

7 Elektrische Messungen an Rinderrhodopsin

Im äußeren Segment der Sehzähbchen (engl.: „Rod outer Segments“, kurz ROS) befinden sich Stapel von geschlossenen Membranen, den sogenannten „discs“ (engl.). Diese „discs“ enthalten das Membranprotein Rhodopsin. Die aufbereiteten Membranen dieser „discs“ werden als ROS Membranen bezeichnet. Die Präparation der Membranen aus Rinderaugen und die Reinigung wurde von Thorsten Mielke durchgeführt. Die ROS Membranen wurden in 70 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei -80°C gelagert (2-3 mg/ml). Zur Befüllung der Meßküvette wurden 50 μl dieser Vorratslösung benutzt. Die Vorratslösung wurde 20 s lang in einem Ultraschallbad behandelt und dann in die mit Elektrolytlösung gefüllte Meßküvette gegeben wie in Kap. 2.7 beschrieben. Durch das Beschallen werden die eventuell noch geschlossenen „discs“ in Membranfragmente oder geöffnete Vesikel verwandelt und die Anlagerung an die Stützfolie kann erfolgen. Die Vorbereitung der Meßküvette ist also identisch mit der bereits für Purpormembranen beschriebenen, mit dem einzigen Unterschied, daß sämtliche präparative Arbeiten unter schwachem Rotlicht durchgeführt werden mußten.

7.1 Ergebnisse

Abb. 7.1 zeigt zeitaufgelöste Photospannungssignale von adsorbierten ROS Membranen nach Anregung durch den frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser bei 532 nm. Da nach Ablauf der Reaktionskaskade die angeregten Moleküle nicht wieder in den Ausgangszustand gelangen, nimmt die Signalamplitude von Anregung zu Anregung kontinuierlich ab (hier etwa 30 %). Der Hauptteil der Ladungsverschiebung findet im Zeitbereich zwischen 100 μs und 10 ms statt und kann entweder mit einer einzelnen Gauß-verteilten Kinetik (1,9 ms mit $\sigma=0,24$) oder mit zwei Exponentialfunktionen angepaßt werden (1,1 und 3,0 ms, 45 und 55 %). Im nachfolgenden Zeitbereich von 100 ms bis einige Sekunden zerfällt die Spannungsamplitude in mehreren Phasen. Dies geschieht aufgrund der Entladung über den Meßwiderstand und der Membranleitfähigkeit. Die erste Phase der Systementladung setzt bereits mit einer Zeitkonstanten von 60 ms ein und ist damit deutlich schneller als in den Purpormembranen. Dies ist möglicherweise durch eine schlechtere Adsorption der ROS Membranen oder durch einen geringeren Membranwiderstand bedingt.

Da sich zur Zeit der zweiten Anregung ein Gemisch aus Rhodopsin im Grundzustand, M_I , M_{II} und späteren Intermediaten besteht, kann man aus dem unveränderten Signalverlauf bei der zweiten Anregung schließen, daß außer dem Grundzustand keine anderen Intermediate zum elektrischen Signal beitragen.

Nimmt man Protonen als Ursache des Spannungssignals an, so bedeutet das negative Vorzeichen des Spannungssignals, daß die Ladungen zur Stützmembran hin verschoben werden. Die bekannten Ladungsbewegungen, die mit dem Aufbau von M_{II} assoziiert sind, sind der Protonentransfer von der Schiffischen Base zu Glu-113 (welches sich zwischen der Schiffischen Base und der intradiskalen Oberfläche befindet) und eine Protonenaufnahme an der extradiskalen Oberfläche. Beide Prozesse bedeuten eine Ladungsverschiebung in Richtung von der extradiskalen zur intradiskalen Oberfläche. Daher kann man aus dem Vorzeichen des elektrischen Spannungssignals schließen, daß die ROS Fragmente mit der intradiskalen Seite an die Stützfolie adsorbiert sind.

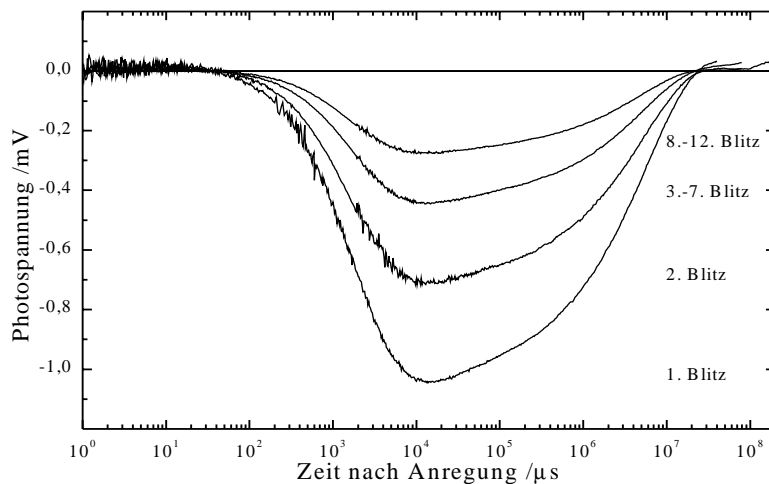


Abb. 7.1 Photospannungssignale von ROS-Fragmenten mit derselben Meßmethode wie für Bacteriorhodopsin. Die ersten beiden Anregungen nach der Anlagerung im Dunkeln wurden separat dargestellt. Danach wurde über jeweils fünf Anregungen gemittelt. Zur Anpassung des aktiven Signals im ms-Zeitbereich werden entweder zwei Exponentialfunktionen oder eine Gauß-verteilte Kinetik benötigt. Auffällig ist auch das frühe Einsetzen der Entladung mit einer ersten Zeitkonstante von 60 ms. Bedingungen: 22°C; 3 mM Tris; HEPES und Natriumacetat; pH 7,8; 150 mM KCl.

Abb. 7.2 zeigt die Temperaturabhängigkeit des elektrischen Signals. In dieser Abbildung wurde die Systementladung abgezogen und die Amplituden nach Gl. 2.35 korrigiert, weil die Systementladung selbst mit steigender Temperatur schneller wurde. Dies deutet ebenfalls auf eine lose Adsorption hin. Der Überschinger bei 40°C ist möglicherweise ebenfalls ein Artefakt durch die Systementladung, die hier nicht mehr korrekt subtrahiert werden konnte. Die Amplituden wurden auf dieselbe Endspannung normiert. Die Zeitspuren wurden mit jeweils zwei Exponentialfunktionen für den Aufbau der negativen Spannung angepaßt. Der dazugehörige Arrhenius-Plot ergibt Aktivierungsenergien von 86 und 123 kJ/mol für die schnellere bzw. die langsamere Komponente.

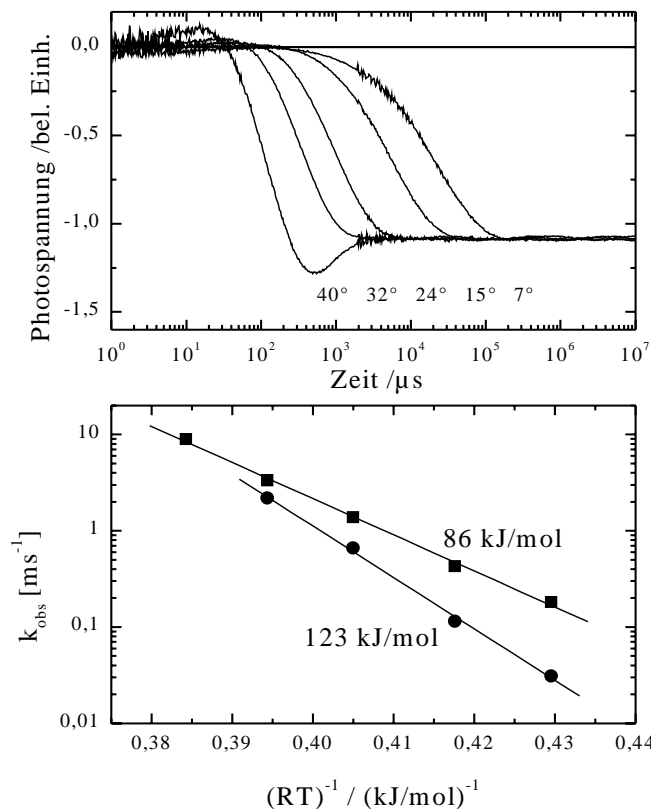


Abb. 7.2 Oben: Temperaturabhängigkeit des Spannungssignals von adsorbierten ROS Membranen. Die Systementladung wurde abgezogen und die Amplituden wurden auf die gleiche Endspannung normiert.

Unten: Arrhenius-Plot der beiden Zeitkonstanten einer Anpassung mit je zwei Exponentialfunktionen für die aktive Komponente. Für die Zeitspur bei 40°C wurde jedoch nur eine Komponente zur Anpassung benötigt, hier sind die beiden Prozesse nicht mehr getrennt detektierbar. Die Aktivierungsenergien betragen 86 und 123 kJ/mol. Messung bei pH 7,8 und Standardbedingungen.

Die Salzabhängigkeit des elektrischen Signals ist in Abb. 7.3 gezeigt. In dieser Meßreihe wurde die Laserintensität soweit herabgesetzt, daß nur etwa 6% der Moleküle pro Blitz gebleicht wurden. Von steigender Ionenkonzentration unbeeinflusst zeigen sich die

Zeitkonstanten des ms Prozesses (Zeitkonstanten der Anpassungen nicht gezeigt), aber die Signalamplitude steigt, trotz der fortschreitenden Bleichung, zwischen 10 und 200 mM KCl zunächst an, um dann ab 200 mM wieder abzufallen. Die mit der Salzkonzentration immer schneller werdende Systementladung und der immer größer werdende Überschwinger im Sekundenbereich zeigt, daß die ROS Membranen eine wenn auch geringe Leitfähigkeit für das verwendete Salz besitzen. Die gedachte Weiterführung dieses Verhaltens zu noch höherer Salzkonzentration entspricht dem Übergang von Spannungs- zu Strommessungen.

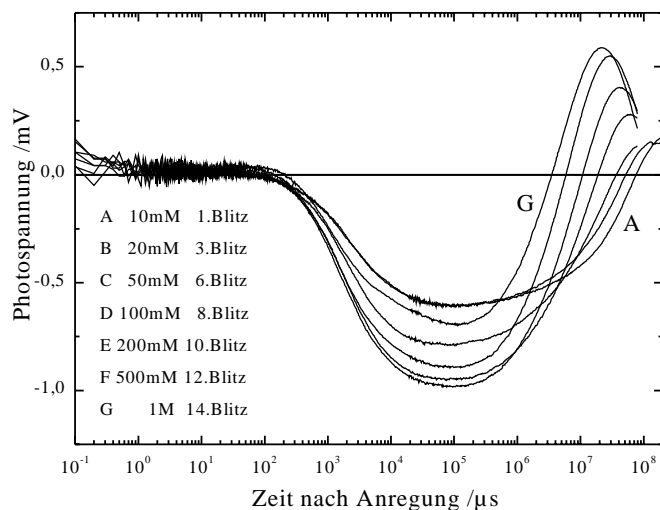


Abb. 7.3 Salzabhängigkeit des elektrischen Signals von Rhodopsin. Zur Zuordnung sind die Zeitspuren A (10 mM) und G (1 M) in der Systementladung gekennzeichnet. Mit zunehmender Salzkonzentration wird die Entladung systematisch schneller. Zusätzlich zu den Salzkonzentrationen ist die Nummer des Blitzes auf die Probe angegeben. Daraus erkennt man, daß trotz fortschreitender Ausbleichung die Signalamplitude zunimmt und erst oberhalb 200 mM abnimmt. Bedingungen: pH 6,8, 22°C, Standardpuffer.

Abb. 7.4 zeigt, daß die Kinetik in D₂O verlangsamt wird. Eine Analyse der Daten mit Gauß-verteilter Kinetik liefert $\tau_{D_2O}=3,1$ ms mit $\sigma=0,3$ bzw. $\tau_{H_2O}=1,9$ ms mit $\sigma=0,24$. Der kinetische Isotopeneffekt beträgt daher 1,6. Da insgesamt nur zwei Anlagerungen in D₂O durchgeführt wurden, muß aufgrund der Reproduzierbarkeit ein Fehler von $\pm 0,3$ an diesem Verhältnis angenommen werden. Der Wert von 1,6 ist gut verträglich mit der Annahme, daß das elektrische Signal durch Protonenbewegung verursacht wird.

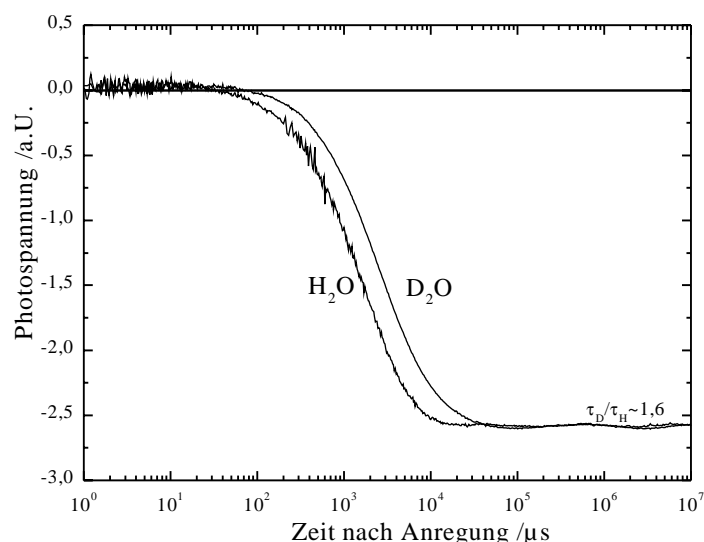


Abb. 7.4 Kinetischer Isotopeneffekt auf das elektrische Signal. Die Vergleichsprobe wurde mehrmals in D₂O gewaschen und einige Tage gelagert, bevor die Anlagerung und die Messung durchgeführt wurde. Zum besseren Vergleich wurden hier wieder die Systementladungen abgezogen und die Signale auf den gleichen Endwert normiert. Bedingungen: 22°C; 150 mM KCl; pH 7,8 bzw. pD 7,5; Standardpuffer.

Die Absorption von blauem Licht (420 nm) im M_{II} Zustand des Rhodopsins führt zur Photorückreaktion in den unbelichteten Ausgangszustand. In dieser Photoreaktion ist somit die Reiseromerisierung des Chromophors und die Reptonierung der Schiffsbasis in einer weiteren Dunkelreaktion enthalten. Um die Ladungsbewegung, die mit dieser Reaktion verbunden ist, zu messen, wurden die angelagerten ROS Membranen durch 20 intensive grüne Blitze (532 nm) innerhalb von etwa einer Minute in das M_{II} Intermediat gebracht. Die untere Zeitspur von Abb. 7.5, die durch den ersten der 20 Blitze induziert wurde, zeigt die

normale 2 ms Protonenbewegung, die mit dem Aufbau von M_{II} assoziiert wird. Unter den gegebenen Bedingungen ist die Lebensdauer des M_{II} etwa 20 min. Daher ist ausreichend Zeit, um die Photoreaktionen des M_{II} Intermediates zu untersuchen. Direkt nach den 20 grünen Blitzen wird nun ein blauer Blitz (420 nm) gezündet, der die Photorückreaktion von M_{II} anregen soll. Die Zeitspur dieses ersten blauen Blitzes (Abb. 7.5) zeigt, daß die Spannung nach diesem Blitz ein positives Vorzeichen besitzt. Dieses bestätigt die Vermutung, daß es sich um eine Photorückreaktion in den Ausgangszustand handelt, denn die Ladungsbewegung ist entgegengesetzt der der Vorwärtsbewegung. Eine Anpassung mit einer einzigen Exponentialfunktion liefert eine Anstiegszeit von 30 ms für diese Rückwärtsreaktion. Der anschließende Zerfall der nun positiven Spannung ist durch die Systementladung bedingt. Darauf folgende blaue Blitze erzeugen ein Signal kleinerer Amplitude, denn aufgrund des vom vorhergehenden blauen Blitzes zurückgebrachten M_{II} Intermediats nimmt die Menge der verfügbaren M_{II} Konzentration ab. Weiterhin zeigen die Zeitspuren, daß bei den folgenden blauen Blitzen die 2 ms Komponente wieder enthalten ist, die auch bei Anregung durch den grünen Blitz beobachtet wurde. Dies ist dadurch zu erklären, daß der zweite blaue Blitz die von dem vorherigen blauen Blitz in den Grundzustand gebrachten Moleküle wieder anregen kann. Die Zeitspuren 2, 3 und 4 sind daher Überlagerungen dieser positiven und negativen Anteile. Die positive Amplitude des ersten blauen Blitzes beträgt nur etwa die Hälfte des ersten grünen Blitzes. Die Amplitude hängt jedoch von den Blitzintensitäten, den Quanteneffizienzen und den Extinktionskoeffizienten bei den beiden Wellenlängen und der Lage des M_I - M_{II} Gleichgewichts ab. Nimmt man die Blitzintensitäten, Effizienzen und Extinktionskoeffizienten für Vorwärts- und Rückwärtsreaktion als gleich an und setzt man ein vollständig auf der M_{II} Seite liegendes Gleichgewicht voraus, dann ist entweder der Rückweg kürzer, d.h. unvollständig, oder nicht alle vom blauen Blitz angeregten Moleküle werden in den Ausgangszustand zurückgebracht.

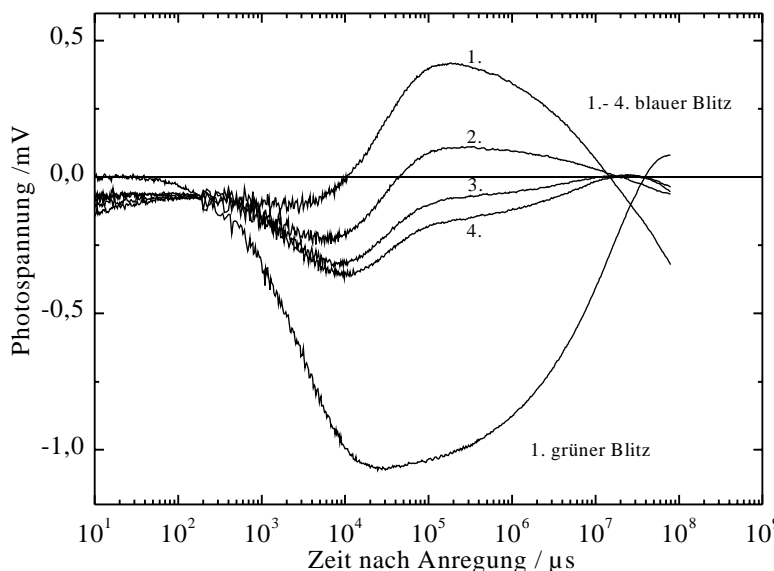


Abb. 7.5 Die Photorückreaktion des M_{II} Intermediates von Rhodopsin. Die Zeitspur mit der großen negativen Amplitude zeigt den Aufbau des M_{II} Intermediates durch Anregung mit einem starken grünen Blitz (532 nm). Anschließend werden 20 weitere grüne Blitze innerhalb einer Minute gezündet, deren Zeitspuren jedoch nicht gemessen werden. Anschließend werden vier blaue Blitze (420 nm) gezündet, deren Zeitspuren aufgezeichnet sind. Die starke Drift des Signals im langsamen Zeitbereich ist durch die Systementladung der 20 starken vorhergehenden Blitze bedingt. Bedingungen: 22°C; pH 7,3; 150 mM KCl; Standardpuffer

Die Kinetik der Ladungsverschiebung der Vorwärtsreaktion im ms-Zeitbereich ist stark pH abhängig. Die Daten von Abb. 7.6 zeigen, daß mit sinkendem pH-Wert die Kinetik um ungefähr eine Größenordnung beschleunigt wird. Die Anpassung mit zwei Exponentialfunktionen liefert bei jedem pH-Wert zwei Zeitkonstanten, die im mittleren Teilbild gezeigt sind. Die schnellere Zeitkonstante ist oberhalb von pH 7 unverändert und wird mit sinkenden pH-Werten immer schneller. Die langsamere Zeitkonstante ist nur schwächer pH abhängig. Diese pH Meßreihe wurde an derselben Anlagerung mit aufeinander folgenden Blitzen durchgeführt. Daher nimmt die Amplitude stetig ab. Der vor der Anregung noch im Ausgangszustand befindliche Anteil kann in den elektrischen Messungen nicht bestimmt

werden. Außerdem könnte die Anlagerungsmenge ebenfalls pH abhängig sein. Daher haben die absoluten elektrischen Amplituden dieser Meßreihe keine Relevanz. Die Zeitspuren wurden daher auf denselben Endwert skaliert. Die Amplituden der beiden Exponentialfunktionen wurden als relative Größen im unteren Teilbild abgebildet. Man erkennt einen Übergang von überwiegend langsamer zu überwiegend schneller Komponente mit abnehmendem pH, dessen pK Wert etwa zwischen 4 und 5 liegt.

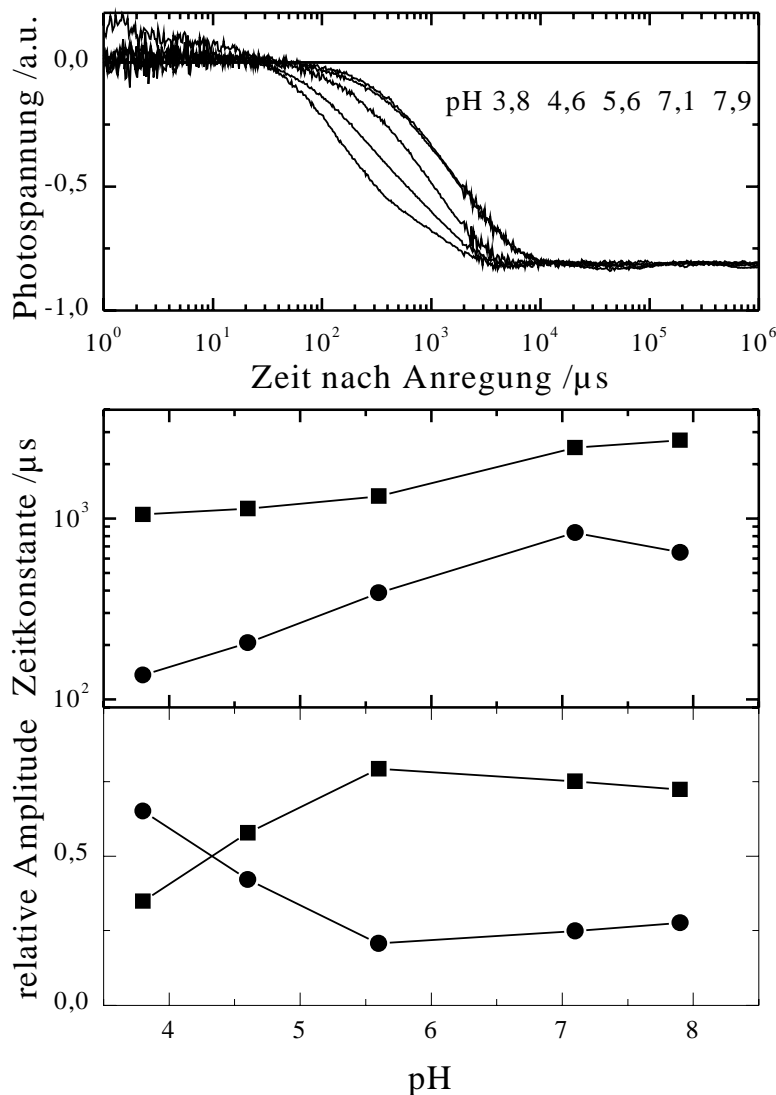


Abb. 7.6 Oberes Teilbild: Zeitspuren des elektrischen Signals von Rhodopsin bei fünf unterschiedlichen pH Werten. Die Systemladung wurde abgezogen, da die Systemladung selbst stark pH-abhängig war. Außerdem wurden die Amplituden auf dieselbe Endspannung skaliert.

Im mittleren Teilbild sind die Zeitkonstanten einer Anpassung mit zwei Exponentialfunktionen gezeigt.

Im unteren Teilbild sind die dazugehörigen Amplituden als relative Größen aufgetragen. Die Symbole (■, ●) dienen der Zuordnung der Amplituden zu den Zeitkonstanten.

Bedingungen: 22°C, 150 mM KCl; Standardpuffer.

Die molekulare Ursache der beobachteten Ladungsbewegung ist vermutlich der Ladungstransport von der Schiffsbasis nach Glu 113 während des Übergangs nach M_{II} . Daher sollten diese elektrischen Messungen mit der Kinetik der Absorptionsänderung bei 380 nm übereinstimmen, die ebenfalls die Deprotonierung der Schiffsbasis detektiert. Die optischen Messungen wurden bei 10°C durchgeführt, um die Kinetik zu verlangsamen. Dadurch reicht trotz der starken Lichtstreuung der Membranen eine einzige Anregung aus, um ein brauchbares Signal-Rauschverhältnis zu erhalten. Abb. 7.7 zeigt die Zeitspuren der Absorptionsänderung bei 380 nm, die mit jeweils einem einzelnen Blitz an einer jeweils frischen Probe bei unterschiedlichen pH Werten erhalten wurden. Die Daten zeigen, daß nach etwa einer Sekunde ein Gleichgewichtswert erreicht wird. Um die oben beschriebene Photorückreaktion von M_{II} , die in dieser optischen Messung durch das blaue Meßlicht hervorgerufen wird, zu minimieren, wurde das Meßlicht erst unmittelbar vor dem Blitz eingeblendet (ca. 2 s vorher). Ein deutlicher Effekt durch das Meßlicht wurde bei den experimentellen Bedingungen jedoch erst nach 10 s festgestellt. Um eventuelle

Photoreaktionen von langlebigen Intermediaten zu vermeiden, wurde nicht über mehrere Anregungen gemittelt, sondern nur die Daten einer einzigen Anregung benutzt und dann für den nächsten pH Wert eine frische Probe benutzt. Der Endwert der Amplitude der zeitaufgelösten Absorptionsänderung nimmt mit steigendem pH-Wert ab. Dies spiegelt das M_I/M_{II} Gleichgewicht wieder. Die leichte Abnahme der Amplitude unterhalb pH 5,5 ist möglicherweise durch eine einsetzende Denaturierung bedingt, denn von der Systematik des pH Effektes her würde man diese Abnahme nicht erwarten. In der Abbildung wurden deshalb die Amplituden bei diesen pH-Werten etwas hochskaliert, um das Überlappen der Zeitspuren zu vermeiden. Deutlich zu erkennen ist, daß mit der Änderung des Gleichgewichtwertes auch die Kinetik des M_{II} -Aufbaus beschleunigt wird.

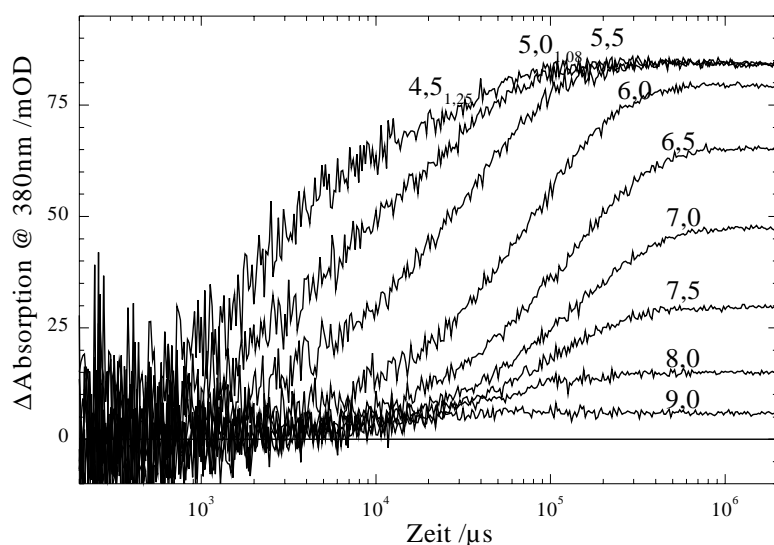


Abb. 7.7 Kinetik der Absorptionsänderung einer Suspension von ROS Membranen bei 380 nm nach Anregung durch den 532 nm Laser bei pH-Werten zwischen 4,5 und 9,0. Bei jedem pH Wert wurde eine frische Probe benutzt. Zur deutlichen Darstellung wurden die Zeitspuren bei pH 4,5 und 5,0 mit Faktoren 1,25 und 1,08 skaliert, um Überschneidungen zu vermeiden. Bedingungen: 150 mM KCl, 10°C, Standardpuffer.

Eine Anpassung dieser optischen Daten erfordert ebenso wie die elektrischen Daten zwei Exponentialfunktionen. Die pH Abhängigkeit der Zeitkonstanten und der Amplituden dieser beiden Exponentialfunktionen ist im oberen und mittleren Teilbild von Abb. 7.8 dargestellt. Nur bei sehr hohem pH genügt aufgrund der geringen Amplitude eine einzige Komponente. Die schnelle Komponente wird von pH 6,5 zu pH 4,0 hin beschleunigt, während die langsamere Komponente eine schwächere pH Abhängigkeit besitzt. Das Verhalten der Zeitkonstanten ist damit ähnlich wie bei der elektrischen pH-Meßreihe (Abb. 7.6 mittleres Teilbild). Vermutlich detektieren beide Messungen dieselbe Reaktion. Die Amplituden zeigen ebenfalls ähnliches Verhalten: Von pH 4 zu pH 6 nimmt die Amplitude der schnellen Komponente zugunsten der langsameren ab. Oberhalb pH 6 nimmt dann auch die Amplitude der langsameren Komponente ab. Um die Amplituden mit denen der elektrischen Messung (Abb. 7.6 unteres Teilbild) zu vergleichen, wurden diese ebenfalls als relative Größen aufgetragen (Abb. 7.9). Auch hier sieht man qualitative Übereinstimmung, nur der Kreuzungspunkt der beiden Anteile liegt um 0,8 pH-Einheiten höher als bei den elektrischen Amplituden.

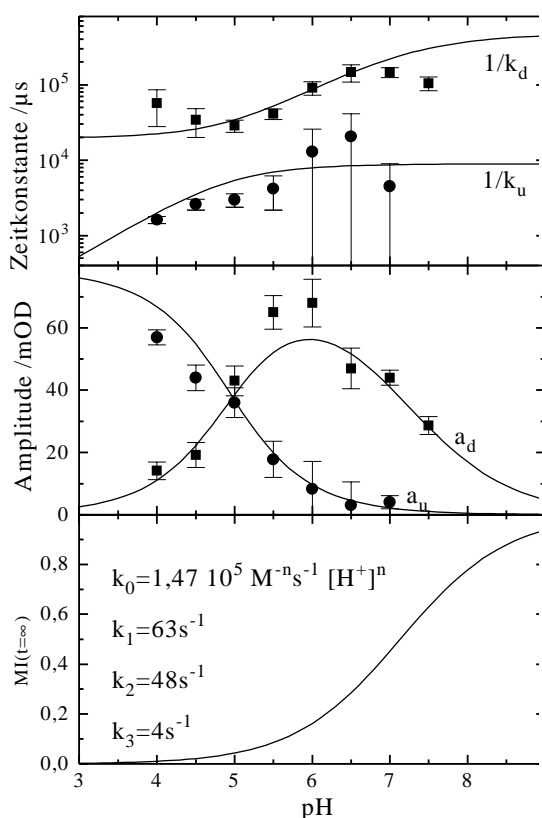


Abb. 7.8 Oberes und mittleres Teilbild: Zeitkonstanten und Amplituden einer Anpassung der Zeitspuren aus Abb. 7.7 mit zwei Exponentialfunktionen. Bei pH 7,5 wurde nur noch eine Exponentialfunktion zur Anpassung benutzt und oberhalb dieses pH Wertes wurden die Zeitspuren nicht mehr ausgewertet, da die Amplituden hier zu klein sind. Die ausgezogenen Linien ergeben sich aus einer globalen Anpassung dieser vier Kurvenverläufe an das im Text beschriebene Modell mit folgenden Parametern: $k_0'=1,47 \cdot 10^5 \text{ M}^{-n}\text{s}^{-1}$, $k_1=63\text{s}^{-1}$, $k_2=48\text{s}^{-1}$, $k_3=4\text{s}^{-1}$ und $n=0,63$.

Unteres Teilbild: Endwert der Konzentration von M_I berechnet mit den aus der Kinetik bestimmten mikroskopischen Parametern und Gl. 7.13. Dies ist der theoretische Kurvenverlauf einer Titration nach der Henderson-Hasselbalch Gleichung mit einem pK Wert von 7,14.

Die pH-Abhängigkeit der Zeitkonstanten und Amplituden wird im folgenden mit einem kinetischen Modell analysiert, das auf einer aktuellen Vorstellung über das M_I/M_{II} -Gleichgewicht beruht (Arnis und Hofmann, 1993; Thorgeirsson et al., 1993). In diesen Modellen werden zwei nicht spektral unterscheidbare Intermediate postuliert, die bei 380 nm ihr Absorptionsmaximum besitzen. Dazu werden in der Literatur unterschiedliche Nomenklaturen benutzt. In dieser Arbeit werden die beiden Zustände mit M_{IIa} und M_{IIb} bezeichnet. Da in den Messungen nur zwei Zeitkonstanten beobachtet werden, ist ein Modell mit drei Intermediaten zur Beschreibung der Kinetik ausreichend. Außerdem sollen die Intermediate in sequentieller Form durchlaufen werden. Somit erhält man das folgende Modell:



Dieses kinetische Modell wird durch folgendes Differentialgleichungssystem beschrieben:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} M_I \\ M_{IIa} \\ M_{IIb} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_0 & k_1 & 0 \\ k_0 & -k_1 - k_2 & k_3 \\ 0 & k_2 & -k_3 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_I \\ M_{IIa} \\ M_{IIb} \end{pmatrix} \tag{Gl. 7.2}$$

Wird nach der Blitzanregung das M_I Intermediat mit einer Rate gebildet, die sehr viel höher ist als die Raten $k_0 \dots k_3$, so gilt näherungsweise folgende Anfangsbedingung:

$$\begin{pmatrix} M_I(0) \\ M_{IIa}(0) \\ M_{IIb}(0) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{Gl. 7.3}$$

Damit sind die Konzentrationsverläufe eindeutig bestimmt und die Lösung ist von der Form:

$$\begin{pmatrix} M_I(t) \\ M_{IIa}(t) \\ M_{IIb}(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{13} \\ c_{21} & c_{22} & c_{23} \\ c_{31} & c_{32} & c_{33} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e^{-k_u t} \\ e^{-k_d t} \\ 1 \end{pmatrix} \quad \text{Gl. 7.4}$$

Dabei sind k_u und k_d die negativen Eigenwerte der Ratenmatrix (neben dem Eigenwert 0) und die dazugehörigen Eigenvektoren stehen als Vorfaktor vor den Exponentialfunktionen. Die jeweilige Länge der Eigenvektoren ist durch die Anfangsbedingung festgelegt.

Mit Hilfe der Abkürzung:

$$w = \sqrt{(k_0 + k_1 + k_2 + k_3)^2 - 4(k_0 k_2 + k_0 k_3 + k_1 k_3)} \quad \text{Gl. 7.5}$$

lassen sich die Raten in kompakter Form angeben:

$$k_u = (k_0 + k_1 + k_2 + k_3 + w)/2, \quad k_d = (k_0 + k_1 + k_2 + k_3 - w)/2 \quad \text{Gl. 7.6}$$

Die Absorptionsänderung bei 380 nm schreibt sich nun in folgender Form:

$$\Delta A(t) = (\varepsilon_{MI} - \varepsilon_{rh}) M_I(t) + (\varepsilon_{MII} - \varepsilon_{rh})(M_{IIa}(t) + M_{IIb}(t)) \quad \text{Gl. 7.7}$$

Da sich ε_{MI} und ε_{rh} bei 380 nm nicht stark unterscheiden, da beides Formen mit protonierter Schiffischer Base sind, bleibt nur der zweite Term in Gl. 7.7 übrig. Die Kinetik der Absorptionsänderung ist damit von der Form:

$$\Delta A(t) = (\varepsilon_{MII} - \varepsilon_{rh}) \left((c_{21} + c_{31}) e^{-k_u t} + (c_{22} + c_{32}) e^{-k_d t} + c_{23} + c_{33} \right) \quad \text{Gl. 7.8}$$

Für die Amplitude mit hoher Rate ergibt sich:

$$a_u = c_{21} + c_{31} = \frac{-k_0 k_d (k_0 + k_1 - k_2 - k_3 + w)}{2w(k_0 k_2 + k_0 k_3 + k_1 k_3)} \quad \text{Gl. 7.9}$$

und für die Amplitude mit niedriger Rate:

$$a_d = c_{22} + c_{32} = \frac{k_0 k_u (k_0 + k_1 - k_2 - k_3 - w)}{2w(k_0 k_2 + k_0 k_3 + k_1 k_3)} \quad \text{Gl. 7.10}$$

Wenn nun der Übergang $M_I \rightarrow M_{IIa}$ mit einer Protonenaufnahme gekoppelt ist, so ist dies bei näherungsweise konstanter H^+ Ionenkonzentration ein Prozeß von pseudo-erster Ordnung, d.h. die Rate k_0 ist dann proportional zur H^+ Konzentration: $k_0 = k_0' [H^+]^n = k_0' 10^{-n \text{ pH}}$. Dabei ist n die Anzahl der aufgenommenen Protonen. Bei hohen pH Werten ($k_0 \rightarrow 0$) ergeben sich dann folgende Grenzwerte für Raten und Amplituden:

$$\begin{aligned} w &\xrightarrow{k_0 \rightarrow 0} \sqrt{(k_1 + k_2 + k_3)^2 - 4k_1 k_3} \\ k_u &\xrightarrow{k_0 \rightarrow 0} (k_1 + k_2 + k_3 + w)/2, \quad k_d \xrightarrow{k_0 \rightarrow 0} (k_1 + k_2 + k_3 - w)/2 \\ a_u &\xrightarrow{k_0 \rightarrow 0} 0, \quad a_d \xrightarrow{k_0 \rightarrow 0} 0 \end{aligned} \quad \text{Gl. 7.11}$$

Das bedeutet, daß bei hohem pH die beiden Raten gegen endliche Werte gehen, während die zugehörigen Amplituden verschwinden. Das entspricht dem Verhalten der Zeitkonstanten in elektrischen Messungen (Abb. 7.6) bei hohem pH. Bei den optischen Messungen (Abb. 7.8) ist dieses Verhalten in den Amplituden und den Zeitkonstanten zu erkennen, wenn man den großen Fehler für k_d aufgrund der kleinen Amplitude berücksichtigt.

Für niedrigen pH ($k_0 \rightarrow \infty$) ergeben sich folgende Grenzwerte:

$$\begin{aligned}
 w &\xrightarrow{k_0 \rightarrow \infty} \sqrt{k_0^2 + 2k_0(k_1 - k_2 - k_3) + \dots} \approx k_0 + k_1 - k_2 - k_3 \\
 k_u &\xrightarrow{k_0 \rightarrow \infty} k_0 + k_1, & k_d &\xrightarrow{k_0 \rightarrow \infty} k_2 + k_3 \\
 a_u &\xrightarrow{k_0 \rightarrow \infty} -1, & a_d &\xrightarrow{k_0 \rightarrow \infty} 0
 \end{aligned}
 \tag{Gl. 7.12}$$

Bei niedrigem pH entkoppeln die Raten, das heißt die Raten der beiden Einzelprozesse können jeweils durch die Summe aus Vorwärts- und Rückwärtsrate ausgedrückt werden. Die Rate des langsameren Prozesses geht gegen einen konstanten Wert mit verschwindender Amplitude. Die Rate des ersten Schrittes wird dagegen immer schneller und nimmt die gesamte Amplitude ein. Dieses Verhalten der Zeitkonstanten bei niedrigem pH entspricht wieder genau dem der elektrischen Meßreihe (Abb. 7.6), und bei der optischen Meßreihe Abb. 7.8 stimmt zusätzlich das Verhalten der Amplituden mit diesem Modell überein. Da für die vier gemessenen Größen a_d , a_u , k_d und k_u analytische Funktionen hergeleitet wurden, ist es möglich, eine globale Anpassung an die vier gemessenen pH-Abhängigkeiten durchzuführen. Aus dieser Anpassung werden sechs Parameter erhalten: die vier mikroskopischen Raten k_0' , k_1 , k_2 und k_3 , der Faktor n für die Anzahl aufgenommener Protonen und einen weiteren Amplitudenfaktor für die Umrechnung der Konzentrationen in Absorptionsänderungen. Diese Parameter sind, bis auf den Amplitudenfaktor, in der Beschriftung von Abb. 7.8 angegeben.

Der nichtganzzahlige Parameter n ist möglicherweise durch die Oberflächenladung bedingt, die zu einer Differenz zwischen dem pH an der Oberfläche und dem in der Lösung führt (Szundi und Stoeckenus, 1989). Ein ähnlicher Wert für diesen Parameter n wurde bereits in kinetischen Experimenten erhalten, die mit schlechterer Zeitauflösung nur eine einzige Zeitkonstante für den M_I - M_{II} Übergang detektierten ($n=0,7$; Parkes und Liebman, 1984).

Zum Vergleich mit der pH-Abhängigkeit der elektrischen Amplituden der beiden Komponenten, sind die optischen Amplituden in Abb. 7.9 als relative Größen aufgetragen. Da die Anpassung an das Modell analytische Funktionen für die absoluten Amplituden lieferten, können die relativen Größen ebenfalls analytisch ausgedrückt werden. Der so erhaltene Kurvenverlauf ist ebenfalls in Abb. 7.9 eingezeichnet.

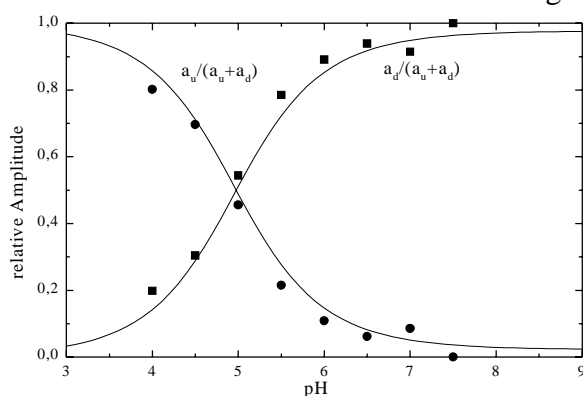


Abb. 7.9 Relative Amplituden der schnellen (■) und langsamen Komponente (●) der optischen Meßreihe in Abhängigkeit des pH. Die Daten entsprechen denen aus dem mittleren Teilbild von Abb. 7.8. Die durchgezogenen Linien ergaben sich aus dem im Text beschriebenen Modell, ebenfalls mit denselben Parametern wie in Abb. 7.8.

Weiterhin interessant ist die Endkonzentration von M_I , denn dieser Wert wird häufig gemessen (z.B. DeLange et al., 1997). Dieser entspricht dem Eintrag c_{13} in der Lösung Gl. 7.4:

$$M_I(\infty) = c_{13} = \frac{k_1 k_3}{k_1 k_3 + k_0 k_2 + k_0 k_3}
 \tag{Gl. 7.13}$$

Nimmt man wieder k_0 als pH-abhängig an ($k_0 = k_0' 10^{-n \text{ pH}}$), so kann man diesen Ausdruck umformen zu:

$$M_I(\infty) = \frac{1}{1 + 10^{\frac{1}{n} \log \left(\frac{k_2 + k_3}{k_1 k_3} k_0 \right) - pH}} \quad \text{Gl. 7.14}$$

Vergleicht man diesen Ausdruck mit der Henderson-Hasselbalch Beziehung, so kann man einen pK ermitteln, der sich aus den intrinsischen Raten des gekoppelten Prozesses ergibt:

$$pK = \frac{1}{n} \log \left(\frac{k_2 + k_3}{k_1 k_3} k_0 \right) \quad \text{Gl. 7.15}$$

Benutzt man die in Abb. 7.8 angegebenen Werte, so erhält man aus diesen mikroskopischen Raten einen pK von 7,14, in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten (z.B. bei 150 mM Salzkonzentration pK 7,3; DeLange et al., 1997).

Eine weitere Möglichkeit ist es, in dem zweiten Vorwärtsschritt, also in k_2 , die pH Abhängigkeit anzunehmen. Dies entspricht dann dem für Mizellen angenommenen Modell (Arnis und Hofmann, 1993). Diese Möglichkeit wurde ebenfalls Mithilfe der obigen Gleichungen durchgerechnet. Dabei zeigt sich, daß mit abnehmendem pH, bei einer bestimmten Protonenkonzentration k_2 größer als k_0 wird. Dann wird k_0 ratenlimitierend, was bedeutet, daß der größte Teil der Amplitude mit der unter diesen Bedingungen langsameren Rate $k_0 + k_1$ erfolgt. Das steht jedoch im Widerspruch zur Messung, die zeigt, daß bei niedrigem pH die gesamte Amplitude mit der schnelleren Zeitkonstante erfolgt (Abb. 7.8). Das Verhalten der Amplituden über dem pH läßt sich nicht einmal qualitativ mit einem Modell erklären, das die pH-Abhängigkeit in k_2 annimmt. Daher kann auch keine Anpassung der mikroskopischen Raten an ein solches Modell erfolgen. Offenbar ist daher der Reaktionsmechanismus des M_I - M_{II} Übergangs von Rhodopsin in Mizellen und in Membranen unterschiedlich.

7.2 Diskussion

Vergleich der elektrischen Messungen mit der Literatur:

Von elektrischen Spannungsmessungen an ROS Membranen wurde bereits mehrfach berichtet. Drachev und Mitarbeiter (1981) führten ebenfalls Messungen an adsorbierten Rhodopsinmembranen durch und berichteten ebenfalls von zwei Zeitkonstanten im ms-Zeitbereich. Eine systematische Untersuchung des pH-Verhaltens wurde jedoch nicht durchgeführt. Auch in Messungen von Lindau und Rüppel (1983, 1984) wurde die ms-Komponente des elektrischen Signals untersucht. Die Autoren fanden eine verteilte Kinetik mit einer mittleren Zeitkonstante von 2 ms, in guter Übereinstimmung mit den Messungen hier. Zur Interpretation dieser Verteilung wurden Konformations-Subzustände herangezogen, nicht jedoch mehrere Phasen des M_{II} Aufbaus. Außerdem wurde geschlossen, daß das elektrische Signal alleine durch Ladungsbewegungen im Inneren des Proteins verursacht wird, nicht jedoch von der Protonenaufnahme im selben Zeitbereich. In anderen Messungen (Bauer et al., 1984) reichte das Signal-Rauschverhältnis nicht aus, um mehrere Komponenten zu detektieren, wohl aber, um das Signal dem M_I - M_{II} Übergang zuzuordnen.

Die molekulare Ursache der Ladungsbewegung und der Absorptionsänderung:

Die Absorptionsänderung bei 380 nm wird durch die Deprotonierung der Schiffsbasis verursacht und ist gleichbedeutend dem Aufbau von M_{II} . Dabei ist der Protonenakzeptor die Glutaminsäure an der Position 113 (Jäger et al., 1994). Der Kinetische H/D-Isotopeneffekt (Abb. 7.4) ist ein Indiz dafür, daß die beobachtete lichtinduzierte Ladungsverschiebung im ms-Zeitbereich durch Protonentransfer hervorgerufen wird. Das Vorzeichen der Ladungsbewegung ist verträglich mit dem Protonentransfer von der

Schiffschen Base zu Glu-113, als auch mit einer Protonenaufnahme an der extradiskalen Seite von Glu-134 (Arnis et al., 1994). Beide Prozesse finden in diesem Zeitbereich statt. Von der starken Ähnlichkeit der pH-Abhängigkeit und auch der Temperaturabhängigkeit (siehe unten) der elektrischen und optischen Messungen kann man schließen, daß das elektrische Signal ebenfalls durch den Protonentransfer von der Schiffschen Base zu Glu-113 hervorgerufen wird. Die Protonenaufnahme an der Oberfläche findet in einem Gebiet mit hoher Dielektrizitätskonstante statt und wird damit nur eine geringe Amplitude besitzen. Ebenso kann man das Spannungssignal bei der Photorückreaktion als intramolekulare Ladungsverschiebung von Glu-113 zurück zur Schiffschen Base interpretieren.

Die Temperaturabhängigkeit:

Für die zwei Komponenten des elektrischen Signals wurden hohe Aktivierungsenergien von 86 und 123 kJ/mol für die schnelle und langsame Komponente beobachtet. Solch eine starke Temperaturabhängigkeit wurde ebenfalls in zeitaufgelösten optischen Signalen für den M_I/M_{II} Übergang beobachtet. Für ROS Membranen wurden dort 67 und 107 kJ/mol für die schnelle und langsame Komponente erhalten (Thorgeirsson et al., 1993). Diese Ähnlichkeit signalisiert ebenfalls denselben Ursprung für elektrische und optische Messungen.

pH-Abhängigkeit:

Ein wichtiger Vorteil von elektrischen gegenüber optischen Messungen an ROS Membranen ist das gute Signal/Rauschverhältnis bei einer einzelnen Blitzanregung. Daher konnte gezeigt werden, daß die schnellere Komponente die stärkere pH Abhängigkeit besitzt. Der Nachteil der elektrischen Messungen ist, daß die Amplituden nur geringe Aussagekraft besitzen, denn sie sind nicht auf die Menge der angeregten Moleküle normierbar. Brauchbare Information über die absoluten Amplituden erhält man aus den Absorptionsmessungen. Mit beiden Methoden (Abb. 7.6 und Abb. 7.8) wurden nur zwei Komponenten in Einzelblitzanregung beobachtet. An ROS Membranen wurden jedoch bereits in ähnlichen Absorptionsmessungen bei 380 nm drei Komponenten gefunden (Straume et al., 1990). In diesen Experimenten wurde das Signal über 10 Blitze gemittelt, um das Signal-Rauschverhältnis zu verbessern. Die dritte und schnellste der dort beobachteten Komponenten hat jedoch nur eine Amplitude von 2%. Daher bleibt diese Komponente in den hiesigen Messungen im Rauschen am Anfang der Zeitspur verborgen (Abb. 7.7). Da optische als auch elektrische Messungen nur zwei Zeitkonstanten detektieren, reicht das Modell Gl. 7.1 mit der pH Abhängigkeit im ersten Schritt zur Beschreibung aus, denn es gibt eine ausreichende Beschreibung der pH Abhängigkeit der Messung wieder. Komplexere Modelle könnten diese pH Abhängigkeit ebenfalls beschreiben, dies jedoch nur mit mehr Parametern. Daher ist das einfachste Modell hier zu bevorzugen. Die starke pH-Abhängigkeit rührt von einer Protonenaufnahme her, die vermutlich an der extradiskalen Oberfläche stattfindet (Arnis et al., 1994). Versuche diese Aufnahme mit k_2 in Verbindung zu bringen schlagen fehl. Die pH-Abhängigkeit liegt offenbar in k_0 . Dies bedeutet, daß die Protonenaufnahme und die Deprotonierung der Schiffschen Base in ROS Membranen stark gekoppelt sind. Für Dodecylmaltosid Mizellen wurde ebenfalls ein Modell mit zwei sequentiellen M_{II} Intermediaten benutzt, um die Kinetik und pH Abhängigkeit des Absorptionssignals bei 380 nm und der Protonenaufnahme zu analysieren (Arnis und Hofmann, 1993). In diesem System wurde beobachtet, daß die Protonenaufnahme langsamer als die Deprotonierung der Schiffschen Base erfolgt. Die Daten waren konsistent mit einer pH Abhängigkeit in k_2 . Der Reaktionsmechanismus in ROS Membranen und Dodecylmaltosid Mizellen ist daher offenbar unterschiedlich. Dieser Unterschied ist auch daran zu erkennen, daß in ROS Membranen die langsamere Komponente die höhere Aktivierungsenergie besitzt, während dies im Mizellensystem umgekehrt ist (Arnis und Hofmann, 1993). Unter der Annahme, daß der Prozeß mit der höheren Aktivierungsenergie die Strukturänderung des Proteins kennzeichnet,

etwa weil dies globale Reorientierungen voraussetzt, dann ist die Reihenfolge von Protonenaufnahme und Strukturänderung in Mizellen und Membranen umgekehrt.

Oberflächenladungseffekte:

Der nichtganzzahlige Wert von $n=0,63$ führt zur Vermutung, daß die Protonierungsreaktion nicht direkt aus der wäßrigen Phase erfolgt. Die Protonenaufnahme erfolgt an Glu-134 an der extradiskalen Membranoberfläche (Arnis et al., 1994). Der pH an der Oberfläche ist entweder größer oder kleiner als der pH im Lösungsmittel, je nach Vorzeichen der Oberflächenladung. Diese Differenz zwischen Lösungsmittel-pH und Oberflächen-pH hängt vom pH selbst und der Ionenstärke ab (Szundi und Stoeckenius, 1989). Die Kinetik der Aufnahmereaktion ist vom pH an der Oberfläche abhängig. Der pH wird jedoch im Lösungsmittel gemessen. In bR wird ebenfalls ein Proton von der zytoplasmatischen Oberfläche aufgenommen. Diese Reaktion wird ratenlimitierend für den M-Zerfall bei hohem pH (Otto et al., 1989). Dort wurde aus der M-Zerfallskinetik ebenfalls ein Wert von $n=0,7$ beobachtet, der durch Oberflächenladungseffekte erklärt werden konnte.

Neuere Messungen der Salzabhängigkeit des M_I/M_{II} Gleichgewichtes (DeLange et al., 1997) schlagen vor, daß die dort beobachtete pK Verschiebung wenigstens zum Teil von dem Abschirmeffekt der positiven Oberflächenladung auf der extradiskalen Seite durch das Salz herrührt. Eine positive Oberflächenladung dieser Seite könnte ebenfalls die Orientierung der adsorbierten ROS Membranen an der positiven Stützfolie erklären. Mit steigender ionischer Stärke wird das M_I/M_{II} Gleichgewicht zu M_{II} verschoben (DeLange et al., 1997). Eine damit erwartete Änderung der Kinetik des elektrischen Signals wurde hier jedoch nicht beobachtet, der Effekt der Ionenstärke in Abb. 7.3 liegt in der Amplitude. Besser kann der Effekt der Ionenstärke in Abb. 7.3 durch eine erhöhte Adsorption bei stärkerer Abschirmung der positiv geladenen Stützfolie erklärt werden. Der Abschirmeffekt sollte bei hoher Ionenstärke gesättigt sein und in der Tat wird oberhalb 200 mM eine Reduktion der Amplitude durch das Ausbleichen beobachtet.

Obwohl die Aktivierungsenergien, die pH-Abhängigkeit, und der Zeitbereich auf denselben molekularen Ursprung von elektrischen und optischen Signalen hindeuten, sollte erwähnt werden, daß unter gleichen experimentellen Bedingungen die Zeitkonstanten nicht exakt gleich sind. Unglücklicherweise ist es nicht möglich, Absorptionsmessungen und elektrische Messungen dieser Art an derselben Probe durchzuführen. Bei gleicher Temperatur, pH und Ionenstärke sind die elektrischen Zeitkonstanten etwa zwei bis dreimal schneller. Während die Absorptionsmessungen in wäßriger Lösung durchgeführt wurden, wurden die elektrischen Signale an Membranen erhalten, die an einer positiv geladenen Stützfolie adsorbiert waren. Die Abweichungen in der Kinetik sind daher höchst wahrscheinlich durch Unterschiede im lokalen pH und im lateralen Druck zu erklären. Ähnliche Unterschiede für elektrische und optische Messungen wurden mit Bacteriorhodopsin erhalten (Holz et al., 1989). In diesem Fall waren die kinetischen Daten in Übereinstimmung mit den optischen, wenn eine pH Verschiebung von etwa einer Einheit zu tieferen Werten angenommen wurde.

Photoreaktion aus M_{II}

Es ist bekannt, daß das M_{II} Intermediat durch blaues Licht photoreversibel ist (Williams, 1968). Der Mechanismus dieser Photorückreaktion ist nicht im Detail bekannt, aber vermutlich ist es die schnelle lichtinduzierte Isomerisierung von *all-trans* zu *11-cis* oder *9-cis*, gefolgt von einer langsamen Dunkelreaktion. Bei dieser wird die Schiffsbasis von Glu-113 reprotoniert und anschließend ein Proton abgegeben. Die Absorptionsabnahme bei 380 nm und Zunahme um 500 nm, die bei der Photorückreaktion beobachtet werden (Arnis und Hofmann, 1995), reflektieren die Reprotonierung der Schiffsbasis. Für Rhodopsin in Dodecylmaltosid Mizellen zeigt die Kinetik der Photorückreaktion zwei Komponenten von näherungsweise gleicher Amplitude (bei 12°C, pH 6, 130 mM NaCl (Arnis und Hofmann,

1995)). Die eine Komponente ist schneller als 1 ms und damit zeitlich nicht aufgelöst und die andere Komponente zeigt eine Anstiegszeit von 50 ms. Differenzspektren zeigten, daß die schnelle und langsame Komponente von zwei unterschiedlichen Endprodukten mit Werten von λ_{\max} von 470 und 500 nm herrühren (Arnis und Hofmann, 1995). Ähnliche Resultate wurden zuvor mit ROS Membranen erhalten (Williams, 1968). In Dodecylmaltosid Mizellen ist die Photorückreaktion von einer Protonenabgabe begleitet, die dreimal langsamer stattfindet ($t_{1/2}=250$ ms bei pH 7 und 12°C) als die Kinetik der Reprotonierung der Schiffischen Base (Arnis und Hofmann, 1995). Hier wurde mit ROS Membranen beobachtet, daß die Ladungsbewegung der Photorückreaktion mit nur einer Zeitkonstante von 30 ms erfolgt. (pH 7,3; 150 mM KCl, 22°C). Vermutlich ist diese Komponente das elektrische Analogon der 50 ms Komponente bei den Absorptionmessungen. Das Vorzeichen der Ladungsverschiebung (Abb. 7.5) ist konsistent mit einer Reprotonierung der Schiffischen Base von derselben Gruppe, die im Vorwärtsschritt das Proton erhalten hat, nämlich Glu-113. Diese Ladungsbewegung ist auffällig langsam. In Bacteriorhodopsin ist die entsprechende Reaktion der Protonentransfer von Asp-85 zur Schiffischen Base in der Photorückreaktion des M-Intermediats. Diese erfolgt mit einer Zeitkonstante von 200 ns (siehe Kap. 5.3), also fünf Größenordnungen schneller als in Rhodopsin. Daher wird sich der Mechanismus der Reprotonierung der Schiffischen Base in der Photorückreaktion in diesen beiden Proteinen stark unterscheiden. Im Prinzip sollte die Photorückreaktion aus M_{IIa} und M_{IIb} mit unterschiedlicher Kinetik in den Ausgangszustand von Rhodopsin erfolgen. Diese Fragestellung könnte mit elektrischen Messungen mit Doppelblitzanregung (grün/blau) untersucht werden, ähnlich wie in den Experimenten zur Photorückreaktion aus dem M-Intermediat von Bacteriorhodopsin in Kap 5.3.

