

Intermediaten durchlaufen, die sich durch die Lage des Absorptionsmaximums im sichtbaren Wellenlängenbereich unterscheiden [5]. Angegeben sind ebenfalls die Übergangszeiten und die Temperaturen bei denen sich die einzelnen Zwischenstufen stabilisieren lassen. Der Zyklus ist vereinfacht gezeichnet. Mit der genauen Aufklärung beschäftigen sich zur Zeit verschiedene Arbeitsgruppen. Während eines solchen Zyklus werden Protonen von der Innenseite der Membran auf die Außenseite gepumpt.

Um die intramolekularen Prozesse in dem Protein zu bestimmen, benutzen wir die statische und zeitaufgelöste FTIR-Differenzspektroskopie. Der sogenannte Multiplex-Vorteil dieser Methode erlaubt im Vergleich zu Messungen mit dispersiven IR-Geräten sehr viel kürzere Meßzeiten, so daß Infrarot-Absorptionsänderungen im Bereich 10^{-2} bis 10^{-3} reproduzierbar gemessen werden können. Eine FTIR Apparatur ist nach dem Prinzip des Michelson Interferometers (Abb. 2A) aufgebaut. In Abhängigkeit vom Weg x des bewegten Spiegel erhält man ein sogenanntes Interferogramm (Abb. 2B) [6]. Über eine Fouriertransformation berechnet man daraus das Einkanalspektrum der zu untersuchenden Probe.

Stabile Zwischenstufen bei Minusgraden

Um aus dem Absorptionsspektrum des Proteins (Abb. 3) die Absorptionsbanden der funktionell relevanten Gruppen zu selektieren, werden Differenzspektren zwischen verschiedenen Zuständen der Chromoproteine gebildet. Die verschiedenen Intermediate werden entweder bei tiefen Temperaturen stabilisiert (K_{590} , L_{550} , M_{412}) oder zeitaufgelöst bei Raumtemperatur gemessen.

Bei der statischen Methode wird die Probe im Dunkeln bei einer bestimmten Temperatur eingefroren (z. B. bei 77 K), ein Absorptionsspektrum (BR_{570}) aufgenommen, dann belichtet und schließlich von dem, bei der jeweiligen Temperatur stabilisierten Intermediat (bei 77 K: K_{590}), ein Spektrum bestimmt und die Differenz gebildet. Abb. 4a zeigt ein bei 77 K gemessenes BR-K-Differenzspektrum. Da der BR-K Übergang photoreversibel ist, kann zur Kontrolle von einem

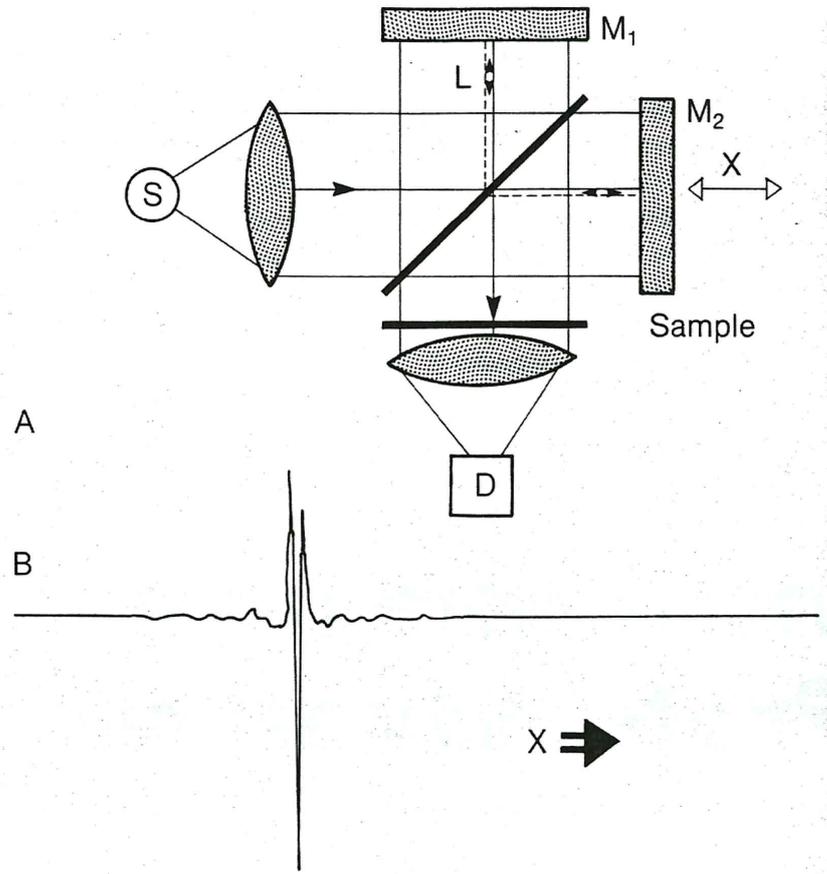


Abb. 2: A) Schema eines FTIR Gerätes; B) Interferogramm.

Absorbance Spectrum of Hydrated Purple Membrane Films

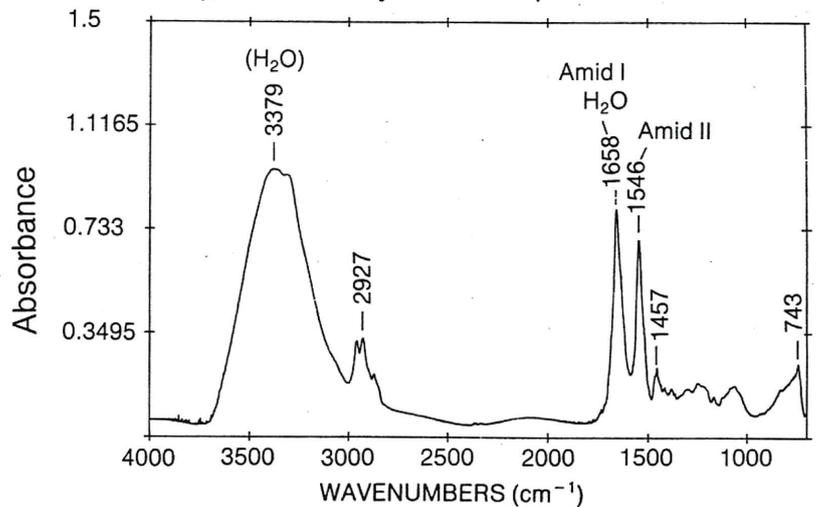


Abb. 3: Übersichtsspektrum eines hydratisierten Purpurchromoproteinmembranfilms; Bakteriorhodopsin ist das einzige Protein in der Purpurchromoproteinmembran.

BR-K-Differenz-Spektrum ein K-BR-Differenzspektrum abgezogen werden (Abb. 4b). Die Kontrolle zeigt, daß eine Vielzahl von reproduzierbaren Absorptionsänderungen in der Probe beobachtet werden.

Mit Laserblitz angeregt

Bei der zeitaufgelösten Methode (Abb. 5) wird die Probe angeblitzt und die Spektren zu verschiedenen Zeiten Δt nach dem Anregungsblitz während

des Photozyklus bei Raumtemperatur aufgenommen [7]. Die Zeitauflösung wird bestimmt durch die Zeitdauer eines Scans, die sehr viel kürzer als die Zykluszeit ist. Erreicht werden momentan bei einer spektralen Auflösung $\Delta\nu = 8 \text{ cm}^{-1}$, eine Zeitauflösung von $\Delta T = 9 \text{ ms}$, d. h. in dieser Zeit wird das gesamte Spektrum der Probe gemessen. In Abb. 6 sind die Differenzspektren einer Fe-BR-Probe, die einen verlangsamen Photozyklus zeigt, zu verschiedenen Zeiten Δt nach dem Anregungsblitz wiedergegeben [8]. Man beobachtet in diesem Zeitbereich die Rückreaktion von M nach BR.

Zuordnung mit Isotopenmarkierung

Zur eindeutigen Zuordnung der Banden zu funktionell relevanten Seitengruppen des Proteins werden isotope markierte Proben benutzt, bei denen verschiedene Stellen des Chromophors oder der Aminosäuren isotope markiert sind. Abb. 7 zeigt das BR-M Differenzspektrum in der Carbonylgegend von unmodifiziertem und zu 70% $4\text{-}^{13}\text{C}$ -Asp isotope markiertem Bakteriorhodopsin in H_2O und D_2O [9]. Aufgrund der Bandenverschiebungen in der markierten Probe können die Carbonylbanden bei 1763 cm^{-1} und bei 1755 cm^{-1} internen Asparginsäuren zugeordnet werden. Die Bande bei 1740 cm^{-1} reagiert nicht auf $4\text{-}^{13}\text{C}$ -Asp Markierung, verschiebt sich aber in D_2O und spiegelt daher eine Carbonylstreckschwingung einer Glutaminsäure wider. Da auch die entsprechenden Banden der deionisierten Form zugeordnet wurden, zeigen diese Banden Protonierungsänderungen von internen Asparginsäuren während des Photozyklus an [9].

Der Farbstoff »schleppt« Protonen

Die mit der FTIR-Methode erzielten Ergebnisse können in folgendes Modell (Abb. 8) übersetzt werden [11, 13, 14]: Durch lichtinduzierte, gleichzeitige Isomerisierung des Chromophors um die $\text{C}_{13} = \text{C}_{14}$ und $\text{C}_{14} - \text{C}_{15}$ Bindung wird die positive Ladung des Chromophors vom Gegenion getrennt. Wegen der Destabilisierung wandert die positive Ladung in die Polyenke und er-

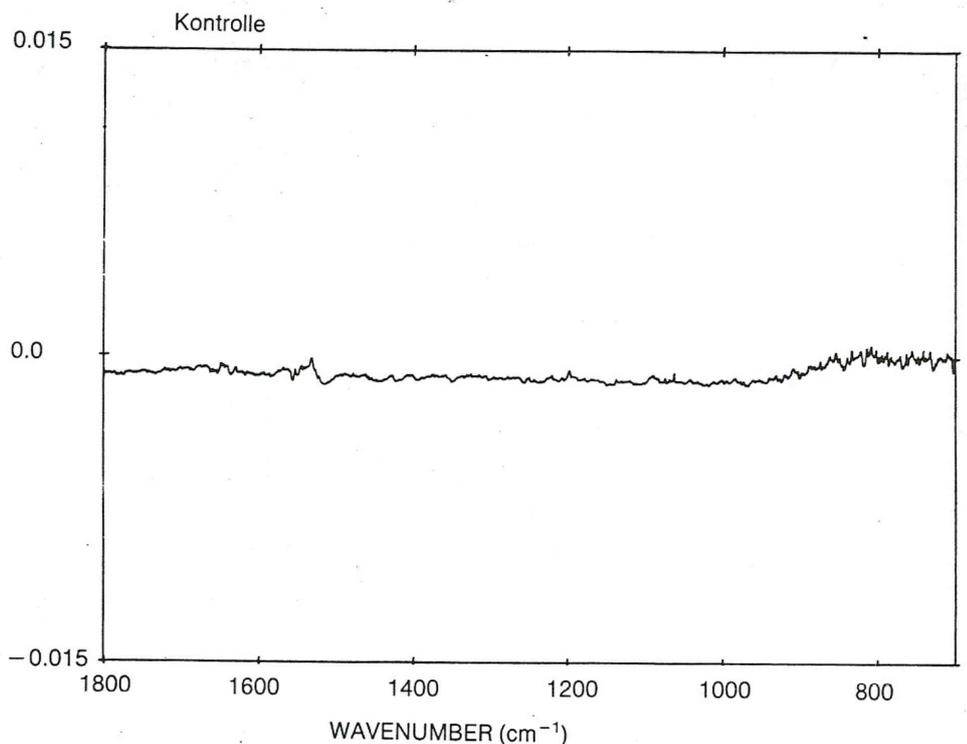
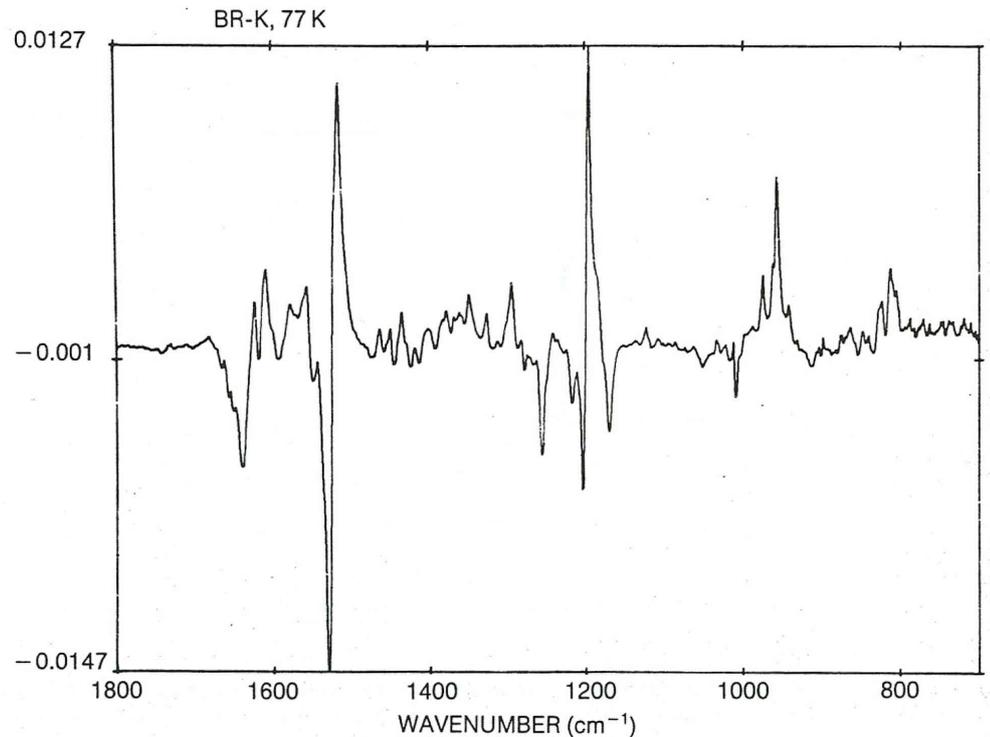


Abb. 4: a) BR-K-Differenzspektrum. Aus den Banden zwischen 1300 cm^{-1} und 1100 cm^{-1} kann man auf die Struktur des Chromophors im Grundzustand (BR: all-trans) und im lichtaktivierten Zustand (K: 13-cis, 14-s-cis) schließen [11]. Die Banden um 1600 cm^{-1} bis 1800 cm^{-1} spiegeln Änderungen von Proteinseitengruppen und Proteingerüst wieder.

b) Kontrolle: BR-K minus K-BR.

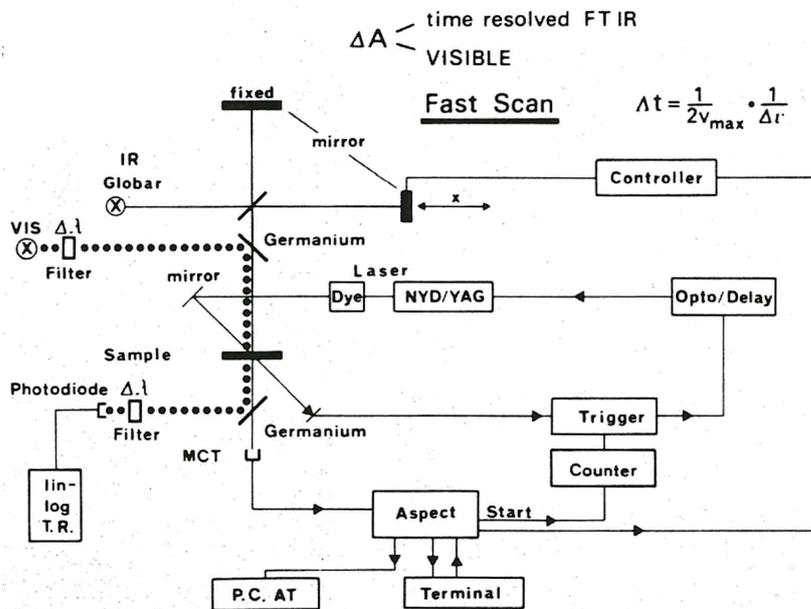


Abb. 5: Schema der Apparatur für zeitaufgelöste FTIR-Messungen. Als Grundgerät wird ein Bruker IFS 88 benutzt. Der Photozyklus wird durch einen Laserblitz (Laser) angeregt (Sample). Während des Photozyklus werden zu den verschiedenen Zeiten Δt nach dem Anregungsblitz Interferogramme aufgenommen. Counter, Trigger und Delay dienen dazu, die Spiegelbewegung (Controller) mit dem Laserblitz zu korrelieren. Die IR-Absorptionsänderungen werden mit einem MCT-Detektor aufgenommen und auf dem Aspect Computer gespeichert. Anschließend wird die Fouriertransformation durchgeführt. Simultan kann die Absorptionsänderung im sichtbaren Spektralbereich bei einer Wellenlänge gemessen werden. Der sichtbare Meßstrahl wird über Germaniumfenster, die transparent für den IR-Strahl sind, ein- und ausgespiegelt. Die Absorptionsänderungen werden auf einem Transientenrekorder mit logarithmischer Zeitachse gespeichert.

zeugt Ladungen im Innern des Proteins in K_{590} . Im K-L Übergang versucht das Protein einen energetisch günstigeren Zustand zu erreichen, indem durch Deprotonierung einer internen Asparaginsäure die Chromophorladung wie im Ausgangszustand BR wieder stabilisiert wird. Da aber der pK der Schiff'schen Base durch die $C_{14}-C_{15}$ Isomerisierung reduziert ist, wird die Salzbrücke in L_{550} instabil. Im L-M Übergang beobachtet man einen Protonentransfer von der Schiff'schen Base zu der Asparaginsäure Asp 1. Begleitend wird auch das ursprüngliche Gegenion, die Asparaginsäure Asp 2 protoniert. Der Chromophor transportiert also lichtinduziert über eine Isomerisierungsreaktion Protonen zwischen zwei internen Asparaginsäuren (Abb. 9).

Offene Fragen

Dieses Modell kann die Umwandlung der Lichtenergie in eine Protonentransferreaktion beschreiben. In Zukunft wollen wir versuchen, den Protonentransfer von den Proteinoberflächen ins Innere des Proteins aufzuklä-

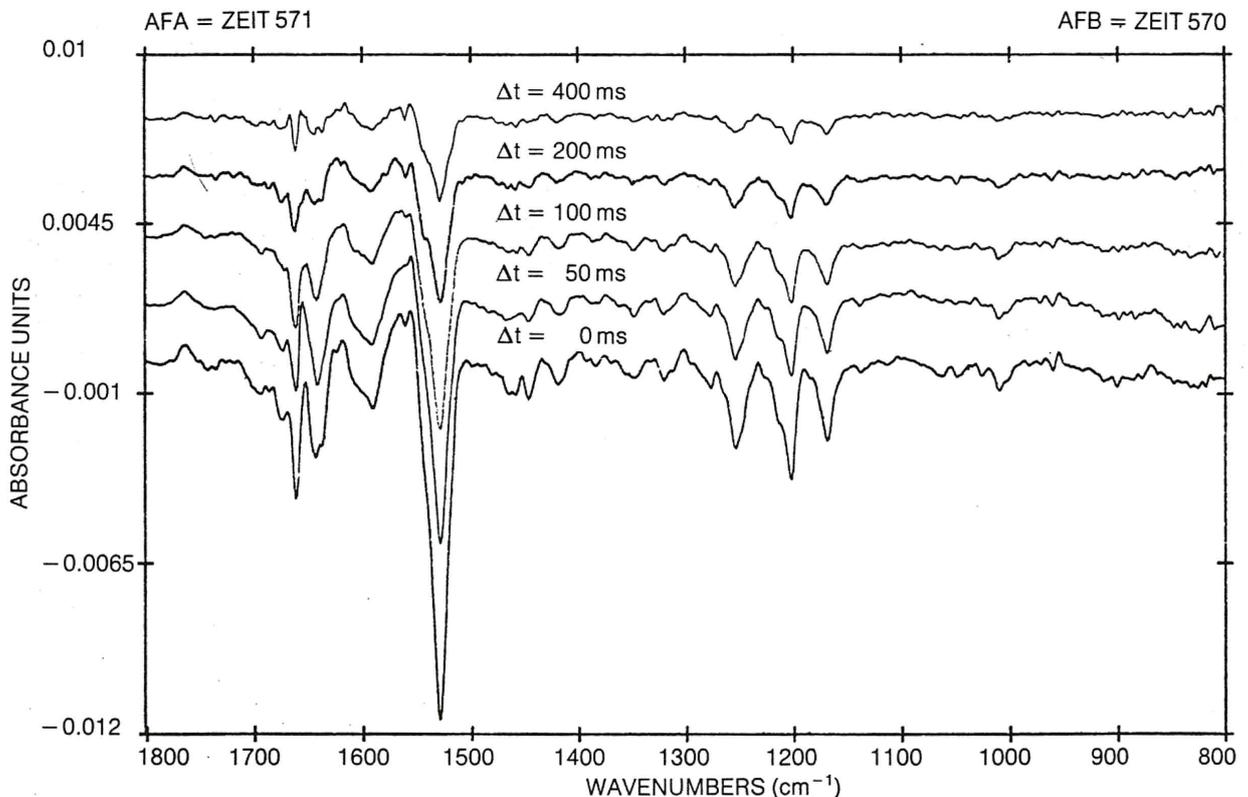


Abb. 6: Differenzspektren, aufgenommen zu verschiedenen Zeiten Δt nach Anregen eines Photozyklus in einer Fe-BR-Probe. Die Differenzen sind gebildet zwischen einem Referenzspektrum, aufgenommen unmittelbar vor dem Laserblitz, und Spektren, aufgenommen zu den angegebenen Zeiten Δt nach dem Laserblitz. Die Änderungen bei 1650^{-1} bedeuten z. B. ein Kippen der α -Helizes.

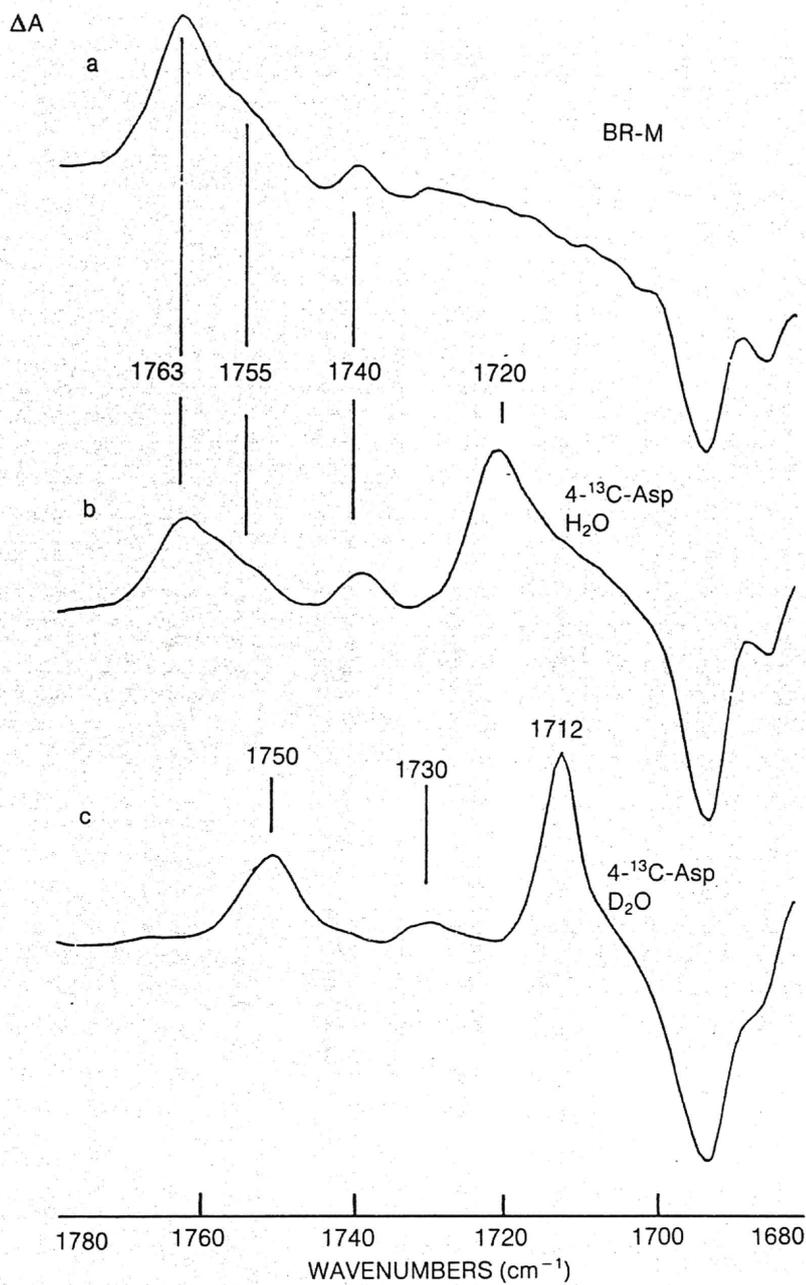


Abb. 7: Zuordnung der Carbonylbanden im BR-M Differenzspektrum mit Hilfe von 4-¹³C-Asp-markierten Bakteriorhodopsin-Proben [9].

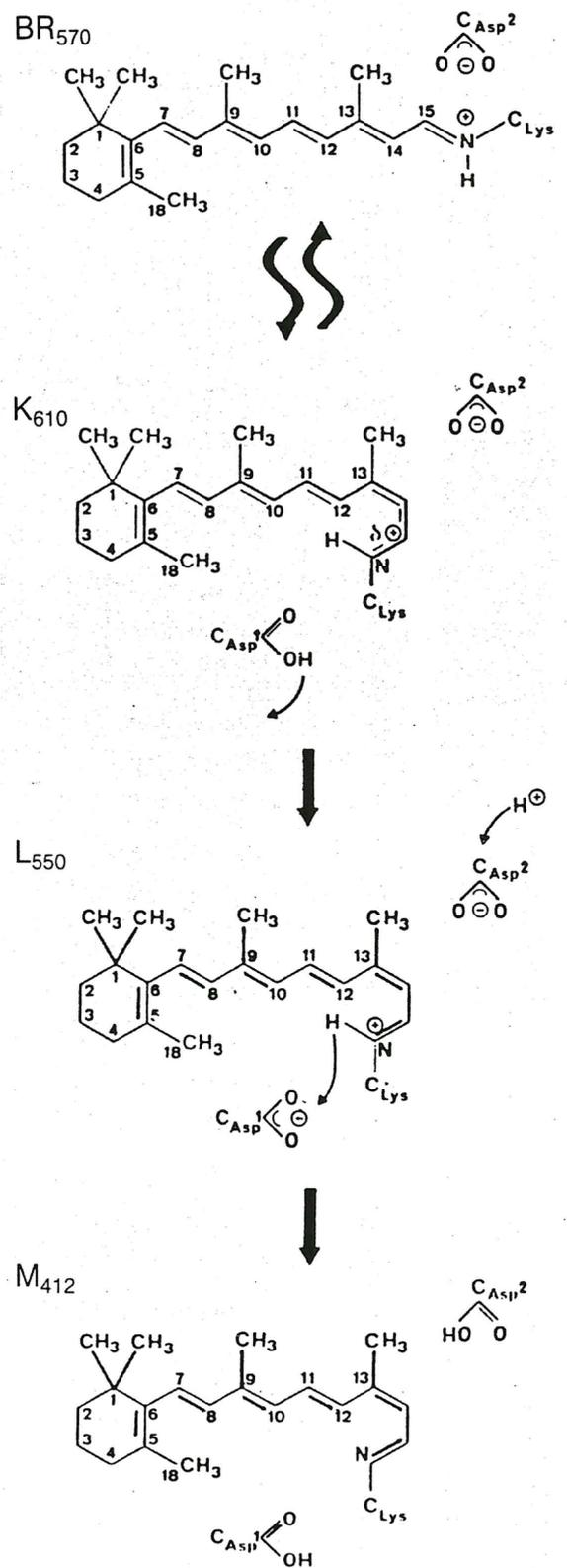


Abb. 8: Modell über lichtinduzierte intramolekulare Prozesse. Damit kann die Transduktion der Lichtenergie in Protonentransferreaktionen beschrieben werden.

ren (Abb. 9). Dabei ist auch die Rolle von zweiwertigen Kationen, die auf der Membranaußenseite angebunden sind, von Interesse [12].

Daneben wurde begonnen, die lichtinduzierten intramolekularen Prozesse vom photosynthetischen Reaktionszentrum zu untersuchen. Dabei ist es zum ersten Mal gelungen, von Proteinkristallen hochwertige lichtinduzierte Differenzspektren aufzunehmen [15].

Literatur

- 1 Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2853-2857
- 2 Stoeckenius, W., Bogomolni, R. A. (1982), Annu. Rev. Biochem. 52, 587 bis 616
- 3 Henderson, R. and Unwin, R. N. T. (1975) Nature 257, 28-32
- 4 Gerber, G. E., Gray, L. P., Wildenauer, D. and Khorana, H. G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10, 5426 bis 5430

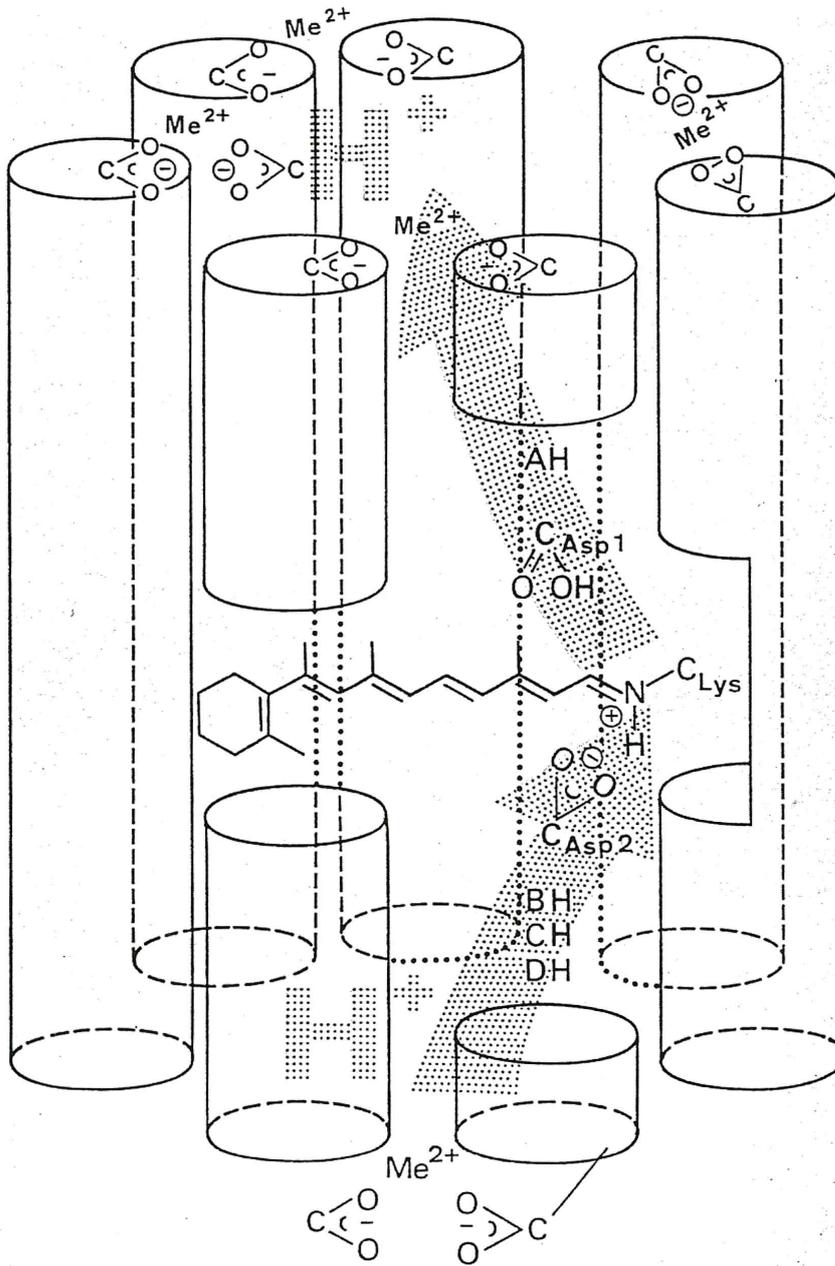


Abb. 9: Schema des Protonentransfers in Bakteriorhodopsin.

- 5 Lozier, R. H., Bogomolni, R. A., Stockenius, W. (1975) *Biophys. J.* 15, 955-962
- 6 Griffiths, P. R., *Chemical-Infrared-Fourier-Transform Spectroscopy*, J. Wiley (1975)
- 7 Gerwert, K. and Hess, B., *Microchimica acta*, in press
- 8 Gerwert, K. and Hess, B. in *Spectroscopy of Biological Molecules*, eds: Schmidt, Siebert (1987), in press
- 9 Engelhard, M., Gerwert, K., Hess, B., Kreutz, W. and Siebert, F. (1985) *Biochemistry* 24, 400-407
- 10 Gerwert, K. (1986) *Transduktion der Lichtenergie in Protonentransferreaktionen beim Bakteriorhodopsin*, Doktorarbeit, Freiburg
- 11 Gerwert, K. and Siebert, F. (1986) *EMBO J.* 5, 805-811
- 12 Gerwert, K., Ganter, U. M., Siebert, F. and Hess B. (1987) *FEBS Lett.* 213, 39-44.
- 13 Gerwert, K., Hess, B. (1988), *Initiation of lightinduced prototransfer reaction in bacteriorhodopsin*, in: *Biophysical studies of retinal proteins*, eds.: Frauenfelder, Honig, Nakanishi, University of Illinois Press, 144-48.
- 14 Schulten, K., Tavan, P. (1978) *Nature* 272, 85-86.
- 15 Gerwert, K., Buchanan, S., Michel, H., Hess, B. (1988), *FEBS letters*, in press.