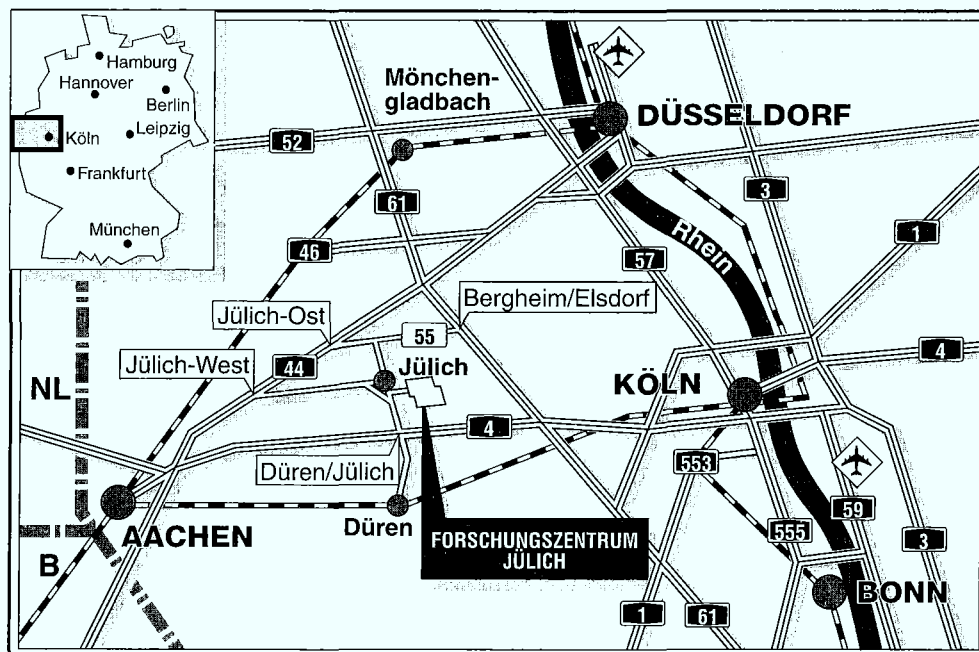


Institut für Biologische Informationsverarbeitung

**Untersuchung der Struktur-Funktions-
Beziehung der lichtgetriebenen
Protonenpumpe Bakteriorhodopsin
mittels UV-Vis-, FTIR-Spektroskopie
und Röntgenbeugung**

Irina Saß



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3267

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-3267

D61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon: 02461/61-61 02 · Telefax: 02461/61-61 03 · Telex: 833 556-70 kfa d

**Untersuchung der Struktur-Funktions-
Beziehung der lichtgetriebenen
Protonenpumpe Bakteriorhodopsin
mittels UV-Vis-, FTIR-Spektroskopie
und Röntgenbeugung**

Irina Saß

Inhaltsverzeichnis.

1. Einleitung und Aufgabenstellung.	1
2. BR als Untersuchungsobjekt.	4
2.1. Der molekulare Aufbau von BR.	4
2.2. Der BR-Photozyklus.	6
2.3. Das Einfangen der Intermediate von BR.	8
3. Probenpräparation.	11
4. Spektroskopische Messungen im sichtbaren und infraroten Wellenlängenbereich.	12
4.1. Grundlagen der FTIR-Spektroskopie.	13
4.2. Differenzspektroskopie.	14
4.3. Zeitaufgelöste spektroskopische Messungen mit der Rapid-Scan-Technik.	16
5. Grundlagen der Röntgenbeugungsexperimente.	17
5.1. Beugung an Stapeln von zweidimensionalen Proteingittern.	17
5.2. Die Diffraktionsexperimente.	20
5.3. Das Fourierdifferenz-Verfahren.	21
6. Ergebnisse und Interpretation.	23
6.1. Methode zur Bestimmung des Wassergehaltes in der BR-Probe mittels FTIR-Spektroskopie.	23
6.2. FTIR und UV-Vis Messungen an den M ₁ -, M ₂ -, M _N -, N-, N/O-Intermediaten von BR.	25
6.2.1. Das N-Intermediat von BR.	26
6.2.2. Die M-Intermediate von BR.	31
6.2.3. Das N/O-Intermediat der BR Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn.	36
6.3. Röntgenbeugungsexperimente an den M ₁ -, M ₂ -, M _N -, N- und N/O-Intermediaten.	42

6.3.1. Messungen an den M ₁ -, M ₂ - und M _N -Intermediaten der BR-Mutante Asp96Asn.	44
6.3.2. Röntgenbeugungsexperimente an mit 9-Desmethyl-Retinal regeneriertem BR.	48
6.3.3. Statische und zeitaufgelöste Röntgenbeugungsexperimente an den M- und N/O-Intermediaten der BR Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn.	50
6.4. Diskussion.	60
7. Zusammenfassung.	80
Literaturverzeichnis.	83
Danksagung.	

Abkürzungen.

Ala	Alanin
ADP	Adenosindiphosphat
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
BO	Bakterioopsin
BR	Bakteriorhodopsin
BR ^{da}	dunkeladaptierter BR Grundzustand
BR ^{la}	lichtadaptierter BR Grundzustand
GuaHCl	Guanidiniumhydrochlorid
IR	Infrarot
FTIR-Spektroskopie	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
Leu	Leucin
OD	optische Dichte
PM	Purpurmembran
RT	Raumtemperatur
UV-Vis	ultravioletter-sichtbarer Spektralbereich

1. Einleitung und Aufgabenstellung.

Ein wichtiges Ziel von Strukturuntersuchungen an Proteinen ist die Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehungen. Dabei sind die integralen Membranproteine, die den Stofftransport über die Membran ermöglichen, von besonderem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Membranprotein Bakteriorhodopsin (BR) untersucht, das dem Archaeobakterium *Halobacterium salinarium* als lichtgetriebene Protonenpumpe dient. Es gibt eine bedeutende Klasse von Proteinen mit BR-ähnlicher Struktur aber unterschiedlicher Funktion, wie z. B. die Chloridpumpe Halorhodopsin und den Sehfärbstoff Rhodopsin, sowie eine große Klasse von Rezeptoren der hormonellen Signalübertragung. Als das im Bezug auf die Struktur und Funktion am besten untersuchte Protein dieser Klasse ist BR ein ideales Modellsystem für die Erforschung der Struktur-Funktions-Beziehung ähnlich gebauter Signal- und Transportproteine.

Bakteriorhodopsin nutzt die Energie des Lichtes, um im *Halobacterium salinarium* Wasserstoffionen aus dem Inneren der Zelle in das Außenmedium zu pumpen. Dabei durchläuft BR einen Photozyklus mit verschiedenen Intermediaten. Trotz einer großen Anzahl von Untersuchungen mit den unterschiedlichsten Methoden sind viele der molekularen und kinetischen Details des lichtgetriebenen Protonenpumpprozesses noch unverstanden.

Da die einzelnen Schritte des Photozyklus von Änderungen in der Farbe des BR begleitet sind, läßt sich der Photozyklus durch Absorptionsmessungen im sichtbaren Spektralbereich verfolgen. Sie spiegeln Änderungen im Chromophor und seiner Proteinumgebung wider. Zur besseren Identifizierung der Intermediate und um eine Korrelation zwischen den optisch definierten Intermediaten und den lokalen Strukturänderungen im gesamten Protein während des Photozyklus zu erhalten, werden FTIR-Messungen durchgeführt.

Die meisten Zwischenzustände von BR können unter entsprechenden Bedingungen während des Photozyklus mehr oder weniger

stark angereichert werden, zumindest in Mengen, die für spektroskopische Untersuchungen ausreichen. Zur Untersuchung der strukturellen Änderungen ist es hingegen notwendig, daß sich mindestens 70% der Moleküle im gleichen Zustand befinden. Aus diesem Grund gelang es bis jetzt nur für den ersten langlebigen Photozykluszustand, das M-Intermediat, Strukturänderungen gegenüber dem Grundzustand nachzuweisen.

Das Ziel dieser Arbeit ist, zur Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehung der lichtgetriebenen Protonenpumpe BR mittels FTIR- und optischer Spektroskopie, sowie Röntgenbeugung beizutragen. Dabei galt das Hauptinteresse dem zweiten langsamen Teil des Photozyklus, der die Photozyklusintermediate M, N und O umfaßt.

Nach neueren spektroskopischen Untersuchungen läßt sich der M-Zustand in zwei Unterzustände, M_1 und M_2 , aufteilen. Also wurde für diese Arbeit zunächst angestrebt zu klären, welcher dieser Unterzustände die zuvor beschriebenen Strukturänderungen aufweist. Um dieses zu erreichen, sollten die Proben mit spektroskopischen Methoden charakterisiert werden, d.h. den Nachweis zu führen, daß unter den gewählten Bedingungen das gewünschte Photozyklusintermediat in ausreichender Menge in der Probe vorliegt. Für diese Untersuchung ist der Einsatz der FTIR-Methode unerläßlich, da sich die M-Unterzustände mit der UV-Vis-Spektroskopie kaum unterscheiden lassen.

Im weiteren sollte geklärt werden, ob das N-Intermediat ebenfalls noch Strukturänderungen gegenüber dem Grundzustand aufweist. Für diese Untersuchung ist es wiederum notwendig, zunächst mit spektroskopischen Messungen die Probenbedingungen zu bestimmen und diese auch zu kontrollieren. Nachdem es gelungen ist, den Zwischenzustand in möglichst hoher Konzentration einzufangen, sollten zum Nachweis von strukturellen Änderungen in der Tertiärstruktur des Proteins und zu ihrer Lokalisierung Röntgenbeugungsmessungen durchgeführt werden.

Entsprechend sollte auch für das letzte Photozyklusintermediat (O-Zustand) untersucht werden, ob Strukturänderungen noch nachweisbar sind.

2. BR als Untersuchungsobjekt.

In der Membran des Bakteriums *Halobacterium salinarium* gibt es Bereiche, die sogenannten Purpurmembranen (PM), die als einziges Protein nur das Pigment Bakteriorhodopsin (BR) enthalten [1]. Nach Lichtanregung baut es über der Membran einen Protonengradienten auf, der zur Phosphorylierung von ADP genutzt wird. Der lichtabsorbierende Teil des BR- der Chromophor Retinal- ist für die purpurne Farbe der Membran verantwortlich.

Für *Halobacterium salinarium* dient BR als "Notstromaggregat", wenn sich die äußeren Bedingungen für die Atmung der Zelle verschlechtern.

2.1. Der molekulare Aufbau von BR.

Bakteriorhodopsin besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 248 Aminosäuren, dem Bakterioopsin (Molekulargewicht 26.5 kD), sowie dem Chromophor Retinal. Die Sequenz der Polypeptidkette wurde durch Proteinsequenzierung bestimmt [2]. Die Sekundärstruktur des Proteins von BO besteht aus sieben α -Helices, die fast senkrecht zur Membranebene die Membran durchqueren [3].

Der Chromophor Retinal ist etwa in der Mitte des Proteins eingebettet und über eine protonierbare Schiff'sche Base an Lysin 216 gebunden. Seine Lage und Orientierung zwischen den Helices wurde durch Neutronen- und Röntgenbeugungsexperimente an deuterierten, bzw. schweratommarkierten Retinalen ermittelt

[4,5,6]. Zur Membranebene bildet die Polyenkette des Retinals einen Winkel von 25° , so daß der β -Iononring etwa $5 \text{ \AA}$ näher zur extrazellulären Seite liegt.



Abb.1 Darstellung der auf die Membranebene projizierten Elektronendichteverteilung des BR Monomers. Die sieben Helices sind mit den Buchstaben A bis G gekennzeichnet. Zur Verdeutlichung der chemischen Struktur des Retinals wurde es um 90° um die Polyenkette gedreht eingezeichnet (aus [61]).

In der Purpurmembran ordnen sich die BR-Moleküle in einem zweidimensionalen hexagonalen Gitter an, wobei jede Elementarzelle ein Trimeres von BR enthält. Die Gitterkonstante beträgt etwa $63 \text{ \AA}$. Die dreidimensionale Struktur von BR wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bis zu einer Auflösung von $3\text{-}8 \text{ \AA}$ bestimmt [6].

2.2. Der BR-Photozyklus.

Nach Lichtanregung durchläuft BR einen Photozyklus mit verschiedenen Intermediaten, die durch ihr Absorptionsmaximum und ihre Lebensdauer charakterisiert sind. Der lichtadaptierte Grundzustand BR^{la}, mit einem Absorptionsmaximum bei 568 nm, enthält überwiegend (96%) die all-trans Chromophor-Konformation [7]. Im Dunkeln relaxiert BR^{la} in die dunkeladaptierte Form BR^{da}. Dieser Grundzustand weist ein Absorptionsmaximum bei 560 nm auf und ist durch das Vorliegen von zwei Isomerzuständen des Retinals, die im Verhältnis von etwa 42% 13-cis zu 58% all-trans vorliegen, charakterisiert [7].

Während des Photozyklus ändert sich sowohl der Isomerisierungszustand des Chromophors, als auch der Protonierungszustand der Schiff'schen Base und einiger Aminosäuren, die aktiv am Protonenpumpprozess mitwirken [8,9,10,11,12,13,14,15,16]. Nach der Lichtanregung findet eine 13-cis Isomerisierung des Retinals in 500 fs statt, welches dem ersten Photozyklusintermediat J₆₀₀ entspricht. J₆₀₀ zerfällt thermisch innerhalb von 5 ps zu K₆₄₀, das nach 1 µs in L₅₅₀ übergeht. Beim Schritt von L₅₅₀ zu M₄₁₀ wird die Schiff'sche Base deprotoniert und das Proton von Asp85 aufgenommen. Gleichzeitig wird ein Proton auf der extrazellulären Seite abgegeben [10]. Im darauffolgenden N-Intermediat wird die Schiff'sche Base wieder reprotoniert. Dabei ist Asp96 der Protonendonator für die Protonierungsreaktion der Schiff'schen Base. Für das Absorptionsmaximum des N-Zustandes werden in verschiedenen Publikationen Werte von 520 bis 570 nm angegeben. Die Rückisomerisierung des Chromophors von 13-cis nach all-trans erfolgt beim Übergang von N₅₅₀ nach O₆₄₀ [17]. Die Reaktion von O₆₄₀ nach BR schließt den Zyklus ab. Bei Raumtemperatur dauert der Photozyklus etwa 20 ms (Abb. 2).

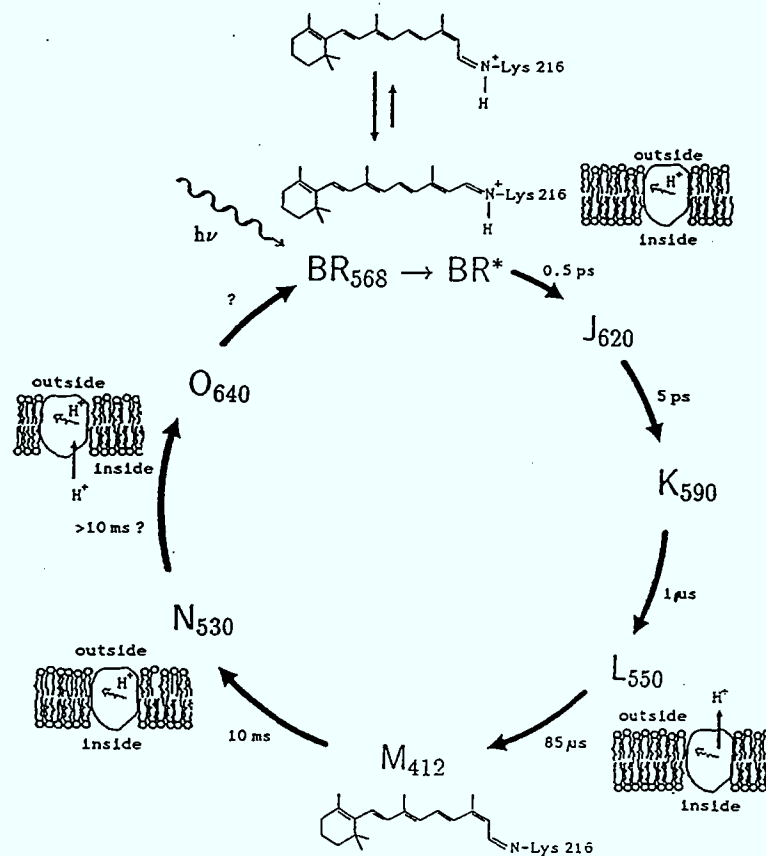


Abb. 2 Darstellung des Wildtyp-BR Photozyklus mit Angabe der Zeitkonstanten für die Zerfälle der einzelnen Intermediate und Darstellung des Protonierungszustandes der Schiff'schen Base (aus [45]).

Der zweite Teil des Photozyklus $M \rightarrow BR$ verläuft sehr viel langsamer, im Millisekundenbereich, trotzdem ist er aber noch nicht vollständig aufgeklärt. Es werden eine Vielzahl von Modellen diskutiert, die die experimentellen Daten beschreiben sollen, darunter solche mit Gleichgewichtsreaktionen zwischen den Intermediaten, Verzweigungen zu parallelen Zyklen unterschiedlicher BR-Spezies, oder Postulierung zusätzlicher Intermediate, wie z.B. ein zweiter oder dritter M-Zustand [18,19,20, 21,22,23,24]. Eine starke spektrale Überlappung der N-, L-Intermediate und des BR Grundzustandes, die Entstehung des N- und O-Intermediates mit gleicher Ratenkonstante, sowie die ungewöhnlich starke Temperatur- und pH-Abhängigkeit der N- und O-Anteile im Photozyklus bereiten große Schwierigkeiten beim Versuch, den reinen N-Zustand zu stabilisieren. Da der M-Zustand

zum nachfolgenden N-Zustand zerfällt, liegen außerdem oft Mischungen dieser beiden Zustände vor. Gegenüber dem N-Zustand ist der O-Zustand leichter zu identifizieren, da sein Absorptionsmaximum am stärksten rotverschoben ist. Die Präsenz dieses Zwischenzustandes im Photozyklus wurde bereits mit Hilfe der Ramanspektroskopie bestätigt [24].

Mit FTIR-Untersuchungen des BR Photozyklus konnte gezeigt werden, daß Asp85 und Asp96 die wichtigsten Teile des Protonenleitungsweges sind [13,15], wobei die anderen Aminosäuren zusammen mit Wassermolekülen als Bausteine eines Wasserstoffbrückenweges dienen können, entlang dessen die Protonen transportiert werden. Die FTIR-Spektren der BR Intermediate deuten darauf hin, daß nicht nur im Retinal und einigen Aminosäuren, sondern auch im Amid I und Amid II Bereich des Proteins während des Photozyklus Veränderungen stattfinden, die auf Änderungen in den Helices hindeuten können.

In meiner Arbeit habe ich versucht, das N- und das N/O-Intermediat in möglichst hoher Konzentration einzufangen, um durch FTIR-Untersuchungen und Röntgenbeugung strukturelle Änderungen von BR in diesen Zustände im Vergleich zum M- und zum Grundzustand zu ermitteln. Ein weiteres Ziel meiner Arbeit war es, die zwei M-Zustände (M_1 und M_2) getrennt einzufangen, durch FTIR-Messungen zu charakterisieren und durch Röntgenbeugungsexperimente festzustellen, welche Konformationsänderungen diese Zustände zueinander und zum Grundzustand aufweisen.

2.3. Das Einfangen der Intermediate von BR.

Zur Messung der kurzlebigen Zwischenzustände des BR sind im Prinzip zwei Strategien denkbar:

1. Die Zwischenzustände werden angeregt und ihr Zerfall wird vom Zeitpunkt der Anregung an zeitaufgelöst verfolgt.
2. Die Zwischenzustände werden eingefangen und stabilisiert.

Das Stabilisieren von Intermediaten kann durch verschiedene physiko-chemische Bedingungen erreicht werden, z.B. tiefe Temperaturen, Variation des pH-Wertes und der Feuchtigkeit der Probe, die Zugabe spezieller Substanzen und durch die Kombination solcher Bedingungen.

In der Arbeitsgruppe Büldt/Dencher wurde der M-Zustand von BR für Neutronenbeugungsmessungen durch Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid (GuaHCl) verlangsamt [26]. GuaHCl gilt bei wasserlöslichen Proteinen als denaturierendes Agens. BR, eingebettet in der PM, wird bei Zugabe von 3 M GuaHCl weder denaturiert noch inaktiviert, der Photozyklus wird aber bis zu 100 mal verlangsamt, so daß es gelingt, die Probe zu 100% im M-Zustand einzufangen.

Detaillierte Untersuchungen vom N-Intermediat haben gezeigt, daß es notwendig ist, die Experimente bei erhöhtem pH und großem Wassergehalt durchzuführen, da unter diesen Bedingungen das O-Intermediat nicht mehr beobachtet und der Zerfall des N-Intermediates etwas verlangsamt wird, so daß dieses Intermediat sich anreichert [27].

Experimente an sehr trockenen PM-Filmen haben gezeigt, daß der Photozyklus nicht vollständig ablaufen kann und das M-Intermediat akkumuliert.

Einen großen Einfluß auf die Kinetik des Photozyklus hat auch die Temperatur. Je tiefer die Temperatur ist, desto langsamer wird der Photozyklus. Bei Temperaturen tiefer als 250 K kann man bestimmte Intermediate des BR stationär messen, z.B. den M-Zustand unter 250 K, das L-Intermediat unter 200 K und den K-Zustand bei etwa 80 K.

Variation anderer Parameter, wie pH-Wert, Salzgehalt in der Probe oder Belichtung mit unterschiedlicher Intensität in verschiedenen Wellenlängenbereichen, können ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Untersuchung der Intermediate spielen.

Durch Experimente an Mutanten, bei denen bestimmte Aminosäuren ersetzt wurden, ließ sich nachweisen, daß Protonierungsänderungen von den vier Asparaginsäuren Asp85, Asp96,

Asp115 und Asp212 während des Protonenpumpprozesses auftreten [13, 15]. Es wurde gefunden, daß Asp85 und Asp96 als Protonenakzeptor, bzw. Protonendonor für die Schiff'sche Base dienen. Der Austausch dieser Aminosäuren, die an der Protonleitung beteiligt sind, sowie von Aminosäuren, die über Wasserstoffbrücken oder Van-der-Waals Wechselwirkungen mit dem Retinal in Verbindung stehen, kann dazu führen, daß der Photozyklus verändert wird. Am deutlichsten werden diese Veränderungen durch eine Verlangsamung, bzw. Beschleunigung der Zeitkonstanten von bestimmten Intermediaten des Photozyklus. Als besonders nützlich für die Untersuchung des M-Intermediates erwies sich die Mutante Asp96Asn. Entsprechendes gilt für die Untersuchung des O-Zustandes mit der Mutante Tyr185Phe [14] und des N- und O-Intermediates mit der Mutante Leu93Ala und der Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn [7,28].

Als ebenso wichtig für die Untersuchung von bestimmten Photozyklusintermediaten erwies sich die Regenerierung von BO mit modifiziertem Retinal, z.B. verlangsamt das Entfernen der 9-Methylgruppe den Photozyklus um einen Faktor 100. Dabei kann ein langlebiger K/L-Zustand, ein schnell zerfallendes M- und ein sehr langsam zerfallendes N-Intermediat beobachtet werden [29, 62].

Diese Möglichkeiten, durch den Einsatz von modifiziertem BR den zweiten Teil des Photozyklus zu verlangsamen, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit ausgenutzt. Dabei wurden die Messungen an den Mutanten durch eine zusätzliche Variation der physiko-chemischen Parameter erweitert.

3. Probenpräparation.

Da die natürliche Funktion von BR nur bei einer gewissen Mindestmenge von Wasser gewährleistet ist [30,31], arbeitet man mit hydratisierten Schichten zuvor getrockneter Proben. Für alle Meßmethoden dieser Arbeit sind die Proben ähnlich präpariert worden. Dabei wurde folgender Weg beschritten: eine bestimmte PM-Suspensionsmenge wird auf ein ebenes „Fenster“ aufgetragen und getrocknet. Danach wird die Probe in einer Hydratisierungskammer für etwa 24 Stunden bei der gewünschten Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend in einer Probenhalterung „luftdicht“ verschlossen, so daß sich der eingestellte Wassergehalt in der Probe während der Messung nicht verändern kann.

Die Dicke der PM-Filme hängt von der Meßmethode ab. Für die Röntgenbeugungsexperimente werden Filme benötigt, deren optische Dichte zwischen 3 und 4 liegt. Als Unterlage wird bei Röntgenbeugungsmessungen eine dünne Mylar Folie (12 μm) oder eine Glimmerscheibe verwendet.

Eine große Schwierigkeit bei Messungen im infraroten Spektralbereich wird durch die starke Absorption von Wasser verursacht, da die Wasserbanden im selben Spektralbereich wie auch die wichtigsten Absorptionsbanden der Proteine liegen. Für FTIR-Experimente sollte die optische Dichte der Probe bei 568 nm nicht größer als OD 1 sein, damit der IR-Strahl nicht zu stark absorbiert wird. Die PM-Suspension für IR-Messungen wird auf CaF_2 -Fenster aufgetragen, da CaF_2 für den IR-Strahl im uns interessierenden Meßbereich eine Transmission von etwa 90% aufweist. Die Proben für die IR-Experimente sind auch für Messungen im UV-Vis-Bereich verwendbar, da CaF_2 auch dort transparent ist.

4. Spektroskopische Messungen im sichtbaren und infraroten Wellenlängenbereich.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der UV-Vis- und der FTIR-Spektroskopie der zweite Teil des BR-Photozyklus untersucht.

Die Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich spiegelt Absorptionsänderungen des Chromophors wider. Das Spektrum der BR-Probe im sichtbaren Bereich ist ein Kriterium um zu entscheiden, ob die Probe den entsprechenden Zustand vollständig erreicht hat und dort stabilisiert wurde.

Im Gegensatz zur sichtbaren Spektroskopie, die Informationen über das Retinal und seiner direkten Umgebung liefert, enthält ein IR-Absorptionsspektrum Beiträge der Atombindungen im gesamten Protein. Da jedoch nur ein geringer Teil dieser Bindungen während des Photozyklus Änderungen erfährt, kann man durch Differenzbildung zwischen dem Spektrum eines Intermediats und dem Grundzustand die Absorptionsbanden der veränderten Molekülgruppen selektieren. Für eine bessere Kontrolle und zum Verständnis der zeitlichen Abfolge der Intermediate im Photozyklus wurde der Photozyklus im sichtbaren und infraroten Bereich mit Hilfe der Rapid-Scan-Technik zeitaufgelöst gemessen.

Die „steady-state“ Experimente im sichtbaren Bereich wurden mit einem Shimadzu-Photometer UV2101PC durchgeführt. Die FTIR-Messungen erfolgten mit dem IFS66 Bruker-Spektrometer. Mit dem IFS66 Bruker-Spektrometer lassen sich nach entsprechendem Wechsel des Detektors, des Strahlteilers und der Quelle auch Experimente im sichtbaren Spektralbereich durchführen. Zeitaufgelöste Messungen an BR im sichtbaren und infraroten Wellenlängenbereich wurden mit einer Zeitauflösung von 20 ms mit dem IFS66 Bruker-Spektrometer durchgeführt. Die Probenanregung erfolgte mit einem Nd:Yag/Laser ($\lambda=532$ nm; Pulsenergie 5 mJ).

4.1. Grundlagen der FTIR-Spektroskopie.

Grundlage der IR-Spektroskopie ist die Wechselwirkung elektromagnetischer IR-Strahlung mit den Molekülen. Diese Strahlung versetzt die Moleküle in angeregte definierte Schwingungs- und Rotationszustände, die sich durch die Absorptionen bei entsprechenden Wellenlängen beobachten lassen. Eine Absorption findet nur statt, wenn die zu beobachtende Schwingung mit einer Dipolmomentänderung verbunden ist. Der für die Analytik von Molekülen interessante Spektralbereich liegt zwischen 2 und 20 μm und wird in der IR-Spektroskopie gängigerweise in der Einheit der reziproken Wellenlänge ($n=1/\lambda$) angegeben.

Die Technik eines FTIR-Spektrometers beruht auf dem Prinzip des Michelson-Interferometers (Abb.3). Die drei wesentlichen Hauptbestandteile dieses Interferometers sind ein Strahlteiler, ein fest montierter und ein beweglicher Spiegel. Das Licht einer breitbandigen Infrarot-Quelle fällt auf einen Strahlteiler. Der reflektierte Teil -im Idealfall 50%- fällt auf den festmontierten Spiegel und wird von dort zurück durch den Strahlteiler gelenkt. Der andere Anteil geht durch den Strahlteiler durch, trifft auf den beweglichen Spiegel und wird von diesem auf den Strahlteiler zurückgeworfen, um sich mit dem ersten Teil wieder zu einem Strahl zu vereinigen. Dieser tritt durch die Probe und fällt schließlich auf den Infrarot-Detektor. Durch die zeitabhängige Bewegung des Spiegels wird eine Phasenverschiebung aller Wellenlängen des einen Strahls gegenüber dem anderen hervorgerufen. Als Resultat solcher Messungen erhält man ein Interferogramm, in dem die gemessenen Strahlungsintensität in Abhängigkeit der genauen Spiegelposition dargestellt ist. Das gemessene Interferogramm besteht aus einer Überlagerung aller eingestrahlten Wellenlängen. Das Frequenzspektrum wird durch eine inverse Fouriertransformation des Interferogrammes berechnet [32].

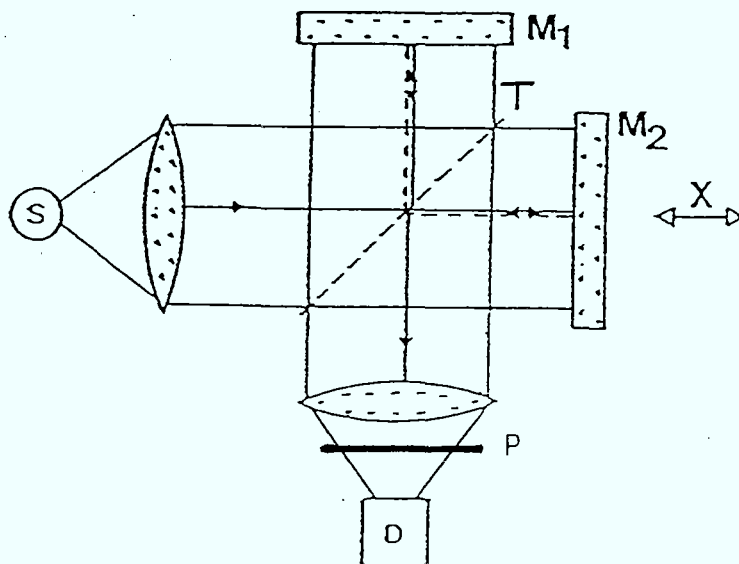


Abb.3 Darstellung des Michelson-Interferometers (S-Lichtquelle, D-Detektor, M1-fester Spiegel, M2-beweglicher Spiegel, P-Probe, T-Strahlteiler).

4.2. Differenzspektroskopie.

Das IR-Spektrum eines Proteins enthält die Absorptionsbanden aller Molekülschwingungen, die mit Dipolmomentveränderung einhergehen. Die Technik der Differenzspektroskopie ermöglicht es, das Verhalten nur der am Photozyklus beteiligten Molekülgruppen zu selektieren. Durch die Differenzbildung zwischen den Absorptionsspektren, die während des Zyklus aufgenommen wurden, und einem Spektrum des Proteins im Grundzustand werden die unveränderten Banden eliminiert.

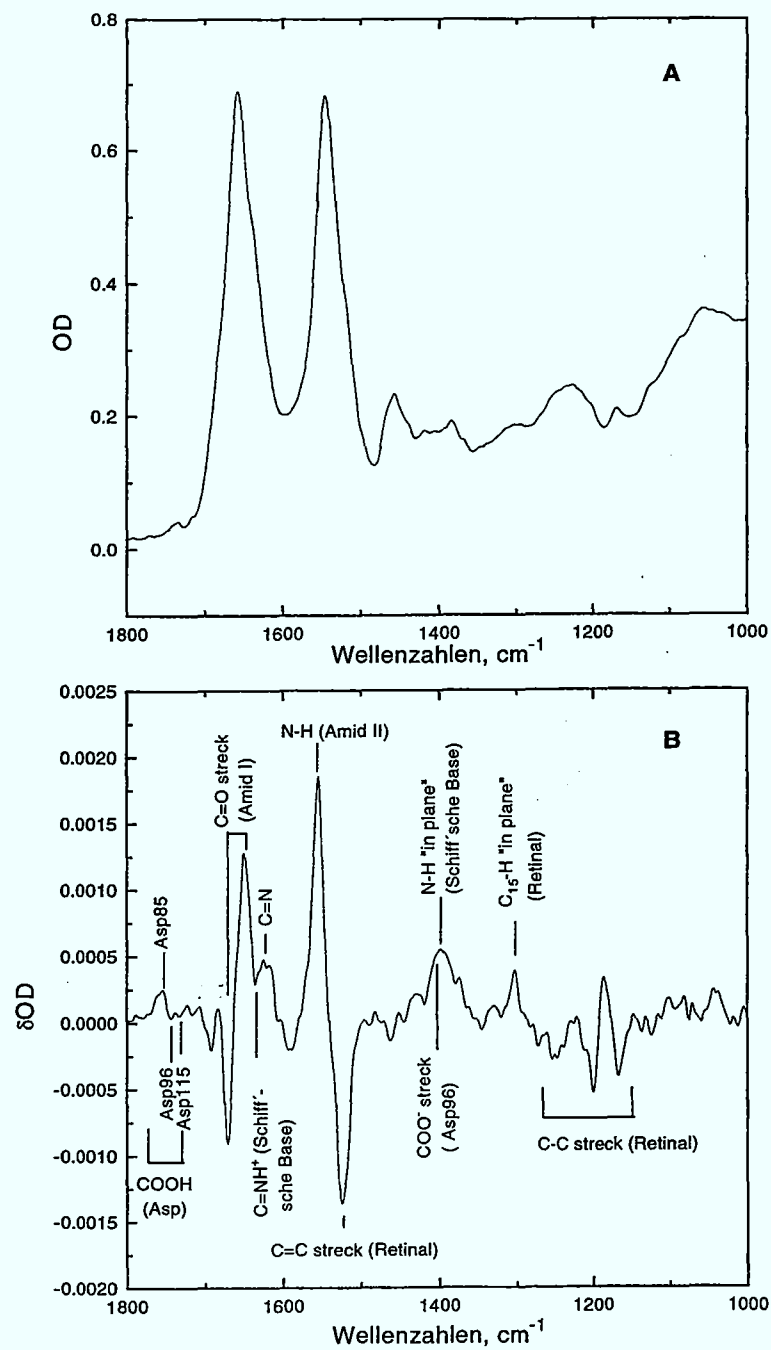


Abb.4 A). FTIR-Absorptions- und **B).** Differenzspektrum einer BR-Probe mit den charakteristischen Schwingungsbanden.

So konnte gezeigt werden, daß der Ablauf des BR-Photozyklus mit Änderungen im Retinal, in der Konformation der Polypeptidenkette des Proteins und dem Protonierungszustand einiger Aminosäuren korreliert ist. Abbildung 4 zeigt das typische Absorption- und Differenzspektrum einer BR Probe.

Die gleiche Methode wurde auch für einige Messungen im sichtbaren Bereich erfolgreich angewandt.

4.3. Zeitaufgelöste spektroskopische Messungen mit der Rapid-Scan-Technik.

Bei der FTIR-Spektroskopie ist die Zeitauflösung durch die Dauer der Aufnahmezeit für ein Interferogramm limitiert. In der Regel liegt die Dauer eines Meßvorganges für eine Messung mit ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis in der Größenordnung von Sekunden. Eine Messung der Photozyklusintermediate ist nur dann sinnvoll, wenn der beobachtete Zwischenzustand während des Meßvorganges als konstant angenommen werden kann. Der Ablauf des BR Photozyklus ist hingegen selbst bei dem Einsatz von bestimmten Mutanten viel schneller (einige Millisekunden).

Zur Untersuchung schnellerer Vorgänge wird die Rapid-Scan-Technik eingesetzt. Dabei werden jeweils mit der maximalen Spiegelgeschwindigkeit nach einem Triggersignal mehrere Interferogramme nacheinander aufgenommen. Die Zeitdifferenz zwischen den Interferogrammen bestimmt die Zeitauflösung, die Anzahl der Wiederholungen eines solchen Zyklus die Qualität der zu jedem Zeitpunkt gemittelten Interferogramme. Das Triggersignal wurde für die Untersuchung des Photozyklus mit der Laserblitzanregung gekoppelt. Als Referenz für die Differenzbildung dient ein Spektrum, das vor jeder Anregung gemessen wurde.

Entsprechend wurden auch Rapid-Scan-Messungen im sichtbaren Wellenlängenbereich durchgeführt.

5. Grundlagen der Röntgenbeugungsexperimente.

5.1 Beugung an Stapeln von zweidimensionalen Proteingittern.

Röntgenbeugung an kristallinen Strukturen resultiert in einer diskreten Intensitätsverteilung in der Detektorebene senkrecht zum Primärstrahl. Die Geometrie der Intensitätsverteilung wird durch das Braggsche Reflexionsgesetz bestimmt. Für den eindimensionalen Fall lautet dies:

$$2d \sin\theta = n\lambda \quad (5.1.1)$$

oder umgeformt

$$\frac{2 \sin\theta}{\lambda} = \frac{n}{d} \quad (5.1.2)$$

wobei d -der Gitterabstand der untersuchten Struktur, λ -die Wellenlänge des Röntgenstrahls, θ -der Beugungswinkel und n -die Ordnung der Beugung ist. Dadurch werden die Bedingungen für das Auftreten von diskreten Intensitätsverteilungen (Reflexe) bestimmt. Die Gleichung (5.1.2) kann man auch in anderer Form schreiben:

$$\vec{S} = \vec{G} \quad (5.1.3)$$

wobei

$$\left| \vec{S} \right| = \frac{2 \sin\theta}{\lambda} \quad (5.1.4)$$

und

$$\left| \vec{G} \right| = \frac{n}{d} \quad (5.1.5)$$

sind, d.h. Beugungsreflexe treten auf, wenn der Streuvektor $\vec{S}$ gleich dem reziproken Gittervektor $\vec{G}$ ist. Im Reziproken-

raum wird der Gittervektor $\vec{G}$ durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\vec{G} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^* \quad (5.1.6),$$

wo h, k, l -die Millerschen Indizes und $\vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^*$ -die Einheitsvektoren des Reziprokenraumes sind. Die Millerschen Indizes entsprechen der Ordnung „ n “ des Braggschen Gesetzes für den dreidimensionalen Fall, d.h. es sind die ganzzahligen „Koordinaten“ der Reflexe.

Für die Untersuchung von zweidimensionalen Proteingittern werden die Proben so hergestellt, daß sich die Membranen in der Probe bevorzugt so anordnen, daß die Membrannormalen parallel zur Normalen des Untergrundes sind. Die Beugung des parallel zur Membrannormalen einfallenden Strahls an einem zweidimensionalen hexagonalen Proteingitter resultiert in der $(\vec{a}^*, \vec{b}^*)$ -Ebene in ein zweidimensionales hexagonales Gitter mit diskreten Reflexen (h, k) . Entlang der $\vec{c}^*$ Achse sind die Reflexe ausgedehnt. Die Membranfragmente sind bei obengenannter Probenpräparation gegeneinander um beliebige Winkel verdreht. Dies verursacht die Verschmierung der Reflexe in der $(\vec{a}^*, \vec{b}^*)$ -Ebene zu Zylinderringen. Auf einem Ring liegen alle Reflexe (h, k) mit gleicher Summe $h^2 + hk + k^2$.

Bei der „in-plane“-Messungen ist die Membranebene senkrecht zum Röntgenstrahl angeordnet, d.h. es werden die Beugungsreflexe $(hk0)$ gemessen (Abb.5). Die Ewald Kugel schneidet die verschmierten Reflexe (h, k) so, daß das Beugungsbild aus Pulverringen besteht.

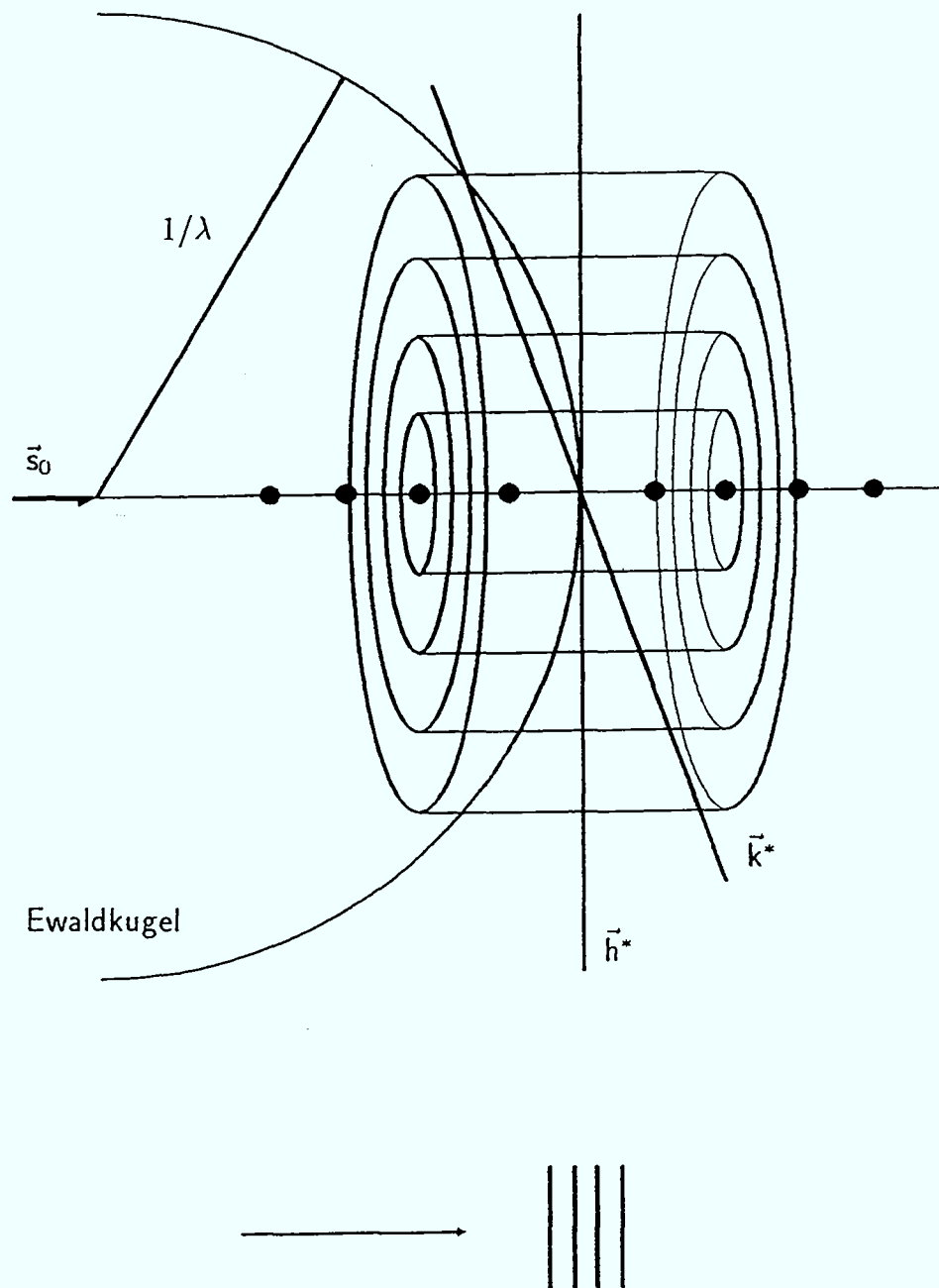


Abb.5 Die Streugeometrie bei senkrechtem Einfall.

Bei „lamellaren“ Messungen sind die Membranebenen parallel zur Einfallsrichtung orientiert, und es werden so diskrete Reflexe (001) entlang des Meridians und die Intensitätsverteilung der Zylinderringe in der Equatorialebene gemessen. (Abb.6)

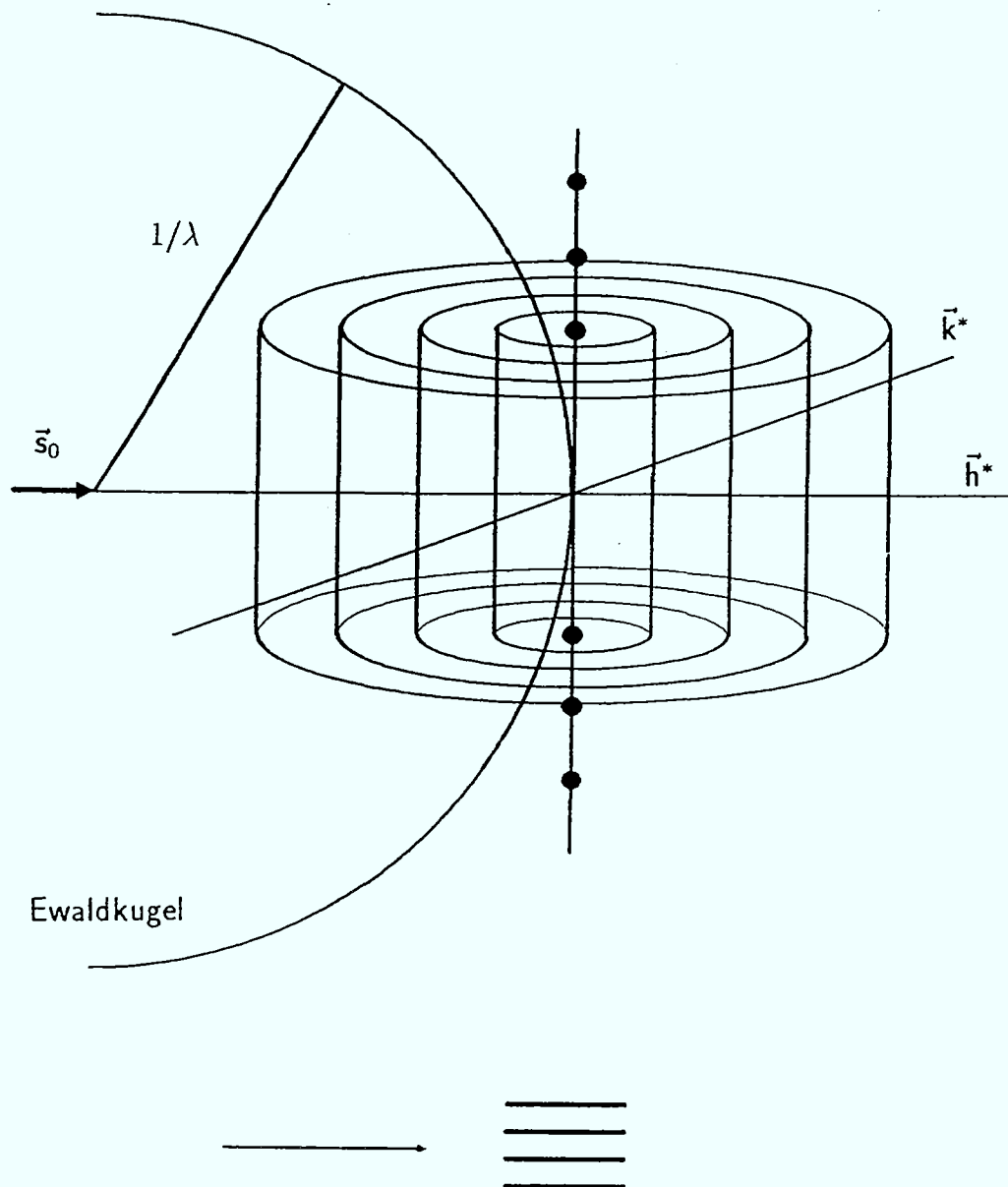


Abb. 6. Die Streugeometrie bei streifendem Einfall.

5.2 Die Diffraktionsexperimente.

Die Röntgenbeugungsexperimente wurden an der EMBL-Beamline X-13 im HASYLAB (DESY) in Hamburg durchgeführt. Für „in-plane“ Messungen wurde die Probe senkrecht zum einfallenden Röntgenstrahl orientiert. Die Beugungsmuster wurde

mit einem ortsempfindlichen Lineardetektor [33,34] registriert. Der Probe-Detektor-Abstand betrug 110 cm.

Es wurden sowohl „stady-state“ als auch zeitaufgelöste Messungen durchgeführt. Für die „stady-state“ Experimente wurden die Beugungsspektren mit und ohne Dauerlicht aufgenommen. Die Probe wurde in diesem Falle durch gelbes Licht einer Halogenlampe belichtet. Die kürzeren Wellenlänge der Halogenlampe wurden durch einen Filter (Schott OG 515) ausgeblendet. Jede Aufnahme dauerte 30 sec. Um die Reproduzierbarkeit der auftretenden Effekte zu kontrollieren, wurden die Aufnahmen mehrmals wiederholt und zwar alternierend mit und ohne Dauerlicht.

Für die zeitaufgelösten Messungen erfolgte die Anregung des Photozyklus mit einer Xe-Blitzlampe im Wellenlängenbereich von 500-680 nm. Die Anregungszeit betrug 0.75 ms. Die Messung der Beugungsmuster wurde durchgeführt, in dem nacheinander die Daten von 20 ms-Meßintervallen abgespeichert wurden. Für eine ausreichende Zählstatistik wurde der Meßzyklus für jede Probe mindestens 5000 mal wiederholt.

5.3 Das Fourierdifferenz-Verfahren.

Die gemessenen Beugungsmuster der PM ermöglichen es die Intensitäten des hexagonalen Gitters bis zu einer Auflösung von 7 Å zu bestimmen. Nach Anwendung der Lorentzkorrektur lassen sich aus diesen Intensitäten die Amplituden der Strukturfaktoren berechnen. Sind auch die Phasen der Strukturfaktoren bekannt, läßt sich durch Anwendung des Fourierformalismus eine projizierte Elektrondichteverteilung parallel zur PM-Ebene berechnen. Die notwendigen Phasen und Intensitätsverhältnisse, der in dem gemessenen Beugungsmuster überlappenden Reflexe, wurden von den elektronmikroskopischen Messungen von Henderson et al. [6] übernommen. Zur Untersuchung von kleinen Konformationsänderungen des BR während des Photozyklus reicht die Auflösung der projizier-

ten Struktur der BR-Einheitszelle nicht aus. Um Unterschiede zwischen den Strukturen mit und ohne Belichtung direkt zu ermitteln wird das Fourierdifferenz-Verfahren angewandt.

Unterschiede in der Elektronendichteverteilung zwischen zwei Intermediaten lassen sich mit folgender Gleichung beschreiben:

$$\Delta\rho_{a-b} = \rho_a - \rho_b = \frac{1}{A} \sum_h \sum_k [|F_a(h,k)| \exp i\varphi_a - |F_b(h,k)| \exp i\varphi_b] \exp -2\pi i(hx+ky) \quad (5.3.1)$$

Hier sind φ_a - und φ_b -die Phasen, $F_a(h,k)$ - und $F_b(h,k)$ -die Strukturfaktoren, ρ_a - und ρ_b -die Elektronendichteverteilungen in der Grundstruktur und der modifizierten Struktur. Die Millerschen Indizes h,k sind die diskreten „Koordinaten“ des Streuvektors und x,y -die relativen Koordinaten, bezogen auf die Länge der Elementarzelle, des Ortsvektors in der Elementarzelle, A -ist die Fläche der Elementarzelle.

Unter der Voraussetzung, daß die Phasen ungefähr gleich sind, läßt sich diese Gleichung dann umschreiben:

$$\Delta\rho_{a-b} = \frac{1}{A} \sum_h \sum_k [|F_a(h,k)| - |F_b(h,k)|] \exp i\varphi_b \exp -2\pi i(hx+ky) \quad (5.3.2)$$

Daraus geht hervor, daß die Differenzbildung vor oder nach der Fouriersynthese äquivalent ist.

Das Ergebnis dieser Berechnung wird als Fourierdifferenzmap dargestellt, d.h. es zeigen sich Maxima und Minima an den Positionen in der Elementarzelle, an denen Unterschiede zwischen der Messung A und B aufgetreten sind. Da die Größe der Maxima und Minima ein Ausdruck für das Ausmaß der Strukturänderung ist, wurden in dieser Arbeit alle Darstellungen so skaliert, daß die absolut größte Änderung den Wert 1 hat. Die Konturen in den Darstellungen haben die folgenden Werte: 0.92, 0.8, 0.68, 0.56, 0.44, 0.32, 0.2; -0.2, -0.38, -0.56, -0.74, -0.92.

6. Ergebnisse und Interpretation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden spektroskopische Messungen am BR-Grundzustand und an BR-Photozyklusintermediaten im sichtbaren und infraroten Wellenlängenbereich durchgeführt. Diese Experimente sind besonders wichtig zur besseren Charakterisierung und Kontrolle, wenn Photozyklusintermediate eingefangen werden sollen. In diesem Sinne sollen sie auch bei der Festlegung von optimalen Bedingungen für die Röntgenbeugungsexperimente helfen.

Die Röntgenbeugungsexperimente an BR und seinen Intermediaten sind der entscheidende Teil meiner Arbeit. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen die globalen strukturellen Änderungen im Molekül während des Photozyklus.

6.1. Methode zur Bestimmung des Wassergehaltes in der BR Probe mittels FTIR-Spektroskopie.

Da die natürliche Funktion eines Proteins nur bei entsprechender Feuchtigkeit möglich ist [30,31], ist es wichtig den Wassergehalt in der Probe während des Experimentes zu kontrollieren. Um dies zu gewährleisten, wurde eine spezielle Methode zur Bestimmung der Wassermenge in der Probe erarbeitet.

An Hand des FTIR-Absorptionsspektrums von BR kann man aus dem Verhältnis der Banden bei 3390 cm^{-1} (O-H Streckschwingungsmode von H_2O) und 1546 cm^{-1} (N-H Schwingungen der Amid II Bande) auf die Wassermenge in der Probe schließen (Abb. 7).

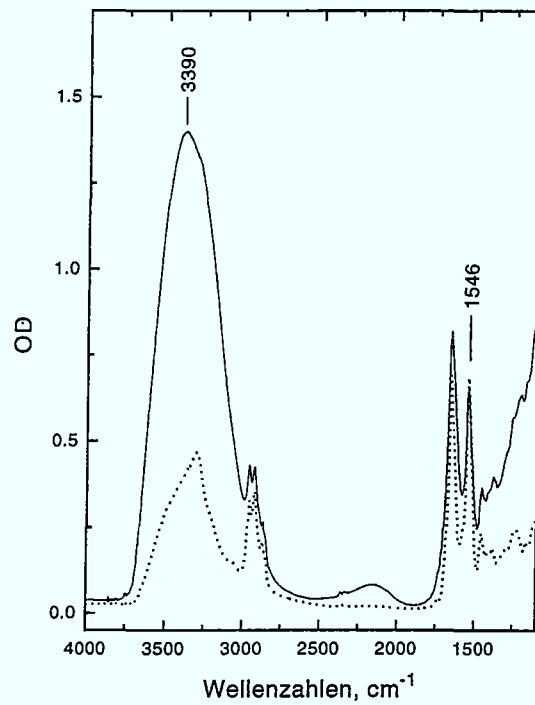


Abb.7 FTIR-Messungen an zwei BR-Proben mit unterschiedlichem Wassergehalt; der Probeninkubation bei 100% r.F. (—) und bei 70% r.F. (.....).

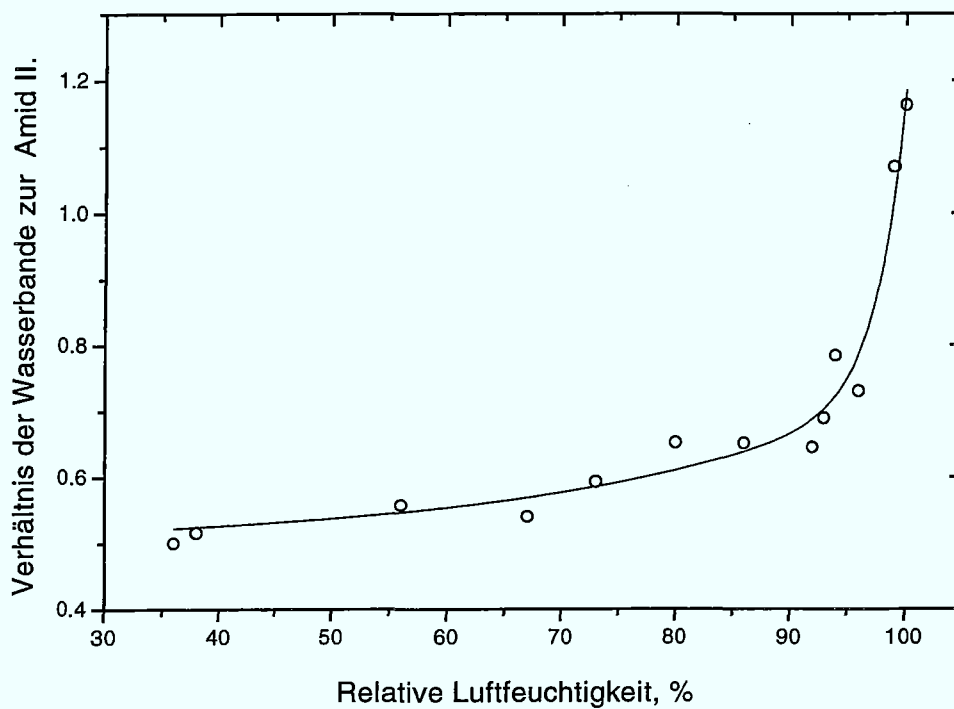


Abb.8 Abhängigkeit des Verhältnisses der Wasserbande (3390 cm^{-1}) zur Amid II Bande (1546 cm^{-1}) von der Luftfeuchtigkeit. Fit mit $Y=0.5+0.46 \exp[(x-100)/2.5]+0.23\exp[(x-100)/27.8]$.

Abbildung 8 zeigt das experimentell bestimmte Verhältnis der FTIR-Banden als Funktion der relativen Luftfeuchtigkeit bei der die Probe inkubiert worden war. In der Abbildung 8 ist außerdem der Kurvenverlauf der Funktion $y=0.5+0.46\exp[(x-100)/2.5]+0.23\exp[(x-100)/27.8]$ dargestellt, der sich als bester Fit an die dargestellten Meßwerte ergab. Dadurch ist es möglich, aus der Grafik den Wassergehalt in jeder Probe anhand des gemessenen Bandenverhältnisses zu bestimmen.

6.2 FTIR- und UV-Vis-Messungen an M_1 -, M_2 -, M_N -, N-, N/O-Intermediaten von BR.

Wie bereits dargestellt, sind die meisten BR-Photozyklusintermediate bereits mit FTIR- und UV-VIS-spektroskopischen Methoden untersucht worden. Aus den verschiedenen Literaturquellen sind die Differenzspektren der Zwischenzustände des Photozyklus bekannt. Da es jedoch bisher keine Übereinstimmung über die Anzahl der Photozyklusintermediate gibt und diese sich auch nicht immer eindeutig voneinander trennen lassen, sind die Spektren der einzelnen Intermediate nicht zweifelsfrei charakterisiert. So ist es bis jetzt nicht klar, welches der beschriebenen M-Spektren das richtige Spektrum des reinen M-Zustandes ist. In der Publikation von Perkins et al. [18], wurden zwei M-Zustände diskutiert (M_1 und M_2), die durch unterschiedliche FTIR-Spektren charakterisiert sind. Vonck et al. [20], Han et al. [21] und Sasaki et al. [19] beschreiben zusätzlich ein sogenanntes M_N -Intermediat, das sehr große Ähnlichkeit zum M_2 -Intermediat aufweist. In einigen anderen Publikationen werden sogar drei und mehr M-Intermediaten postuliert [22,23,24].

Bis jetzt ist das M-Intermediat das einzige Photozyklusintermediat, das mittels Röntgen-, Neutronen- und

schließlich auch mittels Elektronenbeugung untersucht wurde [42,43,44,45,46,47,48,49]. Dabei wurden die strukturellen Änderungen zwischen dem M- und Grundzustand von BR bestimmt. Bei diesen Arbeiten wurde das M-Intermediat auf zweierlei Weise eingefangen, entweder durch Inkubation des Wildtype BR mit Guanidiniumhydrochlorid (GuaHCl) oder durch Inkubation der BR-Mutante Asp96Asn bei einem hohen pH-Wert. In Anbetracht der vorab geschilderten Vielfalt an M-Zuständen, ist es interessant zu klären, welchem der möglichen M-Intermediate das bei den Beugungsexperimenten eingefangene M entspricht.

Zu diesem Zweck wurden die M-, M_1 -, M_2 -, M_N - und N-Zustände nach den in der Literatur angegebenen Verfahren eingefangen und durch FTIR- und UV-VIS-Messungen charakterisiert. Außerdem, wurden bei der Optimierung der Bedingungen für mögliche Röntgenbeugungsexperimente an den Intermediaten des Photozyklus von BR FTIR-Messungen bei tiefen Temperaturen durchgeführt.

6.2.1 Das N-Intermediat von BR.

Obwohl mit der UV-VIS-Spektroskopie der M-Zustand eindeutig charakterisiert ist, gilt dies nicht für die Spektroskopie im infraroten Wellenlängenbereich. Wie bereits erwähnt wurde, sind in der Literatur eine Vielzahl von sich mehr oder weniger stark unterscheidenden FTIR-Differenzspektren für den M-Zustand beschrieben worden. Unter anderem wurde vermutet, daß es sich um Differenzspektren von mehreren gleichzeitig vorhandenen Intermediaten handelt [41], d.h. dem gleichzeitigen Auftreten des L- und M-Intermediates oder des M- und N-Intermediates.

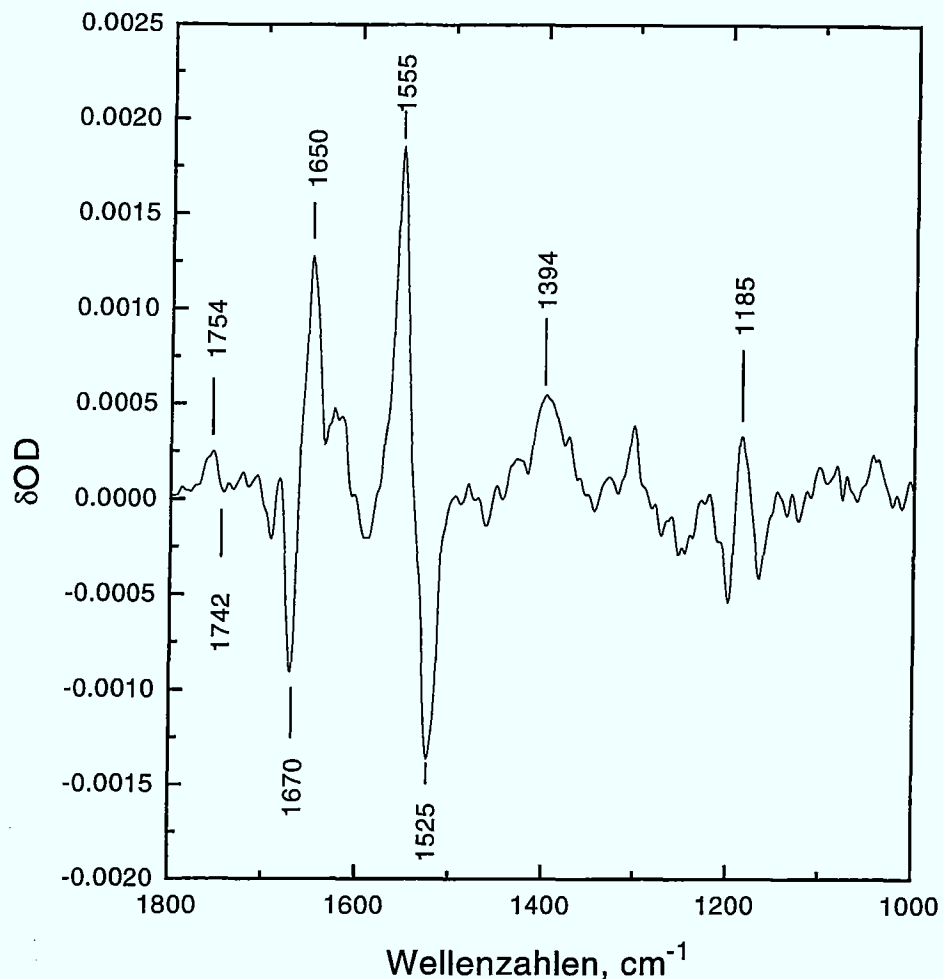


Abb. 9 FTIR-Differenzspektrum des N-Intermediates (Wildtyp-BR, pH 10, 100% r.F., RT)

Im Gegensatz zum M-Zustand, wurde für den N-Zustand von verschiedenen Arbeitsgruppen nur ein FTIR-Differenz-Spektrum beschrieben [27,41,56]. Daher erscheint es für die spätere Diskussion der FTIR-Spektren der M-Intermediate sinnvoll, zunächst die charakteristischen FTIR-Differenz-Banden des N-Intermediates zu zeigen.

Das FTIR-Differenz-Spektrum des N-Intermediates wurde, wie es von Pfefferle et al. beschrieben worden ist [27], bei pH 10 und einem hohen Wassergehalt gemessen. Die Anreicherung des N-Intermediates erfolgte durch eine kontinuierliche Belichtung der Probe mit gelbem Licht ($\lambda > 470 nm$) (Abb. 9).

Die folgenden Banden sind für das N-Intermediat charakteristisch:

- 1). Ausgeprägte positive C-C Schwingungsbande des Retinal bei 1186-1188 cm^{-1} . [27,41]
- 2). Ausgeprägtes Maximum der symmetrischen COO- Streck-schwingung bei 1394-1398 cm^{-1} . [35]
- 3). Scharfe Bande der N-H-Schwingung im Amid II Bereich bei 1555 cm^{-1} . [52]
- 4). Charakteristische Form der Schwingungsbanden im Bereich von 1600-1700 cm^{-1} : ein Minimum im Amid I Bereich bei 1670 cm^{-1} und ein Maxima bei 1650 cm^{-1} [54,55].
- 5). COO⁻-Schwingungsbande der deprotonierten Aminosäure Asp96 bei 1742 cm^{-1} . [35]
- 6). COOH-Schwingung der protonierten Aminosäure Asp85 bei 1756 cm^{-1} [35].

Wie bereits im Kapitel 2.3 erwähnt, kann man durch eine spezielle Modifizierung des Retinals den zeitlichen Ablauf des Photozyklus stark verändern. In der Arbeitsgruppe von Prof. F. Siebert (Universität Freiburg) fand man, daß das mit 9-Desmethyl-Retinal regenerierte BO eine Verlangsamung des Photozyklus um einen Faktor von 100 aufweist. Dabei handelt es sich um einen verlangsamten Zerfall des N-Intermediates [29]. Somit ist das auf diese Art und Weise modifizierte BR bestens für Strukturuntersuchungen des N-Intermediates mittels Röntgenbeugung geeignet. Das modifizierte BR wurde uns freundlicher Weise von Prof. F. Siebert zur Verfügung gestellt. Vor der Durchführung der Röntgenbeugunsexperimente wurden zahlreiche spektroskopische Untersuchungen im sichtbaren und infraroten Wellenlängenbereich durchgeführt, um die optimalen physiko-chemischen Bedingungen für die Untersuchung des N-Intermediates zu bestimmen. Die ausgewählten Bedingungen waren: pH 7, 100% r.F., Raumtemperatur. Der N-Zwischenzustand konnte unter den genannten Bedingungen durch kontinuierliche Belichtung der Probe mit gelbem Licht (OG 513 nm) angereichert werden.

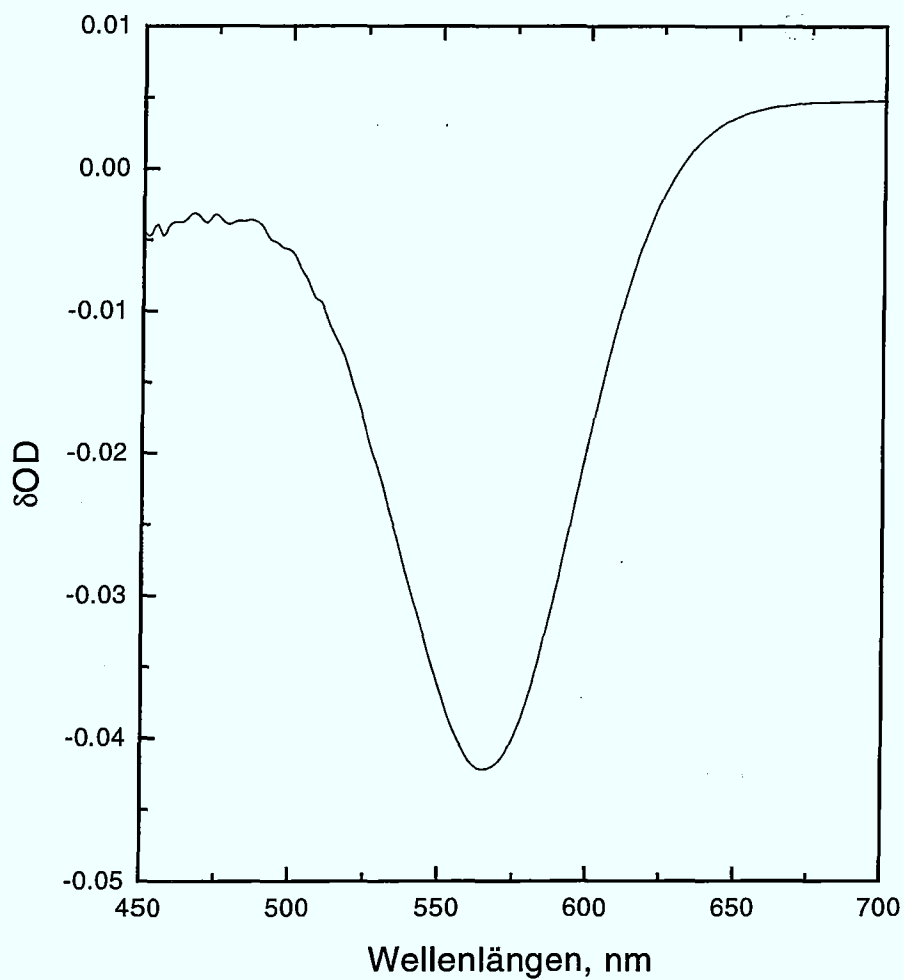


Abb.10 UV-Vis-Differenzspektrum des N-Intermediates (BR 9-Desmethyl-Retinal).

Die Abbildung 10 zeigt das N-BR-Differenzspektrum im Wellenlängenbereich von 450-700 nm. Wie man in der Abbildung sieht, weist das angereicherte N-Intermediat als einziges ein Minimum bei 550 nm auf. Ein entsprechendes FTIR-Differenz-Spektrum ist in der Abbildung 11 dargestellt.

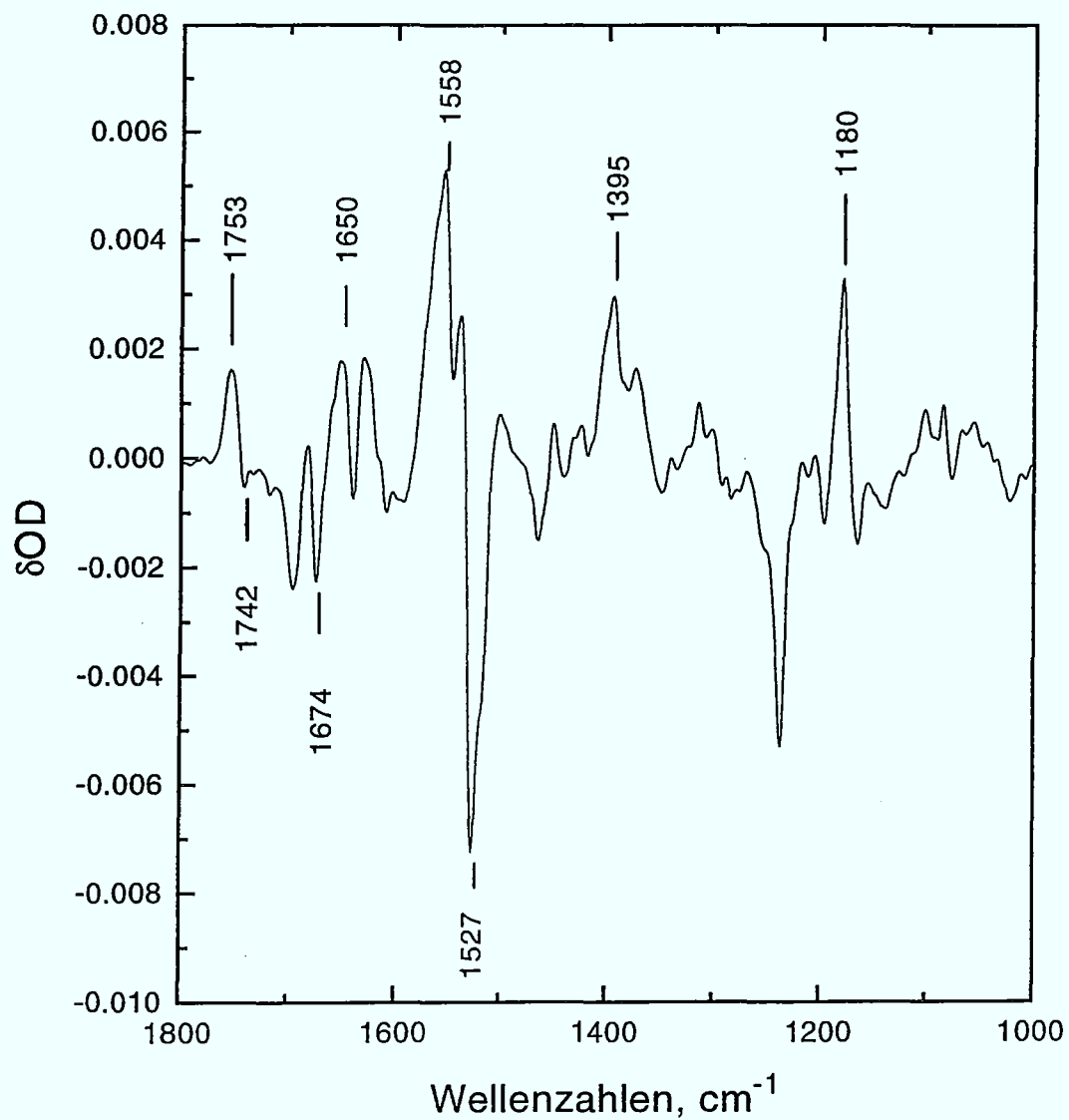


Abb.11. FTIR-Differenzspektrum des N-Intermediates (BR 9-Desmethyl-Retinal).

Unterschiede zwischen diesem Spektrum und dem N-Spektrum des nativen BR treten nur im Bereich der C-C-Schwingungen des Retinals (1200-1100 cm^{-1}) auf (Abb.9 und 11).

6.2.2. Die M-Intermediate von BR.

Das M-Intermediat von BR ist im sichtbaren Wellenlängenbereich leicht identifizierbar, da das Absorptionsmaximum (412 nm) stark gegenüber dem des Grundzustandes (568 nm) verschoben ist. Aufgrund der im sichtbaren Spektralbereich durchgeführten Experimente konnte nachgewiesen werden, daß es verschiedene Bedingungen gibt, unter denen man bis zu 100% der BR-Moleküle im M-Zustand einfangen kann (Abb.12).

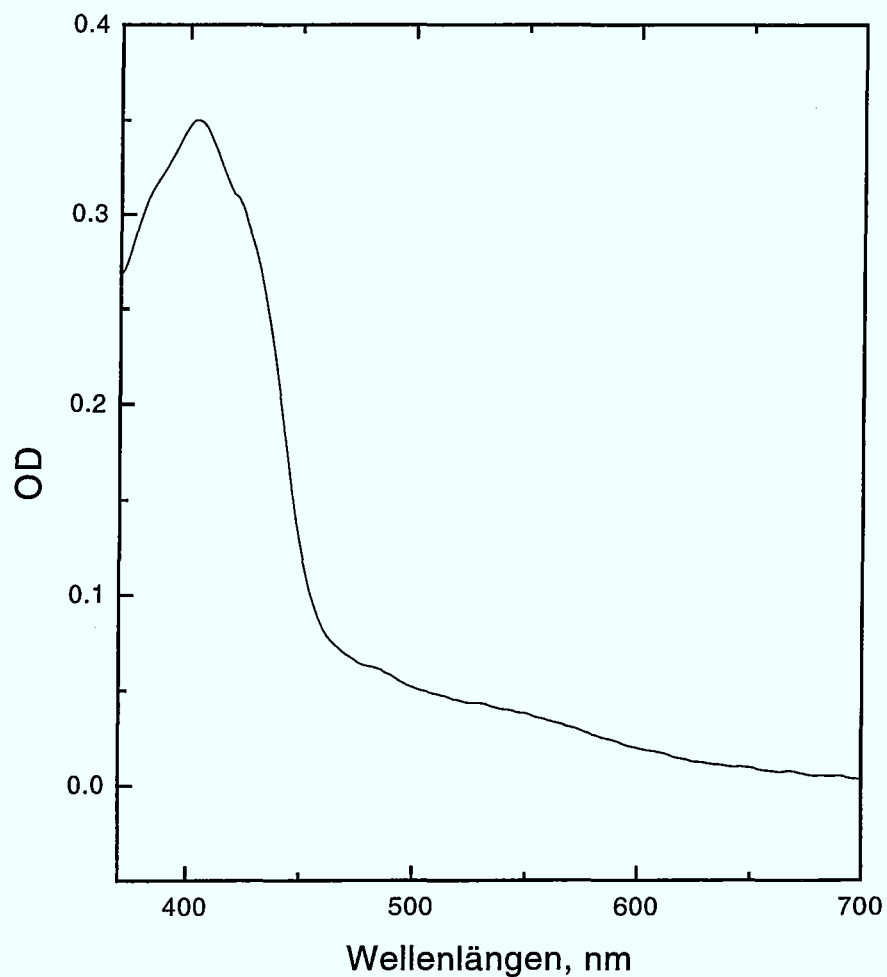


Abb.12. UV-Vis-Spektrum des M-Intermediates nach Inkubation des Wildtyp-BR mit GuaHCl (pH 10).

Im einzelnen sind dies folgende Bedingungen: niedriger Wassergehalt (weniger als 50% r. F.), tiefe Temperaturen (220-250 K), Inkubation mit GuaHCl bei einem hohen pH-Wert. Außerdem läßt sich eine Verlangsamung des Zerfalles des M-Intermediates durch den Austausch bestimmter Aminosäuren von BR erreichen, vor allem der der Aminosäure Asp96 (Kapitel 2.3). In dieser Arbeit wurden die Mutante Asp96Asn und die Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn untersucht. Die Messungen der Proben des mit GuaHCl inkubierten Wildtyp-BR und der Mutanten, jeweils inkubiert bei einem hohen pH-Wert, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Wassergehalt in den Proben wurde durch Inkubation bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% bei 20°C eingestellt, ausgenommen bei den Proben, die extra als trocken gekennzeichnet wurden. Die entsprechenden Spektren im infraroten Wellenlängenbereich sind in Abbildung 13 dargestellt.

Man sieht deutlich die Übereinstimmungen bei den sechs FTIR-Differenzspektren, die sie von den Spektren des N-Intermediates unterscheiden:

- 1). Die C-C-Schwingung des Retinal bei 1186-1188 cm^{-1} ist weniger ausgeprägt.
- 2). Die Bande der COO^- -Streckschwingung bei 1396-1398 cm^{-1} tritt nicht auf [35].
- 3). Die COOH-Schwingungsbande der protonierten Aminosäure Asp 85 befindet sich bei 1761 cm^{-1} .

Trotz der Übereinstimmungen aller sechs M-Spektren in den genannten Wellenzahlenbereichen, gibt es auch Unterschiede zwischen diesen Differenzspektren, die mehr oder weniger deutlich ausgeprägt sind.

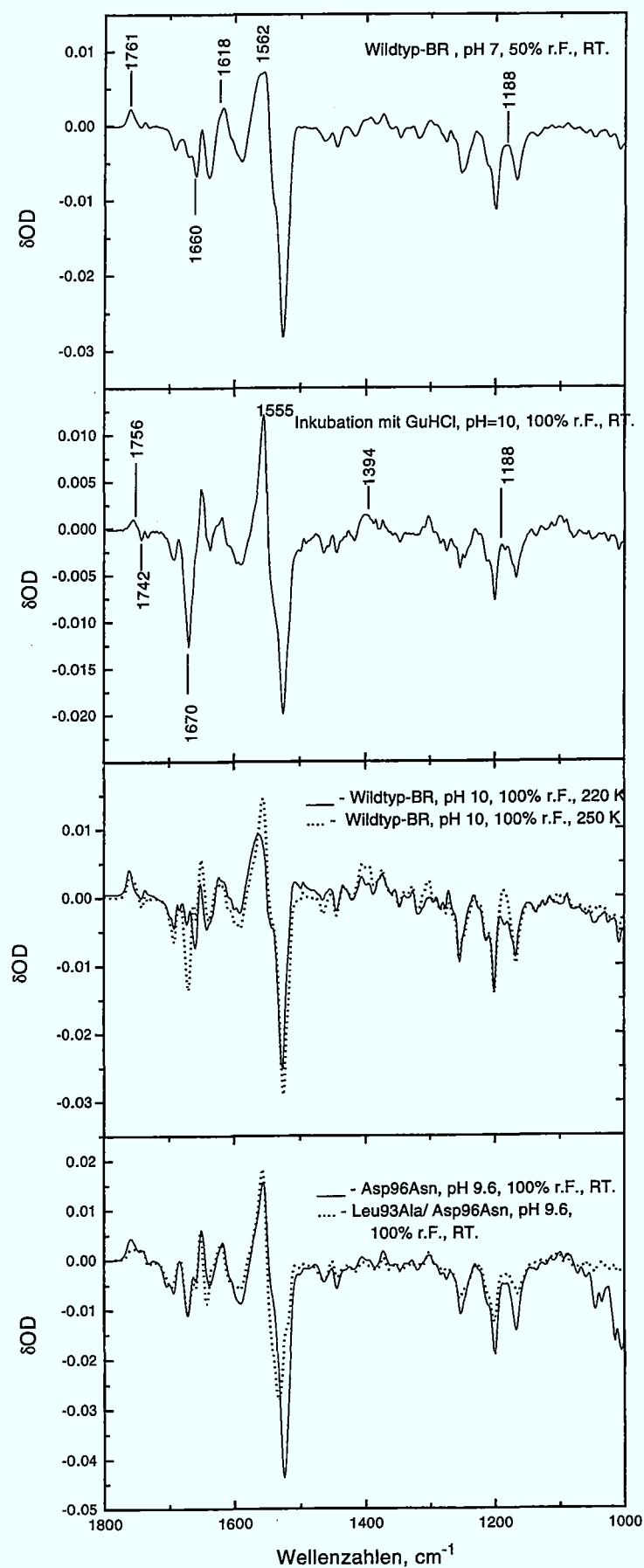


Abb.13 FTIR-Differenzspektren der verschiedenen M-Intermediate.

Das Spektrum des M-Intermediates der trockenen Probe hat Ähnlichkeit mit dem Spektrum der Probe bei 220 K, besonders im Bereich den N-H-Schwingungen (Amid II) bei 1555 cm^{-1} und im Bereich der Schiff'schen Base Schwingungen bei $1620\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$. Die markante Verbreiterung der Amid II Bande, eine stärker ausgeprägte Bande bei 1660 cm^{-1} als bei 1670 cm^{-1} (Amid I Bereich) und die Lokalisation der Asp 85 Bande bei 1761 cm^{-1} sprechen dafür, daß diese Form des M-Intermediates mit dem als M_1 bezeichneten Intermediat übereinstimmt [18].

Diese Charakteristika der Differenzspektren sind auch in Übereinstimmung mit dem in der Literatur beschriebenen „reinen“ Spektrum des M-Intermediates [56]. Im Vergleich zu dem Spektrum des N-Intermediates weisen diese Spektren des M-Intermediates die größten Unterschiede auf.

Diese Unterschiede sind für die Proben des Wildtyp-BR gemessen bei 250 K oder inkubiert mit GuaHCl (pH 10) und bei den Proben der Mutanten, nicht mehr so deutlich. Vor allem im Amid I und Amid II Bereich werden diese Spektren des M-Intermediates dem des N-Intermediates ähnlicher. Charakteristisch für das M-Intermediat bleibt aber, daß keine ausgeprägte Bande bei 1188 cm^{-1} auftritt. Da es sich bei dieser Bande um die C-C Schwingung des Retinal handelt, ist dieses in Übereinstimmung mit dem Absorptionsmaximum dieser Proben unter gleiche Bedingungen im sichtbaren Bereich. Die Änderungen in Amid I Bereich, d.h. die Bande bei 1670 cm^{-1} ist stärker ausgeprägt als bei 1660 cm^{-1} , entspricht dem Übergang zum M_2 -Intermediat [18].

Am deutlichsten ist die Änderung im Amid Bereich im FTIR-Differenzspektrum der Probe, die mit GuaHCl inkubiert wurde. In diesem Fall zeigt sich die größte Übereinstimmung mit dem in der Literatur beschriebenen M_N -Intermediat [19, 20].

Neben den obenbeschriebenen statischen Messungen unter Dauerlicht, wurde auch der Zerfall des M-Intermediates nach Anregung des Photozyklus mit einem kurzen Laserpuls untersucht. Diese Experimente wurden an der Doppelmutante

Leu93Ala/Asp96Asn nach Inkubation der Probe bei pH 9.6 durchgeführt. Die Abbildung 14 zeigt das zeitabhängigen Verhalten der optischen Dichte der Absorptionsbanden im sichtbaren und infraroten Wellenlängenbereich. Man sieht, daß fast alle Banden eine ähnliche Kinetik aufweisen. Die ermittelten Zeitkonstanten, sowohl für die UV-Vis- als auch für die FTIR-Banden, weisen fast alle einen Wert von ca. 40 sec auf (Abb.14). Die für diese Kinetik ermittelten Zeitkonstanten sind in Tabelle 1a und 1b aufgeführt.

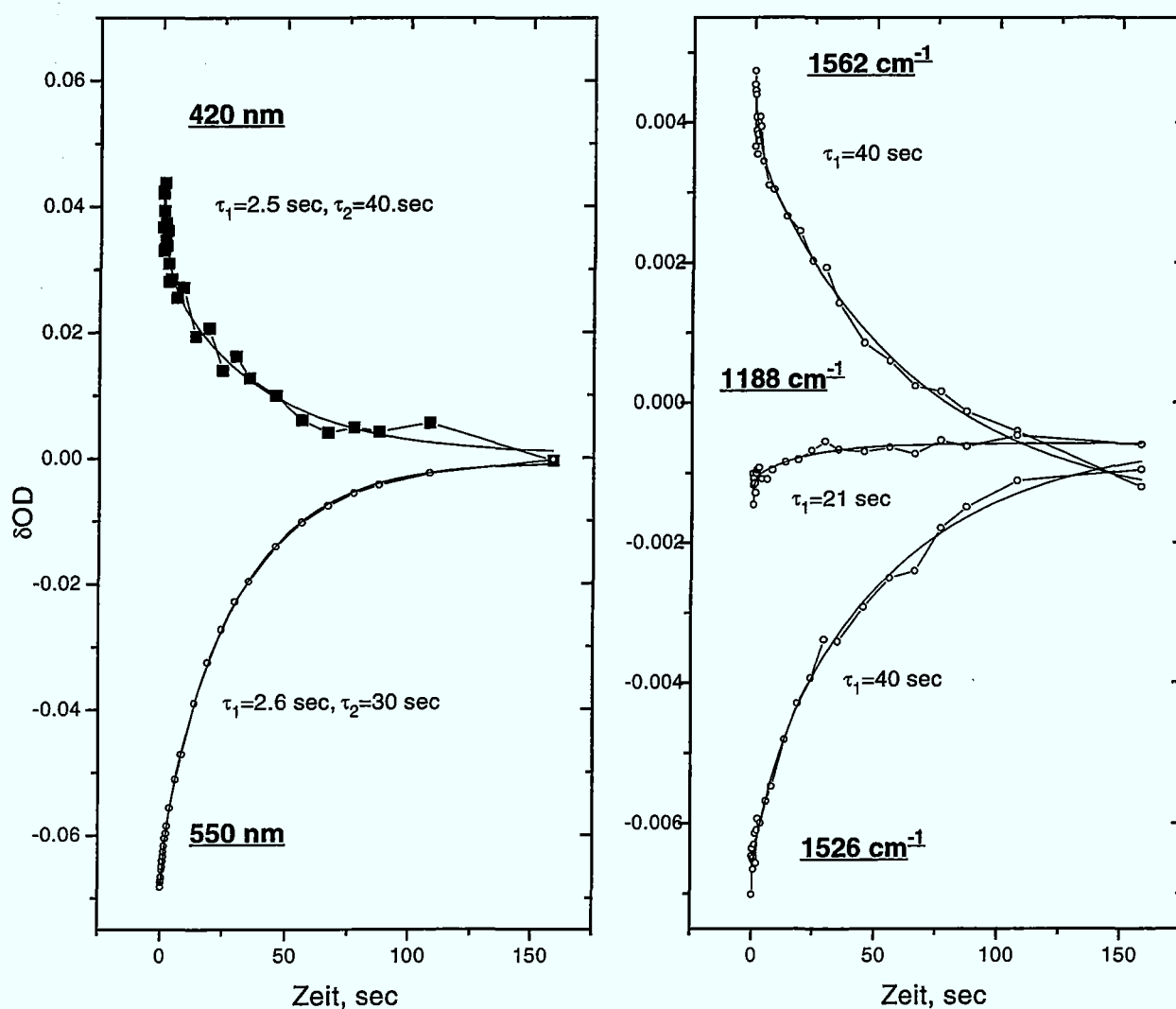


Abb.14 Kinetisches Verhalten der UV-Vis-Absorption und einiger FTIR-Banden der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 9.6.

6.2.3 Das N/O-Intermediat der BR Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn .

Durch optische Untersuchungen des Photozyklus der Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn von Tittor et al. [28] war bekannt, daß bei dieser Mutante ein verlangsamter Zerfall von den Intermediaten auftritt, die auf den M-Zustand im Photozyklus folgen. Für eine weitere Charakterisierung dieser Mutante wurden statische und zeitaufgelöste Messungen vor allem im infraroten Wellenlängenbereich durchgeführt. Die UV-Vis-Messungen an dieser Mutante bei pH 4.2, 100mM KCl haben gezeigt, daß ein O-ähnliches-Intermediat mit einem Absorptionsmaximum bei 605 nm auftritt. Dieses Intermediat weist keine Absorptionsänderungen bei 410 nm auf, also ist der M-Zerfall bereits abgeschlossen, s.Abb 15.

FTIR-Untersuchungen unter diesen Bedingungen zeigten, daß es sich bei dem „eingefangenen“, langlebigen Zustand um einen „N/O-Zustand“ handeln kann (Abb.15).

Im Vergleich mit Daten einer anderen Mutante [14] und des Wildtype-BR [56], weist das FTIR-Spektrum dieser Mutante vor allem im Wellenzahlenbereich 1500-1550 cm^{-1} , deutliche Unterschiede auf. Bei diesem Bereich handelt es sich um die Ethylen-Retinal Schwingungsbanden. Veränderungen in diesem Bandenbereich werden aber verständlich, wenn man die ebenfalls vorhandene Veränderung im sichtbaren Wellenlängenbereich (Absorptionsmaximum bei 605 nm statt bei 640 nm) berücksichtigt [35].

Vergleicht man hingegen das gemessene FTIR-Spektrum der Doppelmutante bei pH 4.2 mit dem Differenzspektrum des N-Intermediats, so ist eine erstaunlich gute Übereinstimmung vor allem im Bereich der Amid I, Amid II und C-C Schwingungsbanden des Retinals vorhanden (Abb.9).

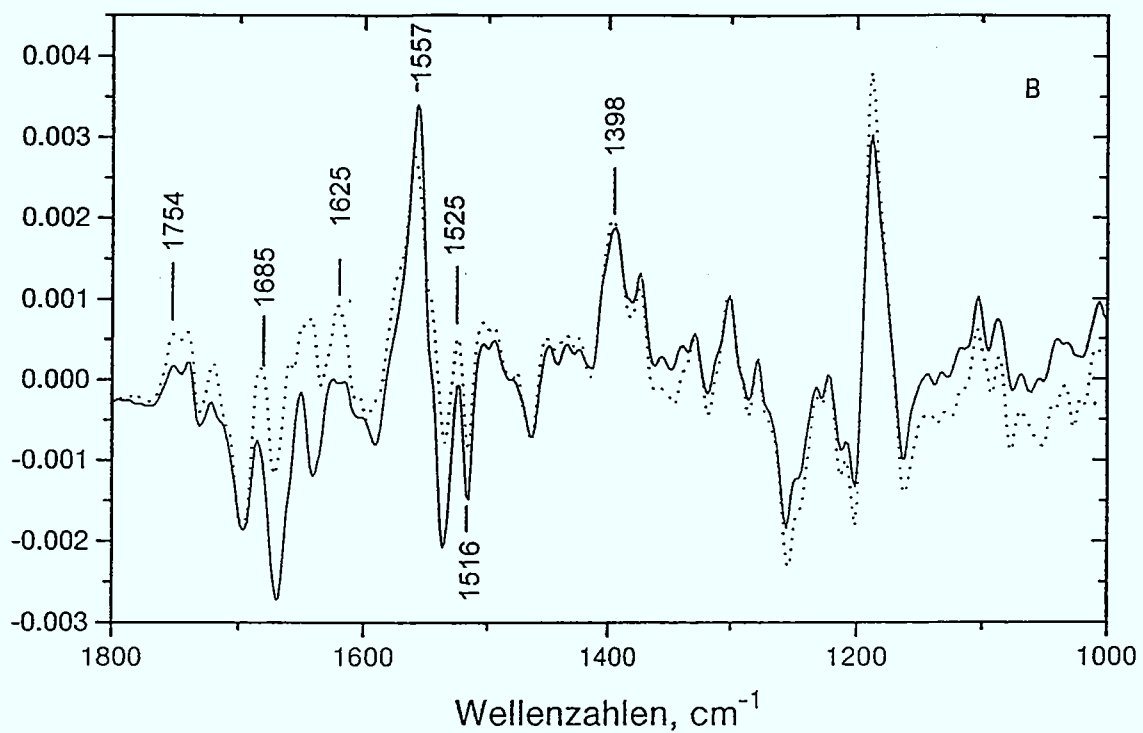
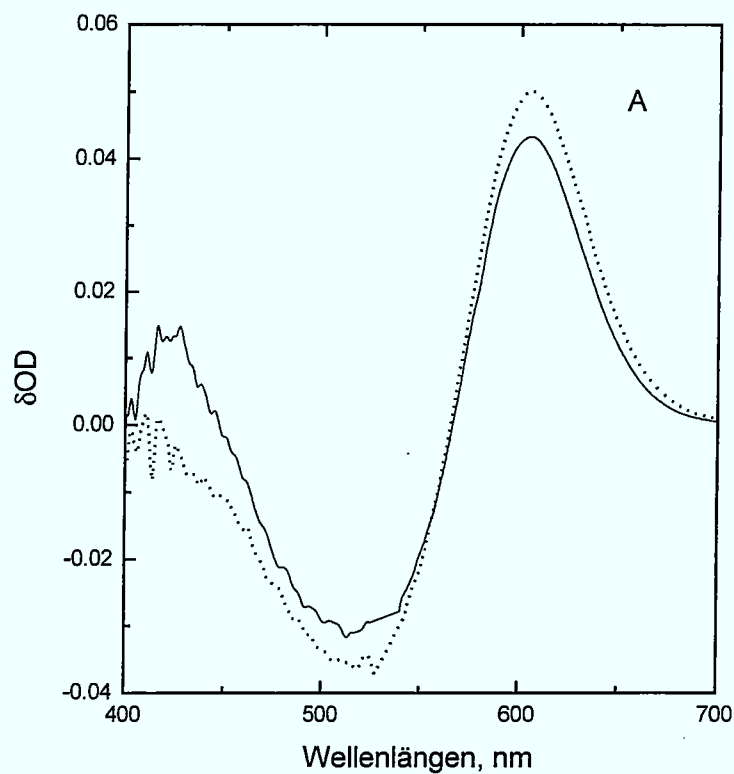


Abb. 15 Differenzmessungen (Dauerlicht-lichadaptiert) der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 4.2 (.....) und pH 5.2 (_____).

A). Statische UV-Vis-, **B)** Statische FTIR-Messungen.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der UV-Vis- und FTIR-Messungen kann dieses eingefangene Intermediat nur als N/O-Zustand bezeichnet werden. Die einzige Bande im FTIR-Differenzspektrum, die eindeutig auf ein O-ähnliches Intermediat hindeutet, ist die markante Bande bei 1525 cm^{-1} der C=C Retinalschwingung.

Entsprechende Messungen wurden an dieser Mutante auch bei pH 5.2, 100mM KCl, durchgeführt. Die UV-Vis-Messungen zeigen, daß die Erhöhung des pH-Wertes in der Probe dazu führte, daß neben dem N/O-Intermediat (Absorption bei 605 nm) auch das M-Intermediat (Absorption bei 410 nm) unter Dauerbelichtung akkumuliert wird.

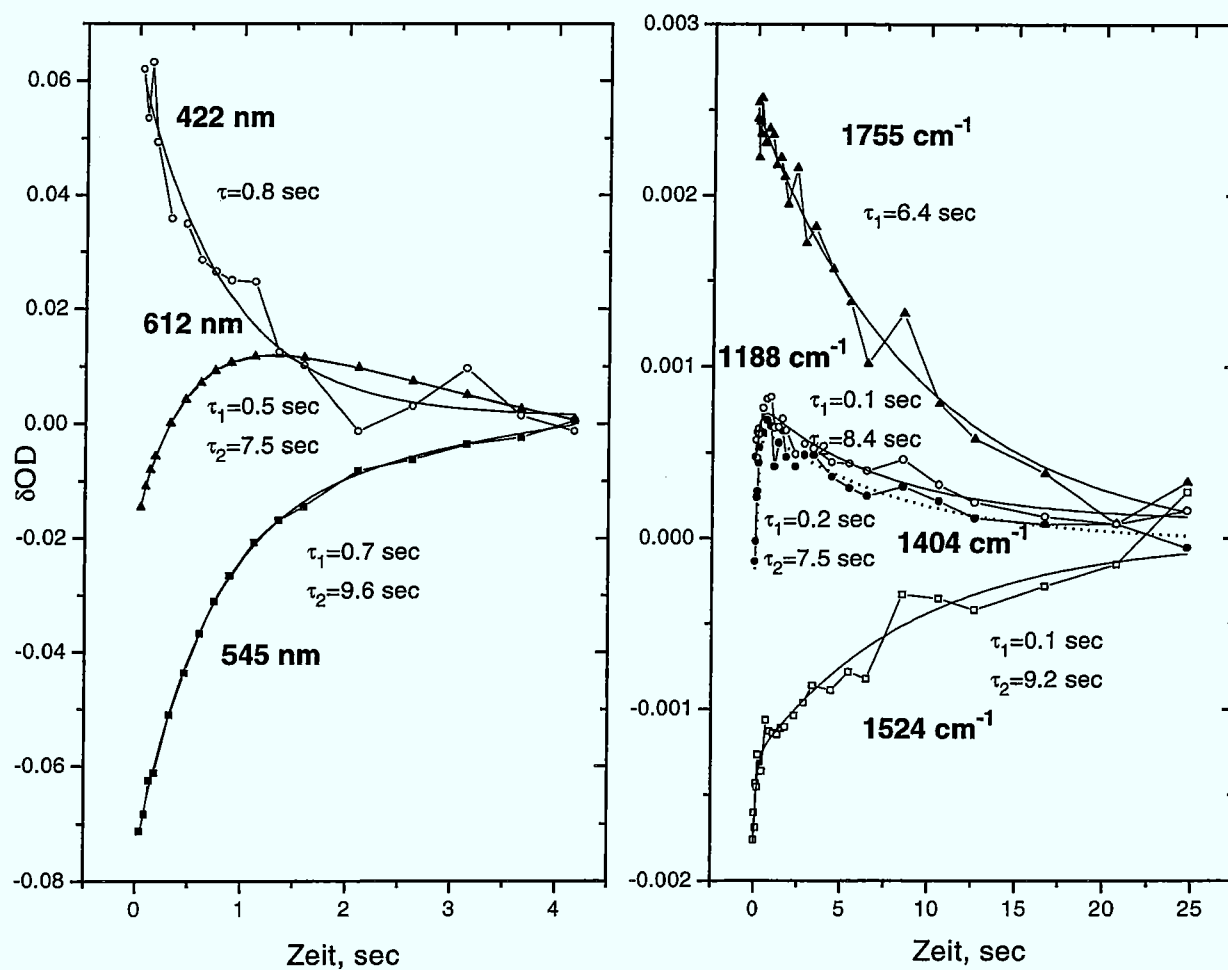


Abb.16 Kinetisches Verhalten der UV-Vis-Absorption und einiger FTIR-Banden der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 5.2.

Es scheint, daß der N/O-Zerfall beschleunigt ist, da die Absorption im Bereich von 605 nm geringer ist, als bei den Experimenten bei pH 4.2. Die Größe des M-Anteils, bzw. N/O-Anteils bei diesem pH-Wert hängt deutlich von dem Wassergehalt in der Probe ab. Je trockener die Probe ist, desto mehr handelt es sich bei dem eingefangenen Zustand um das M-Intermediat.

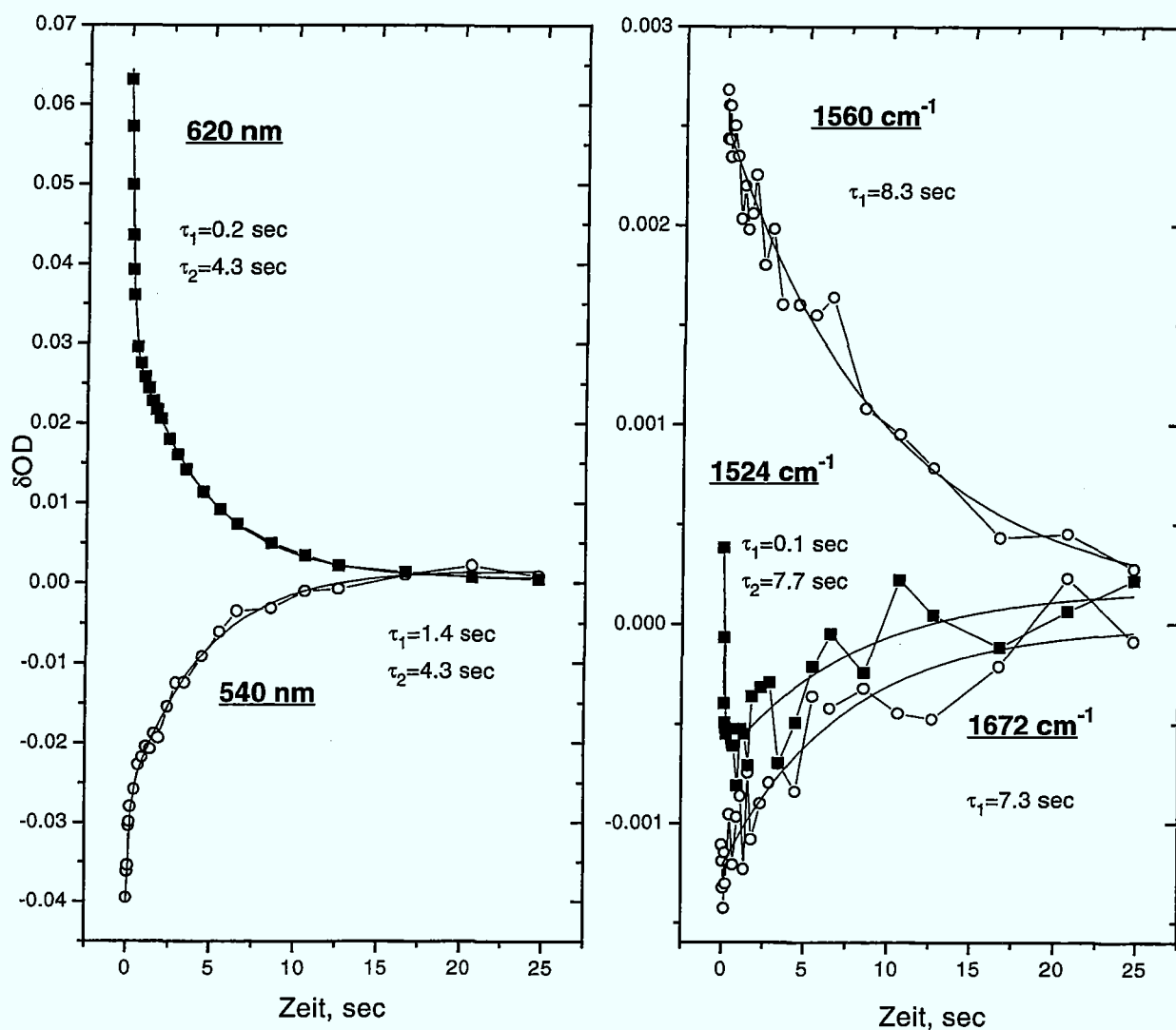


Abb. 17 Kinetisches Verhalten der UV-Vis-Absorption und einiger FTIR-Banden der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 4.2.

Das FTIR-Differenzspektrum stimmt hingegen bei sehr feuchten Proben fast mit dem Spektrum der Probe bei pH 4.2 überein. Der Unterschied besteht darin, daß die Schwingungsbande bei 1525 cm^{-1} nicht so stark wie bei der Probe mit pH 4.2 ausgeprägt ist. Um den Ablauf und das Auftreten der Intermediate des Photozyklus dieser Mutante genauer zu verfolgen, wurden kinetische Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Die Resultate der zeitaufgelöste Untersuchungen der Doppelmutante bei pH 5.2 und 4.2 (100 mM KCl) sind in Abbildung 16 und 17 dargestellt und die Zeitkonstanten sind in der Tabelle 1a und 1b zusammengefaßt.

Tab. 1a. Amplituden (δOD) und Zeitkonstanten des jeweiligen Fittes an den Zeitverlauf der Absorptionsbanden im sichtbaren Wellenlängenbereich der Leu93Ala/Asp96Asn Probe bei pH 4.2, 5.2 und 9.6.

	pH 4.2		pH 5.2		pH 9.6	
UV-Vis (nm)	Ampl.	Zeit, ±Fehler (ms)	Ampl.	Zeit, ±Fehler (ms)	Ampl.	Zeit, ±Fehler (ms)
420	-	-	0.06	817 ±132	0.01 0.03	2655 ±1900 39634 ±14051
540	-0.02 -0.03	143 ±25 4314 ±303	-0.06 -0.04	677 ±40 9556 ±2816	-0.007 -0.06	2547 ±308 30262 ±495
610	0.04 0.03	157 ±7 4318 ±207	-0.04 0.05	493 ±23 7502 ±3848	-	-

Wie erwartet, gibt es in Abhängigkeit vom pH-Wert der Probe

Unterschiede im Zeitverhalten des Absorptionsmaximums bei 605 nm und einiger FTIR-Differenzbanden.

Tab. 1b. Amplituden (δOD) und Zeitkonstanten des jeweiligen Fittes an den Zeitverlauf der Differenzbanden im infraroten Wellenlängenbereich der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 4.2, 5.2 und 9.6.

	pH 4.2		pH 5.2		pH 9.6	
FTIR (cm^{-1})	Ampl.	Zeit $\pm$ Fehler (ms)	Ampl.	Zeit $\pm$ Fehler (ms)	Ampl.	Zeit $\pm$ Fehler (ms)
1754	0.001	8050 ± 870	0.0003	6317 ± 1062	0.001	41265 ± 5407
1742	0.001	7762 ± 938	0.0003	7528 ± 2772	0.001	45444 ± 5321
1672	-0.001	7338 ± 1085	-0.0009	7928 ± 4792	-0.002	41865 ± 8813
1560	0.002	8330 ± 603	0.002	9832 ± 1462	0.005	44573 ± 2579
1524	0.001	80 ± 23	-0.0005	150 ± 76	-0.006	41046 ± 1490
	-0.001	7714 ± 1694	-0.0013	9211 ± 1127		
1516	0.001	129 ± 35	-0.001	9940 ± 1419	-0.003	39595 ± 2091
	-0.002	8858 ± 932				
1398- 1404	0.002	7410 ± 378	-0.0003	217 ± 97	-	-
			0.0007	7505 ± 2062		
1188	0.001	128 $\pm$ 27	-0.0008	138 ± 23	-0.001	22710 ± 4900
	0.003	8701 ± 316		8414 ± 2417		
			0.0007			

Das Zeitverhalten der UV-Vis-Absorptionsänderung und der FTIR-Banden sind für jeweils einen pH-Wert ähnlich. Die pH-Abhängigkeit der Kinetik sieht man am deutlichsten am Zeitverlauf des Absorptionsmaximums bei 605 nm, das für das N/O-Intermediat charakteristisch ist. Auch die FTIR-Differenz-Banden zeigen in ihrem Zeitverhalten einige Unterschiede für die Proben bei pH 4.2 und 5.2. Besonders auffällig ist es für die Banden bei 1525 und 1186-1188 cm^{-1} der C=C und C-C Schwingung im Retinal Bereich. Der Unterschied in der Bande bei 1525 cm^{-1} ist eine Bestätigung dafür, daß diese Bande mit der Absorption im sichtbaren Wellenlängenbereich korreliert ist.

6.3. Röntgenbeugungsexperimente an den M_1 -, M_2 -, M_N -, N- und N/O-Intermediaten.

Obwohl durch Neutronenbeugungs-[46,47,48] und Röntgenbeugungsexperimente [42,43,44], später auch durch Elektronendiffraktionsuntersuchungen [21,49,64], Strukturänderungen im Protein nach dem Übergang zum M-Zustand nachgewiesen werden konnten, ist noch ungeklärt, ob auch bei anderen Photozyklusintermediaten Strukturänderungen auftreten. Vor allem auch im Hinblick auf die Vielzahl der oben beschriebenen möglichen M-Intermediate (M_1, M_2, M_N) ist es notwendig die Strukturänderungen während des Photozyklus näher zu untersuchen. Als Beitrag zur Klärung dieser Frage wurden „steady-state“ Röntgenbeugungsmessungen an drei unterschiedlichen BR-Proben durchgeführt: der BR-Mutante Asp96Asn, der Doppelmutante Asp96Asn/Leu93Ala und an BR, regeneriert mit 9-Desmethyl-Retinal.

Zusätzlich wurden kinetische Messungen an der BR-Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn vorgenommen, um den zeitlichen Verlauf der Strukturänderungen im BR während des Photozy-

klus mit den Kinetiken der spektroskopischen Untersuchungen vergleichen zu können und somit die auftretenden Strukturänderungen eindeutiger bestimmten Photozyklusintermediaten zuordnen zu können.

Für die „steady-state“ Experimente wurden Diffraktionsmuster alternierend von unbelichteten/lichadaptierten und entsprechend Kapitel 5.2 belichteten Proben gemessen. Die zeitaufgelösten Messungen wurden wie in Kapitel 5.2 beschrieben durchgeführt.

Wie auch durch unsere spektroskopischen Messungen bestätigt wurde, ist der Anteil der verschiedenen Photozyklusintermediate zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht nur vom pH-Wert, sondern auch vom Wassergehalt der Probe abhängig. Um die Kinetik der strukturellen Änderungen mit der der spektroskopischen vergleichen zu können, wurden die Probe während der Beugungsexperimente mehrmals auch optisch zeitaufgelöst gemessen. Dafür wurde ein Diodenarray-Spektralphotometer genutzt, mit dem nach der gleichen Blitzlichtanregung des Photozyklus wie für die Röntgenbeugungsmessungen im Millisekundenbereich optische Spektren von BR aufgenommen werden können.

Bei optimaler Probendicke (OD 3) für zeitaufgelöste Röntgenbeugungsexperimente ist die Absorption am Absorptionsmaximum des M-Zustandes (410 nm) und des Grundzustandes (568 nm) aber bereits zu groß, um mit diesem Aufbau optisch kinetische Messungen durchführen zu können. Zur Vermeidung dieses Problems wurde neben der „dicken“ Probe eine „dünnere“ (OD 0.8) im Probenhalter aufgetragen. So sollte sichergestellt werden, daß beide, sowohl die „dicke“, als auch die „dünnere“ Probe, der gleichen Luftfeuchtigkeit ausgesetzt sind und somit den gleichen Wassergehalt aufweisen. Durch Vergleichsmessungen an der „dünnen“ Probe in Wellenlängenbereichen für die bei der „dickeren“ Probe noch sinnvolle kinetische Messungen möglich sind (≥ 620 nm), kann dann kon-

trolliert werden, ob die Zeitverläufe der Absorptionsänderungen der „dünneren“ und „dickeren“ Proben identisch sind.

6.3.1. Messungen an den M_1 -, M_2 - und M_N -Intermediaten der BR-Mutante Asp96Asn.

In vorangegangenen Untersuchungen an der Mutante Asp96Asn konnten Strukturänderungen des Proteins im M-Zwischenzustand, vergleichen zum Grundzustand, nachgewiesen werden.[43,47,64]. Wie aber spektroskopische Untersuchungen vor allem im infraroten Wellenlängenbereich zeigen ([18,19,20] und s. Kap. 6.2), gibt es verschiedene M-Zustände, die in Abhängigkeit von der Feuchtigkeit oder anderen physiko-chemischen Bedingungen akkumuliert werden können. Im folgenden wird der Einfluß des Wassergehaltes in der Probe auf die Strukturänderungen des M-Intermediates beschrieben. Dafür wurden Proben von der Mutante Asp96Asn bei 100%, 75%, 57% und 15% relativer Luftfeuchtigkeit (r.F.) gemessen.

Im Gegensatz zu den trockenen Proben sind bei den Proben mit 100% und 75% r.F. unter Dauerbeleuchtung die für den M-Zustand charakteristischen Reflexänderungen (bei Reflex (1,0), (1,1), (2,0), (3,2), (4,1)) deutlich zu sehen (Abb.18).

Ebenso tritt bei diesen Proben mit dem Übergang zum M-Zustand auch die Vergrößerung des Gitters um 0.2 Å auf. Ab einer relativen Luftfeuchtigkeit von 57% zeigte sich bei allen Reflexen eine Abnahme der Intensität. Außerdem, konnte, trotz der charakteristischen Gelbfärbung des M-Zustandes, ab einer relativen Luftfeuchte von 57% keine oder nur eine sehr geringe Intensitätsänderung der für das M-Intermediat charakteristischen Reflexe (3,2) und (4,1) festgestellt werden.

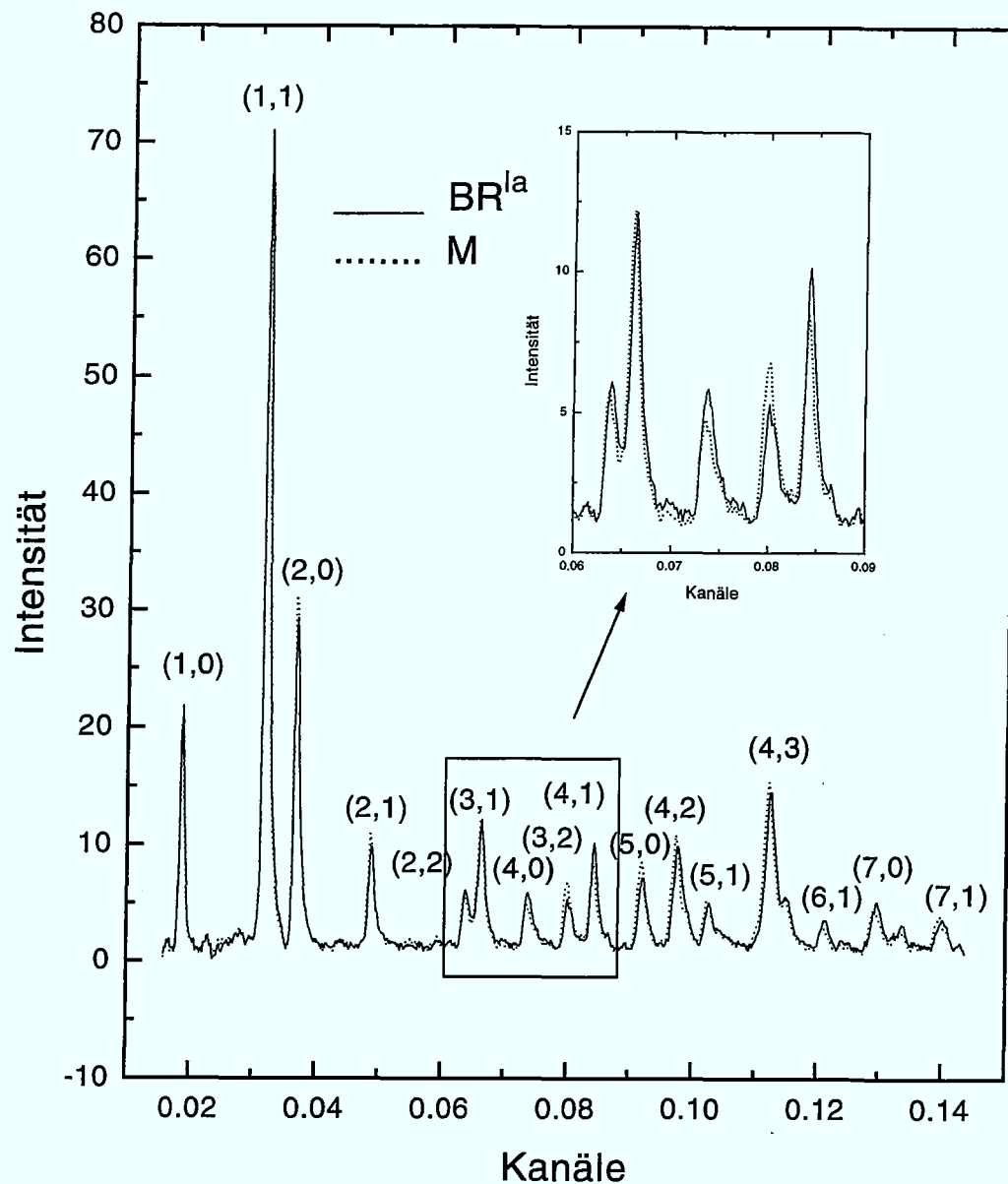


Abb.18 Röntgenbeugungsbild der Mutante Asp96Asn bei pH 9.6: lichtadaptierter Zustand (BR^{la}) und unter Dauerbelichtung (M-Intermediat) bei 100% r.F. und RT.

Hingegen tritt bei dieser Luftfeuchtigkeit die Vergrößerung des Gitters, wie für den M-Zustand festgestellt [47,48], noch auf. Bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 15% tritt diese Gitteränderung hingegen nicht mehr auf.

Unabhängig von den zunächst festgestellten Größen der Intensitätsänderungen wurden die Intensitäten der Reflexe für alle Proben, sowohl für den lichtadaptierten, als auch für den Dauerlichtzustand bestimmt. Daraus ergaben sich für jede Probe Differenzintensitäten, die für die feuchten Proben (100%, 75% r.F.) ca. 10% der Reflexintensitäten ausmachen. Für die trockenen Proben ergaben sich nur noch Differenzintensitäten von 3.4%.

Die daraus ermittelten Fourierdifferenzmaps zeigen die bekannten Differenzmaxima für die feuchten Proben, hauptsächlich Helix G (100%r.F.) und Helix B, G & F (75% r.F.). Für die Probe bei 57% r.F. findet man ebenfalls Differenzmaxima bei Helix B und bei Helix F, zusätzlich aber auch noch ein bisher nicht beschriebenes Maximum bei Helix C. Geringe Differenzmaxima ergaben sich auch für die Probe bei 15% r.F., lokalisiert bei Helix B, G und zwischen C & F (Abb.19).

Zur Charakterisierung der gemessenen M-Intermediate wurden unter gleichen Bedingungen FTIR-Messungen durchgeführt. Diesen Messungen zufolge wurde die Proben bei 75% und 100% r.F. unter Dauerbelichtung im $M_2(M_N)$ -Zustand eingefangen, während die trockenen Proben (57% und 15% r.F.), bei ansonsten gleichen experimentellen Bedingungen, in dem als M_1 bezeichneten Intermediat eingefangen wurden. (S. Kap. 6.2.2). Unter Berücksichtigung der FTIR-Spektren kann man die Röntgenbeugungsdaten also so interpretieren: die beschriebenen Strukturänderungen treten nicht mit dem „reinen“ M-Intermediat (M_1), sondern erst nach dem Übergang zum M_2 -Intermediat auf.

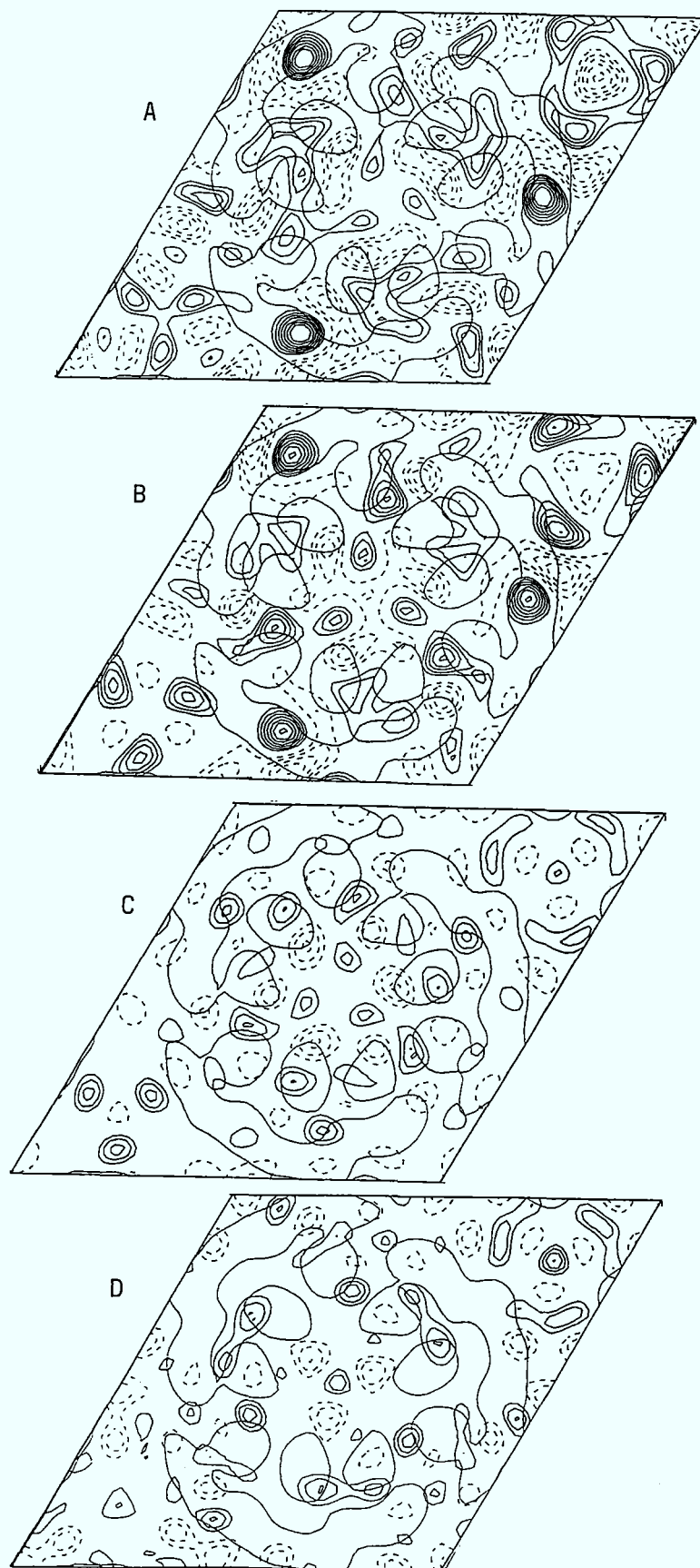


Abb. 19 Fourierdifferenzmaps der Mutante Asp96Asn bei **A)** . 100% r.F., **B)** . 75% r.F., **C)** . 57% r.F., **D)** . 15% r.F.. (—) positive, (---) negative Kontouren. Ebenfalls mit durchgezogener Linie ist der Umriß des BR Moleküls dargestellt.

6.3.2. Röntgenbeugungsexperimente am mit 9-Desmethyl-Retinal regenerierten BR.

Wie im Kapitel 6.2.1 beschrieben, kann man in der hochhydratisierten BR-Probe mit modifiziertem Retinal unter ständiger Belichtung das N-Intermediat anreichern. Da das FTIR-Differenzspektrum dieser Probe die größte Übereinstimmung zu dem in der Literatur beschriebenen N-Intermediat [27] aufweist, sollten Strukturänderungen die sich mit dieser Probe unter den genannten Bedingungen nachweisen lassen eindeutig dem N-Zustand zuzuordnet sein.

Die Röntgenbeugungsmessungen an diesem modifizierten BR, das freundlicherweise von Prof.F.Siebert zur Verfügung gestellt wurde, zeigen nach dem Belichten im Gegensatz zu vergleichbaren Messungen am M-Intermediat kaum Intensitätsveränderungen in den Reflexen. Geringe Intensitätsänderungen sind bei den Reflexen $(2,0)$, $(3,2)$, $(4,1)$ nachweisbar (Abb.20). Ob diese wirklichen Strukturänderungen entsprechen läßt sich nicht abschließend beurteilen, da das Signal-Rausch-Verhältnis des Beugungsmusters dieser Probe nicht groß genug ist. Dies mag an der zur Verfügung stehenden Probenmenge liegen, vielleicht aber auch an der größeren Empfindlichkeit für Strahlenschäden dieser Probe unter Dauerbelichtung. Für die zweite Vermutung spricht, daß der Versuch, mehrere Dunkel-Licht-Zyklen zu messen, erfolglos abgebrochen werden mußte, da bereits nach dem zweiten Zyklus die Intensitäten aller Beugungsreflexe deutlich abnahmen.

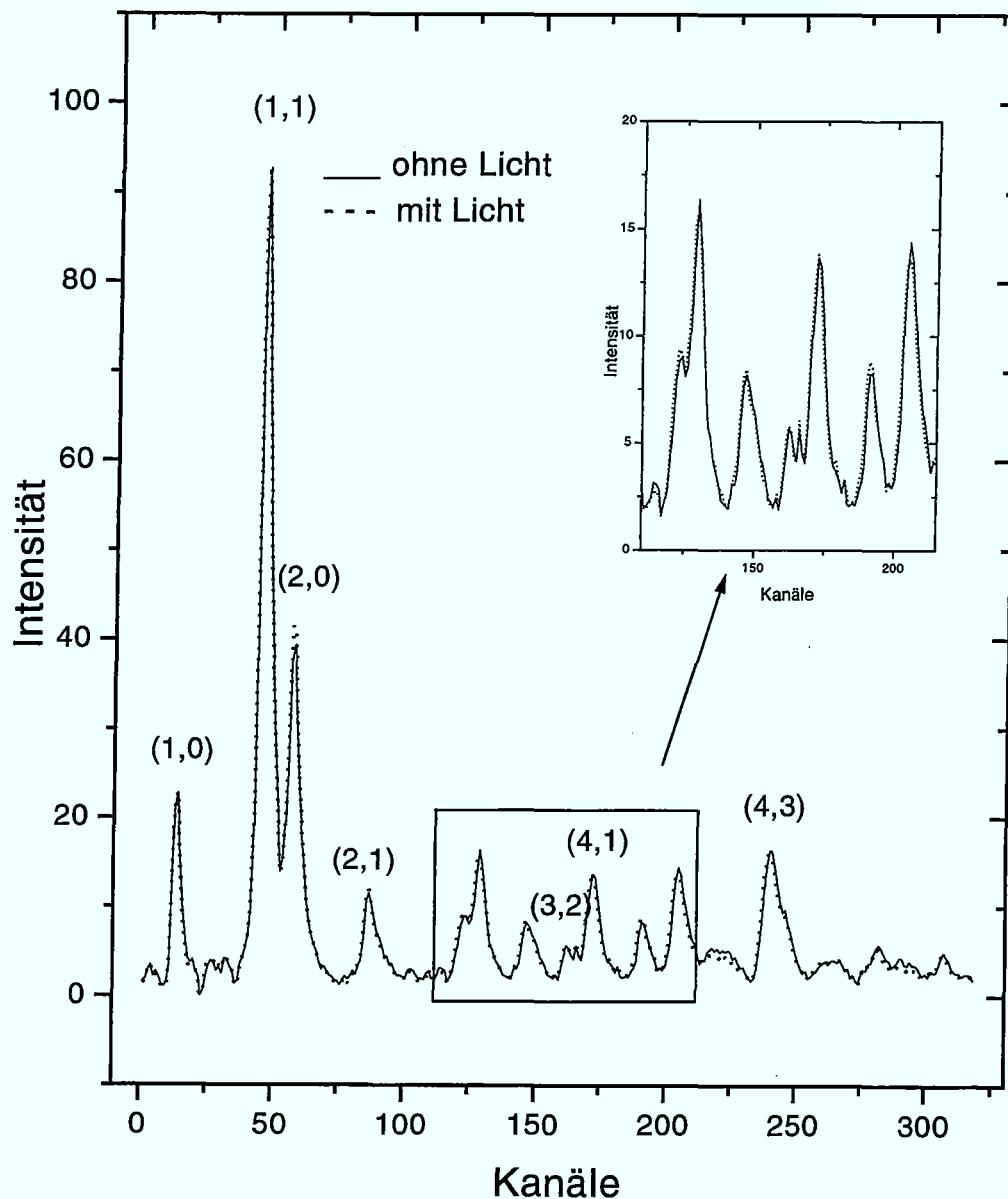


Abb. 20 Röntgenbeugungsbilder des 9-Desmethyl-Retinal BR: lichtadaptiert und unter Dauerlichtbedingungen.

Für das Auftreten zumindest geringer Strukturänderungen im N-Intermediat spricht die Gitterkonstantenänderung, die unter Dauerbelichtung auch bei diesen Messungen nachweisbar ist. Die Gitterkonstante wird um $0.1 \text{ \AA}$ größer.

6.3.3. Statische und zeitaufgelöste Röntgenbeugungsexperimente an den M- und N/O-Intermediaten der BR Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn.

Die Doppelmutante Asp96Asn/Leu93Ala wurde für statische und zeitaufgelöste Röntgenbeugungsmessungen eingesetzt, um die Änderungen der Proteinsstruktur während des zweiten Teiles des BR-Photozyklus zu untersuchen. Wie bereits im Kapitel 6.2.3 beschrieben, kann man durch Inkubation bei niedrigem pH-Wert das N/O-Intermediat unter Dauerlicht einfangen. Der M-Zustand läßt sich durch Inkubation bei pH 9.6 eben so stark verlangsamen, wie bei der zuvor für die Untersuchungen des M-Zustandes verwendete Mutante Asp96Asn. Dies ist besonders vorteilhaft, da es so möglich ist, mit einer Mutante sowohl die Strukturänderungen des M-Zustandes, als auch die der später im Photozyklus auftretenden Intermediate zu untersuchen.

Die statischen Röntgenbeugungsexperimente an der bei pH 9.6 inkubierten Probe belegen durch die deutlichen Intensitätsänderungen der charakteristischen Reflexe (1,0), (1,1), (2,0), (3,2) und (4,1) unter Dauerbelichtung, daß der gleiche M-Zustand wie bei der Mutante Asp96/Asn [43] eingefangen werden kann (Abb.21). Dies zeigt, daß bei der gewählten Probendicke und den vorhandenen Belichtungsbedingungen der Photozyklus so weit angeregt werden kann, daß das für den gewählte pH-Wert charakteristische Intermediat auch akkumuliert wird, d.h. sich die Mehrzahl der Moleküle in der Probe in dem entsprechenden Photozykluszustand befinden.

Die mit pH 5.2 und 4.2 inkubierten Proben, unter ansonsten gleichen Bedingungen gemessen, zeigen diese Reflexintensitätsänderungen weit weniger deutlich, dafür aber die zuvor beschriebene Gitterkonstantenänderungen in dem gleichen Ausmaß wie bei der Probe, die mit pH 9.6 inkubiert worden war (Abb 22). Intensitätsänderungen lassen sich bei den Reflexen (1,0), (1,1), (2,0), (3,2) und (4,1) nachwei-

sen. Die Reflexintensitätsänderungen sind bei der Probe mit pH 4.2 weniger ausgeprägt.

Für die Proben der drei pH-Werte wurde mit den Intensitätsänderungen jeweils eine Fourierdifferenzmap berechnet.

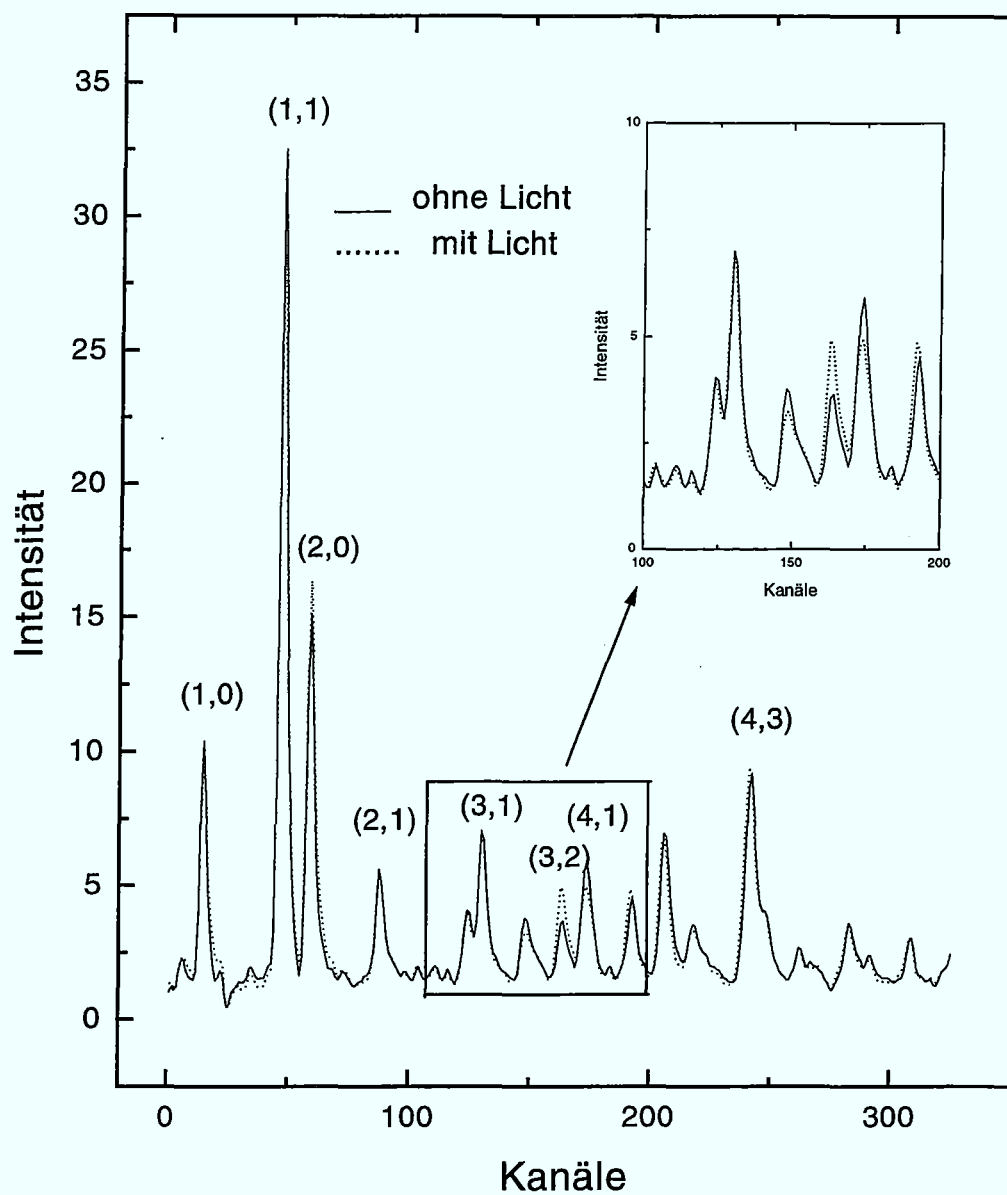


Abb. 21 Röntgenbeugungsbilder der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 9.6: lichtadaptiert und unter Dauerlichtbedingungen.

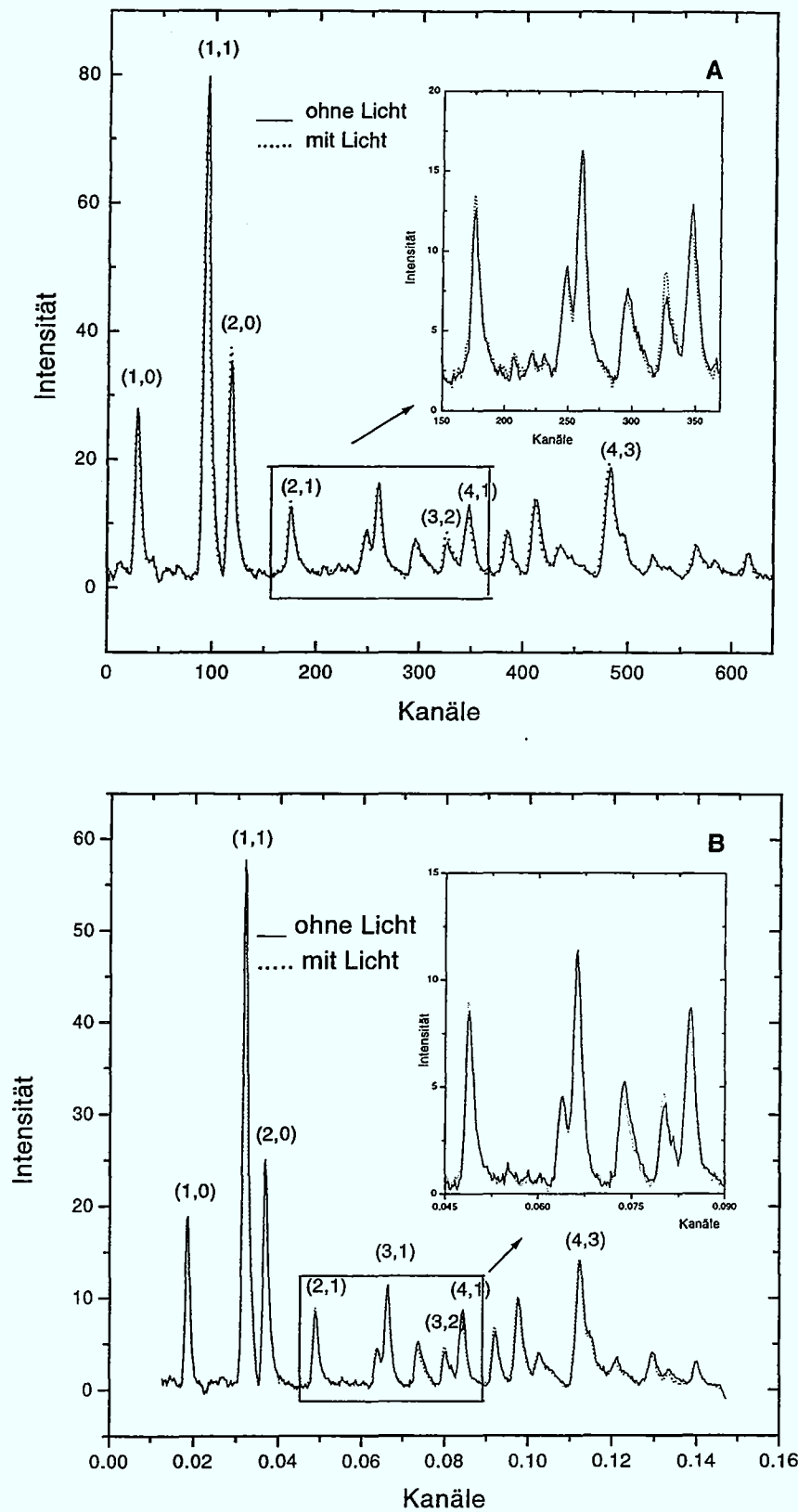


Abb. 22 Röntgenbeugungsbilder der Mutante Leu93Ala/Asp96A lichtadaptiert und unter Dauerlichtbedingungen **A)** . bei pH 5.2 und **B)** . bei pH 4.2.

Diese zeigt für die Probe bei pH 9.6 zusätzlich zu den bekannten Differenzmaxima bei Helix B,F,G ein weiteres deutliches Maximum zwischen Helix C und F. Die Probe bei pH 5.2 weist die gleichen Differenzmaxima auf, nur deren relative Höhen haben sich geändert. Entsprechendes gilt für den pH-Wert 4.2, in diesem Falle sind nur die Maxima noch weniger ausgeprägt (Abb.23).

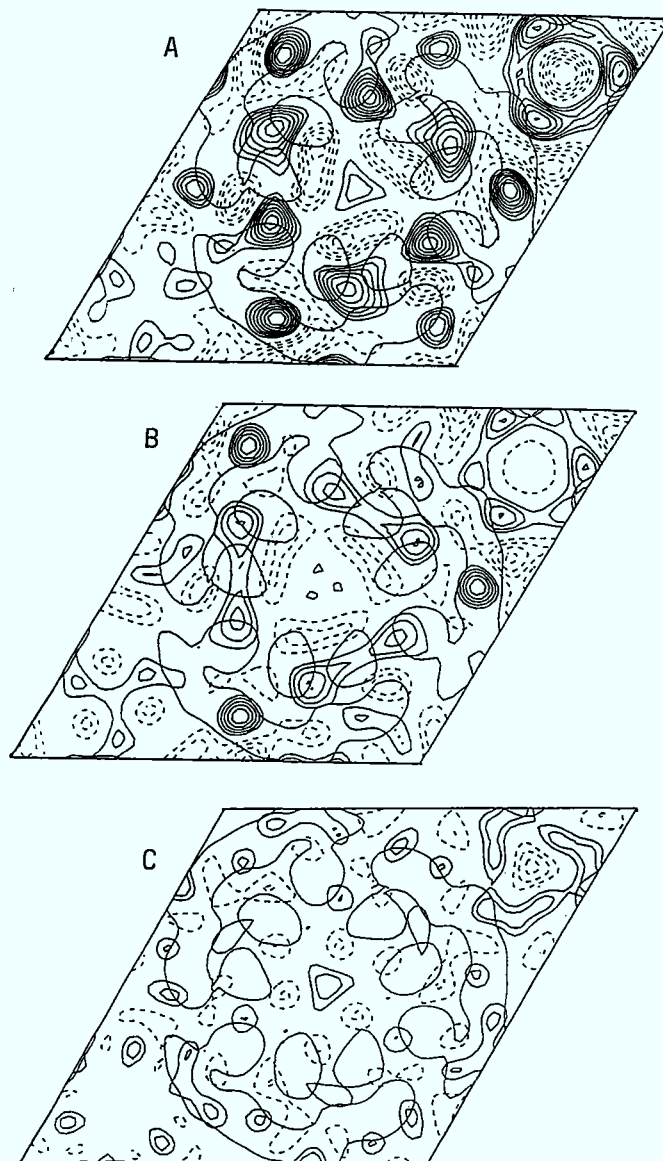


Abb.23 Fourierdifferenzmap der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn **A)**. bei pH 9.6, **B)**. bei pH 5.2 **C)**. bei pH 4.2. (—) positive, (---) negative Konturen. Ebenfalls mit durchgezogener Linie ist der Umriß des BR-Moleküles dargestellt.

Entsprechende Ergebnisse ergaben sich für die zeitaufgelösten Messungen an der Doppelmutter bei pH 9.6, 5.2 und 4.2. Während die zeitabhängigen Intensitätsänderungen der Beugungsreflexen (1,0), (1,1), (2,0), (3,2) und (4,1) im Vergleich zum Fehler bei der Probe mit pH 9.6 sehr deutlich sind, lassen sich bei den zeitaufgelösten Messungen an der Probe bei pH 4.2, wenn überhaupt, dann nur noch sehr geringe zeitliche Änderungen der Reflexintensitäten nachweisen. Für die Probe bei pH 5.2 sind diese Änderungen noch deutlich, aber weit weniger ausgeprägt, als für die Probe bei pH 9.6 (Abb.24, 25 & 26).

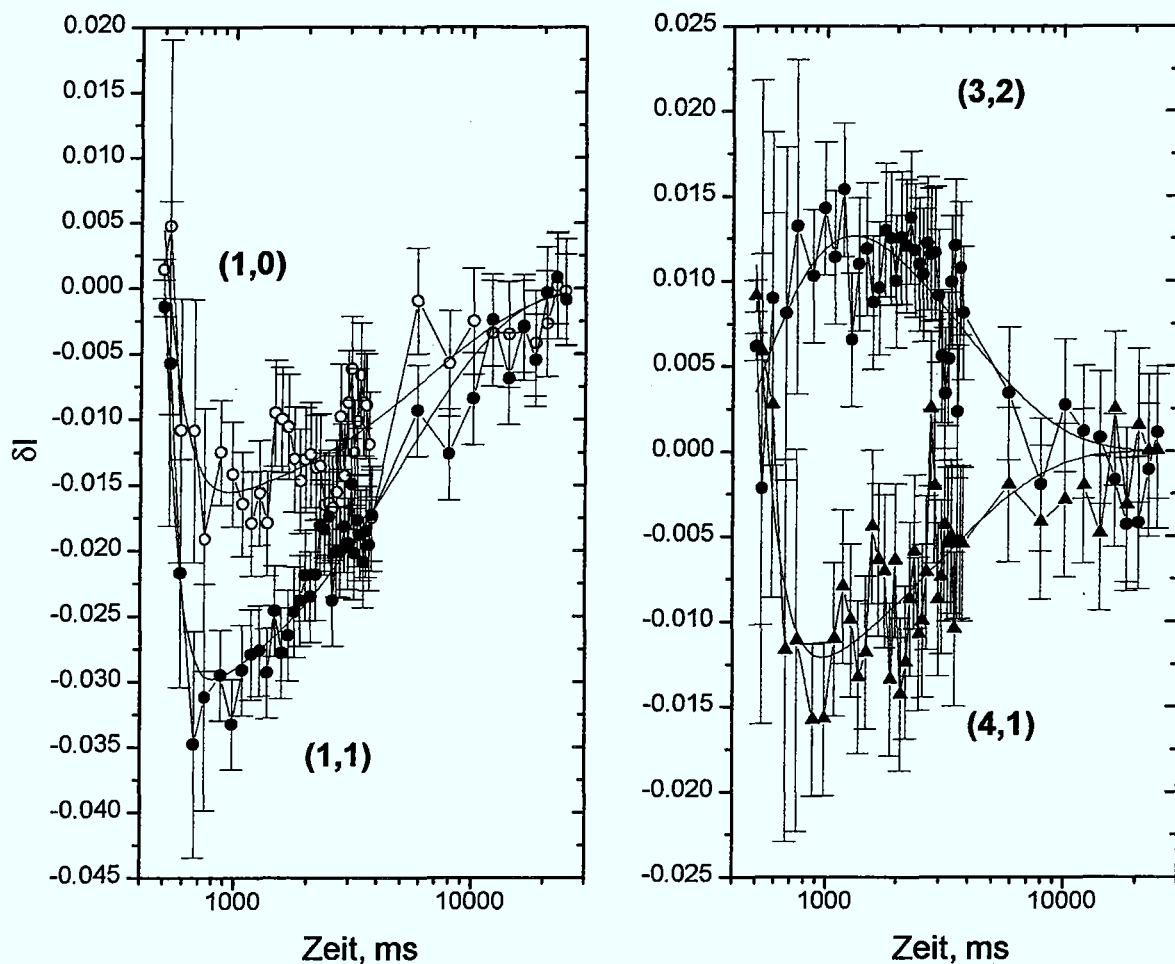


Abb.24 Kinetisches Verhalten der Röntgenbeugungsreflexe (1,0), (1,1), (3,2) & (4,1) der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 9.6.

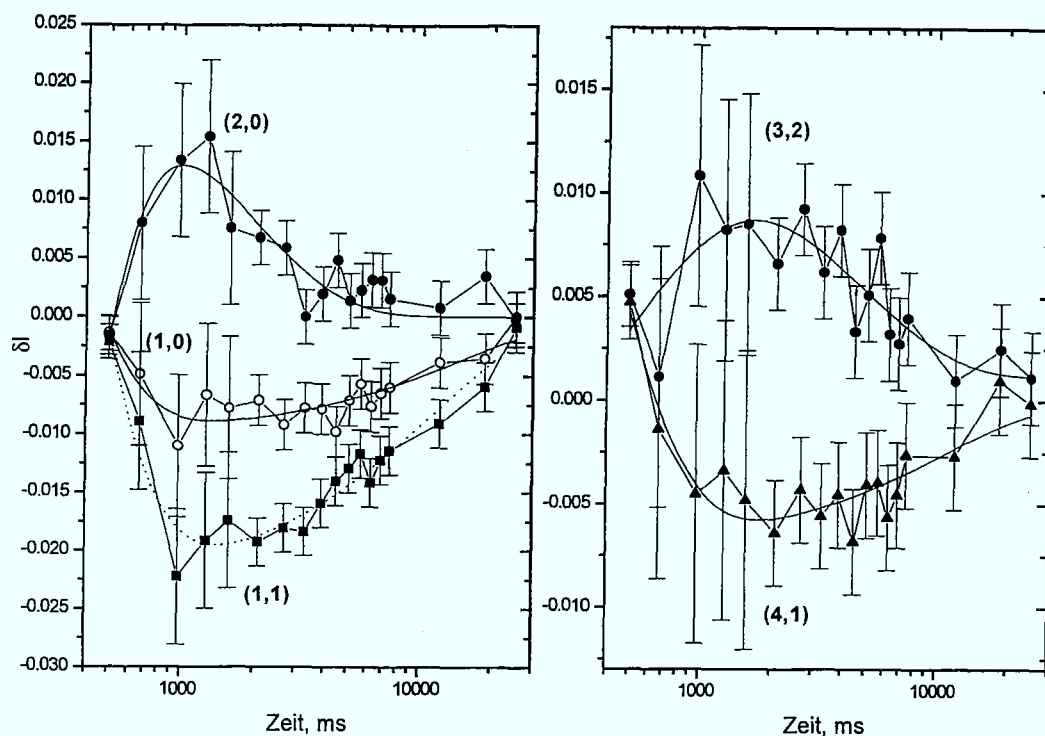


Abb. 25 Kinetisches Verhalten der Röntgenbeugungsreflexe (1,0), (1,1), (2,0), (3,2) & (4,1) der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 5.2.

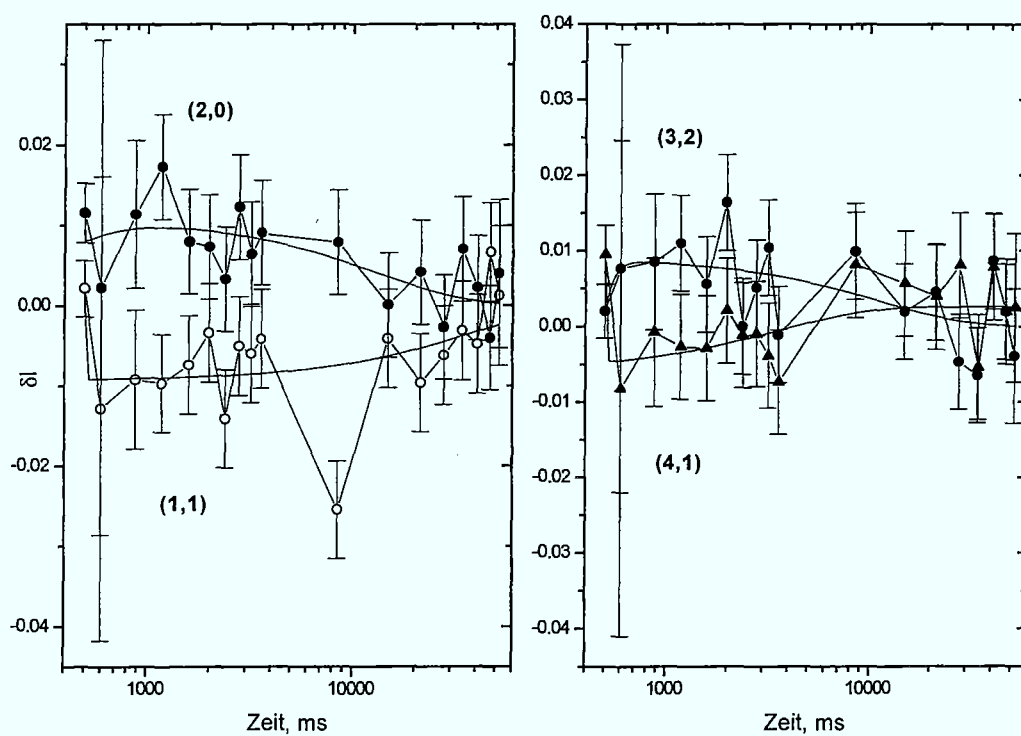


Abb. 26 Kinetisches Verhalten der Röntgenbeugungsreflexe (1,1), (2,0), (3,2) & (4,1) der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 4.2.

Tab.2: Amplituden (δI) und Zeitkonstanten des jeweiligen Fittes an den Zeitverlauf der Intensitätsänderungen einiger Röntgenbeugungsreflexe der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 9.6 und 5.2.

	pH 9.6		pH 5.2	
Reflex	Amplitude	Zeit ±Fehler (ms)	Amplitude	Zeit ±Fehler (ms)
(1,0)	0.02	100 ±34	0.01	203 ±101
	-0.02	6560 ±1475	-0.01	15008 ±3983
(1,1)	0.03	69 ±14	0.02	233 ±62
	-0.03	5246 ±517	-0.02	11326 ±1675
(2,0)	-	-	-0.02	200 ±93
			0.02	1678 ±476
(3,2)	-0.01	346 ±181	-0.01	562 ±521
	0.02	3628 ±1195	0.01	4491 ±2273
(4,1)	0.03	115 ±36	0.01	309 ±103
	-0.01	3138 ±843	-0.01	10923 ±3822

Aus dem kinetischen Verhalten von einigen Beugungsreflexen kann man die Zeitkonstanten, genau wie für OD-Änderungen der FTIR- und UV-Vis-Spektroskopie bestimmen. Die Zeitkonstanten für die Intensitätsänderungen dieser Reflexe sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die unter gleichen Bedingungen gemessenen optische Spektren zeigen den zeitlichen Verlauf der Absorption der ent-

sprechenden Proben (s. Kap.6.3). Die Zeitkonstanten des zeitabhängigen Verhaltens der Absorptionsmaxima bei 410, 540 und 610 nm der dünnen und dicken Proben bei pH 4.2 und 5.2 sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Amplituden (δOD) und Zeitkonstanten des jeweiligen Fittes an den Zeitverlauf der Absorptionsbanden im sichtbaren Spektralbereich der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 4.2 und 5.2.

	pH 4.2				pH 5.2			
	dick		dünn		dick		dünn	
	Amp.	Zeit $\pm$ Fehler (ms)	Amp.	Zeit $\pm$ Fehler (ms)	Amp.	Zeit $\pm$ Fehler (ms)	Amp.	Zeit $\pm$ Fehler (ms)
420 nm	-	-	-	-	0.20	1080 ± 20	0.09	510 ± 40
540 nm	-	-	-0.13	23 ± 1	-	-	-0.05	42 ± 3
			-0.06	1210 ± 66			-0.11	560 ± 10
			-0.09	12900 ± 3000			-0.11	4480 ± 20
620 nm	0.078	123 ± 4	0.022	190 ± 10	-0.03	28 ± 6	-0.02	42 ± 7
	0.113	2100 ± 200	0.045	2400 ± 400	-0.29	810 ± 10	-0.09	409 ± 7
	0.117	12000 ± 6000	0.046	12000 ± 9000	0.24	11020 ± 1000	0.05	11700 ± 100

Der Aufbau des N/O-Intermediates (605 nm) der Probe bei pH 4.2 ist doppel so schnell wie der der Probe bei pH 5.2. Der Zerfall dieses Intermediates erfolgt hingegen bei der Probe bei pH 5.2 etwas schneller als bei pH=4.2 (Abb.27 &

28). Diese Absorptionsänderung, die für das N/O-Intermediat charakteristisch ist, fehlt der Probe bei pH 9.6; dafür läßt sich die zeitliche Veränderung des Absorptionsmaximum bei 410 nm verfolgen. Diese Absorptionsänderung fehlt wiederum der Probe bei pH 4.2 vollständig, tritt aber auch bei pH 5.2 auf.

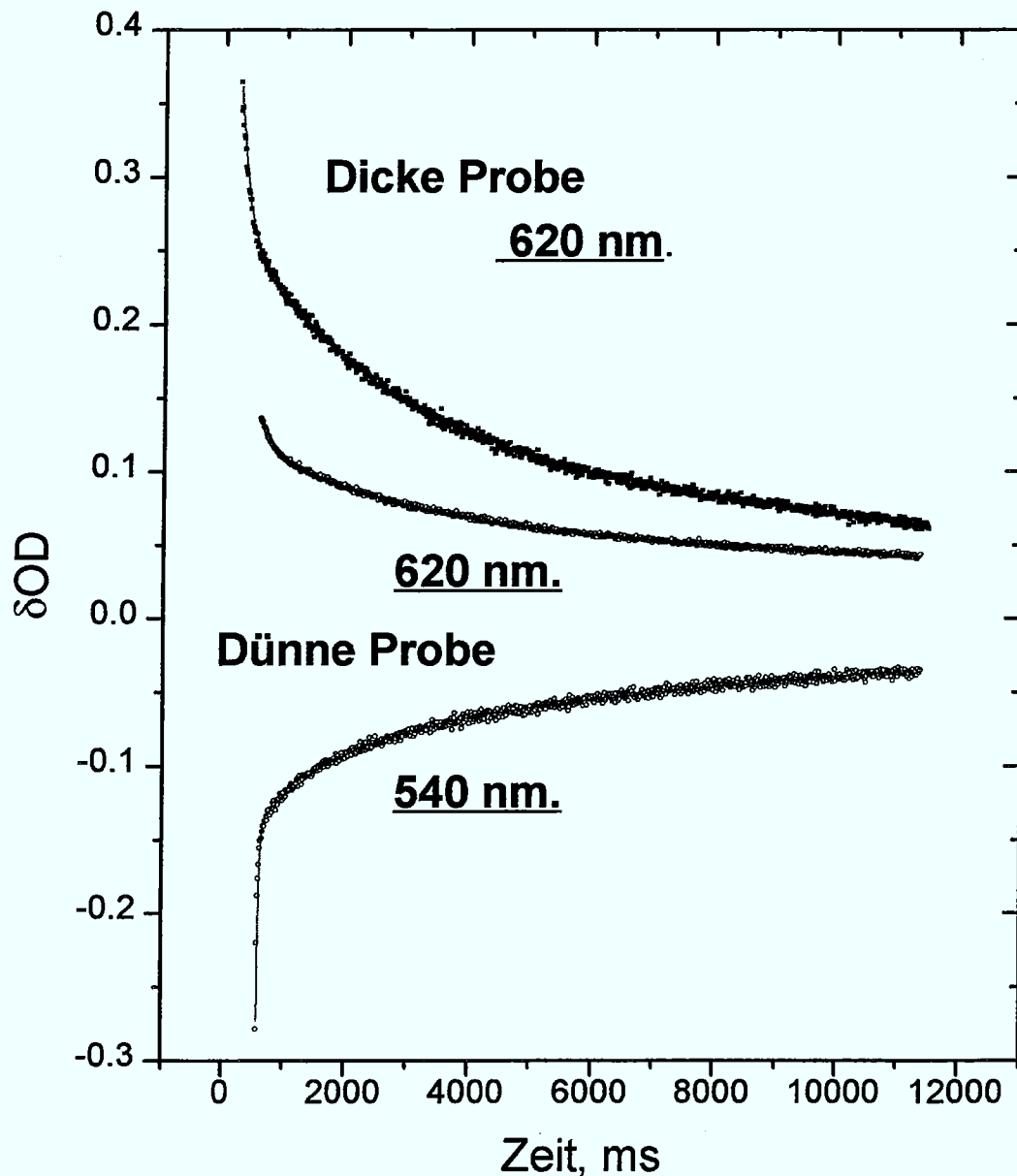


Abb. 27 Kinetisches Verhalten der Absorption der dicken und dünnen Probe der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 4.2.

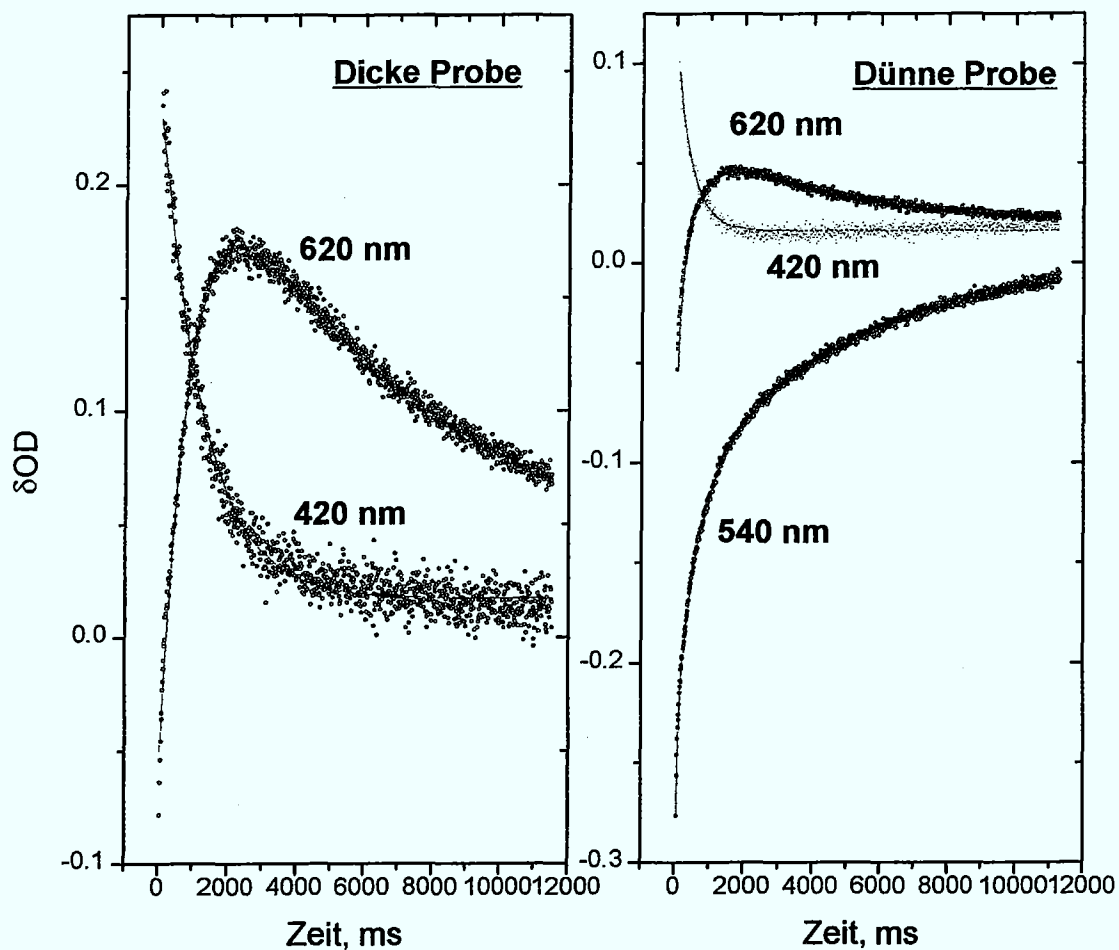


Abb. 28 Kinetisches Verhalten der Absorption der dicken und dünnen Probe der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn bei pH 5.2.

Um die Zuordnung der strukturellen Änderungen zu den spektroskopisch charakterisierten Intermediaten vornehmen zu können, ist es notwendig, die Zeitverläufe aller dieser Messungen miteinander zu vergleichen. Anhand der Kinetik der Intensitätsänderung der Reflexe und der UV-Vis-Messungen sieht man, daß die Strukturänderungen des Proteins (Röntgenbeugungsdaten) unabhängig vom pH-Wert der Probe vor dem Ablauf des Photozyklus, d.h. der vollständigen Relaxation der Absorption bei 540 nm, abgelaufen ist. Die größten Intensitätsänderungen sind immer zeitlich mit dem Auftreten der für den M-Zustand charakteristischen Ab-

sorption bei 410 nm korreliert. Die Abnahme der Absorption bei dieser Wellenlänge ist aber immer schneller, als die Relaxation der Intensitätsänderungen.

Auf Grund der spektroskopischen und Röntgenbeugungsdaten bei unterschiedlichen pH-Werten kann man annehmen, daß die größte Strukturänderung während des Photozyklus mit dem „M-Zerfall“ abgeschlossen ist und für die folgenden Photozyklusintermediate (N & O) nur noch geringe strukturelle Unterschiede zum Grundzustand nachweisbar sind.

6.4. Diskussion.

Auf Grund der vorangegangenen Untersuchungen von Dencher et al. [47,48], Koch et al. [43] und anderen [42,44,45,46] ist nun sicher, daß Strukturänderungen im Protein mit dem Übergang von Grund zum M-Zustand stattfinden. Zu der Frage, ob weitere Strukturänderungen bei anderen Intermediaten des Photozyklus von BR auftreten oder aber die gefundenen Strukturänderungen auch bei späteren Intermediaten noch vorhanden sind, gibt es hingegen keine weiteren Untersuchungen. Nach FTIR-Messungen von Gerwert [66] kann man aber vermuten, daß auch im N-Zustand Strukturänderungen vorhanden sind.

Die M-Zustände.

Spektroskopische Untersuchungen im sichtbaren Spektralbereich [58,59,60] deuten daraufhin, daß der M-Zustand aus zwei oder mehr Unterzuständen besteht. Besonders wichtig für die Interpretation der gefundenen Strukturänderungen ist diese Aufspaltung des M-Zustandes insofern, daß der für den gerichteten Protonentransport notwendige irreversible Schritt zwischen dem M_1 und M_2 -Zustand liegen soll [58,65,67]. Auf Grund dieser Untersuchungen ist es von Interesse festzustellen, ob die in den vorangegangenen Experimenten gefundenen Strukturänderungen dem M_1 - oder M_2 -Zustand zu zu-

ordnen sind. Neuere FTIR-Untersuchungen des M-Zustandes von Perkins et al. [18] haben gezeigt, daß es zwei M-Intermediate gibt, die sich durch kleine Änderungen im Amid I Bereich unterscheiden. Diese Intermediate wurden entsprechend den früheren Veröffentlichungen M_1 und M_2 genannt.

Die Untersuchungen zum M_1 - und M_2 -Zustand.

Nach Perkins et al. [18] läßt sich durch Abkühlen der BR-Wildtyp Probe auf 240 K der M_1 -Zustand einfangen. Durch unsere Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß auch Proben, die trockener als 75% r.F. sind ein ähnliches Bandenmuster im Amid I Bereich (Bande bei 1660 cm^{-1} größer als bei 1670 cm^{-1}) zeigen. Die Röntgenbeugungsexperimente an diesen trockenen Proben zeigen unter Dauerlicht im Diffraktionsmuster vor allem nicht mehr die charakteristischen Änderungen der Reflexe (3,2) und (4,1).

Der M_2 -Zustand, der sich bei 260 K einfangen läßt, ist nach Perkins et al. [18] durch eine ausgeprägtere Bande bei 1670 cm^{-1} charakterisiert. Ein entsprechendes Amid I Bandenmuster konnten wir für die Asp96Asn Proben nachweisen, die bei einer höheren Luftfeuchtigkeit als 75% r.F. inkubiert worden sind. Diese Experimenten ergaben außerdem, daß die Abnahme der 1660 cm^{-1} Bande mit der Zunahme der Feuchtigkeit in den Proben korreliert ist. Ebenso verändert sich mit der Feuchtigkeit das Maximum im Amid II Bereich. Beugungsexperimente an Proben, die bei Feuchtigkeiten von mehr als 75 % r.F. inkubiert worden waren, zeigen nach der Belichtung ein Diffraktionsmuster mit den bekannten deutlichen Intensitätsänderungen.

Die gefundenen Ergebnisse der Diffraktionsexperimenten unter Berücksichtigung der FTIR-Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die bekannten Strukturänderungen, die dem M-Übergang zugeschrieben werden, tatsächlich aber erst mit dem Übergang zum M_2 -Intermediat auftreten. Daß dieses Ergebnis nicht nur für die BR-Mutante Asp96Asn gilt, sondern

auch für den BR-Wildtype, läßt sich dadurch belegen, daß die gleichen Änderungen im Amid I Bereich in der Mutante Asp96Asn und im Wildtype BR auftreten. Somit kann dies nicht ein Effekt sein, der auf Grund der Mutation oder dem hohen pH-Wert auftritt.

Daß der Übergang vom M_1 - zum M_2 -Zustand ein entscheidender Schritt während des Photozyklus ist, demonstrieren auch die funktionellen Messungen von G. Thiedemann [57]. Diese haben gezeigt, daß ein Wassergehalt in der Probe entsprechend der Luftfeuchtigkeit von mindestens 75% r.F. vorhanden sein muß, damit BR Protonen pumpen kann. Bei einer Feuchte von 57% r.F. war kein Protonpumpen nachweisbar [57]. Bei geringerem Wassergehalt kann nicht die Deprotonierung der Schiff'sche Base, d.h. die Protonierung von Asp 85, der limitierende Schritt für das Protonenpumpen sein. Die für den M-Zustand charakteristische Gelbfärbung trat auf.

Ebenso zeigen unsere FTIR-Messungen bei diesen trockenen Proben, daß die Protonierung von Asp85 im Differenzspektrum deutlich nachweisbar ist und auch deutliche Banden bei 1640 und 1626 cm^{-1} , die für die Deprotonierung der Schiff'schen Base charakteristisch sind.

Faßt man die Ergebnisse zusammen, so kann man nur schlußfolgern, daß die Freisetzung des Protons auf der extrazellulären Seite nicht gleichzeitig mit der Deprotonierung der Schiff'schen Base erfolgt. Vielmehr muß nach unseren Ergebnissen die Freisetzung des Protons, d.h. der aktuelle Pumpvorgang, erst nach der Strukturänderung, d.h. mit dem Übergang von M_1 zu M_2 , erfolgen.

Diese Schlußfolgerung ist im Widerspruch zur Annahme [59], daß die extrazelluläre Seite des Protonkanals offen ist und das Proton sofort mittels einer Änderung des Wasserstoffbrückensystems des im Kanal enthaltenen Wassers,

von einer noch nicht bestimmten Aminosäure freigesetzt werden soll, nach dem Asp85 protoniert ist.

Nimmt man weiterhin an, daß die Protonenfreisetzung durch die Änderung des Wasserstoffbrückensystems vermittelt wird, so besagen unsere Ergebnisse aber, daß dieses System nicht alleine durch die Protonierung von Asp85 verändert wird, sondern eine Konformationsänderung im Protein notwendig ist. Oder aber andererseits daß das postulierte Wasserstoffbrückensystem gar nicht für die Freisetzung des Protons nötig ist, sondern allein die Konformationsänderungen des Proteins, die die Wechselwirkung der Aminosäuren so verändert, daß die Freisetzung des Protons erfolgt.

Möglicherweise tritt auch schon im M_1 -Intermediat eine Strukturänderung im Protein auf. Das Beugungsdiagramm der trockenen Probe (57% r.F.) weist nach der ersten Belichtung noch Intensitätsunterschiede zum Beugungsdiagramm der lichtadaptierten Probe auf. Diese Intensitätsänderungen sind klein im Vergleich zu den Proben mit einem höheren Wassergehalt.

In der Fourierdifferenzmap resultieren diese Intensitätsänderungen in Differenzmaxima, die auf einige Strukturänderungen vor allem in den Bereichen der Helix B, der Helix C und bei Helix F hindeuten. Das Differenzmaximum bei Helix F ist in diesem Fall in Richtung von Helix C verschoben, im Gegensatz zum charakteristischen Differenzmaximum der feuchten Proben. Die Differenzmaxima der trockenen Probe sind nur etwa halb so groß wie bei den feuchten Proben, somit spiegeln sie geringere Strukturänderungen wider. Auf Grund des schlechteren Signal-Rausch-Verhältnisses der Beugungsdiagramme dieser Probe im Vergleich zu den feuchteren Proben und der geringeren Intensitätsänderungen ist dieser Befund aber nicht so sicher wie die zuvor beschriebenen [43]. Interessant ist aber, daß diese Strukturänderungen nur nach der ersten Belichtung der Probe auftrat und selbst nach 15 Minuten noch nicht zum Grundzustand relaxiert ist.

Betrachtungen zum M_N -Zustand.

Unter Dauerbelichtung zeigt die mit GuaHCl inkubierte Probe des Wildtypes ebenfalls wie die Mutante Asp96Asn einen erheblich verlangsamten M-Zerfall [47,48]. Der unter diesen Bedingungen eingefangene M-Zustand unterscheidet sich nach den FTIR-Daten (Abb.13) von den zuvor beschriebenen M_1 - und M_2 -Intermediaten. Durch die Inkubation mit GuaHCl erhält man offensichtlich ein reines M_N -Intermediat [19] (ohne Anteile des M-Intermediates).

Für dieses Intermediat ist charakteristisch, daß im Amid I und Amid II Bereich des Differenzspektrums die größten Änderungen des Photozyklus im Vergleich zum Grundzustand auftreten, wie ansonsten für das N-Intermediat bei hochhydratisierten Proben beschrieben [37].

Ebenso ist bereits die Bande des protonierten Asp85 von 1761 nach 1756 cm^{-1} verschoben, welches eine Umgebungsänderung für Asp85 andeutet, die für das N-Intermediat bezeichnend ist. Außerdem ist deutlich eine negative Bande bei 1742 cm^{-1} sichtbar, welches für das deprotonierte Asp96 charakteristisch ist.

Alle Anzeichen, die auf eine Reprotonierung der Schiff'schen Base in Differenzspektrum hindeuten (1640, 1400, 1188 cm^{-1}) fehlen hingegen und schließen somit aus, daß das N-Intermediat unter dieser Bedingung eingefangen wurde.

Diese Ergebnisse sind Grundlage für folgendes Modell: die Wirkung des GuaHCl bei hoher Feuchtigkeit besteht darin, daß Asp96 zwar noch deprotoniert wird, das Proton aber nicht zur Schiff'schen Base gelangen kann. Möglicherweise kann das Guanidinium im zytoplasmatischen Protonenkanal eindringen und dort das Proton vom Asp96 „wegfangen“. Als Folge davon kann der Photozyklus bis zum M_2 -Zustand ungestört ablaufen. Die für den Übergang zum N-Zustand notwendige Reprotonierung der Schiff'schen Base erfolgt hingegen nicht mehr. Alle mit dem M_2 -Intermediat verbundenen Struk-

Strukturänderungen sind deutlich ausgeprägt, beziehungsweise sind die Änderungen im Amid I und Amid II Bereich noch deutlicher ausgeprägt, als für das M₂-Intermediat beschrieben.

Somit sind alle, nach den Diffraktionsdaten für das M-Intermediat und nach den FTIR-Daten für das N-Intermediat, postulierten Strukturänderungen bereits vor dem Übergang zum N-Intermediat deutlich nachweisbar.

Untersuchungen an der Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn.

Um zu überprüfen, ob nach dem Übergang von M- zum N-Intermediat noch weitere Strukturänderungen auftreten, bzw. die bekannten Strukturänderungen noch im N- oder O-Zustand erhalten sind, wurden Untersuchungen an der Mutante Leu93Ala/Asp96Asn durchgeführt. Diese Mutante soll nach den Angaben von Tittor et al. (1994) [28] einen langlebigen „O“-Zustand bei einer Proben­temperatur von 45°C, bzw. einen langlebigen N-Zustand bei einer Proben­temperatur von 22°C aufweisen, ähnlich wie zuvor für die Mutante Leu93Ala von Subramaniam et al. (1991) [7] beschrieben.

Die Doppelmutante hat bezüglich unserer Untersuchungen den Vorteil, daß mit dieser Probe bei pH 9.6 auch ein verlangsamer M-Zerfall beobachtet werden kann. Somit sollte es mit dieser Mutante möglich sein erst die Strukturänderungen in M-Zustand zu untersuchen (Inkubation bei pH 9.6) und bei einer entsprechenden Probe, die mit einem tieferen pH-Wert inkubiert worden ist (N-, N/O-Zustand), zu kontrollieren, ob noch die gleichen, andere oder gar keine Strukturänderungen nachweisbar sind. Besonders vielversprechend in Hinblick auf die Untersuchung der späteren Photozyklus-intermediate erwies sich, daß mit diesen Proben (pH 5.2) zeitaufgelöste Messungen möglich waren, bei denen direkt nach der Lichtblitzanregung des Photozyklus der M-Zustand deutlich ausgeprägt war. Dieser M-Zustand zerfiel in ca.

einer Sekunde begleitet von dem Aufbau des N/O-Intermediates.

Zur Charakterisierung der Doppelmutantenproben wurden zunächst FTIR- und UV-Vis-Untersuchungen durchgeführt, die ergaben, daß sich der M-Zustand durch Inkubation bei pH 9.6, der „O“-Zustand bei Raumtemperatur durch Inkubation mit pH 4.2 und ein M-N-O-Zustand bei Raumtemperatur durch Inkubation mit pH 5.2 einfangen läßt.

Diese Messungen wurden an Filmen der Doppelmutante durchgeführt, zeigen aber das gleiche Verhalten, wie Messungen an der entsprechenden Doppelmutante in Lösung (persönliche Mitteilung von S. Verclas und Prof. N. A. Dencher). Der Unterschied in den Bedingungen, unter welchen das N-, bzw. das „O“-Intermediat akkumuliert, im Vergleich zu den Angaben von Tittor et al. [28], liegt also nicht darin begründet, daß wir Filme der Doppelmutante für unsere Untersuchungen verwendeten.

Es zeigte sich bereits bei den Vorversuchen, daß gerade im mittleren pH-Bereich (pH 5.2) das Gleichgewicht zwischen den M-, N- und O-Intermediaten deutlich vom Wassergehalt und der Temperatur in der Probe abhängt.

Im folgenden soll näher auf die einzelnen Intermediate (pH-Werte, bei denen die Untersuchungen durchgeführt wurden) der Doppelmutante eingegangen werden.

Der M-Zustand der Doppelmutante.

Die statischen Messungen am M-Zustand der Doppelmutante (pH 9.6) ergaben keine deutlichen Unterschiede zu den Ergebnissen der BR Mutante Asp96Asn, abgesehen von einer Verschiebung der Absorptionsbanden zu kürzeren Wellenlängen (Grundzustand 540 nm). Das FTIR-Spektrum weist wiederum die charakteristischen Amid-Banden für den M₂-Zustand auf. Das UV-Vis-Spektrum zeigt ein deutliches Absorptionsmaximum bei 405 nm und ein Verschwinden des Absorptionsmaximums des Grundzustandes (540 nm) unter Dauerbelichtung.

Die Beugungsdiagramme weisen nach Belichtung Intensitätsänderungen in den für den M-Zustand charakteristischen Reflexen (1,0), (1,1), (2,0), (3,2) & (4,1) auf. Die Berechnung der Fourierdifferenzmap mit diesen Intensitätsänderungen ergab, trotz der große Ähnlichkeit zu den Änderungen in den Reflexen der Mutante Asp96Asn, gewisse Unterschiede in der Verteilung der Differenzmaxima. Es zeigten sich die bekannten positiven Maxima bei Helix G und F [11, 43], *zusätzlich aber ein deutliches Maximum bei Helix B, welches zuvor hauptsächlich bei Wildtyp BR inkubiert mit GuaHCl nachgewiesen worden war [48] und ein kleineres aber sehr deutliches Maximum zwischen Helix C, D und F, welches zuvor noch nicht so deutlich für den M-Zustand beobachtet worden war.*

Da bei Helix C dieser Fourierdifferenzmaps zusätzlich ein deutliches Minimum auftritt, scheint bei der Doppelmutante im M-Zustand zusätzlich Helix C, oder ein Teil von dieser Helix in Richtung von Helix F gekippt zu sein. Somit scheint durch das Entfernen der Aminosäure Leucin in Position 93 (Helix C) die Flexibilität des Moleküls erhöht zu sein. Dieses könnte auch die Erklärung dafür sein, daß diese Doppelmutante bei den anderen pH-Werten einen verlangsamten Zerfall der nachfolgenden Intermediate aufweist, und zwar in dem die zusätzliche Verkipfung von Helix C bei niedrigeren pH-Werten langsamer relaxiert als die üblichen Strukturänderungen, und somit das Erreichen des Grundzustandes verlangsamt.

Die zeitaufgelöste Betrachtung des M-Zustandes.

Die kinetischen Messungen des M-Zustandes zeigen schon deutlichere, wenn auch „kleine“ Unterschiede zum Verhalten der Mutante Asp96Asn.

Bei den zeitabhängigen FTIR-Messungen sieht man neben der Amid I Bande bei 1670 cm^{-1} in den ersten Zeitschritten eine deutliche Schulter bei 1660 cm^{-1} , was darauf hindeutet,

daß kein reiner M_2 -Zustand vorliegt, eher eine Mischung aus M_1 und M_2 .

Ebenso lassen sich an Hand der zeitaufgelösten UV-Vis-Messungen Hinweise für einen verlangsamten Übergang von M_1 zu M_2 finden. Der isosbestische Punkt zwischen den Absorptionsmaxima bei 405 und 540 nm verändert seine Lage während der ersten Zeitschritte des M-Zerfalls. Diese Änderung ist in Übereinstimmung mit dem Übergang vom M_1 - zum M_2 -Zustand, da nach Zimanyi et. al. [65] gerade für die Mutante Asp96Asn ein Wellenlängenunterschied von ca. 5 nm für die Absorptionsbande bei 410 nm nachgewiesen worden ist.

Diese Ergebnisse erklären das Zeitverhalten der Intensitätsänderungen von den zeitabhängigen Röntgenbeugungsmessungen. *Die charakteristischen Reflexänderungen treten bei dieser Mutante nicht sofort nach der Blitzlichtanregung auf, sondern man kann regelrecht den Aufbau der Intensitätsänderungen verfolgen. Dieser ist, unterschiedlich für die einzelnen Reflexe, nach ca. 0.7 bis 1.4 Sekunden abgeschlossen. Der Zeitrahmen, in dem sich die Verschiebung des isosbestischen Punktes bei den UV-Vis-Messungen nachweisen läßt, ist von der gleichen Größenordnung.*

Die Veränderung im Amid I Bereich der FTIR-Messung ist langsamer, was aber leicht damit zu erklären ist, daß die Probe wahrscheinlich etwas trockener war, als die für die übrigen Messungen.

Bemerkenswert bezüglich der Intensitätsänderungen der Röntgenbeugungsreflexe ist außerdem, daß *der Zerfall der Intensitätsänderungen nicht mit der gleiche Zeitkonstante für alle Reflexe erfolgt*. Dies ist im Widerspruch zu den ursprünglichen Messungen von Koch et al. [43], aber durchaus verständlich, wenn man davon ausgeht, daß es nicht nur eine strukturelle Änderung gegenüber dem Grundzustand gibt. Dies würde dann bedeuten, daß das BR zwischen dem M_2 - und dem Grundzustand noch eine zusätzliche Konformation an-

nimmt, die sich sowohl vom M-Zustand als auch vom Grundzustand unterscheidet.

Weiterhin zeigen diese zeitaufgelösten Röntgenbeugungsexperimente auch zum ersten mal, daß die bereits bekannte *Gittervergrößerung sich mit einer ähnlichen Zeitkonstante aufbaut, wie die Intensitätsänderungen der Reflexe*. Die Relaxation der Gitteränderung erfolgt mit einer Zeitkonstante von ca. 3 Sekunden, welches den schnelleren Zerfallszeiten der Intensitätsänderungen entspricht. Somit erfolgt die Gitterkonstantenänderung erst mit dem Übergang vom M_1 - zum M_2 -Zustand, *relaxiert aber bevor die ursprüngliche BR-Struktur des Grundzustandes erreicht wird*.

Der „M-N-O“-Zustand der Doppelmutante.

Ebenso, wie die Doppelmutantenprobe bei pH 9.6, wurde die Probe bei 5.2 zunächst statisch untersucht. Dabei zeigte sich, daß bei diesem pH-Wert der Zustand, der eingefangen werden kann, sehr stark vom Wassergehalt der Probe abhängt. So reichte die Spanne der Zustände von reinem M, detektierbar bei trockenen Proben sowohl mit FTIR-, als auch mit UV-Vis-Spektroskopie, bis zu einem reinen N/O-Zustand, bei extrem feuchten Proben. Dazwischen ließen sich natürlich auch alle Mischzustände unter Dauerlichtbedingungen „einfangen“. Als Kriterium dafür, welcher Zustand eingefangen wurde dienten im sichtbaren Spektralbereich die Absorptionsbande bei 405 nm und bei den FTIR-Spektren vor allem die Retinalbanden (1188, 1525, 1533 cm^{-1}).

Somit ist für die Interpretation der statischen Röntgenbeugungsmessungen von besonderer Bedeutung, ob die Probe tatsächlich bei 100% r.F. untersucht wurde. Diese Bedingung stellt aber trotzdem nicht sicher, daß unter den experimentellen Bedingungen ein reiner N/O-Zustand eingefangen wird. Leider kann die Probe, die für diese Beugungsexperimente verwendet wurde, nicht durch spektroskopische Messung kontrolliert werden, denn um ein Beugungsdiagramm mit einem

gutem Signal-Rausch-Verhältniss zu erhalten, ist eine Probendicke notwendig, die mindestens OD 3 entspricht. Diese Tatsache beinhaltet auch die Schwierigkeit, daß man nicht sicher sagen kann, ob die Probe wirklich durch die Dauerbelichtung in den gewünschten Zustand gebracht werden konnte. Im Gegensatz zu den Proben, die für die Untersuchung des M-Zustandes verwendet wurden, kann man wegen des Abschirmungseffektes (ähnliche Absorptionsbanden) bei der Untersuchung des N/O-Zustandes nicht ohne weiteres davon ausgehen, daß das Anregungslicht alle BR-Moleküle der Probe erreicht.

Trotz dieser Unsicherheiten wurden statischen Beugungsexperimenten durchgeführt. Das Röntgenbeugungsdiagramm zeigt auch für die Reflexe die für das M-Intermediat charakteristisch sind $((1,0), (1,1), (2,0), (3,2), (4,1))$, Änderungen, wenn auch weniger deutlich ausgeprägt. Zusätzlich sind aber auch noch Intensitätsänderungen bei den Reflexen $(2,1)$ und $(4,3)$ deutlich feststellbar, die im Verhältnis zu den charakteristischen M-Reflexänderungen bei dieser Probe deutlicher sind, als für den M-Zustand zu erwarten wäre. Dieses deutet daraufhin, daß die gefundenen Intensitätsänderungen nicht einem reinen M-Zustand entsprechen, sondern eher einem späteren Photozyklusintermediat oder einer Mischung der M-, N- und N/O-Zustände.

Die Fourierdifferenzmap, der für diese Probe gemessenen Intensitätsänderungen, zeigt hauptsächlich Differenzmaxima an den bereits für den M-Zustand beschriebenen Positionen. Verändert hat sich aber die relative Höhe der Differenzmaxima zu einander. So bleibt das größte Differenzmaximum bei Helix G, während dasjenige bei Helix F weniger deutlich ausgeprägt ist und jenes bei Helix B noch geringer im Verhältnis zum Maximum bei Helix G. Das für die Doppelmutante charakteristische Maximum bei Helix C hat hingegen ungefähr die gleiche relative Höhe, wie für den M-Zustand charakteristisch ist, auch wenn in diesem Falle dieses Maximum eine

geringere Ausdehnung aufweist. Das dazugehörige Minimum ist hingegen geringer ausgeprägt.

Somit kann man für den bei diesem Experiment eingefangenen Zustand annehmen, daß Helix C etwas weniger verkippt ist. Die Veränderung bei Helix B ist bereits am deutlichsten zum Grundzustand relaxiert, während die Änderungen bei Helix G eben so deutlich sind, wie bei dem M-Zustand. Ob es sich bei diesen Änderungen um solche für den N- oder N/O-Zustand charakteristische Strukturunterschiede zum Grundzustand handelt, oder aber um einen Mischzustand, kann nicht entschieden werden.

Die kinetische Betrachtung des Überganges vom M- zum N/O-Zustand.

Zur Klärung der Frage, welche strukturellen Änderungen noch für den N-, bzw. N/O-Zustand zu erwarten sind, sollten die kinetischen Beugungsexperimente beitragen. Anhand von kinetischen FTIR-Messungen ließ sich zeigen, daß bei feuchten Proben in den ersten Zeitschritten nach der Blitzlichtanregung die für den M-Zustand charakteristischen Banden vorhanden sind, die dann mit der Zeit eine für den N/O-Zustand charakteristische Änderung aufweisen, vor allem deutlich in den Wellenzahlbereichen: 1188, 1525, 1533 cm^{-1} (Retinal) und 1398 cm^{-1} (Reprotonierung der Schiff'schen Base).

Entsprechende Messungen im sichtbaren Wellenlängenbereich zeigen auch, daß für Proben bei pH 5.2 der M-Zustand zeitlich vom N/O-Zustand getrennt auftritt. Somit kann man annehmen, daß bei einer Blitzlichtanregung auch wirklich alle BR-Moleküle aktiviert werden, analog zu den Experimenten am M-Zustand. Man kann also davon ausgehen, daß die Strukturänderung, die zu einer späteren Zeit nach der Anregung feststellbar sind, nicht mehr dem M-Zustand entsprechen, sondern nachfolgenden Intermediaten.

Es wurden zeitaufgelöste UV-Vis-Messungen, sowohl an der dicken Probe (OD 4), die für zeitaufgelöste Röntgenbeugungs-

experimente verwendet wurden, als auch an einer dünneren Probe (OD 0.8) in der gleiche Halterung (annähernd gleiche Bedingungen) durchgeführt. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, nach welcher Zeit der M-Zustand in dieser Probe zerfallen ist und der durch die Absorption bei 605 nm charakterisierte N/O-Zustand maximal ausgeprägt ist.

Die UV-Vis-Messung an der dünneren Probe wurde durchgeführt, um die Kinetik der Photozyklusintermediate in allen Wellenlängenbereichen genauer messen zu können, unter der Annahme daß die Kinetik auch für die dickere Probe entsprechende Zeitkonstanten aufweist. Wie sich aber durch die Messungen an der dicken Probe bei den Wellenlängen, die einer vernünftigen Messung zugänglich waren (423 nm und 614 nm), herausstellte, ist dies nicht der Fall. Der M-Zerfall ist in der dicken Probe doppelt so langsam, wie in der dünnen. Entsprechendes gilt für die Kinetik des N/O-Zustandes. Also kann man feststellen, daß die parallele Messung an einer dünneren Probe nicht immer geeignet ist um eine Kontrolle für das Verhalten der für die Beugungsexperimente eingesetzten Probe darzustellen. Das qualitative Verhalten beider Proben ist aber identisch. Also können die unterschiedlichen Kinetiken nur ein Ausdruck des unterschiedlichen Wassergehaltes in der Probe sein.

In Übereinstimmung mit UV-Vis-Messungen (dickere Probe) ist das zeitliche Verhalten der Intensitätsänderungen der Beugungsreflexe. *Wie bei der Messung am reinen M-Zustand (pH 9.6), konnte auch bei dieser Probe der Aufbau der Intensitätsänderungen zeitlich verfolgt werden.* Dieser ist nach 500 bis 600 ms abgeschlossen. Im gleichen Zeitbereich hat nach den UV-Vis-Messungen die anfängliche Absorption bei 432 nm um ca. 40% abgenommen. Ob diese Abnahme des M-Zustandes den Abschluß des Überganges vom M_1 - zum M_2 -Intermediat darstellt, kann nur vermutet werden. Die optischen Daten dieser Messung geben wiederum den indirekten Hinweis auf einem Übergang von M_1 zu M_2 in Form des Auftretens der

Veränderung des isosbestischen Punktes zwischen den Absorptionsmaxima bei 405 und 540 nm.

Während der Aufbau der Intensitätsänderung der Reflexe mit einer vergleichbaren Zeitkonstante erfolgte, ist die Zerfallszeit sehr unterschiedlich. So ist die Intensitätsänderung des Reflexes (2,0) ungefähr zur gleichen Zeit abgeschlossen, wie der optische M-Zerfall, bzw. der N/O-Aufbau. Die Reflexe (1,0) und (1,1) zerfallen hingegen annähernd so langsam wie der N/O-Zustand, also viel langsamer als der M-Zustand. Die für den M-Zustand „charakteristischen“ Reflexe (3,2), (4,1) zeigen ein Zeitverhalten, welches zwischen diesen beiden Extremen liegt.

Die Gitterkonstante ändert sich zunächst mit der Kinetik des Intensitätsänderungsaufbaus. Die Zunahme der Gitterkonstanten ist also analog zu den zuvor angestellten Überlegungen mit dem Übergang zum M_2 -Zustand abgeschlossen. Die Relaxation ist dagegen langsamer als die Intensitätsänderung für den Reflex (2,0), aber schneller, als die übrigen besprochenen Intensitätsänderungen. Also relaxiert das Gitter bevor der N/O-Zustand abgeschlossen ist, aber auf jeden Fall nach dem Übergang vom M- zum N-Zustand.

An Hand der kinetischen Beugungsdaten läßt sich folgende Vorstellung von der zeitlichen Abfolge der Strukturänderungen entwickeln. Die größten Strukturänderungen zusammen mit der Gitteränderung erfolgen mit dem Übergang von M_1 zu M_2 . Diese Strukturänderungen werden mit dem Übergang zum nächsten Intermediat nur geringfügig verändert (nur schneller Zerfall der Intensitätsänderung für Reflex (2,0)). Mit dem Übergang zum darauffolgenden N/O-Intermediat werden die vorhandenen Strukturänderungen geringer, die Gitteränderung ist relaxiert und es treten andere, wenn auch geringe Änderungen in der Struktur auf, bevor der Grundzustand erreicht ist (schnellerer Zerfall der Intensitätsänderung für die Reflexe (3,2) und (4,1) als für (1,0) und (1,1)).

Nutzt man diese Ergebnisse zur Interpretation der statischen Beugungsexperimente, so kann man auf Grund der geringeren aber deutlichen Intensitätsänderungen der Reflexe (3,2) und (4,1) annehmen, daß in diesem Falle das auf M folgende Intermediat akkumuliert wurde. Dies entspricht der für die Fourierdifferenzmap oben beschriebenen Interpretation der Strukturänderung.

Der N/O-Zustand der Doppelmutante.

Die Messungen an der Doppelmutante bei pH 4.2 sollten vor allem dazu dienen den reinen N/O-Zustand zu untersuchen. Nach den ersten zeitaufgelösten photometrischen Messungen an der Doppelmutante in Lösung (S. Verclas, Prof. N. Dencher, persönliche Mitteilung) zeigte sich, daß bei diesem pH Wert der M-Zustand sehr schnell zerfällt und anschließend für Sekunden eine Absorptionsbande bei 605 nm im Differenzspektrum auftritt.

Ebenso zeigten bereits die ersten FTIR-Messungen unter Dauerlicht, daß bei dieser Probe ein reiner N/O-Zustand eingefangen wird. Dies läßt sich eindeutig vor allem an Hand der Ethylen-Retinal-Banden 1536 cm^{-1} (sehr stark verkleinert), 1525 cm^{-1} (stark vergrößert) und 1517 cm^{-1} feststellen. Dabei ist die Bande bei 1525 cm^{-1} eindeutig mit dem Absorptionsmaximum bei 605 nm korreliert [51]. Das unter Dauerlichtbedingungen kein Anteil vom M-Zustand in der Probe vorhanden ist, läßt sich ebenfalls eindeutig mit den FTIR-Differenzspektren durch die Banden 1640 cm^{-1} (minimal, also keine deprotonierte Schiff'sche Base) und 1396 cm^{-1} (deutliches Maximum, Reprotonierung der Schiff'schen Base) nachweisen.

An der gleichen Probe (Film) durchgeführte UV-Vis-Messungen zeigen unter Dauerlicht auch nur Differenzbanden bei 540 und 605 nm, also eindeutig den N/O-Zustand. Im Unterschied zu den vorangegangenen Untersuchungen bei pH 5.2 wa-

ren diese Ergebnisse weit weniger empfindlich gegenüber Variationen in der Probenfeuchtigkeit und Probentemperatur.

Unter identischen Bedingungen, abgesehen davon, daß die Probe eine Dicke entsprechend OD 4 aufwies, wurden auch die Röntgenbeugungsexperimente durchgeführt. Die Beugungsbilder zeigen *nach Belichtung noch geringere Intensitätsänderungen in den Reflexen als für die zuvor untersuchten Proben*. Dies ist auch auf Grund der vorangestellten Überlegungen über den zeitliche Ablauf der Strukturänderungen zu erwarten und spricht ebenfalls eindeutig dafür, daß der N/O-Zustand eingefangen wurde und dieser *nur noch sehr geringe Strukturänderungen gegenüber dem Grundzustand* aufweist.

Die mit diesen geringen Intensitätsänderungen berechnete Fourierdifferenzmap weist entsprechend geringere Differenzmaxima auf, dafür aber an viel mehr Stellen im Molekül, als für die zuvor beschriebenen Zuständen. Die bereits erwähnten Differenzmaxima bei Helix B, F, G und zwischen C & F sind annähernd an den gleichen Position auch in diesem Zustand vorhanden, aber nicht deutlicher ausgeprägt, als weitere Maxima bei Helix A, E und ein weiteres Maximum bei G. Ebenso treten deutliche Minima zusätzlich zwischen A und B, C und G und E und F auf.

Berücksichtigt man die relative Höhen der Differenzmaxima zu einander, so ist gegenüber der Probe bei pH 5.2 die auffälligste Veränderung, die starke Abnahme des Maximums bei Helix G. Demgegenüber haben sich die Maxima bei Helix B und F relativ zu Helix G weit weniger verändert. Somit ist die, für den N/O-Zustand zuvor vermutete, zusätzliche Änderung in der Struktur tatsächlich nachweisbar.

Es bleibt zu berücksichtigen, daß diese Intensitätsänderungen in den Reflexen sehr klein sind (gesamte Intensitätsänderung betrug 3,4%), und dem entsprechend fehlerbehaftet sind, d.h. in diesem Falle wirken sich die Ungenauigkeiten

igkeiten der Untergrundsbestimmung und der Fehler in der Intensitätsbestimmung der einzelnen Reflexe deutlicher aus.

Außerdem besteht bei dieser Probe wieder die Schwierigkeit eindeutig zu bestimmen, wie viele der Moleküle wirklich durch die Belichtung angeregt wurden, da die optische Dichte zu groß war (OD 4), um photometrisch kontrollieren zu können ob der N/O-Zustand vollständig eingefangen wurde.

Die kinetische Betrachtung des N/O-Zustandes.

Zur Untersuchung dieser Punkte wurden kinetische Messungen durchgeführt. Die Messungen im sichtbaren Spektralbereich an einer dünnen (OD 0.8), wie auch an einer dickeren (OD 4), für die Beugungsexperimente geeigneten, Probe zeigten nach Blitzlichtanregung das obenerwähnte Differenzspektrum mit dem Zerfall der Absorptionsbande bei 605 nm im Sekundenbereich. Die dickere Probe läßt zwar keine Messung bei den Wellenlängen der Absorptionsmaxima (540 und 606 nm) zu, daß zeitliche Verhalten läßt sich aber auch bei dieser Proben durch die Messung bei $\lambda=620$ nm verfolgen. Dabei zeigte sich in diesem Fall das gleiche Zeitverhalten für die dicke und für die dünne Probe.

Um sicherzustellen, wie viele der Moleküle auch in der dicken Probe durch den Lichtblitz angeregt worden waren, wurden sowohl die Absorptionsspektren, als auch die Differenzspektren der dünnen und der dicken Probe verglichen. Es ergab sich, daß sich die gestörten Absorptionsbanden der dicken Probe zu der ungestörten Form vervollständigen ließen, wenn man einen Anteil von mindestens ca. 75% angeregter Moleküle voraussetzt, d.h. *auch bei der dicken Probe ließen sich mindestens ca. 75% der BR Moleküle im N/O-Zustand einfangen.*

Die zeitaufgelösten Röntgenbeugungsexperimente an dieser Probe zeigen, wie erwartet, nur sehr geringe Intensitätsänderungen und lassen auf Grund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses keine Aussage über die Zeitkonstanten der Än-

derungen zu. An dem Verhalten der Reflexe sieht man aber, daß die geringen Änderungen sofort nach der Lichtblitzanregung aufgetreten sind. Dies entspricht den optischen Messungen in dem Sinne, daß der M-Zustand unter diesen Bedingungen nach einigen Millisekunden vollständig zerfallen ist. Außerdem bestätigen die gemessenen geringen Intensitätsänderungen der Reflexe ((1,0), (1,1), (2,0), (3,2) und (4,1)) unter der Voraussetzung, daß in diesem Falle 75% der Moleküle im N/O-Zustand waren, die Aussagen, die auf Grund der statischen Experimente bei dem gleichen pH gemacht wurden. Also lassen sich für den N/O-Zustand zwar Strukturänderungen gegenüber dem Grundzustand nachweisen, diese sind aber verglichen mit denen des M-Zustandes klein.

Diese Aussage läßt sich auch durch die FTIR-Differenzmessungen belegen. Die Amid I und Amid II Bereiche zeigen deutlich weniger ausgeprägte Banden, als für die vorangegangenen Intermediate (M und N). Das Zeitverhalten dieser FTIR-Differenzbanden läßt sich durch einen einfachen exponentiellen Zerfall beschreiben.

Andere Bereiche des FTIR-Differenzspektrums weisen hingegen ein komplexeres Zeitverhalten auf, vor allem die Ethylen-Retinal-Banden (1536, 1525, 1517 cm^{-1}). Dieses Zeitverhalten findet man auch im sichtbaren Spektralbereich für die Veränderung der Absorption bei 540 und 605 nm. Es tritt jeweils erst eine schnelle Komponente auf ($\tau \sim 100$ ms) und anschließend die langsame Relaxation zum Grundzustand. Dies könnte auf zwei verschiedene N/O-Zustände hindeuten, die sich dann aber nach den Ergebnissen der Röntgenbeugungsexperimente strukturell nicht mehr unterscheiden.

Zuordnung des N/O-Zustandes.

Zur abschließenden Interpretation der Ergebnisse soll noch mal näher auf den N/O-Zustand eingegangen werden. Wie bereits erwähnt, unterscheidet sich das Fourier-Differenzspektrum dieses Zustandes von denen in der Literatur be-

schriebenen, s. Abb.15B und [14, 37]. Dies gilt vor allem für den Bereich 1100-1200 cm^{-1} , der charakteristisch für die Retinalkonformation ist und unter anderem Auskunft darüber gibt, ob der Chromophor in all-trans oder in 13-cis Konformation vorliegt [14].

Das Maximum bei 1188 cm^{-1} mit dem gleichzeitigen Auftreten des Minimums bei 1164 cm^{-1} ist ein Hinweis, daß bei dem N/O-Zustand nicht die für den O-Zustand charakteristische all-trans Konformation des Retinals vorliegt. Viel mehr entspricht dieser Bereich einem N-Zustand, ebenso wie das ausgeprägte Maximum bei 1394-1397 cm^{-1} .

Der Bereich bei 1540 bis 1500 cm^{-1} Wellenzahlen entspricht hingegen, wie auch das blauverschobene Absorptionsmaximum im sichtbaren Bereich, einem O-Zustand. Auch zeigen die Amid I- und Amid II-Bereiche weniger ausgeprägte Maxima und Minima, als für den N-Zustand üblich ist.

Demzufolge entspricht der N/O-Zustand strukturell einem O-Zustand [14], bei dem die Reisomerisierung des Retinals noch nicht erfolgt ist.

Daß es zwei verschiedene O-Zustände geben könnte, wurde bereits von Ebrey [63] diskutiert. In diesem Falle sollte für den O_1 -Zustand bestimmend sein, daß Asp96 bereits reprotoniert ist, während erst mit dem Übergang zum O_2 -Zustand die Reisomerisierung von 13-cis zum all-trans Retinal erfolgt. Da bei der Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn die Reprotonierung von Asp96 nicht erfolgen kann, kann dies auch nicht der limitierende Schritt für den Übergang vom N- zum O-Zustand sein. Hingegen scheint *die Reisomerisierung des Retinals der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für den Zerfall zum Grundzustand zu sein. Aus dem Beschriebenen folgt somit, daß der O_1 -Zustand der Doppelmutante bei niedrigem pH-Wert eingefangen worden ist.*

Unter Berücksichtigung dieser Interpretation und der Ergebnisse der Strukturuntersuchung bei pH 4.2 kann man sa-

gen, daß mit dem Übergang vom N- zum O-Zustand die Strukturänderungen fast vollständig abgeschlossen sind.

7. Zusammenfassung.

Für die Bearbeitung der Fragestellung, welche Photozyklusintermediate Strukturänderungen gegenüber dem Grundzustand von BR zeigen, erwies sich der kombinierte Einsatz von UV-Vis-, FTIR- und Röntgenbeugungsmessungen von großem Vorteil. Die spektroskopischen Messungen an den Proben des BR-Wildtyps, des 9-Desmethyl-Retinal BR, der BR Mutante Asp96Asn und der BR Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn dienten nicht nur zur Charakterisierung der Proben unter den unterschiedlichen physiko-chemischen Bedingungen, sondern auch zur Kontrolle, bzw. Charakterisierung des Probenzustandes während der Strukturuntersuchungen mit Röntgenbeugung.

Auf diese Weise konnten für die BR Photozyklusintermediate M, N und N/O die strukturellen Änderungen des Moleküls gegenüber der Struktur des lichtadaptierten BR Grundzustandes untersucht werden.

Durch die Variation der Hydratation der BR Mutante Asp96Asn ließ sich zeigen, daß der zuvor von Varo et al. [67,68] postulierte irreversible Schritt zwischen den Intermediaten M_1 und M_2 wirklich auftritt. Proben, die im M_1 -Zustand eingefangen worden waren, zeigten nicht die für den M-Zustand charakteristischen Strukturänderungen [43,47,48]. Hingegen zeigten die Proben im M_2 -Zustand diese Strukturänderungen deutlich. Also treten die Strukturänderungen erst mit dem Übergang von dem M_1 - zum M_2 -Zustand auf und sind wahrscheinlich der notwendige irreversible Schritt für den gerichteten Protonentransport.

Die strukturelle Trennung des M_1 - vom M_2 -Zustand ließ sich auch durch kinetische Röntgenbeugungsmessungen an der Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn nachweisen. Bei einem hohen pH-Wert zeigt die Probe nach Blitzlichtanregung Intensitätsänderungen, die für den M-Zustand bekannt sind. Im Gegensatz zu den früheren Messungen [43], konnte nicht nur

der Zerfall der Intensitätsänderungen gezeigt werden, sondern auch ihr Aufbau, der durch parallel durchgeführte UV-Vis-Messungen dem Übergang vom M_1 - zum M_2 -Zustand zugeordnet werden konnte.

Die kinetischen Messungen an der Doppelmutante zeigten außerdem, daß die Intensitätsänderungen der Reflexe nicht mit den gleichen Zeitkonstanten zerfallen, wie noch bei früheren Messungen vermutet worden war [43]. Anhand dieser Messungen, vor allem mit Proben bei pH 5.2, konnte dann auch nachgewiesen werden, daß die Strukturänderungen langsamer zerfallen als der M_2 -Zustand. Also sind auch noch für den N-Zustand Strukturänderungen nachweisbar. Diese sind geringer und etwas anderes als die für den M_2 -Zustand.

Besonders für die Untersuchungen des N- und des N/O-Zustandes waren die kinetischen Messungen von Bedeutung. Spektroskopisch ließ sich an einer Probe, die unter gleichen Bedingungen auch für die Röntgenbeugungsexperimente verwendet wurde, der Zeitverlauf des M-Zerfalles, des N/O-Aufbaus und schließlich des N/O-Zerfalles messen. Auf Grund dieser Messungen ist sicher, daß ein Großteil der Intensitätsänderungen mit dem Aufbau des N/O-Zustandes relaxiert.

Daß im N/O-Zustand kaum noch Strukturänderungen gegenüber dem Grundzustand vorhanden sind, ließ sich auch durch Röntgenbeugungsmessungen an einer Probe bei pH 4.2 zeigen. Bei diesem pH-Wert läßt sich mit der Doppelmutante Leu93Ala/Asp96Asn der N/O-Zustand ohne Anteile des M-Zustandes untersuchen. Sowohl kinetisch, als auch statisch sind nur sehr geringe Intensitätsänderungen in den Beugungsdiagrammen nachweisbar.

Auf Grund der durchgeführten Messungen ergibt sich für die Strukturänderungen während des Photozyklus, unter der Annahme daß die Messungen an den Mutanten keinen zusätzlich veränderten Photozyklus widerspiegeln, folgendes Modell: *die Strukturänderungen treten erst mit dem Übergang vom M_1 - zum M_2 -Zustand auf. Mit dem Übergang zum N-Zustand relaxie-*

ren diese, bzw. orientieren sich die Helices dabei geringfügig neu zu einander. Der darauffolgende O-Zustand weist hingegen keine oder nur noch sehr geringe Strukturänderungen auf.

Literaturverzeichnis.

1. Stoeckenius, W., Lozier, R.H. and Bogomolni, R.A., (1979)
Biochim. Biophys. Acta **505**:215.
2. Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.A., Feigina, M.Y., Kiselev, A.V.
and Lobdanov N.A., (1979), FEBS Lett., **100**:219.
3. Henderson, R., and Unwin, P.N.T., (1975), Nature, **275**:28.
4. Büldt, G., Konno, K., Nakanishi, K., Plön, H.-J., Rao, B.N. and
Dencher, N.A., (1991), Photochem. Photobiol., **54**, 6:873.
5. Heyn, M.P., Westerhausen, J., Wallat, I., Seiff, I., (1988),
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**:2146.
6. Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann,
E. and Downing K.H., (1990), J. Mol. Biol., **213**:899.
7. Subramaniam, S., Greenhalgh, D.A., Rath P., Rothschild, K.J.
and Khorana H.G., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**:6873.
8. Gerwert, K., Hess, B., Soppa, J., Oesterheld, D., (1989), Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, **86**:4943.
9. Turner, G.J., Miercke, L.J.W., Thorgeirsson, T.E., Klinger,
D.S., Betlach, M.C. and Stround, R.M., (1993), Biochem.,
32:1332.
10. Heberle, J., Oesterheld, D. and Dencher, N.A., (1993), EMBO
J., **12**, 10:3721.
11. Subramaniam, S., Marti, T., Rösselet, S.J., Rothschild, K.J.
and Khorana, H.G., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
88:2583.
12. Fahmy, K., Weidlich, O., Engelhard, M., Tittor, J.,
Oesterheld, D. and Siebert, F., (1992), Photochem. Photobiol.,
56, 6:1073.

13. Fahmy, K., Weidlich, O., Engelhard, M., Sigrist, H. and Siebert, F., (1993), *Biochem.*, **32**:5862.
14. Bousche, O., Sanjay, S., Krebs, M.P., Khorana, H.G., (1992), *Photochem. Photobiol.*, **56**, 6:1085.
15. Braiman, M.S., Mogi, T., Marti, T., Stern, L.J., Khorana, H.G. and Rothschild, K.J., (1988), *Biochem.*, **27**:8516.
16. Smith, S.O., Pardoen, J.A., Mildner, P.P.J., Curry, B., Lugtenburg, J., Mathies, R., (1983), *Biochem.*, **22**:6141.
17. Friedman, N., Gat, Y., Sheves, M. and Ottolenghi, M., (1994), *Biochem.*, **33**:14758.
18. Perkins, G.A., Liu, E., Burkard, F., Berry, E.A. and Glaeser, R.M., (1992), *J. of Struct. Biol.*, **109**:142.
19. Sasaki, J., Shichida, Y., Lanyi, J.K. and Maeda, A., (1992), *J. of Biol. Chem.*, 267, **29**:20782.
20. Vonck, J., Han, B.-G., Burkard, F., Perkins, G.A. and Glaeser, R.M., (1994), *Biophys. J.*, **67**:1173.
21. Han, B.-G., Vonck, J. and Glaeser R.M., (1994), *Biophys. J.*, **67**:1179.
22. Takei, H., Gat, Y., Sheves, M. and Lewis, A., (1992), *Biophys. J.*, **63**:1643.
23. Smith, S.O., Pardoen, J.A., Mulder, P.P.J., Curry, B., Lugtemburg, J. and Mathies, R., (1983), *Biochem.*, **22**:6141.
24. Ames, J.B. and Mathies, R.A., (1990), *Biochem.*, **29**:7181.
25. Gerwert, K., Souvignier, G. and Hess, B., (1990), *Proc. Natl. Acad. sci. USA*, **87**:9774.
26. Dresselhaus, D., (1988), Dissertation, TU Berlin.

27. Pfefferle, J., Maeda, A., Sasaki, J. und Yoshizawa T., (1991),
Biochem., **30**:6548.
28. Tittor, J., Wahl, M., Schweiger, U., Oesterhelt, D., (1994),
Biochim. et Biophys. Acta, **1187**:191.
29. Weidlich, O., Siebert, F. (1994), Poster zur Jahrestagung 1994
der Deutsche Gesellschaft für Biophysik.
30. Papadopoulos, G., Dencher N.A., Zaccai, G. and Büldt, G.,
(1990), J. Mol., Biol., **214**:15.
31. Papadopoulos, G., (1988), Dissertation, FU Berlin.
32. Griffiths, P.R., de Haseth, J.A., (1986), Fourier Transform
Infrared Spektrometry, John Wiley & Sons.
33. Boulin, C.J., Kempf, R., Gabriel, A. and Koch, M.H.J, (1988),
Nucl.Instrum.Methods, **A269**:312.
34. Gabriel, A., Dauvergne, F., (1982), Nucl. Instrument. Methods,
201:223.
35. Braiman, M.S., Bousche, O., and Rothschild, K.J., (1991),
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**:2388.
36. Bagley, K., Dollinger, G., Eisenstein, L., Singh, A.K
and Zimanyi, L., (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**:4972.
37. Heßling, B., Souvignier, G. and Gerwert, K., (1993), Biophys.
J., **65**:1929.
38. Braiman, M.S., Ahl, P.L. and Rothschild, K.J., (1987), Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, **84**:5221.
39. Sasaki, J., Maeda, A., Kato, C. and Hamaguchi, H., (1993),
Biochem. **32**:867.
40. Braiman, M.S. and Rothschild, K.J., (1988), Ann. Rev. Biophys.
Chem., **17**:541.

41. Ormos, P., Chu, K. and Mourant, J. (1992), *Biochem.*, **31**:6933.
42. Uruga, T., Hamanaka, T., Wakabayashi, K. and Amemiya, Y., (1990), *J. Biochem.*, **108**:938.
43. Koch, M.H.J., Dencher, N.A., Oesterhelt, D., Plöhn, H.-J., Rapp, G. and Büldt, G., (1991), *EMBO J.*, **10**, 3:521.
44. Nakasako, M., Kataoka, M., Amemiya, Y. and Tokunaga, F., (1991), *FEBS Letters*, **292**, 1,2:73.
45. Hauß, T., (1993), Dissertation, FU Berlin.
46. Hauß, T., Büldt, G., Heyn, M.P. and Dencher, N.A., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**:11854.
47. Dencher, N.A., Heberle, J., Bark, C., Koch, M.H.J., Rapp, G., Oesterhelt, D., Bartels, K. and Büldt, G., (1991), *Photochem., Photobiol.*, **54**, 6:881.
48. Dencher, N.A., Dresselhaus, D., Zaccari, G. and Büldt, G., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:7876.
49. Glaeser, R.M., Baldwin J., Ceska T.A. and Henderson, R., (1986), *Biophys. J.*, **50**:913.
50. Fahmy, K. and Siebert, F., (1990), *Photochem. Photobiol.*, **51**, 4:459.
51. Aton, B., Doukas, A.G., Callender, R.H., Becher, B. and Ebrey, T.G., (1977), *Biochem.*, **16**, **13**:2995.
52. Takei, H. and Lewis, A., (1993), *Photochem. Photobiol.*, **57**, 4:707.
53. Mathies, R.A., Lin, S.W., Ames, J.B. and Pollard, W.T., (1991), *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, **20**:491.

54. Earnst, T.N., Roepe, P., Braiman, M.S., Gillespie, J. and Rothschild, K., (1986), *Biochem.*, **25**:7793.
55. Marrero, H. and Rhotschild, K.J, (1987), *Biophys. J.*, **52**: 629.
56. Souvignier, G. and Gerwert, K., (1992), *Biophys. J.*, **63**: 1393.
57. Thiedemann, G., (1994), Dissertation, FU Berlin.
58. Zimanyi, L. and Lanyi, J.K., (1993), *Biophys. J.*, **64**:240.
59. Varo, G., Lanyi, J.K., (1990), *Biochem.*, **29**:2241.
60. Lanyi, J.K., (1993), *Biochim. et Biophys. Acta*, **1183**:241.
61. Birge, R.R., (1990), *Annu.Rev.Phys.Chem.*, **41**:683.
62. Weidlich, O., Friedman, N., Sheves, M. and Siebert, F., (1995), *Biochem.*, **34**:13502.
63. Ebrey, T.G., *Thermodynamics of Membrane Receptore and Channels*, (1993), Ed. Jackson, M.B., **10**, CRC Press.
64. Subramaniam, S., Gerstein, M., Oesterhelt, D. and Henderson , R., (1993), *EMBO J.*, **12**:1.
65. Zimanyi, L., Cao., Y., Chang, M., Ni ,B.,Needleman, R. and Lanyi, J.K., (1992), *Photochem. Photobiol.*, **56**:1049.
66. Gerwert, K., (1992), *Biochim. et Biophys. Acta*, **1101**: 147.
67. Varo, G. and Lanyi, J.K., (1991), *Biochem.*, **30**:5008.
68. Varo, G. and Lanyi, J.K., (1991), *Biochem.*, **30**:5016.

Danksagung.

Allen meinen Arbeitskollegen danke ich für die alltägliche Unterstützung und Diskussionenbereitschaft, ebenso wie für das angenehme Arbeitsklima, welches alles zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Außerdem möchte ich mich besonders bedanken bei:

Herrn Prof.Dr. G. Büldt, als meinem Doktorvater, für seine Hilfe in allen Bereichen und dem aufmunternden Interesse an allen Details bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof.Dr. N.A. Dencher für seine großzügige Unterstützung zu Beginn meiner wissenschaftlichen Tätigkeit, so wie für das andauernde Interesse an dem Fortgang der Arbeit.

Herrn Dr. M.H.J. Koch und Dr. G. Rapp für die Unterstützung bei den Messungen am DESY in Hamburg.

Herrn Prof. Dr. D. Oesterhelt und Prof. Dr. F. Siebert für die zur Verfügung gestellten BR-Mutanten.

Herrn Dr. D. Naumann für die Einführung in die FTIR-Spektroskopie und die Möglichkeit in seinem Labor die ersten FTIR-Messungen durchzuführen.

Herrn Dr. J. Heberle als Diskussionspartner und Ratgeber bei vielen biophysikalischen und technischen Problemen.

Herrn Dipl.Phys. B. Oelze für die Unterstützung und allgemeine Hilfe während der gesamten Arbeit.

Und *eigentlich allen voran* Herrn Dr. H.J. Saß für seine wissenschaftliche Hilfe, seine Geduld, seine Zuversicht mir gegenüber und seine liebevollen Unterstützung.

Jül-3267
August 1996
ISSN 0944-2952