

## Flash Photolysis of Rhodopsin

## II. Measurements on Rhodopsin Digitonin Solutions and Fragments of Rod Outer Segments

GÜNTER V. SENGBUSCH\* and HENNIG STIEVE\*\*

Institut für Zoologie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

(Z. Naturforsch. 26 b, 861—862 [1971]; received April 27, 1971)

Some reactions of bovine rhodopsin in buffered 0.5% digitonin solution (pH 7) were examined kinetically by means of flash photolysis. When rod outer segments are treated with digitonin solution only part of the rhodopsin present in rod outer segments is dissolved. Even when the dissolving process is repeated several times, membrane fragments are still left containing about 20 to 50% of the total amount of rhodopsin<sup>1</sup>. Consequently the "rhodopsin solutions" still contain fragments of membranes in which the rhodopsin is differently bound from that in the dissolved digitonin complex. The size of these remaining membrane fragments depends on the speed at which the "rhodopsin solutions" were centrifuged.

When rod outer segments incubated in digitonin are centrifuged at 4000 g a "rhodopsin digitonin solution" (A) remains as supernatant showing temporally separated difference absorption spectra after a flash. These spectra shown in Fig. 1 can be attributed to the reactions rhodopsin—lumirhodopsin, lumirhodopsin—metarhodopsin I, and metarhodopsin I—metarhodopsin II as to be seen when compared with those spectra measured on rod suspensions<sup>1</sup>. The reaction rhodopsin—lumirhodopsin was not resolved temporally; therefore nothing can be said about other intermediates occurring before the reaction lumirhodopsin—metarhodopsin I.

If the "rhodopsin digitonin solution" (A) is centrifuged at 30 000 g a precipitate is obtained that can be suspended for example in Ringer's solution (B).

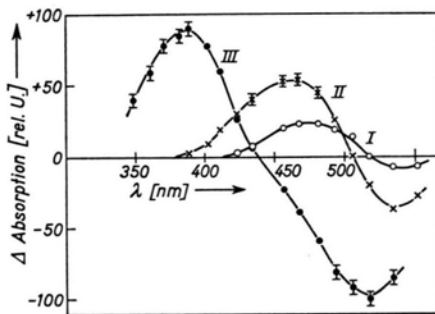


Fig. 1. Separated difference absorption spectra measured on "rhodopsin digitonin solution" (A) (centrifuged at 4000 g). I. Rhodopsin—lumirhodopsin; II. lumirhodopsin—metarhodopsin I; III. metarhodopsin I—metarhodopsin II.

Sonderdruckanforderungen an: Dr. G. v. SENGBUSCH, Institut für künstliche Organe, D-4404 Telgte, Orkotten 21.

\* Present address: Institut für künstliche Organe, D-4404 Telgte/Wefft., Orkotten 21, Germany.

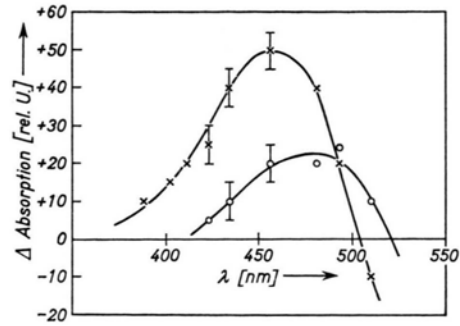


Fig. 2. Separated difference absorption spectra measured on fragments of rod outer segments showing the reactions rhodopsin—lumirhodopsin (circles) and lumirhodopsin—metarhodopsin I (crosses).

The supernatant is a "rhodopsin digitonin solution" centrifuged at 30 000 g (C). The particles of the fraction precipitating between 4000 g and 30 000 g cannot be identified with a light microscope but are most probably fragments of membranes containing rhodopsin. Fig. 2 shows the difference absorption spectra measured on such a suspension. In this case the typical maxima at 480 nm and 460 nm show that the measured reactions can be interpreted as rhodopsin—lumirhodopsin and lumirhodopsin—metarhodopsin I.

After a flash the "rhodopsin digitonin solution" centrifuged at 30 000 g shows difference absorption spectra similar to those in Fig. 2. The associated reactions can also be interpreted as rhodopsin—lumirhodopsin and lumirhodopsin—metarhodopsin I.

The half life times  $\tau_{1/2}$  of the reactions lumirhodopsin—metarhodopsin I and metarhodopsin I—metarhodopsin II are longer (about two times) in the "solution" centrifuged at 30 000 g than in suspensions of rod outer segments. The values for the activation energies  $E_A$  are slightly lower but range in the same order of magnitude as the values measured on rod outer segments (see Table I).

|     | umi — meta I   |                                | meta I — meta II |                                |
|-----|----------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
|     | $E_A$          | $\tau_{1/2}(37^\circ\text{C})$ | $E_A$            | $\tau_{1/2}(37^\circ\text{C})$ |
|     | [kcal/mole]    | [ $\mu\text{sec}$ ]            | [kcal/mole]      | [ $\mu\text{sec}$ ]            |
| (S) | $21.2 \pm 4.5$ | $100 \pm 50$                   | $33.7 \pm 1.0$   | $580 \pm 50$                   |
| (A) | $19.1 \pm 4.5$ | $150 \pm 50$                   | $28.7 \pm 1.4$   | $1050 \pm 80$                  |
| (B) | —              | —                              | $33.0 \pm 1.5$   | $610 \pm 60$                   |
| (C) | $\approx 19$   | $\approx 200$                  | $\approx 28$     | $\approx 1000$                 |

Table I. Kinetic data of the reactions lumirhodopsin—metarhodopsin I and metarhodopsin I—metarhodopsin II. (S) = suspension of rod outer segments; (A) = rhodopsin digitonin solution centrifuged at 4000 g for 30 min; (B) = suspension of fragments of rod outer segments; (C) = rhodopsin digitonin solution centrifuged at 30 000 g for 30 minutes.

\*\* Present address: Institut für Neurobiologie der Kernforschungsanlage Jülich, D-5170 Jülich, Germany.

<sup>1</sup> G. v. SENGBUSCH and H. STIEVE, Z. Naturforsch. 26 b, 488 [1971].

New measurements of CONE<sup>2</sup> on rat retinae in situ concerning the reaction lumirhodopsin—metarhodopsin I agree with our results measured on rod suspensions given in Table I.

ERHARDT et al.<sup>3</sup> interpreted their results concerning the decay of lumirhodopsin as three simultaneous first-order processes. These results were re-examined by RAPP et al.<sup>4</sup> who now interpret this decay as either a first-order or a second-order process. These re-examined results, however, still differ from ours, especially in the values for the rate constants  $k$ . In their

first-order analysis of the decay of lumirhodopsin these authors give the following value:

$$k = 3.87 \cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1} \text{ at } -20^\circ \text{C.}$$

According to our and CONE's results the value for  $k$  is about

$$k = 4 \text{ sec}^{-1} \text{ at } -20^\circ \text{C.}$$

New results given by ABRAHAMSON<sup>5</sup> for the decay of metarhodopsin I in rod discs are in accordance with our data found for the rod fragment fraction (B) (see Table I).

<sup>2</sup> R. A. CONE, private communication.

<sup>3</sup> F. ERHARDT, S. E. OSTROY, and E. W. ABRAHAMSON, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **112**, 256 [1966].

<sup>4</sup> J. RAPP, J. R. WIESENFELD, and E. W. ABRAHAMSON, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **201**, 119 [1970].

<sup>5</sup> E. W. ABRAHAMSON, private communication.

### Light Enhanced Decarboxylation of Indol-3-acetic Acid by Thermal Proteinoids

HEINRICH G. HARDEBECK

Kernforschungsanlage Jülich, Institut für Landwirtschaft,  
517 Jülich

WALTER HAAS

Institut für Anatomie und Physiologie der Haustiere  
der Universität, 53 Bonn

(Z. Naturforsch. **26 b**, 862—863 [1971]; received April 6, 1971)

Polylysine thermally prepared by the method of FOX and HARADA<sup>1</sup> strongly inhibits plant growth, which was supposed to be caused by inactivation of indol-3-acetic acid. Incubation of thermal polylysine with indol-3-acetic acid (IAA) in a Warburg apparatus by HAAS and HARDEBECK<sup>2</sup> yielded carbon dioxide. Further investigations using <sup>14</sup>C-labelled IAA were to prove that carbon dioxide evolved from IAA. The influence of visible light was studied in this context, for WEBER et al.<sup>3</sup> had shown thermal proteinoids to possess photocatalytic activity for a number of decarboxylation reactions.

In a typical experiment (Fig. 1) 20 mg of thermal polylysine were incubated with 20  $\mu$ moles of indol-3-(acetic acid-1-<sup>14</sup>C) (0,294 mCi/mmole) for 2—3 days in 10 ml Britton-Robinson buffer, pH 4,5, at which DEVERALL<sup>4</sup> a maximum of spontaneous IAA decarboxylation had observed. Incubation solutions were prepared under sterility precautions and kept in

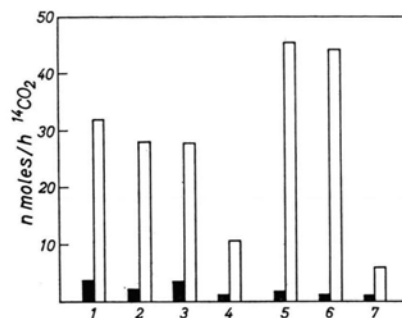


Fig. 1. Photochemically Enhanced Decarboxylation of Indol-3-(Acetic Acid-1-<sup>14</sup>C). Key: 1. Thermal Polylysine WH I/II, 2. Thermal Polylysine WH III, 3. Thermal Polylysine WH IV, 4. L-Lysine (free base), 5. Lysine-rich proteinoid LSD-2, 6. Acidic 2:2:1-proteinoid E (1965), 7. Equimolar mixture of 18 amino acids. Black columns: dark-reaction, White columns: light-reaction.

regular test tubes in a waterbath at 37 °C. A stream of nitrogen carried evolved <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> to a trap of 5 ml 1 N NaOH. Samples were irradiated by two 200 watt tungsten filament bulbs in 15 cm distance, the light being filtered through a 10% solution of CuSO<sub>4</sub> of 5 cm thickness. <sup>14</sup>C was estimated quantitatively using a liquid scintillation spectrometer. In key experiments the identity of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> was confirmed by preparing a barium carbonate precipitate, followed by repeated washings and subsequent <sup>14</sup>C-estimation.

Fig. 1 shows representative results for the proteinoid-enhanced decarboxylation of IAA. Thermal polylysine

Reprints request to Dr. WALTER HAAS, D-6128 Höchst, Oberhöchster Str. 6.

<sup>1</sup> S. W. FOX and K. HARADA, in: P. ALEXANDER and H. P. LUNDGREN, eds., *Analytical Methods of Protein Chemistry*, Vol. 4, p. 129, Pergamon Press, Ltd., London 1966.

<sup>2</sup> W. HAAS and H. G. HARDEBECK, *Naturwissenschaften* **56**, 220 [1969].

<sup>3</sup> A. L. WEBER, A. WOOD, H. G. HARDEBECK, and S. W. FOX, *Federat. Proc.* **27**, 830 [1968].

<sup>4</sup> B. J. DEVERALL, *Nature* [London] **207**, 828 [1965].

<sup>5</sup> S. W. FOX, *Nature* [London] **205**, 328 [1965] and *Naturwissenschaften* **56**, 1 [1969].

<sup>6</sup> A. I. OPARIN, *The Origin of Life on Earth*, Academic Press, New York 1957.

accelerates dark-rates distinctly, whereas basic and acidic proteinoids exhibit only little activity in darkness. The polylysine-enhanced dark-reaction follows Michaelis-Menten kinetics, thus indicating a reversible catalyst-substrate interaction. The mechanism of inhibited plant growth by thermal polylysine is interpreted, therefore, to involve and accelerated decarboxylation and physiological inactivation of IAA.

Irradiation of the samples with visible light yielded up to fortyfold increased rates compared to the velocity in darkness. Response to light and darkness was prompt, and nearly identical rates were obtained for successive dark-light cycles. Considerable complexity of the light-reaction is indicated, as kinetic studies did

not give a straight line for the Lineweaver-Burk plot. The photosensitization is supposedly due to an unidentified yellow pigment, which is firmly bound to the polypeptide-type proteinoid molecules.

The findings are of interest in the context of chemical evolution since thermal proteinoids are prepared by Fox<sup>5</sup> under prebiologically plausible conditions. Extended studies will have to show as to whether such observations will have a bearing on the hypothesis of Oparin<sup>6</sup>, that first organisms were exclusive heterotrophs.

The authors want to express sincere gratitude to Prof. Dr. E. SCHÜRMANN for generously providing research facilities.

---

## BESPRECHUNGEN

---

**Methoden der organische Chemie, Band XIII/1**, Metallorganische Verbindungen Li, Na, K, Rb, Cs, Ag, Au. Houben/Weyl; herausgegeben von EU. MÜLLER, H. MEERWEIN und K. ZIEGLER, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1970, XXVIII, 904 S., m. 13 Abbn.; Preis geb. DM 336,-.

Die Herausgeber legen auch mit diesem Band des *Houben-Weyl* ein Werk vor, das geradezu monumentalen Charakter trägt. Eine Reihe hervorragender Fachvertreter hat sich zusammengefunden um den bisherigen Kenntnisstand der Metallorganischen Chemie der Alkalimetalle Lithium, Natrium, Kalium, Rubidium und Cäsium sowie der Münzmetalle Kupfer, Silber und Gold kritisch zu sichten und nach Gliederung des Materials nach methodischen Gesichtspunkten in übersichtlicher Form darzubieten. Dabei steht wieder die Behandlung „der Methoden zur Herstellung und Umwandlung“ der Verbindungen dieser Stoffklasse im Vordergrund, während die Beschreibung der einzelnen Stoffe selbst – schon nach dem Vorwort zum Gesamtwerk – den entsprechend anders orientierten Handbüchern, wie dem *Beilstein*, vorbehalten sein soll.

Wenngleich bei der Erfassung der einschlägigen Literatur keine absolute Vollständigkeit angestrebt werden sollte, so wurde doch besonderer Wert auf eine lückenlose Darlegung der *Syntheseverfahren* gelegt, die jeweils als Schwerpunkt der einzelnen Kapitel anzusehen sind. Ein besonderes Lob verdient dabei die Leistung, daß in einem 1970 erschienenen Buch von fast 900 Seiten mit schätzungsweise 5000 Literaturzitaten in der Mehrzahl der Abschnitte die Literatur wenn nicht bis 1970, so doch mit Sicherheit bis 1969 berücksichtigt werden konnte! Die Anordnung jedes der einschlägigen Zitate als Fußnote auf jeder der betroffenen Seiten ist eine Konzession an den Leser, die die Effizienz des Werkes ganz beträchtlich steigert. Dazu kommen ein je etwa fünfzigseitiges Autoren- und Sachregister (letzteres mit schätzungsweise 4000 Stichworten), die sich in

der Praxis als besonders hilfreich erweisen werden. Im Text wurde mit Hinweisen auf entsprechende Abhandlungen an anderen Stellen des Bandes oder des Gesamtwerkes nicht geizt, so daß auf wichtige Querverbindungen klar hingewiesen ist und häufige Wiederholungen unnötig wurden. Die im Kleindruck angefügten Arbeitsvorschriften ersparen vielfach das Heranziehen mehr oder weniger schwer zugänglicher Originalliteratur.

Ein erstes Kapitel befaßt sich mit Eigenschaften, Handhabung und Analytik von alkalimetallorganischen Verbindungen (U. SCHÖLLKOPF) und legt damit gewissermaßen die experimentellen Grundlagen für die folgenden Abschnitte. Mehr als überall sonst ist hier ein reicher Erfahrungsschatz des Autors erkenntlich – und unerläßlich. Ein zweites Kapitel von allgemeiner Bedeutung befaßt sich mit der CH-Acidität organischer Verbindungen, die ja fast überall in der metallorganischen Chemie eine große, wenn nicht entscheidende Rolle spielt (H. F. EBEL). Daran schließen sich die mehr spezialisierten Abschnitte über lithiumorganische (U. SCHÖLLKOPF) und andere alkaliorganische Verbindungen (außer denen des Lithiums) an (H. F. EBEL und A. LÜTTRINGHAUS). Der abschließende, wesentlich kleinere Teil ist den organischen Verbindungen des Kupfers, Silbers und Golds gewidmet (G. BÄHR † und P. BURBA). Hier macht sich das bewußte Ausklammern der Komplexverbindungen dieser Metalle mit Olefinen recht nachteilig bemerkbar, da die Grenzen zwischen  $\sigma$ - und  $\pi$ -gebundenen Metallorganen naturgemäß schwer und eigentlich nur willkürlich zu ziehen sind. Die gerade heute oft im Mittelpunkt des Interesses stehende Chemie metallorganischer Komplexverbindungen wird erst Gegenstand des Bandes XIII/8 dieses Werkes sein. Bei den Alkalimetallen ist dieses Problem naturgemäß gegenstandslos.

Die Ausstattung des Buches ist wie immer ausgezeichnet. Der Text und die Formeln und Gleichungen sind

übersichtlich angeordnet und die Zahl der Druckfehler ist nach Berücksichtigung der beigefügten (einkleb- baren) Korrekturen minimal. Nur wo z. B. recht be- kannte Namen in „umfunktionierte“ Formen wie z. B. B. BRYLE-SMITH, O. GLENSER, A. E. FAVORSHII oder G. N. SCHRANZER erscheinen wird es dem Rezensenten leicht gemacht, die letzten Schönheitsfehler aufzudecken.

In einer Zeit, in der kleine Monographien mit sehr kurzlebiger Aktualität zu stolzen Preisen auf den Markt kommen, muß ein 900-Seiten-Band des Houben- Weyl mit seinem vergleichsweise zeitlosen Wert auch zum Preis von DM 336,— zwar auch nicht billig, aber doch enorm preiswert erscheinen.

H. SCHMIDBAUR, Würzburg.

**Das Weltall und seine Entdeckung.** Von GÜNTEER DOEBEL. DuMont Schauberg, Köln 1968, 337 S., mit zahlreichen Abbn.; Preis DM 26,—.

Seit Sputnik 1 hat sich eine Welle von Büchern über Weltraumfahrt, aber auch über allgemeine Astronomie auf den Ladentisch ergossen. Mußte man zuvor den Mangel an guten Wegweisern in die moderne Astronomie beklagen, so ist es jetzt fast ein Zuviel. Immerhin können durch dies Zuviel alle Arten von Geschmacks- richtungen und von geistiger Aufnahmefähigkeit befriedigt werden.

Unter dem Untertitel „Astronomie von Babylon bis Kap Kennedy“ versucht G. DOEBEL den Leser durch

die für die Entwicklung des menschlichen Geistes so typische und so erstaunliche Geschichte der Astronomie zu führen. Sinnvoll beginnt er zunächst mit einem Resümee unserer heutigen Vorstellungen des Planeten Erde. Wenn hier geophysikalische Probleme, etwa die Polwanderung, in Form einer Abendunterhaltung bei zwei Flaschen Wein abgehandelt werden, so gibt diese Episode ein gutes Beispiel für den romanhaften, locke- ren Stil, in dem das ganze Buch geschrieben ist. Es fol- gen Kapitel über die Geschichte der Astronomie, For- men kosmischer Materie, Galaxien, Kosmologie, Raum- fahrt und — so etwas darf nicht fehlen — die Zukunft der Erde und der Menschheit. Reißerische Untertitel wie „Merkur ließ es regnen“ oder „Astronomen im Alkoholrausch“ gliedern den Fortgang des Romans.

In der beschwingten Schilderung der Astronomie und der Astronomen, in die der Autor gewissermaßen hin- einkriecht, mag ein gewisser Reiz liegen für solche Leser, die bei dieser Wanderung durch eines der auf- regendsten Kapitel der Geistesgeschichte kein schweres Gepäck tragen wollen. Daß dabei an vielen Stellen Unrichtigkeiten unterlaufen, nimmt wenig wunder. Ein reicher Bildteil vorzüglicher farbiger und schwarz- weißer Aufnahmen ist in das Buch eingestreut. Man muß aber objektiv bemängeln, daß im Text jeder Hin- weis auf diese oft weit vom Text entfernt stehenden Bilder fehlt. Empfehlenswert? für weniger anspruchs- volle Leser, die gerne hin- und herblättern und an Stories Freude haben. H. HAFFNER, Würzburg.