

stoffatome eine verzerrt oktaedrische Koordination auf. Zunehmendes Interesse finden auch Verbindungen der schweren Erdalkalimetalle mit den schweren Tetrelen wie beispielsweise in den erst jüngst strukturell charakterisierten Bariumstannaniden.^[26]

Die strukturelle Charakterisierung einfacher Dialkylstrontium- und -bariumverbindungen steht noch immer aus. Da aber mit dem zunehmenden Wissen über Synthesemöglichkeiten und Strukturen dieser Verbindungen auch ein steigendes Anwendungspotential vor allem als anionische Polymerisationsstarter zu erwarten oder in ausgewählten Fällen bereits nachgewiesen ist,^[8d, 27] stehen wir erst am Anfang einer sich rasant entwickelnden Chemie der schweren homologen Grignard-Reagentien.

- [1] V. Grignard, *Ann. Chim.* **1901**, 24, 433–490.
- [2] M. Hogenbirk, G. Schat, O. S. Akkerman, F. Bickelhaupt, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7302–7303.
- [3] J. J. Eisch, R. B. King, *Organometallic Synthesis*, Vol. 2, Academic Press, New York, **1981**, S. 101: „The derivatives of calcium, strontium, and barium have received only sporadic attention, but recently refined preparative methods may signal promising developments, especially for the potentially useful organocalcium reagents.“
- [4] M. Kaupp, P. von R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 491–497.
- [5] M. Hargittai, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2233–2301.
- [6] a) M. Kaupp, P. von R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11 202–11 208; b) M. Kaupp, P. von R. Schleyer, H. Stoll, H. Preuss, *J. Chem. Phys.* **1991**, 94, 1360–1366.
- [7] a) T. P. Hanusa, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1023–1036; b) D. J. Burkey, T. P. Hanusa, *Comments Inorg. Chem.* **1995**, 17, 41–77; c) A. J. Bridgeman, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 2887–2893; d) P. Jutzi, N. Burford, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 969–990.
- [8] a) K. Mashima, H. Sugiyama, N. Kanehisa, Y. Kai, H. Yasuda, A. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 6977–6978; b) J. S. Overby, T. P. Hanusa, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2300–2302; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2191–2193; c) M. J. Harvey, T. P. Hanusa, V. G. Young, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 241–242; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 217–219; d) T. P. Hanusa, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 210, 329–367.
- [9] F. G. N. Cloke, P. B. Hitchcock, M. F. Lappert, G. A. Lawless, B. Royo, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 724–726.
- [10] C. Eaborn, S. A. Hawkes, P. B. Hitchcock, J. D. Smith, *Chem. Commun.* **1997**, 1961–1962.
- [11] P. S. Tanner, R. A. Williams, T. P. Hanusa, *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 2234–2235.
- [12] M. Westerhausen, C. Birg, H. Nöth, J. Knizek, T. Seifert, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 2209–2214.
- [13] D. J. Burkey, T. P. Hanusa, *Organometallics* **1996**, 15, 4971–4976.
- [14] W. A. Herrmann, C. Köcher, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2256–2282; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2162–2187.
- [15] A. J. Arduengo III, F. Davidson, R. Krafczyk, W. J. Marshall, M. Tamm, *Organometallics* **1998**, 17, 3375–3382.
- [16] M. Westerhausen, M. H. Digeser, H. Nöth, T. Seifert, A. Pfitzner, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6722–6725.
- [17] D. C. Green, U. Englich, K. Ruhlandt-Senge, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 365–367; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 354–357.
- [18] A. Weeber, S. Harder, H. H. Brintzinger, K. Knoll, *Organometallics* **2000**, 19, 1332; siehe auch S. R. Drake, D. J. Otway, S. P. Perlepes, *Main Group Met. Chem.* **1991**, 14, 243–256.
- [19] J. S. Alexander, K. Ruhlandt-Senge, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2732–2734; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2658–2660.
- [20] D. C. Bradley, M. B. Hursthouse, A. A. Ibrahim, K. M. Abdul Malik, M. Motevallii, R. Mösel, H. Powell, J. D. Runnacles, A. C. Sullivan, *Polyhedron* **1990**, 9, 2959–2964.
- [21] a) S. Harder, M. Lutz, *Organometallics* **1997**, 16, 225–230; b) F. Feil, S. Harder, *Organometallics* **2000**, 19, 5010–5015.
- [22] M. G. Gardiner, C. L. Raston, H. Viebrock, *Chem. Commun.* **1996**, 1795–1796.
- [23] V. Knapp, G. Müller, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 187–190; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 183–186.
- [24] M. Westerhausen, C. Gückel, T. Haberer, M. Vogt, M. Warchhold, H. Nöth, *Organometallics* **2001**, 20, 893–899.
- [25] M. Westerhausen, C. Gückel, P. Mayer, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2736–2739; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2666–2668.
- [26] U. Englich, K. Ruhlandt-Senge, F. Uhlig, *J. Organomet. Chem.* **2000**, 613, 139–147.
- [27] S. Harder, F. Feil, A. Weeber, *Organometallics* **2001**, 20, 1044–1046.

Das Licht weist den Weg – oder: die Konformationsänderungen des Retinalchromophors im Sehpigment Rhodopsin nach Lichtanregung

Wolfgang Gärtner*

Rhodopsin, das Sehpigment der Tiere – ein Paradigma für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

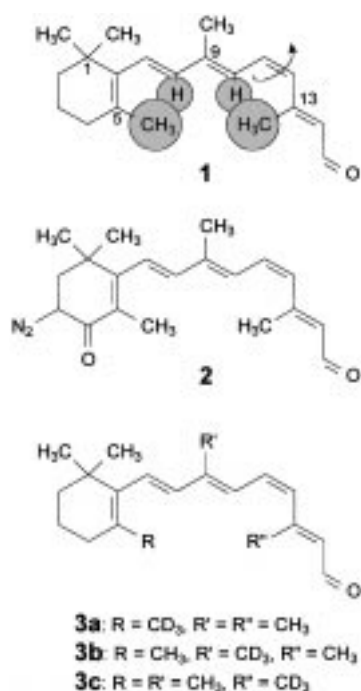
Nur wenige Moleküle kann man als biochemische „Klassiker“ bezeichnen, die auch noch ihren Weg als ausgezeichnete Beispiele in die Biochemie-Lehrbücher gemacht haben. Zu diesen ist sicherlich der Archetyp der Sehpigmente (visual pigments) zu zählen, das Rinderrhodopsin.^[1] Das starke wissenschaftliche Interesse, die Struktur und Funktion von

Rhodopsin zu verstehen, beruht nicht nur auf der faszinierenden Umwandlung absorbierten Lichts in ein biologisches Signal, sondern ist auch darin zu sehen, dass Rhodopsin als Paradigma für eine große und kontinuierlich wachsende Gruppe von Rezeptoren aus sieben transmembranen Helices dient. All diesen intrinsischen Membranrezeptoren gemeinsam ist ihre Eigenschaft, auf einen externen Reiz, wie er in anderen sensorischen (olfaktorischen und gustatorischen) Transduktionen oder in den Hormon- oder Neurotransmitter-gesteuerten Signalwegen auftritt, zu reagieren und dieses so erzeugte Signal durch die Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins in das Zellinnere zu übermitteln.^[2]

Die wissenschaftliche Bearbeitung der Sehpigmente begann vor mehr als einem Jahrhundert mit den Arbeiten von

[*] Prof. Dr. W. Gärtner
Max-Planck-Institut für Strahlenchemie
Stiftstraße 34–36, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
Fax: (+49) 208-306-3951
E-mail: gaertner@mpi-muelheim.mpg.de

Pionieren wie Kühne, der die Fixierung von Bildern durch den in der Retina eingebetteten „Sehpurpur“^[3] nachwies, indem er beleuchtete Muster dem Auge darbot. Seit dieser Zeit haben Pharmakologen, Biologen, Biophysiker, Mediziner, Neurologen und Theoretiker vielfältige multidisziplinäre Ansätze verfolgt. Chemiker haben sich in der Sehforschung engagiert, seit in den frühen dreißiger Jahren George Wald den Aldehyd des Vitamin A, Retinal, als chromophore Gruppe in den Sehpigmenten charakterisierte.^[4a] Er identifizierte die Photoisomerisierung des 11-*cis*- in das all-*trans*-Isomer als Primärreaktion und konnte darüber hinaus zeigen, dass – wie unter physiologischen Bedingungen – gebleichtes Sehpigment durch Inkubation mit dem (natürlich vorkommenden) 11-*cis*- (**1**, Schema 1) und auch mit dem 9-*cis*-Isomer von Retinal zum funktionellen Pigment regeneriert werden konnte.^[4b]



Schema 1. Strukturformeln von 11-*cis*-Retinal **1**, 3-Diazo-4-ketoretinal **2** sowie 11-*cis*-5-, -9- und -13-Trideuteromethylretinal **3a–c**.

Die Herstellung modifizierter Chromophore durch das bereits damals verfügbare breite Repertoire der Retinoid- und Carotinoidchemie^[5] erlaubte detaillierte Studien zum exakten Verständnis der Chromophorkonformation und zu den Wechselwirkungen zwischen Retinal und Protein.^[6] Insbesondere der weite Absorptionsbereich der Sehpigmente, der unter Verwendung nur eines einzigen Chromophortyps^[7] das gesamte „sichtbare“ (sic!) Spektrum überstreicht, stellt eine Herausforderung an die experimentellen und theoretischen Ansätze dar. Ein erstes Ergebnis dieser Versuche war die Identifizierung der Verknüpfung des Chromophors mit dem Protein in Form einer protonierten Schiffsbasis. Diese Art der kovalenten Anbindung führt zu einer hohen Polarisierbarkeit des π -Elektronensystems des Polyens. Sie war grundlegend für das von Honig und Nakanishi vorgelegte „external two point charge model“, das eine Erklärung für die Mechanismen der Wellenlängenvariation der Sehpigmente bot.^[8]

Chromophor-Protein-Wechselwirkungen in Rhodopsin auf atomarem Niveau

Ungeachtet der vielen Versuche zur Aufklärung der Struktur und der Funktion von Rhodopsin unter Einsatz chemischer, spektroskopischer, rekombinanter und theoretischer Methoden blieb ein Blick auf die Struktur von Rhodopsin mit atomarer Auflösung lange verwehrt. Erst kürzlich wurde eine dreidimensionale Struktur mit hinreichender Auflösung vorgestellt,^[9] die es erlaubt, viele der früher erhaltenen Ergebnisse zu bewerten und möglicherweise zu korrigieren.

Allerdings ist es auch anhand der Kristallstruktur nicht möglich, die Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein im Detail zu beschreiben, und natürlich kann sie die Dynamik der Konformationsänderungen nicht wiedergeben, die beide Komponenten nach Lichtaktivierung eingehen. Zwei kürzlich erschienene Publikationen widmen sich diesem Aspekt, d.h. der Konformation des in das Protein eingebetteten Chromophors im Ruhezustand von Rhodopsin und der Konformationsänderungen bei der Photobleichung.^[10, 11]

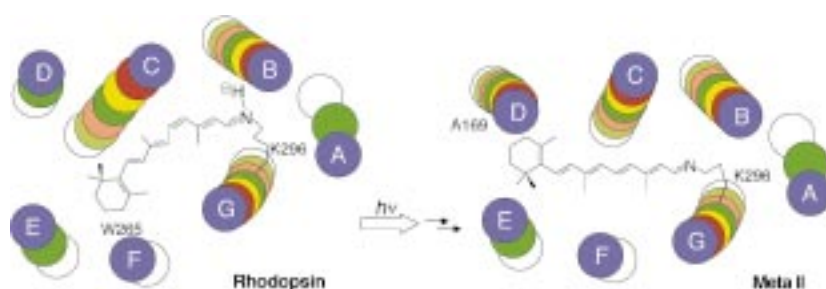
Untersuchung der Chromophorbewegung durch Cross-linking-Experimente

Borhan et al.^[10] verwenden das chemisch modifizierte Retinalderivat 3-Diazo-4-ketoretinal **2** (Schema 1) um so die Bewegung von Retinal „along the visual transduction path“, wie es im Titel dieser Arbeit heißt, zu studieren. Obwohl die Signaltransduktion beim Sehvorgang selbstverständlich aus mehr besteht als nur aus den lichtinduzierten Prozessen des Sehpigments allein, eröffnen die erhaltenen Ergebnisse einen detaillierten und unerwarteten Blick auf die Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein und ermöglichen es, die Konformationsänderungen zu verfolgen, die der Chromophor nach Lichtanregung durchläuft. Weitere Einzelheiten zur Publikation in *Science*^[10] wurden in zwei weiteren Arbeiten veröffentlicht,^[12, 13] die sich dem gleichen Problem widmen, d.h. der Bildung neuer kovalenter Bindungen zwischen Chromophor und Protein durch Cross-linking während des Bleichungsvorgangs. Diese Untersuchung basiert auf der Struktur des Retinalderivats **2**, das nur eine von vielen ähnlichen Verbindungen ist, die Nakanishi und Mitarbeiter hergestellt hatten. All diesen Verbindungen ist gemeinsam, dass sie mehrere Typen von Reaktionen eingehen können. Neben ihrer Fähigkeit, in gleicher Weise wie der native Chromophor über die Bildung einer protonierten Schiffsbasis eine kovalente Bindung zum Protein zu bilden, tragen diese Verbindungen einen Diazosubstituenten im Cyclohexenylring als zweite reaktive Gruppe. Die Diazogruppe setzt unter UV-Belichtung molekularen Stickstoff frei, und es entsteht ein extrem reaktives Carben, das sich sofort in C-H-Bindungen von Aminosäuren in unmittelbarer Umgebung einschleibt. Aufgrund der hohen Reaktivität des Carbens werden Bindungen nur zu direkt benachbarten Molekülen gebildet, sodass die direkte Umgebung sondiert werden kann (zur Identifizierung wurden diese Cross-linking-Verbindungen darüber hinaus mit einer tritierten Aldehydgruppe (CTO) ausgestattet, sodass bei chromatographischer Aufarbeitung der proteolytisch erhaltenen Peptide (zum Zwecke der Sequenzermittlung) der kovalent gebundene Chromo-

phor bequem detektiert werden kann^[12]). Entsprechend können diese Verbindungen in Opsin-gebundener Form dem nativen Chromophor ähnlich durch langwelliges Licht photoisomerisiert werden (11-*cis* → *all-trans*) und anschließend zu einem beliebigen Zeitpunkt der nachfolgenden thermischen Reaktionen durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht in das reaktive Carben überführt werden. Die Autoren beginnen ihre Analyse der Retinal-Opsin-Wechselwirkungen mit dem Nachweis, dass der artifizielle Chromophor die korrekte Bindungsstelle im Protein besetzt und dass die Diazogruppe im Protein-gebundenen Chromophor im Dunkeln intakt bleibt. Um die physiologisch relevanten Zustände im lichtaktivierten Rhodopsin zu analysieren, wurde mit **2** assembliertes Rhodopsin bei tiefen Temperaturen bestrahlt, sodass das erste stabile Photoprodukt, Bathorhodopsin, abgefangen werden konnte und die Folgeintermediate dann durch langsame, schrittweise Temperaturerhöhung erhalten werden konnten. Nach diesem etablierten Verfahren wurde das Bathorhodopsin bei –196 °C gebildet und dann mit UV-Licht bestrahlt, um die Carben-spezies zu erzeugen, die dann mit der Proteinumgebung reagiert. Entsprechend wurden Proben bei Temperaturen gebleicht, unter denen entweder Lumi- oder eine Mischung aus Meta-I- und Meta-II-Rhodopsin erhalten werden. Die Bildung der verschiedenen Intermediate wurde jeweils vor der UV-Belichtung durch Differenz-UV/Vis-Spektroskopie (Intermediatspektrum abzüglich des Spektrums des Ausgangszustands) nachgewiesen.

Durch Cross-linking im Dunkeln, also im Ausgangszustand von Rhodopsin ohne vorherige langwellige Belichtung, sowie im Bathozustand wurde die gleiche Aminosäure, Trp265 in Helix F, modifiziert. Offensichtlich bleibt also ungeachtet der *cis-trans*-Photoisomerisierung des Chromophors (Rhodopsin-Bathorhodopsin) die Position des Cyclohexenylrings nahezu unbeeinflusst. Dieser Befund ist nach Ansicht der Autoren in Übereinstimmung mit anderen Ergebnissen, wie sie unter anderem aus schwingungsspektroskopischen Messungen erhalten worden waren, denen zufolge der Chromophor unabhängig von der erzeugten *trans*-Geometrie seine Konformation kaum ändert, und zwar offenbar, weil die Photoisomerisierung der 11,12-Doppelbindung größtenteils durch Konformationsänderungen von Einfachbindungen kompensiert wird.

Wenn das Protein in den Lumizustand überführt und anschließend die Cross-linking-Reaktion durchgeführt wurde, wird eine andere Aminosäure, Ala169, modifiziert. Diese ist in der vierten Helix von Rhodopsin lokalisiert, und auf den ersten Blick verwirrt dieses Ergebnis. Denn folgt man der schematischen Darstellung der Autoren (Schema 2; man beachte, dass die Publikation von Borhan et al.^[10] vor der Veröffentlichung der Rhodopsinstruktur^[9] eingereicht wurde), so erscheint diese Helix (D) durch die beiden Helices C und E, die sich einander annähern und einen Teil der Chromophorbindungstasche bilden, nach außen gedrängt zu werden. Entsprechend musste zur Erklärung der Ergebnisse eine bemerkenswert große Konformationsänderung der Chromophorstruktur und eine noch größere des Proteins



Schema 2. Räumliche Anordnung der sieben Transmembranhelices in Lumi- und Metarhodopsin nach Borhan et al.^[10] (Copyright® American Association for the Advancement of Science 2000).

beim Übergang von Batho- zu Lumirhodopsin angenommen werden. Im Einzelnen sollen die beiden ursprünglich benachbarten Helices C und E durch die nach innen drängende Helix D (mit der später durch Cross-linking verknüpften Aminosäure Ala169) auseinander gedrückt werden, sodass der reaktive Chromophor zugänglich wird. Darüber hinaus ist zu beachten, dass der Kristallstruktur von Rhodopsin zufolge die Seitenkette von Ala169 nach außen gerichtet ist, sodass nicht nur eine Translations-, sondern auch eine Rotationsbewegung um die Längsachse für die Helix D angenommen werden muss. Die Aminosäure Ala169 wird auch in den Meta-I- und Meta-II-Zuständen modifiziert, was darauf hindeutet, dass der Chromophor beim Übergang in diese Intermediate keine starken Konformationsänderungen mehr eingeht. In der Tat ist die selektive Verknüpfung einer Aminosäure, von der man annimmt, dass sie nach außen gerichtet ist, ein bemerkenswertes Ergebnis, umso mehr, wenn unter den angegebenen experimentellen Bedingungen der Lumizustand nur zu ca. 50% entsteht. Dies bedeutet, dass durch die Bewegung des Cyclohexenylrings im Verlauf der Bildung des Lumizustands die reaktive Carbengruppe selektiv in Richtung der D-Helix ausgerichtet wird. Insgesamt fordern die Autoren eine mehr als bemerkenswerte strukturelle und konformative Flexibilität von Chromophor und Protein bei der lichtinduzierten Bleichung von Rhodopsin.

Charakterisierung der Chromophorkonformation durch Festkörper-Deuterium-NMR

Auch die Publikation von Gröbner et al.^[11] behandelt die Konformation des Rhodopsinchromophors im Ruhezustand und die Konformationsänderungen beim Übergang in den Meta-I-Zustand. Diese Veröffentlichung ist die vorläufig letzte einer Reihe von Arbeiten zur NMR-spektroskopischen Bestimmung der Konformation des Rhodopsinchromophors.^[14, 15] Für ihre Untersuchungen haben die Autoren die Festkörper-NMR-Methode auf verschiedene Rhodopsinproben angewandt, die jeweils mit selektiv Deuterium-markierten Retinalchromophoren rekonstituiert worden waren. Das Prinzip dieser Methode zur Strukturermittlung fußt auf der Immobilisierung der Rhodopsinproben auf festen Trägern (hier Glasplatten) im Inneren des NMR-Rotors in einem präzisen Winkel zur Rotorachse. Damit wird es möglich, die Orientierung des Deuteriumquadrupol-Tensors der deuterierten Proben bezüglich der Membrannormalen und des angelegten äußeren Magnetfeldes zu bestimmen (magic angle

oriented sample spinning NMR, MAOSS-NMR). Durch die NMR-Analyse von Rhodopsinproben, deren Retinalchromophore an den Positionen 5, 9 oder 13 trideuterierte Methylgruppen tragen (**3a–c**, Schema 1), können die Konformation des Chromophors in der Bindungsstelle und die Konformationsänderungen während der Bleichung bestimmt werden. Gröbner et al.^[11] widmen sich unter Verwendung des 5-CD₃-Chromophors bevorzugt den Bewegungen des Cyclohexenylrings während des Rhodopsin-Metarhodopsin-Übergangs. Ähnlich wie in der Untersuchung von Borhan et al.^[10] wurde auch hier bei Temperaturen um 0 °C durch Belichtung der Metazustand gebildet und stabilisiert und die Chromophorkonformation mit der im Ruhezustand von Rhodopsin verglichen. Aufbauend auf früheren Bestimmungen der Anordnung der Polyenkette (die durch Messungen mit 9- und 13-CD₃-markierten Retinalen erhalten wurde,^[14] wobei die Winkel zwischen diesen Substituenten und der Membrannormalen 44 bzw. 30 ± 5° betragen) ergeben die NMR-Daten mit dem C5-CD₃-markierten Chromophor eine 6-*s-trans*-Anordnung von Ring und Kette sowohl für den Rhodopsin-Ausgangszustand als auch für die Meta-I-Form (man bestimmte für den C5-CD₃-Bindungsvektor einen Winkel von 21 ± 5° im Ausgangszustand und von ca. 50° im Metazustand). Im Ausgangszustand weist die Polyenkette des Retinals eine bemerkenswerte Verdrillung entlang ihrer Längsachse (44 und 30° für die beiden Substituenten, siehe oben) und eine zusätzliche Drehung zwischen Ring und Kette. Bei Erreichen der Metarhodopsin-Form nimmt der Chromophor dann allerdings eine nahezu vollständig relaxierte all-*trans*-Konformation/Konfiguration ein. In diesem Zustand bilden die Bindungsvektoren aller drei Methylgruppen mit der Membrannormalen einen Winkel von 60–65°. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht nur der Cyclohexenylring, sondern auch die gesamte Polyenkette infolge der Photoisomerisierung der 11,12-Doppelbindung beträchtliche Konformationsänderungen eingeht. Neben dem Befund, dass die Polyenkette in der 11-*cis*-Form infolge einer sterischen Hinderung zwischen dem Wasserstoffatom an C10 und der Methylgruppe an C13 im Bereich der 11,12-Doppelbindung stark verdrillt ist, wie bereits andere, unter anderem Circular dichroismus-Messungen nahegelegt haben,^[16, 17] ist die hier vorgeschlagene Verdrillung zwischen Ring und Kette unter Bildung einer 6-*s-trans*-Anordnung überraschend. Eine sterische Hinderung zwischen der Methylgruppe an C5 und dem Wasserstoffatom an C8, die zuerst in den Kristallstrukturen von Retinoiden nachgewiesen wurde, wurde auch für die Struktur des Chromophors in der Rhodopsin-Bindungstasche vermutet. Allerdings wurde früher angenommen, dass daraus eine verdrillte 6-*s-cis*-Konformation resultiert (übrigens basiert auch dieses Ergebnis interessanterweise auf Festkörper-NMR-Untersuchungen^[18]). Gröbner et al.^[11] argumentieren nun in Anbetracht dieser offensichtlichen Diskrepanz, dass die frühere Zuordnung der Konformation des – auch damals ¹³C-markierten – Chromophors als 6-*s-cis* aus dem Vergleich mit Spektren von Modellverbindungen getroffen worden war, die in organischen Lösungsmitteln gemessen wurden, und dass die Signale „am oberen Ende des Bereichs für 6-*s-cis*-Modellverbindungen, nahe der Region für die 6-*s-trans*-Derivate gefunden wurden“ (Fußnote [18] in Lit. [11]).

Den NMR-Daten und der Rhodopsin-Kristallstruktur zufolge befindet sich der Ring des Retinalchromophors in der Bindungstasche sandwichartig zwischen den aromatischen Aminosäuren Trp265 (die ja auch durch die Cross-linking-Experimente identifiziert worden war) und Tyr268. Beide Aminosäuren sind hochkonserviert in allen bisher untersuchten Opsinen. Während eine Konformationsänderung des Retinalrings von einer verdrillten 6-*s-transoiden* zu einer völlig relaxierten 6-*s-trans*-Konformation den hier diskutierten NMR-Befunden zufolge möglich erscheint, wäre eine Rotation der Ringhälfte infolge der Photoisomerisierung, wie es die Cross-linking-Experimente nahelegen, deutlich unwahrscheinlicher, da aufgrund der starken Wechselwirkungen zwischen den drei Ringen (Cyclohexenyl und zwei aromatische Aminosäuren) eine hohe Energiebarriere zu überwinden wäre.

Die dreidimensionale Kristallstruktur von Rhodopsin: Konsequenzen für die vorgeschlagenen Chromophorkonformationen

Die Ergebnisse der beiden hier diskutierten Publikationen müssen vor dem Hintergrund der kürzlich präsentierten Struktur von Rinderrhodopsin gesehen werden.^[9] Obwohl diese nur den Grundzustand mit einer Auflösung von 2.8 Å zeigt, darf die deutlich erkennbare Anordnung der sieben Transmembranhelices bei Diskussionen über Konformation und Konformationsänderungen nicht übergangen werden. Während die sowohl aus den Cross-linking- als auch aus den NMR-Experimenten hergeleitete enge Nachbarschaft des Rings des Retinalchromophors und der Helix F des Proteins mit der dreidimensionalen Struktur in Einklang zu bringen ist, sind die von Borhan et al. postulierten starken Änderungen des Proteinrückgrats bei Erreichen des Lumi- und des Metazustands deutlich kritischer zu bewerten – nicht nur, da sich die beiden Helices C und E erheblich voneinander fortbewegen müssen, um der Helix D Zugang zur Chromophor-Bindungstasche zu ermöglichen, sondern auch, da sich die Helix D selbst, die das Cross-linking-Target Ala169 enthält, um ihre Längsachse drehen muss, denn der Alaninrest weist im Ausgangszustand vom Proteininneren und von der Chromophor-Bindungstasche weg (Abbildung 1). Die etwas weniger ausgeprägten Änderungen der Ringkomponente, die Gröbner et al.^[11] aufgrund ihrer NMR-Studien vorschlagen – Übergang von der früher postulierten *cisoiden* in die *transoide* und bei Erreichen des Metazustands in die relaxierte 6-*s-trans*-Konformation –, sind angesichts der Kristallstruktur prinzipiell leichter zu akzeptieren (siehe aber unten!). Weitere NMR-Untersuchungen werden möglicherweise helfen, die Lücke zwischen dem Ausgangszustand und dem hier untersuchten Meta-Intermediat zu füllen. Außerdem darf man geringe Änderungen in der Anordnung des Proteinrückgrats bei Erreichen einer höheren atomaren Auflösung erwarten, was möglicherweise klären hilft, ob für größere Strukturänderungen im Protein konformativer Freiraum vorhanden ist. Man sollte hierbei nicht vergessen, dass ein Photorezeptor wie Rhodopsin, der im Dunklen, also im Ruhezustand absolut „still“ sein muss, nach Lichtaktivierung aber beträchtliche Konformationsänderungen im Bereich der

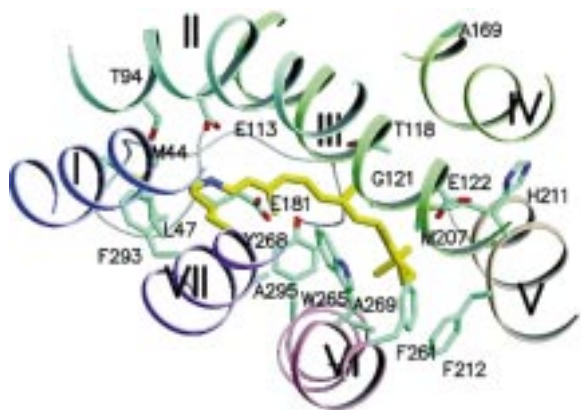
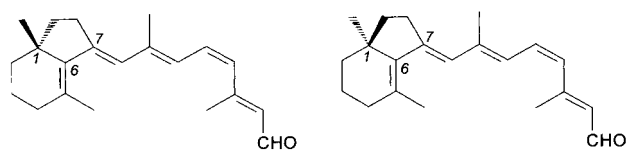


Abbildung 1. Dreidimensionale Kristallstruktur von Rhodopsin nach Palczewski et al.^[9] betrachtet von der cytoplasmatischen Seite des Proteins. Man beachte die starke Neigung der Helix III bezüglich der Membranoberfläche (Copyright© American Association for the Advancement of Science 2000).

cytosolischen Schleifen eingeht, um eine Bindungsstelle für das G-Protein zu bilden, sehr wohl eine große konformative Flexibilität aufweisen muss. In der Tat weisen die Ergebnisse mit anderen Methoden, insbesondere Steady-state- und zeit aufgelöste EPR-Messungen an selektiv spinmarkierten Rhodopsinen, auf die hohe Beweglichkeit in verschiedenen Bereichen des Proteins hin. Eine hier häufig verwendete Sonde ist die 1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-Gruppe, die kovalent an Cysteinreste angebunden werden kann, wobei diese sich entweder an ihren natürlichen Positionen im Protein befinden oder mittels gerichteter Mutagenese an verschiedene Stellen eingebracht werden können. Diese Methode liefert Informationen darüber, ob ein bestimmter Bereich des Proteins bei dessen Funktion an Flexibilität gewinnt oder diese einbüßt. Wenn mehr als ein Spinmarker eingeführt wird, können mit dieser Methode sogar Abstände zwischen benachbarten Proteinbereichen bestimmt werden.^[19]

Die Chemie schlägt zurück

Die aktuellsten Ergebnisse, die von Nakanishi et al. mit modifizierten Retinalchromophoren erhalten wurden, liefern allerdings bemerkenswerte neue Einsichten zur Einbindung des Chromophors und zur Flexibilität zwischen Ring und Kette des Rhodopsin-gebundenen Retinals: Die Autoren beschreiben Ergebnisse, die mit zwei Retinalderivaten erhalten wurden, in denen jeweils eine der beiden geminalen Methylgruppen des Rings mit dem C7-Atom der Kette über eine Methylengruppe verbrückt wurde (Schema 3).^[20] Nach



Schema 3. Strukturformeln der 11-*cis*-Isomere von 7,16- und 7,17-Methanoretinal, dem (1*R*)- (links) bzw. (1*S*)-fixierten Analogon (rechts) von Retinal.

diesem neuartigen chemischen Ansatz kann nicht nur die 6-*cis*-Konfiguration eindeutig festgeschrieben werden, sondern darüber hinaus auch zwischen dem (1*R*)- und dem (1*S*)-Enantiomer unterschieden werden (Schema 3). In der Tat bildet nur das (1*R*)-Enantiomer bei Inkubation mit gebleichtem Rhodopsin ein Chromoprotein, dessen Absorptionsmaximum dem des nativen Pigment ähnelt. Die physiologische Aktivität des neuen Pigments, gemessen anhand der Fähigkeit, das G-Protein zu aktivieren, erreicht ca. 80% der Aktivität von Rhodopsin natürlichen Ursprungs.

Es scheint in der Tat so, dass trotz des beachtlichen Fortschritts in der Aufklärung der Struktur und der Funktion von Rhodopsin, die Zahl der offenen Fragen und der ungelösten Probleme offenbar gerade wegen der immer genaueren Kenntnis von Struktur und Funktion dieses Proteins eher zu- als abnimmt.

- [1] a) „Vertebrate Phototransduction and the Visual Cycle, Part A“: *Methods Enzymol.* **2000**, 315; b) „Vertebrate Phototransduction and the Visual Cycle, Part B“: *Methods Enzymol.* **2000**, 316.
- [2] a) T. Gudermann, T. Schöneberg, G. Schultz, *Annu. Rev. Neurosci.* **1997**, 20, 399–427; b) A. G. Beck-Sicking, *Drug Discovery Today* **1996**, 1, 502–513.
- [3] W. Kühne, *Unters. Physiol. Inst. Univ. Heidelberg* **1877**, 1, 15–103.
- [4] a) G. Wald, *Nature* **1933**, 132, 316–317; b) G. Wald, *J. Gen. Physiol.* **1936**, 19, 781–795.
- [5] *Carotenoids* (Hrsg.: O. Isler), Birkhäuser, Basel, **1971**.
- [6] K. Nakanishi, R. K. Crouch, *Isr. J. Chem.* **1995**, 35, 253–272.
- [7] Neben Retinal finden sich in allen bisher untersuchten Sehpigmenten nur das 3- oder 4-Hydroxyderivat sowie 3,4-Dehydroretinal (A₂-Retinal) als Chromophore. Während eine Hydroxygruppe im Cyclohexenylring von Retinal die Absorptionseigenschaften eines gegebenen Pigments nicht merklich beeinflusst, führt der Einbau von A₂-Retinal zu einer bathochromen Verschiebung der Absorptionsbande. Dieser Austausch (A₁- gegen A₂-Retinal in einem Sehpigment), wie er bei vielen Amphibien vorkommt, wird als Adaptation gegenüber einer veränderten spektralen Zusammensetzung des Lichts in einem gegebenen Habitat verstanden.
- [8] B. H. Honig, U. Dinur, K. Nakanishi, V. Balogh-Nair, M. A. Gawinowicz, M. Arnaboldi, M. G. Motto, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 7084–7086.
- [9] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **2000**, 289, 739–745.
- [10] B. Borhan, M. L. Souto, H. Imai, Y. Shichida, K. Nakanishi, *Science* **2000**, 288, 2209–2212.
- [11] G. Gröbner, I. J. Burnett, C. Glaubitz, G. Choi, A. J. Mason, A. Watts, *Nature* **2000**, 405, 810–813.
- [12] M. L. Souto, J. Um, B. Borhan, K. Nakanishi, *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 2617–2628.
- [13] K. Nakanishi, *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, 48, 1399–1409.
- [14] G. Gröbner, A. Taylor, P. T. F. Williamson, G. Choi, C. Glaubitz, J. A. Watts, W. J. de Grip, A. Watts, *Anal. Biochem.* **1997**, 254, 132–138.
- [15] G. Gröbner, G. Choi, I. J. Burnett, C. Glaubitz, P. J. E. Verdegem, J. Lugtenburg, A. Watts, *FEBS Lett.* **1998**, 422, 201–204.
- [16] Q. Tan, J. Lou, B. Borhan, E. Karnaukhova, N. Berova, K. Nakanishi, *Angew. Chem.* **1997**, 99, 2190–2194; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2089–2093.
- [17] V. Buss, K. Kolster, F. Terstegen, R. Vahrenhorst, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1997–2000; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1893–1895.
- [18] S. O. Smith, I. Palings, V. Copie, D. P. Raleigh, J. M. L. Courtin, J. A. Pardo, J. Lugtenburg, R. A. Mathies, R. G. Griffin, *Biochemistry* **1987**, 26, 1606–1611.
- [19] Z. T. Farahbakhsh, K. Hideg, W. L. Hubbell, *Science* **1993**, 262, 1416–1419.
- [20] K. Nakanishi, persönliche Mitteilung (2001).