



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

Institut für Neurobiologie

**Absorptionsspektroskopische Analyse
des Astacus Rhodopsinsystems und Nachweis
einer metabolischen Regeneration
des Rhodopsins nach Helladaptation**

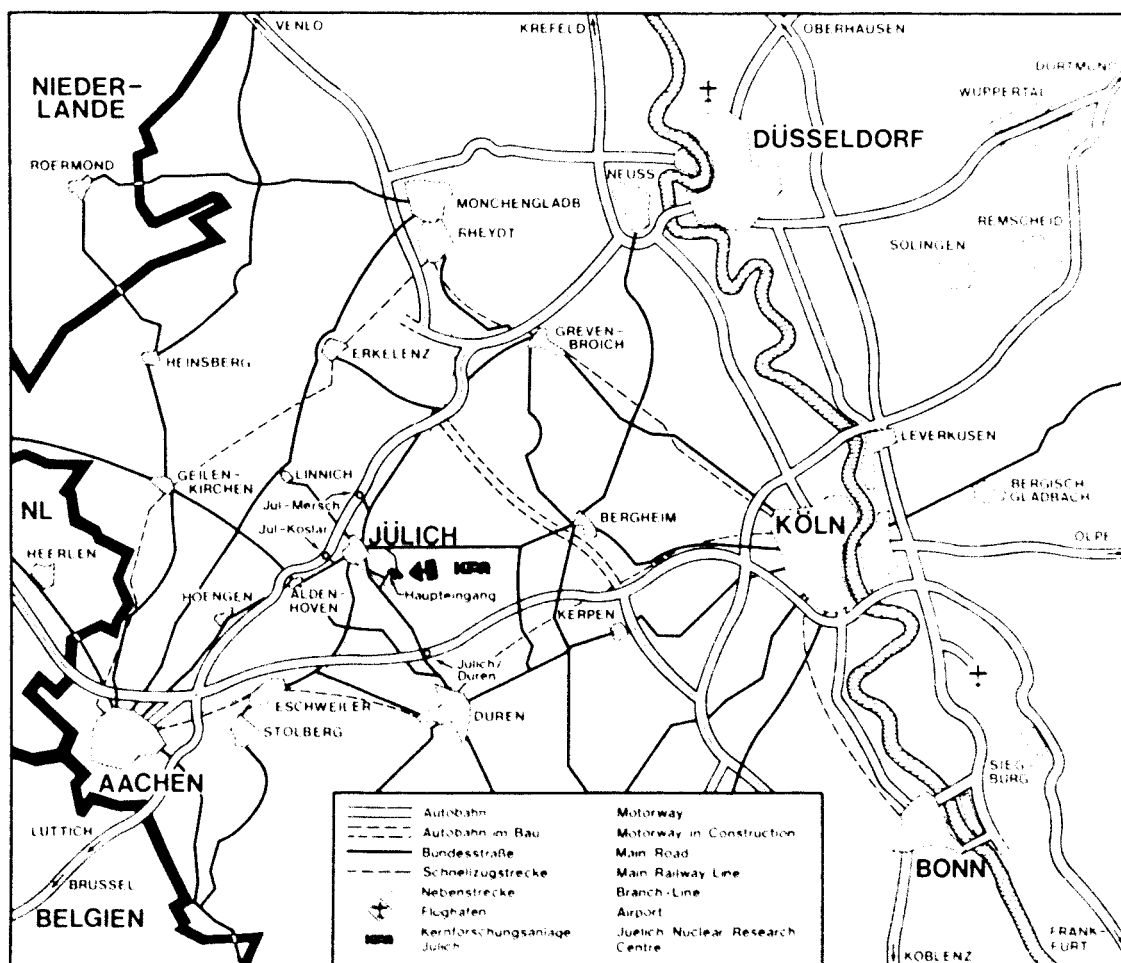
von

K. Hamacher

Jül - 1718

Mai 1981

ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich - Nr. 1718

Institut für Neurobiologie Jül - 1718

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: (02461) 61-0 · Telex: 833556 kfa d

**Absorptionsspektroskopische Analyse
des Astacus Rhodopsinsystems und Nachweis
einer metabolischen Regeneration
des Rhodopsins nach Helladaptation**

von

K. Hamacher

D 82 (Diss. T. H. Aachen)

Inhaltsverzeichnis

	Summary	IV
1	Einleitung	1
1.1	Möglichkeiten der Rhodopsin-Regeneration	2
2	Material und Methoden	6
2.1	Versuchsmaterial	6
2.2	Präparation der <i>Astacus</i> -Retinen	6
2.3	Freisetzung der Rhabdome	7
2.4	Isolierung der Rhabdome	7
2.5	Ultraschallbehandlung der Rhabdomsuspensionen	9
2.6	Detergensextraktion der photosensorischen Membranen	9
2.6.1	Extraktionsbedingungen	10
2.7	Absorptionsspektroskopische Analyse des Chromoproteinsystems	11
2.7.1	Spektroskopie beschallter Rhabdomsuspensionen	11
2.7.2	Spektroskopie der Digitonin-Rhabdomextrakte	12
2.7.3	>in vitro< Belichtung des membrangebundenen sowie Digitonin-gelösten Chromoproteinsystems	12
2.7.4	Kinetik der Extinktionsänderung bei Belichtung der Systeme mit Licht der Wellenlänge 600 nm bzw. 485 nm	12
2.7.5	Kinetik der thermisch induzierten Denaturierung von Rhodopsin bzw. Metarhodopsin in Gegenwart von Digitonin	13
2.8	>in vivo< Adaptation der <i>Astacus</i> -Augen	14
2.8.1	Belichtungsbedingungen	14
2.8.2	Dunkeladaptationsbedingungen	15
2.9	Anhang des methodischen Teils	16
2.9.1	Berechnung des Rhodopsin-Molenbruchs anhand absorptionsspektroskopischer Daten	16
3	Ergebnisse	22
3.1	Rhabdom-Isolierung	22
3.1.1	Proteinzusammensetzung der gereinigten Rhabdome	23
3.1.2	Proteinzusammensetzung der Digitonin-Rhabdomextrakte	25

II

3.2	Spektrale Eigenschaften beschallter Rhodopsin-suspensionen	26
3.2.1	Extinktionsspektren	26
3.2.2	Photoreversibilität des Rhodopsin-Metarhodopsin-Systems	28
3.2.3	Normierte Differenzspektren	30
3.3	Verlauf der photochemisch induzierten Isomerisierung des membrangebundenen Sehpigmentes	33
3.3.1	Belichtung des dunkeladaptierten Sehpigmentes mit konstanter Lichtintensität bei 600 nm und 0°C	33
3.3.2	Belichtung des 600 nm-adaptierten Sehpigmentes mit konstanter Lichtintensität bei 485 nm und 0°C	37
3.4	Spektrale Eigenschaften der Digitonin-Rhabdom-extrakte bei 0°C	39
3.4.1	Extinktionsspektren	39
3.4.2	Photoreversibilität des mizellar gelösten Chromoproteins	41
3.4.3	Normiertes Differenzspektrum	41
3.5	Kinetik der photochemisch induzierten Isomerisierung des mizellar gelösten Chromoproteins	43
3.6	Spektrale Eigenschaften der Digitonin-Rhabdom-extrakte in Gegenwart von Hydroxylamin	43
3.6.1	Extinktionsspektren des Digitonin-gelösten Chromoproteins nach Abzug des Basisspektrums	46
3.7	Hypothetische Spektren des Rhodopsins und Metarhodopsins im System sonifizierter Rhabdomsuspensionen	50
3.7.1	Vergleich der Chromoproteinspektren mit ϵ -Werten modifizierter Dartnall-Nomogramme (Ebrey u. Honig-Nomogramme)	51
3.7.2	Stoffmengenanteil von Rhodopsin und Metarhodopsin in der Photorezeptormembran - Berechnung aus absorptionsspektroskopischen Daten	53
3.8	Spektrale Änderung sonifizierter Rhabdomsuspensionen in Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes	56

III

3.8.1	Stoffmengenanteil des Rhodopsins in verschiedenen photostationären Zuständen des membran- gebundenen Chromoproteins	59
3.9	Lichtinduzierte Abnahme des Rhodopsinanteils in der lebenden Retina	63
3.9.1	Stoffmengenänderung des Rhodopsins bei Belich- tung dunkeladaptierter Krebse mit Raumlicht	63
3.9.2	Stoffmengenänderung des Rhodopsins durch Belich- tung dunkeladaptierter Krebse bei $\lambda > 550$ nm	65
3.10	Metabolische Substitution von Metarhodopsin durch Rhodopsin in der lebenden Retina (Dunkel- regeneration)	68
3.11	Thermisch induzierte Änderung der absorptions- spektroskopischen Eigenschaften der Digitonin- gelösten Chromoproteine	71
3.11.1	Spektroskopische Änderung eines unbelichteten Extraktes bei Erhöhung der Temperatur von 0°C auf 20°C	71
3.11.2	Spektroskopische Änderung eines unbelichteten Extraktes bei Erhöhung der Temperatur von 0°C auf 30°C	72
3.11.3	Spektroskopische Änderung eines belichteten Extraktes bei Erhöhung der Temperatur von 0°C auf 20°C	74
3.11.4	Spektroskopische Änderung des belichteten Extraktes bei Erhöhung der Temperatur von 0°C auf 30°C	76
4	Diskussion	80
4.1	Spektrale Eigenschaften des <i>Astacus</i> -Chromoproteins	80
4.2	Abschätzung der molaren Extinktionskoeffizienten	83
4.3	Thermische Stabilität des <i>Astacus</i> -Chromoproteins	84
4.4	Metabolische Regeneration des <i>Astacus</i> -Rhodopsins	86
5	Zusammenfassung	90
6	Anhang (Tabellen)	94
7	Literaturverzeichnis	101

IV

Summary

A method was developed to isolate, from a single *Astacus* retina, purified rhabdoms almost entirely free from screening pigments.

The quantity of isolated rhabdoms (about 70% of the total amount) is sufficient to allow measurement of the extinction spectra of both the membrane-bound and the digitonin-solubilized chromoproteins of a single retina.

SDS-gelelectrophoretical analysis of the protein pattern of purified photoreceptor membranes yields a rhodopsin portion of 40...50% of the total protein.

The portion of rhodopsin extracted from purified rhabdoms is about 80% of the total amount of solubilized proteins.

Absorption spectra of the rhodopsin system show that both, the membrane-bound chromoprotein (sonicated rhabdom suspension) and the digitonin-solubilized chromoprotein are thermostable and photoreversible at 0°C and pH 7.0.

The differences between the spectra of the chromoprotein isomers or the spectra of the different photostationary states, resp., of the chromoprotein solution and the membrane-bound system, measured at 0°C and pH 7.0, are nearly identical and yield extreme values of ΔE at 570 nm and 485 nm.

The maximum of the extinction spectrum of *Astacus* rhodopsin (0°C, pH 7.0) is $\lambda_{\max} = 530$ nm. Metarhodopsin ($\lambda_{\max} = 500$ nm) is produced nearly quantitatively by irradiation of rhodopsin at $\lambda > 630$ nm. The molar extinction coefficient of metarhodopsin is greater by a factor of 1.4...1.43 than that of rhodopsin, each measured at their respective $\lambda_{\max}$. The isosbestic point is at 536 nm.

Due to its photoreversibility metarhodopsin can be isomerized to rhodopsin by irradiation at $\lambda < 630$ nm. As the extinction spectra of the two chromoprotein isomers overlap, only partial photochemical isomerization to rhodopsin is possible.

Irradiation at ca. 465 nm leads to the maximal mole fraction ($x_R = 0.52 \pm 0.02$) of photochemically produced rhodopsin.

The normalized spectrum of the metarhodopsin shows good agreement with the relative ϵ -values of modified Dartnall-nomograms, while the ϵ -values of the *Astacus* rhodopsin for $\lambda < 480$ nm are greater by a factor 1.1...1.5 than the nomogram values of a pigment with $\lambda_{\max} = 530$ nm.

The light-induced isomerization of rhodopsin to metarhodopsin, or vice versa, can be described, for constant light intensity, by a first-order reaction.

According to data by other authors (compare Hamdorf, 1979; Schwemer, 1969) the relation of the portions of rhodopsin and metarhodopsin (x_R/x_M) in cephalopods and several insects is almost directly proportional to the relation of the molar extinction coefficients (ϵ_M/ϵ_R) at the irradiation wavelength λ_e .

Contrary to this, the spectroscopical analysis of the *Astacus* visual pigment shows that the relation (x_R/x_M) is not directly proportional to the value $\epsilon_M(\lambda_e)/\epsilon_R(\lambda_e)$. Consequently the relative quantum yield γ_M/γ_R of the photochemical rhodopsin-metarhodopsin isomerization is < 1 in the *Astacus* visual pigment. According to the present results the relative quantum yield has its maximal value of 0.68 at $\lambda_e = 450$ nm. For $\lambda_e > 450$ nm the quantum yield γ_M/γ_R is < 0.68 , e.g. for $\lambda_e = 536$ nm (isosbestic point) ca. 0.43.

The light-induced decrease of the rhodopsin portion in vivo depends on the state of adaptation of the *Astacus* eyes. Irradiation of dark-adapted *Astacus* eyes in vivo at 0°C leads to the photostationary state (x_R : 0.26...0.31,

VI

illumination with room light). At 20°C even 50 hs illumination with room light (50...70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) only leads to a decrease of $x_R = 0.83...0.86$.

The light-induced decrease of the rhodopsin mole fraction in vivo can be restored by a metabolic process of rhodopsin regeneration. The regeneration rate is obviously independent of the mole fraction of metarhodopsin (x_M) in the range $0,2 < x_M < 0,9$. At 15°C the temporal increase of the rhodopsin mole fraction ($\Delta x_R / \Delta t$) is about 0.005 h^{-1} . Consequently, complete metabolic substitution of metarhodopsin ($x_M: 1 \rightarrow 0$) occurs at 15°C within 6...7 days. At 10°C the in vivo process is slower by a factor 2. The question whether dark regeneration is an enzymatic isomerization of metarhodopsin and/or a biochemical synthesis of rhodopsin cannot yet be answered.

The course of the spectra of the digitonin-solubilized chromoprotein is remarkably dependent on the temperature. A temperature rise of the >unilluminated< digitonin-rhabdom extract from 0°C to 20°C leads to a hypsochromic shift of the spectrum in comparison with that measured at 0°C, and to a decrease of $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}}$ by ca. 30%. At this temperature the system is not photoreversible but is bleached under illumination, while retinal is released. An analogous spectral change of the rhodopsin system can be measured when the temperature is raised from 0° to 30°C. The hypsochromic shift of the rhodopsin spectrum is followed, at 30°C, by a thermal denaturation of the chromoprotein under release formation of retinal within about 5 hs ($\tau_{1/2} = 80 \text{ min}$). The denaturation at 30°C, however, does not lead to complete bleaching of the system. Only illumination induces quantitative bleaching under additional formation of retinal.

Also in the case of thermal denaturation of the metarhodopsin ($\theta = 20^\circ\text{C}$, or 30°C , resp.) a not yet closely characterized photosensitive retinylidene-chromoprotein is observed, which is thermally much more stable than rhodopsin and metarhodopsin.

VII

The kinetic of the thermal denaturation of the meta-rhodopsin corresponds to a first-order reaction with a half time $\tau_{1/2} = 34$ min at 30°C .

The process of the denaturation of the digitonin-solubilized chromoprotein at 20°C , or 30°C , resp., - accompanied by the separation of retinal - is accelerated by irradiation of the system.

The kinetic of the hydrolytical separation of the chromophore and its dependence on wavelength and intensity of the stimulating light, however, was not investigated.

1 Einleitung

In den Lichtsinneszellen tierischer Organismen ist das Chromoprotein Rhodopsin die Schlüsselsubstanz zur Transduktion des Lichtreizes in ein elektrisches Signal.

Die Absorption eines Photons durch Rhodopsin initiiert eine ionenselektive Änderung der Leitfähigkeit der Photorezeptormembran. Diese lichtinduzierte Leitfähigkeitsänderung, hauptsächlich für Na^+ -Ionen, hat eine zeit- und lichtabhängige Spannungsänderung an der Sehzellmembran - Rezeptorpotential genannt - zur Folge. Die Spannungsänderung wird an der Synapse in eine Folge von Nervenimpulsen umgewandelt und an das Gehirn weitergeleitet.

Das photosensitive Rhodopsin ist ein integrales Protein der Photorezeptormembran und besteht aus dem Opsin und dem kovalent gebundenen Chromophor Retinal. Retinal ist ein Aldehyd und kann als primäres Oxydationsprodukt des Vitamin A betrachtet werden. Die kovalente Bindung des Retinals an das Opsin resultiert aus der Kondensation der Carbonylgruppe des Retinals mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysins des Proteins unter Bildung eines Imins (Bownds, 1967; Wald, 1968).

Im Rhodopsin der Vertebraten und Evertrebraten liegt das konjugierte Pentaen-System des Retinals in der 11-cis-Konfiguration vor (vergl. review, Stieve, 1977). Absorption eines Photons durch das Rhodopsinmolekül bewirkt eine Isomerisierung des Retinals in die all-trans-Konfiguration. Eine sich daran anschließende strukturelle Änderung des Chromoproteins führt beim Rhodopsin der Vertebraten letztlich zur Hydrolyse des Imins in all-trans-Retinal und Opsin (Wald, 1968). Im Gegensatz zu den Farbstoffreaktionen der Vertebraten hat die photochemische Isomerisierung der Evertrebraten-Rhodopsine (z.B. von Insekten, Krebsen und Tintenfischen) keine unmittelbare Abspaltung des Chromophors, sondern die Bildung eines thermostabilen Metarhodopsins zur Folge (Brown und Brown, 1958; Hubbard und St. George, 1958; vergl. Goldsmith, 1972).

Die Metarhodopsine der Evertebraten sind photoreversibel und können photochemisch zum Rhodopsin reisoimerisiert werden (photochemisches flip-flop-System). Aufgrund der absorptionsspektroskopischen Eigenschaften des Evertebraten-Rhodopsins (Überlappung der Spektren von Rhodopsin und Metarhodopsin) führt Belichtung des Rhodopsinsystems zu einem photostationären Zustand, in dem der Stoffmengenanteil der isomeren Chromoproteine von der Wellenlänge bzw. spektralen Verteilung des eingestrahltten Lichtes abhängt (Hamdorf et al. 1968). Eine vollständige photochemische Isomerisierung des Metarhodopsins zum Rhodopsin durch polychromatisches Licht (z.B. Weißlicht) ist daher nicht möglich. Da jedoch in völlig dunkeladaptierten Evertebraten-Retinen offensichtlich kein Metarhodopsin vorliegt (Hubbard und St. George, 1958; Bruno et al., 1977) muß ein lichtunabhängiger metabolischer Regenerationsprozeß des Rhodopsins postuliert werden.

1.1 Möglichkeiten der Rhodopsin-Regeneration

In der Retina von Vertebraten wird das Rhodopsin im wesentlichen metabolisch durch Kondensation von Opsin mit 11-cis-Retinal gebildet (vergl. O'Brien, 1978).

Bei Evertebraten sind dagegen prinzipiell zwei Mechanismen der Regeneration von Rhodopsin relevant:

- 1) photochemische Regeneration
(photochemische Isomerisierung des Metarhodopsins)
- 2) metabolische Regeneration
 - a) durch biochemische Synthese von Opsin und anschließende Kondensation mit 11-cis-Retinal
 - b) partielle Synthese: Kondensation von - durch hydrolytische Chromophorabspaltung beim Metarhodopsin entstandenem - Opsin und 11-cis-Retinal (?)
 - c) enzymatisch katalysierte Metarhodopsin-Isomerisierung (?)

Die photochemische Regeneration des Evertebraten-Sehpigmentes ist für die Aufrechterhaltung eines hohen Rhodopsinanteils, insbesondere für die Retinen einiger Insekten von Bedeutung (Hamdorf und Rosner, 1973; Höglund et al., 1973; Hamdorf und Schwemer, 1975)

Offen ist die Frage, nach welchen Mechanismen eine metabolische Regeneration der Evertebraten-Rhodopsine erfolgt. So ist nicht definitiv geklärt, ob - außer der biochemischen Synthese - der metabolischen Regeneration eine enzymatische Isomerisierung des Metarhodopsins und/oder eine partielle Synthese des Rhodopsins zugrunde liegt.

Zur Zeit gibt es nur wenige Arbeiten, die sich dem Problem der metabolischen Regeneration von Evertebraten-Rhodopsin widmen:

Schwemer (1969) konnte beim Tintenfisch *Eledone moschata* erstmals eine Regeneration des Rhodopsins in vivo nachweisen. Die Halbwertszeit dieses Prozesses beträgt bei 20°C etwa 10 min. Die absorptionsspektroskopischen Daten wurden durch elektrophysiologische Untersuchungen von Hamdorf (1970) bestätigt, der darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen Rhodopsinkonzentration und Empfindlichkeit des Photorezeptors nachweisen konnte. Bei der Fliege *Calliphora erythrocephala* wurde für die Rhodopsin-Regeneration aus Metarhodopsin eine Halbwertszeit von etwa 25 min bei Raumtemperatur ermittelt (Stavenga et al., 1973). Eine Regeneration des Rhodopsins im Dunkeln wurde auch beim Schmetterling *Aglais urticae* beobachtet. Stavenga (1975) bestimmte anhand von Reflexionsmessungen an Retinen in vivo eine Halbwertszeit die im Bereich 15...45 min liegt. Eine wesentlich längere Halbwertszeit der Rhodopsin-Regeneration wurde bei der Motte *Galleria* gemessen (Goldman et al., 1975). Nach Belichtung dunkeladaptierter Tiere mit Sonnenlicht dauerte die anschließende metabolische Dunkelregeneration des Rhodopsins mehrere Tage. Eine Halbwertszeit von ca. 1 h bei 15°C fanden Bruno et al. (1977) für den metabolischen Prozeß der Regeneration des *Homarus* Sehpigmentes.

Die bisher vorliegenden Werte der in vivo Regenerationszeit der Evertebraten-Rhodopsine streuen erheblich und erlauben daher keine verallgemeinernde Aussage über diesen Prozeß und dessen Mechanismus.

In der vorliegenden Arbeit ist das Rhodopsinsystem des Sumpfkrebsses *Astacus leptodactylus* Gegenstand der Untersuchung. Die Wahl dieses Objektes bietet sich gerade deshalb an, weil bereits eine Vielfalt elektrophysiologischer Ergebnisse zum Mechanismus der *Astacus*-Sehzelle vorliegt (Stieve, 1973; 1976; 1977; vergl. Hartung, 1978), die durch physikalisch-chemische und biochemische Untersuchungen ergänzt werden sollen. Die Arbeit soll mit dem dazu beitragen, ein möglichst umfassendes Modell der Funktionsweise eines Photorezeptors zu erstellen.

Ein wesentliches Problem biochemischer Untersuchungen an Evertebratenaugen (insbesondere bei Insekten und Krebsen) ist die geringe Menge des zur Verfügung stehenden biologischen Materials und damit die Isolierung z.B. der photosensorischen Membran, in der das Rhodopsin lokalisiert ist.

An dieser Stelle soll auf die Morphologie der *Astacus*-Retina (vergl. Winterhager, 1979) nicht eingegangen werden. Es sei lediglich erwähnt, daß die photosensorische Membran der Krebse in speziellen Strukturen, den sog. Rhabdomen, angeordnet ist. Ein einzelnes Rhabdom wird durch "Pakete" hexagonal angeordneter, fingerförmiger Ausstülpungen (Mikrovilli) von 8 Retinulazellen gebildet (vergl. Hamacher, 1977).

Die Aufgabe, neben den absorptionsspektroskopischen Eigenschaften des *Astacus*-Rhodopsinsystems (vergl. Wilms, 1977) eine mögliche metabolische Regeneration des Rhodopsins nachzuweisen, setzte voraus, eine Methode zu entwickeln, das Sehpigment einer *Astacus*-Retina spektroskopisch exakt zu analysieren. Anhand der spektralen Daten sollte das Stoffmengenverhältnis der isomeren Chromoproteine (Rhodopsin und Metarhodopsin) ermittelt werden.

Das Rhodopsin des *Astacus* ist ein Glykoprotein (Baer, unveröffentl.), mit einer molaren Masse von etwa 35000 g/mol (Hamacher, 1977), vergleichbar den Molmassen der Sehpigmente anderer Tierarten. Als membran-gebundenes, integrales Protein ist es nicht wasserlöslich und kann durch das nichtionische Detergens Digitonin im nativen Zustand mizellar gelöst werden. Im Digitonin-Extrakt ist das Chromoproteinsystem (oberhalb von 0°C) äußerst labil und wird thermisch irreversibel denaturiert.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsmaterial

Die zur Präparation und Isolierung der Photorezeptormembran (Rhabdome) benutzten Augen stammen von Flußkrebse (*Astacus leptodactylus*). Die Krebse wurden über den Feinkosthandel bezogen und bei ca. 13°C in Aquarien gehalten.

Im allgemeinen wurden die Krebse vor Versuchsbeginn bei der erwähnten Temperatur 18...20 h dunkeladaptiert und - je nach Versuchsplanung - unter den beschriebenen Lichtbedingungen (s. 2.8) helladaptiert.

Die Präparation der Augen und die Freisetzung der Rhabdome sowie die sonstigen Prozeduren wurden bei Rotlicht ($\lambda > 690$ nm) und einem Temperaturbereich von 0...3°C durchgeführt.

2.2 Präparation der Retinen

Das Krebsauge wurde am unteren Ende des Augenstiels abgeschnitten und der Chitinpanzer des Augenstiels mit einer kleinen Schere in einer Spirallinie bis zum unteren Ende der Cornea abgetrennt. Nach dem Abschneiden des Augengewebes wurde die Retina mit einer Pinzette von der Cornea abgezogen und in ein Eppendorf-PE-Gefäß (Ø 4 mm; l=45 mm) mit 200 µl einer eisgekühlten Lösung folgender Zusammensetzung überführt:

70 mmol Na-Phosphat/l; 1 mmol MgCl_2 /l; pH 7.0
+ 5 mg Albumin (reinst)/ml

(Komponenten des Na-phosphatpuffers: Na_2HPO_4 ; NaH_2PO_4)

2.3 Freisetzung der Rhabdome

Zur Freisetzung der Rhabdome wurde die Retina durch eine rotierende Wendel ($\varnothing=1$ mm) aus V2A-Stahldraht in dem Albumin-haltigen Na-phosphatpuffer suspendiert. Die Wendel wurde mit Hilfe eines Zahntechnikermotors über eine biegsame Welle angetrieben.

Um eine möglichst hohe Ausbeute an Rhabdomen zu erhalten, wurde die Drehzahl des Motors etwa 4...5 mal schubweise auf $8000...9000 \text{ min}^{-1}$ erhöht und zwar so, daß man - mittels Fußschalter - die max. Drehzahl innerhalb von ca. 2 s erreicht, nachfolgend sprunghaft reduziert und erneut beschleunigt. Übersteigt die Drehzahl der Wendel den Wert von ca. 10^4 min^{-1} haben die auftretenden Scherkräfte eine teilweise Zerstörung der freigesetzten Rhabdome zur Folge, so daß die Rhabdomausbeute kleiner wird.

Eine lichtmikroskopische Kontrolle der Retina-Suspension (5 μl) gibt Aufschluß über die Güte und Menge der Rhabdome und Rhabdomfragmente. Bei richtiger Dosierung der Quirlschübe liegt die max. Zahl der freigesetzten Rhabdome pro Retina bei etwa 1400 (s. Ergebnisse 3.1).

Durch Zusatz von Albumin zur Suspensionslösung wird die Adsorption von Schirmpigmentgranula aus der Suspension an die Peripherie der freigesetzten Rhabdome vermindert. Die weitgehende Dekontamination der Photorezeptormembran von Pigmentgranula ist insbesondere für eine exakte absorptionsspektroskopische Analyse des Rhodopsinsystems vonnöten.

2.4 Isolierung der Rhabdome

Die Abtrennung der Rhabdome von den übrigen Gewebekomponenten der Retina-Suspension erreicht man durch Anwendung der Dichtegradientenzentrifugation. Der eingesetzte Saccharosegradient hat folgende Zusammensetzung: In ein

Cellulosenitratröhrchen ($V=2$ ml) füllt man 0.5 ml Saccharoselösung der Dichte 1.20 g/ml (Saccharose in Na-phosphatpuffer 70 mmol/l; pH 7.0) und schichtet darüber einen kontinuierlichen Saccharosegradienten, der aus 0.64 ml Albumin-haltiger Saccharoselösung (Pufferzusammensetzung s. 2.2) der Dichte 1.18 g/ml und dem gleichen Volumen des Albumin-haltigen Na-phosphatpuffers (s. 2.2) hergestellt wird. Auf diesen Gradienten schichtet man die Suspension einer Retina (200 μ l) und zwar unmittelbar nach der Freisetzung der Rhabdome. Die Temperatur des Gradienten und der Suspension soll im Bereich $0...2^{\circ}\text{C}$ liegen.

Die Zentrifugation erfolgte bei einer Zentrifugalbeschleunigung von ca. $1,3 \cdot 10^5 \times g$ und einer Temperatur von $1...2^{\circ}\text{C}$. Eingesetzt wurde eine Ultrazentrifuge vom Typ Christ Omega 70000 mit Schwenkbecherrotor 552/61 Ti. Dauer der Zentrifugation: 1 h bei 35000 min^{-1} .

Die rhabdomhaltige Phase innerhalb des kontinuierlichen Gradienten wurde mit einer auf 0°C gekühlten 100 μ l-Pipette mit zugehöriger Ansaugvorrichtung (Schraubadapter) abgezogen und die Suspension (100...150 μ l) zur kurzzeitigen Lagerung (bis zu einigen Tagen) bei -25°C unter Lichtabschluß eingefroren.

Zum Abhebern der Rhabdomsuspension ist es zweckmäßig, senkrecht zur Beobachtungsrichtung eine Lampe mit (Schott)-Kantenfilter RG 695 anzuordnen, damit man - anhand der auftretenden Lichtstreuung - die geringe Menge der Rhabdomphase gut erkennen und möglichst quantitativ isolieren kann.

Der Ort der Rhabdomphase innerhalb des kontinuierlichen Gradienten ist vom Adaptationszustand der Rhabdome abhängig und liegt im Dichtebereich von $\rho=1.13...1.16 \text{ g/ml}$. Ursache dieser unterschiedlichen spezifischen Dichte ist

die von den Adaptationsbedingungen abhängige Beladung der Rhabdomoberfläche mit Pigmentgranula, d.h. je mehr Granula adsorptiv an die Rhabdomoberfläche gebunden sind, desto größer ist die scheinbare Rhabdomdichte.

2.5 Ultraschallbehandlung der Rhabdomsuspensionen

Die Suspension der isolierten Rhabdome einer Retina (100...150 μ l) wurde in einem Eppendorf-Gefäß ($V=1.5$ ml) mit Hilfe eines Ultraschall-Desintegrators (Branson Sonifier B 12) homogenisiert. Zu beachten ist vor allem, daß die Temperatur der Rhabdomsuspension während des Beschallens nicht wesentlich ansteigt, damit das photo-sensorische System thermisch nicht verändert oder denaturiert wird. Um die Temperaturerhöhung möglichst gering zu halten, wurde der Metallstab des Sonifiers im Eisbad auf 0°C gekühlt. Unmittelbar vor der Beschallung wurde das Eisbad entfernt, der Stab trocken gewischt und das untere Ende des konischen Stabes mit Stickstoff gekühlt. Die Umspülung mit N_2 während der Sonifizierung schützt außerdem die Probe vor Oxydation.

Beschallt wurde ca. 8 s mit einer Resonanzenergie von 75-80 W, wobei die Temperatur der Probe auf maximal $5...6^{\circ}\text{C}$ ansteigt.

Nach dem Homogenisieren wurde die vesikuläre Photorezeptor-membran-Suspension in eine auf 0°C gekühlte Mikroküvette überführt und anschließend absorptionsspektroskopisch analysiert (s. 2.7).

2.6 Detergensextraktion der photosensorischen Membran

Zur Extraktion des Chromoproteins aus der Photorezeptor-membran wurde das nichtionische Detergens Digitonin eingesetzt. Das Detergens wurde aus einem Saponingemisch der Fa. Merck, Darmstadt, durch fraktionierte Kristallisation gewonnen (vergl. Diplomarbeit Hamacher, 1977).

Die Detergenslösung hatte einen Gehalt von 200 mg Digitonin in 10 ml 70 mmolare Na-phosphatlösung pH 7.0.

2.6.1 Extraktionsbedingungen

Die aus dem Dichtegradienten isolierte Rhabdomsuspension (100...150 μ l) wurde mit ca. 1 ml Na-phosphatpuffer (70 mmol/l; pH 7.0) versetzt und in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 0...2°C, 2 min bei $10^4 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Zur weitgehenden Abtrennung des den Rhabdomen anhaftenden Albumins wurde das Pellet nochmals in 1.5 ml Phosphatpuffer bei 0°C suspendiert und anschließend wie oben beschrieben zentrifugiert.

Zu dem Pellet wurde eisgekühlte 2%-ige Digitoninlösung (120 μ l) gegeben, das Gemisch mit Hilfe eines Quirls homogenisiert und anschließend das System im Dunkeln etwa 16...18 h im Eisbad belassen.

Zur Abtrennung des Extraktes von nicht gelösten Membrananteilen wurde die Digitonin-haltige Suspension bei 0...2°C, 45...60 min bei $5 \cdot 10^4 g$ zentrifugiert (Beckman-Zentrifuge J 21B Rotor JA 21 mit Adapter für 200 μ l-Becher).

Zur Analyse der spektroskopischen Eigenschaften bei Temperaturen $> 15^\circ\text{C}$ wurde bei einigen Versuchen zu 100 μ l Digitonin-Rhabdomextrakt 10 μ l einer neutralen 0.2 molaren H_2NOH -Lösung - als Reagens zur Umsetzung von freigesetztem Retinal zum Retinaloxim - zugesetzt. Die H_2NOH -Zugabe erfolgte stets nach Beendigung der Extraktion, unmittelbar vor Beginn der Spektroskopie, um eine mögliche Denaturierung des Chromoproteins während der Extraktion zu vermeiden.

2.7 Absorptionsspektroskopische Analyse des Chromoproteinsystems

Die spektroskopische Analyse der sonifizierten Rhabdomsuspensionen sowie der Digitonin-Rhabdomextrakte einer Retina wurden im Zweistrahl-Spektralphotometer Cary 118 C vorgenommen. Wegen des geringen Probenvolumens von 80...120 μ l wurden für die Messungen Quarz-Mikroküvetten (114-QS 1.000) eingesetzt. Zur isothermen Spektroskopie wurde die Küvettenhalterung mittels eines Kryostaten (MGW Lauda Typ TUK 30D) thermostatisiert und die Temperatur der Probe mit Hilfe eines Kupfer-Konstanten Thermoelementes gemessen. Damit das Thermoelement den Strahlengang nicht beeinflusste, berührte es nur die Oberfläche der Suspension bzw. Detergensiösung.

Die Aufzeichnung der Spektren wurde bei konstanter Verstärkung des SEV (Gain: 0.3) und variabler Spaltbreite (0.01...0.04 mm) des Monochromators (auto slit) durchgeführt; der Wellenlängenvorschub betrug 1 bzw. 2 nm/s.

2.7.1 Spektroskopie sonifizierter Rhabdomsuspensionen

Zur Verhinderung einer thermisch induzierten Änderung des Rhodopsin-Metarhodopsin-Systems wurden die beschallten Rhabdomsuspensionen bei $0 \pm 1^\circ\text{C}$ spektroskopiert. Als Vergleichslösung diente eine nicht thermostatisierte, Albumin- und Saccharose-haltige Na-phosphatlösung, deren Zusammensetzung der Rhabdomsuspension im Dichtegradienten entsprach ($\rho = 1.15 \text{ g/ml}$). Wegen der relativ großen Lichtstreuung der Suspensionen wurde die Extinktion nur im Wellenlängenbereich 700...350 nm aufgezeichnet.

Das Auftreten einer lichtinduzierten Änderung des Systems durch den Einfluß des Meßlichtes wurde in der Weise geprüft, daß das Spektrum der ursprünglichen Suspension bis zu 6 mal repetierend aufgezeichnet wurde. Durch

Streuänderungen der Suspension bedingte Extinktionsänderungen wurden durch Korrektur der Extinktion bei 700 nm auf den ursprünglichen Wert kompensiert, d.h. die Spektren wurden ausgehend vom zu Beginn eingestellten E_{700} -Wert (0...0.01) gemessen.

2.7.2 Spektroskopie der Digitonin-Rhabdomextrakte

Analog den beschallten Rhabdomsuspensionen wurden die Digitonin-Rhabdomextrakte bei einer Temperatur von $0 \pm 1^\circ\text{C}$ spektroskopiert. Die Spektren wurden im Bereich von 700...270 nm gemessen; als Vergleichslösung diente eine Detergenslösung äquivalenter Zusammensetzung. Zur Prüfung des Meßlichteinflusses wurden die Extrakte mehrmals (2...4 mal) hintereinander spektroskopiert.

2.7.3 >in vitro< Belichtung des membrangebundenen und des mizellar gelösten Chromoproteinsystems

Zur Untersuchung des Chromoproteins hinsichtlich seiner photosensitiven bzw. photoreversiblen Eigenschaften wurden die Proben im Spektralphotometer bei 0°C mit dem Meßlicht bei verschiedenen Wellenlängen belichtet. Tabelle I, im Anhang des methodischen Teils (s. 2.10.2), gibt einen Überblick über die Wellenlängen des Lichtes, die Halbwertsbreite bei einer Spaltbreite des Monochromators von 1 mm sowie die auf die Wellenlänge des monochromatischen Lichtes bezogene Photonenstromdichte am Ort der Küvette.

Die Belichtung der Probe im Spektralphotometer hat den Vorteil, daß die Küvette in der Halterung verbleiben kann und somit nicht dejustiert wird.

2.7.4 Kinetik der Extinktionsänderung bei Belichtung der Systeme mit Licht der Wellenlänge 600 nm bzw. 484 nm

Ausgehend vom Chromoprotein des dunkeladaptierten Zustands

der Retina, sowohl mizellar gelöst als auch membrangebunden (beschallte Rhabdomyosomen), wurde die Kinetik der lichtinduzierten Isomerisierung des Rhodopsins zum Metarhodopsin bzw. vice versa bei konstanter Lichtintensität (vergl. Tabelle A) und einer Temperatur von 0°C untersucht.

Hierzu wurde das System, wie unter 2.7.3 beschrieben, zunächst bei $\lambda=600\pm 15$ nm in bestimmten Zeitintervallen von 15 s bis zu 1 min belichtet (s. Abb.) und nach jedem Belichtungsintervall die Extinktionsänderung bei 485 nm - dem Ort größter Extinktionsänderung - gemessen. Nach Erreichen des photochemischen Gleichgewichtszustandes ($\Delta E=0$) wurde in analoger Weise der Verlauf der Extinktionsänderung bei 485 nm durch definierte Belichtung bei $\lambda=485\pm 8$ nm ermittelt.

2.7.5 Messung der Kinetik der thermisch induzierten Denaturierung von Rhodopsin bzw. Metarhodopsin in Gegenwart von Digitonin

Zur Analyse der thermischen Veränderung des mizellar gelösten Chromoproteinsystems wurden die Proben im Anschluß an die Spektroskopie bei 0°C bei einer Temperatur von 20°C bzw. 30°C absorptionsspektroskopisch untersucht.

Die Mikroküvettenhalterung wurde mit Hilfe des Thermostaten auf 20°C bzw. 30°C erwärmt, währenddessen die Extrakt-haltige Küvette im Dunkeln bei 0°C aufbewahrt wurde.

Nach dem Erwärmen der Küvettenhalterung auf den Sollwert wurde die Mikroküvette bei Rotlicht ($\lambda > 690$ nm) innerhalb von 20...30 s im Wasserbad auf die Meßtemperatur erwärmt und unmittelbar danach spektroskopiert. Nach Aufnahme des Spektrums blieb die Probe bei konstanter Temperatur eine bestimmte Zeit im Dunkeln und wurde anschließend erneut spektroskopiert. Die Zahl der Messungen und die Dauer der

dazwischen liegenden Dunkelintervalle waren je nach Versuch verschieden und sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Die Kinetik der thermisch induzierten Denaturierung der Chromoproteine wurde aus der Extinktionsänderung des spektralen Maximums (λ_{max}) als Funktion der Zeit isothermer Dunkelintervalle ermittelt.

2.8 >in vivo< Adaptation der Astacus-Augen

Benutzt wurden im allgemeinen Krebse, die in einem lichtdichten Behälter bei 13°C 16...50 h bzw. nur 5 h dunkeladaptiert waren. Die Belichtung der Augen in vivo wurde unter Wasser im Aquarium bzw. Kunststoffbehälter durchgeführt. Der Beginn der Belichtung erfolgte zwischen 10 und etwa 13 Uhr. Es wurden verschiedene Belichtungsbedingungen gewählt, um deren Einfluß auf das Stoffmengenverhältnis von Rhodopsin zu Metarhodopsin zu untersuchen.

2.8.1 Belichtungsbedingungen

In einer Versuchsserie wurden Krebse mit Raumlicht (Leuchtstoffröhren, Osram weiß universal Energiestromdichte 50...70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) in Höhe des Auges belichtet. Die Helladaptation erfolgte bei 0°C, um metabolische Prozesse, wie z.B. die Wanderung von Pigmentgranula und die Neubildung von Rhodopsin zu verlangsamen. Hierzu wurden die dunkeladaptierten Krebse in ein mit Eis-Wasser gefülltes Aquarium gesetzt und - zur Anpassung der Körpertemperatur an das umgebende Medium - ca. 10 min im Dunkeln gehalten. Danach wurden die Krebse bis zu 6 h belichtet.

In einer zweiten Versuchsserie wurden beide Augen der Krebse bei 0°C mit Hilfe eines Doppellichtleiters (Kaltlichtquelle Volpi 250 W) über ein Schott-Kantenfilter OG 550 (Transmission: $\lambda > 540 \text{ nm}$) helladaptiert. Die Energiestromdichte betrug etwa $75 \pm 5 \text{ mW}/\text{cm}^2$ in Höhe der Augen.

Damit beide Augen gleichmäßig beleuchtet werden konnten, wurden die Krebse mit Hilfe einer Makropinzette, die an ein Stativ geklammert war, festgehalten und beide Lichtleiter im gleichen Abstand von den Augen fixiert. Die Belichtung dauerte von wenigen Minuten bis zu einer Stunde.

Nach dem Belichtungsintervall wurden die Augen der Krebse bei Rotlicht abgetrennt und nach dem beschriebenen Verfahren die Photorezeptormembranen isoliert und spektroskopisch analysiert.

2.8.2 Dunkeladaptationsbedingungen

Zur Untersuchung der Kinetik der Substitution des - infolge der Belichtung in vivo - gebildeten Metarhodopsins durch Rhodopsin, wurden Krebse nach Abtrennung eines der belichteten Augen bei einer Temperatur von 5, 10 bzw. 15°C in einem lichtdichten Aquarium dunkeladaptiert. Die Zeitintervalle der isothermen Dunkeladaptation lagen zwischen 24 h und etwa 160 h.

Nach dem jeweiligen Dunkelintervall wurde das zweite Auge abgetrennt, präpariert und nach der Reinigung der Photorezeptormembranen das Stoffmengenverhältnis der isomeren Chromoproteine spektralphotometrisch ermittelt.

2.9 Anhang des methodischen Teils

2.9.1 Berechnung des Rhodopsin-Stoffmengenanteils anhand spektroskopischer Daten

Analytische Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes zur Bestimmung der Konzentration bzw. des Stoffmengenanteils von Rhodopsin (R) und Metarhodopsin (M) in einem kolloid-dispersen System (sonifizierte Rhabdomsuspensionen)

Für die Extinktion des Chromoproteins gilt:

$$E_{\lambda_1} = \epsilon_{\lambda_1}^R \cdot c_R \cdot l + \epsilon_{\lambda_1}^M \cdot c_M \cdot l \quad (1)$$

$$E_{\lambda_2} = \epsilon_{\lambda_2}^R \cdot c_R \cdot l + \epsilon_{\lambda_2}^M \cdot c_M \cdot l \quad (2)$$

Daraus errechnen sich die Konzentrationen der Komponenten R und M:

$$c_R = \frac{E_{\lambda_1} \cdot \epsilon_{\lambda_2}^M - E_{\lambda_2} \cdot \epsilon_{\lambda_1}^M}{l(\epsilon_{\lambda_1}^R \epsilon_{\lambda_2}^M - \epsilon_{\lambda_2}^R \epsilon_{\lambda_1}^M)} \quad (3)$$

$$c_M = \frac{E_{\lambda_2} \cdot \epsilon_{\lambda_1}^R - E_{\lambda_1} \cdot \epsilon_{\lambda_2}^R}{l(\epsilon_{\lambda_1}^R \epsilon_{\lambda_2}^M - \epsilon_{\lambda_2}^R \epsilon_{\lambda_1}^M)} \quad (4)$$

E = Extinktion

$\epsilon(\lambda)$ = molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

c = Molarität von Rhodopsin bzw. Metarhodopsin

l = Schichtdicke der Probe

$$c_{\text{ges.}} = c_R + c_M = \text{const.}$$

$$n_{\text{ges.}} = c_{\text{ges.}} \cdot V$$

$$n_{\text{ges.}} = n_R + n_M$$

n_R = Stoffmenge des Rhodopsins im Suspensionsvolumen V

n_M = Stoffmenge des Metarhodopsins im Suspensionsvolumen V

Für den Stoffmengenanteil (Molenbruch) x der Chromoprotein-komponenten Rhodopsin und Metarhodopsin gilt:

$$x_R = \frac{n_R}{n_R + n_M} = \frac{c_R \cdot V}{n_{\text{ges.}}} = \frac{c_R}{c_{\text{ges.}}} = \frac{c_R}{c_R + c_M}$$

Substitution der Molaritäten in Gl. 3 und 4 durch den Molenbruch und Kombination der Gleichungen ergibt:

Bezugswellenlängen $\lambda_1 = 485 \text{ nm}$ (Ort größter Extinktionsänderung)
 $\lambda_2 = 536 \text{ nm}$ (isosbestischer Punkt) $\epsilon_{536}^R = \epsilon_{536}^M$

$$x_R = \frac{E_{485} \cdot \epsilon_{536}^M - E_{536} \cdot \epsilon_{485}^M}{E_{485} \cdot \epsilon_{536}^M - E_{536} \cdot \epsilon_{485}^M + E_{536} \cdot \epsilon_{485}^R - E_{485} \cdot \epsilon_{536}^R}$$

$$x_R = \frac{E_{485} \cdot \epsilon_{536}^M - E_{536} \cdot \epsilon_{485}^M}{E_{536} (\epsilon_{485}^R - \epsilon_{485}^M)}$$

$$x_R = \frac{E_{485}}{E_{536}} \cdot \frac{\epsilon_{536}^M}{\epsilon_{485}^R - \epsilon_{485}^M} - \frac{\epsilon_{485}^M}{\epsilon_{485}^R - \epsilon_{485}^M} \quad (5)$$

Die absoluten Extinktionswerte (E) und molaren Extinktionskoeffizienten der Chromoproteinisomere sind nicht bekannt. Basierend auf den hypothetischen Spektren von Rhodopsin

und Metarhodopsin (s. Abb. 15) können jedoch die Verhältnisswerte der molaren Extinktionskoeffizienten berechnet und in Gl. 5 eingesetzt werden:

$$\frac{\epsilon_{485}^M}{\epsilon_{485}^R} = A \qquad \frac{\epsilon_{485}^M}{\epsilon_{536}^M} = B$$

$$x_R = \frac{1}{\left(\frac{B}{A} - B\right)} \cdot \frac{E_{485}}{E_{536}} - \frac{1}{\left(\frac{1}{A} - 1\right)} = a \frac{E_{485}}{E_{536}} - b \quad (6)$$

Die Größen E_{485} und E_{536} sind aus dem gemessenen Spektrum des Sehpigmentes nicht direkt ablesbar.

Die Extinktionswerte E_{485} und E_{536} können dadurch ersetzt werden, daß als Bezugssystem die Spektren von zwei photostationären Zuständen gemessen werden. E_{485} und E_{536} lassen sich dann indirekt aus den Extinktionsdifferenzen zwischen den Spektren der photostationären Zustände und dem Spektrum des >in vivo< Zustands (α) bestimmen.

Photostationäre Zustände:

System nach Belichtung bei $\lambda_1 = 600 \pm 15$ nm ($x_R = 0.04$)

System nach Belichtung bei $\lambda_2 = 485 \pm 8$ nm ($x_R = 0.52$)

$$E_{536} = \frac{1}{B} E_{485} \text{ (600 nm bel.)} \quad (7)$$

E_{485} (600 nm bel.) $\cong$ E_{485} nach Belichtung bei 600 nm
(photost. Zustand)

Einsetzen von Gl. 7 in 6 ergibt:

$$x_R = b \frac{E_{485}(\alpha)}{E_{485}(600 \text{ nm bel.})} - b \quad (8)$$

$E_{485}(\alpha)$ $\hat{=}$ Extinktion des Chromoproteinsystems vor der Belichtung

$$\frac{E_{485}(600 \text{ nm bel.})}{E_{485}(485 \text{ nm bel.})} \approx 1,25 \pm 0,01 \quad (n=3) \quad (9)$$

$$\Delta E_{485}(600 \text{ nm} - 485 \text{ nm}) = E_{485}(600 \text{ nm bel.}) - E_{485}(485 \text{ nm bel.})$$

$$\Delta E_{485}(600 \text{ nm} - 485 \text{ nm}) = 1,25 E_{485}(485 \text{ nm bel.}) - E_{485}(485 \text{ nm bel.})$$

$$\Delta E_{485}(600 \text{ nm} - 485 \text{ nm}) = 0,25 E_{485}(485 \text{ nm bel.})$$

daraus folgt:

$$E_{485}(485 \text{ nm bel.}) = 4 \Delta E_{485}(600 \text{ nm bel.} - 485 \text{ nm bel.}) \quad (10)$$

$$E_{485}(\alpha) = E_{485}(485 \text{ nm bel.}) - \Delta E_{485}(485 \text{ nm bel.} - \alpha) \quad (11)$$

Einsetzen von Gl. 9 u. 11 in Gl. 8 ergibt:

$$x_R = b \left(\frac{E_{485}(485 \text{ nm bel.}) - \Delta E_{485}(485 \text{ nm bel.} - \alpha)}{1,25 E_{485}(485 \text{ nm bel.})} \right) - b \quad (12)$$

Einsetzen von Gl. 10 in Gl. 12:

$$x_R = b \left(\frac{1}{1,25} - \frac{\Delta E_{485} (485 \text{ nm bel.} - \alpha)}{5 \Delta E_{485} (600 \text{ nm bel.} - 485 \text{ nm bel.})} \right) - b$$

Mittelwert von b aus 3 Messungen: $A = 1.72 \pm 0.03$

$$b = -2.39 \pm 0.06$$

$$x_R = 0,48 \left(\frac{\Delta E_{485} (485 \text{ nm bel.} - \alpha)}{\Delta E_{485} (600 \text{ nm bel.} - 485 \text{ nm bel.})} + 1 \right)$$

Unter Berücksichtigung, daß das System im photostationären Zustand nach Belichtung bei $\lambda = 600 \pm 15 \text{ nm}$ noch einen Rhodopsinanteil von $x_R \approx 0.04$ hat, lautet die Gleichung zur Berechnung des Rhodopsin-Stoffmengenanteils:

$$x_R = 0,48 \left(\frac{\Delta E_{485} (485 \text{ nm bel.} - \alpha)}{\Delta E_{485} (600 \text{ nm bel.} - 485 \text{ nm bel.})} + 1 \right) + 0,04$$

$\Delta E_{485} (485 \text{ nm bel.} - \alpha)$: Extinktionsdifferenz bei $\lambda = 485 \text{ nm}$ zwischen dem Spektrum des photostationären Zustands nach 485 nm-Belichtung und dem Spektrum des >in vivo< Zustands.

$\Delta E_{485} (600 \text{ nm bel.} - 485 \text{ nm bel.})$: Extinktionsdifferenz bei $\lambda = 485 \text{ nm}$ zwischen dem Spektrum des photostationären Zustands nach 600 nm-Belichtung und demjenigen nach 485 nm-Belichtung.

Das Verfahren zur Berechnung der Stoffmengenanteile (Molenbruch^{*} des Rhodopsins bzw. Metarhodopsins) aus den spektralen Daten ist im Anhang des methodischen Teils unter 2.9.1 erläutert.

* Der Molenbruch bzw. Stoffmengenanteil x_k ist eine molare Größe, die das Verhältnis der Stoffmenge n_k einer Komponente k zur Gesamtstoffmenge $\sum n_k$ des Systems wiedergibt.

In diesem Zusammenhang soll der Begriff des Stoffmengenanteils x_k jedoch nur den Anteil von n_R bzw. n_M an der Stoffmenge des Chromoproteins ($n_R + n_M$) umfassen:

$$x_R = \frac{n_R}{n_R + n_M} \qquad x_M = 1 - x_R$$

n_R = Stoffmenge des Rhodopsins (R)

n_M = Stoffmenge des Metarhodopsins (M)

3. Ergebnisse

3.1 Rhabdom-Isolierung

Im Vergleich zu der früher beschriebenen Methode der Rhabdomisolierung (Hamacher, 1977), konnte die Rhabdomausbeute pro Retina von etwa 30 auf ca. 70% erhöht werden, d.h. bei einer durchschnittlichen Anzahl von ca. $2 \cdot 10^3$ Ommatidien pro Retina (Bernards, 1916) beträgt die Zahl der isolierten Rhabdome ca. $1,4 \cdot 10^3$.

Abb. 1 zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme einiger Rhabdome in Albumin-haltiger Saccharoselösung ($\rho = 1.15 \text{ g/ml}$) des Dichtegradienten. Die Rhabdome wurden aus einer (20 h) dunkeladaptierten Retina freigesetzt (s. 2.3) und durch Dichtegradientenzentrifugation von den übrigen Gewebebestandteilen der Retina-Suspension abgetrennt (s. 2.4).

Obwohl durch osmotische Effekte die Struktur der Rhabdome im Vergleich zum >in vivo< Zustand verändert ist, ist die orthogonale Anordnung der Mikrovillipakete lichtmikroskopisch erkennbar.

Die Adsorption von Pigmentgranula an die Rhabdomperipherie ist in Gegenwart von Albumin so weit vermindert, daß die absorptionsspektroskopische Analyse des Rhodopsinsystems durch noch verbleibendes Schirmpigment (Partikel $\emptyset 1 \mu\text{m}$) nicht wesentlich beeinflußt wird (vergl. 3.2 und 3.4).

Retinen, die in vivo hohen Lichtintensitäten (70 mW/cm^2 , ca. 1 h) ausgesetzt waren, liefern Rhabdome, deren orthogonale Mikrovillianordnung in Teilbereichen lichtmikroskopisch nicht mehr erkennbar ist. Darüber hinaus ist die Zahl der Rhabdomfragmente im Dichtegradienten prozentual größer als dies bei unbelichteten Photorezeptormembranen der Fall ist.

Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen an Retinen zeigen, hat intensive Belichtung der Augen (s.o.) eine z.T. zer-

störende Wirkung auf die Struktur der Rhabdome. So treten, neben strukturell unveränderten Mikrovilli, tubuläre Strukturen mutmaßlich fusionierter Mikrovilli auf (Winterhager, Dissertation 1979).

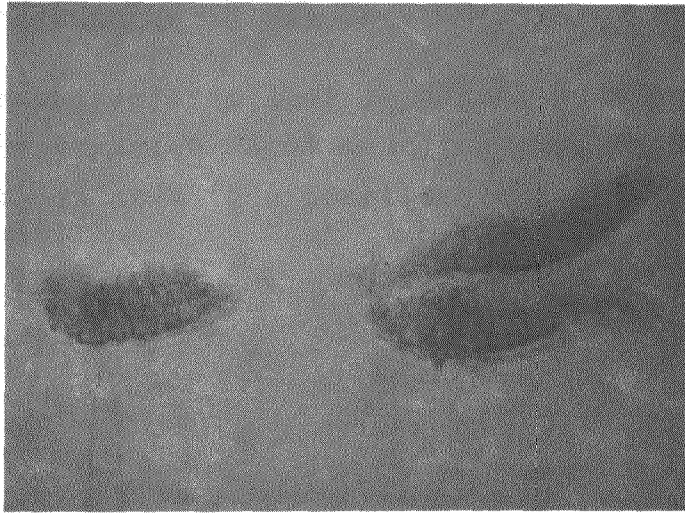


Fig. 1 Purified rhabdoms in albumin containing sucrose solution ($\rho = 1.15 \text{ g/ml}$).

3.1.1 Proteinzusammensetzung der gereinigten Photorezeptor-membran

Das Densitogramm der SDS-gelelektrophoretisch getrennten Proteine gereinigter Photorezeptormembranen - isoliert aus einer Retina - zeigt Abb. 2. Die Trennung der Proteine wurde in einem SDS-haltigen Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) durchgeführt. Der Anteil des Opsins (Bande 1) an

der Gesamtmenge der durch Coomassie Brilliant Blue angefärbten Proteine beträgt 40...50% und liegt somit deutlich unter dem Wert für Opsin in der Photorezeptormembran von Wirbeltieren (z.B. Rind: $\approx 80\%$, Daemen, 1973).

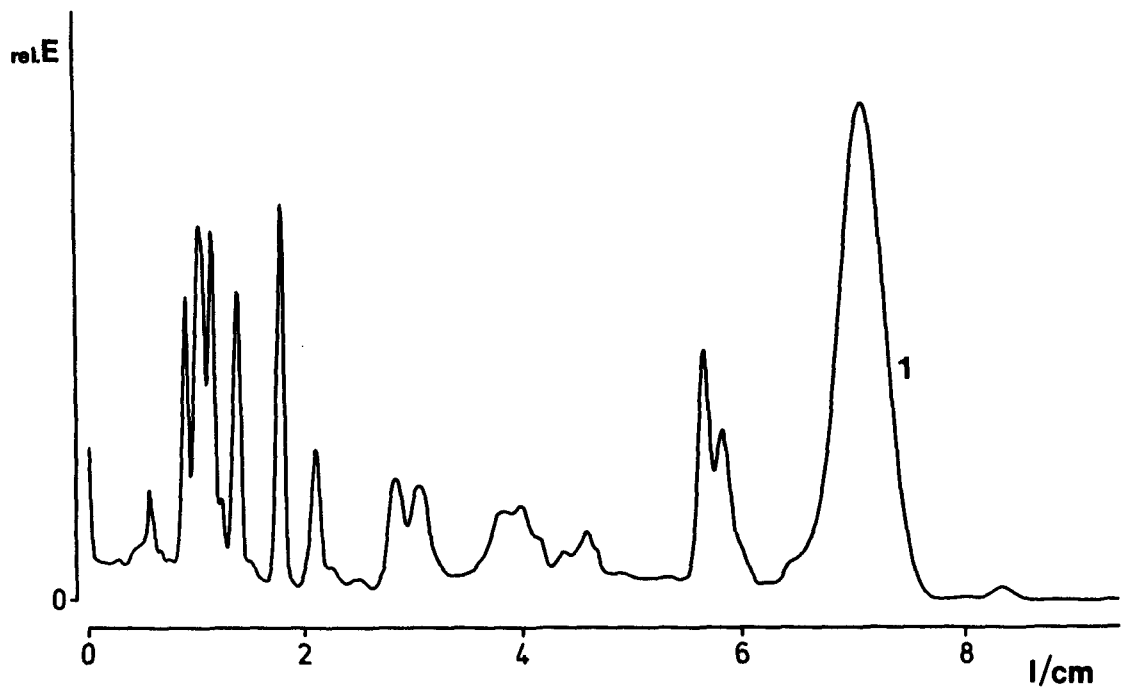


Fig. 2 Electrophoretical separation of *Astacus* photoreceptor membrane proteins on SDS-polyacrylamide gel (Laemmli, 1970). Protein pattern after staining with coomassie brilliant blue. Opsin (band 1) is the major protein (40...50% of the total amount)
ordinate: relative extinction at 580 nm
abszissa: distance from the origin

3.1.2 Proteinzusammensetzung der Digitonin-Rhabdomextrakte

In Digitonin-Rhabdomextrakten enthaltene Proteine wurden SDS-gelelektrophoretisch getrennt (Gelsystem nach Laemmli, 1970) und der Anteil des Opsins densitometrisch bestimmt. Das Densitogramm der aus gereinigten Photorezeptormembranen (einer Retina) extrahierten Proteine zeigt Abb. 2a. Opsin ist das dominierende Protein und entspricht etwa 80% der Gesamtproteinmenge im Extrakt.

Gelelektrophoretische Analyse des Rhabdomrückstandes nach Digitoninextraktion macht deutlich, daß Rhodopsin bei 0°C innerhalb von etwa 16 h praktisch quantitativ extrahiert wird.

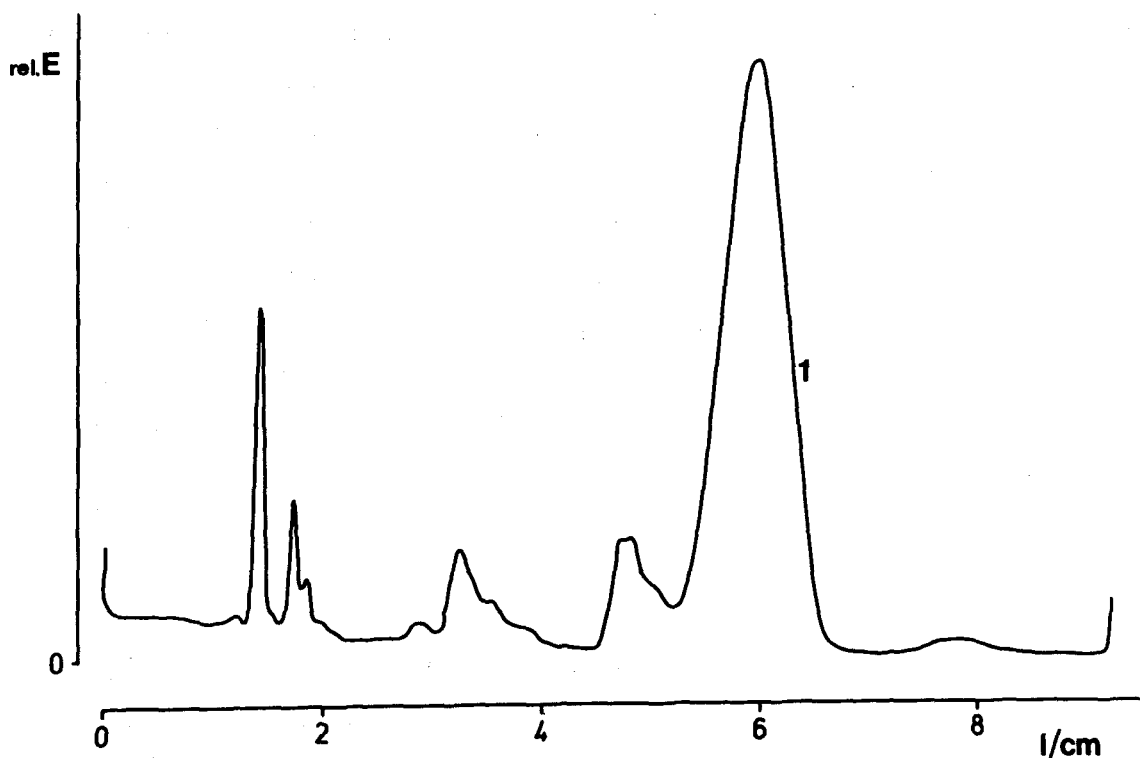


Fig. 2a Electrophoretical separation of proteins extracted with 2% digitonin from purified rhabdoms of a single retina. Protein pattern after staining with coomassie brilliant blue. The portion of opsin (band 1) is about 80% of the total amount of solubilized proteins

3.2 Spektrale Eigenschaften beschallter Rhabdomsuspensionen

Das kolloiddisperse System beschallter Rhabdomsuspensionen ermöglicht eine absorptionspektroskopische Untersuchung des Astacus-Rhodopsins im membrangebundenen Zustand.

Die methodische Verbesserung der Freisetzung und Isolierung, weitgehend von Schirmpigmentgranula befreiter Rhabdome (s. 2.3 u. 2.4) sowie die Erhöhung der Ausbeute an Photorezeptormembranen pro Retina erlauben eine makroskopische Analyse der spektralen Eigenschaften des Chromoproteinsystems einer Astacus-Retina.

Der Versuch mißlang, unbeschallte Rhabdomsuspensionen - in gleicher Weise wie die beschallten - spektroskopisch exakt zu untersuchen, da es unter den gegebenen Bedingungen praktisch nicht möglich war, innerhalb der Saccharoselösung eine zeitlich konstante, homogene Verteilung der Rhabdome zu erreichen. Voraussetzung einer homogenen Verteilung der Rhabdome ist eine identische Dichte der Photorezeptormembran und des Suspensionsmilieus. Sind beide Phasen nicht isopyknisch, flotieren die Rhabdome an die Oberfläche der wäßrigen Phase oder sedimentieren auf den Boden der Küvette. Beschallte Rhabdomsuspensionen (s. 2.5) dagegen sind homogene Suspensionen, die reproduzierbare Extinktionsmessungen ermöglichen.

3.2.1 Extinktionsspektren

Das bei 0°C gemessene Extinktionsspektrum ($\lambda = 680...370$ nm) einer beschallten Rhabdomsuspension - isoliert aus einer (20 h) dunkeladaptierten Astacus-Retina - zeigt Abb. 3 Kurve 1. Unter der Voraussetzung, daß das dunkeladaptierte Auge als einzige Chromoproteinkomponente Rhodopsin enthält, ist Spektrum 1 dem Rhodopsin zuzuordnen. Das Extinktionsmaximum bei 525...530 nm ist nicht notwendigerweise identisch mit dem realen $\lambda_{\max}$, da der durch Streuung der Suspension

und Schirmpigmentreste bedingte Extinktionsanteil nicht bekannt ist. Das Spektrum wurde zweimal hintereinander gemessen. Da beide Spektren praktisch gleich sind, wird deutlich, daß das Meßlicht des Spektralphotometers keine signifikante Extinktionsänderung und somit keine wesentliche lichtinduzierte Isomerisierung des Rhodopsins zum Metarhodopsin bewirkt.

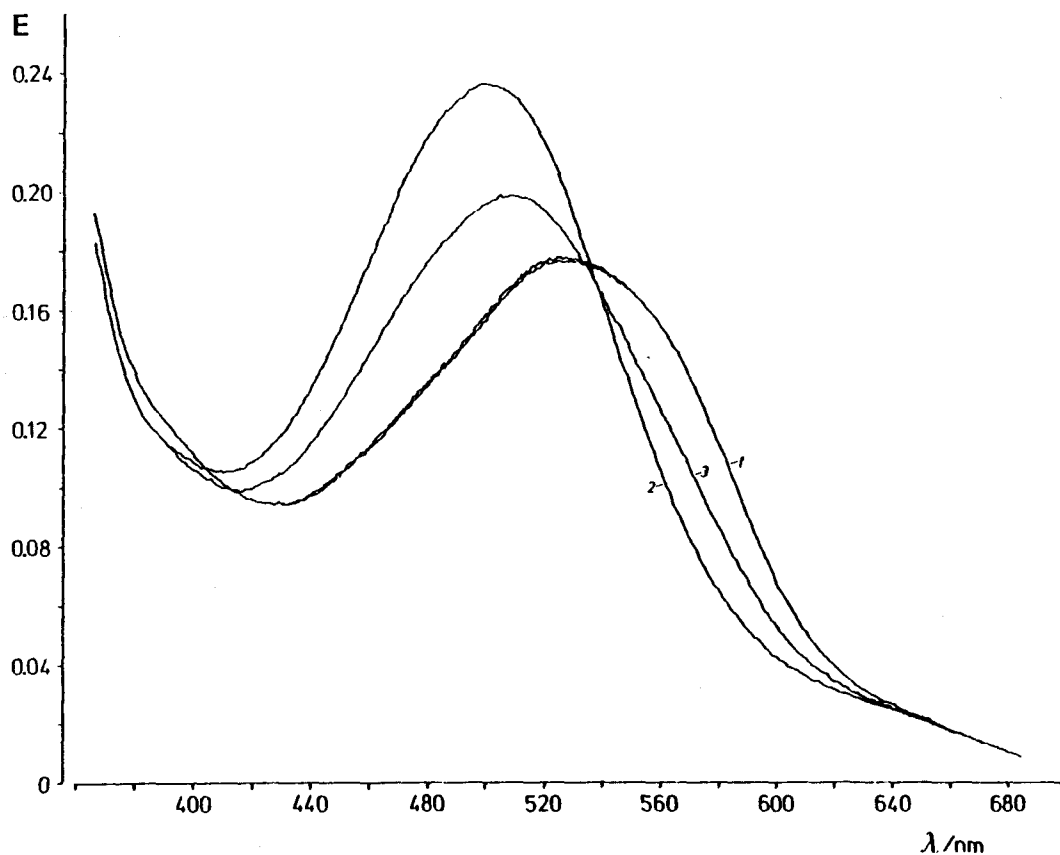


Fig. 3 Extinction spectra of a sonicated rhabdom suspension at 0°C and pH 7.0, isolated from a single retina:
 curve 1: spectrum of the original system (photoreceptor membrane of dark-adapted crayfish); two times measured
 curve 2: spectrum of the photostationary state after irradiation at $\lambda = 600 \pm 15$ nm
 curve 3: spectrum of the photostationary state after irradiation at $\lambda = 485 \pm 8$ nm

Die Belichtung der Suspension bei $\lambda = 600 \pm 15$ nm führt zur Bildung von Metarhodopsin und hat eine hypsochrome Verschiebung des Spektrums zur Folge, verbunden mit einer deutlichen Extinktionszunahme im Wellenlängenbereich 400... 535 nm und einer Extinktionsabnahme zwischen 535 und 650 nm. Kurve 2 in Abb. 3 zeigt den Verlauf des Spektrums im photostationären Zustand, d.h. bei fortgesetzter Einwirkung des Lichtes ($\lambda = 600$ nm) bleibt das Extinktionsspektrum unverändert (s. 3.3).

Nach Photoisomerisierung durch Belichtung bei 600 nm besteht das System hauptsächlich aus Metarhodopsin ($x_M \approx 0.96$) (s. 3.8.1).

3.2.2 Photoreversibilität des Rhodopsin-Metarhodopsin-Systems

Bestrahlt man das bei 600 nm belichtete Sehpigment (Spektrum 2 Abb. 3) bei einer Wellenlänge von 485 ± 8 nm, erfolgt eine Extinktionsänderung in der umgekehrten Richtung: die Extinktion nimmt zwischen 390 und 537 nm ab und im Bereich 537...640 nm zu. Kurve 3 der Abb. 3 zeigt das Extinktionsspektrum nach Erreichen des photostationären Zustandes der 485 nm-Belichtung.

Die Belichtung bei 485 nm hat demnach eine photochemisch induzierte Umkehrung der Rhodopsinisomerisierung zur Folge, primär gebildetes Metarhodopsin wird unter den gegebenen Bedingungen teilweise zum Rhodopsin isomerisiert.

Die Reversibilität dieses photochemischen Prozesses wird auf Abb. 4 deutlich. Die Abbildung zeigt eine Serie von insgesamt vier Extinktionsspektren nach zweifacher, alternierender Belichtung bei 600 nm bzw. 485 nm. Die Spektren beweisen, daß die lichtinduzierten photostationären Zustände reproduzierbar sind und unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Denaturierung des membrangebundenen Chromoproteins stattfindet.

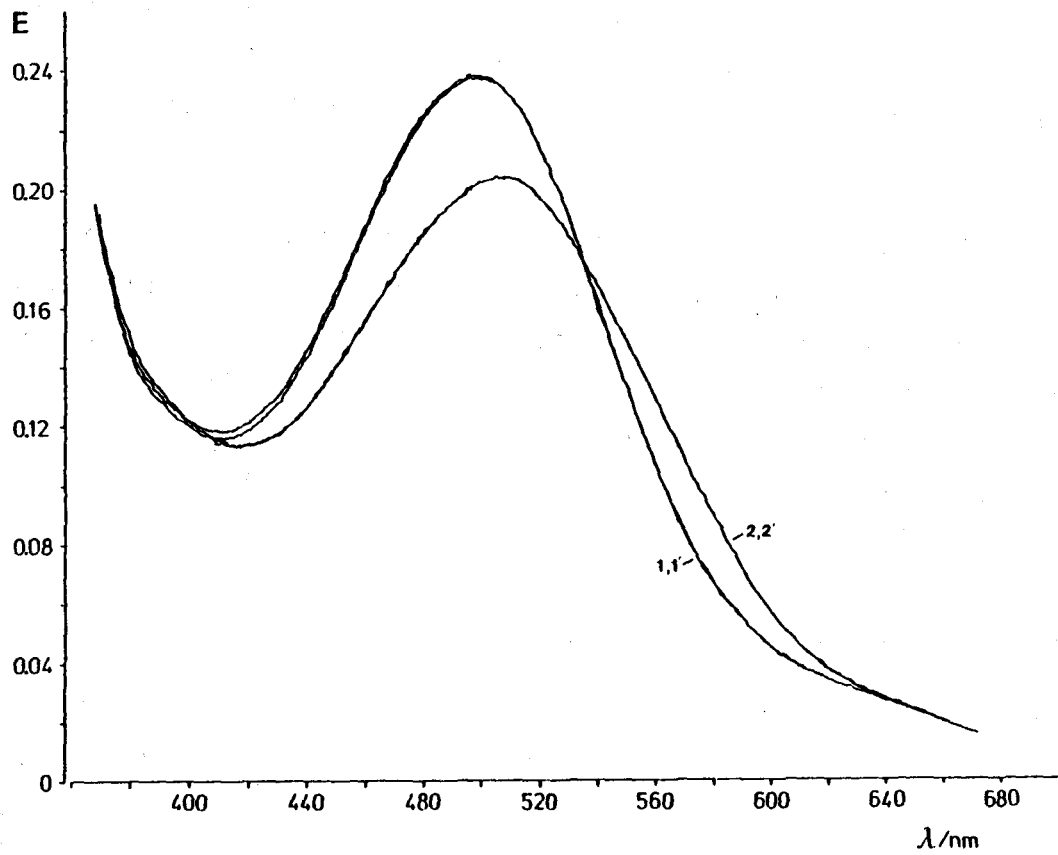


Fig. 4 Extinction spectra of different photostationary states of the membrane-bound chromoprotein (sonicated rhabdoms) after alternating irradiation at 600 ± 15 nm (spectra 1,1') and 485 ± 8 nm (spectra 2,2'); temperature: 0°C , pH 7.0; sequence of measurements: 1; 2; 1'; 2'.

Die isosbestischen Punkte der Spektren in Abb. 3 und 4 liegen im Bereich 534...537 nm.

3.2.3 Normierte Differenzspektren

Abb. 5 zeigt die normierte Differenz zwischen dem Spektrum der sonifizierten Rhabdomyosuspension nach Belichtung bei 600 ± 15 nm und dem Spektrum des >unbelichteten< (dunkeladaptierten) Systems.

Die Extremwerte des Differenzspektrums zeigen die Wellenlängen der größten spektralen Änderung beim lichtinduzierten Übergang vom unbelichteten in den bei 600 nm belichteten Zustand. Einer maximalen Abnahme der Extinktion bei ca. 570 nm steht eine maximale Zunahme bei 485 nm gegenüber. Der isosbestische Punkt ($\Delta E = 0$) befindet sich bei 536 nm. Die Reproduzierbarkeit der spektralen Änderung wird durch die geringe Standardabweichung der normierten ΔE -Werte verdeutlicht (vergl. Tabelle I im Anhang).

Das normierte Differenzspektrum zwischen den photostationären Zuständen: $E(\lambda)$ 600 nm-belichtet minus $E(\lambda)$ 485 nm-belichtet, als Mittelwert der Messungen von sechs Präparationen, ist in Abb. 6 wiedergegeben. Durch Belichtung des 600 nm-adaptierten Zustands bei 485 ± 8 nm nimmt die Extinktion bei ca. 485 nm maximal ab und bei 570 nm maximal zu. Durch anschließende Belichtung bei 600 ± 15 nm wird die durch 485 nm-Belichtung verursachte spektrale Änderung vollständig umgekehrt (s. Abb.4).

Der isosbestische Punkt der Differenzspektren liegt im Bereich 535 ± 3 nm.

Trotz der größeren Standardabweichungen der Differenzwerte in Abb. 6 im Vergleich zu denjenigen in Abb. 5 sind die Differenzspektren in erster Näherung gleich. So ist der Verhältnisswert der maximalen Extinktionsänderungen $|\Delta E_{485} / \Delta E_{570}|$ in Abb. 5 $1,57 \pm 0,06$ derjenige in Abb.6 $1,74 \pm 0,21$.

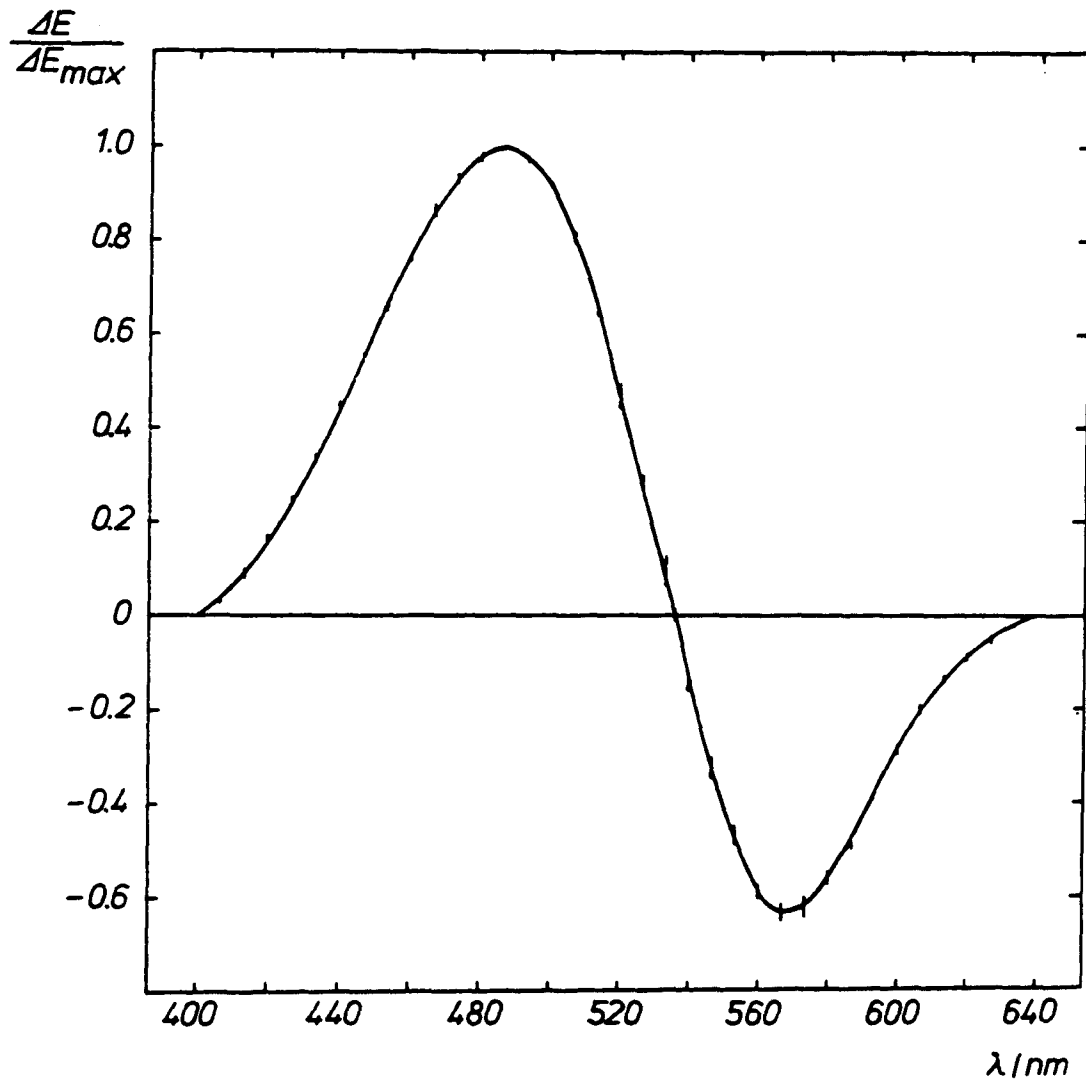


Fig. 5 Normalized >difference spectrum< between the spectrum of sonicated rhodopsins after irradiation at 600 ± 15 nm and the spectrum of dark-adapted sonicated rhodopsins. Error bars indicate the standard error of the mean value ($n=3$).

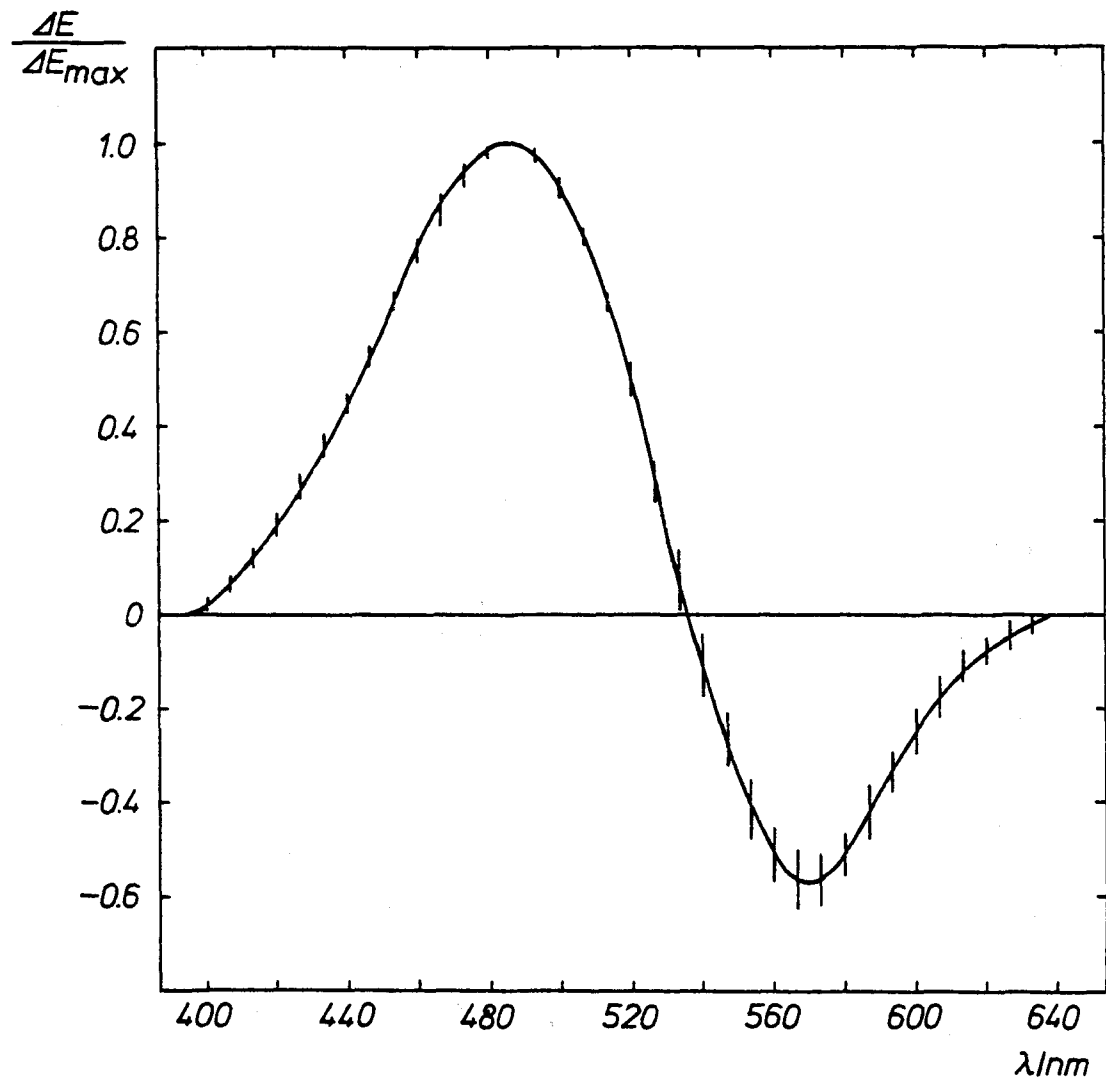


Fig. 6 Normalized >difference spectrum< between the spectrum of sonicated rhabdom suspensions in the photostationary state after irradiation at 600 ± 15 nm and the spectrum after irradiation at 485 ± 8 nm ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$, $n=6$).

3.3 Verlauf der photochemisch induzierten Isomerisierung des membrangebundenen Sehpigmentes

3.3.1 Belichtung des dunkeladaptierten Sehpigmentes mit konstanter Lichtintensität bei $\lambda_e = 600 \text{ nm}$ und 0°C .

Wie bereits unter 3.2.1 erwähnt, hat 600 nm-Belichtung des dunkeladaptierten Sehpigmentes eine Veränderung der Stoffmenge des Rhodopsins zugunsten des Metarhodopsins zur Folge.

Der Verlauf des lichtinduzierten Übergangs von Rhodopsin zum Metarhodopsin kann - bei konstanter Lichtintensität - durch Messung der Extinktionsänderung bei einer bestimmten Wellenlänge, als Funktion der Belichtungszeit, ermittelt werden.

Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Extinktionsänderung proportional der Konzentrationsänderung der Sehpigmente ($\Delta E \propto \Delta c$); einer Konzentrationsabnahme des Rhodopsins entspricht eine äquivalente Zunahme der Metarhodopsinkonzentration. Ausgehend vom unbelichteten Rhodopsinsystem ist die zeitliche Extinktionsänderung proportional der zeitlichen Konzentrationsänderung des Rhodopsins und somit proportional der Reaktionsgeschwindigkeit dieser formal einstufigen, photoreversiblen Reaktion: $R \rightleftharpoons M$.

Abb. 7 zeigt - ausgehend vom unbelichteten System (Spektrum 1) - den Verlauf der Spektren nach verschiedenen Belichtungsintervallen mit konstanter Lichtintensität ($180 \mu\text{W}/\text{cm}^2$; $\lambda_e = 600 \text{ nm}$). Die Spektren haben den gleichen isosbestischen Punkt (ca. 535 nm) und nähern sich mit zunehmender Belichtungszeit dem Spektrum (8) des photostationären Zustands.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten dieser lichtinduzierten Isomerisierung des Rhodopsins wurde die Extinktionsänderung bei 485 nm - dem Ort größter Extinktionszunahme - als Funktion der Belichtungszeit t gemessen (s. Abb.8).

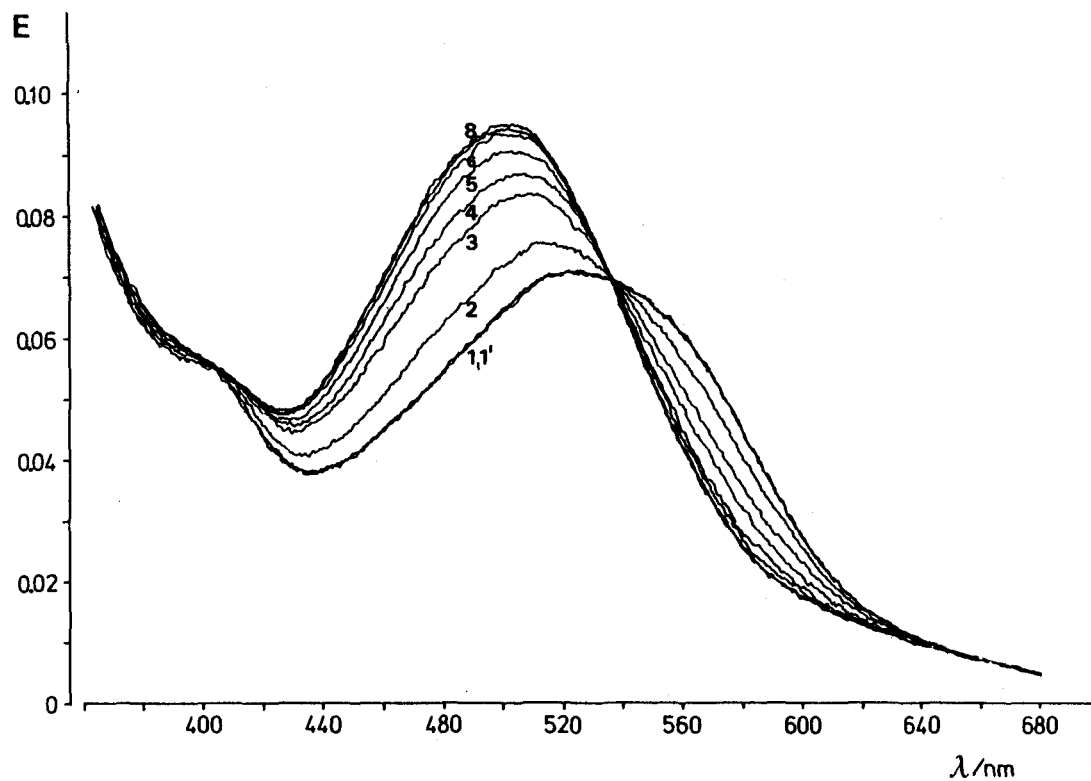


Fig. 7 Spectral changes in the course of the conversion of rhodopsin to metarhodopsin at 0°C and pH 7.0. The system of a sonicated suspension of dark-adapted rhabdoms (spectra 1, 1') was irradiated with light of 600 ± 15 nm for 15, 45, 75, 120, 180, 240 and 400 s (photostationary state); (curves 2...8).

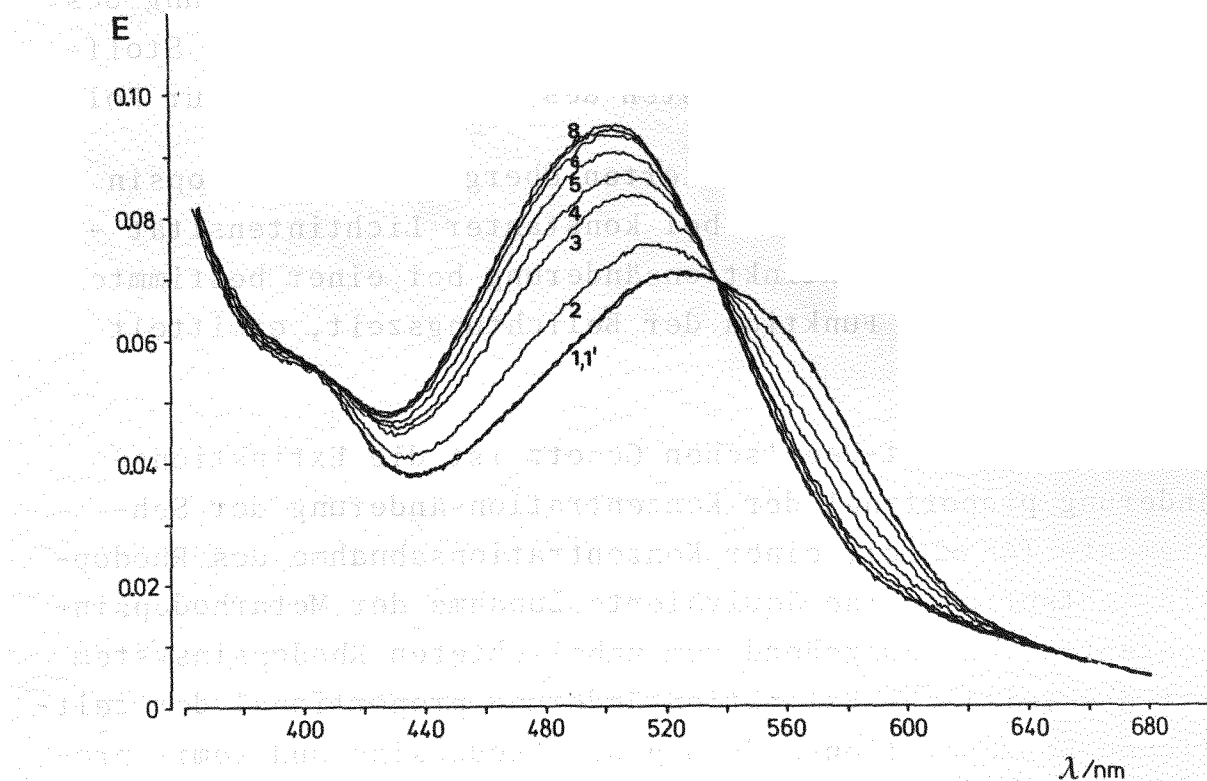


Fig. 7 Spectral changes in the course of the conversion of rhodopsin to metarhodopsin at 0°C and pH 7.0. The system of a sonicated suspension of dark-adapted rhabdoms (spectra 1, 1') was irradiated with light of 600 ± 15 nm for 15, 45, 75, 120, 180, 240 and 400 s (photostationary state); (curves 2...8).

Die Funktion $\Delta E_{485}(t)$ zeigt eine mit zunehmender Belichtungszeit kleiner werdende Änderung von ΔE_{485} , die sich asymptotisch einem Grenzwert $\Delta E_{485}(t \rightarrow \infty)$ nähert. Dieser maximale Wert ist gleich der Differenz zwischen E_{485} des photostationären Zustands nach 600 nm-Belichtung und E_{485} des >unbelichteten< Systems (vergl. Spektren 1 und 8 in Abb. 7). Bei der gewählten Lichtintensität (s.o.) hat das System nach ca. 7 min Belichtung den photostationären Zustand erreicht.

$\Delta E_{\lambda_M}(t)$ läßt sich - bei zeitlich konstanter Lichtintensität $I(\lambda_e)$ - durch folgende Exponentialfunktion beschreiben:

$$\Delta E_{\lambda_M, I}(t) = \Delta E_{\lambda_M}(I \cdot t \rightarrow \infty) [1 - \exp(-kt)]$$

$\Delta E_{\lambda_M}(I \cdot t \rightarrow \infty)$ ist die maximale Extinktionsänderung bei der Meßwellenlänge λ_M (Differenz der photostationären Zustände); $I \cdot t$ ist das Produkt aus der Lichtintensität $I(\lambda_e)$ und der Belichtungszeit t .

k ist formal die Geschwindigkeitskonstante der lichtinduzierten Isomerisierung des Chromoproteins und ist eine Funktion der molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda_e)$ und der Quantenausbeuten $\gamma(\lambda_e)$ von Rhodopsin und Metarhodopsin sowie der Lichtintensität $I(\lambda_e)$ (Quantenflußdichte) bei der Belichtungswellenlänge λ_e (näheres s. K. Hamdorf, 1979).

Gemäß obiger Exponentialfunktion erfolgt die Extinktionsänderung, und damit die lichtinduzierte Isomerisierung des Astacus-Chromoproteins bei konstanter Belichtung, nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung.

Trägt man den natürlichen Logarithmus von $(\Delta E_{\lambda_M}(I \cdot t \rightarrow \infty) \text{ minus } \Delta E_{\lambda_M}(t))$ gegen die Belichtungszeit auf, so kann aus der Steigung der sich ergebenden Geraden (Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden: $r = 0.999$) ein k -Wert von $0.91 \pm 0.05 \text{ min}^{-1}$ ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) errechnet werden.

Die Abhängigkeit der Zeitkonstanten von der Lichtintensität wurde nicht ermittelt. (Mit zunehmender Lichtintensität wird der k -Wert größer.)

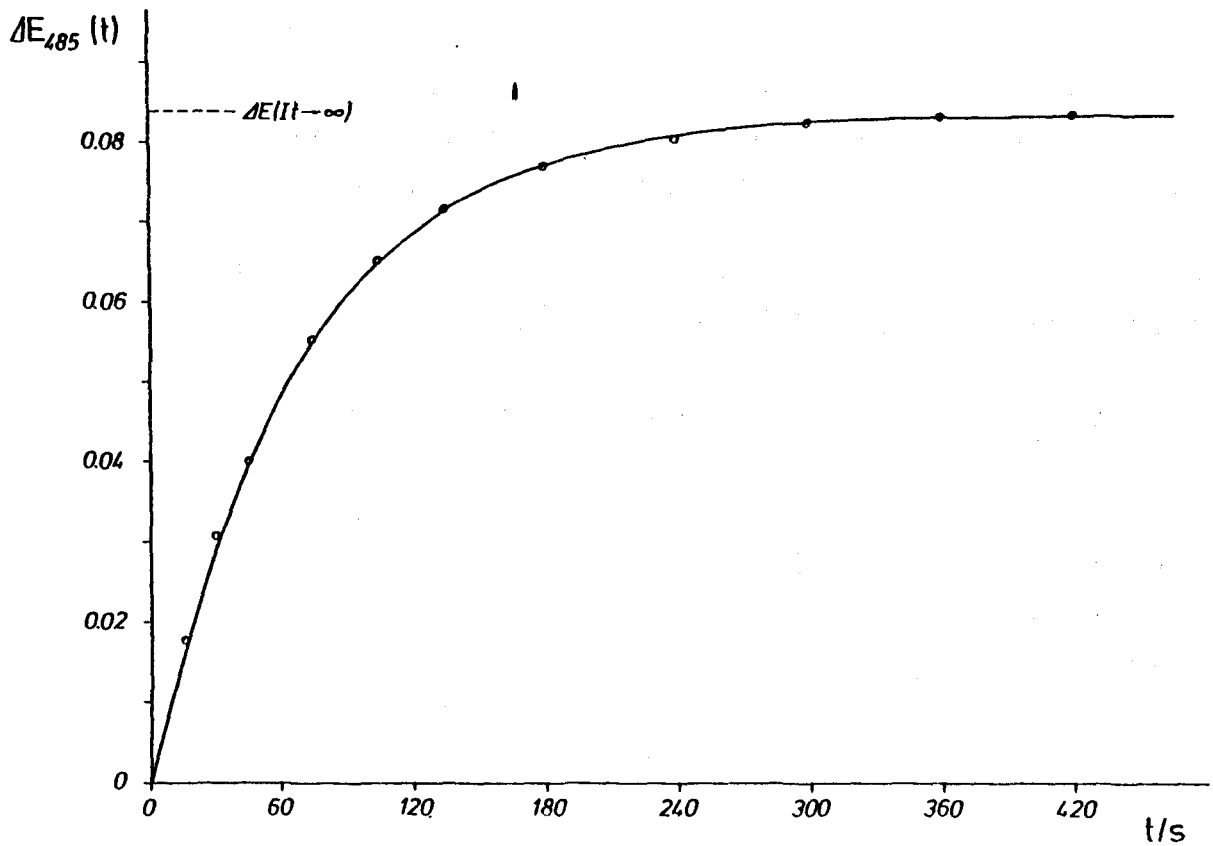


Fig. 8 Extinction change measured at 485 nm as a function of irradiation time. Starting from the unexposed system (rhodopsin), the sonicated suspension of rhabdoms was successively irradiated at 600 ± 15 nm with a light intensity of $180 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. $\Delta E(I \cdot t \rightarrow \infty)$ is the extreme value of extinction change.

3.3.2 Belichtung des 600 nm-adaptierten Sehpigmentes mit konstanter Lichtintensität bei 485 nm und 0°C

Ausgehend vom 600 nm-adaptierten Zustand des Sehpigmentes wurde - entsprechend der Ermittlung des Zeitgesetzes der Metarhodopsinbildung (s. 3.3.1) - die durch Belichtung bei 485 ± 8 nm (Energiestromdichte: $85 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) verursachte Extinktionsänderung ΔE_{485} als Funktion der Belichtungszeit t gemessen.

Belichtung bei 485 nm bewirkt eine Abnahme von E_{485} . Der Grenzwert der Extinktionsänderung $\Delta E_{485}(I \cdot t \rightarrow \infty)$ ist bei der gewählten Lichtintensität nach etwa 6 min Bestrahlung erreicht. Wie unter 3.3.1 erläutert, läßt sich die zeitliche Extinktionsänderung (Abb. 9) durch eine Exponentialfunktion beschreiben. Die photochemisch induzierte Isomerisierung des Metarhodopsins zum Rhodopsin verläuft somit - analog dem Übergang von Rhodopsin zum Metarhodopsin - formal nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung.

Durch mathematische Auswertung der linearisierten Funktion $\Delta E_{485}(t)$ errechnet man aus der Steigung der Regressionsgeraden ($r = 0.998$) den k-Wert: $0.77 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$ ($\bar{x} \pm s$, $n=3$).

Vergleicht man die absoluten Extinktionsänderungen

$|\Delta E_{485}(I \cdot t \rightarrow \infty)|$ deren Größe Abb. 8 u. 9 zeigen, so ist ΔE_{485} , ausgehend vom 600 nm-adaptierten Zustand bei 485 nm-Belichtung, um etwa den Faktor 2 kleiner als ΔE_{485} , die durch Belichtung des >dunkeladaptierten< Systems bei 600 nm verursacht wird.

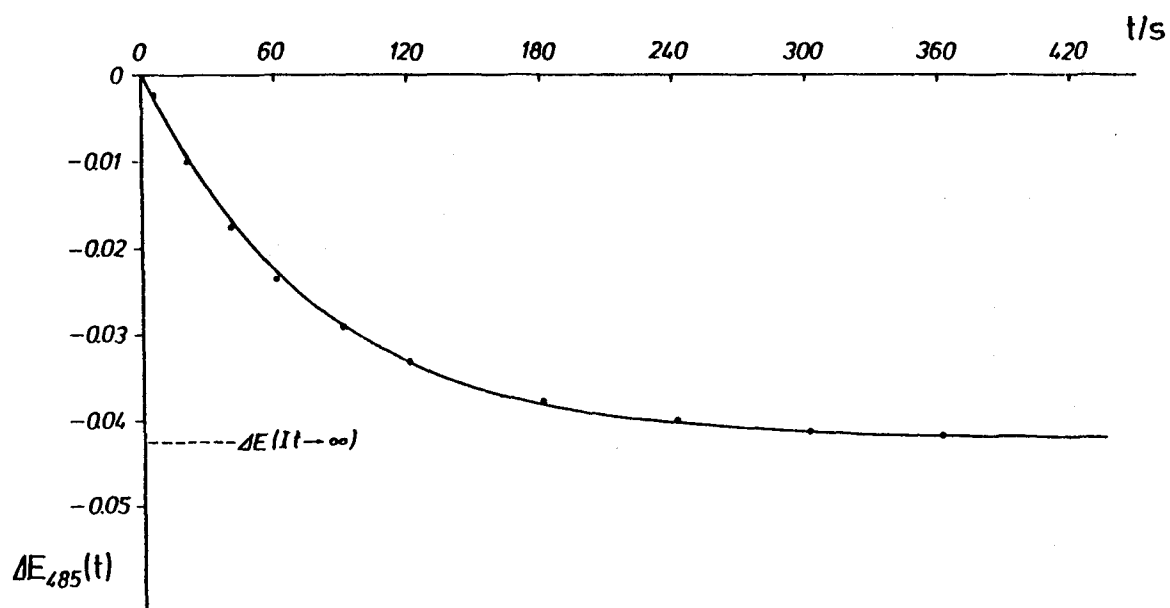


Fig. 9 Extinction change measured at 485 nm as a function of irradiation time. Starting from the photostationary state (irradiated at 600 ± 15 nm), the system was successively irradiated at 485 ± 8 nm with a light intensity of $85 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. $\Delta E(I \cdot t \rightarrow \infty)$ is the extreme value of extinction change.

3.4 Spektrale Eigenschaften der Digitonin-Rhabdomextrakte bei 0°C

In Analogie zu den beschallten Rhabdomsuspensionen wurden die Digitonin-Rhabdomextrakte je einer Retina bei 0°C und pH 7.0 absorptionsspektroskopisch analysiert und die photo-reversiblen Eigenschaften des Systems untersucht.

3.4.1 Extinktionsspektren

Das Spektrum des Digitonin-Rhabdomextraktes einer dunkel-adaptierten Retina (Spektrum 1, Abb. 10) hat gegenüber dem Basisspektrum (Küvette mit Digitoninlösung) Extinktionsmaxima bei etwa 515...520 nm bzw. bei 340 nm. Das Spektrum wurde dreimal hintereinander gemessen. Die Identität der Spektren bestätigt, daß das Meßlicht keine signifikante Isomerisierung des Sehpigmentes zur Folge hat. Belichtet man den Extrakt bei $625 \pm 15 \text{ nm}$, beobachtet man eine hypsochrome Verschiebung des Spektrums im sichtbaren Bereich, verbunden mit einer Zunahme des $E_{\lambda_{\text{max}}}$ -Wertes um etwa den Faktor 1.4.

Kurve 2 zeigt das Spektrum des photostationären Zustands nach Belichtung bei 625 nm ($\lambda_{\text{max}} \approx 500 \text{ nm}$). Die Belichtung hat keinen Einfluß auf die Bande mit dem Maximum bei 340 nm. Der isosbestische Punkt befindet sich, entsprechend den Spektren beschallter Rhabdomsuspensionen, bei etwa 536 nm.

Als Kriterium der >optischen Reinheit< von Rhodopsinpräparationen dient das Extinktionsverhältnis ($E_{280}/E_{\lambda_{\text{max}}(\text{R})}$) der Spektren von Detergensextrakten der Photorezeptormembran. Das E-Verhältnis der Digitonin-Rhabdomextrakte beträgt 3.8...4.2 und ist etwa 25% größer als der Wert, der an Digitoninextrakten von Tintenfisch-Photorezeptormembranen gemessen wurde ($E_{280}/E_{480} \approx 3.3$) (Nashina et al., 1978).

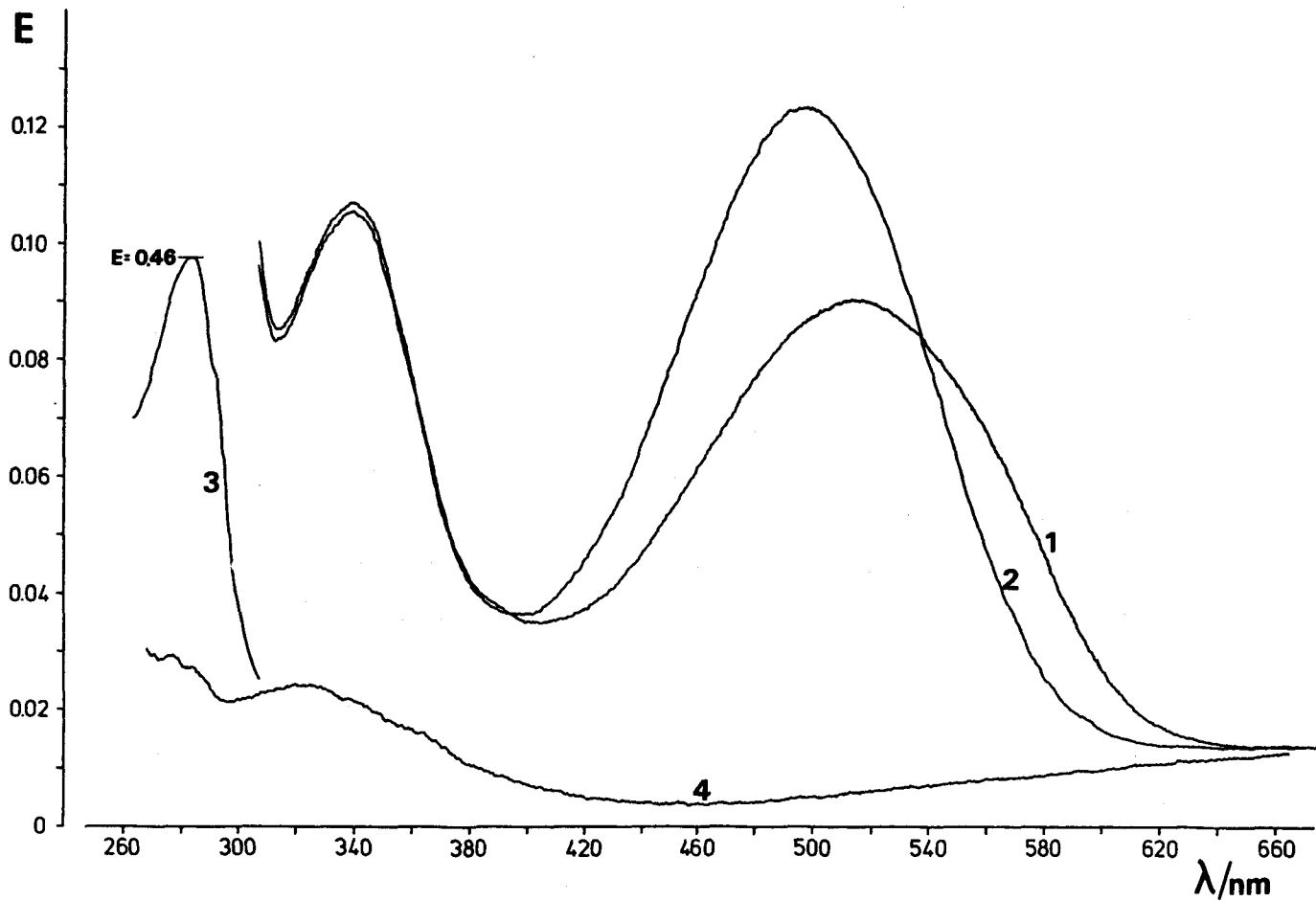


Fig. 10 Extinction spectra of a digitonin extract obtained from purified rhabdoms, measured at 0°C and pH 7.0
 spectrum 1: unexposed extract from rhabdoms of a single dark-adapted retina
 spectrum 2: after 7 min irradiation at 625 ± 15 nm (photo-stationary state)
 The protein band at 280 nm (3) was measured in the absorption range of 0...0.5. After subtraction of the baseline (4) E_{280} is about 0.46.

Die Größe des Extinktionsverhältnisses wird durch die Menge der - neben dem Opsin - in den Rhabdomen enthaltenen Proteine bestimmt. Der prozentuale Anteil des Opsins kann durch Extraktion der Photorezeptor-membran mit wäßrigen Pufferlösungen erhöht werden (Diplomarbeit, Baer, 1980). Es wurde jedoch nicht untersucht, ob sich diese Extraktion auf den Opsinanteil im Detergensextrakt und somit auf eine Verkleinerung des $(E_{280}/E_{\lambda_{\max}})$ -Wertes auswirkt.

3.4.2 Photoreversibilität des mizellar gelösten Chromoproteins

Eine bemerkenswerte Eigenschaft des Digitonin-gelösten Astacus-Sehpigmentes ist die Photoreversibilität bei einer Temperatur von ca. 0°C.

Wird das im photostationären Zustand ($\lambda_e = 575 \text{ nm}$) befindliche Chromoproteinsystem bei $465 \pm 5 \text{ nm}$ belichtet, resultiert eine Extinktionsabnahme im Bereich 410...535 nm sowie eine Zunahme zwischen 535 nm und etwa 630 nm. Die Maxima der Extinktions-änderung liegen bei 485 nm bzw. 570 nm. Die Reversibilität dieser lichtinduzierten, spektralen Änderung wird in Abb. 11 deutlich. Die Spektren der photostationären Zustände wurden nach zweimaliger, alternierender Belichtung bei $575 \pm 12 \text{ nm}$ (Spektren 1;1') bzw. $465 \pm 5 \text{ nm}$ (Spektren 2;2') gemessen.

Die Reproduzierbarkeit der spektralen Änderung - selbst nach einigen Stunden - ist ein Beweis für die thermische Stabilität der beiden Chromoprotein-Isomere in Digitonin bei etwa 0°C.

3.4.3 Normiertes Differenzspektrum

Bildet man das Differenzspektrum zwischen dem photostationären Zustand nach 625 nm-Belichtung und dem >unbelichteten< Digitonin-Rhabdomextrakt (Spektrum 2 minus Spektrum 1, Abb. 10) und setzt die Differenzwerte $\Delta E(\lambda)$ in Relation zur maximalen Extinktionsänderung (ΔE_{485}), so erhält man ein >normiertes Differenzspektrum<, das praktisch mit demjenigen übereinstimmt, welches bei der spektroskopischen Analyse beschallter Rhabdomsuspensionen ermittelt wurde (s. Abb. 5 und Tab. I).

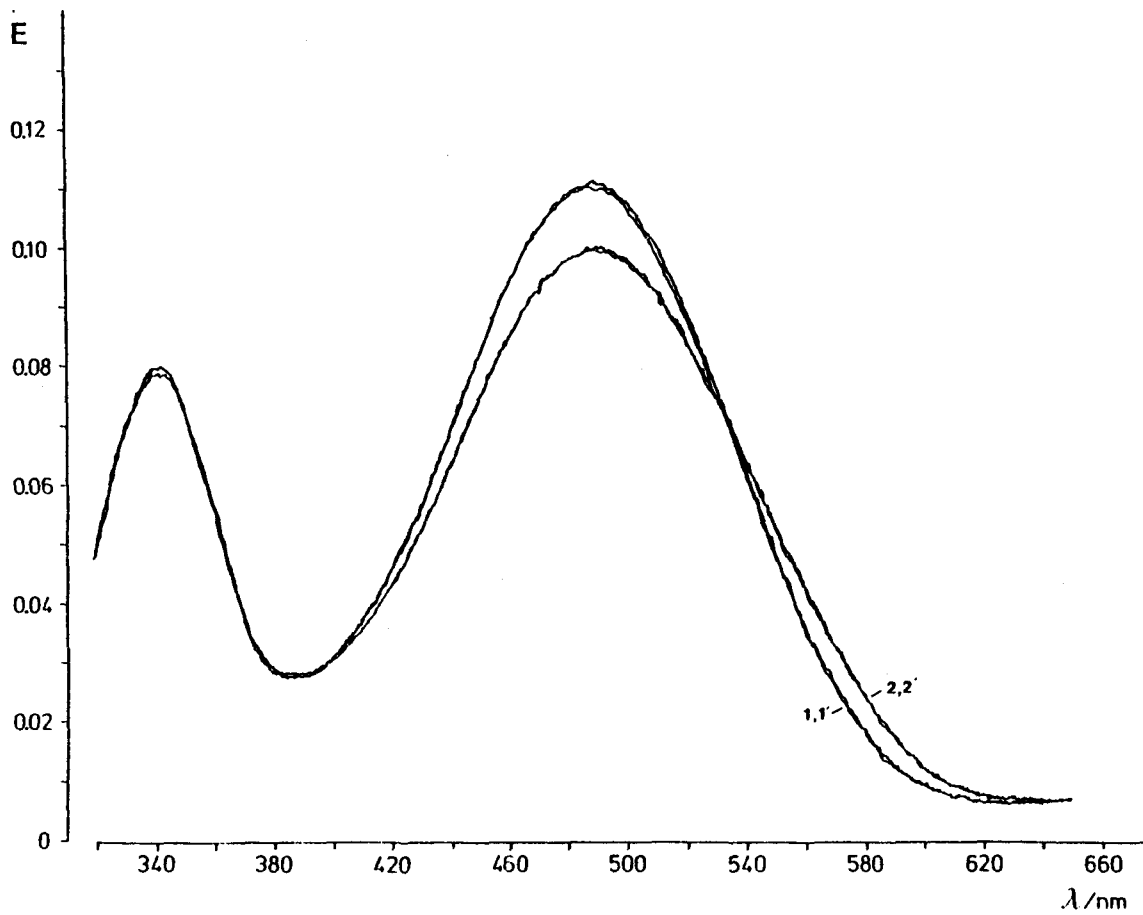


Fig. 11 Extinction spectra of the photoreversible, photostationary states of the chromoprotein in 2% digitonin at 0°C and pH 7.0 after alternating irradiation at 575 ± 12 nm (spectra 1, 1') and 465 ± 5 nm (spectra 2, 2'), respectively.
sequence of measurements: 1; 2; 1'; 2'.

Die Identität der Differenzspektren indiziert gleiche spektroskopische Eigenschaften des Astacus-Sehpigmentes bei 0°C sowohl mizellar gelöst im Digitonin-Rhabdomextrakt als auch im System beschallter Rhabdomsuspensionen.

3.5 Kinetik der photochemisch induzierten Isomerisierung des mizellar gelösten Sehpigmentes

Es wurde absorptionsspektroskopisch untersucht, ob die formalen Geschwindigkeitskonstanten der lichtinduzierten Isomerisierung des mizellar gelösten Chromoproteins (Digitonin-Rhabdomextrakt) mit denen identisch sind, die aus der spektralen Änderung sonifizierter Rhabdomsuspensionen errechnet wurden (s. 3.3).

Hierzu wurden die Extrakte bei konstanter Lichtintensität und 0°C - analog den unter 3.3.1 und 3.3.2 beschriebenen Bedingungen - belichtet und die E_{485} -Änderung als Funktion der Belichtungszeit aufgezeichnet. Die Messungen ergaben, daß die formale Reaktion: $R \rightleftharpoons M$ bzw. vice versa nach dem gleichen Zeitgesetz 1. Ordnung erfolgt wie im System sonifizierter Rhabdomsuspensionen. Die Übereinstimmung der Geschwindigkeitskonstanten ($k = 0.87 \dots 0.98 \text{ min}^{-1}$, $n=2$) in beiden Chromoproteinsystemen ist - ergänzend zu den Extinktionsspektren beider Systeme - ein weiteres Indiz für eine Reihe äquivalenter physikalisch-chemischer Eigenschaften des membrangebundenen und Digitonin-gelösten Astacus-Sehpigmentes bei 0°C und pH 7.0 (s. Diskussion).

3.6 Spektrale Eigenschaften der Digitonin-Rhabdomextrakte in Gegenwart von Hydroxylamin

Kurve 1 in Abb. 12 zeigt das Spektrum eines Digitoninextraktes (0°C; pH 7.0) der Photorezeptormembran einer dunkeladaptierten Retina. Der Extrakt enthielt 0.02 mol $\text{H}_2\text{NOH}/\text{l}$, das - zur Vermeidung einer Denaturierung des Rhodopsins - erst unmittelbar vor Beginn der spektroskopischen Untersuchung zugegeben wurde.

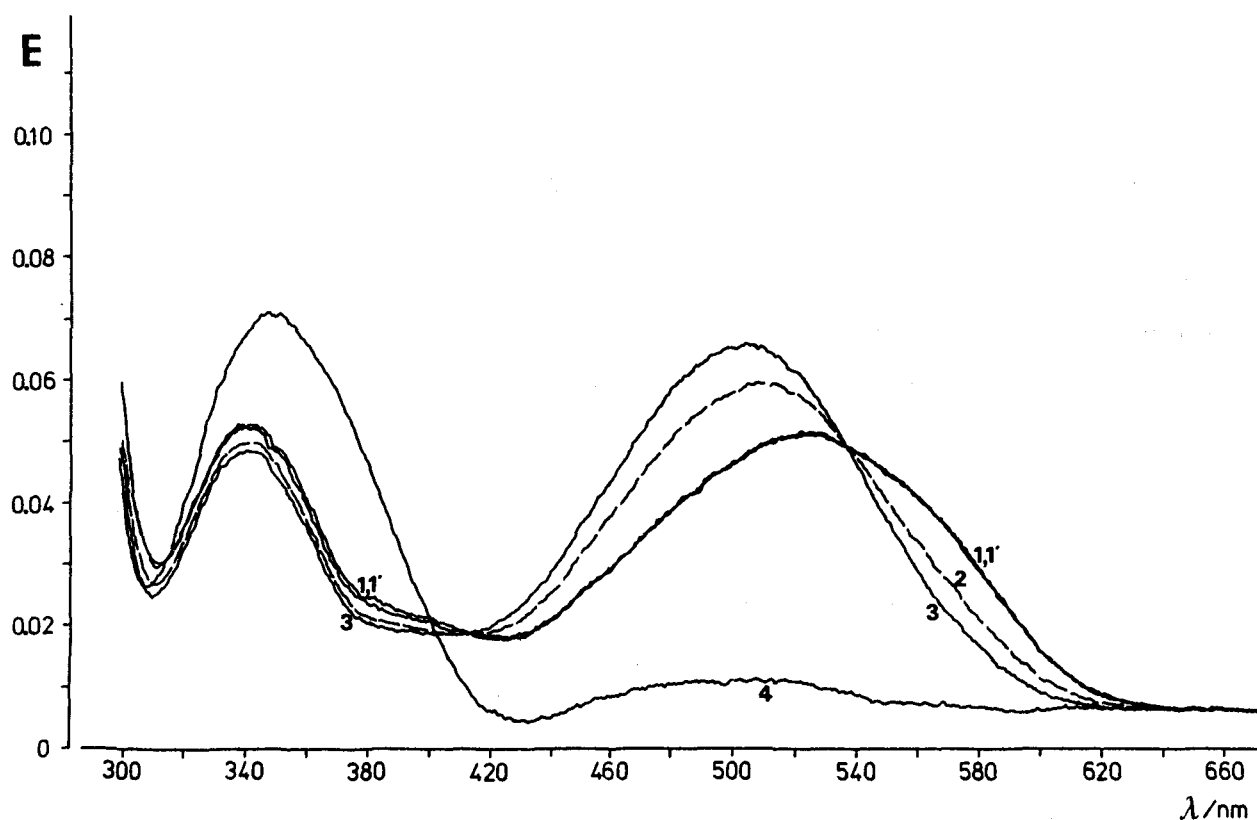


Fig. 12 Extinction spectra of a digitonin extract obtained from purified crayfish rhabdoms, measured at 0°C and pH 7.0 in the presence of Hydroxylamine ($c(\text{NH}_2\text{OH})=0,02 \text{ mol/l}$).
 spectra 1, 1': Extract from rhabdoms of a dark-adapted retina
 spectrum 2: recorded after irradiation for 1 min at $600\pm 15 \text{ nm}$ (light intensity: $0,2 \text{ mW/cm}^2$)
 spectrum 3: after irradiation for 8 min at $600\pm 15 \text{ nm}$ (photosteady state)
 spectrum 4: after total bleaching of the chromoprotein at 30°C by standing in the dark for 2 h and subsequent irradiation at 500 nm for about 5 min (light intensity: $0,1 \text{ mW/cm}^2$).

Der H_2NOH -haltige Extrakt hat photosensitive Eigenschaften. So führt Belichtung bei 600 nm zu einer hypsochromen Verschiebung des Spektrums über Kurve 2 Abb. 12 (nach 1 min Belichtung) zum Spektrum des photostationären Zustands (nach 7 min Belichtung, Kurve 3 in Abb. 12). Vergleicht man die spektrale Änderung des Systems (Differenzspektrum) sowie die Lage des isosbestischen Punktes ($\lambda=536$ nm) mit den Messungen an H_2NOH -freien Extrakten (s. 3.4), so stellt man praktisch keinen Unterschied fest. Das Digitonin-gelöste Rhodopsin bzw. Metarhodopsin ist bei etwa 0°C in Gegenwart von Hydroxylamin photoreversibel und wird - zumindest im Zeitraum von ca. 3 h - im Rahmen der Nachweisempfindlichkeit - nicht denaturiert.*

Erwärmung des Extraktes von 0°C auf 30°C (nach Belichtung bei 600 nm) bewirkt innerhalb eines zweistündigen Dunkelintervalls eine stetige Extinktionsabnahme im Spektralbereich 406...630 nm, verbunden mit einer Zunahme der Extinktion im nahen UV-Bereich zwischen 406 nm und etwa 300 nm. Die Extinktionsänderung ist auf eine thermisch induzierte Hydrolyse des Metarhodopsins unter Freisetzung von trans-Retinal zurückzuführen. Das trans-Retinal kondensiert mit Hydroxylamin unter Bildung von trans-Retinaloxim, dessen Extinktionsmaximum bei 367 nm liegt. Der Verlauf der thermisch- und lichtinduzierten Denaturierung des Chromoproteins sowie die Kinetik des Prozesses sind unter 3.11.4 beschrieben.

Das Spektrum des vollständig gebleichten Astacus-Chromoproteins (nach etwa 2-stündigem Dunkelintervall bei 30°C

* Zusatz von Hydroxylamin zu Beginn der Extraktion (s. 2.6.1) verursacht - selbst bei 0°C - innerhalb von 16 h eine teilweise Denaturierung des zu extrahierenden Chromoproteins. Erkennbar ist die partielle Hydrolyse des Rhodopsins an der im Vergleich zu den H_2NOH -freien Extrakten geringeren Extinktion im sichtbaren Spektralbereich.

und anschließender Belichtung bei 500 nm (5 min) zeigt Kurve 4 in Abb. 12. Die nur geringe Extinktion im sichtbaren Bereich ist ein Beweis dafür, daß der Extrakt keine bedeutenden Mengen photoinsensitiver Schirmpigmente mit $\lambda_{\max}$ bei 515 nm enthält (vergl. Hamacher, 1977).

3.6.1 Extinktionsspektren des Digitonin-gelösten Chromoproteins nach Abzug des Basisspektrums

Das Spektrum des gebleichten Rhodopsins bzw. Metarhodopsins (Kurve 4 in Abb. 12) ist das Basisspektrum und gibt - neben dem Spektrum des gebildeten trans-Retinaloxims - den durch Schirmpigment-Kontamination und Lichtstreuung der mizellaren Lösung verursachten Extinktionsverlauf wieder.

Subtrahiert man dieses Basisspektrum von den Chromoproteinspektren 1 und 3 der Abb. 12, so können die resultierenden Differenzspektren (Abb. 13) im Wellenlängenbereich 420...640 nm als die Extinktionsspektren des Schirmpigment-freien Chromoproteins bei 0°C und pH 7.0 interpretiert werden. Die Differenz zwischen dem Spektrum des >unbelichteten<, vornehmlich Rhodopsin enthaltenden Extraktes und dem Spektrum nach vollständiger Bleichung ist bei 528...530 nm maximal, ein Wert, der näherungsweise dem $\lambda_{\max}$ des Rhodopsins zugeordnet werden kann. Das Maximum der Extinktionsdifferenz zwischen dem bei 600 nm belichteten, hauptsächlich Metarhodopsin enthaltenden Extrakt und dem gebleichten liegt bei etwa 500 nm. Das Verhältnis $\Delta E_{500}/\Delta E_{530}$ beträgt bei 0°C ca. 1.34, d.h. $E_{\lambda_{\max}}$ nimmt durch 600 nm-Bestrahlung des >unbelichteten< Extraktes um den Faktor 1.34 zu. Das Maximum der Extinktionsdifferenz im UV-Bereich ist bei 365...370 nm und ist identisch mit dem $\lambda_{\max}$ des trans-Retinaloxims. (Die unterschiedlichen ΔE -Werte im nahen UV sind vermutlich auf eine Änderung der Lichtstreuung bei Belichtung des Extraktes zurückzuführen (vergl. Abb. 12).

Die Extinktionswerte des Metarhodopsins sind für $\lambda > 625$ nm praktisch gleich null, während die Extinktion des Rhodopsins

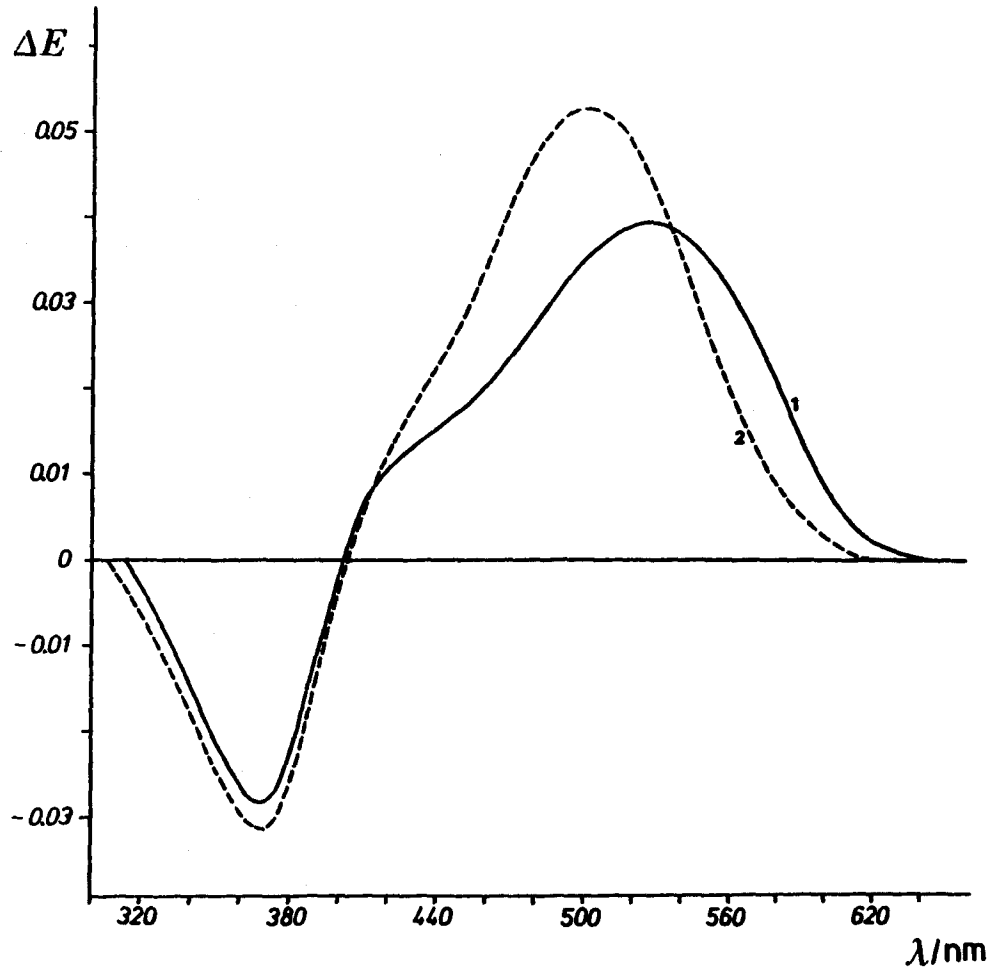


Fig. 13 curve 1: Difference between the spectrum of a digitonin extract before irradiation (curve 1, Fig. 12) and the spectrum after total bleaching of the system (curve 4, Fig. 12)
 curve 2: Difference between the spectrum of the photosteady state after irradiation at 600 nm (curve 3, Fig. 12) and the spectrum of the bleached system (curve 4, Fig. 12).

erst oberhalb von etwa 645 nm näherungsweise auf null zurückgeht. Somit sollte Belichtung des Rhodopsins bei $\lambda > 625$ nm eine ca. 100%-ige Isomerisierung zum Metarhodopsin bewirken.

Diese Hypothese kann experimentell bestätigt werden. So ist die spektrale Änderung des Chromoproteinsystems sonifizierter Rhabdomsuspensionen durch monochromatische Belichtung bei $\lambda = 630$ nm (He/Ne-Laser $\lambda_e = 632,8$ nm) maximal (s. 3.8). Belichtung bei $\lambda > 640$ nm verursacht vergleichsweise keine weitere Zunahme des E_{500} -Wertes, so daß das Spektrum des photostationären Zustands der 630 nm-Belichtung dem Spektrum des Metarhodopsins zugeordnet werden kann (s. Abb. 15). Der E_{500} -Wert nach Belichtung bei 630 nm ist - bezogen auf das Basisspektrum - etwa 4% größer als derjenige nach 600 nm-Belichtung.

Ein Kennzeichen der Spektren in Abb. 13 ist das Verhältnis der Extinktionswerte nach 600 nm-Belichtung zu den E-Werten des unbelichteten Extraktes als Funktion der Wellenlänge: $E(\lambda)_{600}/E(\lambda)_{\text{unbel.}}$. Abb. 14 zeigt den Verlauf der Extinktionsquotienten in Abhängigkeit von der Wellenlänge (420...610 nm). Aufgetragen sind die Mittelwerte und zugehörigen Standardabweichungen der spektroskopischen Daten von drei Digitonin-Rhabdomextrakten dunkeladaptierter Retinen.

Das Maximum der Verhältniswerte (1.80 ± 0.02) befindet sich bei 460...465 nm, d.h. die Extinktion des Metarhodopsins ist bei 460 nm um etwa den Faktor 1.8 größer als diejenige des Rhodopsins. Da die Spektren der isomeren Chromoproteine für $\lambda > 390$ nm gleich verlaufen (vergl. Abb. 10), sind die Verhältniswerte - wie am Ort des isosbestischen Punktes - gleich 1. Das Extinktionsverhältnis erreicht bei etwa 625 nm den Wert 0 ($E(\lambda > 625 \text{ nm})_{600} \approx 0$). Im Spektralbereich 300...430 nm wird das Basisspektrum des gebleichten Chromoproteins durch das Spektrum des gebildeten trans-Retinaloxims überlagert, so daß die Extinktionswerte und die entsprechenden Quotienten für $\lambda = 390$...430 nm lediglich abgeschätzt werden können (s. punktierte Linie in Abb. 14).

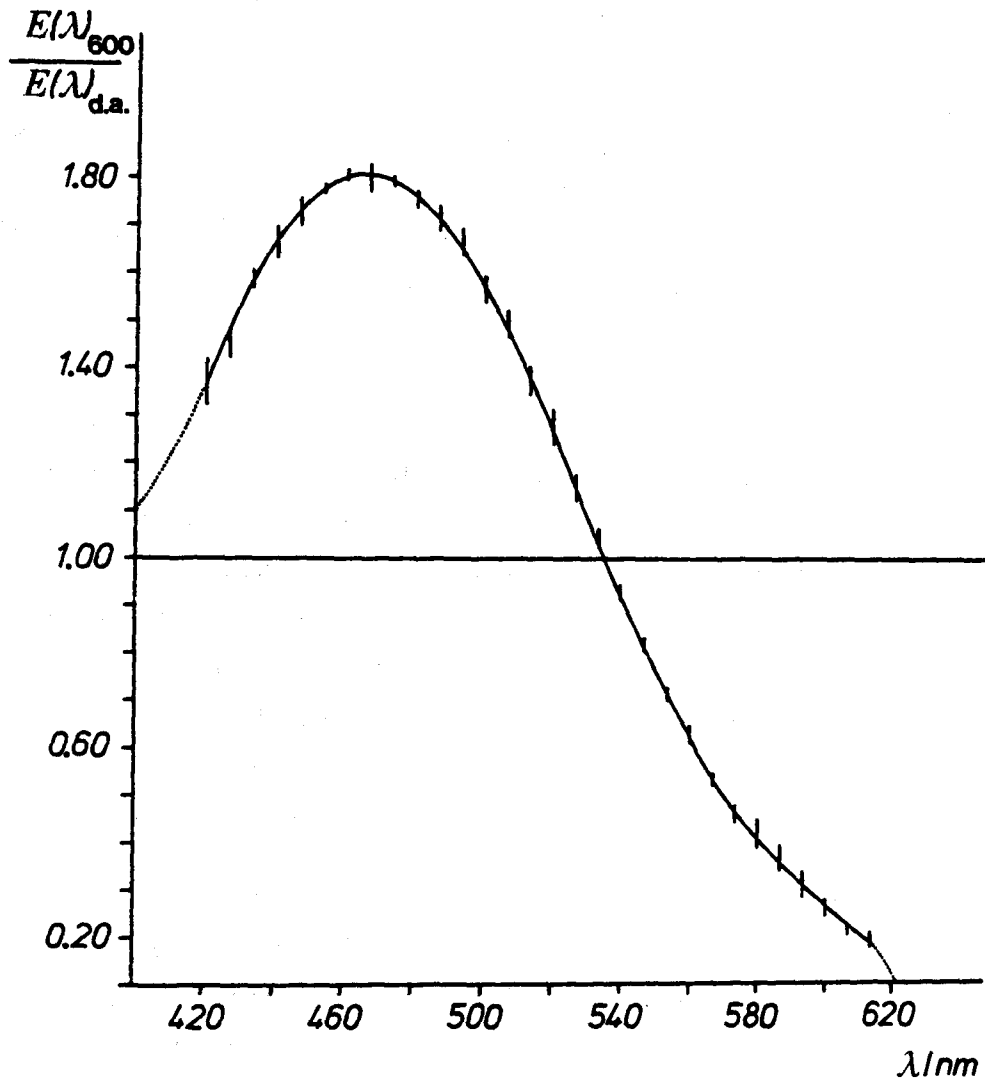


Fig. 14 $E(\lambda)_{600 \text{ nm}}$ Extinction values of the photostationary state irradiating a digitonin extract at 600 nm, measured at 0°C and pH 7.0.

$E(\lambda)_{\text{d.a.}}$ Extinction values of a digitonin extract from rhodopsins of a dark-adapted retina, measured at 0°C and pH 7.0.

3.7 Hypothetische Spektren des Rhodopsins und Metarhodopsins im System sonifizierter Rhabdomsuspensionen

Aufgrund übereinstimmender spektroskopischer Eigenschaften der Digitonin-Rhabdomextrakte und sonifizierter Rhabdomsuspensionen bei 0°C und pH 7.0 (vergl. 3.2 und 3.4), können die Quotienten der Extinktionswerte von Extrakten (s. Abb. 14) auf die Spektren des membrangebundenen Chromoproteins übertragen werden.

Auf der Grundlage der Extinktionsdifferenzen zwischen dem Spektrum des photostationären Zustands nach 600 nm-Belichtung und dem Spektrum der >unbelichteten<, vesikulären Photorezeptormembran kann - mittels der Extinktionsquotienten - das hypothetische Basisspektrum der sonifizierten Rhabdomsuspensionen berechnet werden. Durch Subtraktion des berechneten Basisspektrums von den Spektren der beschallten Rhabdomsuspensionen, erhält man die hypothetischen Spektren des membrangebundenen Rhodopsin-Metarhodopsin-Systems.

Setzt man a priori voraus, daß eine dunkeladaptierte Retina lediglich Rhodopsin enthält, und bei der Präparation der Retina sowie Isolierung der Photorezeptormembran keine signifikante Isomerisierung des Rhodopsins erfolgt, so kann das Spektrum der >unbelichteten< Rhabdomsuspension bzw. des entsprechenden Digitoninextraktes als Spektrum des reinen Rhodopsins postuliert werden.

Wie bereits erwähnt, ist die photochemische Bildung von Metarhodopsin maximal, wenn das Chromoprotein mit Licht der Wellenlänge $\lambda \geq 630$ nm bestrahlt wird. Unter der Bedingung, daß die Extinktionskoeffizienten des Metarhodopsins für $\lambda > 625$ nm gleich null sind, ist das Spektrum des photostationären Zustands nach 630 nm-Belichtung identisch mit dem Metarhodopsin-Spektrum.

Die normierten, hypothetischen Spektren des membrangebundenen Rhodopsins (Kurve 1) und des Metarhodopsins (Kurve 2), bei

0°C und pH 7.0, zeigt Abb. 15. $\lambda_{\max}$ des Rhodopsins ist etwa 530 nm; die zugehörige Extinktion - der Bezugswert für die Normierung - ist gleich 1 gesetzt. Die Extinktion des Metarhodopsins bei $\lambda_{\max}=500$ nm ist um den Faktor 1.4...1.43 größer als $E_{\lambda_{\max}}$ des Rhodopsins. Die Extinktionswerte der Isomeren sind ab ca. 390 nm identisch und haben bei 390...400 nm einen normierten Wert von 0.28...0.30. Der isosbestische Punkt bei 534...537 nm hat eine relative Extinktion von 0.97.

3.7.1 Vergleich der Chromoprotein-Spektren mit ϵ -Werten modifizierter Dartnall-Nomogramme* (Ebrey u. Honig-Nomogramme)

In Tab. II sind die relativen ϵ -Werte des Astacus-Chromoproteinspektren den von Ebrey und Honig aufgestellten Nomogrammwerten entsprechender Vitamin A₁-Sehpigmente (Ebrey u. Honig, 1977) gegenübergestellt. Die experimentellen, normierten $\epsilon(\lambda)$ -Werte des Metarhodopsins stimmen mit den auf der Basis von Vertebraten-Rhodopsinspektren erstellten hypothetischen $\epsilon(\lambda)$ -Werten gut überein. Gleiches gilt für die ϵ -Werte des Astacus-Rhodopsins im Spektralbereich 480...600 nm. Unterhalb von $\lambda=480$ nm sind die gemessenen Extinktionswerte jedoch um den Faktor 1,1...1,5 größer als die Nomogrammwerte eines Rhodopsin-Spektrums mit $\lambda_{\max}=530$ nm.

* Die Dartnall-Nomogramme der Sehpigmentspektren beruhen auf der Annahme, daß die spektrale Bandbreite der Vitamin A₁-Rhodopsine - aufgetragen als Wellenzahl (cm^{-1}) - identisch und unabhängig vom Absorptionsmaximum des Sehpigmentes sind (Dartnall, 1953). Honig und Ebrey (1974) korrigierten die Nomogramme von Dartnall und konstruierten ein Nomogramm, daß die Abhängigkeit der spektralen Bandbreite vom $\lambda_{\max}$ -Wert - der in der Literatur verzeichneten Sehpigmente - berücksichtigt. Anhand der Nomogramme kann bei bekanntem $\lambda_{\max}$ des Chromoproteins der relative ϵ -Wert in Abhängigkeit von der Wellenlänge ermittelt werden.

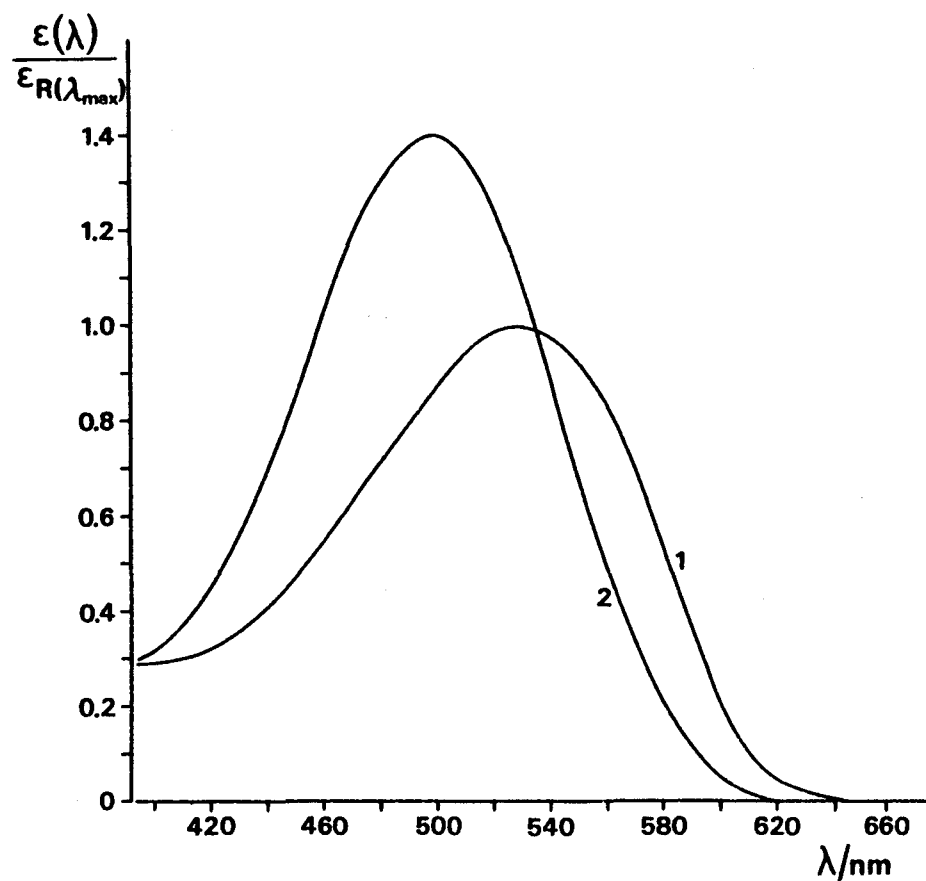


Fig. 15 Normalized, hypothetical spectra of the membrane bound visual pigment (sonicated rhabdoms) after subtraction of the baseline of the original spectra
 curve 1: spectrum of *Astacus* rhodopsin
 curve 2: spectrum of *Astacus* metarhodopsin
 The isosbestic point is at 536 nm.

Die Halbwertsbreite des Rhodopsin-Spektrums von 128 nm ist um etwa 15 nm größer als die hypothetische spektrale Bandbreite eines Vitamin A₁-Sehpigmentes, während die Halbwertsbreite des Metarhodopsin-Spektrums ($\Delta\lambda = 110$ nm) praktisch mit dem zugehörigen Nomogrammwert eines Chromoproteins mit $\lambda_{\max} = 500$ nm übereinstimmt.

3.7.2 Stoffmengenanteil von Rhodopsin und Metarhodopsin in der Photorezeptormembran - Berechnung aus absorptions-spektroskopischen Daten

Enthält die Astacus-Photorezeptormembran lediglich ein Chromoprotein in zwei stereoisomeren Formen: Rhodopsin und Metarhodopsin, so kann - unter Anwendung des Lambert Beerschen Gesetzes - der Stoffmengenanteil (Molenbruch x_k) beider Stereoisomeren aus absorptionsspektroskopischen Daten der sonifizierten Rhabdomsuspensionen berechnet werden.

Grundlage der Berechnung des Molenbruchs sind die hypothetischen Spektren des Rhodopsins ($x_R=1$) und des Metarhodopsins ($x_R=0$), wie sie Abb. 15 zeigt. Die Spektren der Photorezeptormembransuspensionen mit einem Rhodopsinanteil von $0 < x_R < 1$ liegen demnach im Bereich zwischen den Spektren der reinen Stereoisomeren.

Zur Bestimmung des Anteils der Chromoproteinisomere einer in vivo belichteten Retina ist die Messung des Spektrums beschallter Rhabdome nicht hinreichend, da die Konzentration des Chromoproteins in der Membransuspension, der Extinktionsanteil durch Lichtstreuung und die genauen Werte der molaren Extinktionskoeffizienten nicht bekannt sind. Die Berechnung des Stoffmengenverhältnisses ist jedoch möglich, wenn - außer dem Spektrum der ursprünglichen Suspension - als Bezugsgrößen die Spektren von zwei photostationären Zuständen gemessen werden. Ein Charakteristikum des Rhodopsin-Metarhodopsin-Systems im photostationären Zustand ist, daß der Stoffmengenanteil von R und M nicht von den Anfangsbedingungen und der Lichtintensität abhängt, sondern lediglich von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes (Hamdorf et al., 1968).

Zur analytischen Auswertung wurden die Spektren der reversiblen photostationären Zustände nach 600 ± 15 nm-Belichtung sowie 485 ± 8 nm-Belichtung gewählt (vergl. Abb. 3). Die Lage der beiden Spektren relativ zum (hypothetischen) Spektrum des Rhodopsins und Metarhodopsins definiert den Stoffmengenanteil der beiden Isomeren nach 600 nm- bzw. 485 nm-Belichtung. Die Herleitung der Gleichung (1) zur Berechnung des Rhodopsin-Molenbruchs - auf der Basis obiger Spektren - ist unter 2.9.1 im Anhang des methodischen Teils ausführlich beschrieben.

$$x_R = 0.48 \left(\frac{\Delta E_{485}(485 \text{ nm bel.} - \alpha)}{\Delta E_{485}(600 \text{ nm bel.} - 485 \text{ nm bel.})} + 1 \right) + 0.04 \quad (1)$$

Gemäß obiger Gleichung sind zur quantitativen Analyse des Rhodopsin-Stoffmengenanteils nur die folgenden Extinktionsdifferenzen bei $\lambda = 485$ nm - dem Ort größter Extinktionsdifferenzen - zu bestimmen:

- a) Differenz zwischen dem Spektrum des photostationären Zustands nach 485 nm-Belichtung und dem Spektrum des ursprünglichen Systems α (in vivo Zustand des Chromoproteins) ($E_{485}(485 \text{ nm bel.} - \alpha)$) bei $\lambda = 485$ nm
- b) Differenz zwischen dem Spektrum des photostationären Zustands nach 600 nm-Belichtung und dem Spektrum nach 485 nm-Belichtung ($\Delta E_{485}(600 \text{ nm bel.} - 485 \text{ nm bel.})$), ebenfalls bei $\lambda = 485$ nm

Zwischen dem Molenbruch des R. bzw. M. und dem Verhältnis der Extinktionsdifferenzen besteht ein linearer Zusammenhang (s. Abb. 16).

Ist z.B. das Spektrum des in vivo Sehpigmentes (α) identisch mit demjenigen nach 485 nm-Belichtung, so ist

$$\Delta E_{485}(485 \text{ nm bel.} - \alpha) = 0.$$

Der Klammerwert in Gleichung (1) ist in diesem Fall gleich +1 und somit der Molenbruch des Rhodopsins im photostationären Zustand nach Belichtung bei 485 nm etwa $0.48+0.04=0.52$ (vergl. Abb. 16), d.h. ca. 52% der Chromoproteinmoleküle liegen als Rhodopsin vor. Im photostationären Zustand nach 600 nm-Belichtung ist der Molenbruch des Rhodopsins ca. 0.04.

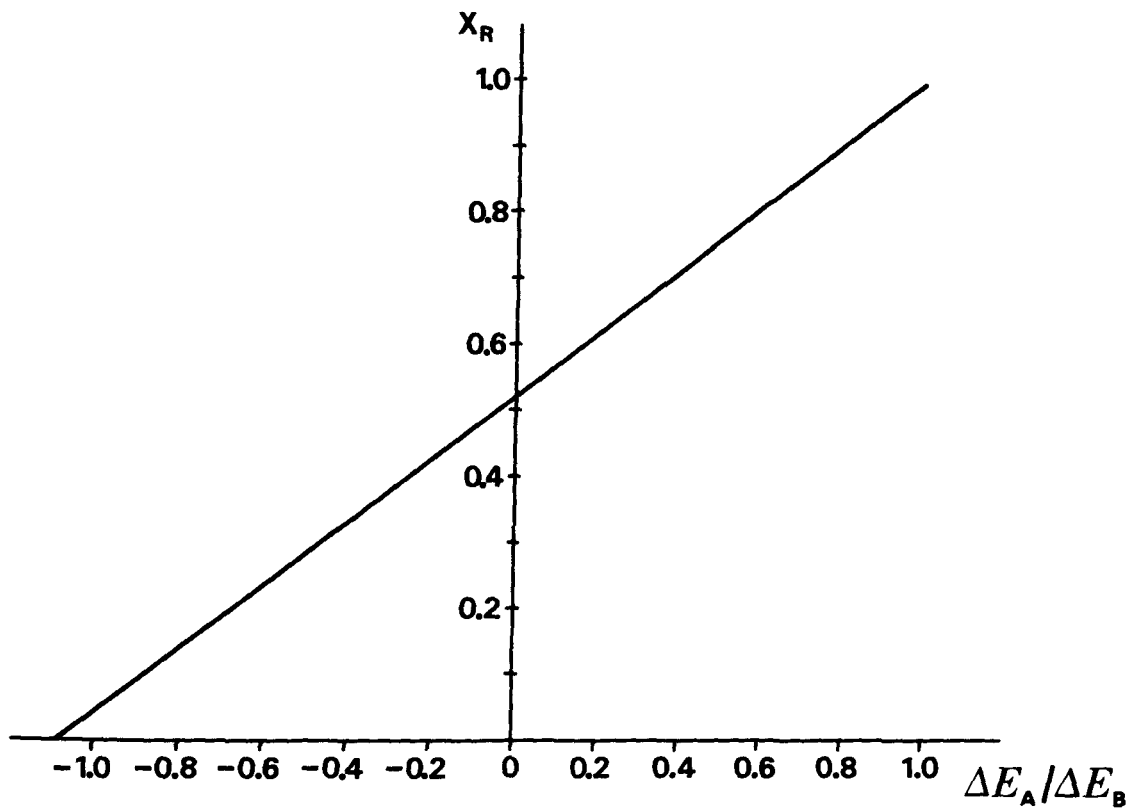


Fig. 16 Functional connection between the mole fraction of rhodopsin (x_R) and the ratio of the extinction differences ($\Delta E_A/\Delta E_B$) measured at $\lambda_m = 485$ nm.

$$\Delta E_A \approx \Delta E_{485} \text{ (485 nm irradiation - } \alpha \text{)}$$

$$\Delta E_B \approx \Delta E_{485} \text{ (600 nm irradiation - 485 nm irradiation)}$$

for further information see text 3.7.2

3.8 Spektrale Änderung sonifizierter Rhabdomsuspensionen in Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahltten Lichtes.

Monochromatische Belichtung des photoreversiblen Astacus-Chromoproteins führt zu einer absorptionspektroskopischen Änderung des Systems, die von der Wellenlänge des eingestrahltten Lichtes abhängt.

Ausgehend vom unbelichteten Sehpigment (Rhodopsin) ist die lichtinduzierte Zunahme der Extinktion bei 485 nm bzw. die Abnahme bei 570 nm - entsprechend dem Anstieg des Metarhodopsinanteils - dann maximal, wenn die Wellenlänge des eingestrahltten Lichtes $\lambda > 630$ nm ist.

Aufgrund der Photoreversibilität führt Belichtung des Metarhodopsins $\lambda < 630$ nm zu einer partiellen Isomerisierung der M-Stoffmenge zum Rhodopsin. Der Anteil des in vitro photochemisch aus Metarhodopsin gebildeten Rhodopsins erreicht bei 460 ± 5 nm-Belichtung (Spektrum 1, Abb. 17) den größten Wert. Die spektralen Änderungen der sonifizierten Rhabdomsuspensionen - in Abhängigkeit von der Belichtungswellenlänge (s. Abb. 17) - zeigen, daß es nicht möglich ist, Metarhodopsin in vitro photochemisch quantitativ zum Rhodopsin zu isomerisieren. Dementsprechend liegen die Spektren der photostationären Zustände des Chromoproteins zwischen den Spektren des 460 nm- und 630 nm-belichteten Systems.

Abb. 17 zeigt die Differenz zwischen den Spektren verschiedener photostationärer Zustände - gemessen an einer Rhabdomsuspension - (nach Belichtung bei 460 (1); 480 (2); 500 (3); 520 (4); 535 (5); 560 (6); 580 (7); 600 (8); 630 nm(9)) und dem unbelichteten Rhodopsinsystem. Die Differenzspektren haben einen gemeinsamen isosbestischen Punkt bei ca. 528 nm. Dieser Schnittpunkt der Spektren ist nicht identisch mit dem isosbestischen Punkt bei unmittelbarer Belichtung des Rhodopsins bei $\lambda > 600$ nm (vergl. Abb. 5):

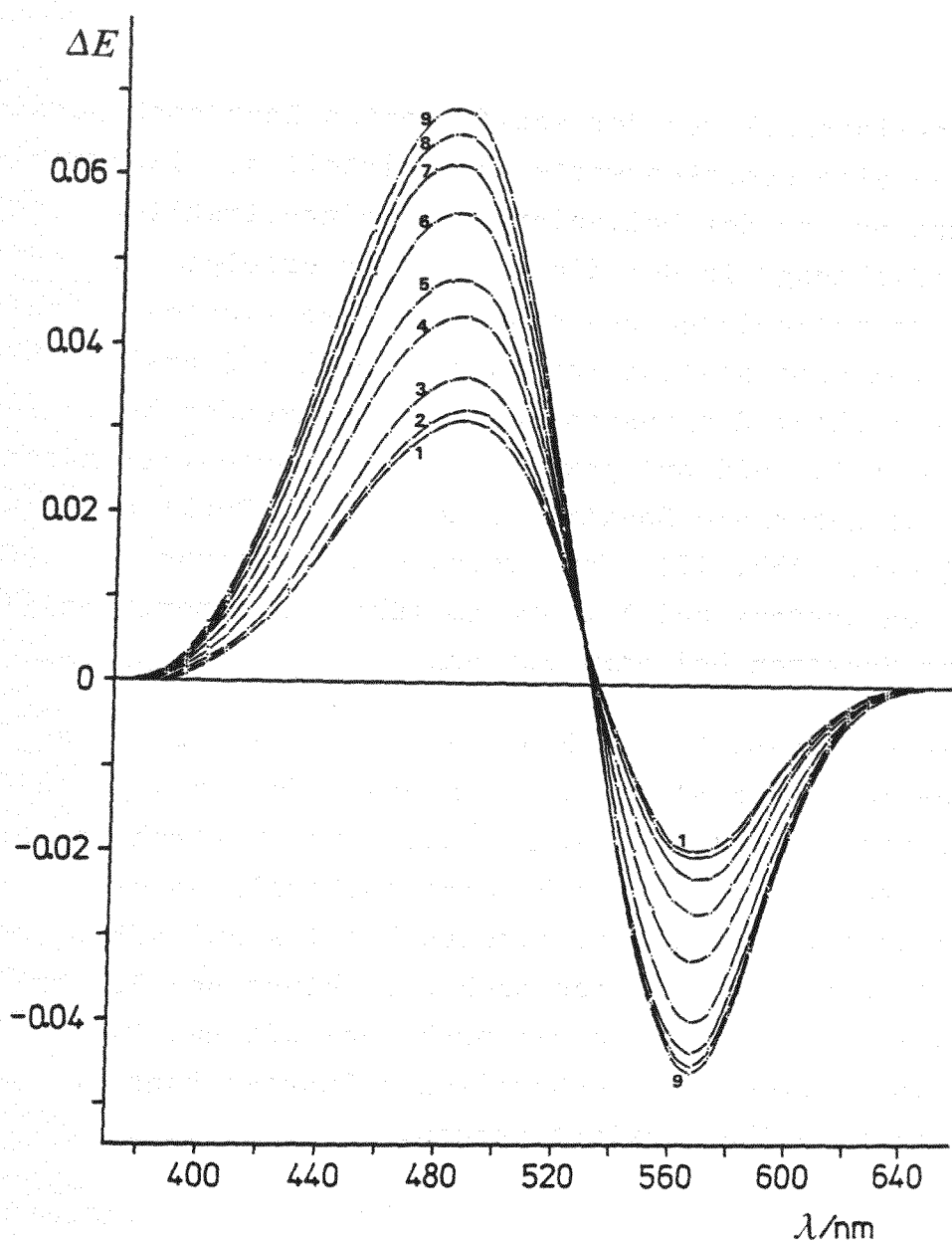


Fig. 17 Difference between the spectra of the photostationary state after irradiation at 460 (1), 480 (2), 500 (3), 520 (4), 535 (5), 560 (6), 580 (7), 600 (8) and 630 nm (9) and the spectrum of purified and sonicated crayfish rhabdoms obtained from a single dark-adapted retina which contained only rhodopsin.

The extreme values of the difference spectra are at 485 nm and at about 570 nm, the isosbestic point is at 528 nm. The spectra were measured at 0°C and pH 7.0.

Die Extinktionsspektren der sonifizierten Rhabdomsuspensionen zeigen eine bemerkenswerte Abhängigkeit des isosbestischen Punktes von der Wellenlänge des eingestrahltten Lichtes und der >Richtung< in der die Belichtung erfolgt (Zu- oder Abnahme der Wellenlänge des eingestrahltten Lichtes). Geht man z.B. vom photostationären Zustand nach 460 nm-Belichtung aus und belichtet die Suspension bei zunehmender Wellenlänge (480, 500, 520...630 nm) jeweils bis zum photostationären Zustand, so haben die Spektren einen isosb. Punkt bei etwa 528 nm (vergl. Abb. 17). Unmittelbare Bestrahlung des 460 nm-belichteten Systems bei $\lambda \geq 600$ nm führt zu einem Schnittpunkt der Spektren bei etwa 536 nm.

Den gleichen isosb. Punkt (536 nm) findet man, wenn das 630 nm-belichtete System bei abnehmender Wellenlänge (610, 580, 550 nm) belichtet wird. Anschließende Bestrahlung bei 520, 490 und 460 nm verursacht eine spektrale Änderung, die eine Verlagerung des isosbestischen Punktes auf 528 nm zur Folge hat, d.h. die Spektren nach Belichtung bei 520 nm $\rightarrow \lambda > 460$ nm haben einen gemeinsamen Schnittpunkt bei 528 nm. Diese eigenartige Fluktuation des isosbestischen Punktes kann zur Zeit noch nicht plausibel erklärt werden.

Die spektrale Änderung und damit verbunden die Verlagerung des isosb. Punktes ist reproduzierbar und unabhängig vom Belichtungszustand der Retina in vivo.

3.8.1 Stoffmengenanteil des Rhodopsins in verschiedenen photostationären Zuständen des membrangebundenen Chromoproteins

Belichtung des Chromoproteinsystems mit Licht verschiedener Wellenlänge verursacht eine Veränderung des Mengenverhältnisses: Rhodopsin zu Metarhodopsin. So hat, wie Abb. 17 deutlich macht, Belichtung bei zunehmender Wellenlänge einen Anstieg des Metarhodopsingehalts und eine äquivalente Abnahme der Rhodopsinmenge zur Folge.

Die Stoffmengenanteile beider Isomere im jeweiligen photostationären Zustand können anhand der Gleichung (1) (s. 3.7.2) aus den spektralen Änderungen berechnet werden. Abb. 18 zeigt den Rhodopsinanteil x_R im photostationären Zustand als Funktion der Wellenlänge des eingestrahltten Lichtes, gemessen bei 0°C und pH 7.0 (sog. photoequilibrium spectrum).

Das Maximum des in vitro photochemisch erzeugten Rhodopsin-Stoffmengenanteils ($x_R = 0.54 \pm 0.02$) wird durch Belichtung des Chromoproteins bei 460 ± 5 nm erreicht. Bestrahlung bei $\lambda > 470$ nm bzw. $\lambda < 450$ nm verringert die Rhodopsinmenge, bei Belichtung im roten Spektralbereich ($\lambda > 630$ nm) nähert sich der R-Anteil asymptotisch dem Wert 0.

x_R bzw. x_M im photostationären Zustand wird hauptsächlich durch das Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten bei der Wellenlänge des eingestrahltten Lichtes (λ_e) bestimmt: $\epsilon_M(\lambda_e)/\epsilon_R(\lambda_e)$ (vergl. Hamdorf, 1979).

Der größte Stoffmengenanteil von R wird gebildet, wenn das Verhältnis maximal ist. Die Abhängigkeit der Isomerenzusammensetzung von dem Verhältnis der ϵ -Werte korreliert mit den absorptionsspektroskopischen Daten des Astacus-Chromoproteins (s. Tab. II). Beispielsweise haben bei $\lambda = 460 \dots 470$ nm sowohl $\epsilon_M/\epsilon_R = 1.86$ als auch $x_R(\lambda_e) = 0.54 \pm 0.02$ den maximalen Wert.

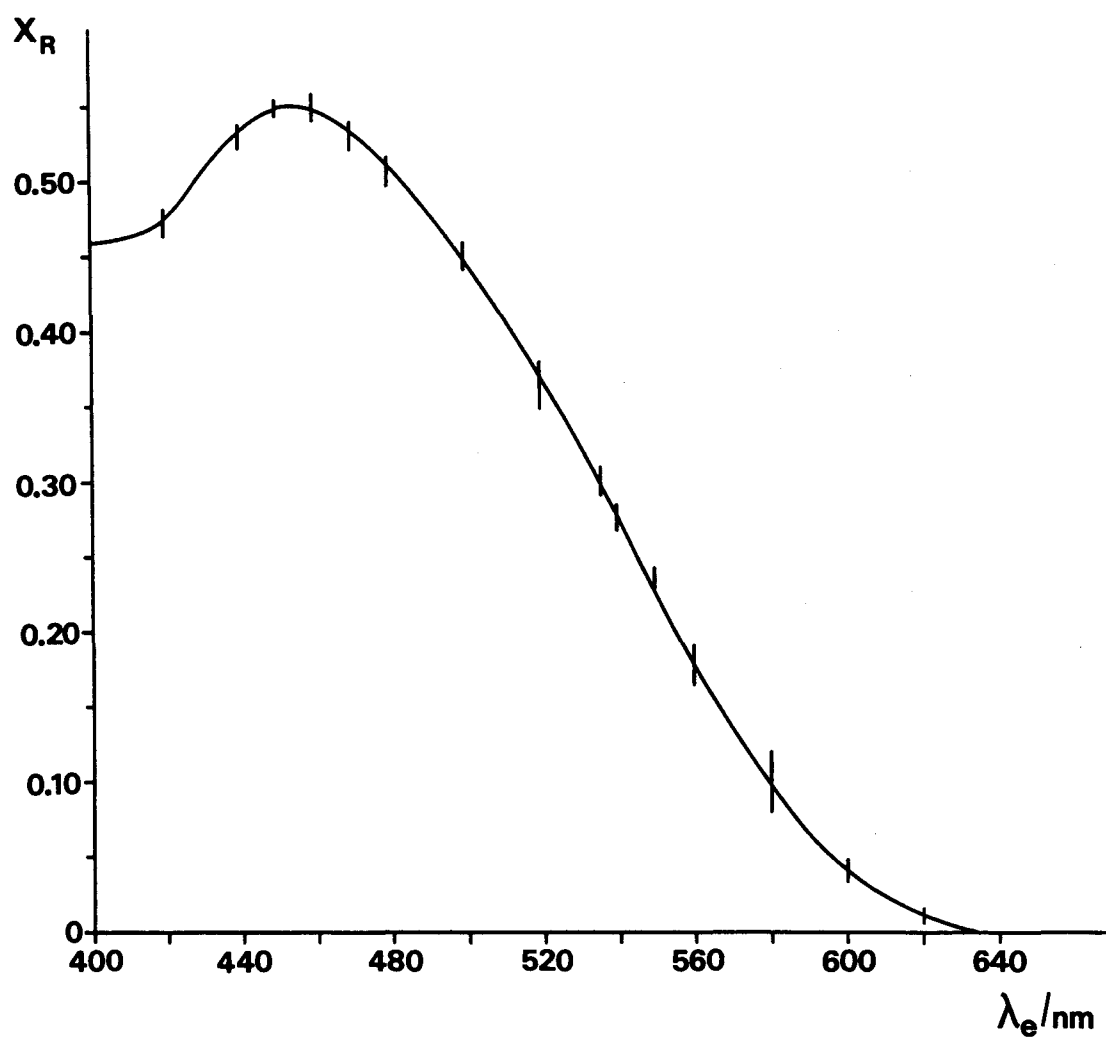


Fig. 18 Dependence of the mole fraction of rhodopsin in the photo-stationary state on the wavelength of the adapting light (λ_e). The values are calculated from equation 1 (see text) based on spectral data (s. Fig. 16 and 15) Bars represent S.D. of the values averaged for three different preparations.

Ein weiterer Parameter, der den Anteil der Chromoprotein-isomere im photostationären Zustand beeinflusst, ist die Quantenausbeute der Hin- und Rückreaktion der Photoisomerisierung. Für eine photoreversible Reaktion 1. Ordnung ($R \rightleftharpoons M$) ist das Verhältnis der Stoffmengenanteile durch die Beziehung gegeben: (vergl. Hamdorf, 1979)

$$\frac{x_R}{x_M}(\lambda_e) = \frac{\epsilon_M}{\epsilon_R}(\lambda_e) \cdot \frac{\gamma_M}{\gamma_R} \quad (2)$$

x = Molenbruch (Stoffmengenanteil) von Rhodopsin (R) und Metarhodopsin (M) im photostationären Zustand nach Belichtung bei der Wellenlänge λ_e .

ϵ = Molare Extinktionskoeffizienten bei der Wellenlänge λ_e .

γ_M/γ_R = relative Quantenausbeute

Die Abhängigkeit der Isomerenanteile von der relativen Quantenausbeute zeigt sich deutlich bei der Bestrahlung des Chromoproteins mit Licht dessen Wellenlänge dem isosbestischen Punkt ($\lambda_{iso} = 536 \text{ nm}$) entspricht. Unter der Voraussetzung, daß die relative Quantenausbeute gleich 1 ist, müßte - aufgrund der Identität der molaren Extinktionskoeffizienten im isosbestischen Punkt - Belichtung bei 536 nm zu einem Stoffmengenanteil von je 0.5 führen. Der berechnete Wert von x_R ist jedoch nur 0.29...0.31, so daß - gemäß der Gleichung (2) - die rel. Quantenausbeute ca. 0.43 ist, d.h. die Quantenausbeute des Rhodopsins ist bei 536 nm-Belichtung um den Faktor 2.3 größer als die des Metarhodopsins.

Das Verhältnis der Stoffmengenanteile von R und M ist demnach nicht direkt proportional dem Verhältnis der ϵ -Werte, wie es anscheinend bei Cephalopoden- und Insekten-Sehpigmenten der Fall ist (vergl. Hamdorf, 1979). So ist die aus dem Quotienten der ϵ -Werte und den Stoffmengenanteilen der photostationären Zustände (vergl. Abb. 18) berechnete relative Quantenausbeute nicht nur <1 , sondern zeigt auch eine gewisse

Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahltten Lichtes λ_e . Die anhand von Gleichung 2 berechneten Quotienten γ_M/γ_R liegen im Bereich zwischen 0.68 ($\lambda_e = 450$ nm) und etwa 0.40 ($\lambda_e = 560$ nm) (s. Tab. III).

3.9 Lichtinduzierte Abnahme des Rhodopsinanteils in der lebenden Retina

3.9.1 Stoffmengenänderung des Rhodopsins bei Belichtung dunkeladaptierter Krebse mit Raumlicht

Wie im methodischen Teil beschrieben (s. 2.8.1), wurden über Nacht (16...20 h) dunkeladaptierte Krebse in vivo isotherm bei 0°C bzw. 20°C belichtet (Raumlicht der Energiestromdichte 50...70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$); anschließend wurde der Stoffmengenanteil des Rhodopsins in beiden Retinen absorptionsspektroskopisch bestimmt.

Die zeitliche Änderung des Rhodopsin-Molenbruchs in vivo bei 0°C und konstanter Lichtintensität gibt Abb. 19 wieder. Der nach etwa 6-stündiger Belichtung ermittelte x_R -Wert: 0.26...0.31 ($n=2$) ist identisch mit dem Rhodopsinanteil, der sich in vitro durch Bestrahlung der isolierten Rhabdome mit Licht der gleichen spektralen Verteilung einstellt (photostationärer Zustand). Allerdings ist das Chromoprotein in gereinigten Photorezeptormembranen - bei gleicher Lichtintensität wie in vivo - bereits nach etwa 15 min Belichtung im photostationären Zustand.

Dagegen hat in vivo Belichtung bei 20...22°C nur eine geringe Abnahme der Rhodopsinmenge zur Folge. Nach 24 h Belichtung ist der Rhodopsinanteil etwa 0.88...0.90 und erreicht selbst nach 48...50 h Dauerbelichtung (70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) nur einen Wert von 0.83...0.86. Offensichtlich ist der auf die Photorezeptormembran auftreffende Photonenstrom zu gering, um in vivo bei 20°C den photostationären Zustand des Chromoproteinsystems ($x_R=0.3$; $x_M=0.7$) einzustellen.

Vermutlich ist bei 20°C die Lichtflußadaptation der Retina (Abschirmung der Rhabdomperipherie durch distale Schirmpigmentgranula) derart wirksam, daß nur eine geringe Rhodopsinmenge isomerisiert wird (s. Diskussion).

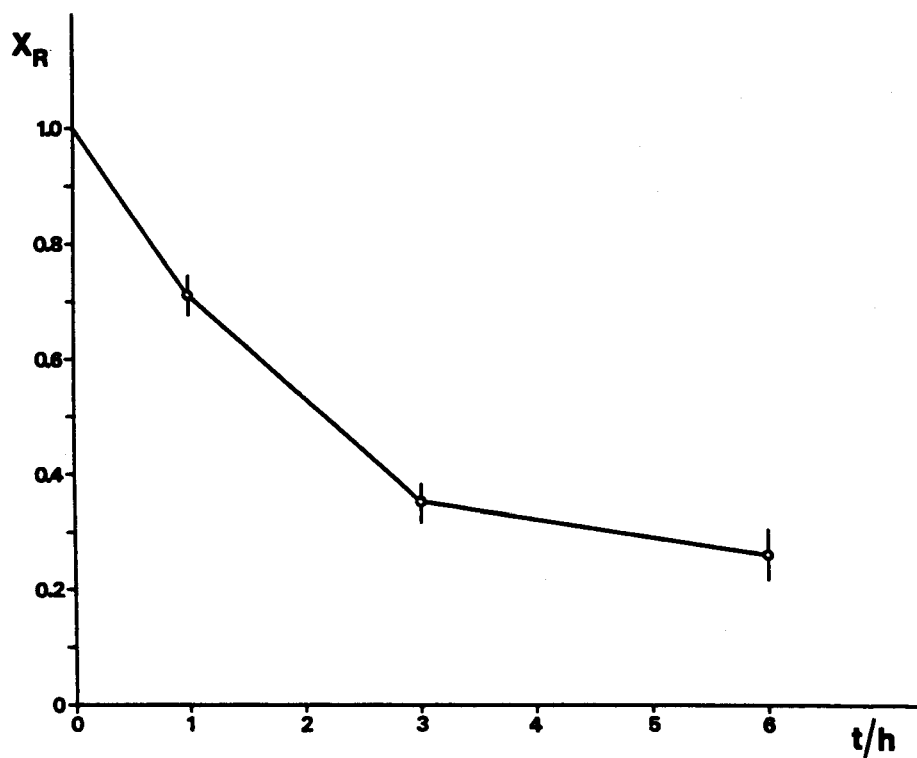


Fig. 19 Dependence of the rhodopsin mole fraction in vivo on the time of irradiation. Dark-adapted crayfish eyes were irradiated at 0°C with roomlight (light intensity: $50\ldots 70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) Each point represents the mean of two experiments.

Der metabolische Prozeß der Substitution von photochemisch gebildetem Metarhodopsin durch Rhodopsin ist - ergänzend zur Lichtflußadaptation - ein Mechanismus, den Rhodopsinanteil in der Photorezeptormembran nicht wesentlich abnehmen zu lassen. Die Kinetik dieser metabolischen Rhodopsinregeneration ist unter 3.10 beschrieben.

Der abschirmende Effekt der distalen Pigmentgranula wird besonders deutlich, wenn z.B. bei 13°C (in der Tierhaltung) >helladaptierte< Krebse - mit hoher Schirmpigmentkonzentration im Bereich der Retinulazellkerne - bei 0°C belichtet werden (70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$). Obwohl die metabolische Regenerationsrate von Rhodopsin bei 0°C vernachlässigbar ist (vergl. 3.10), unterscheidet sich selbst nach 3-stündiger Belichtung der Rhodopsinanteil $x_R: 0.94 \dots 0.97$ nicht wesentlich von demjenigen einer dunkeladaptierten Retina ($x_R \approx 1$). Demzufolge ist es plausibel anzunehmen, daß der größte Teil des einfallenden Lichtes bereits durch das Schirmpigment absorbiert wird und nur ein geringer Photonenstrom die Rhabdome erreicht.

3.9.2 Stoffmengenänderung des Rhodopsins bei Belichtung dunkeladaptierter Krebse mit hoher Intensität bei $\lambda > 550 \text{ nm}$

In einer zweiten Versuchsserie wurden 16...20 h dunkeladaptierte Krebse bei 0°C mit Licht der Wellenlänge $\lambda > 550 \text{ nm}$ (Energiestromdichte: $75 \pm 5 \text{ mW}/\text{cm}^2$) bestrahlt.

Die hohe Lichtintensität verursacht während 60-minütiger Belichtung eine Abnahme des Rhodopsin-Molenbruchs (x_R) von ca. 1.0 auf 0.32 ± 0.13 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$). Der nach 90 min Belichtung erreichte x_R -Wert: $0.15 \dots 0.13$ ist etwa gleich dem Molenbruch im photostationären Zustand.

Die zeitliche Abnahme des Rhodopsinanteils bei 0°C und hoher Lichtintensität (s. Abb. 20) ist - wenn auch mit größerer Geschwindigkeitskonstante - ähnlich derjenigen

bei Bestrahlung der Tiere mit Raumlicht (s. 3.9.1). Eventuell kann die lichtinduzierte Änderung des Rhodopsinanteils in vivo bei 0°C - entsprechend der in vitro gemessenen Isomerisationskinetik (s. 3.3.1) - durch ein Zeitgesetz 1. Ordnung beschrieben werden. Eine mathematische Beschreibung der Kinetik ist jedoch aufgrund der z.T. großen Standardabweichungen und der geringen Zahl von Meßwerten nicht sinnvoll.

Ein Faktor, der offensichtlich die Isomerisationsrate des Rhodopsins in vivo wesentlich beeinflusst, ist - wie bereits unter 3.9.1 erwähnt - die Schirmpigmentbeladung der Rhabdome und die davon abhängige Photonenstromdichte an der Photorezeptormembran. Wie morphologische Untersuchungen an dunkeladaptierten *Astacus*-Krebsen zeigen, unterliegt die Migration der distalen Pigmentgranula einem diurnalen Rhythmus (Röhling, 1980). Anscheinend sind die Rhabdome über Nacht dunkeladaptierter Krebse nicht - wie zunächst angenommen - frei von Schirmpigmenten, sondern haben eine relativ dichte Granulabesetzung an der Rhabdomperipherie, so daß eine wirksame Abschirmung der photosensitiven Membran besteht.

Nach Ergebnissen von S. Röhling liegt eine optimale Depigmentierung der Rhabdome - und damit verbunden eine bessere Zugänglichkeit der Membranen für einfallendes Licht - nach etwa 5-stündiger Dunkeladaptation der Krebse vor (Beginn der Dunkeladaptation im Bereich von 8...17 Uhr).

Beispielsweise bewirkt 15-minütige Belichtung in vivo ($\lambda > 550 \text{ nm}$, $75 \pm 5 \text{ mW/cm}^2$, $\theta = 0^\circ\text{C}$) eines 5 h dunkeladaptierten Krebsauges eine Abnahme des Rhodopsinanteils auf 0.18...0.22. Die Photoisomerisierungsrate ist hier um etwa den Faktor 4 größer als bei Belichtung der über Nacht dunkeladaptierten Tiere.

Im Gegensatz dazu geht der Rhodopsinanteil bei 1-stündiger Belichtung (s.o) eines >helladaptierten< Krebses (hohe Pigmentkonzentration im Bereich der Rhabdome) lediglich auf einen Wert von 0.83...0.85 zurück.

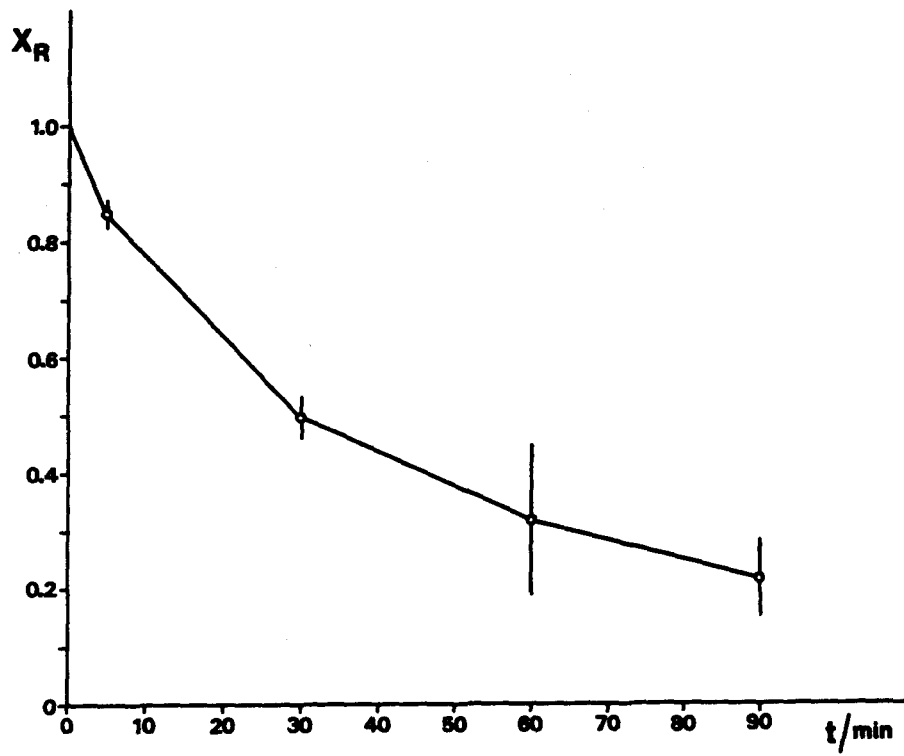


Fig. 20 Dependence of the mole fraction of visual pigment in vivo on the time of irradiation at $\lambda > 550$ nm. Dark-adapted crayfish eyes were irradiated at 0°C through a cut-off filter OG 550 (Schott); light intensity: $75 \pm 5 \text{ mW/cm}^2$

3.10 Metabolische Substitution von Metarhodopsin durch Rhodopsin in der lebenden Retina (Dunkelregeneration)

Belichtung dunkeladaptierter Krebse hat eine Zunahme des Metarhodopsinanteils zur Folge, die je nach Dauer der Belichtung bzw. Größe des Photonenstroms bei einer Temperatur von etwa 0°C zum Erreichen des photostationären Zustands des Chromoproteinsystems führen kann (s. 3.9.1 und 3.9.2).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, nach welchem Mechanismus und mit welcher Kinetik das photochemisch gebildete Metarhodopsin in einem lichtunabhängigen, metabolischen Prozeß durch das isomere Rhodopsin ersetzt werden kann.

Zur Untersuchung dieser sog. Dunkelregeneration des Sehpigmentes wurde ein dunkeladaptierter Krebs bei 0°C belichtet (s. 2.8.1 im methodischen Teil) und nach Beendigung der Belichtung der Rhodopsinanteil einer der beiden Retinen bestimmt. Nach Abtrennung eines der belichteten Augen wurde der Krebs eine bestimmte Zeit isotherm dunkeladaptiert und daran anschließend der Stoffmengenanteil des Rhodopsins in der (regenerierten) Photorezeptormembran analysiert. Aus der Differenz zwischen dem Rhodopsin-Stoffmengenanteil der belichteten Retina und demjenigen nach dem isothermen Dunkelintervall kann die Änderung des Rhodopsin-Molenbruchs (Δx_R) als Funktion der Dunkeladaptationszeit berechnet werden.

Die Mehrzahl der Experimente (7) wurde bei einer Temperatur von $13...15^{\circ}\text{C}$ (Umgebungstemperatur in der Tierhaltung) durchgeführt und die Dauer der Dunkeladaptation zwischen 24 h und etwa 160 h variiert. Bei zwei Versuchen war die Temperatur während des Dunkelintervalls $8...10^{\circ}\text{C}$, ein Versuch wurde bei ca. 5°C durchgeführt.

Der Stoffmengenanteil des in vivo photochemisch gebildeten Metarhodopsins ($x_M = 1 - x_R$) sowie die Zeit der Dunkeladaptation wurden verändert um festzustellen, inwieweit die Kinetik einer metabolischen Änderung des Rhodopsinanteils von diesen beiden Parametern abhängt.

Die Abb. 21 gibt einen Überblick über die Stoffmengenänderung des Rhodopsins in vivo im Verlauf verschiedener Dunkeladaptationsintervalle. Jede Gerade entspricht dem Ergebnis eines Versuches. Die Molenbruchwerte zum Zeitpunkt $t=0$ entsprechen den in vivo photochemisch induzierten Rhodopsinanteilen ($x_R(t=0)$). Der Molenbruchwert nach Beendigung der Dunkeladaptation ($x_R(t)$) ist mit dem zugehörigen Anfangswert linear verbunden. Betrachtet man die Schar der Geraden (punktiert), die aus der Versuchsserie bei 15°C stammen, so fällt auf, daß ihre Steigung näherungsweise gleich ist. Dementsprechend ist die zeitliche Zunahme des Rhodopsinanteils in vivo $(\Delta x_R/\Delta t)_T$ sowohl vom Metarhodopsingehalt zum Zeitpunkt $t=0$ als auch von der Dauer der Dunkeladaptation unabhängig.

Der Differenzenquotient $(\Delta x_R/\Delta t)_{15^\circ\text{C}}$ hat den Wert $0.005 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ ($n=7$) (s. Tab. IV), d.h. der Stoffmengenanteil des Rhodopsins nimmt bei 15°C pro Stunde um etwa 0.5% zu. Wenn z.B. das Rhodopsin in der Photorezeptormembran photochemisch vollständig in Metarhodopsin umgewandelt würde, dauerte es bei 15°C 6...7 Tage, M metabolisch durch R zu ersetzen.

Die Dunkelregeneration von Rhodopsin ist temperaturabhängig. Der Differenzenquotient bei 10°C ist ca. 0.0024 h^{-1} (gestrichelte Geraden in Abb. 21) und somit um etwa den Faktor 2 kleiner als derjenige bei 15°C . Bei 5°C beträgt die Dunkelregenerationsrate nur etwa 25% des Wertes bei 15°C .

Die Frage, ob es sich bei der M-Substitution um eine Neusynthese von Rhodopsin handelt und/oder eine enzymatische Isomerisierung des all-trans Retinyliden-Restes in die 11-cis Konfiguration, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht beantwortet werden (s. Diskussion).

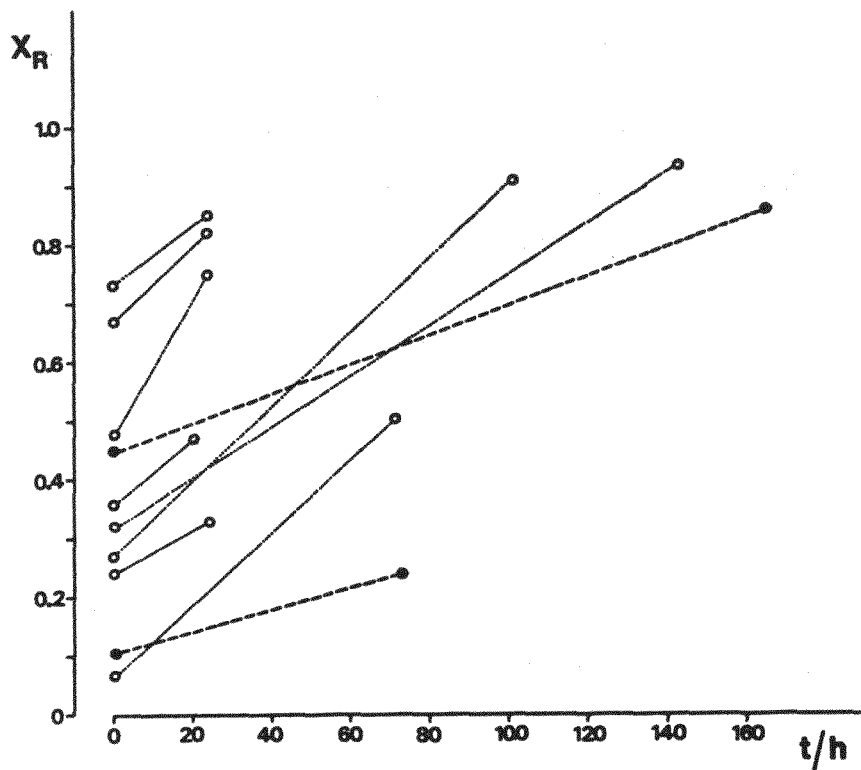


Fig. 21 Increase of the rhodopsin mole fraction x_R in vivo during dark adaptation of crayfish at a constant temperature (15°C or 10°C)
 $x_R(t=0)$ in the mole fraction of rhodopsin after irradiation in vivo at 0°C

The x_R -value after dark adaptation is combined with the original value $x_R(t=0)$ by a dotted line (15°C) and a dashed line (10°C), respectively. Each line represents one experiment.

3.11 Thermisch induzierte Änderung der absorptionsspektroskopischen Eigenschaften der Digitonin-gelösten Chromoproteine

Das Rhodopsin-Metarhodopsinsystem des *Astacus* ist in 2%iger Digitoninlösung bei 0°C und pH 7.0 - auch in Gegenwart von Hydroxylamin ($c(\text{H}_2\text{NOH})=0.02 \text{ mol/l}$) - quasi stabil und wird im Untersuchungszeitraum von etwa 4...5 h offensichtlich nicht in Retinal und Opsin hydrolysiert. Darüberhinaus ist das System photoreversibel (s. 3.4.2).

Bei Temperaturerhöhung beobachtet man eine temperaturabhängige spektroskopische Änderung des Systems, die auf eine Konformationsänderung der Chromoproteine hinweist. Diese thermisch induzierte Änderung führt zum Verlust der Photoreversibilität und hat schließlich eine - durch Lichteinwirkung beschleunigte - irreversible Denaturierung der Chromoproteine zur Folge.

3.11.1 Spektroskopische Änderung eines unbelichteten Extraktes bei Erhöhung der Temperatur von 0°C auf 20°C

Erwärmung des Digitonin-gelösten Rhodopsins (Extrakt der Photorezeptormembranen einer dunkeladaptierten Retina) innerhalb von 20...30 s von 0°C auf 20°C verursacht eine allmähliche hypsochrome Verschiebung des (bei 0°C gemessenen) Spektrums, die nach etwa 60...70 min beendet ist. Der λ_{max} -Wert wird von etwa 530 nm (0°C) auf ca. 490 nm (20°C) verschoben, verbunden mit einer Abnahme des $E_{\lambda_{\text{max}}}$ -Wertes um ca. 30%. Die Bande bei 340 nm ändert sich nicht; daraus folgt, daß bei diesem Prozeß offensichtlich kein Retinal gebildet wird. Nachfolgende Belichtung bei $580 \pm 10 \text{ nm}$ verursacht eine Zunahme der Extinktion im Bereich 500...370 nm, während das Spektrum bei $\lambda > 530 \text{ nm}$ praktisch unverändert bleibt. Anschließende Belichtung des Extraktes bei $\lambda_e = 500 \pm 20 \text{ nm}$, bewirkt keine photoreversible Reaktion, sondern

führt zu einer Extinktionszunahme im UV-Bereich (406...300 nm) die eine Denaturierung des Chromoproteins unter Bildung von Retinal bzw. Retinaloxim indiziert. Permanente Belichtung bei 20°C ($\lambda_e = 500 \pm 20$ nm; $I = 90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) bewirkt innerhalb von 4 h eine vollständige hydrolytische Abspaltung der chromophoren Gruppe. Der isosbestische Punkt der nach verschiedenen Belichtungszeiten gemessenen Spektren liegt bei ca. 406 nm (vergl. Abb. 24).

3.11.2 Spektroskopische Änderung eines unbelichteten Extraktes bei Erhöhung der Temperatur von 0°C auf 30°C

Nach Temperaturerhöhung auf 30°C wird eine schnelle und irreversible hypsochrome Verschiebung des bei 0°C gemessenen Spektrums (1) beobachtet. Kurve 2 in Abb. 22 zeigt das Spektrum unmittelbar nach Erwärmung auf 30°C. Die isotherme Änderung führt innerhalb von 14 min zu einem am spektralen Verlauf deutlich werdenden Zwischenzustand des Systems (s. Kurve 4, Abb. 22), ähnlich dem bei 20°C gemessenen. Die Verschiebung des λ_{max} -Wertes auf 480...490 nm sowie die Abnahme von $E_{\lambda_{\text{max}}}$ um etwa 30% verläuft 5-fach schneller als bei 20°C. Der Verlauf der UV-Bande (λ_{max} bei 340 nm) bleibt - wie Abb. 22 deutlich macht - offensichtlich unverändert.

Die Verlagerung der 340 nm-Bande in Richtung Basislinie ist vermutlich auf eine durch die Temperaturerhöhung verursachte Änderung der Streueigenschaften der mizellaren Lösung zurückzuführen.

Die irreversible Verschiebung des Rhodopsinspektrums (Spektrum 1 → 4) ist wahrscheinlich die Folge einer thermisch induzierten Konformationsänderung des Chromoproteins (s. Diskussion), die bei 30°C nach 15...17 min beendet ist. Das Konformere ist bei 30°C nicht stabil, sondern denaturiert unter Abspaltung des Chromophors (vermutlich 11 cis-Retinal). Man beobachtet eine allmähliche Abnahme der Extinktion im Bereich 600...410 nm sowie eine Zunahme zwischen 410 nm

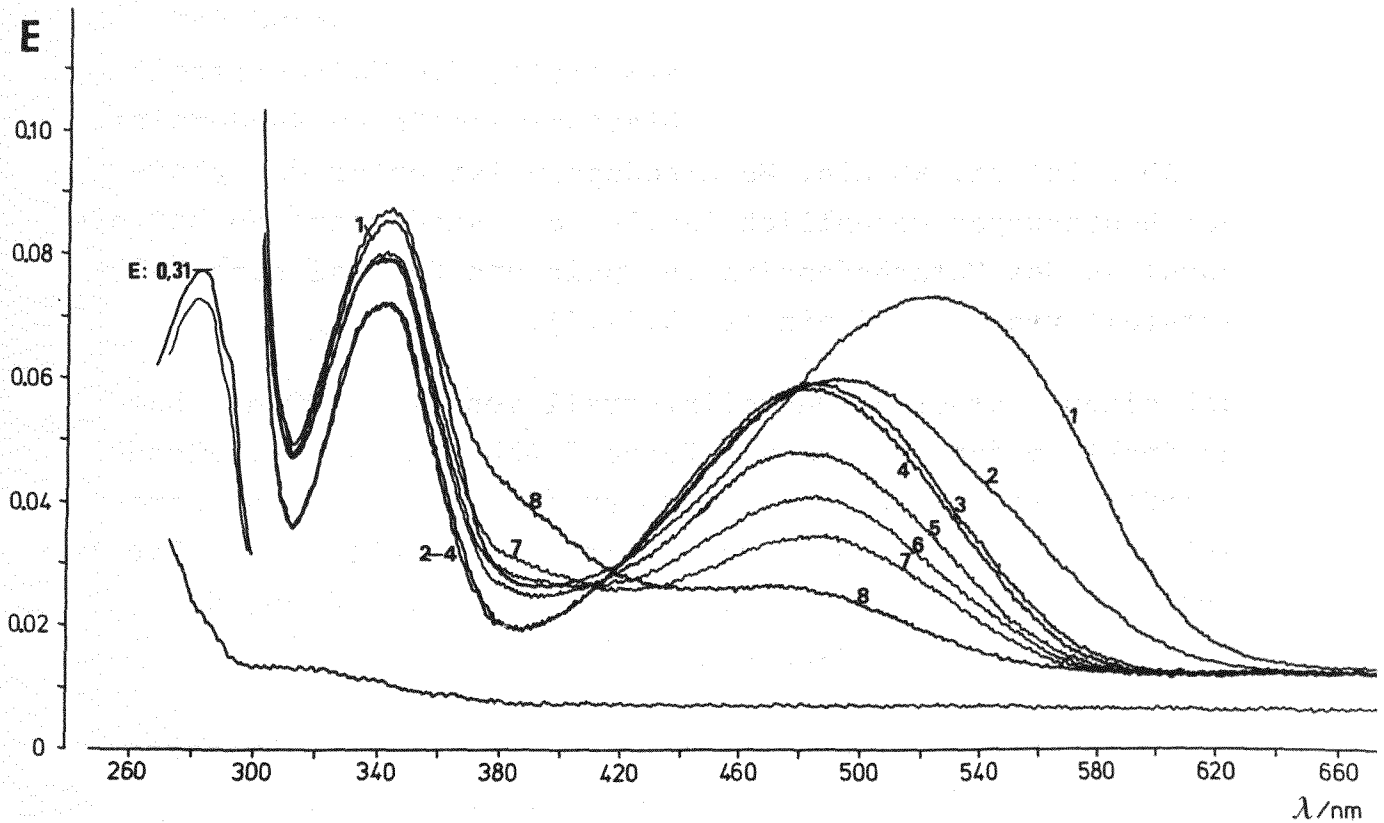


Fig. 22 Spectral change of digitonin-solubilized rhodopsin as a consequence of increasing the temperature from 0°C to 30°C .

curve 1: spectrum of the unexposed digitonin extract of purified rhabdoms at 0°C

curve 2: spectrum immediately after reaching the temperature of 30°C (temperature increasing within 30s)

curve 3: after 7 min in the dark at 30°C

curve 4: after 14 min at 30°C (intermediate state)

curve (5): after 105 min; (6) 175 min; (7) after total 300 min denaturation in the dark at 30°C

curve 8: after additional irradiation with light at 500 nm for 5 min (30°C)

und etwa 300 nm. Auffallend ist, daß die Extinktionszunahme im UV-Bereich anscheinend wesentlich kleiner ist als die Abnahme im sichtbaren Spektralbereich.

Die Kinetik des Denaturierungsprozesses wurde anhand der Extinktionsabnahme bei 480 nm ermittelt; die Halbwertszeit der thermischen Bleichung des Digitonin-gelösten Rhodopsins bei 30°C ist ca. 80 min. Metarhodopsin ist unter den gleichen Bedingungen wesentlich labiler als Rhodopsin: So hat die Hydrolyse des Metarhodopsins in Opsin und Retinal eine Halbwertszeit von etwa 34 min (s. 3.11.4).

Nach einem isothermen Dunkelintervall von etwa 300 min hat das Spektrum den Verlauf von Kurve 7 Abb. 22. Anschließend 5-minütige Belichtung bei 500 ± 20 nm (30°C) verursacht eine lichtinduzierte Bleichung des Systems (s. Spektrum 8). Die Abnahme der Extinktion ist maximal bei 490...500 nm, die Zunahme bei 370 nm ($\Delta E_{490}/\Delta E_{370} \approx 1$).

3.11.3 Spektroskopische Änderung des belichteten Extraktes bei Erhöhung der Temperatur von 0°C auf 20°C

Kurve 1 in Abb. 23 zeigt das Spektrum eines Digitonin-Rhodomextraktes (bei 0°C) im photostationären Zustand nach Belichtung bei 625 ± 15 nm. In dem belichteten Extrakt ist der Stoffmengenanteil des Metarhodopsins $x_M \approx 1$. (s. 3.8.1)

Durch Erhöhung der Temperatur auf 20°C (im Dunkeln) wird eine spektrale Änderung des Systems bewirkt (vergl. Abb. 23), die mit einer Extinktionsabnahme im Bereich 610...390 nm verbunden ist, während die Bande bei 340 nm praktisch unverändert bleibt. Da die Extinktion im UV-Bereich konstant bleibt, wird Retinal offensichtlich nicht abgespalten. Die Kinetik der Extinktionsänderung entspricht formal einer Reaktion 1. Ordnung mit einer Halbwertszeit von 9...11 min. Nach einem Dunkelintervall von 80 min (20°C) wurde Spektrum 7 in Abb. 23 gemessen. Wird der Extrakt anschließend auf 0°C gekühlt, so

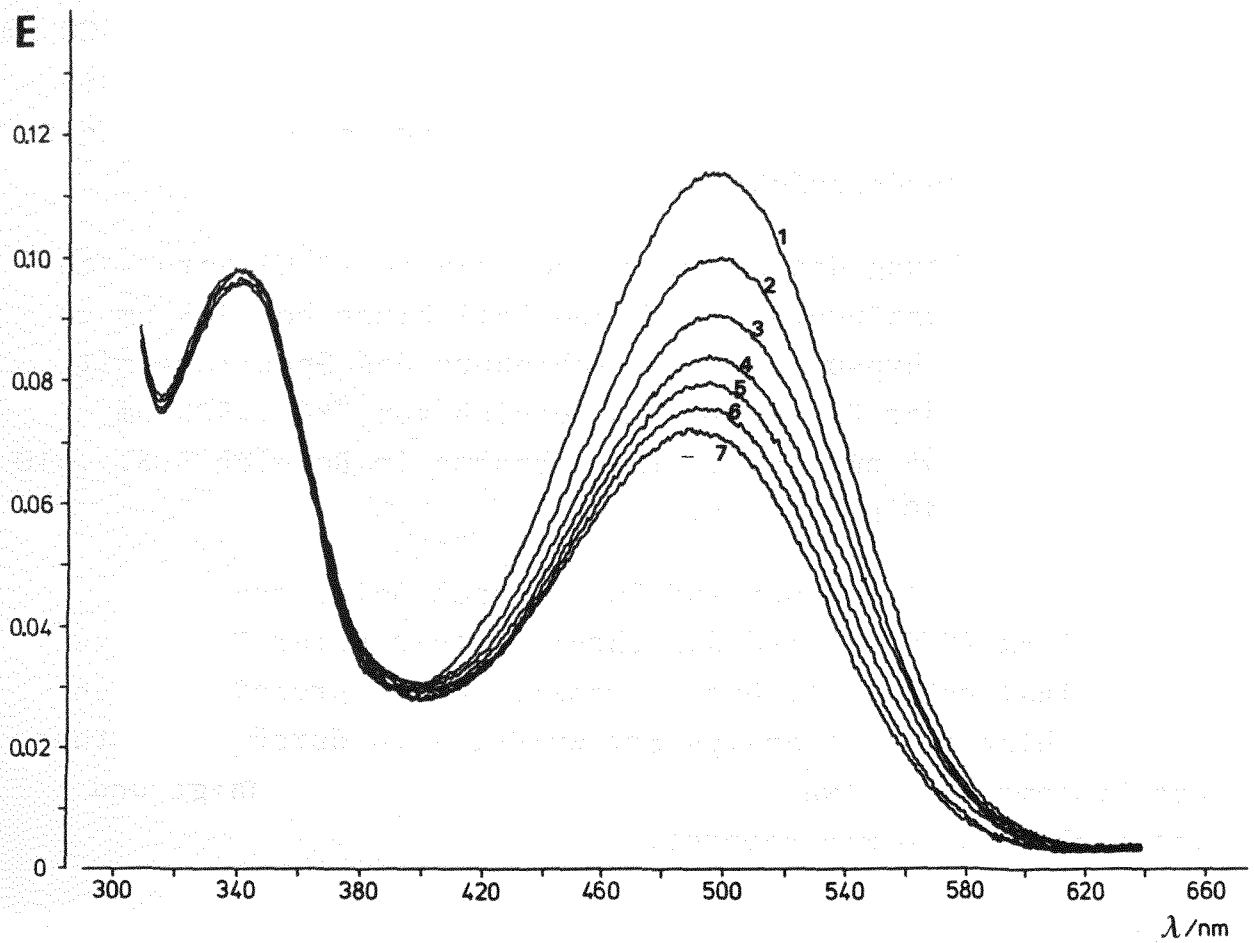


Fig. 23 Thermally induced spectral change of digitonin-solubilized metarhodopsin after increasing the temperature from 0°C to 20°C
 curve 1: spectrum of the chromoprotein at 0°C in the photo-stationary state after irradiation at $625 \pm 15 \text{ nm}$
 2: 5 min after increasing the temperature for 20°C
 3: after a 10 min dark period at 20°C
 (curve 4): after 15 min; (5) 25 min; (6) 45 min; (7) 80 min at 20°C in the dark.

beobachtet man keine reversible (bathochrome) Verschiebung des Spektrums.

Vermutlich ist die Extinktionsabnahme - die bei $\lambda=495\ldots500$ nm maximal ist - ähnlich wie beim Digitonin-gelösten Rhodopsin (s. 3.11.1) auf eine irreversible Änderung der Chromoproteinkonformation zurückzuführen.

Erneute Belichtung des Extraktes bei 625 nm (0°C) verursacht keine Extinktionsänderung, während Belichtung bei 465 nm zu einer weiteren hypsochromen Verschiebung des Spektrums mit einer Zunahme der Extinktion im Bereich von 380...505 nm ($\Delta E_{\text{max}}=445\ldots455$ nm) sowie einer Abnahme im Bereich 505...610 nm ($\Delta E_{\text{max}}=530\ldots540$ nm) führt.

Durch erneutes Aufwärmen auf 20°C - nach Belichtung bei $\lambda_e=465\pm5$ nm (0°C) - wird das Chromoprotein unter Freisetzung von Retinal gebleicht. Dieser Denaturierungsprozeß, dessen Kinetik bisher nicht analysiert wurde, wird durch Belichtung des Systems (bei etwa 500 nm) wesentlich beschleunigt und ist nach etwa 20 min beendet.

3.11.4 Spektroskopische Änderung des belichteten Extraktes bei Erhöhung der Temperatur von 0°C auf 30°C

Digitonin-gelöstes Metarhodopsin (vergl. 3.11.3) wurde in Gegenwart von Hydroxylamin ($c(\text{H}_2\text{NOH})=0.02$ mol/l) innerhalb von 20...30 s von 0°C auf $30\pm1^{\circ}\text{C}$ erwärmt.

Unmittelbar danach wurde das Spektrum gemessen (Kurve 1, Abb. 24), anschließend die mizellare Lösung jeweils nach bestimmten isothermen (30°C) Dunkelintervallen (s. Legende der Abb. 24) spektroskopiert. Die Extinktion nimmt im sichtbaren Bereich ab und im Spektralbereich 406...300 nm infolge Retinaloximbildung zu. Der isosbestische Punkt bei dieser thermischen Denaturierung ist, wie bei der photochemisch induzierten, bei etwa 406 nm.

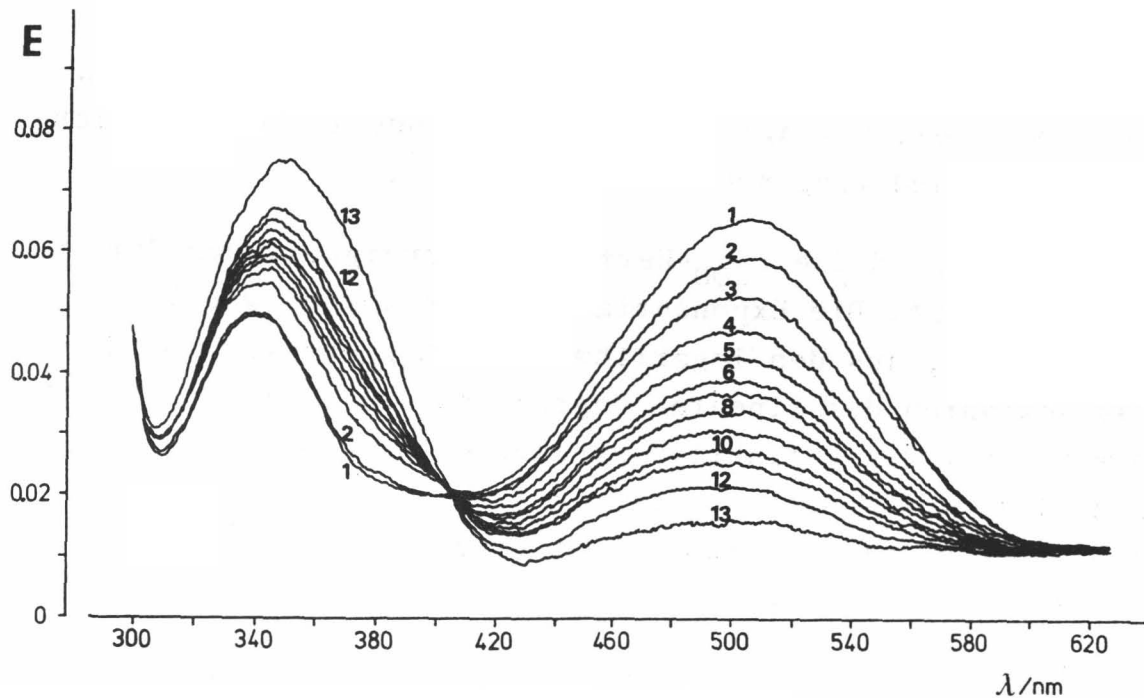


Fig. 24 Thermally induced spectral change of digitonin-solubilized metarhodopsin at 30°C

curve 1: spectrum of the chromoprotein at 0°C in the photo-stationary state after irradiation at 600 ± 15 nm

curve 2: Immediately after warming the extract to about 30°C (temperature increasing within 20...30s)

curve 3: after 5 min; (4) 10 min; (5) 13 min; (6) 16 min; (7) 20 min; (8) 25 min; (9) 35 min; (10) 45 min; (11) 52 min; (12) after 100 min at 30°C

curve 13: spectrum measured after additional light-induced bleaching (irradiation at 500 nm for 5 min) at 30°C

spectrum for the complete bleached system.

Aus der zeitlichen Änderung der Extinktion bei 500 nm (dem Ort etwa größter Extinktionsabnahme) läßt sich die Kinetik der thermisch induzierten Denaturierung des Metarhodopsins bei 30°C berechnen. Der Anfangswert zur Ermittlung der kinetischen Daten ist die Extinktion bei 500 nm nach Erwärmung des Extraktes auf 30°C ($E_{500}(t=0)$). Als Endwert dient E_{500} nach Dunkelintervallen von insgesamt 200 min; zu dieser Zeit beträgt die thermisch induzierte, zeitliche Extinktionsänderung noch etwa 0.005 h^{-1} .

In Abb. 25 sind die E_{500} -Werte in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet. Die Exponentialfunktion wurde, wie in 3.2.1 beschrieben, aus den logarithmierten E_{500} -Werten (o) durch das Verfahren der linearen Regression ermittelt ($r^2=0.999$). Dem Verlauf der Extinktionsabnahme entsprechend folgt die Hydrolyse des Metarhodopsins in trans-Retinal und Opsin einem Zeitgesetz 1. Ordnung mit einer Halbwertszeit $\tau_{1/2}=35,5 \text{ min}$; die Geschwindigkeitskonstante ist $k=0.0195 \text{ min}^{-1}$.

Ein zweiter Versuch ergab die Werte $\tau_{1/2}=34 \text{ min}$ bzw. $k=0.019 \text{ min}^{-1}$. (Die hier wiedergegebenen Daten sind nicht aus den spektralen Änderungen der Abb. 24 berechnet, sondern wurden anhand der Extinktionswerte (E_{500}) anderer Chromoprotein-Präparationen ermittelt.)

Das nach 3 h thermischer Denaturierung bei 30°C gemessene Spektrum (vergl. Kurve 12, Abb. 24) ist bemerkenswerterweise nicht identisch mit dem Spektrum des vollständig gebleichten Chromoproteins (Kurve 13, Abb. 24). Belichtung des thermisch denaturierten Systems bei $500 \pm 10 \text{ nm}$ (Energieflußdichte: $95 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) (30°C) verursacht eine weitere Extinktionsabnahme im Bereich 580...410 nm (ΔE_{max} bei 500 nm) und eine Zunahme der Extinktion im nahen UV-Bereich, maximal bei 365...370 nm.

Diese lichtinduzierte Bleichung ist nach ca. 5 min Belichtung (s.o.) beendet, wobei die Extinktionsabnahme bei 500 nm direkt proportional der E-Zunahme bei 370 nm ist. Demgegenüber beträgt das Verhältnis der Extinktionsänderung

$\Delta E_{500}/\Delta E_{370}$ bei thermischer Denaturierung 1.49, d.h. die Zunahme der Extinktion bei 370 nm ist scheinbar nur ca. 70% der Abnahme bei 500 nm. Bisläng ist jedoch nicht geklärt, in welchem Maße die Bande bei 340 nm sich im Verlauf der thermischen Denaturierung des Chromoproteins verändert und somit eine Extinktionszunahme bei 370 nm überlagert (s. Diskussion).

Zur Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten des Rhodopsins bzw. Metarhodopsins ist die Kenntnis der Änderung der 340 nm-Bande durch Bleichung des Chromoproteins notwendig, damit die durch Entstehung von Retinaloxim bedingte Extinktionszunahme bei 365...370 nm bestimmt werden kann.

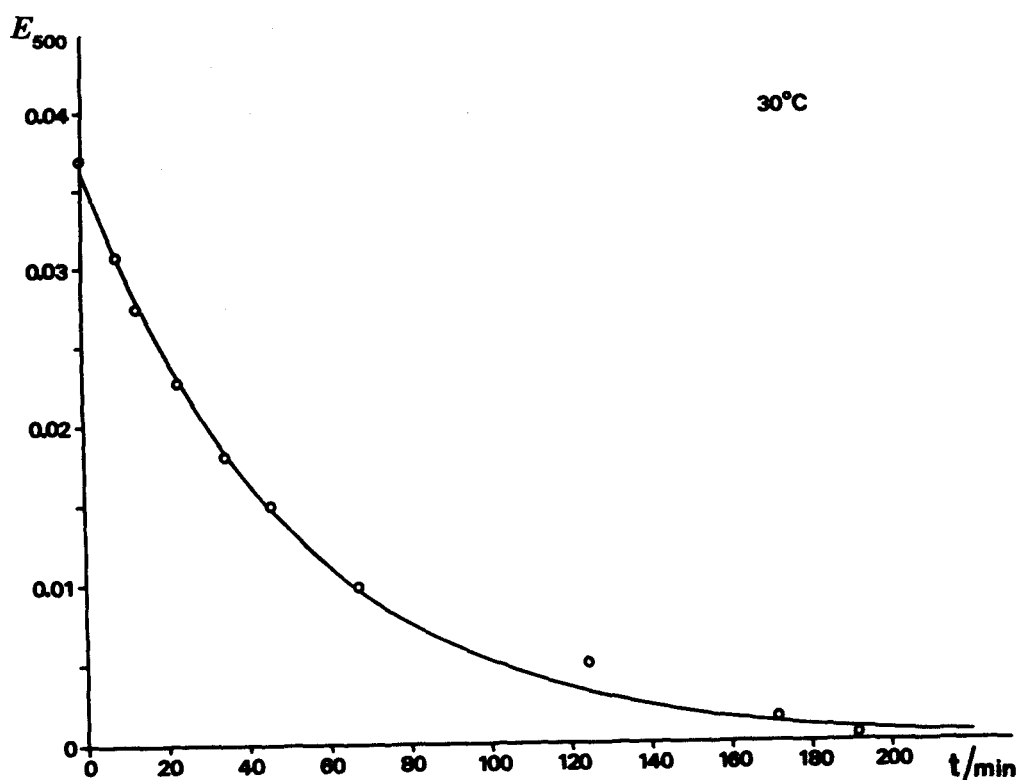


Fig. 25 Kinetic of the thermally induced bleaching of metarhodopsin in digitonin solution at 30°C. The figure shows the extinction at 500 nm depending on time in darkness.

(The extinction decrease is proportional to the change of metarhodopsin concentration c_M ($\Delta E_{500} \propto \Delta c_M$). The reaction follows first-order kinetic.

4 Diskussion

4.1 Spektrale Eigenschaften des *Astacus*-Chromoproteins

Die für Sehpigmente der Evertebraten typischen Merkmale: Photoreversibilität und Thermostabilität im membrangebundenen Zustand, wurden beim *Astacus*-Chromoprotein durch mikrospektralphotometrische Messungen an Rhabdomen nachgewiesen (Wilms, 1977). Die Extremwerte der von Wilms gemessenen Differenzspektren ($\Delta E_{\max}$ bei 570 nm bzw. 475 nm) stimmen etwa mit den Werten überein, die an sonifizierten Rhabdomsuspensionen und dem mizellar gelösten Chromoprotein ermittelt wurden (s. 3.2).

Die spektralen Eigenschaften des Rhodopsinsystems in situ (gemessen an Rhabdomen) und in vitro (gemessen an sonifizierten Rhabdomsuspensionen bzw. Digitonin-Rhabdomextrakten bei 0°C, pH7.0) stimmen gut überein. Die Spektroskopie der homogenen Phasen ergibt jedoch wesentlich exaktere Daten des Rhodopsin-Metarhodopsinsystems, zumal das Signal-Rausch-Verhältnis etwa um den Faktor 10 besser ist als bei der Mikrospektralphotometrie einzelner Rhabdome. Darüber hinaus ermöglicht die relativ gute Photorezeptor-membranausbeute die (konventionelle) absorptionsspektroskopische Analyse des Rhodopsins einer einzigen *Astacus*-Retina. Insofern ist eine mikrospektralphotometrische Untersuchung der Rhabdome nur dann sinnvoll, wenn anisotrope spektrale Eigenschaften des rhabdomeren Chromoproteins (z.B. Dichroismus) analysiert werden sollen.

Der $\lambda_{\max}$ -Wert des *Astacus*-Rhodopsins liegt bei ca. 530 nm und ist etwa gleich dem Absorptionsmaximum, das mikrospektralphotometrisch an einzelnen Rhabdomen dunkeladaptierter Krebse: *Procambarus clarkii* und *Oronectes rusticus* ($\lambda_{\max} = 525 \dots 530$ nm) gemessen wurde (Fujimoto et al., 1966; Waterman, Fernandez und Goldsmith, 1969; Goldsmith, 1977). Die absorptionsspektroskopischen Messungen von

Wilms (1977) an *Astacus*-Rhabdomen ermöglichen - aufgrund fehlender Basisspektren - keine genaue Bestimmung der $\lambda_{\max}$ -Werte des Rhodopsins bzw. Metarhodopsins. Belichtung des membrangebundenen *Procambarus*- bzw. *Orconectes*- Rhodopsins bei $\lambda > 550$ nm führt zur Bildung von Metarhodopsin, dessen $\lambda_{\max}$ von Goldsmith (1977) mit 515 nm angegeben wird.

Belichtet man das *Astacus*- Rhodopsin bei $\lambda > 630$ nm (0°C), so hat das entstehende Metarhodopsin ($\lambda_{\max} \approx 500$ nm) einen molaren Extinktionskoeffizienten, der sowohl in Digitoninlösung als auch im membrangebundenen Zustand um den Faktor 1.4...1.43 größer ist als derjenige des Rhodopsins.

Das Verhältnis der $\lambda_{\max}$ -Werte des *Homarus*-Sehpigmentes in Digitonin-Mizellen (Wald und Hubbard, 1957) sowie im Rhabdom (Bruno et al., 1977) wird mit 1.2 angegeben. Einen ähnlichen Wert findet Goldsmith (1977) für das Sehpigmentssystem des *Procambarus* und *Orconectes*. Vermutlich ist der von Goldsmith und Bruno postulierte Verhältniswert $\epsilon_{M(\lambda_{\max})} / \epsilon_{R(\lambda_{\max})}$ zu klein, da durch Belichtung des Sehpigmentes bei $\lambda > 550$ nm Rhodopsin nicht quantitativ zum Metarhodopsin isomerisiert wird. Darüberhinaus wird bei Raumtemperatur bereits eine licht- und thermisch induzierte Denaturierung des Metarhodopsins beobachtet.

Die lichtinduzierte Isomerisierung des Rhodopsins bzw. Metarhodopsins verläuft bei konstanter Lichtintensität ($\theta = 0^{\circ}\text{C}$) sowohl im nativen membrangebundenen Zustand als auch mizellar gelöst nach der gleichen photochemischen Kinetik. Schwemer et al. (1971) konnten die gleiche Gesetzmäßigkeit am System des UV-Sehfarbstoffes von *Ascalaphus macaronius* nachweisen.

Die spektralen Eigenschaften des Digitonin-gelösten Chromoproteins sind offensichtlich temperaturabhängig. So wird das Rhodopsinspektrum bei Erhöhung der Temperatur von 0°C auf 20 bzw. 30°C irreversibel hypsochrom verschoben. Beim Metarhodopsin wird ebenfalls eine - im Vergleich zu Rhodopsin nur geringe spektrale Verschiebung hervorgerufen, bevor

es unter Retinalabgabe denaturiert. Ursache der hypsochromen Verschiebung des Rhodopsinspektrums ist vermutlich eine irreversible strukturelle Änderung des Proteins, die einen Einfluß auf die Wechselwirkung zwischen dem Chromophor Retinal und dem Opsin und damit auf die Lage des $\lambda_{\max}$ -Wertes hat.

Einige Autoren konnten nachweisen, daß Detergensextraktion der Sehpigmente einiger Evertebraten eine Veränderung des am membrangebundenen System gemessenen Rhodopsinspektrums bewirkt (z.B. bei der Krabbe *Callinectes*; Bruno u. Goldsmith, 1974). Allerdings ist die Frage offen, ob die spektrale Änderung lediglich auf die Anwesenheit des Digitonins oder möglicherweise auf einen Temperatureffekt zurückzuführen ist. So hat das Digitonin-gelöste *Astacus*-Chromoprotein nur bei etwa 0°C gleichartige absorptionsspektroskopische Eigenschaften wie das membrangebundene ($\theta < 20^{\circ}\text{C}$). In gleicher Weise sind die spektralen Eigenschaften des Sehpigmentensystems von *Deilephila elpenor* sowohl in Digitonin (gemessen bei -15°C) als auch in situ (mikrospektralphotometrische Messung bei 20°C) annähernd identisch (Schwemer u. Paulsen, 1973). Andererseits hat eine Temperatur von 29°C offensichtlich keinen wesentlichen Einfluß auf das Extinktionsspektrum des *Homarus*-Rhodopsins, sowohl membrangebunden (Bruno u. Barnes, 1977) als auch Digitonin-gelöst (Wald und Hubbard, 1957).

4.2 Abschätzung der molaren Extinktionskoeffizienten

Offen ist die Frage, inwieweit die Extinktionsbande mit dem Maximum bei 340 nm (s. 3.4) dem Rhodopsinspektrum zugeordnet werden kann oder auf eine Komponente zurückzuführen ist, die sich auch in wäßrigen Extrakten der Schirmpigmentgranula spektroskopisch nachweisen läßt (Hamacher, 1977). Die unzureichenden Kenntnisse der photosensitiven Eigenschaften des Rhodopsins im nahen UV-Bereich erlauben keine Aussage über das etwaige Auftreten eines Extinktionsmaximums des Chromoproteins im Spektralbereich $\lambda < 390$ nm. Die Beantwortung der Frage wird besonders dadurch erschwert, daß bei Denaturierung des Chromoproteins das Spektrum des Retinals bzw. Retinaloxims eventuelle Änderungen der 340 nm-Bande überlagert. Wegen dieser Überlagerung kann die Menge des freigesetzten Retinal(oxims) aus der spektralen Änderung ΔE_{365} bei thermischer Denaturierung nicht exakt bestimmt werden. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, die molaren Extinktionskoeffizienten von Rhodopsin und Metarhodopsin zu berechnen. Anhand der Differenzspektren (vergl. Abb. 12) können lediglich Abschätzungen der $\epsilon_{\max}$ -Werte vorgenommen werden. Demnach liegt der $\epsilon_{\max}$ -Wert des Digitonin-gelösten Rhodopsins im Bereich 41500...45500 $1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, während $\epsilon_{\max}$ des Metarhodopsins etwa den Faktor 1.4 größer ist als derjenige des Rhodopsins ($\epsilon_{M\lambda_{\max}}$: 58000...64000 $1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). $\epsilon_{\max}$ -Werte anderer Crustaceen sind in der Literatur nicht angegeben. Die abgeschätzten Werte stimmen mit den bei Cephalopoden- und Vertebraten-Rhodopsin gemessenen Werten relativ gut überein (vergl. Wald u. Brown, 1953; Hubbard u. St. George, 1957).

4.3 Thermische Stabilität des *Astacus*-Chromoproteins

Digitonin-gelöstes Rhodopsin bzw. Metarhodopsin ist bei etwa 0°C bemerkenswert stabil und hat praktisch die gleichen spektralen Eigenschaften wie das membrangebundene Sehpigment.

Hydroxylamin induziert allerdings auch bei niedriger Temperatur eine allmähliche Denaturierung des Chromoproteins. Im System sonifizierter Rhabdomsuspensionen ist das membrangebundene Chromoprotein bei 0°C thermisch stabil und photo-reversibel und zeigt erst oberhalb von etwa 30...40°C eine beschleunigte Denaturierung unter Freisetzung von Retinal. Das in Digitonin gelöste Chromoprotein ist dagegen schon bei Raumtemperatur wesentlich instabiler und geht offensichtlich über eine konformative Änderung des Proteins - verbunden mit einer spektralen Verschiebung (s. 3.11) - schließlich in Opsin und Retinal über.

Die Kinetik der Hydrolyse des *Astacus*-Metarhodopsins in Opsin und Retinal erfolgt - entsprechend der hydrolytischen Spaltung des *Homarus*-Metarhodopsins (Wald und Hubbard, 1957) - nach einer Reaktion 1. Ordnung. Die Halbwertszeit der hydrolytischen Denaturierung beträgt beim *Astacus*-Metarhodopsin etwa 35 min (30°C) bzw. 43 min beim *Homarus*-Metarhodopsin (29°C).

Eine Besonderheit des Chromoproteins zeigt die absorptions-spektroskopische Analyse der thermisch induzierten Hydrolyse des Digitonin-gelösten Metarhodopsins. Nach 3 h thermischer Denaturierung bei 30°C resultiert ein System, welches durch Belichtung bei $\lambda_e = 500$ nm vollständig gebleicht wird, verbunden mit Retinalfreisetzung und einer Extinktionsabnahme im sichtbaren Spektralbereich. Diese lichtinduzierte Bleichung weist darauf hin, daß im Digitonin-Rhabdomextrakt - neben dem Metarhodopsin - ein weiteres, derzeit nicht näher charakterisiertes, photosensitives Produkt vorliegt bzw. entsteht, das thermisch wesentlich stabiler ist als Metarhodopsin (bzw. Rhodopsin s.u.). Die Frage, ob dieses Retinyliden-Chromo-

protein eine integrale Komponente der Photorezeptormembran ist oder im Verlauf der irreversiblen thermischen Denaturierung des Metarhodopsins in einer Parallelreaktion aus M gebildet wird, ist völlig offen.

Ähnliche Merkmale beobachtet man bei der thermischen Denaturierung des Digitonin-gelösten Rhodopsins: Nach Beendigung der thermischen Bleichung des unbelichteten Sehpigmentes (ca. 5 h bei 30°C) hat Belichtung des Systems bei $\lambda_e = 500 \dots 550$ nm eine weitere Bleichung unter Freisetzung von Retinal zur Folge. Die Ähnlichkeit der lichtinduzierten spektralen Änderung - nach thermischer Bleichung - im belichteten und unbelichteten Extrakt (s. 3.11.2 und 3.11.4) weist darauf hin, daß die im Verlauf der thermischen Bleichung auftretenden Produkte in beiden Systemen (M bzw. R) möglicherweise identisch sind.

Es sind jedoch zusätzliche absorptionsspektroskopische Untersuchungen notwendig, dieses Phänomen genauer zu erklären.

Bei der Untersuchung der thermischen Denaturierung des membrangebundenen *Homarus*-Sehpigmentes (Mikrospektralphotometrie Glutaraldehyd-fixierter Rhabdome) beobachteten Bruno et al. (1977) bei 20°C innerhalb von 6 h eine partielle, thermisch induzierte Bleichung des Chromoproteins. Das nach diesem Dunkelintervall noch vorhandene Pigment konnte durch 7 min Belichtung bei $\lambda > 470$ nm vollständig gebleicht werden. Die Kinetik des Denaturierungsprozesses ließ sich nicht exakt durch eine Reaktion 1. oder 2. Ordnung beschreiben, so daß eine qualitative Bestimmung möglicher Zwischenprodukte nicht möglich war.

4.4 Metabolische Regeneration des *Astacus*-Rhodopsins

Grundsätzlich gibt es drei Mechanismen der Regeneration von Evertebraten-Rhodopsin:

- a) photochemische Isomerisierung des Metarhodopsins
- b) Neusynthese des Rhodopsins
- c) enzymatisch katalysierte Isomerisierung des Metarhodopsins

Die photochemische Regeneration ist ein wirksamer und rasch verlaufender Prozeß, Metarhodopsin in Rhodopsin zu überführen und deshalb physiologisch von Bedeutung (vergl. Hamdorf, 1979; Goldsmith, 1972).

Aufgrund der Überlagerung der Spektren von R und M ist jedoch eine vollständige Isomerisierung des Metarhodopsins zum Rhodopsin nicht möglich. Da es keinen Hinweis gibt, daß die Photorezeptormembran eines vollständig dunkeladaptierten (Krebs)-Auges Metarhodopsin in nachweisbaren Mengen enthält (vergl. Bruno u. Barnes, 1977), muß ein metabolischer Prozeß postuliert werden, der zur Substitution von Metarhodopsin durch Rhodopsin führt. Eine derartige (temperaturabhängige) Dunkelregeneration konnte beim *Astacus leptodactylus* nachgewiesen werden (vergl. Abb. 21). Die Untersuchung der Kinetik der metabolischen Regeneration von Rhodopsin ergab, daß die zeitliche Änderung (Zunahme) des R-Stoffmengenanteils praktisch unabhängig ist vom Metarhodopsinanteil zu Beginn des isothermen Dunkelintervalls. Bemerkenswert ist der langsame Verlauf des Regenerationsprozesses. Die vollständige Substitution von $M(x_M: 1 \rightarrow 0)$ durch R dauert bei 15°C etwa 6...7 Tage, wohingegen mikrospektralphotometrische Untersuchungen der in vivo Dunkelreaktion von Rhodopsin bei Hummer *Homarus* (Bruno et al., 1977) ergaben, daß bei 15°C im Verlauf eines ca. 2.5-stündigen Dunkelintervalls M vollständig durch $R(x_R: 0 \rightarrow 1)$ ersetzt wird.

Die R-Regenerationsraten anderer Crustaceen sind zur Zeit nicht bekannt. Allerdings wurde bei der Untersuchung der spektralen Empfindlichkeit Schirmpigment-freier Augen von

Procambarus clarkii (Kong u. Goldsmith, 1977) festgestellt, daß nach einer lichtinduzierten Bleichung Rhodopsin in vivo bei Dunkelheit innerhalb von 5...14 Tagen vollständig regeneriert wird. Diese Regenerationszeit stimmt mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Zeiten etwa überein.

Voraussetzung zur Bestimmung der Reaktionskinetik einer in vivo Bildung des *Astacus*-Rhodopsins ist die Kenntnis der zeitlichen Konzentrationsänderung des Rhodopsins $(dc_R/dt)_T$. Anhand der spektralen Daten kann jedoch lediglich der Stoffmengenanteil der beiden Isomere berechnet werden, so daß die Stoffmenge des Chromoproteins und damit die Konzentration nicht bekannt ist. Die zur Zeit vorliegenden Ergebnisse zur Morphologie der *Astacus*-Retina erlauben keine Aussage über Änderungen des Rhabdomvolumens und damit der Gesamtproteinmenge im Verlauf eines mehrtägigen Dunkelintervalls.

Hafner et al. (1980) konnte in vivo bei *Procambarus*-Rhabdomen - innerhalb eines 4...6-stündigen Belichtungsintervalls - eine Abnahme des Rhabdomdurchmessers um 25% feststellen. Während eines anschließenden Dunkelintervalls von 6 h hatte der Durchmesser wieder den maximalen Wert erreicht.

Kong u. Goldsmith (1977) stellten bei der Schirmpigmentfreien Mutante des *Procambarus* fest, daß auch nach einem mehrtägigen Dunkelintervall die Rhabdome eine normale Struktur haben. Dementsprechend kann man in erster Näherung eine konstante Photorezeptormembranfläche und damit insgesamt eine gleichbleibende Chromoprotein-Stoffmenge während eines einwöchigen Dunkelintervalls zugrunde legen. Mehrwöchige Dunkeladaptation der *Procambarus*-Krebse (2...16 Wochen) hat dagegen wesentliche strukturelle Änderungen der Rhabdome zur Folge, begleitet von einer Abnahme des Chromoprotein-gehalts auf etwa 50% der ursprünglichen Menge (im Verlauf von etwa 4 Wochen) (Eguchi u. Waterman, 1979).

Nimmt man an, daß die Stoffmenge des *Astacus*-Chromoproteins während des Dunkelintervalls (bis zu 7 Tagen) konstant

bleibt, so gilt (vergl. 3.10): $\Delta x_R \propto \Delta n_R = -\Delta n_M$, d.h. die Zunahme der R-Stoffmenge ist proportional der Änderung des R-Stoffmengenanteils x_R . Aufgrund der direkten Proportionalität von Δx_R und Δn_R gilt entsprechend dem experimentellen Befund: $(\Delta x_R/\Delta t)_T$ ist gleich $(\Delta n_R/\Delta t)_T \approx \text{const.}$ Demnach ließe sich die isotherme Regeneration des Rhodopsins durch eine Reaktion 0. Ordnung beschreiben, deren Geschwindigkeit von der Konzentration des Metarhodopsins im untersuchten Bereich ($0.2 < x_M < 1$) unabhängig ist.

Die Konstanz der Regenerationsgeschwindigkeit des Rhodopsins ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß als limitierender Faktor - z.B. einer endergonischen enzymatischen Isomerisierung des Chromophors das Energieangebot (in Form der Phosphagene: Kreatinphosphat und Argininphosphat) maßgebend ist. Wenn die Konzentration der energiereichen Phosphate (vergl. Lues, 1979) im Fließgleichgewicht konstant ist, kann dieser Parameter - bei gegebener Enzymkonzentration (z.B. einer Isomerase) - die Geschwindigkeit des Regenerationsprozesses bestimmen.

Handelt es sich nicht um eine enzymatische Isomerisierung sondern um eine Neusynthese des Sehpigmentes, so könnte man aus den kinetischen Daten schließen, daß die pro Zeiteinheit abgebaute M-Menge durch die gleiche Menge R ersetzt wird. Die Zahl der pro Zeiteinheit substituierten M-Moleküle wäre dann konstant und unabhängig vom Stoffmengenanteil des M in der Photorezeptormembran.

Diese Deutung gilt nur unter der Voraussetzung, daß die Gesamtmenge des Chromoproteins in der photosensorischen Membran konstant bleibt. Nimmt man an, daß die Retinulazelle eine konstante Syntheserate R-haltiger Membran hat und der durch Exocytose verursachte Verlust an photosensorischer Membran (Eguchi und Waterman, 1976; Winterhager, 1979) ersetzt wird, so müßten die Rhabdome - unabhängig vom Stoffmengenanteil des M (nach Belichtung) - jeweils nach einem konstanten

Dunkelintervall regeneriert sein. Diese Hypothese stimmt jedoch mit der vorliegenden Regenerationskinetik nicht überein. Konkrete Daten über eine mögliche Neusynthese der Photorezeptormembran von Crustaceen sind in der Literatur nicht vorhanden. Autoradiographische Untersuchungen der in vivo Verteilung von ^3H -Leucin in der Photorezeptormembran von *Procambarus* (Hafner u. Bok, 1977) und *Astacus* in situ (Winterhager, 1979) geben keinen konkreten Hinweis auf die Kinetik einer Neusynthese des Rhodopsins.

Der Stoffmengenanteil des Metarhodopsins (x_M) in vivo ($\theta = 15^\circ\text{C}$) ist bei Raumlicht und im normalen Tag-Nacht-Rythmus des Krebses < 0.1 (s. 3.9.1). Im normalen Biotop des Sumpfkrebses ist der M-Anteil, aufgrund der geringen Lichtintensität und der zusätzlichen Abschirmung des Rhabdoms durch Schirmpigmentgranula vermutlich so klein, daß der Rhodopsinanteil > 0.95 ist. Die geringe lichtinduzierte Metarhodopsinbildung kann hier durch eine langsame Regeneration des Rhodopsins kompensiert werden.

Die Frage jedoch, ob es sich bei dieser metabolischen Regeneration um eine enzymatische Isomerisierung des Metarhodopsins und/oder eine Neusynthese des Rhodopsins handelt, kann zur Zeit nicht beantwortet werden.

5 Zusammenfassung

Es wurde eine Methode zur Isolierung gereinigter und von Schirmpigmentgranula weitgehend befreiter Photorezeptormembranen aus einer *Astacus*-Retina entwickelt.

Die isolierte Rhabdommenge (ca. 70% der Gesamtmenge) reicht aus, das membrangebundene und mizellar (in Digitonin) gelöste Chromoprotein einer Retina absorptionsspektroskopisch zu untersuchen.

SDS-gelelektrophoretische Analyse der Proteine gereinigter Photorezeptormembranen ergibt einen Rhodopsinanteil von 40...50% der Gesamtproteinmenge.

In Digitonin-Rhabdomextrakten entspricht der Rhodopsinanteil etwa 80% der im Extrakt enthaltenen Proteine.

Absorptionsspektroskopische Analyse zeigt, daß sowohl das membrangebundene Chromoprotein (System sonifizierter Rhabdomsuspensionen) als auch das Digitonin-gelöste bei 0°C und pH 7.0 quasi thermostabil und photoreversibel ist.

Die bei 0°C und pH 7.0 gemessenen Differenzen zwischen den Spektren der Chromoproteinisomere bzw. den verschiedenen photostationären Zuständen des Digitonin-gelösten und membrangebundenen Chromoproteins sind praktisch identisch und haben Extremwerte von ΔE bei 570 nm bzw. 485 nm.

Das Maximum des Extinktionsspektrums des *Astacus*-Rhodopsins (0°C, pH 7.0) liegt bei etwa $\lambda_{\max} = 530$ nm. Belichtung bei $\lambda \gg 630$ nm führt annähernd zu einer quantitativen photochemischen Bildung des isomeren Metarhodopsins mit $\lambda_{\max} \approx 500$ nm. Der $\epsilon_{\lambda_{\max}}$ -Wert des Metarhodopsins ist um den Faktor 1.4...1.43 größer als derjenige des Rhodopsins. Der isosbestische Punkt liegt bei etwa 536 nm.

Aufgrund der Photoreversibilität kann Metarhodopsin durch Belichtung bei $\lambda < 630$ nm zum Rhodopsin isomerisiert werden. Da sich die Extinktionsspektren beider Chromoproteinisomere überlappen, ist nur eine teilweise photochemische Isomerisierung zum Rhodopsin möglich. Belichtung bei ca. 465 nm führt zum maximalen Stoffmengenanteil ($x_R = 0.52 \pm 0.02$) des photochemisch erzeugten Rhodopsins.

Das normierte Spektrum des Metarhodopsins zeigt eine gute Übereinstimmung mit den relativen ϵ -Werten modifizierter Dartnall-Nomogramme, während die ϵ -Werte des *Astacus*-Rhodopsins für $\lambda < 480$ nm um den Faktor 1.1...1.5 größer sind als die Nomogrammwerte eines Pigmentes mit $\lambda_{\max} = 530$ nm.

Die Kinetik der lichtinduzierten Isomerisierung von Rhodopsin zum Metarhodopsin bzw. vice versa läßt sich - bei konstanter Lichtintensität - durch ein Zeitgesetz 1. Ordnung beschreiben.

Nach Literaturangaben (vergl. Hamdorf, 1979; Schwemer, 1969) ist das Verhältnis der Stoffmengenanteile von Rhodopsin und Metarhodopsin (x_R/x_M) von Cephalopoden und einigen Insekten annähernd direkt proportional dem Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ_M/ϵ_R) bei der Belichtungswellenlänge λ_e . Im Gegensatz dazu ergibt die spektroskopische Analyse des *Astacus*-Sehpigmentes, daß das Verhältnis x_R/x_M nicht direkt proportional dem Wert $\epsilon_M(\lambda_e)/\epsilon_R(\lambda_e)$ ist. Demzufolge ist die relative Quantenausbeute γ_M/γ_R der photochemischen Rhodopsin-Metarhodopsin-Isomerisierung beim *Astacus*-Sehpigment < 1 . Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen hat die relative Quantenausbeute bei $\lambda_e \approx 450$ nm den maximalen Wert 0,68. Für $\lambda_e > 450$ nm ist $\gamma_M/\gamma_R < 0.68$ so z.B. für $\lambda_e = 536$ nm (isosbestischer Punkt) etwa 0.43.

Die lichtinduzierte Abnahme des Rhodopsin-Stoffmengenanteils in vivo ist vom Adaptationszustand der Krebsaugen abhängig. Belichtung dunkeladaptierter Krebsaugen in vivo bei 0°C führt zur Einstellung des photostationären Zustands ($x_R: 0.26 \dots 0.31$;

Belichtung mit Raumlicht). Bei 20°C hat selbst eine 50-stündige Belichtung mit Raumlicht (50...70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) nur eine Abnahme auf $x_R=0.83...0,86$ zur Folge.

Der Verlauf der Spektren des Digitonin-gelösten Chromoproteins zeigt eine bemerkenswerte Abhängigkeit von der Temperatur. So führt Temperaturerhöhung des >unbelichteten< Digitonin-Rhabdomextraktes von 0°C auf 20°C zu einer hypsochromen Verschiebung des bei 0°C gemessenen Spektrums und einer Abnahme von $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}}$ um etwa 30%. Das System ist bei dieser Temperatur nicht photoreversibel, sondern wird durch Belichtung unter Freisetzung von Retinal gebleicht.

Eine analoge spektrale Änderung des Rhodopsinsystems wird bei Erhöhung der Temperatur von 0°C auf 30°C gemessen. Der hypsochromen Verschiebung des Rhodopsinspektrums folgt bei 30°C innerhalb von etwa 5 h eine thermische Denaturierung des Chromoproteins unter Bildung von Retinal ($\tau_{1/2}=80$ min). Die Denaturierung bei 30°C führt jedoch nicht zur vollständigen Bleichung des Systems. Erst Belichtung induziert eine quantitative Bleichung unter zusätzlicher Bildung von Retinal.

Auch im Fall der thermischen Denaturierung des Metarhodopsins ($\theta=20$ bzw. 30°C) wird ein noch nicht näher charakterisiertes photosensitives Retinyliden-Chromoprotein beobachtet, das thermisch wesentlich stabiler als Rhodopsin und Metarhodopsin ist.

Die Kinetik der thermischen Denaturierung des Metarhodopsins entspricht einer Reaktion 1. Ordnung mit einer Halbwertszeit $\tau_{1/2}=34$ min bei 30°C.

Der Prozeß der Denaturierung des mizellar gelösten Chromoproteins bei 20°C bzw. 30°C - unter Abspaltung von Retinal - wird durch Belichtung des Systems wesentlich beschleunigt.

Die Kinetik der hydrolytischen Chromophorabspaltung und deren Abhängigkeit von der Wellenlänge und Intensität des eingestrahltten Lichtes wurde jedoch nicht untersucht.

Die lichtinduzierte Verringerung des Stoffmengenanteils von Rhodopsin in vivo wird durch einen metabolischen Prozeß der Regeneration rückgängig gemacht. Die Regenerationsrate des R ist offensichtlich unabhängig vom Stoffmengenanteil des M im untersuchten Bereich $0.2 < x_M < 0.9$. Bei 15°C ist die zeitliche Zunahme des Rhodopsin-Stoffmengenanteils ($\Delta x_R / \Delta t$) etwa 0.005 h^{-1} . Dementsprechend dauert die vollständige metabolische Substitution von M ($x_M: 1 \rightarrow 0$) durch Rhodopsin bei 15°C etwa 6...7 Tage. Bei 10°C verläuft der Prozeß um etwa den Faktor 2 langsamer.

Ob es sich bei dieser Dunkelregeneration um eine enzymatische Isomerisierung des Metarhodopsins und/oder um eine Neusynthese von Rhodopsin handelt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden.

6 Anhang (Tabellen)

Tab. A

Energiestromdichte bzw. Photonenstrom bei Belichtung des Chromoproteins in der Küvette.

Lichtquelle: Meßlicht des Spektralphotometers Cary 118
(slit: 1mm)

Der Energiestrom durch die Küvette wurde mit einem Photometer Modell 550-1 der Electro Optics Division gemessen.

Die berechneten Photonenströme beziehen sich auf den Mittelwert, der angegebenen Wellenlängen.

$\frac{\lambda}{\text{nm}}$	$\frac{E}{\mu\text{W}/\text{cm}^2}$	Phot./s *
450 ± 6	67	$4,7 \cdot 10^{12}$
485 ± 8	83	$6,3 \cdot 10^{12}$
570 ± 10	140	$1,3 \cdot 10^{13}$
600 ± 15	175	$1,7 \cdot 10^{13}$
625 ± 16	191	$1,9 \cdot 10^{13}$

*Photonenstrom durch die Küvette

Tabelle I

Normierte Werte der Extinktionsdifferenzen

A. Normierte Differenzwerte zwischen dem Spektrum der sonifizierten Rhabdomsuspensionen nach Belichtung bei 600 ± 15 nm und dem Spektrum des unbelichteten Systems. Der Normierungswert ist ΔE bei 485 nm. $\bar{x} \pm s$, $n=3$

B. analog A: gemessen am System der Digitonin-Rhabdomextrakte (bei 0°C) $\bar{x} \pm s$, $n=2$

C. Normierte Differenzwerte der photostationären Zustände: 600 ± 15 nm belichtet - 485 ± 8 nm belichtet (sonifizierte Rhabdomsuspension) $\bar{x} \pm s$, $n=6$

λ/nm	A	B	C
640	$-0,023 \pm 0,003$	$-0,03 \pm 0,01$	0
633	$-0,036 \pm 0,003$	$-0,045 \pm 0,015$	$-0,01$
627	$-0,049 \pm 0,003$	$-0,063 \pm 0,013$	$-0,044 \pm 0,032$
620	$-0,088 \pm 0,004$	$-0,091 \pm 0,003$	$-0,079 \pm 0,026$
613	$-0,136 \pm 0,006$	$-0,136 \pm 0,004$	$-0,110 \pm 0,036$
607	$-0,201 \pm 0,008$	$-0,198 \pm 0,003$	$-0,172 \pm 0,041$
600	$-0,285 \pm 0,010$	$-0,260 \pm 0,010$	$-0,244 \pm 0,044$
593	$-0,383 \pm 0,005$	$-0,346 \pm 0,004$	$-0,338 \pm 0,045$
587	$-0,484 \pm 0,015$	$-0,452 \pm 0,022$	$-0,420 \pm 0,061$
580	$-0,562 \pm 0,015$	$-0,544 \pm 0,018$	$-0,509 \pm 0,045$
573	$-0,626 \pm 0,025$	$-0,590 \pm 0,011$	$-0,561 \pm 0,058$
567	$-0,635 \pm 0,022$	$-0,612 \pm 0,024$	$-0,572 \pm 0,074$
560	$-0,590 \pm 0,017$	$-0,544 \pm 0,018$	$-0,517 \pm 0,062$
553	$-0,470 \pm 0,021$	$-0,436 \pm 0,025$	$-0,417 \pm 0,070$
547	$-0,328 \pm 0,026$	$-0,283 \pm 0,008$	$-0,263 \pm 0,056$
540	$-0,143 \pm 0,019$	$-0,101 \pm 0,017$	$-0,109 \pm 0,065$
533	$0,096 \pm 0,037$	$+0,120 \pm 0,010$	$0,071 \pm 0,067$
527	$0,283 \pm 0,018$	$0,312 \pm 0,005$	$0,279 \pm 0,043$
520	$0,469 \pm 0,025$	$0,502 \pm 0,025$	$0,492 \pm 0,034$
513	$0,648 \pm 0,010$	$0,663 \pm 0,019$	$0,660 \pm 0,012$
507	$0,806 \pm 0,011$	$0,807 \pm 0,008$	$0,802 \pm 0,018$
500	$0,917 \pm 0,004$	$0,904 \pm 0,010$	$0,907 \pm 0,024$
493	$0,977 \pm 0,004$	$0,972 \pm 0,003$	$0,977 \pm 0,010$
485	1,00	1,00	1,00
480	$0,980 \pm 0,009$	$0,972 \pm 0,003$	$0,977 \pm 0,010$
473	$0,932 \pm 0,009$	$0,962 \pm 0,003$	$0,928 \pm 0,025$

467	$0,863 \pm 0,012$	$0,862 \pm 0,020$	$0,854 \pm 0,036$
460	$0,761 \pm 0,003$	$0,766 \pm 0,010$	$0,770 \pm 0,026$
453	$0,661 \pm 0,010$	$0,669 \pm 0,015$	$0,664 \pm 0,019$
447	$0,548 \pm 0,008$	$0,567 \pm 0,010$	$0,549 \pm 0,022$
440	$0,444 \pm 0,009$	$0,470 \pm 0,020$	$0,444 \pm 0,025$
433	$0,339 \pm 0,007$	$0,368 \pm 0,002$	$0,364 \pm 0,022$
427	$0,247 \pm 0,007$	$0,278 \pm 0,017$	$0,275 \pm 0,023$
420	$0,164 \pm 0,005$	$0,205 \pm 0,021$	$0,196 \pm 0,019$
413	$0,089 \pm 0,010$	$0,128 \pm 0,002$	$0,121 \pm 0,020$
407	$0,032 \pm 0,006$	$0,074 \pm 0,003$	$0,067 \pm 0,020$
400	$0,011 \pm 0,007$	$0,021 \pm 0,012$	$0,019 \pm 0,020$
393	0	0	0

Tabelle II

Relative ϵ -Werte von Astacus-Rhodopsin und Metarhodopsin und deren Vergleich mit den Daten der Nomogramme für Sehpigmente von Ebrey und Honig (1977)

$\frac{\lambda}{\text{nm}}$	$\frac{\epsilon_R(\lambda)}{\epsilon_R(\lambda_{\text{max}})}$	rel. ϵ - Werte Nomogramm $\lambda_{\text{max}}=530$ nm	$\frac{\epsilon_M(\lambda)}{\epsilon_M(\lambda_{\text{max}})}$	rel. ϵ - Werte Nomogramm $\lambda=500\dots$ 502 nm	$\frac{\epsilon_M}{\epsilon_R}(\lambda)$
390	0,29		0,21		1,03
400	0,29		0,22		1,09
410	0,30		0,26	0,24	1,20
420	0,32		0,32	0,29	1,44
430	0,36	0,24	0,40	0,37	1,55
440	0,41	0,29	0,50	0,46	1,73
450	0,47	0,31	0,61	0,57	1,81
460	0,54	0,45	0,73	0,70	1,86
470	0,63	0,55	0,84	0,81	1,86
480	0,71	0,66	0,92	0,90	1,82
490	0,79	0,77	0,97	0,97	1,73
500	0,87	0,85	1,00	1,00	1,61
510	0,94	0,93	0,97	0,98	1,45
520	0,985	0,985	0,89	0,91	1,27
530	1,0	1,00	0,78	0,79	1,09
540	0,98	0,97	0,63	0,65	0,91
550	0,92	0,90	0,48	0,48	0,73
560	0,83	0,79	0,35	0,33	0,59
570	0,70	0,67	0,23	0,23	0,47
580	0,54	0,51	0,15	0,14	0,39
590	0,36	0,38	0,08	0,08	0,33
600	0,21	0,27	0,04	0,04	0,26
610	0,10	0,17	0,01		0,20
620	0,05	0,12	0		0,10
630	0,02	0,04			
640	0,005				
650	0				

495
scale

Tabelle III

Anhand des Stoffmengenanteils von Rhodopsin $x_R(\lambda_e)$ im photostationären Zustand errechnete relative Quantenausbeute (γ_M/γ_R) der photochemischen Rhodopsin-Metarhodopsin-Isomerisierung als Funktion der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes λ_e (vergl. 3.8.1)

λ_e	$x_R(\lambda_e)$	$\frac{\epsilon_M}{\epsilon_R}(\lambda_e)$	$\frac{\gamma_M}{\gamma_R}(\lambda_e)$
420	0,46	1,44	0,61
440	0,53	1,73	0,66
450	0,55	1,81	0,68
460	0,55	1,86	0,66
470	0,53	1,87	0,60
480	0,51	1,82	0,57
500	0,46	1,61	0,53
520	0,36	1,27	0,44
536	0,30	1,0	0,43
560	0,18	0,59	0,37
580	0,10	0,89	0,28
600	0,04	0,24	0,17
620	0,01	0,15	0,07
640	≈ 0	≈ 0	-

Tab. IV

Metabolische Änderung des Rhodopsin-Stoffmengenanteils x_R
nach Belichtung der Krebse bei 0°C

a) Dunkelregeneration bei 15±1°C

Versuch	$t_{\text{bel.}}/\text{h}$	x_R (Retina A)	t_α/h	x_R (Retina B)	$\frac{\Delta x_R \cdot h}{\Delta x_t}$	Bemerkung
121179	1	0,24	24	0,33	0,0038	Belichtung durch (Schott) OG 550 Filter
191179	1	0,46	24	0,58	0,0050	$I \approx 70 \text{ mW/cm}^2$
221179	1	0,29	102	0,90	0,0060	"
301179	0,5	0,06	70	0,51	0,0064	"
220180	1	0,32	143	0,93	0,0043	"
290180	1	0,14	145	0,87	0,0048	"
091180	1	0,73	24	0,86	0,0054	Belichtung mit Raumlicht $I = 70 \mu\text{W/cm}^2$

b) Dunkelregeneration bei 10°C

071279	1	0,10	73	0,25	0,0021	Belichtung durch OG 550 Kantenfilter
110180	1	0,42	165	0,84	0,0025	

$t_{\text{bel.}}$ = Belichtungszeit

x_R (Retina A) = Molenbruch des Rhodopsins nach >in vivo<
Belichtung des Krebses

x_R (Retina B) = Molenbruch des Rhodopsins nach dem isothermen
Dunkelintervall t_α

$\Delta x_R / \Delta t$ = zeitliche Änderung des Rhodopsin-Stoffmengenanteils

7 Literaturverzeichnis

- Bernhards, H. (1916): Der Bau des Komplexauges von *Astacus fluviatilis*. Z. wiss. Zool. 116, 649-707.
- Bownds, D. (1967): Site of attachment of retinol in rhodopsin. Nature 216, pp. 1178-1181.
- Brown, P.K. und Brown, P.S. (1958): Visual pigments of the *Octopus* and Cuttlefish. Nature (Lond.) 182, 1288-1290.
- Bruno, M.S. und Goldsmith, T.H. (1974): Rhodopsin of the blue crab *Callinectes*: evidence for absorption differences in vitro and in vivo. Vis. Res. 14, 653-658.
- Bruno, M.S., Barnes, S.N. und Goldsmith, T.H. (1977): The visual pigment and visual cycle of the lobster, *Homarus*. J. comp. Physiol. 120, 123-142.
- Daemen, F.J.M. (1973): Vertebrate rod outer segment membranes. Biochem. biophys. Acta 300, 255-288.
- Dartnall, H.J.A. (1953): The interpretation of spectral sensitivity curves. Brit. Med. Bull. 9, 24-30.
- Ebrey, T.G. und Honig, B. (1977): Research note: New wavelength dependent visual pigment nomograms. Vision Res. 17, 147-151.
- Eguchi, E. und Waterman, T.H. (1976): Freeze-etch and histochemical evidence for cycling in crayfish photoreceptor membranes. Cell Tiss. Res. 169, 419-434.
- Eguchi, E. und Waterman, T.H. (1979): Longterm dark induced fine structural changes in crayfish photoreceptor membrane. J. Comp. Physiol. 1, 191-203.
- Fujimoto, K., Yanase, T. und Ishizuka, I. (1966): The visual substance of the crayfish, *Procambarus clarkii*. Mem. Osaka Gakugei Univ. B, 15, 109-114.
- Goldman, L.J., Barnes, S.N. und Goldsmith, T.H. (1975): Microspectrophotometry of rhodopsin and metarhodopsin in the moth *Galleria*. J. gen. Physiol. 66, 383-404.

- Goldsmith, T.H. (1972): The natural history of invertebrate visual pigments. In: Handbook of Sensory Physiology, ed. H.J.A. Dartnall, Vol. VII/1, 685-719. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1972.
- Goldsmith, T.H. (1977): The spectral absorption of crayfish rhabdoms: pigment, photoproduct, and pH sensitivity. Vis. Res. 18, 463-473.
- Hafner, G.S., Hammond-Soltis, G. und Tokarski, T. (1980): Diurnal changes of lysosome-related bodies in the crayfish photoreceptor cells. Cell Tissue Res. 206, 319-332.
- Hafner, G.S. und Bok, D. (1977): The distribution of ^3H -leucine labeled protein in the retinula cells of the crayfish retina. J. Comp. Neurol. 174.
- Hamacher, K. (1977): Isolierung und Charakterisierung eines photosensitiven Chromoproteins (*Astacus*-Rhodopsin), Diplomarbeit RWTH Aachen.
- Hamdorf, K. (1970): Korrelation zwischen Sehfarbstoff und Empfindlichkeit bei Photorezeptoren. Verh. dtsh. Zool. Ges. 64, 148-158.
- Hamdorf, K. (1979): The physiology of invertebrate visual pigments. In: Handbook of Sensory Physiology, ed. H. Autrum, Vol. VII/6A. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1979.
- Hamdorf, K. und Rosner, G. (1973): Adaptation und Photoregeneration im Fliegenauge. J. comp. Physiol. 86, 281-292.
- Hamdorf, K. und Schwemer, J. (1975): Photoregeneration and the adaptation process in insect photoreceptors. In: Photoreceptor Optics, eds. A.W. Snyder, R. Menzel. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1975.
- Hamdorf, K., Schwemer, J. und Täuber, U. (1968): Der Sehfarbstoff, die Absorption der Rezeptoren und die spektrale Empfindlichkeit der Retina von *Eledone moschata*. Z. vergl. Physiol. 60, 375-415.

- Hartung, K. (1978): Experimente zum K^+ Transfer durch die Photorezeptormembran des Krebses *Astacus leptodactylus* im Dunkeln und bei Belichtung. Eine Studie mit dem Isotop ^{86}Rb . Interner Bericht der Kernforschungsanlage Jülich, Institut für Neurobiologie, KFA-INB-IB 3.
- Höglund, G., Hamdorf, K. und Rosner, G. (1973): Trichromatic visual system in an insect and its sensitivity control by blue light. J. comp. Physiol. 86, 265-279.
- Hubbard, R. und St. George, R.C.C. (1958): The rhodopsin system of the squid. J. gen. Physiol. 41, 501-528.
- Kong, K.L. und Goldsmith, T.H. (1977): Photosensitivity of retinular cells in white-eyed crayfish (*Procambarus clarkii*). J. comp. Physiol. 122, 273-288.
- Laemmli, U.K. (1970): Nature 227, 680-685.
- Lues, I. (1979): Untersuchungen zum energiefreisetzenden Stoffwechsel in den Augen decapoder Krebse. Dissertation an der UNI Bochum.
- Nashima, K., Mitsudo, M. und Kito, Y. (1978): Studies on cephalopod rhodopsin: Fatty acid esters of sucrose as effective detergents. Biochim. biophys. Acta, 536, 78-87.
- O'Brien, P.J. (1978): Rhodopsin: A light-sensitive membrane glycoprotein. In: Receptors and Recognition. Series AV6. Ed. by P. Cuatrecasas, M.F. Greaves. Chapman and Hall, London 1978.
- Röhling, S. (1980): Diplomarbeit an der RWTH Aachen, Institut für Neurobiologie, Kernforschungsanlage Jülich
- Schwemer, J. (1969): Der Sehfärbstoff von *Eledone moschata* und seine Umsetzung in der lebenden Netzhaut. Z. vergl. Physiol. 62, 121-152.
- Schwemer, J., Gogala, M. und Hamdorf, K. (1971): Der UV-Sehfärbstoff der Insekten: Photochemie in vitro und in vivo. Z. vergl. Physiol. 75, 174-188.
- Schwemer, J. und Paulsen, R. (1973): Three visual pigments in *Deilephila elpenor* (Lepidoptera, Sphingidae). J. comp. Physiol. 86, 215-229.

- Stavenga, D.G. (1975): Dark regeneration of invertebrate visual pigments. In: Photoreceptor Optics, eds. A.W. Snyder, R. Menzel. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1975.
- Stavenga, D.G., Zantema, A. und Kuiper, J.W. (1973): Rhodopsin processes and the function of the pupil mechanism in flies. In: Biochemistry and Physiology of Visual Pigments ed. H. Langer, pp. 175-180. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1973.
- Stieve, H. (1973): Experiments on the ionic mechanism of the receptor potential of *Limulus* and crayfish photoreceptor. In: Biochemistry and physiology of visual pigments, Hrsg. H. Langer, Springer Berlin.
- Stieve, H. (1977): On the mechanism of conductance control of the arthropod visual cell membrane. Biophys. Struct. Mechan. 3, 145-151.
- Stieve, H. (1977): Photorezeption und ihre molekularen Grundlagen. Biophysik. Ein Lehrbuch. Herausgegeben von W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1977.
- Stieve, H., Backbier, R., Gaube, H. und Steinbeck, B. (1976): Conductance change of the arthropod visual cell membrane in response to light, indirectly depending on membrane potential. Ber. Kernforschungsanlage Jülich, 1331.
- Wald, G. (1967): Visual pigments of crayfish. Nature, 215, No. 5106, pp. 1131-1133.
- Wald, G. (1968): The molecular basis of visual excitation. Nature (Lond.) 219, 800-807.
- Wald, G. und Brown, P.K. (1953): The molar extinction of rhodopsin, J. gen. Physiol., 37, 189.
- Wald, G. und Hubbard, R. (1957): Visual pigment of a decapod crustacean: The lobster. Nature (Lond.) 180, 278-280.

- Waterman, T.H., Fernández, H.R. und Goldsmith, T.H. (1969):
Dichroism of photosensitive pigment in rhabdoms of the
crayfish *Oronectes*. J. gen. Physiol. 54, 415-432.
- Wilms, M. (1977): Statische und kinetische Untersuchungen
an isolierten Rhabdomen des Sumpfkrebsses mit Hilfe von
Mikrospektralphotometern. Berichte der Kernforschungsan-
lage Jülich, Institut für Neurobiologie JÜL-1401(1977).
- Winterhager, E. (1979): Ultrastrukturuntersuchungen an der
Retina des Flußkrebsses *Astacus leptodactylus* mit Hilfe der
Gefrierbruch- und Ultradünnschnitt-Methode. Dissertation
RWTH Aachen, Institut für Neurobiologie der KFA Jülich.

Herrn Prof. Dr. H. Stieve danke ich für die interessante Themenstellung, für zahlreiche Anregungen und Diskussionen und die Betreuung der Arbeit. Ihm und Herrn J. Winterhager bin ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes verpflichtet. Allen Mitarbeitern des Institutes, insbesondere Herrn Dr. W. Sperling, möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft danken.

