

1 Einleitung

Biologische Membranen bestehen aus einer dünnen bimolekularen Lipidschicht, bei der die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der Lipide ins Innere der Membran weisen, während die hydrophilen Kopfgruppen der wässrigen Phase zugewandt sind. Durch diesen Aufbau wird die wichtigste Funktion der Membran erzielt, den Austausch wasserlöslicher Substanzen zwischen zytoplasmatischem und extrazellulärem Raum einzuschränken. In der Doppelschicht sind Proteine eingebaut, die als Transportsystem zwischen den beiden wässrigen Phasen fungieren, d.h. diese Proteine steuern selektiv den Durchtritt von Stoffwechselprodukten und Ionen. Andere Proteine wiederum können die durch den Transport erhöhte Ionenkonzentration zur Synthese energiereicher Verbindungen nutzen, die für den Organismus eine nutzbare Energieform darstellen (z.B. die ATP-Synthase).

Ein relativ einfach aufgebautes Membranprotein ist die lichtgetriebene Protonenpumpe Bacteriorhodopsin (bR), die in der Plasmamembran von *Halobacterium Salinarium* auftritt. Neben dem einfachen Aufbau besitzt bR viele weitere Eigenschaften, die es zum Modellsystem für die Untersuchung eines Transportproteins hervorhebt:

1. Aufgrund der leichten Handhabbarkeit und hohen Stabilität des Proteins ist das System besonders für physikalische Untersuchungen geeignet.
2. Die Anordnung der Bacteriorhodopsin Moleküle zu einem zweidimensionalen Gitter erlaubt eine Strukturaufklärung, die fast bis zur atomaren Auflösung geführt hat. Damit existiert die Grundlage zur Beschreibung der Funktionsweise des Proteins auf molekularem Niveau.
3. Das Initiieren des Ionentransports durch photochemische Anregung ermöglicht die Durchführung zeitaufgelöster Messungen.
4. Die Verfügbarkeit von Punktmutationen und die Untersuchung von deren geänderten Eigenschaften erlaubt, Rückschlüsse auf die Beteiligung einzelner Gruppen des Proteins an der Transportfunktion zu ziehen.
5. Das Absorptionsspektrum des eingeschlossenen Chromophors ändert sich während des Transportvorgangs und gibt Aufschluß über die Konformationsänderung des Farbstoffmoleküls und seiner Proteinumgebung.
6. Die orientierte Anlagerung von Membranbruchstücken an eine Kondensatorfolie ermöglicht, die elektrische Aufladung der Membran aufgrund der Protonenbewegung zeitlich zu verfolgen.

Eine weitere wichtige Klasse von Membranproteinen bilden die G-Protein gekoppelte Rezeptorproteine. Diese Proteine sind von zentraler Bedeutung für die Signaltransduktion. Prototyp dieser Klasse von Proteinen ist das Sehpigment Rhodopsin. Wie Bacteriorhodopsin ist dies ein lichtaktiviertes Retinalprotein, das sich in den Membranstapeln der Sehzellen befindet. Wie bei bR spielen im Mechanismus der Aktivierung von Rhodopsin elektrogene Protonenladungsbewegungen eine entscheidende Rolle.

1.1 Einführung in das Themengebiet Bacteriorhodopsin

Das Archäobakterium *Halobacterium Salinarium* produziert unter anaeroben Bedingungen, wenn die Atmungskette unterbrochen und keine oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP möglich ist, die Purpormembran. Diese Bereiche der Zellmembran lassen sich besonders gut isolieren und enthalten als einziges Protein Bacteriorhodopsin (Oesterhelt und Stoekenius, 1971). Lichtabsorption durch das Retinal des Bacteriorhodopsin führt zum

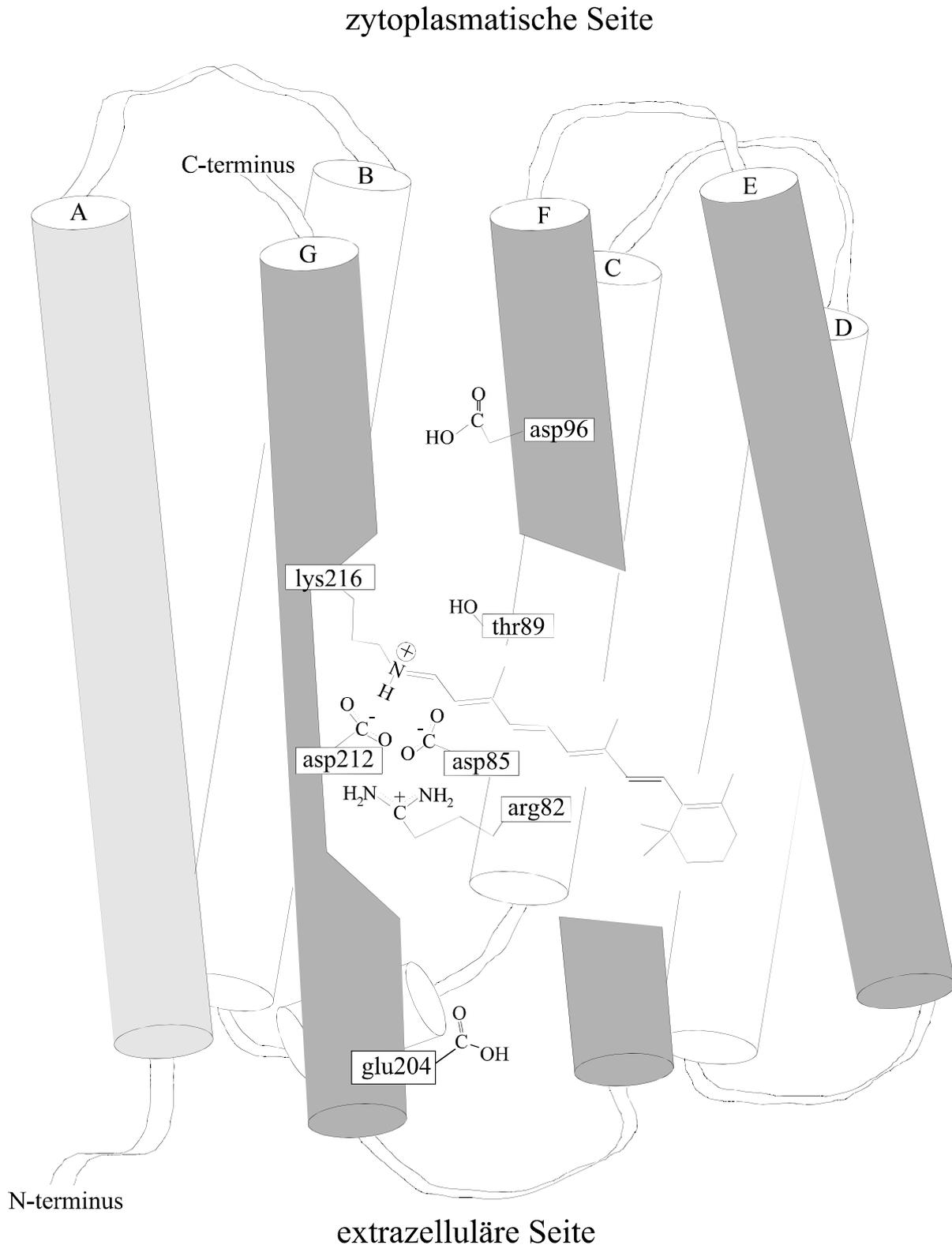


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der sieben transmembranen α -Helices (A-G) von Bacteriorhodopsin und der für die Pumpaktivität wichtigsten Seitengruppen. Das Retinal ist über eine protonierte Schiff'sche Base ($-\text{NH}^+=$) kovalent an die Seitengruppe von Lys-216 gebunden. Die Abbildung wurde entnommen aus Mathies et al. (1991) und leicht modifiziert.

Transport eines Protons über die Membran. Der so erzeugte Protonengradient wird von dem Enzym H^+ -ATP-Synthase der Zelle benutzt, um das energiereichere ATP zu synthetisieren. Der Mechanismus dieses Ionentransports läuft in einer Reaktionskaskade von

photochemischen Transformationen, strukturellen Änderungen und Ladungsbewegungen ab. Übersichtsartikel (Ebrey, 1993; Mathies et al., 1991; Lanyi, 1993) und Sonderausgaben verschiedener Zeitschriften (Isr. J. Chem. Vol. 35, 1995; Biophys. Chem. Vol. 56, 1995) zeigen den aktuellen Forschungsstand über Bacteriorhodopsin auf.

1.2 Die Struktur des Bacteriorhodopsins

Bacteriorhodopsin ist ein Polypeptid, bestehend aus einer Sequenz von 248 Aminosäuren (Khorana et al., 1979) und einem Molekulargewicht von ca. 26500 Dalton. Innerhalb der Purpurmembran trägt das Verhältnis Lipid zu Bacteriorhodopsin 9:1, und die Bacteriorhodopsin Moleküle ordnen sich in einem zweidimensionalen hexagonalen Gitter an. Daher konnte eine dreidimensionale Elektronendichtekarte von Bacteriorhodopsin mittels Elektronenmikroskopie und -diffraktion erstellt werden, deren Auflösung in neueren Experimenten bis 3,0 Å verbessert wurde (Henderson et al., 1990, Grigorieff et al., 1996, Kimura et al., 1997). Außerdem ist es möglich, zweidimensionale Röntgenbeugungs-experimente an Stapeln von Membranen durchzuführen, wobei die Projektion der Elektronendichte auf die Membranebene erhalten wird (Behrens, 1996). Eine neuere Methode, Bacteriorhodopsin in sogenannten kubischen Lipidphasen zu kristallisieren, erlaubte die Stukturaufklärung mit einer Auflösung von 2,5 Å (Landau und Rosenbusch, 1996, Pebay-Peyroula et al., 1997).

In die gemessene Elektronendichtekarte wird die bekannte Aminosäuresequenz hineinmodelliert, wodurch ein Modell mit fast atomarer Auflösung entsteht (Grigorieff et al., 1996). Jedes einzelne Bacteriorhodopsin Molekül besteht aus sieben alphahelikalen Abschnitten (A-G), die die Membran transversal durchqueren und die den Chromophor umgeben (Abb. 1.1). Der Retinidyl-Chromophor ist kovalent via einer protonierten Schiff'schen Base (SB) an die Aminosäure Lysin-216 gebunden. Er liegt etwa in der Mitte der Membran in einem Winkel von etwa 70° zur Normalen der extrazellulären Seite (Heyn et al., 1988, Hauss et al., 1990) und besitzt gegenüber dem freien Retinal ein rotverschobenes Absorptionsmaximum bei 568 nm. Diese Verschiebung rührt daher, daß er der Wechselwirkung von geladenen Gruppen ausgesetzt ist, besonders der im Ausgangszustand protonierten und somit positiv geladenen Bindungsstelle zu Lysin-216 und dem negativ geladenen Gegenion (bestehend aus Asp-85⁻, Asp-212⁻ und Arg-82⁺). Ein weiterer Beitrag zur Verschiebung kommt daher, daß der Chromophor innerhalb des Proteins in der Bewegung eingeeengt und daher nur bestimmte Konformationen einnehmen kann. Den gesamten Effekt der Verschiebung des Absorptionsspektrums durch die Proteinumgebung nennt man Opsinshift.

Im Dunkel liegt der Chromophor in bR als 2:1 Mischung aus 13-*cis*, 15-*syn* (λ_{\max} =555 nm) und all-*trans*, 15-*anti* (λ_{\max} =568 nm) Isomerisierungsform vor (Scherrer et al., 1989). Erst Lichtadaptation führt den Chromophor vollständig in den all-*trans* Zustand, der die pumpaktive Form darstellt.

1.3 Funktion und Photozyklus des bR

Lichtabsorption führt den Grundzustand S₀ (auch einfach bR bezeichnet) in den elektronisch angeregten S₁ Zustand, der mit bR* bezeichnet wird. Der S₁ zerfällt entweder sehr schnell, über einen Zwischenzustand nicht vollständiger Isomerisierung (J), in die isomerisierte Form K oder wieder zurück nach bR. Die Quanteneffizienz zur Bildung der 13-*cis*-Form beträgt 0,64 (Govindjee et al., 1990). K und alle nachfolgenden Intermediate sind elektronische Grundzustände.

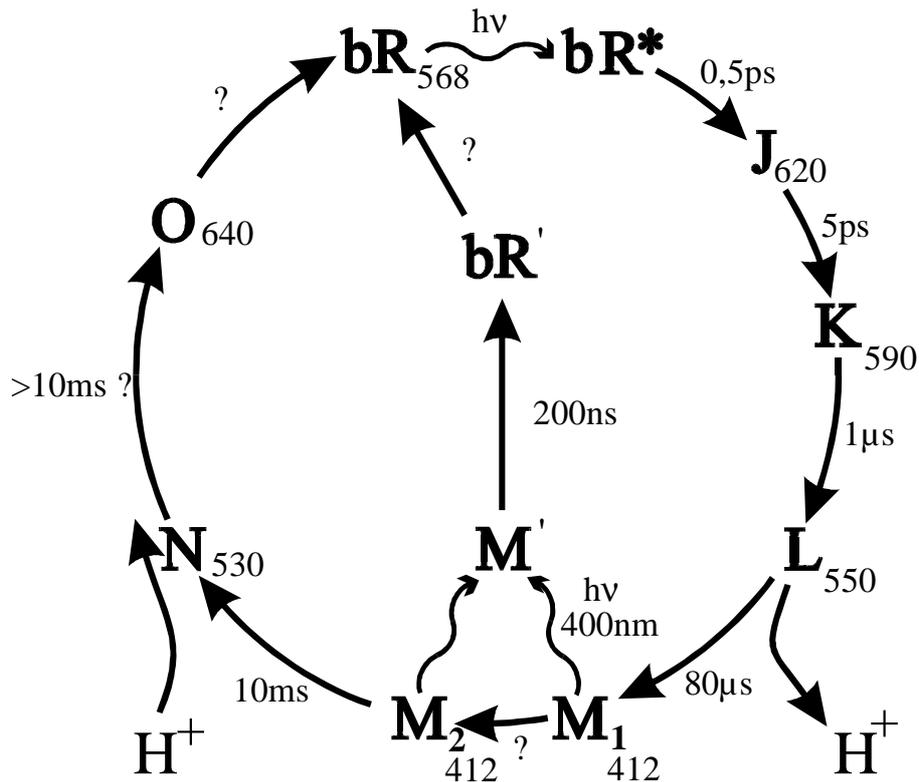


Abb. 1.2 Photozyklus von Bacteriorhodopsin mit den Intermediaten in der Reihenfolge ihres zeitlichen Auftretens. Die Indizes geben die Wellenlänge des Absorptionsmaximums des entsprechenden Intermediates an. Einige der Reaktionsschritte sind in der Literatur umstritten und hier mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. Wird das M-Intermediat mit blauem Licht angeregt, so wird der Transportzyklus unterbrochen und das Molekül relaxiert sehr schnell in den Ausgangszustand.

Die thermische Relaxation von K zurück zu bR, über die Intermediate L, M, N und O, die sich in den Absorptionsspektren unterscheiden, nennt man den Photozyklus (Abb. 1.2). Gemessen wird der Photozyklus mittels zeitaufgelöster Absorptionsspektroskopie, jedoch herrschen unter den verschiedenen Arbeitsgruppen einige Kontroversen über das exakte kinetische Schema dieses Zyklus. Das rührt von den stark überlappenden Absorptionsspektren der Intermediate her, die zu Unsicherheiten bei der Bestimmung der Konzentrationsverläufe führt. Diese Unsicherheit im Konzentrationsverlauf zusammen mit der Tatsache, daß sehr unterschiedliche Reaktionsmodelle zu sehr ähnlichen Konzentrationsverläufen führen können, erklärt einige der Unstimmigkeiten in der Interpretation verschiedener Studien.

Besser getrennt und damit leichter zu analysieren sind die Vibrationspektren der Intermediate, die aus Resonanz Raman- und FTIR-Spektroskopie gewonnen werden. Hier erhält man viele zusätzliche Informationen über die Eigenschaften des Proteins. Die Vielzahl der hier erhaltenen Banden sind jedoch oft schwierig zu interpretieren und die zeitaufgelösten FTIR-Messungen erreichen nicht das Signal-Rauschverhältnis, das bei optischen Absorptionsmessungen erhalten wird.

Ein einfaches kinetisches Schema, das konsistent mit einer Vielzahl von Experimenten ist, ist ein lineares unverzweigtes Modell mit Rückreaktionen (Lanyi und Váro, 1995) $K \leftrightarrow L \leftrightarrow M \leftrightarrow N \leftrightarrow O \leftrightarrow bR$, bei dem die Intermediate vorübergehend im Gleichgewicht vorliegen. Außerdem sollten die Modelle auch in der Lage sein, die Einflüsse von äußeren Parametern auf die Kinetik zu beschreiben, wie etwa den beschleunigten Aufbau von M und den verlangsamten Zerfall von N bei erhöhtem pH. Auch die Temperaturabhängigkeit sollte durch das Reaktionsmodell richtig wiedergegeben werden. Übergänge die globale strukturelle Änderungen enthalten oder die mit einer Isomerisierung verbunden sind, sollten sich durch eine erhöhte Aktivierungsenergie auszeichnen. Andere Gruppen bevorzugen zur

Beschreibung der kinetischen Effekte einen unidirektionalen parallelen oder einen verzweigten Zyklus (Eisfeld et al., 1993). Prinzipiell unterscheiden sich sequentielle und parallele Modelle darin, daß beim sequentiellen Modell mit Rückreaktion, die mikroskopischen Raten auch in die Amplituden eingehen, während beim unidirektionalen parallelen Zyklus die Amplituden die anfangs vorkommende Grundzustandsheterogenität widerspiegeln. Diese beiden Modelle führen zu vollkommen unterschiedlichen Energielagen der Intermediate und damit zur unterschiedlichen Interpretation an welchen Übergängen im Zyklus die treibenden Kräfte der Pumpaktivität am stärksten sind.

Neben den Absorptionseigenschaften müssen auch die anderen veränderten beobachteten Eigenschaften betrachtet werden. So erkennt man in den sogenannten HOOP Moden im Ramanspektrum des K_{590} Intermediats, daß sich das Retinal in einer eingegengten Proteinumgebung befindet, während es in L_{550} entspannter ist (Fodor et al., 1988). Bei dieser Relaxation kommt die protonierte Schiffische Base der negativ geladenen Asparaginsäure-85 näher, denn im $L \rightarrow M$ Übergang verliert sie ihr Proton an Asp-85 (Braithwaite et al., 1988). Gleichzeitig zu dieser Ladungsverschiebung im Inneren des Protein, erscheint ein Proton auf der extrazellulären Oberfläche des Proteins. Dies wurde mit an der Oberfläche gebundenen pH-Indikatoren nachgewiesen (Alexiev et al., 1995). Dieses Proton wird von einer Gruppe dicht unter der Oberfläche abgelöst, vermutlich von Glutamat-204 (Brown et al., 1995).

Im $M \rightarrow N$ Übergang wird die Schiffische Base wiederum von dem internen Donor Asparaginsäure-96 reprotoniert (Otto et al., 1989), der sich etwa in der Mitte des Weges zwischen der Schiffischen Base und der zytoplasmatischen Oberfläche befindet (siehe Abb. 1.1). Im $N \rightarrow O$ Übergang erfolgt die Reisoomerisierung des Chromophors, was sich wieder durch Auftauchen der HOOP Moden des eingegengten Retinal bemerkbar macht. Außerdem benötigt diese Reisoomerisierung eine hohe Aktivierungsenergie, wodurch bei hoher Temperatur die O-Besetzung stark erhöht wird. Die Reprotonierung des internen Donors von der zytoplasmatischen Oberfläche geschieht vermutlich in einem für die Absorptionsspektroskopie unsichtbaren Übergang, während der Lebensdauer von N (Cao et al., 1993). Das O-Intermediat relaxiert schließlich zurück zu bR. Um den Pumpvorgang zu vervollständigen, muß in diesem Übergang noch der Transfer des Protons von der Gruppe 85 auf die Gruppe 204 stattfinden. Abhängig vom pH kann dieser Schritt auch an anderen Stellen im Zyklus stattfinden (Govindjee et al., 1996).

Bei all diesen Schritten wird eine Ladung über Teile der Membran verschoben. Daher sollte man an einer orientierten Anordnung von Membranen ein elektrisches Signal nachweisen können. Zur Orientierung wird das permanente elektrische Dipolmoment der Membranbruchstücke ausgenutzt. So ist es z.B. möglich, Membranbruchstücke an einer Folie orientiert anzulagern und die Spannung über dem Folie-Membransystem zeitaufgelöst zu messen. Bei den erhaltenen Spannungszeitverläufen wurde immer wieder nach Korrelationen mit dem Photozyklus gesucht. Im Detail unterscheiden sich die Ergebnisse der elektrischen Messungen der unterschiedlichen Arbeitsgruppen in der Anzahl der Anpassungsparameter und deren Interpretation. Dennoch passen die zwei wesentlichen Phasen der elektrischen Messungen zeitlich in etwa mit denen für den Aufbau und den Zerfall des M-Intermediats in optischen Messungen zusammen (Holz, 1990, Liu 1990). Die Amplituden dieser beiden elektrischen Komponenten haben dasselbe Vorzeichen. Diese Messungen unterstützen deshalb das oben beschriebene Modell, wobei mit dem Aufbau vom M eine positive Ladung vom Inneren der Membran in Richtung der extrazellulären Oberfläche und mit dem Zerfall von M eine positive Ladung von der zytoplasmatischen Seite ins Membraninnere verschoben wird. Beide Schritte erfolgen in dieselbe Richtung und liefern elektrische Signale gleichen Vorzeichens.

Letztendlich stellt sich die Frage nach dem Mechanismus der die Pumpaktivität bewirkt. Ein naheliegendes einfaches Modell würde die Chromophorisomerisierung zur Erklärung des

Umschaltens zwischen extrazellulärem und zytoplasmatischem Kanal benutzen. Da diese Umschaltung während dem Durchlaufen der L, M und N Intermediate erfolgt und diese alle eine 13-*cis* Chromophorisomerisierung aufweisen, versagt hier dieses einfache Modell. Ein detaillierteres Modell ist das CT-Modell (Mathies et al., 1991), bei dem zwei Proteinkonformationen C und T existieren, die den relaxierten Konformationen der beiden Isomerisierungszustände 13-*cis* und all-*trans* entsprechen. Im Ausgangszustand liegt die T-Konformation vor. Die Isomerisierung durch Licht bringt das Retinalprotein in die eingeeengte 13-*cis* Konformation, die erst später während M zur relaxierten 13-*cis* C-Konformation führt. In dieser Konformation ist dann die Zugänglichkeit der Schiffschens Base durch den zytoplasmatischen Kanal höher. Die in dieser Konformationsänderung T→C erhaltene freie Energie wird dann im N→O Übergang benutzt, um die Isomerisierung und TC Konformationsänderung wieder rückgängig zu machen.

1.4 Das M-Intermediat

Dieses Intermediat ist besonders wichtig zum Verständnis der vektoriellen Pumpfunktion des Proteins, denn mit dem Aufbau des Intermediates wird ein Proton zur extrazellulären Seite abgegeben und im Zerfall ein Proton von der zytoplasmatischen Seite aufgenommen. Die Aufbau- und Zerfallskinetik von M geschieht mit einer komplexen Kinetik. Setzt man ein lineares Reaktionsmodell erster Ordnung voraus, muß für jedes Modell dieser Art die Anzahl der Intermediate der Anzahl der Exponentialfunktionen entsprechen. Da durch Absorptionsspektroskopie keine zusätzlichen Intermediate außer K, L, M, N und O zu unterscheiden sind, aber dennoch mehr als fünf Exponentialfunktionen bei der Anpassung der Photozyklusdaten auftauchen, nimmt man an, daß unterschiedliche Proteinzustände, sogenannte Subzustände existieren, die die Absorptionseigenschaften nicht beeinflussen, aber zu zusätzlichen Phasen in der Kinetik führen können. So wurden aufgrund der dreiphasigen Kinetik des M-Anstiegs zwei M-Intermediate M_1 und M_2 postuliert, zwischen denen ein irreversibler Prozeß stattfinden soll (Váro und Lanyi, 1991a). Diese beiden M Zustände können zur Erklärung des Transportmechanismus dienen, wenn im Übergang von M_1 zu M_2 die Zugänglichkeit der Schiffschens Base von Asp-85 auf der extrazellulären Seite hin zu Asp-96 auf der zytoplasmatischen Seite wechselt.

Prinzipiell sind M-Subzustände mit unterschiedlicher Protonierung der Protein-Seitengruppen oder mit unterschiedlichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Gruppen, mit veränderten Lagen der transmembranen Helices oder M-Subzustände mit unterschiedlicher Orientierung der Seitengruppen im Protonenkanal denkbar (Lanyi und Váro, 1995). Die Differenzierung zwischen diesen möglichen M Subzuständen steht im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Eine weitere Eigenschaft der M Intermediate ist die Photoreversibilität. Die Anregung der M Intermediate mit blauem Licht führt zur isomerisierten Form M' (all-*trans*, siehe Abb. 1.2). Diese zerfällt innerhalb von etwa 200 ns in das bR ähnliche Intermediat bR' . Dabei wird die Schiffschens Base von Asp-85 reprotoniert, die Protonenverschiebung des L-M Übergangs wird damit rückgängig gemacht. Doppelblitzexperimente mit variablem Zeitabstand zwischen dem ersten grünen und dem zweiten blauen Blitz ergaben, daß die Zeitkonstante für den M' Zerfall sich von 100 ns zu 250 ns verändert, wenn der Zeitabstand von 10 μ s zu 200 μ s geändert wird (Druckmann et al., 1992). Diese Beobachtung wurde als Beweis für die Existenz von zwei sequentiellen M Zuständen interpretiert, die den beiden postulierten Zuständen M_1 und M_2 aus dem Photozyklus entsprechen könnten. Diese Beobachtung galt es, im Rahmen dieser Arbeit zu verifizieren.

1.5 Einführung in das Themengebiet Rhodopsin

Das Rhodopsin der Sehzellen in der Netzhaut ist, ebenso wie bR, ein Retinalprotein mit sieben transmembranen Helices. Die biologische Funktion des Rhodopsins ist die Aktivierung des G-Proteins Transducin, die durch Absorption von Licht von dem Chromophor des Rhodopsins gestartet wird. An diese Aktivierung schließt eine komplexe Reaktionskaskade an, die zum Entstehen eines Nervenimpulses führt.

Auch in Rhodopsin ist das Retinal über eine Schiff'sche Base kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines spezifischen Lysinrestes des Opsins gebunden, hier jedoch in Position 296. In der Aminosäuresequenz unterscheidet sich das untersuchte Rinderrhodopsin nur an 12 Stellen von der des Menschen. Die Struktur von Rhodopsin ist weniger genau bekannt als die des bR, da die Kristallisation noch nicht perfekt gelingt.

Nach der Lichtanregung durchläuft Rhodopsin eine Reaktionskaskade mit mehreren Intermediaten, die sich durch ihre Absorptionsspektren unterscheiden (siehe Abb. 1.3). Die Beschreibung dieser Kaskade findet man in einigen Übersichtsartikeln (Hofmann et al., 1995; Kliger und Lewis, 1995). Im Ausgangszustand liegt das Retinal in der 11-*cis* Form vor und hat ein Absorptionsmaximum bei etwa 500 nm. Lichtanregung überführt das Retinal in die all-*trans* Form. Das erste Intermediat ist das rotverschobene Bathorhodopsin. Bathorhodopsin zerfällt (über die Zwischenstufe BSI „blue shifted Intermediate“) im ns Zeitbereich in Lumirhodopsin, das wieder bei etwa 500 nm absorbiert. Bis zu dieser Stufe sind die Übergänge auf lokale Änderungen am Chromophor oder der direkten Umgebung beschränkt. Erst in Metarhodopsin I (M_I) wird von größeren strukturellen Änderungen des Proteins berichtet, die sich durch die Änderung von UV-Banden bei 250-300 nm bemerkbar machen, die von Tyrosin- und Tryptophan- Gruppen herrühren. Beim Übergang von M_I nach M_{II} wird das Proton der Schiff'schen Base abgespalten, welches die starke Wellenlängenverschiebung von über 100 nm erklärt. Dieser Übergang findet in mehreren Phasen statt. Daher wurde ein weiteres spektral nicht unterscheidbares Intermediat postuliert. Die Nomenklatur dieses zusätzlichen isospektralen Intermediates ist in der Literatur nicht eindeutig. So findet man für die isospektralen Zustände die Bezeichnungen M_{IIa}/M_{IIb} (Arnis und Hofmann, 1993) oder M_{I380}/M_{II} (Thorgeirsson et al., 1993) oder $M_{II}^{slow}/M_{II}^{fast}$ (Straume et al., 1990).

Die Beobachtung, daß mit abnehmendem pH das Gleichgewicht des M_I - M_{II} Übergangs zugunsten von M_{II} verschoben wird, stellt zunächst einen Widerspruch zur Deprotonierungsreaktion der Schiff'schen Base im Übergang zu M_{II} dar. Dieser läßt sich damit erklären, daß im M_{II} Aufbau zwei Reaktionen gleichzeitig stattfinden: die Deprotonierung der Schiff'schen Base zu dem internen Akzeptor Glu-113 und eine Protonenaufnahme von einer anderen Gruppe des Proteins.

Die Temperaturabhängigkeit der M_I/M_{II} Kinetik führt zu einer hohen Aktivierungsenergie, die auf größere Reorientierungen schließen läßt, die zu diesem Übergang notwendig sind. Dies ist gut verträglich mit der Feststellung, daß M_{II} der Zustand ist, in dem das G-Protein Transducin ankoppeln und die Signalkette initiiert werden kann.

Metarhodopsin III ist ein Übergangszustand zwischen Metarhodopsin II, in dem das Retinal noch kovalent gebunden ist, und dem Ende der Kaskade bei dem das all-*trans* Retinal vom Opsin getrennt vorliegt. Diese unter Meßbedingungen irreversible Spaltung des Rhodopsins macht die Messungen an Rhodopsin besonders aufwendig, da nach wenigen Laserblitzen die Probe ausgebleicht wird (siehe Abb. 7.1) und zusätzlich im Dunkeln gearbeitet werden muß.

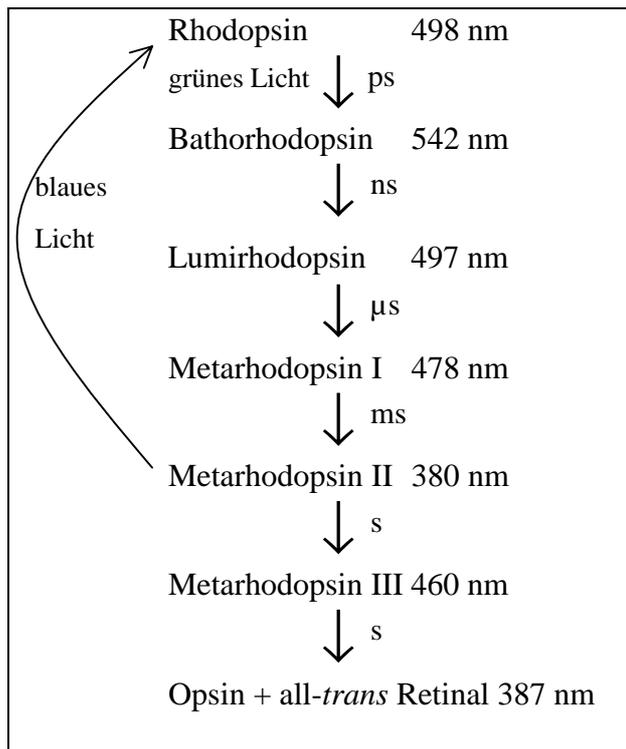


Abb. 1.3 Vereinfachtes Schema der Intermediate während der photolytischen Spaltung des Rhodopsins. Rechts sind die Wellenlängen der maximalen Absorption der Intermediate angegeben. Zwischen den Intermediate sind die Zeitbereiche angegeben, in denen die Übergänge stattfinden. Das vom Opsin abgelöste all-*trans* Retinal kann im Organismus durch die sogenannte Retinal-Isomerase wieder in die 11-*cis* Form umgewandelt werden. Diese Form kann sich dann wieder an das Opsin anlagern, so daß wieder funktionstüchtiges Rhodopsin entsteht. Im Labor wird jedoch mit isolierten ROS Membranen (siehe Kap. 7) gearbeitet, so daß bei einer Messung jedes Proteinmolekül nur einmal diese Kaskade durchlaufen kann. (Schema aus Stryer, 1994)

Da bei dem membrangebundenen Protein Rhodopsin die oben beschriebenen Protonenbewegungen stattfinden, besteht hier, wie schon bei bR beschrieben, die Möglichkeit an orientierten Membranen elektrische Signale nachzuweisen (Fahr, 1981; Drachev et al., 1981; Lindau und Rüppel, 1983). Die größte Amplitude dieser elektrischen Signale findet man im Zeitbereich des Aufbaus von M_{II} .

Anregung von M_{II} mit blauem Licht führt zur Reisoomerisierung in die 11-*cis* Form M_{II}' (Williams, 1968). Diese zerfällt in einer Dunkelreaktion in den Ausgangszustand von Rhodopsin, wodurch die irreversible Spaltung vermieden wird. Da dabei die Ladungsverschiebungen, die mit dem M_{II} Aufbau assoziiert wurden, wieder rückgängig gemacht werden müssen, sollte man auch bei dieser Rückreaktion elektrische Signale erwarten. Diese könnten dann wie bei bR (siehe oben) auf Rückschlüsse für den Mechanismus der Vorwärtsreaktion führen.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, weiteren Aufschluß über die Funktionsweise der Membranproteine Bacteriorhodopsin und Rhodopsin zu erlangen.

Dazu sollten die Photoreaktionen der Photozyklusintermediate von Bacteriorhodopsin untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten die vorhandenen Apparaturen zur zeitaufgelösten Photospannungsmessung und Absorptionsspektroskopie für eine Doppelblitzanregung umgebaut werden. Dabei startet der erste Blitz den normalen Photozyklus und der zweite die Photoreaktion des Intermediats. Da einige Photoreaktionen schnell (100 ns) stattfinden, mußte außerdem die Zeitauflösung weiter erhöht werden. Weiterhin sollte eine Methode zur Auswertung der aus diesen Experimenten erhaltenen Zeitspuren gefunden werden, die es ermöglicht, aus dem überlagerten Signal von Grundzustands- und Intermediatsanregung, die des Intermediates alleine zu erhalten. Anhand von Kontrollexperimenten sollte diese Auswertemethode auch gründlich auf Gültigkeit überprüft werden. Bei den elektrischen Doppelblitzexperimenten ergab sich das Problem, daß der erste Blitz bereits ein Membranpotential erzeugt, so daß für den zweiten Blitz eine andere

Ausgangssituation besteht als für den ersten Blitz. Aus diesem Grund sollte auch der Einfluß des Membranpotentials auf die Kinetik der Ladungsverschiebung untersucht werden.

Kernpunkt der Untersuchungen sollte die Photorückreaktion aus dem M-Intermediat sein. Bei dieser Photorückreaktion wird das Proton, das im L-M Übergang von der Schiffischen Base auf die Seitengruppe von Asp-85 transferiert wurde, wieder zurück zur Schiffischen Base gebracht. Da während der Lebensdauer des M-Intermediats der irreversible Schritt der vektorialen Protonenpumpe stattfindet, vermutet man einen Effekt auf die Kinetik der Photorückreaktion, der abhängig davon ist, ob der irreversible Schritt bereits stattgefunden hat. Wichtiger Punkt ist dabei die Wechselwirkung einzelner Seitengruppen des Proteins, besonders der des internen Donors Asp-85 mit der Protonenabgabegruppe Glu-204. Um diese Wechselwirkung genauer zu studieren, sollte die Photorückreaktion bei variierendem äußeren pH und variierendem Zeitabstand zwischen den beiden Blitzen untersucht werden. Außerdem sollte dazu die Photorückreaktion von Punktmutanten untersucht werden, bei denen die Protonenabgabegruppe überhaupt nicht existiert (E204Q) oder die Wechselwirkung des internen Donors mit der Protonenabgabegruppe gehemmt ist (R82A).

In Zusammenhang mit der M-Rückreaktion sollte die Punktmutante D85N untersucht werden. Bei alkalischem pH liegt der Grundzustand dieser Mutante bereits in einer ähnlich gelben Form wie M vor, d.h. die Schiffische Base ist deprotoniert. Wie bei der Photorückreaktion aus M steigt auch bei dieser Mutante der pK der Schiffischen Base nach der Anregung mit blauem Licht an, d.h. die Schiffische Base ist bestrebt ein Proton zu binden. Da nun die Position 85 keine Ladung zur Verfügung stellen kann, springt hier eine andere Seitengruppe als Ersatz ein. Die Ladungsverschiebungen in dieser Mutante zu charakterisieren, war ebenfalls Ziel dieser Arbeit.

Zum Vergleich sollten auch Messungen an dem Retinalprotein Rhodopsin durchgeführt werden. Hier wird, ähnlich wie bei Bacteriorhodopsin, das Proton der protonierten Schiffischen Base beim M_I - M_{II} Übergang an einen Akzeptor (Glu-113) abgegeben, und zusätzlich wird mindestens ein H^+ auf der zytoplasmatischen Seite aufgenommen. Daher ist dieses System ebenfalls sehr geeignet für zeitaufgelöste Absorptions- und Photospannungsmessungen. Außerdem kann M_{II} durch blaue Blitze (UV) in den Ausgangszustand des Rhodopsins zurückgebracht werden. Hier sollte insbesondere die pH-Abhängigkeit des M_I / M_{II} Übergangs und die Photorückreaktion aus M_{II} untersucht werden.

