

VERSUCHE ZUM MECHANISMUS DES PROTONENTRANSPORTS  
IN DER PURPURMEMBRAN VON HALOBACTERIUM HALOBIUM.  
TRITIUM- UND DEUTERIUMAUSTAUSCH AM PROTEIN-  
GEBUNDENEN RETINAL.

Diplomarbeit  
zur Diplom - Hauptprüfung für Chemiker  
von  
Liselotte Gößwein

Würzburg 1976.

Die vorliegende Diplomarbeit wurde von April 1975 bis März 1976 im Institut für Biochemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. D. Oesterhelt angefertigt.

Erklärung:

Diese Arbeit wurde selbständig angefertigt. Andere als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen wurden nicht benutzt.

L. Göpfer

## Inhaltsübersicht

1.	Einleitung und Aufgabenstellung	1
1.1.	Halobakterien	1
1.2.	Purpurmembraan und Bakteriorhodopsin	2
1.3.	Funktion der Purpurmembraan: Photochemischer Zyklus und elektrochemischer Gradient	4
1.4.	Chemisches Modell zur Erklärung der Protonenpumpe und der Farbe des Chromophors von Bakteriorhodopsin	6
1.5.	Aufgabenstellung	10
2.	Versuche zur radioaktiven Markierung der Retinalkomponente im Chromophor von Bakteriorhodopsin	11
2.1.	Einleitung	11
2.2.	Vorversuche	11
2.2.1.	Darstellung von all-trans- und 13-cis-Retinaloxim	11
2.2.2.	Extraktion von Retinaloxim aus Purpurmembraan	13
2.2.3.	Darstellung von Retinylidenbutylamin	14
2.3.	Inkubation von Purpurmembraan in Tritiumwasser unter Lichtausschluß	14
2.4.	Inkubation von Purpurmembraan in Tritiumwasser unter Belichten	16
3.	Versuche mit 4-Deutero-Retinal im Chromophor des Bakteriorhodopsins von intakten Zellen	20
3.1.	Einleitung	20
3.2.	Synthese von 4-Deutero-Retinal	20

3.2.1.	Syntheseweg	20
3.2.2.	Darstellung von Retinalenolazetat aus Retinal	21
3.2.3.	Darstellung von 4-Deutero-Retinal aus Retinalenolazetat	22
3.3.	Rekonstitution von Bakterio-Opsin mit 4-Deutero-Retinal in intakten Zellen	23
3.3.1.	Vorbemerkung	23
3.3.2.	Aufzucht von Nikotinzellen	23
3.3.3.	Rekonstitution von Bakterio-Opsin mit 4-Deutero-Retinal in Nikotinzellen und Isolierung des Bakteriorhodopsins	24
3.3.4.	Extraktion von Retinal aus Bakteriorhodopsin	26
4.	Abschließende Diskussion	28
5.	Versuche zur Chemie von Retinoretinalverbindungen	29
5.1.	Vorbemerkung	29
5.2.	Acylierung von Retinylidenbutylamin	29
5.3.	Darstellung von 4-Hydroxy-Retinal aus Retinalenolazetat	30
5.4.	Darstellung von Retinal aus Retinalenol- azetat	31
5.5.	Reduktion von Retinalenolazetat	32
5.6.	Addition von Alkohol an Retinalenolazetat	33
6.	Experimenteller Teil	35
6.1.	Geräte	35
6.2.	Material	36
6.3.	Methoden (§ 1 bis 13)	37
7.	Literaturverzeichnis	45

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

### 1.1. Halobakterien

Halophile, das heißt salzliebende Bakterien sind ein Beispiel für biologische Anpassung an extreme Umweltbedingungen. Zum optimalen Wachstum benötigen Halobakterien hohe Salzkonzentrationen, wie sie zum Beispiel auf eingesalzenen Lebensmitteln und Häuten zu finden sind oder auch in Salinen und Salzseen bei der Salzgewinnung aus dem Meer. Zur Aufzucht im Laboratorium verwendet man ein Medium, das neben Pepton Basalsalz enthält, ein Gemisch aus hauptsächlich Kochsalz und geringeren Mengen an Kalium- und Magnesiumsalzen (1).

Man entdeckte die Halobakterien aufgrund ihrer leuchtend roten Farbe, die zum Teil von ihrem Gehalt an Carotinoiden herrührt, hauptsächlich Bakterioruberin, einem  $C_{50}$ -Tetrahydroxy-Carotinoid (2). Auch  $C_{40}$ -Carotinoide, wie zum Beispiel Lycopin, die Vorstufe für  $\beta$ -Carotin, sind in Halobakterien enthalten.

Im Licht und bei Sauerstoffmangel, wie es unter ihren physiologischen Lebensbedingungen häufig der Fall ist, synthetisieren Halobakterien in verstärktem Maß ein membrangebundenes Chromoprotein, mit dessen Hilfe sie die Energie des Sonnenlichts in chemische Energie wandeln können. Sie werden damit unabhängig von der Atmungskettenphosphorylierung und gewinnen ihre lebensnotwendige Energie auf dem Wege der Photophosphorylierung (3-7).

## 1.2. Purpurmembran und Bakteriorhodopsin

Das Chromoprotein der Halobakterien findet sich in der sogenannten Purpurmembran.

In destilliertem Wasser lysieren die Halobakterienzellen (8). Nach Rohrzuckerdichtegradientenzentrifugation der Zellmembranfraktion kann neben der sogenannten Roten Membran (RM 340), die Lycopin enthält (9), hauptsächlich die violettfarbene Bande der Purpurmembran isoliert werden (10, 11). Die im Durchmesser etwa  $0,5 \mu$  großen ovalen Blätter der Purpurmembran können in intakten Zellen bis zu 50% der gesamten Bakterienzellmembran einnehmen (4). Sie weisen eine strukturelle Asymmetrie bezüglich ihrer zum Cytoplasma beziehungsweise zur Zellwand hin orientierten Oberflächen auf (12).

Die Purpurmembran besteht zu etwa 25% ihres Trockengewichts aus Lipiden, die Dihydrophytol-Äther-Analoga von Phosphatidylglycerol, -glycerophosphat, -glycerosulfat und von Glykolipid sind (13), und zu 75% aus dem Chromoprotein der Halobakterien (14). Dieses ist in einer hexagonalen Gitterstruktur in der Ebene der Membran angeordnet, wodurch deren hohe strukturelle Stabilität bedingt ist (12, 15). Die Beweglichkeit der Lipide ist eingeschränkt, es findet keine Rotation des Proteins in der Membranebene statt (16, 17).

Das Absorptionsspektrum von Purpurmembransuspensionen zeigt neben der für Proteine typischen Tryptophan-

absorptionsbande bei 280 nm eine breite Absorptionsbande im langwelligen Spektralbereich bei 560 nm. Farbträger ist das erwähnte Chromoprotein, in welchem in äquimolarer Stöchiometrie Retinal in einer vermutlich protonierten Schiff-Base-Bindung (18, 19) an einen Lysinrest des opsinartigen Proteins gebunden ist. In Analogie zu dem Sehpigment der höheren Lebewesen, Rhodopsin, trägt dieser Retinal-Protein-Komplex der Halobakterien, dessen Chromophor in seiner chemischen Struktur noch nicht genau bekannt ist, den Namen Bakteriorhodopsin (14). Man vermutet Wechselwirkungen der protonierten Retinylidenverbindung, die bei 440 nm absorbieren würde, mit Aminosäureseitenketten, vor allem Tryptophanresten des Proteins (20). Die Rotverschiebung des Absorptionsmaximums zu 560 nm wäre auch

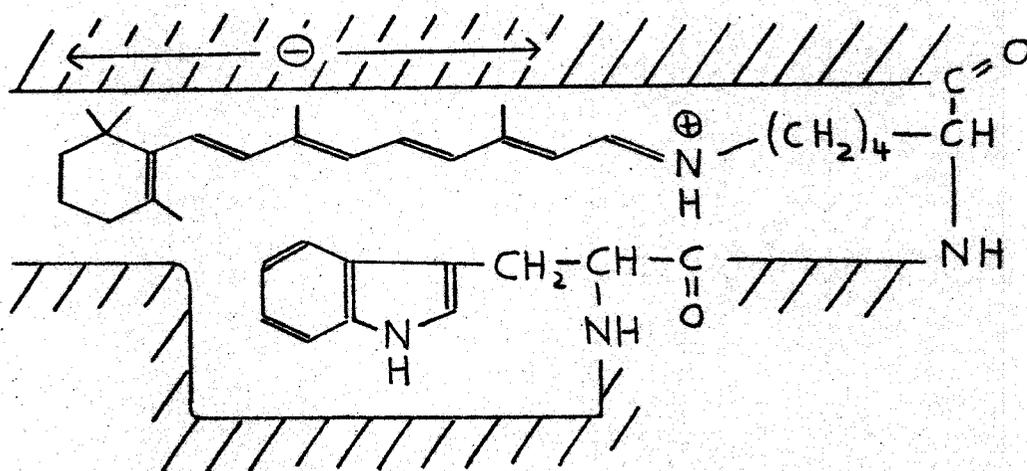


Abb. 1. Schematische Darstellung des Chromophors von Bakteriorhodopsin (20)

dadurch erklärbar, daß zur Neutralisation der positiven Ladung am Stickstoff eine negativ geladene Gruppe des Proteins dient, die in einer durch die Konformation des Proteins bedingten Entfernung von der positiven Ladung fixiert ist (20-22). Eine schematische Darstellung des Chromophors von Bakteriorhodopsin ist in Abb. 1 gegeben.

### 1.3. Funktion der Purpurmembran:

#### Photochemischer Zyklus und elektrochemischer Gradient

Bei Belichten durchläuft Bakteriorhodopsin einen photochemischen Zyklus. Der 560nm-Komplex, auch Purpurkomplex genannt (14), geht dabei im Millisekundenbereich unter Abgabe eines Protons in den sogenannten 412nm-Komplex über (23), welcher in einer Dunkelreaktion unter Aufnahme eines Protons den 560nm-Komplex zurückbildet. Abb. 2 gibt die schematische Darstellung des photochemischen Zyklus von Bakteriorhodopsin wieder, Abb. 3 die Absorptionsspektren seiner zwei langlebigsten Zwischenprodukte.

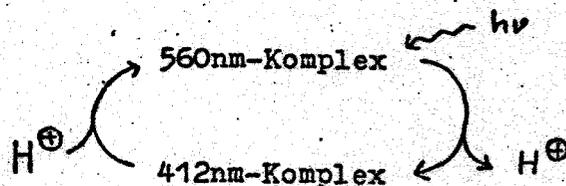


Abb. 2. Schematische Darstellung des photochemischen Zyklus von Bakteriorhodopsin (20)

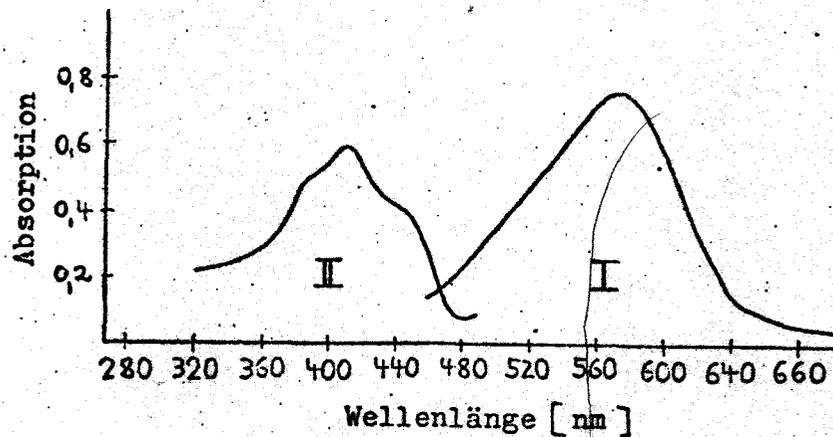
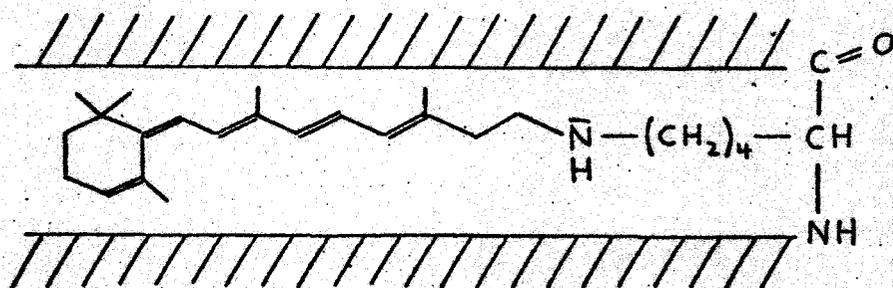


Abb. 3. Absorptionsspektren der zwei langlebigsten Zwischenprodukte des photochemischen Zyklus von Bakteriorhodopsin (24). (I) 560nm-Komplex der Purpurmembran, (II) 412nm-Komplex bei  $-196^{\circ}\text{C}$ , abgefangen aus dem Zyklus durch Kühlen einer belichteten Purpurmembranprobe

Aufgrund der asymmetrischen Orientierung des Proteins in der Membran (12) verläuft die zyklische Protonenabgabe und -aufnahme vektoriell. Es findet ein Protonentransport über die Membran statt: bei Belichten von Halobakterienzellen werden Protonen ins Medium abgegeben und von der cytoplasmatischen Seite her wieder aufgenommen (20). Dadurch wird ein elektrochemischer Gradient über die Membran aufgebaut, dessen Energie entsprechend der chemiosmotischen Hypothese von Mitchell (25, 26) von den Halobakterien zur Synthese von ATP verwendet werden kann. Die lichtgetriebene Protonenpumpe Bakteriorhodopsin kann somit durch Photophosphorylierung Lichtenergie in chemische Energie wandeln.

#### 1.4. Chemisches Modell zur Erklärung der Protonenpumpe und der Farbe des Chromophors von Bakteriorhodopsin

Bakteriorhodopsin reagiert unter Lichtausschluß nicht mit Natriumborant. Im Licht jedoch wird der Chromophor für Natriumborant zugänglich und die C=N -Doppelbindung zwischen Retinal und Bakterio-Opsin wird reduziert (27). Die erhaltene Verbindung zeigt nach Bestrahlen mit UV-Licht in ihrem Absorptionsspektrum (siehe Abb. 4) eine ausgeprägte Feinstruktur, die typisch ist für Retroretinalverbindungen, bei denen alle Doppelbindungen um eine Position auf den Ring zu verschoben sind (28). Folgende Struktur des so reduzierten Chromophors wäre denkbar:



Da dies Reduktionsprodukt sich nur beim Belichten der Purpurmembra in Gegenwart von Natriumborant bildet und, da auch der 412nm-Komplex selbst in seinem Absorptionsspektrum schwach dreigipflig erscheint, kann man auf die mögliche Beteiligung eines retrokonfigurierten Zwischenprodukts am photochemischen Zyklus schließen.

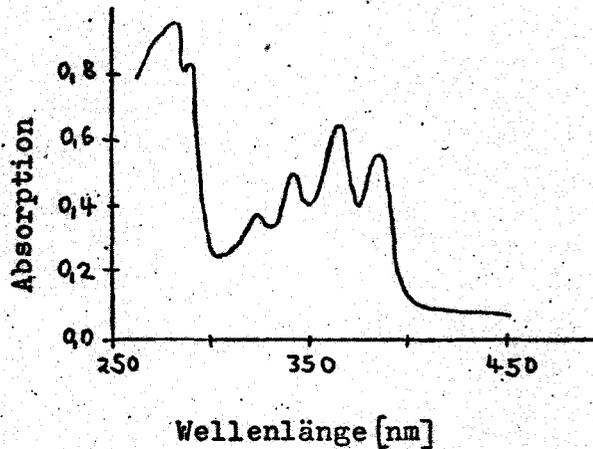
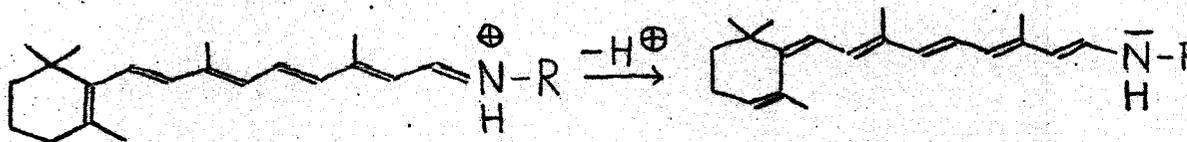


Abb. 4. Absorptionsspektrum des Reduktionsprodukts von Purpurmembran mit Natriumborant im Licht und nach anschließendem Bestrahlen mit UV-Licht (28)

Der Chromophor der Purpurmembran könnte somit über einen Wechsel der Retinalkonfiguration zwischen "normal" und "retro" am gerichteten Protonentransport durch die Membran beteiligt sein.

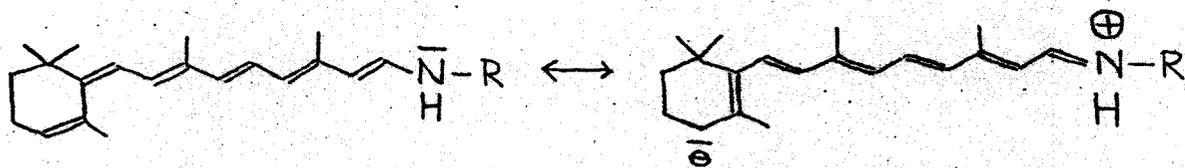
Es läßt sich folgendes chemische Modell der Protonenpumpe entwerfen:

- 1.) Im Licht gibt die Retinalkomponente des Chromophors von der 4-Stellung ihres Cyclohexenrings ein Proton ab, wobei sie in die Retrokonfiguration übergeht (siehe Abb. 5, I):



2.) Das Proton wird von einer über dem Cyclohexenring liegenden negativ geladenen Gruppe des Proteins aufgenommen und ins umgebende Medium abgegeben (siehe Abb. 5, I)

3.) In ihrer Retrokonfiguration weist die Retinalkomponente des Chromophors in einer Grenzstruktur eine Ladungstrennung über 13 Zentren auf:



In 4-Stellung des Cyclohexenrings befindet sich dabei ein Carbanion, das durch eine unter dem Cyclohexenring liegende saure Gruppe des Proteins protoniert wird (siehe Abb. 5, III).

4.) Nach Protonierung dieser Gruppe ist der Ausgangszustand wieder erreicht und der Zyklus kann erneut ablaufen (siehe Abb. 5, IV).

Voraussetzungen für einen vektoriellen Protonentransport nach diesem Pumpmodell sind also die exakte räumliche Anordnung zweier zu Protonenaufnahme und -abgabe befähigter Proteingruppen über und unter der Ebene des Cyclohexenrings sowie der genau festgelegte Unterschied ihrer  $pK_s$ -Werte. Abb. 5 illustriert die Funktionsweise des chemischen Modells der Protonenpumpe.

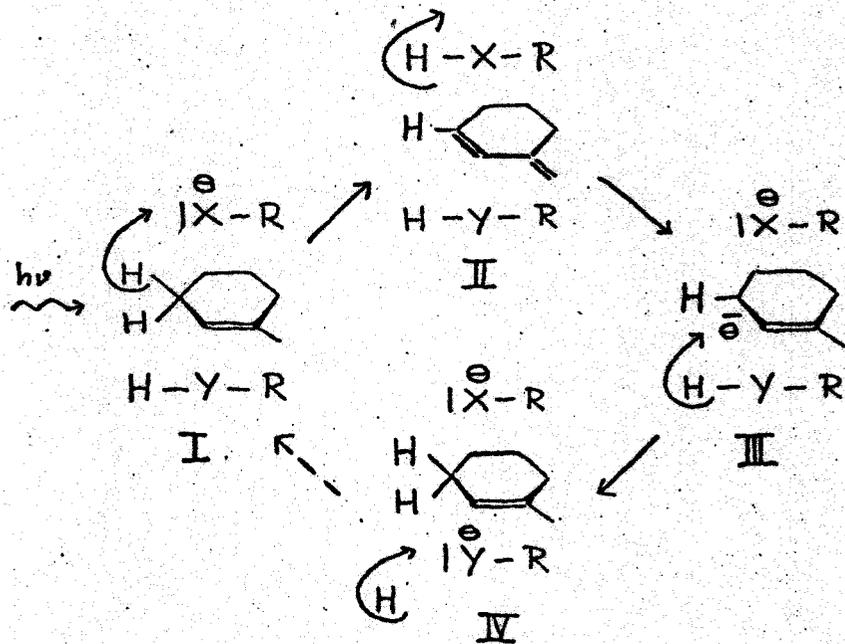
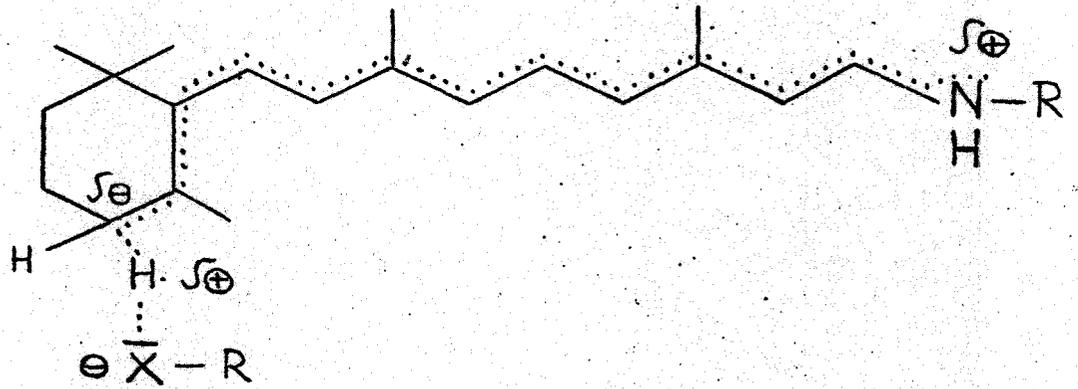


Abb. 5. Schematische Darstellung eines chemischen Modells der Protonenpumpe von Bakteriorhodopsin.- H-X-R und H-Y-R sind exakt über und unter der Ebene des Retinalcyclohexenrings lokalisierte saure Gruppen des Proteins. Der Mechanismus des Pumpmodells ist im Text beschrieben.

Die Farbe des Chromophors von Bakteriorhodopsin könnte über die in Abschnitt 1.2. erwähnten Möglichkeiten hinaus auch folgendermaßen erklärt werden:

Der im Pumpmodell vorgeschlagene Wechsel der Retinalkonfiguration zwischen "normal" und "retro" im Licht unter Abgabe eines Protons von der 4-Stellung könnte im Dunklen in einer cyaninartigen Struktur vorgebildet sein, in der dies Wasserstoffatom bereits gelockert und zwischen dem potentiellen Carbanion der Retinalkomponente und der negativ geladenen Gruppe des Proteins lokalisiert ist



### 1.5. Aufgabenstellung

Dem chemischen Modell des Chromophors von Bakteriorhodopsin zufolge muß Austausch des aziden Wasserstoffatoms in der 4-Stellung des proteingebundenen Retinals mit dem Medium gefordert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, durch Isotopenmarkierung zu prüfen, ob dieses Wasserstoffatom im Dunklen oder bei Belichten von Purpurchromophoren in markiertem Medium mit Deuterium beziehungsweise Tritium austauscht.

## 2. Versuche zur radioaktiven Markierung der Retinalkomponente des Chromophors von Bakteriorhodopsin

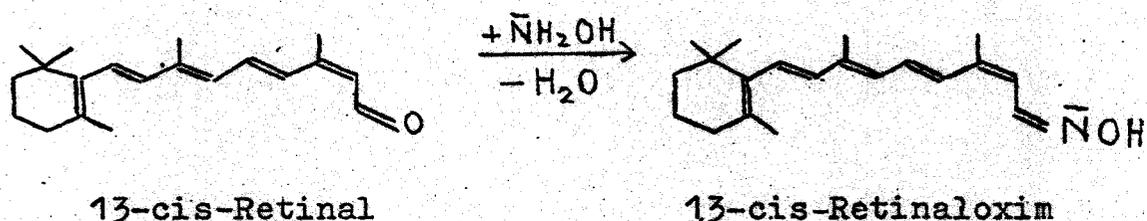
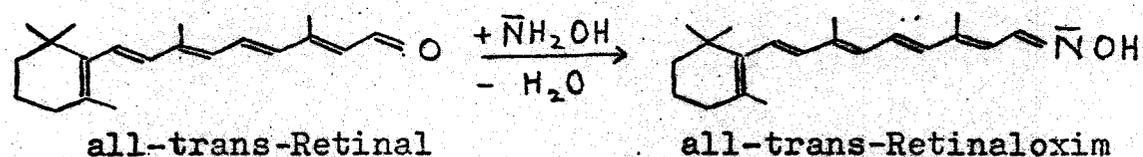
### 2.1. Einleitung

Purpurmembran wurde im Dunklen oder unter Belichten in Tritiumwasser inkubiert, Retinaloxim aus ihrem Chromoprotein extrahiert und dessen Radioaktivität bestimmt.

### 2.2. Vorversuche

#### 2.2.1. Darstellung von all-trans- und 13-cis-Retinaloxim

All-trans- und 13-cis-Retinaloxim wurden gemäß folgender Reaktionsgleichungen aus den entsprechenden Retinalen dargestellt:

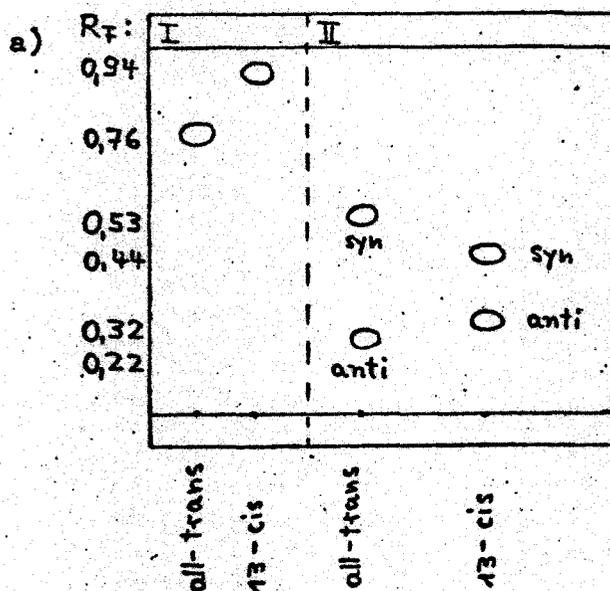


Im Dunklen wurden all-trans- und 13-cis-Retinal in äthanolischer Lösung mit Hydroxylamin versetzt und die entsprechenden Retinaloxime aus dem Reaktionsgemisch extrahiert (siehe exp. Teil § 2).

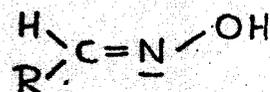
Die Ergebnisse der spektroskopischen und dünnschichtchromatographischen Untersuchungen sind in Tab. 1 und Abb. 6 dargestellt.

Tab. 1. Spektroskopische Daten von isomeren Retinalen und Retinaloximen in Äthanol

Verbindung	$\lambda_{\max}$ [nm]	Lit.	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\epsilon_{\text{mol}}$
all-trans-Retinal	384	(29)	383	42 900
13-cis-Retinal	373	(30)	375	35 500
all-trans-Retinaloxim	356	(29)	355	60 400
13-cis-Retinaloxim	355	(31)	356	54 900



b) syn-Retinaloxim



anti-Retinaloxim

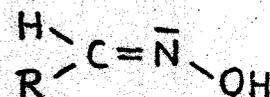


Abb. 6. a) Dünnschichtchromatogramm von isomeren Retinalen (I) und Retinaloximen (II) auf Kieselgel (Laufmittel: 15% Methylheptenon in Petroläther (40-60°C)), b) Strukturformeln der C=N-isomeren Retinaloxime. Die Zuordnung von syn- und anti-Konfiguration zu den jeweiligen C=N-isomeren Retinaloximen erfolgte durch NMR-Spektroskopie (39).

### 2.2.2. Extraktion von Retinaloxim aus Purpurmembran

Bakteriorhodopsin reagiert im Dunklen nicht mit Hydroxylamin. Denaturiert man jedoch das Chromoprotein mit einem Detergens, zum Beispiel Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), so wird die C=N -Doppelbindung zwischen Retinal und Bakterio-Opsin für Hydroxylamin zugänglich und es kann Retinaloxim extrahiert werden (31).

Unter Lichtausschluß ist ein Isomerengemisch von all-trans und 13-cis-Retinal, im Licht nur all-trans-Retinal an der Chromophorbildung von Bakteriorhodopsin beteiligt (31). So konnten aus belichteter Purpurmembran zwei Retinaloxime (all-trans, jeweils syn und anti), aus dunkel adaptierter Purpurmembran jedoch vier Retinaloxime (all-trans und 13-cis, jeweils syn und anti) isoliert werden (siehe exp. Teil § 1 und 3). Die Beteiligung dieser vier Isomeren wurde durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt.

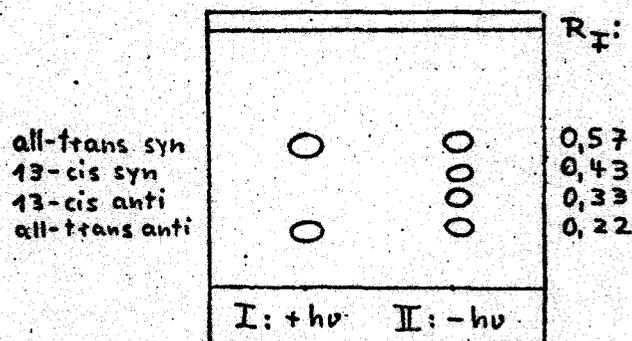
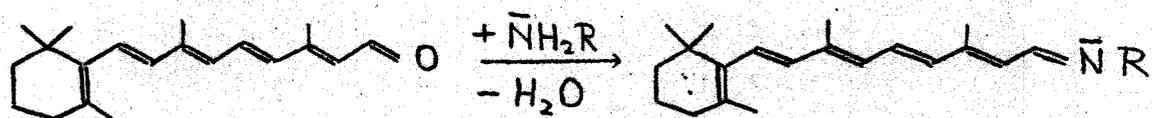


Abb. 7. Dünnschichtchromatogramm von Retinaloximen, die aus lichtadaptierter (I) bzw. dunkeladaptierter Purpurmembran (II) extrahiert wurden (Platte: Kieselgel, Laufmittel: 15% Methylheptanon in Petroläther (40-60°C))

### 2.2.3. Darstellung von Retinylidenbutylamin

Für spätere Kontrollversuche wurde Retinylidenbutylamin als Modellsubstanz für das Retinylidenprotein Bakteriorhodopsin dargestellt. Die Synthese erfolgte gemäß nachstehender Reaktionsgleichung:



Genaue Versuchsbeschreibung und Charakterisierung des Reaktionsprodukts sind im exp. Teil § 4 gegeben.

### 2.3. Inkubation von Purpurmembran in Tritiumwasser unter Lichtausschluß

Eine konzentrierte Purpurmembransuspension wurde unter totalem Lichtausschluß in Tritiumwasser inkubiert. Im Kontrollversuch wurden Wasser, Retinaloxim und Retinylidenbutylamin analog behandelt. Nach einer Stunde wurde die Reaktionsmischung mit Hydroxylamin und einem Detergens versetzt und nach halbstündiger Reaktionszeit das entstandene Retinaloxim nach Zugabe von Äthanol mit Petroläther extrahiert. Ausfallendes Protein verblieb dabei in der wässrigen Phase. Um mitgerissenes Tritiumwasser in der organischen Phase möglichst auszuschließen, wurden

die vereinigten Petrolätherextrakte über Natriumsulfat getrocknet, der Überstand eingeengt und 16 Stunden im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Eine genaue Versuchsbeschreibung ist im exp. Teil § 6 gegeben.

Es wurde mit Volumina von 10 bis 200  $\mu$ l Purpurmembransuspension gearbeitet. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen betrug die Ausbeute an extrahiertem Retinaloxim im Durchschnitt 75%. Anhand der spezifischen Radioaktivität des eingesetzten Tritiumwassers und unter der Annahme eines 1:1 -Einbaus von Tritium in das Retinal wurde die jeweils zu erwartende Radioaktivität des Petrolätherextrakt bestimmt und mit dem Experiment verglichen.

Die Messung der Radioaktivität der Proben erfolgte wie im exp. Teil § 5 beschrieben. Die Zählausbeute für Tritium betrug 40%.

Die Ergebnisse des obigen Versuchs sind in Tab. 2 dargestellt. Aus ihr ist ersichtlich, daß weniger als 5% der erwarteten Radioaktivität im Retinaloximextrakt aus dunkeladaptierter Purpurmembran gefunden wurde. Die erhaltenen Werte unterscheiden sich nicht von den Ergebnissen der Kontrollversuche und liegen innerhalb der Fehlergrenze, die durch das Mitreißen von Tritiumwasser bei der Extraktion von Retinaloxim bedingt ist.

Tab. 2. Inkubation von Purpurchromophoren in Tritiumwasser unter Lichtausschluß. Ergebnisse von 7 unabhängigen Versuchen und jeweils 3 Kontrollversuchen. Die Petrolätherextrakte wurden erhalten wie im exp. Teil § 6 beschrieben, getrocknet und direkt zur Radioaktivitätsmessung eingesetzt.

Proben		Radioaktivität im Petrolätherextrakt [dpm]
ERWARTUNGSWERT:		7 550
Purpurchromophoren in Tritiumwasser	I	223
	II	198
	III	490
	IV	246
	V	387
	VI	625
	VII	281
KONTROLLVERSUCHE:		
Tritiumwasser	I	390
	II	165
	III	301
Retinaloxim	I	305
	II	265
	III	650
Retinyliden- butylamin	I	283
	II	268
	III	365

#### 2.4. Inkubation von Purpurchromophoren in Tritiumwasser unter Belichten

Konzentrierte Purpurchromophorensuspensionen wurden unter Lichtausschluß eine Stunde in Tritiumwasser inkubiert, dann zwischen einer Sekunde und zwei Stunden belichtet und Retinaloxim extrahiert (siehe exp. Teil § 7a).

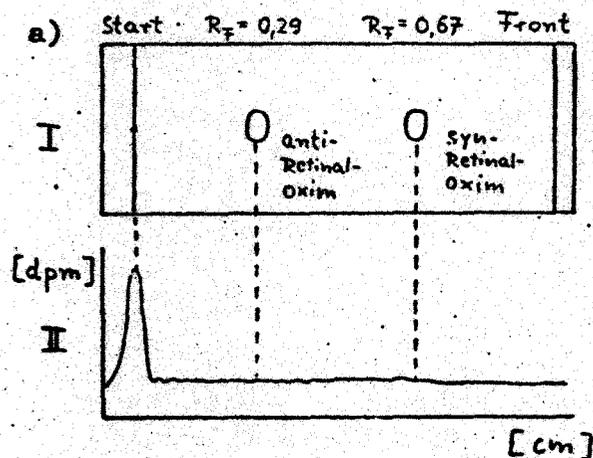
Tab. 3 gibt die Ergebnisse einer repräsentativen Versuchreihe und dreier Kontrollversuche wieder.

Tab. 3. Inkubation von Purpurchromat in Tritiumwasser unter Belichten. Ergebnisse einer repräsentativen Versuchreihe und dreier Kontrollversuche. Die Petrolätherextrakte wurden erhalten wie im exp. Teil § 7a beschrieben, getrocknet und direkt zur Radioaktivitätsmessung eingesetzt.

Proben	Belichtungs- dauer	Radioaktivität im Petroläther- extrakt [dpm]
ERWARTUNGSWERT:		37 750
Purpurchromat in Tritiumwasser	I 1 sec	820
	II 2	1 212
	III 5	1 139
	IV 10	678
	V 20	1 220
	VI 1 min	1 345
	VII 2	3 795
	VIII 5	1 019
	IX 10	532
	X 20	2 666
	XI 60	1 081
	XII 120	973
KONTROLLVERSUCHE:		
Tritiumwasser	I	589
	II	1 182
	III	712

Wie Tab. 3 zeigt, wurde keine von der Belichtungsdauer abhängige Zunahme der Radioaktivität beobachtet. Die erhaltenen Werte streuen zwischen 500 und 1500 dpm, das heißt zwischen 1 und 4% des Erwartungswertes und entsprechen in ihrer Größenordnung dem Blindwert.

Um zu untersuchen, ob die gemessene Radioaktivität der Proben durch beim Extrahieren mitgerissenes Tritiumwasser oder durch radioaktiv markiertes Retinaloxim bedingt war, wurde eine weitere Probe (siehe exp. Teil § 7b) unter Zugabe von Retinaloxim als Trägermaterial der Dünnschichtchromatographie unterworfen. Die Radioaktivität der Dünnschichtplatte wurde mit Hilfe eines Dünnschichtscanners lokalisiert. Abb. 8 illustriert das Ergebnis des Versuchs.



b) Radioaktivität im  
Petrolätherextrakt  
erwartet:  
755 000 dpm  
gefunden:  
34 000 dpm

Abb. 8. a) Dünnschichtchromatogramm von aus Purpurchromatographie membran extrahiertem Retinaloxim unter Zugabe von Trägermaterial (I) (Platte: Kieselgel, Laufmittel: 15% Methylheptanon in Petroläther (40-60°C)). Die Purpurchromatographie membranprobe wurde im Licht in Tritiumwasser inkubiert und Retinaloxim extrahiert wie im exp. Teil § 7b beschrieben. Die Verteilung der Radioaktivität auf der Dünnschichtplatte wurde mit Hilfe eines Dünnschichtscanners untersucht (II) (Nachweisgrenze der Methode für Tritium: <1000 dpm), b) Erwartete und gefundene Radioaktivität im Petrolätherextrakt

Wie aus Abb. 8 ersichtlich, konnte Radioaktivität nur am Start, nicht jedoch im Retinaloxim nachgewiesen werden. Die in den Petrolätherextrakten gemessene Radioaktivität ist somit wahrscheinlich auf mitgerissenes Tritiumwasser zurückzuführen.

In weiteren Kontrollversuchen wurde das extrahierte Retinaloxim durch präparative Dünnschichtchromatographie und Säulenchromatographie isoliert. In so gereinigtem Material wurde keine Radioaktivität gefunden.

### 3. Versuche mit 4-Deutero-Retinal im Chromophor des Bakteriorhodopsins von intakten Zellen

#### 3.1. Einleitung

In Retinaloximextrakten aus Purpurmembran, die im Dunkeln oder unter Belichten in Tritiumwasser inkubiert wurde, konnte in keinem Fall Radioaktivität nachgewiesen werden.

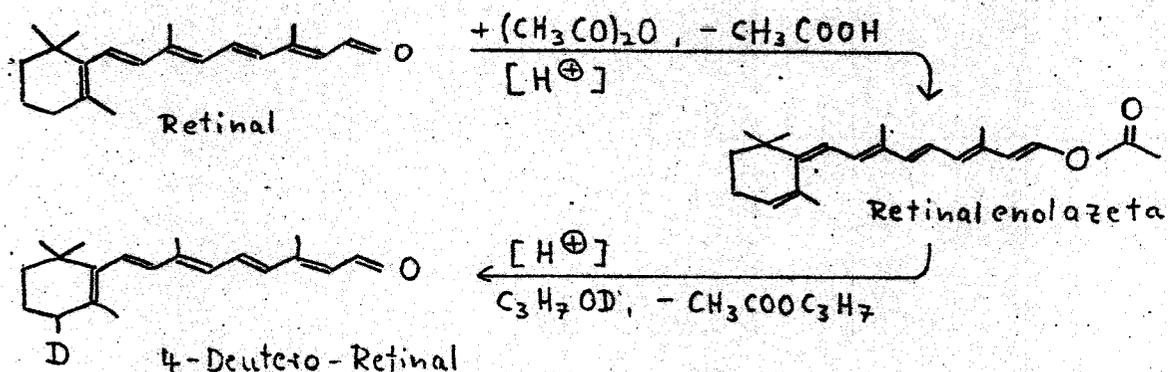
Im Folgenden wurde daher ein in 4-Stellung mit Deuterium markiertes Retinal in den Chromophor von Bakteriorhodopsin eingebaut und geprüft, ob nach Belichten der so modifizierte Purpurmembran und Rückisolation des Retinals dessen Markierung erhalten geblieben ist.

#### 3.2. Synthese von 4-Deutero-Retinal

##### 3.2.1. Syntheseweg

Ein in 4-Stellung deuteriertes Retinal wurde dargestellt, indem aus einer in der Retrokonfiguration fixierten Retinalverbindung in deuteriertem Lösungsmittel Retinal zurückgewonnen wurde.

Die Synthese erfolgte gemäß nachstehendem Reaktionsschem



### 3.2.2. Darstellung von Retinalenolazetat aus Retinal

Zur Darstellung von kleinen Mengen an Enolazetat auf dem Wege der säurekatalysierten Acylierung wurde die Literaturvorschrift (35) folgendermaßen modifiziert:

Eine gekühlte Ätherlösung von Retinal wurde mit einem großen Überschuß Acetanhydrid und katalytischen Mengen Bromwasserstoffsäure versetzt. Nach 90 Minuten Stehen unter Stickstoff bei 5°C war die Reaktion beendet. Das überschüssige Acetanhydrid wurde durch alkalische Hydrolyse entfernt und Retinalenolazetat extrahiert (genaue Versuchsbeschreibung siehe exp. Teil § 8).

Das Reaktionsprodukt wurde spektroskopisch und dünn-schichtchromatographisch untersucht: Abb. 9 zeigt das Absorptionsspektrum, in Tab. 4 sind charakteristische Signale des Massenspektrums gegeben, Tab. 5 illustriert das dünn-schichtchromatographische Verhalten.

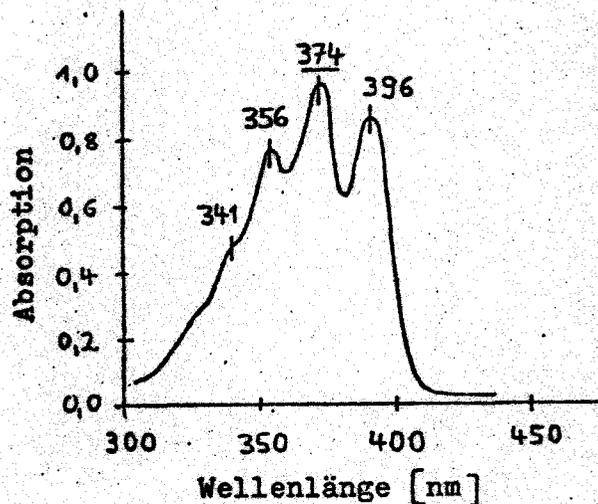


Abb. 9. Absorptionsspektrum von Retinalenolazetat in Äthanol ( $\lambda_{\text{max}} = 356, \underline{374}, 396$ ;  $\epsilon_{\text{mol}} = 63\ 000$ )

Tab. 4. Massenspektrum von Retinalenolazetat. Angegeben sind die Massenzahlen M/e für das Molekülion  $M^{\oplus}$  und 3 weitere charakteristische Bruchstücke.

M/e	Interpretation
326	$M^{\oplus}$
284	$M^{\oplus} - CH_2=C=O(42)$
266	$M^{\oplus} - CH_2=C=O(42) - H_2O(18)$
251	$M^{\oplus} - CH_2=C=O(42) - H_2O(18) - CH_3(15)$

Tab. 5. Dünnschichtchromatogramm von Retinal und Retinalenolazetat auf Kieselgel (Laufmittel: Benzol)

Verbindung	$R_F$	Farbe unter UV-Licht
Retinal	0,26	dunkelgelb
Retinal- enolazetat	0,54	hellorange

### 3.2.3. Darstellung von 4-Deutero-Retinal aus Retinalenolazetat

4-Deutero-Retinal wurde aus Retinalenolazetat durch saure Umesterung dargestellt.

Retinalenolazetat wurde in Äther und Deutero-Isopropanol mit Eisessig und katalytischen Mengen Bromwasserstoffsäure versetzt und mehrere Stunden unter Stickstoff bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt wurde extrahiert, durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt und als Retinal identifiziert (siehe exp. Teil

Das in Abb. 10 dargestellte Massenspektrum der Verbindung weist einen 35% -igen Deuterierungsgrad auf.

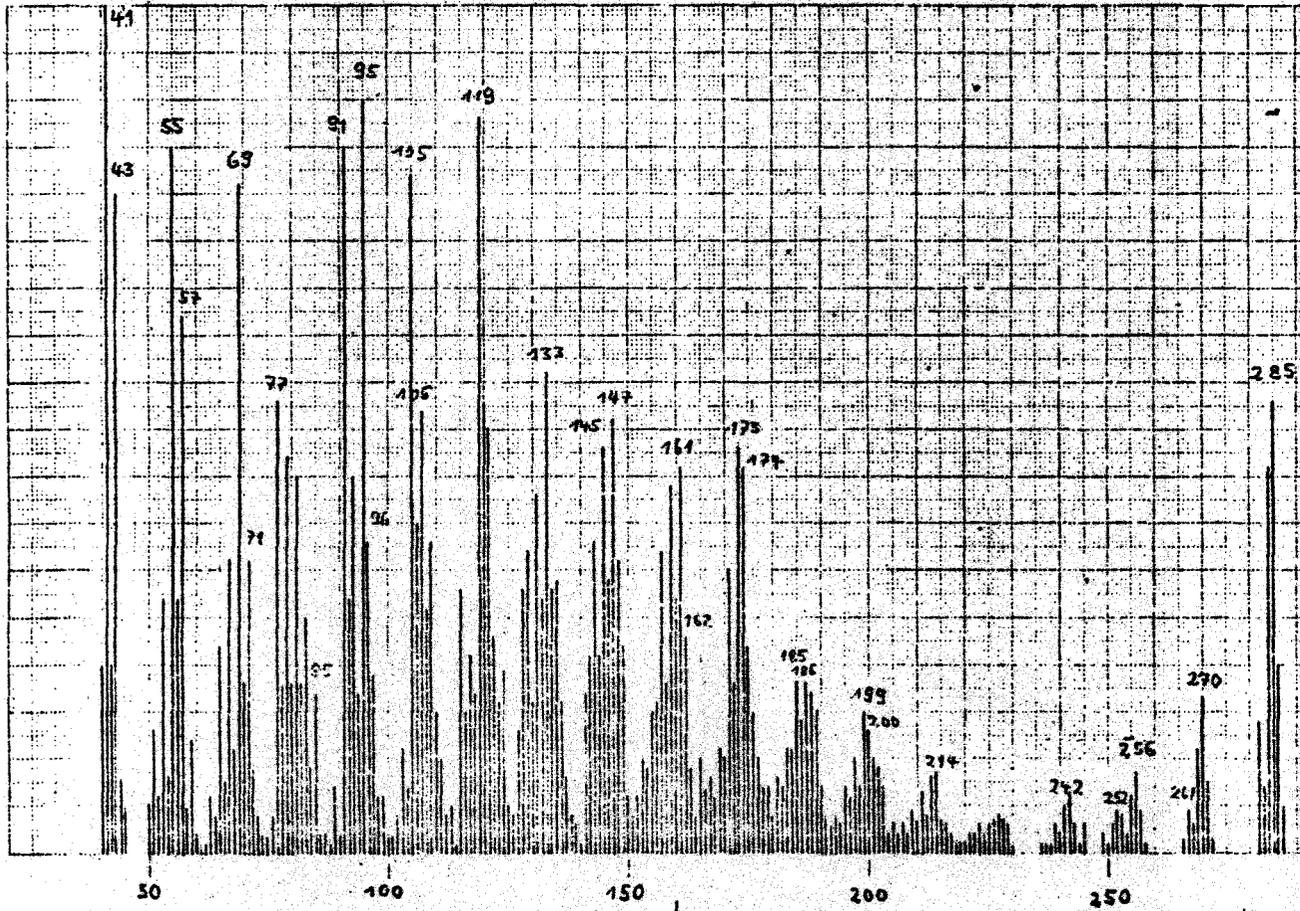


Abb. 10. Massenspektrum von 4-Deutero-Retinal, dargestellt aus Retinalenolazetat durch saure Umesterung

Die für Retinal charakteristischen Signale für die Massenzahlen  $M/e = 284, 269, 255...$  sind von den jeweiligen Isotopenpeaks der Massenzahlen  $(M + 1)/e$  begleitet.

Der Nachweis der Deuterierung in der 4-Stellung des Retinal erfolgte durch Vergleich der NMR- und IR-Spektren von authentischem und deuteriertem Retinal.

### 3.3. Rekonstitution von Bakterio-Opsin mit

#### 4-Deutero-Retinal in intakten Zellen

##### 3.3.1. Vorbemerkung

Werden Halobakterien in nikotinhaltigem Medium gezüchtet, so synthetisieren sie anstelle des Bakteriorhodopsins das retinalfreie Bakterio-Opsin, da die Zyklisierung von Lycopin, der Vorstufe von Retinal, durch Nikotin gehemmt ist (36). Wird Retinal zu diesen sogenannten Nikotinzellen gegeben, so bindet das Bakterio-Opsin Retinal unter Bildung von Bakteriorhodopsin.

Unter diesen Bedingungen ist Bakteriorhodopsin jedoch nicht wie in der Purpurmembran in einer kristallinen Anordnung organisiert, sondern liegt in der sogenannten Braunen Membran vermutlich als Protein-Lipid-Gemisch vor. Ermöglicht man den Bakterien die Gewinnung metabolischer Energie, so wird Purpurmembranbildung beobachtet (36).

##### 3.3.2. Aufzucht von Nikotinzellen

Sterilisiertes nikotinhaltiges Medium wurde mit einem Nikotinzellen-Inokulum angeimpft. Die Aufzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C im Licht und unter Belüften. Der Bakterio-Opsin-Gehalt der Nikotinzellen wurde zu verschiedenen Zeiten ihres Wachstums durch Rekonstitution von Zellysatproben mit überschüssigem Retinal bestimmt (siehe Abb. 11).

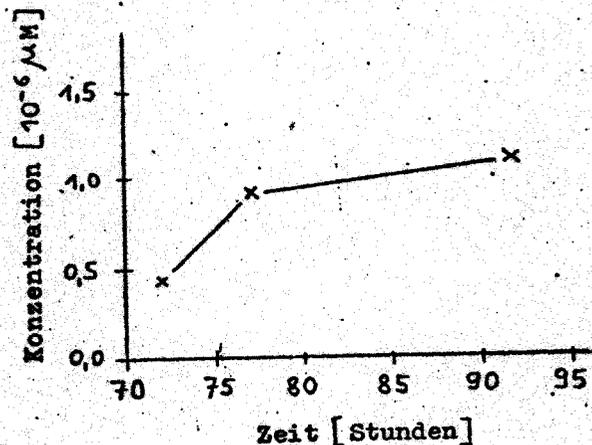


Abb. 11. Bakterio-Opsin-Konzentration der Nikotinzellen zu verschiedenen Zeiten ihres Wachstums. Bestimmt durch Rekonstitution von Zellysatproben mit überschüssige Retinal. Die Aufzucht der Nikotinzellen erfolgte wie im exp. Teil § 10 beschrieben.

Aus Abb. 11 geht hervor, daß in den Nikotinzellen nach 93 Stunden eine Sättigungskonzentration von Bakterio-Opsin erreicht wurde. Die Bakterien wurden daher durch Zentrifugation geerntet und in nikotinhaltigem Basalsalz resuspendiert (Versuchsbeschreibung siehe exp. Teil § 10).

Die Abwesenheit von Purpurchromophoren in den erhaltenen Nikotinzellen wurde durch die folgenden Versuche belegt: Bei Sauerstoffzufuhr konnte ATP-Synthese, unter Stickstoff jedoch keine lichtabhängige Photophosphorylierung nachgewiesen werden.

### 3.3.3. Rekonstitution von Bakterio-Opsin mit 4-Deutero-Retinal in Nikotinzellen und Isolierung des Bakteriorhodopsins

Eine Nikotinzellensuspension in nikotinhaltigem Basalsalz wurde mit einem auf ihren Bakterio-Opsin-Gehalt be-

zogenen geringen Überschuß an 4-Deutero-Retinal in konzentrierter äthanolischer Lösung versetzt und zur "Auskristallisation" von Bakteriorhodopsin zur Purpurchromophore nach Zugabe von Alanin über Nacht bei 37°C im Licht gut geschüttelt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet, in destilliertem Wasser unter Zugabe von DNase lysiert und die Bakteriorhodopsinkonzentration spektroskopisch bestimmt (siehe Abb. 12). Eine genaue Versuchsbeschreibung ist im exp. Teil § 11 gegeben.

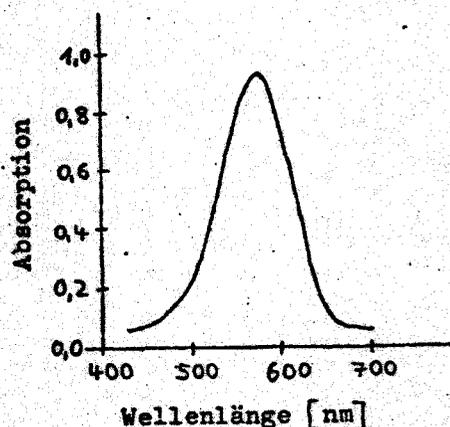


Abb. 12. Purpurkomplexbande im Differenzspektrum der Lysate von Nikotinzellen und rekonstituierten Nikotinzellen. Die Bedingungen des Wachstums und der Rekonstitution der Nikotinzellen sind im exp. Teil § 10 u. 11 beschrieben.

Das Lysat wurde durch Rohrzuckerdichtegradientenzentrifugation aufgearbeitet wie in Lit. (11) angegeben. Das Ergebnis ist in Abb. 13 dargestellt.

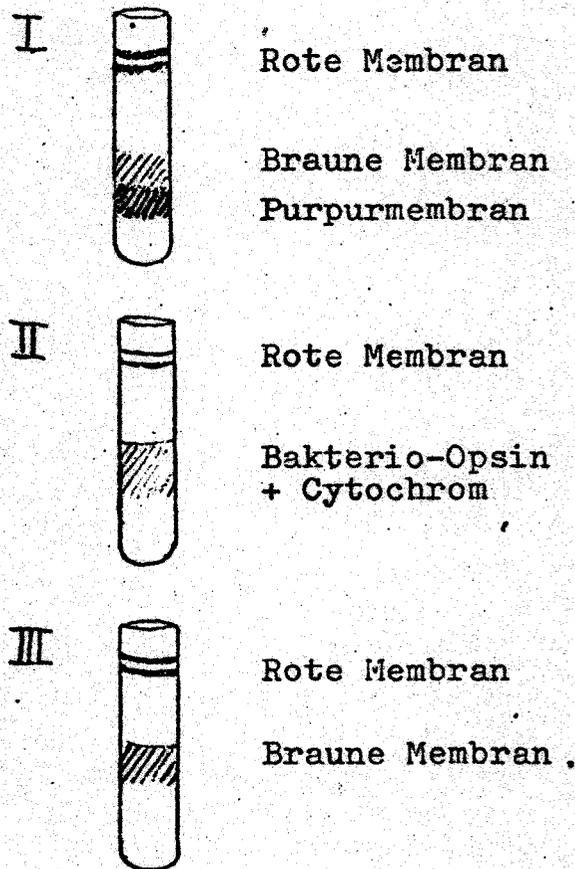


Abb. 13. Rohrzungerdichtegradienten der Lysate von mit 4-Deuterc-Retinal rekonstituierten Nikotinzellen (I), Nikotinzellen (II) und Nikotinzellen unter Zugabe von Retinal zum Lysat (III).

Der in Abb. 13 I gezeigte Gradient wurde fraktioniert und die vereinigten Fraktionen von Brauner und Purpurmembraan isoliert (vgl. Lit. (11)).

#### 3.3.4. Extraktion von Retinal aus Bakteriorhodopsin

Braune Membran und Purpurmembraan aus mehreren Rekonstitutionsansätzen wurden in Kaliumphosphatpuffer resuspendiert und eine Stunde belichtet.

Nach Zugabe von Chloroform, Methanol und Wasser wurde Retinal extrahiert und das erhaltene Rohprodukt durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt (Versuchsbeschreibung siehe exp. Teil § 12).

Das Massenspektrum des extrahierten Retinals unterscheidet sich in seinem Deuterierungsgrad nicht von dem des eingesetzten 4-Deutero-Retinals.

#### 4. Abschließende Diskussion

Im Retinaloximextrakt aus dunkeladaptierter Purpurmembransuspension in Tritiumwasser wurde keine Radioaktivität gefunden. Auch nach Belichten konnte weder ein EINBAU von Tritium in die 4-Stellung der Retinalkomponente von Bakteriorhodopsin noch ein AUSBAU von Deuterium aus einem mit 4-Deutero-Retinal rekonstituierten Bakteriorhodopsin nachgewiesen werden. Diesen Ergebnissen zufolge fungiert die 4-Stellung des Retinalcyclohexenrings von Bakteriorhodopsin nicht als Schaltstelle für den lichtinduzierten gerichteten Protonentransport durch die Membran. Durch die Versuche wurden jedoch nicht das Vorliegen einer cyaninartigen Struktur des Chromophors im Dunkeln und auch nicht die Beteiligung eines retrokonfigurierten Zwischenprodukts am photochemischen Zyklus ausgeschlossen, da das Wasserstoffatom in der 4-Stellung des Retinals durch das umgebende Protein so abgeschirmt sein könnte, daß kein Austausch mit dem Medium stattfindet.

Durch Rekonstitution von Bakterio-Opsin mit modifizierten Retinalen, zum Beispiel 3,4-Dehydro-, 4-Hydroxy- und 5,6-Epoxy-Retinal, konnten in neuester Zeit modifizierte Bakteriorhodopsine dargestellt werden (37). Durch Untersuchungen an diesen Verbindungen müßte sich zeigen lassen inwieweit photochemischer Zyklus oder Protonenpumpe abhängig sind von der Fähigkeit der modifizierten Retinalkomponente, in ein retrokonfiguriertes Zwischenprodukt überzugehen.

## 5. Versuche zur Chemie von Retroretinalverbindungen

### 5.1. Vorbemerkung

Im Zusammenhang mit der Darstellung von Retinalenolazetat und der Untersuchung seines chemischen Verhaltens wurden die folgenden Reaktionen durchgeführt:

Acylierung von Retinylidenbutylamin,

Darstellung von 4-Hydroxy-Retinal und von Retinal aus Retinalenolazetat,

Reduktion von Retinalenolazetat und

Addition von Alkohol an Retinalenolazetat.

### 5.2. Acylierung von Retinylidenbutylamin

In Analogie zur Darstellung von Retinalenolazetat wurde in einem Küvettenvorversuch Retinylidenbutylamin nach-

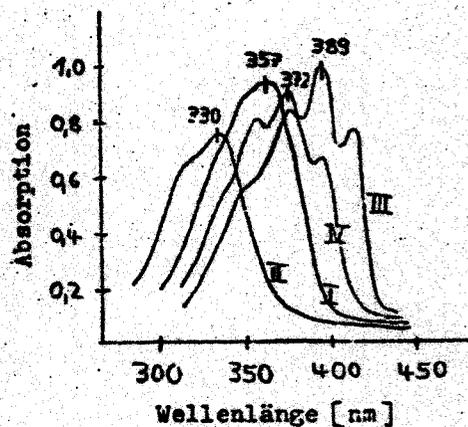
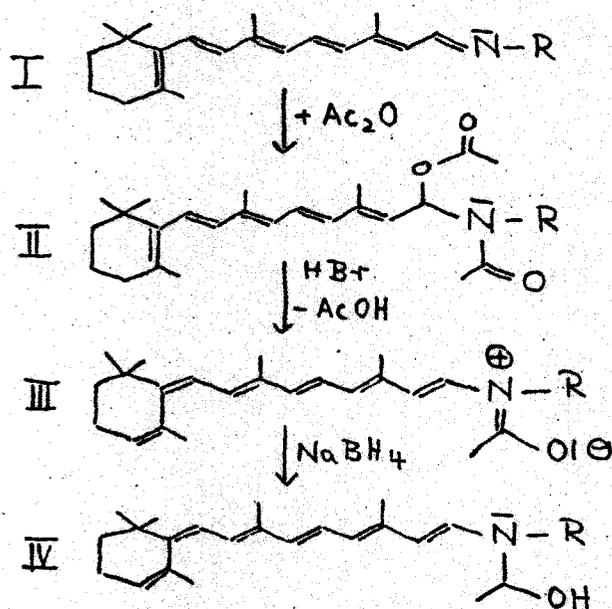


Abb. 14. Absorptionsspektren von Retinylidenbutylamin in Äther (I), nach Zugabe von Acetanhydrid zu I (II), nach Zugabe von HBr zu II (III) und nach Zugabe von Natriumborant zu III (IV)

einander mit Acetanhydrid, Bromwasserstoffsäure und Natriumborant versetzt. Man erhielt die in Abb. 14 dargestellte Spektrenserie.

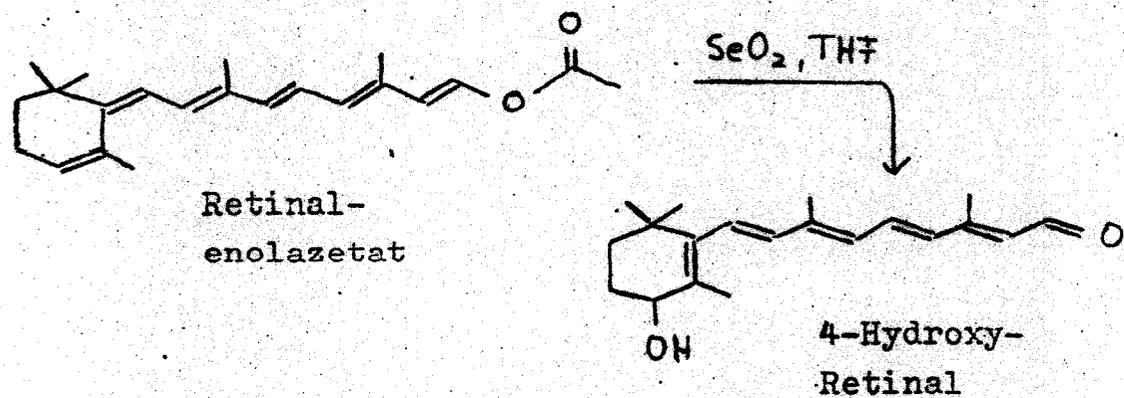
Der Reaktionsverlauf könnte wie folgt erklärt werden:



### 5.3. Darstellung von 4-Hydroxy-Retinal aus Retinalenolazetat

Aus Retinalenolazetat wurde 4-Hydroxy-Retinal (35) dargestellt, ein für Versuche der Rekonstitution von Bakteriopsin interessantes modifiziertes Retinal.

Die Darstellung erfolgte gemäß nachstehender Reaktionsgleichung:



Retinalenolazetat wurde in Tetrahydrofuran gelöst, mit einem Überschuß an feinverteiltem Selendioxyd versetzt und über Nacht unter Stickstoff bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt wurde extrahiert und gereinigt (siehe exp. Teil § 13).

Seine Absorptionsmaxima sind:

- 375 nm in Isopropanol
- 372 nm in Äthanol
- 360 nm in Diäthyläther
- 357 nm in Petroläther

#### 5.4. Darstellung von Retinal aus Retinalenolazetat

Retinal konnte aus Retinalenolazetat auch auf dem Wege der alkalischen Umesterung dargestellt werden.

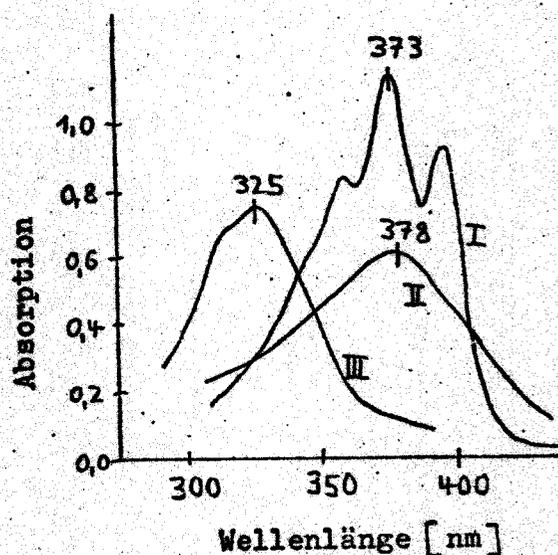


Abb. 15. Absorptionsspektren von Retinalenolazetat in Äthanol (I), nach Zugabe von Natriumäthanolat zu I (II) und nach Zugabe von Natriumborant zu II (III)

Zu einer Retinalenaolazetatlösung in Alkohol (Äthanol, Isopropanol, Tertiärbutanol) wurde das entsprechende Alkoholat gegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit Äther versetzt und mit Kalilauge, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Das getrocknete Reaktionsprodukt wurde als Retinal identifiziert. In einem Küvettenversuch erhielt man die in Abb. 15 dargestellte Spektrenserie.

### 5.5. Reduktion von Retinalenolazetat

Da die Reduktion von Retinal zu Retinol bei seiner Darstellung aus Retinalenolazetat zur Identifizierung des Reaktionsprodukts herangezogen wurde, mußte auch das Verhalten von Retinalenolazetat selbst gegenüber Reduktionsmitteln untersucht werden.

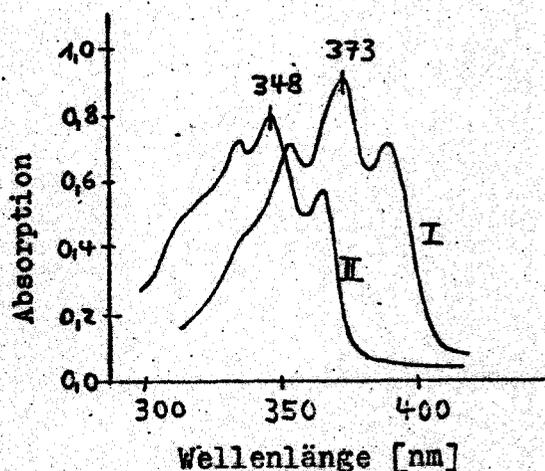
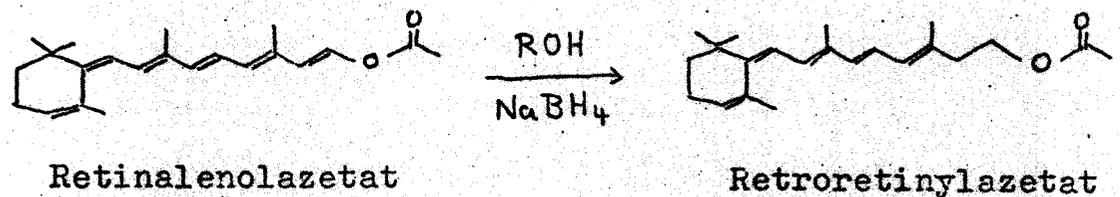


Abb. 16 . Absorptionsspektren von Retinalenolazetat in Methanol (I) und nach Zugabe von Natriumborant (II)

In einem Küvettenvorversuch wurde Retinalenolazetat mit Natriumborant versetzt. Die erhaltenen Absorptionsspektren sind in Abb. 16 wiedergegeben.

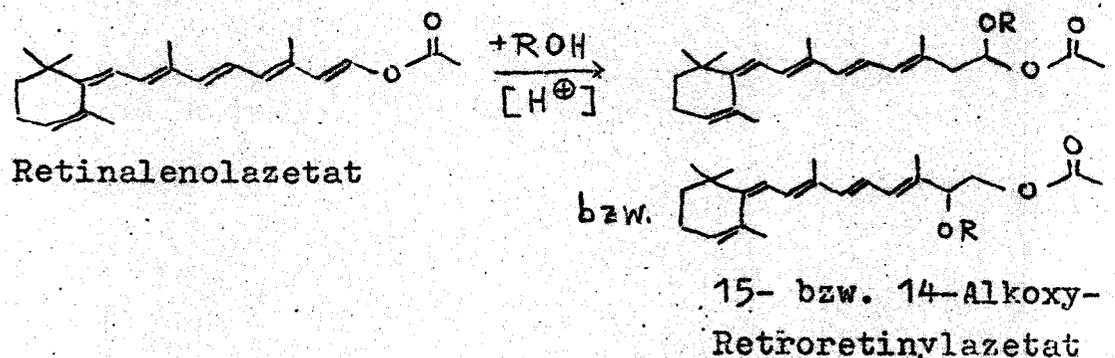
Es kann eine Reduktion von Retinalenolazetat mit Natriumborant gemäß folgender Reaktionsgleichung angenommen werden:



#### 5.6. Addition von Alkohol an Retinalenolazetat

Bei längerem Stehen von Retinalenolazetat in absolutem Alkohol (Methanol, Äthanol, Isopropanol), bevorzugt aber bei Zugabe von katalytischen Mengen Säure (HCl, HBr, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) zu diesen Lösungen, wurde eine Verschiebung des Absorptionsmaximums um 25 nm zu kürzeren Wellenlängen unter Beibehaltung der dreigipfligen Erscheinungsform des Absorptionsspektrums beobachtet (siehe Abb. 17).

In Analogie zu den Beobachtungen von Oroschnik bei Anhydroretinol (38) könnte eine Addition von Alkohol an die 14,15-Doppelbindung des Retinalenolazetats diskutiert werden:



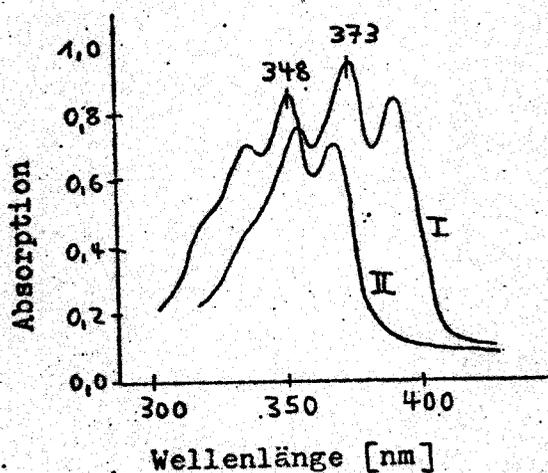


Abb. 17. Absorptionsspektren von Retinalenolazetat in Methanol (I) und nach Zugabe von katalytischen Mengen Salzsäure (II)

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1. Geräte

Zur Messung der Radioaktivität wurde ein Packard Tricarb Flüssigkeitsszintillations-Spektrophotometer (Modell 3320) verwendet.

Für die Aufnahme des Dünnschichtradiogramms danke ich Frau G. Degen. Die Verteilung der Radioaktivität auf der Dünnschichtplatte wurde mit Hilfe eines Radio-dünnschichtscanners der Firma Bertholt-Frieseke bestimmt.

Zur Belichtung der Proben wurde eine Tischlampe (weißes Licht, 60 W) bzw. eine 900 W Xenon- Hochdrucklampe von Osram, 1  $\text{CuSO}_4$  Filter (5%-ige Lösung, 2 cm Schichtdicke), 1 OG 515 Filter (Schott) verwendet.

Die Absorptionsspektren wurden mit einem Beckman DB-G Grating Spectrophotometer aufgenommen.

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

## 6.2. Material

### Chemikalien:

All-trans- und 13-cis-Retinal waren Geschenke der BASF.  
Tritiumwasser wurde vom Radiochemical Centre,  
Amersham, England, bezogen.

Für die Versuche wurden Chemikalien und Lösungsmittel  
des höchsten erhältlichen Reinheitsgrads verwendet.

### Toluolszintillationslösung:

5 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 0,5 g POPOP (1,4-Bis-  
(5-phenyloxazol-2-yl) -benzol) wurden in 1 l Toluol gelöst

### Platte für präparative Dünnschichtchromatographie:

40 g Kieselgel wurden mit 80 ml Wasser 1 Minute kräftig  
geschüttelt, 0,75 mm dick auf 2 Glasplatten (20 x 20 cm)  
gestrichen, bei Raumtemperatur und anschließend 2 Stunden  
bei 110°C getrocknet.

### Medium zur Aufzucht von Halobakterien:

In 1 l Wasser wurden gelöst:

250 g NaCl	}	Basalsalz
20 g MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O		
2 g KCl		
3 g Tris-Natriumcitrat · 2 H <sub>2</sub> O		
10 g Oxoid-Pepton L 37		

Das Medium wurde auf pH 7 eingestellt und durch Glas-  
wolle abfiltriert.

### 6.3. Methoden

#### § 1. Purpurmembransuspensionen

Die in dieser Arbeit verwendete Purpurmembran wurde aus Bakterienzellen des Stammes *Halobacterium halobium* R<sub>1</sub>M<sub>1</sub> wie in Lit. (11) beschrieben isoliert.

Purpurmembran-Stammsuspensionen wurden 35 Minuten bei 19 000 g zentrifugiert und in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7 resuspendiert. Die Konzentration wurde bei 560 nm bestimmt unter Zugrundelegung des molaren Extinktionskoeffizienten von Bakteriorhodopsin,  $\epsilon_{\text{mol}} = 63\ 000$ . Da Retinal in äquimolarer Menge an das Protein gebunden ist (14), beziehen sich die in Zusammenhang mit Purpurmembransuspensionen gegebenen Molangaben sowohl auf Bakteriorhodopsin als auch auf Retinal.

#### § 2. Darstellung von all-trans- und 13-cis-Retinaloxim

3 mg ( $\approx 0,01$  mMol) all-trans-bzw. 13-cis-Retinal (MG 284) wurden im Dunklen in 1 ml Äthanol gelöst und mit 0,2 ml 2 M Hydroxylamin versetzt. Nach 30 Minuten wurde der Überstand des Reaktionsgemischs abgenommen und eingeeengt, der Rückstand in 0,4 ml 50% igem Äthanol gelöst und 3x mit 1 ml -Portionen Petroläther (40-60°C) extrahiert, die vereinigten Extrakte wurden getrocknet und in Äthanol aufgenommen.

### § 3. Extraktion von Retinaloxim aus Purpurmembran

1 ml ( $\cong 0,16 \mu\text{Mol}$  Retinal) Purpurmembransuspension o.D. 10 wurde 2 Stunden im Dunklen äquilibriert bzw. 10 Minuten belichtet (weißes Licht, 60 W). Unter totalem Lichtausschluß wurden 0,4 ml 2 M Hydroxylamin, 0,4 ml 0,1 M CTAB und 2 ml Wasser zugegeben. Nach 30 Minuten wurde die Reaktionsmischung mit 4 ml Äthanol versetzt und Retinaloxim 3x mit 3 ml -Portionen Petroläther (40-60°C) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden getrocknet, eingeengt und in Äthanol aufgenommen.

### § 4 Darstellung von Retinylidenbutylamin

100 mg ( $\cong 0,35 \text{ mMol}$ ) all-trans-Retinal (MG 284) wurden im Dunklen mit 6 ml ( $\cong 60,5 \text{ mMol}$ ,  $\xi = 0,739$ ) frisch über Barium oxid destilliertem n-Butylamin (KP = 78°C, MG 73) versetzt und 2 Stunden unter Stickstoff gerührt. Eventuell unumgesetztes Retinal wurde abfiltriert, das überschüssige n-Butylamin abgezogen und das erhaltene Öl durch wiederholte tropfenweise Zugabe von Petroläther (40-60°C) und anschließendes Einengen zur Kristallisation gebracht. Die orangefarbene Substanz wurde bei -20°C unter Stickstoff aufbewahrt.

Zur Identifizierung des Reaktionsprodukts als Retinylidenbutylamin wurden Schmelzverhalten, Absorptionsspektren, Massenspektrum und dünnschichtchromatographisches Verhalten der Substanz herangezogen:

Schmelzverhalten:

Der Schmelzpunkt des kristallinen Reaktionsprodukts wurde zu 62°C bestimmt (Lit. (33): FP = 63°C).

Absorptionsspektren:

Absorptionsspektren des Reaktionsprodukts wurden in 3 verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen und die Lage der erhaltenen Absorptionsmaxima mit Literaturangaben verglichen:

Lösungsmittel	$\lambda$ max [nm]	Lit.	$\lambda$ max [nm]	$\epsilon$ mol
Methanol	366	(33)	364	-
Äthanol	365	(21)	363	-
Methylcyclohexan	361	(34)	360	56 000

Massenspektrum:

Die Massenzahl des Molekülions ( $M^{\oplus} = 339$ ) im Massenspektrum des Reaktionsprodukts erwies sich als identisch mit dem Molekulargewicht des Retinylidenbutylamins.

Dünnschichtchromatographisches Verhalten:

Durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel (Laufmittel: 30% Aceton in Petroläther (40-60°C)) ließ sich die Reinheit des Reaktionsprodukts nachweisen:

Retinal  $R_F = 0,45$   
Retinylidenbutylamin  $R_F = 0,35$

### § 5. Radioaktivitätsbestimmung

Die Radioaktivität der Proben wurde im Flüssigkeits-  
szintillationszähler gemessen.

Für die jeweils verwendeten 10 ml Toluolszintillations-  
lösung wurde ein Untergrund von im Durchschnitt 30 cpm  
bestimmt.

Ein Farbqueneffekt durch Retinaloxim konnte unter den  
gegebenen Bedingungen nicht festgestellt werden.

### § 6. Inkubation von Purpurchromophoren in Tritiumwasser

unter Lichtausschluß

10  $\mu$ l ( $\approx 5 \times 10^{-3}$   $\mu$ Mol Retinal) Purpurchromophorensuspension  
o.D. 31,5 wurden unter totalem Lichtausschluß in 10  $\mu$ l  
Tritiumwasser der spezifischen Radioaktivität 100 mCi/ml  
1 Stunde inkubiert. Im Kontrollversuch wurden 10  $\mu$ l  
Wasser bzw. 10  $\mu$ l  $5 \times 10^{-4}$  M Retinaloxim oder Retiny-  
lidenbutylamin in Äthanol analog behandelt. Die Reaktions-  
mischung wurde mit 10  $\mu$ l 2 M Hydroxylamin, 10  $\mu$ l 0,1 M  
CTAB und nach 30 Minuten mit 0,2 ml Äthanolversetzt und  
Retinaloxim 3x mit 0,4 ml -Portionen Petroläther (40-60°C  
extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Natrium-  
sulfat getrocknet, der abfiltrierte Überstand eingengt  
und 16 Stunden im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet

§ 7. Inkubation von Purpurmembran in Tritiumwasser  
unter Belichten

a) Bedingungen der Präparation für die Versuchsreihe:  
Jeweils 10  $\mu\text{l}$  ( $\cong 5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{Mol}$  Retinal) Purpurmbran-  
suspension o.D. 31,5 wurden in 10  $\mu\text{l}$  Tritiumwasser der  
spezifischen Radioaktivität 500 mCi/ml 1 Stunde unter  
Lichtausschluß inkubiert. Im Kontrollversuch wurden  
10  $\mu\text{l}$  Wasser analog behandelt. 12 Purpurmembranproben  
in Tritiumwasser wurden zwischen 1 Sekunde und 2 Stunden  
belichtet (gelbes Licht, 900 W). Im Dunklen wurden 10  $\mu\text{l}$   
2 M Hydroxylamin, 10  $\mu\text{l}$  0,1 M CTAB und nach 30 Minuten  
0,2 ml Äthanol zugegeben. Die Extraktion von Retinal-  
oxim und die Trocknung des Petrolätherextraktes erfolgte  
wie in § 6 beschrieben.

b) Bedingung der Präparation für die Dünnschicht-  
chromatographie:  
200  $\mu\text{l}$  ( $\cong 0,286$   $\mu\text{Mol}$  Retinal) Purpurmembransuspension  
o.D. 90 wurden in 200  $\mu\text{l}$  Tritiumwasser der spezifischen  
Radioaktivität 500 mCi/ml inkubiert und 1 Stunde belichtet  
(gelbes Licht, 900 W). Im Dunklen wurden 0,2 ml 2 M  
Hydroxylamin, 0,2 ml 0,1 M CTAB und nach 30 Minuten  
0,4 ml Äthanol zugegeben. Die Extraktion von Retinaloxim  
und die Trocknung des Petrolätherextraktes erfolgte wie  
in § 6 beschrieben.

§ 8. Darstellung von Retinalenolazetat aus Retinal

1,835 g ( $\hat{=}$  6,50 mMol) Retinal (MG 284) wurden im Dunklen in 100 ml absolutem Diäthyläther gelöst und unter Stickstoff im Eisbad gekühlt. 100 ml ( $\hat{=}$  1,06 Mol,  $S = 1,08$  g/ml) Acetanhydrid (MG 102) wurden mit 50  $\mu$ l ( $\hat{=}$  0,44 mMol,  $S = 1,50$  g/ml) 47%-iger Bromwasserstoffsäure (MG 81) versetzt, gekühlt und zur Retinallösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 90 Minuten unter Stickstoff bei 5°C im Dunklen gerührt, dann zu Hydrolyse des überschüssigen Acetanhydrids etwa 10x mit 40 ml -Portionen gekühlter 4 M Kalilauge ausgeschüttelt, 3x mit je 100 ml Natriumhydrogencarbonatlösung, dann mit Wasser gewaschen; 16 Stunden unter Stickstoff bei 5°C über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Schmelzpunkt des orangeroten Produkts war 105°C.

§ 9. Darstellung von 4-Deutero-Retinal aus Retinalenolazetat

500 mg ( $\hat{=}$  1,53 mMol) Retinalenolazetat (MG 326) wurden im Dunklen in 30 ml absolutem Diäthyläther und 50ml Deutero-Isopropanol (dargestellt aus Natriumisopropanolat und Deuteriumoxid) gelöst, mit 1 ml ( $\hat{=}$  17,6 mMol,  $S = 1,05$ g/ml) Eisessig (MG 60) und 50  $\mu$ l ( $\hat{=}$  0,44 mMol,  $S = 1,50$  g/ml) 47%-iger Bromwasserstoffsäure (MG 81) versetzt und 16 Stunden unter Stickstoff bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 30 ml Äther wurde das Reaktionsgemisch 3x mit 50 ml -Portionen 1 M Kalilauge ausgeschüttelt, 3x mit je 50 ml Natriumhydrogencarbonatlösung, dann mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

Das erhaltene Rohprodukt wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt und als Retinal identifiziert (durch Absorptions- und Massenspektroskopie, Dünnschichtchromatographie und Untersuchung des chemischen Verhaltens gegenüber Natriumboratanat und Hydroxylamin).

#### § 10. Aufzucht von Nikotinzellen

700 ml sterilisiertes 1 mM nikotinhaltiges Medium wurde mit Nikotinzellen angeimpft und 60 Stunden bei 37°C im Licht gut geschüttelt. 400 ml dieses Inokulums und einige Tropfen Antischaummittel wurden zu 8 l sterilisiertem 1 mM nikotinhaltigem Medium gegeben. Die Bakterien wurden nach 93 Stunden ihres Wachstums bei 37°C im Licht und unter Belüften durch 10 -minütiges Zentrifugieren bei 8 000 g geerntet und in 1mM nikotinhaltigem Basalsalz resuspendiert.

#### § 11. Rekonstitution von Bakterio-Opsin mit 4-Deutero-Retinal in Nikotinzellen und Isolierung des Bakterio-rhodopsins

200 ml ( $\hat{=}$  0,092  $\mu$ Mol Bakterio-Opsin) einer Nikotinzellensuspension o.D. 2 in 1 mM nikotinhaltigem Basalsalz wurden mit 35  $\mu$ l  $3 \times 10^{-3}$  M 4-Deutero-Retinal in Äthanol unter Rühren versetzt. Nach Zugabe von 2 g

L-Alanin wurde 16 Stunden bei 37°C im Licht geschüttelt. Die rekonstituierten Nikotinzellen wurden 10 Minuten bei 8 000 g zentrifugiert und mit 20 ml destilliertem Wasser unter Zugabe von einigen Körnchen DNase aus Rinderpankreas lysiert. Das Lysat wurde wie in Lit. (11) beschrieben aufgearbeitet.

#### § 12. Extraktion von Retinal aus Bakteriorhodopsin

Zu 3 ml Membransuspension wurden nacheinander 4 ml Chloroform, 8 ml Methanol und 15 ml Wasser gegeben. Das ausfallende Protein verblieb in der wäßrigen Phase. Die Chloroformphase wurde filtriert und eingengt, das erhaltene Rohprodukt durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt und als Retinal identifiziert.

#### § 13. Darstellung von 4-Hydroxy-Retinal

400 mg ( $\hat{=}$  1,22 mMol) Retinalenolazetat (MG 326) wurden in 2 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 600 mg ( $\hat{=}$  5,40 mMol) fein verteiltem Selenoxid (MG 111) versetzt und 16 Stunden unter Stickstoff gerührt. Nach Zugabe von 10 ml Äther wurde filtriert und die organische Phase 3x mit je 10 ml 1 M Kalilauge, dann mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingengt.

7. Literaturverzeichnis

- (1) D. Oesterhelt  
Progr. Mol. Subcell. Biol. 4, 133-166 (1976)
- (2) M. Kelly, S. Norgård, S. Liaach-Jensen  
Acta Chem. Scand. 24, 2169-2182 (1970)
- (3) D. Oesterhelt  
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353, 1554-5 (1972)
- (4) D. Oesterhelt, W. Stoeckenius  
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2853-7 (1973)
- (5) D. Oesterhelt, G. Krippahl  
FEBS Letters 36, 72-76 (1973)
- (6) A. Danon, W. Stoeckenius  
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1234-8 (1974)
- (7) D. Oesterhelt  
Energy Transform. in Biol. Syst., p. 147 (1975)  
Ciba Foundation (North-Holland, Amsterdam)
- (8) W. Stoeckenius, R. Rowen  
J. Cell. Biol. 34, 365-393 (1967)
- (9) D. Oesterhelt  
Abstr. Comm. 8th Meet. Eur. Biochem Soc.  
Abstr. Nr. 125 (1972)
- (10) W. Stoeckenius, W.H. Kunau  
J. Cell. Biol. 38, 337-357 (1968)
- (11) D. Oesterhelt, W. Stoeckenius  
Methods of Enzymology 31, 667-671 (1974)

- (12) A.E. Blaurock, W. Stoeckenius  
Nature (New Biol.) 233, 152-155 (1971)
- (13) M. Kates, P.W. Deroo  
J. Lipid Res. 14, 438 (1973)
- (14) D. Oesterhelt, W. Stoeckenius  
Nature (New Biol.) 233, 149-152 (1971)
- (15) R. Henderson  
J. Mol. Biol. 93, 123-138 (1975)
- (16) C.F. Chignell, D.A. Chignell  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 62, 136-143 (1975)
- (17) K. Razi Nagri, J. Gonzales-Rodriguez et al.  
Nature (New Biol.) 245, 249-251 (1973)
- (18) A. Lewis, J. Spoonhower et al.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 4462-6 (1974)
- (19) R. Mendelsohn, A.L. Verma et al.  
Can. J. Biochem. 52, 774-781 (1974)
- (20) D. Oesterhelt  
25. Coll. Ges. Biol. Chemie, Mosbach, S. 55-77 (1974)
- (21) P.E. Blatz, J.H. Mohler, H.V. Navangul  
Biochemistry 11, 848-855 (1972)
- (22) A. Waleh, L.L. Ingraham  
Arch. Biochem. Biophys. 156, 261-266 (1973)
- (23) D. Oesterhelt, B. Hess  
Eur. J. Biochem. 37, 316-326 (1973)

- (24) D. Oesterhelt et al.  
Enzymes, Electron Transport System 40, 239-251 (1975)
- (25) P. Mitchell  
Biol. Rev. 41, 445-502 (1966)
- (26) P. Mitchell  
J. Bioenergetics 3, 5 (1972)
- (27) D. Oesterhelt, L. Schuhmann  
FEBS Letters 44, 262-265 (1974)
- (28) J. Peters, R. Peters, W. Stoeckenius  
FEBS Letters 61, 128-134 (1976)
- (29) G. Wald, P.K. Brown  
J. gen. Physiol. 37, 189-200 (1953/54)
- (30) G.v. Planta, U. Schwieter et al.  
Helv. Chim. Acta 45, 548-561 (1962)
- (31) R. Hubbard  
JACS 78, 4662-7 (1956)
- (32) D. Oesterhelt, M. Meentzen, L. Schuhmann  
Eur. J. Biochem. 40, 453-463 (1973)
- (33) T. Suzuki, Y. Kito  
Photochem. Photobiol. 15, 257-288 (1972)
- (34) M.M. Fisher, K. Weiss  
Photochem. Photobiol. 20, 423-432 (1974)
- (35) A.J. Reedy  
Eastman Kodak Co. Fr. 1.484.573 (Cl. C 07), 9.6.1965

(36) M. Sumper, H. Reitmeier, D. Oesterhelt  
Angewandte Chemie, im Druck (April 1976)

(37) V. Christoffel  
persönliche Mitteilung

(38) W. Oroshnik  
Science 119, 660 (1954)

(39) M. Gödeke  
persönliche Mitteilung