
Kapitel 1

Einführung in das biologische System Bacteriorhodopsin und Zielsetzung

1.1 Vorkommen und physiologische Relevanz

Bacteriorhodopsin ist ein Protein, das in der Zellmembran des Bakteriums *halobacterium salinarium* vorkommt. Dieses Bakterium wird zum Reich der Archaeobakterien gezählt und ist an extrem hohe Salzkonzentrationen und Sauerstoffarmut angepasst.

In der Zellmembran ist Bacteriorhodopsin (bR) in Bereichen konzentriert, in denen es sich zu Trimeren anordnet, die wiederum ein zweidimensionales hexagonales Gitter bilden. In dieser dichten Packung befinden sich nur etwa 9 Lipide pro bR-Molekül und keine anderen Proteine. Wegen ihrer charakteristischen Färbung werden die von bR besetzten Bereiche der Zellmembran auch Purpurmembranen (PM) genannt. Unter optimalen Wachstumsbedingungen sind bis zu 80% der Zelloberfläche mit Purpurmembranen bedeckt.

Das transmembrane Protein bR ist für das Bakterium unter den spezifischen Bedingungen lebensnotwendig, da es die Energieversorgung der Zelle sichert. Durch die Absorption von sichtbarem Licht wird über der Membran ein Protonengradient aufgebaut. Dieser Protonengradient wiederum steht als delokalisierte Energiequelle für die ATP-Synthese und den Flagellarmotor zur Verfügung. Die ATP-Synthese – durch Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) entsteht die energiereiche Verbindung Adenosintriphosphat (ATP) – wird durch ein membranständiges Enzym katalysiert, das entsprechend seiner Funktion ATP-Synthase genannt wird. Der Antrieb der ATP-Synthese durch einen Protonengradienten wird mit Hilfe der chemi-osmotische Hypothese [Mit61] beschrieben. Der Wirkungsgrad der lichtgetriebenen Protonenpumpe bR ist jedoch außerordentlich gering. Ein Photon im sichtbaren Spektralbereich ($\lambda \approx 530nm$) trägt eine Energie von ca. 2.3eV, während das Proton nur bis zu einer maximalen Potentialdifferenz von 0.1–0.2V transportiert wird.

1.2 Struktur

Das bR-Molekül ist chemisch betrachtet ein Polypeptid, es besteht aus einer Kette von 248 Aminosäuren [Kho79, Ovc79] und hat ein Molekulargewicht von 26.5kDa. Die prosthetische Gruppe bzw. der Chromophor des Proteins ist Retinal¹, das über eine Schiffische Base (SB) kovalent an die Aminosäure Lys-216 gebunden ist. Da die Kristallisation von

¹Ein Derivat des β -Carotins, dessen chemisch korrekte Bezeichnung Retinyliden lautet.

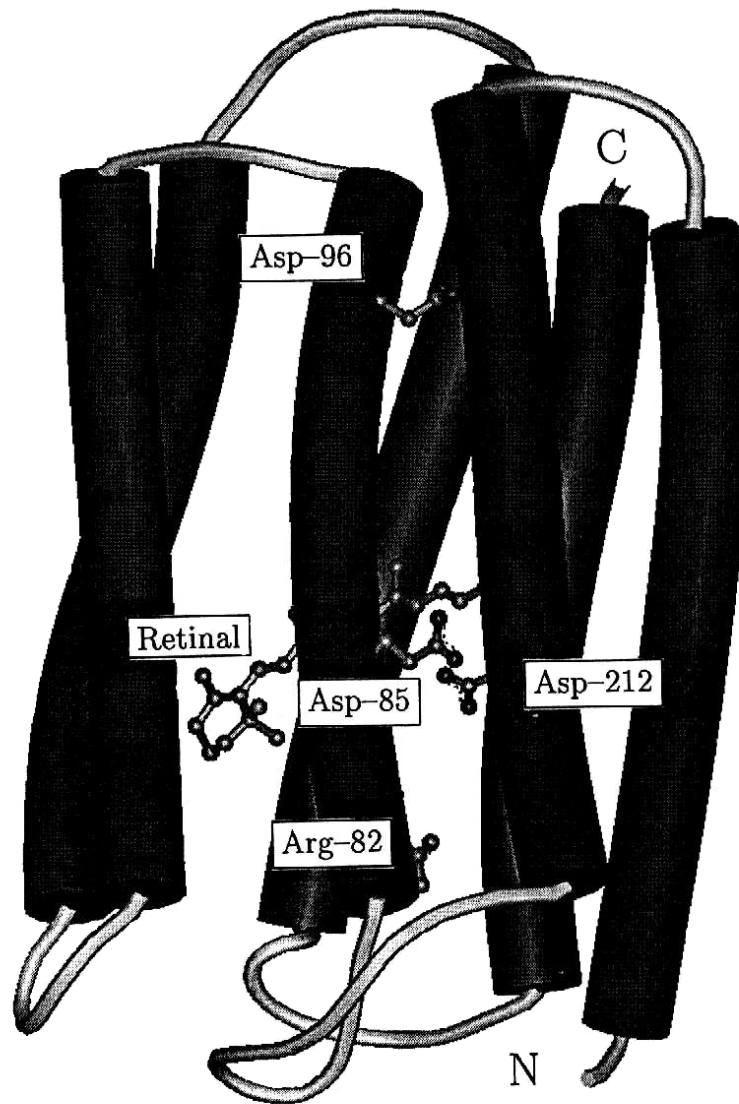


Abbildung 1.1: Räumliche Struktur von bR nach dem Modell von Grigorieff [Gri96]. Die 7 transmembranen α -Helices sind als Säulen dargestellt und die Loopbereiche als dünne Schläuche. Die terminalen Enden (N auf der extrazellulären Seite und C auf der zytoplasmatischen Seite) sind verkürzt angedeutet. Funktionell wichtige Gruppen (Retinal, der Gegenionenkomplex bestehend aus Asp-85, Asp-212 und Arg-82, sowie der Protonendonator Asp-96) sind durch Kugeln und Stäbchen hervorgehoben.

Membranproteinen äußerst schwierig ist, war man bis vor kurzem darauf angewiesen, die Diffraktion am zweidimensionalen hexagonalen Gitter, das natürlicherweise bei den Purpormembranen gegeben ist, zu studieren². Die Gitterkonstante beträgt ca. 62.4 \AA , und die Einheitszelle wird von Trimeren gebildet. Mittels Elektronendiffraktion und -mikroskopie konnte ein dreidimensionales Modell des bR-Moleküls entwickelt werden [Hen75], das nach und nach verfeinert wurde [Hen90, Gri96, Kim97]. Eine schematische Darstellung der räumlichen Struktur ist in Abb. 1.1 gegeben. Die Sekundärstruktur ist durch 7 transmembrane

²Die später zitierten bR-Mikrokristalle, die für Lineardichroismusexperimente benutzt wurden [Sch91], zeigten keine für die Strukturbestimmung brauchbaren Beugungsmuster.

α -Helices charakterisiert, die über sogenannte Loops miteinander verbunden sind. Mit einer Auflösung von 3\AA konnte die Position von fast allen Aminosäuren im Proteinrückgrat bestimmt werden [Kim97], wobei jedoch die zugehörigen Seitenketten teilweise nicht lokalisiert werden konnten. Ebenso war die Lage des Retinals nur näherungsweise zu bestimmen, da die Streukraft der Polyenkette (Methylgruppen) relativ schwach ist.

Um die Lage und Orientierung des Retinals zu bestimmen, wurden verschiedene Methoden angewendet. Durch Neutronenstreuexperimente mit selektiv deuterierten Retinalen [Sei85, Sei86, Hey88, Hau90] wurde die Projektion des Retinals auf die Membranebene ermittelt. Aus Lineardichroismmessungen im sichtbaren Spektralbereich konnte der Winkel der Polyenkette bezüglich der Membrannormalen auf $71 \pm 4^\circ$ [Hey77] bzw. $70.3 \pm 0.4^\circ$ [Lin89] abgeschätzt werden. Aus analogen Messungen mit einem modifizierten Retinal [Lin89] wurde geschlossen, daß die Polyenkette zur extrazellulären Seite geneigt ist und nicht zur zytoplasmatischen, und daß die Methylgruppen C_{18} , C_{19} und C_{20} zur zytoplasmatischen Seite weisen. Mit polarisierter FTIR-Spektroskopie [Ear86, Fah89] konnte nachgewiesen werden, daß die Polyenebene etwa senkrecht auf der Membranebene steht. Die Orientierungen der C_{18} -, C_{19} - und C_{20} -Methylgruppen wurden durch ^2H -NMR [Ulr94] bestimmt, wobei eine „gestörte“ Chromophorstruktur festgestellt wurde, d.h. die Polyenkette ist leicht gekrümmt bzw. tordiert.

Kürzlich ist es gelungen, über sogenannte kubische Lipidphasen dreidimensionale bR-Mikrokristalle herzustellen, die Röntgenstrahlung isotrop beugen [Peb97]. Damit konnte die Struktur mit einer Auflösung von 2.5\AA angegeben werden. Die früheren Strukturen wurden weitestgehend bestätigt, einige Abweichungen betreffen die Loopbereiche und Seitenketten der Aminosäuren. Darüberhinaus konnte die Polyenkette des Retinals direkt aufgelöst werden, und wenigstens acht Wassermoleküle im vermeintlichen Protonenkanal waren identifizierbar. Das Retinal soll in der all-*trans* Konformation vorgelegen haben. Die Orientierungen der oben erwähnten Methylgruppen zeigt jedoch teilweise erhebliche Abweichungen zu den Ergebnissen der ^2H -NMR-Experimente. Die genauen Atomkoordinaten der Struktur sind bei der Brookhaven Databank noch nicht zugänglich. Die neueste Arbeit zur bR-Struktur [Lue98] weist auf ein bisher nicht berücksichtigtes „Twinning“ der in den kubische Lipidphasen gewachsenen bR-Kristalle hin und kommt zu teilweise abweichenden Ergebnissen.

1.3 Spektroskopische Charakterisierung und Funktion

Für die spektralen und funktionellen Eigenschaften von bR ist der Retinal-Chromophor das wesentliche Element. Nach Lichtanregung des Retinals durchläuft das Protein einen Photozyklus, in dessen Verlauf netto ein Proton von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Seite transportiert wird.

Das Apoprotein³ ist im sichtbaren Spektralbereich transparent, d.h. es absorbiert erst bei Wellenlängen unterhalb von 300nm (aromatische Seitengruppen). Das Retinal mit deprotonierter Schiffischer Base weist in organischem Lösungsmittel ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 380\text{nm}$ auf, während es als Chlorid mit protonierter Schiffischer Base im Lösungsmittel Methanol mit einem Maximum bei $\lambda = 440\text{nm}$ (in all-*trans* Konformation) [Lug86] absorbiert. Eine starke Verschiebung des Absorptionsmaximums nach $\lambda \approx 570\text{nm}$ zeigt sich beim Regenerieren des Apoproteins mit all-*trans* Retinal, wenn also der funktionell aktive Zustand wieder hergestellt ist. Diese starke Rotverschiebung wird als *opsin-shift* bezeichnet und ist durch die Ladungsverteilung im Innern des Proteins bzw. in der Bindungstasche des

³das Protein ohne Chromophor

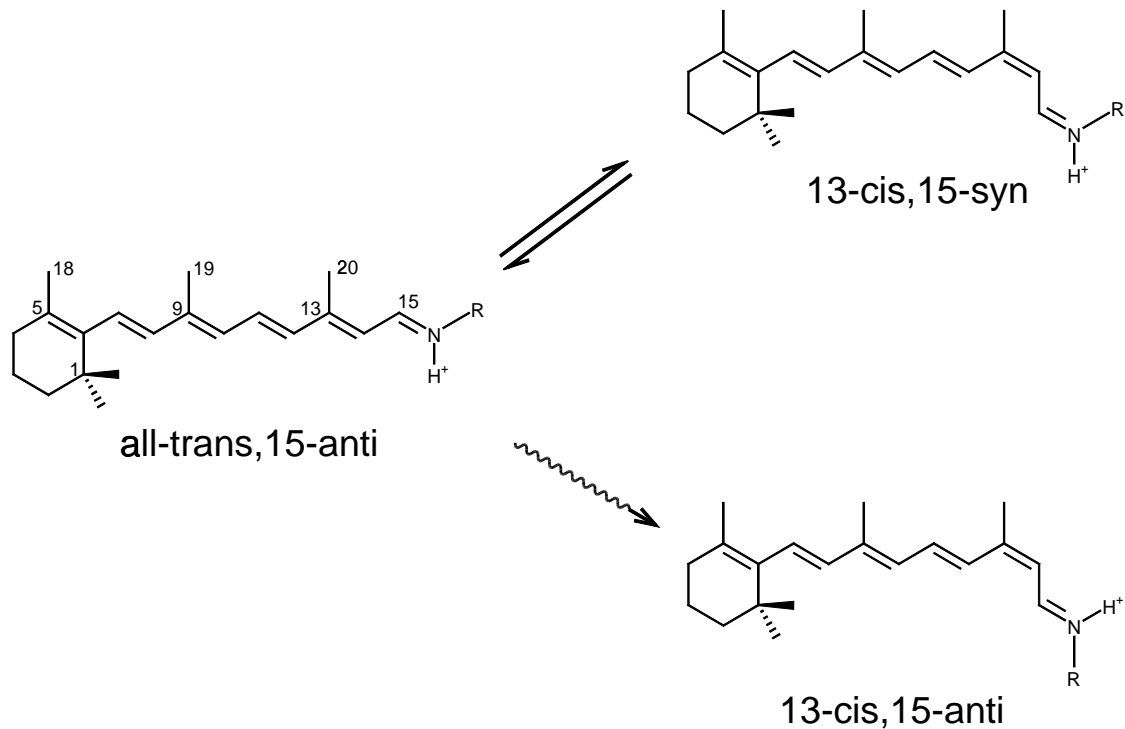


Abbildung 1.2: Isomerisierungszustände von Retinal in bR. Zur besseren Übersicht sind in der linken Darstellung einige C-Atome numeriert, R ist die Seitenkette des Lys-216. Im Dunkeln steht die *all-trans,15-anti* Konformation im Gleichgewicht mit der *13-cis,15-syn* Konformation. Lichtanregung von *all-trans* führt zur *13-cis,15-anti* Konformation.

Retinals bedingt. Den Hauptbeitrag liefert dabei offenbar die elektrostatische Wechselwirkung der positiv geladenen Schiff'schen Base mit dem Gegenionkomplex aus Asp-85, Arg-82 und Asp-212 [Mat91]. Weitere Beiträge werden der *6-s-trans* Konformation des Retinals und dipolaren Proteingruppen in der Nähe des β -Iononrings zugeschrieben.

Im Dunkeln stellt sich in bR ein Gemisch von Retinalisomeren ein (siehe Abb. 1.2), das im thermischen Gleichgewicht zu 34% aus der *all-trans,15-anti* und zu 66% aus der *13-cis,15-syn* Konformation besteht [Sch89]. Dieses Zustandsgemisch wird als dunkeladaptierter Zustand bezeichnet und weist ein um ca. 10nm blauverschobenes Absorptionsmaximum auf. Daraus resultiert ein Absorptionsmaximum von $\lambda \approx 550\text{nm}$ für bR mit Retinal in der reinen *13-cis,15-syn* Konformation. Unter Lichteinfluß geht das Zustandsgemisch nahezu vollständig in die *all-trans,15-anti* Konformation über. Das bedeutet, daß der *all-trans* Zustand nach Lichtanregung einen geschlossenen Zyklus durchläuft, während die *13-cis,15-syn* Konformation nach Lichtanregung teilweise nach *all-trans* übergeht [Hof89].

Für den Protonentransport durch die Membran ist ausschließlich der *all-trans* Zyklus verantwortlich. In diesem Zyklus wird eine Folge von Zwischenzuständen (Intermediaten) durchlaufen, die sich spektroskopisch unterscheiden. Die übliche Charakterisierung der Intermediate erfolgt durch das Absorptionsmaximum im sichtbaren Spektralbereich. Eine Änderung der Absorption im Verlauf der Protonenverschiebung ist insofern plausibel, da die Ladungsverteilung in der Umgebung des Retinals das Potential des elektronischen Systems und damit die Energieabstände zwischen den elektronischen Zuständen beeinflusst (vgl. die Argumentation zum *opsin-shift*). Im idealisierten Bild eines eindimensionalen Potentialkastens würde das Entfernen einer positiven Ladung bedeuten, daß der Kasten kürzer und der Energieabstand zwischen dem elektronischen Grundzustand und dem erstem angeregten Zustand

dadurch größer würde. Das Absorptionsspektrum wäre blauverschoben.

Die zeitliche Reihenfolge in der Reaktionskaskade des all-*trans* Zyklus wird in der Literatur [Mat91, Lan95] wie folgt angegeben, die Subskripte bezeichnen dabei die Absorptionsmaxima in *nm*: Durch Photoisomerisierung in eine 13-*cis*,15-*anti* Konformation (siehe Abb. 1.2) wird der Zyklus initiiert. Nach ca. 0.5ps kann ein rotverschobener Zustand (J_{620}) nachgewiesen werden, der mit einer Zeitkonstanten von 5ps nach K_{590} zerfällt. K_{590} relaxiert im μs -Bereich nach L_{550} . Während dieser Schritte relaxieren Torsionsmomente im Kohlenstoffrückgrat des Retinals. Im Übergang von L_{550} nach M_{410} (Zeitkonstante etwa $100\mu\text{s}$) wird die Schiffische Base deprotoniert, die Gruppe Asp-85 fungiert dabei als Akzeptor, das Absorptionsspektrum wird drastisch blauverschoben. Im gleichen Zeitbereich wird ein Proton an der Oberfläche freigesetzt, die Abgabegruppe X ist möglicherweise Glu-204 [Bro95]. Alle folgenden Relaxationen liegen im Zeitbereich von 5-10ms. Die Schiffische Base wird von der Gruppe Asp-96, die im zytoplasmatischen Kanal liegt, im Übergang nach N_{540} reprotoniert. Die Reisoomerisierung nach all-*trans*,15-*anti* und die Reprotonierung von Asp-96 findet im Zerfall nach O_{640} statt. Mit der Protonenverschiebung von Asp-85 zur Abgabegruppe X auf der extrazellulären Seite wird der Ausgangszustand wieder hergestellt. Eine Übersicht zum Photozyklus ist in Abb. 1.3 dargestellt.

Diese Abfolge von Zuständen im bR-Photozyklus ist jedoch eine grobe Beschreibung und kann nur als Anhaltspunkt dienen, welche spektroskopisch unterscheidbaren Intermediate

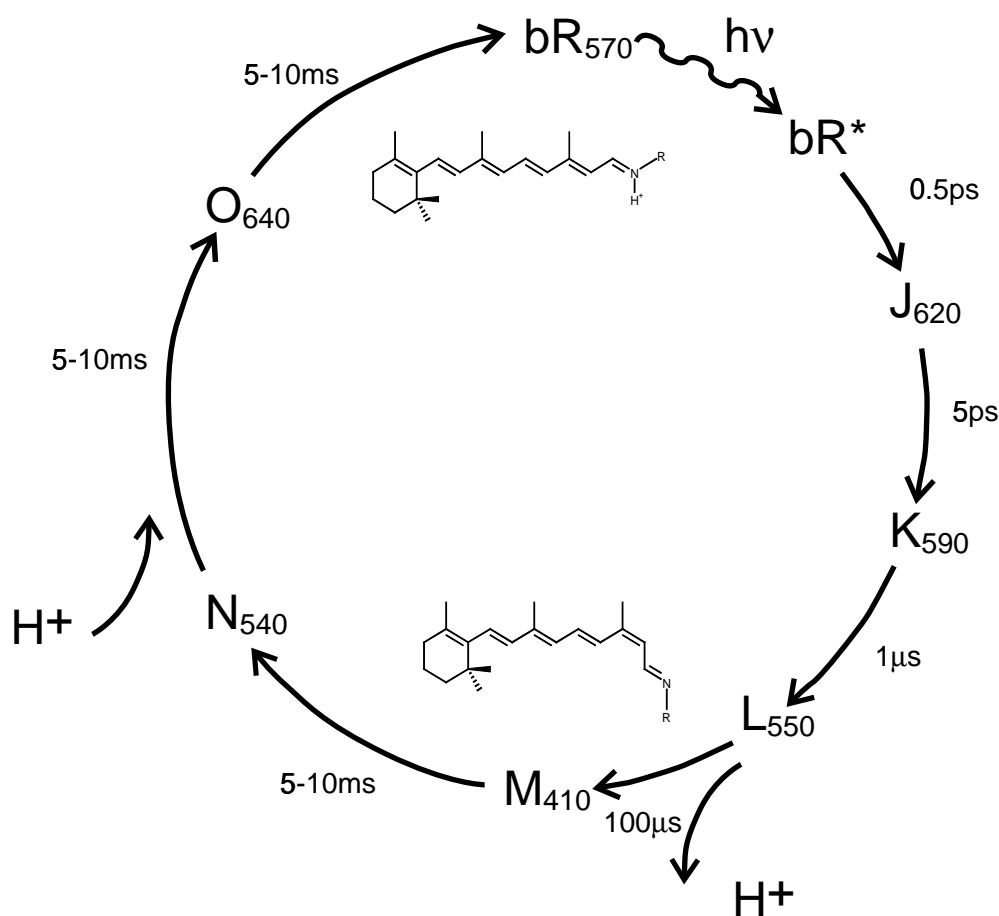


Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung des Photozyklus von all-*trans* bR. Außer bR* sind alle Zwischenzustände elektronische Grundzustände. Die Subskripte bezeichnen die Absorptionsmaxima in *nm*. Für die Zeitkonstanten der Übergänge sind die Größenordnungen angegeben.

in welchem Zeitfenster erscheinen. Einerseits erlaubt die spektrale und kinetische Überlagerung von Intermediaten oft keine eindeutige Zuordnung, andererseits treten in der Regel mehr kinetische Komponenten auf, als Intermediate spektroskopisch zu differenzieren sind. Zwei unterschiedliche Ansätze werden zur Erklärung herangezogen [Lan95]:

(1) Es gibt spektroskopisch ununterscheidbare Intermediate, die sequenziell aufeinander folgen und teilweise in transienten Gleichgewichten zueinander stehen.

(2) Der bR-Grundzustand liegt in unterschiedlichen Subzuständen vor, von denen jeder einen eigenen spezifischen Photozyklus durchläuft (Heterogenität). Eine Verzweigung im Photozyklus, die zu unterschiedlichen parallelen Zerfallskanälen führt, würde ebenfalls in dieses Bild passen.

Ein allgemein akzeptiertes kinetisches Modell konnte bisher nicht gefunden werden.

1.4 Transiente Chromophororientierungen – Zielsetzung der Arbeit

Die Beschreibung der Funktion von bR macht plausibel, daß der Retinalchromophor eine zentrale Rolle spielt. Die durch Lichtabsorption induzierte Isomerisierung des Retinals löst eine Abfolge von Konformationsänderungen des Proteins aus, die den Protonentransport ermöglichen. Durch die Wechselwirkung mit der Proteinumgebung wird die vom Chromophor aufgenommene Energie auf das Protein übertragen. Dabei ist auch eine Änderung der Chromophororientierung zu erwarten. Da Retinal ein konjugiertes planares π -Elektronensystem aufweist, liegt das elektronische Übergangsdipolmoment aus Symmetriegründen in der Chromophorebene und kann somit als Indikator der Chromophororientierung dienen. Für all-*trans* bzw. 11-*cis* Retinalkristalle wurde gezeigt [Dri84], daß die Richtung des Übergangsdipolmoments der Hauptbande näherungsweise durch den Verbindungsvektor zwischen den Enden des π -Elektronensystems gegeben ist. Dieser Schluß konnte auch aus Lineardichroismusexperimenten an bR-Filmen mit nativem bzw. 3,4-Dehydroretinal [Lin89], gestützt durch quantenchemische Rechnungen, gezogen werden.

Die Richtung des elektronischen Übergangsdipolmoments läßt sich durch zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie mit linear polarisiertem Licht während des Photozyklus verfolgen. Während Strukturmethoden wie Röntgendiffraktion oder NMR auf die Untersuchung von wenigen Proteinzuständen beschränkt sind, die sich durch extreme Bedingungen stabilisieren lassen, bieten die zeitaufgelösten Lineardichroismusmessungen die Möglichkeit, transiente, also nichtstationäre, Zustände unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Mit der Information des Isomerisierungszustandes, der durch Resonanz-Raman-Spektroskopie zugänglich ist [Ame89], läßt die Orientierung des elektronischen Übergangsdipolmoments auf eine Änderung der Chromophororientierung und damit indirekt auf eine Strukturänderung des Proteins schließen.

Methodisch unterschiedliche Ansätze zeitaufgelöster Lineardichroismusmessungen wurden auf bR in Purpormembranen angewandt. Photoselektionsexperimente an isotropen [Kar82, Son94, Esq96] bzw. orientierten [Hey92, Son96] Systemen führten jedoch zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. Da diese Messungen eine quasi infinitesimale Anregungsintensität erfordern und somit ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis liefern, war in der Arbeitsgruppe Heyn die Methode der isotropen quasi sättigenden Anregung von orientierten Systemen entwickelt worden [Zsc93, Ott95]. Diese Methode liefert sehr rauscharme Meßkurven und bietet außerdem den Vorteil, daß die formale Beschreibung einfach und übersichtlich ist.

Erste Anwendungen ergaben nur geringe Orientierungsänderungen in den Intermediaten M [Zsc93] und O [Ott95].

Das **Hauptziel** dieser Arbeit war nun, die Orientierung des Übergangsdipolmoments in möglichst allen transienten Intermediaten des bR-Photozyklus zu bestimmen. Ergänzend sollten auch stationäre Chromophorzustände untersucht werden, um die Aussagen aus den zeitaufgelösten Messungen besser einordnen zu können. Aus dieser Zielsetzung resultierten die folgenden Ansatzpunkte:

- Weiterentwicklung der apparativen Methode durch
 - die Verbesserung der Zeitauflösung zur Untersuchung der frühen Photozyklusintermediate,
 - die Verbesserung der Amplitudenauflösung hinsichtlich der späten Photozyklusintermediate,
 - die Minimierung der Streulichtartefakte infolge der hohen Anregungsintensitäten („Blitzdurchschlag“),
 - die Optimierung der isotropen Anregung bzw. die Durchstimmbbarkeit der Anregungsverhältnisse,
 - die Eliminierung von Polarisationsartefakten bei der Detektion bzw. die Erhöhung der Meßgenauigkeit von polarisationsabhängigen Absorptionsänderungen.
- Entwicklung eines Auswerteverfahrens, das die Bestimmung der Orientierung des Übergangsdipolmoments auch bei zeitlicher und spektraler Überlagerung der Intermediate erlaubt.
- Entwicklung eines alternativen Verfahrens zur Orientierung von Membranfragmenten, um insbesondere stationäre Chromophorzustände unabhängig von der Möglichkeit der Orientierung im Magnetfeld untersuchen zu können.

