

Die molekulare Basis des Sehvorgangs (Nobel-Vortrag)^[**]

VON G. WALD [*]

Ich hatte oft das Gefühl, meine Hände seien klüger als mein Kopf. Dies ist eine grobe Art, die Dialektik experimenteller Arbeit zu charakterisieren. Wenn alles gut geht, dann ist sie wie ein ruhiges Gespräch mit der Natur. Man stellt eine Frage und bekommt eine Antwort, man stellt die nächste Frage und bekommt die nächste Antwort. Ein Experiment ist eine List, mit der man die Natur dazu bringt, verständlich zu reden. Danach muß man nur noch zuhören.

Als fortgeschrittener Student an der Columbia-Universität wurde ich von *Selig Hecht* in besonders mitreißender Weise in die Probleme des Sehens eingeführt. *Hecht* war einer der Meister im Messen des menschlichen Sehens, wie *Aubert*, *König* und *Abney* vor ihm. Aber er war nicht damit zufrieden, nur zu messen. Er wollte verstehen, was hinter den Messungen lag, und was sich beim Sehen auf molekularer Ebene abspielte.

Und hier wurde ihm, damals noch fortgeschrittener Student in Harvard, ein Tor durch den großen schwedischen Physikochemiker *Svante Arrhenius* geöffnet. *Hecht* hat mir von der Erregung erzählt, mit der er *Arrhenius'* neues Buch „Quantitative Gesetze in der biologischen Chemie“^[1] gelesen hatte. Es ermutigte zu der Hoffnung, genaue Messungen an intakten Organismen in die einfache Sprache der Kinetik und Thermodynamik chemischer Reaktionen in Lösung übersetzen zu können.

Mit diesem Ziel konzipierte *Hecht* aus seinen Messungen und denen früherer Forscher ein Modell für den Prozeß der Photoreception: Ein lichtempfindliches Pigment (S) dissoziiert bei Belichtung in Produkte (P + A); eines davon ist für den Sehreiz verantwortlich. Anschließend assoziieren P und A oder eine Variante (P + B) wieder unter Regenerierung von S. Bei

gleichbleibendem Licht bildet diese Hin- und Herreaktion ein Pseudogleichgewicht, den photostationären Zustand, der die Grundlage des stationären Sehvorgangs bei konstanter Beleuchtung ist^[2].

Ich habe *Hechts* Laboratorium mit dem großen Wunsch verlassen, jene Moleküle kennenzulernen, für die die genannten Buchstaben Symbole waren. Das brachte mich zu *Otto Warburg* nach Berlin-Dahlem, wo ich Vitamin A in der Netzhaut fand^[3]. Es gab gute Gründe dafür, gerade hier danach zu suchen, wie ich später erkannte, und in diesem Sinn habe ich auch meine Veröffentlichung geschrieben. Während des ersten Weltkrieges war in Dänemark gezeigt worden, daß ernährungsbedingte Nachtblindheit – schon den alten Ägyptern bekannt – ein Symptom des Vitamin-A-Mangels ist^[4]. *Fridericia* und *Holm*^[5] sowie *Tansley*^[6] hatten gefunden, daß Ratten bei Vitamin-A-Mangel weniger Rhodopsin (Sehpurpur) als Normaltiere synthetisieren. Aber Vitamine waren damals noch etwas sehr Geheimnisvolles, und man erwartete kaum, daß sie sich direkt an physiologischen Prozessen beteiligten. Ich glaube, dies war damals das erste Beispiel eines direkten Zusammenhangs, wenn auch *Warburg* und *Christian* schon die ersten gelben Enzyme analysierten^[7] und kurz danach deren Chromophor Riboflavin sich als identisch mit Vitamin B₂ erwies^[8].

Danach ging alles ziemlich schnell. Ich ging nach Zürich zu *Karrer*, der im Jahr davor zusammen mit

[*] Prof. Dr. G. Wald
Biological Laboratories, Harvard University
Cambridge, Mass. 02138 (USA)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1968. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

[1] *S. Arrhenius*: Quantitative Laws in Biological Chemistry. G. Bell, London 1915.

[2] *S. Hecht*, *Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmacol.* 32, 243 (1931); *S. Hecht* in *Murchison*: Handbook of General Experimental Psychology. Clark University Press, Worcester, Mass., 1934, S. 704; *Harvey Lectures* 33, 35 (1937–1938); *Le Base Chimique et Structurale de la Vision*. Hermann et Cie., Paris 1938.

[3] *G. Wald*, *Nature (London)* 132, 316 (1933); *J. gen. Physiol.* 7, 905 (1934/1935).

[4] *O. Blegvad*, *Amer. J. Ophthalmol.* (3) 7, 89 (1924).

[5] *L. S. Fridericia* u. *E. Holm*, *Amer. J. Physiol.* 73, 63 (1925).

[6] *K. Tansley*, *J. Physiology (London)* 71, 442 (1931); *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. B 114, 79 (1933).

[7] *O. Warburg* u. *W. Christian*, *Biochem. Z.* 254, 438 (1932); 266, 377 (1933).

[8] *R. Kuhn*, *P. György* u. *T. Wagner-Jauregg*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 66, 317 (1933); *H. Theorell*, *Biochem. Z.* 275, 37, 344 (1934); 278, 263 (1935).

Morf und Schöpp die Struktur des Vitamins A ermittelt hatte^[9], um dort dessen Nachweis in der Netzhaut zu sichern. Dann zog ich weiter zu **Meyerhof** nach Heidelberg, um einmal etwas anderes zu tun. Aber mit Hilfe einer Ladung ungarischer Frösche, die, nachdem alle Mitarbeiter in Ferien waren, zu spät geliefert wurden, fand ich das Retinin, ein Intermediärprodukt der zu Vitamin A führenden Bleichung des Rhodopsins^[10]. Jahre später zeigten **Ball, Goodwin** und **Morton** in Liverpool, daß Retinin der Vitamin-A-Aldehyd ist^[11]. Auf **Mortons** Vorschlag wurden die Namen aller dieser Moleküle kürzlich zu Ehren der Retina (Netzhaut) geändert, bis jetzt der einzigen Stelle, an der ihre Funktion zu verstehen ist. Vitamin A heißt heute Retinol, Retinin heißt Retinal (Abb. 1), außerdem gibt es die entsprechende Carbonsäure.

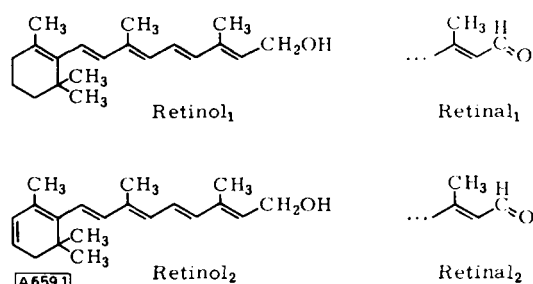


Abb. 1. Strukturen von Retinol₁ und Retinol₂ (Vitamin A₁ und A₂) und der entsprechenden Aldehyde Retinal₁ und Retinal₂ (früher Retinine 1 und 2).

Diese frühen Wanderjahre in den Laboratorien dreier Nobelpreisträger – **Warburg, Karrer** und **Meyerhof** – eröffneten mir eine neue Welt: die Welt der Moleküle. Von da an nahm ich am dauernden Wechselspiel zwischen den Organismen und ihren Molekülen teil. Man isoliert die Moleküle aus einem Organismus, um ihre Struktur und ihr Verhalten kennenzulernen, und man führt sie wiederum dem Organismus zu, um in seiner Reaktion die Funktion der Moleküle sozusagen mit dem Vergrößerungsglas zu betrachten.

Ein grundlegender Charakterzug wissenschaftlicher Untersuchungen ist ihre Stetigkeit. Es ist ein organisches Wachsen, zu dem jeder Forscher zu seiner Zeit beiträgt, was er kann; ein Wachsen wie in Chartres oder an der Hagia Sophia, an denen über die Jahrhunderte hier ein Strebepfeiler, dort ein Turm hinzugefügt worden ist. **Hechts** Werk war ganz eng mit dem von Forschern verbunden, die Generationen vor ihm gearbeitet hatten: **Hermann Aubert** in Breslau^[12], **Arthur König** in Berlin^[13] und **Abney** in England^[14]. Nun trat ich selbst in eine solche Beziehung ein, und zwar mit **Willy Kühne** in Heidelberg. **Kühne** hatte das Rhodopsin

sofort nach seiner Entdeckung durch **Franz Boll** 1877^[15] aufgegriffen und in zwei außergewöhnlich fruchtbaren Jahren mit seinem Mitarbeiter **Ewald** fast das ganze Wissen darüber für das nächste halbe Jahrhundert zusammengetragen^[16]. Vor allem aus **Kühnes** Beobachtungen konnte ich schließen, daß Rhodopsin ein Protein ist, ein Carotinoidprotein, wie das gerade von **Kuhn** und **Lederer**^[17] gefundene blaue Pigment der Hummerschalen, ein Protein, das zusammen mit Retinal und Vitamin A an einem Kreisprozeß beteiligt ist^[10, 18].

Ich habe noch eine weitere Dankesschuld gegenüber Vorgängern an weit entfernten Orten abzutragen. **Köttgen** und **Abelsdorff** hatten gefunden, daß die Differenzspektren der Sehpigmente von acht Fischarten gegenüber denen der Rhodopsine von Fröschen, Eulen und Säugetieren beträchtlich nach Rot verschoben sind^[19]. Beim Versuch, diese Beobachtungen in Woods Hole zu prüfen, war ich sehr erstaunt, den gleichen Rhodopsin-Retinal-Vitamin-A-Zyklus in den Fischen wie in den Fröschen zu finden^[20]. Es stellte sich heraus, daß **Köttgen** und **Abelsdorff** ausschließlich mit Süßwasserfischen gearbeitet hatten. Als ich mich diesen zuwandte, fand ich ein anderes Sehpigment, Porphyropsin, das an einem dem Rhodopsinzyklus ähnlichen Zyklus beteiligt ist, in dem aber neue Carotinoide das Retinal und das Vitamin A ersetzen^[21]. Nach diesen Beobachtungen wurde vorgeschlagen, die Substanz, die das Vitamin A im Sehsystem der Süßwasserfische ersetzt, als Vitamin A₂ zu bezeichnen^[22]. Im folgenden werde ich sie Retinol₂ und ihren Aldehyd Retinal₂ nennen. Die Substanzen unterscheiden sich von ihren Analogen im Rhodopsinzyklus nur durch eine zusätzliche Doppelbindung im Ring (Abb. 1)^[23]. Kurz danach wurde bekannt, daß sogenannte euryhaline und deshalb potentielle Wanderfische wie Lachs, Forelle und Süßwasseraal Mischungen von Rhodopsin und Porphyropsin enthalten, wobei gewöhnlich das System, das dem Laichgebiet des Fisches entspricht, vorherrscht. Andere euryhaline Fische wie der Weiße Barsch und der Maifisch (*Pomolobus pseudoharengus*) besitzen nur dieses System^[24]. Der Ochsenfrosch hat als Kaulquappe Porphyropsin und wechselt

[15] **F. Boll**, Arch. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1877, 4.

[16] **W. Kühne** in **M. Foster**: On the Photochemistry of the Retina and on Visual Purple. Macmillan and Co, London 1878; **A. Ewald** u. **W. Kühne**, Untersuchungen über den Sehpurpur, I–IV, Untersuch. physiol. Inst. Heidelberg 1, (1878); **W. Kühne** in **L. Hermann**: Handbuch der Physiologie. F. C. W. Vogel, Leipzig 1879, Bd. 3, Teil 1, S. 312; **C. Voit**, Z. Biol. 40, i (1900).

[17] **R. Kuhn** u. **E. Lederer**, Ber. dtsh. chem. Ges. 66, 488 (1933).

[18] **G. Wald**, Nature (London) 136, 832 (1935); J. gen. Physiol. 19, 781 (1935/1936).

[19] **E. Köttgen** u. **G. Abelsdorff**, Z. Psych. u. Physiol. Sinnesorg. 12, 161 (1896).

[20] **G. Wald**, Nature (London) 136, 913 (1935); J. gen. Physiol. 20, 45 (1936/1937).

[21] **G. Wald**, Nature (London) 139, 1017 (1937); J. gen. Physiol. 22, 775 (1938/1939).

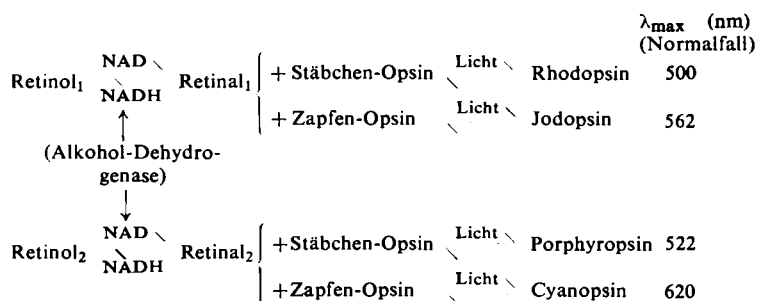
[22] **J. R. Edisbury**, **R. A. Morton** u. **G. W. Simpkins**, Nature (London) 140, 234 (1937).

[23] **R. A. Morton**, **M. K. Salah** u. **A. L. Stubbs**, Nature (London) 159, 744 (1947); **K. R. Farrar**, **J. C. Hamlet**, **H. B. Henbest** u. **E. R. H. Jones**, J. chem. Soc. (London) 1952, 2657.

[24] **G. Wald**, J. gen. Physiol. 22, 391 (1938/1939); 25, 235 (1941/1942).

bei der Metamorphose zum Rhodopsin^[25]. Das Meer-Neunauge (*Petromyzon marinus*) enthält hauptsächlich Rhodopsin, wenn es flußabwärts zum Meer zieht und Porphyropsin, wenn es geschlechtsreif stromaufwärts zum Laichen wandert^[26]. *Denton und Warren*^[27] haben gezeigt, daß das Spektrum des Rhodopsins von Tiefseefischen gegenüber dem von Fischen aus oberflächennahem Wasser nach kürzeren Wellenlängen ($\lambda_{\max} \approx 480 \text{ nm}$) verschoben ist. Beim europäischen Aal findet, wenn er geschlechtsreif ist und seine Wanderung in die Sargasso-See zum Laichen antritt, ein Wechsel von seiner normalen Rhodopsin-Porphyr-opsin-Mischung zum Tiefsee-Rhodopsin statt^[28]. Der chemische Charakter der Sehsysteme hängt bei diesen und anderen Tieren eng mit ihrer Evolution, Entwicklung und Lebensweise zusammen^[29]. Ich freue mich, daß mich die Bemühungen um die Moleküle nicht von der Biologie weg, sondern tiefer in sie hineingeführt haben.

Ich möchte diese Vorgeschichte nun verlassen und berichten, wohin uns die neuere Entwicklung gebracht hat. Alle bekannten Sehpigmente sind nach dem gleichen Plan gebaut. Alle bestehen aus Retinal, das als Chromophor an ein „Opsin“ genanntes Protein gebunden ist, welches in den äußeren Segmenten der Stäbchen und Zapfen der Vertebraten und in den analogen Rhabdomeren der Invertebraten vorkommt. In den Vertebraten sind die beiden Retinale, 1 und 2, an zwei große Familien von Opsinen gebunden, an die der Stäbchen und die der Zapfen, so daß die vier Hauptpigmente des Sehens resultieren^[30]:



Die Retinole werden durch Alkohol-Dehydrogenasen zu den Retinalen oxidiert. Das erste von uns geprüfte Enzym dieser Art, das der Frösche und Fische, arbeitet mit NAD als Coenzym^[31]. Inzwischen sind auch

[25] G. Wald, Harvey Lectures 41, 117 (1945/1946).

[26] G. Wald, J. gen. Physiol. 40, 901 (1956/1957).

[27] E. J. Denton u. F. J. Warren, Nature (London) 178, 1059 (1956); siehe auch F. W. Munz, Science (Washington) 125, 1142 (1957); G. Wald, P. K. Brown u. P. S. Brown, Nature (London) 180, 969 (1957).

[28] D. B. Carlisle u. E. J. Denton, J. Physiology (London) 139, 8 (1957); siehe auch P. K. Brown u. P. S. Brown in [29a].

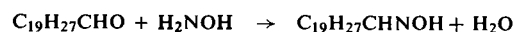
[29] a) G. Wald in M. Florkin u. H. S. Mason: Comparative Biochemistry. Academic Press, New York 1960, Bd. 1, S. 311; b) Science (Washington) 128, 148 (1958); Circulation (New York) 21, 916 (1960).

[30] Jodopsin: a) G. Wald, Nature (London) 140, 545 (1937); b) G. Wald, P. K. Brown u. P. H. Smith, J. gen. Physiol. 38, 623 (1954/1955); Cyanopsin: c) G. Wald, P. K. Brown u. P. H. Smith, Science (Washington) 118, 505 (1953).

[31] G. Wald u. R. Hubbard, J. gen. Physiol. 32, 367 (1948/1949); G. Wald, Science (Washington) 109, 482 (1949); Biochim. biophysica Acta 4, 215 (1950).

Systeme mit NADP beschrieben worden^[32a]. Neuere Arbeiten vervielfachen die Zahl dieser Enzyme (wie das heute wohl unausweichlich ist), und einige davon scheinen recht spezifisch für Retinol zu sein (deshalb Retinol-Dehydrogenasen genannt)^[33].

Unter physiologischen Bedingungen liegt das Gleichgewicht zwischen Retinol und Retinal weit auf der Seite des Retinols, und zwar so weit, daß Retinol nur in dem Maße zu Retinal oxidiert wird, wie dieses aus dem System entfernt wird. In vitro kann das durch Hydroxylamin geschehen, das spontan mit Retinal zum Retinaloxim kondensiert:

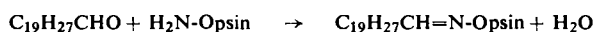


In der Netzhaut übernimmt das Opsin die Funktion, das Retinal bei seiner Entstehung unter Bildung der Sehpigmente abzufangen^[34]. So ist es das Opsin, das die Oxidation des Retinols und damit die Synthese des Sehpigments reguliert.

Ihren ähnlichen Strukturen entsprechend verhalten sich die Sehpigmente auch chemisch außerordentlich ähnlich. Reaktionen eines Sehpigments findet man mit kleinen Variationen bei allen anderen. Die Opsine sind spezies-spezifisch wie andere Proteine und treten oft in Isoproteinen auf, wie etwa beim Menschen. Ein Wechsel des Opsins hat Änderungen des Absorptionsspektrums, der Stabilität, der Kinetik der Bleichung und Regeneration und anderer Eigenschaften zur Folge. Gleichwohl sind alle bekannten Sehpigmente als Variationen eines einzigen Themas anzusehen. Die Vertebraten benutzen den ganzen Zyklus, die Invertebraten

nur Teile. Die Lichtreaktion führt bei den Invertebraten-Pigmenten nur zur Bildung von Retinal, das meist noch in Wechselwirkung mit dem Opsin steht. Auch haben alle Invertebraten-Pigmente Retinal₁ als Chromophor^[29a].

Vor einigen Jahren bewiesen *Collins, Morton und Pitt*^[35], daß im Rhodopsin die Bindung zwischen Retinal und Opsin den Charakter einer Schiffchen Base hat, wobei die Aldehydgruppe des Retinals mit einer Aminogruppe des Opsins reagiert hat:



[32] a) S. Fetterman, J. biol. Chemistry 238, 1145 (1963); b) N. I. Krinsky, ibid. 232, 881 (1958).

[33] A. L. Koen u. C. R. Shaw, Biochim. biophysica Acta 128, 48 (1966).

[34] G. Wald u. P. K. Brown, Proc. nat. Acad. Sci. USA 36, 84 (1950); G. Wald u. R. Hubbard, ibid. 36, 92 (1950); 37, 69 (1951).

[35] F. D. Collins, Nature (London) 171, 469 (1953); R. A. Morton u. G. A. J. Pitt, Biochem. J. 59, 128 (1955).

Bownds aus unserem Arbeitskreis hat kürzlich diese Aminogruppe im Rinder-Opsin als ϵ -Aminogruppe von Lysin identifiziert. Er konnte auch die benachbarten Aminosäuren feststellen. Zusammen mit dem Lysin bilden sie ein Retinyl-Decapeptid der Bruttozusammensetzung (Ala₃, Phe₃, Thr, Pro, Ile)- ϵ -N-Retinyllysin [36]. Abbildung 2 zeigt ein Strukturmodell dieses Teils des Rhodopsinmoleküls. Rinder-Rhodopsin hat nach der üblichen Präparation ein Molekulargewicht von etwa 40000 [37]. Wenn das Molekül kugelförmig ist, entspricht dem ein Durchmesser von etwa 40 Å. Der Chromophor ist etwa 20 Å lang, obwohl sein Molekulargewicht nur 282 beträgt. Im Bild der Rhodopsinstruktur erscheint er deshalb überraschend groß.

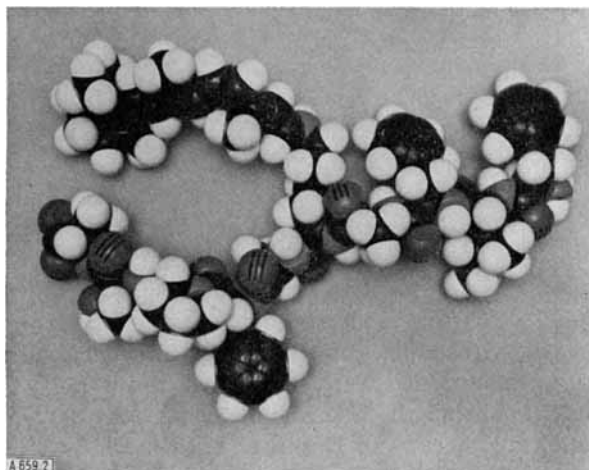


Abb. 2. Modell des Chromophoren-Bereichs des Rinder-Rhodopsins (nach **Bownds** [36]). Der 11-*cis*-Retinyl-Chromophor (oben links) ist an das Opsin unter Bildung einer Schiff'schen Base mit einer ϵ -Aminogruppe von Lysin gebunden. Die in der Nachbarschaft kovalent gebundenen Aminosäuren bilden ein Decapeptid-Fragment der Zusammensetzung (Ala₃, Phe₃, Thr, Pro, Ile)- ϵ -N-Retinyllysin. Die Sequenz der Aminosäuren ist unbekannt und in diesem Modell willkürlich.

Wer Sehpigmente machen will, braucht nicht nur Retinol 1 oder 2, sondern muß auch wissen, ob das richtige geometrische Isomere vorliegt [37]. Die Retinole haben vier CC-Doppelbindungen in der Seitenkette; jede kann in der *cis*- oder *trans*-Form vorliegen (Abb. 3). Die stabilste und vorherrschende Form ist *all-trans*. Die erste Doppelbindung an C-7 steht immer *trans*, da die sterische Hinderung zwischen den Methylgruppen an C-1 und C-9 die 7-*cis*-Bindung unmöglich macht. Die 9- und 13-*cis*-Formen sind möglich, aber die 11-*cis*-Form ist unwahrscheinlich, weil sie eine Überlappung zwischen der Methylgruppe an C-13 und dem Wasserstoff an C-10 zur Voraussetzung hat. Eine *cis*-Bindung ist immer ein Knick in der Kette, im Fall der 11-*cis*-Form ist die Kette aber wegen der sterischen Hinderung zusätzlich verdreht. Diese Abweichung von der ebenen Anordnung und die damit einhergehende Störung der Konjugation ließen erwarten, daß das Molekül instabil und deshalb kaum existent sein dürfte [37, 38].

[36] **D. Bownds**, *Nature* (London) 216, 1178 (1967).

[37] a) **R. Hubbard** u. **G. Wald**, *J. gen. Physiol.* 36, 269 (1952/1953); b) **R. Hubbard**, **R. I. Gregerman** u. **G. Wald**, *ibid.* 36, 415 (1952/1953).

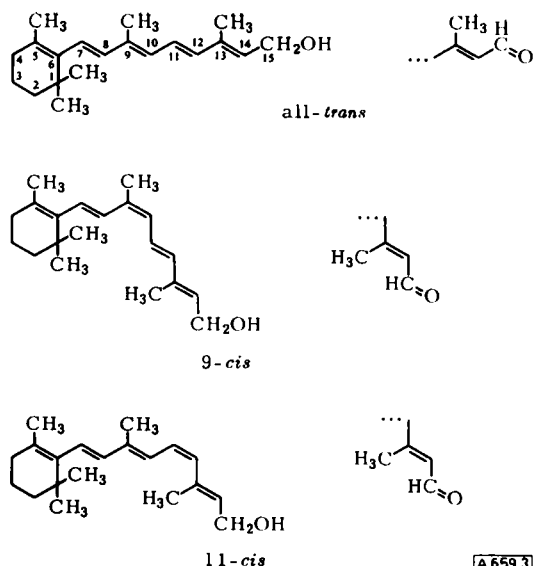


Abb. 3. Strukturen der *all-trans*-, 9-*cis* und 11-*cis*-Isomeren von Retinol₁ (links) und Retinal₁ (rechts).

Trotzdem zeigte es sich, daß 11-*cis*-Retinal, wenn man es einmal hergestellt hat, im Dunkeln recht stabil ist. Tatsächlich haben alle Sehpigmente soweit bekannt als Chromophor 11-*cis*-Retinal₁ oder 11-*cis*-Retinal₂.

Wenn ein Sehpigment allerdings durch Licht gebleicht ist, liegt alles Retinal in der *all-trans*-Form vor. Es muß zur 11-*cis*-Form reisolmerisiert werden, bevor es sich an der Regeneration des Sehpigments beteiligen kann. Demnach ist eine zyklische *cis-trans*-Isomerisierung ein entscheidender Teil jedes bekannten Sehsystems (Abb. 4).

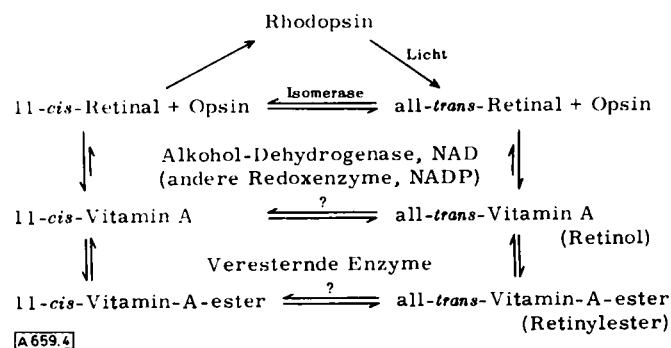


Abb. 4. Schema des Rhodopsinsystems mit dem Isomerisierungszyklus. Die Bleichung des Rhodopsins durch Licht führt zu einem Gemisch von Opsin und *all-trans*-Retinal, das zur 11-*cis*-Form isomerisiert werden muß, bevor es Rhodopsin regenerieren kann. Währenddessen wird viel *all-trans*-Retinal zu *all-trans*-Vitamin A reduziert, von dem das meiste verestert wird [18, 32b]. Diese Produkte müssen zur 11-*cis*-Form isomerisiert oder ausgetauscht werden, bevor sie sich an der Resynthese der Sehpigmente beteiligen können.

Das 9-*cis*-Isomere, dessen Molekülgestalt der des 11-*cis*-Retinals am nächsten kommt, kombiniert ebenfalls mit den Opsinen unter Bildung lichtempfindlicher Pigmente, die sich weitgehend wie die Sehpigmente verhalten [37]. Man nennt sie Isopigmente (Isorhod-

[38] a) **W. Orosnik**, **P. K. Brown**, **R. Hubbard** u. **G. Wald**, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 42, 578 (1956); b) **P. K. Brown** u. **G. Wald**, *J. biol. Chemistry* 222, 865 (1956).

opsin, Isoporphyropsin usw.)^[39]. Keines davon wurde bis jetzt unter physiologischen Bedingungen in der Retina nachgewiesen. Nach unserem jetzigen Wissen müssen die Isopigmente als Artefakte bezeichnet werden.

Als Vorbemerkung zum folgenden ist festzuhalten, daß jedes geometrische Isomere des Retinals in Lösung bei Lichteinwirkung schnell zu einem stationären Gemisch aller möglichen Formen isomerisiert. Die Isomerenverteilung hängt von der Wellenlänge des Lichtes und (mehr noch) von der Polarität des Lösungsmittels ab^[37, 38b]. In unpolaren Lösungsmitteln wie Hexan liegen 95 % als all-*trans*-Retinal vor, in polaren wie Äthanol etwa 50 % in *cis*-Formen und ein überraschend großer Teil, 25–30 %, als 11-*cis*-Retinal. Trotz der thermodynamischen Unwahrscheinlichkeit ist dies eine der am meisten begünstigten Formen des Retinals^[38b, 40].

Vor einigen Jahren haben Hubbard und Kropf gezeigt, daß die einzige Wirkung des Lichtes beim Sehen die Isomerisierung eines Sehpigment-Chromophors von der 11-*cis*- zur all-*trans*-Form ist^[41]. Alles, was dann geschieht – chemisch, physiologisch und sogar psychologisch – sind Dunkelreaktionen, Konsequenzen dieser einen Lichtreaktion.

Diesen photochemischen Schritt kann man isolieren, wenn man das Sehpigment sehr stark abkühlt. Zum Beispiel: Rhodopsin wird in einem 1:1-Gemisch von

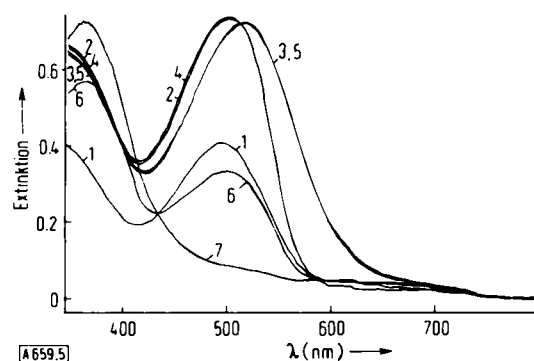


Abb. 5. Gegenseitige Umwandlung von Rhodopsin und Prälumirhodopsin durch Licht bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs. Rinder-Rhodopsin in Glycerin/Wasser 1:1 (Kurve 1) wurde auf -195°C gekühlt (Kurve 2). Bei langer Bestrahlung mit blauem Licht (440 nm) verschiebt sich das Spektrum zu (3). Das Licht hat den 11-*cis*-Chromophor des Rhodopsins isomerisiert, so daß eine stationäre Mischung von Rhodopsin und Prälumirhodopsin (all-*trans*) entstanden ist. Bestrahlung mit orangerotem Licht (600 nm) reisomerisiert den all-*trans*-Chromophor vollständig zu 11-*cis*: Jetzt liegt wieder ausschließlich Rhodopsin vor (Kurve 4). Erneute Bestrahlung mit blauem Licht führt zurück zur stationären Mischung (Kurve 5). Beim Anwärmen auf 25°C im Dunkeln wird das Prälumirhodopsin in dieser Mischung unter Zerfall in all-*trans*-Retinal und Opsin gebleicht, wobei das Retinal mit Hydroxylamin zum Retinaloxim ($\lambda_{\text{max}} = 367 \text{ nm}$) kondensiert. Das Rhodopsin der Mischung bleibt unverändert. Dieses Produkt wurde wieder auf -195°C abgekühlt und das Spektrum aufgenommen (Kurve 6). Zuletzt wurde die Mischung wieder angewärmt, wobei sie bei Belichtung unter Bildung von all-*trans*-Retinal und Opsin vollständig gebleicht wurde (Kurve 7) (nach Yoshizawa und Wald [42]).

[39] P. K. Brown u. P. H. Smith, zitiert in G. Wald, Federat. Proc. 12, 606 (1953); Amer. J. Ophthalmol. 40, 18 (1955); Mod. Probl. Ophthalmol. 1, 173 (1957).

[40] R. Hubbard, J. gen. Physiol. 39, 935 (1955/1956).

[41] R. Hubbard u. A. Kropf, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 130 (1958); Ann. New York Acad. Sci. 74, 266 (1958).

[42] T. Yoshizawa u. G. Wald, Nature (London) 197, 1279 (1963).

Wasser und Glycerin auf die Temperatur des flüssigen Stickstoffs gebracht (etwa -190°C). Das Lösungsmittel ist dann von glasartiger Struktur. Die Absorptionsbande ist enger, die Extinktionskoeffizienten werden höher, und die Maxima verschieben sich etwas nach Rot (Abb. 5)^[42].

Erschöpfende Bestrahlung mit blauem Licht verschiebt das Spektrum noch weiter nach Rot. Endprodukt ist eine stationäre Mischung, in der ein Teil als 11-*cis*-Retinal vorliegt, also das Rhodopsin. Der Rest wurde zum all-*trans*-Retinal isomerisiert, zum Photoprodukt Prälumirhodopsin ($\lambda_{\text{max}} = 543 \text{ nm}$). Strahlt man jetzt orangerotes Licht ein, verschiebt sich das Spektrum wieder zurück zur Ausgangslage: Das orange Licht hat durch Reisomerisierung des all-*trans*- zum 11-*cis*-Chromophor alles Prälumirhodopsin wieder in Rhodopsin übergeführt. Nach langer Bestrahlung mit grünem Licht kann das Spektrum nach noch kürzeren Wellenlängen verschoben werden, was auf der Isomerisierung des 11-*cis*- zum 9-*cis*-Retinal beruht. Wir kommen so zum Isorhodopsin. Bestrahlung des Isorhodopsins mit blauem Licht bringt uns zur Ausgangsmischung von Rhodopsin und Prälumirhodopsin zurück. So kann man beliebig oft ohne Verlust zwischen Rhodopsin (11-*cis*), Prälumirhodopsin (all-*trans*) und Isorhodopsin (9-*cis*) wechseln. Bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs liegt hier ein völlig reversibles System vor.

Vergleichbare Umwandlungen beobachtet man beim Tintenfisch-Rhodopsin^[43], beim Hühner-Jodopsin^[44] und beim Karpfen-Porphyropsin^[45], wie ich gerade von Yoshizawa gehört habe, der jetzt zurück nach Osaka gegangen ist. In allen diesen Fällen hat das Prälu-Photoprodukt eine intensivere Farbe als das Sehpigment selbst, obwohl es doch das erste Produkt bei dessen Bleichung ist. Das Spektrum des Photoprodukts ist gegenüber dem des Sehpigments nach Rot verschoben, und die Extinktionen sind beträchtlich höher.

Wie gesagt entsteht bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs durch Bestrahlung mit blauem Licht aus Rhodopsin eine stationäre Mischung von Rhodopsin und Prälumirhodopsin. Das letztgenannte wandelt sich bei graduellem Erwärmen im Dunkeln bei bestimmten kritischen Temperaturen in eine Folge von Zwischenstufen um – Lumirhodopsin, Metarhodopsin I, Metarhodopsin II –, die schrittweisen Änderungen der Opsinkonformation entsprechen (Abb. 6). Schließlich hydrolysiert die Schiff'sche Base, und es entstehen all-*trans*-Retinal und Opsin^[46]. Während dieser Übergänge treten neue Gruppen des Opsinmoleküls in Reaktion: zwei Thiolgruppen pro Molekül^[47] und eine protonenbindende Gruppe mit einem pK-Wert von ca. 6,6, vermutlich Imidazol^[48].

[43] T. Yoshizawa u. G. Wald, Nature (London) 201, 340 (1964).

[44] T. Yoshizawa u. G. Wald, Nature (London) 214, 566 (1967).

[45] T. Yoshizawa, persönliche Mitteilung, 1967.

[46] R. G. Matthews, R. Hubbard, P. K. Brown u. G. Wald, J. gen. Physiol. 47, 215 (1963/1964).

[47] G. Wald u. P. K. Brown, J. gen. Physiol. 35, 797 (1952/1953); 37, 189 (1953/1954).

[48] C. M. Radding u. G. Wald, J. gen. Physiol. 39, 909 (1955/1956).

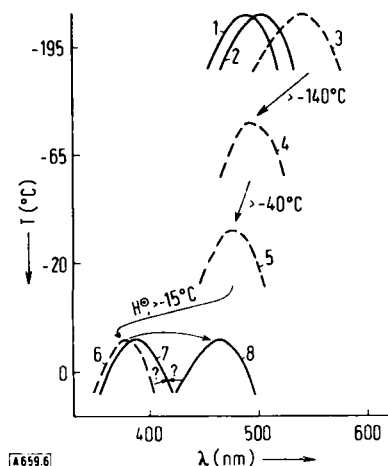


Abb. 6. Zwischenstufen bei der Bleichung des Rinder-Rhodopsins, wie sie bei Bestrahlung bei -195°C und stufenweiser Anwärmung im Dunkeln nachweisbar werden. Bestrahlung bei -195°C ergibt eine stationäre Mischung von Rhodopsin (11-*cis*) (Kurve 2) mit Prämirhodopsin (all-*trans*) (Kurve 3) und Isorhodopsin (9-*cis*) (Kurve 1) in Verhältnissen, die von der Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes abhängen. Beim Erwärmen im Dunkeln geht Prämirhodopsin bei bestimmten kritischen Temperaturen nacheinander in all-*trans*-Zwischenstufen über (Kurve 4: Lumirhodopsin; Kurve 5: Metarhodopsin I; Kurve 6: Metarhodopsin II; Kurve 8: Pararhodopsin), die schließlich in all-*trans*-Retinal (Kurve 7) und Opsin zerfallen.

Eine wirkliche Bleichung im Sinne eines Farbverlustes erfolgt vor allem zwischen den Metarhodopsinen I und II. Bevor Metarhodopsin II sich gebildet hat, muß der Sehreiz ausgelöst worden sein (Abb. 7). Bei der

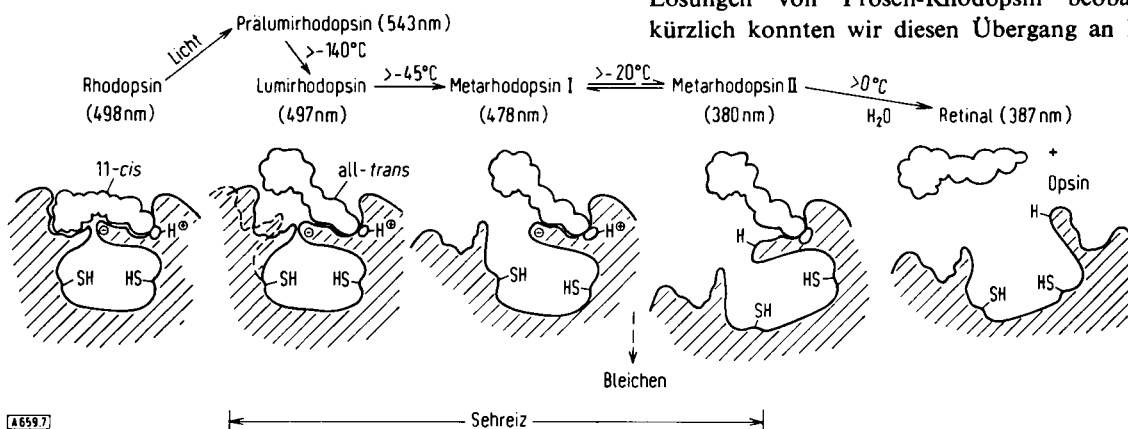


Abb. 7. Stufen der Bleichung von Rhodopsin. Der Chromophor des Rhodopsins, 11-*cis*-Retinal, paßt genau in einen Bereich der Opsinstruktur. Die einzige Wirkung des Lichtes ist die Isomerisierung des Retinals von der 11-*cis*- zur all-*trans*-Form (Prämirhodopsin). Dann öffnet sich das Opsinmolekül mehr und mehr (Lumi- und Metarhodopsine), bis die Retinal-Op sin-Bindung hydrolysiert. Die Bleichung geschieht zwischen Metarhodopsin I und II. Der Sehreiz muß vor dieser Stufe ausgelöst werden. Die Entfaltung des Opsins exponiert neue funktionelle Gruppen, darunter zwei SH-Gruppen und eine protonenbindende Gruppe. Die angegebenen Absorptionsmaxima sind für Prämirhodopsin bei -190°C , bei Lumirhodopsin bei -65°C und bei den anderen Pigmenten bei Zimmertemperatur gemessen.

Körpertemperatur der Säugetiere ist diese Stufe in etwa 1 msec erreicht^[49]. Alle folgenden Umwandlungen verlaufen viel zu langsam, um am Sehreiz beteiligt sein zu können.

Bis zum Metarhodopsin II bleibt der all-*trans*-Chromophor an der gleichen Stelle des Opsins gebunden. Solange diese Voraussetzung gegeben ist, führt die Absorption eines Photons sofort zur Regeneration des Rhodopsins (Abb. 5), indem der all-*trans*-Chromophor zum 11-*cis*-Chromophor isomerisiert wird.

[49] W. A. Hagins, Nature (London) 177, 989 (1956).

Wir haben uns angewöhnt zu sagen, das Licht bleiche die Sehpigmente. Richtig ist, daß es den Chromophor isomerisiert. Wenn dieser Prozeß ungestört bis zum Ende laufen kann, entsteht ein stationäres Gemisch der Chromophorenisomeren, deren Verhältnis zueinander von der Wellenlänge des Lichtes und der relativen Quantenausbeute der Photoreaktionen abhängt. Ein erstes Photon, das vom Rhodopsin absorbiert wird, kann den 11-*cis*- zum all-*trans*-Chromophor isomerisieren; dies ist der erste Schritt des Bleichvorgangs. Die Absorption eines zweiten Photons durch irgendeine der all-*trans*-Zwischenstufen kann den Chromophor zur 11-*cis*-Form reisomerisieren, d.h. das Rhodopsin regenerieren. Es kann aber auch die 9-*cis*-Form, Isorhodopsin, entstehen. Licht bleicht also nicht nur die Sehpigmente, sondern es kann sie oder ihre Isopigmente je nach den Umständen auch regenerieren.

Die letzten Stufen der Bleichung freilich sind noch problematisch. Unter den Bedingungen der Bildung von Metarhodopsin II – besonders wenn man Rhodopsin oder die ans Dunkle adaptierte Netzhaut einem kurzen intensiven Lichtblitz aussetzt und die Folgereaktionen im Dunkeln registriert – findet man, daß das System zum Teil in ein noch tieffarbigeres Produkt übergeht, so daß die bereits abgefallene Extinktion im Sichtbaren (Metarhodopsin II) wieder ansteigt (Abb. 6 und 8).

Diese Erscheinung habe ich schon vor langer Zeit in Lösungen von Frosch-Rhodopsin beobachtet^[50]; kürzlich konnten wir diesen Übergang an Lösungen

von Rinder-Rhodopsin und an der Frosch-Netzhaut^[46] verfolgen. Es scheint sich um den Vorgang zu handeln, den Hagins nach der Reizung isolierter Kaninchenaugen durch Licht beobachtet hat. Die farbgebende Spezies nannte er Produkt C^[49]. Dieses Produkt hat ein Spektrum wie Metarhodopsin I ($\lambda_{\text{max}} \approx 465 \text{ nm}$) und ist manchmal mit ihm verwechselt worden. Es mag hier Pararhodopsin genannt werden. Es bildet sich aus Metarhodopsin II im Dunkeln und im Licht, im letztgenannten Fall schneller.

[50] G. Wald, J. gen. Physiol. 21, 795 (1937/1938).

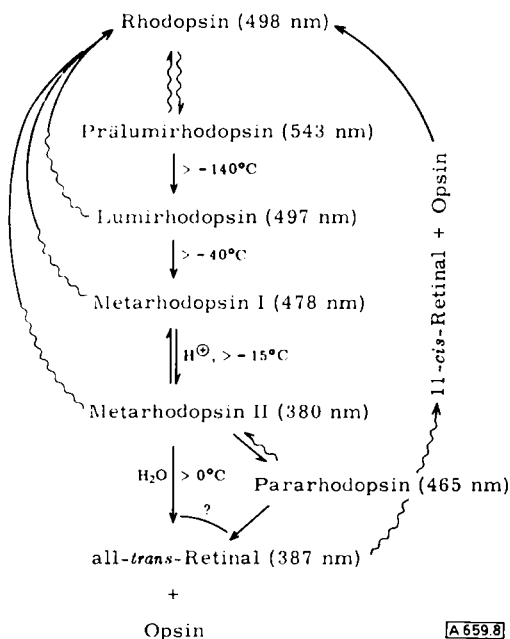


Abb. 8. Zwischenprodukte der Bleichung und Regenerierung von Rhodopsin. Gewellte Pfeile: Photoreaktionen. Gerade Pfeile: Thermische (Dunkel-) Reaktionen. Das Verhältnis des Pararhopsins zu den Endprodukten der Bleichung ist noch problematisch.

Das Licht überführt es wieder in Metarhopsin II, so daß man diese Zwischenstufe je nach Wellenlänge des Lichtes zwischen ihren beiden Erscheinungsformen hin- und herschieben kann. Im Dunkeln zerfällt Pararhopsin in Retinal und Opsin^[46]. Ob es eine entscheidende Zwischenstufe oder ein Umweg der Rhodopsinbleichung ist und ob bei Bestrahlung aus ihm direkt Rhodopsin entstehen kann, bedarf weiterer Untersuchungen^[51].

Ich muß gestehen, daß mein Interesse für solche Einzelheiten der letzten Bleichungsstufen nachgelassen hat, die noch dazu viel zu spät kommen, um mit dem Sehreiz etwas zu tun zu haben. Sie haben jetzt plötzlich neues Interesse erregt, und das kommt von einer ganz erstaunlichen Entwicklung. Dies kann ich hier hervorheben, weil ich selbst gar nichts damit zu tun

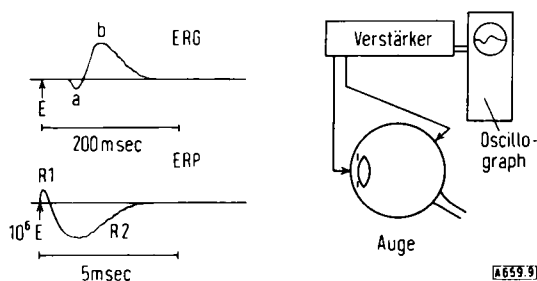


Abb. 9. Schema der Versuchsanordnung zum Aufzeichnen eines Elektretinogramms (ERG) oder zum Messen eines Frühen Receptorpotentials (ERP) an einem ans Dunkle adaptierten Vertebratenauge. Jedes dieser Signale hat einen biphasischen Verlauf mit cornea-positiven (nach oben) und cornea-negativen (nach unten) Komponenten. Im Gegensatz zum ERG zeigt das ERP keine meßbare Latenzperiode. Um bei beiden Typen eine vergleichbare Amplitude zu erhalten, muß der das ERP auslösende Blitz größenordnungsmäßig eine Million mal intensiver sein.

[51] Zitiert bei E. W. Abrahamson u. S. E. Ostroy, Progr. Biophysics molecular Biol. 17, 179 (1967); C. D. B. Bridges in M. Florkin u. E. H. Storz: Comprehensive Biochemistry. Elsevier, Amsterdam 1967, Bd. 27, S. 31.

hatte. Generationenlang sind Chemie und Elektrophysiologie des Sehens getrennte Wege gegangen. Jetzt plötzlich tauchen viele Details der Sehpigmentbleichung und -regeneration in Form einer neuen Art elektrischer Effekte auf.

Die Anordnungen zum Messen von Elektretinogrammen (ERG) sind bekannt (Abb. 9). Eine Meßelektrode an der Hornhaut und eine Bezugselektrode irgendwo im Auge oder am Körper sind über einen Verstärker an einen Oszillographen angeschlossen. Nach einem Lichtblitz beobachtet man eine Ruheperiode ohne Anzeige, die auch beim Säugetier mindestens 1,5 msec dauert und bei niedrigeren Temperaturen noch viel länger ist, danach einen biphasischen Potentialverlauf, die charakteristische a- und b-Phase des ERG. Man könnte vermuten, daß das Latenzintervall die Zeit angibt, die zum Bleichen des Sehpigments bis zur entscheidenden Stufe nötig ist, und außerdem die Zeit für sekundäre Vorgänge, etwa das Zustandekommen der nötigen Verstärkung.

Vor etwa drei Jahren haben K. T. Brown und Murakami einen neuen elektrischen Effekt gefunden, der gerade in jenes Latenzintervall fällt, („Frühes Receptorpotential“, ERP) (Abb. 9)^[52].

Er kommt ohne meßbare Verzögerung. Um ein mäßig großes ERP zu erzeugen, muß der Lichtblitz normalerweise eine Million mal stärker als zum Erzeugen eines ebenso großen ERG sein. Das ERP ist ebenfalls biphasisch. Einer kurzen cornea-positiven Phase (R1) folgt eine längere cornea-negative Phase. Bei 5 °C und darunter beobachtet man nur R1^[53].

Es wird immer klarer, daß die Quelle des ERP die Wechselwirkung des Lichts mit den Sehpigmenten selbst ist. Man erhält ein ERP an Netzhäuten, die auf -30 °C gekühlt, auf 48 °C erwärmt, in Glycerinlösungen getaucht oder in Glutaraldehyd fixiert sind. Bedingung ist lediglich intaktes – und orientiertes – Sehpigment. In den Membranen, die die äußeren Segmente der Stäbchen bilden, ist das Rhodopsin fast perfekt orientiert^[54]. Zerstört man die Orientierung durch Erhitzen, verschwindet auch das ERP^[55].

Dies wird durch ein neueres Experiment demonstriert. Hat ein Lichtblitz in einer ans Dunkle adaptierten Retina ein normales ERP hervorgerufen, dann verursacht ein zweiter Lichtblitz durch Einwirkung auf eine Zwischenstufe der Bleichung (vermutlich Para- oder Metarhopsin II), der also Rhodopsin photoregeneriert, ein biphasisches ERP umgekehrter Polarität (Abb. 10)^[56a]. Wenn also die Isomerisierung vom 11-cis- zum all-trans-Chromophor die Reaktionen steuert, die ein normales ERP auslösen, dann erzeugt

[52] K. T. Brown u. M. Murakami, Nature (London) 201, 626 (1964).

[53] Siehe Übersichtsartikel hierzu in: Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. 30, 457–504 (1965).

[54] G. Wald, P. K. Brown u. I. R. Gibbons, J. opt. Soc. America 53, 20 (1963).

[55] R. A. Cone u. P. K. Brown, Science (Washington) 156, 536 (1967).

[56] a) Ratte: R. A. Cone, Science (Washington) 155, 1128 (1967); b) Tintenfisch: W. A. Hagins u. R. E. McLaughly, ibid. 157, 813 (1967); 159, 213 (1968); c) Limulus: T. G. Smith u. J. E. Brown, Nature (London) 212, 1217 (1966).

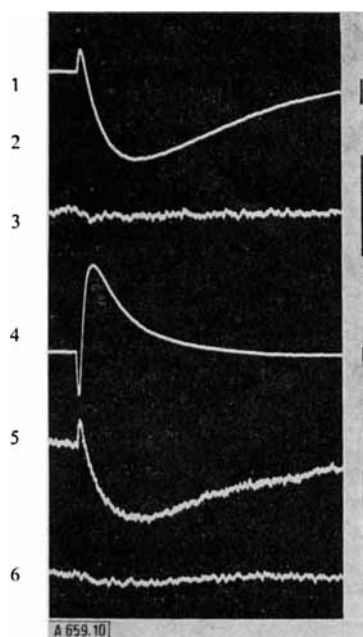


Abb. 10. Photoregeneration des Frühen Receptorpotentials (ERP) im Auge einer Albino-Ratte. Sowohl der Testblitz als auch das bleichende Licht sind aus langen Wellenlängen zusammengesetzt, so wie sie vom Rhodopsin primär absorbiert werden. Der blaue Blitz der Photoregeneration enthält Wellenlängen, wie sie von den langlebigeren Zwischenstufen der Bleichung (wahrscheinlich vor allem Metarhodopsin II und Pararhodopsin) absorbiert werden. Der Kontrollstreifen stammt von einem zweiten Auge, das dem gleichen bleichenden Licht und den Testblitzen mit Ausnahme des blauen Blitzes ausgesetzt war (bei 27 °C). Der erste Blitz (Kurve 1) erzeugt ein normales ERP. Wenn das bleichende Licht das Rhodopsin beseitigt hat (etwa bei 2), ergibt der zweite Blitz kein Signal (Kurve 3), obwohl die Verstärkung erhöht war (die Striche rechts am Rand sind ein Maß für die Verstärkung). Ein blauer Blitz, der das Rhodopsin regeneriert, erzeugt ein ERP umgekehrten Vorzeichens (Kurve 4). Der dritte Testblitz, der wieder ein normales ERP erzeugt (Kurve 5, wieder hohe Verstärkung!), zeigt, daß der blaue Blitz das Rhodopsin tatsächlich regeneriert hat. Der Kontrollblitz beweist, daß ohne eingeschobenen blauen Blitz kein Signal beobachtet wird (Kurve 6, hohe Verstärkung) (nach R. A. Cone [56a]).

die umgekehrte Isomerisierung vom all-*trans*- zum 11-*cis*-Chromophor ähnliche Potentialänderungen, aber mit umgekehrtem Vorzeichen.

Solche Experimente mit Ratten- und Tintenfisch-Netzhaut waren der erste Schritt auf dem Wege, Komponenten des ERP den Photoreaktionen bestimmter Zwischenstufen der Rhodopsinbleichung zuzuordnen [56a, 56b]. Es ist freilich kaum einzusehen, wie intramolekulare Veränderungen dieser Art, an denen vermutlich Ladungsverschiebungen beteiligt sind, Potentialänderungen zwischen Vorder- und Rückseite des Auges erzeugen können. Es gibt aber keinen Zweifel, daß sie das tun, und wir können nur hoffen, das einmal zu verstehen. Bisher gibt es keinen Beweis dafür, daß das durch Rhodopsin erzeugte ERP selbst ein Teil des Sehreizes ist. Die Wechselwirkung des Lichts mit den Zwischenstufen der Bleichung führt jedenfalls nicht zu einem Reiz und erzeugt doch verschiedene Formen früher Receptorpotentiale (ERP). Auf jeden Fall bietet das ERP ein neues und wirkungsvolles Werkzeug zum Studium der Reaktionen der Sehpigmente in situ.

Viele Jahrhunderte war der Mensch das einzige Objekt für die Erforschung der Sehvorgänge. Aus manchen Gründen ist er heute wieder das Versuchsobjekt der Wahl geworden. In vieler Hinsicht bringen Ver-

suche am Menschen einzigartige Vorteile: An anderen lebenden Objekten kann man zwar biophysikalische Ziele verfolgen, aber nur am Menschen „psychophysikalische“. Darüber hinaus ist die Genetik des Menschen heute möglicherweise besser bekannt als die jedes anderen in Frage kommenden Lebewesens. Und beim Menschen muß man Mutanten nicht mühsam aussuchen: sie melden sich selbst.

Vor einigen Jahren hat *Paul Brown* ein registrierendes Mikrospektrophotometer entworfen und gebaut, mit dem man Differenzspektren der Sehpigmente in kleinen Fragmenten der Netzhaut messen kann [57]. Damit ließen sich die Differenzspektren der stäbchenfreien Zone der menschlichen Netzhautgrube (*Fovea centralis*) messen. So wie das Spektrum des menschlichen Rhodopsins mit der spektralen Empfindlichkeit des menschlichen Stäbchen-Sehens übereinstimmt [58], so auch das Spektrum der Fovea-Pigmente mit der spektralen Empfindlichkeit des Zapfen-Sehens [59].

Jedenfalls sind die Zapfen beim Menschen die Rezeptoren der Farbreize. Seit *Thomas Young* nimmt man an, daß das normale menschliche Farbsehen trifunktionell ist. Es erfordert das Zusammenspiel dreier unabhängiger Variabler. Seit vielen Jahren herrscht die Ansicht vor, daß drei Typen von Zapfen beteiligt sind, jeder mit einem speziellen Sehpigment.

Als wir die Fovea von Menschen und Affen im Mikrospektrophotometer mit tiefrotem Licht durchstrahlten, konnten wir das rotempfindliche Pigment allein bleichen und das Differenzspektrum ($\lambda_{\max} \approx 565 \text{ nm}$) messen. Wenn rotes Licht keine weiteren Veränderungen mehr verursachte, bewirkte gelbes Licht eine erneute Bleichung mit dem Differenzspektrum ($\lambda_{\max} \approx 535 \text{ nm}$) des grünempfindlichen Pigments [59]. Vermutlich gibt es auch ein blauempfindliches Pigment, das aber mit dieser Anordnung nicht gemessen werden konnte.

Kurze Zeit später wurde es möglich, mit dem Mikrospektrophotometer die Sehpigment-Differenzspektren einzelner parafovealer Stäbchen und Zapfen aus der Netzhaut von Menschen und Affen zu messen. Solche Messungen sind zugleich und unabhängig von uns und von *Marks, Dobelle* und *MacNichol* an der Johns-Hopkins-Universität durchgeführt worden [60a, 60b]. Sie zeigten, daß die Primaten-Retina zusätzlich zu den Stäbchen mit ihrem Rhodopsin tatsächlich drei Typen von Zapfen enthält, die jeweils vorwiegend oder ausschließlich eines von drei Sehpigmenten mit $\lambda_{\max} \approx 435, 540$ bzw. 565 nm führen (Abb. 11).

Nach Bleichung im Licht kann man das rot- und das grünempfindliche Pigment durch Zusatz von 11-*cis*-Retinal im Dunkeln regenerieren [59]. Für das blauempfindliche Pigment scheint das gleiche zu gelten. Da die Sehpigmente der Primaten-Retina in Stäbchen

[57] P. K. Brown, *J. opt. Soc. America* 51, 1000 (1961).

[58] G. Wald u. P. K. Brown, *Science* (Washington) 127, 222 (1958).

[59] P. K. Brown u. G. Wald, *Nature* (London) 200, 37 (1963).

[60] a) W. B. Marks, W. H. Dobelle u. E. F. MacNichol, *Science* (Washington) 143, 1181 (1964); b) P. K. Brown u. G. Wald, *ibid.* 144, 45 (1964); c) Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. 30, 345 (1965).

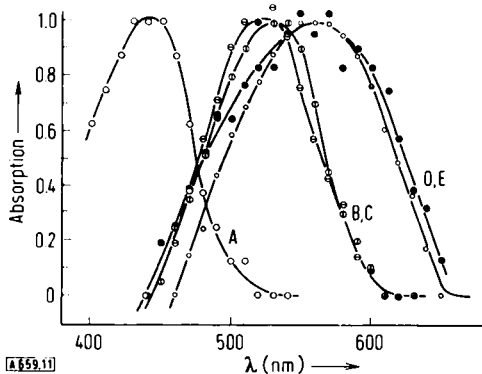


Abb. 11. Differenzspektren der Sehpigmente aus fünf parafovealen Zapfen (ein blauempfindliches (A), zwei grün- (B, C) und zwei rot-empfindliche (D, E)) vom Menschen. Jedes der Spektren wurde durch Aufnahme des „Dunkelspektrums“ und des „gebleichten“ Spektrums von 650 bis 380 nm und zurück mit dem Mikrospektrophotometer erhalten. Dann wurden die Absorptionswerte der „gebleichten“ von denen der „Dunkelspektren“ subtrahiert und die Mittelwerte gebildet. Die Absorptionswerte bei λ_{\max} (Tabelle) zeigen den Grad der Bleichung der Präparationen während der beiden Spektren-Aufnahmen. Die zweite Aufnahme (von 380 nach 650 nm) gibt wegen der Bleichung immer etwas geringere Werte (nach Wald und Brown [60c]).

Maximale Absorption:	650 → 380 nm	380 → 650 nm
A ○	0,009	0,008
B ⊖	0,013	0,008
C ⊙	0,016	0,009
D ⊕	0,021	0,020
E ●	0,016	0,015

und Zapfen anscheinend den gleichen Chromophor, 11-*cis*-Retinal, enthalten, müssen sie sich in den Opsinen unterscheiden.

Die Jodopsine ($\lambda_{\max} \approx 560$ nm) und Cyanopsine ($\lambda_{\max} \approx 620$ nm) sind unter den Tieren weit verbreitet. Jodopsin ist das Haupt-, vielleicht das einzige Zapfen-Pigment bei Huhn, Taube [30b], Katze, Schlange und Frosch [61], so wie das Cyanopsin das Zapfen-Pigment solcher Retinol₂-Tiere wie Schleie, Landschildkröte [62], einer Süßwasserschildkröte und der Kaulquappen der Frösche [63] ist. In einigen Vertebraten, deren Farbsehen untersucht worden ist, sind diese Pigmente augenscheinlich die rot-empfindlichen Komponenten. Bei Mensch und Affe ist das rot-empfindliche Pigment des Farbsehens wahrscheinlich Jodopsin [59], so wie das Cyanopsin beim Goldfisch [64] und beim Karpfen [65]. Kürzlich sind Paare von Sehpigmenten, die ähnliche Spektren wie Rhodopsin und Jodopsin haben, in zwei Krebsarten [66] gefunden worden. Auch hier scheinen die Jodopsine die rot-empfindlichen Komponenten des Farbunterscheidungsvermögens zu sein [67].

Kürzlich ist eine einfache psychophysikalische Methode zur Messung spektraler Empfindlichkeiten der

[61] Frosch: *R. Granit*, Acta. physiol. scand. 3, 137 (1942); Taube: 4, 118 (1942); Schlange: 5, 108 (1943); Katze: 5, 219 (1943).

[62] Schildkröte: *R. Granit*, Acta physiol. scand. 1, 386 (1941); Schleie: 2, 334 (1941).

[63] P. Liebman u. G. Entine, Nature (London) 216, 501 (1967).

[64] W. B. Marks, J. Physiology (London) 178, 14 (1965).

[65] T. Tomita, A. Kaneko, M. Murakami u. E. L. Pautler, Vision Res. 7, 519 (1967).

[66] G. Wald, Nature (London) 215, 1131 (1967).

[67] G. Wald, J. gen. Physiol. 51, 125 (1967/1968).

drei Gruppen von Zapfen am Menschen ausgearbeitet worden [68]. Es handelt sich um eine sehr vereinfachte Version des Verfahrens, mit dem W. S. Stiles zum erstenmal solche Empfindlichkeiten gemessen hat [69]. Bei meiner Anwendung dieser Methode ist das Auge ständig an farbiges Licht adaptiert und zwar so, daß eingestrahktes Licht einer Farbe die Empfindlichkeit von zwei der drei Farbsehmechanismen so erniedrigt, daß die Messung vor allem die Eigenschaften des dritten Mechanismus wiedergibt. Zum Beispiel: Das Auge wird intensivem gelbem Licht ausgesetzt. Dadurch wird die Empfindlichkeit der auf Rot und Grün ansprechenden Systeme so herabgesetzt, daß die Meßwerte der spektralen Empfindlichkeit vom blauempfindlichen System bestimmt werden. Ähnlich isoliert die Einstrahlung von blauem und rotem (also purpurfarbenem) das grünempfindliche, die Einstrahlung vom blauem Licht das rot-empfindliche System. Die so gemessenen Empfindlichkeitskurven kommen auf die mit dem Mikrospektrophotometer gemessenen Differenzspektren der Pigmente heraus (Abb. 12).

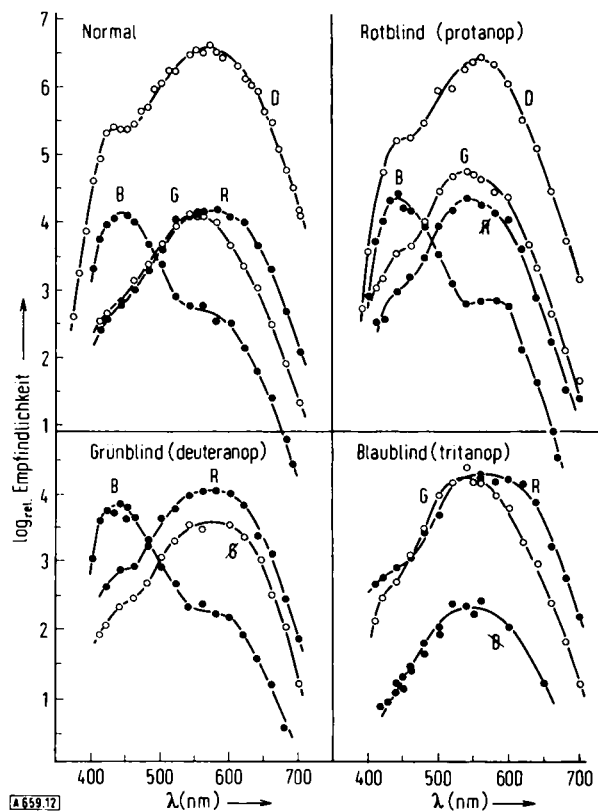


Abb. 12. Messungen der spektralen Empfindlichkeit mit einer standardisierten selektiven Adaptationsmethode im Normalfall (Trichromat) und an drei typischen Fällen der drei Klassen von Farbenblindheit (Dichromaten). Beim Normalfall ergibt die Methode die spektrale Empfindlichkeit der dunkeladaptierten Fovea (D) und die der blau-, grün- und rot-empfindlichen Systeme (B, G, R) während intensiver gelber, purpurroter bzw. blauer Lichteinstrahlung. Die drei Fälle von Farbenblindheit zeigen, daß nur zwei der drei Pigmente des Farbsehens funktionieren. In jedem Fall findet man beim Versuch, das dritte Pigment zu messen, nur die Kurve eines der beiden anderen Pigmente bei niedrigerer Empfindlichkeit. Die durchgestrichenen Symbole B, G und R geben solche Versuche, das fehlende System des farbenblinden Auges zu messen, wieder.

[68] G. Wald, Science (Washington) 145, 1007 (1964).

[69] W. S. Stiles, Nederl. Tijdschr. Natuurkunde 15, 125 (1949); Proc. Nat. Acad. Sci. USA 45, 100 (1959).

Mit dieser einfachen Anordnung kann man auch in die Ursachen der Farbenblindheit eindringen^[70]. So wie das normale Farbsehen trifunktionell (trichromatisch) ist, ist es bei der üblichen angeborenen Farbenblindheit difunktionell (dichromatisch). Theoretisch kann die Verminderung von drei auf zwei Funktionen auf viele Arten und auf jeder Stufe des Sehvorgangs eintreten. Bis jetzt habe ich ziemlich viele Dichromaten auf die geschilderte Art untersucht. Jedem von ihnen fehlte einer der drei Farbmechanismen, während die anderen beiden normal und voll funktionsfähig waren (Abb. 12). Je nachdem, welche Komponente fehlt, kann man die drei Haupttypen der Dichromaten als blau-, grün- oder rotblind charakterisieren.

Man lernt schon in der Schule, daß die Farbenblindheit durch eine geschlechtsgebundene rezessive Mutation verursacht wird. Das stimmt aber nur bei der Rot- und Grünblindheit. Ungefähr 1% der Männer sind rotblind, ungefähr 2% grünblind, während beides bei Frauen fast nie auftritt. Die Blaublichtheit ist sehr selten und nicht geschlechtsgebunden; es ist ungefähr eine von 20000 Personen betroffen, und 40% davon sind Frauen^[71].

Es gibt noch einen anderen weiter verbreiteten erblichen Farbdefekt, die Rot- oder Grünanomalie, die mit der Rot- und Grünblindheit eng verwandt ist. Menschen mit dieser Eigenschaft haben zwar ein Dreifarbensehen, aber sie machen anomale Farban- gleichungen. Die Prüfung mit meiner Methode ergab die für Rot- und Grünblinde typischen Resultate. Das zeigt, daß eine ihrer drei Farbfunktionen abnorm unempfindlich ist, so stark, daß sie mit meiner Methode nicht mehr nachweisbar ist. Dazu kommt, daß das fehlerhafte System Verschiebungen im Spektrum haben muß, um eine Erklärung für die falschen Farban- gleichungen zu geben. Im Fall eines Blaublichten mit Grünanomalie konnte die verschobene Empfindlich- keitskurve des Grün-Receptors gemessen werden^[70]. Sie lag etwa in der Mitte zwischen den normalen Kurven für Grün- und Rotempfindlichkeit, was die abnormen Farbeindrücke erklärt.

Einer der Triumphe der modernen Biologie ist der Nachweis, daß die normale Aufgabe eines Gens die Festlegung der Aminosäuresequenz eines Proteins ist. Lange Zeit konnten die Genetiker nicht entscheiden, ob an der Rot- und Grünblindheit ein oder zwei Gen- orte des X-Chromosoms beteiligt sind. Ich denke, die Tatsache, daß zwei Proteine (zwei Opsine) für die Bil- dung der rot- und grünempfindlichen Pigmente nötig sind, klärt diese Frage^[59].

Das normale Sehen des Menschen setzt die Synthese von vier Opsinen voraus: eins in den Stäbchen für die Bildung des Rhodopsins und drei in den Zapfen für die Pigmente des Farbsehens. Für jedes muß ein spezielles Gen vorhanden sein. Die Annahme ist nahe- liegend, daß zwei dieser Gene, die auf dem X-Chro- mosom dicht beieinander liegen, die Informationen für die Opsine der normalen rot- und grünempfind- lichen Pigmente enthalten (Abb. 13)^[70]. Die Rot- oder

[70] G. Wald, Proc. nat. Acad. Sci. USA 55, 1347 (1966).

[71] W. D. Wright, J. opt. Soc. America 42, 509 (1952).

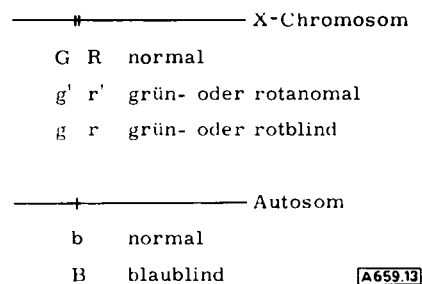


Abb. 13. Hypothetische Anordnung der Gene der drei Opsine, die zusammen mit 11-cis-Retinal das blau-, grün- und rotempfindliche Pigment (B, G, R) des menschlichen Farbsehens bilden. Es wird angenommen, daß zwei dieser Gene, R und G, auf dem X-Chromosom liegen. Mutationen dieser Gene, die die Produktion weniger effektiver Pigmente mit verschobenem Spektrum zur Folge haben, sind für Farbanomalie verantwortlich. Andere Mutationen, die die Bildung funktionsfähiger Sehpigmente unterbinden, erzeugen Farbenblindheit. Normalsichtigkeit ist dominant über Rot- oder Grünanomalie, diese über Rot- oder Grünblindheit. Die Lage des Gens für das Opsin des normalen blauempfindlichen Pigments ist unbekannt, aber die für die Blaublichtheit verantwortliche Mutation scheint eindeutig autosomal zu sein, weil die Eigenschaft ziemlich gleichmäßig bei Männern und Frauen vorkommt. Möglicherweise ist sie dominant über normal.

Grünblindheit wird wahrscheinlich durch Mutationen hervorgerufen, nach denen diese Gene die Fähigkeit der Synthese eines der beiden Pigmente verlieren.

Andere Mutationen am gleichen Genort, die die Bildung abnorm kleiner Mengen der Pigmente mit verschobenem Spektrum verursachen, mögen der Grund für die Rot- und Grünanomalie sein. Alle diese Eigenschaften werden regulär vererbt, wobei Normalsichtigkeit über Farbanomalie und diese über Farbenblindheit dominant sind, wie auch zu erwarten war. Die für die Blaublichtheit verantwortliche Mutation muß autosomal sein. Es gibt einige Beweise dafür, daß sie irregulär dominant vererbt wird, obwohl noch zu wenig Stammbäume blaublichter Patienten verfügbar sind, um die genetischen Verhältnisse zuverlässig zu charakterisieren^[72].

Neuere Arbeiten, die frühere Beobachtungen von König^[73] sowie Willmer und Wright^[74] aufgreifen, führen einen ganz anderen Aspekt der Farbenblindheit ein. Ein kleiner zentraler Bereich der normalen Fovea, der sich über einen Schinkel von 7–8' erstreckt und so kaum größer ist als das Fixierungsgebiet, ist in dem Sinne blaublicht, daß er keine funktionierenden blauempfindlichen Zapfen besitzt (Abb. 14)^[75]. Dies ist eine Angelegenheit der Topographie der Netzhaut, nicht eine Folge der Größe jenes Flecks, denn blauempfindliche Zapfen sind in gleichgroßen Bereichen an anderen Stellen der Fovea oder der peripheren Retina sehr wohl vertreten. Die Blaublichtheit, sonst die seltenste Form erblicher Farbenblindheit, scheint der Normalzustand im Fixierungsgebiet der Fovea zu sein.

Die nachgewiesene Blaublichtheit im Zentrum der normalen Fovea erinnert an die alte und oft wiederholte Beobachtung, daß andere weiter außen gelegene Be-

[72] H. Kalmus, Ann. Human Genetics 20, 39 (1955).

[73] A. König u. E. Köttgen, S.-B. dtsh. Akad. Wiss. 1894, 577; siehe auch [13], dort S. 338.

[74] E. N. Willmer, Nature (London) 153, 774 (1944); E. N. Willmer u. W. D. Wright, ibid. 156, 119 (1945).

[75] G. Wald, J. opt. Soc. America 57, 1289 (1967).

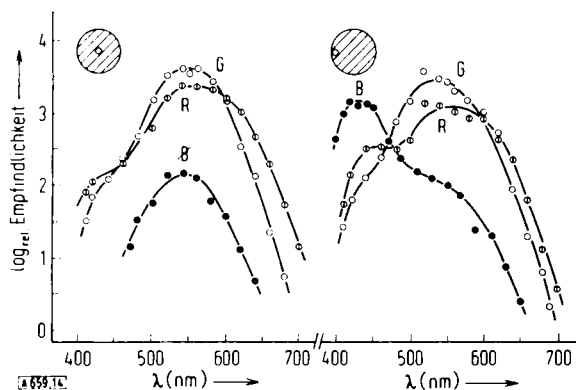


Abb. 14. Blaublicht im Fixierungsgebiet der normalen Fovea. Spektrale Empfindlichkeiten der blau-, grün- und rotsempfindlichen Zapfen (B, G, R) in einem Feld von 7,5 Winkelminuten im Mittelpunkt des Fixierungsgebietes (linke Abb.) oder 7/16 Winkelgrad außerhalb (rechte Abb.). Im Zentrum der Fovea führen, obwohl G und R gut vertreten sind, alle Versuche zur Messung von B nur zu G oder R mit niedriger Empfindlichkeit. Sobald außerhalb des Fixierungsbereichs gemessen wird, erscheint B. Zugleich nehmen G und R etwas an Empfindlichkeit ab, vermutlich wegen geringerer Zapfen-Dichte (nach Wald [75]).

reiche der normalen Netzhaut rot- oder grünblind sind, und daß Gebiete noch weiter außen total farbenblind sind (Abb. 15). Zuverlässige Farbsicht-Experimente in so weit außen liegenden Zonen sind schwierig durchzuführen; hier bleibt noch viel zu tun. Nichtsdestoweniger scheint es jetzt möglich, daß alle klassischen Formen der Farbenfehlsichtigkeit, einschließlich totaler Farbenblindheit, auf der normalen Netzhaut irgendwo vertreten sind.

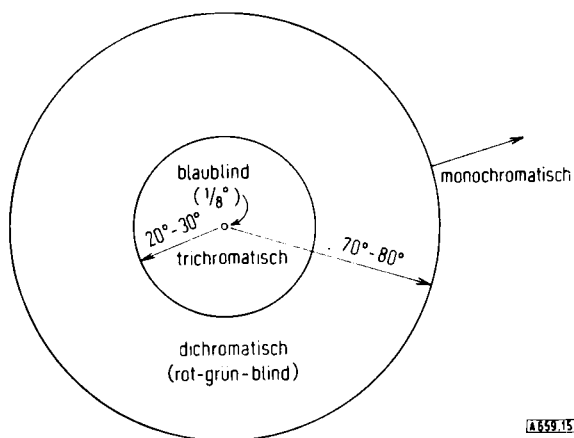


Abb. 15. Diagramm der ungefähren Verteilung der Farbfunktionen über die normale menschliche Netzhaut. Der Fixierungsbereich ist blaublind in dem Sinne, daß er keine blauempfindlichen Zapfen enthält. Ein Ring von 20–30° um ihn ist trichromatisch. Außerhalb dieses Bereichs, bis etwa 70–80°, ist die Netzhaut rot- oder grünblind, und noch weiter außen ist sie vollständig farbenblind (monochromatisch). Die Natur der peripheren Farbenblindheit muß noch erforscht werden. Doch scheint es möglich, daß alle klassischen Formen von Farbenblindheit in verschiedenen Zonen der normalen Netzhaut vorkommen.

Was wir als normale trichromatische Farbsichtigkeit betrachten, scheint die spezifische Eigenschaft lediglich eines breiten Rings der Netzhaut zu sein, der sich vom blaublindem Fixierungsgebiet der Mitte über einen Schinkel von 20–30° nach außen erstreckt (Abb. 15). Der Hauptteil der normalen Netzhaut ist farbenblind. Die Ursachen der Farbenblindheit der peripheren

Retina warten noch auf Erforschung. Man weiß noch nicht, ob hier bestimmte Klassen von Zapfen fehlen, oder ob die von den Zapfen kommenden Nervenkanäle vermindert oder verschmolzen sind.

Was auch immer die Versuche ergeben mögen, es taucht sofort ein Problem auf, das mit der erblichen Farbenblindheit kaum etwas zu tun hat: Die Frage ist nicht, welche Pigmente der Körper machen kann, sondern wie er sie und die Zellen, die sie enthalten, verteilt. Dies bringt uns von der molekularen Genetik zu Fragen der Embryogenese und der Differenzierung. Die menschliche Retina mit ihrer komplexen Topographie und ihrer Zoneneinteilung mag ein besonders geeigneter Gegenstand zum Studium solcher Probleme sein.

Wenn ich diese Betrachtungen überblicke, dann liegt mir viel an der Feststellung, daß der Photoreceptionsprozeß einige seiner bezeichnendsten Aspekte der Tatsache verdankt, daß er zwei Dimensionen verhaftet ist: Auf molekularer Ebene finden wir die zweidimensionale Anordnung orientierter Moleküle, die Membranen, die die Photoreceptions-Organellen bilden, und im Bereich der Zellen die Monoschicht der Receptorzellen, die das Mosaik der Netzhaut ergeben. In dieser Anordnung können jedes Molekül des Sehpigments und jede Receptorzelle ihre eigenen Aktivitäten anzeigen. Durch die Absorption eines einzigen Photons kann irgendein Rhodopsinmolekül unter den vielen Millionen, die ein ans Dunkle adaptiertes Stäbchen enthält, angeregt werden [76], und das Früh-Receptorpotential signalisiert im Detail die synchronen Reaktionen zahlloser Sehpigmentmoleküle.

So wie wir ausgefeilte elektrophysiologische Methoden haben, mit denen wir die Reaktionen einzelner Netzhauteneinheiten messen können, so bereitet es auch keine großen Schwierigkeiten, im lebenden Auge die Eigenschaften und das Verhalten jedes Receptortyps der Oberfläche einer so hoch differenzierten Netzhaut wie der des Menschen durch die Unterschiede der spektralen Absorption und Empfindlichkeit kennenzulernen.

Zurückschauend bedaure ich sehr, in diesem Überblick so viel Wichtiges weggelassen zu haben: Die frühen und wichtigen Studien der Photochemie des Rhodopsins beispielsweise von *Lythgoe*, *Dartnall* und *Goodeve*, *Tansleys* Digitoninmethode zur Extraktion der Sehpigmente, *Dartnalls* Feststellung, daß die Spektren aller Sehpigmente fast gleich aussehen, wenn man sie über einer Frequenzskala aufträgt, *Dentons* erste direkte Spektrophotometrie der Netzhaut, *Rushtons* und *Weales* Pionierarbeit bei den ophthalmoskopischen Messungen an den Pigmenten des Farbensehens beim Menschen, und vieles mehr.

Auf jeden Fall bin ich froh zu sehen, daß alle Teile dieser Zusammenfassung mitten in aktuelle Probleme führen, und genau das hatte ich gerne gewollt.

Eingegangen am 14. Juni 1968 [A 659]

Übersetzt von Dr. Th. Höpner, Heidelberg

[76] S. Hecht, S. Shlaer u. M. H. Pirenne, J. gen. Physiol. 25, 819 (1941/1942).