

- [53] J. A. Decker Jr., *Anal. Chem.* 44, 127 A (1972).  
 [54] P. R. Griffiths, *Anal. Chem.* 46, 645 A (1974).  
 [55] G. Horlick u. H. V. Malmstadt, *Anal. Chem.* 42, 1361 (1970).  
 [56] K. Sakai, *Appl. Opt.* 11, 2894 (1972).  
 [57] R. C. Milward, *Polytec Tech. Bull.* 1 (1972).  
 [58] R. C. Milward, *Z. Anal. Chem.* 264, 195 (1973).  
 [59] E. Knözinger, *Beckman Rep.* 1 + 2/74, 23 (1974).  
 [60] R. C. Milward, *Infrared Phys.* 9, 59 (1969).  
 [61] R. T. Hall, D. Vrabec u. J. M. Dowling, *Appl. Opt.* 5, 1147 (1966).  
 [62] J. Strong u. G. A. Vanasse, *J. Opt. Soc. Am.* 50, 113 (1960).  
 [63] M. F. Kimmit: *Far-Infrared Techniques*. Pion, London 1970.  
 [64] M. J. D. Low, *J. Chem. Educ.* 47, A 163, A 255, A 349, A 415 (1970).  
 [65] D. Ziessow: *On-line Rechner in der Chemie - Grundlagen und Anwendungen in der Fourierspektroskopie*. Walter de Gruyter, Berlin 1973.  
 [66] P. R. Roth, *Hewlett Packard J.* 21, 2 (1970).  
 [67] G. Günther, *Elektron. Datenverarbeitung* 6, 275 (1969).  
 [68] J. M. Cooley u. J. W. Tukey, *Math. Comput.* 19, 297 (1965).  
 [69] M. L. Forman, *J. Opt. Soc. Am.* 56, 978 (1966).  
 [70] G. Horlick, *Anal. Chem.* 43, 61 A (1971).  
 [71] E. G. Codding u. G. Horlick, *Appl. Spectrosc.* 27, 85 (1973).  
 [72] J. E. Hoffmann Jr., *Appl. Opt.* 8, 323 (1969).  
 [73] H. J. Sloane u. K. E. Stine, *Beckman Applications Data Sheet*, IR-8084.  
 [74] E. Knözinger, *Chem. Ztg.* 95, 983 (1971).  
 [75] H. R. Wyss, R. D. Werder u. H. H. Günthard, *Spectrochim. Acta* 20, 573 (1974).  
 [76] C. Schiele, *Beckman Rep.* 1/65, 6 (1965).  
 [77] D. F. Pensenstadler, G. L. Carlson, W. G. Fateley u. F. F. Bentley, *Spectrochim. Acta* 28 A, 183 (1972).  
 [78] M. E. Peterkin, *Appl. Spectrosc.* 25, 502 (1971).  
 [79] C. Schiele u. K. Hüljar, *Appl. Spectrosc.* 19, 163 (1965).  
 [80] K. Dabelstein u. E. Knözinger, unveröffentlicht.  
 [81] G. C. Hayward, *Appl. Spectrosc.* 23, 620 (1969).  
 [82] E. Knözinger, *Z. Anal. Chem.*, im Druck.  
 [83] H. E. Hallam: *Vibrational Spectroscopy of Trapped Species*. Wiley, London 1973.  
 [84] B. Schrader u. W. Meier: *Raman/IR Atlas*. Verlag Chemie, Weinheim 1974.  
 [85] H. Günther, *Chem. Unserer Zeit* 8, 45 (1974).  
 [86] E. Breitmaier, G. Jung u. W. Voelter, *Angew. Chem.* 83, 659 (1971); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 10, 673 (1971).  
 [87] D. A. Netzel, *Appl. Spectrosc.* 26, 430 (1972).  
 [88] T. C. Farrar, *Anal. Chem.* 42, 109 A (1970).

## Bacteriorhodopsin als Beispiel einer lichtgetriebenen Protonenpumpe<sup>[\*\*]</sup>

Von Dieter Oesterhelt<sup>[\*]</sup>

Außer den lange bekannten Sehpigmenten gibt es einen weiteren Retinal-Protein-Komplex in der Natur: das Bacteriorhodopsin aus Halobakterien. Im Gegensatz zu den Sehpigmenten, etwa den Rhodopsinen, die als Lichtsensoren des Auges wirken, fungiert das Bacteriorhodopsin als Lichtenergiewandler. Diese Funktion ist an den asymmetrischen Einbau des Bacteriorhodopsins in die Gitterstruktur der Purpurmembran gebunden, die Flecken auf der Zelloberfläche der Halobakterien bildet. Das Purpurmembransystem ist – neben dem Chlorophyllsystem – das zweite lichtenergiewandelnde Prinzip der belebten Natur. Bacteriorhodopsin wirkt als lichtgetriebene Protonenpumpe oder als wesentlicher Teil eines solchen Pumpsystems. Durch Lichtabsorption wird ein Reaktionszyklus ausgelöst, an den die räumlich gerichtete Abgabe und Aufnahme eines Protons gekoppelt ist. In der intakten Zelle wird dadurch über die Zellhülle des Bakteriums hinweg ein elektrochemischer Gradient aufgebaut, in welchem ein Teil der absorbierten Lichtenergie gespeichert ist und der nicht wie Atmung oder Photosynthese von Redoxprozessen abhängt. Dieser elektrochemische Gradient kann die Energie zur ATP-Synthese im Inneren der Zelle liefern; als Katalysatorsystem dient eine reversibel protonentranslocierende ATPase.

### 1. Einleitung

Ein Aspekt der Bioenergetik ist seit langem die Frage der biologischen Energiekonservierung und der biologischen Energieumwandlung. Die universelle Energiekonserve der Zelle ist das Adenosintriphosphat (ATP)<sup>[1]</sup>: in ihm wird chemische Energie in Form eines hohen Phosphatübertragungspotentials gespeichert, und die freie Energie der Hydrolyse seiner Phosphorsäureanhydrid-Bindungen dient zum Betreiben endergonischer Prozesse in der Zelle, beispielsweise der Biosynthese zelleigener Substanzen und der energieabhängigen Aufnahme von Nahrungsstoffen und Salzen entgegen den herrschenden Konzentrationsgradienten. Für die Energiekonservierung durch ATP-Synthese waren bislang zwei Wege bekannt:

1. die Substratketten-Phosphorylierung des Adenosindiphosphates (ADP) und

2. die Elektronentransportketten-Phosphorylierungen (oxidative und Photophosphorylierung) des ADP.

Bei der Energiekonservierung durch Substratketten-Phosphorylierung erhöhen enzymkatalysierte Reaktionen das Phosphorylierungspotential von Phosphorsäureestern, so daß schließlich ADP phosphoryliert werden kann. Energielieferant für diese Art der ATP-Bildung ist die freie Energie intramolekularer Redoxreaktionen, z. B. bei der Milchsäuregärung die Umwandlung von einem mol Glucose in zwei mol Lactat.

Bei der Energiekonservierung durch oxidative Phosphorylierung werden dagegen die Elektronen eines oxidierbaren Substrates, z. B. Lactat, über eine Kette von Zwischenträgern – Atmungskette genannt – dem Sauerstoff der Luft zugeführt. Auch hier also wird Redoxenergie in die freie Energie der Bildung einer Phosphorsäureanhydrid-Bindung im ATP-Molekül umgewandelt, doch geschieht dies in intermolekularen Prozessen. Wie die Synthese von ATP an die Oxidation eines Substratmoleküls gekoppelt ist, ließ sich bisher nicht vollständig klären. Bei der Photophosphorylierung (z. B. in Bakterien) bewirkt die Lichtabsorption in einem Chlorophyllmolekül die Abspaltung eines Elektrons, das dann über eine Elektronen-

[\*] Prof. Dr. D. Oesterhelt  
 Institut für Biochemie der Universität  
 87 Würzburg, Röntgenring 11

[\*\*] Nach einem Vortrag anlässlich der Chemiedozenten-Tagung in Düsseldorf, April 1975.

transportkette, ähnlich der Atmungskette, den Weg zum Chlorophyll zurückfindet. Wiederum ist an diesen Elektronenfluß die Phosphorylierung von ADP geknüpft. Sie wird zyklische Photophosphorylierung genannt.

Das Bacteriorhodopsinsystem, Gegenstand dieses Aufsatzes, unterscheidet sich von den bisher bekannten Typen biologi-

phosphorylierung nicht der Fall. Hier ist die ATP-Synthese an Elektronentransportprozesse gekoppelt, die von Licht oder dem negativen Redoxpotential organischer Verbindungen getrieben werden. Wie nun diese Redoxenergie in die freie Energie der Hydrolyse des ATP-Moleküls umgewandelt wird, ist Gegenstand von drei Hypothesen (Abb. 2).

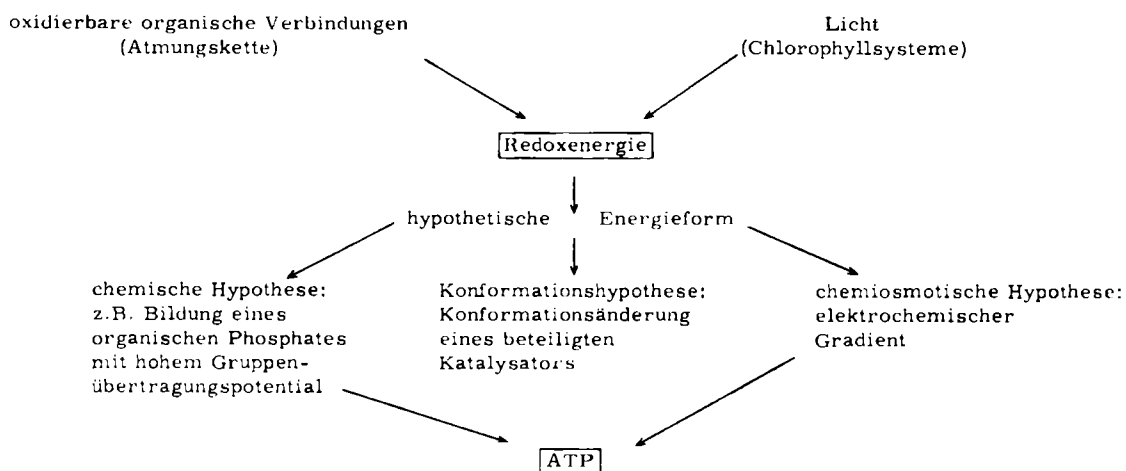


Abb. 2. Hypothesen zur Elektronentransportketten-Phosphorylierung.

scher Energiekonservierung. An seine Lichtwandlerfunktion ist weder die Erhöhung eines Phosphorylierungspotentials noch ein Elektronentransport geknüpft. Nach allem, was wir bisher wissen, wird hier die absorbierte Lichtenergie nicht erst in Redoxenergie umgewandelt, sondern direkt in die Energie eines elektrochemischen Gradienten, der dann die ATP-Synthese treibt. Bevor im Detail auf das Bacteriorhodopsin als lichtgetriebene Protonenpumpe eingegangen wird, soll der grundsätzliche Unterschied zwischen Substratketten-Phosphorylierung und Elektronentransportketten-Phosphorylierung noch etwas näher besprochen werden.

## 2. Wege der ATP-Bildung

Als Beispiel einer Substratketten-Phosphorylierung sei die Bildung von Phosphoenolpyruvat (2) aus 2-Phosphoglycerinsäure (1) durch Dehydratisierung und die anschließende ATP-Bildung unter Freisetzung von Pyruvat (4) angeführt (Abb. 1). Das hohe Phosphorylierungspotential des Phosphoenolpyruvates beruht auf der großen Umwandlungstendenz der entstehenden Enolform (3) des Pyruvates in die Ketoform (4). Die freie Energie der Hydrolyse von ATP beträgt 7 kcal/mol, die des Phosphoenolpyruvates jedoch 12 kcal/mol.

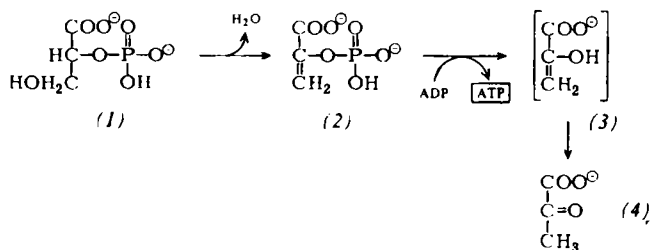


Abb. 1. Bildung von ATP aus Phosphoenolpyruvat (2) und ADP als Beispiel einer Substratketten-Phosphorylierung.

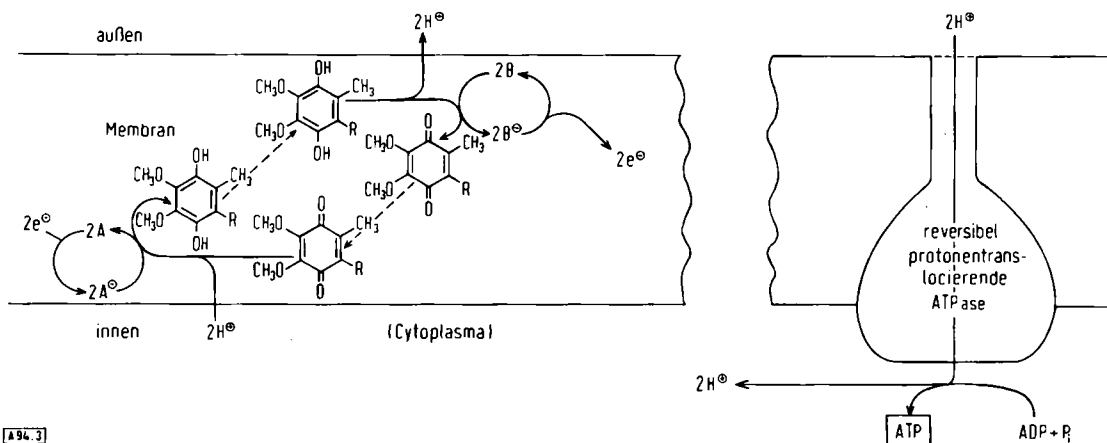
Während wir es bei der Substratketten-Phosphorylierung mit durchschaubaren und dem Chemiker geläufigen Reaktionen zu tun haben, ist dies bei der oxidativen oder der Photo-

Die „chemische Hypothese“ besagt, daß organische Phosphate ihr Phosphorylierungspotential zugleich mit ihrem Redoxzustand verändern und deswegen imstande sind, ADP zu phosphorylieren.

Nach der Konformationshypothese sind bei einigen der an Elektronentransportketten beteiligten Proteinen, z. B. Cytochromen, Konformationsänderungen an den Redoxzustand gekoppelt. Wie bei der chemischen Hypothese soll hier eine Protein-Phosphat-Verbindung im oxidierten Zustand ein höheres Phosphorylierungspotential besitzen als im reduzierten und deshalb ADP phosphorylieren können.

Die dritte Hypothese, die heute mehr und mehr Anerkennung findet, ist die chemiosmotische Hypothese von Mitchell<sup>12)</sup>. Er nimmt an, daß die bei der Oxidation des organischen Substrates freiwerdende Energie in einen elektrochemischen Gradienten zwischen Zellinnerem und Zelläußeren umgewandelt wird, d. h. im Gegensatz zu den beiden anderen Hypothesen existiert hier kein chemisch faßbares Intermediat zwischen der Oxidation des Substrates und der Bildung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat. Diese Reaktion findet an einem Enzymkomplex statt, der unter Abbau des elektrochemischen Gradienten die Bildung der Phosphorsäureanhydrid-Bindung katalysiert.

Abbildung 3 zeigt die Voraussetzungen für Energieumwandlung und -konservierung nach der chemiosmotischen Hypothese. Alle Elektronentransportketten-Phosphorylierungen laufen nur an Membranen ab: bei Bakterien an der Zellmembran, bei höheren Zellen an der inneren mitochondrialen Membran. Am einfachsten wird eine Membran als Lipid-Protein-Mischphase definiert, die zwei wasserhaltige Reaktionsräume voneinander trennt und semipermeabel ist. In dieser Phase sind die Katalysatoren (A, B) der Elektronentransportkette asymmetrisch verteilt, d. h. sie liegen mehr dem inneren oder mehr dem äußeren Reaktionsraum zu. Wesentlich ist ferner das Vorhandensein diffundibler „Protonentransporteur“ wie Chinone und Hydrochinone in der Membran. Abbildung 3 zeigt den Ausschnitt einer Elektronentransportkette, in der – von links nach rechts – Elektronen einen Katalysator A



[A94.3]

Abb. 3. Beispiel einer Elektronentransportketten-Phosphorylierung (nach Mitchells chemiosmotischer Hypothese) (Einzelheiten siehe Text). Als notwendige Voraussetzungen gelten: 1. Vorhandensein einer trennenden Membran, 2. Asymmetrische Verteilung der Katalysatoren (A, B) in der Membran, 3. Vorhandensein diffundibler Protonentransporteur (hier: Ubichinon = Coenzym Q). Die gestrichelten Pfeile zwischen den beiden (gleichen) Chinon- und Hydrochinonmolekülen sollen die Diffusion dieser Moleküle andeuten.

auf der „Innenseite“ der Membran zu  $A^-$  reduzieren. Dieser wird von einem Chinon reoxidiert, das dazu zwei Protonen aus dem Cytoplasma der Zelle aufnimmt und in sein korrespondierendes Hydrochinon übergeht. Das Hydrochinon diffundiert frei in der Membran und kann so an der „Außenseite“ der Membran von B, einem zweiten Katalysator der Atmungskette, zum Chinon reoxidiert werden. Hierbei werden zwei Protonen an das Außenmedium abgegeben; das Chinon kehrt in den Kreislauf zurück. Die Elektronen werden über weitere Zwischenkatalysatoren dem Endelektronenacceptor zugeleitet. Als solcher fungiert häufig Sauerstoff; manche Organismen benutzen jedoch auch Nitrat, Sulfat oder sogar organische Substanzen für diesen Zweck. Abbildung 3 illustriert also den Teilschritt eines Zweielektronentransfers, an den der Transport von zwei Protonen aus der Zelle durch die Membran nach außen strikt gekoppelt ist.

Welches Resultat hat nun dieser Protonentransport? Wäre die Membran für Ionen undurchlässig, hätte dies zur Folge, daß die Änderung des Redoxpotentials während der Oxidation eines Substrates vollständig in ein Membranpotential umgewandelt würde. Dieses Membranpotential ist das elektrostatische Feld, das durch die transportierten Protonen aufgebaut wird. Solche Potentialunterschiede zwischen Zellinnerem und Zelläußerem können etwa 300 Millivolt erreichen. Berücksichtigt man, daß nur die etwa 30 Å dicke Lipidphase der Membran die Ladungen voneinander isoliert, so müßten die Feldstärken in der Größenordnung von 100000 Volt/cm liegen, d. h. sehr groß sein.

Betrachtet man nun einen zweiten, realen Fall, in dem die Zellmembran für Protonen kaum, für andere Kationen, z. B. Kalium-Ionen, aber besser permeabel ist. Diese Permeabilität beruht auf passiver Diffusion und kann durch Ionentransporteur wie cyclische Antibiotika oder natürliche Carrier erhöht werden (erleichterte Diffusion). Die treibende Kraft für den Einstrom von Kalium-Ionen (oder anderen Kationen) ist immer das von der elektronentransportgetriebenen Protonenpumpe erzeugte elektrostatische Feld. Je nach den Permeabilitätsverhältnissen in der trennenden Membran wird sich das chemische Potential der ausgepumpten Protonen

$$\Delta\mu_H^+ = F\Delta\psi - 2.3RT\Delta(\text{pH})$$

mit verschiedenem Gewicht auf zwei Größen verteilen: Das Membranpotential (elektrostatische Feld) und den Konzentra-

tionsgradienten. Nach der chemiosmotischen Hypothese wird also die elektromotorische Kraft in eine „protomotorische“ Kraft

$$\Delta p = \Delta\psi - Z\Delta(\text{pH}) [\text{mV}]; \quad Z = 59$$

umgewandelt, die die freie Energie für die ATP-Synthese im Inneren der Zelle liefert. Hierzu werden die zuvor ausgepumpten Protonen durch ein Enzymsystem, die reversibel protonentranslocierende ATPase, in die Zelle unter ATP-Synthese zurückgeschleust (Abb. 3). Der Gesamtprozeß der Energiekonservierung umfaßt somit zwei Teilschritte:

1. Protonen werden in einer von Redoxprozessen getriebenen Pumpaktion aus der Bakterienzelle ausgeschleust und bauen einen elektrochemischen Gradienten auf.
2. Die Energie der rückströmenden Protonen wird zur enzymatischen Synthese des Adenosintriphosphates benutzt.

Tabelle 1. Einige ATPasen, deren gemeinsame katalytische Eigenschaft die Kopplung des elektrochemischen Potentials eines Ions an das ATP-Hydrolyse, Synthese-Gleichgewicht ist.

Name	Vorkommen	Funktion
$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase	Sarkoplasmatisches Reticulum (Muskel)	Regulation des Ca-Spiegels im Muskel
$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase	Zellmembran, z. B. Nervenzellen	Aufrechterhaltung des hohen intrazellulären K-Spiegels
$\text{H}^+$ -ATPase	Mitochondrien, Bakterien	ATP-Synthese

Die reversibel protonentranslocierende ATPase ist nicht das einzige Enzymsystem, das einen elektrochemischen Gradienten mit Synthese und Hydrolyse von ATP zu koppeln vermag<sup>[2a]</sup>. Sowohl bei der „Calciumpumpe“ des sarkoplasmatischen Reticulums im Muskel als auch bei der „Natrium-Kalium-Pumpe“ in Plasmamembranen konnte eine ATP-Synthese auf Kosten eines Ionengradienten nachgewiesen werden. Physiologisch gesehen ist es jedoch die Aufgabe der Calcium- und der Natrium-Kalium-Pumpe, einen Ionengradienten durch ATP-Hydrolyse zu erzeugen, der Protonenpumpe dagegen, einen solchen Ionengradienten zur ATP-Synthese zu nutzen (Tabelle 1). Der enzymatische Vorgang dieser Energiekopplung ist eines der zentralen ungelösten Probleme der Biochemie. Auch die Wirkungsweise der vom Elektronentransport getriebenen Protonenpumpe ist noch nicht bekannt.

Kehren wir nun zum Bacteriorhodopsinsystem zurück! Bacteriorhodopsin kann wie die Elektronentransportkette der Photosynthese als eine lichtgetriebene Protonenpumpe bezeichnet werden, die – eingebettet in die Zellmembran – ebenfalls einen elektrochemischen Gradienten aufbaut, der zur ATP-Synthese in der Zelle benutzt wird<sup>[3]</sup>. Neu an diesem System ist auch nicht die primäre Energiequelle – es ist das Licht wie in grünen Pflanzen oder photosynthetisierenden Bakterien. Neu dagegen ist die Wirkungsart dieser Pumpe, denn sie ist nicht an Elektronenflüsse gebunden. Ein Zyklus von Konformationsänderungen des Bacteriorhodopsins, der der Lichtabsorption folgt, übt die Pumpwirkung bezüglich der Protonen aus.

### 3. Vorkommen, Isolierung und Struktur der Purpurchromatophorenmembran

Halobakterien, in denen Bacteriorhodopsin gefunden wird, sind sehr bemerkenswerte Organismen. Diese Bakterien leben nur in Kochsalzlösungen höchster Konzentration und überleben sogar in kristallinem Salz. Entdeckt wurden sie um die Jahrhundertwende auf getrocknetem Salzfish in Skandinavien, der aufgrund seiner rötlichen Färbung als verdorben galt<sup>[4]</sup>.

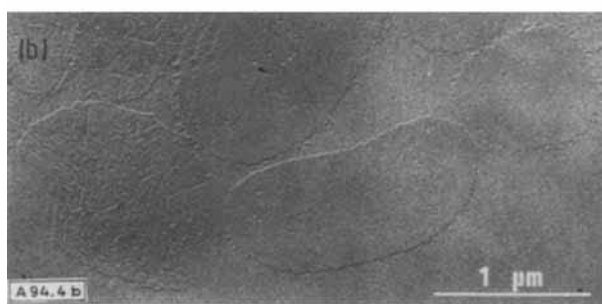


Abb. 4. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Purpurchromatophorenmembranen (*Halobacterium halobium*). a) Purpurchromatophorenmembranstücke in ganzen Zellen. Die Oberfläche der Flecken erscheint glatt oder rau, je nachdem, ob die Innen- oder die Außenseite einer Zelle dargestellt wird. Zugleich zeigt sich die starke strukturelle Asymmetrie der Membranflecken (nach [7]). b) Isolierte Purpurchromatophorenmembranblätter, die auf frisch gespaltenen Glimmer gesprüht und dann mit Platin/Kohle bedampft wurden (Aufnahme M. Clavier).

In Meerwasserbecken zur Salzgewinnung oder austrocknenen Meerarmen erreichen Halobakterien hohe Zelldichten, die ausgedehnte Rotfärbungen, bedingt durch die Carotinoidpigmente, verursachen. Ungewöhnliche Eigenschaften sind für diese Bakterien die Regel. So besitzen sie eine Zellwand, die nur aus Proteinaggregaten aufgebaut ist und der Zellmembran

von außen aufsitzt. Die stäbchenförmigen Zellen haben einen Durchmesser von etwa 0,5  $\mu\text{m}$  und eine Länge von 5–10  $\mu\text{m}$ . Betrachtet man die Zelloberfläche, nachdem man die Wand mit Hilfe der Gefrierätztechnik entfernt hat, so sieht die Zellmembran nicht homogen aus, sondern hat Flecken mit einem Durchmesser von etwa 0,5  $\mu\text{m}$  (Abb. 4a). Ein günstiger Umstand macht es möglich, diese Flecken präparativ zu isolieren und im Reagensglas zu untersuchen: Werden Halobakterien reinem Wasser ausgesetzt, so lysieren die Zellen, und die Zellmembranfragmente lassen sich mit einfachen Zentrifugationsmethoden voneinander trennen<sup>[5, 6]</sup>.

Die schwerste Fraktion, die Purpurchromatophorenmembranfraktion, ist violett. Sie besteht aus Membranblättern mit einem Durchmesser von etwa 0,5  $\mu\text{m}$ . Physikalische Untersuchungen von *Blaurock* und *Stoeckenius* haben gezeigt, daß es sich hierbei um die vorher erwähnten Flecken handelt, die in die Zellmembran als differenzierte Regionen eingestreut sind<sup>[7]</sup>. Diese Purpurchromatophorenmembran ist aus 75 % Protein und 25 % Lipid zusammengesetzt. Der Proteinanteil besteht aus einer einzigen Spezies, dem Bacteriorhodopsin, dessen Molekulargewicht etwa 26000 Dalton beträgt. Die Verschiedenheit der inneren und äußeren Membranoberfläche wird dadurch augenfällig, daß die Risse nur in der Hälfte der Membranblätter auftreten (Abb. 4b).

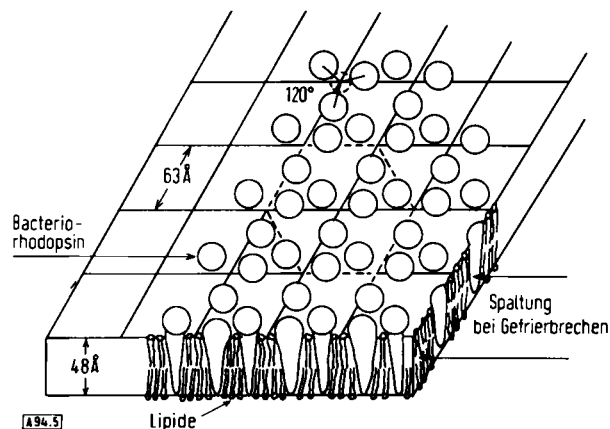


Abb. 5. Schematische Darstellung der Purpurchromatophorenmembranstruktur nach *Blaurock*, *Stoeckenius* und *Henderson* [7–9].

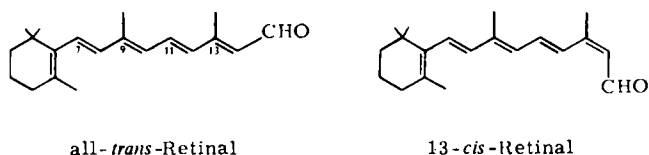
Abbildung 5 faßt schematisch zusammen, was heute über den Aufbau der Purpurchromatophorenmembran bekannt ist. Bacteriorhodopsin ist in Gruppen von je drei Molekülen an den Punkten eines zweidimensionalen hexagonalen Gitters angeordnet. Die Purpurchromatophorenmembran ist nur etwa halb so dick wie andere Membranen; dies betont, wie schon die periodische Anordnung des Proteins, daß es sich bei der Purpurchromatophorenmembran keinesfalls um eine normale biologische Membran handelt. Wie in Abbildung 5 angedeutet, überspannen die Proteinmoleküle den gesamten Querschnitt der Membran oder zumindest einen großen Teil davon; jedes Bacteriorhodopsinmolekül ist ausgeprägt unsymmetrisch, und alle diese Moleküle sind in der gleichen Richtung orientiert. Neueste Untersuchungen von *Blaurock* und *Henderson* haben ergeben, daß ein erheblicher Teil des Proteins in Helixform vorliegt und daß diese Helices senkrecht zur Membranebene angeordnet sind<sup>[8, 9]</sup>. Die Ungleichverteilung des Proteins auf die beiden Oberflächen der Membran – etwa zwei Drittel entfallen auf die eine und ein Drittel auf die andere Seite – läßt sich mit der Gefrierbrechmethode und anschließender elektronenoptischer Betrachtung der Abdrücke demonstrieren. Die hexagonale Struktur der

Purpurmembran kann auch sichtbar gemacht werden, wenn Membranblätter, z. B. an Glimmer adsorbiert, getrocknet und mit Platinkohle beschattet werden. Durch Schrumpfen reißt die Membran in Richtung der hexagonalen Achsen; dies ist an Rissen zu erkennen, die einander parallel sind oder Winkel von 60 oder 120° miteinander bilden (vgl. Abb. 4b).

Zusammenfassend läßt sich zunächst feststellen, daß Bacteriorhodopsin asymmetrisch in der Zelloberfläche des Bakteriums in Form zweidimensional kristalliner Aggregate organisiert ist und daß diese gleichförmige Orientierung in der Membranstruktur eine entscheidende Voraussetzung für die Funktion des Moleküls als Protonenpumpe ist.

#### 4. Der Chromophor des Bacteriorhodopsins und sein photochemischer Zyklus

*Halobacterium halobium* ist das bisher einzige Bakterium, in dem Vitamin-A-Aldehyd (Retinal) nachgewiesen wurde. Diese Substanz tritt sonst nur in Organismen auf, die über Sehkraft verfügen.



Retinal, das ein Absorptionsmaximum im nahen UV bei 380 nm besitzt, ist im Bacteriorhodopsin kovalent an das Protein Bacterio-Opsin gebunden. Durch Wechselwirkung mit Aminosäureseitenketten des Proteins bildet Retinal mit diesen einen Chromophor, der ein weit nach Rot verschobenes Absorptionsmaximum bei 560 nm hat und der Membran die purpurviolette Farbe verleiht (Abb. 6). Die chemische Struktur dieses Chromophors ist unbekannt. Er wird Purpurkomplex genannt und entsteht beim Zusammengeben von Retinal und Bacterio-Opsin auch im Reagensglas. Die Spezifität ist hierbei stark ausgeprägt; nur 13-cis- und all-trans-Retinal ergeben den Chromophor<sup>[10]</sup>.

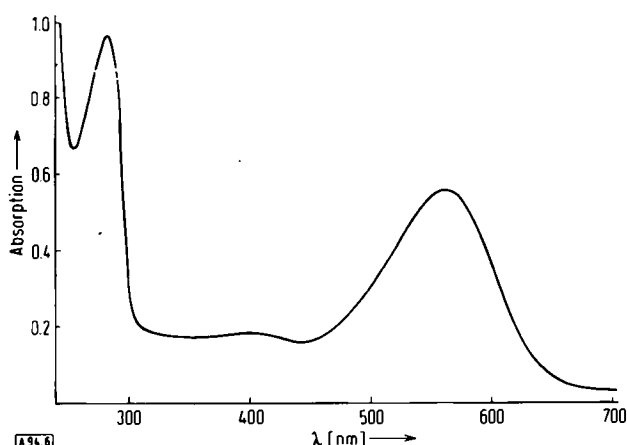


Abb. 6. Absorptionsspektrum der Purpurmembran.

Dies ist ein klarer Unterschied zu den Sehpigmenten, deren Chromophor nur mit 9-cis- oder 11-cis-Retinal, dem physiologischen Retinalisomer, gebildet werden kann. Die Sehpigmente als Lichtsensoren besitzen eine völlig andere Funktion als der Lichtenergiewandler Bacteriorhodopsin; dafür könnte die Anwesenheit der verschiedenen Retinalisomere verantwortlich sein.

Die primären photochemischen Reaktionen in den Sehpigmenten und im Bacteriorhodopsin ähneln sich. Das vom Chromophor absorbierte Lichtquant verändert nicht nur den Chromophor selbst, sondern auch die ihn umgebende Proteinstruktur. Diese Konformationsänderung löst bei den Sehpigmenten den Sehvorgang aus, beim Bacteriorhodopsin führt sie zu einem Produkt, das innerhalb von Millisekunden wieder in den ursprünglichen Chromophor übergeht, d. h. Bacteriorhodopsin unterliegt einer thermoreversiblen photochemischen Reaktion. Sehpigmente zeigen diese Thermoreversibilität nicht; dieser Unterschied ist sehr wahrscheinlich durch 11-cis-Retinal als Bestandteil dieser Retinal-Protein-Komplexe bedingt. Licht induziert die Isomerisierung der thermodynamisch instabilen (weil sterisch gehinderten) 11-cis-Verbindung in die all-trans-Form, die jedoch den ursprünglichen Chromophor nicht zurückbilden kann. Erst die Bereitstellung von externem 11-cis-Retinal führt zur Regeneration des Sehpigmentes Rhodopsin<sup>[11]</sup>.

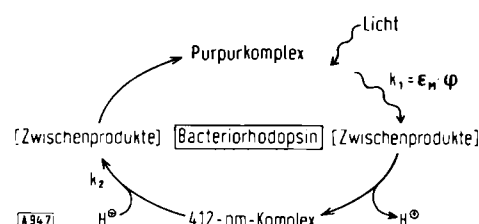


Abb. 7. Der photochemische Zyklus des Bacteriorhodopsins.

Abbildung 7 faßt die thermoreversible photochemische Reaktion des Bacteriorhodopsins zu einem Zyklus zusammen und hebt zwei Zustände des Chromophors oder Chromoproteins besonders hervor: den Purpurkomplex (oder 560-nm-Komplex) und den 412-nm-Komplex. Lichtabsorption durch den Purpurkomplex ( $\epsilon_M = 63000$ ) führt mit einer Quantenausbeute ( $\phi$ ) von etwa 0.8 über eine oder mehrere Zwischenstufen zum 412-nm-Komplex, das langlebige Zwischenprodukt der zyklischen Reaktionsfolge. Von ihm führt eine Reaktion zurück zum Ausgangszustand.

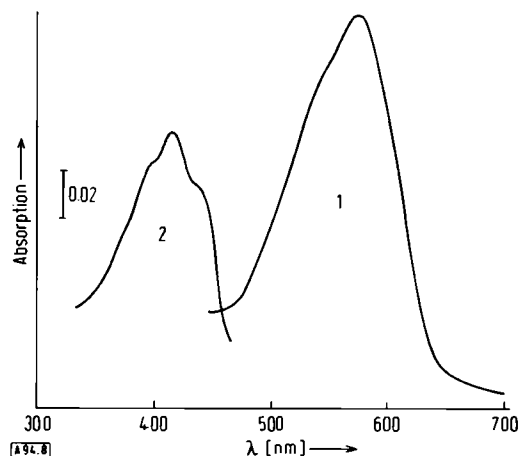


Abb. 8. Absorptionsbanden des Bacteriorhodopsin-Chromophors in zwei Zuständen (ausgefroren bei  $-196^\circ\text{C}$ ): 1 im Dunkeln der Purpurkomplex, 2 im Licht das langlebige Zwischenprodukt (412-nm-Komplex) des photochemischen Zyklus.

Unter geeigneten Belichtungsbedingungen bilden Purpurkomplex und 412-nm-Komplex ein quasistationäres Gemisch, dessen spektrale Charakteristik in einem Rapispektroskop aufgezeichnet werden kann. In Abbildung 8 werden die Ab-

sorptionsbanden der beiden Chromophorzustände verglichen. Wenn sich auch am photochemischen Zyklus des Bacteriorhodopsins (B) mehr als zwei Zustände des Proteins beteiligen, so genügen doch zur Ableitung des Geschwindigkeitsgesetzes dieses Reaktionszyklus die Geschwindigkeitskonstanten der Bildungs- und der Zerfallsreaktion des langlebigsten Zwischenproduktes (412-nm-Komplex):

$$V = \frac{k_2 \cdot [B]}{1 + k_2 / (\varepsilon \cdot \varphi \cdot J)} \quad V_{\max} = k_2 \cdot [B]$$

$$k_1 = \varepsilon_M \cdot \varphi$$

Die Bildungsgeschwindigkeit des 412-nm-Komplexes wird nur von seiner Konzentration bestimmt, die ihrerseits von der Lichtintensität (J) und der Konzentration des Purpurkomplexes abhängt. Die Situation ähnelt einer klassischen Michaelis-Menten-Beziehung zwischen der Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion und der Substratkonzentration: Nur ist im Falle des Bacteriorhodopsins (B) die Substratkonzentration durch die Lichtintensität ersetzt. Wird die Lichtintensität gesteigert, so nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit zu, bis sie einen konstanten, von der Lichtintensität unabhängigen (aber temperaturabhängigen) Wert  $k_2 \cdot [B]$  erreicht hat. Dieser ist der Wechselzahl eines Enzyms analog und läßt sich experimentell als  $k_2$  bestimmen. Demnach wird der Zyklus im Bacteriorhodopsin bei Raumtemperatur und Lichtsättigung etwa 200mal pro Sekunde durchlaufen.

Zwei weitere Eigenschaften des photochemischen Zyklus sind in diesem Zusammenhang erwähnenswert. Unter natürlichen Belichtungsbedingungen läuft der Zyklus lichtlimitiert ab, d. h. er erreicht nicht seine Maximalgeschwindigkeit. Außerdem gibt es aus dem 412-nm-Komplexzustand eine photochemische Rückreaktion zum Purpurkomplex<sup>[12]</sup>.

Unter geeigneten experimentellen Bedingungen lassen sich auch die unterschiedlichen Eigenschaften der Purpurkomplexform und der 412-nm-Komplexform des Bacteriorhodopsins aufzeigen<sup>[13]</sup>. Es sind dies die folgenden:

1. Unterschiedliche Tryptophanfluoreszenz. Sie deutet auf Konformationsunterschiede der beiden Formen hin.

2. Unterschiedliche Reaktivität des Chromophors gegenüber Hydroxylamin und Hydridoborat. Nur der 412-nm-Komplex (oder auch eines der anderen Zwischenprodukte) reagiert unter Abspaltung von Retinaloxim oder irreversibler Fixierung eines Retinylrestes an das Protein. Auch dieses Verhalten kann auf eine unterschiedliche räumliche Anordnung des Proteins in der Umgebung des Chromophors und/oder eine Veränderung der elektronischen Struktur des Chromophors zurückgeführt werden. In diesem Zusammenhang ist die Verschiedenheit der Spektren beider Formen bemerkenswert (vgl. Abb. 8). Während der Purpurkomplex das typische Spektrum einer Retinalverbindung zeigt, besitzt der 412-nm-Komplex ein dreigipfeliges Spektrum, das typisch für *retro*-Retinale ist<sup>[12]</sup>, d. h. Retinale, in denen die Doppelbindungen um eine Position verschoben sind.

3. Unterschiedlicher Energieinhalt. Ein Teil der absorbierten Lichtenergie wird im 412-nm-Komplex gespeichert, erkenntlich an seiner vollständigen Umwandlung in den Purpurkomplex im Dunkeln.

4. Unterschiedliche pK-Werte. Entscheidend für die Funktion des Bacteriorhodopsins als Ionenpumpe ist die Verschiebung von pK-Werten des Proteins beim Wechsel zwischen

beiden Formen. Beim Übergang in den 412-nm-Komplex werden Protonen freigesetzt und entsprechend bei der Regeneration des Purpurkomplexes wieder aufgenommen.

Der photochemische Zyklus des Bacteriorhodopsins ist also von der aufeinanderfolgenden Abgabe und Wiederaufnahme eines Protons begleitet. Die absorbierte Lichtenergie von etwa 50 kcal/mol wird auf das Bacteriorhodopsin und das Proton verteilt. Ein Teil geht auf den 412-nm-Komplex über und treibt den photochemischen Zyklus, der andere Teil ermöglicht es dem Proton, den elektrochemischen Gradienten aufzubauen. Es ist weiter zu erwarten, daß das Proton das Proteinmolekül nicht dort verläßt, wo in der Folge ein anderes Proton aufgenommen wird, d. h. daß jedes einzelne Bacteriorhodopsinmolekül (u. U. auch ein definiertes Assoziat von Protein und Lipid) eine molekulare Pumpe ist. Allerdings wird ein Nettoeffekt der Protonenabgabe erst zu beobachten sein, wenn die Bacteriorhodopsinmoleküle nicht statistisch angeordnet vorliegen, sondern wie in der Zellmembran alle die gleiche Orientierung besitzen.

Ein artifizielles, sehr einfaches System simuliert die Verhältnisse in der Zelle und erlaubt, Bacteriorhodopsin als Protonenpumpe zu untersuchen. Wie Racker und Stoekenius als erste gezeigt haben, gelingt es, die Purpurmembran mit Lipidfilmen so zu verschmelzen, daß einerseits die Orientierung des Bacteriorhodopsins erhalten bleibt, andererseits sich ein Vesikel (Proteoliposom) bildet, das ein von der Lösung abgetrenntes Volumen einschließt und damit als Modell einer Zelle betrachtet werden kann<sup>[14]</sup>. Werden solche Proteoliposomen belichtet, so wird das äußere Medium alkalisch, d. h. das Bacteriorhodopsin pumpt Protonen in diese Vesikel. Nach Abschalten des Lichtes fließen die Protonen wieder aus den Vesikeln heraus, so daß der pH-Wert der Außenlösung auf seinen ursprünglichen Wert zurückkehrt (Abb. 9a). Da diese Proteinlipidvesikel zu klein sind, um eine pH-Messung im Inneren zu erlauben, muß man zu einer indirekten Methode greifen, um den pH-Gradienten nachzuweisen. Dies gelingt mit fluoreszierenden Aminen<sup>[15]</sup>, deren unprotonierte Form die Lipidwand der Vesikel leicht durchdringen kann, während dies der protonierten Form nicht möglich ist. Amine, z. B. 9-Amino-6-chlor-2-methoxyacridin (5), verteilen sich deshalb gemäß dem pH-Gradienten zwischen innerer und äußerer Phase. An Chloroplasten und Liposomen wurde gezeigt, daß die Fluoreszenz des im Inneren angehäuften Farbstoffs vollständig unterdrückt wird, und daß das Ausmaß der Fluoreszenzunterdrückung ein Maß für den entstandenen pH-Gradienten ist. Der in Abbildung 9b gezeigte Befund bestätigt die Erwartung, daß Bacteriorhodopsin durch seine Pumpwirkung Protonen nach innen schafft und sich das Acridin-Derivat anhäuft. Bei Belichtung wird die Fluoreszenz des zugesetzten Farbstoffs (5) gelöscht, nach Abschalten des Lichtes tritt sie wieder auf.

Ein pH-Gradient der in Abbildung 9a beobachteten Größe ( $\Delta pH \approx 0.1$ ) kann sich nur dann ausbilden, wenn beim Einpumpen der Protonen andere Kationen ausströmen oder auch ein Anion mit dem Proton einströmt. Wie in Abschnitt 2 erwähnt, kann dieser Gegentransport durch die Permeabilität der Trennschicht bedingt sein. Der Gegentransport könnte aber auch eine dem Pumpmolekül selbst innewohnende Eigenschaft sein, d. h. Bacteriorhodopsin könnte in seinem photochemischen Zyklus für das abgegebene Proton z. B. ein Kalium-Ion aufnehmen und umgekehrt. Bacteriorhodopsin wäre dann ein lichtgetriebener Ionenaustauscher und als Pumpe neutral,

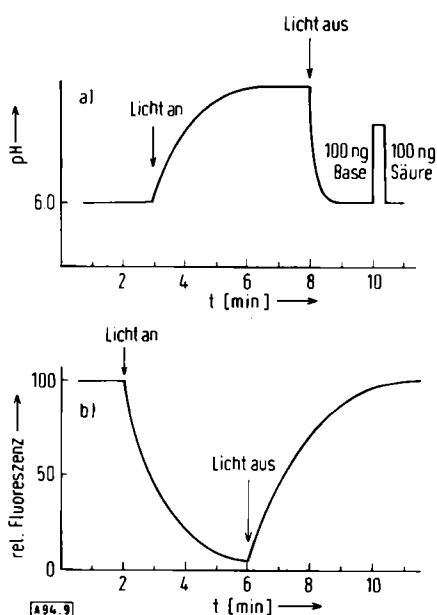
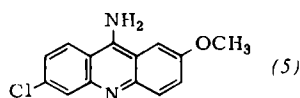


Abb. 9. Demonstration eines lichterzeugten pH-Gradienten mit bacteriorhodopsinhaltigen Lipidvesikeln (Proteoliposomen). a) Reversible pH-Zunahme des äußeren Mediums bei Belichtung ( $\Delta\text{pH} \approx 0.1$ ). b) Reversible Fluoreszenzänderung des Acridinfarbstoffs 9-Amino-6-chlor-2-methoxyacridin (5) im Innern einer Lipidvesikel bei Belichtung. Bacteriorhodopsin:  $5 \cdot 10^{-7}$  mol/l; (5):  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

d. h. die Potentialkomponente der von der Pumpe erzeugten protomotorischen Kraft wäre permanent Null. Wir können sicher sein, daß Bacteriorhodopsin aber keine solche elektro-neutrale Pumpe, sondern eine elektrogene Pumpe ist, d. h. daß der photochemische Zyklus nur von der zyklischen Abspaltung und Aufnahme von Protonen und keinen anderen Kationen begleitet wird. Zum einen sind der Aufbau des pH-Gradienten und die Fluoreszenzunterdrückung durch die Pumpe von einem langsameren Prozeß, also z. B. der Gegendiffusion eines Kations, limitiert. Zum anderen ist es Skulachev et al. gelungen, Bacteriorhodopsin in planare Lipidfilme einzubauen, die zwei Kompartimente mit wäßrigen Elektrolytlösungen trennen, und durch Belichten in diesem System Potentiale bis zu 300 Millivolt zu erzeugen und direkt zu messen<sup>[16]</sup>. Zusammengefaßt läßt sich feststellen, daß Bacteriorhodopsin als elektrogene Pumpe für Protonen mit einer Wechselzahl von etwa  $200 \text{ s}^{-1}$  arbeitet.

## 5. Energieumwandlung in der intakten Zelle

Bacteriorhodopsin ist in der intakten Zelle umgekehrt wie in den Proteoliposomen orientiert, d. h. von der Zelle werden Protonen nach außen gepumpt (Abb. 10). Aus der Wechselzahl, der Bacteriorhodopsinkonzentration der Zelle (etwa die Hälfte der Zelloberfläche ist mit der Purpurmembra bedeckt) und dem Volumen einer solchen Zelle läßt sich errechnen, daß bei Lichtsättigung innerhalb einer Millisekunde eine protomotorische Kraft von etwa 300 Millivolt erzeugt werden kann, die für die ATP-Synthese ausreicht. Alle anderen Ionenflüsse, soweit experimentell beobachtet, sind langsamer. Dazu gehört auch die passive Rückdiffusion der Protonen ohne Arbeitsleistung. Die vom Bacteriorhodopsin getriebene ATP-Synthese

kann also sofort einsetzen, muß aber einigen Bedingungen gehorchen: Inhibitoren der ATPase wie Dicyclohexylcarbodiimid (6) oder Entkoppler (Substanzen, die die Durchlässigkeit der Zellmembran für Protonen drastisch erhöhen) müssen die Photophosphorylierung der Zellen unterdrücken. Außerdem erwartet man eine Konkurrenz der lichtgetriebenen Protonenpumpe Bacteriorhodopsin und der elektronentransportgetriebenen Protonenpumpe Atmungskette. Die beiden Protonenpumpen konkurrieren in der Tat; der quantitative Vergleich von absorbierten Quanten und nicht verbrauchtem Sauerstoff zeigt, daß nicht nur der photochemische Zyklus des Bacteriorhodopsins, sondern auch die Energieumwandlung in der Zelle unter physiologischen Bedingungen mit hoher Quantenausbeute verläuft<sup>[17]</sup>.

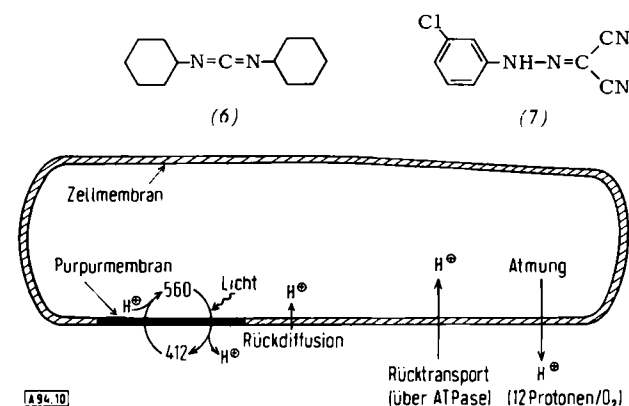


Abb. 10. Schematische Darstellung der protonentranslocierenden Vorgänge in der Halobakterienzelle. 412 = 412-nm-Komplex; 560 = Purpurkomplex.

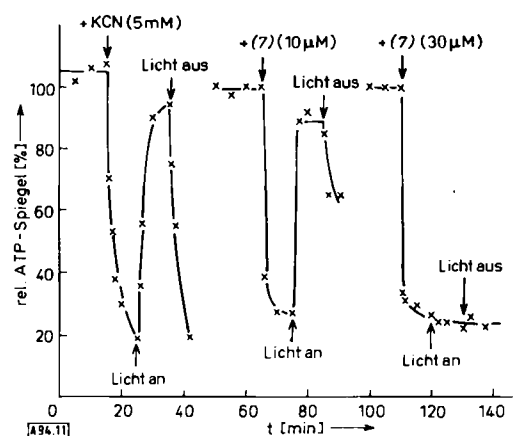


Abb. 11. Einfluß von Cyanid und dem Entkoppler *m*-Chlorphenylhydrazono-malononitril (7) auf die Photophosphorylierung in Halobakterien (nach [19]).

Die Photophosphorylierung<sup>[18, 19]</sup> in Halobakterien kann unter anaeroben Bedingungen oder nach Vergiftung der Atmung mit Cyanid nachgewiesen werden. Abbildung 11 zeigt, wie zugesetztes Kaliumcyanid (5 mmol/l) den intrazellulären ATP-Spiegel von 100 auf fast 0% senkt, da die oxidative Phosphorylierung gehemmt ist und die Substratketten-Phosphorylierung unter den gegebenen Bedingungen keine Rolle spielt. Wird nun Licht eingeschaltet, so steigt das ATP-Niveau auf praktisch den gleichen Wert wie unter maximaler Atmung. Da die Halobakterien kein Chlorophyll besitzen, ist dies ein neuer Typ der Phosphorylierung. Gibt man in einem weiteren Versuch zu den atmenden Zellen eine entkoppelnde Substanz, z. B. *m*-Chlorphenylhydrazono-malononitril (7), so wird bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{mol/l}$  die Atmung als elektronentransportgetriebene Pumpe ausgeschaltet, d. h. das A*i*P-

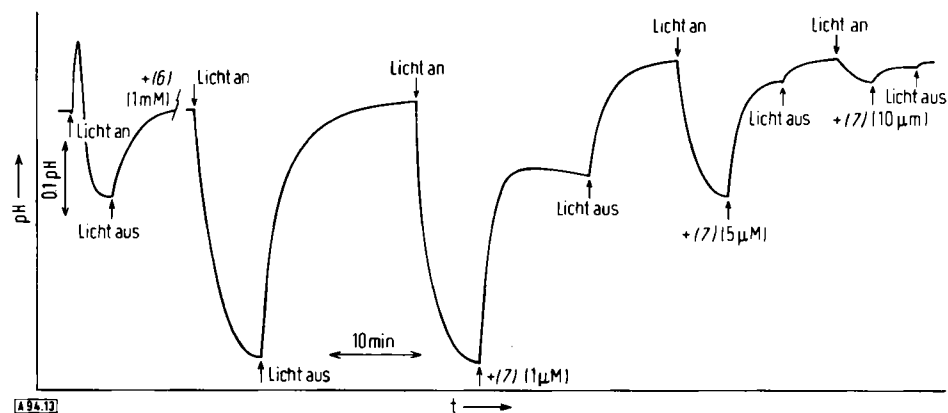


Abb. 13. Abkoppeln der lichtgetriebenen Protonenpumpe von der ATP-Synthase durch Dicyclohexylcarbodiimid (6) und zunehmendes Nachlassen der Effizienz der Protonenpumpe bei steigender Zugabe des Entkopplers *m*-Chlorphenylhydrazono-malononitril (7) nach [19].

Niveau sinkt, weil nun die Protonen nicht mehr an der translozierenden ATPase ATP synthetisieren, sondern die durchlässig gewordene Zellmembran passiv, d.h. ohne Arbeitsleistung, durchströmen. Bacteriorhodopsin als eine offensichtlich effizientere Pumpe kann dagegen die Protonen aus der Zelle noch schneller auspumpen als sie passiv zurückströmen, so daß sich bei Belichtung das ATP-Niveau in fast voller Höhe einstellt. Erhöht man nun die Konzentration des Entkopplers auf 30 μmol/l und damit die Durchlässigkeit der Membran noch weiter, so läßt sich das ATP-Niveau in der Zelle auch durch Belichtung nicht mehr anheben.

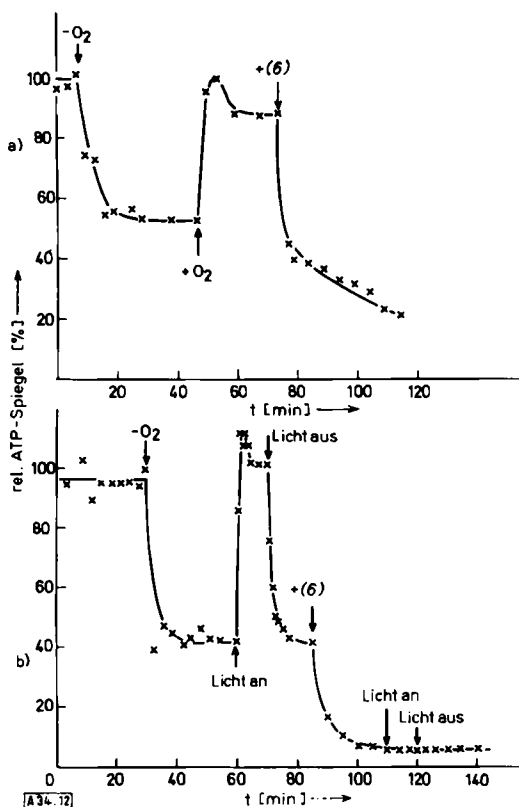


Abb. 12. Vergleich von oxidativer Phosphorylierung (a) und Photophosphorylierung (b) in Halobakterien. Dicyclohexylcarbodiimid (6) als Hemmstoff der reversibel protonentranslozierenden ATPase nimmt in beiden Fällen der Zelle die Fähigkeit zur ATP-Synthase (nach [19]).

Abbildung 12a zeigt die Hemmung des ATP-synthetisierenden Systems durch Dicyclohexylcarbodiimid (6). Zunächst wird den Zellen reversibel Sauerstoff entzogen und danach

die oxidative Phosphorylierung durch Zugabe von (6) irreversibel gehemmt. In Abbildung 12b sieht man die Abnahme des ATP-Spiegels nach Abschalten von Sauerstoff und den Anstieg des ATP-Spiegels bei Belichtung. Zugabe von (6) nach Abschalten des Lichtes und anschließende Belichtung verändern das ATP-Niveau nicht mehr – die Pumpe ist von der ATP-Synthase chemisch abgekoppelt.

Eine weitere Voraussage aus dem Schema in Abbildung 10 ist das Zusammenspiel der Protonenpumpe mit dem Rücktransport der ausgepumpten Protonen durch das ATPase-System. Wie erwartet, nimmt die Anfangsgeschwindigkeit der ATP-Synthase mit steigender Lichtintensität zu, da die Pumpgeschwindigkeit des Bacteriorhodopsins mit zunehmender Lichtintensität ansteigt. Dies kann solange weitergehen, bis das ATP-synthetisierende System den Prozeß limitiert; die Geschwindigkeit der ATP-Synthase bleibt jetzt konstant.

Daß Bacteriorhodopsin als lichtgetriebene Protonenpumpe fungiert, läßt sich in der Zelle auch nach Inhibierung der ATP-Synthase demonstrieren. Das komplizierte Zusammenspiel von Protonenpumpe und ATP bezüglich der pH-Werte im Außenmedium soll hier nicht näher erörtert werden. Koppelt man aber die ATP-Synthase durch Dicyclohexylcarbodiimid (6) ab, kann die Wirkung der Protonenpumpe allein untersucht werden (Abb. 13). Nun wird im Licht ein Gleichgewichtsniveau des pH-Wertes erreicht, dessen Lage von der Auspumpgeschwindigkeit und der passiven Rückdiffusion der Protonen abhängt. Die pH-Differenz Licht/Dunkel wird durch Zugeben des *m*-Chlorphenylhydrazono-malononitrils (7) solange erniedrigt, bis die Zellmembran vollständig durchlässig für Protonen geworden ist.

## 6. Ausblick

Abschließend soll betont werden, daß die Wirkung von Bacteriorhodopsin als lichtgetriebene Protonenpumpe sowohl in künstlichen Systemen als auch in der intakten Zelle nachgewiesen und verstanden werden kann. Was wir bis heute in keiner Weise nachweisen und verstehen können, ist die Chemie der Chromophorveränderung, die den räumlich gerichteten Ausstoß eines Protons bewirkt. Ohne Zweifel ist es eine herausfordernde Aufgabe, chemische Modellvorstellungen etwa auf der Basis von Retinal-*retro*-Retinal-Umwandlungen zu entwickeln, die einen solchen Prozeß erklären könnten. Es wäre die bislang erste Erklärung eines aktiven Transportprozesses



auf molekularer Ebene. Noch viel schwieriger wird allerdings zu verstehen sein, wie ein elektrochemischer Gradient über die Zellmembran hinweg ein chemisches Gleichgewicht verschiebt und welche enzymatischen Reaktionen sich dabei abspielen. Dieses zentrale Problem der Bioenergetik wird ohne Zweifel noch sehr viel mehr Zeit zu seiner Lösung in Anspruch nehmen.

Die in diesem Aufsatz erwähnten eigenen Ergebnisse wurden in München am Institut für Biochemie in Zusammenarbeit mit M. Meenthen, L. Schuhmann und G. Krippahl, in Tübingen am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Zusammenarbeit mit U. Fischer, R. Hartmann und H. Michel durchgeführt und in Würzburg am Institut für Biochemie fortgesetzt. Allen Mitarbeitern gilt mein Dank für ihre Beiträge. P. Overath stellte freundlicherweise 9-Amino-6-chlor-2-methoxyacridin zur Verfügung. Die Arbeiten wurden von Anbeginn durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

Eingegangen am 3. Oktober 1975 [A 94]

[1] F. Lipmann, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1, 99 (1941).

- [2] P. Mitchell, Biophys. J. 3, 5 (1972).  
 [2a] P. J. Garrahan u. I. M. Glann, J. Physiol. (London) 192, 237 (1967); A. G. Dawson u. R. Whitam, Biochim. Biophys. Acta 203, 590 (1970); W. Hasselbach in P. D. Boyer: The Enzymes Academic Press, New York 1974, 3. Aufl., Bd. 10, S. 431 ff.  
 [3] D. Oesterhelt u. W. Stoekenius, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2853 (1973).  
 [4] H. Larsen, Adv. Microb. Physiol. 1, 97 (1967).  
 [5] D. Oesterhelt u. W. Stoekenius, Methods Enzymol. 31, 667 (1974).  
 [6] D. Oesterhelt u. W. Stoekenius, Nature New Biol. 233, 149 (1971).  
 [7] A. E. Blaurock u. W. Stoekenius, Nature New Biol. 233, 152 (1971).  
 [8] A. E. Blaurock, J. Mol. Biol. 93, 139 (1975).  
 [9] R. Henderson u. P. N. T. Unwin, Nature 257, 28 (1975).  
 [10] D. Oesterhelt u. L. Schuhmann, FEBS Lett. 44, 262 (1974).  
 [11] D. Oesterhelt in: Biochemistry of Sensory Functions. 25. Coll. Ges. Biol. Chemie, Mosbach. Springer, Berlin 1974, S. 55 ff.  
 [12] D. Oesterhelt, R. Hartmann, U. Fischer, H. Michel u. Th. Schreckenbach, FEBS Lett., im Druck.  
 [13] D. Oesterhelt u. B. Hess, Eur. J. Biochem. 37, 316 (1973).  
 [14] E. Racker u. W. Stoekenius, J. Biol. Chem. 249, 662 (1974).  
 [15] R. Kraayenhof, FEBS Lett. 6, 161 (1970); D. W. Deamer, R. C. Prince u. A. R. Crofts, Biochim. Biophys. Acta 274, 323 (1972).  
 [16] L. A. Drachev, A. D. Kaulen, S. A. Ostroumov u. V. P. Skulachev, FEBS Lett. 39, 43 (1974).  
 [17] D. Oesterhelt u. G. Krippahl, FEBS Lett. 36, 72 (1973).  
 [18] A. Danon u. W. Stoekenius, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1234 (1974).  
 [19] D. Oesterhelt in: Ciba Foundation Symp. on Energy Transformation in Biological Systems. Elsevier Excerpta Medica, North Holland, Amsterdam 1975, S. 147 ff.

## ZUSCHRIFTEN

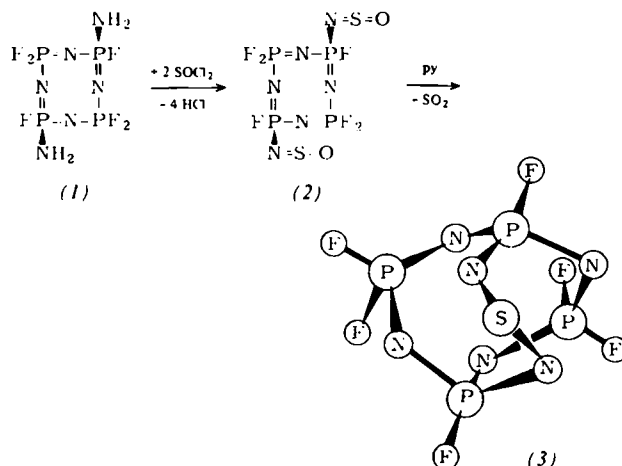
Zuschriften sind kurze vorläufige Berichte über Forschungsergebnisse aus allen Gebieten der Chemie. Vom Inhalt der Arbeiten muß zu erwarten sein, daß er aufgrund seiner Bedeutung, Neuartigkeit oder weiten Anwendbarkeit bei sehr vielen Chemikern allgemeine Beachtung finden wird. Autoren von Zuschriften werden gebeten, bei Einsendung ihrer Manuskripte der Redaktion mitzuteilen, welche Gründe in diesem Sinne für eine vorzügliche Veröffentlichung sprechen. Die gleichen Gründe sollen im Manuskript deutlich zum Ausdruck kommen. Manuskripte, von denen sich bei eingehender Beratung in der Redaktion und mit auswärtigen Gutachtern herausstellt, daß sie diesen Voraussetzungen nicht entsprechen, werden den Autoren mit der Bitte zurückgesandt, sie in einer Spezialzeitschrift erscheinen zu lassen, die sich direkt an den Fachmann des behandelten Gebietes wendet.

### Ein schwefeldiimido-überbrücktes Cyclophosphazen<sup>[\*\*]</sup>

Von Herbert W. Roesky und Enno Janßen<sup>[\*]</sup>

Die Chemie fluorhaltiger Cyclophosphazene ist in den letzten Jahren ausgiebig untersucht worden<sup>[1]</sup>, doch blieben Derivate mit anorganischen Ringbrücken unbekannt. Modellbetrachtungen an  $P_4N_4F_8$  ergaben, daß hier für eine solche zentrale Brücke mindestens drei Kettenglieder erforderlich sind. Ausgehend von  $P_4N_4F_6(NH_2)_2$  (1) erhielten wir durch Umsetzung mit  $SOCl_2$   $P_4N_4F_6(NSO)_2$  (2). In Gegenwart von Pyridin spaltet (2) Schwefeldioxid ab, und es entsteht ein

geringer Ausbeute 1,5,7,7,10,10-Hexafluor-3 $\lambda^4$ -thia-2,4,6,8,9,11-hexaaza-1 $\lambda^5$ ,5 $\lambda^5$ ,7 $\lambda^5$ ,10 $\lambda^5$ -tetraphosphabicyclo[3.3.3]undeca-2,3,5,7,9(1),10-hexaen (3).



(3) ist ein gelblicher, kristalliner Festkörper, der bei 25°C/0.5 Torr sublimiert und bei 57°C schmilzt. Die Zusammensetzung ist durch vollständige Elementaranalyse gesichert. Der monomolekulare Aufbau im flüssigen und gasförmigen Zustand geht aus dem Molekulargewicht (gef. 350, kryoskopisch in  $C_6H_6$ ) und dem Massenspektrum [ $M^+$ :  $m/e$  = 354 (48 %)] hervor. Im  $^{19}F$ -NMR-Spektrum treten zwei Multipletts im Intensitätsverhältnis 1:2 auf; ihre Schwerpunkte liegen bei  $\delta_F$  = 59.8 und 66.2 ppm. Das Spektrum ist temperaturunabhängig, so daß der Strukturvorschlag (3) plausibel erscheint.

#### Arbeitsvorschrift:

4.2 g (0.01 mol)  $P_4N_4F_6(NSO)_2$ <sup>[2]</sup> werden unter Zugabe katalytischer Mengen Pyridin (2 Tropfen) 2 Tage am Wasserbad erhitzt. Sublimation des Reaktionsproduktes ergibt 0.28 g (8 %) (3). Diese Verbindung entsteht auch in geringer Ausbeute

[\*] Prof. Dr. H. W. Roesky und Dr. E. Janßen  
 Anorganisch-chemisches Institut I der Universität  
 6 Frankfurt am Main 50, Niederurseler Hang

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.