

6 Die alkalische Form der Mutante D85N

6.1 Einleitung

Im Wildtyp ist die Asparaginsäure in Position 85 der Akzeptor beim Ladungstransfer während des L-M Übergangs. Voraussetzung dafür ist, daß die Seitenkette bei neutralem pH deprotoniert vorliegt und somit eine negative Gegenladung zur protonierten und damit positiv geladenen Schiffischen Base darstellt. Diese negative Gegenladung bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Retinals, und trägt damit zum „Opsinshift“ bei. Durch Absenkung des pH unter den pK von 2,6 kann Asp-85 im Wildtyp protoniert und damit neutralisiert werden. Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Retinals von 580 nm nach 610 nm verschoben, man spricht von der „purpur-blau Umwandlung“. Das elektrische Signal dieser „blauen Form“ hat das umgekehrte Vorzeichen wie das aktive Pumpsignal und ist nur transienter Natur, d.h. es kehrt im ms-Zeitbereich lange vor Einsetzen der Systementladung wieder zur Nulllinie zurück (Moltke und Heyn, 1995).

In der Punktmutante D85N ist die protonierbare Seitenkette der Asparaginsäure durch das nicht protonierbare, also immer neutral vorliegende Asparagin ersetzt, während die Länge des Aminosäurerestes erhalten bleibt. Daher liegt diese Mutante bereits bei physiologischem pH „optisch blau“ vor (λ_{\max} 615 nm). Durch die Entfernung der negativen Ladung wird außerdem der pK der Schiffischen Base von 13 (ein meßtechnisch schlecht zugänglicher Bereich, da hier das Protein bereits denaturiert) nach 8-9 herabgesetzt. Daher besteht hier die Möglichkeit, die Form des Proteins mit deprotonierter Schiffischer Base, kurz auch als die „gelbe Form“ (λ_{\max} 405 nm) bezeichnet, bei einem pH zu untersuchen, bei dem das Protein noch stabil ist. Diese Form besitzt starke Ähnlichkeit zum M-Intermediat des Wildtyp-Photozyklus, denn dort ist ebenfalls die Schiffische Base deprotoniert und Asp-85 neutralisiert. Zu den elektrischen Eigenschaften dieser „gelben Form“ lagen bereits Strommessungen mit Anregung durch blaues Gleichlicht vor (Tittor et al., 1994), die Anlaß zu den im Folgenden aufgeführten zeitaufgelösten Messungen gaben.

6.2 Vergleich der gelben Form von D85N mit dem Wildtyp

Typische zeitaufgelöste Spannungssignale der gelben Form von D85N und des Wildtyps sind in Abb. 6.1 gezeigt. In beiden Messungen beträgt die Membrankapazität 1,8 nF kombiniert mit einem 50 G Ω Meßwiderstand. Damit wurden Systementladungszeiten von 12 s und 150 s erhalten. Dabei sind die 12 s ein amplitudengewichteter Mittelwert über 2 Exponentialfunktionen für die große Entladungsamplitude. Da die Mutation die Oberflächenladung nicht verändern sollte, wird die Anlagerung an die Stützfolie dieselbe Orientierung wie die der Wildtypmembran haben, also ist die extrazelluläre Membranseite der Stützfolie zugewandt. Ferner folgt aus Abb. 6.1, daß bis zum Einsetzen der Systementladung in der gelben Form von D85N genauso wie im Wildtyp Protonen von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Seite transportiert werden, obwohl der Donor als auch der Akzeptor des ersten größeren Ladungstransfers überhaupt nicht vorhanden sind, und man deshalb eine nicht pumpaktive Form erwartet hätte. Im Detail unterscheiden sich die Spannungssignale von Wildtyp und D85N wie folgt: Die erste, wahrscheinlich nicht aufgelöste Komponente bei 60 ns ist von entgegengesetzter Richtung wie im Wildtyp und wird wahrscheinlich der Ladungsumverteilung nach der Isomerisierung des Chromophors entsprechen. Die erste größere Ladungsverschiebung, die bei dem Wildtyp um 30 μ s stattfindet und der Deprotonierung der Schiffischen Base zugunsten von Asp-85 sowie der Ladungsverschiebung im extrazellulären Kanal zugeschrieben wird (siehe Kapitel 5), fehlt im Signal von D85N vollständig. Dies ist nicht verwunderlich, da weder Donor noch Akzeptor für diesen Schritt

vorhanden sind. Das Überraschende dieses Experiments ist, daß die beiden langsameren Komponenten von 0,7 ms und 13 ms bei D85N trotz des fehlenden ersten Schrittes vorhanden sind.

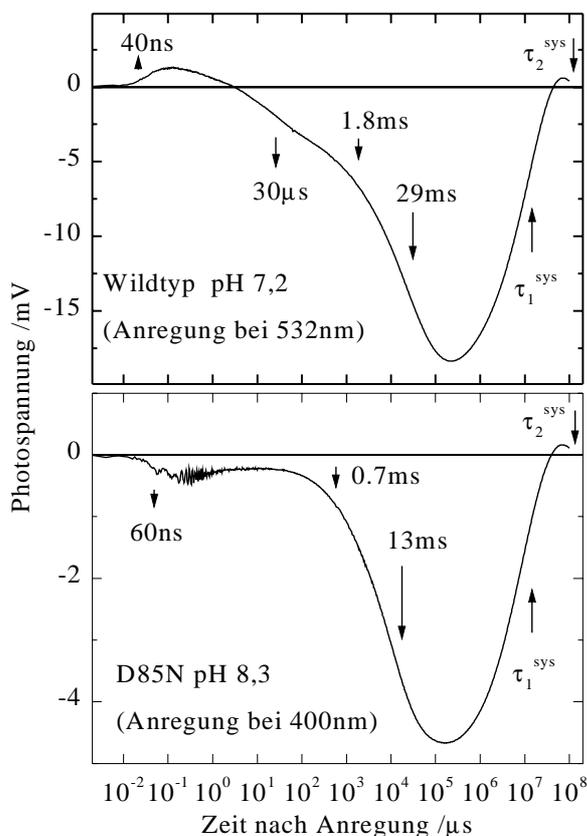


Abb. 6.1: Vergleich der zeitaufgelösten Photospannungssignale des Wildtyps und der gelben Form von D85N. Oben: Wildtyp bei pH 7,2 angeregt mit dem Nd:YAG-Laser bei 532 nm. Unten: D85N bei pH 8,3 angeregt mit dem Farbstofflaser bei 400 nm. Die Pfeile markieren die Zeitkonstanten, relativen Amplituden und Vorzeichen der wichtigsten aktiven Komponenten. Die Systementladungszeiten τ_1^{sys} und τ_2^{sys} liegen bei 12 s und 150 s. Bei dem Wildtyp sind die 30 μs und 29 ms Komponenten Gauß-verteilte Kinetiken mit $\sigma_1=0,79$ und $\sigma_3=0,35$, bei D85N ist die 13 ms Komponente Gauß-verteilt mit $\sigma=0,40$. Bedingungen bei beiden Messungen sind 150 mM K_2SO_4 ; 22°C, Standard Puffer. Da die Membranfragmente mit der extrazellulären Seite an der Stützfolie adsorbiert sind, bedeuten abwärts zeigende Pfeile einen Protonentransport von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Seite.

Für die Spannungssignale von D85N bei Anregung mit blauem Licht wurde eine pH-Meßreihe von 5,4 bis 11,8 durchgeführt (Abb. 6.2). Die beiden wesentlichen Komponenten im Millisekunden Zeitbereich wurden dabei jeweils mit einer Gauß-verteilter Kinetik angepaßt, während die schnellen Komponenten nicht dargestellt sind, da sie im interessierenden pH Bereich verschwindend klein sind und im tiefen pH Bereich von der blauen Form herrühren (Moltke, 1993). Beim Übergang von niedrigem zu hohem pH wächst zunächst die 10 ms Komponente mit einem pK von etwa 7,5 an. Die Zeitkonstante dieser Komponente bleibt zunächst überwiegend konstant und die 1 ms Komponente trägt bei niedrigem pH noch nicht bei. Danach nimmt die 10 ms Komponente mit einem pK von etwa 8,5 zugunsten der 1 ms Komponente ab. Jedoch erfolgt dieser Übergang nicht vollständig zugunsten der schnelleren Komponente, sondern beide Komponenten koexistieren, bis beide bei etwa pH 10,5 zerfallen. In diesem zweiten pH-Bereich der Koexistenz der beiden Komponenten nimmt die Zeitkonstante der langsameren Komponente von 10 ms auf 1 s zu. Außerdem taucht ab pH 10,7 eine weitere Komponente von 5-10 ms auf, die von entgegengesetzter Amplitude ist.

Abb. 6.3 zeigt den Effekt von Azid auf die Kinetik des elektrischen Signals und die Absorptionszeitspur bei 650 nm. Offenbar zerfällt das blaue Intermediat mit zunehmender Azidkonzentration immer schneller. Die Amplitude des elektrischen Signals der Mutante nimmt im Bereich von 100 ms bis 1 s ebenfalls mit steigender Azidkonzentration zu. Um den Effekt deutlicher darzustellen, wurde die Systementladung (siehe Abb. 6.1) abgezogen. Obwohl das elektrische Signal nicht bis zum vollständigen Zerfall des 650 nm Intermediats verfolgt werden kann, kann man schließen, daß beim Zerfall des Intermediats eine zusätzliche Ladungsverschiebung in dieselbe Richtung wie beim Aufbau des Intermediats auftritt. Damit wird vermutlich im Zerfall des Intermediats der Pumpzyklus abgeschlossen.

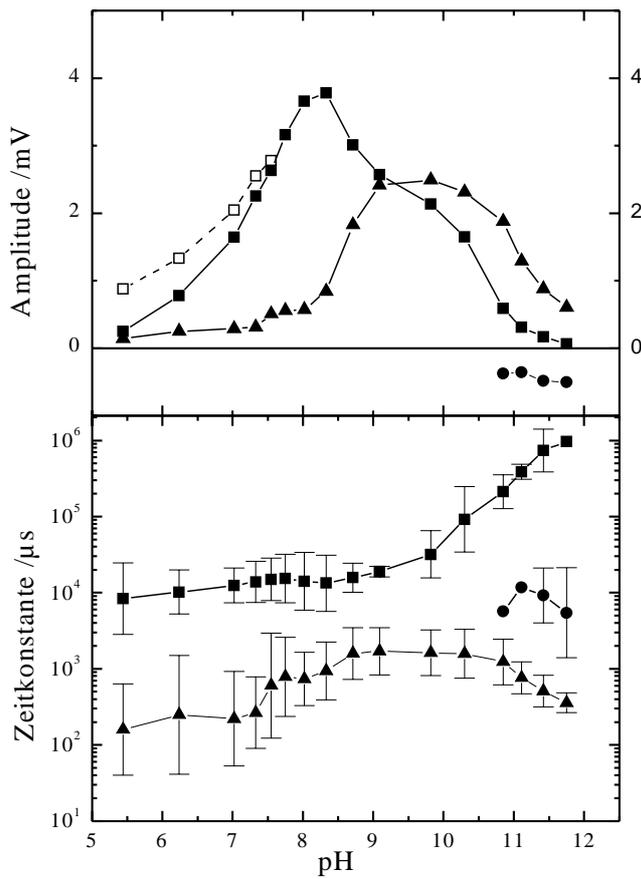


Abb. 6.2 pH-Abhängigkeit der ms Komponenten. Die Anpassung erfolgte mit zwei bzw. drei Komponenten (\square , \blacksquare , \blacktriangle) unter bzw. oberhalb pH 10,6. Die 10 ms Komponenten unterhalb pH 7,7 wurden mit der ns Anstiegskomponente des blauen Signals korrigiert (\blacksquare), da diese sonst einen Beitrag liefert. Falls Balken angegeben, entsprechen sie den Breiten der Gauß-verteilten Kinetiken, andernfalls wurden Exponentialfunktionen verwendet. Bedingungen 22°C, 150 mM K_2SO_4 .

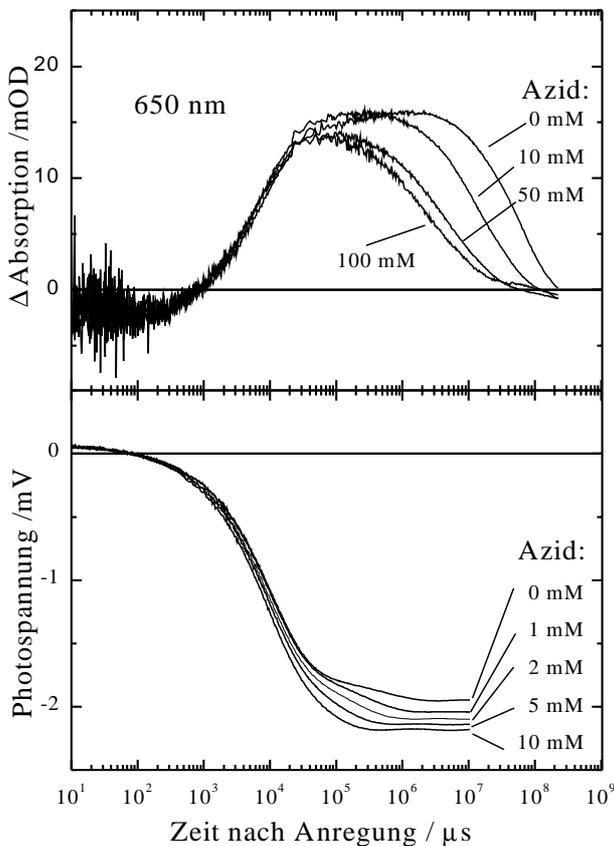


Abb. 6.3 *Oben:* Azideffekt auf die Lebensdauer des blauen Intermediats, gemessen an der Absorptionszeitspur bei 650 nm (pH 8; 150 mM K_2SO_4). *Unten:* Azideffekt auf das Photospannungssignal nach Abzug der Systementladung und Korrektur der Amplituden nach Gl. 2.35. Zwar ist dieses Spannungssignal aufgrund der Systementladung nur bis 1 s brauchbar, aber man erkennt deutlich eine Zunahme der Spannung in diesem Zeitbereich. Es genügen bereits sehr geringe Konzentrationen Azid, da die Konzentration von Purpurmembran in der Küvette für elektrische Messungen nur etwa 10 nM beträgt. (22°C; pH 7,1, 150 mM K_2SO_4) Die optischen Messungen wurden freundlicherweise von Frau Dr. U. Alexiev zur Verfügung gestellt.

6.3 Diskussion

Bei der Titration der Mutante D85N im Dunkeln sind drei Spezies spektroskopisch zu unterscheiden (Turner et al., 1993, Dickopf et al., 1995). Bei niedrigem pH liegt eine reine blaue (615 nm, „O-ähnlich“) Form vor, die mit steigendem pH und einem pK von 8,2 in die gelbe Form (405 nm) übergeht. Mit steigendem pH wird jedoch nicht eine reine gelbe Form erreicht, sondern ein Gemisch aus gelber und purpur Form (570 nm, „N-ähnlich“) mit einem pK von 9,6 gebildet. Je nach pH liegt außer dem zu untersuchenden gelben Zustand zusätzlich noch entweder der blaue oder der purpurne Zustand vor.

Die beiden großen Komponenten der elektrischen Messungen im ms-Bereich sind korreliert mit dem Auftauchen von rotverschobenen Intermediaten in optischen Messungen (siehe Abb. 6.4). Eine genaue Analyse der optischen Daten ergibt ebenfalls zwei Zeiten von 1,9 ms und 11 ms. Während die erste Zeit der Übergang zu einem blauen Intermediat ist, könnte die zweite Zeit der Übergang in eine purpur Form sein. Diese Übergänge sind außerdem pH-abhängig. Bei niedrigem pH dominiert der schnelle Übergang in die O-ähnliche Form, während bei hohem pH der Übergang in die N-ähnliche Form dominiert. Zusammen mit der Feststellung, daß bereits im Dunkeln pH-abhängig mehr N oder O-artiger Zustand beigemischt ist, erwächst die Vermutung, daß es sich um eine Titration von parallel ablaufenden Zyklen handelt. Bei pH 8 verläuft der Zyklus überwiegend über ein O-ähnliches Intermediat während bei einem $\text{pH} > 9$ der Zyklus überwiegend über ein N-ähnliches Intermediat verläuft.

Die Rückkehr der rotverschobenen Intermediate in den gelben Zustand erfolgt erst nach mehreren Sekunden und kann in den elektrischen Messungen aufgrund der dann einsetzenden Systementladung nicht erfaßt werden. Interessant ist jedoch, daß die Protonenaufnahme und -Abgabe mit dem Aufbau und Zerfall des blauen Intermediates erfolgt (Abb. 6.5). Da bei der Protonenaufnahme eine negative Spannung entsteht (und in der Anlagerung dieselbe Orientierung wie bei dem Wildtyp erwartet wird), muß die Aufnahme von der zytoplasmatischen Seite erfolgen. Die Abgabe erfolgt erst im Sekundenbereich, läßt sich jedoch mit Azid beschleunigen. Im elektrischen Signal vergrößert Azid die erreichte Spannung (Abb. 6.3), so daß man daraus schließen kann, daß mit dem Zerfall des blauen Intermediates eine Protonenabgabe nach außen erfolgt, und damit ein kompletter Pumpzyklus durchlaufen wird. In Gleichlichtmessungen wurde beobachtet (Tittor et al., 1994), daß Azid das kontinuierliche Stromsignal vergrößert. Dies ist konsistent mit den Messungen hier, die zeigen, daß der ratenlimitierend Schritt durch Azid beschleunigt wird.

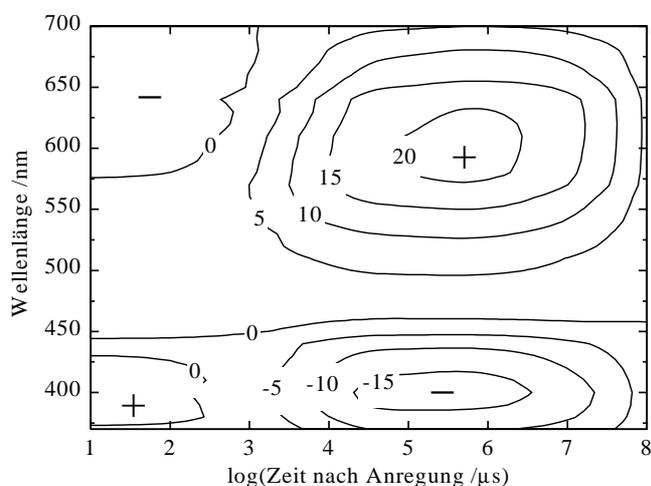


Abb. 6.4 Kontourplot der Absorptionsänderung der Mutante D85N (bei pH 8) nach Anregung mit blauem Licht von 400 nm. Die Absorptionszunahme im Langwelligen hat deutlich eine größere Breite als das Minimum bei 400 nm. Daraus kann man bereits vermuten, daß das Maximum von mehr als einem Intermediat herrührt. +/-: Vorzeichen der Absorptionsänderung, Skalierung 5 mOD/Höhenlinie. Der Kontourplot wurde freundlicherweise von Frau Dr. U. Alexiev zur Verfügung gestellt. Bedingungen: 150 mM KCl, 22°C.

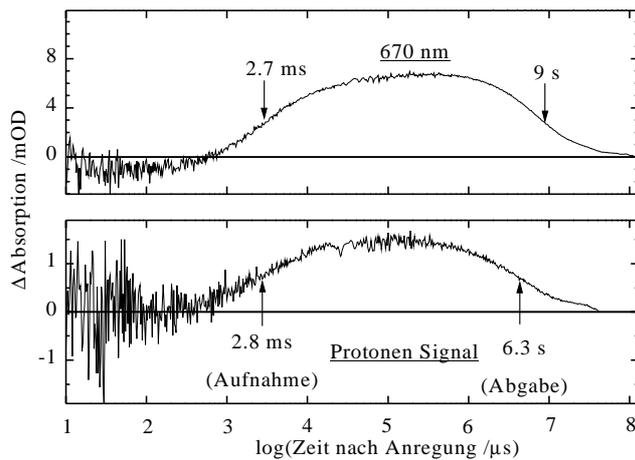


Abb. 6.5 *Oben*: Absorptionszeitspur des blauen Intermediates im Photozyklus von D85N. *Unten*: Kinetik von Protonenaufnahme und Abgabe ins Medium, wie es mit dem pH-Indikator „Phenol Red“ detektiert wurde. Der Plot wurde freundlicherweise von Frau Dr. U. Alexiev zur Verfügung gestellt. Bedingungen pH 8,0; 32°C, 150 mM K₂SO₄.

Da der Photozyklus der Mutante D85N große Ähnlichkeit mit der zweiten Hälfte des Zyklus des Wildtyps besitzt, sind vermutlich auch die molekularen Ursachen ähnlich. Z.B. verläuft der Photozyklus des Wildtyps bei niedrigem pH überwiegend über das O-Intermediat, und bei hohem pH überwiegend über das N-Intermediat. Auch das elektrische Signal der Mutante D85N hat im ms-Zeitbereich große Ähnlichkeiten mit dem Spannungssignal von dem Wildtyp (Abb. 6.1). Die erste größere Komponente im elektrischen Signal der Mutante D85N um 1 ms ist vermutlich die Protonierung der Schiffischen Base von Asp-96, denn diese Komponente ist wie im Wildtyp pH-unabhängig. Die zweite ms-Komponente ist vermutlich die Reprotonierung der Asp-96 von der zytoplasmatischen Seite, denn diese Komponente wird pH-abhängig langsamer. Die letzte, in den elektrischen Messungen nur andeutungsweise in Anwesenheit von Azid beobachtete Komponente ist die Protonenabgabe von der Schiffischen Base ins extrazelluläre Medium. Die molekulare Ursache der umgekehrten Amplitude bei sehr hohem pH ist nicht klar, wurde jedoch ebenso bei E204Q bei hohem pH beobachtet. Dies ist möglicherweise die Deprotonierung einer Gruppe in der Nähe der zytoplasmatischen Oberfläche, nachdem die Schiffische Base protoniert wurde.

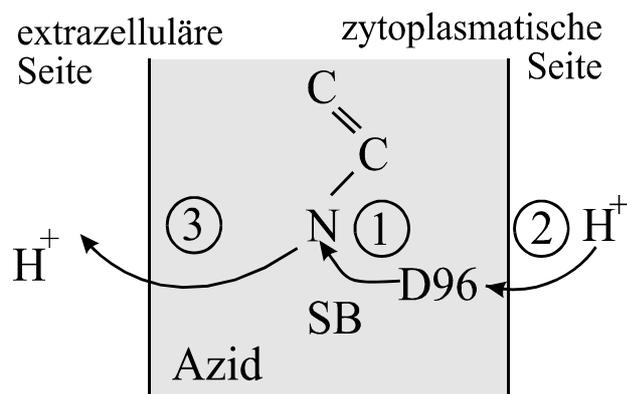


Abb. 6.6 Modellvorstellung über die molekularen Ursachen für das Spannungssignal nach Lichtanregung der gelben Form von D85N mit blauem Licht. Prozeß 1 und 2 sind ähnlich wie in dem Wildtyp, während Prozeß 3 gegenüber dem Wildtyp erst an letzter Stelle erfolgt, da der Akzeptor Asp-85 hier fehlt.

Neuere Röntgendiffraktionsmessungen (Brown et al., 1997) haben ergeben, daß in der Mutante D85N durch den Übergang von der Form bei niedrigem pH zu der Form bei hohem pH Strukturänderungen induziert werden können. Diese Änderungen sind dieselben wie die Unterschiede zwischen dem M-Intermediat und dem Grundzustand von dem Wildtyp. Dabei wurde ausgeschlossen, daß diese Strukturänderung durch die geänderte Isomerisierung hervorgerufen wird. Daher muß man davon ausgehen, daß bereits vor der Anregung mit blauem Licht der zytoplasmatische Kanal der Mutante geöffnet ist. Ähnlich wie bei der Photorückreaktion aus dem M-Intermediat wird in dieser Mutante durch Absorption von blauem Licht eine pK Erhöhung der Schiffischen Base induziert. In der Photorückreaktion von

M wird die Schiff'sche Base von der Seitengruppe Asp-85, die sich in der unmittelbaren Umgebung befindet, innerhalb von einigen 100 ns reprotoniert. Dieser naheliegende Donor steht in der Mutante D85N nicht zur Verfügung. Hier wird die Schiff'sche Base von dem internen Donor Asp-96 protoniert. Das äußert sich in einer größeren Spannungsamplitude (mit anderem Vorzeichen) und einer langsameren Zeit (1 ms) als bei der Photorückreaktion aus dem M-Intermediat. Mit der Deprotonierung von Asp-96 erhält man den N-artigen Zustand. Im Übergang zum O-artigen Zustand wird Asp-96 wieder von der zytoplasmatischen Seite reprotoniert. Dadurch wird eine stabile Konformation angenommen, so daß die Schiff'sche Base Zeit hat, in den extrazellulären Kanal zu deprotonieren. Dies kann offenbar einige Sekunden dauern. Da Azid diese Komponente beschleunigt, kann es vermutlich als Akzeptor auf der extrazellulären Seite wirken.

In der Arbeitsgruppe wurden ebenfalls Stopped Flow Experimente mit der Mutante D85N durchgeführt (Penz, 1996). Diese ergaben bei einem pH-Sprung von 6,5 nach 9,9, daß die Deprotonierung der Schiff'schen Base über den zytoplasmatischen Kanal erfolgt, und über zwei Prozesse im Zeitbereich von 100 ms bzw. 1 s abläuft. Da im Photozyklus der umgekehrte Weg zurückgelegt wird wie bei diesen Stopped Flow Experimenten, ist anzunehmen, daß im Photozyklus diese Raten als Rückreaktionen der Millisekunden Komponenten enthalten sind.