

Kapitel 9

Zusammenfassung

Absorptions- und Dispersionseigenschaften von stationären und transienten Chromophorzuständen der lichtgetriebenen Protonenpumpe Bacteriorhodopsin wurden mit linear polarisiertem Licht in orientierten Membransystemen untersucht. Dazu wurde die Meßanordnung von den üblichen Lineardichroismusexperimenten um einen zusätzlichen Polarisator erweitert, so daß sich die orientierte Probe zwischen zwei Polarisatoren befindet, deren Transmissionsachsen parallel zueinander sind. Die relative Transmission dieser Anordnung als Funktion des Polarisationswinkels liefert neben der isotropen Absorption und der Absorptionsanisotropie auch die lineare Doppelbrechung als unabhängige Meßgröße. Durch dieses Verfahren wird eine hohe Genauigkeit bei der Bestimmung der Anisotropie erzielt, und außerdem wird die Polarisationsabhängigkeit des Detektionssystems, die sonst als Artefakt überlagert ist, eliminiert. Das Meßprinzip ist sowohl für Gleichlichtmessungen als auch für zeitaufgelöste Messungen mit isotroper Anregung anwendbar.

Die Orientierung der Purpurmembranfragmente erfolgte für einen Großteil der Proben in einem Magnetfeld der Stärke 14 T. Der dabei erreichte Ordnungsparameter ($S_2 \approx 0.5$) war ausreichend für die optischen Messungen. Präparationen ohne Salz und Puffer lieferten einen niedrigeren Ordnungsparameter, was darauf schließen läßt, daß pH-Wert und Ionenstärke einen Einfluß auf die Membrankrümmung und damit auf den effektiven Ordnungsparameter haben. Eine quantitative Untersuchung dieses Effektes wäre sicherlich wünschenswert, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Alternativ wurde ein Verfahren zur Orientierung von Membranfragmenten entwickelt, das sehr einfach zu realisieren ist und keine aufwendigen Apparate (z.B. Hochfeld) erfordert. Dazu wurde ein Polyacrylamidgel mit darin immobilisierten Membranfragmenten vollständig ausgetrocknet und anschließend anisotrop gequollen. Der für diese Geometrie optimale Ordnungsparameter ($S_2 = -0.5$) wurde annähernd erreicht, unabhängig von pH-Wert und Ionenstärke. Bei den optischen Messungen dieser Proben ist die Überlagerung der Spannungsdoppelbrechung zu berücksichtigen, die sich aber teilweise vorteilhaft auf die Genauigkeit bei der Bestimmung der Doppelbrechung bzw. der Doppelbrechungsänderung auswirkt.

Für die zeitaufgelösten Experimente wurden an der Blitzlichtapparatur apparative und konzeptionelle Verbesserungen durchgeführt. Durch den Einsatz moderner Hardware-Komponenten zur Datenaufnahme konnten die Zeitauflösung im frühen und die Amplitudenauflösung im späten Zeitbereich verbessert werden, die Speichertiefe ermöglicht, 9 Zeitdekaden zu erfassen. Zuverlässige Information über die frühen Intermediate K und L ist dank der hohen Zeitauflösung zugänglich. Ein Doppelmonochromator reduziert bzw. unterdrückt das breitbandige Streulicht des Anregungsblitzes („Blitzdurchschlag“), so daß die Totzeit des Photomultiplier nicht infolge sättigender Intensität verlängert wird. Bei hoher

Meßlichtintensität bzw. mit schmalbandigen Lichtquellen wie den Diodenlasern sind die Signale im frühen Zeitbereich dann sehr rauscharm. Die Meßlichtintensität ist aber durch das System Bacteriorhodopsin, das ein sättigbarer Absorber ist, begrenzt.

Die „isotrope“ Anregung konnte durch eine geeignete Strahlführung optimiert werden, so daß die Intensitäten der beiden Anregungstrahlen unabhängig voneinander variiert werden können. Die Anregung kann als isotrop betrachtet werden, wenn die senkrecht zur Richtung des Meßlichts stehenden Anregungskomponenten etwa die gleiche Intensität haben. Der Einfluß der coaxialen Anregungskomponente, d.h. der Komponente mit Polarisationsvektor in Richtung des Meßlichtes, ist vernachlässigbar.

Der Vergleich über die Kramers–Kronig–Relation zeigte, daß der Chromophorbeitrag zur linearen Doppelbrechung mit den Lineardichroismusdaten konsistent ist. Der Chromophorbeitrag zum Brechungsindex von Purpurmembranen läßt sich damit abschätzen, er beträgt z.B. bei einer Wellenlänge von 633nm für senkrechten Lichteinfall etwa 0.022. Stationäre und transiente Doppelbrechungsänderungen von Purpurmembranen sind in fast allen Fällen an die Änderungen im Lineardichroismus gekoppelt. Die einzige Ausnahme wurde unter extrem alkalischen Bedingungen im Zerfall des M–Intermediates gefunden. Hier tritt ein Beitrag in der transienten Doppelbrechungsänderung auf, der nicht in Beziehung zum transienten Lineardichroismus steht. Im Normalfall kann aber die Doppelbrechungsänderung als zusätzliche Kontrolle für die Anisotropiebestimmung dienen.

Orientierungsänderungen des elektronischen Übergangsdipolmoments bezüglich der Membrannormalen wurden für Übergänge zwischen stationären Chromophorzuständen bestimmt, die mit Isomerisierungen verknüpft sind. Im Übergang von der all-*trans* Konformation zur 13-*cis*,15-*syn* Konformation, der bei der Licht–Dunkel–Adaptation abläuft, ändert sich die Orientierung des Übergangsdipolmoments im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht. Die 9-*cis* Isomerisierung, die den photoinduzierten Übergang von der blauen Form in den Pinkzustand begleitet, ist dagegen mit einer Zunahme des Winkels zwischen dem Übergangsdipolmoment und der Membrannormalen um etwa 2.5° verbunden. Im photostationären M–Zustand liegt der Chromophor in einer 13-*cis*,15-*anti* Konformation mit deprotonierter Schiffischer Base vor, und der Winkel zwischen dem Übergangsdipolmoment und der Membrannormalen ist um etwa 1.4° kleiner als in der all-*trans* Konformation des bR–Grundzustands.

Die Bestimmung der Orientierung des Übergangsdipolmoments in transienten Zuständen ist erschwert durch deren spektrale und kinetische Überlagerung. Für die zeitaufgelösten Messungen wurde ein modellunabhängiges Auswertungsverfahren entwickelt, das es erlaubt, aus Absorptionsänderung und transientem Lineardichroismus, unter Verwendung von geeigneten Nebenbedingungen, nicht nur die Orientierung des Übergangsdipolmoments in transienten Intermediaten, sondern auch die Intermediatsspektren und deren zeitliche Konzentrationsverläufe zu bestimmen. Das Verfahren konnte erfolgreich auf die frühen Intermediate K, L und M im Photozyklus von nativem Bacteriorhodopsin bzw. der Mutante D96A angewandt werden, wobei eine Erhaltungsbedingung für ein eindeutiges Ergebnis erforderlich war. Die Orientierungsänderungen bezüglich des bR–Grundzustandes sind relativ klein und zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen nativem und modifiziertem System: $\Delta\theta_K = -0.8^\circ \pm 0.2^\circ$, $\Delta\theta_L = -1.6^\circ \pm 0.2^\circ$, $\Delta\theta_M = -1.1^\circ \pm 0.3^\circ$. Für das N–Intermediat, das nur unter stark alkalischen Bedingungen akkumuliert werden konnte, ergaben sich das Spektrum und die Anisotropie aus einer Eigenwertgleichung, die die Information aus Absorptionsänderung und transientem Lineardichroismus verknüpft. Aus dem zeitlichen Verlauf der Anisotropie konnten sogar zwei Subzustände des N–Intermediats identifiziert werden, die sich nur in der Orientierung des Übergangsdipolmoments unterscheiden. Die Orientierung

gen dieser Subzustände waren jedoch nicht eindeutig bestimmt, sondern lediglich durch eine obere bzw. eine untere Grenze des Polarwinkels eingeschränkt. Für N_1 beträgt die Orientierungsänderung bezüglich des bR-Grundzustandes mindestens $\Delta\theta_{N_1} = -3.7^\circ$ und für N_2 höchstens $\Delta\theta_{N_2} = -2.1^\circ$. Die Orientierung des Übergangsdipolmoments im O-Intermediat konnte durch die geringe Akkumulation bzw. durch die Überlagerung des 13-*cis* Zyklus weniger genau bestimmt werden. Aus den Anisotropiezeit Spuren im langwelligen Spektralbereich ergibt sich die Abschätzung $-1.4^\circ \leq \Delta\theta_O \leq 0^\circ$. Eine positive Änderung für $\Delta\theta_O$, d.h. ein größerer Polarwinkel des Übergangsdipolmoments als im bR-Grundzustand, kann ausgeschlossen werden.

Die geringen Winkeländerungen des elektronischen Übergangsdipolmoments im Photozyklus von Bacteriorhodopsin sind mit dem folgenden molekularen Modell vereinbar: Die 13-*cis* Isomerisierung des Retinals ist mit einer Reorientierung der Polyenkette verbunden, so daß der C_5 - C_{13} -Verbindungsvektor um etwa $10 - 14^\circ$ zur Membrannormalen kippt, die C_{19} und C_{20} -Methylgruppe werden in Richtung zytoplasmatischer Seite ausgelenkt, der Winkel zwischen dem C_5 -N-Verbindungsvektor und der Membrannormalen ändert sich dabei aber nur um $1 - 4^\circ$. Durch den verkürzten Abstand zwischen dem N-Atom und dem β -Iononring und durch die 15-*anti* Konformation wird möglicherweise über die Seitenkette von Lys-216 eine Wechselwirkung mit Helix G vermittelt.

Für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methodik stellt die lichtgetriebene Protonenpumpe Bacteriorhodopsin ein ideales Modellsystem dar. Doch auch andere photoaktive Proteine, insbesondere weitere Vertreter aus der Klasse der Retinalproteine, würden sich als Untersuchungsobjekte anbieten. Beim Sehpigment Rhodopsin ist die Lichtaktivierung mit der Isomerisierung des Retinal-Chromophors von 11-*cis* nach all-*trans* verbunden. Weitere Beispiele für Systeme, bei denen Änderungen der Chromophororientierung funktionelle Wichtigkeit haben, sind das phototaktische Pflanzenprotein Phytochrom [Sin95] und der bakterielle Photorezeptor PYP (Photoactive Yellow Protein) [Gen98]. Diese sind jedoch keine membranständigen Proteine, so daß die Immobilisierung und Orientierung nach den hier beschriebenen Methoden erschwert ist.

