

Die Chemie des Vitamins A und des Sehvorgangs

Von Robert R. Rando *

Der Sehvorgang wird in der Netzhaut (Retina) durch eine photochemische Isomerisierung initiiert: Im photosensitiven Protein Rhodopsin wandelt sich die Schiff-Base von 11-cis-Retinal in ihr all-trans-Gegenstück um. Dieses all-trans-Retinal wird anschließend freigesetzt und zu all-trans-Retinol (Vitamin A) reduziert, das schließlich verestert wird. Zur Aufrechterhaltung des Sehprozesses muß daher im Auge das 11-cis-Retinoid wiederhergestellt werden. Schon in den siebziger Jahren des vorigen Jahrhunderts fand Kühne, daß zur Regeneration von Rhodopsin das Pigmentepithel erforderlich ist, das sich hinter der Netzhaut befindet. In der Tat wurde im Pigmentepithel in jüngster Zeit ein Isomerasensystem entdeckt, das zugegebenes Vitamin A in 11-cis-Retinol umwandeln kann. – Pauling sagte in den dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts voraus, daß bestimmte cis-Doppelbindungen in Carotinoiden und Retinoiden, einschließlich der 11-cis-Retinoide, bedeutend weniger stabil als die entsprechenden trans-Doppelbindungen sein sollten. Diese Vorhersage war zwar experimentell gestützt, ließ aber die entscheidende Frage offen, woher die Energie für den Isomerisierungsprozeß im Auge stammt. Diese Frage wurde durch den überraschenden Nachweis beantwortet, daß Membranen als Energiequelle wirken können, ist eine unerwartete biologische Funktion. Der vorliegende Beitrag befaßt sich mit den chemischen Grundlagen dieses neuen, energieabhängigen Isomerisierungsprozesses.

1. Einleitung

Die Chemie des Sehzyklus bildet das entscheidende Bindeglied zwischen dem physikalischen Phänomen Licht und dem biologischen Vorgang des Sehens. Spätestens seit den siebziger Jahren des vorigen Jahrhunderts ist bekannt, daß das rote Rhodopsin in der Netzhaut durch Licht vollständig gebleicht wird, wenn wir sehen^[1]. Dieses Ausbleichen zerstört den Chromophor und bildet den ersten Schritt des Sehzyklus. Die übrigen Schritte des Zyklus dienen der Erholung vom Sehvorgang und damit der Vorbereitung erneuten Sehens, wobei Rhodopsin regeneriert wird. Seit kurzem beginnen wir, diesen zweiten Teil des Sehzyklus im Detail zu verstehen.

Häufig stellt man eine Analogie zwischen einer Kamera und dem menschlichen Auge her. Beide haben ein Linsensystem, und die Iris des Auges, wie auch die Blende der Kamera, bestimmt die Menge des eintretenden Lichts. Die Netzhaut, wie auch der Film, wird dem Licht „exponiert“. Aber wie alle anderen Vergleiche zwischen belebter Natur und Maschine hinkt auch dieser und wird der Komplexität und Schönheit des biologischen Systems auch nicht annähernd gerecht. So ist die Netzhaut z. B. beträchtlich vielseitiger als ein photographischer Film. Sowohl der Film als auch die Netzhaut enthalten lichtempfindliche Materialien. In der Netzhaut handelt es sich um lichtempfindliche Proteine – Rhodopsine –, die in Organellen namens Stäbchen und Zapfen vorliegen. An dieser Stelle endet die Analogie. Zwei Hauptunterschiede sind, daß die Netzhaut selbst ihre Empfindlichkeit auf die Lichtstärke der Umgebung einstellen kann und, höchst wichtig, daß die lichtempfindlichen Pigmente regenerierbar sind. Dies bedeutet, daß das pigmentierte Material nach der Umwandlung durch Licht kontinuierlich regeneriert wird, so daß neue Bilder darauf entstehen

können. Die Fähigkeit der Netzhaut, sich auf niedrige Lichtstärken einzustellen, und die Regenerierbarkeit des Rhodopsins beruhen darauf, daß es bei Belichtung eine Form bildet, die kein sichtbares Licht absorbiert und im Dunkeln regeneriert wird. So regelt das Licht selbst die Empfindlichkeit der Netzhaut nach der Umgebungslichtstärke durch Veränderung der Menge an Pigment in der Netzhaut.

Das Holoprotein Rhodopsin besteht aus 11-cis-Retinal als dem Chromophor und Opsin, dem durchsichtigen Protein. Als ein besonders hartnäckiges Problem bei der Erforschung des Sehens erwies sich der thermische Mechanismus, durch den 11-cis-Retinal im Wirbeltierauge synthetisiert wird. Das Auge ist das einzige Organ des Körpers, in dem sich dieses Retinoidisomer^[*] in größerem Ausmaß finden läßt. Wald^[2] zeigte, daß Belichtung von Rhodopsin das gebundene 11-cis-Retinal in all-trans-Retinal überführt. Später wurde berichtet^[3, 4], daß lösliche Isomerasen auf all-trans-Retinal aus Augenhomogenaten wirken, diese in 11-cis-Retinal überführen können und dadurch den Sehzyklus vervollständigen. Weitere Experimente zeigten jedoch, daß diese beiden Berichte nicht zutrafen: Unter den beschriebenen Bedingungen wurden unphysiologisches 9-cis-Retinal und Isorhodopsin (das Addukt von Opsin und 9-cis-Retinal) anstelle von 11-cis-Retinal und Rhodopsin gebildet^[5, 6]. Wegen der Labilität von all-trans-Retinalen gegenüber chemischer Isomerisierung und der vor dem Aufkommen der HPLC-Technik extremen Schwierigkeit, die isomeren Retinale zu trennen, muß jeder frühere Bericht über das Isomerasenproblem in Zweifel gezogen werden. Bis 1986 ließ sich kein System nachweisen, das fähig gewesen wäre, im Dunkeln und *in vitro* 11-cis-Retinal zu bilden.

Wie geht dann die Biosynthese von 11-cis-Retinal im Auge vonstatten? Ziel dieses Übersichtsbeitrags ist es, die Natur dieses Prozesses anhand neuerer Befunde zu erhellen und seine chemischen Grundlagen auf der Basis neuerer Befunde zu beschreiben.

[*] Prof. R. R. Rando
Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology
Harvard Medical School
240 Longwood Ave., Boston, MA 02115 (USA)

[*] Unter Retinoiden versteht man Retinole, Retinale und Retinylester.

2. Vitamin A und das Sehen

Da Proteine kein sichtbares Licht absorbieren, war es klar, daß irgendwie ein organischer Chromophor beteiligt sein muß. Bereits in der Antike war bekannt, daß Nachtblindheit ernährungsbedingt sein kann^[7]. Die Ägypter entdeckten damals, daß frische Leber einen Stoff enthält, der gegen diese Beschwerden hilft. Sehr viel später wurde dieser Stoff als Vitamin A identifiziert, und es wurde seine Rolle beim Sehen erkannt. Vitamin-A-Mangel in der Ernährung erzeugt Nachtblindheit. Wenn dieser Mangel nicht abgestellt wird, so führt er sogar zur völligen Erblindung^[8]. Auch heute noch ist Vitamin-A-Mangel in Ländern der Dritten Welt die häufigste Einzelursache der Erblindung.

Vitamin A, oder *all-trans*-Retinol (Abb. 1), ist ein Diterpen, das aus β -Carotin durch eine Oxidation entsteht, die bis heute noch Rätsel aufgibt. Sicher ist, daß β -Carotin im Darm

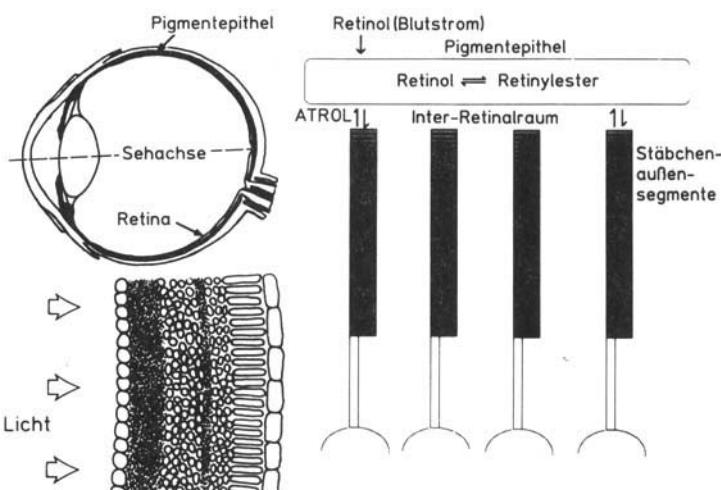


Abb. 2. Netzhaut und Pigmentepithel, schematisch, bei unterschiedlichen Auflösungen. Oben links ist ein Querschnitt des Auges gezeigt, darunter eine Vergrößerung der Netzhaut mit dem Pigmentepithel. Dort stellen die rechteckigen Zellen am rechten Rand das Pigmentepithel dar; links anschließend befinden sich die Stäbchenaußensegmente. Schließlich zeigt die Abbildung im rechten Teil das Pigmentepithel und das Stäbchenaußensegment in enger Nachbarschaft. Der Fluß von Retinoiden zwischen den beiden Zelltypen ist ebenfalls angedeutet. ATROL bedeutet *all-trans*-Retinol.

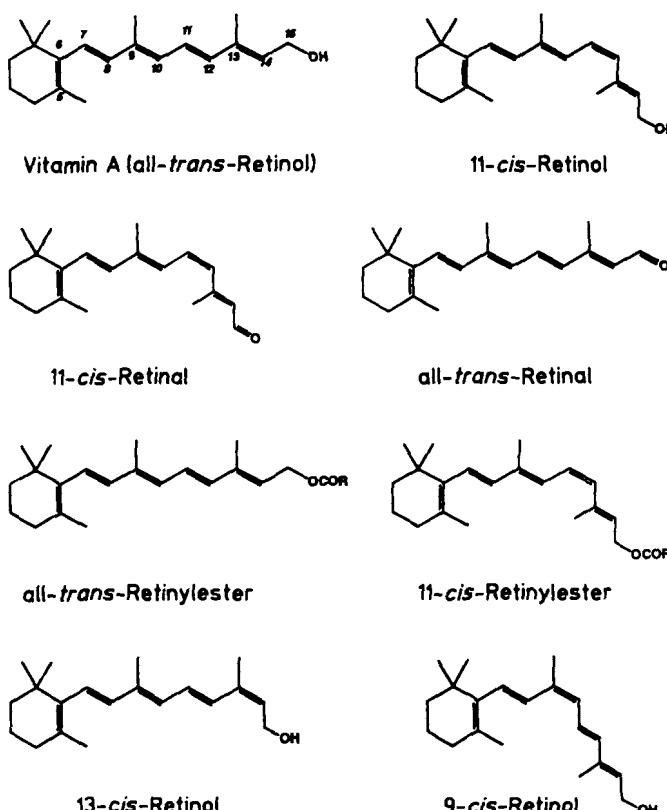


Abb. 1. Struktur von Vitamin A und anderen für den Sehprozeß wichtigen Retinoiden.

zu *all-trans*-Retinal gespalten wird, das dann enzymatisch reduziert und verestert wird. Die so erhaltenen Retinylester werden zur Leber transportiert, dort zu *all-trans*-Retinol hydrolysiert und dann auf diverse Gewebe, inclusive Auge, verteilt. Im Auge wird Retinol an das Pigmentepithel abgegeben, das sich direkt unter der Netzhaut befindet und eng mit ihr verbunden ist (Abb. 2). Seit Jahren wußte man, daß das Pigmentepithel zur Erhaltung einer gesunden Netzhaut wichtig ist. Die Ablösung der Netzhaut vom Pigmentepithel führt unbehandelt zur Erblindung. Eine wichtige Rolle des Pigmentepithels ist die Versorgung der Netzhaut mit Retinoiden, den Vorläufern des Sehchromophors.

In den dreißiger Jahren war bekannt, daß Vitamin A oder ein Abkömmling davon notwendig für das Sehen ist. George Wald und andere postulierten nun, daß 11-cis-Retinal, eines der Folgeprodukte von Vitamin A, die entscheidende Komponente des Rhodopsins ist. Da 11-cis-Retinal Licht von ungefähr 380 nm am stärksten absorbiert und Stäbchen-Rhodopsin Licht von ungefähr 500 nm, mußte das Protein das 11-cis-Retinal erheblich beeinflussen. Es wurde gezeigt, daß 11-cis-Retinal leicht mit dem Protein Opsin zu Rhodopsin reagiert; dabei bildet sich eine Schiff-Base (Abb. 3)^[9]. Dieses Addukt ist in protonierter Form tatsächlich der



Robert R. Rando, 1941 in New York geboren, promovierte 1966 an der Yale University bei Professor William von E. Doering in Physikalisch-organischer Chemie. Danach arbeitete er bei Professor Konrad Bloch am Chemistry Department der Universität Harvard über den Wirkungsmechanismus der β -Hydroxydecanoylthioester-Dehydrase und befaßte sich mit mechanistischen Studien an 3-Decinoyl-N-acetyl-cysteamin, der ersten Verbindung, die während der enzymatischen Reaktion in einen Inhibitor umgewandelt wird. Rando hat ferner neue Typen solcher Inhibitoren entwickelt und Naturstoffe entdeckt, die diesem Paradigma folgen. Seit einigen Jahren untersucht er den biochemischen Mechanismus des Sehens von Wirbeltieren und die Biochemie von Membranen. Rando ist derzeit Gustavus-Adolphus-Pfeiffer-Professor für Biologische Chemie und molekulare Pharmakologie an der Harvard Medical School.

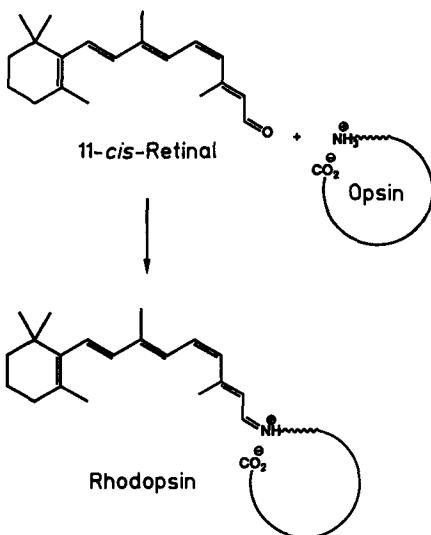


Abb. 3. Bildung von Rhodopsin aus dem Protein Opsin und 11-cis-Retinal.

Chromophor der Sehpigmente. Erwähnenswert ist auch, daß 11-cis-Retinal nur in den Augen sehender Lebewesen, aber nicht in irgendwelchen Lebensmitteln vorkommt. Weiterhin ist interessant, daß die Stämme, die sehen können – Wirbeltiere, Gliedertiere und Weichtiere – alle 11-cis-Retinal als Sehchromophor verwenden.

3. Eine photochemische *cis*- nach *trans*-Isomerisierung startet den Sehzyklus

Bei der Isolierung von Rhodopsin zeigt sich sofort seine große Lichtempfindlichkeit. Das integrale Membranprotein verliert schnell seine rote Farbe, sobald es dem Licht ausgesetzt wird, ein Prozeß, den man als Bleichung bezeichnet (Abb. 4). Die Produkte dieser Lichtreaktion sind all-trans-Retinal und das Protein Opsin. Im Dunkeln besteht keine messbare Tendenz, 11-cis-Retinal zu bilden, wenn Rhodopsin in einer isolierten Netzhaut oder in einer Detergentslösung vorliegt. Die photochemische Isomerisierung von Rhodopsin hat eine hohe Quantenausbeute von etwa 0.67^[10]. Dieser Wert ist ungefähr 100mal höher als derjenige einer isolierten, protonierten Retinal-Schiff-Base. Diese photochemische *cis*-nach *trans*-Umwandlung findet innerhalb von Pikosekunden statt und ist der einzige Teil des Sehvorgangs, an dem Licht beteiligt ist^[11]. Wie in Abschnitt 5.2 gezeigt wird, enthalten 11-cis-Retinoide ungefähr 4 kcal mol⁻¹ mehr Energie als ihre all-trans-Gegenstücke. Daher wird im Unterschied zu anderen photochemischen Prozessen, bei denen Lichtenergie als thermodynamische Triebkraft dient, im Sehvorgang Licht als Initiator für eine ansonsten exotherme Reaktion verwendet.

Die photochemische Isomerisierung des Chromophors von Rhodopsin führt über mehrere Intermediate schließlich zur Hydrolyse der Schiff-Base von all-trans-Retinal; dabei werden all-trans-Retinal und Opsin gebildet (Abb. 5)^[9]. Die Isomerisierung ist im wesentlichen abgeschlossen, wenn das erste wohlbekannte Intermediat, Bathorhodopsin, entstanden ist^[12]. Interessanterweise enthält dieses Bathorhodopsin einen wesentlichen Teil der Energie des einfallenden Pho-

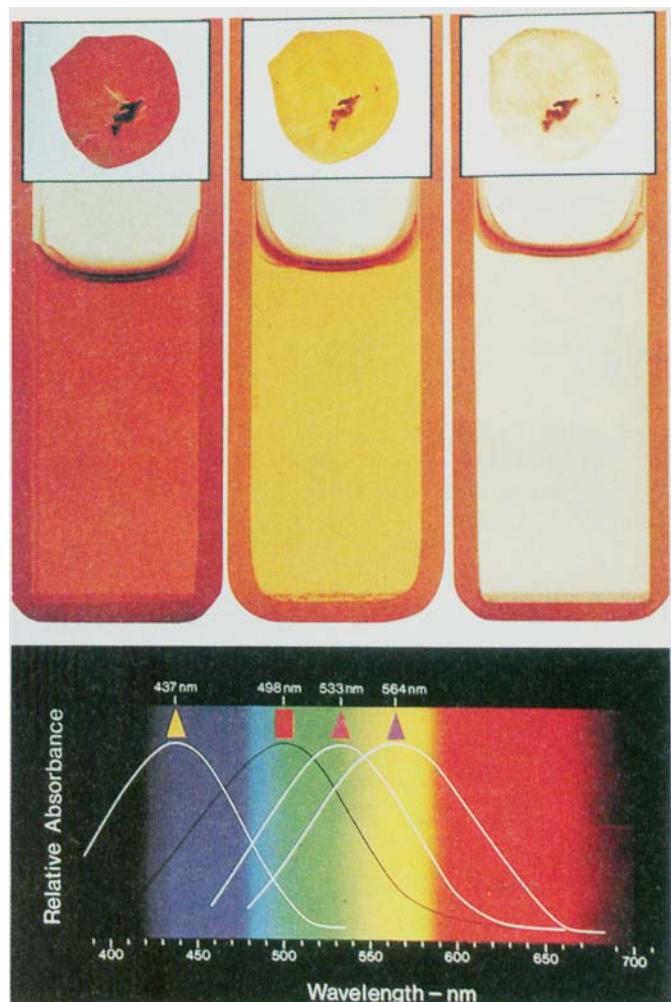


Abb. 4. Oben: Sukzessives Ausbleichen von Rhodopsin in der Netzhaut von Fröschen (und darunter) in Detergentslösung durch Licht [21]. Unten: Absorptionseigenschaften des Stäbchenrhodopsins und der Rhodopsine aus den Zapfen. Die letzteren genannten Rhodopsine ermöglichen das Farbensehen [21]. Die Netzhaut und die Extrakte wurden von P. K. Brown und J. E. Dowling hergestellt. Der untere Teil der Abbildung wurde von P. K. Brown hergestellt. Nachdruck mit Genehmigung des Verlegers von „The Retina: An Approachable Part of the Brain“, von John E. Dowling, Cambridge, MA: The Belknap Press of Harvard University Press, Copyright by John E. Dowling. Alle Rechte vorbehalten.

tons^[13]. Ein mol Photonen der Wellenlänge 500 nm hat eine Energie von 57 kcal. Nach photomikrokalorimetrischen Messungen weist Bathorhodopsin eine um 36 kcal mol⁻¹ höhere Energie als Rhodopsin auf^[13]. Zu den Möglichkeiten der Speicherung dieser Energie gehören Spannungsenergie im Chromophor und eine durch die Isomerisierung induzierte Ladungstrennung zwischen der protonierten Schiff-Base und ihrem am Protein gebundenen Gegenion (Abb. 6)^[14].

Die restlichen Intermediate der Sehkaskade wurden ebenfalls genauer untersucht^[11]. Wahrscheinlich spiegeln diese spektroskopisch definierten Intermediate Konformationsänderungen im Protein wider, die durch die Photoisomerisierung hervorgerufen werden. Sehr interessant ist Metarhodopsin II, da dieses Intermediat (R*) die Information weitergibt, daß Licht absorbiert wurde. Im Unterschied zu den anderen Intermediaten enthält Metarhodopsin II eine deprotonierte Schiff-Base^[14]. Wird durch Monomethylierung des Lysins im aktiven Zentrum eine Deprotonierung von Rhodopsin (genauer: der Schiff-Base) verhindert, so

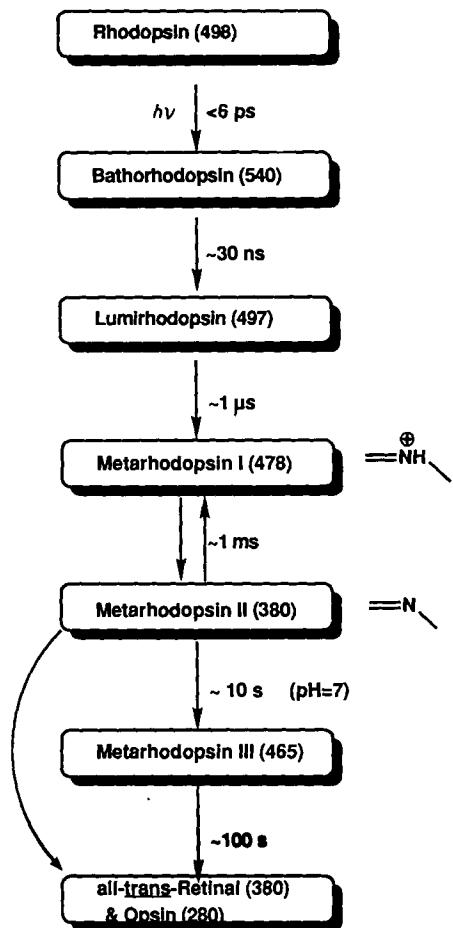


Abb. 5. Photochemie von Rhodopsin. Ausbleichen von Rhodopsin resultiert in der Entstehung der abgebildeten, spektroskopisch definierten Intermediate. Die Wellenlängen der maximalen Absorption (λ_{\max}) der Intermediate sind in Klammern und die Halbwertszeiten bei Raumtemperatur direkt neben den Pfeilen angegeben.

kann kein Metarhodopsin II und damit auch kein R*-Zustand entstehen^[15, 16]. Daraus folgt, daß die Deprotonierung der Schiff-Base für die biochemische Aktivierung von Rhodopsin notwendig ist. Es ist also geklärt, daß die Bildung

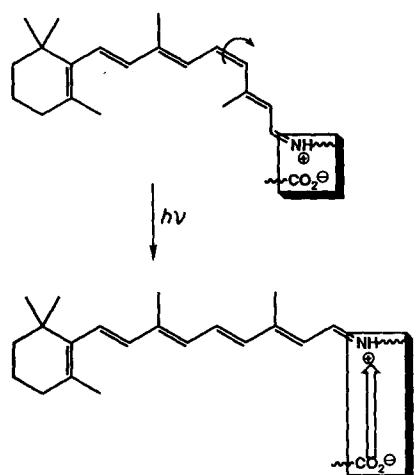


Abb. 6. Möglicher Mechanismus einer Ladungstrennung, durch die cis- nach trans-Photoisomerisierung einer protonierten 11-cis-Schiff-Base. Das abgebildete Carboxylat-Ion ist Teil des Proteingerüstes.

von Metarhodopsin II von größeren Konformationsänderungen im Rhodopsin begleitet wird und daß diese Änderungen an die nächste molekulare Komponente in der Sehkaskade, das Retinal-G-Protein (genauer: Rhodopsin-assoziiertes G-Protein), weitergegeben werden.

Die Wechselwirkung zwischen R* und seinem G-Protein wurde gut untersucht^[17]. Diese Wechselwirkung katalysiert den Austausch von GDP durch GTP im aktiven Zentrum des G-Proteins. Durch Bindung von GTP an das aktive Zentrum wird das G-Protein aktiviert und dadurch fähig, die Hemmung der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase des Stäbchenaußensegments aufzuheben. Und wenn dieses Enzym aktiviert ist, kann es cGMP mit diffusionskontrollierter Geschwindigkeit hydrolyseren^[18]. Die Hydrolyse soll die Konzentration an freiem Effektor (cGMP) erniedrigen. Da die Permeabilität der Natrium-Kanäle des Stäbchenaußensegments für Natrium-Ionen durch cGMP geregelt wird^[19], resultiert die Hydrolyse von cGMP in einer Hyperpolarisierung des Stäbchenaußensegments. Diese Änderung des Membranpotentials wird an andere Nervenzellen der Netzhaut übermittelt und an das Gehirn weitergeleitet, wo dann das optische Bild konstruiert werden kann.

Metarhodopsin II kann auch gleich nach seiner Bildung direkt zu all-trans-Retinal und Opsin hydrolysiert^[17]. Auch Metarhodopsin III kann aus Metarhodopsin II entstehen, das somit als Speicherform für das spätere physiologisch aktive Intermediat Metarhodopsin III dient^[17].

Da all-trans-Retinal beim Bleichen freigesetzt wird, ist ein physiologischer Mechanismus zur Regeneration von 11-cis-Retinal erforderlich; andernfalls wäre das Sehen nur einmal im Leben möglich. Der Grund dafür, daß am Sehprozeß der Wirbeltiere ein Bleichmechanismus beteiligt ist, liegt wahrscheinlich in seiner Bedeutung für die Lichtadaptation^[20]. Sinnesadaptation, natürlich auch beim Sehen, bezieht sich auf die Fähigkeit eines Sinnesorgans, seine Empfindlichkeit nach der Stärke des Umgebungssignals einzustellen. Diese Fähigkeit kann erstaunliche Ausmaße erreichen; so muß das Auge beim Sehen imstande sein, Lichtintensitäten zwischen ein paar Prozent und etwa dem 10^{10} fachen des Hintergrunds zu unterscheiden^[21]. Dieser Prozeß ist zwar multifaktoriell bedingt, doch wird ein wichtiger Vorgang, die Dunkeladaptation, im wesentlichen durch die Menge an Rhodopsin in den Stäbchen bestimmt. Dunkeladaptation erleben wir gewöhnlich, wenn wir uns aus einer gut beleuchteten in eine abgedunkelte Umgebung, z.B. ein Kino, begeben. Anfänglich ist unser Sehvermögen recht eingeschränkt, aber mit der Zeit verbessert es sich. Diese langsame Phase der Dunkeladaptation deckt sich mit der Geschwindigkeit der 11-cis-Retinal-Regeneration^[21]. Die Geschwindigkeit ist artspezifisch und beträgt für den Menschen $t_{1/2} = 5$ min, für Amphibien und Ratten dagegen 30 bzw. 40 min^[21, 22]. Da eine logarithmische Abhängigkeit zwischen der Menge an Rhodopsin und der Sehempfindlichkeit beobachtet wird^[21], hat eine Änderung des Rhodopsinspiegels einen starken Einfluß auf die Sehempfindlichkeit. Die immense Empfindlichkeit des menschlichen Auges, das bereits wenige Photonen wahrnehmen kann^[23], spiegelt sich zum Teil in der extrem hohen Rhodopsinkonzentration im Stäbchenaußensegment wider (10^9 Rhodopsinmoleküle pro Stäbchen^[21]). Die Verminderung dieser inhärenten Empfindlichkeit erfordert eine Modulation der Pigmentmenge durch einen Ausbleich-Regenerations-Cyclus.

4. Die Regeneration des Rhodopsins

4.1. Der Sehzyklus

Ein halbes Jahrhundert bevor ein Vitamin-A-Derivat als der photosensitive Chromophor beim Sehen erkannt wurde, hatte der große deutsche Physiologe *Kühne* schon wesentliche Einsichten über den Sehzyklus gewonnen. So hatte er zum Beispiel erkannt, daß die Netzhaut eine photosensitive Substanz enthält, die weiß, d. h. gebleicht, wird, wenn sie dem Licht ausgesetzt ist^[11]. Weiterhin hatte er entdeckt, daß die rote Farbe einer Netzhaut in isoliertem Material nicht wiederhergestellt werden kann, sondern daß dies einen engen Kontakt zum Pigmentepithel erfordert. Diese Entdeckung war von großer Bedeutung und bestand auf dem Prüfstand der Zeit, denn in all den Jahren seit damals – mehr als einem Jahrhundert – hat niemand die Regeneration des Rhodopsins in einer isolierten Retina überzeugend nachweisen können.

Die Entdeckung der Rolle des Vitamins A beim Sehvorgang legte es nahe, den Ausbleichzyklus auf molekularer Ebene zu analysieren. Es wurde schnell erkannt, daß die enzymatische Weiterverarbeitung von Vitamin A das Herzstück dieser Umwandlungen war. Das durch die Bleichung freigesetzte all-trans-Retinal wird in der Netzhaut durch spezifische Nicotinamid-abhängige Retinol-Dehydrogenasen schnell zu Vitamin A reduziert^[24]. Das Vitamin A wird dann ins Pigmentepithel gebracht, wo es verestert wird, zum Großteil mit langketten gesättigten Fettsäuren wie solchen aus der Palmitin- und Stearinsäure-Reihe. Jedem der drei all-trans-Retinoide (siehe Abb. 7) entspricht ein 11-cis-Retinoid. Die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die für die gegenseitige Umwandlung dieser sechs Verbindungen erforderlich ist, bildet den klassischen und zu stark vereinfachten Sehzyklus (Abb. 7). So könnte die Doppelbindungsiso-

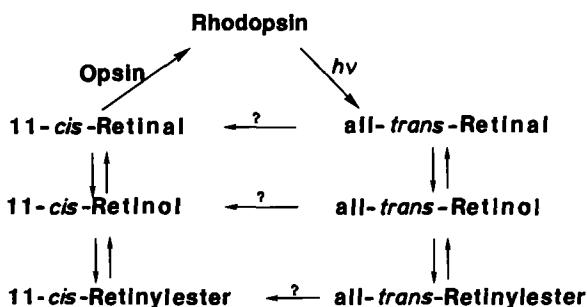


Abb. 7. Klassisches Modell des Sehzyklus (vgl. Abb. 31).

merisierung potentiell bei jedem dieser drei Substrate auftreten und jedes der drei Produkte bilden, und zwar entweder in der Netzhaut oder im Pigmentepithel. Nach der Isomerisierung muß das 11-cis-Retinoid entweder als Alkohol oder als Aldehyd durch spezifische Bindeproteine in das Stäbchenaußensegment zurückgebracht werden^[25–28], wo es dann zur Regeneration des Rhodopsins verwendet werden kann (nach Oxidation, falls 11-cis-Retinol zurücktransportiert wurde).

Die dynamische Natur des Sehzyklus kann anhand von Experimenten verstanden werden. Gemessen wurde die

Menge der unterschiedlichen Retinoide während der Licht- und Dunkeladaptation bei lebenden Tieren^[29, 30]. Bei Albino-Ratten ist der Überschuß an Retinoiden gering; das heißt, daß alles Opsin an Retinoide gebunden ist und nur wenig Retinoide übrigbleiben. In diesem einfachen Fall kann im Licht ein beträchtlicher Fluß von Retinoiden von der Netzhaut in das Pigmentepithel beobachtet werden, der im Dunkeln umkehrbar ist (Abb. 8)^[21]. In den höheren Wirbeltieren

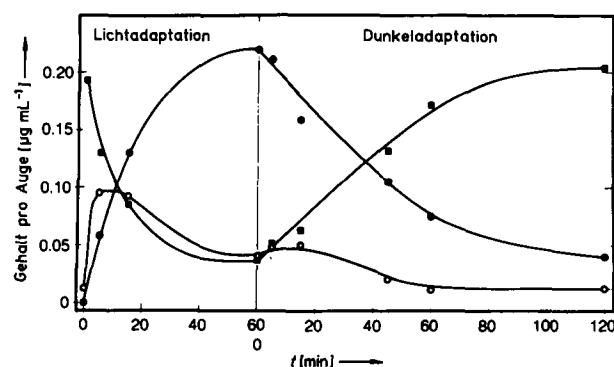


Abb. 8. Retinoidflüsse zwischen der Netzhaut und dem Pigmentepithel der Ratte im Dunkeln und im Licht [29]. Im Licht wird Rhodopsin gebleicht, und Retinal wird reduziert und in das Pigmentepithel transportiert. Im Dunkeln läuft die Rückreaktion ab. ■■■ Retinal in der Netzhaut; ○○○ Vitamin A in der Netzhaut; ●●● Vitamin A im Pigmentepithel. Nachdruck (leicht verändert) mit Genehmigung aus Nature 188, 114. Copyright © 1960 Macmillan Magazines Limited.

und Amphibien liegen Retinoide gegenüber Opsin in ungefähr dreifachem Überschuß vor. In diesen Fällen werden die überschüssigen Retinoide als Ester im Pigmentepithel gespeichert^[29]. Der Retinoidpool von Tieren wie Fröschen kann im Dunkeln bis zu 75% aus 11-cis-Retinoiden bestehen, wobei an Opsin gebundenes 11-cis-Retinal in der Netzhaut und 11-cis-Retinylester im Pigmentepithel die Hauptkomponenten sind^[29, 31]. Im Licht findet eine massive Verschiebung zu den all-trans-Isomeren statt, vor allem in Form von Retinylestern. Dunkeladaptation macht diese Verschiebung rückgängig^[29, 31]. Da bis jetzt kein Enzym des Sehzyklus vollständig gereinigt oder charakterisiert wurde, bleiben mögliche Kontrollelemente unerkannt.

4.2. Eine thermische Isomerisierung vervollständigt den Sehzyklus

Um die Grundlagen des Isomerisierungsprozesses aufzuklären, der die 11-cis-Retinoide für das Sehen bereitstellt, muß man zunächst bestimmen, ob die Reaktion photochemisch oder thermisch verläuft. Es scheint klar zu sein, daß 11-cis-Retinoide im Dunkeln aus all-trans-Retinoiden regeneriert werden. Weiterhin ist die Geschwindigkeit der Regeneration des Rhodopsins in schwachem Licht unabhängig von dessen Wellenlänge^[32]. Diese beiden Befunde stützen die Annahme, daß die physiologisch relevante Rückisomerisierung *trans* → *cis*, anders als das Ausbleichen, rein thermisch verläuft. Obwohl dies chemische Schwierigkeiten mit sich bringt, bietet der thermisch-enzymatische Prozeß klare teleologische Vorteile. Zwei Hauptvorteile sind, daß ein thermischer Regenerationsprozeß von der Wellenlänge und der

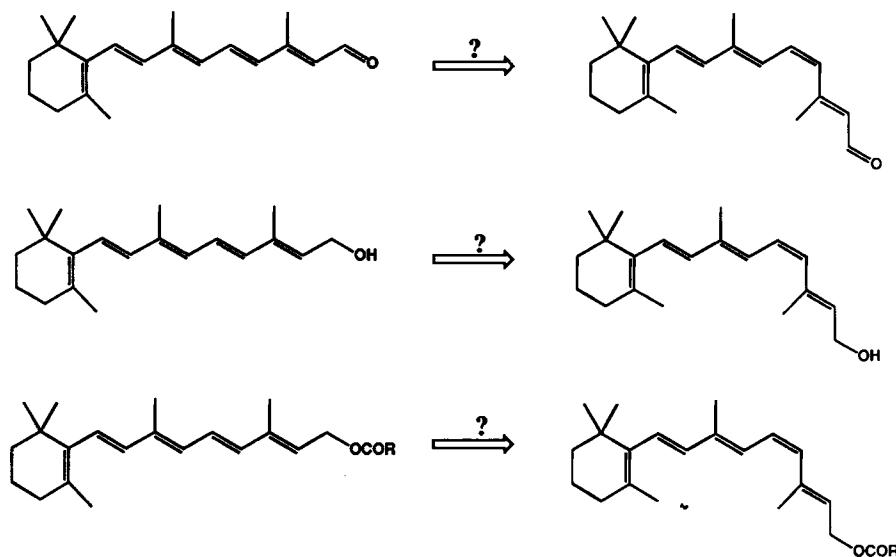


Abb. 9. Mögliche Substrate der Isomerisierung.

Intensität des Umgebungslichts unabhängig ist, und daß es für enzymatische Prozesse wirksame Kontrollmechanismen gibt, die für photochemische Prozesse nicht verfügbar sind.

5. Das Isomerisierungsproblem

5.1. Einführung

Die Aufklärung der Grundlagen der Isomerisierungsreaktion bringt viele nicht-triviale Schwierigkeiten mit sich. Man muß sowohl das Substrat als auch das Produkt der Isomerisierungsreaktion bestimmen. Wie in Abschnitt 4.1 erwähnt, liegen die Retinoide im Sehsystem als Retinale, Retinole und Retinylester vor (Abb. 9). Jedes der drei all-*trans*-Retinoide könnte das Substrat und jedes der drei 11-*cis*-Retinoide könnte das Produkt sein. Ein zweites entscheidendes Problem, das sich als untrennbar von der Frage nach der Natur des Substrates erwies, ist die Herkunft der Energie für die *trans*- nach *cis*-Isomerisierung.

5.2. Thermodynamische Betrachtungen

Auf diese thermodynamischen Fragen wies erstmals *Pauling* in den dreißiger Jahren hin, als er sich mit Carotinoidstrukturen befaßte^[33, 34]. *Pauling* schloß aus strukturellen Prinzipien, daß bestimmte *cis*-Doppelbindungen in Retinoiden weniger stabil sein sollten als ihre all-*trans*-Gegenstücke (Abb. 10). Die planaren Doppelbindungen würden die Methylgruppen zu einer Überlappung mit den in Abbildung 10 markierten Wasserstoffatomen zwingen, wenn das Polyen-System als Ganzes planar bliebe. Nach *Paulings* Ansicht bestehen zwischen diesen gespannten *cis*-Isomeren und ihren all-*trans*-Analoga große Energieunterschiede, weil Resonanzenergie durch Abweichung von der Planarität verlorengeht. So sagte er z. B. voraus, daß die Spaltung eines all-*trans*-Carotinoids mit elf Doppelbindungen in nicht-wechselwirkende Fragmente mit drei und fünf konjugierten Doppelbindungen die Energie des Systems um 16.1 kcal mol⁻¹ erhöhen würde^[34]. Demnach läßt sich die

Energie des 11-*cis*-Retinals auf 8–9 kcal mol⁻¹ höher abschätzen als die des all-*trans*-Retinals^[35]. In diesem Fall wurde angenommen, daß bereits recht kleine Abweichungen von der Planarität die Konjugations-Wechselwirkung und damit die Resonanzstabilisierung aufheben. Weiterhin wurde zwar 7-*cis*-Retinal als instabil vorhergesagt, doch sollten sowohl 9-*cis*- und 13-*cis*- als auch 9-*cis*,13-*cis*-Retinal relativ stabil sein (vgl. Abb. 10). 7-*cis*-Retinal ist sterisch stark gehindert; die anderen Isomere sind es kaum.

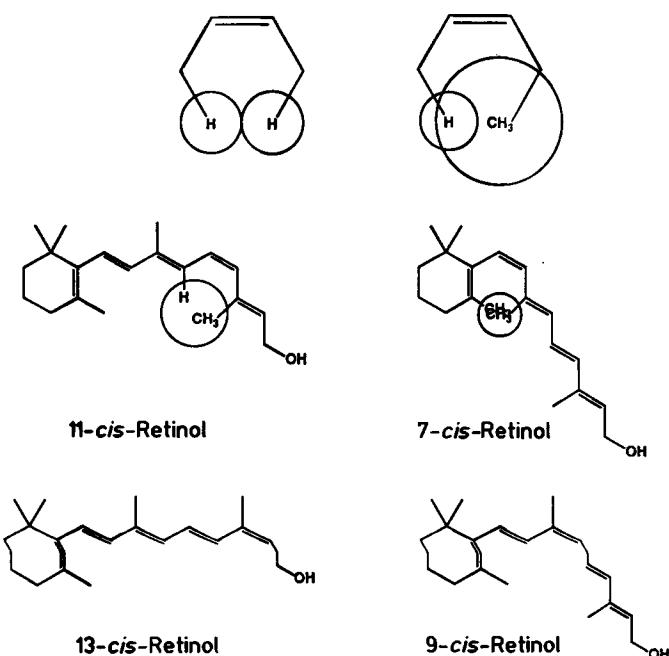


Abb. 10. Abstoßung von Methylgruppen und Wasserstoffatomen als eine Quelle der Spannung in 11-*cis*-Retinoiden.

Frühe Gleichgewichtsmessungen an Retinalen waren inkorrekt und haben die Stabilität der 11-*cis*-Retinoide stark überschätzt^[36]. NMR-Messungen an Lösungen von Retinal in Trifluoressigsäure zeigten keine der für Olefine charakteristischen C-H-Resonanzen, die der 11-*cis*-Bindung zugeschrieben werden könnten, und legen daher nahe, daß 11-*cis*-

Retinal keinen wesentlichen Beitrag zum Gleichgewicht liefert^[37]. Diese Befunde wurden durch HPLC-Messungen bestätigt^[38]. Durch Iod oder Trifluoressigsäure äquilierte Retinale oder Retinylester bestanden nur zu 0.1% aus 11-cis-Retinoiden^[39]. Das gleiche Resultat erhält man, wenn Retinole durch Iodid ins Gleichgewicht gebracht werden. Die Energiedifferenz zwischen 11-cis-Retinal und seinem all-trans-Gegenstück beträgt 4.1 kcal mol⁻¹; bei anderen Retinoidpaaren wurden ähnliche Differenzen beobachtet. Da die destabilisierende Wechselwirkung zwischen dem Wasserstoff an C-10 und der Methylgruppe an C-13 (oder der C-13-Vinylgruppe, falls das Molekül in 12-s-cis-Form vorliegt) auf einer intramolekularen Abstoßung beruht, hat die Art der Substitution an C-15 keinen nennenswerten Einfluß auf die Gleichgewichtslage. Somit erweist sich die brillante strukturelle Hypothese von *Pauling* als qualitativ korrekt. Quantitativ ist sie etwas ungenau, im wesentlichen deshalb, weil damals nicht bekannt war, daß Resonanzwechselwirkungen zwischen konjugierten Doppelbindungen auch dann möglich sind, wenn diese nicht genau in einer Ebene liegen.

Die dreidimensionale Struktur des 11-cis-Retinals im Kristall ist mit der Hypothese von *Pauling* in Einklang: Im Vergleich zur Struktur des all-trans-Retinals ist eine kräftige Drehung um die C12-C13-Bindung erkennbar (Abb. 11)^[40].

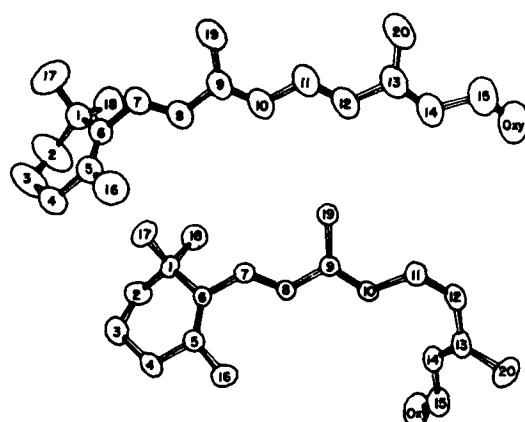


Abb. 11. Struktur von all-trans- und 11-cis-Retinal im Kristall [40]. Nachdruck mit Genehmigung aus *Nature* 232, 187. Copyright © 1971 Macmillan Magazines Limited.

Wegen der starken Verdrillung um diese Bindung ist der Bereich von C-12 bis O mit dem übrigen Molekül nicht mehr coplanar^[40]. Die Bindungswinkel an C-11 und C-12 betragen 127.3 bzw. 130.3°, und das 12-s-cis-Konformer ist bevor-

zugt^[40]. Weiterhin liefern wie erwartet bei den in Abbildung 12 gezeigten Verbindungen die 11-cis-Isomere den Hauptbeitrag im Gleichgewicht^[41, 42]. In 13-Desmethylretinal wird durch Entfernung der Methylgruppe an C-13 die destabilisierende Wechselwirkung aufgehoben, während in der Trimethylen-überbrückten Verbindung der Substituent an C-11 die all-trans-, nicht aber die 11-cis-Konfiguration destabilisiert. Folgendes sei betont: Daß eine intramolekulare sterische Wechselwirkung die 11-cis-Retinoid-Konfiguration destabilisiert, bedeutet zugleich, daß Lösungsmitteländerungen wenig oder keinen Einfluß auf die Gleichgewichtslage haben sollten. Dies wurde mit Kohlenwasserstoffen, chlorierten Kohlenwasserstoffen und Alkoholen als Lösungsmitteln bestätigt^[43]. Überdies wird die Gleichgewichtslage auch durch phospholipidhaltige Vesikel aus Eigelb-Lecithin, die cis-konfigurierte ungesättigte Fettsäuren enthalten, nicht meßbar gestört^[44]. Wir können deshalb ziemlich sicher sein, daß die in vitro gemessenen Gleichgewichtsdaten für die Situation in vivo relevant sind, und deshalb muß eine Energiequelle gefunden werden, die das Überwiegen der 11-cis-Retinoid-Konfiguration im Auge verursacht.

5.3. Katalyse der Isomerisierung in Modellsystemen

Ein weiterer Gesichtspunkt neben den thermodynamischen Verhältnissen betrifft den Mechanismus, durch den die Isomerisierung der Retinoide katalysiert werden kann. Es interessiert zunächst die Thermochemie der unkatalysierten Isomerisierungsreaktionen. Eingehend untersucht wurden nur Reaktionen der Retinale, vor allem die 11-cis- zu all-trans-Retinal-Umwandlung^[36]. Hier beträgt die Aktivierungsenergie E_A für eine rein thermische Umsetzung 25 kcal mol⁻¹^[36]. Dieser Wert liegt weit unter dem E_A -Wert von ungefähr 64 kcal mol⁻¹ für eine π -Bindung. Das bedeutet, daß die vermuteten Diradikalzentren durch die benachbarten Doppelbindungen stark stabilisiert sind – ein Resultat, das im Hinblick auf Befunde über die Isomerisierung konjugierter Olefine zu erwarten war^[45]. Der E_A -Wert von 25 kcal mol⁻¹ ist interessant, denn danach dürfte die Reaktion bei einer relativ geringen Abnahme von E_A um ungefähr 5 kcal mol⁻¹ bei physiologischen Temperaturen mit signifikanter Geschwindigkeit ablaufen. Im Prinzip wäre es denkbar, diese Abnahme durch Vergrößerung des Konjugationssystems zu erreichen, etwa durch Bildung einer Schiff-Base mit einem aromatischen Amin (Abb. 13)^[46]. Dies könnte biologisch von Bedeutung sein, da aromatische Amine in der Natur reichlich vorhanden sind. Man fand allerdings, daß

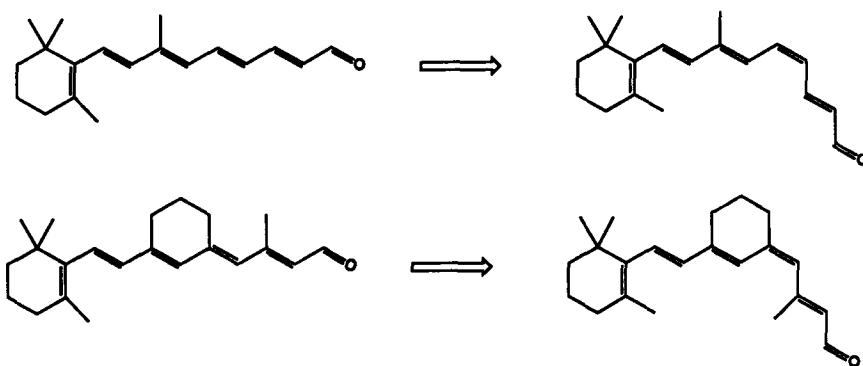


Abb. 12. Retinale, bei denen das 11-cis-Isomer stabiler als das all-trans-Isomer ist (siehe Text).

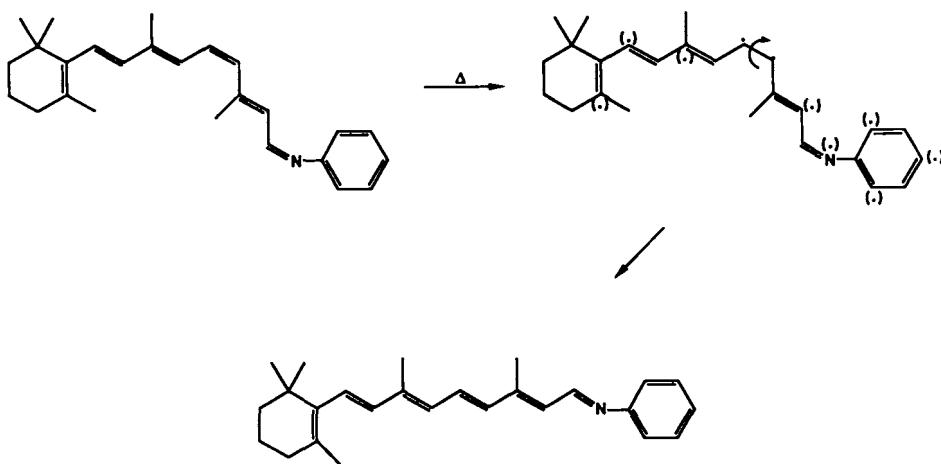


Abb. 13. Zur thermischen Isomerisierung der Schiff-Base eines aromatischen Amins mit 11-cis-Retinal.

Schiff-Basen der in Abbildung 13 gezeigten Art thermisch langsamer als ihre Retinalvorstufen isomerisieren^[46].

Es gibt mehrere Studien über katalysierte Isomerisierungen von Retinoiden und Carotinoiden. Ein großer Teil der frühen Literatur zu diesem Thema befaßte sich mit Radikal-induzierten, üblicherweise durch Iod katalysierten Isomerisierungen von Carotinoiden und Retinoiden^[47]. Selbstverständlich können Retinoide durch Radikale äquilibriert werden, mit ziemlicher Sicherheit durch Additions-Eliminations-Prozesse, jedoch sind derartige Mechanismen wahrscheinlich für die biologische Situation nicht relevant.

Obwohl die Bildung von Schiff-Basen mit Retinalen nicht die Isomerisierung katalysiert wird, isomerisieren protonierte Schiff-Basen leicht^[46]. Wahrscheinlich ist auch Basenkatalyse beteiligt, denn die Reaktionsgeschwindigkeit hängt stark vom Gegenion ab^[46]. So beträgt die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung (25 °C) für die Isomerisierung der *n*-Butylamin-Schiff-Base von 11-cis-Retinal mit HCl $2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, mit Trifluoressigsäure unter den gleichen Bedingungen dagegen nur $2.6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ^[46].

Um den Basen-katalysierten Mechanismus zu verstehen, wurden Schiff-Basen mit sekundären Aminen wie Piperidin als Modellverbindungen untersucht^[46]. Die Schwierigkeit bei Schiff-Basen mit protonierten primären Aminen besteht darin, daß starke Basen nicht als Katalysatoren verwendet

werden können, weil sie lediglich die protonierte Schiff-Base deprotonieren. Wenn 11-cis-Retinal mit einer äquivalenten Menge Piperidinhydrogenperchlorat und einer katalytischen Menge Piperidin behandelt wird, erweist sich die Bildung der Schiff-Base als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Isomerisierung (Abb. 14)^[46]. Die Säure-Basen-Katalyse scheint daher die Isomerisierung der Schiff-Basen von Retinal erheblich zu beschleunigen. Erwähnenswert ist, daß derartige Reaktionen unter physiologischen Bedingungen stattfinden können. So lassen sich Retinale sowohl durch reduzierte Flavine^[48] als auch durch Phosphatidylaminoethanol^[49] isomerisieren. In beiden Fällen ist vermutlich die Bildung der Schiff-Base die Voraussetzung für die tatsächliche Isomerisierung. Bei der Katalyse durch Phosphatidylaminoethanol wirkt möglicherweise der Phosphatsauerstoff als Base^[49].

Während an Retinalen mehrere Modellstudien zur Isomerisierung durchgeführt wurden, gibt es keine grundlegenden Untersuchungen dieser Art an Retinolen oder Retinylestern. Beide Stoffklassen dürften leicht Carbenium-Ionen bilden, und diese könnten dann isomerisieren. Daß bei diesen Verbindungen keine Modellstudien zur Isomerisierung mitgeteilt wurden, mag mit ihrer Neigung zu Eliminationsreaktionen zusammenhängen. Zumindest bei den Retinolen fand man, daß sie mit HCl hauptsächlich zu Anhydroretinolen reagieren (Abb. 15)^[50].

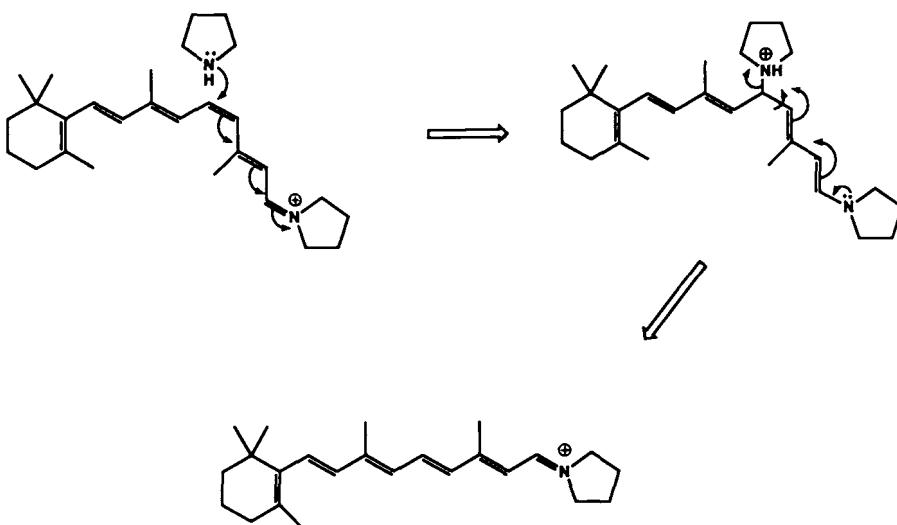


Abb. 14. Katalyse der Isomerisierung von 11-cis-Retinal durch ein sekundäres Amin.

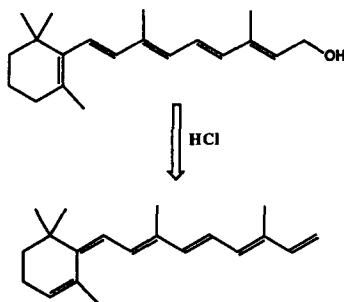


Abb. 15. Säurekatalysierte Bildung eines Anhydroretinols aus all-*trans*-Retinol.

6. Die Natur der Isomerasereaktion

6.1. Die Energiequelle kann kein Bindeprotein sein

Das Hauptproblem bei der Lösung der Isomerasereaktion ist die Klärung der Energiequelle, welche den thermodynamischen Bergauf-Prozeß bewirkt. Oberflächlich betrachtet könnte man argumentieren, daß die Verfügbarkeit des Opsins als thermodynamische Senke dienen kann, die die Isomerasereaktion zur Bildung von 11-*cis*-Retinal treibt. Diese Möglichkeit besteht, wenn äquivalente Mengen von Vitamin A und Opsin vorliegen, aber nicht, wenn Vitamin A im Überschuß ist. Dies ist z. B. beim Menschen der Fall: Auch nach Beendigung der Rhodopsinsynthese werden 11-*cis*-Retinoide im Auge noch im Dunkeln gebildet. Eine weitere mögliche Energiequelle könnten spezifische Bindeproteine sein, welche die Struktur der 11-*cis*-Retinoide erkennen. In der Tat wurden im Sehsystem mehrere Retinoid-bindende Proteine identifiziert, von denen jedoch nur in einem Fall eine Spezifität für die 11-*cis*-Bindung mitgeteilt wurde^[25]. Dieses Bindeprotein ist aber nur in geringen Mengen (ca. 0.1–0.2 Äquivalente pro Äquivalent Vitamin A) vorhanden und kommt daher wahrscheinlich als Energiequelle nicht in Betracht. Hierzu wären zumindest stöchiometrische Mengen erforderlich. Überdies liegen 11-*cis*-Retinylester, die wichtigste Speicherform der 11-*cis*-Retinoide, unkomplexiert als Öltröpfchen im Pigmentepithel vor^[51]. Trotzdem schien es noch möglich, daß bislang nicht beschriebene Retinoid-bindende Proteine von Bedeutung sind, und so mußte festgestellt werden, ob eine derartige Energietransduktion möglich ist. Die Verwendung von aromatischen Aminen, die den Sehzyklus „kurzschließen“, ermöglichte eine unerwartete Lösung dieses Problems.

Wir hatten gefunden, daß retinotoxische aromatischen Amine des in Abbildung 16 dargestellten Typs imstande sind, bereits gebildete 11-*cis*-Retinoide im Dunkeln abzubauen^[52–54]. Diese Verbindungen reagieren in vitro mit 11-*cis*-Retinal zu Schiff-Basen und katalysieren in Phosphatidylcholin-haltigen Vesikeln die schnelle exotherme Isomerisierung zu all-*trans*-Retinal (Abb. 16)^[53, 54]. Die gleichen Schiff-Basen wurden auch in vivo nach Zugabe dieser Amine beobachtet. Dies führte zu der Hypothese, daß diese aromatischen Amine die Menge an 11-*cis*-Retinoiden in vivo vermindern, indem sie den Sehzyklus durch Abbau von 11-*cis*-Retinal nach dessen Bildung kurzschließen^[53]. Dieser Mechanismus hat für den Ablauf des Sehzyklus bedeutende Konsequenzen. Erstens zeigt er, daß eine nicht

energiegekoppelte Retinal-Isomerase nicht existieren kann, da die aromatischen Amine gerade dies sind und eben eine völlig destruktive Wirkung haben. Zweitens belegt er, daß die Enzyme des Sehzyklus im Dunkeln aktiv sind. Drittens demonstriert er einen generellen Mechanismus der Toxizität in der Netzhaut. Vor allem aber zeigt er, daß 11-*cis*-Retinoid-bindende Proteine als Energiequelle für die Bildung dieser Retinoide in vivo nicht von Bedeutung sein können. Wären derartige 11-*cis*-Retinoid-bindende Proteine vorhanden, so hätten die aromatischen Amine die Menge des endogenen 11-*cis*-Retinoids nicht vermindern können.

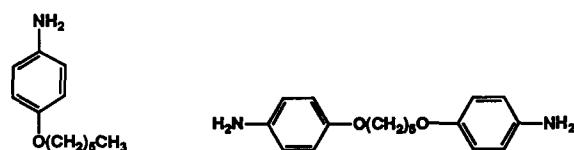


Abb. 16. Retinotoxische aromatische Amine. Links: 4-Hexyloxyanilin; rechts: 4,4'-Pentamethylendioxydianilin.

6.2. Die Natur des Substrates in vivo

Die in Abschnitt 6.1 beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß eine einfache Stabilisierung der 11-*cis*-Retinoide nicht genügt, um ihre Bildung zu begünstigen. Ehe die Frage nach der Energiequelle beantwortet werden konnte, mußte zunächst ein gewisses Verständnis der Natur des Substrates der Isomerasereaktion gewonnen werden. Als diese Experimente durchgeführt wurden, war noch kein in-vitro-System für die *trans*-nach *cis*-Isomerisierung bekannt. Die Frage des Substrates wurde in vivo durch ein Doppelmarkierungsexperiment untersucht (Abb. 17)^[55]. Ratten oder (und) Fröschen wurde ein racemisches Gemisch von [(15*S*)-³H]- und [(15*R*)-³H]all-*trans*-Retinol plus [¹⁵¹⁴C]all-*trans*-Retinol verabreicht. Aus früheren Versuchen wußten wir, daß dieses Gemisch in das visuelle System der Tiere eingebaut wird. Falls die Isomerisierung auf der Aldehydstufe stattfindet, sollte die Hälfte der ³H-Menge, die im anfangs gebildeten 11-*cis*-Retinol(ester) enthalten ist, verloren gehen. Falls die Isomerisierung dagegen erst auf der Alkoholstufe stattfindet, sollte die ³H-Menge erhalten bleiben.

Bei einem in-vivo-Doppelmarkierungsexperiment wie diesem ist eine Reihe von Annahmen erforderlich, um die Ergebnisse interpretieren zu können. Diese Annahmen und ihre Konsequenzen sind die folgenden: 1) Der unspezifische (d. h. nicht-enzymatische) Verlust von ³H in vivo ist minimal. Wäre er beträchtlich, dann könnte er die Grenze von 50% übersteigen und mit der Zeit weiter zunehmen. Diese Art des Verlustes ist aber unwahrscheinlich, da die ³H-Markierung von Retinol in protischen Lösungsmitteln recht beständig ist. 2) Kinetische Isotopeneffekte, die das erwartete ³H/¹⁴C-Verhältnis ändern (können), sind gering. Weder für einen primären ¹⁴C-Isotopeneffekt noch für einen sekundären ³H-Isotopeneffekt wird eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit um auch nur 10% erwartet. Da die ³H-Markierung während der Oxidation freigesetzt wird, ist ein primärer ³H-Isotopeneffekt auf die Bildung des Produktes nicht möglich. Somit wird das ³H/¹⁴C-Verhältnis in Retinal durch mögliche primäre Isotopeneffekte nicht beeinflußt. Die ³H/¹⁴C-Verhältnisse der Produkte einer Oxidationsre-

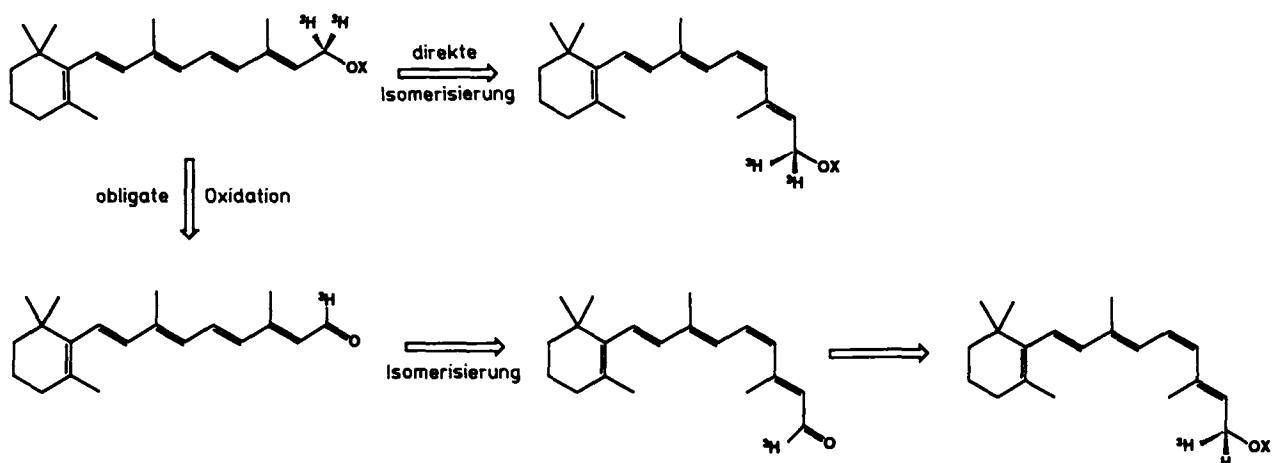


Abb. 17. Doppelmarkierungsexperiment zur Entscheidung, ob der Alkohol oder der Aldehyd isomerisiert.

aktion könnten durch einen primären ^3H -Isotopenefekt erhöht werden, sofern die Reaktion weitgehend vollständig ablief – diese Situation wird jedoch in den hier beschriebenen Experimenten nicht erwartet; der Umsatz ist gering. 3) Es ist wichtig, daß die Redoxreaktionen der Retinole, welche von der Retinol-Dehydrogenase katalysiert werden, nicht zu schnell gegenüber der Isomerisierung ablaufen. Die Redoxreaktionen können jedoch mit Inhibitoren der Retinol-Dehydrogenase verlangsamt werden.

Unter diesen Voraussetzungen ergaben die an Ratten durchgeführten Doppelmarkierungsexperimente eindeutige Ergebnisse^[55]. Etwa 70 % der ^3H -Menge des Ausgangsmaterials war in den anfangs gebildeten 11-cis-Retinylestern erhalten geblieben, und dieser Anteil konnte durch Zugabe von 4-Methylpyrazol, einem bekannten Inhibitor der Retinol-Dehydrogenase, auf mehr als 80 % erhöht werden^[55]. Nach langer Inkubation (24 h) betrug der ^3H -Verlust in allen Retinoiden etwa 50 %, ein Ergebnis, das die Stereospezifität des Verlustes von ^3H belegt. (Die Frage der Stereochemie der Dehydrogenasen wird in Abschnitt 6.4 angesprochen.) Demnach muß die Isomerisierung auf der Oxidationsstufe des Alkohols stattfinden; all-trans-Retinal kann somit nicht das Substrat sein. Zwar lassen diese Experimente noch sowohl Ester als auch Alkohole als mögliche Substrate zu, doch sind Ester wahrscheinlicher, da das zurückgewonnene all-trans-Retinol unter allen Bedingungen 50 % seiner ^3H -Markierung verloren hatte und so nicht leicht als Isomerasesubstrat gedient haben konnte, denn die Produkte enthielten deutlich mehr als 50 % ^3H . Dagegen enthielten die all-trans-Retinylester noch etwa 90 % ihres ^3H und könnten somit die Isomerasesubstrate sein.

6.3. 11-cis-Retinoid-Regeneration in vitro

Wie bereits in Abschnitt 1 bemerkt, zeigte Kühne^[11], daß gebleichte Frosch-Netzhaut nur dann ihr Sehpigment regeneriert, wenn sie in Kontakt zum Pigmentepithel steht. Später wurde gefunden, daß etwa 50–85 % des Pigments in diesen in-vitro-Präparationen nach einer einzelnen starken Bleichung regenerieren^[29, 56–58]. Selbst dieses Ausmaß an Regeneration des Rhodopsins könnte aber durch endogen vorliegende 11-cis-Retinoide erklärt werden, ohne daß eine de novo-Biosynthese der Retinoide für die Regenerierung

erforderlich wäre, vor allem, wenn die Präparationen nicht genügend gebleicht worden waren, um die Vorräte an 11-cis-Retinylestern im Pigmentepithel abzubauen. Diese Möglichkeit führte – zusammen mit wiederholten Mißerfolgen beim Versuch, eine Retinal- oder eine Retinoid-Isomerase nachzuweisen – zur Hypothese, daß 11-cis-Retinal außerhalb des lebenden Organismus nicht synthetisiert werden kann, weil beim Durchtrennen des optischen Nervs ein wichtiger Nervenreiz für die Kontrolle der Dunkeladaptation zerstört wird, oder auch, weil die in-vitro-Kulturbedingungen für die Erhaltung der Lebensfähigkeit des Gewebes ungeeignet waren.

Erste Untersuchungen dieses Problems zeigten, daß keine efferente Kontrolle der Regeneration des Rhodopsins auftritt, da nach einseitigem Durchtrennen des optischen Nervs an lebenden Fröschen die Regenerationsgeschwindigkeit des Rhodopsins in beiden Augen gleich war^[59]. Wurden Amphibien-Augenpräparationen (mit intakter Netzhaut und intaktem Pigmentepithel) in ein Kulturmedium für Amphibiengewebe gebracht, ergaben sich klare Hinweise für eine de-novo-Biosynthese von 11-cis-Retinoiden^[59]. Rhodopsin wurde nach mehrfachen Bleichungs-Regenerations-Cyclen regeneriert, und es konnten auch eindeutige Daten für die de-novo-Biosynthese von 11-cis-Retinylestern an diesen Augenpräparationen erhalten werden^[59].

Es interessierte nun, dieses in-vitro-11-cis-Retinoidsynthese-System zu vereinfachen, um seine Charakterisierung und Reinigung zu erleichtern. Eine Membranpräparation aus Netzhaut/Epithelgewebe von Amphibien, die aus dem Überstand einer 600 × g-Zentrifugation gewonnen wurde, konnte zugegebenes all-trans-Retinol zu einer Mischung aus 11-cis-Retinol, 11-cis-Retinal und 11-cis-Retinylpalmitat umsetzen^[60]. Auch all-trans-Retinylpalmitat und all-trans-Retinal wurden von diesen Membranen erzeugt. Es wurde eine zeitabhängige, fast lineare Zunahme der Menge neu gebildeten [^3H]-11-cis-Retinols beobachtet, während in Abwesenheit von Augengewebe keine Synthese stattfand^[60]. In Abbildung 18 A sind die Anteile von isomeren [^3H]-Retinolen in Augengewebe als Funktion der Inkubationszeit dargestellt. Demnach wird [^3H]-13-cis-Retinol, ein Isomer ohne bekannte Funktion im Sehprozeß, nicht in nennenswerter Menge gebildet. Abbildung 18 B zeigt ein Kontrollexperiment ohne den Überstand aus Netzhaut/Pigmentepithel. Eine unspezifische Isomerisierung von all-trans- zu 13-cis-Retinol war in

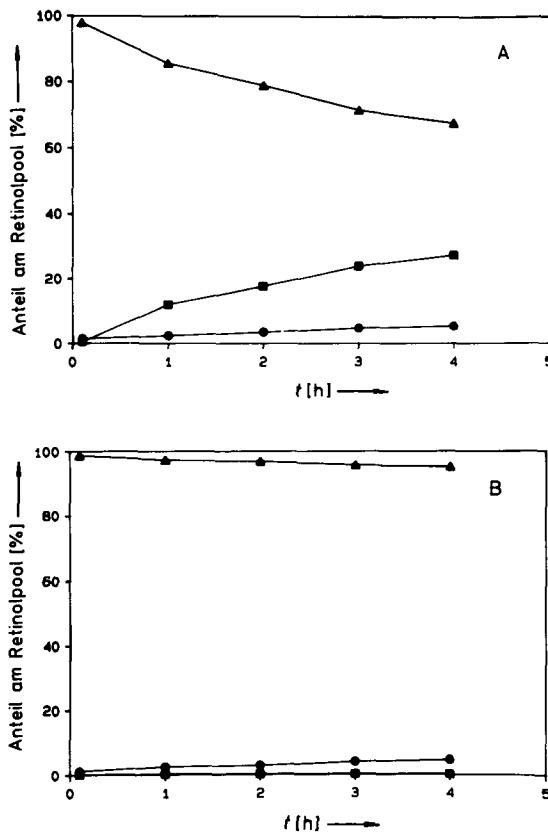


Abb. 18. Isomerenverteilung von $[^3\text{H}]\text{-Retinol}$ während einer in-vitro-Inkubation [60]: A) 1.0 mL eines 600 \times g-Überstandes aus lichtadaptierter Netzhaut/Pigmentepithel zweier Froschaugen oder B) 1.0 mL Phosphatpuffer wurden im Dunkeln mit 50 μL 10proz. Rinder-Serumalbumin und 4 μCi [11,12- ^3H]all-trans-Retinol in 4 μL Ethanol inkubiert. Stündlich wurden 200- μL -Proben mit Hexan extrahiert und die $[^3\text{H}]\text{-Retinole}$ durch HPLC analysiert. ■—■ [3H]-11-cis-Retinol; ●—● [3H]-13-cis-Retinol; ▲—▲ [3H]-all-trans-Retinol. Nachdruck mit Genehmigung von Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84, 1849. Copyright © 1987 National Academy of Science.

geringem Maße nachweisbar, 11-cis-Retinol entstand jedoch nicht in meßbarer Menge. Wie für einen biologisch signifikanten Prozeß zu erwarten, erwies sich die 11-cis-Retinoid-Biosyntheseaktivität als wärmeempfindlich^[60]. Intaktes Protein und intakte Membranen sind erforderlich, da die Aktivität nach Zugabe von Proteinase K oder Phospholipase C zerstört wird^[61].

Es sei erwähnt, daß größte Sorgfalt aufgewendet wurde, um eine falsche Identifizierung des vom Membransystem synthetisierten 11-cis-Retinoids zu vermeiden, denn dies hat in der Vergangenheit zu schweren Irrtümern geführt. Die hier beschriebenen 11-cis-Retinoide wurden sowohl chromatographisch als auch mit chemischen Methoden identifiziert^[60]. Nach chromatographischer Reinigung und anschließender Isomerisierung mit Iod oder Veresterung mit Palmitoylchlorid verhielt sich das biosynthetisch hergestellte 11-cis-Retinol wie authentisches Material^[60].

Die oben beschriebenen Befunde zeigen eindeutig das Vorhandensein einer biosynthetischen Aktivität, die erhebliche Mengen von 11-cis-Retinoid synthetisieren kann. So konnte 11-cis-Retinol z. B. 40–50 % des isolierten Retinolpools ausmachen, das heißt weit mehr, als dem Anteil im Gleichgewicht entspricht. Es interessierte nun, ob die Isomeraseaktivität sich in der Netzhaut oder im Pigmentepithel befindet und welches Retinoid als Substrat dient. Untersuchungen an Amphibien ergaben eine fast vollständige Lokalisierung der

Isomeraseaktivität in den Membranen des Pigmentepithels^[60]. Die geringfügige Aktivität in der Netzhaut ist fast mit Sicherheit auf die Kontamination durch noch anhängendes Pigmentepithel zurückzuführen. Die Isomerisierungsaktivität wurde auch am Rinderauge beobachtet, bei dem sich Netzhaut und Pigmentepithel besser trennen lassen. Hier wurde die Aktivität nur in den Membranen des Pigmentepithels gefunden^[62].

Diese Ergebnisse erklären, warum frühere Versuche zur Regeneration von Pigment nach Zugabe diverser all-trans-Retinoide zu isolierter Netzhaut fehlschlugen^[63, 64]. Dagegen stehen sie im Widerspruch zu zwei Veröffentlichungen, nach denen Pigmentepithel und daraus gewonnene Homogenate nicht imstande seien, zugegebenes all-trans-Retinol in 11-cis-Retinoide umzuwandeln^[65, 66]. Inzwischen weiß man, daß diese Interpretation der experimentellen Ergebnisse nicht zulässig ist, da das all-trans-Retinol in 2- bis 4proz. Ethanol in Abwesenheit von jeglichem Trägerprotein zugesetzt wurde. Unter diesen Bedingungen denaturiert das membrangebundene Isomerisierungssystem^[60, 61]. Der erfolgreiche Nachweis der Isomeraseaktivität in Pigmentepithel-Membranen hing von der Verwendung sehr niedriger Ethanolkonzentrationen, 0,5 % Rinder-Serumalbumin als Trägerprotein und dem Nachweis von 11-cis-Retinol als Produkt ab^[60]. Kürzlich konnte eine Umwandlung von all-trans-Retinol in 11-cis-Retinoide auch in Kulturen von intakten Pigmentepithelen gezeigt werden^[67, 68].

6.4. Substratspezifität der Isomerase

Da markiertes all-trans-Retinol durch die in Abschnitt 6.3 beschriebene Membranpräparation aus Pigmentepithel in all-trans-Retinal, all-trans-Retinylpalmitat und in alle drei 11-cis-Analoga überführt werden kann, ist nicht anzunehmen, daß all-trans-Retinol das Substrat des Isomerasystems und 11-cis-Retinol das direkte Produkt der Isomerasereaktion ist. Die Möglichkeit, daß all-trans-Retinal das Isomerasesubstrat ist, war leicht auszuschließen. Membranen, die sorgfältig gewaschen worden waren, um Nicotinamid-haltige Cofaktoren zu entfernen, isomerisieren zugegebenes all-trans-Retinol ebensogut wie ungewaschene Membranen^[60]. all-trans-Retinal dagegen wurde nur von ungewaschenen Membranen, die Redoxreaktionen durchführen konnten, in größerem Maße umgesetzt. Im Rindersystem setzen isolierte Pigmentepithel-Membranen all-trans-Retinal nicht zu 11-cis-Retinal um^[62]. Die Annahme, daß freies all-trans-Retinal nicht das Isomerisierungssubstrat sein kann, wurde durch den Befund belegt, daß [15- ^3H , 15- ^{14}C]all-trans-Retinol durch native Frosch- und Rinder-Pigmentepithel-Membranen unter völliger Erhaltung der Tritiummarkierung in 11-cis-Retinol überführt wird (Abb. 19)^[61]. Dieses Ergebnis steht völlig in Einklang mit den Ergebnissen der in-vivo-Variante des in Abschnitt 6.2 beschriebenen Doppelmarkierungsexperimentes^[55] und schließt aus, daß freies all-trans-Retinal das Isomerasesubstrat ist, da bei Oxidation des Retinols vor der Isomerisierung das Tritium verloren gehen würde.

Die oben beschriebenen Experimente zeigen, daß Retinal nicht das Substrat sein kann, doch lassen sie sowohl Retinol als auch Retinylpalmitat als mögliche Substrate zu. Wird all-trans-Retinol von Rinder-Pigmentepithel-Membranen

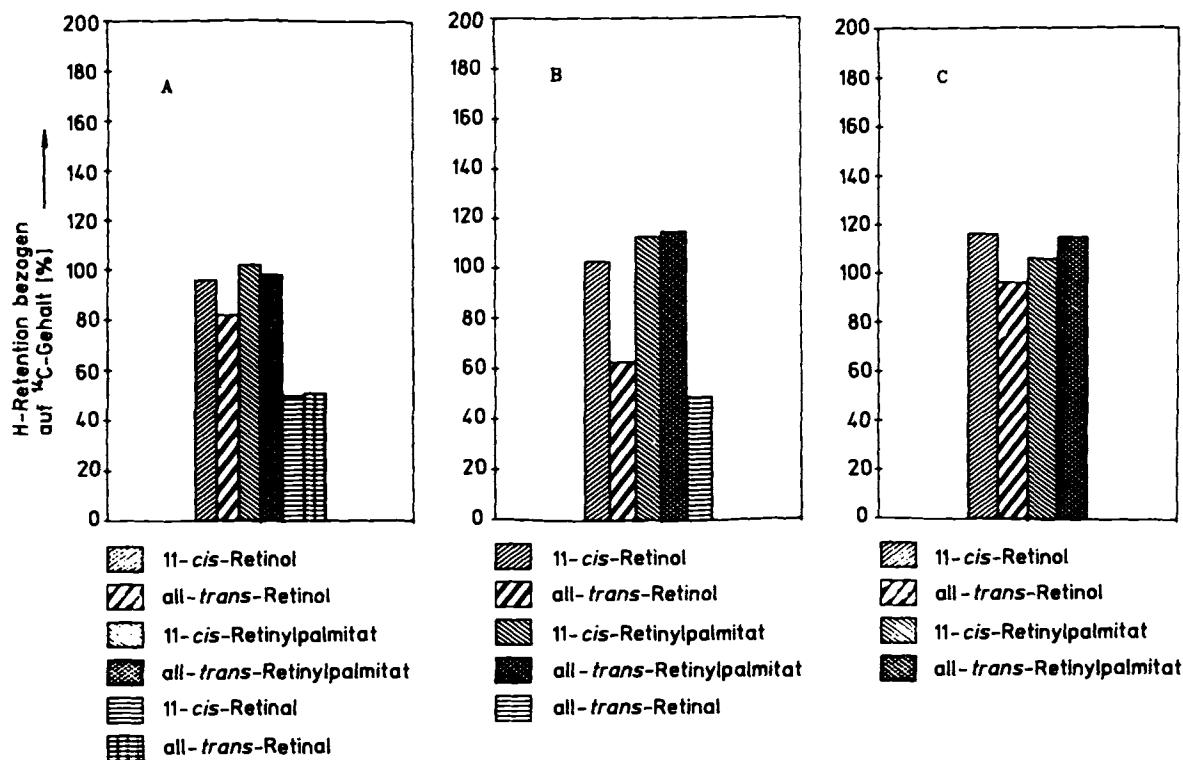


Abb. 19. Doppelmarkierungsexperimente A) an einem $600 \times g$ -Überstand aus Frosch-Pigmentepithel, B) an der gewaschenen $600 \times g$ -Partikelfraktion von Frosch-Netzhaut/Pigmentepithel und C) an der $150000 \times g$ -Partikelfraktion von Rinder-Pigmentepithel [61]. - A) Eine Mischung von [^{3}H]- und [^{14}C]-all-trans-Retinol, die $0.1 \mu\text{Ci}^{3}\text{H}$ enthielt ($^{3}\text{H} : {^{14}\text{C}} = 5.2 : 1$), wurde mit 4 mL eines $600 \times g$ -Überstands aus Netzhaut/Pigmentepithel von vier lichtadaptierten *Rana-pipiens*-Fröschen und $100 \mu\text{L}$ 10proz. Rinder-Serumalbumin 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Retinoide wurden mit Standardmethoden analysiert. B) Die gewaschene $600 \times g$ -Partikelfraktion wurde durch zweimaliges Abzentrifugieren des $600 \times g$ -Überstandes mit $50000 \times g$ (je 20 min bei 4°C) mit anschließendem Resuspendieren im ursprünglichen Puffervolumen hergestellt. Eine Mischung von [^{3}H]- und [^{14}C]-all-trans-Retinol, das $0.1 \mu\text{Ci}^{3}\text{H}$ enthielt ($^{3}\text{H} : {^{14}\text{C}} = 5.2 : 1$), wurde mit 4 mL dieser aus Netzhaut/Pigmentepithel gewonnenen $600 \times g$ -Partikelfraktion aus vier lichtadaptierten *Rana-pipiens*-Fröschen 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Retinoide wurden mit Standardmethoden analysiert. Nennenswerte, mit 11-cis-Retinal verbundene Radioaktivität wurde nicht gefunden. C) Die gleiche Menge von [^{3}H]- und [^{14}C]-markiertem all-trans-Retinol in $100 \mu\text{L}$ 10proz. Rinder-Serumalbumin (als Retinolcarrier) wurde mit 3 mg Protein aus Rinder-Pigmentepithel, das in 4 mL 50 mM Phosphatpuffer (pH 7.2) suspendiert war, bei 35°C 1 h inkubiert. Die Retinoide wurden mit Standardmethoden analysiert. Diese Homogenatpräparation ist im wesentlichen frei von Redoxaktivität, da keine nennenswerten Mengen von 11-cis- und all-trans-Retinal gebildet wurden. Alle vier analysierten Retinoloidisomere behielten ihre ^{3}H -Markierung vollständig. Nachdruck (leicht verändert) mit Genehmigung von J. Biol. Chem. 262, 16848. © 1987 The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

umgesetzt, die vorher mit UV-Licht behandelt und gewaschen worden waren, so wird das Retinol praktisch vollständig zu Retinylestern verestert (Abb. 20 A) [69]. Anschließend wird 11-cis-Retinol gebildet, während die Menge an all-trans-Retinylester abnimmt. Dazu kommt, daß, wie in Abbildung 20 B [69] gezeigt, diese Membranen 11-trans-Retinylpalmitat zu 11-cis-Retinol umsetzen. Andere 11-trans-Retinylester wie das Oleat und das Decanoat werden ebenfalls zu 11-cis-Retinol, nicht aber zu den entsprechenden 11-cis-Retinylestern umgesetzt [70]. Zusammengenommen bilden diese Experimente zwar keinen eindeutigen Beweis, geben aber doch sehr starke Hinweise darauf, daß Retinylester die wirklichen Substrate der Isomerase sind und direkt in 11-cis-Retinol umgewandelt werden. Die Feinheiten eines derartigen Prozesses werden in Abschnitt 7.1 im Rahmen der Energiefrage angesprochen.

Die Spezifität des Isomerasensystems für bestimmte Retinoloidisomere ist beträchtlich. In gewaschenen Pigmentepithel-Membranen werden zugegebene 9-cis- und 13-cis-Retinol mit hoher Ausbeute verestert, keines der beiden jedoch in signifikantem Maße isomerisiert [61]. Methylierte Analoga von all-trans-Retinol wie das O-Methyl- und das 15-Methyl-Derivat wurden ebenfalls untersucht; der Methylether ist völlig inaktiv, das 15-Methyl-Derivat ist ein äußerst

schwaches Substrat der Isomerase [71]. Das Isomerasensystem scheint also für all-trans-Retinoide hochspezifisch zu sein.

Die Spezifität der beschriebenen Isomerase muß mit dem in vivo beobachteten Mangel an Stereospezifität in Einklang gebracht werden [72]. Es steht fest, daß nach intraocularer Injektion von [^{15}C]-13-cis-Retinol und [$^{11,12-3}\text{H}_2$]-all-trans-Retinol beide Isotope mit etwa gleicher Effizienz in Rhodopsin eingebaut werden [72]. Unter geeigneten Bedingungen kann dieses in vivo erhaltene Ergebnis in vitro reproduziert werden. So wird z. B. von ungewaschenen Pigmentepithel-Membranen 13-cis-Retinol anscheinend ebenso schnell zu 11-cis-Retinoiden isomerisiert wie all-trans-Retinol selbst [61].

Diese Ergebnisse lassen sich vereinbaren, sofern berücksichtigt wird, daß ungewaschene Membranen sowohl Nicotinamid-haltige Cofaktoren als auch die Enzyme enthalten, um das zugegebene 13-cis-Retinol zu 13-cis-Retinal zu oxidieren. 13-cis-Retinal kann dann nicht-enzymatisch zu all-trans-Retinal isomerisiert werden, das zu all-trans-Retinol reduziert wird. Die kinetisch einfache und thermodynamisch bevorzugte Isomerisierung von 13-cis-Retinal zu all-trans-Retinal findet in Gegenwart von Phosphatidylaminoethanol oder von Lipiden statt, die aus der Netzhaut stammen [49] (vgl. Abschnitt 5.3). In der Tat werden Retinale von primä-

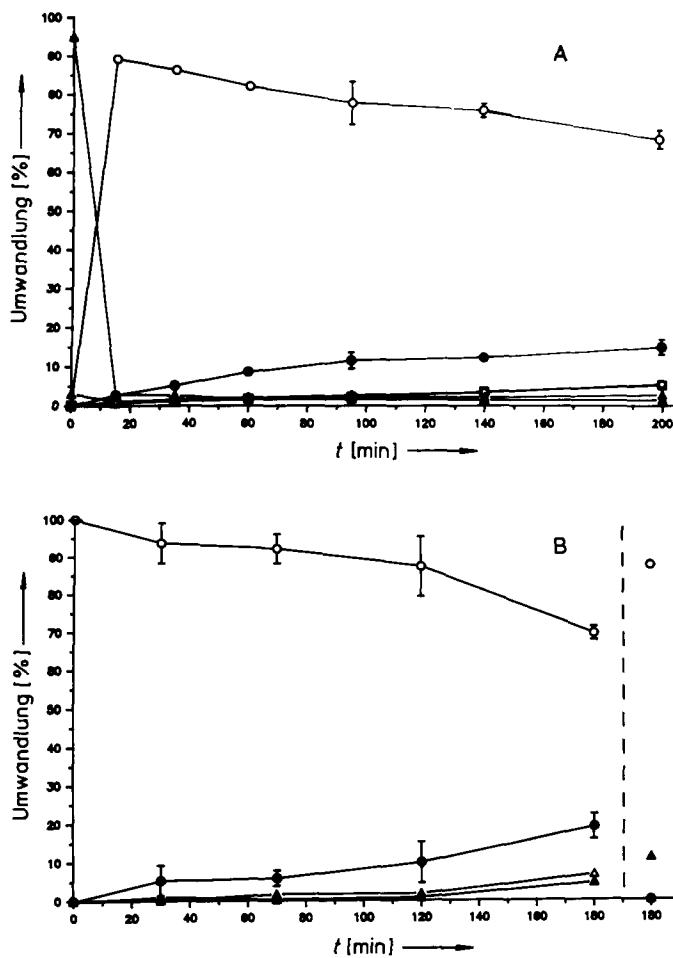


Abb. 20. Umsetzung von A) Vitamin A und B) all-trans-Retinylpalmitat durch belichtete Pigmentepithel-Membranen [69]. A) Rinder-Pigmentepithel-Membranen wurden belichtet und gewaschen. Die Membranen (2 mg mL^{-1}) wurden mit $0.05 \mu\text{M}$ [11,12- ^3H]all-trans-Retinol ($50 \mu\text{Ci mM}^{-1}$, Amersham) und Rinder-Serumalbumin inkubiert. In Abwesenheit von Membranen wurde kein 11-cis-Retinol gebildet. Zu den angegebenen Zeiten wurden Retinoide mit Methanol-Hexan extrahiert und durch HPLC analysiert. Jedes Experiment wurde in zwei parallelen Ansätzen durchgeführt; das Ganze wurde mehrmals wiederholt. Nach der Inkubation wurden auch kleine Mengen der Retinale ($< 5\%$) gefunden. B) Membranen wurden mit synthetisch hergestelltem [^3H]all-trans-Retinylpalmitat ($0.3 \mu\text{M}$, 5 Ci mM^{-1}) inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Retinoide wie in A) angegeben untersucht. Bei Kontrollinkubationen (rechter Teil von Abb. 20 B) in Abwesenheit von Membranen bildeten sich wesentlich höhere Mengen an all-trans-Retinol (ca. 10% der gesamten Radioaktivität am Ende des Experiments) als bei Inkubation in Gegenwart von Membranen. ○—○ Retinylester; ●—● 11-cis-Retinol; △—△ 13-cis-Retinol; ▲—▲ all-trans-Retinol; □—□ 11-cis,13-cis-Retinol; ○—○ all-trans-Retinol. Nachdruck (leicht verändert) mit Genehmigung von Science 244, 968 © 1989 der AAAS.

ren und sekundären Aminen leicht isomerisiert^[46]. Eine mögliche physiologische Rolle dieses nicht-enzymatischen Isomerisierungsweges bleibt offen, obwohl er erklären würde, warum 13-cis-Retinoide im Auge normalerweise nicht gefunden werden. Die schnelle „chemische“ und nicht isomeraseabhängige Isomerisierung von 13-cis-Retinal zu all-trans-Retinal und dessen anschließende Reduktion zum Vorfänger des Isomerasensystems, all-trans-Retinol, könnte alle vorhandenen 13-cis-Retinoide nutzen und als eine Art Nebenweg dienen.

Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden auch an einer Reihe von Dihydroretinolen untersucht, die in Abbildung 21 dargestellt sind^[73]. Keines der Dihydroisomere wurde in größerem Ausmaß in sein 11-cis-Gegenstück umgewandelt, wenn dies auch bei Vitamin A₂ (3,4-Dihydro-all-trans-Reti-

nol) der Fall war. Demnach ist eine intakte Polyenkette für ein Isomerasesubstrat erforderlich^[73]. Die mechanistischen Auswirkungen dieses Befunds werden in Abschnitt 8 diskutiert. Interessanterweise ist Vitamin A₂ bei niederen Amphibien ein wichtiger Sehchromophor, und es wird, wie erwähnt, durch das Isomerasensystem umgesetzt^[73].

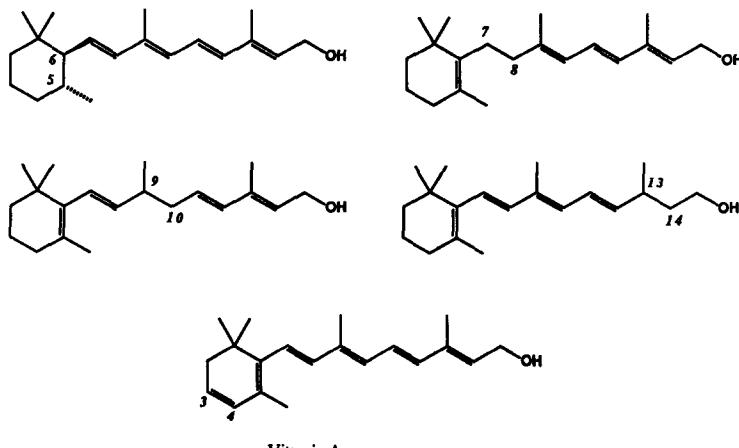


Abb. 21. Dihydroretinole und Vitamin A₂.

6.5. Biochemische Charakterisierung des Isomerasensystems

Das Isomerasensystem ist membrangebunden, wie bereits in Abschnitt 6.3 erwähnt. Die Isomeraseaktivität kann durch Zentrifugation aus dem Überstand entfernt werden und taucht dann in der Partikelfraktion auf^[60]. Anscheinend verteilt sich die Isomeraseaktivität ziemlich gleichmäßig über die Membranfraktionen, wie Zentrifugationsstudien gezeigt haben. Diese Studien werden durch die starke Estersynthetaseaktivität erschwert, die anscheinend mit der Isomeraseaktivität wandert^[60, 62]. Durch ausgedehntes Beschallen konnte jedoch ein $100\,000 \times g$ -Überstand aus leichten Membranen gewonnen werden, der seine Fähigkeit, all-trans-Retinol auf anderem Wege als durch Isomerisierung umzusetzen, so weitgehend verloren hatte, daß weniger als 8% des zugesetzten Retinols verestert wurden^[61]. Die Isomeraseaktivität dieser Membranen konnte durch Zugabe von all-trans-Retinol gesättigt werden, wie dies für einen biologisch relevanten Prozeß zu fordern ist, und zeigte einen apparenten V_{\max} -Wert von 5 pmol pro Stunde und pro mg Protein und einen apparenten K_m -Wert von $0.8 \mu\text{M}$. Die Ursache dieses niedrigen V_{\max} -Wertes wird unten diskutiert. Das pH-Optimum liegt bei 8.0^[61]. In einem weniger stark gereinigten $600 \times g$ -Überstand wird V_{\max} pro Auge auf 100 pmol h^{-1} geschätzt. Dieser Wert ist eine untere Grenze, da ein beträchtlicher Teil (etwa die Hälfte) der Isomeraseaktivität in der $600 \times g$ -Partikelfraktion bleibt und während der Homogenisierung Aktivität verloren geht. In lebenden Fröschen der Art *Rana pipiens* bildet jedes Auge während der Dunkeladaptation 1–2 mol 11-cis-Retinoide pro Stunde; die Speicherform 11-cis-Retinylpalmitat entsteht bei längerer Dunkelheit mit etwa einem Zehntel dieser Geschwindigkeit^[29, 31]. Auch in Abwesenheit etwaiger unbekannter limitierender Cofaktoren ist somit die Bildungsgeschwindigkeit von 11-cis-Reti-

noiden *in vitro* beträchtlich und mit der physiologischen Geschwindigkeit vergleichbar.

In einem $600 \times g$ -Überstand von Rinder-Pigmentepithel beträgt V_{max} der Isomerisierung pro mg Protein etwa 1 nmol h^{-1} . Der bei Amphibien bestimmte niedrige V_{max} -Wert wurde in einem System gemessen, aus dem bewußt Estersynthetase-Aktivität abgereichert worden war. Spätere Experimente zeigten, daß die Ester obligate Zwischenprodukte des Isomerisierungsprozesses sind. Dies erklärt, daß rohe Membranfraktionen zu wesentlich höheren Geschwindigkeiten führen als Membranpräparationen, deren Estersynthetase-Aktivität vermindert worden war.

Die Isomerase- und Estersynthetase-Aktivität wird zwar von einer großen Zahl von Detergentien recht leicht zerstört, doch konnten in jüngerer Zeit geeignete Detergentien für ihre Solubilisierung und weitere Reinigung gefunden werden^[74].

6.6. Solubilisierung in Detergentien und teilweise Reinigung der Isomerase und Ester-Synthetase

Isomerase und Ester-Synthetase werden durch zahlreiche Detergentien leicht denaturiert^[61]. Dennoch gelang es uns vor kurzem^[74], beide Aktivitäten im zwitterionischen Detergens Zwittergent-3,14 [3-(*N,N*-Dimethyl-*N*-tetradecylammonio)-1-propansulfonat]^[75] zu solubilisieren. Durch Anionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie wurde die Ester-Synthetase ungefähr 200fach angereichert^[74]. Die Isomerase war nach der Anionenaustauschchromatographie ungefähr 10- bis 14fach angereichert.

Als Folge dieser Reinigungsschritte ließen sich an den Enzymen mehrere interessante Befunde beobachten. Wie schon in Abschnitt 6.4 erwähnt, können Pigmentepithel-Membranen aus zugegebenen Retinolen Retinylester bilden, ohne daß acylierenden Substanzen wie Fetsäureacyl-CoA-Derivate zugesetzt werden müssen. Dies wurde von Krinsky zuerst entdeckt^[75]. Daraus folgt man, daß die Membran selbst die Acyldonoren enthält. Nach Solubilisierung und starker Anreicherung der Retinylester-Synthetase wurde die Herkunft des Acyldonors schnell erkannt: Es wurde gefunden, daß der Membranbestandteil Lecithin (Phosphatidylcholin) als Acyldonor für die Retinylestersynthese dient und daß der Transfer von der 1-Position des Phospholipids zum Retinol erfolgt, wobei ein Retinylester und ein 2-Acyllyso-phospholipid entstehen (Abb. 22)^[74]. Das Enzym ist also

eine Lecithin-Retinol-Acyl-Transferase (LRAT). Ähnliche Schlußfolgerungen zogen Saari et al. aus Arbeiten mit Rohmembranfraktionen^[76]. Die Retinylester-Synthetase wirkt also durch Umesterung, wie sie ähnlich auch in der Leber gefunden wurde^[77]. Interessanterweise ist diese Reaktion umkehrbar und könnte Retinol aus einem Retinylester durch Rückumesterung ohne Hydrolyse *in vivo* freisetzen. Dies würde offensichtlich Energie sparen, da Retinol im Bedarfsfall ohne Hydrolyse eines Phospholipids gebildet werden könnte. Ein zweiter interessanter Gesichtspunkt ist die gemeinsame Anreicherung von Isomerase- und Estersynthetase-Aktivität bei der Anionenaustausch- und Gelchromatographie, die die Existenz eines Multienzymkomplexes oder einer anderen funktionellen Verbindung nahelegt^[74].

7. Auffinden der Energiequelle

7.1. Retinylester sind die Isomerasesubstrate

Wie in Abschnitt 6.3 beschrieben, können die Pigmentepithel-Membranen zugegebenes Vitamin A ohne zugefügte Energiequellen in 11-*cis*-Retinoide überführen. Da sorgfältiges Waschen der Membranen die Isomeraseaktivität nicht beeinflußt, scheint die gesuchte Energiequelle nicht löslich zu sein. Tatsächlich stimulierten zugesetzte energiereiche Substanzen wie MgATP, MgGTP oder Palmitoyl-CoA die Isomeraseaktivität nicht^[61]. Von weiterem Interesse ist der Mechanismus der Energieübertragung. *in-vivo*-Experimente mit aromatischen Aminen als Isomerisierungskatalysatoren schließen offenbar die Möglichkeit aus, daß noch unbekannte Bindeproteine die notwendige Energie liefern. Andere mechanistische Möglichkeiten mußten herangezogen werden, um den energieabhängigen Isomerisierungsprozeß zu erklären. Die Möglichkeit, daß ein irreversibler Schritt die Energie liefern könnte, scheidet aus, denn alle Reaktionen des Sehzyklus sind umkehrbar^[69]. Es muß daher ein weiterer Typ einer Energiequelle in Betracht gezogen werden.

Die enge Beziehung zwischen endogener Retinylestersynthese und Isomerisierung liefert den Schlüssel zur Lösung des Rätsels^[62]. Bis jetzt haben Untersuchungen zur Lokalisierung der Aktivität der Isomerase und Retinylester-Synthetase in der Membran gezeigt, daß diese beiden Aktivitäten weder durch differentielle noch durch Dichtegradientenentrifugation voneinander getrennt werden können. Wie in Abschnitt 6.6 erwähnt, bleiben die solubilisierten enzymatischen Aktivitäten auch bei der Reinigung zusammen. Schließlich scheinen chemisch sehr verschiedene Reagenzien wie Ethanol, Hydroxylamin und *p*-Hydroxyquecksilberbenzoat beide Aktivitäten in etwa paralleler Weise zu hemmen^[62]. Ethanol kann Enzyme denaturieren. Von Hydroxylamin weiß man, daß es die Retinylestersynthese hemmt, möglicherweise aufgrund einer Wechselwirkung mit einem höherenergetischen Acylzwischenprodukt^[75]. Die Beobachtung, daß die Aktivität sowohl der Ester-Synthetase als auch der Retinoid-Isomerase durch Vorbehandlung mit Hydroxylamin in ungefähr gleichem Ausmaß gehemmt wird, läßt einen Zusammenhang zwischen den beiden Prozessen vermuten. Die Ergebnisse mit *p*-Hydroxyquecksilberbenzoat, einem Thiolat-spezifischen alkylierenden Agens, sind ebenfalls eindrucksvoll^[62]. Dieses Reagens beeinflußt beide Aktivitä-

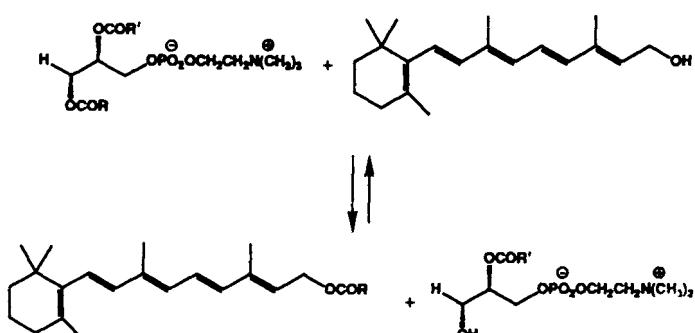


Abb. 22. Umesterung von Retinol mit Phosphatidylcholin (Lecithin), die durch das Enzym LRAT katalysiert wird.

ten auf mehr oder weniger gleiche Art, was eine fundamentale Beziehung zwischen beiden Aktivitäten impliziert.

Neueste Untersuchungen mit all-*trans*-Retinyl- α -bromacetat, das die Synthese der Retinylester durch die Pigmentepithel-Membran spezifisch inhibiert, tragen Wesentliches zur Frage des tatsächlichen Substrates der Isomerase bei^[78]. Im Pigmentepithelsystem inaktiviert all-*trans*-Retinyl- α -bromacetat die Synthetase nicht, sondern ist ein ausgesprochen starker Inhibitor, der im μ M-Bereich wirkt. Wenn Pigmentepithel-Membranen mit dieser Verbindung vorbehandelt und dann mit all-*trans*-Retinol versetzt werden, so wird es praktisch nicht (< 5%) in Retinylester umgewandelt, und es bilden sich auch keine 11-*cis*-Retinoide. Wenn die Membranen jedoch zuerst mit all-*trans*-Retinol behandelt werden, wobei sich größtenteils all-*trans*-Retinylester bilden, und dann der Inhibitor zugegeben wird, entsteht 11-*cis*-Retinol bis nahe an den Kontrollwert (d. h. ohne zugegebenen Inhibitor). Diese Experimente lassen wenig Zweifel daran, daß die all-*trans*-Retinylester und nicht die all-*trans*-Retinole in 11-*cis*-Retinole überführt werden und daß die Bildung der Retinylester ein obligater Bestandteil des Isomerisierungswegs ist. Würde all-*trans*-Retinol direkt zu 11-*cis*-Retinol isomerasieren, dann hätte die Vorbehandlung der Membranen mit all-*trans*-Retinyl- α -bromacetat die Isomerisierung begünstigen müssen, da weniger Substrat bei der Esterbildung verloren gegangen wäre. Weiterhin wurde gefunden, daß in Anwesenheit des Inhibitors zwar all-*trans*-Retinylester in 11-*cis*-Retinol überführt, aber keine 11-*cis*-Retinylester gebildet wurden. Dieses Experiment schließt einen Ester-Ester-Isomerisierungsweg aus.

Warum könnte eine Verknüpfung von Estersynthese und Isomerisierung interessant sein? Ester sind „hochenergetische“ Verbindungen und werden mit einer Freien Energie in der Größenordnung von -5 kcal mol^{-1} hydrolysiert^[79]. Wenn die Freie Energie der Hydrolyse eines Esters an den Isomerisierungsprozeß gekoppelt werden könnte, stünde mehr als genug Energie zur Verfügung, um die Isomerisierung zu treiben. Die Freie Energie jeder komplizierten chemischen Reaktion läßt sich berechnen, wenn sie formal in einfachere chemische Reaktionen zerlegt werden kann, bei denen die Änderungen der Freien Energie bekannt sind. Im vorliegenden Fall summieren sich die Energien wie in Abbildung 23 gezeigt und legen eine Möglichkeit nahe, wie die Esterhydrolyse mit der Isomerisierung gekoppelt sein könnte.

te^[69]. Hier wäre das Substrat ein all-*trans*-Retinylester und das Produkt 11-*cis*-Retinol. Das Enzym, das die Isomerisierung katalysiert, ist eher eine „Isoesterase“ als eine einfache Isomerase. Die Isomerisierungsreaktion wird hier in zwei unabhängige Reaktionen zerlegt. Aus der Gesamtänderung der Freien Energie geht hervor, daß es sich um eine exotherme Isomerisierung handelt. Wichtig ist, daß die beiden Reaktionen hier nicht unabhängig voneinander auftreten. Es ist höchst interessant, daß die treibende Energie der Reaktion aus den Phospholipiden der Membran stammt, da Retinylester durch Umesterung mit Lecithin entstehen. In diesem Fall würden die Phospholipide somit als ATP-Ersatz wirken.

Ein all-*trans*-Retinylester als das Substrat der Isomerisierung steht im Einklang mit früheren Beobachtungen. Wie bereits in Abschnitt 6.4 erwähnt, wird zugegebenes all-*trans*-Retinol vor der Bildung von 11-*cis*-Retinol schnell in all-*trans*-Retinylester umgewandelt^[60, 69]. Zusätzlich werden all-*trans*-Retinylester durch die Isomerase-haltigen Membranen zu 11-*cis*-Retinol umgewandelt^[69]. Schließlich zeigten die in-vitro-Doppelmarkierungsexperimente, bei denen $[(15S)^3\text{H}]$ - und $[(15R)^3\text{H}]$ -all-*trans*-Retinol plus $[15-^{14}\text{C}]$ -all-*trans*-Retinol verwendet wurden, daß die spezifische Aktivität nur bei den all-*trans*-Retinylestern für eine Rolle als 11-*cis*-Retinoid-Vorstufen ausreichte^[55]. Der in Abbildung 23 gezeigte Mechanismus macht auch die Befunde von Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an den Dihydroretinoiden verständlich. Zu guter Letzt sind auch die Experimente mit dem Inhibitor der Retinylester-Synthetase, all-*trans*-Retinyl- α -bromacetat in voller Übereinstimmung mit diesem Mechanismus.

7.2. Bei der Isomerisierung wird die C-O-Bindung gespalten

Das Reaktionsschema in Abbildung 23 ermöglicht experimentell überprüfbare Vorhersagen. Eine Vorhersage ist, daß bei der Isomerisierung die C-O-Bindung gespalten wird. Außerdem könnte diese Spaltung einen Einfluß auf die Stereochemie von Retinoiden haben, die an C-15 markiert sind, weil das prochirale Zentrum im Zwischenzustand symmetrisch wird. Die vorhergesagte Spaltung der C-O-Bindung war leicht überprüfbar: dazu wurde das Schicksal von ^{18}O aus $[15-^{18}\text{O}]$ -all-*trans*-Retinol nach enzymatisch katalysierter

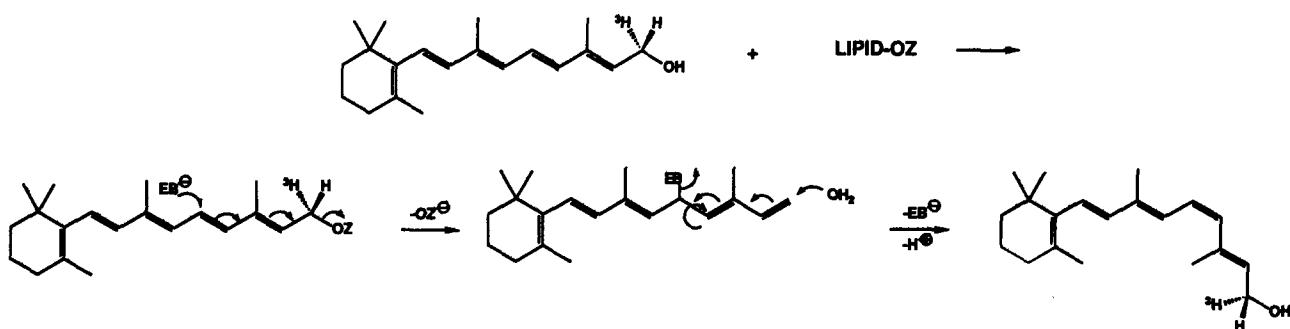


Abb. 23. Eine gekoppelte Reaktion kann die thermodynamisch ungünstige Isomerisierungsreaktion treiben [69].
EB[⊖] = Nucleophil im aktiven Zentrum eines Enzyms; OZ[⊖] = Carboxylat.

all- <i>trans</i> -Retinylester + H ₂ O → all- <i>trans</i> -Retinol	$\Delta G^0 \approx -5 \text{ kcal mol}^{-1}$
all- <i>trans</i> -Retinol → 11- <i>cis</i> -Retinol	$\Delta G^0 + 4 \text{ kcal mol}^{-1}$
all- <i>trans</i> -Retinylester + H ₂ O → 11- <i>cis</i> -Retinol	$\Delta G^0 - 1 \text{ kcal mol}^{-1}$

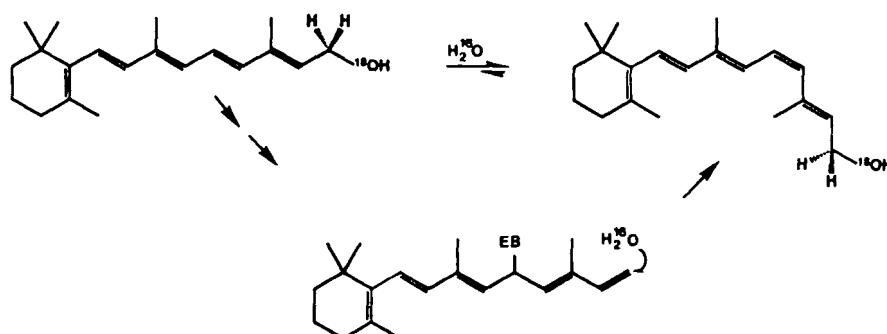


Abb. 24. Die Isomerisierung verläuft unter Spaltung der C-O-Bindung.

Isomerisierung in H_2^{18}O -haltigem Puffer durch Felddesorptions-Massenspektrometrie untersucht^[69]. Dieses Experiment zeigte eindeutig, daß das gebildete 11-cis-Retinol nur ^{18}O enthielt (Abb. 24)^[69]. Somit wird die Isomerisierung von vollständiger Spaltung der C-O-Bindung begleitet.

7.3. Stereochemische Betrachtungen über die Isomerase und verwandte Enzyme

Die Freisetzung von ^{18}O (Abb. 24) ist mit dem in Abbildung 23 gezeigten Reaktionstyp in Einklang. Da sich die Hybridisierung von C-15 während der Isomerisierung von sp^3 nach sp^2 ändern sollte, kann dieser Prozeß durch stereochemische Experimente überprüft werden. Dabei interessiert, ob als Folge der Isomerisierung Retention oder Inversion an C-15 auftritt (Abb. 25).

Zu diesem Zweck wurden Experimente mit chiral markiertem all-trans-Retinol ausgeführt^[80]. $[(15R)^-3\text{H}]$ all-trans-Retinal wurde durch Reduktion von $[15-^3\text{H}]$ all-trans-Retinal mit Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH) und NADH hergestellt^[80]; $[(15S)^-3\text{H}]$ all-trans-Retinol wurde durch Inkubation von all-trans-Retinol mit $[\alpha-^3\text{H}]$ Benzylalkohol, HLADH und NAD gewonnen. Die markierten Retinole und $[15-^{14}\text{C}]$ all-trans-Retinol wurden mit Amphibien- oder Rinder-Pigmentepithel-Membranen inkubiert^[80]; danach wurden die Retinole und Retinylester gesammelt und analysiert (vgl. Abb. 26). Das enzymatisch gebildete 11-cis-Retinol wurde mit Iod, das selbstverständlich keinen Einfluß auf die Stereochemie an C-15 hat, zum all-trans-Retinol isomerisiert. Nachdem die Retinylester zu den entsprechenden Retinolen hydrolysiert worden waren, konnte mit HLADH leicht entschieden werden, ob Inversion oder Retention der Konfiguration stattgefunden hatte^[80].

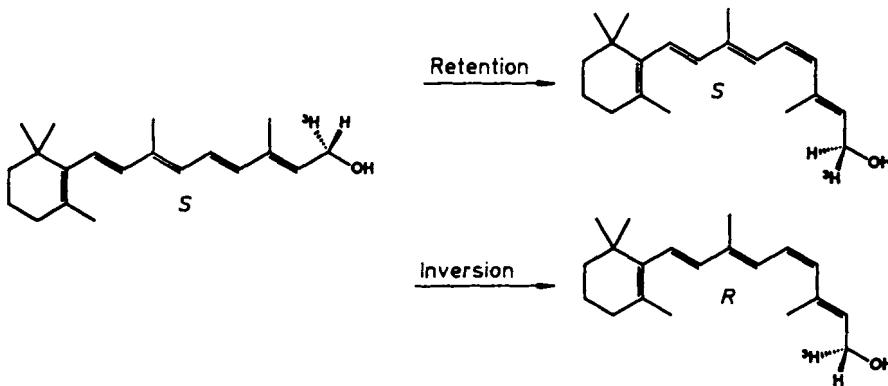


Abb. 25. Die Isomerisierung kann unter Retention oder Inversion der Konfiguration am prochiralen Zentrum C-15 von all-trans-Retinol verlaufen.

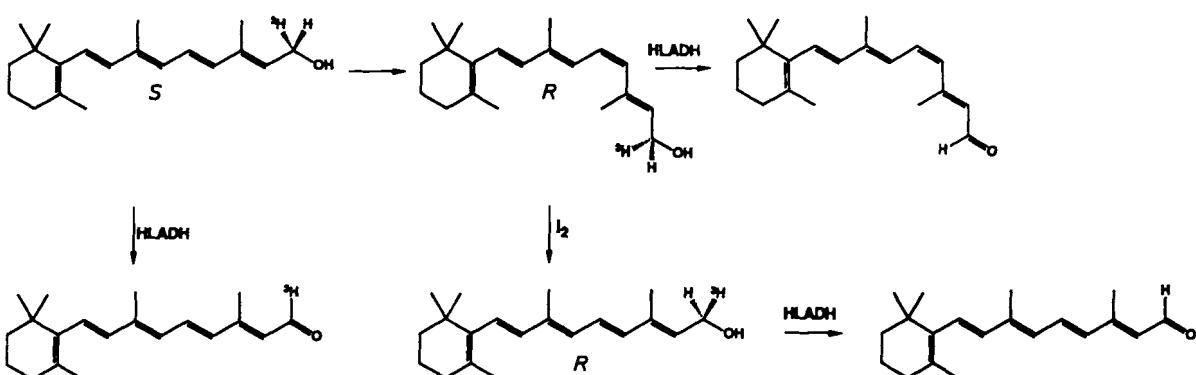


Abb. 26. Analyse des stereochemischen Resultats der Isomerisierungsreaktion.

Das Ergebnis war insofern überraschend, als innerhalb des experimentellen Fehlers vollständige Inversion der Konfiguration als Folge der Isomerisierung sowohl im Amphibien- als auch im Rinderansatz aufgetreten war^[80]. Das Ergebnis kann interpretiert werden, wenn man außer dem Befund, daß die C-O-Bindung während der Isomerisierung gespalten wird, zwei weitere Informationen berücksichtigt. Erstens muß die Isomerisierung auf der Alkoholstufe auftreten, zweitens ist es höchst unwahrscheinlich, daß enzymgebundenes all-*trans*-Retinol zuerst zu Retinal oxidiert, dann isomerisiert und auf der Rückseite zu 11-*cis*-Retinol reduziert wird, denn es wurde keinerlei Hinweis auf einen Isotopeneffekt gefunden. Bei einem solchen Mechanismus müßte der primäre Isotopeneffekt extrem groß sein, weil er das Produkt zweier getrennter Isotopeneffekte wäre. Außerdem wird zugegebenes all-*trans*-Retinal nicht isomerisiert.

Die beobachtete stereochemische Inversion ist nach Abbildung 23 leicht zu verstehen und stützt diese mechanistische Interpretation. Bemerkt werden sollte, daß diese Inversion der Konfiguration während der Isomerisierung uns die Feststellung ermöglichte, daß die Isomerase die Rückreaktion katalysiert^[69]. Chiral markiertes 11-*cis*-Retinol wird von der Isomerase zu einem all-*trans*-Retinol der umgekehrten absoluten Konfiguration umgesetzt^[69]. Gegenüber der Isomerisierung ist 11-*cis*-Retinol relativ instabil: es isomerisiert wie erwartet unter Retention der Konfiguration an C-15 zu all-*trans*-Retinol.

Bei chemischen Reaktionen, die in Lösung ablaufen, können Ergebnisse stereochemischer Experimente mechanistisch interpretiert werden. Natürlich ist im Falle von Enzymen eine einfache Interpretation oft nicht möglich. Es ist daher von Interesse, die hier nachgewiesene Inversion weiter zu untersuchen. Weil die Isomerisierung eine Drehung um die C11-C12-Bindung um etwa 180° umfaßt, könnte eine Inversion sogar dann beobachtet werden, wenn Spaltung und Bildung der C-O-Bindung relativ zum aktiven Zentrum des Enzyms auf der gleichen Seite des Moleküls stattfänden (Abb. 27).

Die Inversion der Konfiguration an C-15 muß mit dem Befund in Einklang gebracht werden, daß nach Gabe von markiertem Retinol an Ratten maximal ein Verlust von 50% des ³H-Gehalts aus dem [15-³H]all-*trans*-Retinol in den verschiedenen Retinoiden beobachtet wurde^[55]. Da die Retinole entweder *R*- oder *S*-konfiguriert waren (sie wurden durch NaB³H₄-Reduktion aus all-*trans*-Retinal gewonnen), würde eine stereochemische Inversion und Oxidation durch Retinol-Dehydrogenasen mit der gleichen Spezifität für die Posi-

tion des abgespaltenen Wasserstoffs zur fast völligen Entfernung von ³H aus den Retinoiden führen. HLADH hat gegenüber 11-*cis*-Retinol die gleiche Stereospezifität wie gegenüber all-*trans*-Retinol, das aufgrund der Analogie zu anderen Alkoholsubstraten dieses Enzyms für pro-*R*-spezifisch gehalten wird^[80, 81]. Bei all-*trans*- und 11-*cis*-Retinol-Dehydrogenase des Auges unterscheidet sich jedoch die Stereospezifität^[80, 82]. Die all-*trans*-Retinol-Dehydrogenasen entfernen den pro-*R*-Wasserstoff, 11-*cis*-Retinol-Dehydrogenasen dagegen den pro-*S*-Wasserstoff^[80, 82]. Bezüglich der NAD-Cofaktoren ist die Situation bei Amphibien ziemlich klar, denn dort fehlen die multiplen all-*trans*-Retinol-Dehydrogenasen, die bei Rindern gefunden wurden. In Amphibien ist die 11-*cis*-Retinol-Dehydrogenase hinsichtlich NAD wieder pro-*S*-spezifisch, während für all-*trans*-Retinol-Dehydrogenase die entgegengesetzte Stereospezifität erhalten wird^[82].

Bei Rindern erwies sich die 11-*cis*-Retinol-Dehydrogenase wiederum gegenüber dem Cofaktor als pro-*S*-spezifisch^[82]. Die all-*trans*-Retinol-Dehydrogenasen sowohl des Stäbchenaußensegments als auch des Pigmentepithels waren pro-*R*-selektiv, wenn auch pro-*S*-Wasserstoff in beträchtlichem Maße umgesetzt wurde^[82]. Angesichts der Übereinstimmung der Redoxpotentiale von all-*trans*- und 11-*cis*-Retinol ist die mechanistische Bedeutung der Stereospezifität dieser Redoxreaktionen nicht klar^[82]. Bei den Cofaktoren schlugen Bernhard et al.^[83] vor, daß die entgegengesetzte Konfigurationsspezifität der Dehydrogenasen bezüglich des C-4-Wasserstoffs von NADH darauf beruht, daß die Cofaktoren in der Dehydrogenase direkt von einem aktiven Zentrum zum nächsten weitergegeben werden.

8. Mögliche Mechanismen der Isomerisierungsreaktion

Die beschriebenen stereochemischen Studien und die Freisetzung von Isotopen stützen den in Abbildung 23 dargestellten Typ des Mechanismus, ebenso wie die mit Dihydroretinoiden durchgeführten Struktur-Aktivitäts-Experimente. In Abbildung 23 wurde der Einfachheit halber ein S_N2'-Mechanismus dargestellt, obwohl auch andere Möglichkeiten in Frage kommen (Abb. 28). Es sind viele Mechanismen möglich, sofern sie energiereichere Intermediate als 11-*cis*-Retinol postulieren. So sind z. B. in Abbildung 28 drei weitere Kategorien von Mechanismen gezeigt. Carbeniumionen-Mechanismen (Abb. 28 A) sind aufgrund der Polyennatur

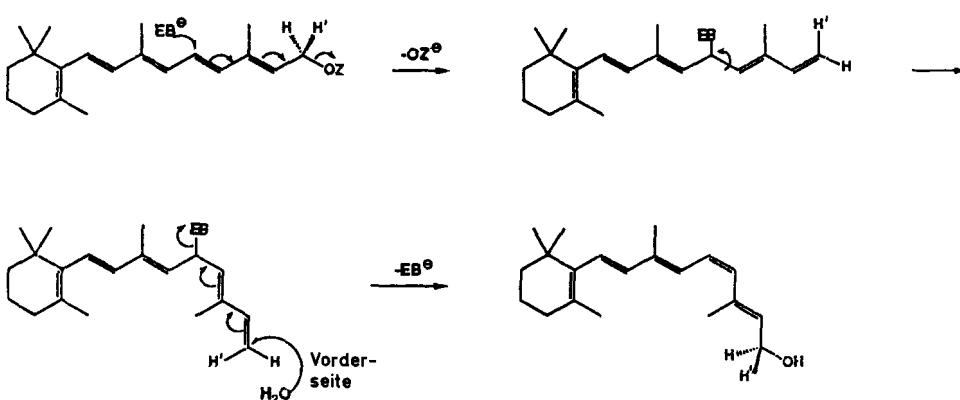


Abb. 27. Spaltung und Rückbildung der C-O-Bindung auf der gleichen Seite des Moleküls können zu einer scheinbaren stereochemischen Inversion führen.

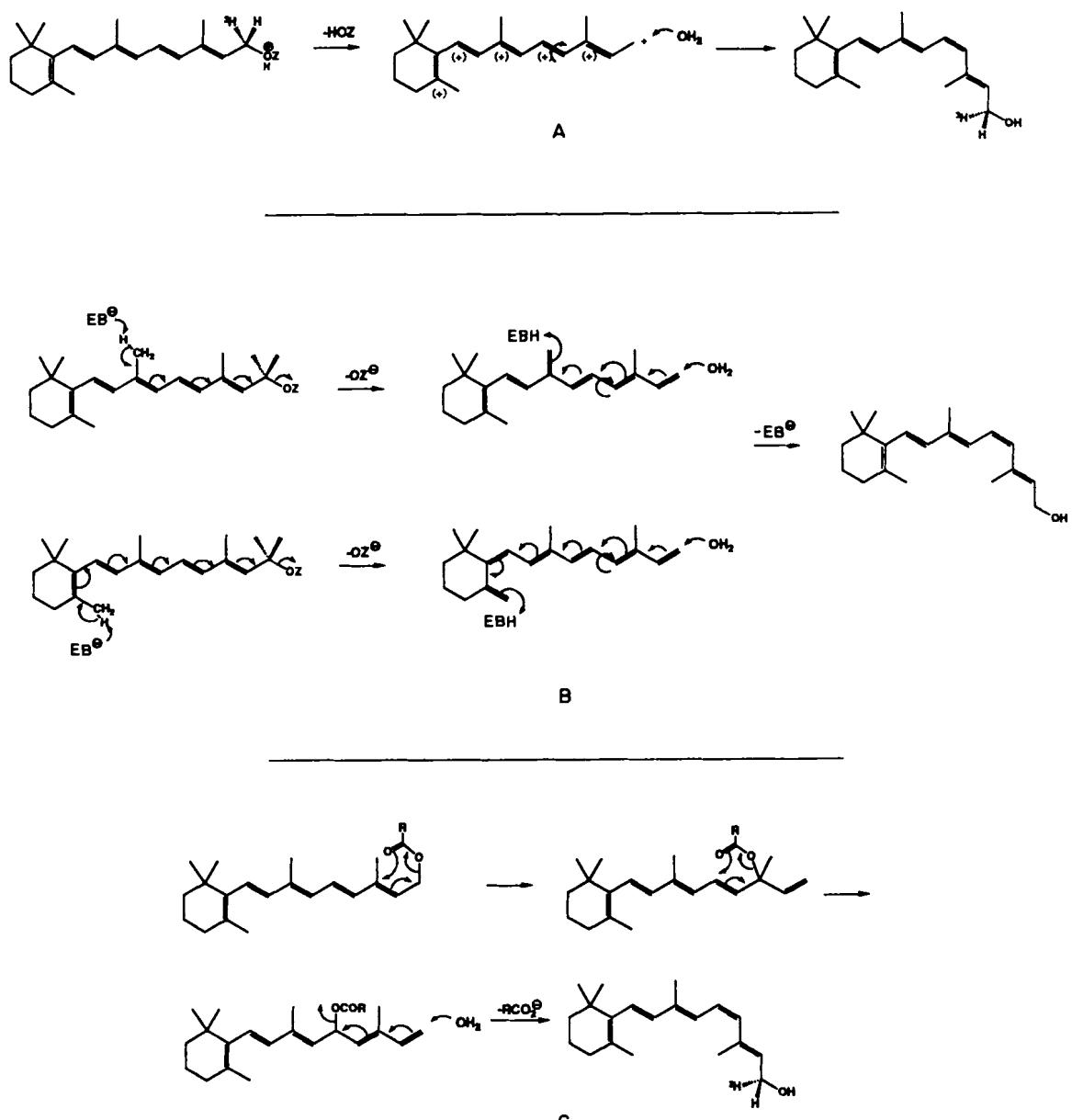


Abb. 28. Mögliche Isomerisierungsmechanismen. A) Carbeniumionen-Mechanismus; B) C-H-Bindungs-Abstraktions-Mechanismus; C) thermischer Mechanismus.

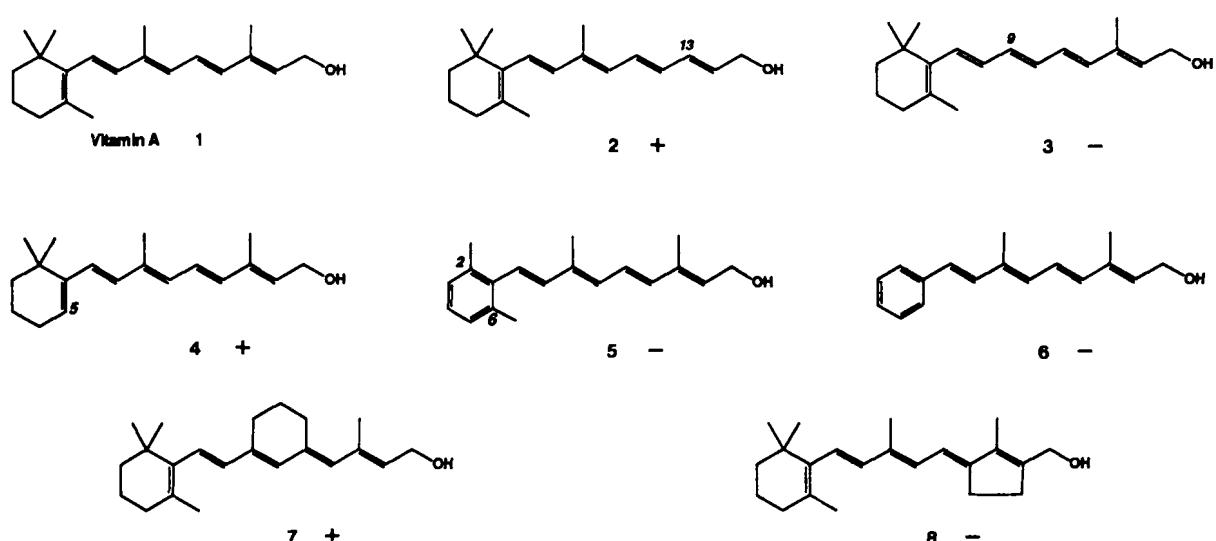


Abb. 29. Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an der Isomerase. + bedeutet aktiv, - bedeutet inaktiv.

der Retinole sicherlich möglich. Auch C-H-Bindungs-Abstraktions-Mechanismen (Abb. 28 B) sind attraktive Kandidaten, vor allem wenn in der C-9-Methylgruppe eine C-H-Bindung gespalten wird. Eine Abstraktion an der C-13-Methylgruppe würde die C11-C12-Doppelbindung nicht beeinflussen, und eine Abstraktion an der C-5-Methylgruppe oder am Cyclohexylering würde zu sehr stabilen Intermediaten führen. Die letzte Kategorie (Abb. 28 C) umfaßt lediglich thermische Reaktionen, in denen die Estergruppe das Polygerüst „hinunterläuft“. Zwar können wir derzeit nicht zwischen den Mechanismen unterscheiden, doch befassen sich weitere Struktur-Funktions-Studien an mehreren Retinoiden mit diesem Problem (Abb. 29)^[84]. Alle untersuchten Retinoide werden vor jeder möglichen Isomerisierungsreaktion in *all-trans*-Retinylester überführt. Vom C-H-Abstraktions-Mechanismus bleibt lediglich die C-H-Abstraktion an der C-9-Methylgruppe, da 9-Desmethyl-*all-trans*-retinol 3 nach der Veresterung nicht isomerisiert wurde. Da Vitamin A₂ (Abb. 21), 5-Desmethyl-*all-trans*-retinol 4 und 13-Desmethyl-*all-trans*-retinol 2 allesamt Isomerasesubstrate sind (nach Veresterung), scheiden andere mögliche C-H-Bindungs-Abstraktions-Mechanismen aus. Weitere Informationen, die die anderen gezeigten Mechanismen (Abb. 28 A und C) wahrscheinlich machen oder ausschließen, liegen derzeit nicht vor.

9. Die Membran als Energiequelle

Wenn auch die genaue Natur des Isomerisierungsmechanismus noch offen ist für Spekulationen, sind doch die wesentlichen Grundzüge klar. Vor allem lösen alle gezeigten Mechanismen das Problem der Energiequelle für die Isomerisierungsreaktion. Die Energie stammt aus der Freien Energie der Hydrolyse der Retinylester. Da die Retinylester durch Umesterung mit Membranlipiden entstehen, ist es die Membran selbst, die die treibende Energie für die Isomerisierungsreaktion zur Verfügung stellt (Abb. 30).

Die hier genutzte Gruppentransfer-Strategie ähnelt Fällen, in denen ATP, dessen Freie Energie der Hydrolyse

– 7.3 kcal mol^{–1} beträgt, als Energiequelle für thermodynamisch ungünstige Reaktionen benutzt wird. In vielen dieser Fälle, z. B. der Biosynthese von Saccharose aus Fructose und Glucose, erfolgt zuerst die Phosphorylierung einer Hydroxylgruppe und im Anschluß daran, statt gleichzeitig, eine Umlagerungsreaktion. Trotzdem sind diese Mechanismen bezüglich der treibenden Kraft dem vorgeschlagenen Isomerase-mechanismus sehr ähnlich. Der letztgenannte Mechanismus könnte als neuer Mechanismus der Energieübertragung in Membranen mit Phospholipiden als Energiequelle von allgemeinem Interesse sein. Dies ist auch eine bis dahin unerwartete Rolle von Membranen.

Schließlich kommen wir auf den Sehzyklus selbst zurück. Unser derzeitiges Verständnis ist in Abbildung 31 dargestellt. Die Annahme, daß Retinylester eine rein passive Rolle

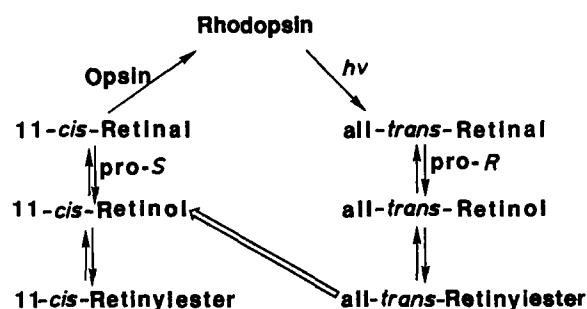


Abb. 31. Aktuelles Modell des Sehzyklus (vgl. Abb. 7).

als Speicherform des Retinols spielen, muß verworfen werden; stattdessen sehen wir sie in einer entscheidenden, dynamischen Rolle als Vorläufer der 11-cis-Retinoidchromophore.

10. Zusammenfassung und Ausblick

Die hier beschriebenen Untersuchungen bieten einen kurzen Überblick über die molekularen Mechanismen der Biosynthese von 11-cis-Retinoiden im Auge. Interessanterweise wurde die Lösung durch strikt chemische Überlegungen erreicht; das bedeutet, daß die Arbeit mit der Frage nach der Herkunft der Energie für die thermodynamische Bergauf-Isomerisierung von all-trans- zu 11-cis-Retinoiden begann. Einfache Lösungen dieses Problems wie die vermutete Existenz einer Retinal-Isomerase sind nicht richtig und konnten es nicht sein, da sie keinen Mechanismus zur Energieübertragung vorsehen. Anders als Retinol enthält Retinal keine Gruppe, die durch eine Gruppentransfer-Reaktion aktiviert werden kann, und läßt sich daher nicht in thermodynamisch sinnvoller Weise aktivieren.

Viele wichtige Fragen müssen noch beantwortet werden. Was den Isomerisierungsprozeß angeht, wird eine Klärung des tatsächlichen Mechanismus der Isomerase wichtig sein. Es wurden mehrere Möglichkeiten vorgeschlagen; ob überhaupt eine davon zutrifft, muß geprüft werden. Weiterhin ist es notwendig, die Beziehung zwischen Ester-Synthetase und Isomerase wie auch die Beziehung zwischen den verbleibenden Enzymen des Sehcyclus aufzuklären. Isomerase oder vielleicht besser „Isoesterase“ und Ester-Synthetase werden

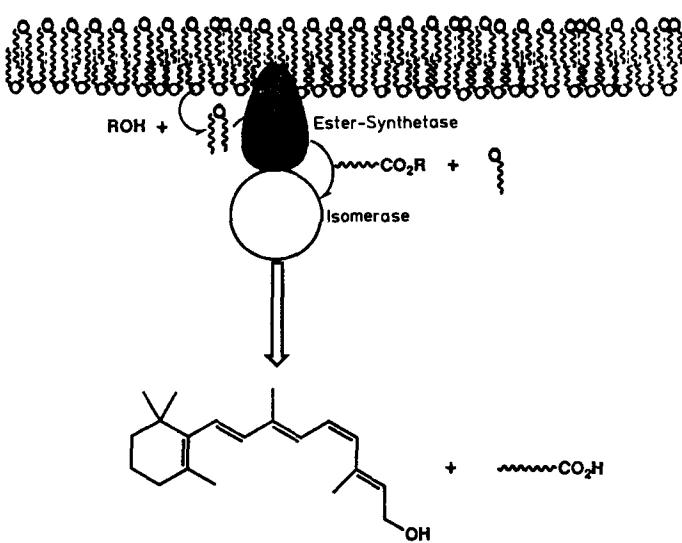


Abb. 30. Biosynthese von 11-cis-Retinol unter Beteiligung von Membranphospholipiden.

gereinigt und sequenziert werden müssen, um ihre mögliche Verwandtschaft mit anderen bekannten Enzymen zu bestimmen. Die Kenntnis der Primärsequenz dieser Enzyme wird zur Klärung der Frage wichtig sein, ob einige der häufigeren Augenkrankheiten auf Mutationen dieser Enzyme beruhen.

Vielleicht von größter biologischer Wichtigkeit ist der Nachweis, ob der hier beschriebene Gruppentransfer-Mechanismus unter Beteiligung von Membranphospholipiden allgemeine Bedeutung hat. Zwar ist ATP als „Energiewährung“ der Zelle anerkannt, doch zeigen die hier mitgeteilten Untersuchungen, daß andere Möglichkeiten existieren und eingehende Betrachtung erfordern.

Ich möchte mich für die wichtigen Beiträge von Dr. Robert Barry, Dr. Paul S. Bernstein, Dr. Francisco J. Cañada, Dr. Andrew Chang, Dr. Peter Deigner, Dr. Brian S. Fulton, Dr. Wing C. Law und Herrn John Lichtman zu den hier besprochenen Untersuchungen bedanken. Die Arbeit im Laboratorium des Autors wurde durch das Forschungsstipendium EY 04096 des U.S. Public Health Service aus den National Institutes of Health gefördert.

Eingegangen am 23. Oktober 1989 [A 761]
Übersetzt von Dr. Jörg Tittor, Martinsried

- [1] W. Kühne, *Unters. Physiol. Inst. Heidelberg* 1 (1878) 341.
- [2] G. Wald, *Annu. Rev. Biochem.* 22 (1953) 497.
- [3] S. Amer, M. Ahktar, *Nature New Biol.* 237 (1972) 266.
- [4] R. Hubbard, *J. Gen. Physiol.* 39 (1956) 935.
- [5] J. P. Rotmans, F. J. M. Daemen, S. L. Bonting, *Biochim. Biophys. Acta* 267 (1972) 583.
- [6] J. J. Ostapenko, V. V. Furajev, *Nature New Biol.* 243 (1973) 185.
- [7] G. Wolf, *Am. J. Clin. Nutr.* 31 (1978) 290.
- [8] J. E. Dowling, G. Wald, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 44 (1958) 648.
- [9] R. R. Birge, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 10 (1981) 315.
- [10] R. R. Birge, L. M. Hubbard, *Biophys. J.* 34 (1981) 517.
- [11] K. S. Peters, M. L. Applebury, P. M. Rentzepis, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74 (1977) 3119.
- [12] R. Mathies, *Methods Enzymol.* 88 (1982) 633–643.
- [13] A. Cooper, *Nature (London)* 282 (1979) 531.
- [14] A. G. Douglas, B. Aton, R. H. Callender, T. G. Ebrey, *Biochemistry* 17 (1978) 2430.
- [15] C. Longstaff, R. R. Rando, *Biochemistry* 24 (1985) 8137.
- [16] C. Longstaff, R. D. Calhoun, R. R. Rando, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83 (1986) 4209.
- [17] K. P. Hofmann, *Photobiochem. Photobiophys.* 13 (1986) 309.
- [18] L. Stryer, *Annu. Rev. Neurosci.* 9 (1986) 87.
- [19] E. E. Fesenko, S. S. Kolesnikov, A. L. Lyubarsky, *Nature (London)* 313 (1985) 310.
- [20] G. W. R. Weinstein, R. Hobson, J. E. Dowling, *Nature (London)* 215 (1967) 134.
- [21] J. E. Dowling: *The Retina*, Harvard University Press, Cambridge 1987, Kap. 7.
- [22] H. Davson: *Physiology of the Eye*, 4. Aufl., Academic Press, New York 1980, S. 232.
- [23] S. Hecht, C. Haig, A. M. Chase, *J. Gen. Physiol.* 20 (1937) 831.
- [24] P. Julia, J. Farres, X. Pares, *Exp. Eye Res.* 42 (1986) 305.
- [25] J. C. Saari, A. H. Bunt-Milan, D. L. Bredberg, G. G. Garwin, *Vision Res.* 24 (1984) 1595.
- [26] D. Bok, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 26 (1985) 1659.
- [27] A. J. Adler, C. D. Evans, *Prog. Clin. Biol. Res.* 190 (1985) 65.
- [28] G. J. Chader, B. Wiggert, Y.-L. Lai, L. Lee, R. T. Fletcher, *Prog. Retinal Res.* 2 (1983) 163–184.
- [29] J. E. Dowling, *Nature (London)* 188 (1960) 114.
- [30] A. Knowles, H. J. A. Dartnall in H. Davson (Hrsg.): *The Eye*, Vol. 2 B, Academic Press, New York 1977, Kap. 10.
- [31] C. D. B. Bridges, *Exp. Eye Res.* 22 (1976) 435.
- [32] W. A. H. Rushton, *J. Gen. Physiol.* 41 (1957) 419.
- [33] L. Pauling, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 3 (1939) 203.
- [34] L. Pauling, *Helv. Chim. Acta* 32 (1949) 2241.
- [35] R. Hubbard, G. Wald in A. Rich, N. Davidson (Hrsg.): *Structural Chemistry and Molecular Biology*, W. H. Freeman, San Francisco 1968, S. 545–554.
- [36] R. Hubbard, *J. Biol. Chem.* 24 (1966) 1814.
- [37] D. J. Patel, *Nature (London)* 224 (1969) 799.
- [38] W. Sperling, P. Carl, C. N. Rafferty, N. A. Dencher, *Biophys. Struct. Mech.* 3 (1977) 79.
- [39] R. R. Rando, A. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 2879.
- [40] R. Gilardi, I. L. Karle, J. Karle, W. Sperling, *Nature (London)* 232 (1971) 187.
- [41] Y. Schichida, A. Kropf, T. Yoshizawa, *Biochemistry* 20 (1981) 1962.
- [42] A. Albeck, M. Friedman, M. Sheves, M. Ottolenghi, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 4614.
- [43] A. Chang, B. Fulton, R. R. Rando, unveröffentlicht.
- [44] L. Boni, R. R. Rando, unveröffentlicht.
- [45] W. von E. Doering, W. R. Roth, *Angew. Chem.* 75 (1963) 27; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2 (1963) 115.
- [46] D. Lukton, R. R. Rando, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 4525.
- [47] L. Zechmeister, *Chem. Rev.* 34 (1944) 267.
- [48] S. Futterman, M. H. Rollins, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 7773.
- [49] G. W. T. Groenendijk, C. W. M. Jacobs, S. L. Bonting, F. J. M. Daemen, *Eur. J. Biochem.* 106 (1980) 119.
- [50] R. A. Auerbach, M. F. Granville, B. E. Kohler, *Biophys. J.* 25 (1979) 443.
- [51] H. Davson: *Physiology of the Eye*, 4. Aufl., Academic Press, New York 1980, S. 218–219.
- [52] P. S. Bernstein, J. R. Lichtman, R. R. Rando, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83 (1986) 1632.
- [53] P. S. Bernstein, B. S. Fulton, R. R. Rando, *Biochemistry* 25 (1986) 3370.
- [54] B. S. Fulton, R. R. Rando, *Biochemistry* 26 (1987) 110.
- [55] P. S. Bernstein, R. R. Rando, *Biochemistry* 25 (1986) 6473.
- [56] M. Zewi, *Acta Physiol. Scand.* 1 (1941) 271.
- [57] T. Reuter, *Vision Res.* 6 (1966) 15.
- [58] C. D. B. Bridges in H. Lauger (Hrsg.): *Biochemistry and Physiology of Visual Pigments*, Springer, New York 1973, S. 115–121.
- [59] P. S. Bernstein: „Biochemistry and Pharmacology of Rhodopsin Regeneration in the Vertebrate Eye“, Ph.D. Thesis, Harvard University 1987.
- [60] P. S. Bernstein, W. C. Law, R. R. Rando, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84 (1987) 1849.
- [61] P. S. Bernstein, W. C. Law, R. R. Rando, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 16848.
- [62] B. S. Fulton, R. R. Rando, *Biochemistry* 26 (1987) 7938.
- [63] D. R. Pepperberg, R. H. Masland, *Brain Res.* 151 (1978) 194.
- [64] J. I. Perlman, B. R. Nodes, D. R. Pepperberg, *J. Gen. Physiol.* 80 (1982) 885.
- [65] M. T. Flood, C. D. B. Bridges, R. A. Alvarez, W. S. Blaner, P. Gouras, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 24 (1983) 1227.
- [66] S.-L. Fong, C. D. B. Bridges, R. A. Alvarez, *Vision Res.* 23 (1983) 47.
- [67] S. R. Das, P. Gouras, *Biochem. J.* 250 (1988) 459.
- [68] J. G. Flannery, W. O'Day, J. Horwitz, D. Bok in T. Hara (Hrsg.): *Molecular Physiology of Retinal Proteins*, Proc. of the Yamada Conference, Yamada Science Foundation, Japan 1988, S. 261–266.
- [69] P. S. Deigner, W. C. Law, F. J. Cañada, R. R. Rando, *Science (Washington, DC)* 244 (1989) 968.
- [70] F. J. Cañada, R. R. Rando, unveröffentlicht.
- [71] W. C. Law, R. R. Rando, unveröffentlicht.
- [72] P. S. Bernstein, J. R. Lichtman, R. R. Rando, *Biochemistry* 24 (1985) 487.
- [73] W. C. Law, R. R. Rando, S. Canonica, F. Derguini, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 5915.
- [74] R. J. Barry, F. J. Cañada, R. R. Rando, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 9231.
- [75] N. I. Krinsky, *J. Biol. Chem.* 232 (1958) 881.
- [76] J. C. Saari, D. L. Bredberg, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 8636.
- [77] P. N. MacDonald, D. E. Ong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156 (1988) 157.
- [78] A. Trehan, F. J. Cañada, R. R. Rando, *Biochemistry* 29 (1990) 309.
- [79] W. P. Jencks, in H. A. Sober (Hrsg.): *CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3. Aufl., Chemical Rubber Co., Cleveland 1970, S. J183.
- [80] W. C. Law, R. R. Rando, *Biochemistry* 27 (1988) 4147.
- [81] F. Loewus, F. H. Westheimer, B. Vennesland, *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 5018.
- [82] W. C. Law, S. Kim, R. R. Rando, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1988) 793.
- [83] D. K. Srivastava, S. A. Bernhard, R. Langridge, J. A. McClarin, *Biochemistry* 24 (1985) 629.
- [84] W. C. Law, F. J. Cañada, R. R. Rando, S. Canonica, F. Derguini, K. Yamamoto, K. Nakanishi, unveröffentlicht.