



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

Institut für Neurobiologie

**Nachweis eines Retinal-Protein-Komplexes
als wirksames Pigment der direkten
photophobischen Reaktion (PS 370) von
Halobacterium halobium, sowie
spektroskopische und biochemische
Untersuchungen am Bacteriorhodopsin
der Purpurmembran**

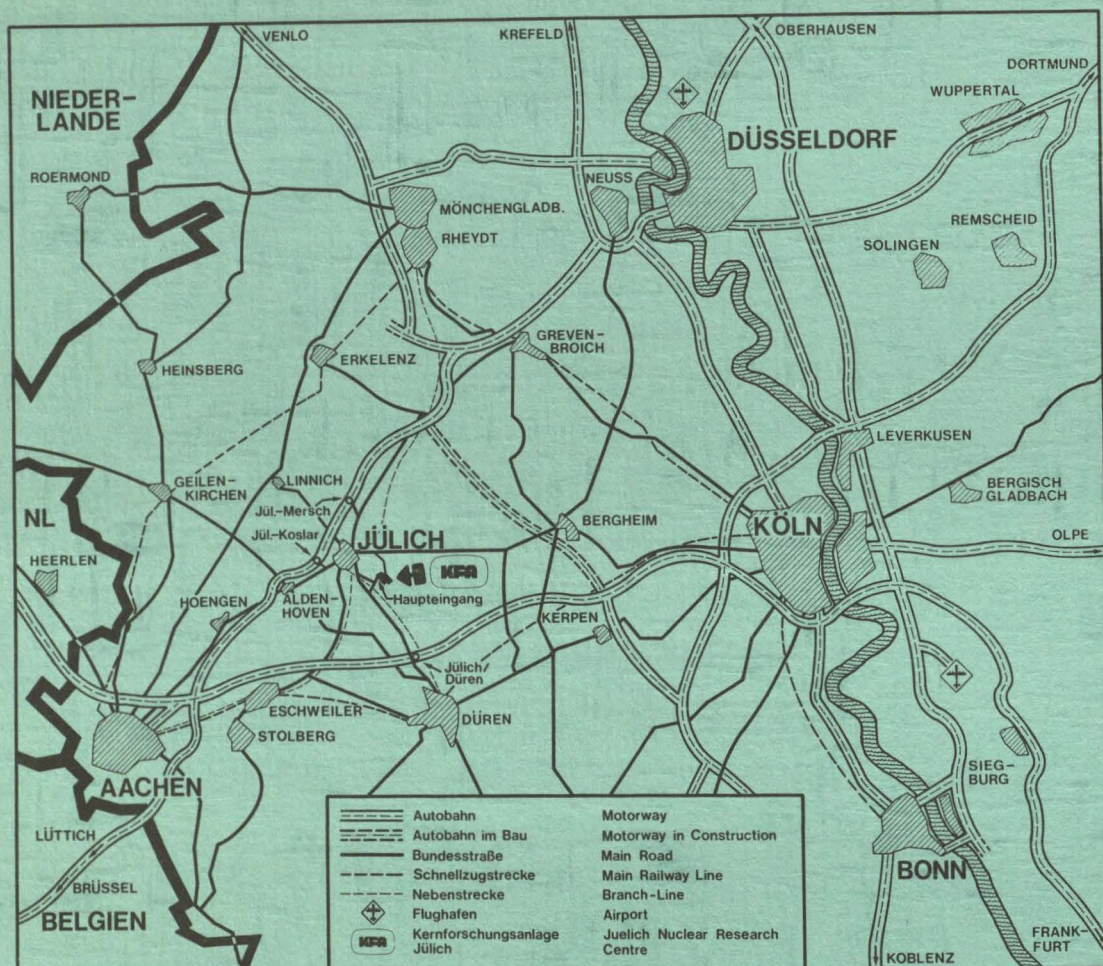
von

N. A. Dencher

Jül - 1623

Oktober 1979

ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 1623

Institut für Neurobiologie Jül - 1623

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH,
Jülich, Bundesrepublik Deutschland

**Nachweis eines Retinal-Protein-Komplexes
als wirksames Pigment der direkten
photophobischen Reaktion (PS 370) von
Halobacterium halobium, sowie
spektroskopische und biochemische
Untersuchungen am Bacteriorhodopsin
der Purpurmembran**

von

N. A. Dencher

D 82 (Diss. T. H. Aachen)

Abstract

1. Identification and characterization of the photopigment system mediating the step-up response (PS 370) in Halobacterium halobium

Both photosystems, PS 370 and PS 565, controlling behavioral responses in *Halobacterium halobium* are reversibly inhibited when bacteria are grown in the presence of 1 mM nicotine which is known to block biosynthesis of retinal.

Photobehavior can be restored within some minutes to hours by adding retinal to nicotine-treated bacteria, PS 370 thereby reappearing earlier than PS 565. The reconstitution rate depends on the concentration and on the kind of retinal isomers applied. All-trans retinal is most effective. PS 370 becomes fully sensitive if reconstituted in the presence of nicotine. This rules out the possibility that the alkaloid may directly inhibit steps of signal transmission following photoreception.

The action spectrum of PS 370 regenerated with retinal alone of H.h., strain R₁L₃ (a mutant deficient in carotenoids), fails to show all secondary peaks around 450 nm which in strain R₁ occur besides the prominent maximum at 370 nm. Addition of carotenoids (mainly α -bacterioruberin) to reconstituted cells of R₁L₃ restores the sensitivity in that spectral region. Carotenoids or flavin solely added to nicotine-treated bacteria cannot restore photobehavior.

These results indicate that the active pigment of PS 370, which mediates the photophobic response to increase of light intensity (step-up response), represents a retinal protein complex and that carotenoids participate in photoreceptor function as accessory pigments. The biochemical relation of the UV-absorbing retinal protein complex to bacteriorhodopsin is discussed.

2. Light and dark reactions of bacteriorhodopsin

Flash photometric experiments were performed which help to clarify the photochemistry and interconversion of 13-cis bacteriorhodopsin and trans bacteriorhodopsin. For the measurements regenerated 13-cis bacteriorhodopsin, regenerated trans bacteriorhodopsin, isolated purple membrane, and living bacteria were used. The results of this study are summarized in the reaction scheme shown in Fig. 20.

An analytic method based on the clearly distinct photoreactions of 13-cis and trans bacteriorhodopsin was developed to determine their ratio in a given sample. The analytic data obtained by flash photometry are in quantitative agreement with those obtained by extraction of the retinal isomers (see 3.).

3. Identification of the retinal isomers of light- and dark-adapted bacteriorhodopsin

Retinal isomers of bacteriorhodopsin were extracted with ethanol and identified by high-pressure liquid chromatography. Light-adapted purple membrane yielded close to 100% (> 98%) trans retinal, dark-adapted purple membrane about equal amounts of 13-cis and trans retinal (50.1 ± 2.3 % trans retinal, mean and s.d. of seven experiments, purple membrane dark-adapted at 1 °C).

4. Circular dichroism spectroscopy of the purple membrane

Circular dichroism measurements of bacteriorhodopsin under different experimental conditions, e.g. in the purple membrane, solubilized in detergents, during reconstitution of the chromophore-free membrane with retinal, were performed. Coupling between retinal chromophores on adjacent bacteriorhodopsin molecules in the hexagonal surface lattice of the purple membrane leads to exciton circular dichroism spectra in the 568 nm absorption band.

5. Phosphorylation of bacteriorhodopsin

Experiments made to find phosphorylation of bacteriorhodopsin during biogenesis of the purple membrane or during the photocycle showed no such phosphorylation.

Die vorliegende Arbeit beruht auf Untersuchungen, die in der Zeit von Mai 1974 bis Mai 1977 am Institut für Neurobiologie der Kernforschungsanlage Jülich durchgeführt wurden.

Im Verlauf der verhaltensphysiologischen Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung des Pigmentsystems der direkten photophobischen Reaktion (PS 370) von *Halobacterium halobium*, dem Hauptthema dieser Dissertation, ergaben sich eine Reihe von interessanten Fragestellungen im Zusammenhang mit der Struktur und Funktion des Bacteriorhodopsins in der Purpurmembran. Die auftretenden Probleme wurden gemeinsam mit anderen Wissenschaftlern des Instituts für Neurobiologie und des Biozentrums Basel diskutiert und die Experimente durchgeführt. Diese Zusammenarbeit erlaubte eine erfolgreiche und relativ schnelle Bearbeitung der Fragen. Darüber hinaus ermöglichte sie mir die vertiefende Weiterbildung beziehungsweise Einarbeitung in verschiedene biochemische und biophysikalische Methoden und Denkweisen. Für die anregende Zusammenarbeit bei den in Kapitel 2-5 beschriebenen Untersuchungen möchte ich mich bei P.-J. Bauer, P. Carl, H. Kühn, Ch.N. Rafferty, W. Sperling und M. Wilms (Inst. Neurobiologie) und M.P. Heyn (Biozentrum Basel) bedanken.

Allen Mitgliedern des Instituts für Neurobiologie bin ich zu Dank verpflichtet für zahlreiche Diskussionen und ständige Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. E. Hildebrand für seine freundliche Betreuung und die kritische Durchsicht des Manuskriptes. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. H. Stieve für die Unterstützung und sein stetiges Interesse.

<u>Einführung und Übersicht</u>	1
1. <u>Identifizierung und Charakterisierung des Pigmentsystems der direkten photophobischen Reaktion (PS 370) von Halobacterium halobium</u>	7
1.1. Einleitung	7
1.2. Material und Methoden	10
1.2.1. Bakterien	10
1.2.2. Wiederherstellung der photophobischen Reaktionen	10
1.2.3. Membran- und Pigmentisolierung	11
1.2.4. Chemikalien	11
1.2.5. Absorptionsspektren	12
1.2.6. Versuchsaapparatur und Messung der lichtinduzierten Verhaltensreaktion	12
1.3. Ergebnisse	14
1.3.1. Vergleich der Bakterienstämme R_1 und R_1L_3	14
1.3.2. Vorversuche an H.h. R_1L_3	16
1.3.3. Einfluss von Nikotin auf die photophobische Reaktion	17
1.3.4. Rekonstitution der Photosysteme in Nikotinzellen	19
1.3.4.1. Rekonstitution des PS 370 mit all- <u>trans</u> Retinal	19
1.3.4.2. Abhängigkeit der Regenerationskinetik des PS 370 von der Retinalkonzentration	20
1.3.4.3. Abhängigkeit der Regenerationskinetik des PS 370 vom Retinalisomer	20
1.3.4.4. Regeneration des PS 565 mit all- <u>trans</u> Retinal	20
1.3.4.5. Einfluss von Riboflavin und Carotinoiden auf die lichtinduzierte Verhaltensreaktion in Nikotinzellen	21
1.3.5. Abhängigkeit der Latenzzeit der DPR (PS 370) von der Reizintensität	21

1.3.6. Aktionsspektren der DPR (PS 370)	22
1.3.6.1. Aktionsspektrum der DPR nach Regeneration der Nikotinzellen mit all- <u>trans</u> Retinal	22
1.3.6.2. Aktionsspektrum der DPR nach Regeneration mit all- <u>trans</u> Retinal und Carotinoiden	23
1.4. Diskussion	24
1.4.1. Ein Retinylidenprotein als aktives Pigment des PS 370	24
1.4.2. Strukturelle Beziehung des Retinylidenproteins der DPR zum Bacteriorhodopsin der Purpurmembran	27
1.4.3. Die Rolle von Carotinoiden im PS 370	29
1.4.4. Lokalisation des PS 370	31
1.4.5. Das Pigment des PS 565	31
1.4.6. Biologische Bedeutung der beiden Photosysteme	32
1.4.7. Signalwandlung und -transmission	34
1.4.8. Ausblick	36
2. <u>Photo- und Dunkelreaktionen des Bacteriorhodopsins</u>	39
(Zusammenfassung der Veröffentlichungen: Dencher und Wilms, 1975; Dencher, Rafferty und Sperling, 1976 b)	
3. <u>Identifizierung der Retinalisomere von licht- und dunkeladaptiertem Bacteriorhodopsin</u>	42
(Zusammenfassung unveröffentlichter Experimente einer Zusammenarbeit mit P. Carl)	
3.1. Einleitung	42
3.2. Material und Methoden	43
3.3. Ergebnisse und Diskussion	44
3.3.1. Extraktion nach Jan	44
3.3.2. Extraktion nach Oesterhelt, Meentzen und Schuhmann	44
3.3.3. Extraktion nach Rotmans, Bonting und Daemen	45

4.	<u>Circulardichroismus der Purpurmembran</u>	46
	(Zusammenfassung der Veröffentlichungen: Heyn, Bauer und Dencher, 1975; Bauer, Dencher und Heyn, 1976)	
5.	<u>Experimente zur Frage der Phosphorylierbarkeit des Bacteriorhodopsins</u>	49
	(Zusammenfassung unveröffentlichter Experimente; Zusammenarbeit mit H. Kühn)	
5.1.	Einleitung	49
5.2.	Material und Methoden	49
5.3.	Ergebnisse und Diskussion	50
	Literaturverzeichnis	52
	Abbildungen	61
	Zusammenfassung	84

Einführung und Uebersicht

Seit dem Erscheinen der beiden ersten Veröffentlichungen 1971 über das Bacteriorhodopsin (BR) in der Purpurmembran (PM) von *Halobacterium halobium* (H.h.) (Blaurock und Stoeckenius, 1971; Oesterhelt und Stoeckenius, 1971) ist dieses System in kurzer Zeit zu einem der interessantesten Untersuchungsobjekte der Membranbiologie geworden. Lagen bis 1974 nur ungefähr 10 Veröffentlichungen über dieses Objekt vor, so ist ihre Zahl bis Ende 1978 auf über 300 angestiegen. Worin liegt dieses wachsende Interesse begründet?

Ein erster Grund ist sicher in der aussergewöhnlichen molekularen Struktur des BR und der PM selbst zu suchen. BR ist ein Chromoprotein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 26 000 Daltons, (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971) dessen starke purpurne Farbe ($\lambda_{\max} \approx 570$ nm) durch den Chromophor Retinal bewirkt wird. Das all-trans oder 13-cis Isomer des Retinals ist kovalent über eine protonierte Schiff'sche Base an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes der Proteinkomponente gebunden (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971; Lewis et al., 1974). Ungefähr 70 % der Aminosäuren sind als Helix angeordnet und durchspannen als sieben 35-40 Å lange Säulen die Membran (Henderson und Unwin, 1975; Dencher und Heyn, 1978). Innerhalb der PM sind die BR Moleküle in einem zweidimensionalen hexagonalen Gitter angeordnet, wobei jeweils drei Proteine sich in direktem Kontakt befinden. BR ist das einzige Protein der PM und macht ungefähr 75 % ihrer Gesamtmasse aus, die restlichen 25 % sind Lipide (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971). Diese Anordnung des BR bewirkt eine relativ feste Beschaffenheit der PM, die als abgegrenzte Bereiche der Oberflächenmembran dieses extrem halophilen Bakteriums unter bestimmten Wachstumsbedingungen synthetisiert wird. (Ausführliche Uebersichten über die Struktur des BR und

der PM finden sich bei: Dencher, 1974a; Oesterheld, 1976; Henderson, 1977)

Ein weiterer Grund für das starke Interesse an H.h. ist die strukturelle und möglicherweise funktionelle Aehnlichkeit des BR mit dem Sehpigment Rhodopsin, bei dem das 11-cis Isomer des Retinals als Chromophor vorliegt. Trotz einer Vielzahl von Untersuchungen im Laufe der letzten 100 Jahre seit den ersten bahnbrechenden Arbeiten von W. Kühne (1878, 1882) ist man von einem Verständnis des Sehprozesses auf molekularer Ebene noch weit entfernt. Man hofft daher, dass die am BR gewonnenen Ergebnisse auch zu einem Verständnis der Photochemie des Rhodopsins und des Transduktionsmechanismus der Photorezeption führen können. Nicht nur die vielfach grössere chemische und photochemische Stabilität des BR scheint dabei von Vorteil. Es wird auch angenommen, dass in einem weniger komplexen und entwicklungsgeschichtlich ursprünglicheren System (Procaryont) die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen einfacher ausgebildet sind. Der Durchbruch in der molekularen Genetik ist ebenfalls durch Untersuchungen an Procaryonten und Phagen erzielt worden. Die Entdeckung lichtgesteuerter Verhaltensreaktionen bei H.h., an denen auch BR beteiligt ist (Dencher, 1974 a,b; Hildebrand und Dencher, 1974,1975), bestärken diese Hoffnung.

Sicher einer der Hauptgründe ist das angewachsene Interesse an Biomembranen. Während die fünfziger und sechziger Jahre dieses Jahrhunderts ganz im Zeichen der Genetik standen, hat sich in den letzten Jahren die Grundlagenforschung verstärkt der interdisziplinären Erforschung der Struktur und Funktion von Biomembranen zugewandt. Membranen stellen eines der wichtigsten und sicher phylogenetisch ältesten Bestandteile der Zelle dar. Zur Zeit kann die PM dank Röntgenbeugungs-, elektronenmikroskopischer und biochemischen Untersuchungen als eine der bestcharakterisierten Membranen angesehen werden.

Seit kurzem ist z.B. die vollständige Aminosäuresequenz des BR bekannt (Ovchinnikov et al., 1978). Die Funktion des BR als lichtgetriebene Protonenpumpe ist möglicherweise auch von allgemeiner Bedeutung für die Aufklärung der Transporteigenschaften von Membranen.

Der H^+ -Transport der BR wird z.Z. auch dazu ausgenutzt um in natürlichen und künstlichen Systemen die von P. Mitchell (1966) aufgestellte chemiosmotische Theorie der Energieumwandlung zu überprüfen.

Im Folgenden wird eine Uebersicht über die Teilaspekte gegeben, die von mir alleine oder aber in Zusammenarbeit mit anderen Mitgliedern des Instituts für Neurobiologie (KFA Jülich) und des Biozentrums (Universität Basel) bearbeitet wurden.

1. Identifizierung und Charakterisierung des Pigmentsystems der direkten photophobischen Reaktion (PS 370) von Halobacterium halobium

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass zwei verschiedene Photosysteme von H.h. eine spezifische Verhaltensreaktion steuern. Mit Hilfe von Verhaltensexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass das BR der PM für die inversere photophobische Reaktion (PS 565) verantwortlich ist (Dencher, 1974 a). Die chemische Natur der Pigmente der direkten photophobischen Reaktion blieb jedoch unklar. In der hier beschriebenen Untersuchung an Mutanten und an künstlich Retinal-frei gemachten Zellen von H.h. konnte gezeigt werden, dass die durch UV- und Blaulicht auslösbare Verhaltensreaktion ebenfalls von einem Retinal-Protein-Komplex gesteuert wird. Carotinoide wirken dabei als akzessorische Pigmente und übertragen die absorbierte Energie auf das Retinylidenprotein. Die Experimente unterstützen auch die früheren Schlussfolgerungen, dass BR das Pigment der inversen photophobischen Reaktion ist.

2. Photo- und Dunkelreaktionen des Bacteriorhodopsins

Ein Verständnis der molekularen Arbeitsweise des BR als Photosensor und Energiewandler ist ohne Kenntnis der zugrundeliegenden Prozesse nach Absorption des Photons durch das Pigment nicht möglich. Zu Beginn dieser Untersuchungen lagen aber fast keine Ergebnisse über die Photoreaktionen des BR unter physiologischen Bedingungen vor. In Zusammenarbeit mit M. Wilms wurden blitzlichtphotometrische Messungen an trans BR durchgeführt. Bei der Untersuchung der Kinetik des photochemischen Zyklus des BR wurden zwei vorher unbekannte Zwischenprodukte entdeckt und mit Hilfe eines pH - Indikators photometrisch die im μ s- und ms- Bereich stattfindenden $[H^+]$ -Änderungen gemessen (Dencher und Wilms, 1975).

In gemeinsam mit W. Sperling und Ch. N. Rafferty durchgeführten Messungen der Photo- und Dunkelreaktionen des 13-cis BR konnte gezeigt werden, dass 13-cis BR und trans BR unterschiedliche Zwischenprodukte nach Lichtabsorption durchlaufen. Auf der Grundlage der verschiedenen Photoreaktionen beider BR-Isomere wurde eine analytische Methode zur Bestimmung ihres Mengenverhältnisses entwickelt (Dencher et al., 1976b).

3. Identifizierung der Retinalisomere von licht- und dunkeladaptiertem Bacteriorhodopsin

Zur Frage des Retinalisomers im dunkeladaptierten BR lagen widersprüchliche Angaben vor (Oesterhelt et al., 1973; Jan, 1975). Zusammen mit P. Carl wurde daher des Retinal unter verschiedenen Bedingungen aus der PM extrahiert und Hochdruckchromatographisch identifiziert. Während im lichtadaptierten BR nur all -trans Retinal nachgewiesen werden konnte, findet man im dunkeladaptierten BR ein Gemisch von all -trans und 13 -cis Retinal im Verhältnis von 1:1.

4. Circulardichroismus der Purpurmembran

CD-Spektren wässriger PM-Suspensionen zeigten als bemerkenswertestes Kennzeichen zwei Banden von entgegengesetztem Vorzeichen im Bereich des Absorptionsmaximums um 570 nm, die im Absorptionsspektrum nicht erkennbar sind. Die mit P.J. Bauer und M.P. Heyn durchgeführten Untersuchungen unterstützten die aufgestellte Hypothese, dass diesem Teil des CD-Spektrums ein Exciton Spektrum zugrunde liegt, hervorgerufen durch Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren benachbarter BR Moleküle im hexagonalen Gitter der PM (Heyn et al., 1975; Bauer et al., 1976). Diese CD Daten erlauben nicht nur Aussagen über die Orientierung der Chromophore, der CD-Effekt kann auch als empfindliche Probe zum Studium von Proteinbeweglichkeit und Aggregationszustand des BR angewendet werden (Heyn et al., 1977a); Dencher und Heyn, 1978).

5. Experimente zur Frage der Phosphorylierbarkeit des Bacteriorhodopsins.

Auf einer Zusammenarbeit mit H. Kühn beruhende biochemische Untersuchungen (Isotopenmarkierung, Gelelektrophorese) an lebenden Zellen und isolierter PM ergaben keinen Hinweis auf eine lichtabhängige Phosphorylierung des BR. Auch bei der Biogenese der PM aus der "braunen Membran" konnte eine Phosphorylierungsreaktion nicht nachgewiesen werden.

Die in Abschnitt 2. und 4. beschriebenen Experimente wurden in den folgenden Veröffentlichungen zusammengefasst:

Dencher, N. and Wilms, M. (1975): Flash photometrie experiments on the photochemical cycle of bacteriorhodopsin. Biophys. Struct. Mechanism 1, 259 - 271.

Dencher, N.A., Rafferty, Ch.N., and Sperling, W. (1976): 13 -cis und trans bacteriorhodopsin: Photochemistry and dark equilibrium. Ber. KFA Jülich Jül - 1374, 1-42.

Heyn, M.P., Bauer, P.-J., and Dencher, N.A. (1975): A natural CD label to probe the structure of the purple membrane from Halobacterium halobium by means of exciton coupling effects. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 897 - 903.

Bauer, P.-J., Dencher, N.A., and Heyn, M.P. (1976): Evidence for chromophore-chromophore interactions in the purple membrane from reconstitution experiments of the chromophore-free membrane. Biophys. Struct. Mechanism 2, 79 - 92.

Die Ergebnisse von Abschnitt 3. liegen als Abstrakt vor:

Dencher, N.A., Carl, P., and Sperling, W. (1976): Isomeric configuration of retinal in bacteriorhodopsin from Halobacterium halobium. Tenth Intern. Congress of Biochemistry, Hamburg (FRG), July 25-31, Abstract 05-1-317.

1. Identifizierung und Charakterisierung des Pigmentsystems der direkten photophobischen Reaktion (PS 370) von Halobacterium halobium

1.1. Einleitung

Zwei unterschiedliche Mechanismen der Energiegewinnung ermöglichen es dem in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen ($> 2 \text{ mol/l NaCl}$) lebendem Halobacterium, seine Stoffwechselfunktionen aufrechtzuerhalten. Unter aeroben Bedingungen wird durch den Metabolismus von Aminosäuren, die in Form von Proteinen und Peptiden im Medium vorliegen, in der Atmungskette mittels oxidativer Phosphorylierung die benötigte Energie gewonnen. In Abwesenheit von Aminosäureverbindungen und/oder unter anaeroben Bedingungen ist Halobacterium halobium (H.h.) (und andere Arten seiner Gattung) zur Durchführung einer bis vor kurzem unbekannten Art von Photophosphorylierung befähigt. Mit Hilfe des Chromoproteins Bacteriorhodopsin (BR) der Purpurmembran (PM), das als lichtgetriebene Protonenpumpe arbeitet, wird ein elektrochemischer Protonengradient über der Zellmembran aufgebaut (Oesterhelt und Hess, 1973; Oesterhelt und Stoeckenius, 1973). Dieser elektrochemische Gradient dient nicht nur der Synthese von ATP (Danon und Stoeckenius, 1974; Danon und Caplan, 1976) sondern wird auch direkt für Transportprozesse genutzt, z.B. Aufnahme von K^+ und Aminosäuren, Auswärtstransport von Na^+ (Lanyi und MacDonald, 1976; Lanyi et al., 1976). Sehr wahrscheinlich ist auch der Protonengradient die direkte Energiequelle der Flagellenbewegung (Belyakova et al., 1976; Manson et al., 1977).

Neben dem Mechanismus der Energietransformation konnte auch eine sensorische Funktion des BR nachgewiesen werden (Dencher, 1974 a). Es ist seit langem bekannt und untersucht (Engelmann, 1882; 1883), dass bewegliche photosynthetische Bakterien die Fähigkeit

haben, die für die Photophosphorylierung optimalen Lichtbedingungen aufzusuchen. Auch für H.h. wäre diese Fähigkeit einer lichtgesteuerten Verhaltensreaktion von grossem Vorteil.

Die in der stationären Wachstumsphase 4-10 μm langen und 0,5-0,7 μm breiten stäbchenförmigen Halobakterien (Abb. 1) schwimmen mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 2,3 $\mu\text{m/s}$ (24°C) durch die sie umgebende Lösung (Dencher, 1974 a). Bündel von je 5-10 Flagellen befinden sich an beiden Polen der Zelle (Houwink, 1956; Hildebrand und Dencher, 1975) und ermöglichen eine Bewegung in beiden Richtungen entlang der Körperlängsachse. Es konnte gezeigt werden, dass eine Intensitätsänderung des eingestrahlten Lichtes zu einer plötzlichen Umkehr der Schwimmrichtung führt (Dencher, 1974 a). Bei dieser sogenannten photophobischen Reaktion (vorübergehende Änderung der Bewegung nach einer zeitlichen Veränderung der Lichtintensität) unterbricht das Bakterium nach einer Latenzzeit von ungefähr 1s seine vorher gleichförmige Bewegung, verharret für ungef. 1s auf der Stelle und schwimmt dann in annähernd entgegengesetzter Richtung. Der Zellkörper rotiert dabei um seine Längsachse, und zwar entgegengesetzt zur Drehrichtung vor der Reaktion. Weder Phototaxis noch Photokinese (lichtabhängige Schwimmgeschwindigkeit) konnten dagegen in H.h. beobachtet werden (Dencher, 1974 a). Diese stereotype phobische Verhaltensreaktion kann sowohl durch eine plötzliche Intensitätsabnahme von gelbgrünem Licht ("inverse photophobische" oder "step-down" Reaktion, Diehn et al., 1977) als auch durch eine Intensitätszunahme von ultraviolettem oder blauem Licht ("direkte photophobische" oder "step-up" Reaktion) ausgelöst werden. Eine genaue Untersuchung dieser Verhaltensreaktion ergab, dass sie von zwei verschiedenen Photosystemen gesteuert wird. Eine Reihe von experimentellen Daten weist darauf hin, dass das wirksame Pigment des Photosystems 565 (PS 565) der inversen photophobischen Reaktion (IPR) das BR der PM ist. So zeigt das Aktionsspektrum der IPR ein Empfind-

lichkeitsmaximum bei 565 nm, welches mit dem Absorptionsmaximum des BR im sichtbaren Spektralbereich übereinstimmt (Abb 2). Bei Halobakterien, welche keine PM synthetisiert haben, kann die IPR nicht ausgelöst werden (Dencher, 1974 a). Diese photosensorische Funktion des BR entspricht in seiner Aufgabe der bei diesem (Schimz und Hildebrand, 1978) und anderen Mikroorganismen (z.B. Adler, 1975; Berg, 1975) entwickelten chemotaxischen Reaktion. Beide Mechanismen erlauben die Ansammlung in Gebieten mit nutzbaren Energiequellen (elektromagnetische Strahlung, metabolisierbare organische Verbindungen). Die BR gesteuerte IPR führt zu einer Ansammlung der Bakterien an einem Ort optimaler Bedingungen für die BR-abhängige Photophosphorylierung.

Wegen der komplexen Form des Aktionsspektrums (Banden bei 280 nm und 370 nm, Nebenmaxima im Bereich von 400-520 nm; Abb. 3) konnten keine eindeutigen Aussagen über die Natur der Pigmente des Photosystem 370 (PS 370) der direkten phototaxischen Reaktion (DPR) gemacht werden. Aus der Lage der Hauptmaxima wurde geschlossen, dass es sich bei dem wirksamen Pigment des PS 370 um ein Chromoprotein handelt, welches entweder Retinal oder Flavon als Chromophor enthält. Im ersteren Falle müssten Carotinoide, die im Wildtyp von H.h. in hoher Konzentration vorhanden sind und im Wellenlängenbereich oberhalb von 400 nm absorbieren direkt an der Photorezeption beteiligt sein, während sie im letzteren Falle als Schirmpigmente wirken. (Hildebrand und Dencher, 1974).

Die im folgenden beschriebenen Experimente wurden mit dem Ziel durchgeführt, die Pigmente des PS 370 zu identifizieren. Die Ergebnisse der Untersuchungen machen es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem aktiven Pigment des PS 370 um eine Retinal-Protein Verbindung handelt. Carotinoide, die selbst die Verhaltensreaktion nicht auslösen können, wirken als Antennenpigmente.

1.2. Material und Methoden

1.2.1. Bakterien

Halobacterium halobium, Stamm R_1 und R_1L_3 , wurde in sterilem Nährmedium (Oesterhelt und Hess, 1973; Dencher, 1974 a) bei 40°C unter Weisslicht (6 x 20 W Leuchtstoffröhren; 1 mW/cm^2) gezüchtet (s.a. Bauer et al., 1976). Bakterien aus der stationären Wachstumsphase (ungefähr $1,5 \cdot 10^9$ Zellen/ml) wurden für die Experimente verwendet.

Zur Anzucht von Retinal-freien Zellen wurden die Zellen so lange in Gegenwart des Alkaloids Nikotin kultiviert, bis keine photophobische Reaktion mehr ausgelöst werden konnte. Um die Retinal enthaltenden Bakterien des Impfmateri als schrittweise zu eliminieren, wurden jeweils 500 ml Nikotin-haltiger (1 mmol/l) Nährlösung mit 0,5-1 ml Zellsuspension inokuliert und dieser Vorgang alle 5 bis 6 Tage wiederholt, insgesamt mindestens fünfmal. Diese im folgenden als "Nikotinzellen" bezeichneten Bakterien wurden direkt aus der Kultur verwendet.

1.2.2. Wiederherstellung der photophobischen Reaktionen

Das Wiederauftreten der Photosysteme in Nikotinzellen wurde nach Entfernung von Nikotin bzw. nach Zugabe verschiedener Chromophore untersucht. Im ersten Fall wurden die Zellen durch eine kurze Zentrifugation geerntet (1,5 min bei 10 000 g, Eppendorf -Zentrifuge 5412), in Nikotin-freiem Nährmedium resuspendiert, erneut zentrifugiert und dann in der gleichen Lösung wiederaufgenommen. Danach wurden die Bakterien im Brutschrank bei 38°C im Dunkeln bis zum Test gelagert. Eine künstliche Regenerierung der Photopigmente erfolgte durch Zugabe von Äthanol-gelöstem Chromophor (verschiedene Retinalisomere und/oder Carotinoide oder Riboflavin) zu Suspensionen von Nikotinzellen in Gegenwart des Alkaloids bei 32 oder 38°C im Dunkeln. Die zur Bestimmung von Aktionsspektren benötigten Proben wurden mindestens 8-12 h unter diesen Bedingungen gehalten.

Gewöhnlich betrug die Retinalkonzentration in der Probe $1,8 \cdot 10^6$ mol/l. Riboflavin in wässriger oder äthanolischer Lösung wurde in ähnlicher Endkonzentration zugesetzt, die Carotinoide dagegen in 2-3 fachem Überschuss verglichen zum Gehalt im Stamm R₁. Die Äthanol-Konzentration der Probe lag gewöhnlich bei 0,1 % und überstieg niemals 0,5 %.

1.2.3. Membran- und Pigmentisolierung

Die Methode zur Isolierung der PM ist an anderer Stelle beschrieben (Dencher, 1974 a; Bauer et al., 1976), die weiteren Membranklassen (z.B. "braune" und "rote" Membran) wurden auf einem linearen 20 - 45 % Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Die Extraktion der Carotinoide erfolgte aus Zellen des Stammes H.h. R₁, die eine sehr hohe Konzentration an diesen Pigmenten enthalten. Zellen der späten stationären Wachstumsphase wurden abgeerntet und gegen destilliertes Wasser bis zur Lysis der Zellen dialysiert. Nach Zentrifugation (48 000 g, 45 min) des klaren purpurroten Lysates erhält man die PM als Sediment und einen hellroten Überstand. Dieser wässrige Überstand mit Absorptionsmaxima bei 537, 498, 471 und 393 nm (Abb. 4) wurde mit einem Aceton-Methanol-Gemisch (1/1, v/v) versetzt, kräftig geschüttelt und danach mit Diäthyläther überschichtet, der dann vorsichtig in der Lösung verteilt wurde. Nach einigen Minuten bildete sich eine stark rötlich gefärbte Oberphase aus (Abb. 4), die abgehebert und unter Stickstoffbegasung eingedampft wurde.

1.2.4. Chemikalien

All -trans und 13 -cis Retinal von Fluka wurden hochdruckchromatographisch nachgereinigt, 11 -cis Retinal wurde von Dr. W. Sperling (Institut für Neurobiologie, KFA Jülich) zur Verfügung gestellt. L - Nikotin war ein Fluka-, Riboflavin ein Merck-Produkt.

1.2.5. Absorptionsspektren

Absorptionsspektren wurden entweder mit einem Cary 17 oder einem Cary 118 c gemessen. Messungen stärker lichtstreuender Proben, z.B. von Zellsuspensionen, wurden im Lichtstreuuzusatz des Cary 118 c unter Verwendung von Küvetten mit einer optischen Weglänge von 1 oder 5 mm durchgeführt.

1.2.6. Versuchsanordnung und Messung der lichtinduzierten Verhaltensreaktion

Die Verhaltensexperimente wurden an einzelnen Zellen in einer H.h.-Suspension mit der früher beschriebenen Apparatur durchgeführt (Dencher, 1974 a). Die Bakteriensuspension befand sich in einer thermostatisierbaren ($\pm 0,2^\circ\text{C}$) Quarzkammer und wurde unter einem mit Phasenkontrasteinrichtung ausgestatteten Mikroskop (Leitz, Ortholux; Objektive: Zeiss, Neofluar 63 X oder Ultrafluor 100 X) im Durchlicht beobachtet. Hintergrundlicht der Wellenlängen $> 645\text{ nm}$ ($2,3\text{ mW /mm}^2$), welches weder vom freien Retinal noch von beiden PS absorbiert wird, fiel durch den Kondensor auf die Probe. Das monochromatische Reizlicht (Halbwertsbreite $\leq 10\text{ nm}$) konnte mit Hilfe eines Auflichtilluminators über einen halbdurchlässigen Spiegel bei gleichzeitiger Beobachtung des Objekts durch das Objektiv eingestrahlt werden. Zwei unterschiedliche Reizlichtquellen standen zur Verfügung: für den Wellenlängenbereich von 350 - 800 nm eine Xenon-Hochdrucklampe (Hanovia, 150 W) in Verbindung mit einem Gittermonochromator (Bausch und Lomb, UV /sichtbarer Bereich), für den Bereich herab bis 250 nm eine Quecksilber-Hochdrucklampe (Osram HBO 200) mit einem Quarz-Prismenmonochromator (Zeiss, M4 QIII). Ein elektronischer Verschluss regelte die Art und Dauer des Lichtreizes, der gewöhnlich bis zum Auftreten der Reaktion gegeben wurde. Die auf das Versuchsobjekt eingestrahlte Reizlichtintensität wurde mit einem Lichtmessgerät (UDT - 40 A) in Verbindung mit den zugehörigen geeichten Silizium-Photodetektoren Pin 10 und Pin 10 UV in μW gemessen und in Photonen pro Fläche

und Zeit ($h\nu \cdot \text{mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) umgerechnet.

Als Messparameter diente die Latenzzeit der in Abschn. 1.1. beschriebenen lichtinduzierten Verhaltensreaktion. Einzelne Bakterien der Zellsuspension wurden unter dem Mikroskop beobachtet und die Reizintensität so lange variiert bis 19 von 20 ausgesuchten Zellen die Stopreaktion innerhalb eines vorgegebenen Zeitintervalls ("Latenzzeit") von 1,9 bis 2,0 s nach Reizbeginn ausführten. Es wurden dazu die Reaktionen von jeweils 70 - 130 Individuen untersucht. Die Bestimmung eines Messwertes erfordert demgemäss bis zu 20-30 min Zeit. Um für kinetische Messungen eine bessere Zeitauflösung zu erreichen, wurde bei vorgegebener Reizlichtintensität die Latenzzeit zwischen Beginn des Reizes und der Verhaltensreaktion an 4-20 Zellen gemessen. Der Messvorgang dauerte dementsprechend nur ca. 10 bis 50 s. Dieses Verfahren wurde auch angewandt, wenn wegen zu geringer Empfindlichkeit der Photosysteme und/oder zu geringer Ausgangsleistung der Strahlungsquellen die Reizintensität nicht ausreichte, eine Reaktion innerhalb der Latenzzeit von 1,9 - 2,0 s auszulösen. Mit Hilfe der gemessenen Abhängigkeit der Latenzzeit von der Reizlichtintensität (s. Abschn. 1.3.5) können die unterschiedlichen Messparameter direkt ineinander umgerechnet werden. Die Messungen wurden gewöhnlich bei 32 ° C durchgeführt.

In den Regenerationsexperimenten mit Retinalisomeren wurde jede Probe oder wenigstens jeder Bereich einer Probe nur einem einzigen Lichtreiz ausgesetzt um eine Photoisomerisierung des Retinals vor der Messung zu vermeiden.

1.3. Ergebnisse

1.3.1. Vergleich der Bakterienstämme R_1 und R_1L_3

Im Gegensatz zu früheren Messungen (Dencher, 1974 a) wurden die im folgenden beschriebenen Untersuchungen grösstenteils an Zellen des Stammes R_1L_3 durchgeführt. Sowohl im Wachstumsverlauf als auch in Zellgrösse, Zellform und Fortbewegungsgeschwindigkeit unterscheiden sie sich nicht von den Zellen des Stammes R_1 . Während des Wachstums wird aber eine gallertige, gräuliche Masse unbekannter Zusammensetzung in das Nährmedium abgegeben.

SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese der isolierten PM von H.h. R_1L_3 zeigt eine einzige Proteinbande mit einer dem BR von R_1 identischen Wanderungsgeschwindigkeit (technische Angaben zur SDS-Gelelektrophorese, s. Dencher, 1974 a).

Die Absorptionsspektren der PM von H.h. R_1 (Abb. 2) und R_1L_3 (Abb. 5) stimmen prinzipiell überein. In beiden Fällen liegt das Absorptionsmaximum des lichtadaptierten BR bei ungef. 570 nm. Das für ein Protein typische Spektrum im Wellenlängenbereich < 300 nm hat ein Maximum bei 283 nm und eine ausgeprägte Schulter bei 293 nm, die charakteristisch für die Aminosäure Tryptophan ist, von der vier (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971; Bridgen und Walker, 1976) bzw. sieben Moleküle (Keefer und Bradshaw, 1977) pro BR angenommen werden. Das kleinere Extinktionsverhältnis 283nm/568nm ($R_1L_3 = 1,7$, Abb. 5; $R_1 = 2,2$, Abb. 2) und die ausgeprägtere Feinstruktur im Bereich von 300 nm bis 450 nm der PM von R_1L_3 ist auf geringere Lichtstreuungsartefakte zurückzuführen, die durch die Verwendung des Spektralphotometers Cary 118 c erreicht wurden. Das Absorptionsspektrum der PM von R_1L_3 zeigt im Bereich von 450 bis 550 nm keine auf Kontamination durch Carotinoide hinweisende Schultern. Auch die bis jetzt untersuchten Licht- und Dunkelreaktion des BR sind in beiden Mutantenstämmen gleich. So kann die auf einer reversiblen

13 -cis/trans Isomerisation des Chromophors beruhende "Licht-Dunkeladaptation" des BR (Oesterhelt et. al., 1973) auch in R_1L_3 beobachtet werden. Der photochemische Reaktionszyklus des trans -BR wurde sowohl an PM von H.h. R_1 (Dencher und Wilms, 1975) als auch von H.h. R_1L_3 (Dencher et al., 1976) untersucht und gleiche Zwischenprodukte und Kinetiken gemessen.

Der augenfällige Unterschied zwischen den beiden Bakterienstämmen besteht in der unterschiedlich starken Färbung der Bakterien. Während die auf festem Nährboden gewachsenen Zellkolonien von H.h. R_1 eine kräftig dunkelrote Farbe haben, sind die Kolonien von R_1L_3 nur schwach purpur-rötlich. Vergleichbares beobachtet man auch in flüssigen Kulturen, obwohl die vorher im Vergleich zu H.h. R_1 deutlich farbloseren Kulturen von H.h. R_1L_3 in der späten stationären Wachstumsphase rötlich werden. Die Unterschiede im Pigmentgehalt der Bakterienstämme werden in Abb. 6 deutlich. Die Kurve a zeigt das Absorptionsspektrum einer Kultur von R_1 , Kurve b das entsprechende Spektrum einer gleichalten Kultur des Stammes R_1L_3 . In beiden Fällen diente Nährlösung als Referenz. Trotz der Verwendung des Spektralphotometers Cary 118 c mit der Möglichkeit den Photomultiplier unmittelbar an den Proben zu plazieren und so die Lichtstreuungsartefakte zu reduzieren, können ausser zwei Schultern bei ungefähr 500 nm und 540 nm in Kurve a keine weiteren Einzelheiten aufgelöst werden. Erst das Differenzspektrum (a-b) zeigt deutlich eine dreigipfelige Absorptionsbande mit Maxima bei 480 nm, 505 nm und 543 nm. Ein ähnliches Spektrum mit Maxima bei 471 nm, 498 nm und 537 nm erhält man für das Lysat von H.h. R_1 nach Abtrennung der PM (Abb. 4). Auch das von R_1L_3 - Kulturen gewonnene Lysat zeigt dieses Spektrum, aber bei gleicher Ausgangskonzentration an Zellen - besonders von jungen Kulturen - mit einer bedeutend geringeren Extinktion. Dieser spektroskopische Vergleich der beiden Zellstämme macht deutlich, dass die Zellen des Stammes R_1L_3 eine geringere Konzentration an Pigmenten (Carotinoiden, s. Abschn. 1.4.3.) mit den ge-

messenen Absorptionseigenschaften enthalten. Die PM-Konzentration in den beiden Mutantenstämmen ist dagegen gleich. Dies ist daran erkennbar, dass im Differenzspektrum der Abb 6 im Bereich um 570 nm weder ein Maximum noch ein Minimum ausgebildet ist. Weiterhin wurden gleiche Mengen PM isoliert.

Die Zellen des Stammes R_1L_3 zeigen die gleichen strahlungsinduzierten Verhaltensreaktion wie die Zellen des Stammes R_1 . Auch die Empfindlichkeit der DPR bei 370 nm und der IPR bei 565 nm entsprechen denen von H.h. R_1 (Abweichungen davon s. Abschn. 1.3.2.).

1.3.2. Vorversuche an H.h. R_1L_3

Im Falle eines Flavoproteins als Photopigment der DPR wäre zu erwarten, dass das Aktionsspektrum neben Maxima bei 280 und 370 nm ein weiteres ausgeprägtes Maximum bei 450 nm haben sollte (s. Abschn. 1.4.1.). Das an Zellen des Stammes R_1 gemessene Aktionsspektrum zeichnet sich dagegen nur durch zwei Empfindlichkeitsmaxima bei 280 und 370 nm aus, während im Bereich von 390 bis 530 nm die Empfindlichkeit deutlich geringer ist als bei 370 nm (Abb. 3). Als mögliche Erklärung für das Fehlen eines Maximums im Bereich von 450 nm wurde angenommen, dass die in R_1 reichlich vorhandenen und im Wellenlängenbereich oberhalb von 400 nm absorbierenden Carotinoide (Abb. 4,6) als Schirmpigmente wirksam sind und dort die Empfindlichkeit verringern (Hildebrand und Dencher, 1975). Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Empfindlichkeit des PS 370 an den Carotinoid-ärmeren Zellen des Stammes R_1L_3 gemessen. Da die Konzentration dieser Pigmente abhängig ist vom Wachstumsalter (Abschn. 1.3.1.) wurden die Messungen meist an sehr jungen Zellen

durchgeführt, bei denen sich gerade das PS 370 ausgebildet hatte. Die Zellsuspension war dann fast farblos. Die IPR konnte zu diesem Zeitpunkte meist noch nicht ausgelöst werden, da sie sich später entwickelt als die DPR (Dencher, 1974 a). Die Messungen zeigten, dass das PS 370 von H.h. R_1L_3 bei 370 nm eine etwas kleinere, bei 400 nm dagegen eine geringfügig größere Empfindlichkeit hatte als in den Zellen von H.h. R_1 . Bei 420 nm waren die H.h. R_1L_3 Zellen deutlich ($\approx 1/3$) weniger empfindlich. Bei 440 nm und 450 nm konnte nur mit 10 bis 18-fachen Reizlichtintensitäten eine Reaktion mit einer Latenzzeit von 2s ausgelöst werden. Oberhalb 450 nm zeigten die Zellen keine Reaktion mehr. Wurden diese Untersuchungen an Zellen aus einem späteren Wachstumsstadium durchgeführt, so konnte je nach Grad der Rotfärbung der Zellen auch durch ein Reizlicht der Wellenlänge zwischen 460 und 510 nm eine DPR hervorgerufen werden. In allen Fällen war aber die Empfindlichkeit in diesem Bereich geringer als bei H.h. R_1 .

1.3.3. Einfluss von Nikotin auf die photophobische Reaktion

Um zu prüfen, ob Retinal der Chromophor des Pigments der DPR (PS 370) ist, wurden Messungen an H.h. R_1L_3 -Zellen durchgeführt, bei denen die Retinalsynthese durch das Alkaloid Nikotin blockiert war. Unter diesen Bedingungen wird die PM nicht ausgebildet, und die Retinal-freie Proteinkomponente Bacterio-opsin befindet sich in einem anderen differenzierten Membranbereich, in der sogenannten "braunen Membran". (Sumper et al., 1976).

Die Messungen ergaben, dass im Verlauf der Nikotin-Behandlung (d.h. mit steigender Anzahl der überimpften Kulturen, s. Abschn. 1.2.1.) die Empfindlichkeit der Photosysteme abnahm und im fünften oder sechsten Ansatz nach Zugabe von Nikotin beide Photosysteme inaktiv wurden. Durch diese Behandlung waren das normale Bewegungsverhalten und die Fortbewegungsgeschwindigkeit nicht beeinflusst (Abschn. 1.3.1.). Eine photophobische Reaktion konnte weder durch eine plötzliche Verringerung der Lichtinten-

sität bei 565 nm noch durch eine Erhöhung bei 280 oder 370 nm ausgelöst werden. Die verwendeten Reizintensitäten waren dabei 1000-fach stärker als die sonst benötigten.

Zur Frage, ob es sich bei der Wirkung des Nikotins um einen reversiblen oder irreversiblen Prozess handelt, wurde die Empfindlichkeit der Photosysteme 370 und 565 nach dem Auswaschen des Alkaloids (s. Abschn. 1.2.2.) bei 370 nm bzw. 565 nm geprüft. Um den Verlauf der Anfangsphase (unmittelbar nach Entfernung des Nikotins) verfolgen zu können, wurde die Latenzzeit bei einer sehr hohen konstanten Reizlichtintensität ($4,3 \cdot 10^{12} \text{ hv mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\lambda = 370 \text{ nm}$) gemessen, die 28,6 mal so gross war wie die für H.h. R_1 bestimmte Schwellenintensität (Dencher, 1974 a) (Abb. 7). Durch die Empfindlichkeitszunahme des PS 370 war die Latenzzeit bei dieser Reizstärke nach einiger Zeit kürzer als 1 s und daher nur noch ungenau zu messen. Im folgenden wurde deshalb die Schwellenintensität (Latenzzeit 1,9-2,0 s) bestimmt (Abb. 8). Die in Abb. 7 aufgetragenen Daten konnten mit Hilfe der in Abschn. 1.3.5. beschriebenen Abhängigkeit der Latenzzeit von der Reizlichtintensität in die entsprechenden Schwellenintensitäten umgerechnet werden (Abb. 8,o).

Die Daten der Abb. 7 und 8 zeigen, dass die Wirkung von Nikotin auf die DPR vollständig reversibel ist. Das erste Auftreten der DPR erfolgt ungefähr 30 min nach der ersten Zentrifugation. Die maximale Empfindlichkeit war nach ungefähr 200 min erreicht und genauso gross wie vor der Behandlung mit Nikotin (z.B. Abb. 3). Aus Abb. 8 ist ersichtlich, dass die absolute Empfindlichkeit des PS 370 offensichtlich abhängig ist vom Stoffwechselzustand der Zellen. Zwischen der 320. und 1210. Min. nach Auswaschen des Nikotins wurden die Zellen weiterhin bei 38° C im Dunkeln gelagert, aber nicht mehr geschüttelt. Dies führte zu einer Abnahme der Empfindlichkeit auf ca. $1/3$. Schütteln und Belichten der Probe bewirkte eine erneute Empfindlichkeitszunahme (Abb. 8, Messpunkt bei 1600 min).

In Gegensatz zur DPR konnte die IPR zweifelsfrei erst 20 h 30 min nach Versuchsbeginn nachgewiesen werden. Trotz einer relativ hohen Reizlichtintensität von $2,3 \cdot 10^{13} \text{ h}\nu \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\lambda = 565 \text{ nm}$) betrug die gemessene Latenzzeit $4,0 \pm 0,9 \text{ s}$ ($n = 7$).

1.3.4 Rekonstitution der Photosysteme in Nikotinzellen

In einer Reihe von Experimenten wurden photosensorisch inaktive Nikotinzellen mit verschiedenen Chromophoren inkubiert und die Empfindlichkeit beider Photosysteme untersucht. Messparameter war die Latenzzeit der durch einen konstanten Lichtreiz ausgelösten photophobischen Reaktion.

1.3.4.1. Rekonstitution des PS 370 mit all -trans Retinal

Die Kinetik der Regeneration des PS 370 nach Zugabe von all -trans Retinal ist in Abb. 9 dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 wurde zu 1 ml Nikotinzellen in Nikotin -haltigem Nährmedium 1 μl einer $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ äthanolischen Retinallösung gegeben. Man beobachtet eine schnelle Empfindlichkeitszunahme (Verringerung der Latenzzeit) der DPR bis nach 25 - 35 min ein relativ konstanter Wert erreicht wird. Die erste Reaktion konnte unter diesen Versuchsbedingungen ($4,7 \cdot 10^{11} \text{ h}\nu \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\lambda = 370 \text{ nm}$; 32° C) 7 - 8 min nach Zugabe des Retinals ausgelöst werden. Eine Erhöhung der Retinalkonzentration nach 340 min (weitere 9 μl der $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ Stammlösung) bewirkt nur noch eine geringfügige weitere Zunahme der Empfindlichkeit. Zu den mit a und b gekennzeichneten Zeitpunkten wurde die Schwellenintensität (Latenzzeit 1,9 - 2,0 s) bestimmt und Werte von $1,8 \cdot 10^{11}$ (a) bzw. $1,2 \cdot 10^{11}$ (b) $\text{h}\nu \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erhalten. Ein Vergleich mit dem entsprechenden Wert an unbehandelten H.h. R_1 Zellen (s. Abschn. 1.3.6.) zeigt deutlich, dass Zugabe von all -trans Retinal zu einer vollständigen Wiederherstellung der Empfindlichkeit der DPR bei 370 nm in Nikotinzellen führt. Die Übereinstimmung dieser Ergebnisse mit denen an der gleichen Kultur 8 Tage später gemessenen Daten (Abb. 9, •) verdeutlicht die gute Reproduzierbarkeit der Versuche.

1.3.4.2. Abhängigkeit der Regenerationskinetik des PS 370 von der Retinalkonzentration

Die Konzentration des all -trans Retinals in der Probe hat einen Einfluss auf die Grösse des Zeitintervalls zwischen Zugabe des Chromophors und dem ersten Auftreten der DPR (Abb. 10). Die Kinetik der Abnahme der Latenzzeit in dem gemessenen Bereich $< 6\text{ s}$ scheint dagegen nicht beeinflusst zu werden. Aus Abb. 10 ist ersichtlich, dass eine photophobische Reaktion mit einer Latenzzeit von 3 s ($4,7 \cdot 10^{11}\text{ hv mm}^{-2}\text{ s}^{-1}$, $\lambda = 370\text{ nm}$) ungefähr 6,12 und 45 min nach Inkubation der Nikotinzellen mit $9,0 \cdot 10^{-6}$, $1,8 \cdot 10^{-6}$ bzw. $3,6 \cdot 10^{-7}\text{ mol/l}$ all -trans Retinal ausgelöst werden kann. Bei der geringsten Konzentration war auch nach 150 min die ursprüngliche Empfindlichkeit noch nicht vollständig wieder erreicht. Ohne Retinalzugabe kommt es zu keiner Regeneration des PS 370.

1.3.4.3. Abhängigkeit der Regenerationskinetik des PS 370 vom Retinalisomer

Das Zeitintervall zwischen Inkubation der Zellen und dem ersten Auftreten der Photoantwort hängt nicht nur von der Retinalkonzentration (s. Abschn. 1.3.4.2.) sondern auch von der Art des verwendeten Retinalisomers ab. Bei gleicher Isomerkonzentration (Endkonzentration: $1,8 \cdot 10^{-6}\text{ mol/l}$) und gleicher Reizintensität ($8,0 \cdot 10^{11}\text{ hv mm}^{-2}\text{ s}^{-1}$, $\lambda = 370\text{ nm}$) konnte die DPR mit einer Latenzzeit von 3 s erst ungefähr 70 min nach Zugabe von 13 -cis Retinal und 110 min nach Zugabe von 11 -cis Retinal ausgelöst werden, verglichen mit 10 min im Fall des all -trans Isomers (Abb. 11).

1.3.4.4. Regeneration des PS 565 mit all -trans Retinal

Zugabe von all -trans Retinal führt in Nikotinzellen auch zu einem Wiederauftreten der IPR. Die Empfindlichkeit des regenerierten PS 565 bleibt jedoch weit unter dem Niveau der unbehandelten Zellen. Der Pfeil in Abb. 9 überstreicht den Zeit-

bereich des ersten Auftretens der IPR. Bei einer Reizlichtintensität von $1,5 \cdot 10^{13} \text{ h}\nu \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\lambda = 565 \text{ nm}$) wurden die folgenden Latenzzeiten gemessen: Nach 93 min: $2,1 \pm 0,3 \text{ s}$ ($n = 9$), nach 121 min: $2,3 \pm 0,2 \text{ s}$ ($n = 6$), nach 314 min: $2,8 \pm 0,3 \text{ s}$ ($n = 8$).

1.3.4.5. Einfluss von Riboflavin und Carotinoiden auf die lichtinduzierte Verhaltensreaktion von Nikotinzellen

Weder die Zugabe von Riboflavin noch von aus H.h. R_1 extrahierten Carotinoiden (Abschn. 1.2.3.) zu Nikotinzellen bewirkt eine Rekonstitution der Photosysteme. Trotz langer Inkubationsdauer (3 Tage) und Anwendung grösstmöglicher Reizintensitäten konnten weder DPR noch IPR ausgelöst werden.

1.3.5. Abhängigkeit der Latenzzeit der DPR (PS 370) von der Reizintensität

Für die Auswertung einer Reihe von Experimenten (z.B. Abschn. 1.3.3., 1.3.6. und 1.3.7.) war es notwendig, die Abhängigkeit des Latenzzeit der DPR von der Reizintensität zu kennen. Zu diesem Zweck wurden Nikotinzellen für 6-7 h mit $1,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ all -trans Retinal bei 38° C im Dunkeln inkubiert und die DPR durch 370 nm-Licht ausgelöst. Abb. 12 zeigt, dass die gemessene Latenzzeit mit steigender Reizintensität kürzer wird. Die durch leere bzw. ausgefüllte Kreise dargestellten Daten stammen von Zellen der gleichen Kultur und wurden im Abstand von fünf Tagen gemessen. Die mit Hilfe der linearen Regression berechnete Gerade beschreibt die erhaltenen Messwerte im gesamten untersuchten Intensitätsbereich recht gut. Bei den beiden Messpunkten ohne Fehlerbalken wurde nicht die Latenzzeit auf eine vorgegebene Lichtintensität sondern die Reizlichtintensität für die DPR mit einer Latenzzeit von 1,9 - 2,0 s gemessen. Diese Werte ($1,54 \cdot 10^{11}$ bzw. $1,58 \cdot 10^{11} \text{ h}\nu \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) stimmen sehr gut mit den in Abschn. 1.3.3. und 1.3.6. beschriebenen Messwerten überein. Die auf dieser Messreihe beruhenden Daten fanden da-

her für die Umrechnung von Latenzzeiten in Schwellenintensitäten Verwendung. Die offenen Dreiecke geben die an einer anderen, sehr jungen Kultur gewonnenen Messdaten wieder. Obwohl die absolute Empfindlichkeit des PS 370 in diesem Falle etwas höher war als gewöhnlich ($9,72 \cdot 10^{10} \text{ hv mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für eine Latenzzeit von 1,9 - 2,0 s), ist die ermittelte Steigung der Regressionsgeraden in guter Ubereinstimmung mit den oben beschriebenen Daten.

Die entsprechenden Messwerte der IPR sind zum Vergleich in Abb. 13 dargestellt (umgezeichnet nach Dencher, 1974 a). Die berechnete Steigung der Regressionsgeraden ist annähernd doppelt so gross wie die der DPR (Abb. 12).

1.3.6. Aktionsspektren der DPR (PS 370)

1.3.6.1. Aktionsspektrum der DPR nach Regeneration der Nikotinzellen mit all -trans Retinal

Der Stamm R_1L_3 zeichnet sich durch die sehr geringe Konzentration an Carotinoiden aus (Abschn. 1.3.1.). Absorptionsspektren von Nikotinzellen und isolierten Membranfraktionen führten zu dem Befund, dass das Alkaloid nicht nur die Synthese des Retinals blockiert, sondern auch die der oberhalb 380 nm absorbierenden Carotinoide. Das Aktionsspektrum des PS 370 von mit all -trans Retinal regenerierten Nikotinzellen sollte daher weitgehend dem Absorptionsspektrum des wirksamen Photopigmentes entsprechen.

Die in Abb. 14 dargestellten Messwerte der spektralen Empfindlichkeitskurve der DPR wurde im Verlauf von drei Tagen an Individuen der gleichen Kultur gemessen. Als Vergleichswert diente die jeweils zu Beginn und am Ende einer Messreihe bestimmte Empfindlichkeit bei 370 nm. Die Zellen wurden jeweils 8-12 h vor Versuchsbeginn mit all -trans Retinal inkubiert (Abschn. 1.2.2.).

Für jeden Messwert wurde eine neue Probe verwendet.

Die Abb. 14 zeigt eine breite Bande mit maximaler Empfindlichkeit bei 370 nm, einem Minimum bei 310 nm und einer Schulter bei 400 nm. Im Bereich von 400 nm bis 450 nm nimmt die Empfind-

lichkeit steil ab. Im Vergleich zum Stamm R_1 ist die Empfindlichkeit bei 370 nm geringfügig kleiner, dagegen im Wellenlängenbereich von 320 bis 360 nm und 380 bis 410 nm deutlich erhöht. Die 370 nm -Bande dieses Aktionsspektrums ist breiter und glatter als die entsprechende des Stammes R_1 , ausserdem ist die Empfindlichkeit bei 280 nm eindeutig verringert. Die zur Auslösung der Standardantwort (Latenz 2s) bei 370 nm benötigte Lichtintensität war $1,8 \pm 0,2 \cdot 10^{11} \text{ hv mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, $n = 5$) in den regenerierten Nikotinzellen, im Vergleich dazu $1,5 \pm 0,2 \cdot 10^{11} \text{ hv mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($n = 7$) im Stamm R_1 .

1.3.6.2. Aktionsspektrum der DPR nach Regeneration mit all -trans Retinal und Carotinoiden

Die Unterschiede in den gemessenen Aktionsspektren von Carotinoid-reichen (R_1) und Carotinoid-armen ($R_1 L_3$, s. Abschn. 1.3.2.; regenerierten Nikotinzellen, s. Abschn. 1.3.6.1.) Halobakterien könnten ein Hinweis dafür sein, dass diese Pigmente am PS 370 beteiligt sind. Um diese Annahme zu prüfen, wurden mit all -trans Retinal regenerierte Nikotinzellen zusammen mit extrahierten Carotinoiden von H.h. R_1 (s. Abb. 15) inkubiert. Als Folge dieser Behandlung kann jetzt auch oberhalb 450 nm bis 570 nm die DPR ausgelöst werden (Abb. 16). Das so erhaltene Aktionsspektrum ähnelt jetzt dem von R_1 ; die Empfindlichkeit bei 370 nm erreicht wieder den ursprünglichen Wert und die Bande wird spitzer. Auch bei 280 nm bewirkt die Zugabe von Carotinoiden eine Empfindlichkeitszunahme. Sowohl im Spektralbereich um 400 und 450 nm als auch oberhalb 530 nm bleiben aber deutliche Unterschiede bestehen.

1.4. Diskussion

1.4.1. Ein Retinylidenprotein als aktives Pigment des PS 370

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse machen es sehr wahrscheinlich, dass es sich beim wirksamen Pigment des PS 370 von H.h. um eine Retinal-Protein Verbindung (Retinylidenprotein) mit Absorptionsmaxima bei 280 und 370 nm handelt. Diese Annahme wird durch eine Reihe direkter und indirekter Hinweise unterstützt.

Den ersten Hinweis auf die chemische Natur des zugrundeliegenden Chromophors lieferte der Befund, dass die DPR nicht in solchen Zellen auftritt, die in Gegenwart von Nikotin gezüchtet worden waren (Abschn. 1.3.3.). Es ist bekannt, dass dieses Alkaloid die Retinalsynthese durch Blockierung der Zyklisierung von Lycopon zum β -Carotin unterdrückt (Howes und Batra, 1970). Wie Abb. 8 verdeutlicht, handelt es sich hierbei nicht um eine irreversible Schädigung der Photosysteme. Das Wiederauftreten der Photoreaktion schon ungefähr 30 min nach Entfernung des Alkaloids (Abb. 7) weist auf eine schnelle Wiederaufnahme der Retinalsynthese hin. Der Nachweis einer Regeneration des PS 370 in Gegenwart von Nikotin (z.B. Abb. 9-11) schliesst die Möglichkeit aus, dass das Alkaloid einen Schritt des Transduktionsmechanismus zwischen Photopigment und Flagellenaktivierung blockiert.

Ein mehr direkter Beweis für ein Retinylidenprotein als Rezeptormolekül ist die Fähigkeit des Retinals die DPR in Nikotinzellen wiederherzustellen (Abschn. 1.3.4.1., Abb. 9; Abschn. 1.3.4.2., Abb. 10). Die Unwirksamkeit von Riboflavin in den Regenerationsexperimenten (Abschn. 1.3.4.5.) macht es unwahrscheinlich, dass ein Flavoprotein der primäre Photorezeptor ist.

Die an R_1L_3 und Nikotinzellen gemessenen Aktionsspektren der DPR sprechen ebenfalls für die Annahme eines Retinylidenproteins. Die Spektren zeigen neben einem Empfindlichkeitsmaximum bei 280 nm, bewirkt durch den Proteinanteil des Pigments, nur ein weiteres Maximum bei 370 nm (Abschn. 1.3.2. und 1.3.6.1., Abb. 14).

Das Absorptionsspektrum eines Flavoproteins dagegen hat Maxima bei 280, 370 und ca. 450 nm, wobei das letztere gewöhnlich das ausgeprägtere ist (Abb. 3 b). Im Falle eines Flavoproteins als Photorezeptor sollte sich die Bande bei 450 nm im Aktionsspektrum der Verhaltensreaktion widerspiegeln, falls es nicht, wie früher postuliert (Hildebrand und Dencher, 1975) durch Schirmpigmente maskiert wird. Obwohl in R_1L_3 und regenerierten Nikotinzellen die prinzipiell als Schirmpigmente infrage kommenden Carotinoide grösstenteils (S. Abschn. 1.3.1.) bzw. vollständig (s. Abschn. 1.3.6.1.) fehlen, findet man im Aktionsspektrum nicht das erwartete Flavon-Maximum. Im Gegenteil, die Zellen sind in diesem Bereich unempfindlich; oberhalb 450 nm kann die DPR nicht mehr ausgelöst werden. (Abb. 14). Diese Betrachtung spricht aber nicht zwingend gegen ein Flavoprotein als Pigment, da im Falle eines reduzierten Flavins die Absorptionsbande bei 450 nm verkleinert ist. (Mahler und Cordes, 1971).

Das Aktionsspektrum von Retinal-regenerierten Nikotinzellen entspricht sowohl in der Form als auch in der Position der Banden dem Absorptionsspektrum eines Retinylidenproteins, welches in vitro durch Behandlung des BR mit dem Detergenz Cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB) erzeugt werden kann (Abb. 15). In diesem modifizierten BR wie auch in dem natürlichen Rezeptorpigment des PS 370 scheinen die nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Proteinanteil zu fehlen, von denen angenommen wird, dass sie für die bathochrome Verschiebung der Absorptionsbande von Sehpigmenten und BR verantwortlich sind. Die 370 nm-Bande im Aktionsspektrum des PS 370 könnte der Absorption des über eine unprotonierte Schiff'sche Base gebundenen Retinals zugeschrieben werden. Zur Zeit ist aber noch unbekannt, ob das Retinal wirklich kovalent an das Protein gekoppelt ist. Ein über nichtkovalente Bindungen fixierter Chromophor könnte jedoch die gleichen spektralen Eigenschaften zeigen.

Rhodopsine, d.h. Retinal-Protein Pigmente, die ihr Absorptionsmaximum im ultravioletten Spektralbereich haben, sind nicht ungewöhnlich. So liegt beim Insekt *Ascalaphus* das Absorptionsmaximum von Sehpigment und Photoprodukt (Metarhodopsin) bei 345 bzw. 375 nm (Hamdorf et al., 1973). Auch das letzte Zwischenprodukt in der Reaktionskette des Vertebraten-rhodopsins besitzt sein Maximum bei 380 nm.

In Nikotinzellen konnte bei 280 nm auch mit sehr hohen Strahlungsintensitäten keine Verhaltensreaktion hervorgerufen werden. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass ein Protein allein die Reaktion nicht vermitteln kann. Der Chromophor Retinal ist offensichtlich für den Prozess der Signalwandlung notwendig. Weiterhin scheinen nur solche Photonen die UV-induzierbare Reaktion auszulösen, die vom Proteinanteil des Retinylidenproteins absorbiert werden, nicht jedoch von anderen Membranproteinen.

In den Regenerationsexperimenten war das all -trans Isomer des Retinals am wirkungsvollsten (Abschn. 1.3.4.3., Abb 11). Das Apoprotein bindet offensichtlich bevorzugt oder ausschliesslich dieses Isomer. Dies steht im Gegensatz zum Apoprotein des BR der PM, das sowohl mit all -trans als auch mit 13 -cis Retinal regeneriert werden kann. (Oesterhelt et al., 1973), wobei das 13 -cis Isomer stärker (Dencher et al., 1976) und schneller (Keen und Dencher, 1976) gebunden wird. Die beobachtete Rekonstitution des PS 370 durch 13 -cis und 11 -cis Retinal findet möglicherweise erst nach katalytischer Isomerisation zur trans-Form statt, was durch die längere Verzögerungsphase angedeutet wird. (Abb. 11). Eine Photoisomerisation durch das Reiz- bzw. Beobachtungslicht kann ausgeschlossen werden (vergl. Abschn. 1.2.6.), ebenso ist die Dunkelisomerisation bei Temperaturen unterhalb 60° C zu gering, um den Effekt zu erklären.

1.4.2. Strukturelle Beziehung des Retinylidenproteins der DPR zum Bacteriorhodopsin der Purpurmembran

Obwohl ein Retinylidenprotein offensichtlich das wirksame Pigment des PS 370 darstellt (s. Abschn. 1.4.1.), kann über die molekulare Struktur dieses Pigments, besonders seines Proteinanteils, wie auch über die in der Zelle vorliegende Konzentration zur Zeit nur spekuliert werden. Untersuchungen an intakten Zellen und isolierten Membran- und Cytoplasmafraktionen erlaubten es nicht das Pigment spektroskopisch oder biochemisch nachzuweisen. Es ist jedoch nicht ungewöhnlich, dass photosensorische Pigmente von Mikroorganismen in sehr geringer Konzentration in der Zelle vorhanden sind. (z.B. Euglena). Daher ist es einfacher oder sogar die einzige Möglichkeit, sie mit Hilfe von Aktionsspektren zu charakterisieren.

Im Prinzip sollte es möglich sein aus Experimenten, wie sie in Abschnitt 1.3.4.3. beschrieben wurden, die Anzahl der Retinylidenproteine des PS 370 zu bestimmen. Aus den Daten der Abb. 10 könnte man schliessen, dass bei einer Retinalkonzentration von $3,6 \cdot 10^{-7}$ mol/l gerade noch alle Rezeptorproteine des PS 370 mit Chromophor gesättigt sind, da fast die vollständige Empfindlichkeit des Photosystems zurückgewonnen wird. Die aus den vorliegenden Angaben berechnete Anzahl von $1,5 \cdot 10^5$ Pigmentmolekülen pro Zelle ($2,2 \cdot 10^{14}$ Retinalmoleküle/ml, ca. $1,5 \cdot 10^9$ Zellen/ml) ist sicher zu hoch. Sie liegt im Bereich der BR-Konzentration (ca. $9 \cdot 10^5$ BR/Zelle) und in diesem Falle müsste das Pigment sowohl spektroskopisch als auch biochemisch nachweisbar sein. Der Fehler liegt in der Annahme, dass das zugegebene Retinal vollständig und ausschliesslich vom Apoprotein des PS 370 gebunden wird. Dies setzt eine extrem hohe Bindungskonstante voraus. Nach Zentrifugation der rekonstituierten Bakteriensuspension zeigte sich, dass nicht alle Retinalmoleküle gebunden wurden. Weiterhin wird das zuge-

gebene Retinal nicht ausschliesslich vom Apoprotein des Pigmentes des PS 370 gebunden, sondern ein Teil wird wahrscheinlich vom Bacterioopsin der braunen Membran weggefangen. Unter Vernachlässigung des nicht gebundenen Retinalanteils und unter der Annahme einer Konzentration an Bacterioopsin von 10 % des Wertes unbehandelter Zellen (s. Abschn. 1.4.5.) erhält man Werte von $< 60\,000$ Retinylidenproteine pro Zelle für das PS 370.

Bei dieser Abschätzung wird eine gleiche Bindungskonstante für Retinal von Apoprotein und Bacterioopsin vorausgesetzt. Man könnte diese Betrachtung weiter quantifizieren, wenn man die Messungen an einem Mutantenstamm von H.h. wiederholen würde, der kein Bacterioopsin (BR) synthetisiert. Weiterhin liesse sich die Konzentration an freiem Retinal spektroskopisch bestimmen.

Untersuchungen an Zellen, die die Fähigkeit zur BR-Synthese verloren haben, könnten auch zur Klärung der Frage beitragen, ob das Retinylidenprotein des PS 370 ein Vor- bzw. Nebenprodukt in der Biosynthese des BR darstellt. So ist aus früheren Untersuchungen bekannt, dass in einer sich entwickelnden Kultur von H.h. das PS 370 ungefähr 10 h früher als das PS 565 auftritt. PS 370 besitzt ausserdem sofort seine maximale Empfindlichkeit, während sich PS 565 langsamer ausbildet und die Empfindlichkeitszunahme parallel der Bildung der PM verläuft (Dencher, 1974 a). Auch in den Rekonstitutionsexperimenten konnte das PS 370 eher als das PS 565 beobachtet werden (Abb. 9). Diese Reihenfolge könnte darauf hinweisen, dass es sich bei dem Pigment des PS 370 um eine biosynthetische Vorstufe des BR handelt. Dies würde beinhalten, dass die Proteinkomponente beider Pigmente identisch oder weitgehend identisch ist. Beispielsweise könnte das Retinylidenprotein des PS 370 aus einer längeren Aminosäurekette bestehen, von der beim Übergang zum BR ein Endstück enzymatisch abgespalten wird. Gegen die Annahme eines identischen Proteins spricht dagegen der Befund, dass PS 370 durch all -trans

Retinal vollständig wiederhergestellt werden kann (s. Abschn. 1.3.4.1), obwohl die Konzentration an regenerierbarem Bacterioopsin in Nikotinzellen viel kleiner ist als die Menge an BR in unbehandelten Zellen (Sumper und Herrmann, 1976). Dies macht unterschiedliche Biosynthesenwege für beide Pigmente wahrscheinlicher.

Spekuliert werden könnte darüber, ob die Bindungstasche für das Retinal, d.h. die Anordnung der Aminosäuren in der Umgebung des Chromophors, in beiden Fällen ähnlich ist. Die gemessene Geschwindigkeit der Empfindlichkeitszunahme während der Regeneration des PS 370 in Nikotinzellen (Abb. 9) ist ähnlich wie die Bildungsgeschwindigkeit des BR aus Bacterioopsin und all -trans Retinal in vitro (Keen und Dencher, 1976). Die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums im Falle des BR kann schon durch Protonierung der Schiff'schen Base und gegebenenfalls Lokalisation eines Gegenions in ihrer Umgebung befriedigend erklärt werden (Honig et al., 1976).

1.4.3. Die Rolle von Carotinoiden im PS 370

Der in Abschnitt 1.3.1. durchgeführte Vergleich zwischen den beiden verwendeten Mutantenstämmen von H.h. macht deutlich, dass sich R_1L_3 durch eine viel geringere Konzentration an Pigmenten auszeichnet. Da es sich dabei um Carotinoide handelt, kann aus dem typischen dreigipfeligen Absorptionsspektrum geschlossen werden (Abb. 4 und 6). Die Lage der Absorptionsbanden ist charakteristisch für das C_{50} - Carotinoid Bacterioruberin (Kelly et al., 1970), das in Stamm R_1 sicher den Hauptanteil dieser Pigmente ausmacht. Nach Wachstum in Gegenwart von Nikotin konnten bei R_1L_3 keine oberhalb 380 nm absorbierende Carotinoide nachgewiesen werden (s. Abschn. 1.3.6.1.).

Die im Vergleich zu den Carotinoid - reichen R_1 - Zellen in R_1L_3 Zellen und Carotinoid -freien Nikotinzellen fehlende Empfindlichkeit im Wellenlängenbereich oberhalb 450 nm (s Abschn. 1.3.2., 1.3.6.1., Abb 16) weist auf ihre Funktion als Antennenpigmente

im PS 370 hin. Diese Annahme fand dadurch Bestätigung, dass die von H.h. R_1 extrahierten Carotinoide (Abb. 4 und 15) zu einer deutlichen Empfindlichkeitszunahme im Spektralbereich zwischen 420 und 570 nm führten, wenn sie Retinal regenerierten Nikotinzellen zugesetzt wurden (Abb. 16). Ist das Retinylidenprotein in der Zelle vorhanden, so scheint ein Teil der Carotinoide als Antennenpigment an der DPR beteiligt zu sein. Allein können sie die DPR nicht auslösen (s. Abschn. 1.3.4.5.). Sie übertragen offenbar die absorbierte Energie auf das wirksame Retinal-Protein-Pigment. Berücksichtigt man die relativen Konzentrationen der beiden Pigmentarten in der Zelle, so ist die Wirksamkeit der Energiewanderung als gering anzunehmen. Da der Energietransfer von der energieärmeren (längerwelligen) Seite zur energiereicheren (kürzerwelligen) erfolgt, muss eine Energieübertragung über Triplett-Triplett-Wechselwirkungen diskutiert werden.

Qualitativ lässt sich das an R_1 und an mit Retinal und Carotinoiden regenerierten Nikotinzellen (Abb. 16) gemessene Aktionspektrum des PS 370 mit den Absorptionsspektren des künstlich modifizierten BR und der extrahierten Carotinoide (Abb. 15) annähernd zur Deckung bringen. Die geringfügigen Unterschiede in der Lage der Maxima im Bereich zwischen 450 und 550 nm sind in Einklang mit einer gefundenen Blauverschiebung der Absorptionsspektren von Carotinoiden in Lösungsmitteln geringer Polarisierbarkeit, z.B. Äthanol (Abb. 4; siehe auch Lanyi, 1973). Ein selektiver Verlust an membrangebundenen Carotinoiden während der Extraktion kann die Unterschiede in den Aktionsspektren von R_1 und von vollständig rekonstituierten Nikotinzellen (Abb. 16) erklären. Abb. 4 verdeutlicht, dass nach der Extraktion noch Carotinoide mit einem vom Bacterioruberin verschiedenen Spektrum in der Membranfraktion zurückbleiben.

Aus Abb. 16 ist ebenfalls zu erkennen, dass die Bande bei 370 nm im Aktionsspektrum der DPR von R_1 -Zellen und von mit Retinal und Carotinoiden regenerierten Nikotinzellen schmaler ist als in Zellen, die nur mit Retinal regeneriert sind. Möglicherweise wirkt ein Teil der Carotinoide, die in diesem Spektralbereich

absorbieren, als Schirmpigmente. Zur Zeit liegen für diese Annahme jedoch keine experimentellen Befunde vor.

Das Zusammenwirken eines Retinal-Protein-Komplexes mit Carotinoiden als Photorezeptor wurde kürzlich auch für ein anderes biologisches Objekt postuliert. Die meisten Ommatidien im Komplexauge von Fliegen enthalten in der Membran der zentralen Rhabdomere neben Rhodopsin ein photostabiles dichroitisches Pigment, wahrscheinlich ein Carotin. Es wird vermutet, dass dieses Carotin als Antennenpigment wirkt und die absorbierte Energie auf das UV - empfindliche Sehpigment überträgt (Kirschfeld und Franceschini, 1977).

1.4.4. Lokalisation des PS 370

In der isolierten PM von H.h. konnte ausser dem BR kein weiteres Pigment, d.h. weder Carotinoide noch ein UV - absorbierendes Retinylidenprotein nachgewiesen werden. Da das PS 370 entsprechend seinem Wirkungsmechanismus (s. Abschn. 1.4.7.) höchstwahrscheinlich ein Bestandteil der Cytoplasmamembran darstellt, muss angenommen werden, dass das aktive Retinylidenprotein gemeinsam mit den Carotinoiden in Membranbereichen vorliegt, die die PM umgeben. Die als akzessorische Pigmente wirkenden Carotinoide müssen in einer speziellen molekularen Anordnung in unmittelbarer Nachbarschaft der Retinylidenproteine lokalisiert sein, um die Energieübertragung zu gewährleisten. Im Hinblick auf die hohe Carotinoidkonzentration in der sogenannten "roten Membran" (Sumper, et al., 1976) ist diese Membranfraktion der wahrscheinlichste Ort des PS 370.

1.4.5. Das Pigment des PS 565

Die in Nikotinzellen fehlende IPR (Abschn. 1.3.3.) und die Wirksamkeit von Retinal das PS 565 wiederherzustellen (Abschn 1.3.4.4.) sind weitere Beweise für BR als verantwortliches Photopigment dieses Systems. Der Befund einer 7,5- bis 10-fach geringeren

Empfindlichkeit des PS 565 in regenerierten Nikotinzellen (Abb. 9) im Vergleich zu unbehandelten Halobakterien (Dencher, 1974 a) ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sumper und Herrmann (1976), dass Bacterioopsin seine eigene Synthese hemmt. In Nikotinzellen ist daher die Konzentration an regenerierbarem Bacterioopsin viel kleiner anzunehmen als die Konzentration an BR in normalen Zellen. Ein entsprechender "feed-back" Mechanismus scheint für das Apoprotein des PS 370 zu fehlen, da nach Rekonstitution dieses Photosystems die ursprüngliche Empfindlichkeit gefunden wurde.

Wegen der geringen Empfindlichkeit des PS 565 unter diesen Bedingungen ist nicht auszuschliessen, dass die in Abschnitt 1.3.4.4. beschriebene Regenerationskinetik durch apparative Begrenzung der Reizlichtintensität bedingt war. In diesem Falle würde man bei Verwendung einer höheren Reizlichtintensität ein frühzeitigeres Auftreten der IPR beobachten.

Die Rekonstitution des PS 565 verläuft langsamer als die Regeneration von BR (Keen und Dencher, 1976), ist aber schneller als die Bildung der PM (Sumper und Herrmann, 1976). Eine spezifische hexagonale Gitterstruktur des BR, wie sie in der PM vorliegt, scheint für dessen Funktion als Photosensor daher nicht notwendig zu sein.

1.4.6. Biologische Bedeutung der beiden Photosysteme

Es bleibt die Frage zu diskutieren, ob die beobachteten stereotypen lichtgesteuerten Verhaltensreaktionen für das Überleben von H.h. in seiner extremen Umgebung von Vorteil sind oder keine Bedeutung haben.

Durch die Wirkung des PS 565 wird eine Umkehr der Bewegungsrichtung durch eine plötzliche Verringerung der Lichtintensität bestimmter Wellenlänge hervorgerufen, während eine Erhöhung der Intensität keine Wirkung hat. Ein Lichtfleck (gelbgrünes bzw. weisses Licht) wirkt daher als Falle für diejenigen Bakterien, die zufällig in ihn hereinschwimmen (Abb. 17). Tatsächlich kann beobachtet werden, dass innerhalb weniger Minuten sich eine An-

sammlung von Halobakterien in einem Lichtfleck bildet (Abb. 18). Ein ähnlicher Effekt ist auch beim Übergang von Licht einer Wellenlänge in einen Bezirk gleicher Intensität einer anderen Wellenlänge zu beobachten (z.B. 565 $\rightarrow$ 500 nm). Das Aktionspektrum dieses Photoverhaltens (Abb. 2) stimmt sowohl mit dem Absorptionsspektrum des BR (Abb. 2 und 5) als auch mit den Aktionsspektren der BR - abhängigen energiewandelnden Prozesse (z.B. Pumpen von Protonen, ATP - Synthese, Transport von Ionen und Aminosäuren, siehe Henderson, 1977) überein. Die Halobakterien scheinen daher das vom BR kontrollierte PS 565 zu verwenden um die optimalen Strahlungsbedingungen (Intensität und Wellenlänge) für die BR-abhängige Energienwandlung zu finden. Die biologische Funktion des PS 370 ist weniger offensichtlich. Mit Hilfe der DPR meiden die Zellen das energiereiche blaue und ultraviolette Licht (Abb. 17), das sie schädigen könnte. So wurde eine Wachstumshemmung carotinoidfreier Halobakterien durch Sonnenlicht beschrieben (Larsen, 1973). Indirekt bewirkt die Vermeidung dieses kurzwelligen Spektralbereichs eine Ansammlung der Bakterien in dem auch vom PS 565 bevorzugten Wellenlängenbereich. Die geringe Pigmentkonzentration, die hohe Empfindlichkeit und die Fähigkeit zur Adaptation (Dencher, 1974 a) lassen es sehr wahrscheinlich erscheinen, dass das PS 370 abweichend von BR nur eine sensorische Funktion besitzt.

Die hier beschriebenen Experimente wurden in einer künstlichen Umgebung unter Anwendung monochromatischer Lichtreize durchgeführt. In ihrem natürlichen Biotop, dem Salzsee, sind Halobakterien intensiver Sonnenbestrahlung ausgesetzt. Wie können sie unter diesen Umgebungsbedingungen ihre sensorischen Photosysteme verwenden, d.h. welche sind die wirksamen Reize? Sonnenlicht, welches eine Wasserschicht mit photosynthetischen Organismen durchdringt, wird nicht nur in seiner Intensität verringert sondern auch in seiner spektralen Zusammensetzung verändert. Wegen der selektiven Absorption des blauen und roten Spektralbereichs durch die verschiedenen Chlorophylle und Carotinoide wirkt dieses System als biologischer Spektralfilter (Abb. 19). Je länger die

Schichtdicke dieses Filters, um so grösser ist der relative Anteil von Wellenlängen zwischen 500 und 600 nm im durchgelassenen Licht. Andererseits verwendet H.h. für die BR - abhängige Energiewandlung gerade diejenigen Strahlungsanteile, die von den photosynthetischen Organismen nicht oder nur zum Teil genutzt werden ("spektrale Nische") (Abb. 19). Es ist denkbar, dass mit Hilfe beider Photosysteme die Zellen sich in einer bestimmten Wassertiefe ansammeln, die für ein Überleben günstige Lichtverhältnisse aufweist, d.h. optimal sind für die BR-abhängige Lichtenergiewandlung ohne dabei die Zellen zu schädigen. In Gegenwart geeigneter Nährstoffe und ausreichender Sauerstoffversorgung wird keine PM synthetisiert und das PS 370 könnte unter diesen Bedingungen das Photoverhalten allein kontrollieren.

Es muss hervorgehoben werden, dass es sich bei diesen Überlegungen um reine Spekulationen nach Zweckmässigkeit Gesichtspunkten handelt, die z.Z. nicht durch Untersuchungen des Verhaltens von H.h. in seiner natürlichen Umwelt belegt werden können.

1.4.7. Signalwandlung und -transmission

Über den molekularen Mechanismus der Signalwandlung bei H.h. kann man zur Zeit nur Spekulationen anstellen. Die Reaktionskette zwischen der Absorption des Photons durch das Pigmentmolekül und der Änderung der Flagellenaktivität (Umkehr der Rotation) ist unbekannt. Die folgende stark vereinfachte Betrachtung basiert auf Ergebnissen, die bei der Untersuchung des chemophobischen Verhaltens anderer Bakterien gewonnen wurden. Danach führt eine vorübergehende Änderung des Membranpotentials zu Änderungen des Bewegungsverhaltens (Miller und Koshland, 1977). Ausserdem ist bekannt, dass die Flagellen durch den Protonengradienten über der Membran energetisiert werden (Belyakova et al., 1976; Manson et al., 1977).

Unter normalen Lichtbedingungen, d.h. unter den Bedingungen bei denen die photophobischen Reaktionen beobachtet wurden, existiert in der PM nur das all -trans Isomer des BR (trans BR) (Oesterhelt et al., 1973; Dencher et al., 1976 a,b; Sperling et al., 1977). Die Dunkel- und Photoreaktionen des trans BR zum 13 -cis BR (Abb. 20) können wegen der langsamen Reaktionsgeschwindigkeit (Keen und Dencher, 1976) bzw. wegen der notwendigen hohen Lichtintensitäten (Dencher et al., 1978; Sperling et al., 1978) für die Diskussion der Signalwandlung nicht herangezogen werden.

Nach Absorption eines Photons durchläuft das angeregte BR einen komplexen Reaktionszyklus (Abb. 20) der in lebenden Bakterien bei 20° C ungefähr 100 ms dauert (Dencher et al., 1976 b). Der wirksame Reiz für das PS 565, d.h. die Verringerung der Lichtintensität, verkleinert die Zahl der angeregten BR-Moleküle und damit auch die Anzahl der aus der Zelle transportierten Protonen (Lozier et al., 1975; Dencher und Wilms, 1975). Wegen der elektrogenen Wirkung der Protonenpumpe BR bewirkt der Reiz vermutlich eine Depolarisation des bestehenden Membranpotentials, die als Signal für die Umsteuerung des Flagellenantriebs dienen könnte.

Auch die Erregungsübertragung des PS 370 könnte über eine vorübergehende Abnahme des Membranpotentials verlaufen, indem das Retinylidenprotein entweder als lichtempfindliche Membranpore selbst die Permeabilität für eine bestimmte Ionenart (z.B. K⁺) erhöht oder mittelbar das Öffnen einer Pore bewirkt.

Im Gegensatz zum PS 565 ist die Empfindlichkeit des PS 370 unabhängig von pH - Wert des Mediums (Dencher, unveröffentlichte Ergebnisse). Dies deutet darauf hin, dass im PS 370 Protonen nicht direkt am Transduktionsmechanismus beteiligt sind. Calciumionen sind dagegen für die Auslösung der photophobischen Reaktion in beiden Photosystemen notwendig. Dies konnte durch Experimente mit einer durch EGTA verringerten äusseren Calciumkonzentration gezeigt werden (Dencher, unveröffentlichte Ergebnisse). Einen ersten mehr direkten Hinweis für die Beteiligung des Membranpoten-

tials an der sensorischen Transduktion von H.h. liefert der Befund, dass eine Erhöhung der äusseren K^+ - Konzentration und die damit vermutlich verbundene Verringerung des Membranpotentials (Wagner et al., 1978) beide Photosysteme hemmt (Hildebrand und Janković, unveröffentlichte Ergebnisse).

Eine Steuerung des Photoverhaltens von H.h. durch vorübergehende Depolarisation der Membran würde die schnelle und gleichzeitige Umkehr der Flagellendrehrichtung an beiden Polen der Zelle erklären (Krieg et al., 1967) und auch die Tatsache, dass simultane Reizung beider Photosysteme integriert wird (Hildebrand und Janković, unveröffentlichte Ergebnisse).

1.4.8. Ausblick

Die Untersuchung photosensorischer Reaktionen in H.h. (Dencher, 1974 a) und die hier beschriebene weiterführende Charakterisierung der beteiligten Photosysteme kann nur als Ausgangspunkt und Grundlage weiterer intensiver Untersuchungen an diesem biologischen Objekt angesehen werden. Die photophobische Reaktion von H.h. könnte sich ähnlich der schon länger intensiv untersuchten "Chemotaxis" anderer Bakterien als ein geeignetes Modellsystem zur Erforschung des Transduktionsmechanismus von Reiz in Erregung auf molekularer Ebene dienen. Wegen der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit der beiden Retinal-Protein-Pigmente von Halobakterium mit dem Rhodopsin der Invertebraten und Vertebraten sind Beiträge zum Verständnis des Sehprozesses zu erwarten (Stieve, 1977).

Weitere Erkenntnisse über das PS 370 könnten die folgenden Experimente liefern:

- 1) Bestimmung der Zahl der Retinylidenproteine wie in Abschnitt 1.4.2. beschrieben. Nach ungefährem Kenntnis der Pigmentkonzentration in der Zelle könnte man abschätzen, ob biochemische und/oder spektroskopische Methoden eine Isolierung und Charakterisierung dieses Pigmentes erlauben.

- 2) Untersuchungen an Mutantenstämmen, die die Fähigkeit zur Synthese des BR verloren haben, könnten Aufschluss darüber geben, ob das Retinylidenprotein des PS 370 ein Vor- bzw. Nebenprodukt der BR - Synthese darstellt und strukturell dem BR ähnlich ist.
- 3) Aufschlüsse über Funktionsweise und Struktur des Retinylidenproteins im Vergleich zum BR könnten Rekonstitutionsexperimente an Nikotinzellen mit verschiedenen Retinalisomeren und chemisch modifizierten Retinalen liefern.
- 4) Eine chromatographische Auftrennung des extrahierten Carotinoidgemisches und Inkubation der durch Retinal regenerierten Nikotinzellen mit den gereinigten Carotinoiden würde die noch offene Frage beantworten, welche dieser Pigmente als Antennen - bzw. als Schirmpigmente wirken.
- 5) Verwendung fremder bzw. modifizierter Carotinoide und anderer Chromophore in Regenerationsexperimenten einerseits und Einsatz spezifischer Chemikalien (z.B. Kaliumjodid als Triplettquencher) andererseits ermöglichen die Untersuchungen des Mechanismus der Energiewanderung zwischen Carotinoiden und Retinylidenprotein.

In Abschnitt 1.4.7. wurde die Hypothese diskutiert, dass vorübergehende lichtinduzierte Änderungen des Membranpotentials (möglicherweise Depolarisationen) das Photoverhalten von H.h. steuern. Diese Hypothese liesse sich durch folgende Untersuchungen nachprüfen:

- 1) Fortführung der in Abschnitt 1.4.7. erwähnten Experimente über die Ionenabhängigkeit der Verhaltensreaktion durch Variation der entsprechenden Ionenkonzentration bzw. Verwendung von Ionophoren, z.B. Valinomycin, Gramicidin, Nigericin, Monensin, CCCP und FCCP).

- 2) Beobachtung des lichtabhängigen Verhaltens nach Ausschalten des Membranpotentials durch das lipophile Kation TPM P^+ (Triphenylmethyl - phosphonium) oder des pH - Gradienten über der Zellmembran durch die schwache Säure DMO (5,5 - dimethyloxazolidene - 2,4 - dione).

- 3) Messung lichtinduzierter Schwankungen des Membranpotentials durch direkte extrazelluläre Ableitung an Einzelzellen und Zellsuspensionen oder indirekt mit spektroskopischen Methoden. Bei letzteren könnten sowohl spannungsempfindliche künstliche (Merocyanine, di S - C₃ - (5), Oxonol) wie auch natürliche Pigmente (Elektrochromie von Carotinoiden und BR) eingesetzt werden und die Absorptions- bzw. Fluoreszenzänderung mit den beobachteten Verhaltensreaktionen verglichen werden.

2. Photo- und Dunkelreaktionen des Bacteriorhodopsins

(Zusammenfassung der Veröffentlichungen: Dencher und Wilms, 1975; Dencher, Rafferty und Sperling, 1976 b)

Für ein Verständnis der molekularen Funktionsweise des Bacteriorhodopsins als Energiewandler und Photosensor ist die Kenntnis der Photochemie dieses Pigmentes eine der Voraussetzungen. Die nach Absorption eines Photons im BR (wie auch in anderen Photopigmenten, z.B. Rhodopsin, Chlorophyll) stattfindenden physikalisch-chemischen Veränderungen führen zu charakteristischen Änderungen des Absorptionsspektrums. Im Falle des BR laufen erste beobachtbare Vorgänge unter physiologischen Bedingungen (Temperatur, Umgebung des Pigmentmoleküls) im Zeitbereich von Pico- bis Millisekunden ab. Die Methode der Blitzlichtphotolyse (Norrish und Porter, 1949) erlaubt eine zeitliche Auflösung dieser rasch ablaufenden Reaktionen und ermöglicht die kinetische Analyse des Systems. Im Gegensatz zum Vertebratenrhodopsin, bei dem jede aufgeprägte Störung (Lichtblitz) zu einer irreversiblen Veränderung des Pigmentmoleküls führt (Abspaltung des Retinals vom Opsin) sind die im Falle des trans BR und, mit Einschränkungen, des 13- cis BR induzierten Veränderungen vollständig reversibel (Ausnahmen s. Sperling et al., 1978 und 1979). Mit der gleichen Probe kann daher eine grosse Zahl identischer oder verschiedener Experimente durchgeführt werden, da nach Störung des Systems der eingestellte instationäre Zustand zum ursprünglichen Gleichgewichtszustand relaxiert. (Änderungen des Systems durch andere als durch Photonen hervorgerufene Störungen sind bei dieser Betrachtung vernachlässigt.)

Im folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse zweier Arbeiten zusammengefasst, die in Zusammenarbeit mit Ch.N. Rafferty, W. Sperling und M. Wilms durchgeführt wurden. Mit Hilfe der Blitz-

lichtphotometrie und stationären Absorptionsmessungen wurden die Photo- und Dunkelreaktionen des trans BR und des 13 -cis BR an lebenden Bakterien, isolierter PM und regeneriertem BR unter meist physiologischen Bedingungen untersucht. (Nomenklatur s. Seite 80, Legende zu Abb. 20.)

trans BR:

- 1) ^{411}T ist nicht wie vorher vermutet wurde (Oesterhelt und Hess, 1973) das primäre Photoprodukt des trans BR, sondern das von uns beschriebene ^{630}T .
- 2) Die Reaktion $^{411}\text{T} \rightarrow$ trans BR verläuft nicht nur thermisch, sondern kann auch photochemisch erfolgen (s. auch Dencher et al., 1976 a)
- 3) Messungen mit dem pH-Indikator Bromokresolgrün zeigen, dass während der Bildung und dem Zerfall des von uns gefundenen Zwischenproduktes ^{646}T bei pH 5,0 Protonen aufgenommen und wieder freigesetzt werden.
- 4) Die Aktivierungsenergie für die Bildung von ^{411}T , ^{646}T und trans BR beträgt 14,1, 13 und 19 kcal/mol.

13 -cis BR:

Da trans BR zwar in reiner Form in der lichtadaptierten PM vorliegt, 13 -cis BR in vivo dagegen nur gemeinsam mit dem trans - Isomer auftritt (Kapitel 3) konnte erst durch eine neu eingeführte Untersuchungsmethodik eindeutige Aussagen über die Photochemie des 13 -cis BR gemacht werden. Bei dieser Methode wird Chromophor-freies Bacterioopsin mit 13 -cis oder all -trans Retinal inkubiert und auf diese Weise BR mit dem entsprechenden Isomer künstlich hergestellt.

- 1) Die an diesem Material gewonnenen Daten zeigen, dass im Gegensatz zu früheren Befunden (Lozier et al., 1975; Lozier und Niederberger, 1977) die beiden BR-Isomere unterschiedliche Photo- und Dunkelreaktionen nach Anregung durchlaufen.
- 2) Das Photoprodukt ^XC entsteht bei -90°C in weniger als 50 ns aus 13-cis BR und zerfällt mit einer Halbwertszeit von $1,5\ \mu\text{s}$ zu einem weiteren Zwischenprodukt, ^{610}C .
- 3) ^{610}C zerfällt mit einer Halbwertszeit von 37 ms bei 20°C in 13 -cis BR und trans BR.
- 4) Die Reaktion $^{610}\text{C} \rightarrow 13\text{ -cis BR}$ verläuft sowohl thermisch als auch photochemisch.
- 5) ^XC und ^{610}C sind Zwischenprodukte bei der Photoisomerisation von 13 -cis BR nach trans Br.

Basierend auf den verschiedenen Photoreaktionen von 13 -cis und trans BR wurde eine analytische Methode zur Bestimmung ihres Mengenverhältnisses entwickelt. Lebende Bakterien, isolierte PM und regeneriertes BR enthalten im dunkeladaptierten Zustand beide Isomere im Verhältnis 1:1. Das Gleichgewicht trans BR/ 13 -cis BR ist zwischen 1° und 60°C nur geringfügig temperaturabhängig. In lichtadaptierten Proben wurde nur trans BR nachgewiesen.

3. Identifizierung der Retinalisomere von licht- und dunkeladaptiertem Bacteriorhodopsin

(Zusammenfassung unveröffentlichter Experimente einer Zusammenarbeit mit P. Carl)

3.1. Einleitung

Zwei unterschiedliche spektroskopisch fassbare Zustandsformen des BR kann man beobachten, die reversibel ineinander umwandbar sind. Lagert man eine BR-haltige Probe im Dunkeln bis keine weiteren Absorptionsänderungen auftreten (dunkeladaptierte PM bzw. BR), so hat das Absorptionsspektrum sein Maximum bei 558 nm (Abb. 21). Belichtung dieser Probe mit sichtbarem Licht führt innerhalb von Sekunden bis Minuten (abhängig von der verwendeten Lichtintensität) zu einer Verschiebung des Maximums nach 568 nm, begleitet von einer ungefähr 12 % Zunahme der Extinktion (lichtadaptierte PM bzw. BR). Im Dunkeln relaxiert dieses System zum ursprünglichen Gleichgewichtszustand ($k = 7 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ bei 25° C , Keen und Dencher, 1976). Durch Extraktion des Chromophors konnte nachgewiesen werden, dass sich die licht- und dunkeladaptierten Proben in ihrem Gehalt in Retinalisomeren unterscheiden. Während in der lichtadaptierten PM nur all -trans Retinal nachgewiesen wurde (Oesterhelt et al., 1973; Jan, 1975), unterscheiden sich die Ergebnisse für die dunkeladaptierte PM deutlich. Oesterhelt et al. (1973) finden neben all -trans Retinal nur geringe Anteile des 13 -cis Isomers, dagegen ist nach Jan (1975) 13 -cis Retinal der einzige Chromophor des dunkeladaptierten BR.

Für die Interpretation einer Reihe von Daten, z.B. blitzlichtphotometrischer Untersuchungen der Photochemie von dunkeladaptiertem BR, ist die Kenntnis der verantwortlichen Chromophore von Bedeutung. Aus diesem Grunde wurde gemeinsam mit P. Carl die o.g. Extraktionsversuche wiederholt. Nachdem in Vorversuchen sich die Unzulänglichkeit der vorher verwendeten Extraktionsmethoden gezeigt hatte, wurde für die weiteren Untersuchungen auf

eine Methode von Rotmans et al. (1972) zurückgegriffen. Weiterhin wurde die Identifizierung und Quantifizierung der extrahierten Chromophore nicht nur dünnschichtchromatographisch, sondern gewöhnlich mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, in Einklang mit den blitzlichtphotometrischen Daten (Kapitel 2), dass in der dunkeladaptierten PM all -trans und 13 -cis Retinal im Verhältnis von 1:1 vorliegen (Dencher et al., 1976 a,b).

3.2. Material und Methoden

Retinalisomeren aus PM des Stammes R₁L₃ wurde nach den Angaben von Rotmans et al. (1972), Oesterhelt et al. (1973) und Jan (1975) extrahiert. Im Falle der von uns meist angewendeten Methode nach Rotmans et al. wurde eine konzentrierte PM-Suspension im Dunkeln bei 0° bzw. 20°C mit absolutem Äthanol versetzt (Endkonzentration ≥ 90 %), 10 min kräftig geschüttelt, danach die Membranen abzentrifugiert (10 min, 48 000 g), der Überstand mit dem gleichen Volumen Eiswasser verdünnt und die wässrige Phase mit einem gleichen Volumen an n - Hexan extrahiert. Diese Prozedur wurde 3-4 mal mit dem verbleibenden Membranniederschlag und dem Überstand wiederholt und die Proben getrennt analysiert. Nach Messung des Absorptionsspektrums der Hexanphase (Abb. 22) wurden die Proben hochdruckchromatographisch aufgetrennt und das Eluat spektroskopisch bei 370 nm untersucht (Apparatur und Methodik s. Sperling et al., 1977). Die Retinalisomere wurden durch ihre Zurückhaltezeit auf der Säule identifiziert, ihr quantitativer Gehalt ist durch die Fläche der Absorptionsbande unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Isomere bei 370 nm gegeben (Abb. 23). Retentionszeiten und Flächen der Banden wurden mit bekannten Lösungen von all -trans und 13 -cis Retinal geeicht. Neben PM wurde auch reines 13 -cis Retinal den Extraktionsmethoden unterworfen um nachzuprüfen, ob die Behandlung zu einer Isomerisierung des Chromophors führt.

Die PM Probe wurde für 3-5 min mit Licht der Wellenlängen $> 515 \text{ nm}$ und einer Intensität von 10 mW/cm^2 lichtadaptiert.

3.3. Ergebnisse und Diskussion

3.3.1. Extraktion nach Jan

Nach der Vorschrift von Jan (1975) soll die PM durch Zugabe des Detergenz CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) chemisch gebleicht, danach durch ln-HCl die Schiff'sche Base zwischen Retinal und Protein hydrolysiert und das freigesetzte Retinal in Chloroform extrahiert werden. Obwohl unter genauer Einhaltung der Vorschrift diese Methode an einer Reihe unterschiedlicher Proben durchgeführt wurde, konnte kein Chromophor extrahiert werden. Absorptionsspektren machten es sehr wahrscheinlich, dass es zu keiner Hydrolyse der Schiff'sche Base gekommen ist.

3.3.2. Extraktion nach Oesterhelt, Meentzen und Schuhmann

In der Extraktionsmethode von Oesterhelt et al. (1973) wird die PM mit Eisessig und CTAB bzw. Me_2SO für 90 min inkubiert und danach mit Petroleumbenzin das Retinal extrahiert. Das Petroleumbenzin wurde in unseren Versuchen wegen der Verwendung der HPLC durch n-Hexan ersetzt. Um die Ausbeute an Chromophor zu erhöhen, wurde die gleiche Probe dreimal extrahiert.

In Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Oesterhelt et al. konnte eine Gemisch von 13 -cis und all -trans Retinal aus der dunkeladaptierten PM extrahiert werden. Die erste Extraktion lieferte 22% 13 -cis und 78% all -trans Retinal, die zweite und dritte zusammen 18 % und 82 %. Die Wiederholung dieser Prozedur an reinen 13 -cis Retinal Lösungen zeigte jedoch, dass diese Methode zu einer Isomerisierung des 13 -cis Retinals zum all -trans Isomer führt und so das Versuchsergebnis verfälscht. Der Grund liegt möglicherweise in der extrem langen Inkubationszeit von 90 min.

3.3.3. Extraktion nach Rotmans, Bonting und Daemen

Diese von Rotmans et al. (1972) beschriebene Extraktionsmethode scheint für die Anwendung an der PM am besten geeignet zu sein. So führte sie in Kontrollexperimenten zu keiner Isomerisation des 13 -cis Retinals. Weiterhin waren die Ergebnisse unabhängig davon, ob die Extraktion bei 0° C oder 20° C durchgeführt wurde. Da mit der ersten Extraktion nur jeweils 15-30 % des Chromophors extrahiert werden konnte, wurde das Verfahren zwei- bis dreimal an der gleichen Probe wiederholt und so eine maximale Ausbeute von 50 - 60 % erzielt. Schon mit der ersten Extraktion konnten 30 - 40 % des Chromophors erhalten werden, wenn gefriergetrocknete PM mit absolutem Äthanol versetzt wurde.

Abb. 23 zeigt ein Beispiel der erhaltenen Daten. (Die beiden Proben hatten eine unterschiedliche BR Konzentration und sind daher nicht direkt miteinander vergleichbar). Das aus der lichtadaptierten PM extrahierte Retinal bestand fast ausschliesslich aus dem all -trans Isomer (> 98 %), während aus der dunkeladaptierten PM gleiche Anteile beider Isomere extrahiert wurden. Neben dem 13 -cis Isomer konnten $50,1 \pm 2,3 \%$ ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$, $n = 7$) all -trans Retinal in bei 1° C und pH 6,9 dunkeladaptierter PM nachgewiesen werden.

Kontrollmessungen ergaben, dass das Verhältnis der Isomere im BR vom Suspensionsmedium abhängen kann. So enthielt in Basalsalz/Äther (Oesterhelt und Hess, 1973) suspendierte PM auch im lichtadaptierten Zustand grössere Mengen 13 -cis Retinal.

Diese mit Hilfe der Äthanol - Extraktion an wässrigen PM - Suspensionen gewonnenen Daten sind in Übereinstimmung mit unseren in Kapitel 2 beschriebenen, auf blitzlichtphotometrischen Messungen beruhenden Ergebnissen und wurden später durch Untersuchungen von Maeda et al. (1977) und Pettei et al. (1977) quantitativ bestätigt.

4. Circulardichroismus der Purpurmembran

(Zusammenfassung der Veröffentlichungen:

Heyn, Bauer und Dencher, 1975; Bauer, Dencher und Heyn, 1976)

Die Circulardichroismus - (CD) Spektroskopie beruht auf der Tatsache, dass die rechts- und linksdrehende Komponente des zirkular polarisierten Lichts beim Durchtritt durch eine optisch aktive Substanz verschieden stark absorbiert wird. Der CD bei einer gegebenen Wellenlänge λ ist daher definiert als $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$, d.h. als Differenz der Extinktionskoeffizienten der beiden Komponenten. Die CD - Spektroskopie ist besonders geeignet für Konformationsuntersuchungen an Polypeptiden und Polynucleotiden (z.B. Bestimmung des α -Helixgehalts von Proteinen) und erlaubt die Messung der Kinetik von Konformationsänderungen (z.B. Helix - Knäuel - Umwandlungen). Unter bestimmten Bedingungen kann auch die Wechselwirkung von Chromophoren studiert werden.

Das CD - Spektrum von Rhodopsin in der Diskmembran zeigt im sichtbaren Spektralbereich eine einzige positive Bande im Bereich des Absorptionsmaximums (z.B. Rafferty, 1977). Während das Rhodopsin eine grosse Rotations - (Cone, 1972) und Translationsbeweglichkeit (Poo und Cone, 1973) besitzt, sind die BR - Moleküle in der PM unbeweglich (Razi Naqvi et al., 1973) und bilden ein geordnetes hexagonales zweidimensionales Oberflächengitter (Blaurock und Stoeckenius, 1971; Henderson und Unwin, 1975). Das CD - Spektrum einer PM - Suspension besitzt als bemerkenswertestes Kennzeichen zwei Banden von entgegengesetztem Vorzeichen im Bereich des Absorptionsmaximums um 570 nm, die im Absorptionsspektrum nicht erkennbar sind (Becher und Cassim, 1975; Heyn et al., 1975). Für dieses Spektrum gibt es zwei mögliche Erklärungen:

1. Überlagerung einer breiten positiven Bande am Absorptionsmaximum (hervorgerufen durch eine Wechselwirkung zwischen Retinal und Proteinanteil) und einer Exciton Bande mit einem positiven kürzerwelligen und einem gleich grossen negativen längerwelligen Extremum (hervorgerufen durch Wechselwirkungen

- zwischen Chromophoren benachbarter BR - Moleküle in der PM);
2. Kombination zweier verschiedener Übergänge mit entgegengesetztem CD im gleichen Molekül.

Während es für die zweite Hypothese keine Hinweise aus dem Absorptionsspektrum gibt, unterstützten die von uns durchgeführten Messungen die erste Interpretation.

1. Um eine Wechselwirkung zwischen benachbarten Pigmentmolekülen zu verhindern, wurde die PM mit Hilfe des Detergenz Triton X-100 solubilisiert. Das CD - Spektrum der nicht mehr gekoppelten BR - Moleküle besteht dann nur noch aus einer positiven Bande am Absorptionsmaximum des Chromophors. Dies ist ein Einklang mit der ersten Interpretation.
2. Bei tiefen Temperaturen und hohen Lichtintensitäten kann das Photogleichgewicht zwischen trans BR und seinem Zwischenprodukt ^{411}T auf die Seite von ^{411}T verschoben werden (s. auch Kapitel 2). Die Exciton - Kopplungsbande bei 570 nm sollte dann verschwinden, da die verbliebenen isolierten 570 nm - Komplexe (trans BR) im statistischen Mittel keine ungebleichten Nachbarn haben, mit denen sie wechselwirken können. Wir beobachteten unter diesen Bedingungen nur eine positive Bande bei 570 nm.
3. Es ist möglich, die Chromophor - freie Apomembrane durch Zugabe von all -trans Retinal zu regenerieren (s. Kapitel 2). In den anfänglichen Stufen dieser Regenerationsexperimente (d.h. $\leq 25\%$ Regeneration) sind nur einzelne isolierte Retinal-Bindungsplätze besetzt und wir beobachteten - wie Hypothese I fordert - nur eine positive Bande. Erst bei einem höheren Prozentsatz an regeneriertem BR trat zusätzlich die negative Bande auf. Die Amplitude der "Exciton" - Bande wuchs quadratisch mit dem Prozentsatz an regeneriertem BR.

Zusätzlich zu diesen die Exciton - Theorie unterstützenden Ergebnissen konnte aus den Daten geschlossen werden, dass im Gegensatz zu früher gemachten Aussagen (Blaurock und Stoeckenius, 1971) die Übergangsdipolmomente der Chromophore nicht parallel

zur Fläche der Membran sein können. Diese Voraussage wurde kürzlich durch direkte Messungen bestätigt (Heyn et al., 1977b; Bamberg et al., 1979). Weiterhin zeigte das CD - Spektrum im Bereich von 190 - 250 nm keine signifikanten Änderungen nach Zugabe von Retinal zur Apomembran. Dieser Befund weist darauf hin, dass bei der Regeneration keine Änderung der Sekundärstruktur des Proteins auftritt.

Wegen der starken Abhängigkeit des Exciton - Signals von der Geometrie der Übergangsdipolmomente der Chromophore wird dieser CD - Effekt als empfindliche Probe zum Studium der Proteinbeweglichkeit und des Aggregationszustands des BR verwendet (Cherry et al., 1977; Heyn et al., 1977 a; Dencher und Heyn, 1978).

Chromophor - Chromophor - Wechselwirkungen sind seit langem in der Spektroskopie von Nukleinsäuren und Proteinen bekannt. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen intermolekularen Kopplung von Chromophoren benachbarter Moleküle handelt es sich hier jedoch meist um intramolekulare Wechselwirkungen (z.B. zwischen den Basen der DNA oder den Peptidbindungen im Polypeptid), die zur Hypochromie in der Absorption und zu den charakteristischen Exciton - Banden in der optischen Aktivität führen (Van Holde, 1971; Heyn et al., 1977 a).

5. Experimente zur Frage der Phosphorylierbarkeit des Bacteriorhodopsins

(Zusammenfassung unveröffentlichter Experimente; Zusammenarbeit mit H. Kühn)

5.1. Einleitung

Bei der durch Licht induzierten Phosphorylierung des Sehpigments Rhodopsin wird die entstehende Phosphatgruppe von ATP oder GTP (Adenosin - bzw. Guanosin 5'-triphosphat) in einer langsamen Dunkelreaktion enzymatisch kovalent an Serin und Threonin der Proteinkomponente gebunden (Kühn und Dreyer, 1972). Unter physiologischen Bedingungen konnte man sowohl die Phosphorylierung (Halbwertszeit bei 21° C ca. 2 min) als auch die Dephosphorylierung (Halbwertszeit ca. 13 min) beobachten (Kühn, 1974; Kühn und Bader, 1976). Nicht die an dieser Reaktion beteiligte Rhodopsin - Kinase, sondern nur das Rhodopsin selbst muss durch Licht aktiviert werden (Kühn et al., 1977). Die physiologische Bedeutung der lichtabhängigen Phosphorylierung des Rhodopsins ist zur Zeit noch ungeklärt.

Wegen der strukturellen und möglicherweise funktionellen Ähnlichkeit von Rhodopsin und Bacteriorhodopsin erhebt sich die Frage, ob beim BR ebenfalls eine lichtinduzierte Phosphorylierung stattfindet. Auch bei der energieabhängigen Biogenese der PM aus der "braunen" Membran wurde eine Phosphorylierung des BR in Betracht gezogen (Sumper et al., 1976).

5.2. Material und Methoden

Die im folgenden geschilderten Experimente wurden sowohl mit isolierter PM als auch an lebenden Halobakterien durchgeführt. Bei den in vitro Untersuchungen wurde isolierte und gereinigte PM zusammen mit $AT^{32}P$ und isolierten Stäbchenaussensegmenten (ROS) vom Rind inkubiert (vergl. Kühn und Dreyer, 1972; Kühn et al., 1973).

Bei den in vivo Versuchen wurden Halobakterien des Stammes R_1L_3 aus der stationären Wachstumsphase mit $[^{32}P]$ Phosphat (2 - 10 mCi/100 ml Suspension) für 1 bis 6 Tage im Dunkeln bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Jeweils 20 ml der Bakteriensuspension wurden dann direkt bzw. nach Belichtung zu 300 ml aqua dest. von ca $1^{\circ}C$ gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Dies führte zu einer sofortigen Lysis der Zellen. Die Belichtung erfolgte auch während und nach Zugabe zur Stop-Lösung (Weisslicht bzw. $\lambda > 515\text{ nm}$ von 10-50 mW/cm² für 1 - 6 h; konstante bzw. intermittierende Beleuchtung, 20s Licht/1,5s Dunkel). Um eine enzymatische Dephosphorylierung zu unterbinden, wurde in den meisten Experimenten bekannte Phosphatase - Hemmstoffe (10 mmol/l Maleinsäure, 10 - 1000 mmol/l NaF, 50 mmol/l KJ, 500 mmol/l LiCl, 20 mmol/l EDTA, 20 mmol/l Jodacetat, 10 mmol/l Alloxan, 100 mmol/l NaAsO₄, 10 mmol/l Phosphat) der Stop - Lösung und/oder der Bakteriensuspension zugefügt. In einigen Fällen wurden die Zellen auch in kochendem Wasser lysiert. Die Isolierung der PM erfolgte danach wie an anderer Stelle beschrieben (Dencher, 1974 a; Bauer et al., 1976). Die isolierte PM bzw. die restlichen Bestandteile der Zelle wurden einer SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese unterworfen (Methode s. Dencher, 1974 a). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt und/oder die gefrorenen Gele bei $-20^{\circ}C$ mit einem Röntgenfilm autoradiographiert (5 - 14 Tage).

Zur Untersuchung der Biogenese der PM wurden Nikotinzellen (s. Kapitel 1) mit anorganischem ^{32}P inkubiert und danach in Ab- oder Anwesenheit von Energiequellen (Licht und/oder Pepton) mit all-trans Retinal regeneriert (s. Abschn. 1.2.2.). Die weitere Behandlung der isolierten PM erfolgte wie oben beschrieben.

5.3. Ergebnisse und Diskussion

1. In den in vitro Untersuchungen konnte keine Phosphorylierung des BR beobachtet werden. Der Phosphorylierungsgrad von ROS ist unabhängig davon, ob das verwendete AT ^{32}P vorher (für 20 min) mit PM inkubiert wurde. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass BR keine ATP-ase Aktivität besitzt.

2. In mehr als 70 in vivo Versuchsansätzen unter verschiedenen Bedingungen konnte weder eine lichtinduzierte noch eine im Dunkeln stattfindende Phosphorylierung des BR nachgewiesen werden.

Bei Anwesenheit von NaF (> 50 mmol/l) in der Stop - Lösung erschien eine Anzahl von ^{32}P - markierten Banden auf den SDS-Gelen. Die am stärksten markierte Bande hatte ungefähr die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie BR, die übrigen Banden eine geringere Beweglichkeit. Diese phosphorylierten Banden traten sowohl in belichteten wie auch unbelichteten Proben auf. Kontrollexperimente zeigten aber, dass es sich dabei nicht um BR, sondern um Proteine anderer Zellbestandteile handelt. Die Behandlung mit NaF führte zu einer starken Verklumpung der Zellbestandteile, so dass die PM nicht in reiner Form zu isolieren war.

Da keine Netto- Phosphorylierung des BR festgestellt werden konnte, wäre an eine rasch ablaufende Dephosphorylierung zu denken. Der Photozyklus des BR läuft in intakten Zellen ca. 10 mal, in der PM sogar ca. 100 mal pro Sekunde ab (Kapitel 2), daher ist ein so schneller Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsmechanismus nur schwer vorstellbar.

3. Unter den in Abschnitt 5.2. beschriebenen Bedingungen konnte auch bei der Biogenese der PM eine Phosphorylierung des BR nicht nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

- Adler, J. (1975), Chemotaxis in bacteria. *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 341-356.
- Bamberg, E., Appell, H.-J., Dencher, N.A., Sperling, W., Stieve, H. and Lugger, P. (1979), Photocurrents generated by bacteriorhodopsin in planar bilayer membranes. *Biophys. Struct. Mech.*, 5, 277 - 292.
- Bauer, P.J., Dencher, N.A. and Heyn, M.P. (1976), Evidence for chromophore-chromophore interactions in the purple membrane from reconstitution experiments of the chromophore-free membrane. *Biophys. Struct. Mech.*, 2, 79-92.
- Becher, B.M., Cassim, J.Y. (1975), Effects of light perturbation on the circular dichroism of purple membrane from H.h. *Abstr. 19th Ann. Meeting Biophys. Soc.* W-PM-F3.
- Belyakova, T.N., Glagolev, A.N. and Skulachev (1976), Electrochemical gradient of H^+ ions as a direct source of energy during bacterial locomotion. *Biochemistry*, 41, 1206-1209.
- Berg, H.C. (1975), Chemotaxis in bacteria. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 4, 119-136.
- Blaurock, A.E. and Stoeckenius, W. (1971), Structure of the purple membrane. *Nature New Biol.*, 233, 152-155.
- Bridgen, J. and Walker, I.D. (1976), Photoreceptor protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. Molecular weight and retinal binding site. *Biochemistry*, 15, 792-798.
- Cherry, R.J., Muller, U., Henderson, R. and Heyn, M.P. (1978), Temperature-dependent aggregation of bacteriorhodopsin in dipalmitoyl- and dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.*, 121,

283-298.

Cone, R. A. (1972), Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane. *Nature New Biol.*, 236, 39-43.

Danon, A. and Caplan, S. R. (1976), Stimulation of ATP synthesis in *Halobacterium halobium* R_1 , by light-induced or artificially created proton electrochemical potential gradients across the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 423, 133-140.

Danon, A. and Stoeckenius, W. (1974), Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71, 1234-1238.

Dencher, N. (1974a), Photophobische Reaktion von *Halobacterium halobium* R_1 und ihre Beziehung zur Purpurmembran. Diplomarbeit, Aachen/Jülich.

Dencher, N. (1974b), Functions of bacteriorhodopsin. In: *Biochemistry of Sensory Functions*, (Jaenicke, L., ed.), pp. 161-163. Springer-Verlag.

Dencher, N. A. (1978), Light-induced behavioural reactions of *Halobacterium halobium*: evidence for two rhodopsins acting as photopigments. In: *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*, (Caplan, S. R. and Ginzburg, M., eds.), pp. 67-88. Elsevier/North-Holland Bio-medical Press.

Dencher, N. A., Carl, P. and Sperling, W. (1976a), Isomeric configuration of retinal in bacteriorhodopsin from *Halobacterium halobium*. Tenth Intern. Congress of Biochemistry, Hamburg (FRG), July 25-31, Abstract 05-1-317.

- Dencher, N.A., Kohl., K.D., Rafferty, Ch.N. and Sperling, W. (1978), Photoisomerization of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 21, 73a.
- Dencher, N.A. and Heyn, M.P. (1978), Formation and properties of bacteriorhodopsin monomers in the non-ionic detergents octyl- β -D-glucoside and Triton X-100. *FEBS Lett.*, 96, 322-326.
- Dencher, N.A., Rafferty, Ch.N. and Sperling, W. (1976b), 13-cis and trans bacteriorhodopsin: photochemistry and dark equilibrium. *Berichte der Kernforschungsanlage Jülich Jül-1374*, 1-42.
- Dencher, N. and Wilms, M. (1975), Flash photometric experiments on the photochemical cycle of bacteriorhodopsin. *Biophys. Struct. Mech.*, 1, 259-271.
- Diehn, B., Feinleib, M., Haupt, W., Hildebrand, E., Lenci, F. and Nultsch, W. (1977), Terminology of behavioral responses of motile microorganisms. *Photochem. Photobiol.*, 26, 559-560.
- Engelmann, Th.W. (1882), Ueber Licht- und Farbenperception niederster Organismen. E. Pflüger, *Archiv f. Physiologie*, Bd. XXIX, 387-400.
- Engelmann, Th.W. (1883), Bacterium photometricum. E. Pflüger, *Archiv f. Physiologie*, Bd. XXX, 95-124.
- Hamdorf, K., Paulsen, R. and Schwemer, J. (1973), Photoregeneration and sensitivity control of photoreceptors of invertebrates. In: *Biochemistry and Physiology of Visual Pigments*, (Langer, H., ed.), pp. 155-166.
- Henderson, R. (1977), The purple membrane from *Halobacterium halobium*. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 6, 87-110.
- Henderson, R. and Unwin, P.N.T. (1975), Three dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, 257, 28-32.

- Heyn, M. P., Bauer, P. J. and Dencher, N. A. (1975), A natural CD label to probe the structure of the purple membrane from *Halobacterium halobium* by means of exciton coupling effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 67, 897-903.
- Heyn, M. P., Bauer, P. -J. and Dencher, N. A. (1977a), Protein-protein interactions in the purple membrane. In: *Biochemistry of Membrane Transport*, (Semenza, G. and Carafoli, E., eds.), pp. 96-104, Springer-Verlag Berlin.
- Heyn, M. P., Cherry, R. J. and Müller, U. (1977b), Transient and linear dichroism studies on bacteriorhodopsin: determination of the orientation of the 568 nm all-trans retinal chromophore. *J. Mol. Biol.*, 117, 607-620.
- Hildebrand, E. (1977), What does *Halobacterium* tell us about photoreception? *Biophys. Struct. Mech.*, 3, 69-77.
- Hildebrand, E. and Dencher, N. (1974), Photophobische Reaktionen von *Halobacterium halobium* und ihre Beziehung zum Retinal-Protein-Komplex der Zellmembran. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 87, 93-99.
- Hildebrand, E. and Dencher N. (1975), Two photosystems controlling behavioural responses of *Halobacterium halobium*. *Nature*, 257, 46-48.
- van Holde, K. E. (1971), *Physical Biochemistry*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Honig, B., Greenberg, A. D., Dinur, U. and Ebrey, Th. G. (1976), Visual-pigment spectra: Implications of the protonation of the retinal Schiff base. *Biochemistry*, 15, 4593-4599.
- Houwink, A. L. (1956), Flagella, gas vacuoles and cell wall structure in *Halobacterium halobium*. *J. Gen. Microbiol.*, 15, 146-150.

- Howes, C.D. and Batra, P.P. (1970), Accumulation of lycopene and inhibition of cyclic carotenoids in *Mycobacterium* in the presence of nicotine. *Biochim. Biophys. Acta*, 222, 174-179.
- Jan, L.Y. (1975), The isomeric configuration of the bacteriorhodopsin chromophore. *Vision Res.*, 15, 1081-1086.
- Keefer, L.M. and Bradshaw, R.A. (1977), Structural studies on *Halobacterium halobium* bacteriorhodopsin. *Fed. Proc.*, 36, 1799-1804.
- Keen, M.E. and Dencher, N.A. (1976), Kinetic measurements for the regeneration of pigments from bacteriorhodopsin-apoprotein and 13-cis and all-trans retinal and for the reactions of the dark equilibrium. EMBO-workshop on transduction mechanism of photoreceptors, October 4-8, Jülich/Germany, Abstract p. 64.
- Kelly, M., Norgard, S. and Liaaen-Jensen, S. (1970), Bacterial Carotenoids. XXXI. C₅₀-carotenoids 5. Carotenoids of *Halobacterium salinarum*, especially bacterioruberin. *Acta chem. scand.*, 24, 2169-2182.
- Kirschfeld, K. and Franceschini, N. (1977), Photostable pigments within the membrane of photoreceptors and their possible role. *Biophys. Struct. Mech.*, 3, 191-194.
- Krieg, N.R., Tomelty, J.P. and Wels, J.S. (1967), Inhibition of flagellar coordination in *Spirillum volutans*. *J. Bact.*, 94, 1431-1436.
- Kühn, H. (1974), Light-dependent phosphorylation of rhodopsin in living frogs. *Nature*, 250, 588-590.
- Kühn, H. and Bader, S. (1976), The rate of rhodopsin phosphorylation in isolated retinas of frog and cattle. *Biochim. Biophys. Acta*, 428, 13-18.

- Kühn, H., Cook, J.H. and Dreyer, W.J. (1973), Phosphorylation of rhodopsin in bovine photoreceptor membranes. A dark reaction after illumination. *Biochemistry*, 12, 2495-2502.
- Kühn, H. and Dreyer, W.J. (1972), Light dependent phosphorylation of rhodopsin by ATP, *FEBS Lett.*, 20, 1-6.
- Kühn, H., McDowell, J.H., Leser, K.-H. and Bader, S. (1977), Phosphorylation of rhodopsin as a possible mechanism of adaptation. *Biophys. Struct. Mech.*, 3, 175-180.
- Kühne, W. (1878), *Untersuch. Physiol. Inst. Univ. Heidelberg*, 1, 1-6.
- Kühne, W. (1882), *Untersuch. Physiol. Inst. Univ. Heidelberg*, 2
- Lanyi, J.K. (1973), Influence of electron transport on the interaction between membrane lipids and Triton X-100 in *Halobacterium cutirubrum*. *Biochemistry*, 12, 1433-1438.
- Lanyi, J.K. and MacDonald, R.E. (1976), Existence of electrogenic hydrogen ion/sodium ion antiport in *Halobacterium halobium* cell envelope vesicles. *Biochemistry*, 15, 4608-4613.
- Lanyi, J.K., Yearwood-Drayton, V. and MacDonald, R.E. (1976), Light-induced glutamate transport in *Halobacterium halobium* envelope vesicles. I. Kinetics of the light-dependent and the sodium-gradient-dependent uptake. *Biochemistry*, 15, 1595-1602.
- Lehninger, A.L. (1970), *Biochemistry*, Worth Publishers, Inc., New York.
- Lewis, A., Spoonhower, J., Bogomolni, A., Lozier, R., Stoëckenius, W. (1974), Tunable Laser resonance Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 4462-4466.

- Lozier, R.H., Bogomolni, R.A. and Stoeckenius, W. (1975), Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.*, 15, 955-962.
- Lozier, R.H. and Niederberger, W. (1977), The photochemical cycle of bacteriorhodopsin. *Fed. Proc.*, 36, 1805-1809.
- Maeda, A., Iwasa, T. and Yoshizawa, T. (1977), Isomeric composition of retinal chromophore in dark-adapted bacteriorhodopsin. *J. Biochem. Tokyo*, 82, 1599-1604.
- Mahler, H.R. and Cordes, E.H. (1971), *Biological Chemistry*, Harper and Row Publishers.
- Manson, M.D., Tedesco, P., Berg, H.C., Harold, F.M. and van der Drift, C. (1977), A protonmotive force drives bacterial flagella. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 3060-3064.
- Miller, J.B. and Koshland, Jr., D.E. (1977), Sensory electrophysiology of bacteria: Relationship of the membrane potential to motility and chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 4752-4756.
- Mitchell, P. (1966), Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev.*, 41, 445-502.
- Norrish, R.G.W. and Porter, G. (1949), Chemical reactions produced by very high light intensities. *Nature*, 164, 658.
- Oesterhelt, D. (1976), Isoprenoids and bacteriorhodopsin in halobacteria. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 4, pp. 133-166, Springer-Verlag.

- Oesterhelt, D. and Hess, B. (1973), Reversible photolysis of the purple complex in the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem.*, 37, 316-326.
- Oesterhelt, D., Meentzen, M. and Schuhmann, L. (1973), Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophores. *Eur. J. Biochem.*, 40, 453-463.
- Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1971), Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature New Biol.*, 233, 149-152.
- Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1973), Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 2853-2857.
- Ovchinnikov, Yu. A., Abdulaev, N. G., Feigina, M. Yu., Kiselev, A. V., Lobanov, N. S. and Nasimov, I. V. (1978), The amino acid sequence of bacteriorhodopsin. *Bioorg. Khim.*, 4, 1573- .
- Pettie, M. J., Yudd, A. P., Nakanishi, K., Henselman, R. and Stoeckenius, W. (1977), Identification of retinal isomers isolated from bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 16, 1955-1958.
- Poo, M. -M. and Cone, R. A. (1973), Lateral diffusion of rhodopsin in necturus rods. *Exp. Eye Res.*, 17, 503-510.
- Rafferty, Ch. N., Cassim, J. Y. and McConnell, D. G. (1977), Circular dichroism, optical rotatory dispersion, and absorption studies on the conformation of bovine rhodopsin in situ and solubilized with detergent. *Biophys. Struct Mech.*, 2, 277-320.
- Razi Naqvi, K., Gonzalez-Rodriguez, J., Cherry, R. J. and Chapman, D. (1973), Spectroscopic technique for studying protein rotation in mem-

- branes. *Nature New Biol.*, 245, 249-251.
- Rotmans, J.P., Bonting, S.L. and Daemen, F.J.M. (1972), On the chromophoric group of rhodopsin. *Vision Res.*, 12, 337-341.
- Schimz, A. and Hildebrand, E. (1978), Response of *Halobacterium halobium* to chemical stimuli. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 359, 1143-1144.
- Sperling, W., Carl, P., Rafferty, Ch.N. and Dencher, N.A. (1977), Photochemistry and dark equilibrium of retinal isomers and bacteriorhodopsin isomers. *Biophys. Struct. Mech.*, 3, 79-94.
- Sperling, W., Rafferty, Ch.N., Kohl, K.-D. and Dencher, N.A. (1978), Effect of light on the isomer composition of bacteriorhodopsin in the purple membrane of *Halobacterium halobium*. In: *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*, (Caplan, S.R. and Ginzburg, M., eds.), pp. 323-330. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Sperling, W., Rafferty, C.N., Kohl, K.-D. and Dencher, N.A. (1979), Isomeric composition of bacteriorhodopsin under different environmental light conditions. *FEBS Lett.*, 97, 129-132.
- Stieve, H. (1977), Thoughts on the comparative biology of photosensory function. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, 1-25.
- Sumper, M. and Herrmann, G. (1976), Biogenesis of purple membrane: regulation of bacterio-opsin synthesis. *FEBS Lett.*, 69, 149-152.
- Sumper, M., Reitmeier, H. and Oesterhelt, D. (1976), Biosynthesis of the purple membrane of *Halobacteria*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 15, 187-193.
- Wagner, G., Hartmann, R. and Oesterhelt, D. (1978), Potassium uniport and ATP synthesis in *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem.*, 89, 169-180.

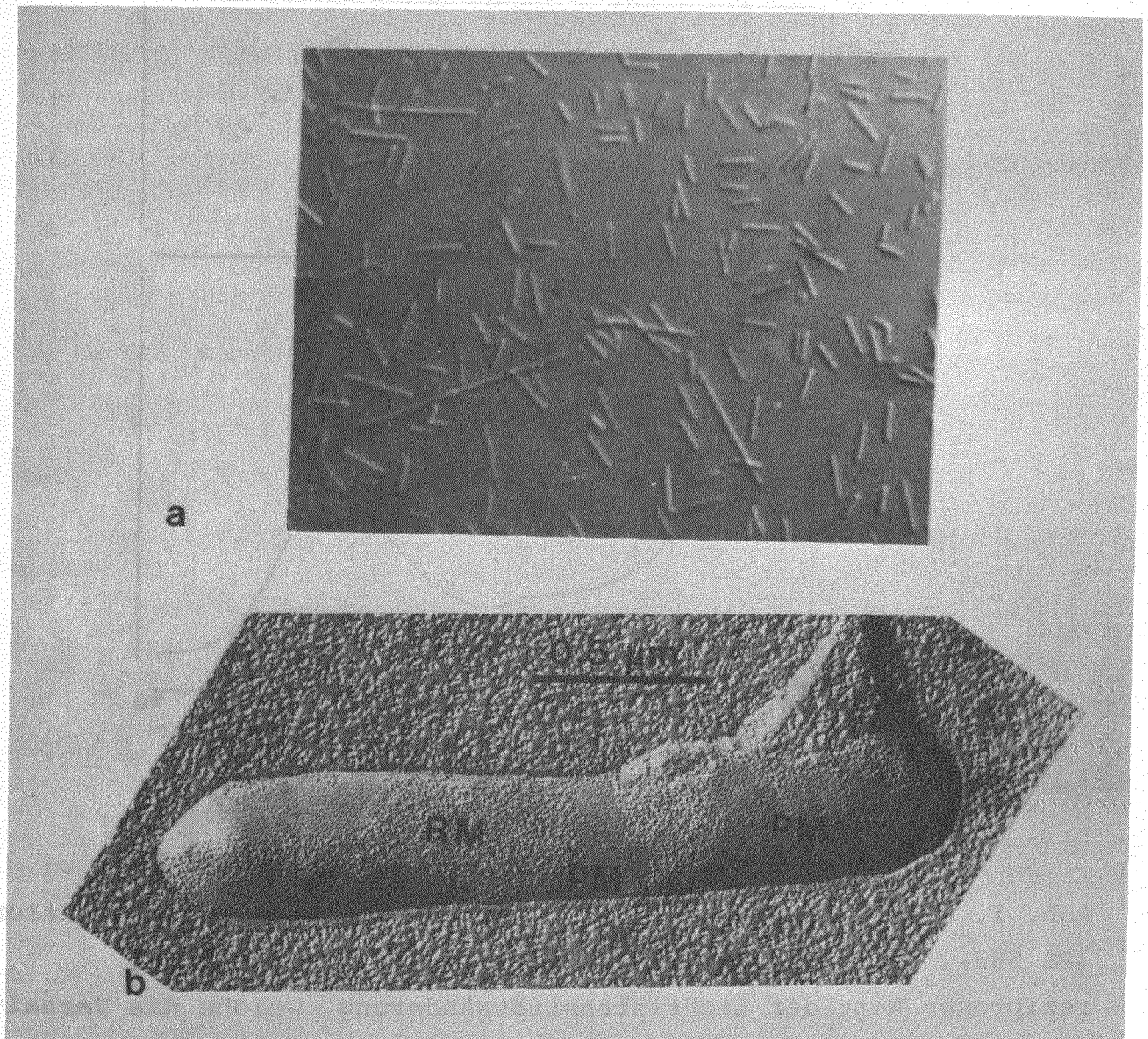


Abb. 1. *Halobacterium halobium* in der stationären Wachstumsphase.
a, Lichtmikroskopische Aufnahme lebender Zellen: x ca. 2400.
b, Elektronenmikroskopische Aufnahme eines gefriergebrochenen Bakteriums. Purpurmembra (PM) ist von "roter Membran" (RM) umgeben. Die PF-Fläche (plasmatic fracture face) ist sichtbar.
(b, Original E. Uebags, INB, KFA Jülich.)

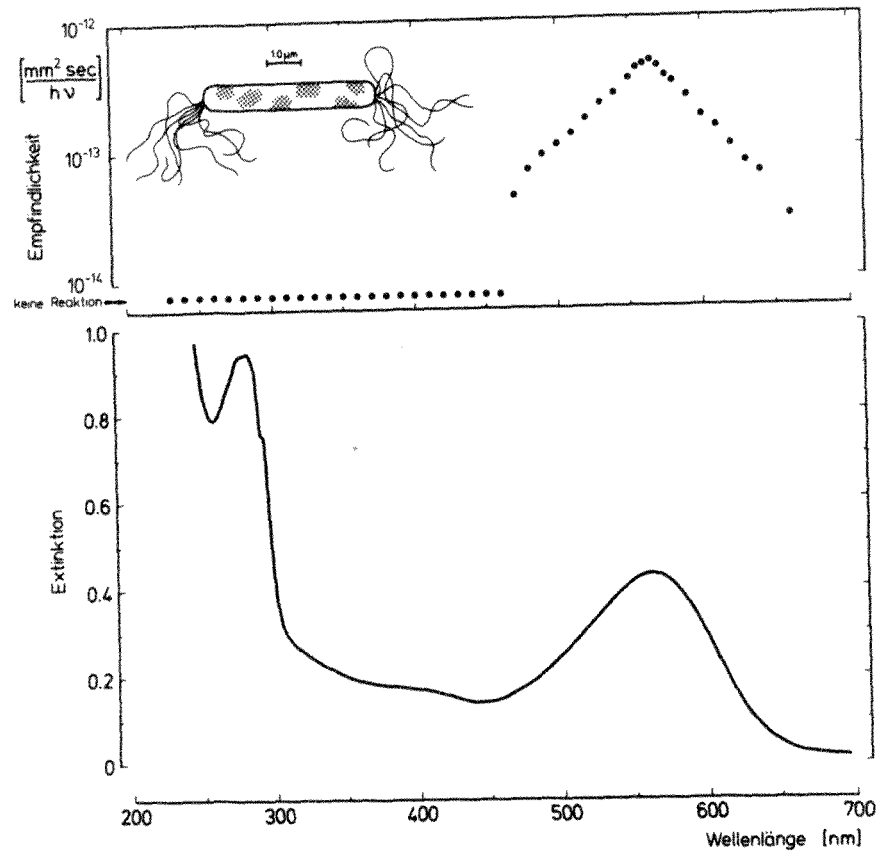


Abb. 2. a, Aktionsspektrum der inversen photophobischen Reaktion (PS 565). Ordinate: Empfindlichkeit in log. Darstellung; reziproker Wert der Lichtintensitätsänderung, welche die Verhaltensreaktion mit einer Latenzzeit von 1,9 - 2,0 s auslöst. Hintergrundlicht: $\lambda = 420 - 490$ nm. Temperatur: $26^{\circ}C$.
b, Absorptionsspektrum der isolierten Purpurmembraan in H_2O . (Hildebrand und Dencher, 1975)

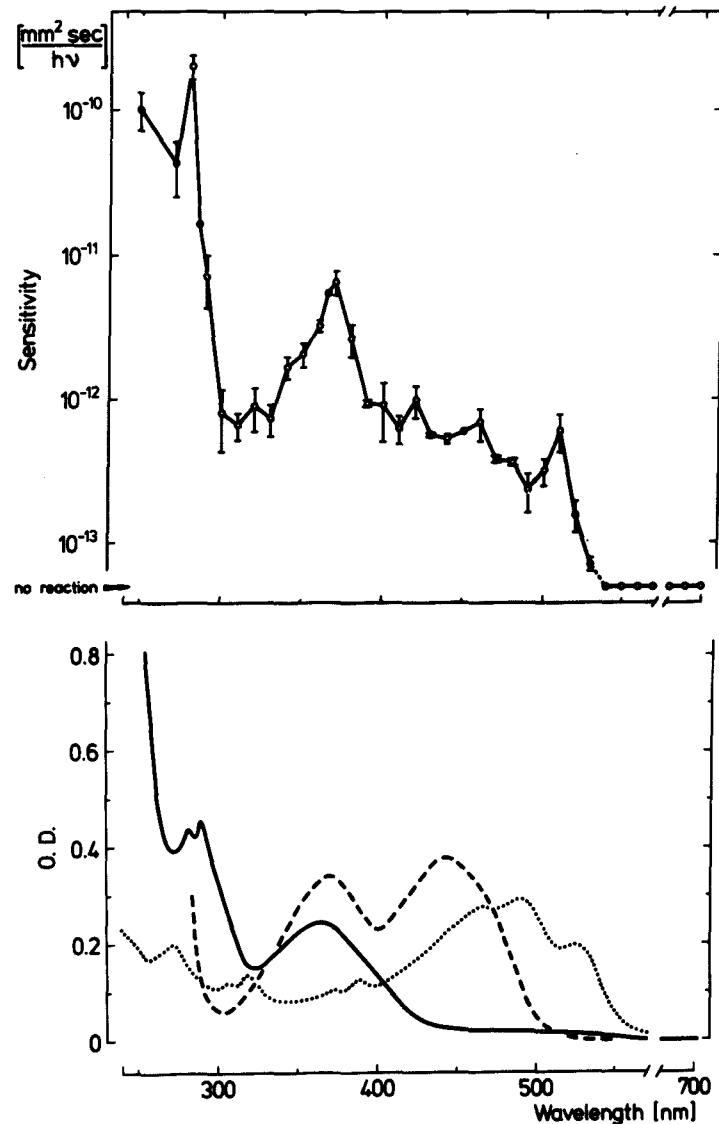


Abb. 3. Aktionsspektrum der direkten photophobischen Reaktion (PS 370). Ordinate: Empfindlichkeit wie in Abb. 2a. o, Mittelwert aus drei bis sieben Einzelmessungen mit Standardabweichungen; ●, Einzelmessung bzw. Mittelwert aus zwei Messungen. Hintergrundlicht: $\lambda > 645 \text{ nm}$. Temperatur: 26°C . b, Absorptionsspektren von mit dem Detergenz CTAB bei $\text{pH} \approx 8,5$ behandelte Purpurmembra (—), von Riboflavin in H_2O (----) und von aus H.h. R₁ extrahierten Carotinoiden (.....). (Hildebrand und Dencher, 1975)

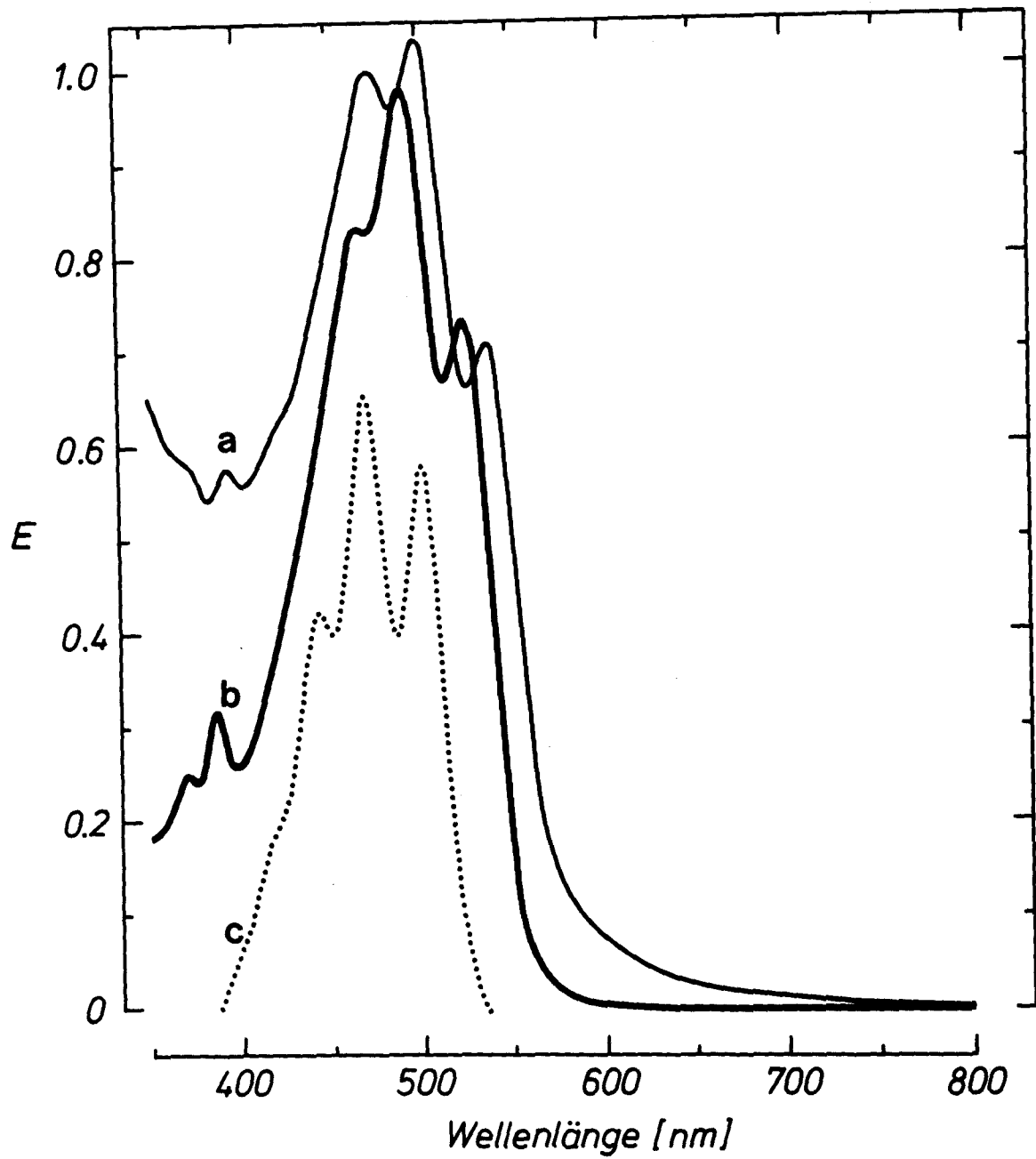


Abb. 4. Absorptionsspektren von Carotinoiden aus *Halobacterium h.R₁*.
Wässriger Überstand nach Abtrennung der Purpurmembran (a),
extrahierte Carotinoide in Äthanol (b),
und nichtextrahierbare Pigmente der Membranfraktion (c).

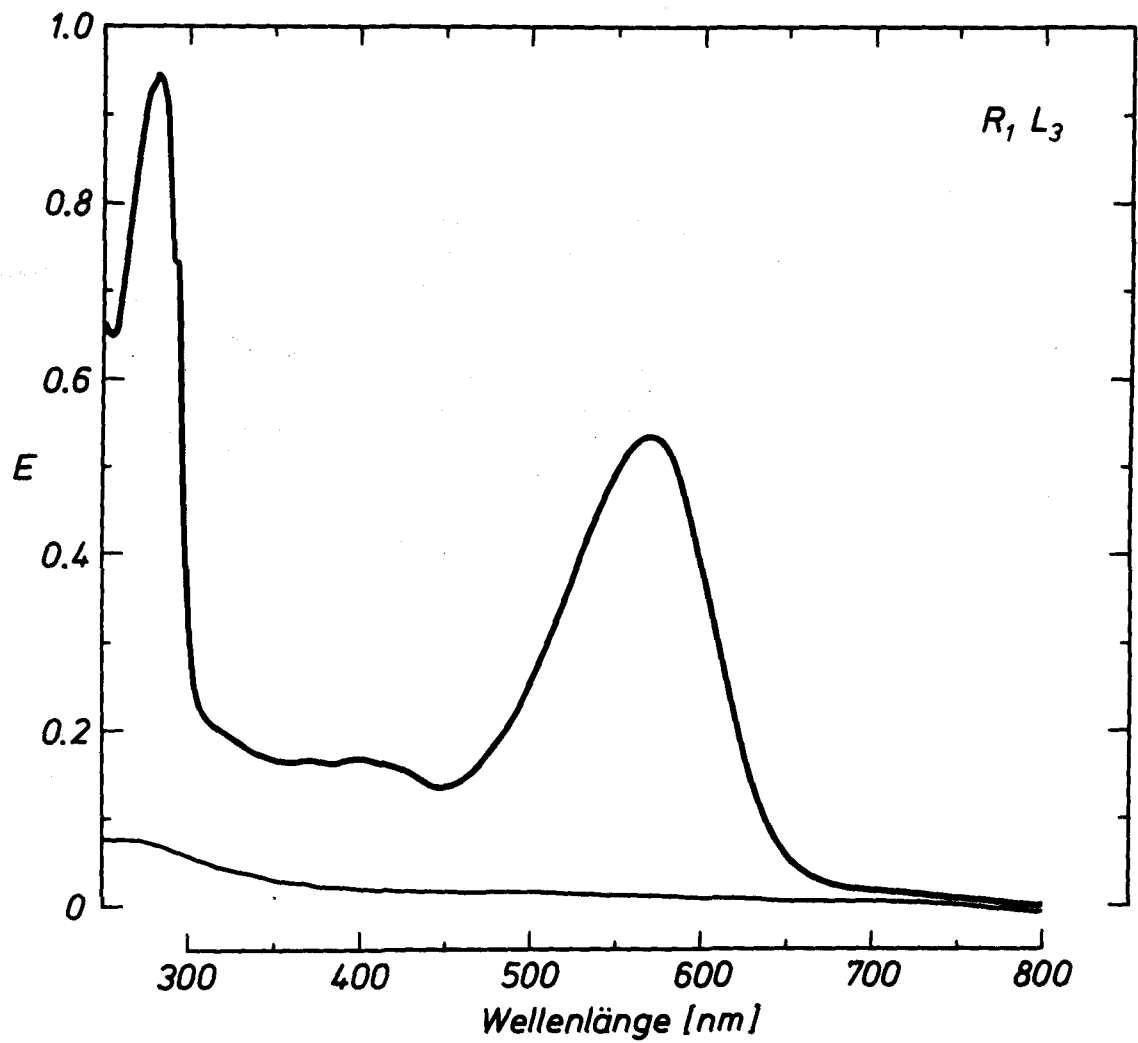


Abb. 5. Absorptionsspektrum der isolierten lichtadaptierten
Purpurmembran von *H.h. R₁L₃* in H_2O .

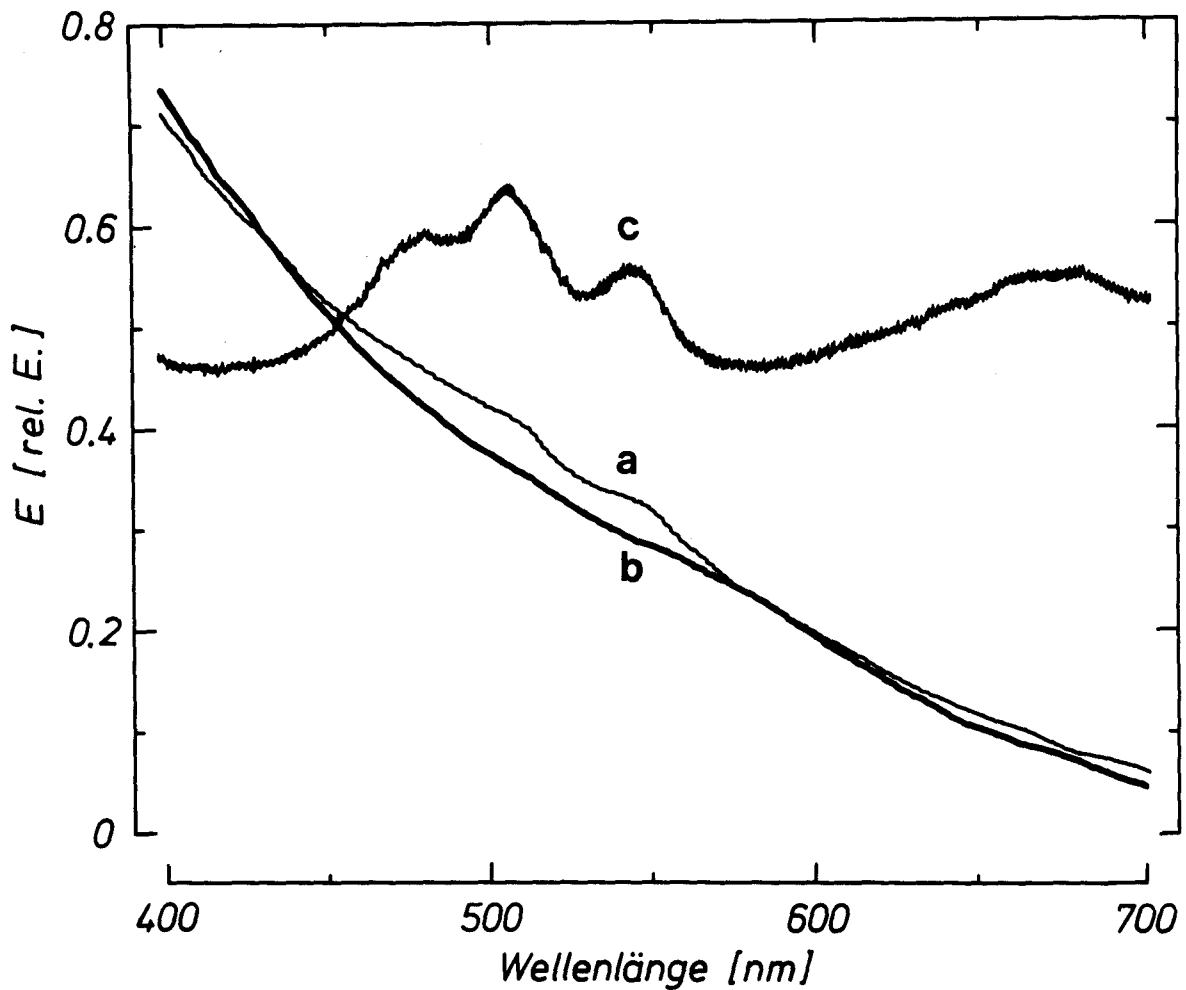


Abb. 6. Absorptionsspektren von intakten Halobacterien.
a, H.h. R_1 ; b, H.h. R_1L_3 ; c, Differenzspektrum a-b.
Optische Weglänge: 5 mm. Der Photomultiplier wurde unmittelbar hinter die Messzellen plaziert um die Lichtstreuungsartefakte zu reduzieren. Als Referenz für die Spektren a und b diente Nährlösung. Das Differenzspektrum wurde mit fünffacher Empfindlichkeit gemessen.

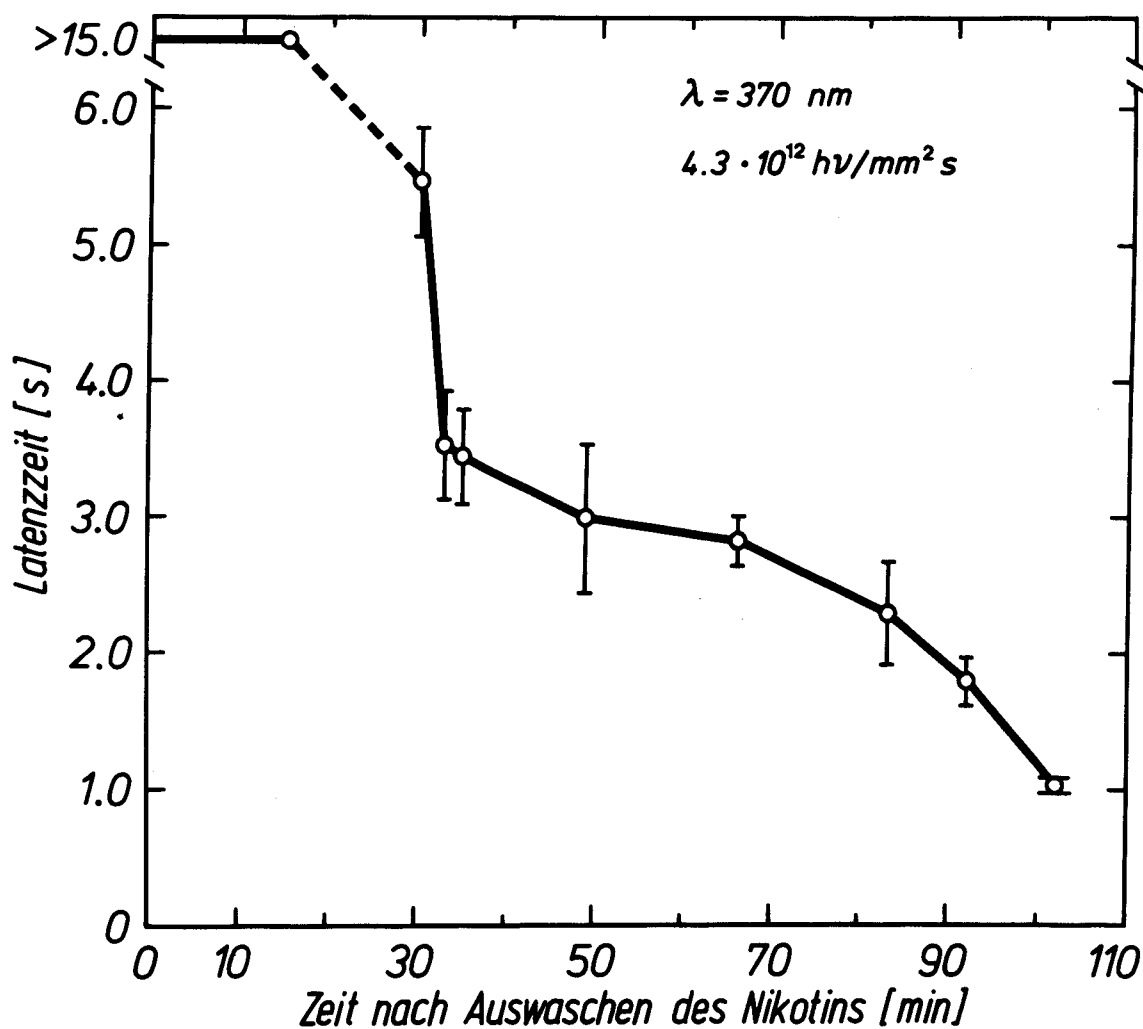


Abb. 7. Empfindlichkeitszunahme des PS 370 (DPR) in Nikotinzellen nach Entfernung des Alkaloids.

Ordinate: Latenzzeit zwischen Reizbeginn ($4,3 \cdot 10^{12} \text{ h}\nu \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\lambda = 370 \text{ nm}$) und Stopreaktion der Bakterien. Temperatur: 38°C . Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 - 8 Messungen.

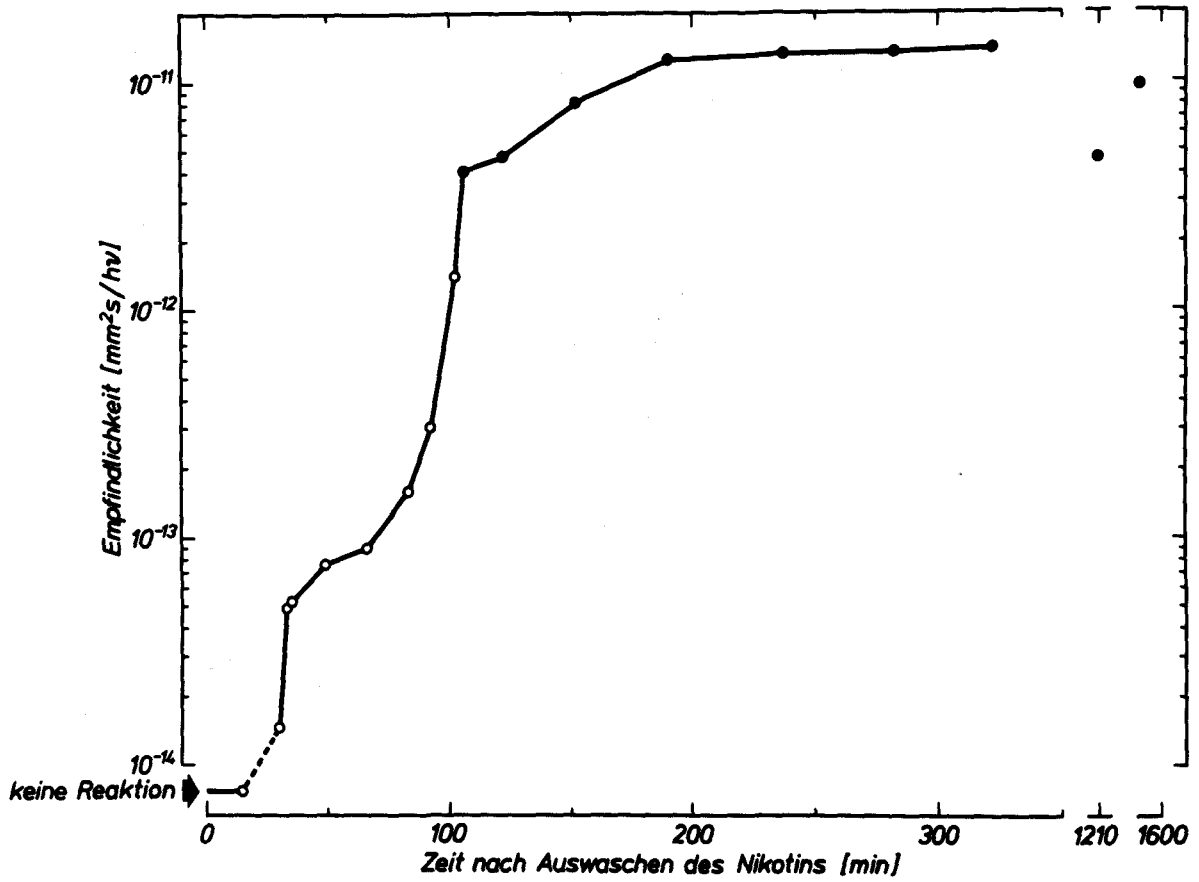


Abb. 8. Empfindlichkeitszunahme des PS 370 (DPR) in Nikotinzellen nach Entfernung des Alkaloids.

Ordinate: Empfindlichkeit wie in Abb. 2a. o, Messpunkte der Abb. 7 umgerechnet mit Hilfe der Daten von Abb. 12.

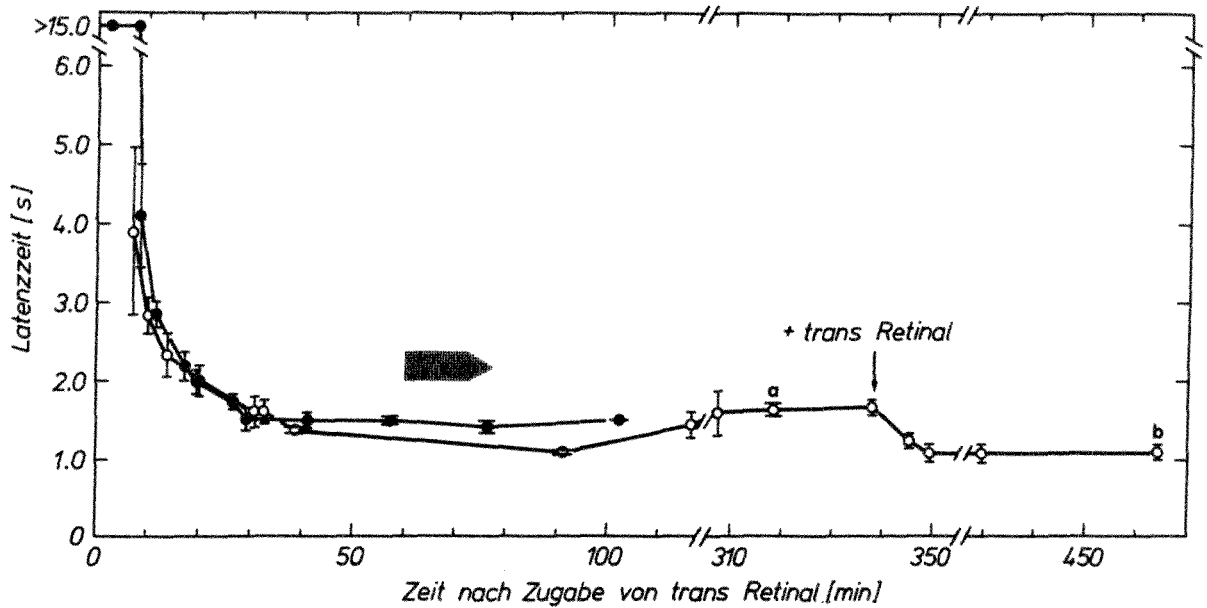


Abb. 9. Regenerationskinetik des PS 370 in Nikotinzellen nach Zugabe von all-trans Retinal.

Ordinate: Latenzzeit zwischen Reizbeginn ($4,7 \cdot 10^{11} \text{ h}\nu \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\lambda = 370 \text{ nm}$) und Stopreaktion der Bakterien. Unterschiedliche Symbole verdeutlichen zwei Messreihen. Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 - 14 Einzelmessungen. Zum Zeitpunkt 0 und nach 340 min wurde all-trans Retinal zur Zellsuspension gegeben (Endkonzentration: $1,8 \cdot 10^{-6}$ bzw. $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$).

Der Pfeil überstreicht den Zeitbereich des ersten Auftretens der IPR (PS 565). Reizlicht: $1,5 \cdot 10^{13} \text{ h}\nu \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\lambda = 565 \text{ nm}$.

Temperatur: 32°C .

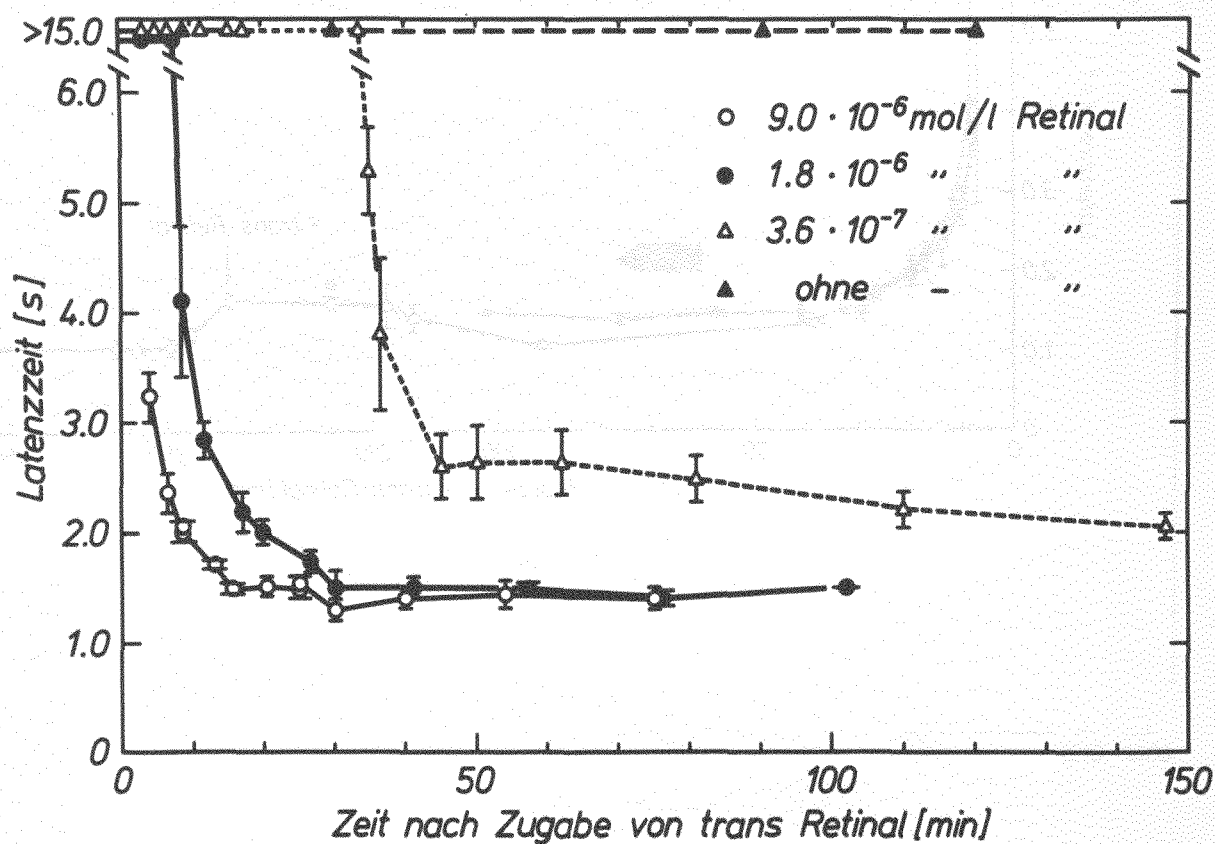


Abb. 10. Abhängigkeit der Regenerationskinetik des PS 370 von der Konzentration des all-trans Retinals.

Ordinate wie in Abb. 9. Temperatur: 32°C.

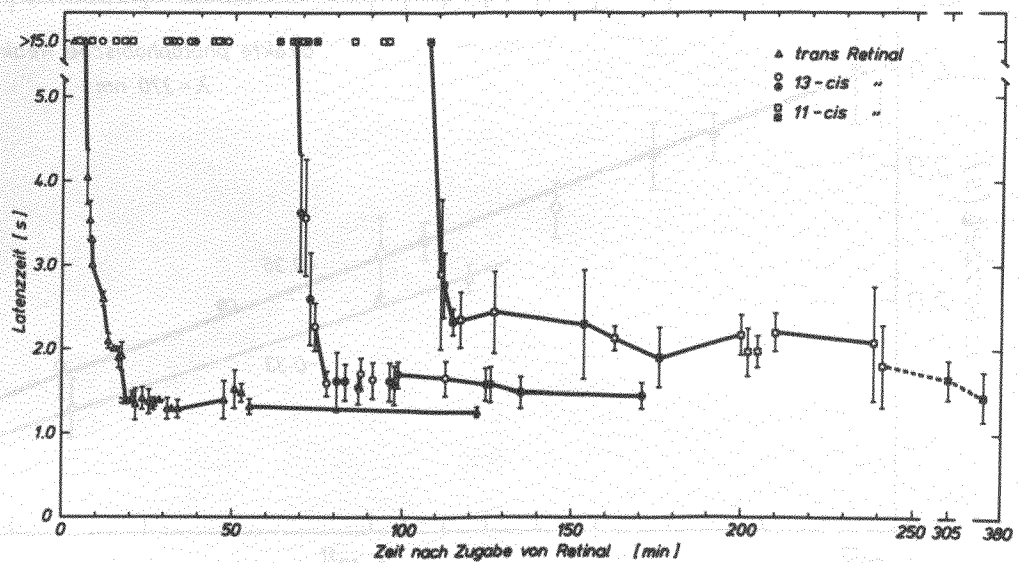


Abb. 11. Abhängigkeit der Regenerationskinetik des PS 370 vom Retinalisomer.

Ordinate wie in Abb. 9, jedoch $8 \cdot 10^{11} \text{ h}\nu \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\lambda = 370 \text{ nm}$. Zugabe von all-trans, 13-cis und 11-cis Retinal; Endkonzentration: $1,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$. Offene und ausgefüllte Symbole representieren unterschiedliche Meßserien ($n = 4 - 12$). Temperatur: 38°C .

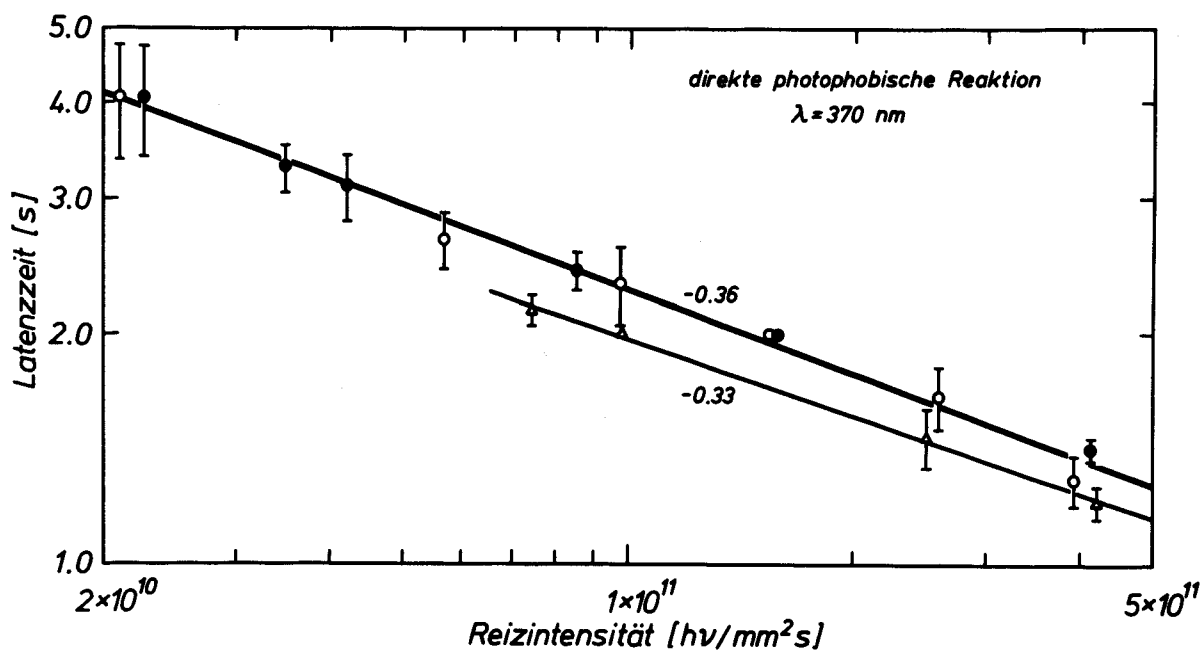


Abb. 12. Abhängigkeit der Latenzzeit der DPR (PS 370) von der Reizintensität.

Nikotinzellen wurden mit all-trans Retinal (Endkonzentration: $1,8 \cdot 10^{-6}$ mol/l) regeneriert. Hintergrundlicht: $\lambda > 645$ nm. Temperatur: 32°C . Messpunkte mit Fehlerbalken representieren Mittelwerte und Standardabweichungen von 13 - 20 Einzelmessungen; bei den Messpunkten ohne Fehlerbalken wurde die Schwellenintensität (Latenzzeit 2,0 s) bestimmt. Erklärung der Symbole, s. Abschn. 1.3.5. Die Gerade wurde mit Hilfe der linearen Regression berechnet.

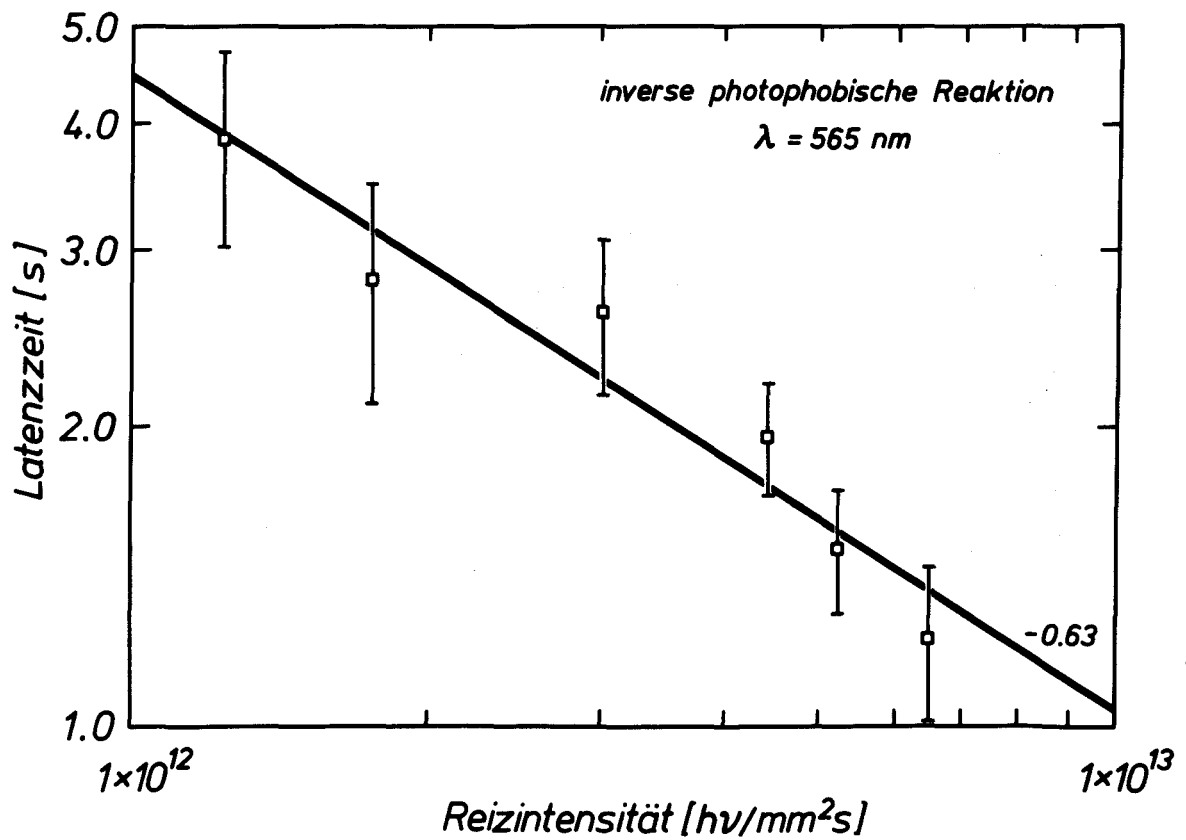


Abb. 13. Abhängigkeit der Latenzzeit der IPR (PS 565) von der Reizintensität.

H.h. R_1 . Hintergrundlicht: $\lambda = 420 - 490 \text{ nm}$. Temperatur: 26°C .
 $n = 20$. (Umgezeichnet nach Dencher, 1974a)

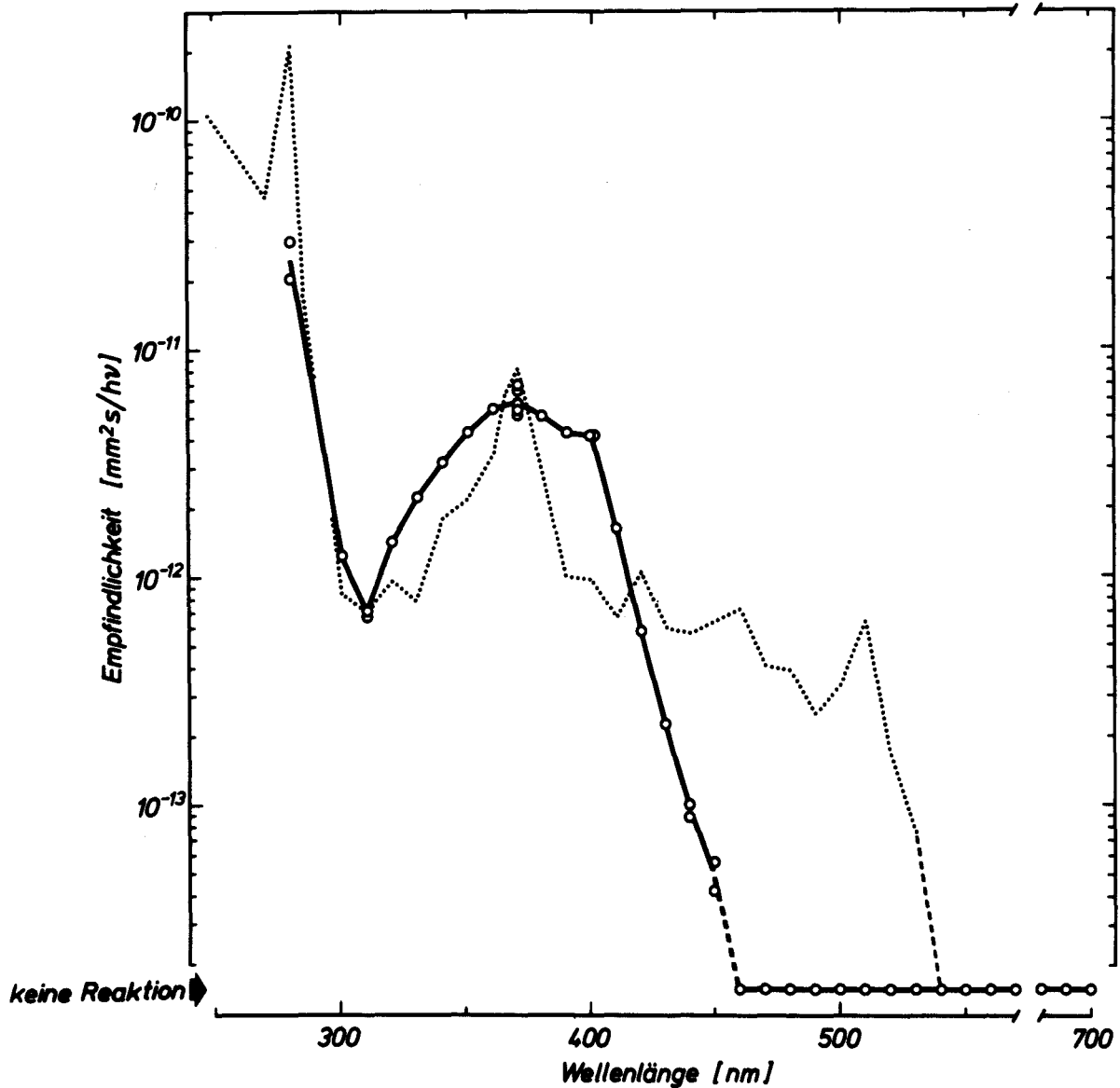


Abb. 14. Aktionsspektrum der DPR (PS 370) nach Regeneration von Nikotinzellen mit all-trans Retinal.

Ordinate wie in Abb. 2a. Hintergrundlicht: $\lambda > 645$ nm. Das an Carotinoid-reichen R_1 Zellen gemessene Aktionsspektrum (.....) wurde als Vergleich von Hildebrand und Dencher (1975) übernommen.

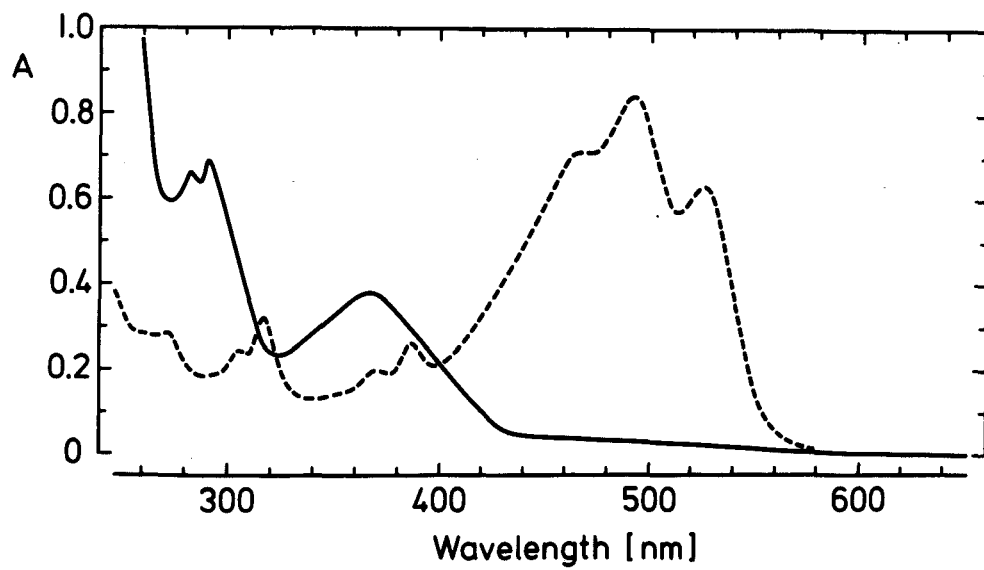


Abb. 15. Absorptionsspektren eines Retinylidenproteins, erhalten nach Behandlung der Purpurmembraan mit dem Detergenz CTAB (10 mmol/l, pH $\approx$ 8,5) (—————) und der aus H.h., Stamm R₁ extrahierten Carotinoide in Äthanol (-----).

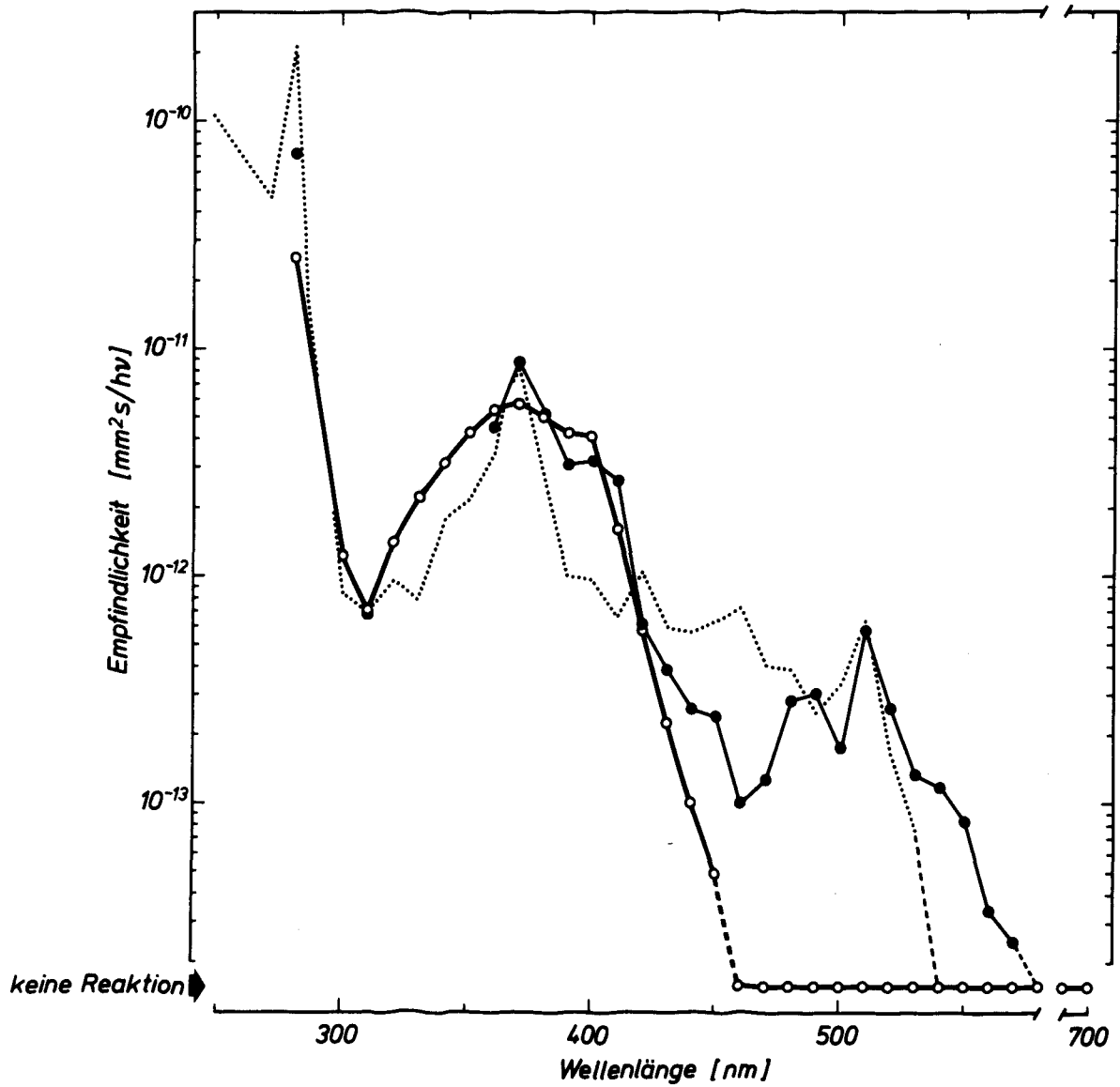


Abb. 16. Aktionsspektrum der DPR (PS 370) nach Regeneration von Nikotinzellen mit all-trans Retinal und Carotinoiden (●). Erklärung der beiden weiteren Spektren und übrige Angaben, s. Abb. 14.

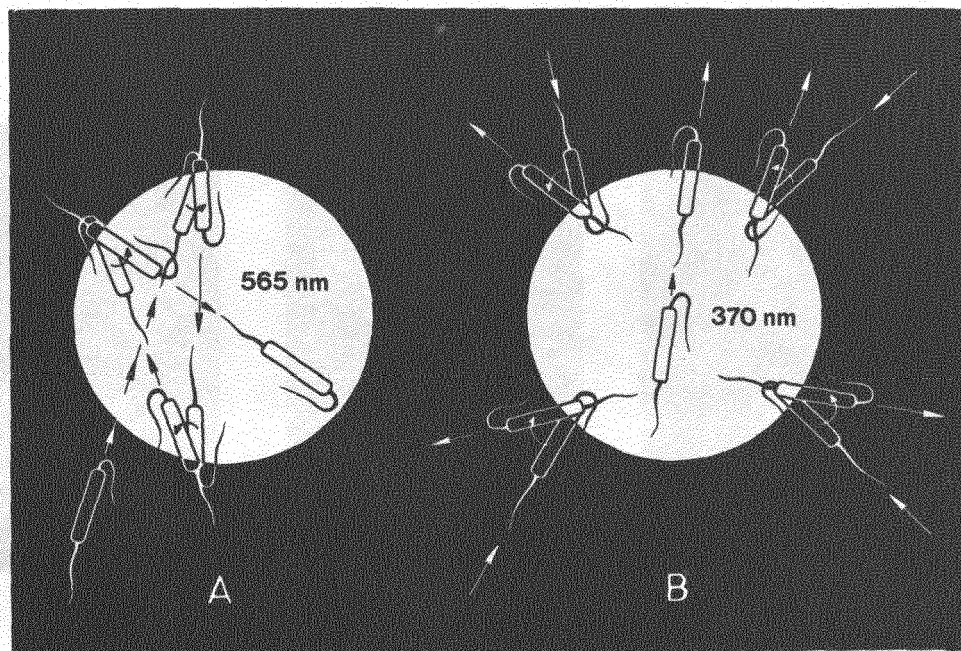


Abb. 17. Photoverhalten von *Halobacterium halobium*.

A, Ansammlung (trapping) von Bakterien in einem gelbgrünen (565 nm) Lichtfleck durch die IPR.

B, Meidung von ultraviolettem Licht durch die DPR.

(Hildebrand, 1977)

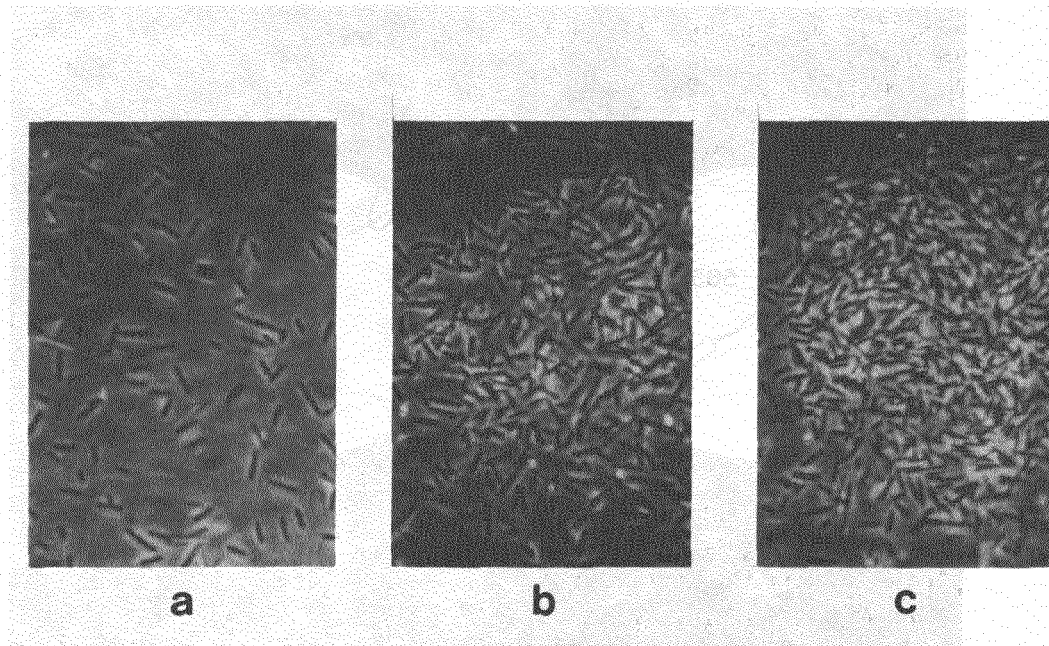


Abb. 18. Ansammlung von Halobakterien in einem Bereich mit günstigen Lichtbedingungen.

Reizlicht: $2,8 \cdot 10^{12} \text{ h}\nu \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\lambda = 565 \text{ nm}$; Hintergrundlicht: $5 \cdot 10^{15} \text{ h}\nu \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\lambda = 420 - 490 \text{ nm}$. Phasenkontrastaufnahmen vor (a), 10 min (b) und 25 min (c) nach Reizbeginn. Temperatur: 25°C . (Dencher, 1978)

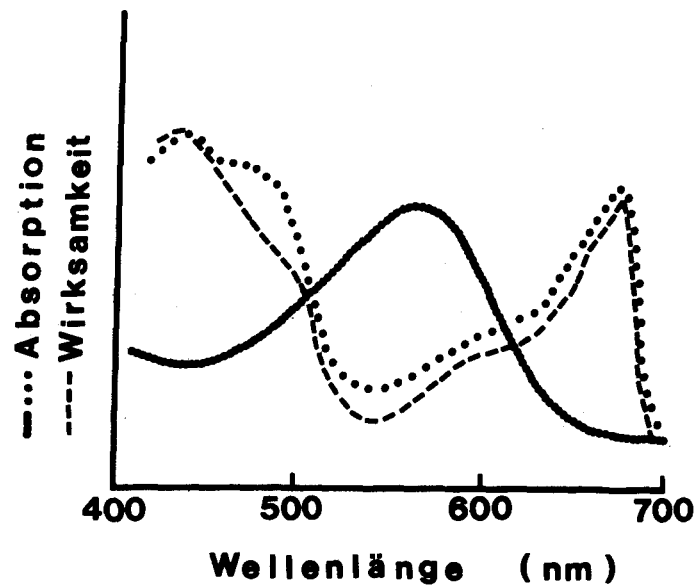


Abb. 19. Vergleich des Absorptionsspektrums von Bacteriorhodopsin (—) mit dem Absorptionsspektrum von Zellen der Grünalge *Ulva taeniata* (·····) und dem an diesem System gemessenen Aktionsspektrum der photosynthetischen Sauerstoffproduktion (-----). (Ulva - Spektren nach Lehninger, 1970.)

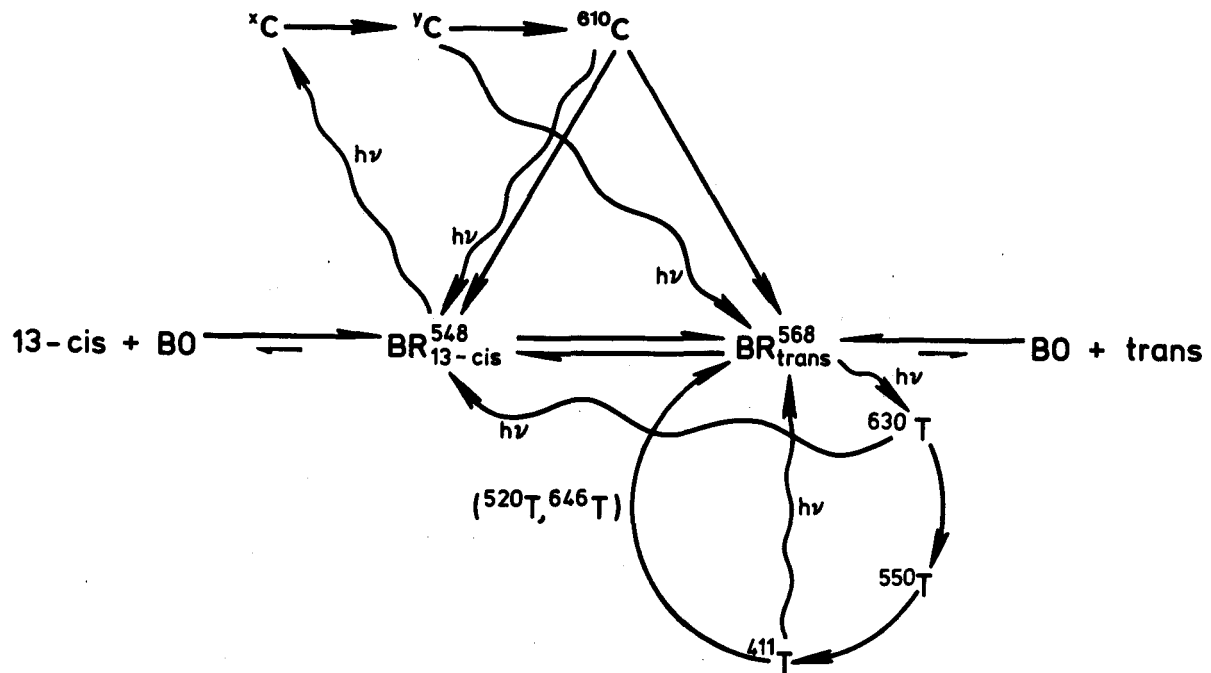


Abb. 20. Vereinfachtes Reaktionsschema der Photochemie und der Dunkelreaktionen von 13-cis und trans Bacteriorhodopsin. Produkte, die aus 13-cis BR bzw. trans BR nach Absorption von Licht entstehen, werden mit C bzw. T bezeichnet. Der Index auf der rechten Seite gibt das Wellenlängenmaximum des Absorptionsspektrums, der Index auf der linken Seite das Maximum des Differenzspektrums an. Index x und y weist darauf hin, dass das genaue Maximum des Differenzspektrums z.Z. nicht bekannt ist. (Sperling et al., 1978 u. 1979)

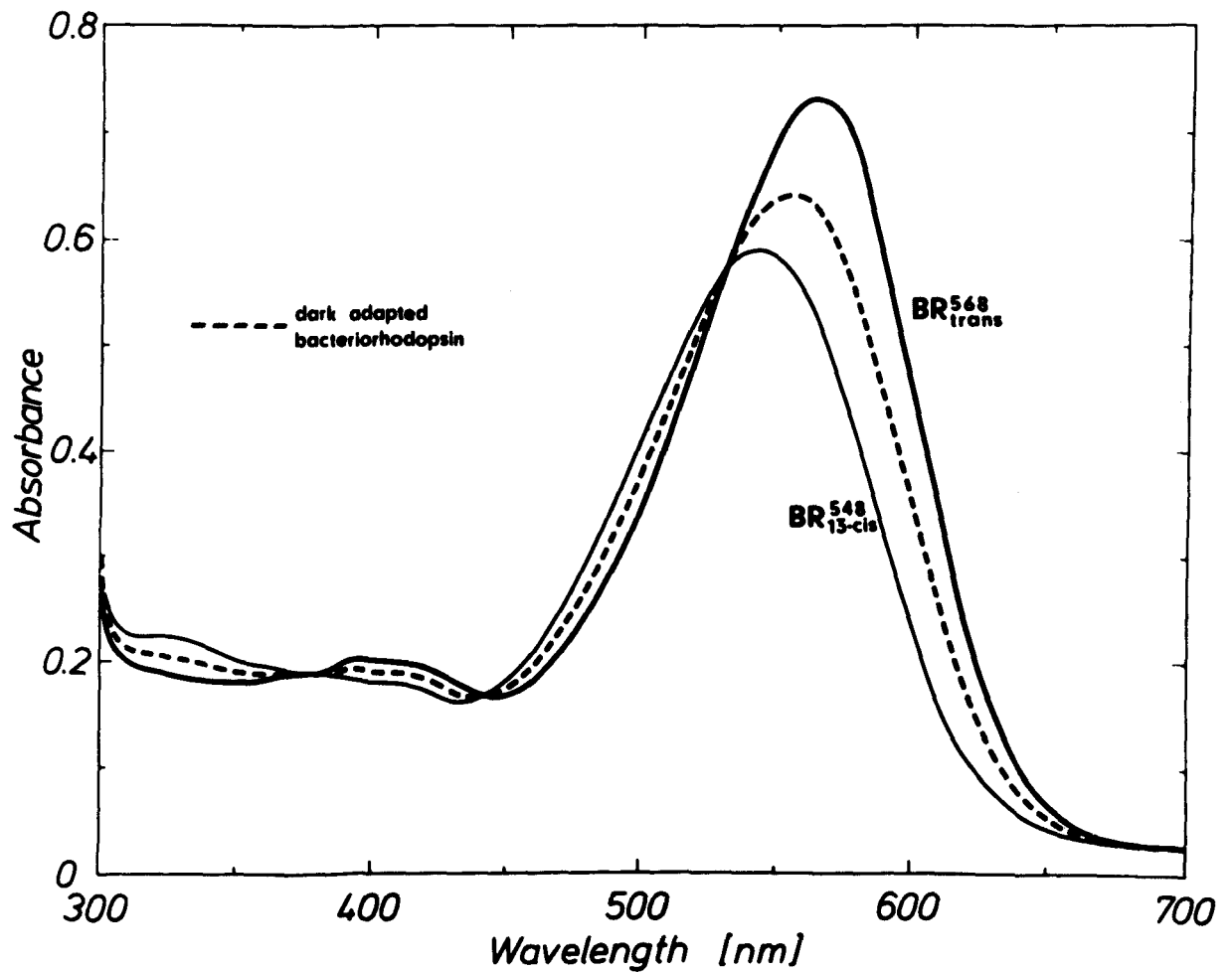


Abb. 21. Absorptionsspektren von 13-cis BR, trans BR und dem Gemisch von beiden Isomeren nach Dunkeladaptation, gemessen bei 20°C.

Wässrige Purpurmembran-Suspension nach Licht- (—) bzw. Dunkeladaptation bei 20°C (-----). Das Spektrum des 13-cis BR wurde berechnet auf der Grundlage von $K = [\text{trans BR} / 13\text{-cis BR}] = 1$ (—).

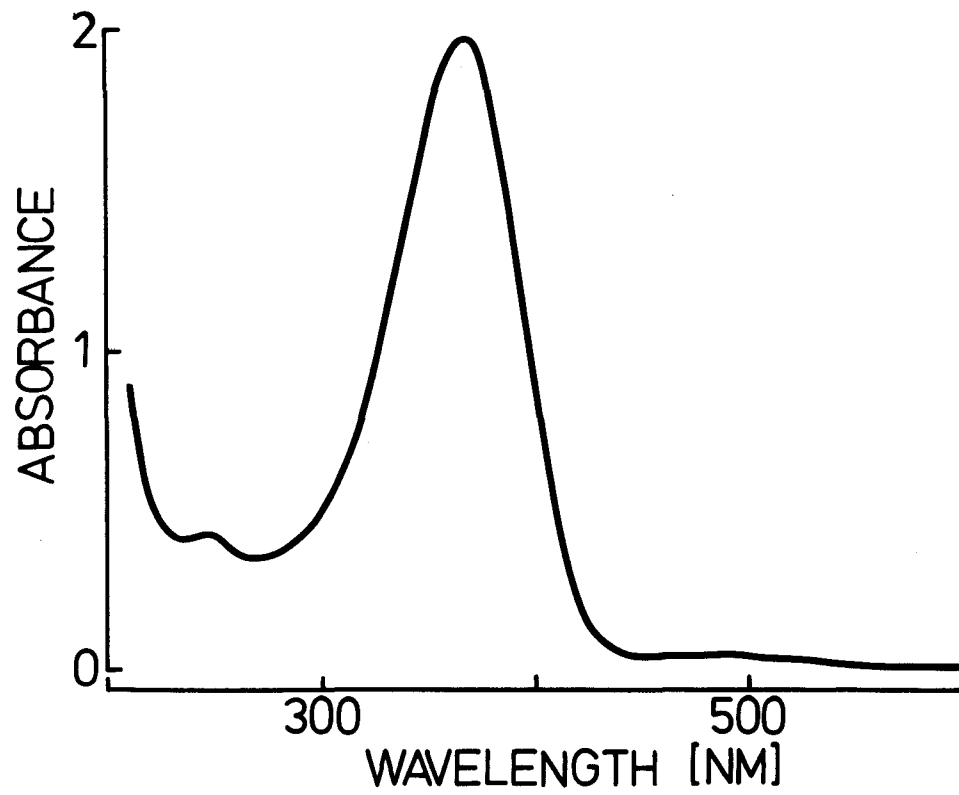


Abb. 22. Absorptionsspektrum der aus der dunkeladaptierten Purpurmembran extrahierten Chromophore in Hexan.

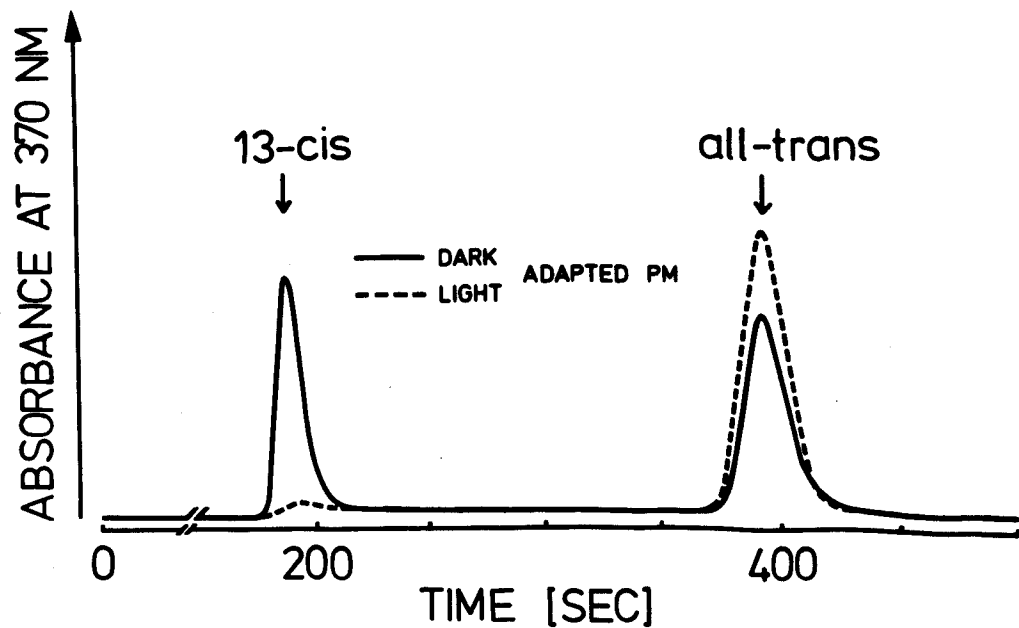


Abb. 23. Hochdruckflüssigkeitschromatogramm von Retinalisomeren. Extrahierte Chromophore der lichtadaptierten (-----) und dunkeladaptierten (———) Purpurmembran. Die beiden Proben hatten eine unterschiedliche BR-Konzentration und sind daher nicht direkt miteinander vergleichbar. Abszisse: Retentionszeit, d.h. Zeitdauer zwischen Auftragen der Probe auf die Säule und Absorptionsmessung der jeweiligen Isomerfraktion im Detektor. (Apparatur und Auftrennbedingungen, s. Sperling et al., 1977.)

Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden an *Halobacterium halobium* fünf verschiedene Gebiete bearbeitet:

1. Identifizierung und Charakterisierung des Pigmentsystems der direkten photophobischen Reaktion (PS 370) von *Halobacterium halobium*

Die an Pigmentmutanten und an künstlich Retinal-frei gemachten Zellen durchgeführten Verhaltensexperimente lassen es sehr wahrscheinlich erscheinen, daß die durch ultraviolette und blaues Licht auslösbare Verhaltensreaktion (DPR) von einem Retinal-Protein-Komplex gesteuert wird. In Zellen, bei denen die Retinalsynthese durch das Alkaloid Nikotin gehemmt war (Nikotinzellen) fehlte die DPR. Auswaschung des Alkaloids bzw. Zugabe von Retinal führte zu einer Wiederherstellung des Photoverhaltens. Diese Befunde und die an Carotinoid-freien Mutanten und Nikotinzellen bestimmten Aktionsspektren mit Empfindlichkeitsmaxima bei 280 und 370 nm sprechen für die obige Annahme. Die Regenerationsexperimente von Nikotinzellen mit Retinal und Carotinoiden und die Aktionsspektren zeigen, daß Carotinoide als akzessorische Pigmente wirken und die absorbierte Energie auf das wirksame Retinylidenprotein übertragen.

Die Untersuchungen unterstützen auch die früheren Befunde, daß Bacteriorhodopsin das Pigment der inversen photophobischen Reaktion (PS 565) ist.

Die biologische Bedeutung der beiden Photosysteme für *Halobacterium halobium* und der zugrundeliegende Mechanismus der Signalwandlung und -transmission wird ausführlich diskutiert.

2. Photo- und Dunkelreaktionen des Bacteriorhodopsins

Blitzlichtphotometrische Untersuchungen führten zur Erstellung eines Reaktionsschemas für die Photo- und Dunkelreaktionen der beiden Bacteriorhodopsinisomeren, trans BR und 13-cis BR (Abb.20). Auf der Grundlage dieser Daten wurde eine analytische Methode zur Bestimmung des Mengenverhältnisses der beiden BR-Isomere entwickelt. Die damit erhaltenen Daten sind in Einklang mit den in Kapitel 3 beschriebenen Untersuchungen.

3. Identifizierung der Retinalisomere von licht- und dunkeladaptiertem Bacteriorhodopsin

Drei unterschiedliche Methoden zur Extraktion des Retinals aus dem Bacteriorhodopsin der Purpurmembran wurden miteinander verglichen. Die Identifizierung und Quantifizierung der Retinalisomere erfolgte mit Hilfe der Hochdruckchromatographie. Nur die Äthanol-Extraktion (Rotmans et al., 1972) erwies sich dabei für das vorliegende System als geeignet. Die mit dieser Methode gewonnenen Daten zeigen, daß in dunkeladaptiertem Bacteriorhodopsin ein Gemisch von all-trans und 13-cis Retinal im Verhältnis von 1:1 vorliegt. Aus dem lichtadaptierten Bacteriorhodopsin wurde dagegen ausschließlich ($\geq 98\%$) das all-trans Isomer extrahiert.

4. Circulardichroismus der Purpurmembran

CD-Spektroskopie des Bacteriorhodopsins unter verschiedenen Bedingungen - z.B. in der Purpurmembran, solubilisiert mit Detergenz, während Regeneration von Bacteriorhodopsin mit Retinal - führte zu dem Befund, daß Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren benachbarter Bacteriorhodopsinmoleküle im hexagonalen Gitter der Purpurmembran auftreten. Dies bewirkt eine "Exciton"-Bande im CD-Spektrum.

5. Experimente zur Frage der Phosphorylierung des Bacteriorhodopsins

An lebenden Halobakterien und isolierter Purpurmembran wurde mit Hilfe biochemischer Untersuchungsmethoden (Isotopenmarkierung, SDS-Gelelektrophorese) versucht, eine mögliche Phosphorylierung des Bacteriorhodopsins aufzuzeigen. Weder bei der Biogenese der Purpurmembran noch bei der Funktion des Bacteriorhodopsins als lichtgetriebene Protonenpumpe konnte eine Phosphorylierungsreaktion nachgewiesen werden.

This work was partially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 160).