Nr. 467 765 (1965)
- 27 Milanytch, M.
Diplomarbeit, Univ. München (1973)
- 28 Kelly, M., Norgård, S., Liaaen-Jensen, S.
Acta Chim. Scand. 24, 2169-2182 (1970)
- 29 Hartmann, R., unveröffentlicht
- 30 Bergmeyer, H.U.
Methoden der enzymatischen Analyse, S. 2039, 9. Aufl.
Verlag Chemie, Weinheim (1970)
- 31 Oesterheld, D., Schuhmann, L., Gruber, H.
FEBS Letters 44, 257-261 (1974)
- 32 Vetter, W., Englert, G., Rigassi, W., Schwieter, U.
in Carotenoids (Herausgeber: O. Isler) S. 193,
Birkhäuserverlag, Basel (1971)

- 33 Howes, C.D., Batra, P.P.
Biochim. Biophys. Acta 222, 174-179 (1970)
- 34 Reitmeier, H., unveröffentlicht
- 35 Sumper, M., Reitmeier, H., Oesterhelt, D.
Ang. Chemie 88, 203-210, (1976)
- 36 Sumper, M., unveröffentlicht
- 37 Gößwein, L., unveröffentlicht
- 38 Schreckenbach, T., unveröffentlicht
- 39 Glover, J., Redfearn, E.R.
Biochem. J. 58, XV, (1954)