

8 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den intramolekularen Ladungsverschiebungen und den Absorptionsänderungen der Membranproteine Bacteriorhodopsin (bR) und Rhodopsin nach Anregung durch Lichtabsorption.

Dazu wurde zunächst ein experimenteller Aufbau realisiert, bei dem ein erster Laserblitz den Photozyklus von bR auslöst und im variablen Zeitabstand ein zweiter Laserblitz folgt, der die Photoreaktion der Intermediate L, M, N oder O hervorruft. Die Datenerfassung konnte dabei wahlweise mit Einsetzen des ersten oder des zweiten Blitzes gestartet werden. Durch den Einsatz eines schnellen Speicheroszilloskops und durch die Reduktion der linear abgetasteten Daten auf eine logarithmische Zeitskala konnten die Ladungsverschiebungen und die Absorptionsänderungen in dem Zeitbereich zwischen 1 ns und 200 s aufgezeichnet werden. Aus der Zeitspur des Doppelblitzexperiments und den Zeitspuren der beiden Blitze bei Einzelanregung wurde eine Differenz gebildet, um die Photoreaktion der Intermediate von dem überlagerten Photozyklussignal und der zusätzlichen Grundzustandsanregung des zweiten Blitzes herauszufiltern.

Bei den elektrischen Messungen konnte die Differenzbildung nicht sinnvoll über den ganzen Zeitbereich durchgeführt werden. Hier bremsen Aufladungseffekte im späten Teil des Photozyklus die langsamen Prozesse noch weiter ab. Bei den Doppelblitzexperimenten ist zur Zeit der zweiten Anregung bereits die Spannung von der ersten Anregung aufgebaut, daher ist das hier erhaltene Signal nicht eine einfache lineare Überlagerung von Spannungssignalen der Anregung von Grundzustand und der des jeweiligen Intermediats. Das Herausfiltern des Spannungssignals der Reaktion des Intermediats ist daher für langsame Prozesse nicht möglich. Bei den elektrischen Messungen wurden daher die Aufladungseffekte genauer untersucht und es wurde eine analytische Gleichung zur Beschreibung dieses Effektes gefunden. Mit Hilfe dieser Gleichung konnte gezeigt werden, daß sich die Aufladung im wesentlichen nur auf die u_3 Komponente im ms-Zeitbereich auswirkt, die dem M-Zerfall zugeordnet wird. Mit Doppelblitzexperimenten konnte gezeigt werden, daß sich die Rate für diesen Prozeß, bei einer über dem Verschiebeweg angelegten Spannung $V(a)-V(b)$, mit der Gleichung $k = k_0 e^{\frac{ze^{V(a)-V(b)}}{2k_B T}}$ aus der Ratentheorie beschreiben läßt.

Durch optische Doppelblitzexperimente konnte gezeigt werden, daß die Photoreaktionen der Intermediate L und M, angeregt durch einen grünen bzw. blauen zweiten Blitz, zurück in den Ausgangszustand bR führen. Analoge elektrische Experimente zeigten, daß dabei die Bewegung des Protons umgekehrt zur üblichen Pumprichtung erfolgt, die Ionenpumpe also inhibiert wird. Die Photorückreaktion von M konnte mit Hilfe apparativer Verbesserungen des Verstärkers und der digitalen Abtastung erstmals in elektrischen Messungen zeitlich aufgelöst werden. Als Ergebnis wurde ein zweiphasiger Zerfall von der isomerisierten Form M' zu bR ermittelt, der die Reprotonierung der Schiffischen Base von Asp-85 widerspiegelt. Dieser zweiphasige Zerfall wurde ebenfalls in optischen Messungen dieser Photorückreaktion gefunden. Die langsamere der beiden Komponenten erscheint nur oberhalb eines pH Wertes von 6 und bei einem Zeitabstand der größer als 100 μ s ist. Da der pK der Protonenabgabe im Zyklus 5,8 beträgt (Zimányi et al., 1992) und das Erscheinen des Protons auf der Oberfläche mit etwa 70 μ s erfolgt (Alexiev et al., 1995), wurde daraus geschlossen, daß die langsame Komponente der Photorückreaktion aus M mit dieser Protonenabgabe gekoppelt ist. Das bedeutet eine Wechselwirkung der inneren Gruppen, der Schiffischen Base und Asp-85, mit der 14 Å entfernten, dicht unter der Membranoberfläche befindlichen Abgabegruppe. Diese Kopplung wurde im Rahmen des gängigen Verständnisses der Protonenpumpe diskutiert. Dabei spielt die Umorientierung der Seitengruppe von Arg-82 und das Umklappen eines

Wasserstoffbrückennetzwerkes eine wichtige Rolle. Mit einer ad hoc eingeführten zeitabhängigen Änderung des Gleichgewichtes zwischen Asp-85 und Schiffschers Base wurde diese Kopplung beschrieben und damit konnte die Kinetik der Photorückreaktion von M simuliert werden.

Interessant bei der Abhängigkeit der M-Photorückreaktion vom Zeitabstand ist, daß bei sehr großen Zeitabständen die Reprotonierung der Schiffschers Base im elektrischen Signal immer dasselbe Vorzeichen hat, die Reprotonierung also immer von der extrazellulären Seite her erfolgt. Nach der allgemeinen Auffassung des Pumpmechanismus hat sich im späten M-Zustand, dem sogenannten M_2 , die Zugänglichkeit der Schiffschers Base von Asp-85 auf der extrazellulären Seite hin zu Asp-96 auf der zytoplasmatischen Seite geändert. Demnach würde man bei großen Zeitabständen eine Umkehrung des Vorzeichens bei der Photorückreaktion erwarten. Da dies nicht beobachtet wurde, ist die Existenz eines derart definierten M-Intermediats in Frage gestellt. Vielmehr scheint die Zugänglichkeit von Asp-85 unverändert, während die Zugänglichkeit von Asp-96 im späten M lediglich hinzukommt.

Weiterhin wurden die Photorückreaktionen von M in den Mutanten D96A, R82A und E204Q untersucht. Bei D96A sind die beiden Komponenten der Photorückreaktion unverändert gegenüber dem Wildtyp, obwohl bei dieser Mutante im M-Intermediat bereits die Struktur des N-Intermediats des Wildtyps vorliegt, die überwiegend Veränderungen auf der zytoplasmatischen Seite aufweist. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß die Zugänglichkeit der Schiffschers Base zu Asp-85 auch im späten M Intermediat erhalten ist.

Bei der Mutante R82A wurde in der M-Photorückreaktion nur die schnelle Komponente gefunden. Dies ist auch bei hohem pH Wert der Fall, wenn die Protonenabgabe wieder stattfindet. Daher ist hier offenbar die Kopplung der Abgabegruppe mit Asp-85 und der Schiffschers Base gestört. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß Arg-82 an dieser Kopplung im Wildtyp beteiligt ist.

In der Mutante E204Q ist die vorgeschlagene Protonenabgabegruppe durch das neutrale Glutamin ersetzt. Tatsächlich fehlt im elektrischen Signal der Mutante E204Q eine Komponente mit 70 μ s, die im Signal des Wildtyps vermutlich die Reorientierung von Arg-82 darstellt. Die Protonenabgabe ist in den späten ms-Zeitbereich verschoben und in Einklang damit wird eine elektrische Komponente in diesem Zeitbereich beobachtet. Im optischen Signal der Photorückreaktion aus M ist das Verhältnis schneller zu langsamer Komponente etwa 2:1, während das Umgekehrte bei dem Wildtyp beobachtet wurde. Die langsame Komponente wurde beim Wildtyp durch eine pK-Änderung von Asp-85, aufgrund der Deprotonierung der Abgabegruppe und Reorientierungen im extrazellulären Kanal, erklärt. Da in der Mutante keine Protonenabgabe stattfindet, ist eine mögliche Erklärung für das geänderte Amplitudenverhältnis, daß hier im Vergleich zum Wildtyp im extrazellulären Kanal nur eine teilweise Reorientierung stattfindet.

Die optischen Messungen der Photoreaktionen aus den Intermediaten N und O schließlich zeigen, daß die Intermediate nach der Reprotonierung der Schiffschers Base von Asp-96 nicht mehr durch eine zweite Anregung den Weg des Photozyklus zurücklaufen können. Die Deprotonierung der Schiffschers Base ist nun nicht mehr möglich. Statt dessen entstehen neue Intermediate, die zwar auch wieder zu bR zerfallen, jedoch wird dabei die Protonenpumpe vermutlich nicht mehr inhibiert.

Mit elektrischen Messungen wurde die alkalische Form der Mutante D85N untersucht. Diese Form ist ähnlich dem M-Intermediat, denn die Schiffschers Base ist deprotoniert und die Seitengruppe in Position 85 ist neutral. Bei Anregung mit blauem Licht kann jedoch kein Transfer von der Position 85 zur Schiffschers Base wie bei der Photorückreaktion aus M stattfinden, da die Seitengruppe 85 jetzt nicht deprotonierbar ist. Daher bleibt als Donor zur Protonierung der Schiffschers Base die Asp-96 auf der zytoplasmatischen Seite, diese

Protonierung erfolgt jedoch viel langsamer als die von Asp-85 in der Photorückreaktion von M.

Trotz der Entfernung des Akzeptors an der Stelle 85 transportiert die Mutante bei hohen pH Werten nach Lichtanregung Protonen in dieselbe Richtung wie der Wildtyp. Die Untersuchung des Azideffektes auf das elektrische Signal ließ auf eine langsame, teilweise in der Systementladung verschwindende Komponente schließen, deren Vorzeichen dieselbe Richtung der Ladungsverschiebung wie die ms-Komponente zeigt und daher Indiz für das vollständige Durchlaufen eines Pumpzyklus ist. Aus dem Vergleich der elektrischen Komponenten mit den entsprechenden Komponenten aus optischen Photozyklus- und pH-Indikatormessungen und durch den Vergleich mit den Vorgängen im Wildtyp, ließ sich ein Modell für die molekularen Schritte beim Ladungstransport in dieser Mutante finden. Im ersten Schritt wird die Schiffische Base von Asp-96 protoniert, im zweiten wird Asp-96 von der zytoplasmatischen Seite reprotoniert und in einem sehr langsamen (einige s) dritten Schritt wird das Proton von der Schiffischen Base zur extrazellulären Seite hin abgegeben. Somit ist das Protein wieder in den Ausgangszustand zurück gelangt.

Ergänzend wurden elektrische und optische Messungen mit Rinderrhodopsin durchgeführt. Ebenso wie bei bR entsteht nach Anregung mit einem grünen Laserblitz ein Intermediat mit einer deprotonierten Schiffischen Base und einem blauverschobenen Spektrum (M_{II}). Hier konnte das elektrische Signal im ms-Zeitbereich mit der Absorptionsänderung bei 380 nm, also dem M_{II} Aufbau, korreliert werden. Beide Meßmethoden lieferten Zeitspuren die sich mit zwei Exponentialfunktionen anpassen lassen. Die pH-Abhängigkeit der Zeitkonstanten und der Amplituden dieser beiden Exponentialfunktionen ließen sich mit dem

Reaktionsmodell $M_I \xrightleftharpoons{+H^+} M_{IIa} \rightleftharpoons M_{IIb}$, also mit zwei bei 380 nm absorbierenden M_{II} -Spezies, erklären. Dabei ist der erste Übergang mit einer Protonierungsreaktion gekoppelt, während der zweite Übergang pH unabhängig ist. Die gefundene Reihenfolge ist damit kontrovers zu dem zur Zeit diskutierten Reaktionsmodell, das jedoch hauptsächlich auf Messungen an Mizellen beruht.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die durch einen blauen Laserblitz gestartete Photoreaktion von M_{II} eine elektrische Spannungsamplitude mit umgekehrtem Vorzeichen wie der M_{II} Aufbau liefert. Vermutlich kehrt hier das Proton, das im M_{II} Aufbau von der Schiffischen Base zum Akzeptor Glu-113 transferiert wurde, wieder zurück. Im Gegensatz zur Photorückreaktion aus dem M-Intermediat von bR geschieht diese Reaktion mit einer Zeitkonstante, die etwa fünf Größenordnungen in der Zeit langsamer ist.

