

5 Photoreaktionen der Intermediate von Bacteriorhodopsin

5.1 Die Photorückreaktion aus dem L-Intermediat

Aus dem elektrischen Doppelblitzexperiment Abb. 4.13 resultierte die Vermutung einer Photorückreaktion aus dem L-Intermediat. Um diese Vermutung zu untermauern, wurden wiederum optische Doppelblitzexperimente bei 532/580 nm durchgeführt. Dabei wurden bei 16 Wellenlängen zwischen 380 und 650 nm jeweils vier Zeitspuren gemessen:

1. Anregung durch den Nd:YAG-Laser alleine,
2. Doppelblitzanregung durch den Nd:YAG-Laser und den Farbstofflaser bei 580 nm in festem Zeitabstand von 10 μ s, wobei der Start der Datenaufnahme erst bei Einsetzen des zweiten Blitz erfolgt ($\Delta A_D(\lambda, t)$),
3. Anregung durch den Nd:YAG-Laser alleine, jedoch erfolgt die Datenaufnahme um 10 μ s verzögert ($\Delta A_Y(\lambda, t)$) und
4. Anregung durch den Farbstofflaser alleine ($\Delta A_F(\lambda, t)$).

Um ein qualitatives Bild des Photozyklus zu erlangen, wurde zunächst eine globale Anpassung der Einzelblitz Zeitspuren (1.) bei sämtlichen Wellenlängen mit 6 Exponentialfunktionen durchgeführt (siehe Materialien). Aus dem Ergebnis dieser Anpassung wurde ein Kontourplot der Absorptionsänderung erstellt (Abb. 5.1 links). Man erkennt das K-Intermediat im Zeitbereich 100 ns-1 μ s an der Absorptionszunahme (+) im langwelligen Bereich bei 630 nm. Das M-Intermediat im ms Zeitbereich ist am deutlichsten am Maximum bei 410 nm und am Minimum bei 570 nm zu erkennen. Außerdem erkennt man noch ein wenig O-Intermediat bei 10 ms an der kleinen Zunahme bei 650 nm. Die Intermediate L und N sind nicht als getrennte Maxima zu erkennen, weil ihre Spektren nicht sehr stark vom Grundzustand verschieden sind und diese immer nur im Gemisch mit anderen Intermediaten vorliegen.

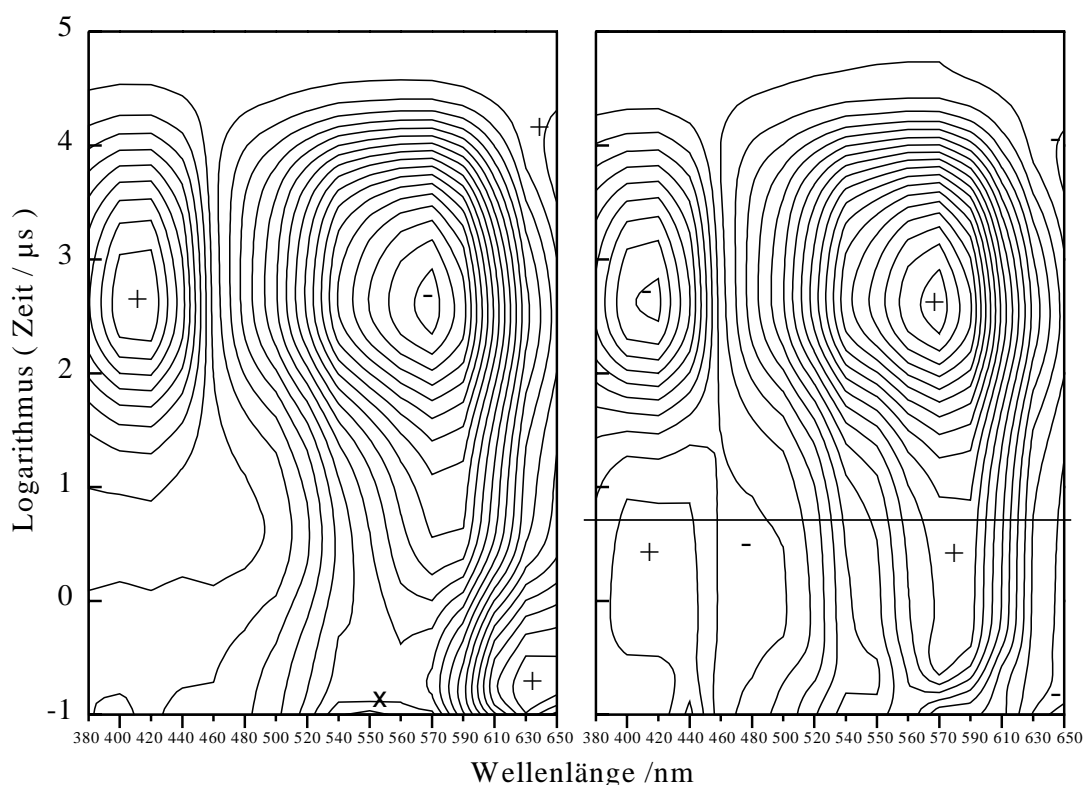


Abb. 5.1 Links: Kontourplot der Absorptionsänderung bei alleiniger Anregung durch den Nd:YAG-Laser. Rechts: Kontourplot der Absorptionsänderung nach der L→BR Photorückreaktion, entstanden aus der im Text beschriebenen Differenz $\Delta A_L(\lambda, t)$, die aus 3 Zeitspuren gemäß Gl. 5.1 gebildet wird. Die horizontale Linie kennzeichnet den Zeitpunkt 5 μs . Symbole +/-: Vorzeichen der Absorptionsänderung, x: Artefakt durch Streulicht des Lasers, $\Delta A=15$ (links) bzw. 4 (rechts) mOD/Höhenlinie. Die Wellenlängenskala ist nicht linear und wurde zur besseren Bestimmung des λ_{max} Wertes des L-Intermediats im Bereich um 550 nm expandiert. Bedingungen: Wildtyp-Gelprobe, pH 7,0; 150 mM KCl; 10 mM Trisma Base und 22°C.

Um die Absorptionsänderung, die bei den Doppelblitzexperimenten durch Anregung der Intermediate hervorgerufen wird, zu extrahieren, wurde aus den Zeitspuren (2.), (3.) und (4.) bei jeder Wellenlänge jeweils folgende Differenz gebildet:

$$\Delta A_L(\lambda, t) = \Delta A_D(\lambda, t) - \Delta A_Y(\lambda, t) - f_1 \Delta A_F(\lambda, t) \quad \text{Gl. 5.1}$$

Der Faktor f_1 , der die Anregung aus dem Grundzustand berücksichtigt, wurde aufgrund der Experimente in Abschnitt 4.1 und des hier erhaltenen Absorptionssignals bei 570 nm zu 0,62 abgeschätzt. Die Differenzsignale wurden dann derselben Anpassung wie für den ersten Blitz alleine unterworfen. Der daraus entstandene Kontourplot ist neben dem des ersten Blitzes alleine in Abb. 5.1 rechts dargestellt. Der ganze Zeitbereich nach 100 μs , indem die starke M-Absorptionsänderung und auch die schwache O-Absorptionsänderung liegt, ist der Absorptionsänderung durch den Nd:YAG-Laser alleine sehr ähnlich, jedoch ist das Vorzeichen der Absorptionsänderung entgegengesetzt. Das demonstriert genau das nach dem Theorieteil (Kapitel 3) erwartete Verhalten für eine Anfangsbedingung mit negativer Besetzung des L-Intermediats, die über negativ besetzte Folgezustände M und O zurück nach bR zerfällt. Im schnellen Zeitbereich bis 10 μs unterscheiden sich die beiden Kontourplots jedoch sehr. Zum einen fehlt im Signal der Photorückreaktion von L das K-Intermediat. Dafür gibt es einen Bereich um 1 μs , in dem die Absorptionsänderung nahezu konstant ist. Dieser

Zeitbereich direkt nach dem Streulichtartefakt, entspricht einer Anfangsbedingung mit einer negativen L-Besetzung, hervorgerufen durch eine schnelle Photoreaktion vom L-Intermediat zum bR-Grundzustand. Dieser Anfangszustand ändert sich nicht bis etwa 10 μs , um dann über eine negative M-Besetzung zu zerfallen. Die Absorptionsänderung auf diesem Zeitplateau entspricht genau dem bR-L Differenzspektrum, wenn diese Interpretation einer schnellen Photorückreaktion vom L-Intermediat richtig ist. Um dies zu testen, wurde ein Zeitpunkt am Ende des Plateaus bei 5 μs ausgewählt (horizontale Linie in Abb. 5.1 rechts) und die Absorptionsdifferenz über der Wellenlänge aufgetragen (Abb. 5.2 oben). Aus diesem bR-L Differenzspektrum kann dann Mithilfe des absoluten Absorptionsspektrums der bR-Probe das L-Spektrum erhalten werden. Dazu ist jedoch zu beachten, daß die dargestellte Differenz nur von dem Bruchteil der Moleküle herrührt, der zurückgeschossen wurde. Dieser Bruchteil läßt sich aus der späteren negativen M-Amplitude abschätzen, die 71 mOD bei 570 nm beträgt. Die M-Amplitude des Nd:YAG-Lasers beträgt 255 mOD bei 570 nm, so daß $71/255=28\%$ der angeregten Moleküle zurückgeschossen wurden. Da aber nur 38% der bR-Moleküle überhaupt vom ersten Blitz angeregt wurden, resultiert das Differenzsignal nur von $28\% \cdot 38\% = 10,6\%$ der gesamten Moleküle. Daher muß die Differenz aus Abb. 5.2 oben auf 100% hochskaliert werden und kann dann erst vom bR-Spektrum abgezogen werden. Das so erhaltene Spektrum ist unten in Abb. 5.2 gezeigt. Es besitzt nur etwa 71% der Amplitude des bR-Spektrums und das Maximum ist zu 550 nm hin verschoben. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit dem von anderen Arbeitsgruppen gefundenen L-Spektrum (Zimányi und Lanyi, 1993). Dadurch wird das Vorliegen einer schnellen Photorückreaktion aus dem L-Intermediat bestätigt. Andererseits bietet diese Methode eine unabhängige Möglichkeit zur Bestimmung des L-Spektrums, da die herkömmliche Bestimmung des L-Spektrums durch Analyse der Photozyklusdaten aufgrund der starken Überlappung mit dem Grundzustandsspektrum schwierig ist (Zimányi und Lanyi, 1993). Die Photorückreaktion des L-Intermediats selbst ist nicht zeitlich aufgelöst und liegt vermutlich im Zeitbereich kürzer als 100 ns. Jedoch scheint es bei der *cis-trans* Rückisomerisierung der Photorückreaktion von L kein stark rotverschobenes K-Intermediat, wie es in der Vorwärtsreaktion nach der *trans-cis* Isomerisierung von bR auftritt, zu geben. Untersuchungen der Photorückreaktion von L mit Gleichlichtmessungen (Balashov und Litvin, 1981) bei tiefer Temperatur zeigten jedoch ein K-Intermediat in der L-Photorückreaktion, dessen Spektrum jedoch nur 5 nm von dem des L-Intermediats verschoben ist, und daher in dieser zeitaufgelösten Messung schwer zu detektieren ist. Diese schwache Verschiebung des K-Intermediates, deutet auf eine veränderte Proteinumgebung bereits im L-Intermediat hin.

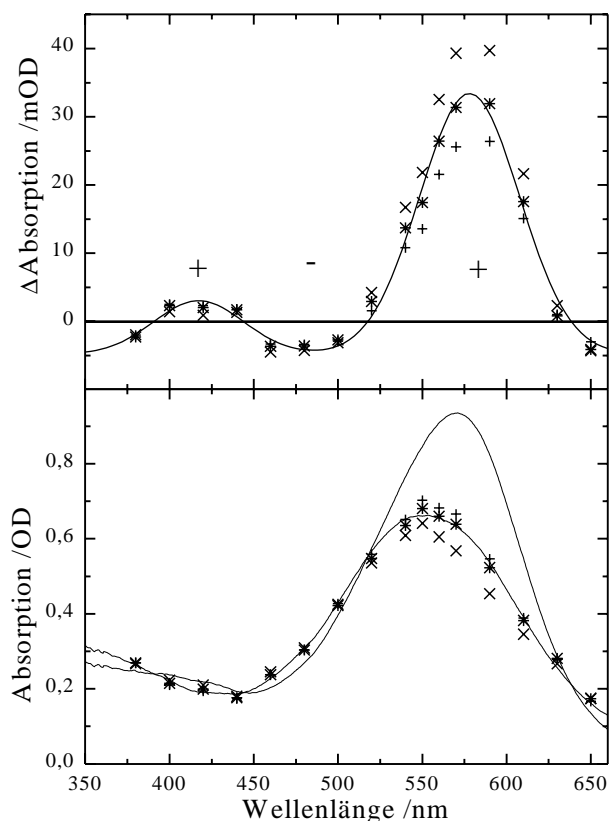


Abb. 5.2 Absorptionsdifferenz aus einem Schnitt durch Abb. 5.1 rechts bei 5 μ s nach dem zweiten Blitz (markiert durch die horizontale Linie in Abb. 5.1). Unter den im Text beschriebenen Annahmen stellt diese Differenz das bR-L Differenzspektrum dar. Zur Abschätzung des Fehlers wurde neben $f_1=0,62$ (*) die Auswertung mit $f_1=0,67$ (x) und mit $0,57$ (+) wiederholt. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung von einer Summe aus zwei Gauß-Kurven und einem Offset an die *-Werte. Diese Linie dient nur zur Augenführung.

bR-Spektrum derselben Probe wie in den zeitaufgelösten Messungen von Abb. 5.1, erhalten mit dem Spektralphotometer. Dazu das aus dem Differenzspektrum erhaltene L-Spektrum. Zur Differenzbildung werden im Text einige Annahmen gemacht. Die Symbole stellen wieder den Fehlerbereich aufgrund der Unsicherheit des Korrekturfaktors dar. Die durchgezogene Linie wurde aus der oben beschriebenen Anpassung an das Differenzspektrum erhalten.

Die Photorückreaktion des L-Intermediats muß bei Doppelblitzexperimenten, bei denen ein zweiter blauer Blitz die Photorückreaktion aus M initiiert, als Überlagerung berücksichtigt werden, da das blaue Licht prinzipiell auch das L-Intermediat anregen kann. Jedoch sieht man an dem Differenzspektrum Abb. 5.2 oben, daß man bei einer Wahl der Meßlichtwellenlänge von 400 nm für die Untersuchung der M-bR Photorückreaktion, die L-bR Rückreaktion vernachlässigen kann.

5.2 Die Photorückreaktion aus dem M-Intermediat

Zur Untersuchung des Differenzspektrums der Photorückreaktion aus dem M-Intermediat wird zunächst genauso vorgegangen wie im vorhergehenden Abschnitt 5.1 bei der Photorückreaktion aus dem L-Intermediat. Um die M-bR Photorückreaktion anzuregen, wurde der Farbstofflaser mit Stilben 3 bei einer Wellenlänge von 420 nm betrieben. Um ein maximales Signal dieser Photorückreaktion zu erhalten, wurde ein konstanter Zeitabstand von 500 μ s gewählt, bei dem die M-Besetzung maximal ist. Mit dieser Einstellung wurden bei 15 Wellenlängen zwischen 380 nm und 650 nm wieder jeweils die vier in Abschnitt 5.1 beschriebenen Zeitspuren (1.)-(4.) gemessen. Aus den Zeitspuren des Nd:YAG-Lasers erhält man wieder den Photozyklus, der in Abb. 5.3 links als Kontourplot zu sehen ist. Aus den anderen drei Zeitspuren wird die Differenz $\Delta A_M(\lambda, t)$ analog zu Gl. 5.1 gebildet, die die Absorptionsänderung alleine durch Anregung der Intermediate durch den blauen Blitz aus der Doppelblitzzeitspur herausextrahiert. Bei dieser Meßreihe wurde aus dem Absorptionssignal bei 570 nm f_1 zu 0,64 abgeschätzt. Auf die Darstellung der Absorptionsänderung von dem blauen Blitz alleine (4.) wurde hier verzichtet, da bis auf einen Amplitudenfaktor dasselbe Bild erhalten wird wie mit dem Nd:YAG-Laser (1.). Das bedeutet, daß eigentlich die Meßreihe beschränkt werden könnte auf die Messung von 3 Zeitspuren, und daß die Zeitspur des blauen Lasers alleine (4.) mit einem Amplitudenfaktor aus Zeitspur (1.) erhalten werden könnte. Da aber nicht auszuschließen ist, daß bei Anregung einer höheren Bande des Grundzustandes mit dem blauen Laserblitz und bei anderen experimentellen Bedingungen

durchaus Abweichungen auftreten könnten, wurde trotzdem Zeitspur (4.) immer mit aufgezeichnet.

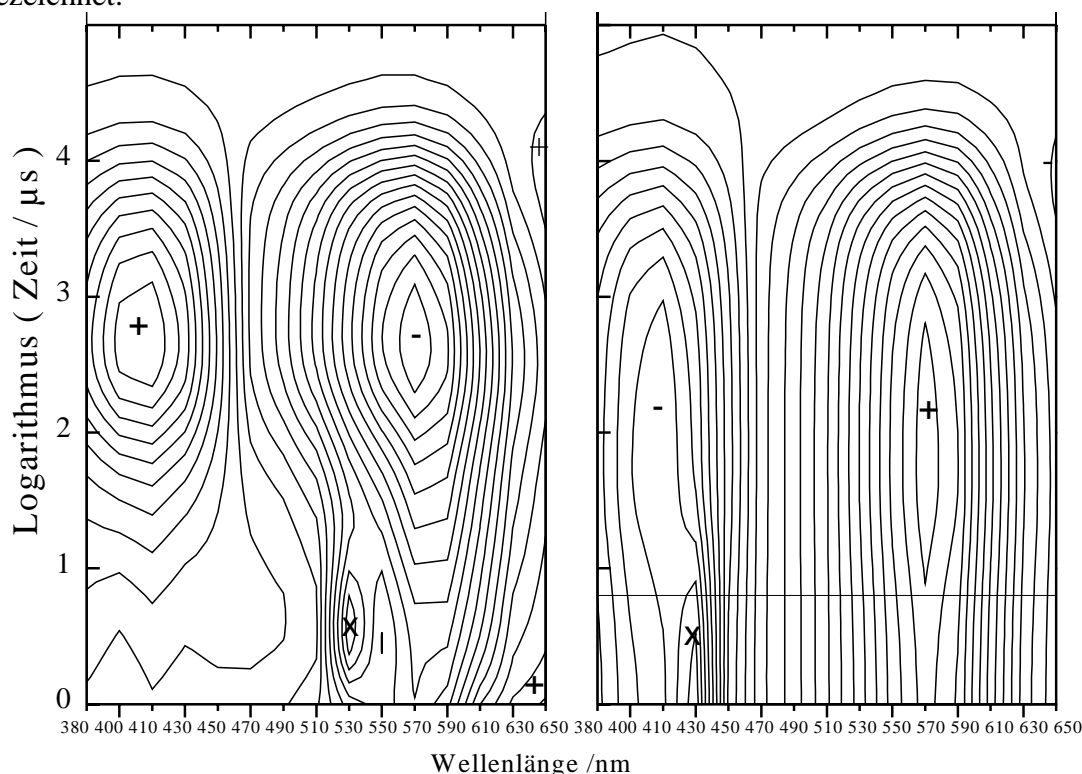


Abb. 5.3 Links: Absorptionsänderung des Photozyklus nach der Anregung durch den Nd:YAG-Laser. Rechts: Kontourplot der Absorptionsänderung $\Delta A_M(\lambda, t)$ (entsprechend Gl. 5.1) nach der M-bR Photoreaktion, die durch den blauen Blitz angeregt wird. Die horizontale Linie bei $5 \mu\text{s}$ markiert den Schnitt durch $\Delta A_M(\lambda, t)$, der zur Berechnung des M-bR Differenzspektrums verwendet wird. $\Delta A = 15 \text{ mOD/Höhenlinie}$ links und 8 mOD/Höhenlinie rechts. Die Wellenlängenskala ist nicht linear, im Bereich des M-Absorptionsmaximum wurde bei 400 nm und 410 nm gemessen. Symbole und experimentelle Bedingungen wie in Abb. 5.1.

Betrachtet man hier den Kontourplot der Absorptionsänderung durch Anregung der Intermediate (hier hauptsächlich M) durch den blauen Blitz, so erhält man einen Plot ohne besondere Merkmale. Wie in der Photoreaktion aus L erkennt man das starke Absorptionsmaximum zwischen $100 \mu\text{s}$ und 1 ms mit entgegengesetztem Vorzeichen wie im entsprechenden Plot mit dem Nd:YAG-Laser alleine. Außerdem ist im Langwelligen die schwache Absorptionsänderung des O-Intermediats mit umgekehrtem Vorzeichen wie im Plot daneben zu erkennen. Diese beiden Merkmale umgekehrter Absorptionsänderung zeigen wieder, daß es sich um eine Photoreaktion, also die Erzeugung einer negativen Besetzung handelt. Anders als im vorhergehenden Abschnitt 5.1 findet hier diese Photoreaktion erst im M-Intermediat statt, daher sieht man überwiegend nur noch die langsamen M-Zerfallskomponenten im Signal, die dem Zerfall einer negativen M-Besetzung entsprechen. Außerdem scheint auch diese Photoreaktion sehr schnell zu erfolgen, da diese Differenz direkt (also zum ersten experimentell möglichen Meßpunkt mit der Halogenlampe) nach dem blauen Blitz bereits zu bestehen scheint, und im Bereich von $1 \mu\text{s}$ - 1 ms nur sehr wenig (1 Höhenlinie) Absorptionsänderung zu beobachten ist. Nimmt man wieder an, daß zu diesem Zeitpunkt die zurückgeschossenen Moleküle sich bereits im Grundzustand befinden, so entspricht der Schnitt durch die Absorption direkt nach dem Blitz bei $5 \mu\text{s}$ (der ersten gut auswertbaren Zeit), der durch die Photoreaktion der Intermediate erzeugten Absorptionsdifferenz zu bR. Dies ist in Abb. 5.4 oben dargestellt. Aus dem Maximum des negativen M Signals von 115 mOD in der Zeitspur bei 570 nm und dem Signal des Nd:YAG-Lasers alleine von 241 mOD läßt sich der Anteil der zurückgeschossenen Moleküle zu 48% der vom ersten

Blitz angeregten Moleküle abschätzen. Zusammen mit der Anregung des ersten Blitzes von 36% läßt sich abschätzen, daß die Absorptionsdifferenz von $36\% \cdot 48\% = 18\%$ der gesamten Moleküle herrührt. Mit dem absoluten Spektrum von bR läßt sich dann wieder das Spektrum des Intermediats bestimmen, von dem aus die Photorückreaktion stattgefunden hat. Diese ist in Abb. 5.4 unten dargestellt.

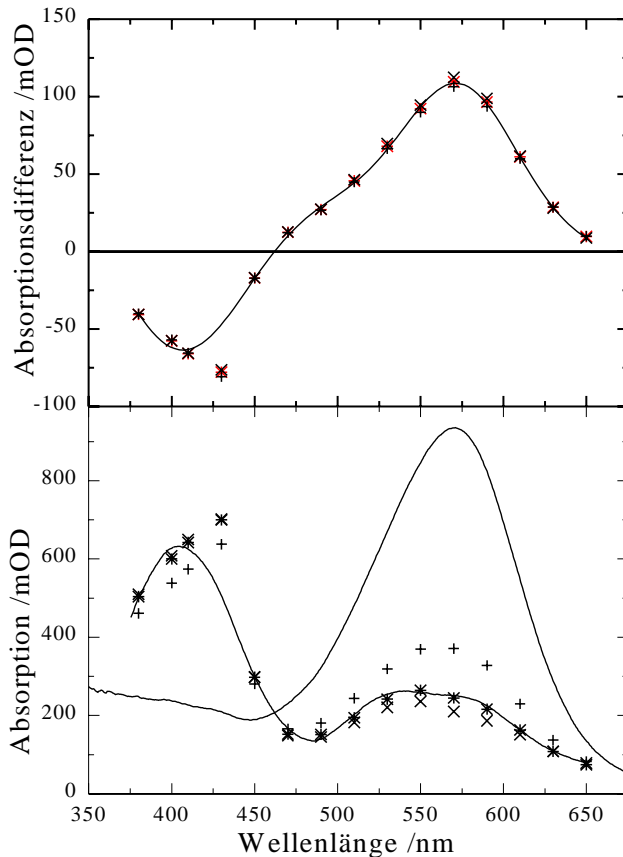


Abb. 5.4 Oben: Absorptionsdifferenz durch Photoreaktion der Intermediate entstanden aus einem Schnitt durch Abb. 5.3 rechts bei 5 μ s. Die drei Symbole entsprechen einer Auswertung mit drei verschiedenen Werten für f_1 *:0,64; +:0,69; x:0,59, zur Abschätzung des Fehlers. Der Ausreißer bei 430 nm entsteht durch Streulicht, daß sich bei dieser kurzen Wellenlänge sogar bis 5 μ s nach dem Blitz auswirkt. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung an die *-Werte (außer dem Wert bei 430 nm) mit einer Summe von zwei Gauß-Funktionen, einem Offset und einem linearen Anstieg.

Unten: Absorptionsspektrum der bR-Probe und das aus der Differenz oben erhaltene Spektrum des Ausgangszustandes der Photoreaktion. Obwohl die Differenzen oben für die drei f_1 Faktoren sehr dicht liegen, entsteht durch die unterschiedliche Wichtung der Differenz eine recht große Unsicherheit im Bereich von 550 nm. Die durchgezogene Linie resultiert aus der oben beschriebenen Anpassung.

Mehrere Möglichkeiten müssen zur Erklärung des Spektrums und der kleinen Absorptionsänderung im Bereich 1 μ s-100 μ s des Differenzkontourplots (Abb. 5.3 links) betrachtet werden: Entweder sind Photoreaktionen aus L oder N überlagert, oder die Photorückreaktion von M führt zunächst nur in einen bR ähnlichen Zustand bR', oder das M-Intermediat hat ein atypisches Spektrum mit einer Bande bei 550 nm. Die Photoreaktion aus L führt sehr schnell in den Grundzustand, so daß eine zusätzliche negative M-Besetzung mit etwa der Zeit des L-M Übergangs erfolgen sollte. Diese Erklärung ist gut mit der leichten Absorptionsänderung im Differenzsignal im μ s Zeitbereich verträglich.

Die N-Photoreaktion kann ausgeschlossen werden, da zum einen N unter diesen experimentellen Bedingungen wenig besetzt ist, und außerdem ein anderes Vorzeichen der Absorptionsänderung in dieser Differenz zeigen würde, denn bei der Photoreaktion aus N wird ein M-artiger Zustand gebildet (s.u.) und würde deshalb im Differenzsignal mit einer Absorptionzunahme im kurzwelligen Bereich beitragen.

Nicht vollständig ausgeschlossen kann eine langsamere Komponente in der M-bR Photorückreaktion werden, etwa bR' \rightarrow bR. Dagegen spricht jedoch, daß die kleine Änderung im Bereich 1 μ s-10 μ s bei 400 nm zu der bei 570 nm entgegengesetzt ist, während man bei einer bR' \rightarrow bR Reaktion allein eine Änderung im 570 nm Bereich erwarten würde. Außerdem wird für bR' ein leicht blauverschobenes Absorptionsmaximum von 550 nm beobachtet (Fig.1 in Kalisky et al., 1978), so daß man bei der Konstruktion des Spektrums eher eine negative Bande bei dieser Wellenlänge erwartet hätte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß vermutlich bei jedem Photorückreaktionssignal aus M noch ein kleiner Beitrag aus der L-Photorückreaktion steckt. Das ist auch eine Erklärung für die Abweichung in der Bestimmung der Anregung aus dem Absorptionssignal bei 570 nm und der in Abschnitt 4.1 beschriebenen Doppelblitzmethode, denn wenn während des Zeitbereichs des M-Intermediats noch ein Teil der Moleküle im L-Intermediat verbleibt, so wird die Anregung im Absorptionssignal bei 570 nm zu gering abgeschätzt.

Wählt man die Meßlichtwellenlänge jedoch so, daß die L-bR Differenz verschwindet (etwa bei 400 nm), so erscheint der Beitrag der L-bR Photorückreaktion aber erst mit der Zeitkonstante des L-M Übergangs von 10 μ s. Daher kann man im Zeitbereich kleiner als 10 μ s und einer Meßlichtwellenlänge von 400 nm die Photorückreaktion aus M vollkommen getrennt von der Photorückreaktion aus L untersuchen.

5.3 Zeitaufgelöste Messungen der M-bR Photorückreaktion

5.3.1 Optische Messungen

Mit der für Absorptionsänderungen üblichen 100 W Halogenlampe als Meßlicht ist es leider nicht möglich, die Photorückreaktion des M-Intermediats zeitlich aufzulösen, weil der überlagerte Artefakt vom Streulicht des Laserblitzes nicht vollständig vom Monochromator unterdrückt wird (siehe Abb. 5.3). Daher wurde zur zeitlichen Auflösung der Photorückreaktion als Meßlicht die 406 nm Linie einer Quecksilber Bogenlampe verwendet. Außerdem wurde der Farbstofflaser mit Stilben 3 bei einer Wellenlänge von 420 nm benutzt, so daß sowohl das Streulicht als auch das entstehende Fluoreszenzlicht, von längerer Wellenlänge als das Meßlicht sind und dadurch besser vom Monochromator abgeblockt werden. Das übrige starke Streulicht des Blitzes, welches mit dem Monochromator nicht vollständig zu unterdrücken ist, ist nun gegenüber der hohen Intensität des Meßlichtes vernachlässigbar. Bevor die zeitaufgelösten Experimente zur M-Photorückreaktion gezeigt werden, sei zunächst noch ein weiteres Kontrollexperiment diskutiert.

Wie bereits mehrfach erläutert, liegt zur Zeit des zweiten Blitzes ein Gemisch von M Zustand, anderen Intermediaten und Grundzustand vor. Da der blaue Blitz grundsätzlich alle Intermediate anregen kann, müssen prinzipiell Photoreaktionen von allen Intermediaten in Erwägung gezogen werden.

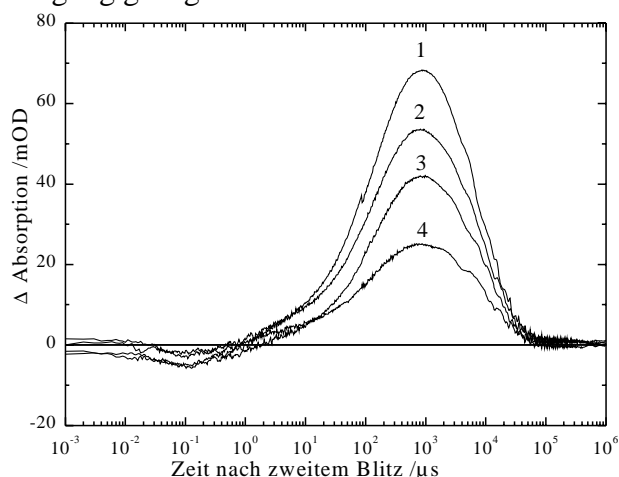


Abb. 5.5 Kontrollexperiment mit der Hg-Bogenlampe als Meßlicht und dem Farbstofflaser bei 580 nm als zweiten Blitz. Obere Zeitspur (1): Anregung durch den Farbstofflaser (580 nm) alleine. Darunter Differenzzeitspuren aus 532/580 nm Doppelblitzexperiment und dem Einzelblitzexperiment (Nd:YAG Laser, 532 nm) bei verzögerter Datenaufnahme. Dabei wurden $\Delta t = 5 \mu$ s (4), 500 μ s (3) und 20 ms (2) zwischen dem 532 nm und 580 nm Blitz gewählt. Die Schwankungen im langsamen Zeitbereich werden durch Instabilitäten der Bogenlampe verursacht.

Um den Beitrag der Photoreaktionen von den anderen Intermediaten abzuschätzen, wurden Kontrollexperimente mit einem zweiten Blitz bei 580 nm durchgeführt bei der die M-Rückreaktion nicht stattfindet, wohl aber alle anderen Intermediate angeregt werden können. Dieses Kontrollexperiment (Abb. 5.5) wurde bei der Wellenlänge der Bogenlampe (406 nm) durchgeführt, um hier dieselbe hohe Zeitauflösung wie bei den späteren M-Rückschußexperimenten zu erhalten. Dazu wurde die einfache Differenz aus dem Doppelblitzsignal

(532/580 nm) und dem verzögerten Einzelblitzsignal (532 nm) gebildet. Nach dem Theorieteil beinhaltet diese einfache Differenz sowohl die Anregung aus dem Grundzustand, als auch die der Intermediate. Man sieht, daß im schnellen Zeitbereich bis 1 μ s sowohl die Zeitspuren der Kontrollexperimente bei verschiedenen Zeitabständen, als auch die Zeitspur des 580 nm Blitz alleine, nur eine geringe Absorptionsänderung überhaupt besitzen, und diese qualitativ sehr ähnlich sind. Diese kleine Amplitude rührt von dem K-Intermediat her, das bei 406 nm eine leicht geringere Absorption besitzt als bR. Bei den Kontrollexperimenten ist diese Amplitude leicht reduziert, da weniger bR zur Anregung vorliegt. Ein Beitrag von Photoreaktionen der Intermediate (L,N,O) ist bei diesen Kontrollexperimenten in dem Zeitbereich kleiner 1 μ s nicht sichtbar, da sich die Absorption dieser Intermediate und ihrer möglichen primären Photoprodukte bei 406 nm offenbar nicht unterscheiden. Z.B. wurde oben gezeigt, daß bei $\Delta t=5 \mu$ s eine schnelle Photoreaktion von L \rightarrow bR stattfindet, aber bei 406 nm L und bR gleiche Absorption haben, und deshalb die L-Photoreaktion bei dieser Wellenlänge nicht sichtbar ist. Die Rückreaktion von L ist bei dieser Wellenlänge erst im Zeitbereich der Folgeintermediate von L sichtbar, dann ist jedoch die M-Rückreaktion bereits abgeschlossen. (Dies erkennt man daran, daß das Verhältnis der M-Amplitude im 1-50 μ s Bereich zur Amplitude im 50-1000 μ s Bereich beim 580 nm Einzelblitz etwa 1:4 beträgt, in der Differenz Doppelblitz - Einzelblitzzeitspur bei 5 μ s beträgt das Verhältnis jedoch nur noch 1:1.)

Aus dieser Argumentation ergibt sich das Signal der M-Rückreaktion $\Delta A_M(t)$ unabhängig vom Zeitabstand der beiden Blitze, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben (jedoch wurde dort vorausgesetzt, daß neben bR nur M vorliegt), einfach aus:

$$\Delta A_M(t) = \Delta A_d(t) - \Delta A_1(t) - f_1 \Delta A_2(t) \quad \text{Gl. 5.2}$$

Dabei ist $\Delta A_d(t)$ wieder die Zeitspur des Doppelblitzexperiments, $\Delta A_1(t)$ die Zeitspur des ersten Blitzes und $f_1 \Delta A_2(t)$ die Zeitspur des zweiten Blitzes alleine, skaliert mit f_1 der Menge Grundzustand, die nach dem ersten Blitz noch bleibt. Nach den Messungen in Kapitel 4.1 für die Anregungsstärke ist dieser Faktor typischerweise 0,6-0,75 und über einen großen Bereich von Zeitabständen konstant. Da die vom ersten Blitz angeregten Moleküle nach etwa 10 ms wieder in den Grundzustand zerfallen, wächst der Faktor f_1 bei Zeitabständen größer 10 ms auf eins an. In der Praxis wird f_1 jedoch nicht durch eine separate Messung der Anregungsstärke bestimmt, da der Justieraufwand zu groß ist, sondern durch eine Abschätzung aus der Amplitude des Signals des ersten Blitzes. Auf eine hohe Genauigkeit bei der Bestimmung des Faktors kommt es hier nicht an, da aus Abb. 5.5 ersichtlich ist, daß es sich im Bereich kleiner 1 μ s nur um kleine Korrekturen handelt.

Die Konstruktion des Signals nach Gl. 5.2 zeigt Abb. 5.6 für einen Zeitabstand von 500 μ s. In Teilbild C sieht man als Ergebnis dieser Konstruktion die Zeitspur für die Rückreaktion, die offenbar innerhalb von einigen hundert Nanosekunden erfolgt. Im Bereich von 1 μ s-1 ms bleibt das Signal ungefähr konstant, denn nach 1 μ s ist die Rückreaktion bereits beendet. Danach zerfällt die negative M Besetzung innerhalb einiger ms, wie nach dem Theorieteil erwartet.

Im Teilbild D ist der schnelle Teil der Zeitspur noch einmal vergrößert gezeigt. Eine Anpassung mit einer einzigen Exponentialfunktion von 315 ns (a_1) zeigt systematische Abweichungen, während die Anpassung mit einer Summe von zwei Exponentialfunktionen von 70 ns (a_1 32%) und 480 ns (a_2 68%) eine deutliche Verbesserung liefert. Bei einer Verstärkeranstiegszeit von 20 ns (Abschnitt 2.8) erwartet man eine zusätzliche Komponente mit dieser Anstiegszeitkonstante, die etwa -20% der a_1 Komponente ausmachen sollte. Diese Komponente konnte aufgrund des Signal/Rauschverhältnisses nicht getrennt aufgelöst werden und ist immer in der (a_1, τ_1) Komponente enthalten. Daher ist die Zeitkonstante τ_1 zu etwas kürzeren Zeitkonstanten zu korrigieren (maximal 10%). Da diese Korrektur in der Größe der Reproduzierbarkeit der Zeitkonstanten in diesem Zeitbereich ist, wurde im folgenden auf eine Korrektur verzichtet.

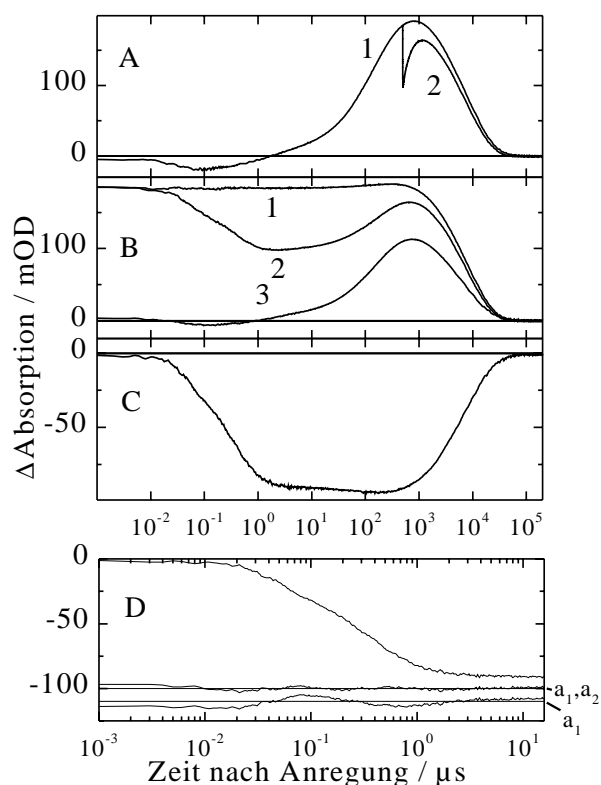


Abb. 5.6 Zeitaufgelöste Absorptionsänderung bei 406 nm nach Einzelblitzanregung (532 nm) oder Doppelblitzanregung (532/420 nm). (A) Kinetik von M-Aufbau und M-Zerfall bei Anregung durch den 532 nm Blitz alleine (Zeitspur 1) und bei Doppelblitzanregung, wobei der zweite blaue Blitz 500 μ s nach dem grünen einsetzt. (B) Dieselben Zeitspuren (1) und (2) aus dem oberen Teilbild, jedoch wurde die logarithmische Datenaufnahme auf Einsetzen des zweiten Blitzes gestartet. Das erlaubt es, die schnelle Photorückreaktion von M aufzulösen. Zeitspur (3) ist das M-Signal, bei Anregung nur durch den blauen Blitz. (C) Signal der Photorückreaktion von M nach Korrektur für die Anregung des Grundzustandes nach Gl. 5.2 mit $f_1=0,6$. (D) Der schnelle Anstiegsteil von (C) auf einer expandierten Zeitskala und darunter die Abweichungen einer Anpassung mit einer Exponentialfunktion (315 ns a_1) oder mit zweien (70 ns, 32%, a_1 ; 480 ns, 68%, a_2). Bedingungen: 150 mM KCl; pH 7,0; 15°C.

Dieses Experiment wurde mit Zeitabständen variierend von 10 μ s bis 20 ms zwischen grünem und blauem Blitz durchgeführt, um den ganzen Zeitbereich in dem das M-Intermediat existiert zu untersuchen. Abb. 5.7 zeigt für jeden Zeitabstand die zwei Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 die für eine Anpassung mit 2 Exponentialfunktionen benötigt werden. Man erkennt, daß diese nahezu unabhängig von dem Zeitabstand sind. Im unteren Teilbild sind die zugehörigen Amplituden a_1 und a_2 abgebildet. Für jeden Zeitabstand sind beide Amplituden ungleich Null, aber das relative Verhältnis zwischen den beiden ändert sich mit dem Zeitabstand. Für kurze Zeitabstände überwiegt die schnelle a_1 Komponente, während für längere Zeitabstände die a_2 Komponente überwiegt. Der Kreuzungspunkt der beiden Komponenten liegt bei 200 μ s. Die Summe der beiden Komponenten ist wie erwartet etwa proportional zur Absorptionsänderung $\Delta A(t)$, da $\Delta A(t)$ die M-Besetzung des ersten Blitzes widerspiegelt.

Da die beiden Zeitkonstanten nahezu unabhängig vom Zeitabstand zu sein scheinen, liegt es nahe eine globale Anpassung über die Zeitspuren bei allen Zeitabständen durchzuführen. Dies wurde mit dem im Abschnitt 2.9 beschriebenen Programm „mupw7“ durchgeführt und liefert zwei Zeitkonstanten von 120 ns und 630 ns. Diese Werte sind gestrichelt im oberen Teilbild eingezeichnet und können gut als mittlerer Wert der Zeitkonstanten der Einzelanpassungen angesehen werden. Die sich aus dieser globalen Anpassung ergebenden Amplituden a_1 und a_2 , sind praktisch nicht von denen der Einzelanpassungen zu unterscheiden und wurden deshalb nicht gesondert eingezeichnet.

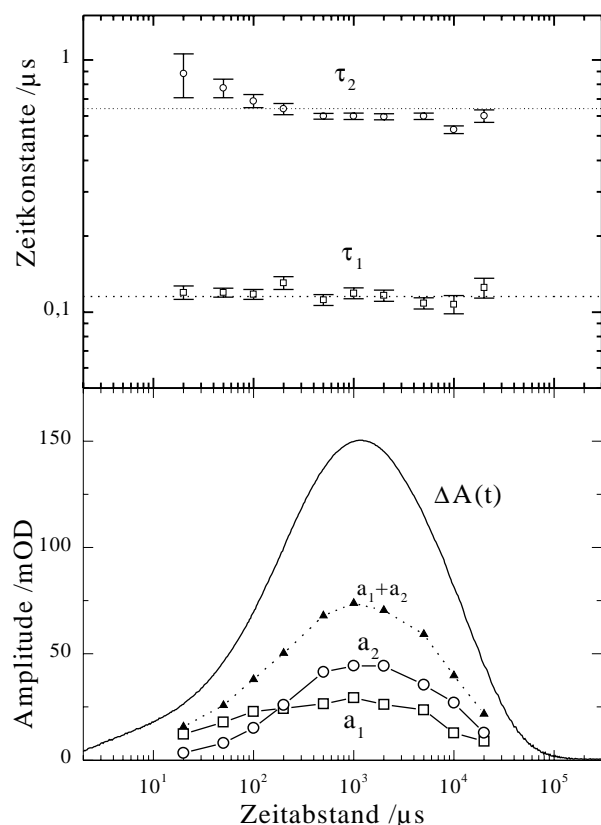


Abb. 5.7 Oberes Teilbild: Abhängigkeit der zwei Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 der M-Photorückreaktion vom Zeitabstand der beiden Blitze. Die gestrichelten Linien sind das Ergebnis einer globalen Anpassung bei sämtlichen Zeitabständen, die Zeitkonstanten von 120 ns und 630 ns ergaben.

Unteres Teilbild: Abhängigkeit der dazugehörigen Amplituden a_1 und a_2 vom Zeitabstand. Außerdem ist die Absorptionsänderung $\Delta A(t)$ bei 406 nm gezeigt, welche die Kinetik der M-Bevölkerung mißt, die durch den ersten Blitz angeregt wurde. Die Summe der beiden Amplituden a_1 und a_2 ist näherungsweise proportional der M-Bevölkerung. Im unteren Teilbild sind die Fehler in der Größenordnung der verwendeten Symbole.

Bedingungen: Wildtyp in 10% Polyacrylamidgel bei pH 7,5, 12°C, 150 mM KCl, $f_1=0,65$; außer bei 20 ms $f_1=0,75$.

In einer weiteren Meßreihe wurde die pH-Abhängigkeit der M-Rückreaktion über den Bereich von 3 bis 12 untersucht (Abb. 5.8). Bei dieser Meßreihe wurde der Zeitabstand zwischen grünem und blauem Blitz bei 500 μs festgehalten, da hier bei allen pH-Werten der M-Zustand am stärksten besetzt ist. Bei den Einzelanpassungen schwankt die Zeitkonstante τ_2 etwas im Bereich niedriger pH-Werte, das aber aufgrund der geringen zugehörigen Amplitude a_2 nicht signifikant ist. Eine Analyse mit dem globalen Anpassungsprogramm ergibt zwei Zeitkonstanten von 90 ns und 510 ns. Das daraus erhaltene Amplitudenverhalten von a_1 und a_2 zeigt deutlich weniger Streuung als die Amplituden der Einzelanpassungen. Diese Amplituden implizieren bei wachsendem pH-Wert, mit einem pK von 6,0, einen Übergang von einer nahezu reinen schnellen a_1 Komponente zu einem 2:1 Gemisch aus a_2 und a_1 Komponente.

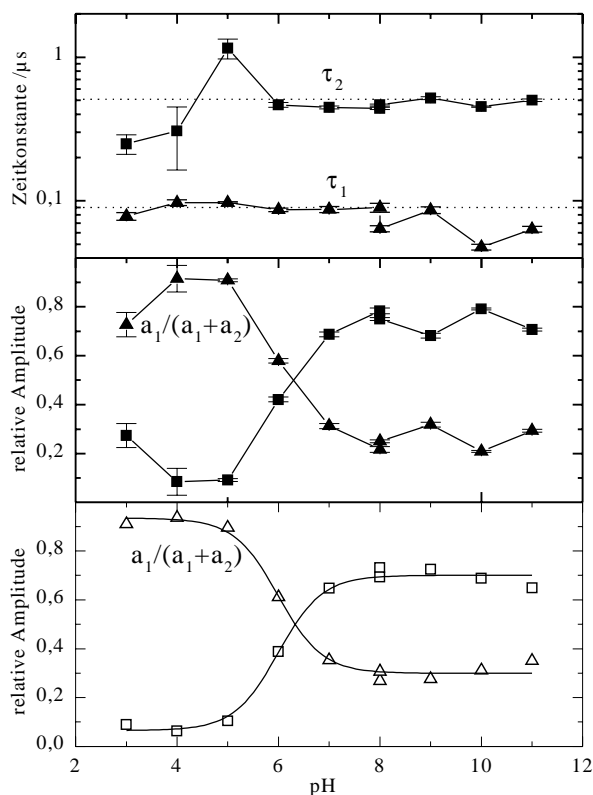


Abb. 5.8 pH-Abhängigkeit der Photorückreaktion aus M: Oberes und mittleres Teilbild: Die beiden Zeitkonstanten und Amplituden einer Analyse der Photorückreaktion von M mit Einzelanpassungen. \blacktriangle , \blacksquare : Parameter des schnellen (a_1 , τ_1), bzw. des langsamen Prozesses (a_2 , τ_2). Die Zeitkonstanten 90 ns und 510 ns der globalen Anpassung sind im oberen Teilbild als gepunktete Linien eingezeichnet.

Da die M-Amplitude über dem pH leicht variiert, wurden statt der absoluten Amplituden die relativen Amplituden betrachtet. Bei pH 8 sind zwei Datenpunkte, da die Titration mit zwei Proben durchgeführt wurde, eine von pH 8 aufwärts, die andere abwärts.

Unteres Teilbild: Analyse derselben Daten mit einem globalen Fit mit 90 ns und 510 ns. Der a_1 Anteil (Δ) nimmt von 93% zu 30% mit einem pK von 6,0 ab. Entsprechend wächst der a_2 Anteil (\square) nur auf maximal 70% an. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung mit einer Henderson-Hasselbalch Gleichung.

Bedingungen: 150 mM KCl; 12°C; $f_1=0,65$; $\Delta t=500 \mu s$.

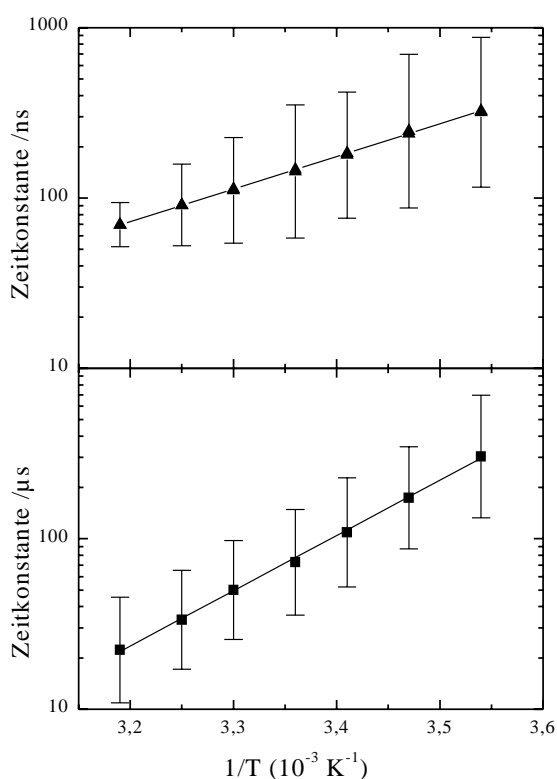


Abb. 5.9 Arrhenius-Plot für die Kinetik der Rückreaktion aus M (oberes Teilbild) im Vergleich zum L-M Übergang (unteres Teilbild). Beide Prozesse wurden mit nur einer Gauß-verteilten Kinetik angepaßt, die angegebenen Balken entsprechen den Breiten dieser Verteilungen. Die Temperatur wurde von 10°C bis 40°C variiert. Aus der Steigung erhält man Aktivierungsenergien von 37 ± 1 kJ/mol für die M-Rückreaktion und 62 ± 1 kJ/mol für den L-M Übergang. Bedingungen: $f_1 = 0,6$, $\Delta t=500 \mu s$, 150 mM KCl, pH 8.

Die Temperaturabhängigkeit der M-Rückreaktion wurde in einer Meßreihe zwischen 10°C und 40°C untersucht (Abb. 5.9). Bei einer Anpassung der Zeitspuren dieser Temperaturreihe mit zwei Exponentialfunktionen ergab sich das Problem, daß bei hoher Temperatur die beiden Zeitkonstanten aufgrund der begrenzten Zeitauflösung nicht mehr so deutlich getrennt sichtbar waren. Die Auftragung der beiden Zeitkonstanten gegen die Temperatur ergab eine schlechte Systematik, so daß die Zuordnung der beiden erhaltenen Zeitkonstanten schwierig

wird. Daher wurde bei dieser Temperaturreihe nur eine einzige Gauß-verteilte Kinetik zur Auswertung der Photorückreaktion gewählt. Die nicht ausreichende Zeitauflösung zeigt sich in der geringeren Breite der verteilten Kinetik bei höherer Temperatur, der Arrhenius-Plot bleibt jedoch linear. Aus der Steigung wurde eine Aktivierungsenergie von 37 kJ/mol für die M-Rückreaktion erhalten. Mit derselben Meßreihe konnte die Aktivierungsenergie für den M-Anstieg im Photozyklus zu 62 kJ/mol bestimmt werden, dabei wurde zur einfachen Charakterisierung ebenfalls nur eine Gauß-verteilte Kinetik benutzt.

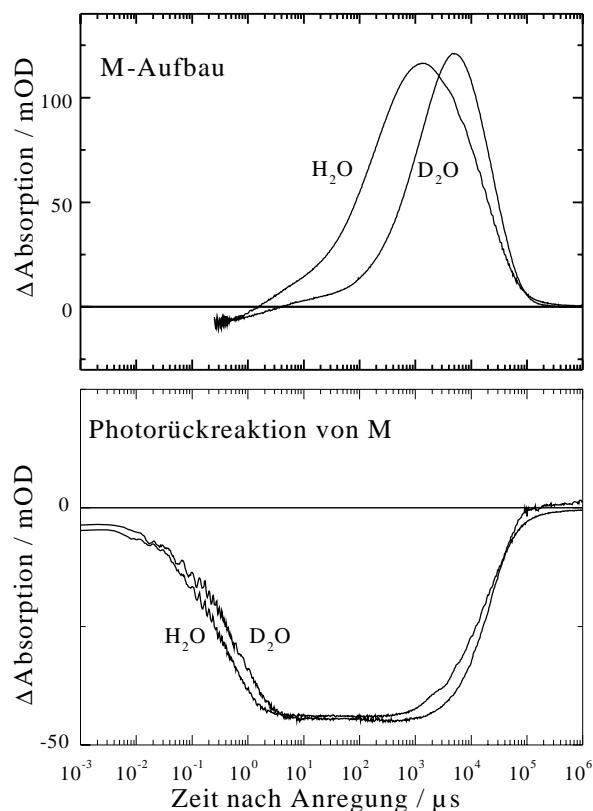


Abb. 5.10 $^1\text{H}/^2\text{H}$ Isotopeneffekt auf die Aufbau- und Zerfallskinetik von M (oberes Teilbild), beobachtet durch die Absorptionsänderung bei 406 nm. Im Vergleich dazu der Isotopeneffekt auf die Photorückreaktion von M (unteres Teilbild). Die Zeitspuren wurden mit $f_1=0,57$ und $f_1=0,55$ für H_2O bzw. D_2O erhalten. Dabei waren die Zeitabstände 1 ms und 2 ms. Bedingungen: pH 7 und pD 7, 150 mM KCl, 10°C .

Der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Isotopeneffekt auf die Kinetik der Photorückreaktion aus dem M-Intermediat wird in Abb. 5.10 mit dem entsprechenden Effekt auf die Bildung von M verglichen. Man sieht hier, daß der Effekt auf die Bildung von M deutlich größer ist als bei der Photorückreaktion aus M. Da die Kinetiken für den Aufbau von M und die Rückreaktion von M mehrphasig sind, wurde zur groben quantitativen Abschätzung wieder jeweils eine Gauß-verteilte Kinetik zur Anpassung dieser Prozesse benutzt. Dadurch trägt der Teilprozeß mit der größten Amplitude zur Lage des Maximums der Gauß-Verteilung am stärksten bei. Für das Verhältnis der Maxima der beiden Gauß-Verteilungen wurde bei dem Aufbau von M $\tau_D/\tau_H=6,8$ gefunden, während sich bei der M-Rückreaktion nur $\tau_D/\tau_H=1,7$ ergab.

5.3.2 Elektrische Messungen

Wie bei den optischen Experimenten zur Untersuchung der Photorückreaktion von M soll auch hier mit der Betrachtung von Kontrollexperimenten mit Anregung durch den Farbstofflaser bei 580 nm als zweitem Blitz begonnen werden. Solche Experimente wurden bereits im Kapitel 4 bei der Untersuchung der Anregungsstärke und der Effekte der Aufladung der Membran vorgestellt (siehe Abb. 4.9, Abb. 4.12 und zugehörige Diskussion). Die Ergebnisse dieser Untersuchung waren, daß bei Zeitabständen während L stark bevölkert ist, die erste K-Amplitude des elektrischen Signals zu klein ist, verglichen mit der folgenden M-Amplitude. Das war ein Hinweis auf eine Photorückreaktion von L, die im Abschnitt 5.1 mit optischen Methoden weiter bestätigt wurde. In elektrischen Experimenten wird diese

Reaktion eine Amplitude von entgegengesetztem Vorzeichen wie die Photorückreaktion von M haben, so daß eine schnelle Komponente im Rückreaktionssignal von M durch das überlappende Rückreaktionssignal von L reduziert wird. Im Gegensatz zu den optischen Messungen ist es bei den elektrischen Messungen nicht möglich Bedingungen zu finden, bei denen die L-Rückreaktion nicht sichtbar ist. Daher wäre es prinzipiell nötig, jedes 532/400 nm M-Rückschußexperiment mit einem 532/580 nm Experiment zu korrigieren, was jedoch nicht praktikabel ist.

Die Kontrollexperimente (Abb. 4.9) zeigten außerdem eine starke Abweichung im langsamen Zeitbereich (größer 1 ms), denn die Amplitude des M-Zerfalls der zusätzlich angeregten Moleküle vergrößerte sich nicht proportional zu der des M-Anstiegs. Erklärung dafür war die Aufladung der Membran bei starker Anregung. Es konnte weiter gezeigt werden, daß für die M-Anstiegskomponente die Additivität der Meßsignale bei Doppelblitzen (bei $\Delta t = 200 \mu\text{s} = \text{konst.}$, wenn L bereits zerfallen ist) durch zusätzlich angeregten Grundzustand gewahrt bleibt, und daher die Korrektur dafür bis in den Zeitbereich bis etwa 100 μs möglich ist, während für spätere Zeiten der Aufladungseffekt die Korrektur verfälscht. Bei den optischen Experimenten wird dieser Effekt nicht beobachtet, da hier ein schneller Ladungsaustausch zwischen extrazellulärer und zytoplasmatischer Seite erfolgen kann.

Trotz dieser Nachteile werden die elektrischen Experimente zur Untersuchung der M-Rückreaktion nach derselben Methode wie die optischen ausgewertet. Dabei ist zu beachten, daß erstens die Korrektur für zusätzlich angeregten Grundzustand wegen der Aufladung der Membran nur bis 100 μs sinnvoll ist und daß zweitens ein Rückschießen aus L bei ungünstigen Zeitabständen überlagert ist.

$$U_M(t) = U_d(t) - U_1(t) - f_1 U_2(t) \quad \text{Gl. 5.3}$$

Alle Abkürzungen sind sinngemäß der Auswertung der optischen Messung zu entnehmen, außer daß ΔA durch U ersetzt wird. Diese Differenzbildung ist in Abb. 5.11 demonstriert. In Teilbild A ist zu sehen, daß der blaue Blitz, der 500 μs nach dem grünen einsetzt (Zeitspur 2), ein schnelles Spannungssignal induziert, das entgegengesetzt zur Spannung des ersten Blitzes allein (Zeitspur 1) und in dieser Abbildung nicht zeitaufgelöst ist. In Teilbild B sind dieselben beiden Zeitspuren abgebildet, aber diesmal erfolgt die Datenaufnahme auf Einsetzten des zweiten Blitzes und man sieht, daß die Rückreaktion innerhalb von einigen hundert Nanosekunden erfolgt. Außerdem ist hier die Zeitspur des blauen Blitzes alleine gezeigt (Zeitspur 3). Teilbild C zeigt das Signal der Photorückreaktion, das durch Subtraktion der Zeitspuren 1, 2 und 3 aus B mit Gl. 5.3 und $f_1=0,65$ zur Korrektur für die Anregung des Grundzustands erhalten wird. Teilbild D zeigt den schnellen Zeitbereich von Teilbild C in vergrößerter Darstellung, zusammen mit den Abweichungen einer Anpassung mit einer (u_1) oder zwei (u_1, u_2) Exponentialfunktionen. Die Anpassung mit zwei Exponentialfunktionen (τ_1 130 ns und τ_2 780 ns) ist deutlich besser. Der Systemanstieg von 25-35 ns (Abschnitt 2.6) ist nicht zeitlich getrennt aufgelöst, sondern in der (u_1, τ_1) Komponente enthalten. Auf eine Korrektur der Zeitkonstante τ_1 mit der Anstiegszeit wurde hier wegen des kleinen Beitrags dieser Korrektur verzichtet, ebenso wie bei den optischen Messungen (Abschnitt 5.3.1).

Die langsame 100 ms Komponente in Teilbild C wird künstlich erzeugt und hat nichts mit der Rückreaktion zu tun. Wie oben erklärt, wird die elektrische M-Zerfallskomponente im ms Bereich, die durch den zweiten Blitz erzeugt wird, dadurch verlangsamt und reduziert, daß der erste starke Blitz bereits ein Membranpotential erzeugt hat. Der Korrekturterm $f_1 U_2(t)$ in Gl. 5.3 berücksichtigt diesen Effekt der Aufladung jedoch nicht. Daher entsteht in der Differenz die zusätzliche Amplitude um 100 ms.

Ein weiteres Problem bei diesen elektrischen Doppelblitzexperimenten ist, daß im Gegensatz zu den analogen optischen Messungen, bei denen man aus der Amplitude des ersten Blitzes in etwa die Anregungsstärke abschätzen kann, keine Kontrolle über den Faktor f_1 gegeben ist. Da aber mit einem stark sättigenden ersten Blitz gearbeitet wurde, muß der

Faktor wie in Kapitel 4 gezeigt, in der Größenordnung 0,55 bis 0,75 liegen. Der bei einer speziellen Messung benutzte Korrekturfaktor wird daraus gewonnen, daß in der Differenzzeitpur im Zeitbereich von 5-500 μs ein zeitlich konstantes Signal entsteht, wie es in Abb. 5.11 Teilbild C zu erkennen ist. Diese Methode beruht auf der Annahme, daß die M-Photorückreaktion in diesem Zeitbereich bereits vollständig abgeschlossen ist.

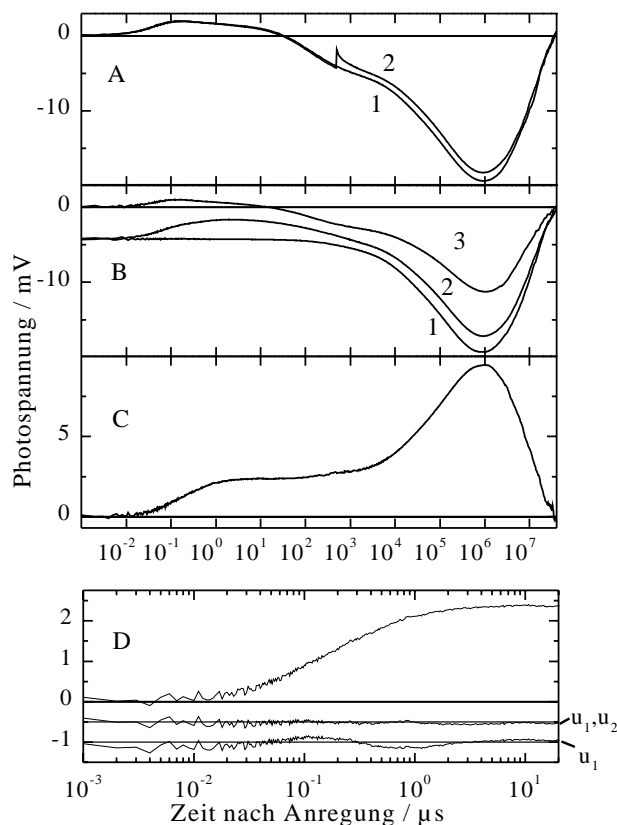


Abb. 5.11 Zeitaufgelöste Photospannungsmessungen nach Einzelblitzanregung (532 nm) und nach Doppelblitzanregung (532/400 nm). (A) Spannungssignal durch den 532 nm Laser (1) und Zeitspur bei Doppelblitzanregung (2) durch den 400 nm Blitz 500 μs nach dem 532 nm Blitz. (B) Dieselben beiden Zeitspuren (1) und (2) wie in Teilbild (A), jedoch wurde der Zeitnullpunkt der Datenaufnahme auf das Einsetzen des zweiten Blitzes gesetzt. Außerdem ist die Zeitspur (3) bei Anregung durch den 400 nm Blitz alleine gezeigt. In Teilbild (C) ist die Differenz der Zeitspuren 1, 2 und 3 aus (B) nach Gl. 5.3 mit $f_1=0,65$ gebildet. (D) Zeigt den Anstiegsteil von (C) auf einer expandierten Zeitskala sowie darunter die Abweichungen einer Anpassung dieses Anstiegs mit einer Exponentialfunktion u_1 (290 ns.), oder zweien u_1 58 %, u_2 42 % (130 ns und 730 ns). Bedingungen: 150 mM KCl, pH 7,0; 0,3°C.

Diese Experimente wurden mit Zeitabständen von 10 μs bis 500 ms zwischen den beiden Blitzen wiederholt, um wieder den ganzen Zeitbereich abzudecken in dem M existiert. Die beiden Zeitkonstanten der Anpassung und die zugehörigen Amplituden sind im oberen und mittleren Teilbild von Abb. 5.12 dargestellt. Für den ersten Zeitabstand bei 10 μs wurde nur eine Exponentialfunktion benötigt, für alle anderen zwei. Die schnellere Zeitkonstante ist gut konstant über den ganzen Bereich von Zeitabständen. Die langsamere der beiden Zeitkonstanten ist ebenfalls über einen großen Bereich konstant, hat jedoch leichtere Abweichungen wenn die zugehörigen Amplituden klein werden. Daher resultieren die abweichenden Zeitkonstanten möglicherweise nur von den kleinen Amplituden. Um die Korrelation zwischen Amplituden und Zeitkonstanten zu eliminieren, wurden sämtliche Zeitspuren bei den unterschiedlichen Zeitabständen mit denselben zwei Exponentialfunktionen angepaßt und die zugehörigen Amplituden verglichen. Dies geschieht wieder mit Hilfe des beschriebenen Rechnerprogramms „mupw7“. Dabei wurden $\tau_1=55$ ns und $\tau_2=580$ ns erhalten, die wieder gut als mittlerer Wert der Einzelanpassungen angesehen werden können (siehe gestrichelte Linie im oberen Teilbild). Die Zeitkonstante τ_1 ist noch etwas schneller als in Abb. 5.11, da zwischen den verschiedenen Messungen der Verstärker noch etwas verbessert wurde.

Bei den Amplituden der globalen Anpassung überwiegt u_1 über den ganzen Bereich von Zeitabständen. Die kleinere Amplitude u_2 , beginnt erst mit einer Verzögerung von 50 μs zu wachsen. Die Summe u_1+u_2 steigt wie der (aus optischen Messungen) erwartete M-Anstieg an, der Zerfall der Summe u_1+u_2 ist jedoch eine gute Größenordnung langsamer.

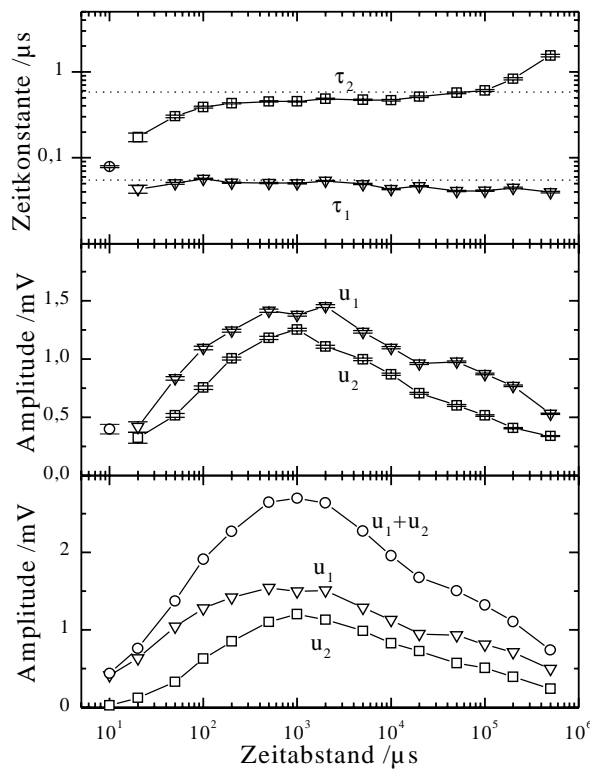


Abb. 5.12 Abhängigkeit der zwei Komponenten (∇ , \square) der M-Rückreaktion vom Zeitabstand zwischen 532 nm und 420 nm Blitz. Bei $10 \mu\text{s}$ reicht eine Komponente (\square).

Oberes Teilbild: Die zwei Zeitkonstanten bei einer Anpassung mit zwei Exponentialfunktionen an jede einzelne Zeitspur, die bei jedem Zeitabstand entsprechend Abb. 5.11 konstruiert wurde.

Mittleres Teilbild: Die zu diesen Zeitkonstanten der Einzelanpassungen zugehörigen Amplituden.

Unteres Teilbild: Die Amplituden einer globalen Anpassung an die Zeitspuren bei sämtlichen Zeitabständen. Als Zeitkonstanten wurden dabei 55 ns und 580 ns erhalten, die als gestrichelte Linien in dem oberen Teilbild eingezeichnet sind. Außerdem ist die Summe der beiden Amplituden eingetragen (\circ).

Bedingungen: pH 7,0; 150 mM KCl; 5°C ; $f_1=0,6$; außer bei 200 ms ($f_1=0,65$) und bei 500 ms ($f_1=0,75$).

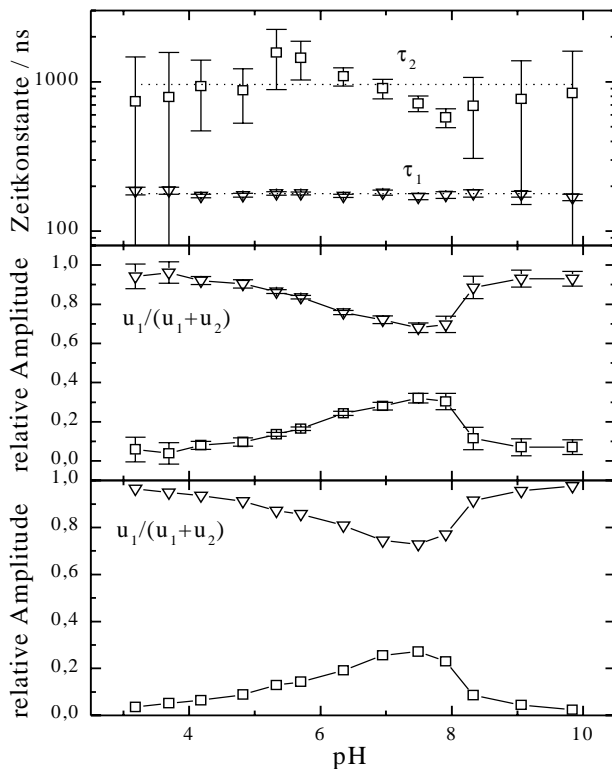


Abb. 5.13 pH-Abhängigkeit der beiden elektrischen Komponenten (∇ , \square) des M-Rückreaktionssignals.

Oberes Teilbild: Die beiden Zeitkonstanten der Rückreaktion bei Einzelanpassung bei jedem pH.

Mittleres Teilbild: Die zu den Einzelanpassungen gehörenden relativen Amplituden $u_1/(u_1+u_2)$ und $u_2/(u_1+u_2)$.

Unteres Teilbild: Die relativen Amplituden einer globalen Anpassung mit 180 ns und 960 ns. Die beiden Zeiten der globalen Anpassung sind als gestrichelte Linien im oberen Teilbild eingezeichnet.

Bedingungen: 150 mM KCl; 12°C ; $f_1=0,7$; $\Delta t=500 \mu\text{s}$.

Die pH-Abhängigkeit der elektrischen M-Photoreaktion zeigt Abb. 5.13. Auch hier können die beiden Zeitkonstanten näherungsweise als konstant angesehen werden, jedoch weist die langsamere der beiden Zeitkonstanten eine große Ungewißheit auf, wenn die zugehörige Amplitude klein wird. Daher scheint auch hier eine globale Anpassung gerechtfertigt, die zu einem glatteren Kurvenverlauf der Amplituden führt (unteres Teilbild).

Die Amplituden selbst sind normiert auf die Summe der beiden Rückschußamplituden, da die Absolutwerte gleichzeitig mit dem elektrischen M-Aufbausignal variieren. Auffällig ist, daß die u_2 Komponente nur auf maximal 30-40% anwächst, während im Vergleich bei der optischen Messung (Abb. 5.8) die a_2 Komponente auf über 60% anwächst. Qualitativ übereinstimmend ist jedoch das Anwachsen der langsamen Komponente mit steigendem pH mit einem pK von ungefähr 6. Bei hohem pH nimmt die langsamere elektrische Komponente jedoch wieder ab (mit einem pK von etwa 8) während die entsprechende optische näherungsweise konstant bleibt. Die Absolutwerte der Amplituden der elektrischen Photorückreaktion von dieser pH-Meßreihe sind in Abb. 5.17 gezeigt.

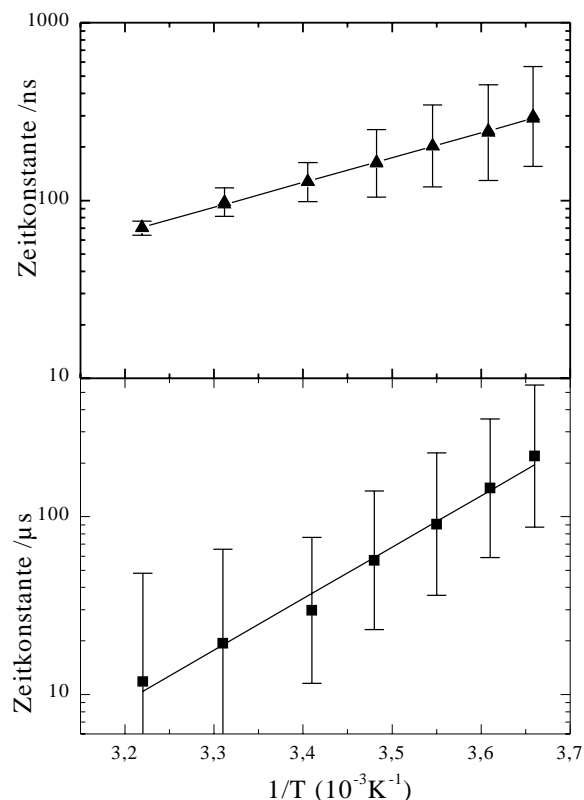


Abb. 5.14 Arrhenius-Plot für die Kinetik der elektrischen M-Photorückreaktion (oberes Teilbild) im Vergleich zur M-Anstiegs Kinetik (unteres Teilbild). Die Balken geben die Breiten σ der Gauß-verteilter Kinetiken der Anpassung wieder. Die Messung wurde im Bereich von 0,2-38°C durchgeführt. Aus den Steigungen wurden Aktivierungsenergien von 27 kJ/mol für die Photorückreaktion und 56 kJ/mol für den M-Anstieg erhalten.

Die Temperaturabhängigkeit der elektrischen M-Rückreaktion wurde in einer Meßreihe zwischen 0,2° und 38°C untersucht. Da die beiden Einzelraten für die Reaktion schlechte Systematik aufwiesen, wurde wieder das Maximum einer Gauß-verteilter Kinetik zur Bestimmung der Aktivierungsenergien benutzt. Man sieht deutlich an der abnehmenden Breite der Gauß-Verteilung bei höherer Temperatur, daß hier die Zeitauflösung nicht mehr ausreicht. In derselben Meßreihe konnte gleichzeitig die Aktivierungsenergie für den M-Aufbau im Zyklus (56 kJ/mol) und für die Photorückreaktion aus M (27 kJ/mol) erhalten werden.

Um den $^1\text{H}/^2\text{H}$ Effekt bei elektrischen Messungen zu untersuchen, wurde eine Anlagerung in D_2O durchgeführt und mit einer Anlagerung in H_2O unter sonst identischen Bedingungen verglichen (Abb. 5.15). Man sieht im oberen Teilbild den kinetischen Isotopeneffekt bei der Vorwärtsreaktion. Aus Anpassungen mit Gauß-verteilter Kinetiken wird ein kinetischer Isotopeneffekt von $\tau_{\text{D}}/\tau_{\text{H}}=2,5$ erhalten. Dieser ist wesentlich kleiner als der in den optischen Messungen erhaltene Wert und auch als der von M. Holz (1990) aus elektrischen Messungen erhaltene Wert von 5. Dies liegt wahrscheinlich an der schlechten Reproduzierbarkeit bei unterschiedlichen Anlagerungen. Auf eine Statistik wurde verzichtet, denn tendenziell wurde wie in den optischen Messungen der stärkste Effekt im L-M Übergang beobachtet. Außerdem sieht man, daß die K-Amplitude gegenüber H_2O vergrößert ist, und daß der K-L Übergang im

elektrischen Signal bei 1 μs eine kleinere Amplitude mit entgegengesetztem Vorzeichen hat. Das umgekehrte Vorzeichen bei H_2O liegt möglicherweise daran, daß der L-M Übergang mit seiner großen Amplitude die entgegengesetzte kleine Amplitude des K-L Übergangs kompensiert (Holz, 1990).

Der Isotopeneffekt auf die Kinetik der M-Photoreaktion ist im unteren Teilbild zu sehen. Der aus Anpassungen mit einer Gauß-verteilten Kinetik erhaltene Wert von $\tau_D/\tau_H=0,85$ ist physikalisch nicht verständlich und im Widerspruch zu den optischen Messungen. Da der Effekt im L-M Übergang bereits recht gering war, und bei den optischen Messungen der Effekt auf die Photoreaktion von M kleiner als auf den L-M Übergang war, wurde auch nur ein kleiner Isotopeneffekt bei der Photoreaktion erwartet. Da jedoch ein Wert kleiner 1 erhalten wurde, liegt hier die Vermutung nahe, daß es sich um ein Artefakt bei dem Vergleich von Messungen an unterschiedlichen Anlagerungen handelt.

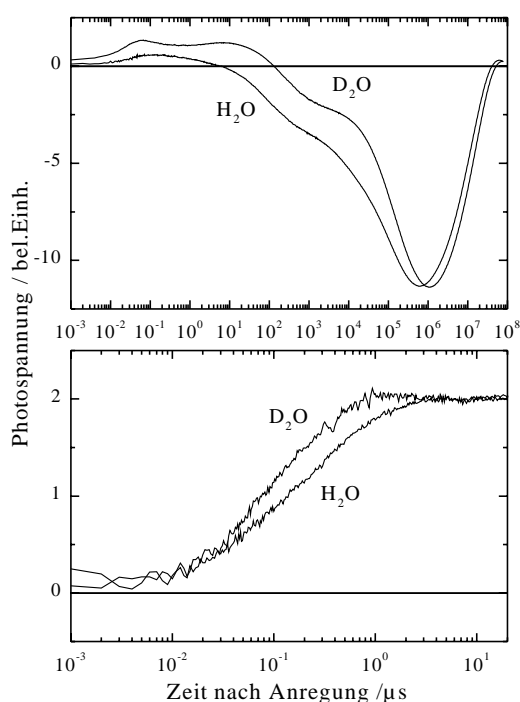


Abb. 5.15 Oberes Teilbild: Kinetischer Isotopeneffekt auf das elektrische Signal von bR nach Anregung mit einem einzelnen Laserblitz. Die elektrischen Signale in H_2O und in D_2O wurden mit je zwei Exponentialfunktionen und zwei Gauß-verteilten Kinetiken im aktiven Bereich zwischen 1 μs und 1 s angepaßt. Der M-Aufbau wurde mit einer Gauß-verteilten Kinetik angepaßt und dabei ergab sich ein Verhältnis der mittleren Zeitkonstanten von $\tau_D/\tau_H=2,5$. Der Effekt auf den M-Zerfall ist sichtlich kleiner, da die Zeitspuren hier zusammenlaufen.

In der Abbildung wurden die Signale auf eine vergleichbare Endspannung skaliert. Die unterschiedlichen Systemzeiten sind durch die unterschiedlichen Anlagerungen bedingt.

Unteres Teilbild: Kinetischer Isotopeneffekt auf die Photoreaktion von M. Die beiden Zeitspuren wurden aus je drei gemessenen Zeitspuren analog zu Abb. 5.11 konstruiert. Der Blitzabstand bei den Doppelblitzexperimenten betrug 2 ms, der Korrekturfaktor $f_1=0,6$. Anpassungen mit Gauß-verteilten Kinetiken ergaben einen Isotopeneffekt von $\tau_D/\tau_H=0,85$, der jedoch vermutlich ein Artefakt ist (siehe Text).

Bedingungen: 150 mM KCl; 7°C; pH 7,0; pD 7,1.

5.4 Die M-bR Photoreaktion: Diskussion

Das M-Intermediat ist von besonderer Bedeutung für das Verständnis des gerichteten Pumpprozesses von bR. Beim Entstehen des M-Intermediats wird ein Proton von der Schiffsbasis zu Asp-85 im extrazellulären Kanal transferiert. Gleichzeitig wird ein zweites Proton von Glu-204 auf die extrazelluläre Oberfläche transferiert (Brown et al., 1995). Im Zerfall des M-Intermediats nimmt die Schiffsbasis wieder ein Proton auf, jedoch von Asp-96, welches sich im zytoplasmatischen Kanal befindet. Letztendlich wird der Pumpzyklus durch die Reprotonierung von Asp-96 von der zytoplasmatischen Oberfläche und der Reprotonierung von Glu-204 durch Asp-85 vervollständigt. Der Mechanismus, der die Zugänglichkeit der Schiffsbasis von Asp-85 zu Asp-96 umschaltet, findet während der Lebensdauer von M statt, und wird „reprotonation switch“ genannt. Eine umfangreiche Diskussion des derzeitigen Verständnisses des „reprotonation switch“ ist kürzlich erschienen (Richter et al., 1996). Darin wird unterschieden zwischen Mechanismen, bei denen sich durch

strukturelle Änderungen die Zugänglichkeit von bestimmten Gruppen ändert („accessibility type“) und Mechanismen bei denen sich durch elektrostatische Wechselwirkung titrierbarer Gruppen deren pK-Werte ändern („affinity type“). Der gerichtete Prozeß des Protonentransports wird hier durch die Abfolge von drei Phasen während des M-Intermediats erzielt (Richter et al., 1996): Die erste Phase ist die Protonenabgabe selbst, denn aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung von Asp-85 und Glu-204 (Balashov et al., 1996) wird durch die Abgabe des Protons von Glu-204 an die extrazelluläre Oberfläche der pK von Asp-85 erhöht. Das bedeutet, daß das Protonierungsgleichgewicht zwischen Schiffscher Base und Asp-85 (das sich sehr schnell einstellt und jeder pK-Änderung folgt) weiter zugunsten von Asp-85 verschoben wird und damit der Rücktransport des Protons von Asp-85 zur Schiffschen Base gehemmt wird. Damit ist die erste Phase des „reprotonation switch“ vom „affinity type“. Die zwei unterschiedlichen M-Subzustände mit protonierter oder deprotonierter Protonenabgabegruppe ($M_1(XH)$ bzw. $M_1'(X^-)$) wurden bereits früher eingeführt (Zimányi et al., 1992). In der zweiten Phase des „reprotonation switch“ ändert dann die Schiffsche Base ihre Zugänglichkeit zugunsten von Asp-96. Dies wird mit dem M_1' zu M_2' Übergang in der Notation von Zimányi bezeichnet. Die dritte Phase in der Arbeit von Richter ist eine langreichweitige Protein-Konformationsänderung, bei der sich der zytoplasmatische Kanal öffnet und somit die Hydratation im Kanal erhöht wird. Dadurch wird der pK von Asp-96 erniedrigt und der Protonentransfer zur Schiffschen Base ermöglicht.

Wird während der Lebenszeit von M blaues Licht (400 nm) angeboten, so führt die Lichtabsorption zur schnellen Isomerisierung des Retinals in die all-*trans* Form (Grieger und Atkinson, 1985), diese Form wird mit M' bezeichnet (die nicht mit den deprotonierten Formen M_1' und M_2' verwechselt werden sollte). Im nachfolgenden thermischen Übergang wird die Schiffsche Base von Asp-85 innerhalb weniger hundert Nanosekunden wieder reprotoniert.

Diese Reprotonierungsreaktion nach der Photoisomerisierung von M kann benutzt werden, um den oben beschriebenen Pumpmechanismus, der in verschiedenen M Zuständen ablaufen soll, zu überprüfen, und um zusätzliche Information zu erlangen. Wenn etwa während der Lebensdauer von M Konformationsänderungen in der Gegend der Schiffschen Base auftreten, oder sich Protonierungszustände titrierbarer Gruppen in der Nähe dieses Bereichs ändern, wie es in dem Modell von Richter beschrieben ist, so sollte sich das auf die Kinetik der Photorückreaktion auswirken. Dies war die Motivation zu diesem Experiment, die noch einmal durch Abb. 5.16 verdeutlicht werden soll.

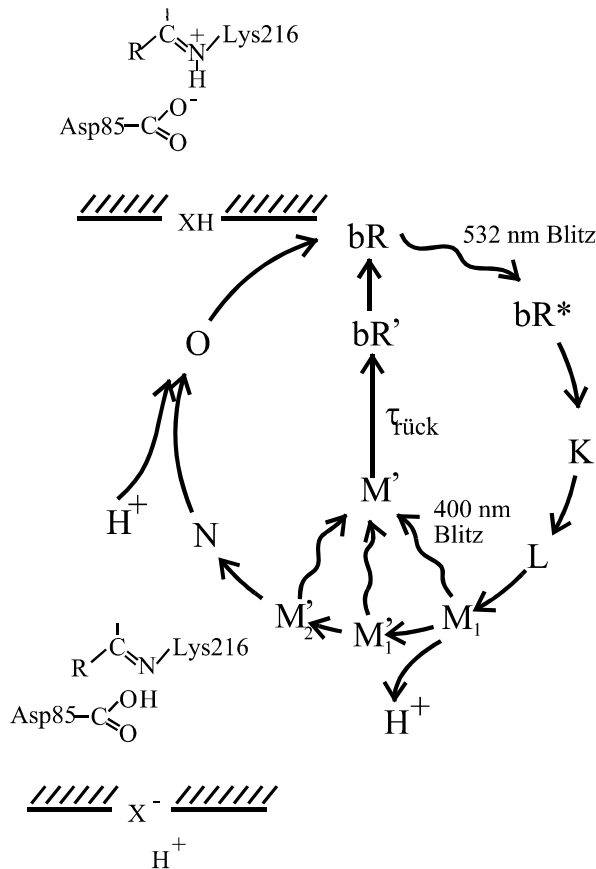


Abb. 5.16 Motivation für die Untersuchung der Photorückreaktion aus dem M-Intermediat. Im Grundzustand bR ist die Schiffische Base protoniert und Asp-85 negativ geladen. Der Protonentransport von der Schiffischen Base zu Asp-85 geschieht im L-M₁ Übergang. Der L-M₁ Übergang ist eine schnelle Gleichgewichtsreaktion mit sehr hoher Rückrate, so daß zunächst überwiegend L vorliegt. Erst wenn M₁ weiter zu M₁' und M₂' zerfällt, wird die SB vollständig deprotoniert. Im Übergang M₁ zu M₁' wird ein Proton von der Gruppe XH abgegeben. Diese Gruppe XH ist wahrscheinlich Glu-204 auf der extrazellulären Seite von bR. Bei der Rückreaktion von den verschiedenen Stufen von M-Intermediaten werden Effekte auf die Kinetik erwartet.

Die Photorückreaktion des M-Intermediats ist bereits lange bekannt. Mit zeitaufgelöster optischer Absorptionsspektroskopie wurde gezeigt, daß der isomerisierte Zwischenzustand M' ein blauverschobenes Absorptionsmaximum von 390 nm besitzt (Kalisky et al., 1978). Für den Zerfall von M' in den Grundzustand bR finden sie eine Zeitkonstante von 200 ns. In einer späteren Veröffentlichung (Kalisky et al., 1981) wird ein Hydrateffekt der M Photorückreaktion gesucht und nicht gefunden. Daraus folgern die Autoren, daß die Schiffische Base nicht von der wässrigen Lösung reprotoniert wird, sondern von einem internen Protonendonator. Zeitaufgelöste Untersuchungen des elektrischen Signals der Photorückreaktion, und der Berechnung der Verschiebewege führte zum Schluß, daß das Proton nicht gepumpt wird, sondern wieder zurück zur Schiffischen Base wandert (Ormos et al., 1980). Hier war die Zeitauflösung jedoch begrenzt durch 2 µs lange Lichtblitze, so daß der direkte Vergleich mit den optischen Ergebnissen nur begrenzt möglich war.

Spätere optische Messungen mit von 10 µs zu größer 200 µs variiertem Zeitabstand zeigten eine veränderte Kinetik der M-Photorückreaktion von 100 ns zu 250 ns (Druckmann et al., 1992). Die Autoren interpretieren diese Änderung mit dem strukturellen M₁'-M₂' Übergang in der Nomenklatur von Zimányi. Gleichlicht FTIR Messungen der M-Photorückreaktion bei tiefer Temperatur zeigen direkt, daß die Reprotonierung der Schiffischen Base von Asp-85 erfolgt (Takei et al., 1992). Außerdem werden hier 3 Stufen für die Photorückreaktion beschrieben. Die erste ist die Photoisomerisierung in M', danach folgen zwei mögliche parallele Reprotonierungswege der SB.

Der erste Schritt in der M-Photorückreaktion, die Photoisomerisierung, ist in diesen elektrischen und optischen Messungen zeitlich nicht aufgelöst, denn diese geschieht in der Regel innerhalb weniger ps. Erst die darauf folgende thermische Reaktion von M' zu bR' ist mit den apparativen Mitteln auflösbar. Der kinetische Isotopeneffekt (Abb. 5.10) bei der Absorptionsänderung zeigt, daß die Kinetik bei 406nm mit einem Protonentransfer verbunden ist. Im elektrischen und optischen Signal sind zwei Komponenten für eine Anpassung erforderlich. In der optischen Meßreihe (Abb. 5.7) mit unterschiedlichen Zeitabständen

zwischen den beiden Blitzen sind die beiden Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 näherungsweise konstant, und die Summe der zugehörigen Amplituden a_1+a_2 ist näherungsweise proportional zur Absorptionsänderung ΔA bei 406 nm (Abb. 5.7). Dies verhält sich wie erwartet, weil die Amplitude der M-Photorückreaktion proportional zur Besetzung des M Intermediates sein sollte. Der relative Beitrag der beiden Amplituden ändert sich jedoch mit dem Zeitabstand. Für kurze Zeitabstände überwiegt die schnellere Komponente, während die langsamere Komponente bei Zeitabständen größer 100 μs am größten ist. Diese Zeit ist dicht bei der Zeit von 70-85 μs , bei der ein Proton auf der Oberfläche erscheint (Alexiev et al., 1995). Die starke Kopplung von dem pK-Wert des Protonenakzeptors Asp-85 mit dem der Protonenabgabegruppe Glu-204 wurde bereits nachgewiesen (Balashov et al., 1995, 1996; Richter et al., 1996). In diesen Untersuchungen wird gezeigt, daß durch die Protonenabgabe von Glu-204 der pK von Asp-85 von 2,6 auf 7,2 ansteigt und damit dessen Protonenaffinität erhöht wird.

Diese pK-Erhöhung von Asp-85 nach der Protonenabgabe ($\sim 100 \mu\text{s}$) sollte daher bei der Photorückreaktion von M zu einer herabgesetzten Rate bei der Reprotonierung der Schiffischen Base führen. Daher scheint zunächst die Zuordnung sinnvoll, daß a_1 die schnelle Reprotonierung der SB von Asp-85 bei noch vorhandener Protonierung von Glu-204 darstellt und a_2 die langsamere Reprotonierung nach der Protonenabgabe von Glu-204. Diese Zuordnung wird durch die Beobachtung unterstützt, daß die Amplitude a_2 erst nach einer Verzögerung von etwa 100 μs einsetzt. Das Problem in dieser Zuordnung besteht darin, daß die a_1 Komponente bei langen Zeitabständen, wenn die Protonenabgabe bereits vollständig beendet ist, nicht verschwindet. Aus diesem Grund ist die folgende Zuordnung, die sich an den Vorgängen während dem Photozyklus orientiert, plausibler: a_1 ist die schnelle Gleichgewichtseinstellung zwischen Asp-85 und SB, und a_2 ist die Wiederherstellung des pK von Asp-85 zu seinem niedrigen Wert im Grundzustand. Erst dadurch wird das Protonierungsgleichgewicht wieder vollständig auf die Seite der SB verschoben. Durch diese Interpretation ist die Koexistenz der beiden Komponenten auch nach der Protonenabgabe gesichert.

Der pK der Protonenabgabegruppe fällt von etwa 9 im Grundzustand zu 5,8 im M-Intermediat (Zimányi et al., 1992). Daher wird unterhalb pH 6 die Protonenabgabegruppe im Photozyklus nicht mehr deprotonieren. Dementsprechend wird unterhalb von pH 6 nur noch die schnelle a_1 Komponente erwartet. Für pH Werte oberhalb von 6 ist Glu-204 die Protonenabgabegruppe und die langsame Komponente a_2 sollte überwiegend beitragen. Genau dieses Verhalten ist in Abb. 5.8 zu beobachten.

In dem oben beschriebenen Modell (Richter et al., 1996) ist die erste Phase des „reprotonation switches“ die Protonenabgabe von Glu-204, die zur pK Erhöhung von Asp-85 führt. Obige Ergebnisse über den umgekehrten Weg bei der Photorückreaktion von M unterstützen genau dieses Modell.

Der pK von etwa 6, der aus den kinetischen Daten bei 12°C entstanden ist, ist in guter Übereinstimmung mit Gleichlichtmessungen der thermischen Stabilität von M' bei tiefen Temperaturen (Friedman et al., 1994). Die Autoren berichten, daß bei -150°C und pH 5 72% von M' zurück nach bR zerfällt, während oberhalb pH 8 dieser Wert auf 40% sinkt. Die Titration zeigt, daß dieser Übergang etwa bei pH 6 mit 100 mM KCl liegt. Die Autoren vermuten aufgrund des pK der Abgabegruppe bei Raumtemperatur, daß diese Abgabegruppe die thermische Stabilität von M' kontrolliert und zwar derart, daß bei einem pH >6, wenn Glu-204 während des Zyklus deprotonieren kann, die Stabilität erhöht wird. Auch diese Messungen stimmen gut mit den eigenen überein, in denen der Prozeß des M'-Zerfalls oberhalb pH 6 überwiegend mit der langsameren Komponente erfolgt.

Die Verlangsamung der M-Rückreaktionskinetik mit wachsendem Zeitabstand, wurde mit Absorptionsspektroskopie schon früher beobachtet (Druckmann et al., 1992). Diese Autoren

beobachteten nur eine einzige Zeitkonstante, die sich jedoch von 100 ns zu 250 ns änderte, wenn der Zeitabstand von 10 μ s nach 250 μ s vergrößert wurde (pH 7; 100 mM NaCl; Raumtemperatur). Die genaueren Messungen hier zeigen, daß zwei Exponentialfunktionen benötigt werden, deren Zeitkonstanten zeitunabhängig sind, aber der relative Beitrag der langsameren Komponente mit dem Zeitabstand zunimmt.

Die Ergebnisse der elektrischen Doppelblitzexperimente unterstützen die Interpretation der Absorptionsmessungen. Das Vorzeichen der Photorückreaktion von M zeigt eine Ladungsverschiebung entgegengesetzt zur Protonenpumprichtung. Das zeigt, daß die Schiffische Base von einer Gruppe reprotoniert wird, die zwischen extrazellulärer Seite und Schiffischer Base liegt. Das stimmt mit den FTIR Untersuchungen überein, welche Asp-85 als Donor für diese Reaktion identifiziert haben (Takei et al., 1992). Die zwei beobachteten Spannungskomponenten u_1 und u_2 sind vermutlich direkt mit den schnellen und langsamen Komponenten a_1 und a_2 der Absorptionskinetik verbunden. In Übereinstimmung mit den optischen Daten, beginnt die u_2 Komponente erst mit 100 μ s verzögert zu wachsen und auch die relative Amplitude von u_2 zeigt einen ähnlichen pK von 6. Daher unterstützen diese Daten die Interpretation der Absorptionsdaten, daß die langsamere Komponente der Reprotonierung der Schiffischen Base mit Glu-204 in deprotoniertem Zustand zugeordnet ist (die erste Phase des „reprotonation switch“). Frühere zeitaufgelöste elektrische Untersuchungen der Photorückreaktion aus M waren durch unzureichende zeitliche Auflösung und Korrektur für die Anregung des vom ersten Blitz nicht angeregten bR durch den zweiten Blitz limitiert. Trotz dieser Probleme, konnte geschlossen werden, daß die Ladungsbewegung von entgegengesetzter Polarität zur Pumprichtung ist und außerdem sehr schnell erfolgt. Die ersten Autoren, die zeitaufgelöste elektrische Untersuchungen der M-Rückreaktion durchgeführt haben (Dancsházy et al., 1978), berichten, daß die Anstiegszeit bei Raumtemperatur schneller als 5 μ s ist. In späteren Messungen, die durch 2 μ s lange Blitze limitiert waren (Ormos et al., 1980), wurde nur eine Komponente von 10 μ s bei Raumtemperatur beobachtet. Die Messungen hier zeigen, daß es keine Diskrepanz zwischen den Zeiten von elektrischen und optischen Messungen der M-Rückreaktion gibt.

Jedoch gibt es einige andere Unterschiede zwischen den elektrischen und optischen Messungen die weiter diskutiert werden müssen.

1. Die langsamere Amplitude der elektrischen Messung u_2 übersteigt nie 40% der gesamten Amplitude, während die entsprechende optische Amplitude a_2 für alle Zeitabstände größer als 200 μ s am größten ist (vgl. Abb. 5.7 und Abb. 5.12). Die Interpretation der elektrischen Amplituden ist komplizierter als die der optischen, da die Spannungsamplituden proportional dem verschobenen Weg und umgekehrt proportional zur lokalen Dielektrizitätskonstanten sind (Trissl, 1990; Moltke et al., 1995). Daher sind die Daten nicht unmittelbar korreliert. Die optischen Messungen detektieren die lokale Reprotonierung der Schiffischen Base, während die elektrischen Messungen die Ladungsverschiebung durch das ganze Protein detektieren. Ein gutes Beispiel für das nicht parallele Verhalten von den optischen und elektrischen Amplituden ist der „alkalische Übergang“ mit einem apparenten pK von etwa 8,2 (Liu 1990). Oberhalb dieses pKs fällt die Amplitude des elektrischen Signals im μ s Zeitbereich, die mit dem L-M Übergang assoziiert wird, auf etwa 35%, während die Population von M sich in diesem Bereich nur schwach ändert (20%) (siehe Abb. 5.17). Das bedeutet, daß die Schiffische Base auch bei pH 10 vollständig deprotoniert, aber der Verschiebeweg über den sich die Ladung bewegt ist stark reduziert. Daher wurde vorgeschlagen, daß der Protonenabgabeschritt im μ s Zeitbereich bei hohem pH nicht stattfindet (Kono et al., 1993; Liu 1990).

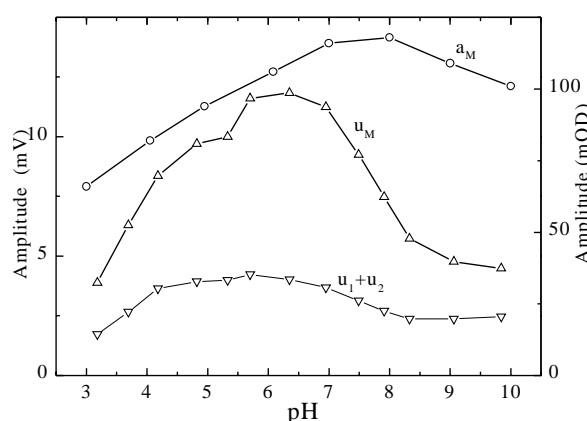


Abb. 5.17 Vergleich der pH Abhängigkeit der absoluten elektrischen und optischen Amplituden des M-Intermediats. a_M (○): Menge an M-Intermediat durch die Absorptionsänderung bei 406 nm gemessen. (rechte Skala). u_M (△): Amplitude des elektrischen Signals im L-M Übergang. u_1+u_2 (▽): Summe der beiden elektrischen Komponenten des M-Rückreaktionssignals. Bedingungen für optische bzw. elektrische Messungen wie in Abb. 5.8 bzw. Abb. 5.13.

2. Beide Amplituden a_2 und u_2 wachsen mit einem apparenten pK von 6 an, aber bei alkalischem pH sinkt u_2 wieder, während a_2 konstant bleibt (siehe Abb. 5.8 und Abb. 5.13). Wahrscheinlich rührt dies von dem oben beschriebenen „alkalischen Übergang“ her. Das elektrische Signal im 10-100 μ s Zeitbereich kann nicht alleine von dem Protonentransfer von der Schiff Base zu Asp-85 herrühren, obwohl die Dielektrizitätskonstante in der Umgebung von Asp-85 sehr gering ist (um 2 im M Intermediat (Braiman et al., 1996)), ist der Abstand zu kurz. Die Protonenabgabe von Glu-204 bringt ebenfalls für das elektrische Signal keine wesentliche Amplitude aufgrund der hohen Dielektrizitätskonstanten. Ein substantieller Beitrag könnte von der positiv geladenen Guanidinogruppe Arg-82 herrühren. Wenn diese Gruppe mit ihrer langen Seitenkette sich von einer Position in der Nähe von Asp-85 in eine Position in Richtung von Glu-204 auf der extrazellulären Oberfläche bewegt, etwa durch die Protonierung von Asp-85 initiiert, wie bereits aus theoretischen Berechnungen vorgeschlagen (Scharnagl und Fischer, 1996), hat die elektrische Amplitude des M-Aufbaus etwa die richtige Größe, (wenn die hydrophile Umgebung von Arg-82 mit in Betracht gezogen wird). Wenn diese beiden Ladungsbewegungen in einem gemeinsamen Schritt ablaufen, erhält man nur eine kinetische Zeitkonstante im μ s-Zeitbereich des elektrischen Signals. Die Bewegung von Arg-82 könnte ebenfalls die Kopplung zwischen Asp-85 und Glu-204 darstellen. Bei hohem pH ist Glu-204 bereits im Ausgangszustand deprotoniert. Es wurde vorgeschlagen, daß oberhalb des pKs von Glu-204 Arg-82 zur extrazellulären Seite hin ausgerichtet ist (Balashov et al., 1993; Scharnagl und Fischer, 1996). Dann bleibt Arg-82 während des ganzen Photozyklus zur extrazellulären Seite hin ausgerichtet und im alkalischen pH Bereich wird kein elektrischer Beitrag von Arg-82 herrühren. Daher ist die μ s Komponente reduziert. Was bleibt, ist die Ladungsbewegung von der Schiff'schen Base nach Asp-85. Diese Interpretation der pH Abhängigkeit der Vorwärtsbewegung im L-M Übergang hat dann entsprechende Konsequenzen für die entgegengesetzte Bewegung im M'-bR Übergang. Wenn Arg-82 dicht bei Glu-204 bleibt, wird die Amplitude der entgegengesetzten Ladungsbewegung recht klein werden und diese Amplitudenabnahme wird mit einem pK zwischen 8 und 9 erfolgen. Die bleibende Amplitude ist die schnelle Komponente u_1 der Ladungsverschiebung, während die langsamere Komponente u_2 , der die Zurückbewegung von Arg-82 zugeordnet wird, verschwindet. Die optischen Amplituden sind nicht sensitiv auf den alkalischen Übergang, da die Schiff'sche Base nicht betroffen ist.

3. Ein weiterer Unterschied ist die im elektrischen Signal der M-Photorückreaktion auftauchende langsame Komponente im ms-Zeitbereich. Dies ist ein Effekt der elektrischen Aufladung der Membran, der in Kap. 4 beschrieben wurde. Da der erste Blitz die Membran auflädt, ist das Signal, das zusätzlich durch die Grundzustandsanregung des zweiten Blitzes erzeugt wird, dieser Spannung ausgesetzt und daher stark verzögert. Im M Rückreaktionssignal wird die Grundzustandsanregung des zweiten Blitzes abgezogen, jedoch wurde diese

unter Bedingungen gemessen, bei denen kein erster Blitz die Membran bereits aufgeladen hat. Daher taucht in dem Differenzsignal die im Vergleich zur Photorückreaktion große Amplitude im ms-Zeitbereich auf.

Weiterer Beachtung gilt dem $^1\text{H}/^2\text{H}$ kinetischen Isotopeneffekt der optischen Messung (Abb. 5.10). Zum einen zeigt der Effekt, daß das optische Signal der M-Rückreaktion von der Protonenbewegung herrührt. Aber der Isotopeneffekt ist in der M-Photorückreaktion (1,7) kleiner als im Vorwärtsschritt des M Aufbau (6,8). In diesem Verhältnis wurden Vorwärts- und Rückwärtsreaktion jeweils mit einer Gauß-verteilter Kinetik ausgewertet, so daß die mittlere Zeitkonstante im wesentlichen durch den Prozeß der größeren Amplitude bestimmt ist. Dieses sind nach oben aufgestellter These, jeweils die langsameren Prozesse, die das SB - Asp-85 Protonierungsgleichgewicht zugunsten von Asp-85 oder SB verschieben. Dies läßt vermuten, daß der Mechanismus, der das Gleichgewicht von der Schiffschens Base zu Asp-85 im M Aufbau verschiebt, sich unterscheidet vom Mechanismus bei dem umgekehrten Schritt beim Zerfall von M'. Der Isotopeneffekt im Photozyklus wurde kürzlich studiert (le Coutre et al., 1996). Im Aufbau von M wird das SB - Asp-85 Gleichgewicht zugunsten von Asp-85 verschoben, dabei ist diese Verschiebung gekoppelt an einen weiteren Protonentransfer der ähnlich dem im Eis erfolgt. In einem solchen eisartigen wasserstoffbrücken gebundenem Netzwerk sind Donor und Akzeptor bereits vororientiert. Damit ist für den Transfer das Aufbrechen der Bindung ratenlimitierend, so daß die Nullpunktsenergieverschiebung bei Proton-Deuteron austausch im gebundenen Ausgangszustand ausschlaggebend für die Änderung der Aktivierungsenergie ist. Z.B. wird für das Aufbrechen einer C-H Bindung ein Effekt bei $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch von einem Faktor 7 erwartet (Atkins, 1987). In Wasser dagegen ist die Reorientierung der Wasserstoffbrückenbindungen ratenlimitierend, daher ist hier beim

Protonentransfer der kinetische Isotopeneffekt $\sqrt{\frac{m_D}{m_H}} = 1,4$ (Agmon 1995). Dieser Wert

entspricht etwa dem der für die Photorückreaktion aus M beobachtet wird. Daher läßt sich umgekehrt schließen, daß die Rückreaktion an einen Protonentransfer gekoppelt ist, der in einer wasserähnlichen Struktur erfolgt. Das legt die Interpretation nahe, daß sich die Struktur im extrazellulären Kanal von einer eisartigen in eine wasserartige Struktur während der Lebensdauer von M ändert. Diese Änderung ist vermutlich auch ein Teil des „reprotonation switches“, da durch diese Strukturänderung der Rückweg von Asp-85 zur Schiffschens Base gehemmt wird. Dieser Mechanismus ist dann vom „accessibility type“. Der Mechanismus einer Änderung von einer Eis- zu einer Wasserstruktur ist mit einer großen Änderung der Polarisierbarkeit verbunden. Ein ähnliches Modell wurde bereits auf der Basis des FTIR Differenzspektrums von L und M Intermediat vorgeschlagen (Olejnik et al., 1992). Die Änderung der Polarisierbarkeit bewirkt hier breite Banden im L-M Differenzspektrum. In deren Interpretation erstrecken sich die Strukturänderungen sogar über den ganzen extrazellulären Kanal. Diese Interpretation liefert einen zusätzlichen Aspekt, der nicht in der Beschreibung der Phasen des „reprotonation switches“ von Richter berücksichtigt ist.

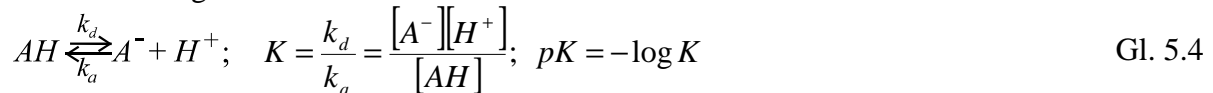
Ein weiter Unterschied zwischen Vorwärts- und Rückwärtsweg des Protons liegt in der Temperaturabhängigkeit: Die optisch und elektrisch gemessenen Aktivierungsenergien stimmen etwa überein, in beiden Fällen ist die Aktivierungsenergie für die Photorückreaktion etwa halb so groß wie für den M Anstieg und den thermischen M-Zerfall. Für die optische Messung stimmt das mit Messungen von Kalisky gut überein, während Ormos für die elektrische Messung einen zu kleinen Wert erhalten hat, wohl aufgrund der begrenzten Zeitauflösung. Das ließe sich auch mit der Strukturänderung Eis-Wasser erklären, da der Übergang in Wasser vermutlich eine geringere Aktivierungsenergie als der Übergang in Eis aufweist.

Die dritte Phase in dem Modell von Richter ist das Öffnen des zytoplasmatischen Kanals, das infolge von Ladungs- oder Isomerisierungsänderungen im ms Bereich stattfinden soll.

Daher wurde auch in der späteren Phase von M eine Änderung in der Kinetik der Rückreaktion erwartet, jedoch nicht beobachtet. Offenbar sind die Effekte, die sich auf die M-Rückreaktion auswirken, sehr lokal auf den extrazellulären Bereich beschränkt. Das würde bedeuten, daß die Schiffische Base vermutlich bis in den späten M die Zugänglichkeit zur extrazellulären Seite behält.

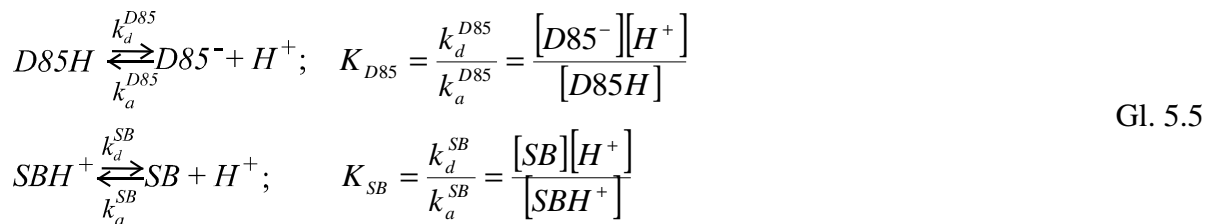
5.4.1 Simulation der Kinetik der M-Rückreaktion

Für die Dissoziation eines Protons von einer Säure AH sind die Dissoziationsrate k_d , die Assoziationsrate k_a und die Gleichgewichtskonstante K definierte Größen, mit folgenden Zusammenhängen:

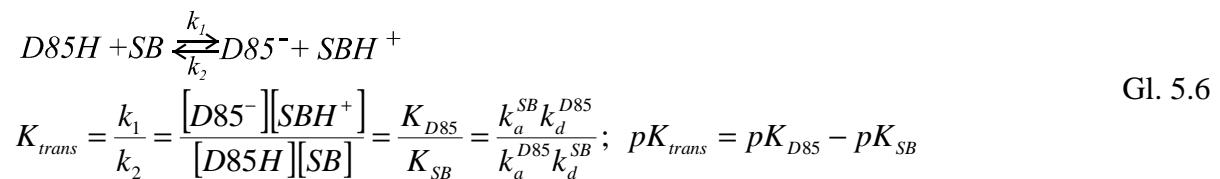


Dabei ist die Dissoziationsrate k_d und damit auch der pK-Wert sehr stark abhängig von der betrachteten Spezies. Die Assoziationsrate k_a dagegen ist limitiert durch die Diffusion der Protonen und ist daher für eine große Anzahl titrierbarer Spezies in wässriger Lösung eine Konstante von sehr hohem Zahlenwert (10^{10} - $10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; Gutman und Nachliel, 1990).

Sind innerhalb eines Proteins zwei solch titrierbaren Gruppen vorhanden, etwa Asp-85 und die Schiffische Base, so gilt für jede der beiden Gruppen eine Beziehung der Art von Gl. 5.4:



Der Protonentransfer zwischen den beiden ist ebenfalls eine Gleichgewichtsreaktion, die durch Kombination der beiden Einzelreaktionen erhalten wird. Dabei verschwindet die Konzentration von H^+ , wenn vorausgesetzt wird, daß sich beide Gruppen im gleichen H^+ Reservoir befinden:



Je nach Wert von pK_{trans} liegt das Gleichgewicht auf der Seite von Asp-85 oder der Schiffischen Base. Für jede der beiden Gruppen gilt eine kinetische Gleichung der Form von Gl. 5.4, die über die Konzentration von H^+ gekoppelt sind. Weil die Assoziationsraten sehr hoch und für beide Gruppen etwa gleich sind (s.o.), sind die langsameren Dissoziationsraten für den Transfer bestimmend. Setzt man voraus, daß in jedem Protein nur ein einziges Proton in der Umgebung von Asp-85 und der Schiffischen Base zur Verfügung steht (was plausibel erscheint denn die beiden Gruppen sind nur 4 Å entfernt), so ist das Proton dann entweder an Asp-85 oder an die Schiffische Base gebunden, so daß die Summe der Konzentrationen von SBH^+ und $D85H$ die Gesamtkonzentration an frei verschiebbaren Protonen ergibt. Wenn man jetzt noch die Konzentrationen auf ein bR-Molekül bezieht, ist die Konzentration ein Wert zwischen 0 und 1. Unter diesen vereinfachenden Annahmen, kann man folgende kinetische Gleichung ansetzen:

$$\frac{d[SBH^+]}{dt} = +k_1[D85H] - k_2[SBH^+]$$

mit

$$[SBH^+] + [D85H] = 1 \quad \text{Gl. 5.7}$$

$$\frac{d[SBH^+]}{dt} = -(k_1 + k_2)[SBH^+] + k_1$$

Stört man das Protonierungsgleichgewicht, indem man eine spontane pK-Änderung der einen oder anderen Gruppe induziert, so wird eine Reaktion erster Ordnung erwartet, und die apparente Rate mit der sich das neue Gleichgewicht einstellt, ist durch die Summe der beiden Dissoziationsraten gegeben.

Während des Photozyklus ändert sich der pK_{trans} von Asp-85 und der Schiffischen Base jedoch durch die Deprotonierung der Protonenabgabegruppe nicht sofort, sondern allmählich (siehe Kap. 5.4). Und zwar liegt zunächst (d.h. im Zeitbereich bis 10 μ s, siehe Abb. 5.5) das Gleichgewicht des $L \leftrightarrow M_1$ Übergangs auf der Seite der protonierten Schiffischen Base (etwa 80%, entspricht $pK_{trans} \approx -1,2$). Erst später wird das Gleichgewicht mit der Deprotonierung ($M_1 \leftrightarrow M_1'$, 70 μ s) der Abgabegruppe zugunsten von Asp-85 verschoben ($pK_{trans} > +1$). Das bedeutet, die Dissoziationsraten sind zeitabhängige Größen. Während des $M_1 \leftrightarrow M_1'$ Übergangs wird der pK_{trans} mit der Zeit der Protonenabgabe ($\tau_d = 70 \mu$ s) von ungefähr -1,2 nach +1 verschoben. Im Photozyklus kann jedoch kein reiner L-Zerfall beobachtet werden, da der L Zustand erst über den K Zerfall besetzt wird. Im M-Signal bei 410 nm (Abb. 5.5), beobachtet man bereits mit der K Zerfallszeit eine schnelle M-Anstiegskomponente bei 1 μ s auf etwa 3-5% des insgesamt gebildeten M. Dies kann man so interpretieren, daß die mikroskopische Rate der $M_1 \rightarrow L$ Reaktion so groß ist, daß bereits mit dem K-Zerfall dieses L- M_1 Gleichgewicht ausgebildet ist.

Die beschriebene pK Änderung im Photozyklus muß andererseits in der M Photorückreaktion wieder rückgängig gemacht werden.

Der pK_{trans} wird also zu einer zeitabhängigen Größe, wenn etwa andere titrierbare Gruppen ihren Ladungszustand ändern. Wenn der Prozeß, an den diese pK-Änderung gekoppelt ist, eine exponentielle Zeitabhängigkeit mit einer Zerfallszeit τ besitzt (wie etwa die Protonenabgabe), so wird in erster Näherung der pK_{trans} ebenfalls diese Zeitabhängigkeit besitzen:

$$pK_{trans}(t) = (pK_0 - pK_\infty)e^{-\frac{t}{\tau}} + pK_\infty \quad \text{Gl. 5.8}$$

Dabei sind pK_0 und pK_∞ die Anfangs- und Endwerte des pK_{trans} . Sei nun etwa nur die Dissoziationskonstante von Asp-85 involviert, so erhält man folgende Zeitabhängigkeit der Raten:

$$k_1(t) = k_2 \left((pK_0 - pK_\infty)e^{-\frac{t}{\tau}} + pK_\infty \right) \quad \text{Gl. 5.9}$$

In die DGl. 5.7 kann nun diese zeitabhängige Rate eingesetzt werden. Mit geeigneten Anfangsbedingungen sowie pK_{trans} Werten und der Zeitkonstanten τ der pK-Änderung kann diese dann numerisch integriert werden (z.B. wie hier mit Mathematica).

Die Simulation des Anstiegs von M im Photozyklus ist wegen der Überlagerung mit der K-Zerfallskinetik (s.o.) nur schwer möglich, da weitere Annahmen über den K-Zerfall gemacht werden müßten. Einfacher ist es bei der Photorückreaktion aus dem M-Intermediat. Als Anfangsbedingung muß hier $[SBH^+](t=0) = 0$ angesetzt werden. Weiterhin verhalten sich die Amplituden der optischen Messung von $a_2 : a_1$ wie 2:1. Das bedeutet, daß nach der ersten Gleichgewichtseinstellung nach der Isomerisierung ein Gemisch aus 1/3 SBH^+ und 2/3 D85H

vorliegt. Mit Gl. 5.6 ergibt sich daraus ein anfänglicher pK_{trans} von $pK_0=0,6$. Wenn die M-Photorückreaktion beendet ist, liegt das Gleichgewicht überwiegend auf der Seite der SB, daher ist $pK_{\infty}=1$ eine erste Abschätzung. Als kinetische Parameter gehen noch die Rate k_2 und Zeitkonstante τ von Gl. 5.9 ein. Die Rate k_2 ist für die erste Gleichgewichtseinstellung verantwortlich, und kann mit 50 ns angesetzt werden (etwas unterhalb der gemessenen Zeit, wenn man die Verstärkeranstiegszeit berücksichtigt). Die Kinetik der pK -Änderung wird durch die Zeitkonstante τ beschrieben. Für diese kann die zweite Zeit der Photorückreaktion, also etwa 500 ns, angenommen werden. Mit diesen Werten erzielt man eine Kinetik wie in Abb. 5.18 abgebildet, die qualitativ der gemessenen in Abb. 5.6 entspricht. Damit ist die eher anschauliche Interpretation des vorhergehenden Abschnitts etwas detaillierter erläutert.

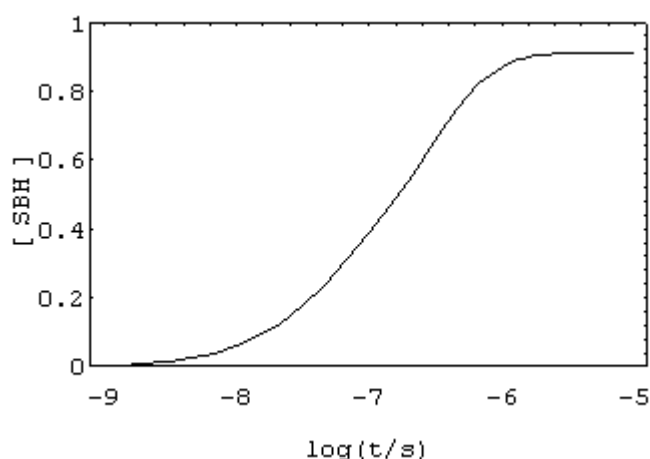


Abb. 5.18 Simulation der M-Photorückreaktion mit dem im Text beschriebenen Modell und Parametern.

5.5 Zeitaufgelöste Messungen der M-Rückreaktion in der Mutante D96A

Die Mutante D96A unterscheidet sich vom Wildtyp dadurch, daß die Asparaginsäure, die als Donor bei der Reprotonierung der Schiffsbasis im Zerfall des M-Intermediats agiert, durch das nicht titrierbare Alanin ersetzt ist. Im Photozyklus der Mutante D96A äußert sich das darin, daß der Zerfall des M-Intermediats, der die Reprotonierung der Schiffsbasis widerspiegelt, gegenüber dem Wildtyp stark verlangsamt ist (Otto et al., 1989). Da sich der erste Teil des Photozyklus, also der Aufbau von M, kaum gegenüber Wildtyp ändert, erhält man insgesamt einen Zyklus, bei dem das M-Intermediat über mehr als zwei Zeitdekaden existiert. Dabei verlangsamt sich der Zerfall von M sehr stark mit zunehmendem äußeren pH-Wert, so daß aus dieser pH-Abhängigkeit geschlossen werden konnte, daß bei fehlendem Donor die Reprotonierung direkt von der zytoplasmatischen Oberfläche erfolgt (Otto et al., 1989). Wegen dieses langlebigen M-Intermediats bietet sich diese Mutante besonders zur Untersuchung der M-Photorückreaktion an. Abb. 5.19 zeigt die Absorptionszeitspur des M-Intermediats der Mutante D96A, bei pH 6,3, das gegenüber dem Wildtyp (Abb. 5.7 oben) eine gute Dekade später zerfällt. Bei dieser Mutante wurden wieder Doppelblitzexperimente mit zweitem blauen Blitz durchgeführt, um die M-Rückreaktion zu untersuchen. Dabei wurde der Zeitabstand von 20 μ s bis 500 ms variiert. Als Ergebnis wurden wieder zwei Komponenten in der Photorückreaktion erhalten, deren Amplituden a_1 und a_2 in einer globalen Anpassung mit denselben beiden Exponentialfunktionen bei jedem Zeitabstand ermittelt wurden. Diese sind ebenfalls in der Abbildung eingetragen. Man erkennt ein ähnliches Verhalten wie beim Wildtyp (Abb. 5.7 unten). Bei kurzen Zeitabständen dominiert a_1 , während später a_2 dominiert. Jedoch ist der Übergang dazwischen nicht so deutlich wie bei dem Wildtyp

ausgeprägt. Dies liegt jedoch vermutlich daran, daß man sich bei einem pH von 6,3 noch nicht so weit über dem pK der Abgabegruppe befindet (siehe Abb. 5.8).

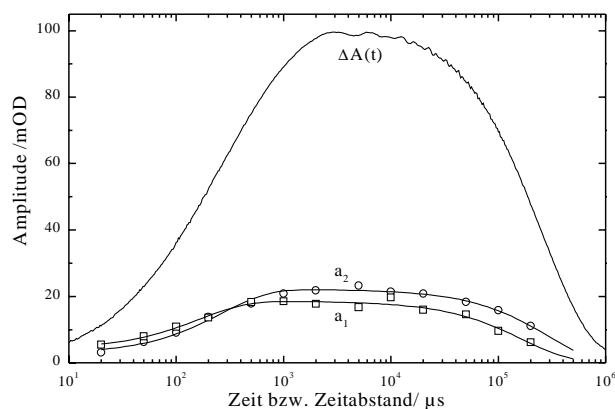


Abb. 5.19 Absorptionszeitspur der Mutante D96A bei 406 nm nach Anregung durch den Nd:YAG-Laser. Außerdem sind die beiden Amplituden a_1 und a_2 der Photorückreaktion aus M, die durch einen zweiten blauen Blitz erzeugt wurde, eingetragen. Die Amplituden ergeben sich wieder aus einer globaler Anpassung der Differenzzeitspuren bei allen Zeitabständen. Dabei wurden die beiden Zeitkonstanten $\tau_1=110$ ns und $\tau_2=720$ ns erhalten. Zur Differenzbildung wurden unterschiedliche f_1 -Werte benutzt: bis $\Delta t=2$ ms 0,75, bis 100 ms 0,8, bei 200 ms 0,9 und bei 500 ms 0,95. Bedingungen: D96A in 10% Polyacrylamidgel bei 15°C, pH 6,3 und 150 mM KCl.

Ebenso wurden Photospannungsmessungen an der Mutante D96A durchgeführt. Abb. 5.20 zeigt im oberen Teilbild das Spannungssignal bei pH 7,9. Im μ s-Bereich gleicht dieses Signal sehr dem des Wildtyps, während der ms Schritt sehr stark verzögert ist (einige 100 ms) und in die Systementladung rutscht. Zwischen diesen beiden Schritten in Pumprichtung liegt noch eine kleinere Komponente mit entgegengesetztem Vorzeichen im Bereich von einigen ms, deren Ursache unklar ist.

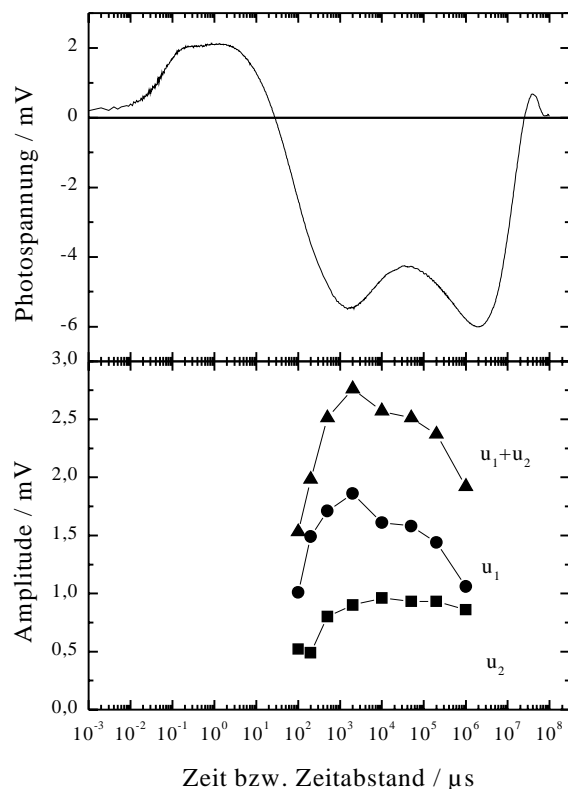


Abb. 5.20 Elektrisches Signal der Mutante D96A bei pH 7,9 (oberes Teilbild). Im unteren Teilbild sind die beiden Amplituden u_1 und u_2 der M-Photorückreaktion gezeigt, die sich wieder aus einer globalen Anpassung bei allen Zeitabständen ergaben. Die Zeitkonstanten dieser beiden Komponenten betragen 180 ns und 1,2 μ s. Der Korrekturfaktor f_1 der Differenzbildung betrug 0,7 für Zeitabstände bis 200 ms und 0,8 bei 1 s. Bedingungen: 150 mM KCl 10°C, pH 7,9.

Beim elektrischen M-Rückreaktionsexperiment ist dasselbe Verhalten zu erkennen, wie bei dem optischen. Bei kurzen Zeitabständen hat man überwiegend die schnelle u_1 -Komponente, während die u_2 Komponente erst etwas verzögert anwächst, jedoch wie beim Wildtyp nicht den Wert der u_1 Komponente übertrifft. Damit gilt die Interpretation der langsamen Komponente der Photorückreaktion aus dem letzten Abschnitt auch bei dieser Mutante. Die Protonenabgabe erfolgt auch hier im ersten Teil des Photozyklus (Holz et al.,

1989), und die damit verbundene pK-Erhöhung von Asp-85 muß wieder rückgängig gemacht werden, ebenso wie in Wildtyp. Daher ist auch hier die langsame Komponente der Photorückreaktion die Wiederherstellung des pK von Asp-85.

Interessant ist, daß sich das Verhalten der beiden Komponenten auch bei extrem langen Zeitabständen nicht wesentlich ändert. In der sehr ähnlichen Mutante D96N wurde aufgrund von FTIR Messungen geschlossen, daß die Struktur in dem späten M-Intermediat bereits dieselbe ist, wie die im N-Intermediat vom Wildtyp (Sasaki et al., 1992). Daher wurde die Nomenklatur M_N eingeführt. Wenn sich trotzdem die M-Rückreaktion nicht ändert, bedeutet das, daß sich die Wechselwirkung zwischen Asp-85 und der Schiffischen Base nicht geändert hat, im Gegensatz zur allgemeinen Auffassung, daß die Schiffische Base ihre Zugänglichkeit von Asp-85 zu Asp-96 im späten M-Zustand ändert.

5.6 Photorückreaktion aus M bei der Mutante R82A

In der Mutante R82A ist die positiv geladene Seitengruppe des Arginin an der Stelle 82 durch das neutrale Alanin ersetzt. Diese Stelle befindet sich im extrazellulären Kanal, zwischen Asp-85 und der Abgabegruppe, und ist Bestandteil des komplexen Gegenions der Schiffischen Base (siehe Einleitung). Damit ist dieses komplexe Gegenion wesentlich verändert, und der pK des purpur-blau Übergangs wird von 2,6 beim Wildtyp zu 7,2 in der Mutante verschoben. Während des Photozyklus der purpur Form von R82A bei pH 8 ist die Reihenfolge von Protonenabgabe und Protonenaufnahme gegenüber dem Wildtyp vertauscht (Otto et al., 1990). Dies ist dadurch erklärbar, daß die fehlende positive Ladung die protonierte Form der Abgabegruppe stabilisiert (Govindjee et al., 1996).

Ebenfalls durch die fehlende positive Ladung erklärbar ist der schnelle L-M Übergang (siehe Abb. 5.21). Dieser erfolgt mit mindestens zwei Komponenten von denen die erste nur einige hundert Nanosekunden schnell ist und bereits die Hälfte der Amplitude ausmacht, und die zweite im Bereich von einigen μs liegt. Wenn die erste der beiden Phasen den schnellen Zerfall von K in ein $L \leftrightarrow M_1$ Gleichgewicht darstellt, so zeigt diese Mutante, daß diese Gleichgewichtseinstellung zwischen Schiffischer Base und Asp-85 durchaus sehr schnell erfolgen kann, wie es auch bei der Interpretation der Photorückreaktion behauptet wurde. Die zweite Phase ist die Gleichgewichtsverschiebung zu vollständiger Protonierung von Asp-85, die im Vergleich zu dem Wildtyp (Abb. 5.7 oben) ebenfalls sehr schnell und mit wesentlich kleinerer Amplitude erfolgt. Diese Gleichgewichtsverschiebung kann jedoch nicht wie in Wildtyp aufgrund der Deprotonierung der Abgabegruppe erfolgen, weil diese Abgabe ja bei dieser Mutante erst sehr spät (ms) stattfindet. Wenn diese Gleichgewichtsverschiebung wie beim Wildtyp über ein wasserstoffbrückengebundenes Netzwerk erfolgt, bei dem Arg-82 beteiligt ist, so ist es eine plausible Annahme, daß in der Mutante dieses Umklappen nur zu einem geringeren Ausmaß erfolgt und daher die zweite M-Anstiegskomponente kleiner ist.

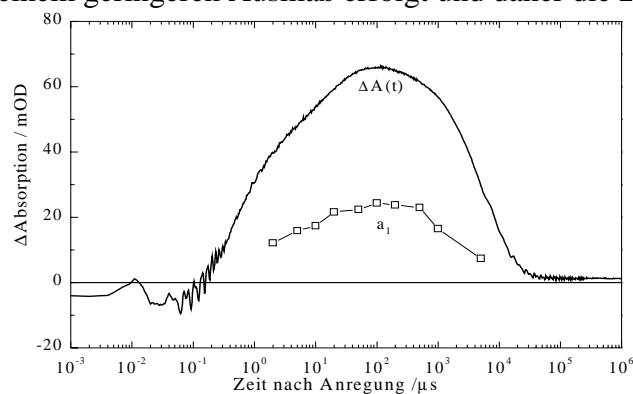


Abb. 5.21 Absorptionszeitspur der Mutante R82A bei 406 nm und pH 8,0 nach Anregung durch den Nd:YAG Laser. Außerdem ist die Photorückreaktion aus M einer globalen Anpassung mit einer Exponentialfunktion bei allen Zeitabständen ausgesetzt worden. Die erhaltene Zeitkonstante beträgt 120 ns und die zugehörige Amplitude a_1 ist in der Abbildung eingezeichnet (\square). Der Korrekturfaktor betrug bei allen Zeitabständen $f_1=0,65$. Bedingungen: Suspension in 150 mM KCl; 15°C.

Nach der früheren Interpretation, daß die a_2 Komponente der Photorückreaktion von M der umgekehrte Weg ist, nämlich das Zurückbringen des pK von Asp-85 auf den

Grundzustandswert, ist es naheliegend, daß diese Komponente in der Mutante kleiner ist als beim Wildtyp, denn die entsprechende Komponente in der Vorwärtsrichtung ist bereits kleiner. Dahingehend paßt die Beobachtung, daß in der Photorückreaktion nur eine schnelle Komponente festgestellt wird. Diese Interpretation der Gleichgewichtsverschiebung, die über Arg-82 gekoppelt ist, erklärt den Widerspruch, daß man bei einer rein elektrostatischen Wirkung von Arg-82 für den Vorwärtsschritt zwar die Beschleunigung in der Mutante auch vorausgesagt hätte, jedoch hätte man für die Rückreaktion von M eine Verlangsamung angenommen.

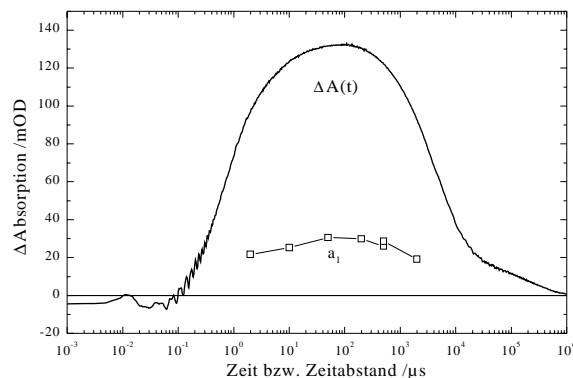


Abb. 5.22 Gleiches Experiment wie im Bild zuvor, jedoch bei pH 10,6. Auch bei diesem pH wurde nur eine einzige Exponentialfunktion von 120 ns zur Anpassung an die M-Rückreaktion benötigt. Die zugehörige Amplitude a_1 ist wieder unter der Absorptionszeitspur eingetragen. Sonstige Bedingungen wie in Abb. 5.21.

Bei einer Erhöhung des pH Wertes über 10 ändert sich die Reihenfolge von Protonenabgabe und Aufnahme wieder wie beim Wildtyp (Govindjee et al., 1996). Dennoch wird in der M-Rückreaktion nur die schnelle Komponente beobachtet (Abb. 5.22). Daher ist in dieser Mutante auch bei hohem pH die Protonenabgabe nicht oder nur schwach mit einer pK-Erhöhung von Asp-85 gekoppelt.

Elektrische Messungen der Rückreaktion von M sind leider nicht sinnvoll, da bei dieser Mutante das elektrisch „blaue Signal“ (Moltke, 1993) überlagert ist, und außerdem die Gesamtamplitude der Photospannung und damit auch die des M-Intermediats nur recht gering ist, vermutlich aufgrund von schlechter Anlagerung (siehe Abb. 5.23). Daher ist eine Photorückreaktion aus M elektrisch kaum detektierbar. Eine Anpassung an das elektrische Signal der Vorwärtsreaktion erfordert fünf Exponentialfunktionen für die aktiven Komponenten, eine für den Systemanstieg und drei für die Systementladung. Die große Amplitude des Systemanstiegs rührt von dem Anteil, der noch im blauen Zustand befindlichen Moleküle her. Für den M-Aufbau werden zwei Komponenten mit 200 ns (21%) und 4 μ s (12%) benötigt. Die entgegengesetzte Komponente mit 200 μ s (-29%) wurde wegen der schlechten Reproduzierbarkeit als Ausdruck einer gestörten Stabilität interpretiert, die zur transienten Protonierung einer jeweils anderen Gruppe führt (Moltke, 1993). Danach folgt noch eine Komponente mit 1,5 ms (48%) und eine mit 20 ms (19%) zur Vervollständigung des Zyklus. Dabei beziehen sich die Prozentangaben auf die Summe der positiven Amplituden.

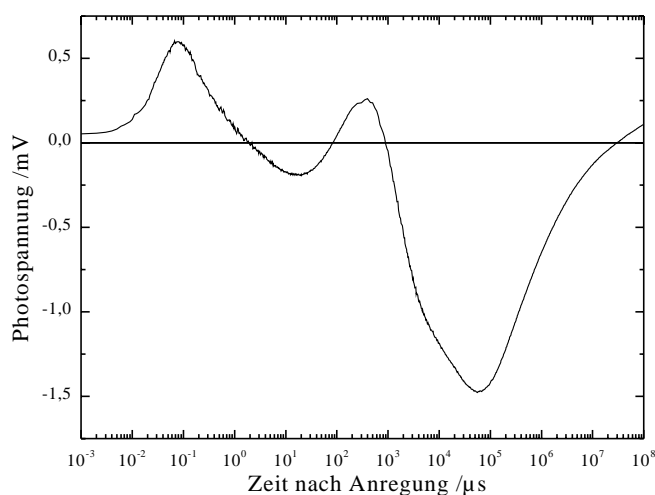


Abb. 5.23 Elektrisches Signal der Mutante R82A nach Anregung mit dem Nd:YAG Laser. Die früh einsetzende und etwas ungewöhnlich aussehende Systementladung läßt auf eine nicht optimale Anlagerung schließen.

Bedingungen: pH 7,9; 22°C, 150 mM KCl.

5.7 Zeitaufgelöste Messungen an der Mutante E204Q

In dieser Mutante ist die Glutaminsäure an der Stelle 204 durch das neutrale Glutamin ersetzt. Im Wildtyp wurde Glu-204 als Protonenabgabegruppe im L-M Übergang auf der Basis von FTIR Messungen vorgeschlagen (Brown et al., 1995). Der pK der Abgabegruppe während des Photozyklus ist 5,8 (Zimányi et al., 1992), d.h. daß bei einem pH unterhalb dieses pK's die Protonenabgabe nicht mehr im L-M Übergang stattfindet, sondern die Glutaminsäure 204 protoniert und damit neutral bleibt. Genau dieser neutrale Zustand an der Stelle 204 wird in der Mutante E204Q künstlich erzeugt. Daher weist der Photozyklus dieser Mutante (siehe Abb. 5.24) sehr große Ähnlichkeiten mit dem Photozyklus von Wildtyp bei niedrigem pH (siehe Abb. 5.31) auf, denn in beiden wird das O-Intermediat stark besetzt, und die Protonenabgabe findet nicht im L-M Übergang statt (Misra et al., 1997). Bei E204Q dauert jedoch der Zerfall des O-Intermediats und damit der ganze Photozyklus eine Dekade länger als in Wildtyp.

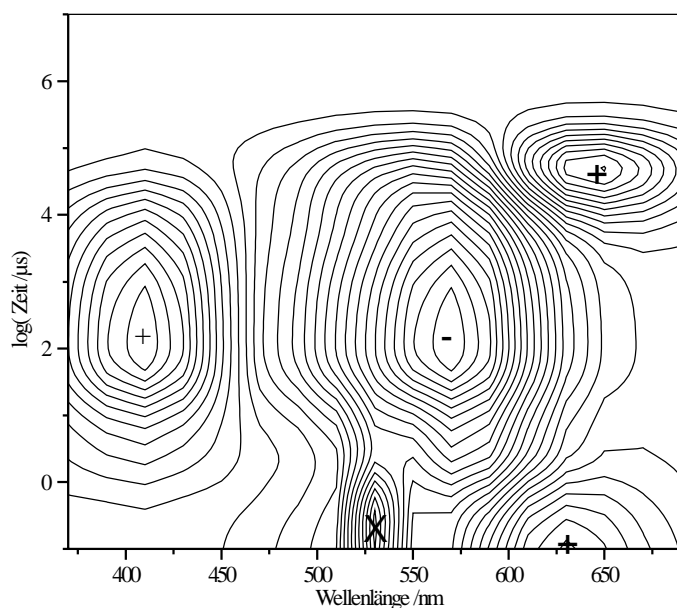


Abb. 5.24 Kontourplot der Absorptionsänderung der E204Q Mutante bei Anregung durch den Nd:YAG-Laser. Zur Erzeugung des Kontourplots wurde eine globale Anpassung an die Zeitspuren bei allen Wellenlängen mit denselben 6 Exponentialfunktionen durchgeführt. +/-: Vorzeichen der Absorptionsänderung, X: Artefakt durch Streulicht des Blitzes, 35 mOD/Höhenlinie. Bedingungen: pH 6,8; 22°C; 10% Polyacrylamidgel; 150 mM KCl. Gemessen wurde bei 17 Wellenlängen zwischen 370 nm und 690 nm.

Der schnelle Teil des Photozyklus ist gegenüber dem Wildtyp ebenfalls leicht geändert. Im Signal bei 410 nm ist zu erkennen, daß der Fuß der μ s-Komponente erhöht ist (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet im Modell von Abschnitt 5.4.1, daß das schnelle Protonierungsgleichgewicht zwischen der Schiffschschen Base und Asp-85 im ersten L-M Schritt stärker auf

der Seite von Asp-85 liegt. Dies ist zunächst verwunderlich, da bei neutralem pH die Protonenabgabegruppe Glu-204 in Wildtyp und Glutamin in der Mutante E204Q neutral vorliegen. Dennoch können Unterschiede dadurch entstehen, daß beide Gruppen unterschiedliche Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können, und dadurch in der E204Q Mutante im M-Aufbau ähnliche Abweichungen auftreten wie bei R82A, bei der die Wasserstoffbrücken im extrazellulären Kanal noch stärker gestört sind.

Experimente mit pH-Indikatoren haben ergeben, daß die Protonenaufnahme vor der Protonenabgabe erfolgt, und daß Aufnahme und Abgabe mit Aufbau und Zerfall des O-Intermediats koinzidieren (Misra et al., 1997). Da die Protonenabgabegruppe, die sich beim Wildtyp dicht unter der extrazellulären Oberfläche befindet, in der Mutante nicht mehr existiert, muß hier das Proton vermutlich den ganzen Weg von Asp-85 zur extrazellulären Oberfläche während des O-Zerfalls zurücklegen. Tatsächlich zeigen die elektrischen Messungen (Abb. 5.25), daß der größte Teil der Ladungsverschiebung im langsamen Millisekundenbereich stattfindet, während der Mikrosekundenschritt gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert ist.

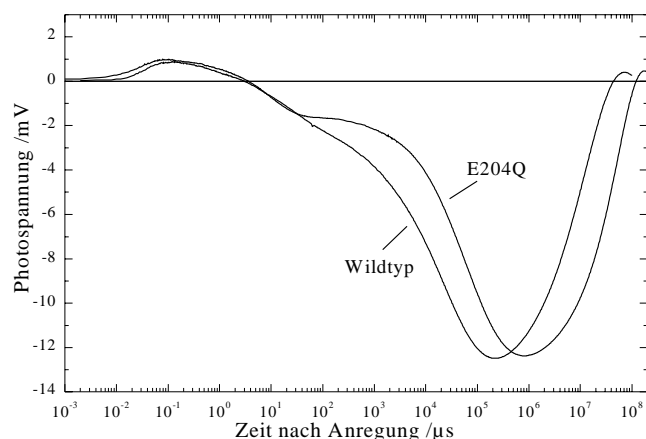


Abb. 5.25 Vergleich des elektrischen Signals der Mutante E204Q (rechte Zeitspur) mit dem des Wildtyps (linke Zeitspur). Die Amplituden wurden auf die gleiche Gesamtspannung skaliert. Bedingungen: 22°C; pH 7,2; E204Q: 150 mM KCl; Wildtyp: 150 mM K₂SO₄.

Man sieht, daß die Signale zu Beginn bis 30 µs sehr gut übereinstimmen. Das Spannungssignal im µs-Bereich nimmt beim Wildtyp dann jedoch weiter zu, während die Spannung bei E204Q einen nahezu konstanten Wert im Zeitbereich zwischen 100 µs und 1 ms einnimmt. Im langsamen Zeitbereich von 10-100 ms scheint die Zeitspur der Mutante, um fast eine Dekade langsamer, parallel zu laufen. Eine genauere Analyse der beiden Zeitspuren mit jeweils 7 Exponentialfunktionen für die aktiven Komponenten ergeben die folgenden Werte. Dabei ist zum besseren Vergleich der Daten bei τ_3 und τ_7 jeweils ein Eintrag ausgelassen worden:

		E204Q		Wildtyp		
a ₀	τ_0	-7%	27 ns	-8%	37 ns	Systemanstieg
a ₁	τ_1	3%	680 ns	4%	670 ns	K→L
a ₂	τ_2	15%	11 µs	9%	10 µs	L→M ₁
a ₃	τ_3	-		9%	71 µs	M ₁ →M ₁ '
a ₄	τ_4	4%	910 µs	12%	1,2 ms	?
a ₅	τ_5	14%	13 ms	25%	12 ms	M→N
a ₆	τ_6	34%	61 ms	32%	54 ms	N→O (→bR Wildtyp)
a ₇	τ_7	23%	220 ms	-		O→bR (E204Q)

(Die Prozentangaben ergeben sich aus $a_i / \sum_i |a_i|$).

Beim Wildtyp wird der Schritt im µs Zeitbereich üblicherweise mit einer Gauß-verteilter Kinetik angepaßt, dessen Maximum bei 35 µs liegt (Holz, 1990). Benutzt man statt dessen zwei Exponentialfunktionen zur Anpassung, so ergeben sich Zeitkonstanten von 10 und 70 µs

für diesen Schritt und man erhält eine qualitativ gleichwertige Anpassung. Dasselbe gilt auch für den Schritt im Millisekunden Zeitbereich. Die Exponentialfunktionen lassen sich besser mit der Mutante E204Q vergleichen, denn hier taucht nur eine Komponente mit 11 μs auf und die 70 μs Komponente fehlt. Wenn die Beobachtung richtig ist, daß bei E204Q die Protonenabgabe an die Oberfläche ausbleibt (Brown et al., 1995, Misra et al., 1997), so sind mehrere Interpretationen des Prozesses mit der Zeitkonstanten von 70 μs und etwa 9% Amplitude möglich. Die erste ist die, daß beim Wildtyp dieser Prozeß der Protonenabgabe an die Oberfläche die elektrische Spannungsamplitude verursacht. Dagegen spricht jedoch, daß der Weg des Protons von Glu-204 zur Oberfläche nur 3-4 Å (entspricht etwa 5-7%) ausmacht. Außerdem reduziert der hohe Dielektrizitätswert in der Nähe der Oberfläche die Spannungssignale zusätzlich. Daher scheint die Interpretation plausibler, die auch in der Diskussion bei der Photorückreaktion aus dem M-Intermediat gewählt wurde: Die Bewegung der positiv geladenen Arg-82 Seitengruppe bewirkt beim Wildtyp die Kopplung zwischen der Protonierung von Asp-85 und der Deprotonierung der Protonenabgabegruppe. In der Mutante E204Q bleibt diese Kopplung aus. Die beiden elektrischen Schritte im Wildtyp wurden bis jetzt nicht getrennt betrachtet, sondern als ein einziger „verschmierter“ 35 μs Schritt für den L-M Übergang aufgefaßt.

Im mittleren Zeitbereich taucht auch in der Mutante die Komponente von 900 μs auf (wenn auch mit kleinerer Amplitude als im Wildtyp), die im optischen Signal keine analoge Komponente zeigt (Holz, 1990). Da in dieser Mutante die Protonenabgabe erst spät auftritt, kann diese übrigbleibende Komponente nicht die Ablösung der Protonen von der Oberfläche sein, wie man es nach Experimenten mit pH-Indikatoren beim Wildtyp (Alexiev et al., 1995) annehmen könnte. Da es sich nur um eine kleine Komponente handelt, könnte dieser Prozeß die Öffnung des zytoplasmatischen Kanals während M sein (Richter et al., 1996), die sich nur in einer Dielektrizitätszahländerung äußert, jedoch keine echte Ladungsverschiebung ist.

Anstatt der 70 μs Komponente taucht in E204Q eine langsame 220 ms-Komponente auf, die von der Amplitude her die 70 μs Komponente vom Wildtyp als auch Teile der 1,2 ms und 12 ms Komponente vom Wildtyp beinhalten könnte. Die Zeitkonstante dieser Komponente stimmt gut mit den pH-Indikatormessungen von Misra überein, die zeigen, daß in diesem Zeitbereich des Zerfalls von O, eine Protonenabgabe erfolgt. Das Vorzeichen dieser elektrischen Messung beweist, daß diese Ladungsverschiebung in Richtung der extrazellulären Seite erfolgt, wie bereits von Misra vermutet. Daher könnte in dieser Mutante die Protonenabgabe in diesem späten Zeitbereich direkt von der Asp-85 auf die extrazelluläre Oberfläche erfolgen, denn die Amplitude für diesen Schritt hat einen großen Anteil (23%).

Bei Wildtyp wird im Zerfall von O die Protonenabgabegruppe von Asp-85 reprotoniert. Wenn die Vorstellung richtig ist, daß sich die Seitengruppe von Arg-82 im Aufbau von M bewegt hat, dann sollte dies später im Zyklus wieder rückgängig gemacht werden, um in den Grundzustand zu gelangen. Dies geschieht dann vermutlich ebenfalls im Zerfall von O. Diese Rückbewegung von Arg-82 ist der Ladungsbewegung der Reprotonierung der Protonenabgabegruppe von Asp-85 entgegen gerichtet, so daß man im Zerfall von O beim Wildtyp nur eine kleine Ladungsverschiebung erhält, die nicht mehr getrennt von der großen Amplitude des N-Zerfalls zu beobachten ist.

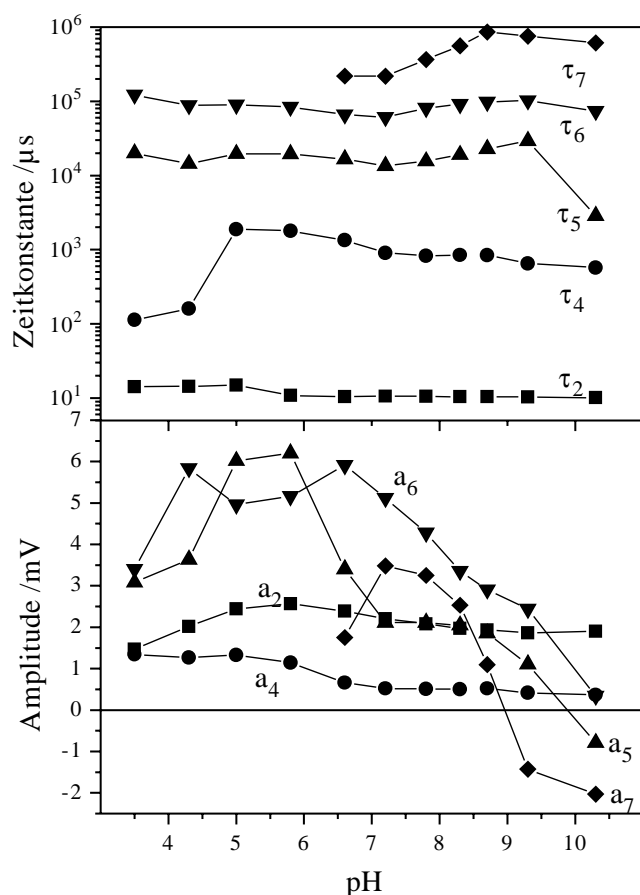


Abb. 5.26 pH-Abhängigkeit der elektrischen Amplituden nach Photoanregung von E204Q. Für eine Anpassung ohne systematische Abweichungen sind 9-10 Exponentialfunktionen notwendig (unter-/oberhalb pH 6). Davon werden 3 für die Systementladung benötigt. Bedingungen: 22°C; 150 mM KCl.

Im Millisekunden Bereich werden drei Zeitkonstanten benötigt, was in guter Übereinstimmung zu den optischen Messungen von Misra steht, die ebenfalls drei M-Zerfallskomponenten aufweisen. Die erste ist der Übergang in ein M-N Gleichgewicht (τ_5), die zweite ist der Zerfall (τ_6) des M-N Gleichgewichtes nach O und die letzte ist der O Zerfall (τ_7).

Mit τ_5 im 10-ms Zeitbereich erfolgt die interne Reprotonierung der Schiffsbasis von Asp-96, die wegen des langen Verschiebewegs mit einer großen elektrischen Amplitude verknüpft ist. Sie ist in E204Q kleiner als bei dem Wildtyp, vermutlich weil das M-N Gleichgewicht hier zunächst stärker bei M liegt. Danach folgt die Reprotonierung von Asp-96 von der zytoplasmatischen Seite (τ_6). Dieser Schritt ist ebenfalls mit einer großen Amplitude verbunden und in E204Q größer, weil hier noch ein Teil von dem vorhergehenden M-N Gleichgewicht hinzukommt. Diese Komponente sollte mit steigendem pH langsamer werden, während das interne N-M Gleichgewicht pH unabhängig sein sollte. In den optischen Messungen von Misra wird dieses Verhalten auch gezeigt. In den entsprechenden Raten in meinen elektrischen Messungen (Abb. 5.26) ist dieses unterschiedliche Verhalten leider nicht zu erkennen, vielmehr werden τ_5 und τ_6 gleichzeitig langsamer. Dies liegt jedoch möglicherweise daran, daß in den elektrischen Messungen die Zeiten nicht so deutlich getrennt sind und deshalb der Effekt auf die Komponente mit der großen Amplituden (τ_6) auf den Prozeß mit der kleineren Amplitude übertragen wird (τ_5). Von den Zeitkonstanten her könnten die beiden Prozesse jedoch mit denen von Misra übereinstimmen.

Die letzte Komponente im elektrischen Signal (τ_7) stimmt sowohl zeitlich, als auch in der pH-Abhängigkeit (denn die Komponente wird erst ab pH 6,6 aufwärts beobachtet), mit der dritten M-Zerfallskomponente von Misra überein. Dort wurde beobachtet, daß dieser Photozyklusschritt mit dem O-Zerfall korreliert ist und gleichzeitig eine Protonenabgabe stattfindet. Mit dem Vorzeichen der Ladungsverschiebung in meinen Messungen zusammen

folgt daraus, daß die Protonenverschiebung in diesem Zeitbereich in Richtung der extrazellulären Seite erfolgt, wie es bereits bei Misra angenommen wurde.

Etwas merkwürdig erscheint jedoch das Amplitudenverhalten bei hohem pH: Zunächst wechselt die τ_7 Komponente das Vorzeichen (pH 9.3). Das könnte daran liegen, daß im geöffneten Kanal der äußere pH über dem transienten pK von Asp-96 liegt, und die Protonen dann nur teilweise von Asp-96 zur Schiffischen Base transferiert werden. Dies erfolgt mit der herkömmlichen Zeitkonstante, jedoch mit reduzierter Amplitude. Ein anderer Teil der noch protonierten Asp-96 könnte jedoch in Richtung der zytoplasmatischen Seite deprotonieren und damit ein entgegengesetztes Vorzeichen liefern. Bei noch höherem pH (10,3) ist eventuell schon ein Teil von Asp-96 deprotoniert und mit dem Öffnen des zytoplasmatischen Kanals bleibt die Re protonierung der Schiffischen Base von Asp-96 ganz aus (a_5 und a_6 werden kleiner). Dann bleibt die Frage, was die Bedeutung der 2 ms Komponente ist, die bei diesem pH mit entgegengesetzter Amplitude auftaucht (a_5). Möglicherweise deprotoniert noch eine weitere Gruppe in Richtung der zytoplasmatischen Oberfläche, wenn der zytoplasmatische Kanal aufgeht, denn dies würde zu einer negativen Spannungskomponente führen.

Interessant ist auch, daß der Einbruch der μ s-Amplitude im Vorwärtsschritt, der im Wildtyp bei pH 8 (Abb. 5.17) beobachtet wird, bei E204Q (a_2) ausbleibt. Dieser Einbruch wurde beim Wildtyp mit der Deprotonierung der Abgabegruppe in Verbindung gebracht (Abschnitt 5.4). Durch diese Deprotonierung wird in Wildtyp die Orientierung der positiv geladenen Arg-82 Seitengruppe in Richtung der negativ geladenen Abgabegruppe festgelegt. Während des Zyklus kann sich daher die Arg-82 Seitengruppe nicht bewegen, und die μ s-Komponente wird reduziert.

In der Mutante E204Q ist die Abgabegruppe neutralisiert. Deshalb kann im Zyklus dieser Mutante die frühe Protonenabgabe über dem ganzen pH Bereich nicht stattfinden. Andererseits ist vermutlich die Reorientierung von Arg-82 an diese Protonenabgabe gekoppelt. Daher findet vermutlich auch die Bewegung von Arg-82 nicht statt, die μ s-Komponente ist immer reduziert und der Einbruch bei pH 8 bleibt aus.

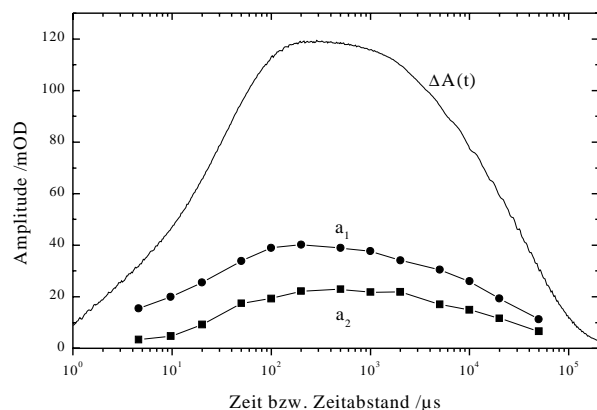


Abb. 5.27 Zeitspur der Absorptionsänderung der Mutante E204Q bei 406 nm ($\Delta A(t)$). Außerdem die beiden Komponenten der Photorückreaktion von M bei einer globalen Anpassung bei allen Zeitabständen mit 72 ns und 600 ns. Bedingungen: 15°C; pH 6,9; 150 mM KCl; Polyacrylamidgel; $f_1=0,65$; außer bei $\Delta t=10, 20$ und 50 ms wurde $f_1=0,7; 0,75$ und 0,8 gesetzt.

Ebenso wie in den vorherigen Abschnitten wurde auch die M-Rückreaktion bei E204Q zeitaufgelöst gemessen. Auf eine Einzelanalyse bei den verschiedenen Zeitabständen wurde hier verzichtet, und nur eine globale Anpassung über sämtliche Zeitabstände durchgeführt, die Zeiten von 72 ns und 600 ns ergab. Auffällig ist, daß die langsame M-Rückschuß Amplitude a_2 immer noch auftaucht, obwohl die Protonenabgabe erst im ms-Zeitbereich einsetzt. Jedoch ist die Amplitude gegenüber Wildtyp ($a_1:a_2=2:1$) reduziert auf 1:2. Bei Wildtyp wurde die Verschiebung des Asp-85 - Schiffische Base Gleichgewichtes im L-M Übergang mit dem Umklappen von Wasserstoffbrückenbindungen und der Bewegung der Seitengruppe von Arg-82 im extrazellulären Kanal in Verbindung gebracht. Der a_2 Komponente wurde das Rückgängigmachen dieser pK Verschiebung zugeordnet. In der Mutante erstrecken sich diese Wasserstoffbrücken nicht mehr über den vollständigen Weg bis Position 204 und der pK von

Asp-85 wird im Vorwärtsschritt L-M nicht so stark erhöht wie in Wildtyp. Die a_2 Komponente, die das Zurückkommen des pK's im Rückwärtsschritt symbolisiert, ist damit von kleinerer Amplitude. Bei der Rückreaktion ist die erste schnelle Komponente größer, das Gleichgewicht bei der Rückreaktion von M liegt also zunächst weiter bei der protonierten Schiffsbasis als bei dem Wildtyp. Offenbar verhält sich die Photorückreaktion aus M ebenso wie die Vorwärtsreaktion im L-M Schritt: Ist hier die schnelle Komponente gegenüber Wildtyp erhöht, so ist es auch in der Photorückreaktion der Fall (siehe auch R82A). Dies steht der einfachen Vorstellung entgegen, daß bei einem schnellem Vorwärtsschritt der Rückwärtsschritt langsamer erfolgt, wie man es bei einer rein elektrostatischen Betrachtung erwartet hätte.

Elektrische Messungen der M-Photorückreaktion bei E204Q sind mit der optischen konsistent, jedoch ist die langsamere Amplitude jetzt noch schwerer zu erkennen (<20% (Daten daher nicht gezeigt).

Neben dem Glutamat in Position 204 wurde auch das Glutamat in Position 194, das sich eine Helixwindung weiter zur extrazellulären Seite hin befindet als Position 204, als Protonenabgabegruppe vorgeschlagen (Balashov et al., 1997). In der E194C Mutante ist das Glutamat durch ein Cystein ersetzt. Diese Mutante hat den Nachteil, daß das Cystein eine titrierbare Gruppe ist. Für diese Mutante wurde ein pK-Wert von 5,2 für die Protonenabgabegruppe gefunden, so daß hier bei neutralem pH bereits keine Protonenabgabe mehr stattfinden kann (Balashov et al., 1997). Im Vergleich dazu findet diese Deprotonierung in Wildtyp mit einem pK Wert von 9,5 statt. Das elektrische Signal der Mutante E194C (Abb. 5.28) hat in der Tat sehr viele Ähnlichkeiten mit dem der E204Q Mutante (Abb. 5.25). Die Zeitspuren von der Mutante und vom Wildtyp wurden so aufeinander skaliert, daß beide dieselbe K-Amplitude bei 100 ns erreichen. Dadurch verlaufen beide Zeitspuren deckungsgleich bis etwa 30 μ s. Die Spannung des Wildtyps nimmt dann weiter ab, während sie sich bei der Mutante bis etwa 1 ms kaum ändert. Dieses Verhalten ist wie bei der E204Q Mutante. Im Bereich von 10-100 ms laufen die beiden Zeitspuren wieder parallel. Die Endspannung des Wildtyps wird bei der Mutante jedoch nicht erreicht. Das könnte jedoch an einer schlechten Anlagerung liegen, die zu einer früheren Systementladung als bei der E204Q Mutante führt. Die Mutanten E204Q und E194C zeigen damit sehr ähnliches Verhalten: Die Amplitude der μ s-Komponente ist reduziert, die ms-Komponente eine Dekade verlangsamt. Aufgrund dieser Merkmale sind E204 und E194 beides mögliche Protonenabgabegruppen, zwischen denen durch die elektrischen Messungen der Mutanten keine Differenzierung getroffen werden kann. Da die Eliminierung einer der beiden Gruppen ausreicht, um die Protonenabgabe zu verhindern (Balashov et al., 1997; Brown et al., 1995), wurde der Begriff „Protonenabgabekomplex“ eingeführt.

Ein Nachteil bei der Untersuchung der E194C Mutante ist die Protonierbarkeit des Cysteins, die in den elektrischen Messungen zu einer pH abhängigen Amplitude der μ s Komponente führt (Daten nicht gezeigt), während bei der E204Q Mutante diese Amplitude über einen großen pH Bereich konstant ist.

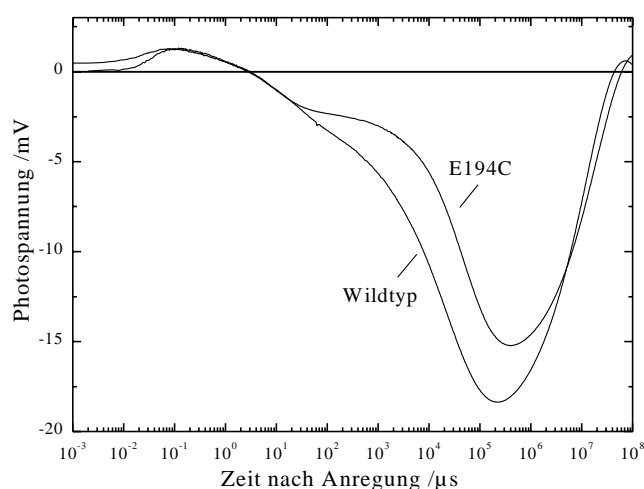


Abb. 5.28 Vergleich des elektrischen Signals der Mutante E194C (rechte Zeitspur) mit dem des Wildtyps (linke Zeitspur). Die Amplituden wurden auf die gleiche K-Amplitude im Bereich von 100 ns skaliert. Dadurch überlagern die Zeitspuren über den ganzen Bereich bis etwa 30 μ s.

Bedingungen: 22°C; pH 7,2; E194C: 150 mM KCl; Wildtyp: 150 mM K₂SO₄.

5.8 Möglicher Beitrag der Arg-82 Seitengruppe zum Protonentransport in bR

In der Diskussion der Photorückreaktion aus M wurde bereits auf einen möglichen Beitrag der Bewegung der positiv geladenen Seitengruppe von Arg-82 zur elektrischen Amplitude des M-Aufbaus hingewiesen. Die Beobachtung war hier, daß bei einem pH oberhalb 8 die elektrische M Amplitude stark abnimmt, obwohl die optische Amplitude bei hohem pH keinen Einbruch erleidet (Abb. 5.17).

Scharnagl und Fischer (1996) haben in einer theoretischen Arbeit gezeigt, daß sich im Ausgangszustand bR die Seitengruppe Arg-82 mit steigendem pH infolge der Deprotonierung von Glu-204 zur extrazellulären Oberfläche hin orientiert. Daraus erwächst die Idee, daß im Photozyklus bei neutralem pH die positiv geladene Seitengruppe von Arg-82 von einer Position in der Nähe von Asp-85 in eine Position in der Nähe der Glu-204 umklappen und damit die Protonenabgabe zur extrazellulären Seite hin auslösen könnte (siehe Abb. 5.29). Protonenabgabe und Umklappen der geladenen Seitengruppe Arg-82 liefern Beiträge zum elektrischen Signal mit demselben Vorzeichen. Die Protonenabgabe von 204 an die extrazelluläre Seite erfolgt über einen Weg von 4 Å. Direkt unter der Oberfläche ist die Dielektrizitätskonstante aufgrund der Benetzung mit Wasser höher, so daß bei der Protonenabgabe vermutlich nur eine geringe Spannung abfällt. Die Strecke vom C_α Atom des Arg-82 zum positiv geladenen Ende der Seitengruppe beträgt 6 Å. Bei einer nur teilweise angenommenen Reorientierung von +45° auf -45° zur Membranfläche erhält man einen Verschiebeweg von 8 Å in Richtung der Membrannormalen. Da diese Reorientierung im Inneren der Membran stattfindet, sollte wegen der geringeren Dielektrizitätskonstante dabei eine wesentlich höhere Spannung abfallen als bei der Protonenabgabe. Da bei dem Aufbau des M-Intermediats sowohl in optischen als auch in elektrischen Messungen ein großer kinetischer Isotopeneffekt beobachtet wird, wird außer der Reorientierung der Seitengruppe auch ein Beitrag von umklappenden Wasserstoffbrückenbindungen angenommen (le Coutre et al., 1996). Die positiv geladene Seitengruppe Arg-82 ist vermutlich über eine Wasserstoffbrückenbindung an ein Wassermolekül zum Inneren des Proteins hin gebunden und gleichzeitig über eine weitere Wasserstoffbrückenbindung an die Seitengruppe T205 zur extrazellulären Seite hin (Pebay-Peyroula et al., 1997).

Mit diesem grob charakterisierten Mechanismus sind nun eine Reihe von Beobachtungen erklärbar:

-Bei hohem pH ist die Protonenabgabegruppe deprotoniert und damit die Orientierung von Arg-82 zur extrazellulären Seite festgelegt. Dadurch wird die elektrische Amplitude des

M-Aufbaus bei hohem pH reduziert. Außerdem ist der pK von Asp-85 permanent erhöht, so daß der M-Aufbau mit schneller Kinetik erfolgt.

-Im Photozyklus bei neutralem pH findet der oben beschriebene Mechanismus des Umklappens der Arg-82 Seitengruppe statt. Dadurch wird der pK von Asp-85 erhöht, und das Protonierungsgleichgewicht zwischen Schiffscher Base und Asp-85 wird zu Asp-85 verschoben. Damit ist der M-Aufbau an die Protonenabgabe gekoppelt. In der Photorückreaktion von M findet man eine langsame Phase. Diese wird dadurch erklärt, daß der pK von Asp-85 wieder auf den Grundzustandswert gebracht werden muß.

-Die große Amplitude des O-Zerfalls bei E204Q wurde mit der Ladungsverschiebung von Asp-85 zur extrazellulären Oberfläche in Verbindung gebracht. Bei Wildtyp wird im Zerfall von O die Protonenabgabegruppe an der extrazellulären Oberfläche von Asp-85 reprotoniert. Dennoch wird nur eine kleine Spannungsamplitude beobachtet. Dies wird dadurch erklärt, daß in diesem Zerfall die Seitengruppe von Arg-82 wieder in ihre Position im Grundzustand zurückkehrt, und damit das Spannungssignal des anderen Prozesses kompensiert.

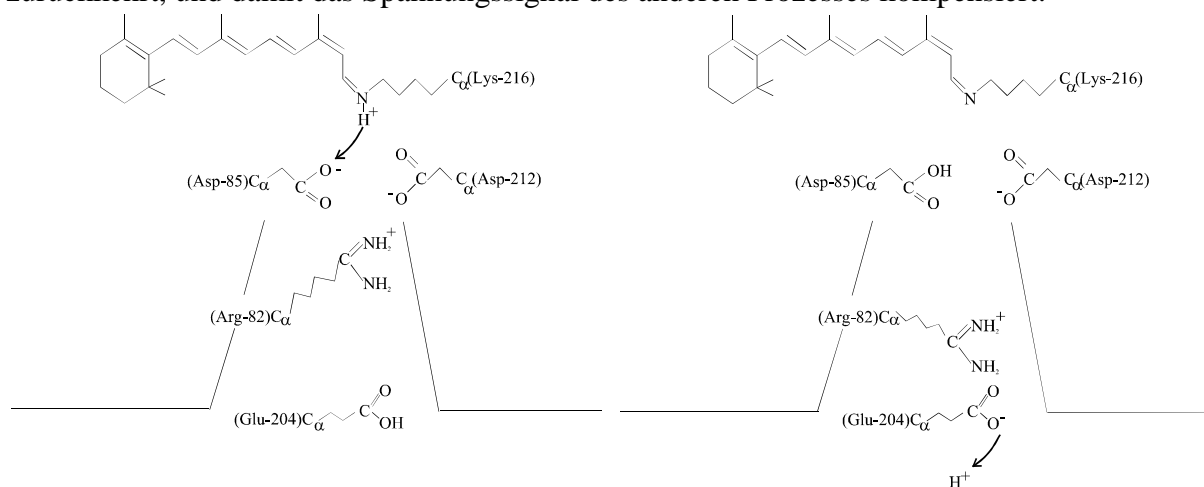


Abb. 5.29 Schematische Darstellung der möglichen Bewegung der positiv geladenen Guanidinium Gruppe in Position 82. Im Ausgangszustand links ist die Gruppe zur Asp-85 Gruppe hin orientiert (Kimura et al., 1997). Nach der Deprotonierung der Protonenabgabegruppe 204 (rechts) ist die Gruppe zur extrazellulären Seite hin orientiert (Scharnagl und Fischer, 1996). Im Photozyklus koppelt die Orientierung dieser Seitengruppe das Gleichgewicht zwischen Schiffscher Base und Asp-85 an das Gleichgewicht von Protonenabgabegruppe 204 und Membranoberfläche. Diese Kopplung erfolgt mit einer Zeitkonstanten von 70 μ s und bei der Photorückreaktion aus M mit 500 ns (siehe Abschnitt 5.4.1). In der Struktur von bR werden mindestens 8 Wassermoleküle angenommen, von denen drei in der Umgebung von Arg-82 Platz finden und an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind (Pebay-Peyroula et al., 1997).

-Bei der R82A Mutante erfolgt die Protonenabgabe nicht mehr mit dem M-Aufbau sondern erst viel später (Otto et al., 1990), denn die Kopplung des pKs von Asp-85 mit der Protonenabgabegruppe via der Bewegung von Arg-82 kann nicht stattfinden. Die fehlende positive Ladung in Position 82 erhöht lediglich den pK von Asp-85, was zu einer schnelleren M-Aufbau Kinetik führt. Die M-Rückreaktion erfolgt nun ebenfalls nur mit der schnellen Komponente, da nicht die große pK-Änderung von Asp-85 auftritt, die beim Wildtyp durch die Bewegung der Seitengruppe von Arg-82 vermittelt wird.

-In der Mutante E204Q ist die Protonenabgabegruppe nicht vorhanden, diese Gruppe ist nun permanent neutral. Wenn beim Wildtyp die Bewegung der Arg-82 die Protonenabgabe verursacht, dann ist umgekehrt leicht vorstellbar, daß bei nicht möglicher Protonenabgabe auch die Bewegung der Seitenkette von 82 eingeschränkt ist. Die reduzierte M-Amplitude im elektrischen Signal dieser Mutante ist daher ein weiterer Hinweis auf die Bewegung der Seitengruppe 82 im Wildtyp. Die langsame Phase im Signal der Photorückreaktion von M besitzt nur eine kleine Amplitude, die möglicherweise durch das Zurückbringen des pK von

Asp-85 aufgrund einer kleinen restlichen Bewegung von Arg-82 oder der Umlagerung weniger Wasserstoffbrücken verursacht wird.

Trotz dieser Hinweise fehlt ein direkter Beweis für die Bewegung dieser Seitengruppe. Dieser könnte mit hochauflösenden Strukturmessungen erbracht werden, die jedoch zusätzlich noch zeitaufgelöst betrieben werden müßten.

5.9 Die Photoreaktion aus dem N-Intermediat

Das Nachfolgeintermediat von M ist das N-Intermediat. Dieses besitzt wieder ein Absorptionsmaximum von 550 nm, denn die Schiffsche Base wurde vom Donor Asp-96 auf der zytoplasmatischen Seite wieder reprotoniert (Otto et al., 1989). Der M-N Übergang erfolgt mit einer $N \rightarrow M$ Rückrate, so daß zwischen N und M immer ein vorübergehendes Gleichgewicht herrscht. Bei neutralem pH ist dieses Intermediat nur sehr schlecht in den Absorptionssignalen zu erkennen, weil bei diesem pH die Reprotonierung von Asp-96 aus dem Medium sehr schnell erfolgt, und damit das N-Intermediat schnell zerfällt. Erschwerend kommt hinzu, daß das Absorptionsspektrum ($\lambda_{\max}=550$ nm) ähnlich wie beim L-Intermediat nur wenig vom Grundzustand verschieden ist. Bei hohem pH wird das N-Intermediat stärker besetzt, da dann die Reprotonierung von Asp-96 von der zytoplasmatischen Seite nur langsam erfolgt. Das N-Intermediat zerfällt dann nur langsam, und das $M \leftrightarrow N$ Gleichgewicht ist deutlicher zu sehen. In Abb. 5.30 links ist ein Kontourplot der Absorptionsänderung bei pH 10,6 und bei Anregung mit dem Nd:YAG-Laser zu sehen. Verglichen mit Abb. 5.1 bei neutralem pH fällt auf, daß das O-Intermediat ausbleibt, und statt dessen das Ausbleichsignal bei 570 nm erst viel später zum Grundzustand zerfällt. Der Zerfall von M erfolgt in zwei Stufen, die eine im ms-Bereich, die zweite im 100 ms Bereich. Die erste Stufe ist der $M \rightarrow N$ Übergang, während die zweite Stufe der N Zerfall ist. Dazwischen liegt der Bereich, in dem N im Gleichgewicht mit M steht. In diesem Zeitbereich erfolgt nun ein zweiter Blitz (30 ms nach dem ersten Blitz) von 580 nm. Dieser kann nun aufgrund der Wellenlänge das M-Intermediat nicht anregen und auch nicht das O-Intermediat, weil dieses nicht besetzt ist. Daher kann dieser Blitz nur das N-Intermediat und den Grundzustand anregen. Die Zeitspur durch die Grundzustandsanregung kann jedoch wieder abgezogen werden. Ebenso wie in Abschnitt 5.1 bei der L-Photoreaktion wird wieder die Differenz nach Gl. 5.1 aus den drei gemessenen Zeitspuren (Doppelblitzzeitspur ΔA_D , Zeitspur des ersten Blitzes mit verzögerter Datenaufnahme ΔA_Y und Zeitspur des zweiten Blitzes ohne vorherigen ersten Blitz ΔA_F) für die Photoreaktion des N-Intermediats gebildet:

$$\Delta A_N(\lambda, t) = \Delta A_D(\lambda, t) - \Delta A_Y(\lambda, t) - f_1 \Delta A_F(\lambda, t) \quad \text{Gl. 5.10}$$

Das Ergebnis dieser Differenz ist in Abb. 5.30 rechts zu sehen. Im Unterschied zum Abschnitt über die Photoreaktionen von L und M ist hier dieses Differenzsignal nicht einfach das Zerfallssignal einer negativen N-Besetzung, das sich durch ein umgekehrtes Vorzeichen des Differenzsignals zeigt. Vielmehr gibt es ein Differenzsignal, das bei 410 nm genauso wie beim ersten Blitz eine positive Absorptionsänderung ergibt. Daher ist die naheliegende Interpretation, daß in der Photoreaktion von N ein M-artiger Zustand auftritt. Dieser zerfällt jedoch erst zwei Dekaden später als der herkömmliche M. Daher erscheint die alternative Interpretation ebenfalls plausibel: Durch die Photoreaktion von N wird die N Besetzung durch das noch vorhandene M aufgefüllt. Dieses nachgelieferte M kann dann erst mit der Zerfallszeit des normalen N zerfallen. Gestützt wird diese Interpretation dadurch, daß das Ausbleichsignal bei 520 nm sich im etwa gleichen Zeitbereich vergrößert und sich in Richtung zum Langwelligeren verschiebt, wo es auch im normalen Signal (linkes Teilbild)

auftritt. Außerdem ist der Akzeptor für die Bildung von M (Asp-85) noch protoniert, so daß die Deprotonierung in Richtung der extrazellulären Seite blockiert ist. Statt dessen müßte jetzt die Schiffsche Base in den zytoplasmatischen Kanal deprotonieren, um ein M-Intermediat zu bilden.

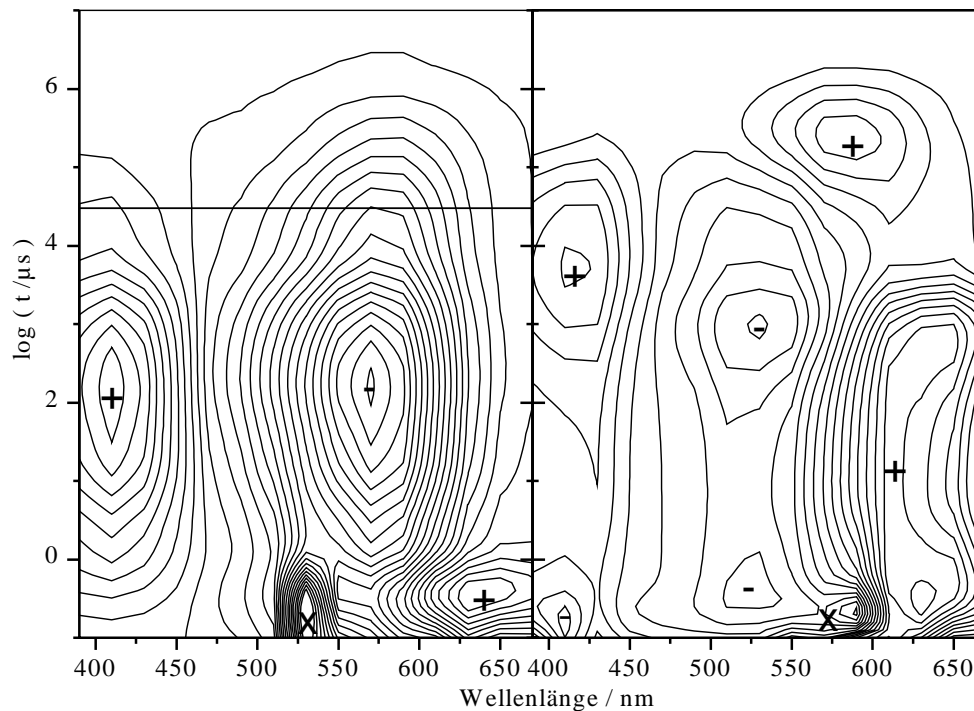


Abb. 5.30 Links: Kontourplot der Absorptionsänderung nach Anregung durch den Nd:YAG-Laser alleine. Die horizontale Linie bei 30 ms markiert den Zeitpunkt bei dem im Doppelblitzexperiment der zweite Blitz von 580 nm erfolgt. Rechts: Kontourplot nach der Photoreaktion von N, angeregt durch einen zweiten Blitz 30 ms nach dem ersten Blitz. Diese Absorptionsänderung entsteht aus der Differenz der drei Einzelblitzexperimente nach Gl. 5.10 mit $f_1=0,62$ und globalem Fit mit 7 Exponentialfunktionen wie in Abschnitt 5.1 beschrieben. Bedingungen: Wildtyp im Polyacrylamidgel; pH 10,6; 150 mM KCl, 20°C. Links: 17 mOD/Höhenlinie, rechts: 3 mOD/Höhenlinie.. +/-: Vorzeichen der Absorptionsänderung. X: Artefakt durch Streulicht des Blitzes. Gemessen wurde bei 15 Wellenlängen zwischen 390 und 670 nm.

Das Ausbleichsignal ist gegenüber dem des Nd:YAG-Lasers alleine zu 520 nm verschoben, weil im Langwelligen zusätzlich eine positive Absorptionsänderung auftritt. Diese positive Absorptionsänderung im μs Zeitbereich ist vermutlich das Bathoprodukt der N-Photoreaktion (K_N). Dieses zerfällt im Zeitbereich um 100 ms (je nach gewählter Interpretation für die positive Änderung bei 410 nm, über M oder direkt) zu einem bR ähnlichen Intermediat. Von der Lage der Wellenlänge könnte es sich um das P582 Intermediat handeln (Balashov, 1995), das im Photozyklus von 13-*cis* bR auftritt. Das N Intermediat ist ebenfalls ein 13-*cis* Isomerzustand. Photoanregung transformiert ihn vermutlich in die all-*trans* Form. Damit wäre dieser Zustand sehr ähnlich dem O-Intermediat, da hier ebenfalls Asp-85 noch protoniert ist und der Chromophor bereits im all-*trans* Zustand ist. Im Gegensatz zu den Photoreaktionen aus K, L und M, die sehr schnell in den Grundzustand zurückführen, verhindert die Photoreaktion von N den Protonentransfer vermutlich nicht, sondern beschleunigt die Reisoomerisierung in die all-*trans* Form des bR Grundzustandes, die sonst erst gleichzeitig mit dem Zerfall von N einhergeht. Der Zerfall des P582 Intermediates findet im selben Zeitbereich wie der Zerfall von N bei Anregung durch einen Blitz alleine statt. Das sind vermutlich dieselben Prozesse, die auch bei Anregung von einem Blitz alleine noch für

die Beendigung des Zyklus benötigt werden: Die Reprotonierung des internen Donors Asp-96, das Schließen des zytoplasmatischen Kanals und die Abgabe des Protons von Asp-85 zur Außenseite. Nur die Reisoomerisierung ist nicht mehr notwendig, da sie bereits durch die Lichteinwirkung des zweiten Blitzes erfolgte.

Der oder die Schritte, die die Richtung der Protonenpumpe ausmachen, sind offenbar bei Erreichen des N Intermediates bereits erfolgt, denn die Reprotonierung der Schiff'schen Base hat bereits stattgefunden und die Photoreaktion von N vermag dies vermutlich nicht mehr rückgängig zu machen. Während die Öffnung des zytoplasmatischen Kanals, die während M stattfinden soll, bei der Photoreaktion von M noch rückgängig gemacht werden kann (siehe D96A), kann der lange Weg den das Proton von Asp-96 über Diffusion zur Schiff Base zurückgelegt hat nicht mehr umgekehrt werden. Vermutlich liegt das Problem bei einer Photorückreaktion von N darin, schnell einen Partner auf der zytoplasmatischen Seite zu finden, der das Proton der Schiff'schen Base wieder aufnehmen könnte, da das Wasser über das es dorthin gekommen ist vermutlich wieder wegdiffundiert ist.

Bei dieser Photoreaktion des N-Intermediats tritt nun im Gegensatz zu den Photoreaktionen der Intermediate L und M in den vorherigen Abschnitten, der Fall auf, daß die Photoreaktion der Intermediate im selben Zeitbereich wie die Übergänge im normalen Photozyklus liegen, und daher nur qualitativ interpretiert werden können.

5.10 Die Photoreaktion aus dem O-Intermediat

Im O-Intermediat ist das Retinal bereits wieder in der *all-trans* Form (Smith et al., 1983). Dies ist in den Absorptionmessungen z.B. daran zu erkennen, daß die Aktivierungsenergie für eine Isomerisierung und damit für den O-Aufbau sehr hoch ist, so daß bei einer Temperaturerhöhung der Aufbau stark beschleunigt wird und das Intermediat stärker besetzt wird. Das Absorptionsspektrum ($\lambda_{\max}=640$ nm) besitzt starke Ähnlichkeit mit der blauen Form von Bacteriorhodopsin, die bei tiefem pH vorliegt. Dies wird dadurch erklärt, daß Asp-85 noch protoniert ist. Vermutlich wird erst im Zerfall von O das Proton von Asp-85 an die Protonenabgabegruppe 204 bzw. zur Außenseite abgegeben. Abb. 5.31 links zeigt den Kontourplot des Photozyklus bei pH 3,3 und 35°C nach Anregung durch den Nd:YAG-Laser. Hier erkennt man deutlich das Absorptionsmaximum bei 640 nm im Zeitbereich zwischen 1 ms und 10 ms, das vom O-Intermediat hervorgerufen wird. Nach $\Delta t=4$ ms erfolgt ein zweiter Blitz von 640 nm, dieser Zeitpunkt ist markiert durch eine horizontale Linie im linken Teilbild. Dieser zweite Blitz kann aufgrund seiner Wellenlänge und des Zeitabstandes seines Auftauchens nur O Intermediat und Grundzustand anregen. Daher erfolgt die Auswertung der Doppelblitzexperimente ebenso wie im letzten Abschnitt nach:

$$\Delta A_O(\lambda, t) = \Delta A_D(\lambda, t) - \Delta A_Y(\lambda, t) - f_1 \Delta A_F(\lambda, t) \quad \text{Gl. 5.11}$$

Diese Differenz ist mit $f_1=0,74$ in Abb. 5.31 rechts als Kontourplot zu sehen. Ebenso wie bei der Photoreaktion aus N, ist im Kontourplot dieser Differenzen nicht einfach eine negative zerfallende O-Besetzung zu sehen, denn das Maximum der Differenz liegt etwa bei 520 nm und nicht bei 550 nm wie im Photozyklus (O-bR Differenzspektrum). Es entsteht also ein blauverschobenes Intermediat und nicht direkt wieder der Grundzustand. In einer früheren Arbeit mit Gleichlicht bei tiefem pH wurde bereits von einem blauverschobenen Photoprodukt P_{490} berichtet (Popp et al., 1993), das durch Photoanregung von O entsteht. In dieser „pink Form“ befindet sich das Retinal im *9-cis* Zustand und besitzt eine Lebensdauer von mehreren Stunden. Um dieses Photointermediat kann es sich jedoch hier nicht handeln, denn man sieht im Differenzkontourplot, daß nach 100 ms alle Photointermediate wieder in den Grundzustand zerfallen sind.

Eine andere Gruppe die zeitaufgelöste Messungen bei permanentem Hintergrundlicht durchgeführt hat (Ohtani et al., 1994), schlägt einen Zyklus $O \xrightarrow{h\nu} G_{520} \rightarrow O$ vor. Dabei ist die Wellenlängenangabe nicht das Absorptionsmaximum der Spezies, sondern das Maximum der Absorptionsdifferenz zum O-Intermediat. Dies paßt sehr gut mit den Messungen hier zusammen, denn die Absorptionzunahme des Differenzsignals liegt bei 520 nm und zerfällt etwas früher als das Minimum des O-Intermediats selbst.

Vermutlich führt die Photoreaktion des O-Intermediats wieder in die 13-*cis* Form G_{520} . Diese ist sehr ähnlich dem L oder N Intermediat, weil die Schiffsche Base und Asp85 protoniert sind, und das Retinal in der 13-*cis* Form ist. In diesem Sinne wäre die Photoreaktion von O ein Schritt im Photozyklus zurück bis zum N-Intermediat. Bereits dieses N-Intermediat war jedoch nicht mehr zur Umkehrung der Pumpe zu bewegen. Daher wird ein solcher Zustand, wenn er aus der Photoreaktion aus O gebildet wird, ebenfalls nicht umkehrbar sein, sondern er zerfällt nach einigen ms wieder in den Zustand aus dem es gebildet wird, nämlich O.

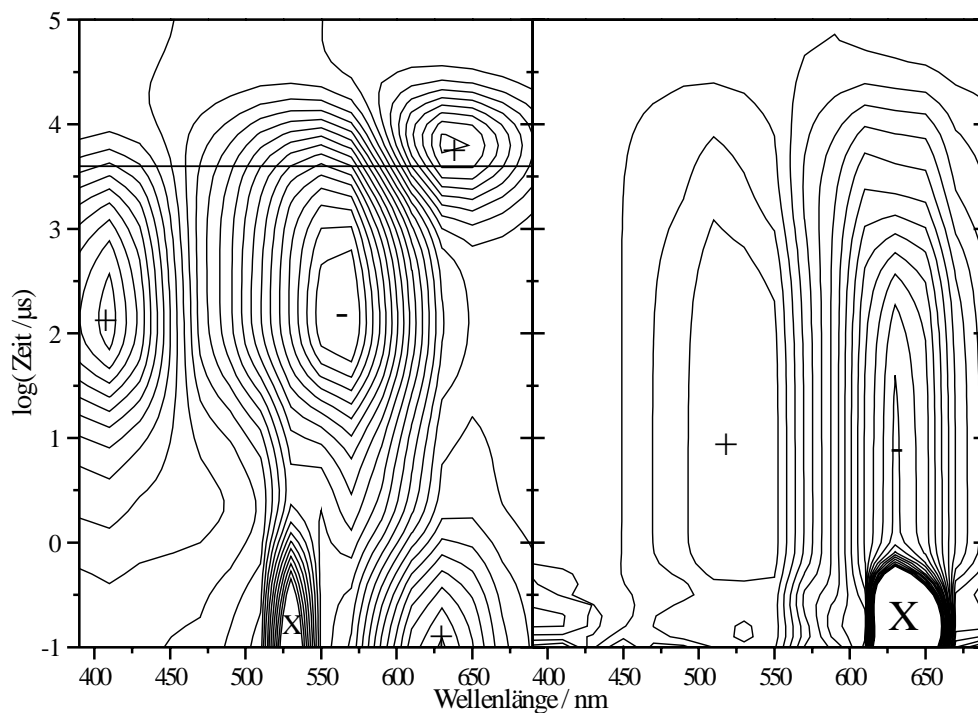


Abb. 5.31 Links: Kontourplot der Absorptionsänderung nach der Photoanregung von Wildtyp bei pH 3,3 mit dem frequenzverdoppelten Nd:YAG Laser. Die horizontale Linie charakterisiert den Zeitpunkt des Eintreffens des zweiten Blitzes (640 nm) nach $\Delta t=4$ ms. Rechts: Differenzabsorption nach Gl. 5.11 mit $f_1=0,74$. Bedingungen: 150 mM KCl; links 10 rechts 3 mOD/Höhenlinie. X: Blitzdurchschlag, +/- Vorzeichen der Absorptionsänderung. Gemessen wurde bei 16 Wellenlängen zwischen 390 und 690 nm.

