

# **Elektrophysiologische Charakterisierung der Konformationsdynamik von Ionenpumpen *in situ***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Sven Geibel  
aus Groß-Gerau

Frankfurt am Main  
2003  
(DF1)



Vom Fachbereich chemische und pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen:

Dekan:.....

Gutachter:.....

Datum der Disputation:.....



Meinen Eltern



Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

- Geibel, S., Kaplan, J. H., Bamberg, E. & Friedrich, T. (2003).  
Conformational dynamics of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase probed by voltage clamp fluorometry.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 964-969
- Friedrich, T., Geibel, S., Kalmbach, R., Chizhov, I., Ataka, K., Heberle, J., Engelhard, M. & Bamberg, E. (2002).  
Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality.  
*J Mol Biol* 321, 821-38.
- Geibel, S., Friedrich, T., Ormos, P., Wood, P. G., Nagel, G. & Bamberg, E. (2001).  
The voltage-dependent proton pumping in bacteriorhodopsin is characterized by optoelectric behavior.  
*Biophys J* 81, 2059-68.



*Although the molecular details are unknown, carrier proteins are thought to transfer the solute across the lipid bilayer by undergoing reversible conformational changes that alternately expose the solute binding site first to one side of the membrane and then to the other.*

*(Molecular biology of the cell [1])*



# Molekulare Mechanismen des vektoriellen Transports

## ladungstransportierender Membranproteine

Der Mechanismus der Energietransduktion beim aktiven Transport über biologische Membranen ist ein faszinierendes und dennoch weitgehend ungeklärtes Problem der Biologie. Spätestens seit der Postulierung von Mitchells chemiosmotischer Hypothese [2] zeigte sich, dass der transmembranäre elektrochemische Ionengradient die treibende Kraft einer Vielzahl auf den ersten Blick völlig unabhängiger Phänomene ist – wie zum Beispiel sekundär aktiver Transport, ATP-Synthese oder Rotation bakterieller Flagellen.

Die molekularen Mechanismen bei der Erzeugung dieser Gradienten oder zur Nutzung der in ihnen gespeicherten Energie beginnen wir gerade erst zu verstehen. Jedoch lassen Gensequenzierungen und die Analyse von Aminosäuresequenzen vermuten, dass viele der beteiligten molekularen Maschinen zu Familien gruppiert werden können, innerhalb derer von den Archaeobakterien bis zu den Säugern ein hohes Maß an Homologie herrscht.

Zur Generierung der transmembranären elektrochemischen Ionengradienten kann in den *Archaea* die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin Lichtenergie in einen aktiven, auswärtsgerichteten Protonentransport konvertieren. In Vertebraten erlaubt die Aktivität der  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase den Aufbau von Ionengradienten, indem sie unter ATP-Hydrolyse  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle und  $\text{K}^+$ -Ionen in die Zelle transportiert. Es wird angenommen, dass die molekularen Mechanismen, die es diesen biologischen Maschinen ermöglichen, primär aktiven, gerichteten – also vektoriellen – Ionentransport gegen enorme Konzentrationsgefälle zu bewerkstelligen, auf fein abgestimmten und ortsspezifischen Konformationsgleichgewichten beruhen. Die Untersuchung der Dynamik und der Ortsspezifität der Konformationsgleichgewichte der  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase und des Bakteriorhodopsin, sowie eines homologen bakteriellen Proteins, sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.



# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>GLOSSAR</b>   | <b>19</b> |
| <br>   |           |
| <b>Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase</b>   | <b>23</b> |
| <br>   |           |
| <b>1 EINLEITUNG</b>  | <b>24</b> |
| <b>1.1 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase</b>   | <b>24</b> |
| 1.1.1 Historie   | 24        |
| 1.1.2 Reaktionszyklus: Das Albers-Post-Modell [7,8]                                      | 25        |
| 1.1.3 Elektrogenizität   | 26        |
| 1.1.4 Struktur   | 27        |
| 1.1.5 Inhibitoren  | 29        |
| 1.1.6 Konformationsänderungen während des katalytischen Zyklus                           | 29        |
| 1.1.7 Voltage-Clamp-Fluorometrie auf der Basis zielgerichteter Fluoreszenzmarkierung     | 30        |
| 1.1.8 Molekulare Dynamik   | 31        |
| 1.1.9 Voltage-Clamp-Fluorometrie auf der Basis potentialsensitiver Fluoreszenzfarbstoffe | 32        |
| <br>   |           |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>   | <b>34</b> |
| <b>2.1 Molekularbiologie</b>   | <b>34</b> |
| 2.1.1 cDNA-Konstrukte und cRNA-Synthese  | 34        |
| 2.1.2 Heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten                             | 34        |
| <b>2.2 Elektrophysiologie</b>  | <b>35</b> |
| 2.2.1 Oozyten-Vorbehandlung  | 35        |
| 2.2.2 Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Messungen  | 35        |
| 2.2.2.1 Messungen und Analyse stationärer Ströme   | 35        |
| 2.2.2.2 Messungen und Analyse transienter Ströme   | 36        |
| <b>2.3 Epifluoreszenzmessungen</b>   | <b>36</b> |
| 2.3.1 Fluoreszenzmarkierung  | 36        |
| 2.3.2 Voltage-Clamp-Fluorometrie   | 37        |

|            |   |  |           |
|------------|---|--|-----------|
| <b>3</b>   | <b>RESULTATE</b>  |  | <b>39</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Voltage-Clamp-Fluorometrie nach ortsspezifischer Fluoreszenzmarkierung</b>   |  | <b>39</b> |
| 3.1.1      | Einleitung  |  | 39        |
| 3.1.2      | Funktionelle Expression   |  | 39        |
| 3.1.3      | Charakterisierung der Referenzkonstrukte mit (NaK <sub>WT</sub> ) und ohne (NaK <sub>zero</sub> ) extrazellulär zugängliche Cysteine  |  | 41        |
| 3.1.3.1    | K <sup>+</sup> -Konzentrations- und Spannungsabhängigkeit der stationären Ströme  |  | 41        |
| 3.1.3.2    | Transiente Ströme unter K <sup>+</sup> -freien Bedingungen  |  | 42        |
| 3.1.4      | Charakterisierung der Cystein-Substitutionsmutanten in der TM5-TM6-Schleife   |  | 45        |
| 3.1.4.1    | Stationäre Pumpströme   |  | 47        |
| 3.1.5      | Fluoreszenzsignale des molekularen Sensorkomplexes der TMRM-markierten Cystein-Mutante NaK <sub>zero</sub> (N790C)  |  | 48        |
| 3.1.5.1    | K <sup>+</sup> -induzierte stationäre Fluoreszenzänderung   |  | 48        |
| 3.1.5.2    | Spannungssprunginduzierte Fluoreszenzänderung unter K <sup>+</sup> -freien Bedingungen  |  | 49        |
| 3.1.5.3    | Einfluss der Farbstoff-Bindung auf die kinetischen Parameter der Cystein-Mutanten NaK <sub>zero</sub> (N790C)   |  | 51        |
| 3.1.5.4    | Na <sup>+</sup> -Substitution von TEA, NMG und TMA  |  | 53        |
| 3.1.5.5    | K <sup>+</sup> -Abhängigkeit von Fluoreszenz- und Stromsignalen   |  | 54        |
| 3.1.5.6    | K <sup>+</sup> -Abhängigkeit der ΔF-U-Kurve   |  | 58        |
| 3.1.5.7    | K <sup>+</sup> -Abhängigkeit der Relaxationkinetik der Fluoreszenzen  |  | 59        |
| 3.1.6      | Einfluss von Mutationen in der Kationen-Bindungstasche am Beispiel NaK <sub>zero</sub> (N790C,E779A)  |  | 59        |
| 3.1.6.1    | Elektrophysiologische Charakterisierung   |  | 59        |
| 3.1.6.2    | Stationäre Pumpströme und Fluoreszenz   |  | 60        |
| 3.1.6.3    | Spannungssprunginduzierte Fluoreszenzänderung unter K <sup>+</sup> -freien Bedingungen  |  | 60        |
| 3.1.6.4    | K <sup>+</sup> -Abhängigkeit der spannungssprunginduzierten Fluoreszenzänderung   |  | 61        |
| <b>3.2</b> | <b>Voltage-Clamp-Fluorometrie mit dem potentialsensitiven Farbstoff RH421</b>   |  | <b>63</b> |
| 3.2.1      | Einleitung  |  | 63        |
| 3.2.2      | RH421 als Sensor für das Membranpotential   |  | 63        |
| 3.2.3      | Fluoreszenzsignale RH421-markierter Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase-Konstrukte  |  | 64        |
| 3.2.3.1    | Transiente Ströme und Fluoreszenzen der Konstrukte NaK <sub>WT</sub> und NaK <sub>zero</sub> unter K <sup>+</sup> -freien Bedingungen                                       |  | 65        |
| 3.2.3.2    | Stationäre Fluoreszenzen der Konstrukte NaK <sub>WT</sub> und NaK <sub>zero</sub>   |  | 67        |
| 3.2.3.3    | Vergleich mit dem Konstrukt NaK <sub>zero</sub> (N790C)   |  | 69        |
| <b>4</b>   | <b>DISKUSSION</b>   |  | <b>70</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Voltage-Clamp-Fluorometrie nach ortsspezifischer Fluoreszenzmarkierung</b>   |  | <b>70</b> |
| 4.1.1      | Einleitung  |  | 70        |
| 4.1.2      | Das Entfernen der extrazellulären Cysteine der Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase induziert keine drastisch veränderten Transporteigenschaften                         |  | 70        |
| 4.1.3      | Durch sulfhydrylspezifische Bindung von TMRM an NaK <sub>zero</sub> (N790C) bildet sich ein molekularer Sensorkomplex für Konformationsänderungen der Transmembranhelix TM5 |  | 73        |
| 4.1.3.1    | Niedrige Fluoreszenz in E <sub>2</sub> P, hohe in E <sub>1</sub> P  |  | 74        |
| 4.1.3.2    | Fluorimetrische Detektion der E <sub>1</sub> P-E <sub>2</sub> P-Konformationsänderung   |  | 74        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 4.1.3.3    | Direkte dynamische Korrelation   | 75         |
| 4.1.3.4    | TMRM-Effekte   | 76         |
| 4.1.3.5    | Fluorimetrische Detektion der Verteilung in den E <sub>1</sub> - und E <sub>2</sub> -Zuständen   | 78         |
| 4.1.3.6    | Wirkung von Ouabain  | 79         |
| 4.1.3.7    | Elektrogenizität der Na <sup>+</sup> -Bindung/Freisetzung  | 79         |
| 4.1.3.8    | Elektrogenizität der K <sup>+</sup> -abhängigen Reaktionsschritte  | 80         |
| 4.1.3.9    | Ortsspezifische Zuordnung der Fluoreszenzänderungen  | 81         |
| 4.1.4      | Mutation der Kationen-Bindungstasche am Beispiel NaK <sub>zero</sub> (N790C,E779A)   | 82         |
| 4.1.4.1    | Einfluss der Mutation N790C auf die Kationen-Bindungsaffinitäten   | 83         |
| 4.1.4.2    | Einfluss der Mutation E779A auf die Kationen-Bindungsaffinitäten   | 83         |
| 4.1.4.3    | Einfluss der Mutation E779A auf die Verteilung in E <sub>1</sub> - und E <sub>2</sub> -Zuständen                                       | 84         |
| 4.1.5      | Zusammenfassung  | 86         |
| <b>4.2</b> | <b>Voltage-Clamp-Fluorometrie mit dem potentialsensitiven Farbstoff RH421</b>  | <b>88</b>  |
| 4.2.1      | Einleitung   | 88         |
| 4.2.2      | Einfluss der Bindung von RH421 auf die kinetischen Parameter von NaK <sub>WT</sub> und der Cystein-Mutante NaK <sub>zero</sub> (N790C) | 88         |
| 4.2.3      | Vergleich der Kinetiken der Relaxation der transienten Ströme und Fluoreszenzänderung von RH421  | 89         |
| 4.2.4      | Fluorimetrische Detektion der Verteilung in E <sub>1</sub> - und E <sub>2</sub> -Zuständen   | 90         |
| 4.2.5      | Zusammenfassung  | 90         |
|            | <br>   |            |
|            | <b>Retinalproteine</b>   | <b>94</b>  |
|            | <br>   |            |
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG</b>  | <b>95</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Bakteriorhodopsin</b>   | <b>95</b>  |
| 1.1.1      | Historie   | 95         |
| 1.1.2      | Photozyklus und spektrale Eigenschaften  | 96         |
| 1.1.3      | Elektrische Pumpströme   | 97         |
| 1.1.4      | Struktur   | 98         |
| 1.1.5      | Vektorialität  | 100        |
| <b>1.2</b> | <b>Proteorhodopsin</b>   | <b>103</b> |
| <b>2</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN</b>   | <b>105</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Molekularbiologie</b>   | <b>105</b> |
| 2.1.1      | cDNA-Konstrukte und cRNA-Synthese  | 105        |
| 2.1.1.1    | Bakteriorhodopsin  | 105        |
| 2.1.1.2    | Proteorhodopsin  | 106        |
| 2.1.2      | Heterologe Expression  | 107        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 2.1.2.1    | <i>Xenopus laevis</i> Oozyten  | 107        |
| 2.1.2.2    | HEK-293-Zellen   | 107        |
| 2.1.2.3    | <i>Escherichia coli</i> – Proteorhodopsin Expression, Aufreinigung und Rekonstitution                      | 107        |
| <b>2.2</b> | <b>Elektrophysiologie</b>  | <b>108</b> |
| 2.2.1      | Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Messungen  | 108        |
| 2.2.1.1    | Bakteriorhodopsin und Proteorhodopsin  | 108        |
| 2.2.2      | Whole-Cell Patch-Clamp-Messungen   | 109        |
| 2.2.2.1    | Bakteriorhodopsin  | 109        |
| 2.2.3      | Photoströme an künstlichen Lipidmembranen  | 109        |
| 2.2.3.1    | Proteorhodopsin  | 109        |
| <b>2.3</b> | <b>Spektroskopie und optische Ausstattung</b>  | <b>110</b> |
| 2.3.1      | Optische Ausstattung zur Anregung von Photoströmen   | 110        |
| 2.3.1.1    | Anregung von Photoströmen an Zellen  | 110        |
| 2.3.2      | Absorptionsspektroskopische Untersuchungen zur Spannungsabhängigkeit des BR-Photozyklus                    | 111        |
| 2.3.2.1    | Zeitaufgelöste Spektroskopie von BR in Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> unter Spannungsklemme-Bedingungen | 111        |
| 2.3.2.2    | Zeitaufgelöste Spektroskopie von BR an Proteoliposomen   | 111        |
| 2.3.2.3    | Zeitaufgelöste Spektroskopie von BR an Purpormembranfragmenten   | 112        |
| <b>3</b>   | <b>RESULTATE</b>   | <b>113</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Bakteriorhodopsin: Regulation durch das elektrochemische Potential</b>                                  | <b>113</b> |
| 3.1.1      | Einleitung   | 113        |
| 3.1.2      | Heterologe Expression von Bakteriorhodopsin in <i>Xenopus</i> -Oozyten und in HEK-293-Zellen               | 113        |
| 3.1.3      | Die Spannungsabhängigkeit des Protonentransports in Gegenwart eines pH-Gradienten                          | 115        |
| 3.1.4      | Die Spannungsabhängigkeit der apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten des BR-Transportzyklus        | 118        |
| 3.1.5      | Spektroskopische Messungen   | 123        |
| 3.1.6      | Spannungssprung-Experimente  | 125        |
| <b>3.2</b> | <b>Bakteriorhodopsin: M-stabilisierende oder destabilisierende Mutanten</b>                                | <b>128</b> |
| 3.2.1      | Einleitung   | 128        |
| 3.2.2      | Grundlegende Unterschiede der Mutanten von BR <sub>WT</sub>  | 129        |
| 3.2.3      | N-akkumulierende Mutanten (1): BR <sub>F171C</sub>   | 131        |
| 3.2.4      | N-akkumulierende Mutanten (2): BR <sub>F219L</sub>   | 133        |
| 3.2.5      | M-akkumulierende Mutanten (1): BR <sub>D96N</sub>  | 134        |
| 3.2.6      | M-akkumulierende Mutanten (2): BR <sub>D96G</sub>  | 136        |
| 3.2.7      | M-akkumulierende Mutanten (3): Die „Tripel“-Mutante BR <sub>D96G,F171C,F219L</sub>                         | 137        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>3.3</b> | <b>Proteorhodopsin</b>   | <b>138</b> |
| 3.3.1      | Einleitung   | 138        |
| 3.3.2      | Der $pK_a$ des primären Protonendonors D97   | 139        |
| 3.3.3      | Zeitaufgelöste UV/VIS-Spektroskopie: Temperatur- und pH-Abhängigkeit des Proteorhodopsin-Photozyklus                         | 140        |
| 3.3.4      | Zeitaufgelöste FT-IR-Spektroskopie   | 142        |
| 3.3.5      | Photoströme von Proteorhodopsin an künstlichen Lipidmembranen  | 145        |
| 3.3.5.1    | Blaulichblitz-Experimente  | 147        |
| 3.3.5.2    | Abhängigkeit der Photoströme von der Lichtintensität   | 147        |
| 3.3.5.3    | Photoströme ausgelöst durch kontinuierliche Belichtung oder Laserblitze  | 149        |
| 3.3.6      | Photoströme von Proteorhodopsin exprimiert in <i>Xenopus</i> -Oozyten  | 150        |
| <b>4</b>   | <b>DISKUSSION</b>  | <b>153</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Bakteriorhodopsin: Regulation durch das elektrochemische Potential</b>  | <b>153</b> |
| 4.1.1      | Einleitung   | 153        |
| 4.1.2      | Der Einfluss von $\Delta pH$ auf den Protonentransport ist geringer als thermodynamisch möglich                              | 153        |
| 4.1.3      | Die Regulation des BR-Transportzyklus  | 154        |
| 4.1.4      | Optoelektrische Eigenschaften von Bakteriorhodopsin  | 158        |
| 4.1.5      | Physiologische Betrachtungen   | 159        |
| 4.1.6      | Zusammenfassung  | 159        |
| <b>4.2</b> | <b>Bakteriorhodopsin: M-stabilisierende oder destabilisierende Mutanten</b>  | <b>161</b> |
| 4.2.1      | Einleitung   | 161        |
| 4.2.2      | Klassifizierung der Mutanten   | 161        |
| 4.2.3      | Das M-Intermediat als „Sensor“ des Membranpotentials   | 163        |
| 4.2.4      | $BR_{F171C}$ erlaubt eine stärkere Akkumulation von N als $BR_{F219L}$   | 165        |
| 4.2.5      | Frühes ( $M_1$ ) und spätes ( $M_2$ ) M-Intermediat – die Mutanten $BR_{D96N}$ und $BR_{D96N}$                               | 166        |
| 4.2.6      | Protonentransport trotz des Ausbleibens substantieller Konformationsänderungen – die „Tripel“-Mutante $BR_{D96G,F171C,F219}$ | 166        |
| 4.2.7      | Protonierungszustände der Schiffbase   | 167        |
| 4.2.8      | Konformationsänderungen als Grundlage der Vektorialität  | 169        |
| 4.2.9      | Zusammenfassung  | 170        |
| <b>4.3</b> | <b>Proteorhodopsin</b>   | <b>172</b> |
| 4.3.1      | Einleitung   | 172        |
| 4.3.2      | Die Rolle von D97, dem primären Protonenakzeptor von Proteorhodopsin   | 172        |
| 4.3.3      | M-ähnliche Intermediate, der Blaulichteffekt   | 174        |
| 4.3.4      | Intensitätsabhängigkeit: Hinweise auf einen Zwei-Photonen-Prozess  | 175        |
| 4.3.5      | Transportmoden   | 176        |

|         |                             |     |
|---------|-----------------------------|-----|
| 4.3.5.1 | Spannungabhängigkeit        | 177 |
| 4.3.5.2 | Physiologische Überlegungen | 178 |
| 4.3.6   | Zusammenfassung             | 179 |

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| <b>LITERATURVERZEICHNIS</b> | <b>180</b> |
|-----------------------------|------------|

# Glossar

|                     |   |
|---------------------|---|
| ADP                 | Adenosin-5'-diphosphat  |
| ATP                 | Adenosin-5'-triphosphat   |
| ATPase              | ATP-hydrolysierendes Enzym  |
| ATR                 | <i>attenuated total reflection</i> , abgeschwächte Totalreflexion   |
| BLM                 | <i>black lipid membrane</i> ; bimolekulare, künstliche, optisch schwarze Lipidmembran   |
| BR                  | Bakteriorhodopsin   |
| BR <sub>WT</sub>    | Bakteriorhodopsin-Wildtyp-Konstrukt, für die Expression in <i>Xenopus</i> -Oozyten  |
| BR <sub>D96N</sub>  | Bakteriorhodopsin-Konstrukt, das die Mutation D96N trägt, auf Basis des Konstrukts BR <sub>WT</sub> für die Expression in <i>Xenopus</i> -Oozyten. Andere Indizes bezeichnen die entsprechenden Mutanten          |
| BR <sub>GFP</sub>   | Bakteriorhodopsin-Konstrukt mit C-terminalem GFP zur Expressionsüberprüfung für die Expression in HEK-293-Zellen  |
| HKBR                | Bakteriorhodopsin-Konstrukt mit N-terminaler H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase β-Untereinheit als Zielsteuerungssequenz für die Expression in <i>Xenopus</i> -Oozyten  |
| HKBR <sub>GFP</sub> | Bakteriorhodopsin-Konstrukt mit N-terminaler H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase β-Untereinheit als Zielsteuerungssequenz und C-terminalem GFP zur Expressionsüberprüfung für die Expression in HEK-293-Zellen |
| cDNA                | kodierende Desoxyribonukleinsäure   |
| CP                  | cytoplasmatisch   |
| cRNA                | kodierende Ribonukleinsäure   |
| DDT                 | Dithiothreitol  |
| EC                  | extrazellulär   |
| EGTA                | Ethylenglykol- <i>bis</i> -N,N,N',N'-tetraessigsäure  |
| ESI                 | <i>electrospray-ionization</i>  |
| FITC                | Fluorescein-Isothiocyanat   |
| FT-IR               | <i>Fourier-transform-infrared</i> , Fourier-Transform Infrarot  |
| HEPES               | N-(2-Hydroxyethylen)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)   |
| HSV                 | <i>Herpes simplex</i> Virus Antigen   |
| K <sub>i</sub>      | Halbsättigungskonzentration der Inhibition  |
| K <sub>M</sub>      | Halbsättigungskonzentration nach Michaelis-Menten   |
| [K <sup>+</sup> ]   | Eckige Klammern bezeichnen die Stoffkonzentration   |
| kDa                 | Kilodalton  |
| MALDI-TOF           | <i>matrix-assisted-laser-desorption/ionization-time-of-flight</i>   |
| MES                 | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure  |
| MOPS                | 2-(N-Morpholino)propansulfonsäure   |
| NA                  | Numerische Appertur   |

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| NaK <sub>rat</sub>                | Ratten-Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha_1$ -Untereinheit, die <i>a priori</i> eine verminderte Ouabain-Sensitivität aufweist.  |
| NaK <sub>rat</sub> (E779A)        | Ratten-Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha_1$ -Untereinheit, die <i>a priori</i> eine verminderte Ouabain-Sensitivität aufweist, in die die Mutation E779A eingefügt wurde.   |
| NaK <sub>WT</sub>                 | Referenzkonstrukt der Schafs-Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha_1$ -Untereinheit, welches die Mutationen Q111R und N122D trägt, um Ouabain-Insensitivität zu gewährleisten.  |
| NaK <sub>zero</sub>               | Durch die Mutationen C911S und C964A extrazellulär Cystein-freies Konstrukt der Schafs-Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha_1$ -Untereinheit, welches zusätzlich die Mutationen Q111R und N122D enthält, um Ouabain-Insensitivität zu gewährleisten.   |
| NaK <sub>zero</sub> (N790C)       | Durch die Mutationen C911S und C964A extrazellulär Cystein-freies Konstrukt der Schafs-Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha_1$ -Untereinheit, welches zusätzlich die Mutationen Q111R und N122D enthält, um Ouabain-Insensitivität zu gewährleisten. Die Mutation N790C erlaubt ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung durch TMRM.  |
| NaK <sub>zero</sub> (N790C,E779A) | Durch die Mutationen C911S und C964A extrazellulär Cystein-freies Konstrukt der Schafs-Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha_1$ -Untereinheit, welches zusätzlich die Mutationen Q111R und N122D enthält, um Ouabain-Insensitivität zu gewährleisten. Die Mutation N790C erlaubt ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung durch TMRM. Zusätzlich wurde die Mutation E779A eingefügt. |
| Ni-NTA                            | <i>nickel-nitrilotriacetic acid</i> ; Nickel-Nitrilo-Triessigsäure  |
| NMG                               | D(-)-N-Methylglucamin   |
| Occlusion                         | das Einschließen der Kationen in die Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase  |
| OD                                | optische Dichte   |
| PAGE                              | <i>polyacrylamidegel electrophoresis</i> , Polyacrylamidgel-Elektrophorese  |
| PCR                               | <i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion   |
| PDB                               | <i>protein data base</i> , Proteindatenbank   |
| pH                                | negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration   |
| P <sub>i</sub>                    | anorganisches Phosphat H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> /HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>  |
| pK <sub>a</sub>                   | negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstanten einer Säure   |
| Protonenakzeptor                  | eigentlich: Protonenakzeptor-Gruppe   |
| Protonendonor                     | eigentlich: Protonendonor-Gruppe  |
| RH421                             | (N-(4-sulfobutyl)-4-(4-(p-(dipentylamino)phenyl)butadienyl)pyridinium <i>inner salt</i>   |
| Schiffbasen-Bindung               | eigentlich: Basenbindung nach Schiff  |
| SDS                               | <i>sodium-dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat   |
| SERCA-Ca <sup>2+</sup> -ATPase    | Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarcoplasmatischen Reticulums  |
| TEA                               | Tetraethylammonium  |
| TMA                               | Tetramethylammonium   |
| TMRM                              | Tetramethylrhodamin-6-maleimid; Derivat eines Tetramethylrhodamin-Fluorophors, welches durch eine Maleimid-Gruppe die spezifische Bindung an Cysteine (Sulphydrylgruppen) zulässt.  |
| transient                         | vorübergehend, transitorisch; eigentlich: vorstationär  |
| TRIS                              | Tris(hydroxymethyl)aminomethan  |

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <i>blue light quenching</i>        | Blaulichtlöschung des BR-Photostroms  |
| <i>gating charges</i>              | Schaltladungen  |
| <i>gating currents</i>             | Schaltladungsverschiebungen   |
| <i>giant excised (patch-clamp)</i> | vergleiche <i>patch-clamp</i> ; als giant excised patch-clamp bezeichnet man eine <i>patch-clamp</i> -Methode, bei der das vor der Pipettenöffnung liegende verhältnismäßig große Membranstück (Ø 20 – 40 µm) aus der Zellmembran herausgerissen wird.  |
| <i>headstage</i>                   | Vorverstärker des <i>patch</i> - oder <i>voltage-clamp</i> Verstärkers  |
| <i>inside-out</i>                  | Innenseite aussen   |
| <i>molecular switch</i>            | Molekularer Schalter; Orientierungsänderung der Schiffbasen   |
| <i>outside-out</i>                 | Aussenseite aussen, entspricht <i>right-side-out</i>  |
| <i>patch-clamp</i>                 | Membranflechklemme; elektrophysiologische Messtechnik, bei der einem elektrisch isolierten Membranstück (oder einer ganzen Zelle) ein definiertes Membranpotential aufgeprägt, „geklemmt“ wird, wodurch eine Bestimmung des elektrischen Stroms unter definiertem Membranpotential ermöglicht wird. Dabei bildet sich zwischen der Öffnung der Messpipette und dem Membranstück ein elektrisch hoher Widerstand im Gigaohm-Bereich. |
| <i>right-side-out</i>              | wie in der Plasmamembran, physiologisch-gerichtet   |
| <i>targeting sequence</i>          | Zielsteuerungssequenz. Sie sorgt für einen verbesserten Einbau des Enzyms in die Plasmamembran  |
| <i>two-electrode voltage-clamp</i> | Zwei-Elektroden Spannungsklemme; elektrophysiologische Messtechnik, bei der einer elektrisch isolierten Zelle ein definiertes Membranpotential aufgeprägt, „geklemmt“ wird, wodurch eine Bestimmung des elektrischen Stroms unter definiertem Membranpotential ermöglicht wird.   |
| <i>whole-cell (patch-clamp)</i>    | vergleiche <i>patch-clamp</i> ; Bei dieser Ganzzell- <i>patch-clamp</i> -Methode wird das vor der Pipettenöffnung liegende Membranstück der Zellmembran zerstört, so dass die gesamte Zelle als verhältnismäßig großes elektrisch isoliertes Membranstück verbleibt.  |

Für die 20 natürlichen Aminosäuren wurde der Dreibuchstaben- oder Einbuchstabencode nach IUPAC-IUB-Vereinbarung (1969) verwendet.



## **Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase**

# 1 Einleitung

## 1.1 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

P-typ-ATPasen bilden eine große Gruppe primär aktiv transportierender Membranproteine, wobei sich der Name von der intermediären Phosphorylierung des Enzyms bei der ATP-Hydrolyse ableitet. Das bekannteste Mitglied dieser Familie ist die ubiquitäre Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, die während jedes Transportzyklus 3 Na<sup>+</sup>-Ionen aus der Zelle exportiert und 2 K<sup>+</sup>-Ionen importiert und dadurch den elektrochemischen Gradienten von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> über die Plasmamembran der meisten Vertebratenzellen aufrechterhält.

### 1.1.1 Historie

Die ersten Hinweise auf die Existenz der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase stammen bereits aus dem Jahre 1941, als Dean darauf hindeutete, dass die notwendige Voraussetzung für die in Säugetierzellen beobachtete Bewegung von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> gegen einen Konzentrationsgradienten das Vorhandensein einer an den Glukosemetabolismus gekoppelten Ionenpumpe ist [3]. Die Grundlage für eine eindeutige Definition der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-spezifischen Prozesse in nativen Membranpräparationen schuf die Identifizierung von Digitalis-Derivaten pflanzlicher Herkunft wie Ouabain, spezifischen Inhibitoren der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, durch Schatzmann (1953) [4]. 1957 beschrieb Skou ein Enzym aus der Mikrosomenfraktion von Nervenzellen des Krebses *Carcinus meanas*, welches in Gegenwart von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Mg<sup>2+</sup> ATP hydrolysierte [5]: die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Obwohl in den darauffolgenden Jahren viele Versuche unternommen wurden, den Transportmechanismus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase aufzuklären, gelang der nächste große Durchbruch erst 1975 durch Jørgensen, dem es glückte, die Ionenpumpe mit hoher spezifischer Aktivität aufzureinigen [6]. In Jørgensens Präparation war die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase so fest in der Membran verankert, dass andere Proteine durch die Zugabe ionischer Detergenzien wie SDS entfernt werden konnten, ohne dass die Ionenpumpe an Aktivität verlor. Mit den so aufgereinigten Proben konnte eine große Anzahl struktureller und funktioneller Studien durchgeführt werden, auf denen das im Folgenden dargestellte Reaktionsmodell basiert.

### 1.1.2 Reaktionszyklus: Das Albers-Post-Modell [7,8]

Während der Hydrolyse von ATP durch die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase kommt es zur Phosphorylierung des Enzyms, bei der eine Phosphatgruppe kovalent an einen Aspartat-Rest innerhalb des hochkonservierten DKTG-Motivs gebunden wird. In ihrer nichtphosphorylierten Form bindet die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in Gegenwart von Na<sup>+</sup> ATP mit hoher Affinität. Mit K<sup>+</sup> dagegen ist die ATP-Affinität weitaus niedriger, was auf zwei verschiedene Konformationen hindeutet: die „Na<sup>+</sup>-Konformation“ (E<sub>1</sub>) und die „K<sup>+</sup>-Konformation“ (E<sub>2</sub>) [6,9-13]. Interessanterweise unterscheiden sich in beiden Konformationen auch die Affinitäten für die verschiedenen Kationen. Auf der cytoplasmatischen Seite, in der E<sub>1</sub>-Konformation, ist die Affinität für Na<sup>+</sup> 3-mal höher als die für K<sup>+</sup> (K<sub>M</sub> für Na<sup>+</sup> ~ 10 mM [14,15]), während sie in der E<sub>2</sub>-Konformation extrazellulär beinahe 12-mal höher für K<sup>+</sup> als für Na<sup>+</sup> (K<sub>M</sub> für K<sup>+</sup> ~ 1 mM [14,15]) ist [16]. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Konformationen besteht darin, dass die E<sub>1</sub>-Konformation drei Bindungsstellen für Kationen aufweist, die E<sub>2</sub>-Konformation dagegen nur zwei. Die sich daraus ergebende Stöchiometrie für den Ionentransport ist 3 zu 2 und begründet die Elektrogenizität der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase [17].

Aus diesen Gegebenheiten lässt sich ein stark vereinfachtes Reaktionsmodell ableiten, welches als Albers-Post-Modell [7,8] bezeichnet wird und in Abbildung 1.1 dargestellt ist. Im Prinzip kann das Enzym in 4 Zuständen vorliegen: E<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>P, E<sub>2</sub> und E<sub>2</sub>P. Zwischen diesen Zuständen herrschen reversible Fließgleichgewichte [18]. Der unter physiologischen Bedingungen irreversible Schritt ist die Phosphorylierung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase durch ATP. Diese Phosphorylierung der mit den Ionen-Bindungsstellen ins Cytoplasma gerichteten E<sub>1</sub>-Konformation führt zur Bildung von E<sub>1</sub>P, wobei 3 Na<sup>+</sup>-Ionen vom Enzym regelrecht eingeschlossen werden („Occlusion“). Diese werden nach der Konformationsänderung zur E<sub>2</sub>P-Konformation, die nun die Ionen-Bindungsstellen auf der extrazellulären Seite trägt, zur extrazellulären Seite ausgeschieden. Anschließend werden 2 K<sup>+</sup>-Ionen gebunden, wodurch die Dephosphorylierung und K<sup>+</sup>-„Occlusion“ hervorgerufen wird. Daraufhin wird erneut die E<sub>1</sub>-Konformation erreicht, und K<sup>+</sup>-Ionen werden zur intrazellulären Lösung abgegeben.

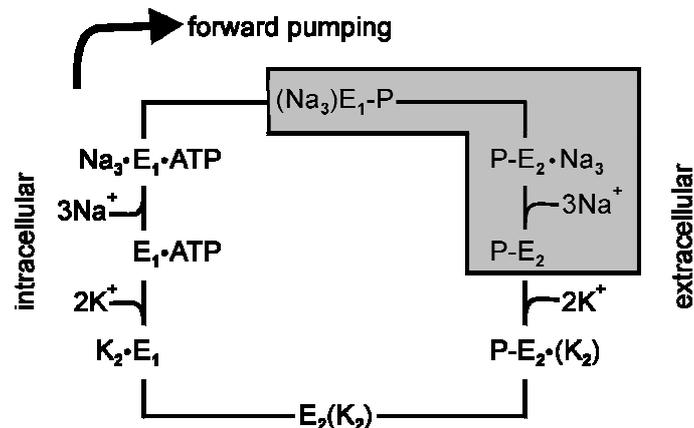


Abbildung 1.1: Vereinfachtes Albers-Post-Modell für den Reaktionszyklus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Im Prinzip kann das Enzym zwei Konformationen einnehmen: E<sub>1</sub> mit Kationen-Bindungsstellen zum Cytoplasma und E<sub>2</sub> mit Kationen-Bindungsstellen zum Extrazellulärraum. Das hauptelektrogene Ereignis wurde den Na<sup>+</sup>-abhängigen Transportschritten zugeordnet (in grau unterlegt), welche kinetisch direkt an den E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsübergang gekoppelt sind.

### 1.1.3 Elektrogenizität

Aufgrund der 3Na<sup>+</sup>/2K<sup>+</sup>-Stöchiometrie der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase vermittelt diese einen Nettotransport von Ladung. Die wesentlichen elektrogenen Ereignisse werden dabei den Na<sup>+</sup>-abhängigen Transportschritten zugeordnet, welche kinetisch direkt an die E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung gekoppelt sind (Abbildung 1.1, grau unterlegt). In Abwesenheit von K<sup>+</sup> ist die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase nahezu ausschließlich auf diese Na<sup>+</sup>-transportierenden Schritte beschränkt, da die Dephosphorylierungsreaktion aus der E<sub>2</sub>P-Konformation unter diesen Bedingungen stark verlangsamt ist. In Form anderer Transportmoden erfolgt in Abwesenheit von K<sup>+</sup> zwar auch sowohl elektroneutraler wie elektrogener Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch, diese beide Transportmoden finden jedoch mit sehr niedrigen Wechselzahlen statt [14].

Eine Änderung des Membranpotentials führt zu einer Änderung der Reaktionskinetiken der elektrogenen Ereignisse und folglich zu extrazellulärer Bindung/Freisetzung von Na<sup>+</sup> in der E<sub>2</sub>P-Form der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Damit einhergehend ändert sich die Konzentration der E<sub>2</sub>P-Form mit gebundenem Na<sup>+</sup>. Diese bestimmt im Folgenden eine Neueinstellung des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Fließgleichgewichts, was zusätzliche Na<sup>+</sup>-Bindung/Freisetzung zulässt. Die Na<sup>+</sup>-Bindungs-/Freisetzungsreaktion ist unmittelbar mit der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Gleichgewichtsreaktion verknüpft [19-24]. Holmgren et al. konnten 2000 erstmals drei unabhängige Ladungsverschiebungen, d.h. drei trennbare

Na<sup>+</sup>-Bindungs-/Freisetzungsschritte, zeigen und damit das in Abbildung 1.2 dargestellte Reaktionsmodell für die Na<sup>+</sup>-abhängigen Reaktionsschritte postulieren [25].

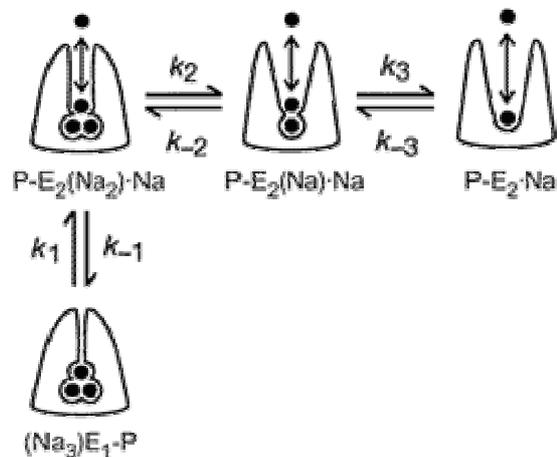


Abbildung 1.2: Na<sup>+</sup>-transportierende Schritte der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (entsprechend den in Abbildung 1.1 in grau unterlegten Reaktionsschritten). Von der (Na<sub>3</sub>)E<sub>1</sub>P-Form ausgehend wird infolge der Konformationsänderung zu (Na<sub>3</sub>)E<sub>2</sub>P unmittelbar ein Na<sup>+</sup>-Ion an das extrazelluläre Medium abgegeben. Dabei ergibt sich die apparente Reaktionsgeschwindigkeitskonstante dieser Reaktion aus der Summe der (durch das elektrische Feld beeinflussbaren) Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k<sub>1</sub> und k<sub>-1</sub>. Diese Reaktion ist der langsamste und hauptelektrogene Schritt und sorgt damit für die potentialabhängige Verteilung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in den Zuständen E<sub>1</sub>P und E<sub>2</sub>P. Anschließend werden die beiden anderen Na<sup>+</sup>-Ionen mit Zeitkonstanten im µs-Bereich an das extrazelluläre Medium abgegeben. Alle Reaktionen sind reversibel. Abbildung übernommen aus [25].

### 1.1.4 Struktur

Die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase besteht aus drei Untereinheiten. Die schwere α-Untereinheit mit ungefähr 100 kDa ist durch ATP phosphorylierbar und besitzt Bindungsstellen für Kationen, ATP und den hochspezifischen Inhibitor Ouabain, und stellt somit eindeutig die katalytische Einheit dar. Die leichte, regulatorische β-Untereinheit mit ungefähr 50 kDa ist ein Membranglykoprotein. Die α- und die β-Untereinheit bilden einen stabilen Heterodimer. Die dritte, die γ-Untereinheit, ist nicht notwendig, um die ATPase Aktivität aufrechtzuerhalten, ändert jedoch die Affinität für K<sup>+</sup> [26] und ist an der Zielsteuerung in der Zelle beteiligt [27]. Weiterhin wird vermutet, dass sie dem Enzym die Eigenschaften eines Kationen-Kanals verleiht [28].

Lingrel et al. klonierten erstmalig die cDNA einer α-Untereinheit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase aus der Schafsnieren und publizierten 1985 ihre Primärstruktur [29]. 1986 folgte die Primärstruktur der β-Untereinheit [30]. Anschließend wurden Homologe für viele weitere Arten gefunden. Obwohl

intensive Anstrengungen unternommen wurden, eine dreidimensionale Struktur der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zu erhalten, gibt es bis heute lediglich Strukturen niedriger Auflösung [31]. Jedoch gelang es 2000 Toyoshima et al. [32], die Struktur der eng verwandten Ca<sup>2+</sup>-ATPase des sarcoplasmatischen Retikulums (SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase) mit 2.6 Å Genauigkeit zu bestimmen. Die großen Ähnlichkeiten der Primärstrukturen, übereinstimmende Hydrophobizitätsprofile, Proteasezugänglichkeits- und immunochemische Studien über die Sekundärstruktur rechtfertigen eine Anpassung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Aminosäuresequenz an die dreidimensionale Struktur der SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase [33]. Abbildung 1.3 zeigt ein solches Strukturmodell.

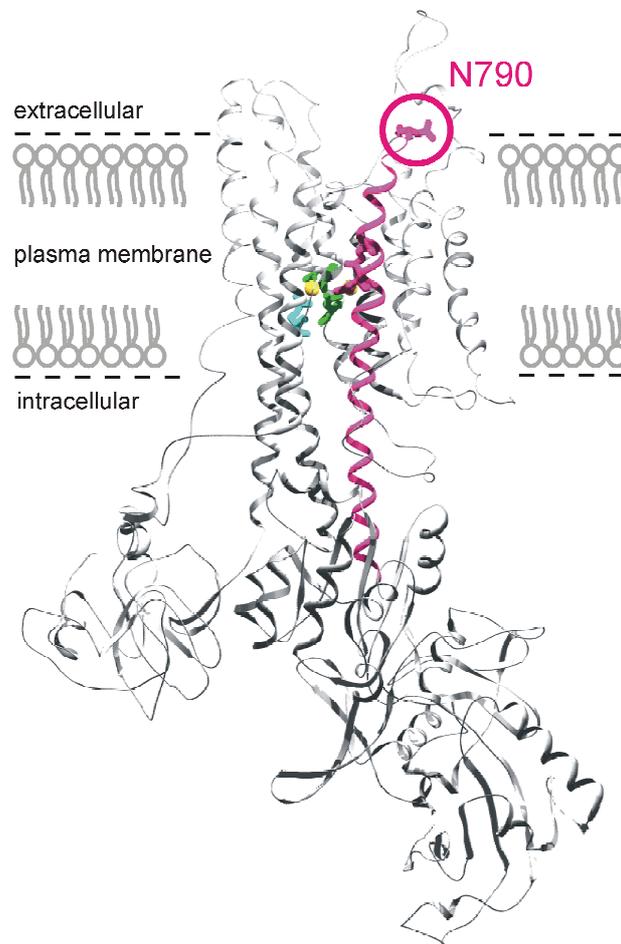


Abbildung 1.3: Dreidimensionale Struktur der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α-Untereinheit erhalten aus einer SwissModel Anpassung (Jan B. Koenderink) anhand der Röntgenstruktur der SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PDB Struktureintrag 1EUL [32]). Transmembranhelix TM5 ist rot markiert, wie auch die Aminosäure N790 (Kreis). Die Aminosäuren der Kation-Bindungstasche sind angefärbt wie die dazugehörige Helix: blau – E327 (TM4), rot – D776 und E779 (TM5), grün – D804 und D808 (TM6). Zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen (aus der Referenzstruktur) sind gelb hervorgehoben.

### 1.1.5 Inhibitoren

Neben Oligomycin und ortho-Vanadat sind Digitalis-Derivate pflanzlicher Herkunft (auch Herzglykoside oder kardiotonisch wirksame Steroide genannt) die gebräuchlichsten Inhibitoren der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Diese Digitalis-Derivate, von denen Ouabain (g-Strophantidin) oder Digitoxigenin die geläufigsten sind, wirken von der extrazellulären Seite der Plasmamembran als sehr spezifische Inhibitoren. Der K<sub>i</sub>-Wert der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase für Ouabain liegt in den meisten Geweben zwischen 10<sup>-7</sup> bis 10<sup>-5</sup> M [16]. Die Phosphorylierung in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> und der Übergang des Enzyms in den E<sub>2</sub>P-Zustand begünstigen dabei die Bindung von Ouabain zusätzlich [34-38]. Maßgeblich an der Ouabain-Bindung beteiligt ist die extrazelluläre Schleife zwischen den Transmembransegmenten TM1 und TM2 der α-Untereinheit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (siehe unten) [39-41]. Dieser Bereich liefert auch eine Grundlage für die stark unterschiedliche Ouabain-Sensitivität unterschiedlicher Gewebe und Spezies. Lingrel et al. bemerkten beim Vergleich der Primärstrukturen verschiedener Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasen, dass die α<sub>1</sub>-Untereinheiten von Nagetieren geladene Aminosäuren an den Enden der ersten beiden Transmembranhelices aufweisen, während die aller anderen Spezies und die α<sub>2</sub>- und α<sub>3</sub>-Untereinheiten dort ungeladene Aminosäuren ausbilden. Werden die neutralen Aminosäuren Glutamin und Asparagin der Schafs-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase dieser Region (Aminosäuren 111 und 122 der α<sub>1</sub>-Untereinheit) durch geladene ersetzt, sinkt die Affinität der mutierten Schafs-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gegenüber Herzglykosiden drastisch [37,42]. Die geladenen Aminosäuren in dieser Region erklären somit die verringerte Ouabain-Sensitivität in Nagetieren. In neueren Publikationen wurden jedoch auch andere Bereiche der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α-Untereinheit als an der Ouabain-Bindung beteiligt beschrieben [43-47].

### 1.1.6 Konformationsänderungen während des katalytischen Zyklus

Wie oben dargestellt wird der Reaktionszyklus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase durch das Albers-Post-Schema beschrieben (Abbildung 1.1). Die Transduktion der freien Energie aus der ATP-Hydrolyse in aktiven Ionentransport wird durch Konformationsänderungen herbeigeführt, die sowohl für die α-, als auch für die β-Untereinheit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase nachgewiesen wurden [6,9,12,48-55]. Mit rein biochemischen

Analysen, in denen konformationspezifische Proteolysemuster untersucht wurden, konnte die Dynamik dieser Prozesse aber nicht aufgelöst werden [6,9]. Daher wurden verschiedene Ansätze unternommen, Konformationsänderungen und ihre Dynamik an der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluorescein-5'-isothiocyanat (FITC), N-(p-(2-benzimidazolyl)phenyl)maleimid (BIPM) oder Styrylpyridinium-Farbstoffen wie RH421 [12,51-55] zu untersuchen. Diese experimentellen Ansätze jedoch waren aus verschiedenen Gründen limitiert. So ist Fluoreszenzmarkierung mit Styrylpyridinium-Farbstoffen nicht ortsspezifisch. Der Fluorophor Fluorescein dagegen bindet zwar an einer definierten Aminosäureposition, blockiert aber die Enzymfunktion nahezu vollständig. Zusätzlich erlaubt keine der Methoden, die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase unter physiologischen Bedingungen wie z.B. definierten Ionengradienten oder Membranpotentialen zu untersuchen. Des Weiteren basierten alle geschilderten Ansätze auf nativen Enzympräparationen, die Mutagenesestudien ausschließen.

### **1.1.7 Voltage-Clamp-Fluorometrie auf der Basis zielgerichteter Fluoreszenzmarkierung**

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Konformationsänderungen zeitaufgelöst und ortsspezifisch nachzuweisen und diese partiellen Reaktionen des Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Reaktionszyklus zuzuordnen. Dazu sollte eine Methode genutzt werden, die ursprünglich in den Laboratorien von Isacoff und Bezanilla am Shaker K<sup>+</sup>-Kanal etabliert wurde [56,57]. Bei der sogenannten Voltage-Clamp-Fluorometrie auf Basis zielgerichteter Fluoreszenzmarkierung werden elektrophysiologische Messungen an heterolog exprimierten, integralen Transportproteinen durchgeführt, in denen einzelne Cysteine in vermutlichen Reporter-Positionen im Bereich extrazellulär orientierter Schleifen eingebracht werden. Ein Fluoreszenzfarbstoff mit einer sulfhydrylspezifisch bindenden Gruppe (z.B. Tetramethylrhodamin-6-maleimid, TMRM, Abbildung 1.4 A) wird dann kovalent an ein solches Cystein gekoppelt, und die beiden bilden zusammen einen ortsspezifischen molekularen Sensor-Komplex. Der Reporterfluorophor reagiert auf Hydrophobizitätsänderungen seiner Umgebung, die durch die Konformationsänderungen herbeigeführt werden. Die Überexpression der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in Oozyten von *Xenopus laevis* bietet die Möglichkeit, unter kontrolliertem Membranpotential zeitgleich und

zeitaufgelöst spektroskopische und elektrische Eigenschaften während der Konformationsänderung *in situ* unter physiologischen Bedingungen zu beobachten.

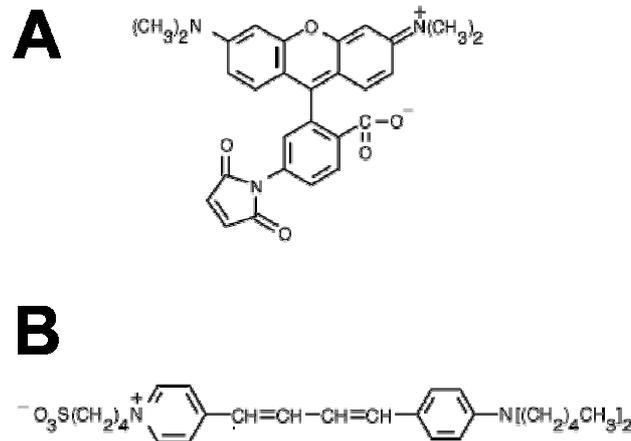


Abbildung 1.4: Fluoreszenzfarbstoffe (A) Tetramethylrhodamin-6-maleimid (TMRM) (B) N-(4-sulfobutyl)-4-(4-(p-dipentylamino)phenyl)butadienylpyridinium inner salt (RH421)

### 1.1.8 Molekulare Dynamik

Die Beteiligung von Transmembranhelix TM5 an funktionellen Rearrangements der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase wurde von Lutsenko et al. vorgeschlagen [49]. Diese Autoren konnten zeigen, dass das TM5-TM6-Segment und die verbindende extrazelluläre Schleife nach Trypsinierung des Enzyms in Abhängigkeit von der Gegenwart von K<sup>+</sup> in das umgebende Medium freigesetzt wird. Bei Betrachtung des Modells der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase auf Basis der Röntgenstruktur der SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase in der E<sub>1</sub>-Konformation (Abbildung 1.3) wird deutlich, dass die Transmembranhelix TM5 sich von der ATP-Bindungsregion, bzw. der Phosphorylierungsstelle bis in die Kationen-Bindungstasche erstreckt [32,33]. Da die Transmembranhelix TM5 und die darauffolgende extrazelluläre Schleife zum Transmembransegment TM6 bei allen P-typ-ATPasen hochkonserviert sind, wird dieser Region eine wichtige Rolle in der Energietransduktion zwischen ATP-Hydrolyse und dem Ionentransport zugeordnet. Die kürzlich publizierte Röntgenstruktur der SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase in der E<sub>2</sub>-Konformation [58] zeigte tatsächlich Bewegungen der Transmembranhelix TM5 von ungefähr 5 Å senkrecht zur Membranebene und noch größere relativ zu den anderen Transmembranhelices. Solche Bewegungen wären ausreichend,

um Änderungen der Hydrophobizität an einem Reporterfluorophor eines extrazellulären Sensorkomplexes herbeizuführen [59,60].

Daher wurde die extrazelluläre TM5-TM6-Schleife gewählt, um Reporter-Cysteine einzufügen. Die generierten Cystein-Mutanten zeigten Pumpaktivitäten, die mit der des Wildtyps vergleichbar waren. Nach Fluoreszenzmarkierung mit TMRM bildete die Mutante N790C einen molekularen Sensorkomplex und reagierte auf K<sup>+</sup>-Zugabe und Spannungssprünge mit Änderungen in der Fluoreszenzintensität, welche durch Zugabe des spezifischen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Inhibitors Ouabain gehemmt werden konnten. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse erlauben – *in situ* unter physiologischen Bedingungen – erstmalig Einblicke in die molekularen Details der Konformationsänderungen der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

### **1.1.9 Voltage-Clamp-Fluorometrie auf der Basis potentialsensitiver**

#### **Fluoreszenzfarbstoffe**

Eine andere Möglichkeit, die Ladungsverschiebung infolge von Konformationsänderungen der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zu beobachten, ist die Detektion von Fluoreszenzänderungen des membrangebundenen, potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffs RH421 [54,61-67]. Styryl-Farbstoffe wie RH421 lagern sich so in die Lipidmembran ein, dass die positiven Ladungen des Zwitterions im Kopfgruppenbereich der Lipide zu liegen kommen. Sie reagieren infolgedessen auf Änderungen des Dipolpotentials und des Transmembranpotential [61,68-71]. Dies beruht darauf, dass sowohl Dipolpotential als auch Membranpotential entlang des Farbstoffmoleküls abfallen (Abbildung 1.4 B) [71]. Änderungen des ersteren können unter anderem durch Ladungsverschiebungen innerhalb eines transmembranären Transportproteins hervorgebracht werden [51,54,61-67,72-77].

Styryl-Farbstoffe erwiesen sich in der Vergangenheit als nützliches Instrument, um Membranpotentiale zu detektieren [68-70]. Sie wurden zudem ausgiebig für zeitaufgelöste Messungen an der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase genutzt [51,54,61,65,66,72-75]. Insbesondere hervorzuheben sind dabei Experimente, bei denen durch plötzliches Mischen von ATP mit Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Membranfragmenten die Phosphorylierungsreaktion der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gestartet wurde (*stopped-flow*-Experimente). Dazu

eignete sich insbesondere der Farbstoff RH421, weil er aufgrund seiner schnellen Fluoreszenzantwort für schnelle Relaxationsexperimente genutzt werden konnte. Mittels dieser ATP-Konzentrationsprung-Experimente konnte gezeigt werden, dass der Styryl-Farbstoff RH421 entweder die E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung oder die damit verbundene Ladungsverschiebung detektiert [51,54,63,65,71,72,78,79]. Im Folgenden wurde er daher genutzt, um an nativen Proteinpräparationen weitere Reaktionsschritte des Albers-Post-Zyklus zu untersuchen [64,67].

In der vorliegenden Arbeit konnten die mit RH421 durchgeführten „*in vitro*“-Messungen an Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase aus nativen Enzympräparationen auf ein „*in vivo*“-System, d.h. ein heterologes Expressionssystem übertragen werden. Dazu wurden Voltage-Clamp-Fluorometrie-Messungen mit RH421 an Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten durchgeführt. Das RH421-induzierte Fluoreszenzniveau war direkt proportional zum Membranpotential. Darüberhinaus reagierte RH421 in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-exprimierenden Oozyten infolge von Spannungssprüngen mit zusätzlichen Änderungen in der Fluoreszenzintensität. Diese folgten in ihrem Zeitverlauf dem Zeitverlauf der infolge der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung auftretenden transienten Ströme und konnten wie die transienten Ströme durch Zugabe des spezifischen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Inhibitors Ouabain gehemmt werden.

Voltage-Clamp-Fluorometrie mit dem potentialsensitiven Fluorophor RH421 ermöglicht eine simultane Aufnahme von Strom- und Fluoreszenzsignalen unter Spannungsklemme-Bedingungen an heterolog exprimierten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Konstrukten. Die Fluoreszenzänderung erfolgt abhängig von Konformationsänderungen, da durch diese Veränderungen der unmittelbaren elektrostatischen Umgebung des Fluorophors auftreten. Dies erlaubt zwar keine Untersuchungen über die Ortsspezifität der Konformationsdynamik, ermöglicht aber dafür die fluorimetrische Untersuchung heterolog exprimierter Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Konstrukten, die nicht zuerst durch Cystein-Mutagenese modifiziert werden müssen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologie

#### 2.1.1 cDNA-Konstrukte und cRNA-Synthese

Die cDNAs der Schafs-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1$ -Untereinheit, einer extrazellulär Cystein-freien Schafs-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1$ -Untereinheit, die die Mutationen C911S und C964A enthielt [80], und der Ratten-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\beta_1$ -Untereinheit wurden in den Oozyten-Expressionsvektor pTLN [81] umkloniert. Anschließend wurden durch rekombinante Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) die Mutationen Q111R und N122D in die  $\alpha_1$ -Untereinheit cDNAs eingefügt, um ein Ouabain-insensitives Protein zu erhalten, wodurch selektive Inhibition der endogenen *Xenopus*-Oozyten-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase möglich wurde [36-38]. Das Ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Konstrukt wird im Folgenden NaK<sub>WT</sub> genannt, das extrazellulär Cystein-freie und Ouabain-insensitive Konstrukt NaK<sub>zero</sub>. Einzelne Cystein-Mutationen innerhalb der extrazellulären TM5-TM6-Schleife wurden mittels PCR und Ligation über *PfIM* I und *Mun* I in das NaK<sub>zero</sub>-Konstrukt eingefügt. Alle beschriebenen cDNA-Konstrukte wurden entweder bei MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) oder mittels einer ABI-310 Sequenzieranlage (Applied Biosystems, CA, USA) sequenziert. cRNA wurde mittels des SP6-„mMessage-mMachine“-cRNA-Syntheseansatzes synthetisiert (Ambion, Austin, TX, USA).

#### 2.1.2 Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

Anästhesierten *Xenopus laevis* Weibchen wurden auf chirurgischem Weg Ovarienlappen entnommen. Das gewonnene Gewebe wurde anschließend einem Kollagenaseverdau unterzogen, um isolierte Stadium V bis VI Oozyten zu gewinnen [82]. Jeder Oozyte wurden 15 – 25 ng  $\alpha$ -Untereinheit- und 1.5 – 2.5 ng  $\beta$ -Untereinheit-cRNA der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase injiziert. Anschließend wurden die Oozyten für 3 Tage bei 18 °C in Oozyten-Ringer-Lösung (90 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MOPS, pH 7.4) aufbewahrt. Die Oozyten-Ringer-Lösung enthielt zusätzlich 1 mg/ml Penicillin/Streptomycin.

## **2.2 Elektrophysiologie**

### **2.2.1 Oozyten-Vorbehandlung**

Vor Beginn der Messungen wurden die Oozyten für 60 Minuten in Ladelösung (110 mM NaCl, 5 mM NaCitrat, 10 mM MOPS/TRIS pH 7.4) und für 30 Minuten in Äquilibrierlösung (100 mM NaCl, 20 mM TEACl, 5 mM BaCl<sub>2</sub>, 5 mM NiCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MOPS/TRIS pH 7.4) eingelegt, um die intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Konzentration zu erhöhen [21].

### **2.2.2 Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Messungen**

#### **2.2.2.1 Messungen und Analyse stationärer Ströme**

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzierte stationäre Ströme an Oozyten von *Xenopus laevis* wurden in der Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Konfiguration (Two-Electrode Voltage-Clamp) mit Hilfe eines Dagan CA-1B Verstärkers (Dagan Corp., Minneapolis, MN, USA) gemessen. Die Datenerfassung und die Steuerung des Transmembranpotentials wurden mit der Software pCLAMP 8 über eine Digidata 1200B Schnittstelle durchgeführt (Axon Instruments Inc., Union City, CA, USA). K<sup>+</sup>-induzierte Pumpströme der endogenen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase wurden als Differenz zwischen den Strömen errechnet, die durch ein spezifisches Spannungsprotokoll zuerst in Abwesenheit und dann in Gegenwart von 10 µM Ouabain aufgezeichnet wurden. K<sup>+</sup>-induzierte Pumpströme der heterolog exprimierten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase wurden als Differenz zwischen den Strömen errechnet, die durch ein spezifisches Spannungsprotokoll zuerst in Gegenwart von 10 µM Ouabain und dann in der von 5 mM Ouabain aufgezeichnet wurden. Da bereits Änderungen von 1 % in den elektrischen Parametern der Oozyten (typische Leckleitfähigkeiten betragen 1 – 10 µS) Änderungen in den Leckströmen von 1 – 10 nA bei Spannungssprüngen von +60 mV bis –160 mV verursachen, wurden nur Experimente ohne erkennbare Änderung der Leitfähigkeiten zur weiteren Analyse herangezogen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (20 – 22 °C) durchgeführt. Die Pipetten für Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Experimente wurden mit 3 M KCl gefüllt. Typische Pipettenwiderstände betragen 0.5 – 2 MΩ. Die Badlösung entsprach der Äquilibrierlösung. Für K<sup>+</sup>-Titrationsexperimente und stationäre Pumpstrommessungen wurden 0.3 – 30 mM KCl gegen äquimolare Mengen von NaCl

ausgetauscht. Für Experimente unter Na<sup>+</sup>-freien Bedingungen wurde NaCl komplett durch äquimolare Mengen von TMA, NMG oder TEA ersetzt.

### 2.2.2.2 Messungen und Analyse transienter Ströme

Oozyten wurden folgenden Spannungsprotokollen ausgesetzt: Ausgehend von Haltepotentialen bei –80 mV oder 0 mV wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen –160 mV und +60 mV in 20 mV Schritten für 400 ms durchgeführt. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzierte transiente Ströme wurden als Differenz zwischen der Stromantwort auf einen spezifischen Spannungssprung zunächst in Abwesenheit von K<sup>+</sup> und dann in Gegenwart von 30 mM K<sup>+</sup> und Ouabain beobachtet. An die transienten Ströme wurde eine monoexponentielle Funktion angepasst. Um Artefakte aufgrund des Ladestroms der elektrischen Kapazität der Oozyten zu vermeiden, wurden die ersten wenigen ms nach dem Spannungssprung ausgeschlossen. Die transportierte Ladung Q wurde als das Zeitintegral der angepassten Kurven extrapoliert nach t = 0 des Spannungssprungs bestimmt. An die gegen die Spannung U der Spannungssprünge aufgetragene Ladung, die sich aus dieser Auswertung ergab, wurde eine Boltzmann-Funktion angepasst (Gleichung 1.1):

$$Q(V) = Q_{\min} + \frac{Q_{\max} - Q_{\min}}{1 + \exp[z_q \cdot F \cdot (U - U_{1/2}) / R \cdot T]} \quad (1.1)$$

(Q<sub>max</sub> und Q<sub>min</sub> = Sättigungswerte bei extremen Potentialen; U<sub>1/2</sub> = Spannung der halbmaximalen Aktivierung; z<sub>q</sub> = Äquivalenzladung)

## 2.3 Epifluoreszenzmessungen

### 2.3.1 Fluoreszenzmarkierung

Cystein-spezifische Fluoreszenzmarkierung der Einzel-Cystein-Mutanten wurde durch Inkubation der Na<sup>+</sup>-beladenen Oozyten (siehe 2.2.1 Oozyten-Vorbehandlung) für 2 – 5 Minuten im Dunkeln und bei Raumtemperatur in Äquilibriumlösung erreicht, die 5 μM TMRM (Tetramethylrhodamin-6-maleimid, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) enthielt (Abbildung 1.4 A und 1.5 A). Anschließend wurde

überschüssiger Farbstoff durch ausgiebiges Waschen mit farbstofffreiem Puffer entfernt. Die fluoreszenzmarkierten Oozyten wurden danach bis zu Beginn der Messung im Dunkeln aufbewahrt. Alternativ wurde (nicht Cystein- und daher nicht ortsspezifische) Fluoreszenzmarkierung durch Zugabe der äquimolaren Menge von RH421 (N-(4-sulfobutyl)-4-(4-(p-(dipentylamino)phenyl)butadienyl)pyridinium inner salt, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) für 2 – 5 Minuten im Dunkeln erreicht (Abbildung 1.4 B).

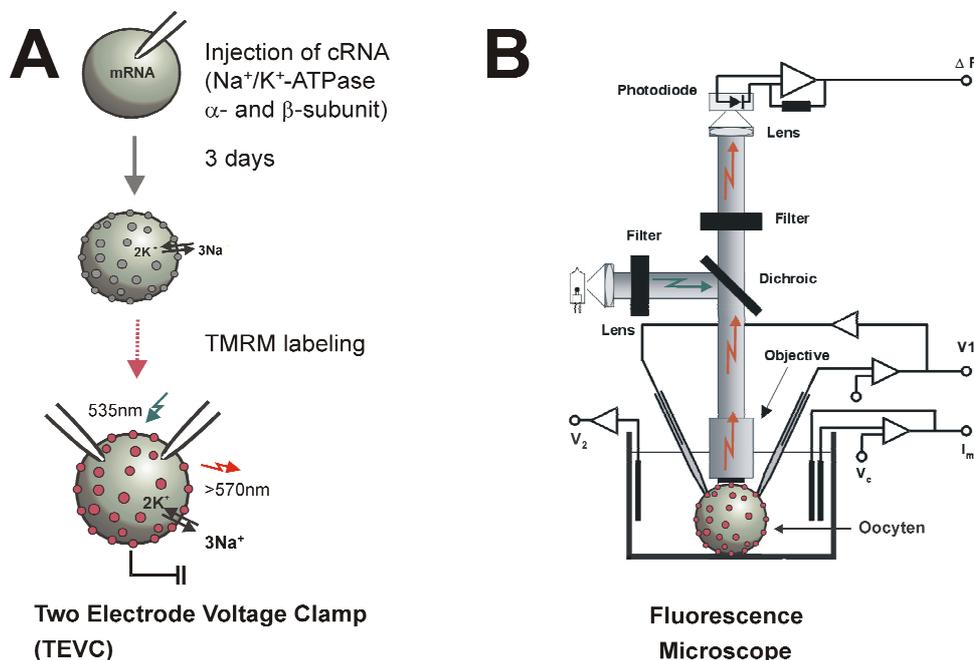


Abbildung 1.5: Voltage-Clamp-Fluorometrie (A) Expressionsprotokoll mit der schematischen Darstellung einer *Xenopus*-Oozyte, die das Konstrukt NaK<sub>zero</sub>(N790) exprimiert, welches nach Fluoreszenzmarkierung mit TMRM den molekularen Sensorkomplex ausbildet. (B) Messaufbau (schematisch)

### 2.3.2 Voltage-Clamp-Fluorometrie

Oozyten wurden in einer Perfusionskammer, die auf dem Kreuztisch eines Epifluoreszenz-Mikroskops mit einem 40x Wasser-Immersionsobjektiv (NA = 0.8) (Zeiss Axioskop 2FS, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) angebracht war, im Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Modus mittels eines Dagan CA-1B Verstärkers (Dagan Corp., Minneapolis, MN, USA) bei Raumtemperatur untersucht. Die Fluoreszenz wurde durch das Licht einer 100 W Halogenlampe angeregt. Das Licht wurde durch einen Filtersatz (XF33, Omega Optical, Brattleboro, VT, USA) gefiltert, der aus einem 535DF50

Anregungsfilter, einem 565EFLP Emissionsfilter und einem 570DRLP dichroitischen Spiegel bestand. Die Fluoreszenz wurde mittels einer PIN-020A Photodiode (UDT Technologies, Torrance, CA, USA) gemessen, die auf dem Kameraausgang des Mikroskops montiert war. Das Photodiodensignal wurde in einen Vorverstärker (*headstage*) eines EPC-5 Patch-Clamp-Verstärkers (List, HEKA, Lamprecht, Deutschland) eingespeist und verstärkt. Eine TTL-gesteuerte Uniblitz VS25 Verschlussblende (Vincent Associates, Rochester, NY, USA) wurde zwischen Lampe und Mikroskop montiert, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern. Die Fluoreszenz- und Stromsignale wurden simultan mittels der Software pCLAMP 8 aufgezeichnet. Die Datenanalyse und Präsentation wurde mittels Origin 5.0 (Microcal Software, Northampton, MA, USA) vorgenommen. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 1.5 B dargestellt.

## 3 Resultate

### 3.1 Voltage-Clamp-Fluorometrie nach ortsspezifischer Fluoreszenzmarkierung

#### 3.1.1 Einleitung

Die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase vermittelt aktiven Ionentransport über die Plasmamembran. Um dies bewerkstelligen zu können, nutzt sie die aus der ATP-Hydrolyse gewonnene Energie für Konformationsänderungen, aufgrund derer Ionen gegen einen elektrochemischen Gradienten aktiv über die Plasmamembran transportiert werden können.

Im folgenden Abschnitt wird gezeigt, wie physiologisch relevante Konformationsänderungen der vollständig aktiven Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase während des Ionentransports zeitaufgelöst und ortsspezifisch detektiert werden können. Dazu wurde die am Shaker K<sup>+</sup>-Kanal erstmalig angewendete Methode der Voltage-Clamp-Fluorometrie kombiniert mit zielgerichteter Fluoreszenzmarkierung genutzt [56,57]. Durch zielgerichtete Substitution einzelner Aminosäuren mit Cysteinen wurde innerhalb der extrazellulären TM5-TM6-Schleife der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -Untereinheit ein molekularer Sensorkomplex generiert. Die ortsspezifische Kopplung eines Rhodamin-Farbstoffs (TMRM) über eine sulfhydrylspezifisch bindende Maleimidgruppe erlaubte Hydrophobizitätsänderungen in der unmittelbaren Umgebung des molekularen Sensorkomplexes zu detektieren. Diese durch Konformationsänderungen an der Membrangrenzfläche hervorgebrachten Hydrophobizitätsänderungen konnten dann mit den Eigenschaften elektrischer Signale verglichen werden, die kinetisch an Konformationsänderungen der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gekoppelt sind [19-25].

#### 3.1.2 Funktionelle Expression

Die cDNA der Schafs-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -Untereinheit und die der  $\beta$ -Untereinheit der Ratten-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase wurden in den *Xenopus*-Expressionsvektor pTLN [81] einkloniert. Dieser enthält eine optimale Kozak-Sequenz und die 5'- bzw. 3'-untranslatierten Regionen des *Xenopus*- $\beta$ -Globins für die

optimale heterologe Expression der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in Oozyten von *Xenopus laevis*. Die Ouabain-Insensitivität generierenden Mutationen Q111R und N122D in der Schafs-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -Untereinheit erlaubten die spezifische Inhibition endogener Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase der Oozyten, die einen K<sub>i</sub>-Wert für Ouabain von ca 0.5  $\mu$ M aufweist [38], durch 10  $\mu$ M Ouabain, ohne die Funktion der heterolog exprimierten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zu beeinträchtigen. Die Ouabain-insensitive Form der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -Untereinheit (hier als NaK<sub>WT</sub> bezeichnet) weist nach Mutagenese einen um den Faktor 1000 höheren K<sub>i</sub>-Wert für Ouabain auf [36,37].

Um die Hintergrundfluoreszenz durch markierte, unspezifische Cysteine der heterolog exprimierten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zu verringern, wurden alle extrazellulär gelegenen Cysteine [83] durch die Mutationen C911S und C964A aus dem Wildtyp der Schafs-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -Untereinheit (NaK<sub>WT</sub>) entfernt. Das Entfernen der extrazellulären Cysteine beeinflusst die Aktivität der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase nicht [83]. In der Mutante ohne extrazelluläre Cysteine – im Folgenden als NaK<sub>zero</sub> bezeichnet – wurden später einzelne Aminosäuren der extrazellulären TM5-TM6-Schleife durch Cysteine ersetzt.

Drei Tage nach Injektion von Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit cRNAs wurde die funktionelle Expression der Konstrukte NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> durch Messung stationärer Ströme auf Zugabe von 30 mM K<sup>+</sup> ermittelt (Abbildung 1.6 A). In Abwesenheit von K<sup>+</sup> findet die intrazelluläre ATP- und Na<sup>+</sup>-Bindung an die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase statt, denn beide Substrate sind innerhalb einer Oozyte vorhanden. Das Enzym wird infolgedessen phosphoryliert, die E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung erfolgt, und Na<sup>+</sup> wird extrazellulär abgegeben. Die anschließende K<sup>+</sup>-abhängige Dephosphorylierungsreaktion findet jedoch in Abwesenheit von K<sup>+</sup> und in Gegenwart von Na<sup>+</sup> nur sehr langsam statt. Erst die Zugabe von K<sup>+</sup> erlaubt eine beschleunigte Dephosphorylierungsreaktion und daher Ionentransport mit hoher Wechselzahl. Dies resultiert in einem elektrischen Strom, der in der 3Na<sup>+</sup>/2K<sup>+</sup>-Stöchiometrie der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase begründet liegt. Die Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Methode erlaubt es, die Spannungsabhängigkeit dieses Stroms zu beobachten.

Bei erfolgreicher Expression betrug der K<sup>+</sup>-sensitive stationäre Pumpstrom ungefähr 350 nA und setzte sich zusammen aus dem Strom der endogenen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (~ 150 nA), der durch die

Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Ouabain nahezu komplett inhibierbar war, und dem Strom der heterolog exprimierten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ( $\sim 200$  nA), nahezu komplett inhibierbar durch 5 mM Ouabain. Die Rolle der  $\beta$ -Untereinheit für die erfolgreiche Überexpression war dabei entscheidend [84,85], denn nur die Koexpression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit konnte eine starke Aktivität heterolog exprimierter Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gewährleisten. Auch die Expression der endogenen Oozyten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -Untereinheit war stark von der Überexpression der  $\beta$ -Untereinheit abhängig. Die von der endogenen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase generierten Ströme bei ausschließlicher Überexpression der  $\beta$ -Untereinheit waren mit ca. 150 nA ungefähr dreimal höher als die von H<sub>2</sub>O-injizierten Kontrolloozyten erzeugten ca. 50 nA (Abbildung 1.6 A). Als optimales Verhältnis wurden 15 – 25 ng  $\alpha$ - und 1.5 – 2.5 ng  $\beta$ -Untereinheit cRNA eingesetzt. Insbesondere niedrigere Anteile an  $\alpha$ - und höhere Anteile an  $\beta$ -Untereinheit cRNA verringerten die Expression.

### **3.1.3 Charakterisierung der Referenzkonstrukte mit (NaK<sub>WT</sub>) und ohne (NaK<sub>zero</sub>) extrazellulär zugängliche Cysteine**

Zunächst mussten die kinetischen Parameter der überexprimierten Referenzkonstrukte NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> untersucht werden, um zu zeigen, dass sich die Eigenschaften dieser Konstrukte nicht maßgeblich von publizierten Daten unterscheiden, und dass es keine gravierenden Unterschiede zwischen den Referenzkonstrukten NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> gab. Mögliche Änderungen der kinetischen Parameter infolge der Cystein-Substitutionen in der TM5-TM6-Schleife konnten dann auf diese Referenzdaten bezogen werden.

#### **3.1.3.1 K<sup>+</sup>-Konzentrations- und Spannungsabhängigkeit der stationären Ströme**

In Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Experimenten zeigten die beiden Referenzkonstrukte NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> nach Zugabe von 30 mM extrazellulärem K<sup>+</sup> nahezu übereinstimmende stationäre Ströme von ca. 200 nA (Abbildung 1.6 A). Die K<sup>+</sup>-stimulierten stationären Ströme resultieren aus dem elektrogenen Transport von 3 Na<sup>+</sup>- gegen 2 K<sup>+</sup>-Ionen mit hohen Wechselzahlen, den die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase nur in Gegenwart extrazellulärer K<sup>+</sup>-Ionen als Substrat zu katalysieren in der Lage ist. Durch

die extrazelluläre Zugabe verschiedener Konzentrationen von K<sup>+</sup> konnte die K<sup>+</sup>-Abhängigkeit der Strom-Spannungs-(I-U)-Kennlinie und die Spannungsabhängigkeit der K<sub>M</sub>-Werte der K<sup>+</sup>-stimulierten stationären Ströme bestimmt werden (Abbildung 1.6 B,C). Die I-U-Kennlinie nimmt dabei die Form einer Glockenkurve an, was auf die Elektrogenizität der extrazellulären Bindung von Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen zurückgeführt werden kann (siehe Diskussion). Bei 3 mM [K<sup>+</sup>] liegt das Kurvenmaximum für beide Konstrukte bei ungefähr 0 mV. Bei niedrigeren K<sup>+</sup>-Konzentrationen ist dieses Maximum zu negativeren Potentialen verschoben. Bei 0 mV ist der K<sub>M</sub>-Wert für K<sup>+</sup> 1.5 ± 0.5 mM (NaK<sub>WT</sub>) bzw. 1.3 ± 0.5 mM (NaK<sub>zero</sub>). Die stationären Ströme und K<sub>M</sub>-Werte beider Konstrukte (NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub>) unterscheiden sich damit im untersuchten Spannungsbereich nicht wesentlich von publizierten Daten (vergleiche z.B. ähnliche stationäre Ströme von Ratten-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in *Xenopus* Oozyten und endogener Oozyten-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in [86], ähnliche I-U-Kurven von Schafs-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in HeLa-Zellen in [87] oder nicht signifikant unterschiedliche K<sub>M</sub>-Werte für K<sup>+</sup> (2.1 ± 0.5 mM bei 0 mV) in [87].

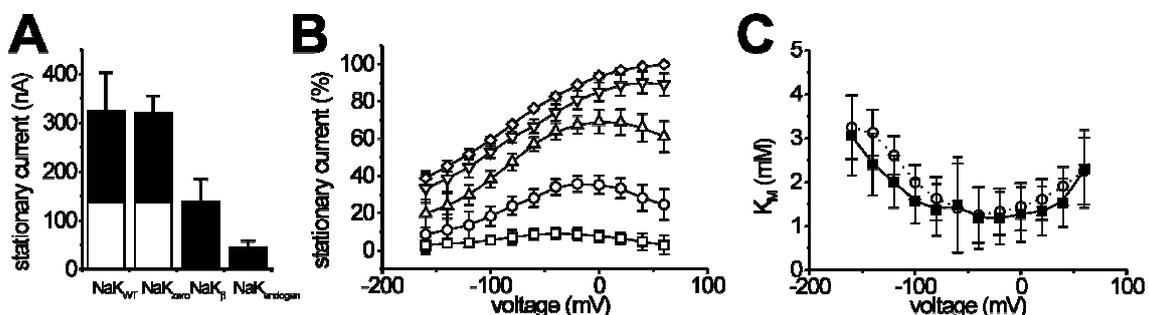


Abbildung 1.6: (A) Ouabain-sensitive stationäre Ströme von *Xenopus*-Oozyten, induziert durch extrazelluläre Zugabe von 30 mM K<sup>+</sup>. Die schwarzen Anteile der beiden ersten Balken repräsentieren Ströme von Oozyten, die die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α-Untereinheit-Konstrukte NaK<sub>WT</sub> oder NaK<sub>zero</sub> und die β-Untereinheit überexprimierten. Die weißen Anteile repräsentieren den durch 10 μM Ouabain inhibierbaren Strom, wie dargestellt als dritter Balken. Dieser Balken repräsentiert gleichzeitig Ströme von Oozyten, die nur die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase β-Untereinheit überexprimierten. Er beruht auf einer damit einhergehenden Überexpression der endogenen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Der vierte Balken repräsentiert Ströme von H<sub>2</sub>O-injizierten Kontrolloozyten, die nur die endogene Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase exprimierten. Die Ergebnisse sind Durchschnittswerte mit Standardfehler von 5 – 15 Oozyten. (B) Spannungsabhängigkeit der stationären Ströme von *Xenopus* Oozyten, die die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α-Untereinheit NaK<sub>WT</sub> und die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase β-Untereinheit exprimierten, induziert durch unterschiedliche K<sup>+</sup>-Konzentrationen: 0.3 mM (Quadrate), 1 mM (Kreise), 3 mM (aufrechte Dreiecke), 10 mM (umgekehrte Dreiecke), 30 mM (Rauten). (C) Spannungsabhängigkeit der K<sub>M</sub>-Werte für K<sup>+</sup> wie ermittelt aus (B) für NaK<sub>WT</sub> (Kreise) im Vergleich mit denen für NaK<sub>zero</sub> (Quadrate). Die Ergebnisse in (B) und (C) sind Durchschnittswerte mit Standardfehler von 3 Oozyten.

### 3.1.3.2 Transiente Ströme unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen

Um genauere Informationen über die Na<sup>+</sup>-transportierenden Reaktionsschritte (infolge der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P Konformationsänderung, unter Vernachlässigung der intrazellulären Na<sup>+</sup>-Bindung und „Occlusion“)

des Albers-Post-Modells zu erhalten, wurden zeitaufgelöste Spannungssprung-Experimente in Abwesenheit von extrazellulärem K<sup>+</sup> durchgeführt (Abbildung 1.7 A). Dabei macht man sich zunutze, dass in Abwesenheit von extrazellulärem K<sup>+</sup> die Dephosphorylierungsreaktion der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase sehr langsam ist ( $< 5 \text{ s}^{-1}$ ). Elektrogener Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch, bei dem Na<sup>+</sup>-Ionen die Rolle der K<sup>+</sup>-Ionen übernehmen, findet unter diesen Bedingungen nur mit sehr geringen Wechselzahlen statt [14]. Die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase liegt unter Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch Bedingungen daher (nahezu) komplett phosphoryliert vor, wodurch diese eine exklusive Untersuchung der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung zulassen. Die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ist also unter diesen Bedingungen nahezu in vollem Umfang auf die Na<sup>+</sup>-transportierenden Schritte beschränkt, die unmittelbar an den E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsübergang gekoppelt sind und mit Ladungstransfer über die Membran einhergehen [19-25]. Änderungen im Membranpotential bestimmen die Reaktionskinetik dieser elektrogenen Reaktionssequenz und verschieben damit die Verteilung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in ihren Enzymkonformationen, also auch das E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Fließgleichgewicht. Infolge einer Störung durch einen Spannungssprung erfolgt eine Relaxation in ein neues E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Fließgleichgewicht mit einer veränderten Verteilung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Moleküle in den Zuständen E<sub>1</sub>P und E<sub>2</sub>P. Die apparente Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Relaxation in diese neue Verteilung ist die Summe der Vorwärts- und Rückwärtsreaktionsgeschwindigkeitskonstanten der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Reaktion. Die in Spannungsklemme-Experimenten beobachteten Ströme folgen Reaktionskinetiken erster Ordnung [19-22]. Positive Potentiale begünstigen den E<sub>2</sub>P-Zustand, denn sie erleichtern die Freisetzung positiver Ladungen auf der extrazellulären Seite und verschieben damit auch das E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Fließgleichgewicht in Richtung des E<sub>2</sub>P-Zustands. Die Freisetzung positiver Ladung auf der extrazellulären Seite resultiert in einem positiven transienten Strom (Abbildung 1.7 A). Um diesen Strom zu beobachten, wurde eine fluoreszenzmarkierte Oozyte Spannungssprüngen in Gegenwart von zunächst 10 μM, dann 5 mM Ouabain ausgesetzt. Der nach Inhibition der heterolog exprimierten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase durch 5 mM Ouabain verbleibende Hintergrundstrom beruht auf Leckleitfähigkeiten der Oozyten und wurde subtrahiert. Abbildung 1.7 A zeigt solche auf 5 mM Ouabain-Zugabe sensitive Differenzströme infolge von Spannungssprüngen von -80 mV zu Potentialen zwischen -160 mV und +40 mV in 40 mV Schritten. Die Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die

Differenzströme ergab die in Abbildung 1.7 B aufgetragene Spannungsabhängigkeit der reziproken Zeitkonstante ( $1/\tau$ ) des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsübergangs.  $1/\tau$  liegt bei 0 mV bei ca.  $80 \text{ s}^{-1}$  und bei  $-160 \text{ mV}$  bei ca.  $300 \text{ s}^{-1}$ . Die resultierenden Kurven der untersuchten Konstrukte NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> sind sich sehr ähnlich.

Eine Auftragung der während der transienten Ströme verschobenen Ladung (Abbildung 1.7 C und D) gibt Aufschluss über die Verteilung der Moleküle in den Zuständen E<sub>1</sub>P und E<sub>2</sub>P sowie über die Anzahl der exprimierten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Moleküle. Da die Anzahl der Ladungen, die durch einen Spannungssprung verschoben wird, aufgrund der begrenzten Zahl der Pumpmoleküle in beiden Richtungen der Spannungsachse beschränkt ist, führen positive Potentiale zu einer maximalen Anreicherung von E<sub>2</sub>P, negative Potentiale dagegen zu einer Anreicherung in der E<sub>1</sub>P-Konformation [19-25]. Die Spannungsabhängigkeit der bewegten Ladung (Q-U-Kurve) folgt einer Boltzmann-Verteilung (Abbildung 1.7 C und D). Die Spannung der Gleichverteilung ( $U_{1/2}$ ) beider Konformationen liegt bei ca.  $-80 \text{ mV}$ , der die insgesamt verschobene Ladung anzeigende Koeffizient  $z_q$  bei ca. 0.7. Aus den Sättigungswerten der Boltzmann-Verteilung ( $\Delta Q = 5 - 20 \text{ nC}$ ) kann die Anzahl der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Moleküle zu ungefähr  $10^{11}$  pro Oozyte bestimmt werden (siehe Diskussion).

Sowohl die ermittelten  $U_{1/2}$ - und  $z_q$ -Werte (NaK<sub>WT</sub>:  $U_{1/2} = -71 \pm 9 \text{ mV}$ ;  $z_q = 0.81 \pm 0.13$ ; NaK<sub>zero</sub>:  $U_{1/2} = -74 \pm 12 \text{ mV}$ ;  $z_q = 0.59 \pm 0.16$ ) als auch die ermittelten  $1/\tau$ -Werte (NaK<sub>WT</sub>:  $1/\tau = 78 \pm 3 \text{ s}^{-1}$ ; NaK<sub>zero</sub>:  $1/\tau = 83 \pm 7 \text{ s}^{-1}$  bei 0 mV) von NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> sind nicht signifikant unterschiedlich. Die apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Gleichgewichtsrelaxation und die E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Gleichgewichtsverteilung stimmen mit publizierten Daten überein ( $1/\tau = 50$  bis  $200 \text{ s}^{-1}$  bei 0 mV;  $U_{1/2} = -30$  bis  $-90 \text{ mV}$ ;  $z_q = 0.6$  bis  $1.0$  [19,21,22,25,88]). Die dargestellten Werte stimmen zudem mit denen aus Ratten-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase überein (NaK<sub>WT</sub>:  $1/\tau$  ca.  $80 \text{ s}^{-1}$  bei 0 mV;  $U_{1/2}$  ca.  $-60 \text{ mV}$ ;  $z_q$  ca. 0.8; Zusammenarbeit mit Jan B. Koenderink, Universität Nijmegen, NL, Manuskript in Vorbereitung). Sowohl die stationären als auch die transienten Ströme konnten durch den Inhibitor Ouabain (5 mM) gehemmt werden (Daten nicht gezeigt). Auch nach vollständigem Ersetzen von Na<sup>+</sup> durch TEA (100 mM) oder NMG (100 mM) verschwanden die transienten Ströme (Daten nicht gezeigt).

Die Konstrukte NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> unterscheiden sich also hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften nicht voneinander. Die erhaltenen Daten stimmen zudem mit denen anderer Publikationen, in denen auch native Gewebepreparationen verwendet wurden, im Wesentlichen überein. Demzufolge führen weder die Mutationen, die die Ouabain-Insensitivität bedingen, noch das Entfernen der extrazellulären Cysteine zu signifikanten Veränderungen der funktionellen Parameter der Konstrukte NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub>.

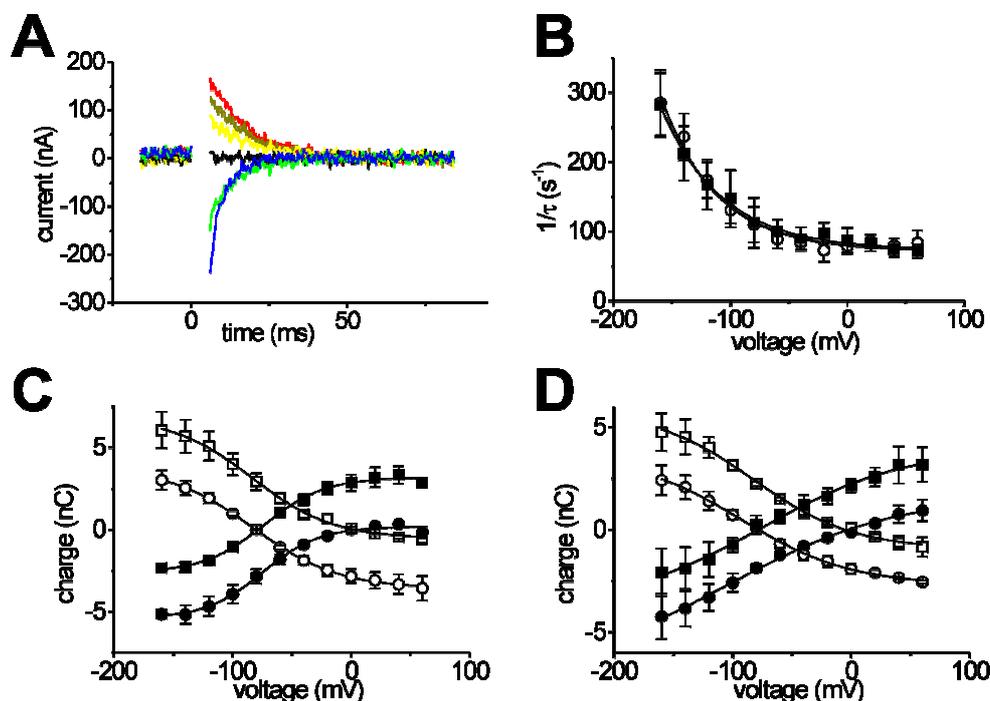


Abbildung 1.7: (A) Ouabain-sensitive transiente Ströme von NaK<sub>WT</sub>-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten, induziert durch Spannungssprünge von -80 mV zu +40 mV (rot), +0 mV (braun), -40 mV (gelb), -80 mV (schwarz), -120 mV (grün) und -160 mV (blau) in Abwesenheit von K<sup>+</sup>. (B) Spannungsabhängigkeit der Kinetik der transienten Ströme: NaK<sub>WT</sub> (Kreise) im Vergleich mit NaK<sub>zero</sub> (Quadrate). (C) Spannungsabhängigkeit der während der transienten Ströme verschobenen Ladung Q für das Konstrukt NaK<sub>WT</sub> für Spannungssprünge von: -80 mV zu -160 mV bis +60 mV (Kreise), 0 mV zu -160 mV bis +60 mV (Quadrate), -160 mV bis +60 mV zu -80 mV (offene Kreise) und -160 mV bis +60 mV zu 0 mV (offene Quadrate), jeweils in 20 mV Schritten. (D) Spannungsabhängigkeit der während der transienten Ströme verschobenen Ladung Q für das Konstrukt NaK<sub>zero</sub> für äquivalente Spannungssprung-Experimente. Boltzmann-Parameter für Spannungssprünge von -160 mV bis +60 mV zu 0 mV (offene Quadrate): NaK<sub>WT</sub>: U<sub>1/2</sub> = -71 ± 9 mV; z<sub>q</sub> = 0.81 ± 0.13; NaK<sub>zero</sub>: U<sub>1/2</sub> = -74 ± 12 mV; z<sub>q</sub> = 0.59 ± 0.16

### 3.1.4 Charakterisierung der Cystein-Substitutionsmutanten in der TM5-TM6-Schleife

In dem Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Konstrukt NaK<sub>zero</sub> wurden im Bereich der Schleife zwischen dem TM5- und TM6-Transmembransegment durch zielgerichtete Mutagenese an 11 verschiedenen Stellen einzelne

Aminosäuren durch Cysteine ersetzt. Abbildung 1.8 zeigt die Lage der Aminosäuren im Bereich der TM5-TM6-Schleifenregion anhand des dreidimensionalen Strukturmodells aus Abbildung 1.3. Es wird deutlich, dass N790 die am weitesten extrazellulär exponierte Position einnimmt.

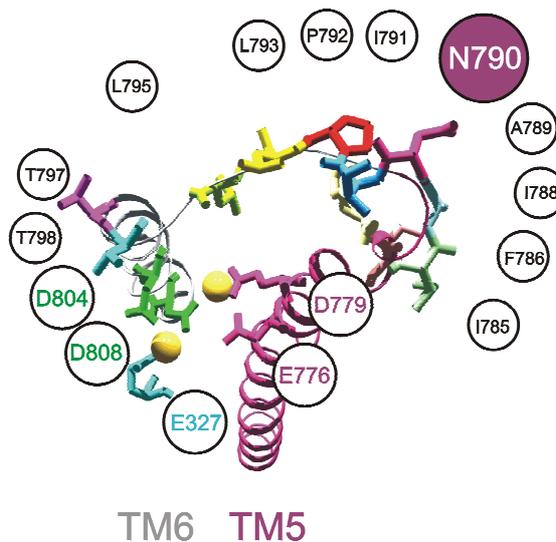


Abbildung 1.8: Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Ansicht von der extrazellulären Seite. Vergrößerte Darstellung der extrazellulären Schleifenregion TM5-TM6 mit den ausgetauschten und durch Cysteine ersetzten Aminosäuren wie angegeben. In unmittelbarer Nähe liegen, die Aminosäuren der Kationen-Bindungstasche E327, E776, D779, D804 und D808, die zwei Kationen (gelb) einschließen. Die Transmembranhelix TM5 ist rot markiert. Die anschließende TM5-TM6-Schleife ist grau dargestellt, weitere Enzymregionen wurden der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt

Der Bereich der TM5-TM6-Schleife schließt an die Transmembranhelix TM5 an, die ihrerseits die Phosphorylierungsdomäne des Enzyms auf der intrazellulären Seite mit der Kationen-Bindungstasche verbindet. Die Wechselwirkung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase mit Kationen lässt sich durch Mutationen in der Kationen-Bindungstasche z.B. der Aminosäure 779 stark beeinflussen [87,89-92]. Weitere, zum Teil unten dargestellte, Befunde dazu lieferten Arbeiten, die in Zusammenarbeit mit Jan B. Koenderink (Universität Nijmegen, NL) und Yi-Kang Hu (OHSU, Portland, OR, USA) durchgeführt wurden. Details finden sich in [93] bzw. [94]. Abbildung 1.8 verdeutlicht, dass die Kationen-Bindungstasche in der Nähe der eingefügten Cystein-Substitutionen liegt. Insbesondere weil die Mutationen in so unmittelbarer Nähe dieser physiologisch relevanten Region lagen, wurde zunächst untersucht, ob die hergestellten Cystein-Mutanten K<sup>+</sup>-induzierte und auf 5 mM Ouabain sensitive Pumpströme generieren.

3.1.4.1 Stationäre Pumpströme

Die funktionelle Expression der Cystein-Mutanten wurde – wie die von NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> – mit Hilfe der Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Methode ermittelt. Elektrische Pumpströme wurden durch Zugabe von 30 mM K<sup>+</sup> ausgelöst. Abbildung 1.9 B zeigt, dass alle Konstrukte – bis auf die Mutante NaK<sub>zero</sub>(F786C) – Ströme produzierten, die nahezu denen von NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> entsprachen. Von den 11 untersuchten Cystein-Mutanten zeigte lediglich eine – NaK<sub>zero</sub>(N790C) – nicht nur deutliche Fluoreszenzmarkierung durch den Rhodamin-Fluorophor (TMRM) im Vergleich mit markierten Kontrolloozyten, sondern sie reagierte zudem mit Fluoreszenzänderungen auf Modifikationen der Bedingungen, die die Besetzung der E<sub>1</sub>P- und E<sub>2</sub>P-Zustände bestimmten (siehe unten). Erstaunlicherweise erlaubte nur die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) die Bildung eines solchen molekularen Sensorkomplexes, nicht aber z.B. die Cystein-Mutanten der benachbarten Aminosäurepositionen NaK<sub>zero</sub>(A789C) und NaK<sub>zero</sub>(I791C) (Daten nicht gezeigt). Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass N790 die dem Extrazellulärraum am stärksten zugewandte Aminosäure ist.

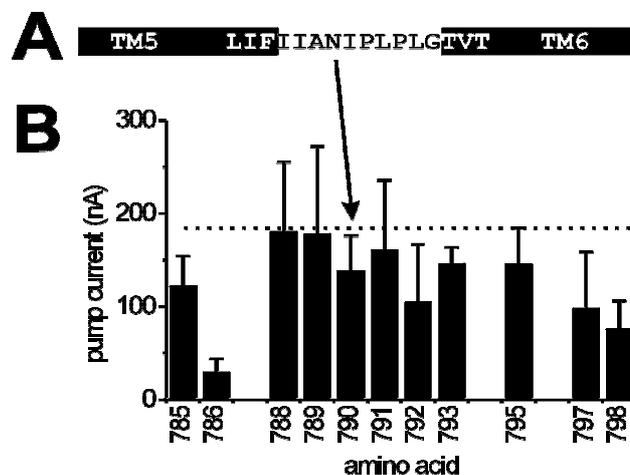


Abbildung 1.9: (A) Aminosäuren der extrazellulären TM5-TM6-Schleife der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in der Zählweise der Aminosäuresequenz der Schafs-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α<sub>1</sub>-Untereinheit. Die Aminosäuren der Enden der Transmembranhelices TM5 und TM6 sind als weiße Schrift auf schwarzem Grund dargestellt. NaK<sub>zero</sub>(N790C) ist die Mutante, die für die Fluoreszenzmessungen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. (B) Stationäre Pumpströme unterschiedlicher Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Konstrukte exprimiert in Oozyten von *Xenopus laevis*, wie sie sich bei der Zugabe von 30 mM [K<sup>+</sup>] ergaben. Die angegebenen Zahlen definieren die Position der jeweils durch ein Cystein substituierten Aminosäuren in den Einzel-Cystein-Mutanten. Die gepunktete Linie bezeichnet die Größe der stationären Ströme der Konstrukte NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub>, die nahezu identische Ströme generierten. Die Daten stammen von 3 – 5 Oozyten. Die Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

### 3.1.5 Fluoreszenzsignale des molekularen Sensorkomplexes der TMRM-markierten Cystein-Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C)

#### 3.1.5.1 K<sup>+</sup>-induzierte stationäre Fluoreszenzänderung

Die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C)-exprimierenden Oozyten zeigten infolge der Fluoreszenzmarkierung mit dem Fluorophor TMRM stärkere Fluoreszenz als H<sub>2</sub>O-injizierte Kontrollloozyten. Dies verdeutlicht Abbildung 1.10 A, in der verschiedene Ansichten von TMRM-markierten Kontrollloozyten und NaK<sub>zero</sub>(N790C)-exprimierenden Oozyten gezeigt sind. Es wird auch deutlich, dass die Hintergrundfluoreszenz am schwarzen Pol entscheidend niedriger ist als am weißen Pol. Daher wurden für alle weiteren Experimente Fluoreszenzmessungen ausschließlich am schwarzen Pol durchgeführt. Eine geringfügige Erhöhung der Fluoreszenz lässt sich bereits durch verstärkte Expression der endogenen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, ausgelöst durch die Injektion von β-Untereinheit cRNA, erreichen. Dieser Effekt beruht darauf, dass auch die endogene Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase extrazelluläre Cysteine enthält, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden können. Die mit der Überexpression der heterolog exprimierten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase einhergehende, verstärkte Expression der endogenen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase führt daher zu einer Erhöhung der Hintergrund-Fluoreszenz. Diese ist allerdings immer wesentlich schwächer als die Fluoreszenz der NaK<sub>zero</sub>(N790C)-exprimierenden Oozyten (Daten nicht gezeigt).

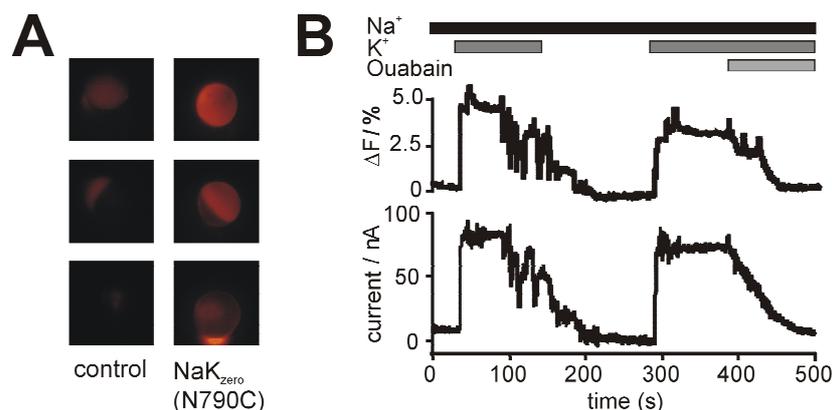


Abbildung 1.10: (A) Fluoreszenz von (links) Kontrollloozyten und (rechts) Oozyten, die die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) exprimierten. Alle Aufnahmen erfolgten unter identischen Markierungs- und Belichtungsbedingungen. Die jeweils drei Bilder repräsentieren verschiedene Ansichten typischer Oozyten. (B) Parallelaufnahme von Pumpstrom (unten) und Fluoreszenzänderung einer einzelnen Oozyte, die die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) exprimierte, wie sie nach Zugabe von 30 mM K<sup>+</sup> und 5 mM Ouabain (angedeutet im über den Kurven dargestellten Perfusionsprotokoll) beobachtet wurden.

Die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) zeigte in Gegenwart von K<sup>+</sup> stärkere Fluoreszenz als in dessen Abwesenheit. Eine Parallelaufnahme von Pumpstrom und Fluoreszenzänderung einer TMRM-markierten, NaK<sub>zero</sub>(N790C)-exprimierenden Oozyte zeigt Abbildung 1.10 B. Die Zugabe von K<sup>+</sup> induzierte einen stationären Strom, der mit einem Fluoreszenzanstieg einherging. Sowohl der K<sup>+</sup>-induzierte stationäre Strom, als auch der Fluoreszenzanstieg konnten durch Zugabe des spezifischen Inhibitors der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, Ouabain (5 mM), auf den Wert in Abwesenheit von K<sup>+</sup> zurückgeführt werden. Diese Beobachtung kann mit Hilfe des Albers-Post-Schemas für den Reaktionszyklus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase erklärt werden (Details siehe Diskussion). In Abwesenheit von K<sup>+</sup> oder in Gegenwart von Ouabain kommt es zu einer Anreicherung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in der E<sub>2</sub>P-Konformation, während in Gegenwart von K<sup>+</sup> die Dephosphorylierung aus der E<sub>2</sub>P-Konformation stimuliert und folglich die E<sub>1</sub>- bzw. E<sub>1</sub>P-Konformation (E<sub>1</sub>(P)) relativ angereichert wird [14,95]. Daher kann das niedrige Fluoreszenzniveau der E<sub>2</sub>(P)-Konformation (E<sub>2</sub> und E<sub>2</sub>P), das hohe Fluoreszenzniveau der E<sub>1</sub>(P)-Form zugeordnet werden. Wie von Cha und Bezanilla beschrieben ist die Quantenausbeute des Fluoreszenzfarbstoffs TMRM stark von der Hydrophobizität des umgebenden Lösungsmittels abhängig [56]. Der Fluoreszenzanstieg weist demnach auf eine stärker hydrophobe Umgebung des Farbstoffs hin, während eine hydrophile Umgebung zu einer Fluoreszenzlöschung führt.

### **3.1.5.2 Spannungssprunginduzierte Fluoreszenzänderung unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen**

Um zu überprüfen, ob die Fluoreszenzänderungen tatsächlich dem E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Übergang zugeordnet werden können, wurden Spannungssprung-Experimente in Abwesenheit von K<sup>+</sup> durchgeführt. Unter diesen Bedingungen ist die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase nahezu ausschließlich auf die elektrogenen, Na<sup>+</sup>-transportierenden Schritte festgelegt, welche unmittelbar und kinetisch untrennbar mit dem E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Übergang verknüpft sind. Aus Spannungssprung-Experimenten können daher Informationen über die Relaxation des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Fließgleichgewichts und die Verteilung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in den Zuständen E<sub>1</sub>P und E<sub>2</sub>P gewonnen werden (siehe Kapitel 3.1.3.2). In Abbildung 1.11 C sind transiente Ströme infolge von Spannungssprüngen dargestellt. Positive Potentiale begünstigen den E<sub>2</sub>P-Zustand, angetrieben durch die Freisetzung positiver Ladungen auf der extrazellulären Seite, was in einem positiven transienten Strom (Abbildung 1.11 C) resultiert. Abbildung 1.11 B verdeutlicht, dass die

Überführung in den E<sub>2</sub>P-Zustand durch positive Potentiale mit einer Fluoreszenzabnahme einhergeht. Diese Beobachtung – niedrige Fluoreszenz im E<sub>2</sub>P-Zustand – stimmt mit den Ergebnissen der K<sup>+</sup>-induzierten stationären Fluoreszenzänderung im Kapitel 3.1.5.1 überein (Abbildung 1.10 B).

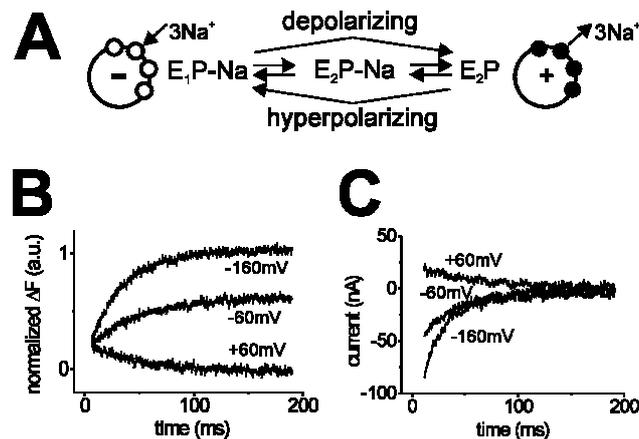


Abbildung 1.11: (A) Vereinfachtes Reaktionsschema der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase unter Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austauschbedingungen in Abwesenheit von K<sup>+</sup>. (B) Fluoreszenzänderungen in Abwesenheit von K<sup>+</sup> in Abhängigkeit von Spannungssprüngen zu Potentialen wie angegeben. (C) Transiente Ströme nach Spannungssprüngen zu den angegebenen Potentialen, parallel aufgezeichnet zu den Fluoreszenzsignalen aus (B).

Ein Vergleich der Signale aus Abbildung 1.11 B und 1.11 C zeigt, dass für alle getesteten Potentiale die reziproken Zeitkonstanten ( $1/\tau$ ) der Fluoreszenzänderungen und der transienten Ströme nahezu identisch waren. Eine Analyse der Signale mittels Anpassung von Exponentialfunktionen erster Ordnung an die Datensätze ergab Informationen über die Spannungsabhängigkeit der apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (Abbildung 1.12 A). Die korrespondierenden Strom- und  $\Delta F$ -Kurven ähneln sich stark, was andeutet, dass der Prozess, der durch die Fluoreszenzänderung detektiert wird, unmittelbar mit der Ladungsverschiebung einhergeht. Zusätzlich dazu ist auch die Spannungsabhängigkeit der transienten Ladungsverschiebung und die Spannungsabhängigkeit der stationären Fluoreszenzen äquivalent (Abbildung 1.12 B). Da die Ladungsverschiebung kinetisch direkt an den E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Übergang gekoppelt ist, kann der Prozess, der durch den Fluorophor am Cystein in Position 790 detektiert wird, der Konformationsänderung während der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Reaktion zugeordnet werden.

Dieselben Spannungssprung-Experimente in Gegenwart des Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-spezifischen Inhibitors Ouabain (5 mM) führten nicht mehr zu detektierbaren transienten Ladungsverschiebungen (Daten nicht gezeigt), und auch die Fluoreszenzänderungen wurden komplett inhibiert (Abbildung 1.14 E).

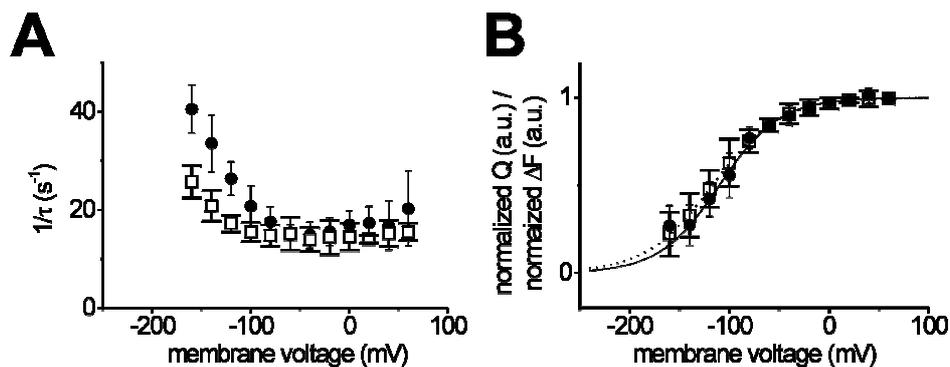


Abbildung 1.12: (A) Apparente Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (reziproke Zeitkonstanten), erhalten nach monoexponentieller Anpassung an die Signale der Fluoreszenzänderungen (Quadrate) und transienten Ströme (Kreise) wie dargestellt in Abbildung 1.11 (B) und (C). Mittelwerte von 5 Oozyten mit Standardfehlern. (B) Spannungsabhängigkeit der Sättigungswerte der stationären Fluoreszenz (Quadrate) und verschobene Ladung (Kreise), erhalten nach monoexponentieller Anpassung an Signale wie dargestellt in Abbildung 1.11 (B) und (C). Mittelwerte von 5 Oozyten mit Standardfehlern. Die Anpassungsparameter einer Boltzmann-Funktion an die Daten ergaben die folgenden Resultate:  $\Delta F$ -U-Kurve ( $U_{1/2} = -117.0 \text{ mV} \pm 1.4 \text{ mV}$ ,  $z_q = 0.76 \pm 0.2$ ), Q-U-Kurve ( $U_{1/2} = -110.1 \text{ mV} \pm 9.1 \text{ mV}$ ,  $z_q = 0.85 \pm 0.12$ ).

### 3.1.5.3 Einfluss der Farbstoff-Bindung auf die kinetischen Parameter der Cystein-Mutanten

#### NaK<sub>zero</sub>(N790C)

Eine kinetische Analyse der transienten Ströme und Fluoreszenzänderungen des Konstrukts NaK<sub>zero</sub>(N790C) ergab eine hohe Übereinstimmung zwischen den Relaxationszeitkonstanten  $\tau$  beider Signalklassen. Auch die Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten war sehr ähnlich – bis auf zwei Einschränkungen. Zum Einen wurde bei negativen Potentialen die Fluoreszenzänderung signifikant langsamer als der Zerfall des transienten Stroms, zum Anderen erfolgten sowohl die transienten Ströme als auch die Fluoreszenzänderungen mit einer ca. 4-mal langsameren Kinetik im Vergleich zu den Konstrukten NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> ( $\tau \sim 60 \text{ ms}$  statt  $15 \text{ ms}$ ). Diese offensichtlichen Unterschiede könnten eine Auswirkung der Mutation N790C sein oder auf der Bindung des Farbstoffs beruhen.

Daher wurden die Zeitkonstanten der spannungssprunginduzierten transienten Ströme in Abwesenheit oder Gegenwart des Fluorophors TMRM unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen untersucht

(Abbildung 1.13 A). Dazu wurde eine nicht fluoreszenzmarkierte Oozyte einem Spannungssprung-Experiment unterzogen und anschließend unter ständig aufrecht erhaltenen Spannungsklemme-Bedingungen 15 Minuten mit 10  $\mu$ M TMRM markiert. Dann wurden erneut die Zeitkonstanten der spannungssprunginduzierten transienten Ströme ermittelt. Anschließend wurden Spannungssprünge in Gegenwart von 5 mM Ouabain durchgeführt. Die verbleibenden Hintergrundströme beruhen auf Leckleitfähigkeiten der Oozyten und wurden subtrahiert. Die gegen das Potential aufgetragenen reziproken Relaxationszeitkonstanten zeigen, dass eine Verlangsamung der Relaxationreaktion im Vergleich zu den Konstrukten NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> schon ohne kovalent gebundenen Fluorophor gegeben war (vergleiche Abbildung 1.7 B mit Abbildung 1.13 A). Durch die Ankopplung des Fluoreszenzfarbstoffs wurde bei negativen Potentialen allerdings die Relaxationreaktion noch zusätzlich verlangsamt (Abbildung 1.13 A).

Die Verlangsamung der Relaxationsreaktion der elektrischen Signale infolge der Fluoreszenzmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff war weniger stark ausgeprägt als die Unterschiede bezüglich der Relaxationsreaktion zwischen elektrischem Signal und Fluoreszenzsignal fluoreszenzmarkierter Zellen (vergleiche Abbildung 1.7 B mit Abbildung 1.13 A). Eine Erklärung hierfür liegt darin, dass zu dem elektrischen Signal alle Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Moleküle beitragen, unabhängig davon, ob sie fluoreszenzmarkiert sind oder nicht. Geht man davon aus, dass nicht alle Moleküle der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase fluoreszenzmarkiert wurden, wäre die Verlangsamung der Relaxation des elektrischen Signals bei vollständiger Markierung ausgeprägter und würde damit der Relaxation des Fluoreszenzsignals entsprechen. Da zu dem Fluoreszenzsignal nur fluoreszenzmarkierte Moleküle beitragen, detektiert es stets die Änderungen der Kinetik in einer vollständig markierten Population, während die elektrisch detektierten Änderungen geringer ausfallen, als sie das bei vollständiger Markierung täten. Für das Fluoreszenzsignal würde sich abhängig von der Vollständigkeit der Markierung demnach lediglich die Signalamplitude ändern.

Die Spannungsabhängigkeit der während der transienten Ströme verschobenen Ladung Q und der stationären Fluoreszenzänderung  $\Delta F$  des Konstrukts NaK<sub>zero</sub>(N790C) ist in Abbildung 1.12 B dargestellt. Die Q-U- und die  $\Delta F$ -U-Kurve folgen Boltzmann-Verteilungen. Diese zeigen gute

Übereinstimmung zwischen den beiden Signalklassen, sind aber beide im Vergleich zu den Boltzmann-Verteilungen der Q-U-Kurven der Konstrukte NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> zu negativen Potentialen verschoben (vergleiche Abbildung 1.7 C,D und Abbildung 1.12 B). Diese Verschiebung im Vergleich zu den Konstrukten NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> war schon in Abwesenheit des Fluorophors zu beobachten (Abbildung 1.13 B). Die kovalente Bindung des Farbstoffs ergab lediglich eine kleine, aber nicht signifikante Verschiebung des Mittelpunkts der Boltzmann-Kurve zu negativen Potentialen hin (Abbildung 1.13 B).

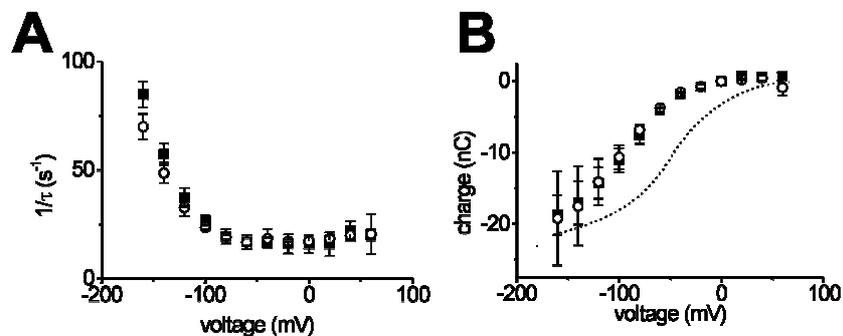


Abbildung 1.13: (A) Apparente Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (reziproke Zeitkonstanten) erhalten durch monoexponentielle Anpassung an die transienten Stromsignale vor (Kreise) und nach (Quadrate) Fluoreszenzmarkierung. Mittelwerte von 3 Oozyten mit Standardfehlern. (B) Spannungsabhängigkeit der verschobenen Ladung vor (Kreise) und nach (Quadrate) Fluoreszenzmarkierung, erhalten durch monoexponentielle Anpassung an die transienten Stromsignale. Mittelwerte von 3 Oozyten mit Standardfehlern. Als gepunktete Linie eingezeichnet ist eine typische I-U-Kennlinie des Referenzkonstrukts NaK<sub>WT</sub>. Die Beschleunigung der apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten in (A) resultiert aus der in diesen Experimenten auf 24 °C erhöhten Temperatur.

### 3.1.5.4 Na<sup>+</sup>-Substitution von TEA, NMG und TMA

Völliges Ersetzen von Na<sup>+</sup> durch TEA, NMG oder TMA (Abbildung 1.14) führte nicht zu einer Änderung der stationären Fluoreszenz, was andeutet, dass sich die Verteilung in den E<sub>1</sub>P und E<sub>2</sub>P Zuständen nicht ändert, und die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase unter diesen Bedingungen im E<sub>2</sub>P-Zustand angereichert verbleibt (Daten nicht gezeigt). Jedoch waren in Messungen, in denen Na<sup>+</sup> vollständig durch 100 mM TEA (Abbildung 1.14 C) ersetzt war, die spannungssprunginduzierten Fluoreszenzänderungen ebenso unterbunden wie in Messungen in Gegenwart von 100 mM NMG (Daten nicht gezeigt, entsprechen Abbildung 1.14 C). Interessanterweise führte allerdings ein kompletter Austausch durch TMA nicht zu einer kompletten Aufhebung der Fluoreszenzänderung

(Abbildung 1.14 D). Eine Erhöhung der stationären Fluoreszenz bei gleichzeitiger Reduktion der spannungssprunginduzierten Fluoreszenzänderungen konnte durch Zugabe von 30 mM K<sup>+</sup> ausgelöst werden (Abbildung 1.14 B). Inhibition durch 5 mM Ouabain in Gegenwart (Abbildung 1.16) und Abwesenheit von K<sup>+</sup> (Abbildung 1.14 E) überführte die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in einen Zustand niedrigster Fluoreszenz, der auch durch Spannungssprünge nicht verändert werden konnte, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass Ouabain die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase im E<sub>2</sub>P-Zustand blockiert [14,95].

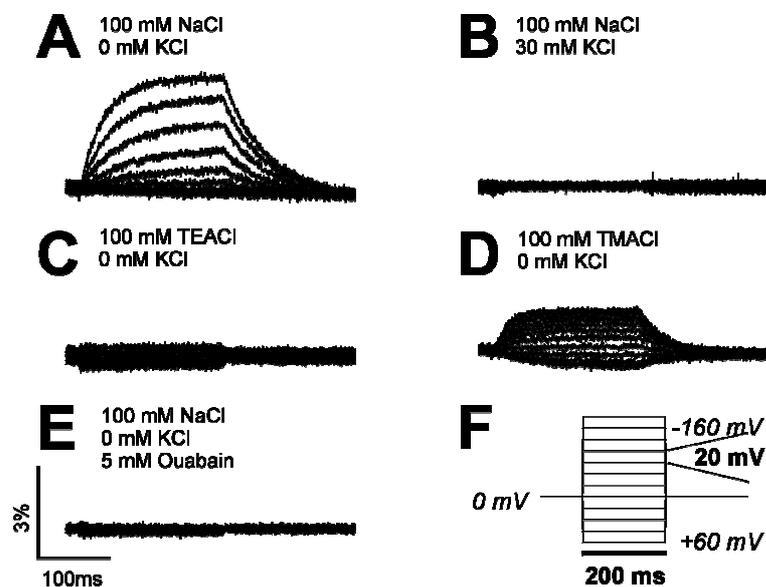


Abbildung 1.14: Spannungssprunginduzierte Fluoreszenzänderungen aufgezeichnet von einer Oozyte, die die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) exprimierte, in Gegenwart 100 mM Na<sup>+</sup> in (A) Abwesenheit und (B) Gegenwart von 30 mM K<sup>+</sup>, (C und D) in Gegenwart unterschiedlicher Na<sup>+</sup>-Substituenten wie angegeben und (E) nach Inhibition durch Ouabain. (F) Spannungsprotokoll, dem dieselbe Zelle bei allen Experimenten ausgesetzt wurde. Ein Anstieg der Kurven entspricht einem Fluoreszenzanstieg.

### 3.1.5.5 K<sup>+</sup>-Abhängigkeit von Fluoreszenz- und Stromsignalen

Nachdem die Na<sup>+</sup>-abhängigen Teilreaktionen des Reaktionszyklus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase untersucht worden waren, sollten nun auch die K<sup>+</sup>-abhängigen Reaktionsschritte bzw. der komplette Reaktionszyklus Gegenstand der Untersuchungen sein. Unter diesen Bedingungen ist eine Aufzeichnung der transienten Ströme nahezu unmöglich [96,97], denn sie treten beschleunigt und mit reduzierter Amplitude auf. Ersteres liegt darin begründet, dass die Relaxation in ein neues

Gleichgewicht in Gegenwart von K<sup>+</sup>-Ionen auch über den K<sup>+</sup>-Zweig erfolgen kann. Die Amplitude der transienten Ströme ist reduziert, da die K<sup>+</sup>-Translokationsschritte weniger elektrogen sind als die Na<sup>+</sup>-transportierenden Schritte. Dementsprechend zeigen die bisherigen Publikationen den Effekt von K<sup>+</sup> auf den transienten Strom lediglich qualitativ [96,97].

Wie bereits oben gezeigt reagierte die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) auf Zugabe von 30 mM extrazellulärem K<sup>+</sup> mit stationären Strömen, die die der beiden Referenzmoleküle NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> um lediglich 30 % unterschritten (Abbildung 1.9 B). Die extrazelluläre Zugabe verschiedener Konzentrationen von K<sup>+</sup> ergab Informationen über die K<sup>+</sup>-Abhängigkeit der I-U-Kennlinie, wie in Abbildung 1.15 A dargestellt. Durch die Auswertung der K<sup>+</sup>-Abhängigkeit der I-U-Kennlinie konnte die Spannungsabhängigkeit der K<sub>M</sub>-Werte für K<sup>+</sup> bestimmt werden (Abbildung 1.15 B). Die K<sup>+</sup>-Abhängigkeit ergab eine Tendenz zu niedrigeren K<sub>M</sub>-Werten für K<sup>+</sup> im Vergleich mit den Referenzzymen NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub>. In der Tat ließe die beobachtete verlangsamte Relaxation des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Fließgleichgewichts bzw. eine verlangsamte E<sub>1</sub>P → E<sub>2</sub>P-Reaktion (Abbildung 1.12 A) ein solches Verhalten erwarten, denn der K<sup>+</sup>-abhängige Reaktionsschritt wirkt dann weniger limitierend für den Pumpzyklus und kann daher auch bei zusätzlicher Beschleunigung durch hohe K<sup>+</sup>-Konzentrationen kaum noch zu einer Erhöhung der Wechselzahl beitragen (siehe Diskussion).

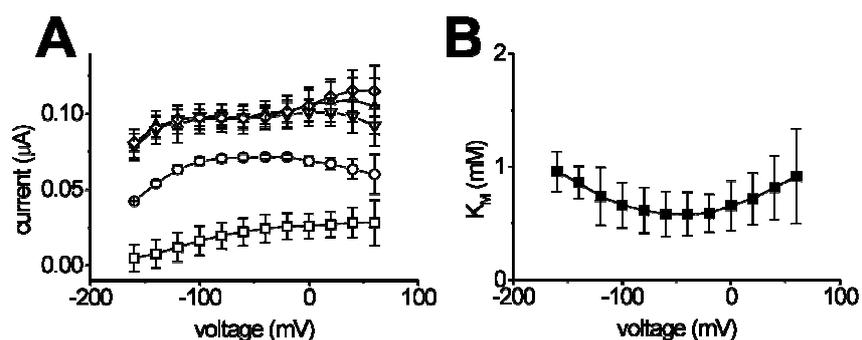


Abbildung 1.15: (A) Spannungsabhängigkeit der stationären Ströme von *Xenopus*-Oozyten, die die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α-Untereinheit NaK<sub>zero</sub>(N790C) und die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase β-Untereinheit exprimierten, induziert durch unterschiedliche K<sup>+</sup>-Konzentrationen: 0.3 mM (Quadrate), 1 mM (Kreise), 3 mM (aufrechte Dreiecke), 10 mM (umgekehrte Dreiecke), 30 mM (Rauten). (B) Spannungsabhängigkeit der K<sub>M</sub>-Werte der Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) für K<sup>+</sup> wie ermittelt aus (A). Die Ergebnisse in (A) und (B) sind Durchschnittswerte mit Standardfehler von 3 Oozyten.

Abbildung 1.16 zeigt spannungssprunginduzierte Fluoreszenzänderungen in Gegenwart unterschiedlicher K<sup>+</sup>-Konzentrationen. Die Signale dieser Abbildung stammen von einer kontinuierlichen Aufzeichnung der Fluoreszenzmessung an einer einzelnen Oozyte, die die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) exprimiert, und erlauben daher einen direkten Vergleich der Fluoreszenzintensität unter den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen. Nach Lösungswechseln zu den angegebenen K<sup>+</sup>- oder Inhibitor-Konzentrationen wurde die Zelle Spannungssprüngen ausgesetzt. Beginnend mit einem Haltepotential von -80 mV wurden Spannungssprünge zwischen +60 mV und -160 mV in 20 mV Schritten appliziert, gefolgt von einem Schritt zurück zu -80 mV. Die basale, stationäre Fluoreszenz bei -80 mV, die zu Beginn jedes solchen Satzes von Fluoreszenzsignalen beobachtet wurde, erhöhte sich mit steigender K<sup>+</sup>-Konzentration. Ein Beginn der Sättigung war zwischen 10 mM und 30 mM [K<sup>+</sup>] zu erkennen. Diese Beobachtung korrespondiert mit der beobachteten ansteigenden basalen Fluoreszenz wie dargestellt in Abbildung 1.10 B bei einem Lösungswechsel von 0 mM zu 30 mM extrazellulärem [K<sup>+</sup>]. Kurve a (Abbildung 1.16) zeigt die Fluoreszenzantworten auf Spannungssprünge bei einer extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration von [K<sup>+</sup>] = 0 mM unter denselben Bedingungen wie in Abbildung 1.11 B. Spannungssprünge zu positiven Potentialen erzielten nur kleine Fluoreszenzabnahmen. Dagegen konnten negative Potentiale große Fluoreszenzanstiege hervorrufen. Bei einer extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration von [K<sup>+</sup>] = 1 mM (Kurve b) lag die basale Fluoreszenz bei -80 mV schon auf einem erhöhten Fluoreszenzwert. Positive Potentiale konnten jetzt Fluoreszenzabnahmen hervorrufen, und Sprünge zu negativen Potentialen führten zu Fluoreszenzanstiegen, die bei extrem positiven und negativen Potentialen ein beginnendes Sättigungsverhalten zeigten. Bei weiter erhöhten extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentrationen (Kurven c und d) konnten Spannungssprünge zu negativen Potentialen nur kleine, nicht mehr mit der Spannung veränderliche Fluoreszenzanstiege hervorrufen, während positive Potentiale zu verhältnismäßig großen, spannungsabhängigen Fluoreszenzabnahmen führten. Mit zunehmender K<sup>+</sup>-Konzentration wurde die absolute Differenz zwischen den spannungsinduzierten Fluoreszenzänderungen kontinuierlich kleiner (Abbildung 1.17 A). Bei einer extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration von [K<sup>+</sup>] = 30 mM erreichte die stationäre Fluoreszenz bei -80 mV ein Maximum, und Spannungssprünge in beide Richtungen konnten so gut wie keine Fluoreszenzänderungen mehr auslösen (Kurve e). Mit

steigender K<sup>+</sup>-Konzentration beschleunigte sich die Relaxation der Fluoreszenzsignale in ein neues stationäres Fluoreszenzniveau (Abbildung 1.17 B).

Um die Reversibilität der beobachteten Effekte zu testen, wurden Spannungssprung-Experimente erneut in Abwesenheit von K<sup>+</sup> durchgeführt (Kurve f). Die erhaltenen Fluoreszenzsignale waren zu denen unter den Anfangsbedingungen äquivalent (vergleiche Kurven a und f).

Die Zugabe von 5 mM Ouabain bei einer extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration von [K<sup>+</sup>] = 30 mM reduzierte die beobachtete Fluoreszenz auf ein Minimum (Kurve g), so dass sie sogar ein wenig niedriger lag als die in Abwesenheit von K<sup>+</sup> unter depolarisierenden Spannungssprüngen beobachtete. Dieselbe Beobachtung konnte auch in Gegenwart von 5 mM Ouabain bei einer extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration von [K<sup>+</sup>] = 0 mM gemacht werden (Abbildung 1.14 E). Unter beiden Bedingungen erzielten Spannungssprünge keine Fluoreszenzänderung mehr, was darauf hindeutet, dass durch Zugabe von 5 mM Ouabain die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in der E<sub>2</sub>P-Konformation arretiert ist [14,95].

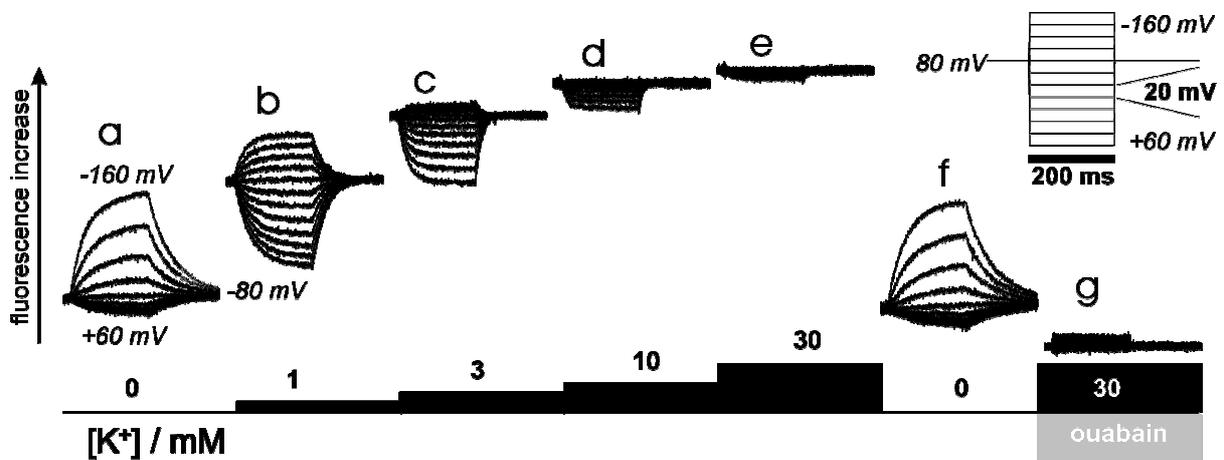


Abbildung 1.16: Spannungssprunginduzierte Fluoreszenzantworten aufgezeichnet an einer Oocyte, die die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) exprimierte, bei unterschiedlichen K<sup>+</sup>-Konzentrationen (a – e) wie angegeben unter den jeweiligen Fluoreszenzsignalen. Bei allen K<sup>+</sup>-Konzentrationen wurde die Zelle dem angegebenen Spannungsprotokoll (Einfügung) ausgesetzt. Die Richtung des Fluoreszenzanstiegs ist angegeben als schwarzer Pfeil. Hohe Fluoreszenz wird dem E<sub>1</sub>P-, niedrige dem E<sub>2</sub>P-Zustand zugeordnet. (f) Kontrollmessung bei [K<sup>+</sup>] = 0 mM am Ende der [K<sup>+</sup>]-Titration. (g) Fluoreszenzantwort nach Inhibition mit 5 mM Ouabain.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit steigender extrazellulärer K<sup>+</sup>-Konzentration die basalen Fluoreszenzwerte anstiegen, die relativen Fluoreszenzänderungen, ausgelöst durch

Spannungssprünge, kleiner wurden, und die Relaxationskinetiken der Fluoreszenzänderungen beschleunigt wurden.

### 3.1.5.6 K<sup>+</sup>-Abhängigkeit der ΔF-U-Kurve

Die Spannungsabhängigkeit der Sättigungswerte der Fluoreszenzänderungen (ΔF-U-Kurve) bei verschiedenen K<sup>+</sup>-Konzentrationen ist in Abbildung 1.17 A dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass sich die Änderung der ΔF-U-Kurve mit steigender K<sup>+</sup>-Konzentration aus zwei charakteristischen Effekten zusammensetzt. Der U<sub>1/2</sub>-Wert ist zu positiven Potentialen verschoben, und die Steigung, entsprechend der Äquivalenzladung z<sub>q</sub>, ist flacher. Der Wert für die Äquivalenzladung z<sub>q</sub>, wie er sich aus Boltzmann-Anpassungen an die ΔF-U-Kurve ergab, verringert sich von ungefähr 0.8 bei 0 mM [K<sup>+</sup>] zu ungefähr 0.45 bei 1 mM [K<sup>+</sup>]. Für höhere K<sup>+</sup>-Konzentrationen ist die ΔF-U-Kurve so stark zu positiven Potentialen verschoben, dass keine Boltzmann-Parameter mehr bestimmt werden können. Bei K<sup>+</sup>-Konzentrationen über 10 mM können nur noch geringe spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass im erschließbaren Spannungsbereich (-160 mV bis +60 mV) die stationäre Verteilung zwischen E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zuständen nicht länger verschoben werden kann, jedoch bleibt die Pumpaktivität der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase unter diesen Bedingungen völlig erhalten.

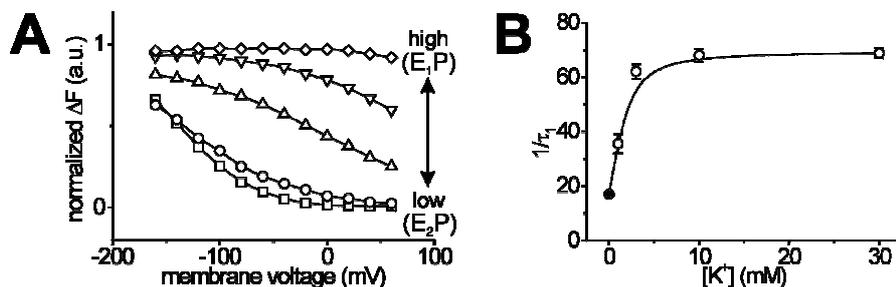


Abbildung 1.17: (A) Spannungsabhängigkeit der stationären Fluoreszenzen (Sättigungswerte der monoexponentiellen Anpassung an die Daten) bei unterschiedlichen K<sup>+</sup>-Konzentrationen: 0 mM (Quadrate), 0.3 mM (Kreise), 1 mM (aufrechte Dreiecke), 3 mM (umgekehrte Dreiecke), 10 mM (Rauten). (B) Reziproke Relaxationszeitkonstanten der Fluoreszenzsignale von NaK<sub>zero</sub>(N790C) erhalten aus monoexponentieller Anpassung der Fluoreszenzrelaxation bei Spannungssprüngen zu -80 mV.

### 3.1.5.7 K<sup>+</sup>-Abhängigkeit der Relaxationkinetik der Fluoreszenzen

Unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen sind die beobachtbaren elektrogenen Reaktionen der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ausschließlich auf die Na<sup>+</sup>-Bindung/Freisetzung in der E<sub>2</sub>P-Konformation beschränkt. Der Reaktionszyklus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase beinhaltet jedoch weitere, wenn auch weniger stark elektrogene Schritte, die zum Teil während der K<sup>+</sup>-Translokation auftreten [13,88,92,98]. Die durch Spannungssprünge ausgelöste Relaxation der Fluoreszenzänderung bei nichtsättigenden K<sup>+</sup>-Konzentrationen liefert erstmalig in Echtzeit kinetische Informationen über elektrogene oder ihnen vorangeschaltete, die Reaktionsgeschwindigkeit limitierende, elektroneutrale Reaktionsschritte im Reaktionszyklus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Die apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der spannungsabhängigen Relaxation in eine neue stationäre Verteilung der Zustände bei 0 mV steigt von 20 s<sup>-1</sup> unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen zu 70 s<sup>-1</sup> bei sättigenden K<sup>+</sup>-Konzentrationen an. Für die sich ergebende Sättigungskurve kann ein apparenter K<sub>M</sub>-Wert von ungefähr 1 mM ermittelt werden (Abbildung 1.17 B). Dieser Wert kommt dem K<sub>M</sub>-Wert für die K<sup>+</sup>-Abhängigkeit der stationären Ströme sehr nahe (Abbildung 1.15 B).

### 3.1.6 Einfluss von Mutationen in der Kationen-Bindungstasche am Beispiel

#### NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A)

Mutationen in der Region der Kationen-Bindungsstellen führen zu Änderungen der kinetischen Parameter bestimmter Schritte im Reaktionszyklus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase [87,89-92,99,100]. Aus diesen Änderungen ergibt sich auch ein Unterschied in der Verteilung der Zustände des Reaktionszyklus. Wie die kinetischen Parameter und die Zustandsverteilung mit Hilfe des molekularen Sensorkomplexes aus N790C und TMRM fluorimetrisch untersucht werden können, soll im folgenden Abschnitt exemplarisch an der Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A) gezeigt werden.

#### 3.1.6.1 Elektrophysiologische Charakterisierung

Aus elektrophysiologischen Messungen ist bekannt, dass Ratten-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, die die Mutation E779A trägt, bereits unter Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch-Bedingungen einen beträchtlichen elektrogenen Na<sup>+</sup>-Transport durchführt, der ungefähr 50 % der Aktivität unter Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Austausch-Bedingungen beträgt,

während dies beim Wildtyp nur ungefähr 5 % sind [87,91,99,100]. Als Referenzmessungen für Untersuchungen an der Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A) wurden Messungen an Mutanten der Ratten-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (die *a priori* eine verminderte Ouabain Sensitivität aufweist [37,42]) – im Folgenden NaK<sub>rat</sub> genannt – herangezogen, die im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Jan B. Koenderink (Universität Nijmegen, NL) elektrophysiologisch charakterisiert wurden. Zusammenfassend konnte in diesen Experimenten gezeigt werden, wie Mutationen einzelner Aminosäuren der Kationen-Bindungstasche (mutierte Aminosäurepositionen: 775, 776, 779, 804, 806 und 808) die Spannungs- und Zeitabhängigkeiten der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Relaxationsreaktion verändern und damit die Kationen-Affinitäten beeinflussen (Manuskript in Vorbereitung, zum Teil vorab in [93]). Der elektrogene Na<sup>+</sup>-Transport der Ratten-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Mutante NaK<sub>rat</sub>(E779A) unter Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch-Bedingungen entsprach in diesen Messungen bei 100 mM extrazellulärem Na<sup>+</sup> und 0 mM extrazellulärem [K<sup>+</sup>] ungefähr 40 % des Pumpstroms unter sättigenden K<sup>+</sup>-Bedingungen (Daten nicht gezeigt). Vergleichende Messungen mit Konstrukten der Ratten-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -Untereinheit NaK<sub>rat</sub> und NaK<sub>rat</sub>(E779A) zeigten auch, dass durch die Mutation E779A die transienten Ströme infolge eines Spannungssprungs insbesondere zu positiven Potentialen deutlich beschleunigt werden (Daten nicht gezeigt). Dies geht mit einer stark verminderten Affinität für K<sup>+</sup>-Ionen ( $K_M > 5$  mM) einher (Daten nicht gezeigt).

### **3.1.6.2 Stationäre Pumpströme und Fluoreszenz**

Einfügung der Mutation E779A in das Schafs-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Konstrukt NaK<sub>zero</sub>(N790C) führte nicht zu signifikanten Aktivitätseinbußen. Sowohl stationäre, K<sup>+</sup>-stimulierte, Ouabain-sensitive Ströme von NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A) (~ 150 nA), als auch Inhibierbarkeit durch 5 mM Ouabain blieben erhalten (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe von K<sup>+</sup> führte zu einem Fluoreszenzanstieg, der vergleichbar zu dem Verhalten des Konstrukts NaK<sub>zero</sub>(N790C) war, und der durch Ouabain auf einen absoluten Minimalwert zurückgeführt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

### **3.1.6.3 Spannungssprunginduzierte Fluoreszenzänderung unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen**

Bei der Untersuchung der Fluoreszenzänderung infolge von Spannungssprüngen mit dem Konstrukt NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A) ergab sich eine auffällige Beobachtung. Spannungssprünge unter Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-

Austausch-Bedingungen konnten nur sehr kleine Fluoreszenzänderungen hervorrufen. Positive Potentiale resultierten in einer Abnahme der Fluoreszenz, während negative Potentiale eine Zunahme der Fluoreszenz bewirkten (Abbildung 1.18 A). Abbildung 1.19 zeigt die Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenzänderung bei 0 mM [K<sup>+</sup>], die eine typische Boltzmann-Kurve beschreibt (NaK<sub>zero</sub>:  $U_{1/2} = -95 \pm 4$  mV;  $z_q = 0.7 \pm 0.06$ ). Die Fluoreszenzänderungen erfolgten mit deutlich beschleunigter Relaxation in einen neuen stationären Zustand im Vergleich zu Messungen mit dem Konstrukt NaK<sub>zero</sub>(N790C) (Abbildung 1.18). Dieses Ergebnis liegt auf einer Linie mit der beschleunigten Relaxation der transienten Ströme des Ratten-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Konstrukts NaK<sub>rat</sub>(E779A) im Vergleich mit dem Referenzkonstrukt NaK<sub>rat</sub> (Daten nicht gezeigt). Die insgesamt nur sehr kleine Amplitude der Fluoreszenzänderung kann dadurch erklärt werden, dass Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, die die Mutation E779A trägt, unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen einen im Vergleich zum Wildtyp beschleunigten Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch durchführt (siehe Diskussion).

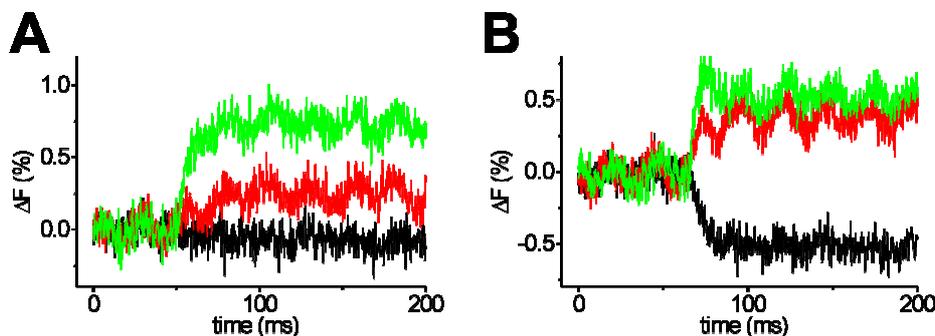


Abbildung 1.18: Spannungssprunginduzierte Fluoreszenzänderungen aufgezeichnet von einer Oozyte, die die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A) exprimiert, bei den K<sup>+</sup>-Konzentrationen (A) 0 mM und (B) 30 mM. Die Spannungssprünge erfolgten von -80 mV nach +60 mV (schwarz), -60 mV (rot) und -160mV (grün).

#### 3.1.6.4 K<sup>+</sup>-Abhängigkeit der spannungssprunginduzierten Fluoreszenzänderung

Überraschenderweise ist die spannungssprunginduzierte Fluoreszenzänderung nach Zugabe von 30 mM [K<sup>+</sup>] nicht nur schneller, sondern vor allem von weitaus größerer Amplitude als unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen. Dies gilt insbesondere für Sprünge zu positiven Potentialen, bei denen unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen beinahe keine Fluoreszenzabnahme mehr beobachtet werden konnte (Abbildung 1.18 B). Abbildung 1.19 zeigt die spannungsabhängige Fluoreszenzänderung für 0 mM und 30 mM [K<sup>+</sup>].

Nicht nur die Amplitude der erreichbaren Fluoreszenzänderungen, sondern auch die im erschließbaren Spannungsbereich maximal erreichbare Fluoreszenz in Gegenwart von 30 mM [K<sup>+</sup>] waren deutlich höher als die in Abwesenheit von K<sup>+</sup>-Ionen. Nach einer Anpassung einer Boltzmann-Funktion an die Fluoreszenzänderung, aufgetragen gegen die Spannung, ergaben sich die folgenden Boltzmann-Parameter:  $z_q = 0.65 \pm 0.15$ ; NaK<sub>zero</sub>:  $U_{1/2} = 40 \pm 23$  mV, wobei die Amplitude der Boltzmann-Kurve für die Fluoreszenzänderung bei 30 mM [K<sup>+</sup>] mehr als doppelt so groß war wie die bei 0 mM [K<sup>+</sup>].

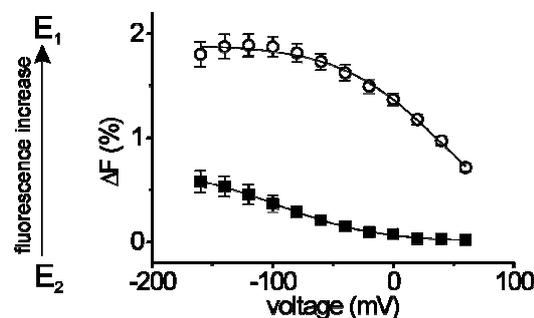


Abbildung 1.19: Spannungsabhängigkeit der stationären Werte der Fluoreszenzsignale von NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A) bei unterschiedlichen K<sup>+</sup>-Konzentrationen: 0 mM (Quadrate), 30 mM (Kreise). Die Anpassungsparameter einer Boltzmann-Funktion an die Daten ergaben die folgenden Resultate: ΔF-U-Kurve für [K<sup>+</sup>] = 0 mM:  $U_{1/2} = -95 \pm 4$  mV,  $z_q = 0.7 \pm 0.06$ ; ΔF-U-Kurve für [K<sup>+</sup>] = 30 mM:  $U_{1/2} = -40 \pm 23$  mV,  $z_q = 0.65 \pm 0.15$ ).

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass in Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A) die Affinität für K<sup>+</sup>-Ionen so verringert ist, dass die maximale Fluoreszenz erst bei weitaus höheren K<sup>+</sup>-Konzentrationen erreicht wird als für das Referenzkonstrukt NaK<sub>zero</sub>(N790C) (siehe Diskussion). Erneut wurde ein ähnliches Ergebnis – eine verringerte Affinität für K<sup>+</sup>-Ionen im Vergleich zum Wildtyp – auch für das Ratten-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Konstrukt der α-Untereinheit NaK<sub>rat</sub>(E779A) beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A) im Vergleich zu NaK<sub>WT</sub>(N790C) eine beschleunigte E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Relaxationsreaktion aufweist, und dass sie eine Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Verteilung in E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zuständen insbesondere bei 30 mM [K<sup>+</sup>] zeigte.

## 3.2 Voltage-Clamp-Fluorometrie mit dem potentialsensitiven

### Farbstoff RH421

#### 3.2.1 Einleitung

Mit Hilfe des potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffs RH421 wurden einzelne Reaktionsschritte des Albers-Post-Modells für den Reaktionszyklus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in schnellen Mischexperimenten zeitaufgelöst untersucht [54,62,63,65,67]. Bisher mußte dazu die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase aus nativen Geweben gewonnen werden, was eine Untersuchung von Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Mutanten ausschließt. Da RH421 als potentialsensitiver Farbstoff auch *in situ* für die Bestimmung von Membranpotentialen angewendet wurde, stellte sich die Frage, ob auch heterolog exprimierte Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase RH421-induzierte Fluoreszenzänderungen bewirken könnte.

Um die mit RH421 an der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase durchgeführten „*in vitro*“-Messungen an Membranfragmenten oder Proteoliposomen auf ein „*in vivo*“-System, d.h. ein heterologes Expressionssystem zu übertragen, wurden Fluoreszenzmessungen mit RH421 an Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten durchgeführt. Im folgenden Abschnitt wird gezeigt, wie dieser sich in die Membran einlagernde, unspezifisch bindende Fluorophor auf die in *Xenopus*-Oozyten überexprimierten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Konstrukte NaK<sub>WT</sub>, NaK<sub>zero</sub> und NaK<sub>zero</sub>(N790C) angewendet wurden. Dies ermöglichte eine simultane Aufnahme von Strom- und Fluoreszenzsignalen unter Spannungsklemme-Bedingungen an heterolog exprimierten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Konstrukten. Der Fluoreszenzfarbstoff bindet zwar nicht an einer durch Cystein-Mutagenese vordefinierten Stelle und erlaubt so keine Untersuchung der ortsspezifischen Konformationsänderungen der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, jedoch ermöglicht er es Messungen am Wildtyp durchzuführen.

#### 3.2.2 RH421 als Sensor für das Membranpotential

Nach Fluoreszenzmarkierung uninjizierter Kontrolloozyten mit RH421 wurden an diesen Spannungssprung-Experimente durchgeführt. Abbildung 1.20 A zeigt die Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenzänderungen. Positive Potentiale bewirkten eine Zunahme der Fluoreszenz. Die

Änderung auf einen neuen Fluoreszenzwert infolge von Spannungssprüngen ist dabei lediglich durch die Zeitauflösung der Spannungsklemme begrenzt. Dies ist zu erwarten, denn die Fluoreszenzantwort von RH421 erfolgt im  $\mu\text{s}$ -Bereich [69,101]. Demzufolge ist die Kinetik des Farbstoffs nicht limitierend für die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-induzierten Fluoreszenzänderungen (siehe unten). Abbildung 1.20 B zeigt eine Auftragung der Fluoreszenzänderung gegen das jeweilige Membranpotential. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die Amplitude der Fluoreszenzänderung über einen großen Spannungsbereich linear von der Spannung abhängt. Die über den Spannungsbereich von 200 mV auftretenden Fluoreszenzänderungen betragen 5 – 10%.

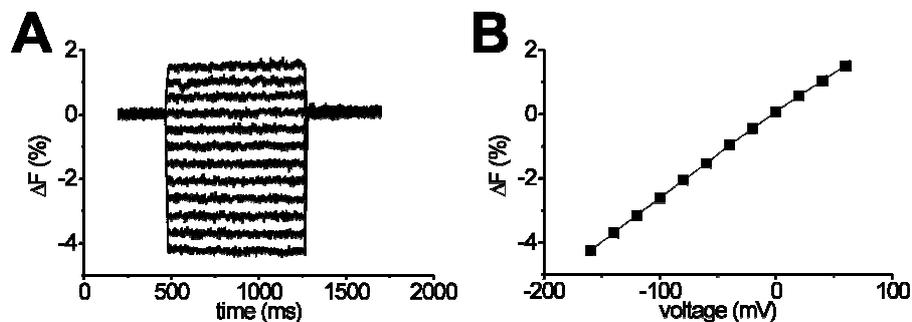


Abbildung 1.20: (A) Fluoreszenzänderung RH421-markierter Kontrollloozyten auf Spannungssprünge von 0 mV zu  $-160$  mV bis  $60$  mV (in  $20$  mV Schritten, bei negativen Potentialen startend). Ein Anstieg der Kurve bedeutet einen Fluoreszenzzunahme. Die endogene Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase wurde durch  $10 \mu\text{M}$  Ouabain inhibiert. (B) Spannungsabhängigkeit des stationären Fluoreszenzwerts.

### 3.2.3 Fluoreszenzsignale RH421-markierter Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Konstrukte

Die Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs RH421 ist reversibel und richtet sich nach einem Verteilungskoeffizienten, der sich aus dem Gleichgewicht zwischen Einlagerungs- und Freisetzungreaktion aus der Plasmamembran der *Xenopus*-Oozyten zusammensetzt. Der Verteilungskoeffizient des Farbstoffs ist aber nicht nur Grundlage dafür, dass im Laufe der Messung wieder Farbstoff in das wässrige Medium zurückdiffundieren kann, sondern auch für eine Umverteilung in die inneren Kompartimente der Zellen, wodurch immer mehr Farbstoff nicht mehr in der Plasmamembran sondern in inneren Membranen zur Hintergrundfluoreszenz beiträgt. Dadurch nahm das Signal/Rausch-Verhältnis im Laufe der Messung immer mehr ab. Infolge eines Lösungswechsels, der einer Reduktion der Farbstoffkonzentration in der extrazellulären Lösung

entspricht, diffundiert RH421 daher vergleichsweise schnell aus der Plasmamembran heraus. Dieser Effekt erwies sich als experimentelles Erschwernis für einen Vergleich der basalen Fluoreszenzniveaus unter Lösungswechselbedingungen. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse beziehen sich demzufolge ausnahmslos nicht auf Lösungswechsel-Experimente sondern auf Spannungssprung-Experimente unter Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch-Bedingungen.

### **3.2.3.1 Transiente Ströme und Fluoreszenzen der Konstrukte NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen**

Infolge von Spannungssprüngen reagierte das RH421-markierte Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Konstrukt NaK<sub>WT</sub> mit den bereits oben gezeigten Ouabain-sensitiven transienten Strömen wie dargestellt in Abbildung 1.21 A bzw. 1.7 B. Gleichzeitig war ein Fluoreszenzsignal zu erkennen, das nicht mehr plötzlich anstieg wie in uninjizierten Kontrolloozyten, sondern nun eine überschwingende, transiente Phase aufwies. Unter diesen Bedingungen überlagert das Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-induzierte Fluoreszenzsignal des RH421 das sich durch ein Membranprotein ergebende Fluoreszenzsignal (Daten nicht gezeigt). Nach Inhibition des Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-spezifischen Fluoreszenzsignals durch 5 mM Ouabain ergaben sich Fluoreszenzsignale infolge von Spannungssprüngen, die denen von uninjizierten Kontrolloozyten glichen (Daten nicht gezeigt). Dieses potentialsensitive Fluoreszenzsignal in Gegenwart von 5 mM Ouabain konnte subtrahiert werden. Für eine Auswertung der spannungssprunginduzierten transienten Ströme wurden ebenso die unspezifischen Leckströme der Oozyten abgezogen, wie sie sich nach Inhibition der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase mit 5 mM Ouabain ergaben. Diese Auswertung resultierte in transienten Strömen (Abbildung 1.21 A) und Fluoreszenzsignalen, die potentialabhängig einen neuen Sättigungswert erreichten (Abbildung 1.21 C).

An die Fluoreszenzsignale und transienten Ströme konnten monoexponentielle Funktionen angepasst und damit die apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (reziproke Zeitkonstanten 1/τ) bestimmt werden. Die Spannungsabhängigkeit der apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ist in Abbildung 1.21 B dargestellt. Es wird deutlich, dass die Relaxation des Fluoreszenzsignals in den stationären Zustand mit derselben apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten erfolgt wie

der transiente Strom (ca.  $80 \text{ s}^{-1}$  bei 0 mV und ca.  $300 \text{ s}^{-1}$  bei  $-160 \text{ mV}$ ; Abbildung 1.21 A und B). Eine Verlangsamung der Relaxation der transienten Ströme (und Fluoreszenzsignale) infolge des Spannungssprungs durch Einlagerung des Farbstoffs war nicht zu erkennen (ca.  $80 \text{ s}^{-1}$  bei 0 mV und ca.  $300 \text{ s}^{-1}$  bei  $-160 \text{ mV}$ ; vergleiche Abbildung 1.7 B und 1.21 B). Die Ergebnisse mit dem Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Konstrukt NaK<sub>zero</sub> entsprechen im Rahmen der Fehlergenauigkeit denen mit dem Konstrukt NaK<sub>WT</sub> (Daten nicht gezeigt).

Die in nativen Membranfragmenten vorliegende Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase reagierte auf ATP-Sprünge in *stopped-flow*-Experimenten mit einer Ladungsverschiebung über die Plasmamembran, die einer Verschiebung im Dipolpotential gleichkommt und dadurch zu einer Fluoreszenzänderung führte [54,62,65,71]. Diese wurde als an die Ladungsverschiebung gekoppelt angenommen, die ihrerseits die E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung detektiert. In vergleichenden Messungen nativer Enzympräparationen konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der transienten Ströme, wie sie in BLM-Experimenten nach ATP-Konzentrationssprung-Experimenten durch photolytische ATP-Freisetzung aus caged-ATP ausgelöst werden, und die Kinetik der Fluoreszenzänderungen, wie sie in *stopped-flow* ATP-Konzentrationssprung-Experimenten durch schnelle Mischung mit Messungen mit RH421 beobachtet werden, übereinstimmende Ergebnisse für die Relaxation des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Übergangs lieferten [24,62,63]. Dieses Ergebnis kann anhand der beobachteten Ergebnisse bestätigt werden, da spannungssprunginduzierte Strom- und Fluoreszenzsignale durch Voltage-Clamp-Fluorometrie im Oozytensystem direkt miteinander verglichen werden können und auch in diesem System gleiche Relaxationszeiten für den E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Übergang lieferten.

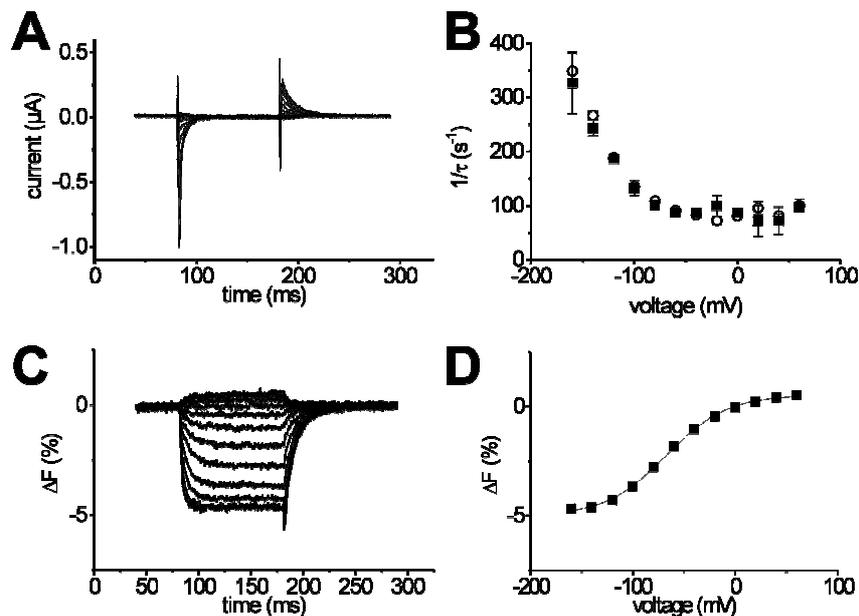


Abbildung 1.21: Vergleich von Strom- und RH421-basierten Fluoreszenzsignalen von *Xenopus*-Oozyten, die das Konstrukt NaK<sub>WT</sub> exprimierten, nach Subtraktion der in Gegenwart von 5 mM Ouabain ausgelösten und daher nicht Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-spezifischen Strom- und Fluoreszenzsignale. Die endogene Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase wurde vorher bereits durch 10 µM Ouabain inhibiert. (A) Transiente Ströme auf Spannungssprünge von jeweils 0 mV zu -160 mV bis 60 mV (in 20 mV Schritten, bei negativen Potentialen startend) und zurück. (B) Spannungabhängigkeit des reziproken Relaxationszeitkonstanten der transienten Ströme wie dargestellt in (A) und der Fluoreszenzänderung wie dargestellt in (C). (C) RH421-basierte Fluoreszenzänderung auf Spannungssprünge von jeweils 0 mV zu -160 mV bis +60 mV (in 20 mV Schritten, bei negativen Potentialen startend). Ein Anstieg der Kurve bedeutet einen Fluoreszenzanstieg. (D) Spannungabhängigkeit des stationären Fluoreszenzwerts. Boltzmann-Parameter für Spannungssprünge von 0 mV zu -160 mV bis +60 mV NaK<sub>WT</sub>: U<sub>1/2</sub> = -67 ± 7 mV; z<sub>q</sub> = 0.94 ± 0.09. Die Kurven sind ebenso repräsentativ für Messungen mit *Xenopus*-Oozyten, die das Konstrukt NaK<sub>zero</sub> exprimierten.

### 3.2.3.2 Stationäre Fluoreszenzen der Konstrukte NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub>

Die Auswertung der stationären Fluoreszenzwerte bei dem jeweiligen Potential aus Abbildung 1.21 C ergab eine Boltzmann-Verteilung, die, wie bei der Auswertung der verschobenen Ladungen (Abbildung 1.7), die Verteilung der Moleküle bei dem jeweiligen Potential im E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P Fließgleichgewicht beschreibt. Wie durch die Experimente mit dem Farbstoff TMRM konnte auch durch die mit dem Farbstoff RH421 eine Verteilung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in ihren Intermediaten detektiert werden, wenn zuvor das spannungsabhängige basale Fluoreszenzsignal subtrahiert worden war. Das notwendige Subtrahieren des spannungsabhängigen basalen Fluoreszenzsignals erschwert allerdings die Auswertung im Vergleich zu der bei Messungen mit TMRM an NaK<sub>WT</sub>(N790C). Zudem ist die Subtraktion aufgrund der stark vom Auswaschen des Fluoreszenzfarbstoffs gekennzeichneten basalen Fluoreszenz verhältnismäßig ungenau. Zu Beginn der Messung erfolgt das Bleichen des Hintergrundsignals durch Auswaschen schneller als das des spannungssprunginduzierbaren

Fluoreszenzsignals. Im weiteren Verlauf der Messung kehrt sich der Effekt um und durch die Umverteilung des Farbstoffs in die inneren Kompartimente der Zellen, findet Bleichen des Hintergrundsignals langsamer als das des spannungssprunginduzierbaren Fluoreszenzsignals statt. Aus diesem Grund ergeben sich nach Subtraktion der Ouabain-insensitiven Fluoreszenzänderung (selbst nach Normierung) biphasische Signale, wie dies insbesondere in der untersten Kurve in Abbildung 1.21 C zu sehen ist. Vor dem eigentlichen Relaxieren des Fluoreszenzsignals auf den alten Wert nach einem Sprung zurück zu 0 mV zeigt sich zunächst noch ein schneller Fluoreszenzabfall. Dieser Effekt beruht darauf, dass bei der Normierung auf das Hintergrundsignal das subtrahierte spannungssprunginduzierte Fluoreszenzsignal einen überproportional großen Wert annimmt. Dennoch konnten die Boltzmann-Parameter für Spannungssprünge von 0 mV zu -160 mV bis +60 mV bestimmt werden: NaK<sub>WT</sub>:  $U_{1/2} = -67 \pm 7$  mV;  $z_q = 0.94 \pm 0.09$ .

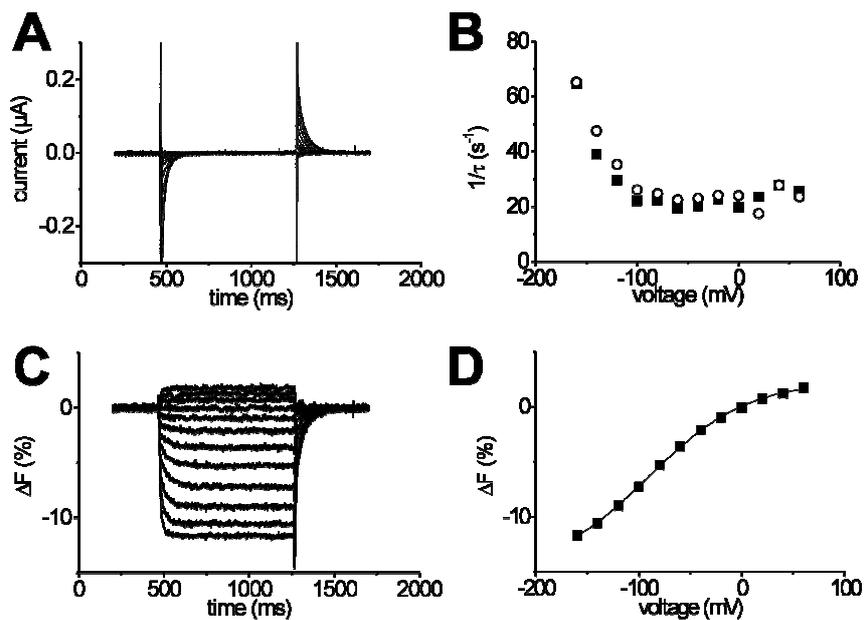


Abbildung 1.22: Vergleich von Strom- und RH421-basierten Fluoreszenzsignalen von *Xenopus*-Oozyten, die das Konstrukt NaK<sub>zero</sub>(N790C) exprimierten, nach Subtraktion der in Gegenwart von 5 mM Ouabain ausgelösten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-unspezifischen Strom- und Fluoreszenzsignale. Die endogene Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase wurde vorher bereits durch 10 µM Ouabain inhibiert. (A) Transiente Ströme auf Spannungssprünge von jeweils 0 mV zu -160 mV bis 60 mV (in 20 mV Schritten, bei negativen Potentialen startend) und zurück. (B) Spannungsabhängigkeit des reziproken Relaxationszeitkonstanten der transienten Ströme wie dargestellt in (A) und der Fluoreszenzänderung wie dargestellt in (C). (C) RH421-basierte Fluoreszenzänderung auf Spannungssprünge von jeweils 0 mV zu -160 mV bis +60 mV (in 20 mV Schritten, bei negativen Potentialen startend). Ein Anstieg der Kurve bedeutet einen Fluoreszenzanstieg. (D) Spannungsabhängigkeit des stationären Fluoreszenzwerts. Boltzmann-Parameter für Spannungssprünge von 0 mV zu -160 mV bis +60 mV: NaK<sub>zero</sub>(N790C):  $U_{1/2} = -91 \pm 5$  mV;  $z_q = 0.62 \pm 0.03$

Die Fluoreszenzänderung im Gegensatz zu den Messungen mit TMRM beruht in diesen Messungen nicht auf ortsspezifisch detektierten Ladungsverschiebungen und nicht auf genau lokalisierbaren Konformationsänderungen. Dennoch stimmen die Werte gut mit denen der Boltzmann-Anpassung an die Q-V-Kurve von NaK<sub>WT</sub> überein ( $U_{1/2} = -83 \pm 10$  mV;  $z_q = 0.82 \pm 0.07$ ; Abbildung 1.7 B). Die Ergebnisse mit dem Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Konstrukt NaK<sub>zero</sub> entsprechen im Rahmen der Fehlergenauigkeit denen mit dem Konstrukt NaK<sub>WT</sub> (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.3.3 Vergleich mit dem Konstrukt NaK<sub>zero</sub>(N790C)

Um festzustellen, ob Voltage-Clamp-Fluorometrie-Messungen auch die Verlangsamung der Kinetik und die Verschiebung der Boltzmann-Kurve des Konstrukts NaK<sub>zero</sub>(N790C) im Vergleich zu NaK<sub>WT</sub> widerspiegeln würden, wurden äquivalente Messungen mit Oozyten durchgeführt, die dieses Konstrukt überexprimierten. Für das Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Konstrukt NaK<sub>zero</sub>(N790C) wurden infolge von Spannungssprüngen und nach Subtraktion der unspezifischen Leitfähigkeiten der Oozyten die Ouabain-sensitiven transienten Ströme beobachtet, wie sie exemplarisch in Abbildung 1.22 A dargestellt sind. Nach Subtraktion des potentialinduzierten basalen Fluoreszenzniveaus ergab sich ein Fluoreszenzsignal wie in Abbildung 1.22 C dargestellt. Eine Auswertung des Zeitverlaufs des Fluoreszenzsignals und der transienten Ströme wurde als Spannungsabhängigkeit der apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten in Abbildung 1.22 B aufgetragen. Im Vergleich zu NaK<sub>WT</sub> ist für NaK<sub>zero</sub>(N790C) bezüglich beider Signale eine signifikante Verlangsamung zu erkennen ( $1/\tau \sim 20$  s<sup>-1</sup> bei 0 mV bzw.  $\sim 70$  s<sup>-1</sup> bei -160 mV; Abbildung 1.22 A und B). Dass die Relaxation der Fluoreszenzantwort mit denselben Zeitkonstanten erfolgt wie die des transienten Stroms, unterstreicht, dass beide Signale demselben Reaktionsprozess zugeordnet werden müssen. Die Auswertung der potentialabhängigen stationären Fluoreszenzwerte ergab eine Boltzmann-Kurve, die gegenüber der des Wildtyp-Konstrukts verschoben war, wie bereits im vorigen Abschnitt für diese Mutante beobachtet worden war (vergleiche Abbildung 1.12 D sowie 1.13 A,B und Abbildung 1.22 D). Die Boltzmann-Parameter betragen für NaK<sub>zero</sub>(N790C)  $U_{1/2} = -91 \pm 5$  mV und  $z_q = 0.62 \pm 0.03$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Voltage-Clamp-Fluorometrie nach ortsspezifischer Fluoreszenzmarkierung

#### 4.1.1 Einleitung

Voltage-Clamp-Fluorometrie an *Xenopus* Oozyten kombiniert mit ortsspezifischer Fluoreszenzmarkierung erlaubt es, Konformationsänderungen der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zeitaufgelöst an aktivem Enzym und *in situ* unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt wird gezeigt, dass die während des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsübergangs auftretenden Konformationsänderungen der Bewegung von Transmembranhelix TM5 zugeordnet werden können. Der Reporterfluorophor befindet sich dabei in der E<sub>1</sub>P-Konformation in einer hydrophoben Umgebung, in der E<sub>2</sub>P-Konformation – die die extrazelluläre Bindung/Freisetzung von Kationen ermöglicht – in einer hydrophileren Umgebung. Die Methode erlaubt weiterhin anhand von Fluoreszenzintensitäten eine zeitaufgelöste Detektion der Verteilung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in ihren Konformationen an aktivem Enzym unter physiologischen Bedingungen. Diese Ergebnisse werden im Hinblick auf die kürzlich publizierten Kristallstrukturen der SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase diskutiert.

#### 4.1.2 Das Entfernen der extrazellulären Cysteine der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induziert keine drastisch veränderten Transporteigenschaften

Die Referenzkonstrukte NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> in *Xenopus* Oozyten generierten auf Zugabe von K<sup>+</sup> einen stationären Pumpstrom, der bei sättigenden Konzentrationen von 30 mM K<sup>+</sup> ungefähr 200 nA erreichte und bei ungefähr 0 mV ein spannungsabhängiges Maximum ausbildet (Abbildung 1.1 A und B). Für niedrigere Konzentrationen von K<sup>+</sup> verschiebt sich das Maximum des stationären Stroms zu negativeren Potentialen. Die Affinität für K<sup>+</sup> liegt bei –40 mV bei einem K<sub>M</sub>-Wert von ca. 1 mM und wird sowohl für negative als auch für positive Spannungen niedriger (Abbildung 1.1 C). Die beobachtete Abhängigkeit der stationären Ströme von K<sup>+</sup>-Konzentration und Spannung stimmt mit publizierten Daten [21,88] und mit an der Ratten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gemessenen Daten (Jan B.

Koenderink, Manuskript in Vorbereitung NaK<sub>WT</sub>: K<sub>M</sub> ~ 1 mM) gut überein. Die beobachtete Glockenkurve der stationären Ströme kann durch die Elektrogenizität der Bindung von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> erklärt werden. Bei negativen Potentialen ist der Pumpstrom vermindert, weil die (stark elektrogene) extrazelluläre Na<sup>+</sup>-Rückbindung an die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase bevorzugt abläuft, und dadurch das Verhältnis von E<sub>1</sub>P zu E<sub>2</sub>P im Fließgleichgewicht nach E<sub>1</sub>P verschoben ist. Durch die stark reduzierte Konzentration an E<sub>2</sub>P werden die der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung folgenden Reaktionen verlangsamt. Die Ströme bei positiven Potentialen sind reduziert, weil unter diesen Bedingungen die extrazelluläre Bindung von positiv geladenen K<sup>+</sup>-Ionen an das Protein erschwert wird, und dies die K<sup>+</sup>-abhängige Dephosphorylierung bzw. die Reaktion E<sub>2</sub> → E<sub>1</sub> verlangsamt. Da die Reaktion E<sub>2</sub> → E<sub>1</sub> der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Reaktionszyklus ist, bewirkt schon eine kleine Änderung der K<sup>+</sup>-Konzentration einen großen Effekt bezüglich des stationären Stroms. Zu dieser Interpretation passt auch die Verschiebung des Maximums der Glockenkurve bei niedrigeren K<sup>+</sup>-Konzentrationen.

Spannungssprünge unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen führen zu transienten Strömen, die auf den elektrogenen Na<sup>+</sup>-Bindungsschritten beruhen [19-25]. Die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase wechselt unter diesen Bedingungen reversibel und nahezu ausschließlich zwischen den Konformationen E<sub>1</sub>P und E<sub>2</sub>P hin und her, denn die Dephosphorylierung in Abwesenheit von K<sup>+</sup> ist sehr langsam. Da dem E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsübergang unmittelbar elektrogene Reaktionen folgen, bei denen Na<sup>+</sup>-Ionen in den Extrazellulärraum abgegeben werden, und die Kinetik elektrogener Prozesse vom Potential beeinflusst wird, wechselt auch die Besetzung der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Zustände infolge von Spannungssprüngen. Positive Potentiale favorisieren den E<sub>2</sub>P-Zustand und die Freisetzung von Na<sup>+</sup> auf der extrazellulären Seite, während negative Potentiale die Rückbindung von extrazellulärem Na<sup>+</sup> und die anschließende Überführung in den E<sub>1</sub>P-Zustand begünstigen. Die Reaktionsfolge E<sub>1</sub>P(3Na<sup>+</sup>) ↔ E<sub>2</sub>P + 3Na<sup>+</sup> weist drei voneinander trennbare elektrogene Ereignisse auf, die als Freisetzung-/Bindungsschritte der 3 Na<sup>+</sup>-Ionen interpretiert werden [25]. Zwei dieser Schritte erfolgen im μs-Bereich und können daher mittels der Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Methode an *Xenopus*-Oozyten nicht aufgelöst werden. Der erste Na<sup>+</sup>-Freisetzungs- bzw. letzte Na<sup>+</sup>-Bindungsschritt jedoch stellt das wesentliche elektrogene Ereignis dar und wird durch die Reaktion des

Konformationsübergangs  $E_1P(3Na^+) \leftrightarrow E_2P(3Na^+)$  geschwindigkeitsbestimmt [25]. Wie beschrieben relaxiert das System nach Störung des Gleichgewichts durch einen Spannungssprung in ein neues Gleichgewicht. Dies ruft transiente Ströme hervor, die im Oozyten-Messsystem – d.h. unter Vernachlässigung der wenig elektrogenen Schritte im  $\mu$ s-Bereich – Kinetiken erster Ordnung folgen (Abbildung 1.2 A).

Bei 21 °C und 0 mV zeigen die transienten Ströme von NaK<sub>WT</sub> unter Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch Bedingungen reziproke Zerfallszeitkonstanten ( $1/\tau$ ) von ca. 80 s<sup>-1</sup>. Negative Potentiale beschleunigen die reziproken Zerfallszeitkonstanten ( $1/\tau$ ) exponentiell zu Werten von ca. 300 s<sup>-1</sup> bei -160 mV (Abbildung 1.2 B). Diese Beschleunigung beruht auf der Beschleunigung der Rückbindung von Na<sup>+</sup> ( $E_2P(3Na^+) \leftarrow E_2P + 3Na^+$ ), was aus der Abhängigkeit von der extrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration, die die Bindung von Na<sup>+</sup> erleichtert, geschlossen werden kann [21,25]. Der Wert der reziproken Zerfallszeitkonstanten ( $1/\tau$ ) bei positiven Potentialen dagegen repräsentiert den Wert der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Vorwärtsreaktion  $E_1P(3Na^+) \rightarrow E_2P(3Na^+)$ . Für sie ist im experimentell zugänglichen Spannungsbereich positiver Potentiale keine Spannungsabhängigkeit zu beobachten. Der hier ermittelte Verlauf der  $1/\tau$ -V-Kennlinie stimmt mit publizierten Daten überein ( $1/\tau = 80 \text{ s}^{-1}$  bei 0 mV;  $300 \text{ s}^{-1}$  bei -160 mV [21,25]).

Da die Anzahl der Ladungen, die durch einen Spannungssprung verschoben werden können, aufgrund der begrenzten Zahl der Pumpmoleküle entlang der Spannungsachse in beide Richtungen beschränkt ist, führen positive Potentiale zu einer maximalen Anreicherung von E<sub>2</sub>P, negative Potentiale dagegen zu einer maximalen Anreicherung der E<sub>1</sub>P-Konformation. In solch einem Modell, in dem das Molekül genau zwei diskrete energetische Zustände einnehmen kann – E<sub>1</sub>P(3Na<sup>+</sup>) und E<sub>2</sub>P + 3Na<sup>+</sup> – wird pro Molekül bei der Überführung in den anderen Zustand stets eine konstante Ladungsmenge verschoben. Die verschobene Ladung ist dann direkt proportional zu der Anzahl der in eine andere Konformation überführten Pumpmoleküle. Da sich die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in den beiden unterschiedlichen Konformationen E<sub>1</sub>P und E<sub>2</sub>P auf zwei unterschiedlichen Energieniveaus befindet, ergibt sich die Verteilung in den beiden Zuständen nach der Wahrscheinlichkeitsverteilung nach Boltzmann. Dementsprechend folgt auch die Spannungsabhängigkeit der während des transienten

Stroms bewegten Ladung (Q-U-Kurve) einer Boltzmann-Verteilung (Abbildung 1.2 C und D). Die Spannung der Gleichverteilung ( $U_{1/2}$ ) in beiden Konformationen liegt bei ca.  $-70$  mV, der die insgesamt verschobene Ladung anzeigende Koeffizient  $z_q$  bei ca. 0.7. Diese Werte sind in Übereinstimmung mit publizierten Werten ( $U_{1/2} = -30$  bis  $-90$  mV;  $z_q = 0.6$  bis 1.0; [19,21,22,25,88]) und mit an der Ratten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gemessenen Daten (NaK<sub>WT</sub>:  $U_{1/2} = \text{ca. } -60$  mV;  $z_q = \text{ca. } 0.8$ ; Jan B. Koenderink, Manuskript in Vorbereitung). Eine Auswertung der Sättigungswerte der Boltzmann-Kurve erlaubt die Anzahl der pro Oozyte an der Ladungsverschiebung beteiligten Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Moleküle zu bestimmen. Die Differenz der Sättigungswerte der Boltzmann-Funktion ergibt die verschiebbare Gesamtladung ( $\Delta Q = 5 - 20$  nC), die ein Spannungssprung auslösen würde, der alle Moleküle von E<sub>1</sub>P nach E<sub>2</sub>P oder zurück überführen würde. Unter der Annahme, dass pro Molekül genau eine Elementarladung verschoben wird ( $\epsilon = 1.602 \times 10^{-19}$  C), ergibt sich nach Gleichung 1.2 die Gesamtzahl (N) der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Moleküle pro Oozyte:

$$N = \frac{Q_{\max} - Q_{\min}}{\epsilon} \quad (1.2)$$

(N = Anzahl der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Moleküle pro Oozyte;  $Q_{\max}$  und  $Q_{\min}$  = Sättigungswerte bei extremen Potentialen;  $\epsilon = 1.602 \times 10^{-19}$  C, Elementarladung)

Aus dieser Berechnung ergibt sich, dass pro Oozyte ungefähr  $10^{11}$  Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Moleküle in der Plasmamembran exprimiert waren.

#### 4.1.3 Durch sulfhydrylspezifische Bindung von TMRM an NaK<sub>zero</sub>(N790C)

##### **bildet sich ein molekularer Sensorkomplex für Konformationsänderungen der Transmembranhelix TM5**

Durch zielgerichtete Einzel-Cystein-Mutagenese wurde in der extrazellulären TM5-TM6-Schleife eine Reporterposition ausfindig gemacht, an welcher sich ein molekularer Sensorkomplex erstellen ließ. Dieser molekulare Sensorkomplex besteht aus einem Reporterfluorophor mit einer sulfhydrylspezifisch bindenden Maleimid-Gruppe und dem am extrazellulären Ende von Transmembranhelix TM5 eingefügten Cystein (N790C), an welches er gekoppelt wird. Mittels des

Reporterfluorophors kann die Bewegung während der Konformationsänderungen im Bereich dieser Transmembranhelix direkt beobachtet werden. Der Zeitverlauf der Bewegung der Transmembranhelix TM5 kann dabei direkt dem Zeitverlauf des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsübergangs zugeordnet werden, währenddessen Na<sup>+</sup>-Ionen transportiert und auf der extrazellulären Seite freigesetzt werden.

#### **4.1.3.1 Niedrige Fluoreszenz in E<sub>2</sub>P, hohe in E<sub>1</sub>P**

Erste Hinweise auf eine niedrige Fluoreszenz in der E<sub>2</sub>P-Konformation und eine hohe Fluoreszenz in der E<sub>1</sub>P-Konformation sind aufgrund der stationären Fluoreszenzänderung durch Zugabe von K<sup>+</sup> zu erkennen (Abbildung 1.10). Die Zugabe von K<sup>+</sup> führt zu einem stationären Pumpstrom, der von einem Fluoreszenzanstieg begleitet ist. Dieses Verhalten kann im Rahmen des Albers-Post-Schemas für den Reaktionszyklus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase erklärt werden. In Abwesenheit von K<sup>+</sup> ist die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase bei 0 mV hauptsächlich im E<sub>2</sub>P-Zustand des Reaktionszyklus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase festgehalten, in dem die Kationen-Bindungsstellen zur extrazellulären Seite zugänglich sind, so dass Na<sup>+</sup> dort freigesetzt werden kann. Die Zugabe von K<sup>+</sup> beschleunigt die Dephosphorylierung, wodurch die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase beschleunigt aus der E<sub>2</sub>P-Konformation abgeführt wird. Die Wechselzahl erhöht sich, was sich in Form eines stationären Pumpstroms ausdrückt. Gleichzeitig verringert sich nicht nur die Konzentration der E<sub>2</sub>P-Konformation. Auch die Konzentration aller anderen Zustände erhöht sich, unter anderem die des E<sub>1</sub>P-Zustands. Da dies zu einem Anstieg der Fluoreszenz führt, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine niedrige Fluoreszenz der E<sub>2</sub>P-, eine hohe der E<sub>1</sub>P-Konformation zugeschrieben werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass TMRM in hydrophoben Umgebungen eine höhere Fluoreszenz zeigt, bedeutet dies, dass während des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsübergangs die Exposition des Farbstoffs so verändert wird, dass er von einer geschützten Position in einer hydrophoben Umgebung in der E<sub>1</sub>P-Konformation in ein fluoreszenzlöschendes, wässriges Medium in der E<sub>2</sub>P-Konformation überführt wird.

#### **4.1.3.2 Fluorimetrische Detektion der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung**

Um eine spezifische Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu Teilreaktionen des Albers-Post-Zyklus zu erlauben, wurden Spannungssprung-Experimente unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen durchgeführt, unter

denen das Protein einem ATP-abhängigen Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> Austausch unterliegt (Abbildung 1.13). Die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase liegt unter Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch Bedingungen (nahezu) komplett phosphoryliert vor, wodurch diese eine exklusive Untersuchung der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung zulassen. Positive Potentiale favorisieren den E<sub>2</sub>P-Zustand und setzen Na<sup>+</sup> auf der extrazellulären Seite frei, während negative Potentiale die Bindung von extrazellulärem Na<sup>+</sup> und die anschließende Überführung in den E<sub>1</sub>P-Zustand hervorrufen. Spannungssprünge zu positiven Potentialen – E<sub>2</sub>P favorisierend – führen gleichzeitig zu einem Abfall der Fluoreszenz, während negative Potentiale – E<sub>1</sub>P favorisierend – zu einem Anstieg der Fluoreszenz führen (vergleiche Abbildung 1.13 B und C). Dieses ist in Übereinstimmung mit der Interpretation des K<sup>+</sup>-Austausch-Experiments, wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben.

#### 4.1.3.3 Direkte dynamische Korrelation

Dem E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsübergang folgt eine Ladungsverschiebung, bei der Na<sup>+</sup> in den Extrazellulärraum abgegeben wird. Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch-Bedingungen erlauben die Untersuchung der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung. Die Kinetik der transienten Ströme und Fluoreszenzänderungen ausgelöst durch Spannungssprünge unter Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch-Bedingungen sind beinahe identisch (Abbildung 1.12 A). Daraus kann man folgern, dass die Fluoreszenzsignale direkt die E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung detektieren. Die strukturellen Änderungen sind direkt mit der physiologischen Funktion des Enzyms korreliert, denn die Ausschleusung der Na<sup>+</sup>-Ionen ist ein entscheidender Reaktionsschritt während des Transportzyklus. Die Fluoreszenzmarkierung an Position 790 zeigt die direkte Beteiligung von Transmembranhelix TM5 und der TM5-TM6-Schleife an dieser Konformationsänderung. Die direkte Analogie der Kinetiken des Fluoreszenzsignals und der transienten Ströme können als eine ideale Situation betrachtet werden, denn eine lineare Korrelation zwischen Umgebungsänderungen am Fluorophor und einer Ladungsverschiebung kann nicht *ab initio* erwartet werden. Im Falle des Shaker K<sup>+</sup>-Kanals – dem mit der Methode der Voltage-Clamp-Fluorometrie am besten untersuchten System – ist die direkte kinetische Korrelation zwischen dem Signal eines Reporter-Fluorophors und der Verschiebung von Schaltladungen (*gating charges*) kompliziert, denn in diesem System tragen verschiedene Proteinregionen zu den beobachteten

Schaltladungsverschiebungen (*gating currents*) bei [56]. Cha und Bezanilla konnten weiterhin zeigen, dass verschiedene Fluorophore an dieselbe Cystein-Einheit gekoppelt unterschiedliche Fluoreszenzantworten ergaben, da diese unterschiedliche Sensitivität hinsichtlich der elektrostatischen Eigenschaften der Mikroumgebung aufwiesen.

Zusätzliche Evidenz für die direkte Korrelation zwischen Konformationsänderungen und Ionen-transport rührt von der Übereinstimmung der Spannungsabhängigkeiten der transportierten Ladung während des transienten Stroms (Q-U-Kurve), bzw. der stationären Fluoreszenz ( $\Delta F$ -U-Kurve) her (Abbildung 1.12 B). Die Anzahl der Ladungen, die durch einen Spannungssprung verschoben werden können, ist in beide Potentialrichtungen beschränkt und die Q-U-Kurve folgt einer Boltzmann-Verteilung. Positive Potentiale führen daher zu einer maximalen Anreicherung von E<sub>2</sub>P, welche als Sättigung der Fluoreszenzänderung beobachtet werden kann. Negative Potentiale dagegen drängen die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in den E<sub>1</sub>P-Zustand, und bei stark hyperpolarisierenden Potentialen (Abbildung 1.12 B, 1.14 A und 1.16 a und f jeweils bei -160 mV) ist ein beginnendes Sättigen der Fluoreszenzänderung zu erkennen. Da die Ladungsbewegungen die E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung widerspiegeln, erlaubt die Q-U-Kurve eine direkte Bestimmung der Menge von E<sub>1</sub>P und E<sub>2</sub>P bei jedem vorgegebenen Potential. Aus der Äquivalenz der Q-U-Kurve und der  $\Delta F$ -U-Kurve kann geschlossen werden, dass die stationären Fluoreszenzwerte ebenfalls ein absolutes Maß für die relativen Anteile von E<sub>1</sub>P und E<sub>2</sub>P sind.

#### 4.1.3.4 TMRM-Effekte

Im Vergleich zu NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub> ( $\sim 80 \text{ s}^{-1}$  bei 21 °C und 0 mV) zeigen die transienten Ströme von NaK<sub>zero</sub>(N790C) unter Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch Bedingungen reziproke Zerfallszeitkonstanten von  $\sim 20 \text{ s}^{-1}$  (Abbildung 1.13 A) mit der Tendenz zur weiteren Verringerung nach Bindung von TMRM (Abbildung 1.13 A). Wie erwähnt liegen die NaK<sub>WT</sub> und NaK<sub>zero</sub>-Werte im Bereich einer Vielzahl publizierter Daten ( $50 - 200 \text{ s}^{-1}$ , [19-25]) Die vergleichsweise niedrigen reziproken Zerfallszeitkonstanten in NaK<sub>zero</sub>(N790C) resultieren aus dem Einbringen der Cysteinsubstitution. Sie können jedoch nicht als Beleg für früher berichtete Werte für die E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Relaxation des Wildtyps von  $20 \text{ s}^{-1}$  verstanden

werden [102]. Auch die an die Q-U-Kurve angepasste Boltzmann-Funktion zeigt eine Verschiebung der halbmaximalen Spannung ( $U_{1/2}$ ) von ungefähr  $-70$  mV ( $\text{NaK}_{\text{zero}}$ ) zu  $-100$  mV ( $\text{NaK}_{\text{zero}}(\text{N790C})$ ) mit der Tendenz einer weiteren Verschiebung nach der Bindung von TMRM (Abbildung 1.13 B). Die generell verlangsamte Reaktionskinetik der  $E_1P$ - $E_2P$ -Konformationsänderung der Mutante  $\text{NaK}_{\text{zero}}(\text{N790C})$  steht in keiner Weise der Zuweisung der beobachteten Fluoreszenzsignale zur  $E_1P$ - $E_2P$ -Konformationsänderung im Weg.

Die zusätzlichen Veränderungen durch die Bindung von TMRM sind erstaunlich gering, bedenkt man, dass ein relativ großes Molekül direkt im Bereich des Ionenzugangswegs kovalent bindet. Dass die Aminosäure N790 nämlich in diesem Bereich liegen muß, kann aus dem starken Einfluss der Mutation N790C auf die kinetischen Parameter der Kationen-Bindung an die  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase geschlossen werden. Entsprechend einer Erniedrigung der lokalen Kationen-Konzentration durch eine reduzierte Zugänglichkeit der Kationen-Bindungstasche ist der Effekt (Verlangsamung der Kinetik bei negativen Potentialen, geringfügige Verschiebung der Boltzmann-Verteilung zu negativen Potentialen) auch derselbe, der bei einer geringfügigen Absenkung der  $\text{Na}^+$ -Konzentration beobachtet wird [20]. Dieselbe Beobachtung – verlangsamte Kinetik nach Cystein-Substitution und Anbringen eines TMRM-Moleküls – wurde auch in den Studien am Shaker  $\text{K}^+$ -Kanal berichtet [56]. Da unmarkierte Pumpmoleküle mit schneller relaxierenden transienten Strömen zu den beobachteten transienten Strömen beitragen, nicht aber zu den Fluoreszenzänderungen, können die bei negativen Potentialen beschleunigten Relaxationen der transienten Ströme im Vergleich mit den Fluoreszenzen durch unmarkierte  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase-Moleküle erklärt werden. Eine unvollständig markierte Population von Pumpmolekülen könnte darauf beruhen, dass eine große Anzahl  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase-Moleküle in Invaginationen der Plasmamembran der Oozyten liegt und damit für den Farbstoff unzugänglich ist. Zusätzlich wären alle  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase-Moleküle, die noch während der Spannungsklemme-Messung in die Plasmamembran gelangen unmarkiert. Dies könnte durch exo- und endocytotischen Prozesse geschehen, die Transmembranproteine teilweise innerhalb weniger Minuten in die Plasmamembran transportieren oder von dort entfernen [103]. Der in Oozyten prinzipiell vorhandene zusätzliche

Beitrag zu den transienten Strömen durch unmarkierte endogene Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase wird durch die Zugabe von 10 μM Ouabain vollständig inhibiert und kann daher vernachlässigt werden.

#### **4.1.3.5 Fluorimetrische Detektion der Verteilung in den E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zuständen**

Mit Hilfe des beschriebenen molekularen Sensorkomplexes können konformationssensitive Fluoreszenzsignale in Gegenwart von K<sup>+</sup> untersucht werden. Die Fluoreszenzmessungen erlauben damit an der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase die kinetische Analyse des katalytischen Zyklus und die Bestimmung der Menge an E<sub>1</sub>-Zuständen und E<sub>2</sub>-Zuständen unter physiologischen Pumpbedingungen (Abbildung 1.16). Unter diesen Bedingungen, d.h. in gleichzeitiger Gegenwart von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>, ist die Beobachtung transienter Ströme aus kinetischen Gründen nahezu unmöglich (siehe Resultate) [96,97]. Fluoreszenzmessungen dagegen ermöglichen es, die Konformationsgleichgewichte der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase auch unter diesen Bedingungen zu untersuchen.

Eine Extrapolation zu den Sättigungswerten der Boltzmann-Funktion (angepasst an die ΔF-U-Kurve) bei 0 mM K<sup>+</sup> ergibt die Sättigungswerte für die Fluoreszenz bei nahezu komplett in die E<sub>1</sub>P- oder E<sub>2</sub>P-Konformation verschobenem Protein. Für die Messungen in Gegenwart von K<sup>+</sup> soll im Weiteren angenommen werden, dass der Fluorophor nur zwischen E<sub>1</sub>-artigen und E<sub>2</sub>-artigen Zuständen unterscheiden kann, da unter allen Bedingungen immer nur monoexponentielle Fluoreszenzänderungen beobachtet wurden. Die Höhe der Fluoreszenz korrespondiert dann direkt zu der Menge an E<sub>1</sub>- oder E<sub>2</sub>-Zuständen. Zur Erklärung der beobachteten Fluoreszenzsignale in Zusammenhang mit dem Albers-Post-Reaktionsschema der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ergibt sich das folgende Bild: Mit hohen extrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentrationen und in Abwesenheit von extrazellulärem K<sup>+</sup> ist die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase auf den elektrogenen Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch beschränkt, und die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase kann in spannungsabhängiger Art und Weise nahezu ausschließlich zwischen E<sub>1</sub>P und E<sub>2</sub>P hin und her reagieren. Im physiologisch relevanten Spannungsbereich zwischen 0 und -60 mV ist die Rückwärtsreaktion langsam, so dass die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase hauptsächlich in der E<sub>2</sub>P-Konformation vorliegt. Extrazelluläres K<sup>+</sup> stimuliert die Dephosphorylierung und damit die Entvölkerung der E<sub>2</sub>P Konformation, und das Enzym folgt dem K<sup>+</sup>-Transportzweig. Ansteigende Konzentrationen von K<sup>+</sup>

führen zu zunehmender Anreicherung der E<sub>1</sub>-Zustände. Bei sättigenden K<sup>+</sup>-Konzentrationen von [K<sup>+</sup>] = 30 mM befindet sich das Enzym größtenteils in E<sub>1</sub>-Konformationen, und die Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenz geht im experimentell zugänglichen Spannungsbereich vollständig verloren. Der Fluoreszenzwert zu jedem Potential und zu jedem Zeitpunkt ist ein absolutes Maß der Menge an E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zuständen. In erster Näherung kann zudem gleichzeitig der Anteil an phosphoryliertem Enzym bei einer vorgegebenen K<sup>+</sup>-Konzentration abgeschätzt werden.

Dazu kann aus dem Verhältnis der Amplituden der Boltzmann-Funktion bei 0 mM K<sup>+</sup> und der Amplituden der Boltzmann-Funktion bei vorgegebener K<sup>+</sup>-Konzentration bestimmt werden, wie groß bei dieser K<sup>+</sup>-Konzentration der Anteil an stark spannungsabhängig verschiebbaren Molekülen ist. Dieser Population von Molekülen besetzt vorzugsweise einen phosphorylierten Zustand.

#### **4.1.3.6 Wirkung von Ouabain**

Die geringsten Fluoreszenzwerte wurden in Abwesenheit von K<sup>+</sup> bei depolarisierenden Potentialen oder in Gegenwart von Ouabain erreicht. Die Inhibition der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase durch ihren spezifischen Inhibitor Ouabain führte weiterhin zu einer kompletten Hemmung der spannungssprunginduzierten Fluoreszenzänderungen (Abbildung 1.14 E und 1.16 g). Ouabain bindet an die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in der E<sub>2</sub>P-Konformation [34-38,104,105]. Der inhibitorische Effekt von Ouabain kann daher auf eine Blockierung des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsübergangs zurückgeführt werden. Dies kann entweder an einer sterischen Inhibition der Konformationsänderungen liegen oder daran, dass der Zugang der extrazellulären Kationen zu ihrer Bindungstasche nicht möglich ist, wodurch die anschließenden Reaktionsschritte unterbunden werden.

#### **4.1.3.7 Elektrogenizität der Na<sup>+</sup>-Bindung/Freisetzung**

Ersetzte man extrazelluläre Na<sup>+</sup>-Ionen vollständig durch TEA oder NMG (100 mM), zeigte sich dieselbe Hemmung spannungssprunginduzierter Fluoreszenzänderungen wie durch Bindung von Ouabain (Abbildung 1.14 C). Die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase reagiert demzufolge in Abwesenheit von extrazellulärem K<sup>+</sup> nicht auf Spannungsänderungen, obwohl der basale Fluoreszenzwert anzeigt, dass

das Enzym die spannungssensitive E<sub>2</sub>P-Konformation besetzt. In Übereinstimmung mit vielen anderen Studien [20,22,24,25,88], deutet dies darauf hin, dass die Elektrogenizität während des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsübergangs nicht von der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung selbst, sondern von der unmittelbar folgenden Na<sup>+</sup>-Freisetzung bzw. der unmittelbar vorangehenden extrazellulären Na<sup>+</sup>-Rückbindung herrührt. Dabei ergibt sich aus der Steigung der Boltzmann-Kurven der verschobenen Ladung und der stationären Fluoreszenz (Q-U-Kurve bzw. ΔF-U-Kurve; Abbildung 1.13 B) in Abwesenheit von K<sup>+</sup> für die verschobene Äquivalenzladung z<sub>q</sub> der Na<sup>+</sup>-abhängigen Reaktionsschritte ein Wert von ca. 0.7. Damit stimmt der aus den Fluoreszenzdaten bestimmte Wert exakt mit den in dieser Arbeit bestimmten Werten für die Reaktion E<sub>1</sub>P → E<sub>2</sub>P überein, welche sich darüberhinaus in guter Übereinstimmung mit publizierten Daten befinden.

#### 4.1.3.8 Elektrogenizität der K<sup>+</sup>-abhängigen Reaktionsschritte

Die maximalen Fluoreszenzwerte werden durch den Sättigungswert der Boltzmann-Funktion bei 0 mM [K<sup>+</sup>] oder den basalen Fluoreszenzwert bei 30 mM [K<sup>+</sup>] repräsentiert. Sättigende K<sup>+</sup>-Konzentrationen (30 mM) führten zur Aufhebung spannungssprunginduzierter Fluoreszenzänderungen (Abbildung 1.16 f) – die Besetzung in E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zuständen kann im experimentell zugänglichen Spannungsbereich durch Spannungssprünge nicht länger verschoben werden. Im Vergleich zu Inhibitorsexperimenten ist die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase unter diesen Bedingungen jedoch vollständig aktiv. Die einfachste Erklärung für die verringerte Steigung der ΔF-U-Kurve in Gegenwart von K<sup>+</sup> (z.B. z<sub>q</sub> der Boltzmann-Verteilung: ~ 0.45 bei 1 mM K<sup>+</sup>) ist die Aktivierung der K<sup>+</sup>-abhängigen Reaktionsschritte, die zu einem Einwärtstransport von ~ 0.25 Elementarladungen pro Pumpzyklus führen, was in Einklang mit dem beobachteten z<sub>q</sub> von ~ 0.7 für die Na<sup>+</sup>-abhängigen Reaktionsschritte und mit der beobachteten geringeren Elektrogenizität der K<sup>+</sup>-abhängigen Reaktionsschritte [21,92,106] steht. Dieser Wert von z<sub>q</sub> ~ 0.25 kann als eine untere Grenze angesehen werden, da bei höheren K<sup>+</sup>-Konzentrationen als 3 mM die Steigung möglicherweise zusätzlich abgeflacht, aber so zu positiven Potentialen verschoben ist, dass kein z<sub>q</sub> bestimmt werden kann.

#### 4.1.3.9 Ortsspezifische Zuordnung der Fluoreszenzänderungen

Die Quantenausbeute des Rhodamin-Fluorophors ist außerordentlich sensitiv auf Hydrophobizitätsänderungen seiner Umgebung [56,57]. Die Annahme, dass der Fluorophor nur zwischen den zwei Hauptkonformationen E<sub>1</sub> (hohe Fluoreszenz) und E<sub>2</sub> (niedrige Fluoreszenz) unterscheiden kann, impliziert, dass er sich in E<sub>1</sub>-Konformationen in einer hydrophoben Umgebung befindet, während ihn E<sub>2</sub>-Zustände in eine stärker hydrophile, fluoreszenzlöschende Position bringen. Dies kann entweder als eine relative Bewegung des extrazellulären Endes der Transmembranhelix TM5 – in deren direkter Verlängerung die Aminosäureposition 790 liegt – in Bezug auf die anderen Membranhelices und/oder auf eine Öffnung eines extrazellulären Zugangskanals verstanden werden, der die Bindung und Freisetzung von Kationen erleichtert. Diese Interpretation wird auch durch die kürzlich publizierte E<sub>2</sub>-Struktur der SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase unterstützt [58]. Diese Ionenpumpe weist eine der α-Untereinheit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase homologe Sekundärstruktur auf. Die beobachtete Bewegung des extrazellulären Endes von Transmembranhelix TM5 der SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase relativ zu der Membranoberfläche beträgt ungefähr 5 Å, was im Vergleich mit den großen Bewegungen der intrazellulären Domänen sehr wenig erscheint (Abbildung 1.23). Solch geringe Änderungen allerdings können ausreichen, um die Umgebung des Fluoreszenzfarbstoffs drastisch zu verändern, wie am Shaker K<sup>+</sup>-Kanal gezeigt wurde [56]. Da für die SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase die homologe Aminosäure zu P778 der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in Transmembranhelix TM5 als feststehender Referenzpunkt bezüglich der Plasmamembran festgelegt wurde, sind größere Bewegungen von N790C relativ zur Membranoberfläche allerdings auch nicht zu erwarten. Die relative Bewegung der Transmembranhelix TM5 der SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase bezüglich der anderen Transmembranhelices ist demzufolge weitaus größer. Die Tatsache, dass nur eine einzige Aminosäure in der extrazellulären TM5-TM6-Schleife als Reporterposition dienen konnte, deutet auf die sehr eingeschränkten räumlichen Bedingungen innerhalb dieser Region hin, die für die Bindung der Kationen entscheidender Bedeutung ist. Das unterstreichen auch die veränderten Kationen-Bindungseigenschaften bzw. die veränderten kinetischen Parameter der Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C), die auftreten, obwohl N790 nicht direkt Bestandteil der Kationen-Bindungstasche ist. Die Struktur der SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase sollte jedoch für die Diskussion der Resultate dieser Arbeit nicht überbewertet

werden, denn die publizierte E<sub>2</sub>-Struktur repräsentiert ein dephosphoryliertes Enzym, welches zudem durch den Inhibitor der SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase Thapsigargin blockiert wurde. Dieser Wirkstoff bindet in der Kationbindungstasche und würde so etwaige Konformationsänderungen verhindern [58,107]. Unabhängig davon, dass die E<sub>2</sub>-Struktur der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des sarcoplasmatischen Retikulums *a priori* schon anders aussehen könnte als die E<sub>2</sub>P-Struktur der α-Untereinheit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, besitzt die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zudem noch eine β-Untereinheit, die einen nicht vorhersagbare strukturellen Einfluss insbesondere an der extrazellulären Oberfläche haben könnte.

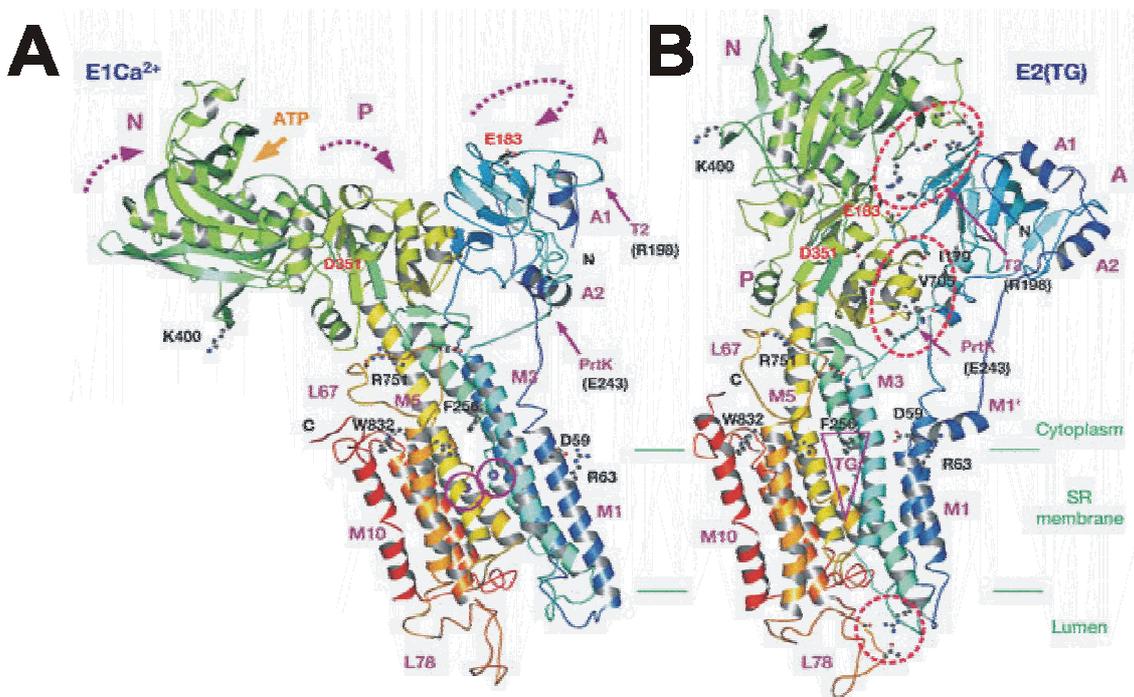


Abbildung 1.23: Strukturmodell der SERCA-Ca<sup>2+</sup>-ATPase in der Form mit gebundenem Ca<sup>2+</sup> (E<sub>1</sub>Ca<sup>2+</sup>) und in der in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> mit gebundenem Thapsigargin (E<sub>2</sub>(TG)). (A) Rot eingekreist sind die gebundenen Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Große Pfeile bedeuten Bewegung der cytoplasmatischen Domänen während der Reaktion E<sub>1</sub>Ca<sup>2+</sup> → E<sub>2</sub>(TG). (B) Rot eingekreist sind zusätzliche Wasserstoffbrücken. Modifiziert nach [58].

#### 4.1.4 Mutation der Kationen-Bindungstasche am Beispiel

##### NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A)

Die Zuweisung der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten zu den zwei unterschiedlichen Konformationen der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase E<sub>1</sub>(P) und E<sub>2</sub>(P) erlaubt eine direkte Untersuchung der Verteilung

in diesen Intermediaten an aktiv pumpender Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, und zwar nicht nur unter Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austauschbedingungen, sondern auch unter Pumpbedingungen. Die Besetzung in den Konformationen ist in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Mutanten aufgrund veränderter kinetischer Parameter des Reaktionszyklus häufig stark verändert [87,89-92,99,100]. Die Besetzung der Zustände ist allerdings bisher an aktivem Protein nicht untersuchbar. Die in der vorgelegten Arbeit etablierte Methode erlaubt es nicht nur die Bestimmung der Besetzung der Zustände sondern auch die Dynamik der Zustandsgleichgewichte zu untersuchen. Daneben erlaubt sie Untersuchungen zur Verteilung der Konformationzustände auch an Mutanten, für die diese Parameter extrem verändert sind.

#### 4.1.4.1 Einfluss der Mutation N790C auf die Kationen-Bindungsaffinitäten

Eine Analyse der elektrophysiologischen Experimente ergibt, dass die Verlangsamung der Reaktion  $E_1P \rightarrow E_2P$  durch Einfügen der Mutation N790C zugleich die Ursache der erhöhten K<sup>+</sup>-Affinität der Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) im Vergleich zu NaK<sub>WT</sub> ist. Durch die Verlangsamung der  $E_1P$ - $E_2P$ -Konformationsänderung ist bei allen K<sup>+</sup>-Konzentrationen dieser Reaktionsschritt viel stärker an der Geschwindigkeitsbegrenzung des Reaktionszyklus beteiligt. Ist die  $E_1P$ - $E_2P$ -Konformationsänderung verlangsamt, führt eine Erhöhung der K<sup>+</sup>-Konzentration und somit eine Beschleunigung der Reaktion  $E_2(P) \rightarrow E_1$  schon bei kleineren K<sup>+</sup>-Konzentrationen nicht mehr zu einer Erhöhung der Wechselzahl der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Dies zieht einen reduzierten  $K_M$ -Wert für K<sup>+</sup> nach sich, wie für die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) im Vergleich zu NaK<sub>zero</sub> zu beobachten war (vergleiche Abbildung 1.1 C und 1.10 B). Der  $K_M$ -Wert beträgt bei -40 mV ca. 0.6 mM für die Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) im Vergleich zu ca. 1.4 mM für NaK<sub>zero</sub>. Die Fluoreszenzexperimente in Gegenwart von K<sup>+</sup> zeigen eine erhöhte Affinität für K<sup>+</sup> insofern, als schon bei 1 mM K<sup>+</sup> und -40 mV mehr als 50 % des Fluoreszenzanstiegs erfolgt waren. Dies entspricht einem apparenten  $K_M$ -Wert bei diesen Bedingungen von ca. 0.8 mM (Abbildung 1.16 und 1.17).

#### 4.1.4.2 Einfluss der Mutation E779A auf die Kationen-Bindungsaffinitäten

Durch Einfügen der Mutation E779A ergibt sich sowohl für die ansonsten unmodifizierte Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase der Ratte (NaK<sub>rat</sub>) als auch für das Konstrukt NaK<sub>zero</sub>(N790C) der Schafs-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase eine

Beschleunigung der Relaxation des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Fließgleichgewichts (Daten nicht gezeigt bzw. Abbildung 1.18 A). Diese Beschleunigung führt zu einer verringerten K<sup>+</sup>-Affinität, wie dies an der Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A) im Vergleich zu NaK<sub>zero</sub>(N790C) sowohl elektrisch wie fluorimetrisch (Abbildung 1.19) gezeigt werden konnte. Eine um mindestens den Faktor 5 verringerte K<sup>+</sup>-Affinität wurde auch für die Mutanten NaK<sub>rat</sub>(E779A) im Vergleich zu NaK<sub>rat</sub> gefunden. Dort ändert sich der K<sub>M</sub> von ca. 1.2 mM zu ca. 8 mM (Daten nicht gezeigt). Diese Verringerung der K<sup>+</sup>-Affinität entspricht auch ungefähr der in früheren Arbeiten berichteten (Faktor 6.6 [100] bzw. Faktor 3 – 4 [108]). Der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Übergang des Konstrukts NaK<sub>zero</sub>(N790C) ist so stark verlangsamt (im Vergleich zu NaK<sub>WT</sub>), dass sich eine Beschleunigung der E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub>-Konformationsänderung schon bei sehr niedrigen K<sup>+</sup>-Konzentrationen nicht mehr beschleunigend für den gesamten Pumpzyklus auswirkt. Im Gegensatz zu NaK<sub>zero</sub>(N790C) verhalten sich E779A-Mutanten umgekehrt. Bei diesen trägt durch die Beschleunigung des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Übergangs dieser erst bei viel höheren K<sup>+</sup>-Konzentrationen zur Geschwindigkeitsbegrenzung bei. Selbst bei hohen Konzentrationen führen Veränderungen in der K<sup>+</sup>-Konzentration daher noch zu einer Änderung der Wechselzahl. Erst bei sehr hohen K<sup>+</sup>-Konzentration wird die Reaktion E<sub>2</sub> → E<sub>1</sub> so sehr beschleunigt, dass der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Übergang geschwindigkeitsbegrenzend wird und damit eine Sättigung der Wechselzahl erreicht wird. Dies erklärt den erhöhten K<sub>M</sub>-Wert für K<sup>+</sup>.

Ähnliche Ergebnisse (schnelle E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Relaxation, Aktivität unter Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Austausch-Bedingungen) durch die Mutation E779A lieferten auch Experimente, die in Zusammenarbeit mit Yi-Kang Hu und Jack H. Kaplan von der OHSU (Oregon Health Sciences University, Portland, OR, USA) an künstlichen Lipidmembranen mit Kationen-Bindungstasche-Mutanten (mutierte Aminosäuren 775 und 779) der Ouabain-sensitiven Schafs-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt) [94].

#### 4.1.4.3 Einfluss der Mutation E779A auf die Verteilung in E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zuständen

Aus der Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenzänderung des Konstrukts NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A) läßt sich die Besetzung der E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zustände direkt ablesen. Ein Vergleich der Parameter der Boltzmann-Kurven, die an die Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenzänderung der Konstrukte NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A) und NaK<sub>zero</sub>(N790C) angepasst wurden, offenbart bei 0 mM [K<sup>+</sup>] nur kleine

Abweichungen zwischen beiden (vergleiche Abbildung 1.12 und 1.19). Für NaK<sub>zero</sub>(N790C) ergibt sich ein  $U_{1/2}$  von ca. -110 mV und ein  $z_q$  von ca. 0.7, für NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A) ein  $U_{1/2}$  von ca. -95 mV und ein  $z_q$  von ca. 0.7. Die Amplitude der Boltzmann-Funktion der Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C) liegt jedoch um ein Vielfaches höher als die der Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C,E779A). Die spannungsabhängige Verteilung in den E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zuständen bei 0 mM [K<sup>+</sup>] ist also in beiden Konstrukten sehr ähnlich, jedoch können nur sehr wenige Pumpen mit der Mutation E779A durch Spannungssprünge in einen anderen Zustand überführt werden, wie aus der kleinen Amplitude der Fluoreszenzänderung geschlossen werden kann. Dies beruht auf einem verminderten Anteil an phosphoryliertem, spannungsabhängigem Enzym und ist durch einen beschleunigten elektrogenen Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austausch in der Mutante erklärbar. Selbst ohne extrazelluläres K<sup>+</sup> findet Dephosphorylierung statt, und ein großer Teil der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Moleküle mit der Mutation E779A liegt im E<sub>2</sub>-Zustand vor, ist nicht phosphoryliert und dadurch weniger spannungsabhängig. Diese Verhältnisse sind mit denen nicht-sättigender K<sup>+</sup>-Konzentrationen bei NaK<sub>zero</sub>(N790C) vergleichbar.

Bei 30 mM [K<sup>+</sup>] zeigt sich ein gravierender Einfluß der Mutation E779A auf die Spannungsabhängigkeit der Verteilung in den E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zuständen. Im Vergleich zu NaK<sub>zero</sub>(N790C) ergibt sich zwar keine verminderte Steigung der Boltzmann-Kurve, dafür aber eine vergrößerte Amplitude der spannungssprunginduzierten Fluoreszenzänderung (im erschließbaren Spannungsbereich). Dies ist im Vergleich zu den Verhältnissen bei 0 mM [K<sup>+</sup>] Ausdruck einer zunehmenden Anreicherung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Moleküle in den phosphorylierten und spannungsabhängigen Zuständen E<sub>1</sub>P und E<sub>2</sub>P. Eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens ist die Anreicherung in E<sub>1</sub>P auf Grundlage einer beschleunigten Reaktion E<sub>2</sub> → E<sub>1</sub> nach Zugabe von K<sup>+</sup>. Dieses Verhalten läßt auch die beobachtete insgesamt erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zu K<sup>+</sup>-freien Bedingungen erklären. Die Fluoreszenzmessungen unterstreichen damit den Einfluss der Mutationen, die die Kationen-Bindungsaffinitäten verändern, auch auf die spannungsabhängige Verteilung zwischen E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zuständen. Die ortsspezifische Voltage-Clamp-Fluorometrie erlaubt damit, Mutanten der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase sehr direkt im Hinblick auf die Verteilung in den E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zuständen zu untersuchen und durch die zeitgleiche Spannungsklemme ihre Spannungsabhängigkeit zu ermitteln.

#### 4.1.5 Zusammenfassung

Durch Kombination ortsspezifischer Fluoreszenzmarkierung mit der Methode der Voltage-Clamp-Fluorometrie ist es erstmals möglich, zeitaufgelöst Konformationsänderungen der aktiven Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase direkt, ortsspezifisch und *in situ* zu beobachten. Die Methode ermöglicht es, die Konformationsänderungen während des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsübergangs der Bewegung von Transmembranhelix TM5 zuzuordnen. Diese ortsspezifische Zuordnung zu einem einzelnen Reaktionsschritt des Reaktionszyklus gelingt durch die Erstellung eines molekularen Sensorkomplexes. Dieser besteht aus einer Cystein-Substitutionsmutation in Aminosäureposition 790 am extrazellulären Ende von Transmembranhelix TM5 und einem über eine sulfhydrylspezifische Bindung an dieses Cystein gekoppelten Reporterfluorophor. Im E<sub>1</sub>P-Zustand befindet sich der Fluorophor in einer hydrophoben Umgebung, während er im E<sub>2</sub>P-Zustand in einem fluoreszenzlöschenden, wässrigen Medium vorliegt. Eine einfache Erklärung für eine solche Veränderung in der Umgebung des Fluorophors könnte die Bewegung von Transmembranhelix TM5 relativ zu anderen Transmembranhelices sein – simultan einhergehend mit einer Öffnung der Kationen-Bindungsstelle zur extrazellulären Seite. Ein vereinfachtes Schema dieser Erklärung ist in Abbildung 1.24 dargestellt.

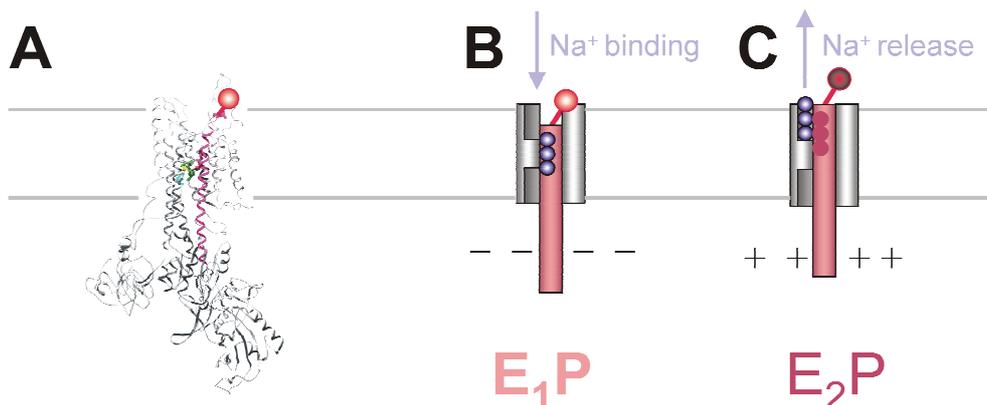


Abbildung 1.24: Veranschaulichendes Modell für die Konformationsänderungen durch Bewegung der Transmembranhelix TM5 (rot), die mit dem E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsübergang einhergehen und dadurch den molekularen Sensorkomplex unterschiedlich hydrophoben Umgebungen aussetzen. (A) Modell der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase aus Abbildung 1.3 in der E<sub>1</sub>-Konformation. (B) Modell der E<sub>1</sub>P-Konformation: Der Fluorophor ist vom Protein eingeschlossen und befindet sich daher in einer die Fluoreszenz wenig vermindernenden hydrophoben Umgebung. Gleichzeitig sind auch die Kationen (Na<sup>+</sup>) in der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase eingeschlossen und können weder an das extrazelluläre noch an das intrazelluläre Medium abgegeben werden. (C) Modell der E<sub>2</sub>P-Konformation: Der Fluorophor ist dem extrazellulären Medium ausgesetzt und befindet sich daher in einer die Fluoreszenz vermindernenden hydrophilen Umgebung. Gleichzeitig sind auch die Kationen-Bindungsstellen der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zum Extrazellulärraum geöffnet, und Kationen können gebunden oder abgegeben werden.

Aus der Steigung der  $\Delta F$ -U-Kurve und dem Verlust der Spannungsabhängigkeit des Fluoreszenzsignals nach dem Ersetzen von extrazellulärem Na<sup>+</sup> gegen TEA oder NMG ergibt sich, dass die Bindung/Freisetzung des extrazellulären Na<sup>+</sup> in der E<sub>2</sub>P-Konformation für die Spannungsabhängigkeit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase verantwortlich ist. Dies ist in Übereinstimmung damit, dass diese Reaktion den hauptelektrogenen Teil des Transportzyklus darstellt. Aus der Veränderung der Steigung der  $\Delta F$ -U-Kurve durch Zugabe von K<sup>+</sup> und der Glockenform der I-U-Kennlinien wird geschlossen, dass die K<sup>+</sup>-abhängigen Reaktionsschritte einen deutlichen elektrogenen Anteil zum Transportzyklus beitragen.

Im Gegensatz zu rein elektrophysiologischen Methoden erlaubt Voltage-Clamp-Fluorometrie kombiniert mit ortsspezifischer Fluoreszenzmarkierung die Bestimmung der Verteilung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in den jeweiligen E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zuständen unter stationären Transportbedingungen. Extrazelluläres K<sup>+</sup> stimuliert die Dephosphorylierung und damit die Entvölkerung der E<sub>2</sub>P Konformation, und das Enzym folgt dem K<sup>+</sup>-Transportzweig. Steigende Konzentrationen von K<sup>+</sup> führen zu sättigender Anreicherung von E<sub>1</sub>-Zuständen, und die Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenz geht im experimentell zu erschließenden Spannungsbereich vollständig verloren.

Die Möglichkeit, die Voltage-Clamp-Fluorometrie an einem heterologen Expressionssystem wie Oozyten von *Xenopus laevis* anzuwenden, ermöglicht es erstmalig, Mutanten der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (insbesondere mit Mutationen in der Kationen-Bindungsstelle) direkt auf ihre Konformationsgleichgewichte hin zu untersuchen und damit die Determinanten der Spannungsabhängigkeit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase weiter zu ergründen.

Die hohe Homologie im Bereich Transmembranhelix TM5, der darauf folgenden extrazellulären Schleife und der Kationen-Bindungstasche innerhalb der P-typ-ATPasen lässt vermuten, dass ein Reporterfluorophor in einer homologen Position die Untersuchung weiterer Enzyme dieser Proteinklasse zuließe. Voltage-Clamp-Fluorometrie kombiniert mit ortsspezifischer Fluoreszenzmarkierung könnte damit neue Ansätze für die Untersuchung von P-typ-ATPasen liefern, die keinen elektrogenen Nettotransport durchführen, wie z.B. die gastrische H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

## 4.2 Voltage-Clamp-Fluorometrie mit dem potentialsensitiven

### Farbstoff RH421

#### 4.2.1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Voltage-Clamp-Fluorometrie an *Xenopus*-Oozyten Messungen mit dem potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoff RH421 zeitgleich mit elektrischen Messungen an heterolog – „*in vivo*“ – exprimierter Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zulässt. Erstmals konnten durch Spannungssprung-Experimente RH421-Fluoreszenzsignale und Pumpströme verglichen werden. Die Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit vergleichenden elektrischen Messungen an künstlichen Lipidmembranen (BLMs) und spektroskopischen Messungen mit schnellen Mischmethoden (*stopped-flow*) [54,63], dass sowohl die Fluoreszenzänderungen des Farbstoffs RH421 als auch die elektrischen Signale demselben Reaktionsschritt im Transportzyklus der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zugeordnet werden können, nämlich der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung bzw. der damit einhergehenden Ladungsverschiebung.

#### 4.2.2 Einfluss der Bindung von RH421 auf die kinetischen Parameter von

##### NaK<sub>WT</sub> und der Cystein-Mutante NaK<sub>zero</sub>(N790C)

An unmarkierter Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase riefen Spannungssprünge unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen transiente Ströme hervor, die auf den elektrogenen Na<sup>+</sup>-Bindungsschritten beruhen, die direkt an die E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung gekoppelt sind (vergleiche Abbildung 1.15 A und 1.16 B). Die Relaxation der transienten Ströme des Konstrukts NaK<sub>WT</sub> erfolgte dabei ungefähr viermal schneller als die des Konstrukts NaK<sub>zero</sub>(N790C) (20 s<sup>-1</sup> im Vergleich mit 80 s<sup>-1</sup> bei 0 mV; vergleiche Abbildung 1.15 A und 1.16 B). Weder die apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten noch die Spannungsabhängigkeit der transienten Ströme zeigten nach Zugabe von RH421 eine Veränderung. Der Fluorophor RH421 lagert sich unter den experimentellen Bedingungen der vorliegenden Arbeit in die Plasmamembran ein, ohne die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zu inhibieren. Diese Beobachtung entspricht Beobachtungen aus Messungen an Membranfragmenten, wie sie für niedrige RH421-Konzentrationen gemacht wurden [62,71]. Diese Feststellung ist insofern wichtig, als für hohe Konzentrationen an

RH421 eine Inhibition der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase beobachtet werden konnte [71]. In der genannten Publikation [71] ergab sich bei elektrischen (BLM) und fluoreszenzspektroskopischen (*stopped-flow*) Messungen an nativen Membranpräparationen eine Verlangsamung der E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung nach Zugabe hoher Konzentrationen von RH421 von ca. 180 s<sup>-1</sup> auf unter 50 s<sup>-1</sup> [54].

### 4.2.3 Vergleich der Kinetiken der Relaxation der transienten Ströme und Fluoreszenzänderung von RH421

Die reziproken Zeitkonstanten ( $1/\tau$ ) der Fluoreszenzantwort entsprechen sowohl für NaK<sub>WT</sub>, als auch für das Konstrukt NaK<sub>zero</sub>(N790C) denen der transienten Ströme. Die apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Relaxation sowohl für das Fluoreszenzsignal als auch für die transienten Ströme für NaK<sub>WT</sub> betragen bei 21 °C und 0 mV ungefähr 80 s<sup>-1</sup> und waren nicht signifikant unterschiedlich. Dieser Wert ist übereinstimmend mit den Ergebnissen einer Vielzahl früherer Publikationen [19-25,54,62,63]. Publikationen, die auf elektrophysiologische Experimente an unter Spannungsklemme-Experimenten untersuchter Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zurückgehen, geben apparente Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für NaK<sub>WT</sub> von 50 – 200 s<sup>-1</sup> bei 0 mV [19,21,22,25,88] an. Elektrische Messungen an BLMs oder *stopped-flow*-Untersuchungen ergeben Werte für die E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationsänderung von 70 – 300 s<sup>-1</sup> [23,24,54,62,63,65,71,94,109,110]. Derartig hohe Werte finden sich in der vorliegenden Arbeit sowohl in elektrischen als auch in fluorimetrischen Messungen wieder. Die Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu früheren Messungen, in denen vergleichsweise niedrige reziproke Zerfallszeitkonstanten für die E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Relaxation von 20 s<sup>-1</sup> [20,72,102,111] gefunden wurden. Die Diskrepanz zu den angeführten Publikationen beruht auf unterschiedlicher Zuordnung der Exponentialfunktionen, mit denen die sich ergebenden transienten Ströme (BLM-Experimente) und Fluoreszenzänderungen (*stopped-flow*-Experimente) angepasst werden können. In einer der früheren Arbeiten mit Spannungsklemme-Methoden liegen die reziproken Zerfallszeitkonstanten zwar auch in vergleichbarer Größe, sind jedoch bei 35 °C

aufgezeichnet [20]. Bei dieser Temperatur wären nach neueren Publikationen derselben Autoren [25,112,113] jedoch viel höhere reziproke Zerfallszeitkonstanten zu erwarten.

#### 4.2.4 Fluorimetrische Detektion der Verteilung in E<sub>1</sub>- und E<sub>2</sub>-Zuständen

Im Unterschied zu dem Farbstoff TMRM zeigt der Farbstoff RH421 auch Fluoreszenzänderungen, die direkt vom angelegten Membranpotential abhängig sind (Abbildung 1.19). Nach Subtraktion dieses Hintergrundsignals ergeben sich Fluoreszenzsignale, die der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zugeordnet werden können. Die stationären Anteile dieser Fluoreszenzwerte spiegeln direkt die Verteilung in den E<sub>1</sub>(P)- und E<sub>2</sub>(P)-Konformationen wider (Abbildung 1.20). Die Spannungsabhängigkeiten der transportierten Ladung während des transienten Stroms (Q-U-Kurve) folgte für NaK<sub>WT</sub> einer Boltzmann-Verteilung, deren Parameter gut mit publizierten Werten übereinstimmen, während die Q-V-Kurve für das Konstrukt NaK<sub>zero</sub>(N790C) zu negativeren Potentialen verschoben war (vergleiche Abbildung 1.2 C und 1.12 B). Dieses Verhalten wird durch die Fluoreszenzwerte direkt wiedergegeben (vergleiche Abbildung 1.21 D und 1.22 D).

#### 4.2.5 Zusammenfassung

Die Methode der Voltage-Clamp-Fluorometrie kombiniert mit dem potentialsensitiven Farbstoff RH421 erlaubt eine Detektion der Konformationsänderung während des E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Übergangs in ähnlicher Weise wie die Messungen mit TMRM. Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, direkt das Konstrukt NaK<sub>WT</sub> untersuchen zu können. Ein Nachteil der Voltage-Clamp-Fluorometrie mit RH421 an der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ist die Notwendigkeit den Beitrag der endogenen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase zum Fluoreszenzsignal hemmen zu müssen, während dieser Anteil bei TMRM markierten Zellen *a priori* nicht zur Fluoreszenzänderung beiträgt. Weiterhin kann mit RH421 keine Aussage über die an der Konformationsänderung beteiligte Proteinregion getroffen werden.

Da gezeigt werden konnte, dass keine Hemmung durch den Farbstoff auftrat, entsprechen die Relaxationszeiten der Fluoreszenzsignale exakt denen der Ströme. Eine Bestimmung des stationären Fluoreszenzwerts bei einem vorgegebenen Potential ermöglicht die direkte Bestimmung der

Verteilung in den E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>-Zuständen. Dies gilt insbesondere für Spannungssprung-Experimente. Problematisch für eine Auswertung der stationären Fluoreszenzen erweist sich zudem die Überlagerung der membranpotentialinduzierten Fluoreszenzänderung mit den spezifischen proteinbasierten Änderungen. Die Bestimmung der stationären Fluoreszenzwerte wird dabei durch das ausgeprägte Bleichen des Farbstoffs und (insbesondere in Lösungswechsel-Experimenten) durch die Reversibilität seines Einbaus in die Plasmamembran zusätzlich erschwert.





## **Retinalproteine**

# 1 Einleitung

Retinalproteine sind nach dem Chromophor Retinal benannt. Dieser ist in allen Retinalproteinen über eine Schiffbasen-Bindung kovalent an ein Lysin des Proteinerückgrats gebunden und vermittelt die primäre Absorption eines Photons. Damit wird im Protein eine Reaktionskaskade angeworfen, die entweder Ionen-transport oder Signaltransduktion ermöglicht. Man unterscheidet bei den Retinalproteinen lichtgetriebene Ionenpumpen wie Bakteriorhodopsin [114], lichtgesteuerte Ionenkanäle wie Channelrhodopsin [115] und sensorische Rhodopsine [116], die als primäre Photorezeptoren G-Protein gekoppelter Rezeptorsysteme fungieren. Die Gruppe der archaebakteriellen Retinalproteine – und ihrer kürzlich entdeckten pro- und eukaryotischen Homologen – unterscheidet sich dabei grundsätzlich von den visuellen Rhodopsinen (Reviews archaebakterieller Retinalproteine: [117,118]).

## 1.1 Bakteriorhodopsin

Bakteriorhodopsin (BR) aus dem Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* ist eine lichtgetriebene Protonenpumpe und generiert einen einwärtsgerichteten Protonengradienten. Damit wird die Plasmamembran mit einem elektrochemischen Potential von bis zu  $-280$  mV [119] energetisiert, welches für sekundär aktive Transportprozesse und ATP-Synthese genutzt werden kann.

### 1.1.1 Historie

1967 beschrieben Stoeckenius und Rowen die Isolation einer purpurfarbenen Membranfraktion aus *Halobacterium salinarum*, einem salzliebenden Archaeobakterium, das in beinahe gesättigten Salzseen lebt [120]. Kurz darauf konnten Oesterhelt und Stoeckenius zeigen, dass die Purpurmembran ihre charakteristische Farbe durch ein kovalent gebundenes Retinalmolekül erhält. Sie nannten das Protein Bakteriorhodopsin [114] in Analogie zu ähnlichen Retinalproteinen, Rhodopsine genannt, die unter den Sehpigmenten gefunden worden waren [121,122].

Das Verständnis der Funktion der Purpurmembran wurde 1973 etabliert als Oesterhelt und Stoeckenius postulierten, dass Bakteriorhodopsin eine lichtgetriebene Protonenpumpe ist, die einen elektrochemischen transmembranären Protonengradienten generiert, den die Zelle zur ATP-Synthese (und für sekundäre Transportprozesse) nutzen kann [123]. 1974 rekonstituierten Racker und Stoeckenius Bakteriorhodopsin und mitochondrielle ATP-Synthase gemeinsam in Lipidvesikeln und erhielten so ein Modellsystem, das fähig war, mit Hilfe von Licht als Energiequelle ATP aus ADP und Phosphat zu synthetisieren [124]. Seit diesen fundamentalen Erkenntnissen dient Bakteriorhodopsin Biophysikern und -chemikern als Modellsystem für elektrogene Ionenpumpen und Photorezeptoren, da es als einfaches aktives Transportsystem eine Vielzahl von Untersuchungen einer Ionenpumpe auf molekularer Ebene ermöglicht.

### **1.1.2 Photozyklus und spektrale Eigenschaften**

Neben der proteintypischen Absorption bei 280 nm besitzt Bakteriorhodopsin ein breites Absorptionsmaximum bei 568 nm und eine vergleichsweise kleine Absorptionsbande bei 400 nm. Nach Belichtung durchläuft Bakteriorhodopsin eine zyklische Sequenz von Intermediaten, die anhand ihrer spektralen Eigenschaften definiert werden. Wenn Bakteriorhodopsin ein Photon absorbiert, wird der Chromophor Retinal in einen angeregten Zustand überführt und isomerisiert von *all-trans* zu *13-cis* Retinal. Über die anhand ihrer spektralen Eigenschaften identifizierbaren Intermediate J, K und L wird das „blauverschobene“ M-Intermediat gebildet, aus dem das Enzym über die Intermediate N und O in den Grundzustand bR zurückfällt. Die Blauverschiebung des Absorptionsmaximums des M-Intermediats basiert darauf, dass die Schiffbase in diesem Zustand deprotoniert vorliegt, nachdem sie ihr Proton an den extrazellulär gelegenen primären Protonenakzeptor D85 abgegeben hat. Schon bei der Bildung des nächsten Intermediats wird die Schiffbase vom intrazellulär gelegenen primären Protonendonator D96 reprotoniert. Die Kinetik der Übergänge wurde mittels zeitaufgelöster Spektroskopie nach Laserblitzanregung intensiv untersucht, und bereits 1975 wurde erstmalig ein Modell für den Photozyklus aufgestellt [125]. Später wurde dieses einfache Modell durch Einführung von Parallel-, Verzweigungs- und Gleichgewichtsreaktionen modifiziert (zusammenfassend in [126]).

Ein vereinfachter Reaktionszyklus mit Angabe der Zerfallszeitkonstanten und Absorptionsmaxima der Photozyklus-Intermediate ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

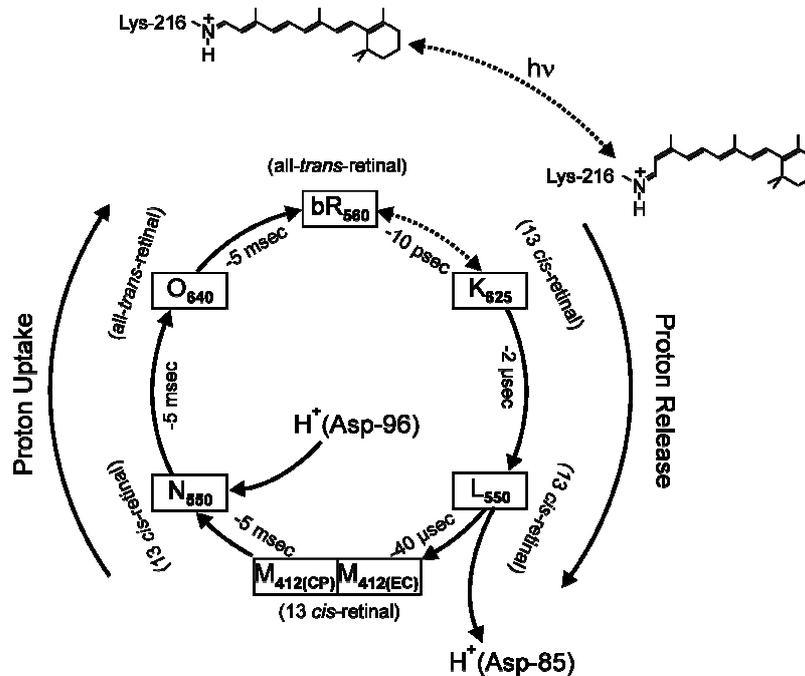


Abbildung 2.1: Vereinfachter Photozyklus von Bakteriorhodopsin. Belichtung des bR-Grundzustands führt zur Isomerisierung des Retinals (*all-trans* → *13-cis*) und Ablaufer der zyklischen Reaktion durch die Photozyklus-Intermediate K, L, M, N und O. Der Isomerisierung des Chromophors Retinal folgt während des Übergangs L → M die Abgabe des Protons der Schiffbasen-Bindung zwischen dem Retinal und K216 zum primären Protonenakzeptor D85. Nach Orientierungsänderung von extrazellulär (EC) nach cytoplasmatisch (CP) wird die Schiffbase während des Übergangs M → N durch den primären Protonendonator D96 reprotoniert. Die Konformation des Retinals (*all-trans* oder *13-cis*) ist jeweils in Klammern neben den Photozyklus-Intermediaten angegeben.

### 1.1.3 Elektrische Pumpströme

Der Photozyklus des Bakteriorhodopsins ist eng an den Transportzyklus gekoppelt (Abbildung 2.1 und 2.3). Nach Absorption eines Photons durch das Retinal erfolgt das erste signifikante elektrogene Ereignis während des Übergangs L → M. Hier wird das Proton der Schiffbasen-Bindung zwischen dem Retinal und K216 der Helix G zu D85 freigegeben, während gleichzeitig ein Proton zur extrazellulären Seite freigesetzt wird. Der  $pK_a$  der Schiffbase fällt von ursprünglich  $pK_a > 13$  auf  $pK_a < 4$  [127,128]. Noch in M erhöht sich der  $pK_a$  der Schiffbase erneut ( $pK_a > 10$ ), die Schiffbase wird für Protonen von der intrazellulären Seite zugänglich und beim Übergang nach N nimmt die Schiffbase von D96 ein intrazellulär gelegenes Proton auf. Die Relaxation zum bR-Grundzustand über das O-

Intermediat beinhaltet die Rückführung des D96 in einen protonierten Zustand durch Reprotonierung von der intrazellulären Seite und Deprotonierung von D85 zur extrazellulären Seite. Während des Transportzyklus werden folglich Protonen von innen nach außen transportiert, wodurch Bakteriorhodopsin einen auswärtsgerichteten elektrischen Strom vermittelt. Der Übergang innerhalb des M-Zustands, der zur Änderung der Zugänglichkeit für Protonen von der extrazellulären Seite zur cytoplasmatischen Seite führt, kann als molekularer Schalter (*molecular switch*) angesehen werden, der das M-Intermediat in  $M_1$  (Protonenzugänglichkeit nach extrazellulär) und in  $M_2$  (Protonenzugänglichkeit nach cytoplasmatisch) unterteilt.

Belichtung mit blauem Licht führt zu selektiver Absorption durch das M-Intermediat, Reisoomerisierung des Retinals und einer Reprotonierung der Schiffbase von der extrazellulären Seite (vom primären Protonenakzeptor D85). Daraus resultiert eine Verminderung des Pumpstroms, die als Blaulichtlöschung (*blue light quenching*) des Photostroms bekannt ist [129-132].

### 1.1.4 Struktur

1975 konnte anhand des Bakteriorhodopsins die erste dreidimensionale Struktur eines Membranproteins ansatzweise bestimmt werden [133]. Henderson und Unwin nutzten dazu die Beugungsmuster niederenergetischer Elektronenstrahlen an Purpurmembranen, in denen Bakteriorhodopsin in zweidimensionaler, quasikristalliner Form vorliegt, unter verschiedenen Kippwinkeln. Die damalige Auflösung von ungefähr 5 Å konnte durch moderne strukturanalytische Verfahren auf Auflösungen von 1.55 Å per Röntgenstreuung an dreidimensionalen Kristallen [134-137] und 2.0 Å per Elektronenstreuung an zweidimensionalen Kristallen [138] verbessert werden.

Bakteriorhodopsin besteht aus 248 Aminosäuren [139-141], die in sieben Transmembranhelices angeordnet sind. Die sieben  $\alpha$ -Helices (benannt A – G) bilden eine kanalartige Transmembranstruktur. Der Kanal wird durch die Helices B, D, F und G gebildet und ist durch den Chromophor Retinal, der über eine Schiffbasen-Bindung zu K216 in Helix G gebunden ist, in eine cytoplasmatisch (CP) und extrazellulär (EC) orientierte Kanalhälfte geteilt. Abbildung 2.2 zeigt ein

Strukturmodell von Bakteriorhodopsin im Grundzustand, in dem unter anderem der Chromophor, K216, D85 (primärer Protonenakzeptor) und D96 (primärer Protonendonor) hervorgehoben sind.

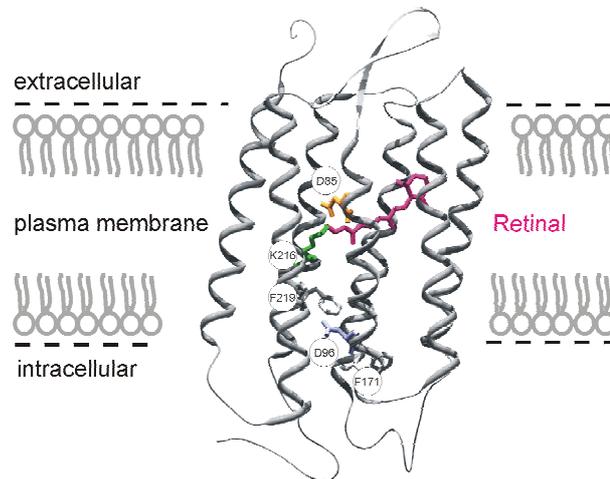


Abbildung 2.2: Dreidimensionales Strukturmodell von Bakteriorhodopsin im Grundzustand bR [135]. Der Chromophor Retinal (rot) ist über eine Schiffbasen-Bindung mit K216 (grün) der Helix G verbunden. Die Aminosäuren, die den primären Protonenakzeptor und Protonendonor stellen, sind gelb (D85) und blau (D96) dargestellt. Grau dargestellt sind die Aminosäurepositionen F171 (unten) und F219. Mutationen in der Aminosäureposition 96 führen zu einer Anreicherung des M-, Mutationen in der Aminosäureposition 171 oder 219 zu einer Anreicherung des N-Intermediats (siehe unten).

Auch für das Verständnis der Funktion des Bakteriorhodopsins als Protonenpumpe war die Ermittlung der hoch aufgelösten Molekülstruktur von fundamentaler Bedeutung. Hervorzuheben sind dabei insbesondere die Arbeiten, in denen Bakteriorhodopsin in bestimmten Photozyklus-Intermediaten arretiert wurde. Dieses Arretieren wurde entweder durch rasches Einfrieren des Wildtyp-Proteins nach Photoanregung [135] oder durch Verwendung von Mutanten, die bestimmte Photozyklus-Intermediate besonders anreichern [142-148], erreicht. Solche „*snapshot*“-Strukturen verdeutlichten, dass während der frühen Photozyklusreaktionen (bR  $\rightarrow$  L) nur kleine strukturelle Änderungen auftreten, während die Relaxation aus dem angeregten Zustand zurück zu bR mit großen strukturellen Änderungen einhergeht (vereinfacht in Abbildung 2.3) [149]. Auf der Grundlage der beobachteten Konformationsänderungen kann der vektorielle Ionentransport durch Bakteriorhodopsin folgendermaßen erklärt werden: Nach der initialen Anregung des Retinals verbleibt der cytoplasmatische Protonenzugangskanal zunächst in geschlossener Konformation. Mit der Deprotonierung der Schiffbase zur extrazellulären Seite über D85, ihrer Zugänglichkeitsänderung und

ihrer Reprotonierung von D96 gehen die aufeinanderfolgenden Öffnungsereignisse des cytoplasmatischen Protonenzugangskanals durch Bewegung von Helix (B), G und F einher und erlauben damit ein Nachströmen der Protonen von der intrazellulären Seite.

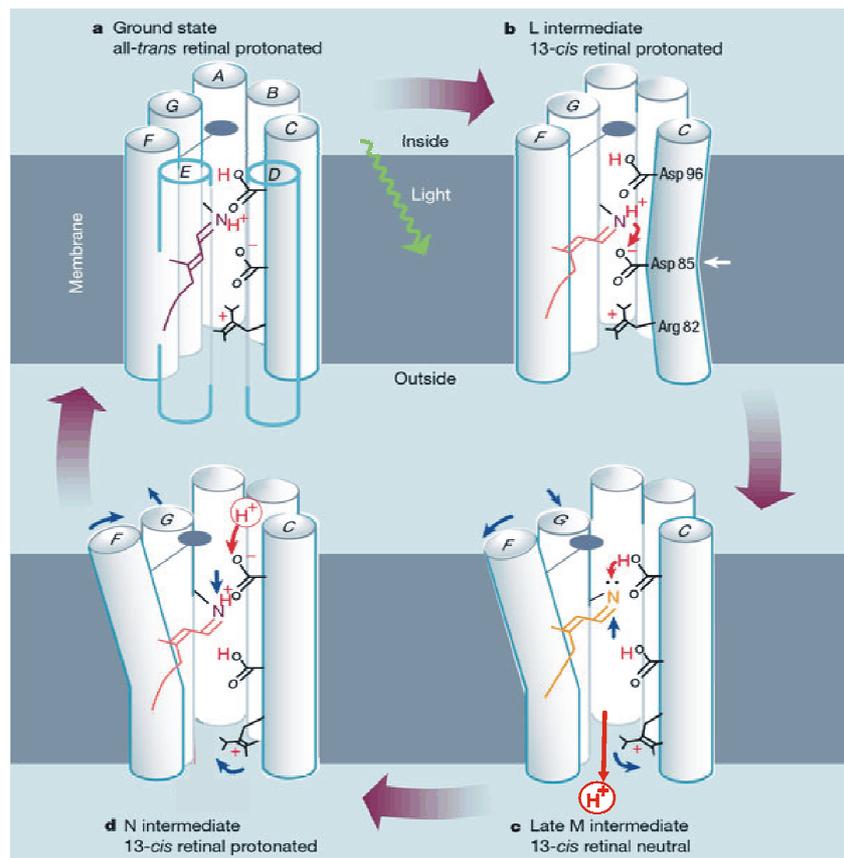


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der strukturellen, spektroskopischen und elektrischen Prozesse während des Bakteriorhodopsin-Photozyklus (adaptiert und verändert nach [149]). (A) Lichtinduzierte Isomerisierung des protonierten Retinals von *all-trans* (purpur) nach *13-cis* (pink) bedingt den Protonentransfer des Schiffbasen-Protons nach D85. Dieser Prozess wird durch eine geringfügige Bewegung von D85 im L-Intermediat (B) in Richtung des N-Atoms der Schiffbase vereinfacht. Im M-Zustand (C) streckt sich das deprotonierte Retinal (gelb) gegen Helix F und bewirkt deren Abknicken. Infolgedessen öffnet sich intrazellulär der Protonenzugangskanal, durch den D96 reprotoniert werden kann (D), nachdem es sein Proton an die Schiffbase abgegeben hat. D85 gibt sein Proton durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken-Bindungen und Wassermolekülen ins extrazelluläre Medium ab. Dabei ist Bewegung von D82 involviert. Rote Pfeile deuten Protonenbewegung, blaue Pfeile Bewegungen im Protein an. Helix D und E sind in (B) – (D) weggelassen. Die an Helix F hängende Fläche repräsentiert sperrige Seitenketten, die durch Bewegung von Helix F den intrazellulären Protonenzugangskanal versperren oder freigeben.

**1.1.5 Vektorialität**

Unter physiologischen Bedingungen transportiert Bakteriorhodopsin Protonen aus der Zelle heraus und generiert durch aktiven, gerichteten (vektoriellen) Protonentransport ein elektrisches

Transmembranpotential von bis zu  $-280$  mV [119]. Ein wichtiger Aspekt des vektoriellen Transports durch Bakteriorhodopsin ist die Regulation der Ionenpumpe durch elektrochemische Gradienten. Bisherige Studien konnten qualitativ zeigen, dass der M-Zerfall durch ein dem Protonenpumpen energetisch entgegengesetztes elektrochemisches Potential verlangsamt wird [150-155]. Quantitative Aussagen wurden jedoch durch schlecht definierte Membranpotentiale oder Vorzugsorientierung der BR-Moleküle im jeweiligen Membransystem erschwert.

Durch heterologe Expression von Bakteriorhodopsin in Oozyten von *Xenopus laevis* wurde es erstmals möglich, die Protonenpumpe unter kontrollierter Transmembranspannung [156,157] zu untersuchen. Erstaunlicherweise konnte, neben zwei Komponenten des M-Zerfalls mit Relaxationszeitkonstanten von ca. 3 und 30 ms, insbesondere bei hyperpolarisierenden elektrischen Potentialen ein langlebiges M-Intermediat mit einer Lebenszeit von ca. 300 ms identifiziert werden [156]. Dieses Intermediat stellt einen Zustand dar, in dem die Schiffbase für Protonen von der extrazellulären Seite zugänglich bleibt, von dort reprotoniert werden kann und folglich einen nichttransportierenden „Kurzschlusszyklus“ erlaubt, der eine Regulation der Ionenpumpe durch das Membranpotential ermöglicht. Eine genaue Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der verschiedenen Komponenten des M-Zerfalls ermöglichten diese ersten Experimente jedoch nicht, und alle 3 Zerfallskomponenten erschienen im Rahmen der Messgenauigkeit als spannungsunabhängig.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Abhängigkeit des stationären Photostroms und der Zerfallskomponenten von einem kontrollierten Potentialgradienten ( $\Delta\Phi$ ) und pH-Gradienten ( $\Delta\text{pH}$ ), d.h. vom elektrochemischen Membranpotential ( $\Delta\psi$ ) untersucht, um ein tieferes Verständnis der Regulation des Pumpprozesses durch  $\Delta\Phi$  und  $\Delta\text{pH}$  (zusammen  $\Delta\psi$ ) zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde Bakteriorhodopsin heterolog in Oozyten von *Xenopus laevis* und in der Zelllinie HEK-293 exprimiert und ein Versuchsaufbau verwendet, der die gleichzeitige und schnelle Einstrahlung einer stationären Lichtquelle (Blendenverschlusszeit von  $< 1$  ms) und eines gepulsten Farbstofflasers ermöglichte.

Die Regulation des Protonenpumpens durch das elektrochemische Membranpotential ( $\Delta\psi$ ) wird durch zwei Prozesse ermöglicht: A) einen verlangsamten M-Zerfall bei hyperpolarisierenden Potentialen; B) ein Anreichern eines langlebigen M-Intermediats mit Zugänglichkeit der Schiffbase von der extrazellulären Seite durch hyperpolarisierende Potentiale. Dieses zerfällt über einen nichttransportierenden „Kurzschlusszyklus“. Beide Effekte zusammen führen zu einer Anreicherung von M-Intermediaten bei hyperpolarisierenden Potentialen und erlauben eine Regulation von Bakteriorhodopsin durch das Membranpotential über einen großen dynamischen Bereich.

Mutationen im cytoplasmatischen Protonenzugangsweg zur Schiffbase haben einen großen Einfluss auf den Zerfall des M-Intermediats. Die Mutanten BR<sub>D96N</sub> und BR<sub>D96G</sub> weisen einen extrem verlangsamten M-Zerfall auf [146,147,158,159]. Ein schneller M-Zerfall und eine Anreicherung des N-Intermediats wurde vornehmlich bei den Mutanten BR<sub>F171C</sub> und BR<sub>F219L</sub> beobachtet [142-145]. Ein Konstrukt, das diese Mutationen vereinigt (die sogenannte „Tripel“-Mutante BR<sub>D96G,F171C,F219L</sub>), zeigt strukturelle Eigenschaften des zweiten Halbzyklus (offene Konformation des cytoplasmatischen Zugangswegs) schon im Grundzustand [147,148,160] und eröffnet die Frage, inwiefern strukturelle Änderungen für den vektoriellen Ionentransport notwendig sind. Alle erwähnten Mutanten haben gemein, dass sie strukturell sehr gut untersucht wurden, und dass für sie auch einige spektroskopische Daten vorliegen. Es existieren allerdings keine Untersuchungen bezüglich ihrer Funktion als elektrogene Ionenpumpen (außer für BR<sub>D96N</sub>), obwohl dies eine *conditio sine qua non* für das Verständnis der Struktur-Funktionszusammenhänge ist.

In der vorliegenden Arbeit werden daher zunächst generelle elektrophysiologische Daten der Mutanten BR<sub>D96N</sub>, BR<sub>D96G</sub>, BR<sub>F171C</sub>, BR<sub>F219L</sub> und der „Tripel“-Mutante BR<sub>D96G,F171C,F219L</sub> aus Spannungsklemme-Experimenten an *Xenopus*-Oozyten vorgestellt. Aufgrund der gemeinsamen Eigenschaft der genannten Mutanten – der veränderten Lebenszeit von M – ergaben sich neue Einblicke in die Regulation des Protonenpumpens von Bakteriorhodopsin durch die Lebensdauer und Spannungsabhängigkeit des M-Intermediats. Der Einfluss eines stabilisierten oder destabilisierten M-Intermediats auf die spannungsabhängige Regulation des Protonenpumpens wird im Hinblick auf die

Vorgänge im Wildtyp-Protein diskutiert und resultiert in einem Modell für die Erklärung effizienten, vektoriellen Transports auf der Grundlage fein abgestimmter Konformationsänderungen.

## 1.2 Proteorhodopsin

Seit der ursprünglichen Klonierung von Proteorhodopsin [161,162] ist eine große Anzahl von Homologen in Bakterien marinen Ursprungs identifiziert worden. In Anbetracht der Biomasse des Bakterioplanktons könnte diese Proteinklasse damit eine wichtige Rolle in der Energiebilanz der Biosphäre haben.

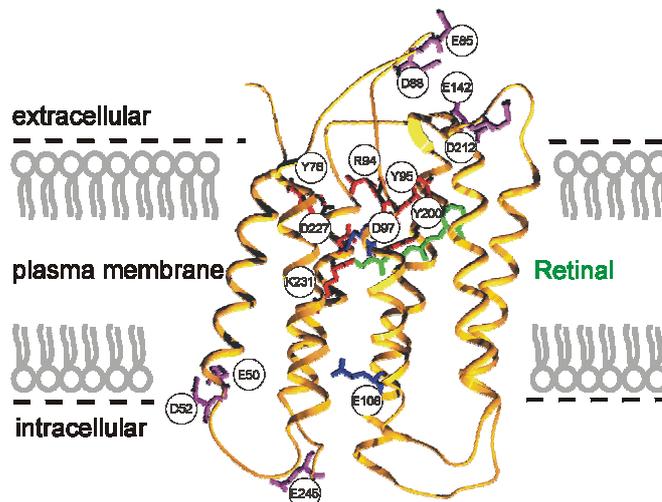


Abbildung 2.4: Molekulares Modell von Proteorhodopsin. Nach Anpassung an die *bop*-Sequenz mittels des Programms Bioedit (unter Festsetzung der konservierten Aminosäuren), wurde die erhaltene Proteorhodopsin Primärsequenz in die von Luecke et al. 1999 publizierte Struktur von BR [134] modelliert (ISM molekulardynamische Berechnung). Da in dieser Struktur die Region zwischen den Aminosäuren Y157 und E161 nicht aufgelöst ist, musste auch in der Proteorhodopsinstruktur die homologe Region ausgeschlossen werden. Die Aminosäuren des extrazellulären und intrazellulären Protonenzugangskanals sind rot, die primären Protonenakzeptor- und Protonendonator-Gruppen D97 und E108 blau und die Glutamat- oder Aspartat-Gruppen der extrazellulären oder cytoplasmatischen Oberfläche purpurfarben dargestellt.

In den bisherigen Publikationen bezüglich Proteorhodopsin wurden die Aminosäuresequenz und Teilaspekte des Photozyklus und der Protonenpumpaktivität beschrieben [161,162]. Ein Sequenzvergleich bakterieller und archaebakterieller Rhodopsine zeigte bemerkenswerte Ähnlichkeiten der Aminosäuren des Protonentransportwegs vom Cytoplasma zur extrazellulären Seite. Auffällige Unterschiede bestehen für die homologe Aminosäure des primären Protonendonors

aus BR (D96), welche in Proteorhodopsin durch E108 ersetzt ist, und für einige Carboxyl-Gruppen, die in die Protonenfreisetzung involviert sind. Jedoch liegen auch bei Proteorhodopsin eine große Anzahl von Aspartaten und Glutamaten in ähnlich günstigen Positionen wie bei BR [161]. Abbildung 2.4 zeigt ein strukturelles Modell des Proteorhodopsins, in dem die konservierten Aminosäuren des cytoplasmatischen und extrazellulären Protonenzugangswegs rot dargestellt sind.

Die publizierten Daten bezüglich Ionentransport und Photozyklus des Proteorhodopsins zeigen auffällige Ähnlichkeiten mit BR. So enthält der Photozyklus die typischen Intermediate M und O und weist, ähnlich wie BR, eine Wechselzahl von  $50 \text{ s}^{-1}$  auf. Der Zerfall aus dem O-Intermediat ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Stationäre Belichtung von Proteorhodopsin-exprimierenden *Escherichia coli* Zellen generiert ein Membranpotential von ungefähr  $-90 \text{ mV}$  und führte zur Ansäuerung des extrazellulären Mediums [161]. In zwei weiteren kürzlich erschienen Arbeiten [163,164] wurden die Ähnlichkeiten zu BR durch weitere UV/VIS- und FT-IR-spektroskopische Daten gestützt.

In der vorliegenden Arbeit wird eine detaillierte Untersuchung des spektroskopischen Verhaltens und der Protonentransport-Eigenschaften des Proteorhodopsins vorgestellt. Dabei kamen zeitaufgelöste UV/VIS- und FT-IR-spektroskopische Messungen, sowie Photostrom-Messungen an künstlichen Lipidmembranen und spannungsgeklemmten *Xenopus*-Oozyten – die Proteorhodopsin heterolog exprimierten – zur Anwendung. Die Resultate beweisen, dass Proteorhodopsin als eine pH-abhängige einwärts- oder auswärtsgerichtete Protonenpumpe fungieren kann. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu BR, für das nur unidirektionaler Transport nachgewiesen werden konnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologie

#### 2.1.1 cDNA-Konstrukte und cRNA-Synthese

##### 2.1.1.1 Bakteriorhodopsin

Bakteriorhodopsin (BR<sub>WT</sub>) wurde in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert, wie von Nagel et al. beschrieben [156]. Dazu wurde ein Promotor-freies Bakterioopsin-Gen in einen veränderten pGEM-3Z-Vektor eingesetzt, der die nicht translatierten 3'- und 5'- Regionen des  $\beta$ -Globin-Gens von *Xenopus laevis* enthielt, um die Expression in Oozyten zu erhöhen. Eine Umklonierung in den pTLN-Vektor ergab keine zusätzliche Verbesserung bei der cRNA-Synthese oder der Expression in *Xenopus*-Oozyten. Um die Expression in der Plasmamembran zusätzlich zu erhöhen, wurde das BR-Propeptid durch die ersten 105 Aminosäuren der gastrischen H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\beta$ -Untereinheit der Ratte [165] ersetzt. Die eingesetzte Region codiert für eine Transmembranhelix und eine Schleifenregion, die zwei mögliche Glykosylierungsstellen enthält, und dient somit als Membrananker. Die H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-Region wurde mittels PCR (*polymerase chain reaction*) amplifiziert und in das ursprüngliche BR<sub>WT</sub>-Konstrukt eingefügt, welches dazu mittels PCR passend verändert wurde. Das Produkt wird im Folgenden als <sub>HK</sub>BR bezeichnet. Für die Expression in HEK-293-Zellen wurde Bakteriorhodopsin als GFP-Fusionsprotein (C-terminales GFP) exprimiert. Über PCR amplifiziert und modifiziert wurden die Konstrukte BR<sub>WT</sub> und <sub>HK</sub>BR in den entsprechend vorbereiteten Vektor pEGFP-n3 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) einligiert. Das STOP-Codon der beiden Konstrukte wurde dazu durch eine *BamH* I Schnittstelle ersetzt, wodurch zwei zusätzliche Aminosäuren in das Fusionsprotein eingesetzt wurden. Die resultierenden Konstrukte werden im Folgenden als BR<sub>GFP</sub> bzw. <sub>HK</sub>BR<sub>GFP</sub> bezeichnet. BR-Punktmutationen wurden mittels des „QuickChange site-directed-mutagenesis“-Ansatzes (StrataGene, La Jolla, CA, USA) auf Basis des BR<sub>WT</sub>-Konstrukts im pTLN-Vektor generiert. cRNAs wurde mittels des SP6-„mMessage-mMachine“-cRNA-Syntheseansatzes synthetisiert (Ambion, Austin, TX, USA).

**2.1.1.2 Proteorhodopsin**

Die cDNA-Sequenz von Proteorhodopsin (249 AS) aus dem unkultivierten  $\gamma$ -Proteobakterium des SAR86 Clusters (Klon: EBAC31A08) [161] und die des NOP-I Gens (304 AS) aus *Neurospora crassa* [166] wurden der Datenbank entnommen (GeneBank Zugangsnummern AF279106 bzw. AAD45253). Anschließend wurden die entsprechenden cDNAs mittels exzessiver rekombinanter PCR *in vitro* synthetisiert. Anwendung fand dabei ein neuartiges Verfahren, das auf einer Methode basiert, die ursprünglich rekursive PCR genannt wurde [167]. Dazu wurden 13 (Proteorhodopsin) bzw. 15 (NOP-I) partiell überlappende Oligonukleotide (synthetisiert von MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) mit 74 – 80 Basenpaaren Länge so entworfen, dass sie sowohl die gesamte Basensequenz der zu erzielenden cDNA überdeckten, als auch diese mit 5'- bzw. 3'-endigen Adaptersequenzen für die Restriktionsenzyme *Nru* I und *Xho* I (Proteorhodopsin) bzw. *Pac* I und *Xho* I (NOP-I) versahen. Aufeinanderfolgende Paare von überlappenden Oligonukleotiden wurden als Matrizenstrang für eine erste Runde rekombinanter PCR-Reaktionen genutzt, wobei Amplifikationsoligonukleotide mit 15 bis 18 Basenpaaren Länge hinzugefügt wurden, um die Ausbeute an PCR-Produkten zu erhöhen. Die resultierenden PCR-Produkte von ungefähr 120 Basenpaaren Länge wurden ihrerseits als Matrizenstränge für eine zweite Runde von PCR-Reaktionen verwendet. Diese Vorgehensweise wurde solange fortgesetzt, bis ein Vollängenprodukt erreicht war, dass dann mittels *Nru* I- und *Xho* I- bzw. *Pac* I- und *Xho* I-Restriktion in den passend geschnittenen pTLN-Vektor umklontiert wurde [81]. cRNA wurde mittels des SP6-„mMessage-mMachine“-cRNA-Syntheseansatzes synthetisiert (Ambion, Austin, TX, USA).

Für anschließende Expression in *Escherichia coli* wurde die cDNA von Proteorhodopsin mittels Adapteroligonukleotiden für die Schnittstellen *Nhe* I und *Xho* I durch PCR amplifiziert und in den passend geschnittenen pET27b(+) Vektor (Novagen Inc., Madison, WI, USA umklontiert (Rolf Kalmbach; Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund). Bei diesem Vorgang wurde das STOP-Codon entfernt und C-terminal sowohl ein antigenes HSV-(*Herpes simplex* Virus-Antigen)-Tag als auch ein 6xHis-Tag angefügt.

Alle beschriebenen Konstrukte wurden entweder bei MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) oder mittels einer ABI-310 Sequenzieranlage (Applied Biosystems, CA, USA) sequenziert.

## **2.1.2 Heterologe Expression**

### **2.1.2.1 *Xenopus laevis* Oozyten**

Anästhesierten *Xenopus laevis* Weibchen wurden auf chirurgischem Weg Ovarienlappen entnommen. Das gewonnene Gewebe wurde anschließend einem Kollagenaseverdau unterzogen, um isolierte Stadium V bis VI Oozyten zu gewinnen [82]. Bei allen Retinalprotein-Konstrukten wurden jeder Oozyte 25 ng cRNA injiziert, wobei die Expression ab 15 ng zu sättigen schien. Anschließend wurden die Oozyten 4 – 6 Tage bei 18 °C in Oozyten-Ringer-Lösung (115 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7.5) unter Zugabe von 1 mg/ml Penizillin/Streptomycin und 1 µM Retinal inkubiert. Durch spontane Bindung des Retinals entstand aus Bakterioopsin Bakteriorhodopsin bzw. aus Proteopsin Proteorhodopsin.

### **2.1.2.2 HEK-293-Zellen**

Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen (*human embryonal kidney cells*) mit DNA von BR<sub>GFP</sub> bzw. <sub>HK</sub>BR<sub>GFP</sub> cDNA wurde mittels der Calciumphosphat-Methode [168] oder des „Effectene“ Transfektionsansatzes (Qiagen, Hilden, Deutschland) erreicht. Die HEK-293-Zellkultur wurde entsprechend etablierten Laborprotokollen durchgeführt (amerikanische *tissue-culture-collection*, Crl1573). Die Zellen wurden für elektrophysiologische Messungen 24 – 48 Stunden nach der Transfektion benutzt.

### **2.1.2.3 *Escherichia coli* – Proteorhodopsin Expression, Aufreinigung und Rekonstitution**

Die Expression von Proteorhodopsin in *Escherichia coli* und die nachfolgende Aufreinigung und Rekonstitution erfolgte im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Rolf Kalmbach, Igor Chizof und Martin Engelhard am MPI für molekulare Physiologie in Dortmund. Da die erhaltenen Proteoliposomen für die Transportmessungen verwendet wurden, ist ihre Herstellung der Vollständigkeit halber kurz dargestellt.

Die Expression von Proteorhodopsin in *Escherichia coli* BL21 (DE3) und die nachfolgende Aufreinigung erfolgte in Analogie zu bereits beschriebenen Prozeduren [162,169-171]. Die Aufreinigung über eine Ni-NTA-(*nickel-nitrilotriacetic acid*)-Säule ergab eine Ausbeute von ca. 2 mg Proteorhodopsin-Protein pro Liter Zellkultur. Die Reinheit der Präparation, bestimmt durch das Verhältnis der Absorption bei 280 nm/518 nm (1.7 – 2.0) und SDS-PAGE (*sodium-dodecylsulfate-polyacrylamidegel electrophoresis*), betrug 95 %. ESI-(*electrospray-ionization*)- und MALDI-TOF-(*matrix-assisted-laser-desorption/ionization-time-of-flight*)-Massenspektren ergaben zwei Maxima, die einem Volllängenprodukt (30660 Da, berechnet 30662 Da) und einem N-terminal um die Sequenz MGKLLILGSVIALPTFA verkürzten Produkt (28840 Da, berechnet 28823 Da) zugeordnet wurden. Die Rekonstitution erfolgte entweder in eine Mischung aus Dioleoylphospholipiden (Dioleoylphosphatidylcholin (65 %), Dioleoylphosphatidylethanolamin (20 %), Dioleoylphosphatidylcholin (10 %) und Cholesterin (5 % w/v)) oder in polare Lipide der Purpurmembran [170,172], wobei ein molares Protein/Lipid Verhältnis von 1:25 gewählt wurde. Präzise Informationen finden sich darüber hinaus in [173].

## **2.2 Elektrophysiologie**

### **2.2.1 Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Messungen**

#### **2.2.1.1 Bakteriorhodopsin und Proteorhodopsin**

BR- und Proteorhodopsin-induzierte Photoströme an Oozyten von *Xenopus laevis* wurden in der Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Konfiguration mit Hilfe eines GeneClamp500 Verstärkers (Axon Instruments Inc., Union City, CA, USA) gemessen [156,157]. Die Datenerfassung, die Blendenverschlusssteuerung und die Steuerung des Transmembranpotentials wurden mit der Software pCLAMP 7 über eine Digidata 1200B Schnittstelle durchgeführt (Axon Instruments Inc., Union City, CA, USA). Nach Filtern durch den 5 kHz Verstärkerfilter wurden die Signale mit einer Aufnahmezeit von 10 kHz aufgezeichnet und aus 3 – 5 Durchläufen gemittelt. Alle Ströme wurden als Differenz zwischen den Strömen errechnet, die durch ein spezifisches Spannungssprungprotokoll zuerst mit und dann ohne Belichtung aufgezeichnet wurden. Nur Experimente ohne erkennbare

Änderung der spannungsinduzierten Hintergrundleitfähigkeiten wurden zur weiteren Analyse herangezogen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Pipettenlösung für Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Experimente enthielt 3 mM KCl. Typische Pipettenwiderstände waren 0.5 – 2 M $\Omega$ . Die Badlösung in allen BR-Experimenten enthielt 100 mM NaCl, 15 mM TEACl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> und 10 mM TRIS (pH 8.5 oder 7.5) oder MES (pH 6.5 oder 5.5). Alle Messungen an Proteorhodopsin wurden in Oozyten-Ringer-Lösung (115 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7.5, oder pH 5.5 gepuffert mit 5 mM MES) durchgeführt.

## **2.2.2 Whole-Cell Patch-Clamp-Messungen**

### **2.2.2.1 Bakteriorhodopsin**

BR-induzierte Photoströme an HEK-293-Zellen wurden in der *whole-cell patch-clamp*-Konfiguration [174] mit derselben Ausstattung wie BR-induzierte Photoströme in Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Messungen an *Xenopus*-Oozyten gemessen, mit dem Unterschied, dass die Signale nach Filtern durch den 10 kHz Verstärkerfilter mit einer Aufnahmezeit von 20 kHz aufgezeichnet wurden. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Pipettenlösung für Patch-Clamp-Experimente enthielt 120 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM TEACl, 10 mM EGTA und 10 mM HEPES und wurde auf pH 7.5 justiert. Typische Pipettenwiderstände waren 2 – 4 M $\Omega$ . Die Badlösung enthielt 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glukose und 10 mM TRIS (pH 8.5 oder 7.5) oder MES (pH 6.5).

## **2.2.3 Photoströme an künstlichen Lipidmembranen**

### **2.2.3.1 Proteorhodopsin**

Optisch schwarze künstliche Lipidmembranen – BLMs (*black lipid membranes*) – mit einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup> wurden über ein Loch zwischen zwei Kompartimenten einer Teflonküvette gezogen [23,110,154,175,176]. Diese waren mit einer Elektrolyt-Lösung (100 mM NaCl oder 100 mM Na-Glukonat, 20 mM HEPES, anfangs pH 7) gefüllt. Die membranbildenden Lösungen bestanden aus 1.5 % (w/v) Diphytanoyl-Phosphatidylcholin (Avanti Biochemicals, Birmingham, AL, USA) und

0.025 % (w/v) Octadecylamin (Riedel-de-Hahn, Hannover, Deutschland) in n-Decan und bildeten eine Membran mit positiver Oberflächenladung. Proteorhodopsin-enhaltende Proteoliposomen wurden dem einer Quecksilberdampflampe zugewandten Kompartiment zugefügt (Osram HBO103W), welche zur Belichtung der Probe diente. Das Licht wurde durch einen Breitband-Interferenz-Filter gefiltert (K55:  $\lambda = 550 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$ , „gelbes Licht“; K40:  $\lambda = 400 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$  „blaues Licht“; Energiedichte  $\sim 4 \text{ W/cm}^2$ ). Die Belichtung wurde durch eine Uniblitz LS6ZM2 Verschlussblende (Vincent Associates, Rochester, NY, USA) mit einer Öffnungszeit von  $< 1 \text{ ms}$  unterbrochen. Aus der anderen Richtung wurde die Membran mit einem gepulsten Farbstofflaser (LPX105MC, Lambda Physik, Göttingen, Deutschland) belichtet. Der Farbstofflaser war mit den Farbstoffen Coumarin 307 ( $\lambda = 508 \text{ nm}$ ; „grüner Laserblitz“) oder PBBO ( $\lambda = 396 \text{ nm}$ ; „blauer Laserblitz“) ausgestattet und bestrahlte die BLM-Fläche mit einer Lichtintensität von  $0.8 \text{ mJ}$  pro Blitz. Die Datenerfassung und die Blendenverschlusssteuerung wurden mittels der Software pCLAMP 7 über eine Digidata 1200B Schnittstelle durchgeführt. Der stationäre Photostrom wurde mit der Zeit größer und erreichte nach ca. 45 min ein Maximum. Anschließend wurde das Messsystem durch Zugabe von Ionophoren ( $5 \mu\text{M}$  Monensin, ein  $\text{Na}^+, \text{K}^+/\text{H}^+$ -Austauscher und  $2 - 3 \mu\text{M}$  1799, ein Protonophor), die das Membransystem leitfähig machen ( $50 - 100 \text{ nS}$ ), von einem AC-gekoppelten Membransystem in ein DC-gekoppeltes überführt [23,110]. Alle initialen Experimente wurden bei pH 7 ausgeführt, um konsistente Bedingungen zu gewährleisten. Erst anschließend wurde der pH-Wert verändert. Alle BLM-Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Datenanalyse und Präsentation wurden mit Origin 5 vorgenommen.

## **2.3 Spektroskopie und optische Ausstattung**

### **2.3.1 Optische Ausstattung zur Anregung von Photoströmen**

#### **2.3.1.1 Anregung von Photoströmen an Zellen**

Zellen wurden mit dem Licht einer Quecksilberdampflampe belichtet (Osram HBO100 W), das durch einen Infrarot-Filter und einen kurzwelligen Kanten-Filter (Schott GC495;  $\lambda > 495 \text{ nm}$ ; „grünes Licht“) oder einen K40 Breitband-Interferenz-Filter ( $\lambda = 400 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$ ; „blaues Licht“) gefiltert und in eine

Lichtleiterfaser eingekoppelt wurde. Die Belichtung wurde durch eine Uniblitz LS6ZM2 Verschlussblende (Vincent Associates, Rochester, NY, USA) mit einer Öffnungszeit von  $< 1$  ms unterbrochen. Für Einzelblitz-Experimente wurde ein durch einen XeCl-Excimer-Laser gepumpter Farbstofflaser verwendet (10 ns Impulsdauer; Farbstoff PBBO:  $\lambda = 396$  nm, „blaues Licht“; Farbstoff Rhodamin 6G:  $\lambda = 581$  nm, „grünes Licht“; Lextra 100, Lambda Physik, Göttingen, Deutschland).

## **2.3.2 Absorptionsspektroskopische Untersuchungen zur Spannungsabhängigkeit des BR-Photozyklus**

### **2.3.2.1 Zeitaufgelöste Spektroskopie von BR in Oozyten von *Xenopus laevis* unter Spannungsklemme-Bedingungen**

Unter Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Bedingungen wurden Oozyten in eine außen weiß gestrichene Glaskapillare von 1.5 mm Innendurchmesser gelegt. Sowohl das Mess- als auch das Emissionslicht wurden durch Lichtleiterfasern von 1 mm Durchmesser geleitet, die in der Kapillare mit einem Winkel von  $90^\circ$  zueinander standen. Das Anregungslicht wurde durch dieselbe Faser wie das Messlicht auf die Oozyte gestrahlt. Als Quelle des Messlichts wurde eine Xenonlampe (Osram Xbo 75W) verwendet, deren Licht vor und nach der Probe durch zwei K40 Breitband-Interferenz-Filter ( $\lambda = 400 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$ ) gefiltert wurde. Die Intensitätsfluktuationen der Lampe (von ungefähr 1 %) wurden vor der Probe zur anschließenden Kompensation gemessen. Für das Messen der Lichtintensitäten des Signals und dieser Kompensationsreferenz wurden identische Photovervielfacher benutzt (Ems, Art 97813). Der BR-Photozyklus wurde mit grünen Laserblitzen angeregt. Die Laserblitzenergie an der Probe betrug ungefähr  $0.1 \text{ mJ/mm}^2$ . Das Signal und die Referenz wurden gleichzeitig in einem Zweikanal-Oszilloskop (LeCroy 9310AM) gespeichert und 500 Einzelmessungen mit einer Wiederholungsfrequenz von 0.5 Hz gemittelt.

### **2.3.2.2 Zeitaufgelöste Spektroskopie von BR an Proteoliposomen**

Für spektroskopische Messungen an in Proteoliposomen rekonstituiertem Bakteriorhodopsin wurde der BR-Photozyklus mit grünen Laserblitzen angeregt. Während des Versuchs baut sich in den

Liposomen ein dem Pumpstrom entgegengerichtetes Membranpotential auf, das durch Zugabe von Ionophoren (5  $\mu$ M Monensin, 5  $\mu$ M 1799) kurzgeschlossen werden konnte. Die Impulsenergie an der Probe betrug ungefähr 0.1 mJ/mm<sup>2</sup>. Das Messlicht einer Xenonlampe (Osram XBO75W) wurde durch zwei K40 Breitband-Interferenz-Filter ( $\lambda = 400 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$ ) gefiltert, um den Einfluss von Streulicht zu minimieren. Beide Lichtstrahlen erreichten die Probe in einem Winkel von 90°. Die Absorptionsänderungen wurden mit Hilfe eines Photovervielfachers (Ems, Art 97813) beobachtet, in einem Zweikanal-Oszilloskop (LeCroy 9310AM) gespeichert und anschließend 512 Einzelmessungen mit einer Wiederholungsfrequenz von 0.2 Hz gemittelt.

### **2.3.2.3 Zeitaufgelöste Spektroskopie von BR an Purpurchromophoren**

Spektroskopische Messungen an BR-Membranfragmenten in Suspension waren experimentell denen an Proteoliposomen ähnlich und unterschieden sich von diesen lediglich hinsichtlich der Anregung durch eine Quecksilberdampfampe (Osram HBO100 W) anstatt eines Lasers, wobei ein Kanten-Filter (Schott GC495;  $\lambda > 495 \text{ nm}$ ; „grünes Licht“) verwendet wurde. Die Belichtung wurde durch eine Uniblitz LS6ZM2 Verschlussblende (Vincent Associates, Rochester, NY, USA) unterbrochen.

## 3 Resultate

### 3.1 Bakteriorhodopsin: Regulation durch das elektrochemische Potential

#### 3.1.1 Einleitung

Spannungsklemme-Experimente an BR-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten und HEK-293-Zellen erlauben, den Einfluss des elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\text{pH}$  und  $\Delta\Phi$ ; zusammen  $\Delta\Psi$ ) auf das Ionenpumpen zu untersuchen, woraus wertvolle Informationen über das bioenergetische Verhalten dieser elektrogenen Ionenpumpe gewonnen werden können. Eine Analyse der  $\Delta\text{pH}$ - und Spannungsabhängigkeit der stationären Ströme und des Zerfalls aus dem M-Intermediat ergab Aufschlüsse über die Regulation des Protonenpumpens durch elektrochemische Gradienten, auf denen aufbauend ein Modell für den Regulationsmechanismus erstellt werden konnte. Spannungssprungexperimente vermochten die Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung direkt aufzulösen und zeigten, dass Bakteriorhodopsin alle Eigenschaften eines optoelektrischen Schaltelements aufweist.

#### 3.1.2 Heterologe Expression von Bakteriorhodopsin in *Xenopus*-Oozyten und in HEK-293-Zellen

Über die Expression von Bakteriorhodopsin-Wildtyp (im Folgenden als BR<sub>WT</sub> bezeichnet) in Oozyten von *Xenopus laevis* (vergleiche [156,157]) hinaus wurde Bakteriorhodopsin erstmalig in einer Säugetier-Zelllinie heterolog exprimiert, und zwar in HEK-293-Zellen als GFP-Fusionsprotein in zwei unterschiedlichen Varianten: mit und ohne ein 105-Aminosäuren Fragment der  $\beta$ -Untereinheit der H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Abbildung 2.5 A). Dieses Fragment dient als Zielsteuerungssequenz (*targeting sequence*) der Chimäre für die optimierte heterologe Expression des archaebakteriellen Bakteriorhodopsins in der Plasmamembran der eukaryotischen Zelle. Die Effizienz der Expression wurde unter dem Mikroskop durch die Beobachtung der Fluoreszenz von GFP und durch Messung lichtinduzierter Pumpströme ermittelt (Abbildung 2.5 B und C).

Bakteriorhodopsin mit der  $\beta$ -Untereinheit der  $H^+,K^+$ -ATPase als Zielsteuerungssequenz ( $_{HK\beta}BR_{GFP}$ ) generierte in Spannungsklemme-Messungen an HEK-293-Zellen Photoströme von über 100 pA und zeigte damit eine höhere Expressionsdichte als das Konstrukt  $BR_{GFP}$  (20 pA/pF verglichen mit 5 pA/pF, wobei 1 pF generell ungefähr  $100 \mu m^2$  Membranfläche entspricht).  $BR_{WT}$ -induzierte Photoströme in spannungsgeklemmten Membranflecken (*giant-exised patches*) von Oozyten erreichten maximal 10 pA (wobei die typische Membranfläche ungefähr  $500 \mu m^2$  entsprach) [156,177,178]. Da die geschätzten Membranbereiche in beiden Fällen vergleichbar sind, kann man schließen, dass in HEK-293-Zellen eine 10-fach höhere Oberflächenexpression als in *Xenopus*-Oozyten vorhanden ist.

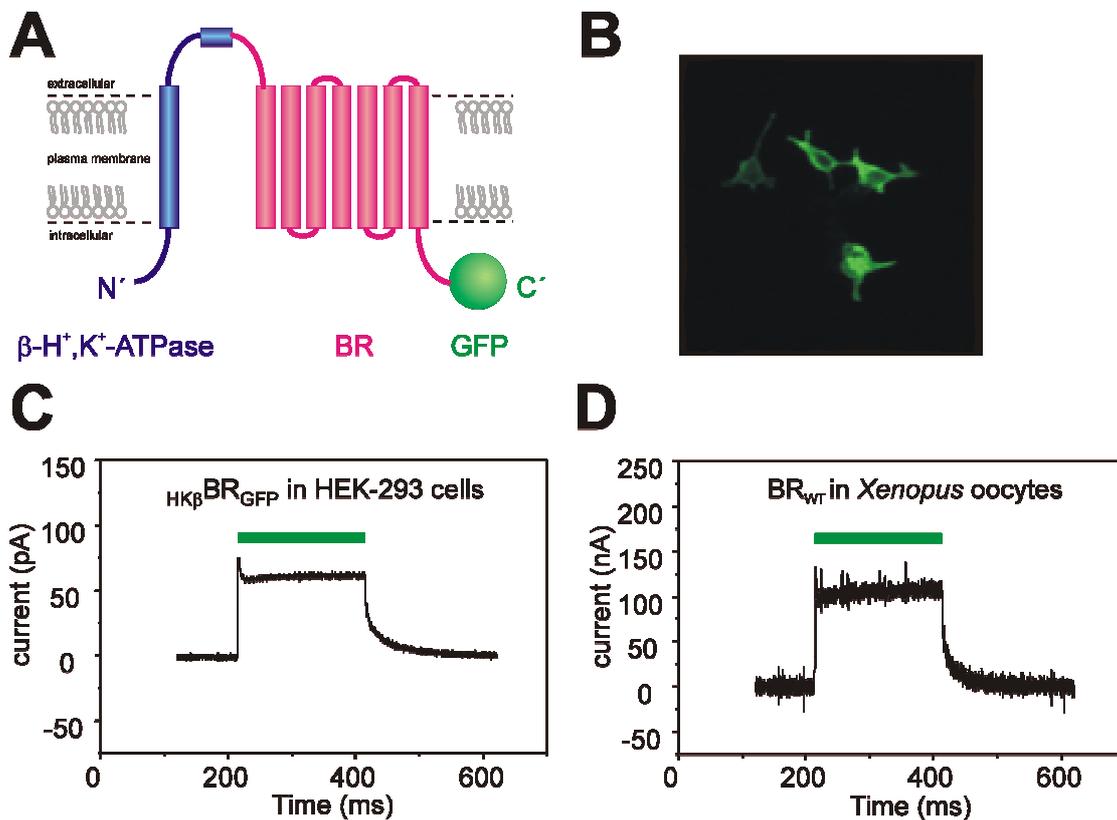


Abbildung 2.5: (A) Schematische Darstellung des Konstrukts  $_{HK\beta}BR_{GFP}$ , an das das 105-Aminosäuren Fragment der  $\beta$ -Untereinheit der  $H^+,K^+$ -ATPase angefügt wurde. (B) GFP-generierte Fluoreszenz  $_{HK\beta}BR_{WT}$ -exprimierender HEK-293-Zellen. (C) Typischer Photostrom einer  $BR_{WT}$ -exprimierenden HEK-293-Zelle bei Belichtung mit grünem Licht, wie durch den grünen Balken bezeichnet. (D) Typischer Photostrom einer  $BR_{WT}$ -exprimierenden *Xenopus*-Oozyte bei Belichtung mit grünem Licht, wie durch den grünen Balken bezeichnet.

Die Richtung des Photostroms entsprach in allen BR-Konstrukten – den in HEK-293-Zellen und der in Oozyten verwendeten Varianten – einem auswärtsgerichteten Protonenstrom, der sich weder in

Richtung und Kinetik noch in der I-U-Beziehung zwischen den verschiedenen Konstrukten unterschied (Abbildung 2.5 C und D). Durch die Etablierung der Expression in zwei Zellsystemen, konnten einerseits Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Messungen an Oozyten über einen breiten pH- und Spannungsbereich, andererseits Patch-Clamp-Messungen an HEK-293-Zellen mit hoher Zeitauflösung für die schnellen Prozesse durchgeführt werden.

### **3.1.3 Die Spannungsabhängigkeit des Protonentransports in Gegenwart eines pH-Gradienten**

Die durchgeführten Spannungsklemme-Experimente bieten die Möglichkeit, den Einfluss von pH-Gradienten ( $\Delta\text{pH}$ ) und Potentialgradienten ( $\Delta\Phi$ ) auf das Ionenpumpen separat zu studieren. Vom rein thermodynamischen Standpunkt wird die Gleichwertigkeit eines Konzentrationsgradienten und eines Potentialgradienten gefordert (Gleichung 2.1 [179],  $\tilde{\mu}_{H^+}$  entspricht  $\Delta\Psi$ ):

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = RT \ln \frac{c_a}{c_i} + zF\Phi \approx 0 \quad (2.1)$$

(R = molare Gaskonstante, T = absolute Temperatur;  $c_a$  = äußere Ionenkonzentration;  $c_i$  = innere Ionenkonzentration; z = Wertigkeit der Ionen; F = Faradaykonstante;  $\Phi$  = Potentialgradient)

Aus kinetischen Gründen jedoch kann sich der Einfluss des Konzentrationsgradienten von dem des Potentialgradienten bemerkenswert unterscheiden. So wurde für die  $F_0F_1$ -ATPase gezeigt, dass der Potentialgradient alleine ausreicht, die ATP-Synthase-Aktivität anzutreiben [180].

Für Bakteriorhodopsin wurde die I-U-Kennlinie unter unterschiedlichen pH-Gradienten untersucht. Der obere Teil von Abbildung 2.6 zeigt an Oozyten gemessene Photoströme bei zwei verschiedenen Spannungen, zunächst bei einem extrazellulären pH-Wert von 7.5 (Abbildung 2.6 A) und dann bei einem extrazellulären pH-Wert von 5.5 (Abbildung 2.6 B), was unter der Annahme eines gepufferten intrazellulären pH-Werts der Oozyten von 7.5 einem  $\Delta\text{pH}$  von zwei Einheiten gegen die Pumprichtung entspricht. In analogen Messungen wurde der extrazelluläre pH-Wert auf 8.5 oder 6.5 (Daten nicht gezeigt) eingestellt. Die Spannungsabhängigkeit der stationären Pumpströme ist bei  $\Delta\text{pH} = 0$  über

den messbaren Spannungsbereich zwischen  $-160$  und  $+60$  mV linear (vergleiche [156]). Auch unter einem  $\Delta\text{pH}$  von zwei Einheiten bleibt diese Linearität der Spannungsabhängigkeit des Pumpstroms innerhalb des messbaren Spannungsbereichs erhalten.

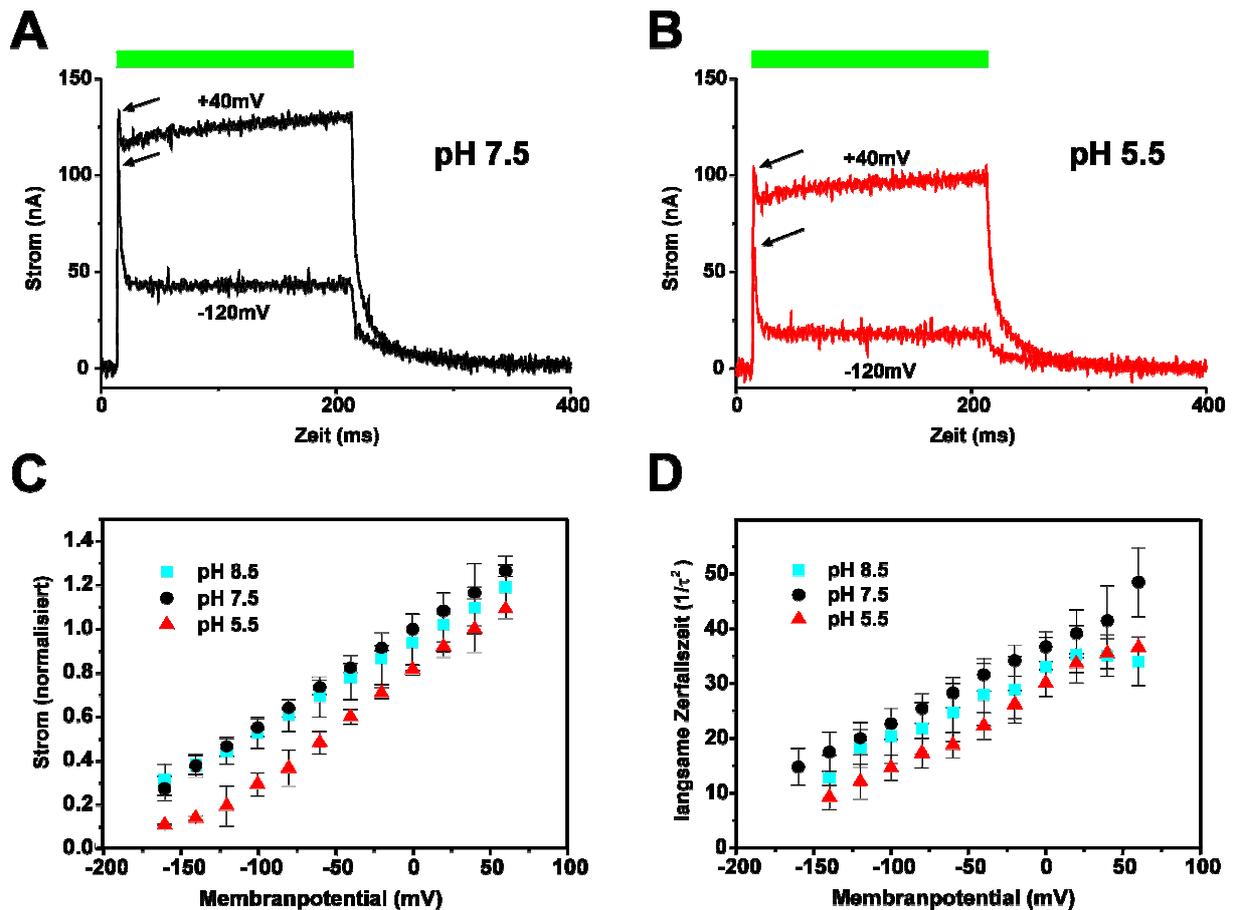


Abbildung 2.6:  $\Delta\text{pH}$ - und Spannungsabhängigkeit der Photoströme von Bakteriorhodopsin exprimiert in Oozyten von *Xenopus laevis*. (A und B) Photoströme bei zwei verschiedenen Potentialen, (A) bei einem extrazellulären pH-Wert von 7.5 und (B) bei einem extrazellulären pH-Wert von 5.5, d.h. in Gegenwart eines pH-Gradienten von zwei Einheiten. Die grünen Balken über den Stromsignalen bezeichnen die Zeitdauer der Belichtung mit grünem Licht. Die Amplituden der transienten Ströme zu Belichtungsbeginn sind durch Pfeile angedeutet. (C) I-U-Kennlinie unter verschiedenen pH-Gradienten (Ströme normiert auf den Durchschnittsstrom bei 0 mV, pH 7.5). (D) Spannungsabhängigkeit der langsamen Komponente der Ausschaltrelaxation der Photoströme ( $\tau_2$ ), wie gezeigt in Abbildung A und B. Jeder Punkt repräsentiert die Daten von 5 (pH 5.5, 8.5) oder 15 (pH 7.5) Oozyten. Die Datenpunkte sind als Durchschnittswerte mit Standardabweichung angegeben.

Aufgrund dieser Linearität erscheint es gerechtfertigt, durch lineare Extrapolation der I-U-Kennlinie ein apparentes Umkehrpotential zu ermitteln (siehe Tabelle 2.1). Ein  $\Delta\text{pH}$  von einer Einheit über die Plasmamembran (Außenseite der Zelle = pH 6.5) verursacht eine Verschiebung des apparenten Umkehrpotentials um 22 mV – viel weniger als die 58 mV, die sich anhand thermodynamischer

Überlegungen auf Grundlage der Nernst-Gleichung erwarten ließen. Ein  $\Delta\text{pH}$  von zwei Einheiten (Außenseite der Zelle = pH 5.5) bewirkt eine Verschiebung von 64 mV. Auch diese ist viel kleiner als die aus der Nernst-Gleichung resultierenden 116 mV. Vergleichende Messungen an HEK-293-Zellen zeigten tendenziell dasselbe pH-abhängige Verhalten der apparenten Umkehrpotentiale. In Patch-Clamp-Messungen an HEK-293-Zellen konnte der intrazelluläre pH-Wert genau kontrolliert werden. Jedoch konnten nur Spannungen bis  $-120$  mV angelegt werden, wodurch die Extrapolation zu apparenten Umkehrpotentialen weniger präzise war. Dennoch wurde stets eine Verschiebung der I-U-Kurve beobachtet, die deutlich unterhalb der anhand der Nernst-Gleichung erwarteten 58 mV pro pH-Einheit lag (Daten nicht gezeigt).

|                      |                  |                  |                  |                   |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| pH (extrazellulär)   | 8.5              | 7.5              | 6.5              | 5.5               |
| Umkehrpotential (mV) | $-233.6 \pm 7.6$ | $-221.7 \pm 7.7$ | $-199.6 \pm 8.5$ | $-157.2 \pm 12.7$ |

Tabelle 2.1: Apparente Umkehrpotentiale der Photoströme von Bakteriorhodopsin exprimiert in *Xenopus*-Oozyten unter unterschiedlichen pH-Gradienten. Durchschnittswerte mit Standardabweichung von 5 (pH 5.5, 6.5, 8.5) oder 15 (pH 7.5) Oozyten.

Obwohl die I-U-Kennlinie über große Bereiche linear ist, wird bei einem extrazellulären pH-Wert von 5.5 und stark negativen Potentialen ein Bereich erreicht, in dem die Pumpströme sehr klein werden und ein geringfügiges Abflachen der I-U-Kennlinie zu beobachten ist. Ein solches Verhalten ist für eine Ionenpumpe zu erwarten, deren Transportrichtung nicht umkehrbar ist. Im Wesentlichen jedoch ist die I-U-Kennlinie für einen nach cytoplasmatisch gerichteten pH-Gradienten parallel. Dies ist für einen nach aussen gerichteten pH-Gradienten (pH 8.5 extrazellulär) nicht der Fall. Hier ist die Steigung der I-U-Kennlinien verringert, d.h. hyperpolarisierende Spannungen erzeugten verhältnismäßig größere und depolarisierende Spannungen verhältnismäßig kleinere Ströme. Außerdem deutet sich bei positiven Potentialen ein Sättigungsverhalten an. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass eine Änderung im extrazellulären pH-Wert eine drastische Änderung im intrazellulären pH-Wert bewirkt, ging jeder Messung eine Kontrollmessung bei pH 7.5 voraus, und ihr folgte eine ebensolche. Eine anhaltende Änderung im intrazellulären pH-Wert sollte als Verschiebung der I-U-Kurve zu negativen Potentialen hin festzustellen sein. Dies wurde in den Experimenten allerdings nie beobachtet.

### **3.1.4 Die Spannungsabhängigkeit der apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten des BR-Transportzyklus**

Informationen über den Einfluss des Potentialgradienten und/oder des pH-Gradienten auf das kinetische Verhalten der Pumpströme können gewonnen werden durch:

- A. Analyse von An- und Ausschaltrelaxationen stationärer Photoströme oder lichtblitzinduzierter zeitaufgelöster Ströme.
- B. Abfragen von Bildung und Zerfall des M-Intermediats mit Hilfe blauer Lichtblitze. Blaues Licht verursacht eine Reisoomerisierung des Retinals im M-Zustand, gefolgt von einer Reprotonierung der Schiffbase von der extrazellulären Seite, wodurch ein nichtpumpender Zwei-Photonen-Zyklus vollendet wird [129,130,132,156].
- C. Analyse von An- und Ausschaltrelaxationen spannungssprunginduzierter Ströme in schnellen Spannungssprung-Experimenten.

Die in Abbildung 2.6 A und B gezeigten Ströme lassen zusätzlich zu dem stationären Pumpstrom zwei nichtstationäre Phasen erkennen: Die An- und die Ausschaltrelaxation, zu sehen als transienter Strom zu Belichtungsbeginn und Zerfall aus dem stationären Strom nach Belichtungsende. Der transiente Strom spiegelt ein schnelles elektrogenes Ereignis vor dem geschwindigkeitslimitierenden Schritt des Pumpzyklus wider. Dieses schnelle elektrogene Ereignis ist die Deprotonierung der Schiffbase während der Reaktion, durch die das  $M_1$ -Intermediat gebildet wird [158,181]. Der transiente Strom zeigt eine nur schwache Spannungsabhängigkeit, wie aus dem Verhältnis der Amplituden bei +40 mV und -120 mV (markiert durch die Pfeile in Abbildung 2.6 A und B) ersichtlich wird. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass die Bildung von  $M_1$  nicht der hauptelektrogene und geschwindigkeitslimitierende Schritt ist. Diese Reaktion trägt etwa 10 – 20 % der Gesamtelektrogenizität [158,181] und ist daher wenig spannungsabhängig. Ein zusätzlicher pH-Gradient verursacht einen größeren Effekt auf den transienten Strom. Das Verhältnis der Amplituden des transienten Stroms bei +40 mV und -120 mV (Pfeile in Abbildung 2.6 A und B) ist in Gegenwart eines pH-Gradienten von zwei Einheiten 1.7 und in Abwesenheit eines pH-Gradienten 1.3.

Der stationäre Strom wird durch das angelegte elektrische Feld stärker beeinflusst, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass der Zerfall  $M_2 \rightarrow bR$  der hauptelektrogene und geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist [158,181]. Die Ausschaltantwort stellt die Zeitabhängigkeit des Zerfalls  $M_1 \rightarrow M_2 \rightarrow bR$  dar. Der Zerfall des Stromsignals nach Belichtungsende besteht aus mindestens zwei Prozessen [156] und kann mit zwei Exponentialfunktionen beschrieben werden.

Der schnelle Prozess (beschrieben durch die Zerfallszeit  $\tau_1$ ) ist – innerhalb der Zeitauflösung des Oozyten-Messsystems – beinahe spannungsunabhängig. Er kann mit einer Zeitkonstante von 1 – 3 ms angepasst werden und wird hauptsächlich durch die RC-Konstante der Spannungsklemme und durch die Schaltzeit des Blendenverschlusses bestimmt. Ähnliche Experimente in HEK-293-Zellen beschrieben den schnellen Zerfall ( $\tau_1$ ) aufgrund der schnelleren Spannungsklemme mit einer etwas verminderten Zeitkonstante. Diese wurde aber maßgeblich durch die Schaltzeit des Blendenverschlusses begrenzt. In Einzelblitz-Experimenten kann diese Limitierung umgangen werden. Dennoch war die Zeitkonstante ( $\tau_1$ ) bei Spannungen zwischen +40 mV und –120 mV spannungsunabhängig und in derselben Größenordnung ( $\tau_1 \sim 0.8$  ms, Daten nicht gezeigt).

Der langsamere Prozess (beschrieben durch die Zerfallszeitkonstante  $\tau_2$ ) war deutlich spannungsabhängig mit Zerfallszeitkonstanten zwischen 20 ms bei +60 mV und 80 ms bei –160 mV. Wie aus Abbildung 2.6 D ersichtlich, war die Steigung der Kurve, die die Spannungsabhängigkeit der reziproken Zeitkonstanten – d.h. der apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten – beschreibt ( $1/\tau_2$ -U-Kurve), der Steigung der I-U-Kurve in Abbildung 2.6 C sehr ähnlich. Damit kann das lineare Verhalten der I-U-Kennlinie durch die Spannungsabhängigkeit des  $M_2$ -Zerfalls in seiner Eigenschaft als geschwindigkeitslimitierender Schritt erklärt werden. Es ist bemerkenswert, dass er zudem in ähnlicher Weise vom  $\Delta pH$  abhängt wie die stationären Ströme bei unterschiedlichen Potentialen und zeigt so, dass die I-U-Kurve über den gemessenen Bereich hauptsächlich durch diesen Prozess geregelt wird.

Die  $1/\tau_2$ -U-Kurve war – obwohl ebenso linear – signifikant weniger steil als die I-U-Kurve. Über eine Potentialdifferenz von 200 mV änderte sich die Größe des Photostroms (I-U-Kurve) um den Faktor 5,

während die  $1/\tau_2$ -U-Kurve nur eine Änderung um den Faktor 3 zeigte. Dies führt dazu, dass die lineare Extrapolation der I-U-Kurve schon bei viel weniger hyperpolarisierenden Potentialen ein völliges Verschwinden des Photostroms voraussagt, als die Potentialabhängigkeit des M-Zerfalls ( $1/\tau_2$ -U-Kurve) dies erwarten ließe. Es liegt daher nahe, für die Abnahme des Stroms bei hyperpolarisierenden Potentialen einen zusätzlichen Regulationsprozess anzunehmen (siehe Diskussion). Dieser zweite Mechanismus sollte bei negativen Potentialen immer stärker zum Tragen kommen.

In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass unter Belichtung bei negativen Potentialen ein M-Intermediat entsteht, das nach Belichtungsende mit einer Zerfallszeitkonstante ( $\tau_3$ ) von mehreren 100 ms zerfällt [156]. Falls dieser Zerfall über einen nichttransportierenden Reaktionsweg erfolgt, könnte dies den Regulationsprozess darstellen, der bei hyperpolarisierenden Potentialen für die überproportionale Abnahme des Stroms verantwortlich ist. Da in derselben Arbeit gezeigt wurde, dass der langsame M-Zerfall pH-abhängig erfolgt und so von 700 ms bei pH 8.0 zu 40 ms bei pH 6.0 beschleunigt wird, konnte vermutet werden, dass  $M_1$  bei hyperpolarisierenden Potentialen durch Reptonierung der Schiffbase ( $pK_a < 4$ ) von der extrazellulären Seite in einem nichttransportierenden „Kurzschlusszyklus“ zum bR-Zustand zurückfällt [156].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zeitverlauf des langlebigen M-Intermediats mit einer Kombination spektroskopischer und elektrischer Methoden detaillierter untersucht. Eine höhere Zeitauflösung als in der vorangegangenen Arbeit wurde durch die Anwendung von Patch-Clamp-Techniken und die Verwendung schneller applizierbarer Belichtungsquellen (schneller Blendenverschluss und gepulster Farbstofflaser) erreicht. Überraschenderweise wurde ein langlebiges M-ähnliches Intermediat mit einer Lebenszeit ( $\tau_3$ ) von ungefähr 200 ms bereits bei 0 mV sowohl in HEK-293-Zellen als auch in *Xenopus*-Oozyten gefunden. Die Akkumulation und Lebensdauer dieses langlebigen M-ähnlichen Intermediats wurde durch hyperpolarisierende Potentiale drastisch erhöht (Abbildung 2.7 B – F).

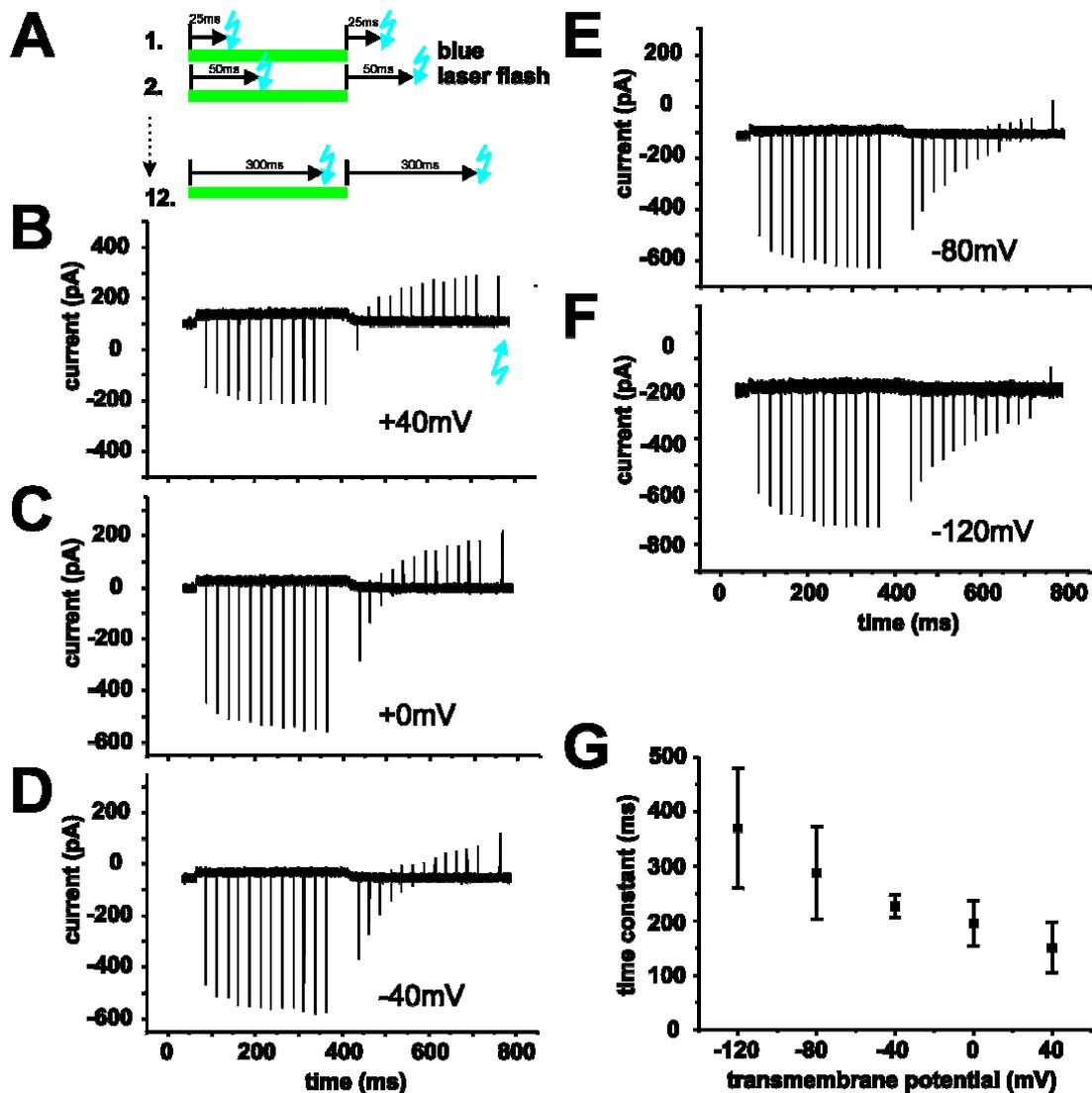


Abbildung 2.7: Blaulichtinduzierte Verminderung des stationären BR-Photostroms in Patch-Clamp-Experimenten an HEK-293 Zellen bei pH 7.5 auf beiden Seiten der Zellmembran. Um die schnelle Kinetik des durch den blauen Laserblitz ausgelösten Stroms zu detektieren, wurden die Signale lediglich mit 10 kHz gefiltert, wodurch die stationären Ströme klein und verrauscht erscheinen. (A) Schematische Darstellung des experimentellen Protokolls. Die grünen Balken illustrieren die Zeitdauer der Belichtung mit grünem Licht. Die Blitze bezeichnen die Belichtung mit einem blauen Laserblitz (396 nm). (B – F) Bei Membranspannungen von +40 bis –120 mV wurden solche Blaulichtblitz-Experimente an derselben Zelle durchgeführt. Alle 12 Messungen pro Membranspannung wurden überlagert, um die Amplituden der laserblitzinduzierten, einwärtsgerichteten Ströme vergleichbar zu machen. Der blaue Blitz am Ende der Stromsignale in (B) bezeichnet eine Belichtung nach nicht durchgeführter Vorbelichtung und stellt somit die durch Blaulichtabsorption des bR-Grundzustands erzeugten Pumpströme dar. Dieser Kontrollblitz wurde in allen Experimenten (B – F) appliziert. (G) Kinetische Auswertung der blaulichtinduzierten Ströme.

Die dargestellten Experimente wurden wie folgt durchgeführt (äquivalente Experimente an *Xenopus*-Oozyten sind im Kapitel 3.2 beschrieben): Unter Patch-Clamp-Bedingungen wurde eine HEK-293-Zelle mit grünem Licht für 300 ms bei fünf unterschiedlichen Spannungen zwischen +40 mV und –120 mV belichtet, um einen stationären Photostrom zu erzeugen. Um die relative Menge des M-Intermediats zu ermitteln, wurden blaue Laserblitze (396 nm, 10 ns Dauer) angewendet. Diese führen

zur sogenannten blaublichtinduzierten Löschung des Photostroms aufgrund der Reprotonierung der Schiffbase von der extrazellulären Seite via D85, wobei die Reprotonierung Folge einer durch blaues Licht verursachten Reisoomerisierung des Retinals ist. Während der Belichtung mit grünem Licht hängt die Größe der blaublichtinduzierten, einwärtsgerichteten transienten Ströme vom Transmembranpotential ab (Abbildung 2.7).

Für die Auswertung der Menge an M-Intermediat wurde das Integral unter diesen transienten Strömen (d.h. die Ladung) berechnet. Die Abbildungen 2.8 A und B zeigen beispielhaft blaublichtblitzinduzierte transiente Ströme in höherer Zeitauflösung an derselben Zelle bei zwei verschiedenen Potentialen (+40 mV und -120 mV). Eine gravierende potentialabhängige Veränderung des Zeitverlaufs ist nicht zu erkennen. Bei +40 mV ist der stationäre Strom groß, und die Blaublichtblitze induzieren eine relativ kleine Ladungsverschiebung, während bei -120 mV der stationäre Strom kleiner ist, und die Blaublichtblitze eine größere Ladungsbewegung verursachen (~ 1.6 mal soviel Ladung). Dieses Resultat lässt sich wie folgt deuten: Unter kontinuierlicher Belichtung ist die Konzentration von M-Intermediat bei negativen Potentialen größer als bei positiven Potentialen.

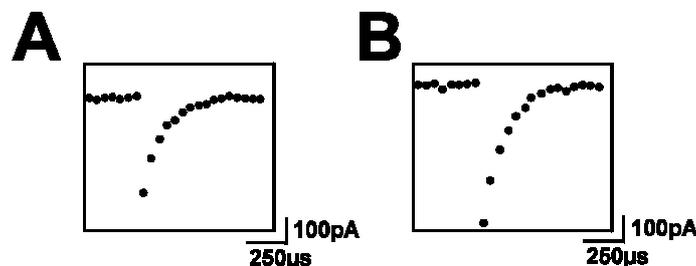


Abbildung 2.8: Transiente Ströme ausgelöst durch einen Blaulichtblitz bei (A) +40 mV und (B) -120 mV.

Die Bestimmung der Lebenszeit des M-Intermediats durch Blaulichtblitze nach dem Ende kontinuierlicher Belichtung macht deutlich, dass die Spannungsabhängigkeit des BR-Pumpstroms durch zwei Prozesse beschrieben werden kann. Betrachtet man Abbildung 2.7, so fällt auf, dass unter den verbesserten experimentellen Bedingungen (d.h. bessere Zeitauflösung und höhere Expression in HEK-293-Zellen) bereits bei einem Potential von +40 mV, bei dem der transportierende Pumpzyklus ca. 20 ms dauert, ein langlebiges M-Intermediat mit einer charakteristischen Zeitkonstante des Zerfalls ( $\tau_3$ ) von ungefähr 150 ms gefunden werden kann. Nach Belichtungsende liessen sich zunächst noch

blaulichtinduzierte, einwärtsgerichtete transiente Ströme beobachten. Wie Abbildung 2.7 B entnommen werden kann, löste ein blauer Laserblitz 25 ms nach Belichtungsende noch einen einwärtsgerichteten transienten Strom aus. Bereits 50 ms nach Belichtungsende verursachte der blaue Laserblitz eine auswärtsgerichtete Ladungsverschiebung, denn die Konzentration des bR-Grundzustands ist zu diesem Zeitpunkt bereits wieder derart erhöht, dass durch Restabsorption des bR-Grundzustands im blauen Wellenlängenbereich ein transienter Pumpstrom in die reguläre Pumprichtung verursacht wird. Der auswärtsgerichtete transiente Strom erreichte seinen Sättigungswert nach Belichtungsende jedoch mit einer charakteristischen Zeitkonstante von  $\tau_3 = 150$  ms. Dies deutet darauf hin, dass bereits unter Belichtung bei +40 mV ein langlebiger M-Zustand existieren muss. Bei -120 mV zeigt sich das Bestehen dieses langlebigen M-Zustands noch deutlicher (Abbildung 2.7 F). Wie oben erwähnt, verursachte der blaue Laserblitz einen größeren negativen transienten Strom und zeigte damit eine erhöhte Menge von M-Intermediat im Vergleich zu dem Wert bei +40 mV. 25 ms nach Belichtungsende existiert fast sämtliches Protein noch in diesem langlebigen M-Zustand. Im Vergleich mit den gleichen Doppelblitz-Experimenten bei +40 mV wird deutlich, dass eine große Menge von langlebigem M-Intermediat durch negative Potentiale festgehalten wird. Bei -120 mV ist außerdem die Zerfallszeit für dieses M-Intermediat größer und beträgt ungefähr 380 ms. Dies unterstützt die Annahme, dass eine Subpopulation aller BR-Moleküle aus dem transportierenden Zyklus abgespalten wird und über ein Zwischenintermediat  $M_1^*$  über einen „Kurzschlusszyklus“ ohne Nettoprotonentransport zerfällt. Andernfalls würde sich der M-Zustand unter kontinuierlicher Belichtung mit der Konsequenz eines sehr langsamen und somit uneffizienten Pumpzyklus akkumulieren (siehe Diskussion).

### **3.1.5 Spektroskopische Messungen**

Im Weiteren wurden Versuche unternommen, den langsamen M-Zerfall auch spektroskopisch zu untersuchen (Abbildung 2.9). In Absorptionsmessungen (400 nm Detektionswellenlänge) an spannungsgeklemmten Oozyten wies der M-Zerfall neben Zerfallszeiten im unteren ms-Bereich einen zusätzlichen exponentiellen Bestandteil mit einer Zerfallszeit  $\tau_3$  von 160 ms auf (Abbildung 2.9 A). Die Zerfallszeitkonstante war wesentlich größer als die normalerweise an Purpurmembranen in

Suspension bestimmte [181,182]. Der Wert der Zeitkonstante  $\tau_3$  variierte zwar von Oozyte zu Oozyte, lag aber immer zwischen 100 und 300 ms. Die Zeitkonstanten des M-Zerfalls konnten jedoch durch Anlegen von Transmembranspannungen nicht erheblich beeinflusst werden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die BR-Moleküle, die zum Absorptionssignal beitragen, nicht nur in der Plasmamembran, sondern auch in den Membranen intrazellulärer Organellen lokalisiert sind, und diese Moleküle durch die Spannungsklemme nicht beeinflusst werden können (Details siehe Diskussion).

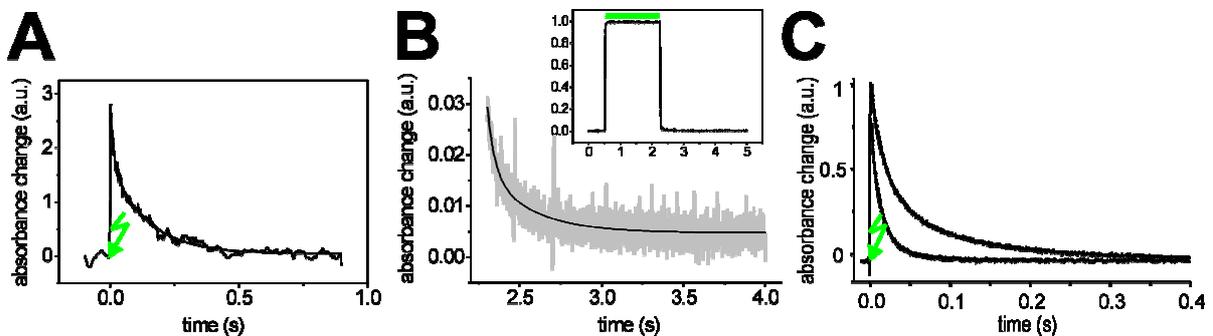


Abbildung 2.9: (A) Absorptionsspektroskopische Messungen an Bakteriorhodopsin in Oozyten, (B) Purpurmembranfragmenten und (C) Proteoliposomen. Die eingefügte Abbildung in (B) zeigt das gesamte Experiment, aus dem die langsame Komponente des Zerfalls vergrößert dargestellt wurde. In (C) zeigt die obere Kurve den langsamen M-Zerfall vor, die untere Kurve den langsamen M-Zerfall nach Zugabe der Ionophoren Monensin und 1799. Grüne Pfeile und Balken bedeuten Laserblitz bzw. stationäre Belichtung.

Die elektrophysiologischen Experimente zeigten, dass der langsame Zerfallsprozess auch bei 0 mV vorhanden ist. Folglich sollte es möglich sein, ihn auch an Purpurmembranen spektroskopisch nachzuweisen. Eine einfache Ermittlung des M-Zerfalls nach stationärer Belichtung mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda > 495$  nm wurde bei einer Detektionswellenlänge von 400 nm durchgeführt. Wie aus Abbildung 2.9 B ersichtlich wird, konnte neben den üblichen M-Zerfallskomponenten von ca. 1 ms und ca. 20 ms noch ein weiterer, zwar kleiner, aber eindeutiger Prozess beobachtet werden. Dieser trägt mit ca. 1 % zur Gesamtamplitude des Signals bei und weist eine Zerfallszeit von ca. 250 ms auf. Leider sind spektroskopische Untersuchungen an Purpurmembranpräparationen unter definierten Spannungsbedingungen nicht möglich. Rekonstituiert man Bakteriorhodopsin jedoch in Liposomen, so erzeugt Bakteriorhodopsin bei Aktivierung selbst einen dem Pumpstrom entgegengesetzten elektrochemischen Gradienten. Der M-Zerfall wurde

entscheidend verlangsamt, wenn Proteoliposomen repetitiv belichtet wurden ( $\tau \sim 90$  ms). Wurden zu denselben Proteoliposomen anschließend Ionophore zugegeben, die das elektrochemische Potential kurzschließen, fand man für den M-Zerfall einen Zeitverlauf, der dem aus Purpurmembranmessungen sehr nahe kommt ( $\tau \sim 10$  ms, Abbildung 2.9 C).

All diese Ergebnisse zeigen, dass das kinetische Verhalten des M-Zerfalls nicht drastisch zwischen den unterschiedlichen BR-Präparationen variiert, also zum Beispiel zwischen der in HEK-293-Zellen exprimierten Form und der trimeren, quasikristallinen Form, die in Purpurmembranen überwiegt. Die spektroskopischen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Pal Ormos (Biological Research Center Szeged, Ungarn) und Verena Pintschovius durchgeführt.

### **3.1.6 Spannungssprung-Experimente**

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen (in Übereinstimmung mit früher publizierten Daten [156]), dass das M-Intermediat bei hyperpolarisierenden Spannungen stark akkumuliert wird. Die Anreicherung reicht von beinahe 0 % bei +80 mV bis zu 90 % bei stark hyperpolarisierenden Spannungen von -160 mV [156]. Da das M-Intermediat bei hyperpolarisierenden Potentialen derartig stark akkumuliert wird, würde man erwarten, dass sowohl seine Bildung als auch sein Zerfall von einer spannungsabhängigen Ladungsverschiebung begleitet wird. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde das folgende Experiment durchgeführt: BR<sub>WT</sub>-exprimierende Oozyten wurden zu einem Potential von -120 mV hyperpolarisiert. Dann wurden depolarisierende Spannungssprünge zu +40 mV vor, während und nach kontinuierlicher Belichtung mit grünem Licht durchgeführt. Das gleiche Experiment wurde anschließend ohne Belichtung durchgeführt, um die Effekte der Hintergrundleitfähigkeit der Oozyten durch Subtrahieren eliminieren zu können. Wie aus Abbildung 2.10 ersichtlich, hatte ein depolarisierender Spannungssprung vor Belichtung keinen Effekt. Belichtung erzeugte den typischen stationären Photostrom mit dem vorangehenden transienten Strom. Depolarisation der Zelle während der Belichtung rief einen drastisch erhöhten Pumpstrom hervor, dem kein transienter Strom voranging. Nach Repolarisation zu -120 mV wurde wieder der gleiche stationäre Photostrom wie zuvor beobachtet. Im Gegensatz zu einem depolarisierenden Spannungssprung vor Belichtung verursachte

der gleiche Spannungssprung sogar 150 ms nach Belichtungsende noch einen positiven transienten Strom. Dieser repräsentiert vermutlich die Ladungsverschiebung, die mit dem Verschwinden des langlebigen M-Intermediats einhergeht. Diese Interpretation wird durch ein Experiment bekräftigt, in dem ein blauer Laserblitz, der M nach bR verschiebt, die Spannungssprung-induzierte Ladungsverschiebung nach Belichtungsende aufhob, wenn er direkt vor dem depolarisierenden Spannungssprung erfolgte (Daten nicht gezeigt).

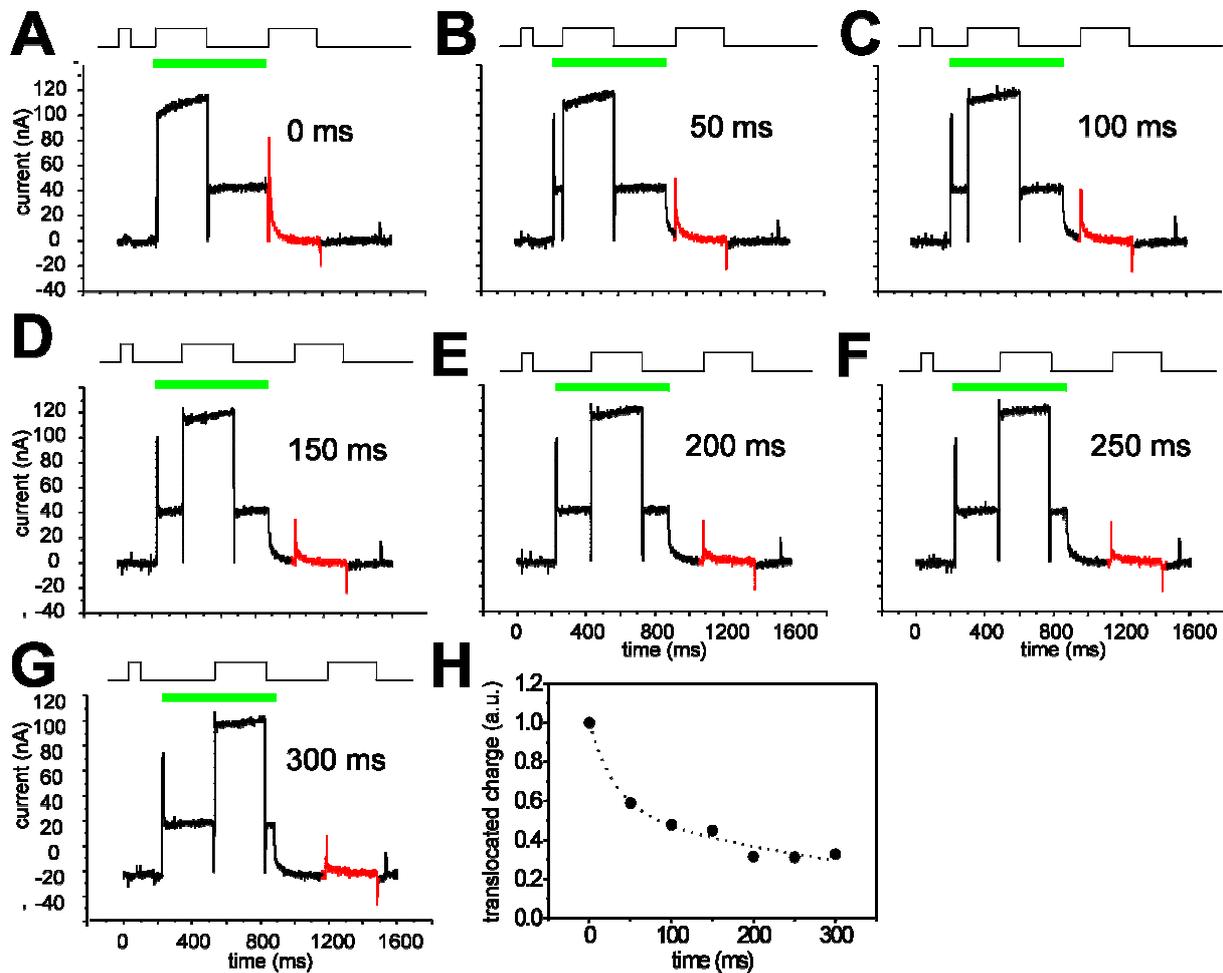


Abbildung 2.10: (A – G) Optoelektrisches Verhalten von Bakteriorhodopsin exprimiert in *Xenopus*-Oozyten. Sowohl Belichtung als auch Spannungssprünge erlauben es, Pumpströme zu induzieren und Bakteriorhodopsin zwischen seinen Intermediaten umzuverteilen. Die Messungen wurden durchgeführt – wie durch das angedeutete Spannungs-/Belichtungsprotokoll dargestellt – wobei Spannungssprünge von 120 mV zu +40 mV und zurück durchgeführt wurden. Die grünen Balken bezeichnen die Belichtungsdauer mit grünem Licht. Bei einem Spannungssprung von –120 mV zu +40 mV während der Belichtung konnte keine zusätzliche Ladungsverschiebung beobachtet werden. Derselbe depolarisierende Spannungssprung zu verschiedenen Zeiten nach Belichtung offenbart einen transienten Strom (rot hervorgehoben). Der Zeitpunkt 0 ms bezeichnet dabei einen Spannungssprung 5 ms nach Belichtungsende. (H) Die Ladungsverschiebung nach dem Spannungssprung, aufgetragen gegen die Zeit, offenbart ein ähnliches Verhalten wie es für die blaulichtinduzierte Ladungsverschiebung nach Belichtungsende gefunden wurde. Eine Anpassung mit zwei Exponentialfunktionen erster Ordnung an diese Kurve ergab zwei Relaxationszeiten von 30 ms und 460 ms. Die Stromsignale wurden jeweils aus 5 Aufnahmen gemittelt. Der extrazelluläre pH-Wert betrug 7.5.

Die depolarisierenden Spannungssprünge erfolgten zu unterschiedlichen Zeiten nach Belichtungsende. Die transienten Ströme wurden integriert und die resultierende verschobene Ladungsmenge gegen die Zeit nach Belichtungsende aufgetragen, wobei der Zeitpunkt des Anlegens des depolarisierenden Spannungssprungs maßgebend war (Abbildung 2.10 H). Eine Anpassung mit zwei Exponentialfunktionen erster Ordnung an diese Kurve ergab zwei Relaxationszeitkonstanten von 30 ms und 460 ms (Abbildung 2.10 H). Bemerkenswert ist, dass die Auswertung ähnliche Zeitverläufe der Ladungsverschiebung ergab wie die aus den Doppelblitz-Experimenten (Abbildung 2.7 G) ermittelten.

## 3.2 Bakteriorhodopsin: M-stabilisierende oder destabilisierende

### Mutanten

#### 3.2.1 Einleitung

Die Geschwindigkeit von Aufbau und Zerfall und damit die Lebensdauer des M-Intermediats hat einen starken Einfluss darauf, wie schnell und effektiv Bakteriorhodopsin Protonen transportiert. Wie in der Diskussion dargestellt sein wird, erfolgt die Regulation des Protonentransports dabei maßgeblich durch die Transmembranspannung, die die Reaktion  $M \rightarrow bR$  reguliert. Eine zusätzliche Regulation des Protonenpumpens wird durch ein Aufspalten des Pumpzyklus im M-Intermediat erreicht. Von dort zerfällt insbesondere bei negativen Potentialen ein Großteil der angeregten Moleküle über einen „Kurzschlusszyklus“ zurück in den bR-Grundzustand. M-stabilisierende oder destabilisierende Mutationen lassen daher veränderte kinetische Eigenschaften des Aufbaus und Zerfalls und damit der Lebensdauer des M-Intermediats erwarten, was auch eine Veränderung der I-U-Kennlinien nach sich ziehen sollte. Daher sollten BR-Mutanten, für die Kristallstrukturen vorliegen, die auf Grundlage spektroskopischer Messungen dem M- oder N-Intermediat zugeordnet wurden [142-147,158,159], in *Xenopus*-Oozyten exprimiert und mittels Spannungsklemme-Experimenten untersucht werden. Namentlich sind das die Mutanten BR<sub>D96N</sub> (M), BR<sub>D96G</sub> (M), BR<sub>F171C</sub> (N) BR<sub>F219L</sub> (N) und die sogenannte „Tripel“-Mutante BR<sub>D96G,F171C,F219L</sub> (M), wobei den Mutanten, die das N-Intermediat stabilisieren, ein beschleunigter M-Zerfall und eine geringere Anreicherung des M-Intermediats zugeordnet werden kann. Die Messungen erlaubten es zusätzliche Aspekte des Protonenpumpens und dessen Regulation durch das M-Intermediat zu untersuchen. Ein zweiter Aspekt dieser Untersuchungen bezieht sich auf eine strukturelle Kontroverse. Bisher ging man davon aus, dass strukturelle Änderungen die Vektorialität des Protonenpumpens von Bakteriorhodopsin bestimmen. In der Mutante BR<sub>D96G,F171C,F219L</sub> konnten allerdings während des Reaktionszyklus keine gravierenden strukturellen Änderungen gefunden werden [147,148]. Demzufolge ist es von großem Interesse, ob diese Mutante noch als vektorielle Protonenpumpe funktionieren kann.

Einen Überblick über die Lage der mutierten Aminosäuren gibt Abbildung 2.11. Dort wird deutlich, dass sie alle entlang des intrazellulären Protonenzugangswegs zur Schiffbase liegen.

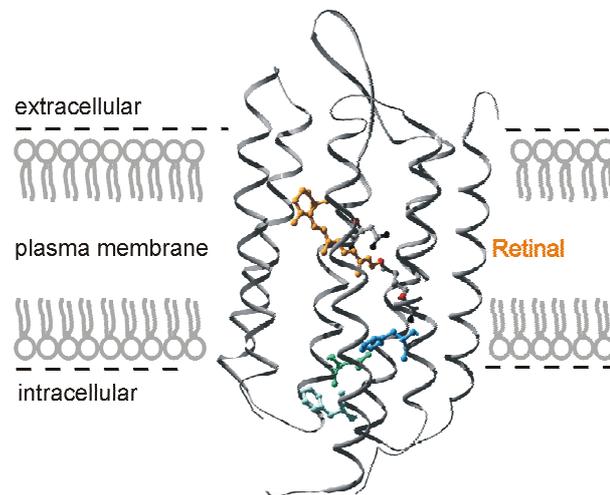


Abbildung 2.11: Dreidimensionales Strukturmodell für Bakteriorhodopsin nach den Koordinaten des Proteinstruktur-Datenbankeintrags 1CWG [135]. Der Chromophor Retinal (gelb) ist über eine Schiffbasen-Bindung an K216 gebunden. Der primäre Protonenakzeptor D85 liegt oberhalb (extrazellulär), der primäre Protonendonor D96 (grün) unterhalb (intrazellulär). Die Aminosäuren F219 und F171 sind blau bzw. hellblau markiert.

### 3.2.2 Grundlegende Unterschiede der Mutanten von BR<sub>WT</sub>

Alle untersuchten Mutanten generierten auf kontinuierliche Belichtung mit grünem Licht, ähnlich wie der Wildtyp (BR<sub>WT</sub>), einen auswärtsgerichteten stationären Photostrom (Abbildung 2.12 A-F). Dieses Verhalten indiziert ein auswärtsgerichtetes Protonenpumpen, wobei eine physiologisch-gerichtete (*right-side-out*) Insertion aller Mutanten in die Plasmamembran vorausgesetzt wird. Eine genauere Betrachtung von Abbildung 2.12 A – F jedoch offenbart, dass sowohl die Amplituden als auch die Zeitverläufe der Photoströme stark differieren. Auch die Abhängigkeit der stationären Ströme vom Membranpotential, dargestellt als I-U-Kennlinie (Abbildung 2.14), war stark verändert.

Blaulichtblitz-Experimente während und nach kontinuierlicher Belichtung mit grünem Licht erlauben die Bestimmung der relativen Menge an M-Intermediat. Für in Oozyten exprimiertes BR<sub>WT</sub> illustriert Abbildung 2.13 A den Aufbau und Zerfall des M-Intermediats während und nach grüner Hintergrundbelichtung, angezeigt durch die Amplituden blaulichtblitzinduzierter, einwärtsgerichteter

transienter Ströme, die zu verschiedenen Zeiten  $\Delta t$  nach An- bzw. Ausschalten der grünen Hintergrundbelichtung gemessen wurden. Jedes Stromsignal repräsentiert 12 übereinanderliegende Messungen mit unterschiedlichen Zeitintervallen (0.1 s – 1.2 s) zwischen Grünlicht an/aus und dem blauen Laserblitz.

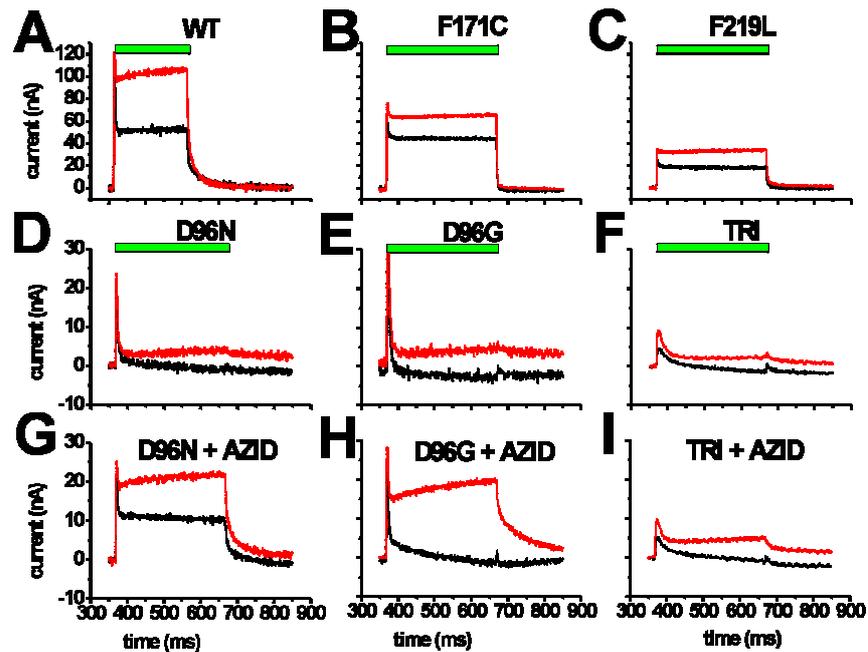


Abbildung 2.12: Photoströme von verschiedenen BR-Konstrukten bei 0 mV (rot) und -100 mV (schwarz) exprimiert in Oozyten von *Xenopus laevis*, in den ersten beiden Reihen gemessen bei pH 7.5, in der untersten Reihe gemessen bei pH 7.5 unter Zugabe von 20 mM Natriumazid. Die grünen Balken über den Stromsignalen bezeichnen die Zeitdauer der Belichtung mit grünem Licht. Die Beschriftungen über den Stromsignalen bezeichnen die jeweilige Mutation.

Nach Ausschalten des grünen Lichts beobachtete man in Oozyten (wie zuvor an HEK-293-Zellen) den langsamen Abfall der Amplitude der transienten Ströme (genauer die Ladung, d.h. das Integral des transienten Stroms) und daher der Menge an M-Intermediat mit typischen, spannungsabhängigen Zeitkonstanten von mehreren 100 ms (vergleiche Abbildung 2.7 und Abbildung 2.13). Die Verringerung der Amplituden der transienten Ströme im Vergleich zu HEK-293-Zellen ist auf die reduzierte Zeitauflösung in Spannungs-klemme-Experimenten an Oozyten zurückzuführen. Betrachtet man im Vergleich zu BR<sub>WT</sub> die zuvor genannten BR-Mutanten hinsichtlich der Zeitabhängigkeit und der Größe der Amplitude der blaulichtblitzinduzierten transienten Photoströme, so wird deutlich, dass

alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutanten Unterschiede in Bildung, Lebensdauer und Zerfall des M-Intermediats aufweisen (Abbildung 2.13 A – F).

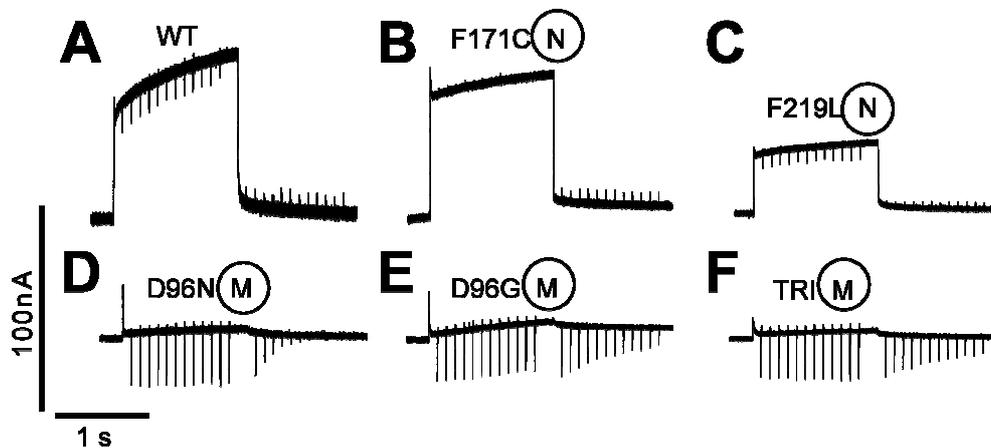


Abbildung 2.13: Blaulichtblitzinduzierte transiente Ströme gemessen an *Xenopus*-Oozyten, die die angegebenen BR-Mutanten exprimierten, bei pH 7.5 und 0 mV. Das Belichtungsprotokoll entsprach dem aus Abbildung 2.10, mit dem Unterschied, dass zwischen den blauen Laserblitzen 100 ms lagen. Alle 12 Messungen pro Mutante wurden überlagert, um die Amplituden der blaulichtblitzinduzierten transienten Ströme vergleichbar zu machen. In den Kreisen ist das durch die jeweilige Mutante angereicherte Intermediat angegeben. Im Vergleich zu Abbildung 2.7 ist die Zeitauflösung in Oozyten auf ca. 1 ms begrenzt (siehe oben), wodurch die Amplituden der schnellen transienten Ströme vergleichsweise klein erscheinen.

### 3.2.3 N-akkumulierende Mutanten (1): BR<sub>F171C</sub>

Abbildung 2.12 B zeigt typische Stromsignale der Mutante BR<sub>F171C</sub> bei 0 mV und bei –100 mV bei Belichtung mit grünem Licht. Die stationären Photoströme erreichten zum Teil Werte von über 100 nA bei 0 mV und lagen damit in derselben Größenordnung wie die des Wildtyps (Abbildung 2.12 A). Die Spannungsabhängigkeit des stationären Pumpstroms der Mutante BR<sub>F171C</sub> war jedoch deutlich schwächer als die von BR<sub>WT</sub>. Während der Strom des Wildtyps um beinahe 50 % reduziert war, wenn das Potential von 0 mV auf –100 mV geändert wurde, so war dieser Effekt bei BR<sub>F171C</sub> viel schwächer ausgeprägt. Demzufolge war auch die zugehörige I-U-Kurve (Abbildung 2.14 B), verglichen mit der von BR<sub>WT</sub> (Abbildung 2.14 A), flacher. Das apparente Umkehrpotential – bestimmt aus der linearen Extrapolation der I-U-Kurve – war zu negativen Potentialen hin verschoben: –280 mV im Vergleich zu –222 mV für BR<sub>WT</sub> (siehe Tabelle 2.2).

Dem stationären Strom ging ein transienter Strom voraus, der in Amplitude und Zeitverlauf BR<sub>WT</sub> ähnlich war. Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, werden Amplitude und Zeitverlauf des

transienten Stroms maßgeblich durch die Reaktion  $bR \rightarrow M$  bestimmt, während die Amplitude des stationären Stroms maßgeblich durch die Reaktion  $M \rightarrow bR$  limitiert wird. Der Quotient aus der Amplitude des transienten und des stationären Stroms ( $I_{\text{peak}}/I_{\text{stationary}}$ ) ist für die Konstrukte  $BR_{F171C}$  und  $BR_{WT}$  nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 2.2), woraus sich schließen lässt, dass die kinetischen Parameter der Photozyklen der Konstrukte  $BR_{F171C}$  und  $BR_{WT}$  ähnlich sind (siehe Diskussion). Das Abklingen des Photostroms nach Belichtungsende erschien für die Mutante  $BR_{F171C}$  auf den ersten Blick jedoch schneller zu sein, als für  $BR_{WT}$ , was auf einen schnelleren Photozyklus schließen ließe (vergleiche Abbildung 2.12 A und B).

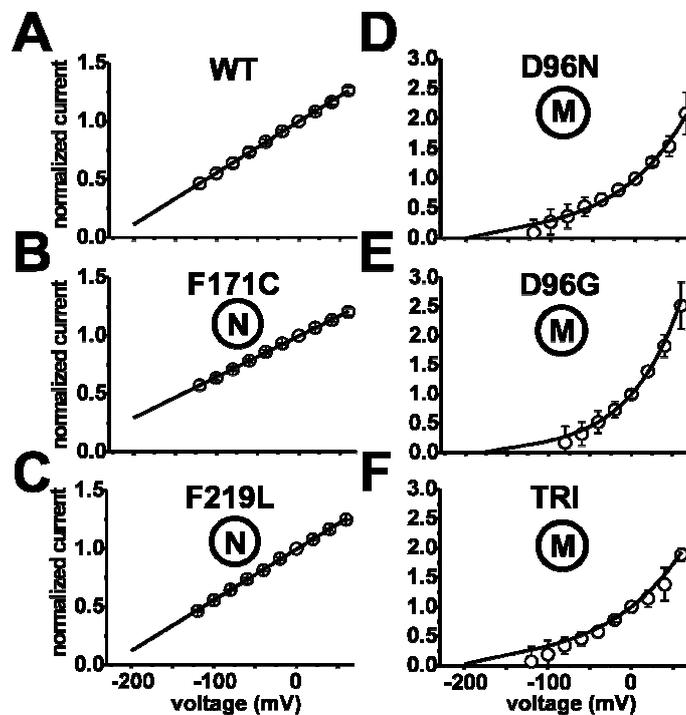


Abbildung 2.14: I-U-Kennlinien der angegebenen BR-Mutanten normiert auf den Strom bei 0 mV. Die überlagerten Anpassungen verdeutlichen die Verschiebung der apparenten Umkehrpotentiale. In den Kreisen ist das durch die jeweilige Mutante angereicherte Intermediat angegeben.

Eine genaue Analyse der Signalverläufe (Tabelle 2.2) offenbarte allerdings, dass der Zerfall, wie für  $BR_{WT}$ , aus zwei exponentiellen Komponenten ( $\tau_1$  und  $\tau_2$ ) besteht. Lediglich die relativen Amplituden beider Komponenten veränderten sich im Vergleich mit  $BR_{WT}$ , im Sinne einer viel größeren Amplitude der schnellen Komponente ( $\tau_1$ ). Die Zeitkonstanten selbst erscheinen im Rahmen der Fehlergrenzen gegenüber  $BR_{WT}$  unverändert ( $\tau_1 = 1 - 3$  ms limitiert durch das Messsystem;  $\tau_2 = 25 - 30$  ms bei 0 mV;

Tabelle 2.2), was andeutet, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ( $\tau_2$ ) zwischen BR<sub>F171C</sub> und BR<sub>WT</sub> nicht signifikant verändert ist. Erstaunlicherweise konnten unter grüner Hintergrundbelichtung für die Mutante BR<sub>F171C</sub> keine blaulichtblitzinduzierten, einwärtsgerichteten transienten Ströme beobachtet werden (Abbildung 2.13 B). Das deutet darauf hin, dass diese Mutante keine detektierbaren Mengen des M-Intermediats anreichert. Selbst bei negativen Potentialen waren nur kleine Mengen an M-Intermediat nachweisbar (Daten nicht gezeigt), und selbst dann erfolgte der Zerfall weitaus schneller als für BR<sub>WT</sub>. Obwohl die in BR<sub>F171C</sub> ausgetauschte Aminosäure im Vergleich zu den anderen in der vorliegenden Arbeit mutierten Aminosäuren die größte Distanz zur Schiffbase aufweist, ergab sich nur für diese BR-Mutante eine solch starke Reduktion des M-Intermediats.

| Mutante (n)   | WT (5)                 | F171C (6)              | F219L (4)              | D96N (6)                | D96G (5)                | Tripel (3)              |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $\emptyset I_{\text{stationary}} / \text{nA}$   | 95.7 ± 17.6            | 51.6 ± 13.0            | 40.2 ± 11.7            | 3.1 ± 1.7               | 2.7 ± 1.4               | 2.9 ± 0.6               |
| $\emptyset I_{\text{peak}} / \text{nA}$   | 124.97 ± 22.1          | 59.7 ± 16.1            | 44.0 ± 12.4            | 31.2 ± 6.5              | 52.3 ± 37.7             | 9.7 ± 2.9               |
| $I_{\text{peak}}/I_{\text{stationary}} (0 \text{ mV})$  | 1.31 ± 0.17            | 1.15 ± 0.04            | 1.11 ± 0.15            | 11.5 ± 3.4              | 20.6 ± 14.9             | 3.4 ± 1.2               |
| Umkehrpotential / mV  | -222                   | -280                   | -228                   | n.b                     | n.b                     | n.b                     |
| M-Zerfall $\tau_2 (0\text{mV}) / \text{ms}$   | 27.2 ± 2.2             | 30.9 ± 2.4             | 42.3 ± 6.9             | >300                    | >300                    | >300                    |
| M-Zerfall $\tau_3 (0\text{mV}) / \text{ms}$   | <100                   | <100                   | <100                   | >300                    | >1200                   | >1500                   |
| Expressionshöhe (N)<br>$\frac{I_{\text{stat}} (C \cdot s^{-1}) \cdot \tau_2 (s)}{1.6 \cdot 10^{-19} (C)}$ | 1.6 · 10 <sup>10</sup> | 1.0 · 10 <sup>10</sup> | 1.1 · 10 <sup>10</sup> | >0.6 · 10 <sup>10</sup> | >0.5 · 10 <sup>10</sup> | >0.5 · 10 <sup>10</sup> |

Tabelle 2.2: Charakteristische Parameter der untersuchten BR-Mutanten.

### 3.2.4 N-akkumulierende Mutanten (2): BR<sub>F219L</sub>

Abbildung 2.12 C zeigt typische grünlichtinduzierte Stromsignale der Mutante BR<sub>F219L</sub> bei 0 mV und -100 mV. Die stationären Photoströme waren im Vergleich zu BR<sub>WT</sub> auf 30 – 50 % vermindert, der  $I_{\text{peak}}/I_{\text{stationary}}$ -Wert jedoch vergleichbar groß wie für BR<sub>WT</sub> (Tabelle 2.2). Der Verlauf der I-U-Kurve ist nicht signifikant verändert im Vergleich zu BR<sub>WT</sub> (vergleiche Abbildung 2.13 A und C). Das apparente Umkehrpotential ist ähnlich zu dem für BR<sub>WT</sub> ermittelten: -228 mV (BR<sub>F219L</sub>) statt -222 mV (BR<sub>WT</sub>). Die langsame Komponente der Ausschaltrelaxation war, wie für BR<sub>F171C</sub> gezeigt, ebenso schnell wie

die von  $BR_{WT}$ , allerdings mit kleinerer Amplitude. Diese war jedoch immer noch größer als die von  $BR_{F171C}$  (vergleiche Abbildung 2.12 A, B und C und Tabelle 2.2).

Im Gegensatz zu den Messungen an  $BR_{F171C}$  konnten blaue Laserblitze auch bei Messungen an der Mutante  $BR_{F219L}$  transiente Einwärtsströme auslösen (Abbildung 2.13 C). Diese waren jedoch etwas kleiner als die von  $BR_{WT}$ , was ein weniger stark bevölkertes, wenn auch nicht völlig entleertes, M-Reservoir (wie bei der Mutante  $BR_{F171C}$ ) andeutet.

Die Experimente zeigen, dass die Eigenschaften der Mutante  $BR_{F219L}$  im Vergleich mit  $BR_{WT}$  geringfügig verändert sind. Obwohl weniger stark ausgeprägt, ähneln die beobachteten Unterschiede zu  $BR_{WT}$  tendenziell denen, die bei  $BR_{F171C}$  gefunden wurden.

### **3.2.5 M-akkumulierende Mutanten (1): $BR_{D96N}$**

Abbildung 2.12 D zeigt typische Stromsignale der M-anreichernden Punktmutante  $BR_{D96N}$  bei 0 mV und -100 mV bei Belichtung mit grünem Licht. Während der transiente Photostrom zu Belichtungsbeginn im Vergleich zu  $BR_{WT}$  reduziert war und lediglich ca. 25 % dessen Amplitude erreichte, war er doch verhältnismäßig groß verglichen mit dem stationären Strom, welcher mindestens 20-mal kleiner war als der von  $BR_{WT}$ . Infolgedessen war auch der  $I_{peak}/I_{stationary}$ -Wert drastisch verändert (Tabelle 2.2). Der schon bei 0 mV sehr kleine stationäre Photostrom verschwand bei -100 mV beinahe vollständig. Die I-U-Kurve war im Bereich 0 mV bis +60 mV für die Mutante  $BR_{D96N}$  viel steiler als für  $BR_{WT}$  (vergleiche Abbildung 2.14 A und D). Interessanterweise weicht die Spannungsabhängigkeit bei negativen Potentialen, bei denen die Stromamplituden klein sind, vom linearen Verhalten ab, und ein tatsächliches Umkehren des Pumpstroms war nicht zu beobachten. Die I-U-Kurve zeigt bei negativen Potentialen ein asymptotisches Verhalten. Während für  $BR_{WT}$  der Spannungsbereich des apparenten Umkehrpotentials nicht erschlossen werden konnte, und so kein Abflachen der I-U-Kennlinie zu beobachten war (außer in sehr geringem Maße bei einem extrazellulären pH-Wert von 5.5), konnte an der Mutante  $BR_{D96N}$  direkt verdeutlicht werden, wie die strikte Vektorialität von BR in seiner Eigenschaft als unidirektionale Protonenpumpe eine Umkehr des Protonenpumpens verhindert.

Der stationäre Photostrom von BR<sub>WT</sub> wird maßgeblich durch den langsamsten Prozess im Photozyklus, hier die langsame Komponente des M-Zerfalls ( $\tau_2$  des Ausschaltstroms), bestimmt. Die Zeitkonstante für diesen Prozess, die im Fall von BR<sub>WT</sub> ungefähr 25 ms bei 0 mV war, ist bei BR<sub>D96N</sub> entsprechend vergrößert. Eine Anpassung mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung ergab Zeitkonstanten von mehr als 250 ms bei 0 mV (Tabelle 2.2). Die Analyse des transienten Einschaltstroms ergab, dass dessen Zeitverlauf dem bei BR<sub>WT</sub> gleicht. Die Reaktion bR → M ist durch die Mutation also nicht signifikant beeinträchtigt.

Abbildung 2.13 C illustriert den anhand der blaulichtblitzinduzierten, einwärtsgerichteten transienten Ströme bestimmten langsamen Zerfall des M-Intermediats ( $\tau_3$ ) bei der Mutante BR<sub>D96N</sub>. Nach Ausschalten des grünen Lichts reduzierten sich die Amplituden der durch blaue Laserblitze ausgelösten transienten Ströme und damit die Menge an M-Intermediat mit einer verglichen mit BR<sub>WT</sub> sehr langsamen Zeitkonstante (> 300 ms im Vergleich zu 200 ms). Dieser Prozess wurde – in Analogie zu dem Verhalten von BR<sub>WT</sub> (siehe oben) – durch hyperpolarisierende Potentiale zusätzlich verlangsamt (> 1000 ms bei –100 mV; Daten nicht gezeigt).

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass Zugabe von Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) den verlangsamten Pumpzyklus der Mutante BR<sub>D96N</sub> auf BR<sub>WT</sub>-vergleichbare Wechselzahlen beschleunigt [159]. Tatsächlich sind in Gegenwart von 20 mM Natriumazid eine Erhöhung des stationären Photostroms und eine Beschleunigung des Zerfalls des Stromsignals nach Belichtungsende in Form einer reduzierten Zerfallszeitkonstante  $\tau_2$  deutlich erkennbar (Abbildung 2.12 E). Auch konnte in Gegenwart von 20 mM Natriumazid der erwartete schnellere Zerfall aus dem M-Intermediat, zu erkennen an kleineren (unter Hintergrundbelichtung) und schneller verminderten (nach Hintergrundbelichtungsende) Amplituden der blaulichtblitzinduzierten, einwärtsgerichteten transienten Ströme, beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Funktion der defekten Protonenpumpe BR<sub>D96N</sub> konnte also durch Zugabe von Natriumazid wiederhergestellt werden, wobei der Verlust der primären Protonendonator-Gruppe für die Reprotonierung der Schiffbase durch Natriumazid kompensiert wird.

### 3.2.6 M-akkumulierende Mutanten (2): BR<sub>D96G</sub>

Für die Mutante BR<sub>D96G</sub> erwartet man ein ähnliches Verhalten wie für BR<sub>D96N</sub>, da beiden Mutanten die primäre Protonendonator-Gruppe entfernt wurde, und spektroskopische Messungen ähnliche Photozyklen nahe legen [159]. Dementsprechend glichen sich die Photoströme beider Mutante (vergleiche Abbildung 2.12 D und E). Wie BR<sub>D96N</sub>, zeigte auch BR<sub>D96G</sub> über den gesamten Spannungsbereich relativ große transiente Ströme zu Belichtungsbeginn, gefolgt von sehr kleinen stationären Strömen, die nach Belichtungsende langsam abfielen ( $\tau_2 > 300$  ms; Tabelle 2.2). Die stationären Ströme beider Mutanten (BR<sub>D96G</sub> und BR<sub>D96N</sub>) lagen bei 0 mV in derselben Größenordnung. Bei Potentialen von -100 mV, bei denen die Mutante BR<sub>D96N</sub> immer noch geringe stationäre Pumpaktivität zeigte, verschwand der stationäre Pumpstrom für die Mutante BR<sub>D96G</sub> völlig. Dies spiegelt sich in einer im Vergleich zu BR<sub>D96N</sub> steileren, erneut asymptotischen I-U-Kennlinie wider (Abbildung 2.14 E).

Durch die Zugabe von 20 mM Natriumazid erhöhten sich für BR<sub>D96G</sub> – ähnlich wie für BR<sub>D96N</sub> – die stationären Pumpströme bei 0 mV, während sich die transienten Ströme beider Mutanten kaum änderten. Der Unterschied in der Spannungsabhängigkeit der stationären Photoströme zwischen beiden Mutanten wurde durch die Zugabe von 20 mM Natriumazid allerdings noch verstärkt. Der stationäre Photostrom der Mutante BR<sub>D96N</sub> wurde über den gesamten Spannungsbereich entscheidend größer. Der stationäre Photostrom der Mutante BR<sub>D96G</sub> dagegen stieg nur bei 0 mV deutlich, bei -100 mV jedoch kaum an (vergleiche Abbildung 2.12 G und H), so dass sich nach Zugabe von 20 mM Natriumazid für die Mutante BR<sub>D96G</sub> eine viel steilere I-U-Kennlinie ergab als für die Mutante BR<sub>D96N</sub>.

Blaulichblitz-Experimente unter kontinuierlicher Hintergrundbelichtung ergaben für BR<sub>D96G</sub> eine ähnlich starke Anreicherung des M-Intermediats wie für BR<sub>D96N</sub>, wobei der Zerfall des M-Intermediats zusätzlich verlangsamt war ( $\tau_3 > 1200$  ms bei 0 mV; Tabelle 2.2).

### 3.2.7 M-akkumulierende Mutanten (3): Die „Tripel“-Mutante BR<sub>D96G,F171C,F219L</sub>

Die für die „Tripel“-Mutante BR<sub>D96G,F171C,F219L</sub> beobachteten Photoströme infolge kontinuierlicher Belichtung mit grünem Licht ähnelten in ihrem Verhalten auf den ersten Blick denen der Mutanten BR<sub>D96G</sub> und BR<sub>D96N</sub>. Die stationären Ströme waren klein, während die ihnen vorangehenden transienten Ströme relativ groß waren (Abbildung 2.12 F). Nach Belichtungsende zerfielen die stationären Ströme mit großen Zeitkonstanten ( $\tau_2 > 300$  ms). Ebenso konnte eine stark ausgeprägte Akkumulation von M unter Hintergrundbelichtung beobachtet werden, und der Zerfall aus M war langsam ( $\tau_3 > 1500$  ms; Abbildung 2.13 F). Die I-U-Kennlinie (Abbildung 2.14 F) war steiler als bei BR<sub>WT</sub> und zeigte bei negativen Potentialen ein asymptotisches Verhalten. Die Erhöhung der stationären Pumpströme nach Zugabe von 20 mM Azid fiel jedoch kleiner aus als bei den Mutanten BR<sub>D96G</sub> und BR<sub>D96N</sub> (Abbildung 2.12 I). Zusammenfassend sind die Eigenschaften der „Tripel“-Mutante BR<sub>D96G,F171C,F219L</sub> und der Mutanten BR<sub>D96G</sub> und BR<sub>D96N</sub> sehr ähnlich. Jedoch gibt es einige Eigenschaften, die merklich von denen der anderen Mutanten und BR<sub>WT</sub> abweichen. Erstens waren Anstieg und Abfall der transienten Ströme bei Belichtungsbeginn verlangsamt, was man im Rahmen eines einfachen Reaktionsmodells ( $bR \rightarrow M \rightarrow bR$ ) als eine verlangsamte Bildung von M verstehen muss. Zweitens führten Blaulichtblitz-Experimente selbst Minuten nach Belichtungsende noch zu einwärtsgerichteten transienten Strömen, anstelle der – aufgrund der Restabsorption des Grundzustands erwarteten – auswärtsgerichteten Ströme (Abbildung 2.15). Dies könnte andeuten, dass auch im Dunkeln ein kleiner Anteil des Proteins bereits spontan in den M-Zustand überführt wird.

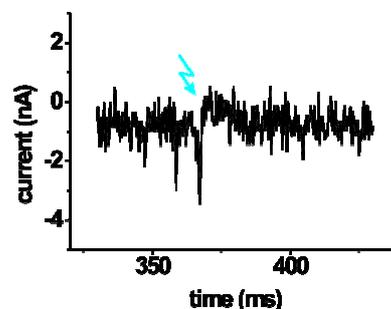


Abbildung 2.15: Blaulichtblitzinduzierter transienter Photostrom der „Tripel“ Mutanten BR<sub>D96G,F171C,F219L</sub> ohne Vorbelichtung.

### 3.3 Proteorhodopsin

#### 3.3.1 Einleitung

Die Stabilisierung oder Destabilisierung des M-Intermediats nimmt großen Einfluss auf die Pumpaktivität von BR. Eine ganz entscheidende Rolle spielen dabei die Protonierungsverhältnisse am primären Protonendonator für die Reprotonierung der Schiffbase D96 (siehe oben) und am primären Protonenakzeptor D85 [126,158]. Die kürzlich entdeckten Retinalproteine aus dem Ascomyceten *Neurospora crassa* (NOP-I = Neurospora opsin 1) [166,183,184] und einem Meeresbakterium der  $\gamma$ -Proteobakterien-Klasse (Proteorhodopsin) [161-164] haben gemeinsam, dass die homologen Aminosäuren des primären Protonenakzeptors (D85 in BR) konserviert sind, während die homologen Aminosäuren des primären Protonendonors (D96 in BR) zu Glutamaten verändert sind. Da die physiologische Funktion dieser Retinalproteine noch völlig unklar ist, und sie sowohl als Ionenpumpen als auch als Lichtsensoren arbeiten könnten, stellte sich die Frage, ob diese Proteine ähnliche Pumpaktivitäten wie BR aufweisen bzw. inwiefern diese verändert sind. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die cDNAs beider Proteine *ab initio* aus Oligonukleotiden synthetisiert, und zwar nach einem neuartigen Verfahren, das eine Abwandlung der sogenannten rekursiven PCR [167] für die Erstellung synthetischer Gene darstellt. Genauere Angaben zu diesem im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu eingeführten Verfahren finden sich im Abschnitt Material und Methoden. Im folgenden Teil werden ausschließlich die nach Überexpression von Proteorhodopsin erhaltenen Ergebnisse besprochen. Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Rolf Kalmbach, Igor Chizov und Martin Engelhard vom MPI für molekulare Physiologie in Dortmund (Expression von Proteorhodopsin in *Escherichia coli*, Aufreinigung und UV/VIS-Spektroskopie) und Kenichi Ataka und Joachim Heberle vom Forschungszentrum in Jülich (FT-IR-Spektroskopie) wurden die spektroskopischen Eigenschaften des Proteorhodopsins bestimmt. Auch die sich daraus ergebenden Resultate sind im Folgenden kurz beschrieben, da sie zur Interpretation der anschließenden Transportmessungen sehr hilfreich sind. Details zu den spektroskopischen Messungen finden sich in [173]. Um seine Ionentransporteigenschaften zu untersuchen, wurde Proteorhodopsin einer elektrophysiologischen Charakterisierung an künstlichen Lipidmembranen und in *Xenopus*-Oozyten unterzogen.

### 3.3.2 Der pK<sub>a</sub> des primären Protonendonors D97

Das Absorptionsspektrum von rekonstituiertem Proteorhodopsin zeigt zwei vorherrschende Absorptionsmaxima: das der Chromophorbande bei 518 nm bzw. 539 nm (pH-abhängig; siehe unten) und das der Proteinbande bei 280 nm. Ein weiteres kleines Absorptionsmaximum bei 360 nm resultiert aus der  $\beta$ -Bande des Chromophors. Der Chromophor kann durch Hydroxylamin gebleicht werden [162,169,171], was genutzt werden kann, um den molaren Extinktionskoeffizienten zu bestimmen [185]. Das Absorptionsmaximum des Chromophors ist reversibel vom pH-abhängig. Es verschiebt sich von 518 nm bei pH 12 ( $\epsilon_{\max} = 43900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) zu 539 nm bei pH 4 ( $\epsilon_{\max} = 44900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Abbildung 2.16 A). Um den apparenten pK<sub>a</sub> zu bestimmen, wurden die pH-abhängigen Spektren an vier asymmetrische Gaußfunktionen (3 für den Chromophor und eine für die Proteinbande) angepasst (Gleichung 2.2, [186,187]).

$$A(\lambda) = \epsilon_{\max} \cdot \exp \left\{ -\frac{\ln 2}{(\ln \rho)^2} \left[ \ln \frac{(1/\lambda - 1/\lambda_{\max})(\rho^2 - 1)}{\Delta\nu\rho} + 1 \right]^2 \right\} \quad (2.2)$$

( $\epsilon_{\max}$  = Extinktionsmaximum;  $\rho$  = Symmetriefaktor;  $\Delta\nu$  = halbmaximale Bandbreite;  $\lambda_{\max}$  = Absorptionsmaximum)

Die Absorption aufgrund von Rayleigh-Streuung wurde durch eine Funktion der Form  $A+B/\lambda^C$  abgeschätzt und in die Anpassungsfunktion einbezogen (IGOR Pro, WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA). Die sich ergebende Titrationskurve konnte mit einem Hill-Koeffizienten von 0.67 und einem pK<sub>a</sub> von 7.68 an eine Hill-Funktion angepasst werden (Abbildung 2.16 A, Einfügung). Ähnliche pH-abhängige Farbänderungen wurden auch für BR beobachtet und dort dem Protonierungsstatus des Gegenions der Schiffbase – D85 (pK<sub>a</sub> ~ 2.6) – zugeordnet [188,189]. In Proteorhodopsin wurden diese Änderungen der korrespondierenden Aminosäure D97 und dieser folglich der pK<sub>a</sub>-Wert von 7.68 zugeordnet.

Um den pH-abhängigen Protonierungsstatus dieses Aspartat-Rests genauer aufzulösen, wurde FT-IR-Differenzspektroskopie mit ATR-(*attenuated total reflection*)-Technik angewendet [190]. Abbildung 2.16 B zeigt 3 repräsentative Differenzspektren, bei denen der pH-Wert der Probe von einer Referenz

bei pH 9.1 zu pH 8.7, 8.0 und 7.2 vermindert wurde. Die größte negative Bande der Differenzspektren zeigte sich bei  $1541\text{ cm}^{-1}$  und kann der C=C Streckschwingung des Retinals in der alkalischen Proteorhodopsin-Form zugeordnet werden [191]. Die korrespondierende Schwingung der azidischen Form liegt bei  $1526\text{ cm}^{-1}$ . Die positive Bande bei  $1717\text{ cm}^{-1}$  wird einer C=O Streckschwingung zugeordnet, die wahrscheinlich auf der Protonierung eines Aspartats oder Glutamats beruht. Diese Zuordnung wird weiterhin unterstützt durch simultanes Erscheinen von negativen Banden bei  $1382\text{ cm}^{-1}$  und  $1577\text{ cm}^{-1}$ , welche auf symmetrischen und asymmetrischen Streckschwingungen der korrespondierenden Carboxylat-Gruppen basieren. In Analogie zu BR wurden diese Banden D97 zugeordnet [192,193]. Die Protonierung anderer Carboxylat-Gruppen an der Oberfläche des Proteins kann ausgeschlossen werden, denn ihr  $pK_a$  liegt bei pH 4.7. Der  $pK_a$  von E108 (D96 in BR) dagegen muss höher als 8.5 sein (siehe unten).

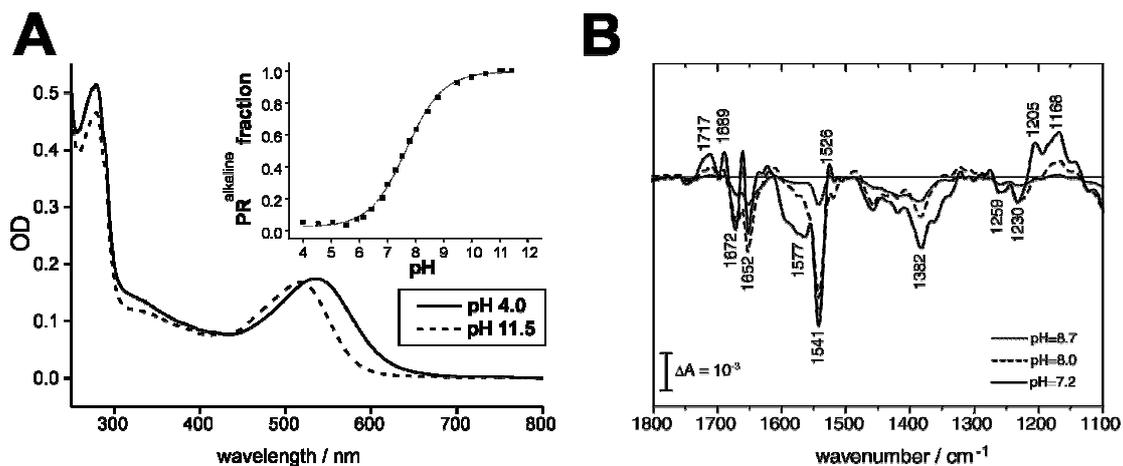


Abbildung 2.16: (A) Absorptionsspektren von Proteorhodopsin bei pH 4 und 11.5. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 539 nm ( $\text{PR}^{\text{acidic}}$ ) nach 518 nm ( $\text{PR}^{\text{alkaline}}$ ). Der eingefügte Graph zeigt die Titrationskurve des  $\text{PR}^{\text{acidic}} \rightarrow \text{PR}^{\text{alkaline}}$  Übergangs. (B) pH-induzierte Infrarot-Differenzspektren von Proteorhodopsin. Die Spektren sind Differenzspektren der Probe bei pH 8.7 (gepunktete Linie), 8.0 (gestrichelte Linie), 7.2 (durchgezogene Linie) und dem Spektrum bei pH 9.1, welches als Referenzspektrum verwendet wurde. Die horizontale Linie repräsentiert die Nulllinie der Absorptionsänderung. Die durch Beschriftung markierten Banden werden im Text beschrieben.

### 3.3.3 Zeitaufgelöste UV/VIS-Spektroskopie: Temperatur- und pH-Abhängigkeit des Proteorhodopsin-Photozyklus

Durch die Messung transienter Absorptionsänderungen in Analogie zu publizierten Verfahren [182] wurden die kinetischen Parameter der Photozyklen der alkalischen und azidischen Form von

Proteorhodopsin bei Temperaturen zwischen 0 °C und 50 °C (in 10 °C Schritten) und bei sechs verschiedenen pH-Werten zwischen pH 10 und pH 5 (in Schritten von einer pH-Einheit) bestimmt (repräsentative Daten in Abbildung 2.17 A). Für jeden Datensatz wurde die Messwellenlänge zwischen 330 nm und 700 nm (in 10 nm Schritten) verändert. Die in Abbildung 2.17 A präsentierten Daten sind charakteristisch für Abbau und Bildung des Grundzustands (530 nm), eines M-ähnlichen Intermediats (410 nm) und eines K- oder O-ähnlichen Intermediats (580 nm). Generell ist der Photozyklus von Proteorhodopsin bei  $\text{pH} \gg 7.68$  ähnlich dem von BR inklusive der Bildung von M- und O-ähnlichen Intermediaten [161,162] mit der Ausnahme, dass kein L-Intermediat gefunden werden konnte. Bei  $\text{pH} \ll 7.68$  dagegen war kein M nachweisbar, und es konnten lediglich Intermediate mit bathochrom verschobenen Absorptionsmaxima gefunden werden (Abbildung 2.17 B).

Die Datensätze bei beiden pH-Werten können mit einer Summe aus 6 Exponentialfunktionen umfassend beschrieben werden, worauf aufbauend die Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Photozyklen möglich ist (Daten nicht gezeigt). Aus dieser Anpassung ergibt sich analog zu BR ein unidirektionales, zyklisches Reaktionsschema (Abbildung 2.17 B, vergleiche [182]). Bei dem Photozyklus der alkalischen Form setzen sich die Intermediate  $P_1 - P_6$  aus spektralen Analogon zu den BR-Intermediaten K, M, N und O zusammen, wobei lediglich  $P_1$  kinetisch und spektral direkt zu K korrespondiert, während sich  $P_2 - P_6$  aus temperaturabhängigen Gleichgewichten von mindestens zwei Intermediaten ergeben.  $P_2$  und  $P_3$  bestehen aus Gleichgewichten von K- ( $\text{PR}_{560\text{nm}}$ ) und M- ( $\text{PR}_{410\text{nm}}$ ),  $P_4 - P_6$  aus einer Mischung von M- ( $\text{PR}_{410\text{nm}}$ ), N- ( $\text{PR}_{530\text{nm}}$ ) und O- ( $\text{PR}_{580\text{nm}}$ ) ähnlichen Intermediaten (Abbildung 2.17 B oben). Der Photozyklus der azidischen Form besteht nur aus bathochrom verschobenen, K- oder O-ähnlichen Intermediaten mit Absorptionsmaxima um 580 nm (Abbildung 2.17 B unten). Erstaunlicherweise ergibt sich keine pH-abhängige Veränderung der Zeitkonstanten. Alle Photozyklus-Messungen wurden mit lichtadaptierten Proben durchgeführt, die in der azidischen Form 20 % und in der alkalischen Form 40 % *13-cis* Retinal enthielten. Ein überlagerter *13-cis* Photozyklus kann daher nicht ausgeschlossen werden.

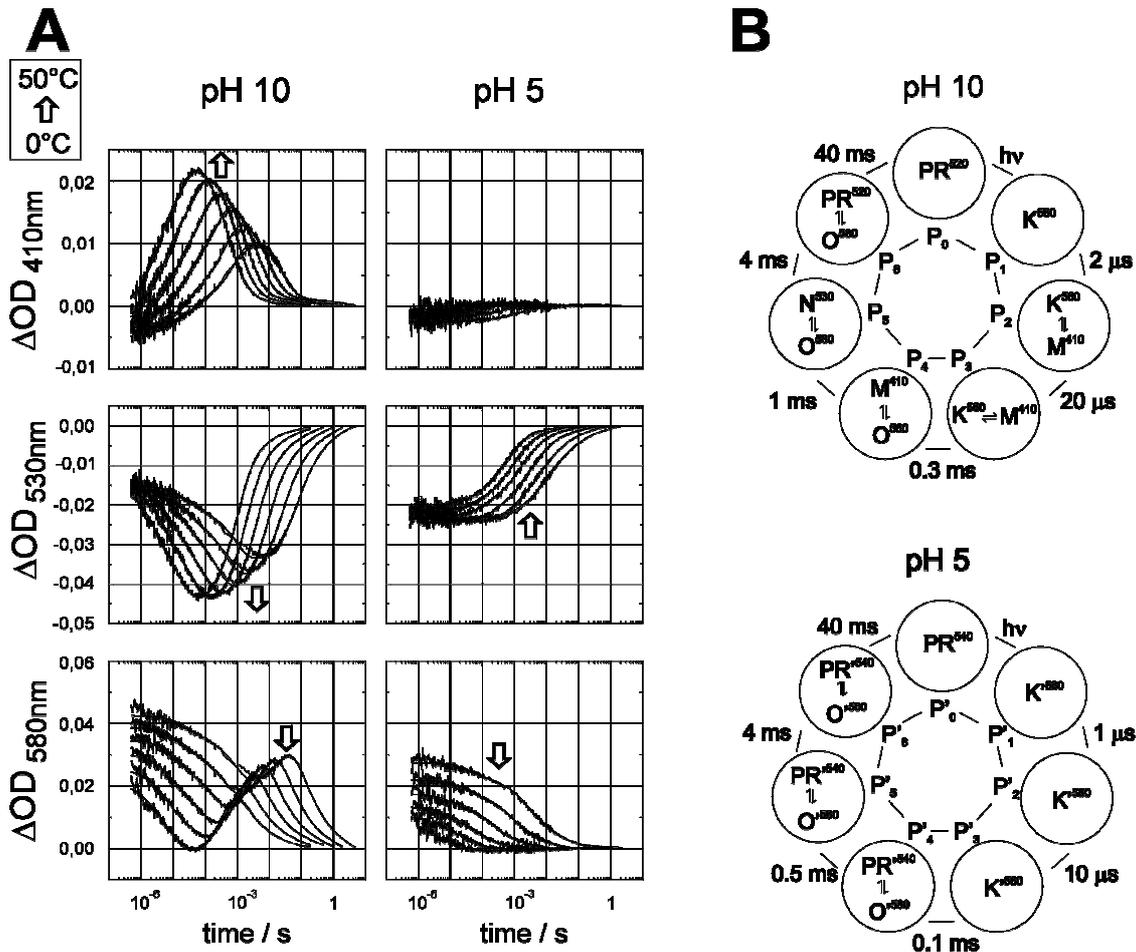


Abbildung 2.17: (A) Transiente Absorptionsänderungen von Proteorhodopsin bei Temperaturen zwischen 0 °C und 50 °C in 10 °C Schritten. Die linken Messkurven wurden bei pH 10, die rechten bei pH 5 aufgezeichnet. Die Pfeile bezeichnen die Änderung des Kurvenverlaufs bei steigender Temperatur. Die gewählten Wellenlängen sind charakteristisch für den Grundzustand PR (530 nm), ein M-ähnliches (410 nm) und K- und O-ähnliche Intermediate (580 nm), wobei diese Zuordnung in Analogie zu den Intermediaten des BR-Photozyklus vorgenommen wurde. Die Resultate multiexponentieller Anpassungen an die Messkurven sind als durchgezogene Linien dargestellt. (B) Photozyklus-Modelle von PR<sup>alkaline</sup> und PR<sup>acidic</sup> wie aus (A) abgeleitet.

### 3.3.4 Zeitaufgelöste FT-IR-Spektroskopie

Um strukturelle und dynamische Informationen über Proteorhodopsin zu erhalten, wurde zeitaufgelöste Step-Scan FT-IR-Spektroskopie in Analogie zu publizierter Vorgehensweise [194,195] im Zeitbereich 7 μs – 200 ms bei 3 verschiedenen pH-Werten (4.9, 7.0 und 8.5) angewendet. Dies erlaubte insbesondere, die Protonierungsgrade der Carboxyl-Reste, der Schiffbase und des primären Protonenakzeptor/donorpaars D97/E108 zeitaufgelöst zu untersuchen. Zeitaufgelöste FT-IR-Spektroskopie erlaubte weiterhin, die Bildung von BR-analogen Photozyklus-Intermediaten im Vergleich mit den UV/VIS-spektroskopischen Messungen nachzuvollziehen.

Die FT-IR-Differenzspektren 14  $\mu$ s nach dem Laserblitz waren mit einer Ausnahme unabhängig vom pH-Wert (Abbildung 2.18 A, oben): Im Absorptionsbereich der C=C Streckschwingung des Retinals war die Frequenz der negativen Bande stark pH-abhängig. Bei pH 4.9 (unteres Spektrum) lag das Minimum bei  $1529\text{ cm}^{-1}$ , was nahe der Frequenz der azidischen Form liegt ( $1526\text{ cm}^{-1}$ , Abbildung 2.16 B), wie sie aus den pH-Titrationsexperimenten bestimmt wurde. Die Intensität der Schulter bei  $1540\text{ cm}^{-1}$  vergrößerte sich bei zunehmendem pH-Wert. Diese Frequenz wird der C=C Streckschwingung der alkalischen Form des Proteorhodopsins zugeordnet (Abbildung 2.16 B), wobei zu beachten ist, dass auch bei pH 8.5 die azidische Form immer noch zu ungefähr 10 % zum Spektrum beiträgt. In der alkalischen Form des Proteorhodopsins ist die höchste Konzentration des M-Intermediats nach ungefähr 1 ms nach der Laserblitzanregung erreicht (Abbildung 2.17 A). Dementsprechend zeigen die korrespondierenden 1-ms-Differenzspektren charakteristische Eigenschaften des M-Zustands, insbesondere das Auftauchen einer positiven Bande im Frequenzbereich um  $1700\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 2.18 A, unten, oberes Spektrum). Die Bande bei  $1755\text{ cm}^{-1}$  kann der C=O Streckschwingung der primären Protonenakzeptor-Gruppe D97 zugeordnet werden, da diese Bande bei  $\text{pH} < 7.68$  zunehmend verschwindet (Abbildung 2.18 A, unten, unteres Spektrum). D97 ist bei diesem pH-Wert nämlich schon im Dunkelzustand protoniert. Zwar liegt die Bande der C=O Streckschwingung von D97 des Proteorhodopsin  $6\text{ cm}^{-1}$  niedriger als die des D85 im M-Zustand des BR, aber ihre Lage ist identisch zu der der Banden der darauffolgenden Intermediate N und O [194]. Die negative Bande bei  $1384\text{ cm}^{-1}$ , die bei niedrigen pH-Werten verschwindet, korrespondiert mit der symmetrischen Streckschwingung der Carboxylat-Gruppe des D97 (Abbildung 3 A). Die Identität der korrespondierenden Frequenzen in BR [196,197] erlauben diese direkte Zuordnung.

Im Carbonyl-Gruppen sensitiven Bereich des 1-ms-Differenzspektrums von Proteorhodopsin sind kleine Differenzbanden bei  $1728\text{ cm}^{-1}$  (–) und bei  $1717\text{ cm}^{-1}$  (+) zu beobachten. Da beide Banden durch  $\text{H}_2\text{O} - {}^2\text{H}_2\text{O}$  Austausch nach unten verschoben werden (Daten nicht gezeigt), können sie der C=C Streckschwingung der Glutamate und Aspartate zugeordnet werden. In Analogie zu der Zuordnung in BR [198] ist die negative Bande bei  $1728\text{ cm}^{-1}$  der C=O Streckschwingung der primären Protonendonator-Gruppe E108 zuzuordnen. Die maximale Anreicherung der deprotonierten Form der

primären Protonendonator-Gruppe E108 ist in der alkalischen Form des Proteorhodopsins nach 10 ms erreicht (Abbildung 2.19 B). In der azidischen Form reichert sie sich dagegen bei Weitem nicht so stark an, da die Reptonierung bei niedrigem pH wesentlich beschleunigt ist. Dieses pH-abhängige kinetische Verhalten stimmt mit Beobachtungen überein, die für die primäre Protonendonator-Gruppe in BR (D96) gemacht wurden [196]. Die niedrigere Frequenz der Bande, die den Protonierungsstatus des E108 anzeigt, im Vergleich zu dem korrespondierenden Wert für D96 in BR ( $1742\text{ cm}^{-1}$ ), deutet auf ein stärkeres Wasserstoffbrücken-Netzwerk hin. Da die Differenzbande auch bei pH 8.5 unverändert ist, kann geschlossen werden, dass der  $pK_a$  von E108 größer als 8.5 ist.

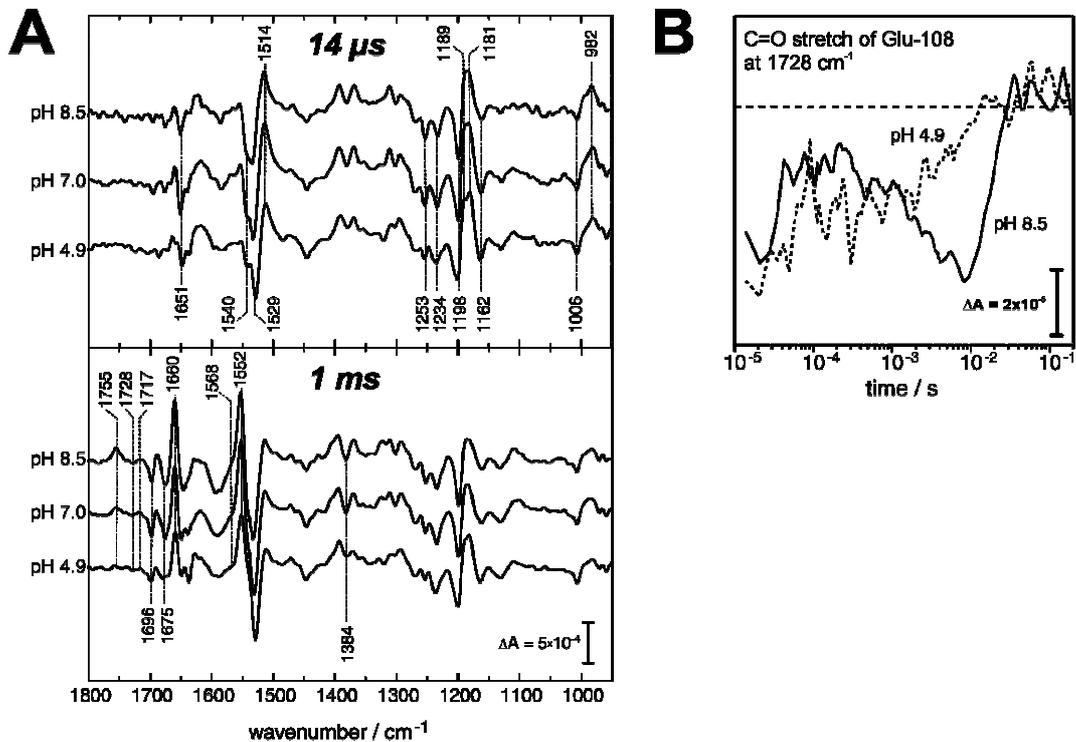


Abbildung 2.18: (A) Lichtinduzierte Infrarot-Differenzspektren von Proteorhodopsin (oben) 14  $\mu\text{s}$  und (unten) 1 ms nach Laserblitzanregung. Die Differenzspektren wurden durch zeitaufgelöste Step-Scan-Experimente bei pH 8.5 (jeweils obere Kurve), pH 7.0 (jeweils mittlere Kurve) und pH 4.9 (jeweils untere Kurve) erhalten. Die durch Beschriftung markierten Banden werden im Text beschrieben. (B) Zeitverlauf der Absorptionsänderung bei  $1728\text{ cm}^{-1}$ , der Wellenzahl, die die Deprotonierungs-/Reptonierungsreaktion von E108 indiziert. Die Daten wurden den zeitaufgelösten Step-Scan-Experimenten entnommen (pH 8.5 durchgezogene Linie, pH 4.9 gestrichelte Linie). Die horizontale Linie repräsentiert die Nulllinie der Absorptionsänderung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels zeitaufgelöster FT-IR-Spektroskopie gezeigt wurde, dass der auffälligste Unterschied zwischen der auswärts- und einwärtspumpenden Form des

Proteorhodopsins auf dem jeweiligen Protonierungsstatus von D97 beruht. Alle anderen spektralen Unterschiede zwischen beiden Formen, zum Teil detaillierter dargestellt in [173], sind im Wesentlichen pH-unabhängig.

### **3.3.5 Photoströme von Proteorhodopsin an künstlichen Lipidmembranen**

Durch kontinuierliche Belichtung von Proteorhodopsin-Präparationen an künstlichen Lipidmembranen mit gelbem Licht bei pH 7 konnten charakteristische Photoströme beobachtet werden (Abbildung 2.19 A,B). In Abwesenheit von Ionophoren war das Stromsignal biphasisch und offenbarte drei eindeutig trennbare Relaxationsprozesse: Eine rasche Auslenkung ins Negative, der eine schnelle Phase folgte, während der das Signal seine Polarität änderte, und einen nachfolgenden langsamen Zerfall zur Grundlinie zurück (Abbildung 2.19 A). Die Zeitkonstante des langsamen Zerfalls spiegelt den Ladungsprozess der elektrischen Kapazität des Verbundmembransystems wider (siehe Material und Methoden). Nach Zugabe der Ionophoren 1799 (Protonophor) und Monensin ( $\text{Na}^+, \text{K}^+/\text{H}^+$ -Austauscher) blieben die ersten beiden Phasen unverändert. Nun aber entwickelte sich ein positiver stationärer Strom (Abbildung 2.19 B), der kontinuierliches Pumpen verdeutlicht. Die Ionophoren permeabilisieren das Membransystem für Protonen und  $\text{Na}^+$ -Ionen. Der Ionophor Triphenylzinn ( $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$  Austausch, [199]) veränderte die Amplitude der Photoströme nicht (Daten nicht gezeigt). Da alle Signale nicht  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  abhängig waren, ist anzunehmen, dass die Pumpströme von Protonen getragen werden.

Die stationären Ströme von Proteorhodopsin bei pH 7 zeigen umgekehrte Polarität zu entsprechenden BLM-Experimenten, die mit BR in Purpurmembranfragmenten oder rekonstituiert in Proteoliposomen durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt). Dies kann auf eine – im Gegensatz zu BR – *right-side-out* Orientierung von Proteorhodopsin in den Proteoliposomen-Präparationen zurückgeführt werden. Ein positiver Strom entspricht demnach einem auswärtsgerichteten Protonenstrom sowohl in Bezug auf das Molekül selbst (wobei D97 als extrazellulär bezüglich der Schiffbase angenommen ist), als auch in Bezug auf die Proteoliposomen (siehe Diskussion). Wie bei BR führte Belichtung mit blauem Licht

– zusätzlich zu kontinuierlicher Belichtung mit gelbem Anregungslicht – zu einer Reduzierung der stationären Photoströme (Abbildung 2.19 B).

Bei pH 10 war die negative transiente Stromkomponente nicht vorhanden und die auswärtsgerichteten Ströme entsprachen – erneut mit umgekehrter Polarität – denen von BR. Die stationären Ströme waren jedoch unter diesen Bedingungen relativ klein, was auf die niedrige Effizienz der Ionophoren bei diesem pH-Wert zurückzuführen ist. Bei pH 5 wurden negative stationäre Photoströme beobachtet. Da die Adsorption der Liposomen an die Lipidmembran immer bei pH 7 durchgeführt wurde, ist eine Umorientierung des Proteorhodopsins innerhalb der Liposomen durch die pH-Änderung als Erklärung für dieses Phänomen auszuschließen. Die Umkehr des Pumpstroms bei pH-Werten, bei denen den spektroskopischen Daten zufolge D97 protoniert ist, lässt vermuten, dass der Protonierungsstatus von D97 starken Einfluss auf die Vektorialität des Protonenpumpens hat.

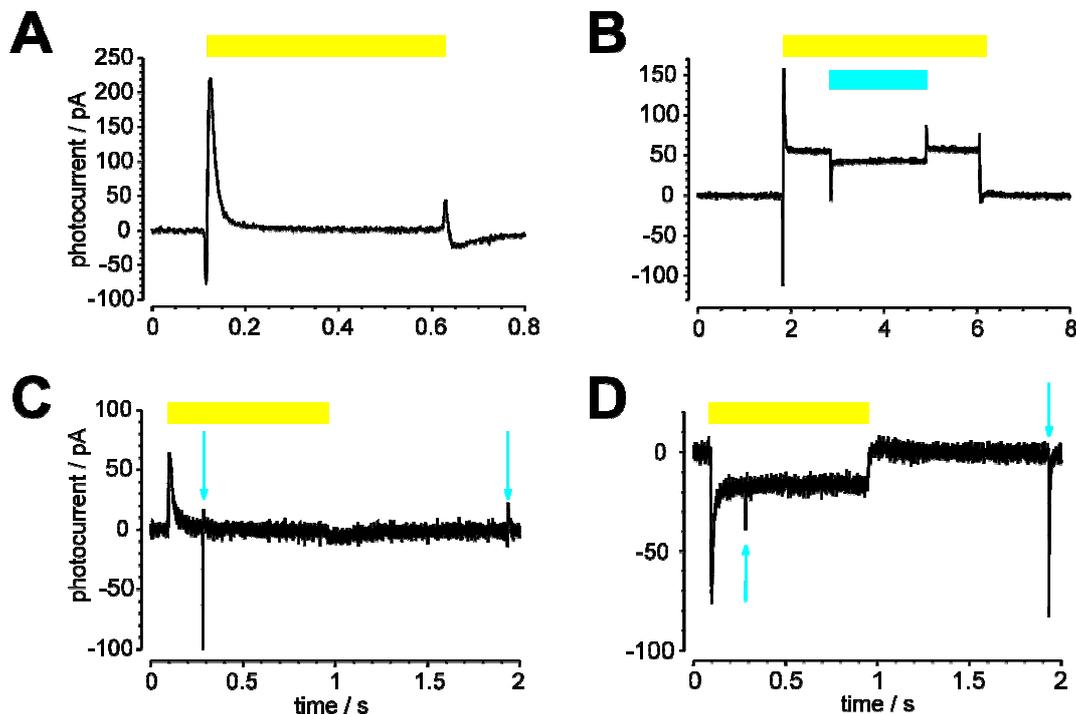


Abbildung 2.19: Photoströme von in Proteoliposomen rekonstituiertem Proteorhodopsin angelagert an BLMs. Gelbe Balken bezeichnen Belichtung mit gelbem Licht. (B) Blaue Balken oder (C und D) Pfeile bezeichnen zusätzliche Belichtung durch kontinuierliches blaues Licht (Osram XBO110W, Schott K40 Filter,  $400 \pm 25$  nm) oder durch blaue Laserblitze. Photoströme bei pH 7 (A) in Abwesenheit und (B) in Gegenwart der Ionophoren 1799 und Monensin. (C) Photoströme bei pH 10 und (D) Photoströme bei pH 5.2 jeweils in Gegenwart der Ionophoren 1799 und Monensin. Die stationären Ströme bei pH 10 sind kleiner als bei pH 7, weil die Ionophoren bei pH 10 mit niedrigerer Effizienz arbeiten. Alle Experimente dieser Abbildung wurden in 100 mM Natrium-Glukonat Puffer durchgeführt.

**3.3.5.1 Blaulichtblitz-Experimente**

Die zeitaufgelösten Absorptionsspektren aus Abbildung 2.18 zeigen, dass bei alkalischem pH ein M-Intermediat gebildet wird, welches bei azidischem pH nicht detektierbar ist. Folglich ließ sich bei pH 10 (unter kontinuierlicher gelber Belichtung) ein großer, einwärtsgerichteter transienter Strom, ausgelöst durch Blaulichtblitze, finden (vergleichbar zu BR). Blaulichtblitze mehrere 100 ms nach Belichtungsende lösten nur kleine, auswärtsgerichtete transiente Ströme aus (Abbildung 2.19 C), die auf Anregung des PR-Grundzustands beruhen.

Bei pH 5.2 war unter gelber Hintergrundbelichtung nur ein sehr kleiner blaulichtblitzinduzierter, einwärtsgerichteter transienter Strom detektierbar, der nicht einmal notwendigerweise von einem Blaulichteffekt der azidischen Form herrührt, sondern auch von der bei diesem pH-Wert immer noch zu ca. 2 % vorliegenden alkalischen Form (siehe Titrationskurve in Abbildung 2.17 A) stammen könnte. Ein grüner Laserblitz während der Belichtung löste keinen zusätzlichen Photostrom aus (Daten nicht gezeigt). Nach Belichtung mit gelbem Licht konnten sowohl blaue (Abbildung 2.19 D) als auch grüne (Daten nicht gezeigt) Laserblitze einwärtsgerichtete Pumpströme auslösen. Sowohl elektrische als auch spektroskopische Daten zeigen, dass keine eindeutig detektierbaren Konzentrationen eines M-Intermediats vorliegen. Nichtsdestotrotz kann die Existenz eines kurzlebigen M-Intermediats nicht ausgeschlossen werden.

**3.3.5.2 Abhängigkeit der Photoströme von der Lichtintensität**

Eine bemerkenswerte Eigenschaft des Proteorhodopsins ist die Lichtintensitätsabhängigkeit seines Protonentransports. Bei pH 7, bei dem ungefähr ein 2:1 Gemisch aus azidischer und alkalischer Form vorliegt, rief eine Abschwächung der Intensität des gelben Lichtes auf < 2.5 % einwärtsgerichtete Ströme (transiente und stationäre) hervor. Bei höheren Intensitäten wechselte die Richtung des stationären Stroms ins Positive. Aber selbst bei 100 % Lichtintensität (2 W/cm<sup>2</sup>) war keine Sättigung des auswärtsgerichteten Stroms erreicht (Abbildung 2.20 A und C).

Bei pH 5.4 konnten 10 % Lichtintensität die größten einwärtsgerichteten stationären Ströme auslösen. 100 % führten zu einem einwärtsgerichteten transienten Strom, dem ein kleiner auswärtsgerichteter

stationärer Strom folgte (Abbildung 2.20 B und C). Dies deutet an, dass die alkalische und azidische Form des Proteorhodopsins mit unterschiedlicher Polarität zum Pumpstrom beitragen, sich gegenseitig überlagern und beide unterschiedlich von der Lichtintensität abhängen.

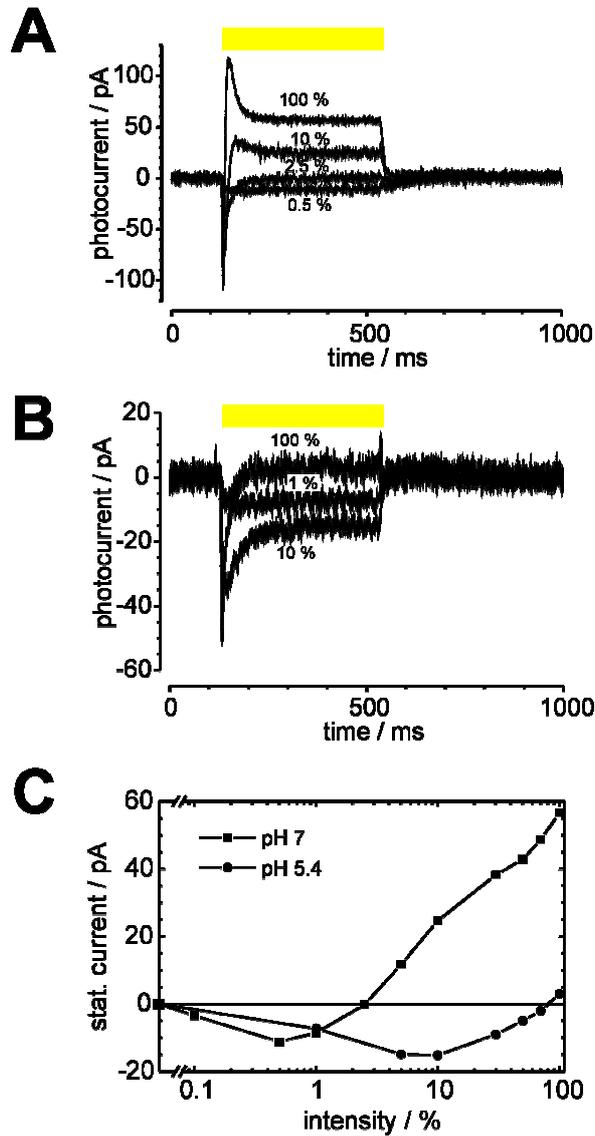


Abbildung 2.20: Abhängigkeit der stationären Photoströme von der Lichtintensität in BLM-Experimenten bei (A) pH 7 und (B) pH 5.4 mit Belichtungsstärken wie angegeben. Gelbe Balken bezeichnen Belichtung mit gelbem Licht. (C) Intensitätsabhängigkeit der stationären Photoströme, aufgetragen auf einer semilogarithmischen Skala für pH 7 (Quadrate) und pH 5.4 (Kreise). Alle Experimente dieser Abbildung wurden in 100 mM NaCl-Puffer in Gegenwart der Ionophoren 1799 und Monensin durchgeführt.

**3.3.5.3 Photoströme ausgelöst durch kontinuierliche Belichtung oder Laserblitze**

Um eine Erklärung für die beobachtete Lichtintensitätsabhängigkeit zu erhalten, wurden Messungen durchgeführt, in denen die durch kontinuierliche Belichtung ausgelösten stationären Photoströme ( $\sim 40$  mW pro BLM der Fläche  $1 \text{ mm}^2$ ) und transiente Ströme infolge eines grünen Laserblitzes ( $\sim 0.8$  mJ pro BLM und  $10$  ns Impulsdauer entsprechend einer Intensität von  $8 \times 10^4 \text{ W}$ ) bei neutralem oder alkalischem pH miteinander verglichen werden konnten (Abbildung 2.21). Während einzelne Laserblitze nur eine Ein-Photon-Anregung ermöglichen, können bei kontinuierlicher Belichtung potentiell mehrere Photonen während eines Photozyklus absorbiert werden. Bei pH 7 (Abbildung 2.21 A) und bei pH 8.4 (Abbildung 2.21 C) führte Belichtung mit kontinuierlichem gelben Licht zu einem auswärtsgerichteten Photostrom. Bei pH 10 (Abbildung 2.21 E) war der stationäre Strom sehr klein, denn die Effizienz der Ionophoren ist bei diesem pH-Wert stark reduziert. Daher ist der stationäre Strom, der im gleichen Experiment an derselben BLM bei pH 7 ermittelt wurde, zum Vergleich als horizontale Linie eingezeichnet. Da Alkalinisierung und die damit einhergehende Deprotonierung von D97 das auswärtsgerichtete Protonenpumpen verstärkt, läge der für gleichbleibende Ionophoren-Effizienz erwartete stationäre Strom sogar noch über diesem Wert.

Wenn bei pH 7 ein grüner Laserblitz auf die Membran eingestrahlt wurde (Abbildung 2.21 B), konnte aufgrund der besseren Absorption der azidischen Form des Proteorhodopsins lediglich ein negativer Strom und keine positiven Komponenten beobachtet werden. Im Gegensatz dazu induzierte kontinuierliche Belichtung stationäre, auswärtsgerichtete Photoströme (Abbildung 2.21 A). Bei pH 8.4 zeigte die Stromantwort auf einen grünen Lichtblitz eine positive Komponente (Abbildung 2.21 D), welche im Vergleich zum stationären Strom (Abbildung 2.21 C) sehr klein war. Bei pH 10, bei dem alle Proteorhodopsin-Moleküle in der alkalischen Form vorliegen, erzeugte ein grüner Laserblitz einen deutlich ausgeprägten positiven transienten Strom (Abbildung 2.21 F). Verglichen jedoch mit dem stationären Strom, der bei ausreichender Effizienz der Ionophoren zu erwarten wäre, erschien die Amplitude des vorangehenden transienten Stroms nur unwesentlich höher, während für BR die Amplituden transientser Ströme infolge von Laserblitzanregung im selben Messsystem in der Regel 5- bis 10-mal höher sind als die stationären Ströme [200]. Die relativ kleinen, durch grüne Laserblitze

auszulösenden, transienten Ströme der alkalischen Form von Proteorhodopsin deuten daher auf ein wenig effizientes Protonenpumpen durch einen Ein-Photonen-Prozess (Details siehe Diskussion).

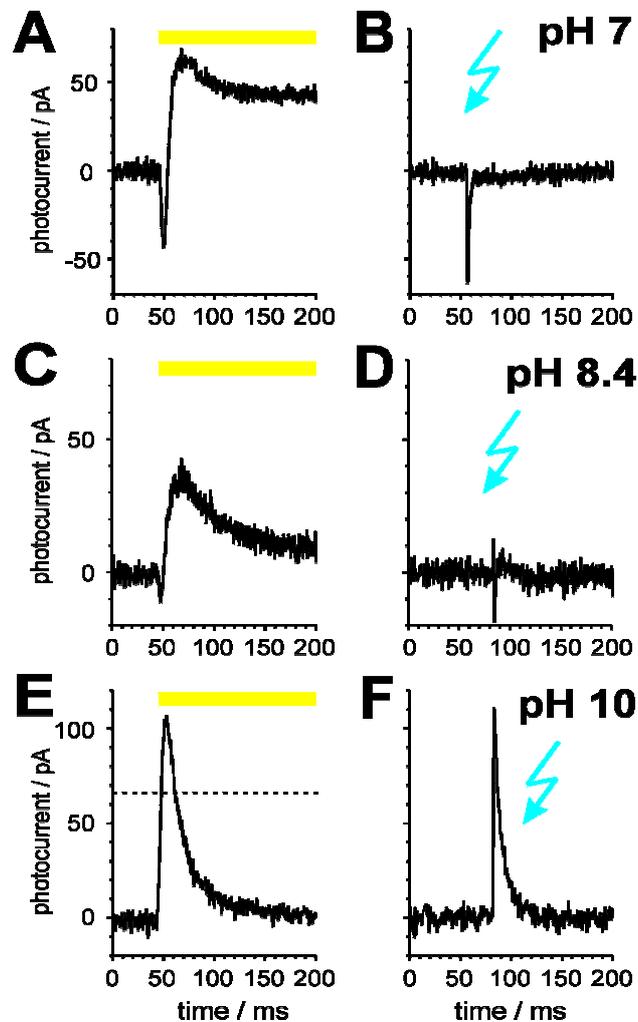


Abbildung 2.21: Vergleich von Proteorhodopsin-Photoströmen ausgelöst durch Belichtung mit (A), (C) und (E) kontinuierlichem gelben Licht einer Quecksilberdampf Lampe und (B), (D) und (F) grünen Laserblitzen bei (A) und (B) pH 7, (C) und (D) pH 8.4 und (E) und (F) pH 10 in Gegenwart der Ionophoren 1799 und Monensin. Die Daten in jeder Reihe resultieren aus denselben BLM-Experimenten. Gelbe Balken und grüne Pfeile bezeichnen Belichtung mit kontinuierlichem gelbem Licht oder grünen Laserblitzen. (E) Aufgrund der niedrigen Effizienz der Ionophoren bei pH 10 sind bei diesem pH-Wert die stationären Photoströme relativ klein. Daher ist der stationäre Strom, der zuvor in demselben BLM-Experiment bei pH 7 gemessen wurde, als horizontale Linie eingezeichnet.

### 3.3.6 Photoströme von Proteorhodopsin exprimiert in *Xenopus*-Oozyten

Photoströme konnten auch nach heterologer Expression von Proteorhodopsin in Oozyten von *Xenopus laevis* gemessen werden. Grünlichtinduzierte Pumpströme bei pH 7.5 und pH 5.5 bei

+60 mV und -120 mV sind in Abbildung 2.22 A und B dargestellt. Die I-U-Kennlinie (Abbildung 2.22 C) wurde auf die entsprechenden Stromamplituden bei pH 7.5 und 0 mV normiert. Der stationäre Photostrom bei pH 7.5 war über den gesamten Spannungsbereich auswärtsgerichtet und zeigte eine lineare Spannungsabhängigkeit mit einem durch Extrapolation bestimmten apparenten Umkehrpotential von ca. -260 mV (Abbildung 2.22 C).

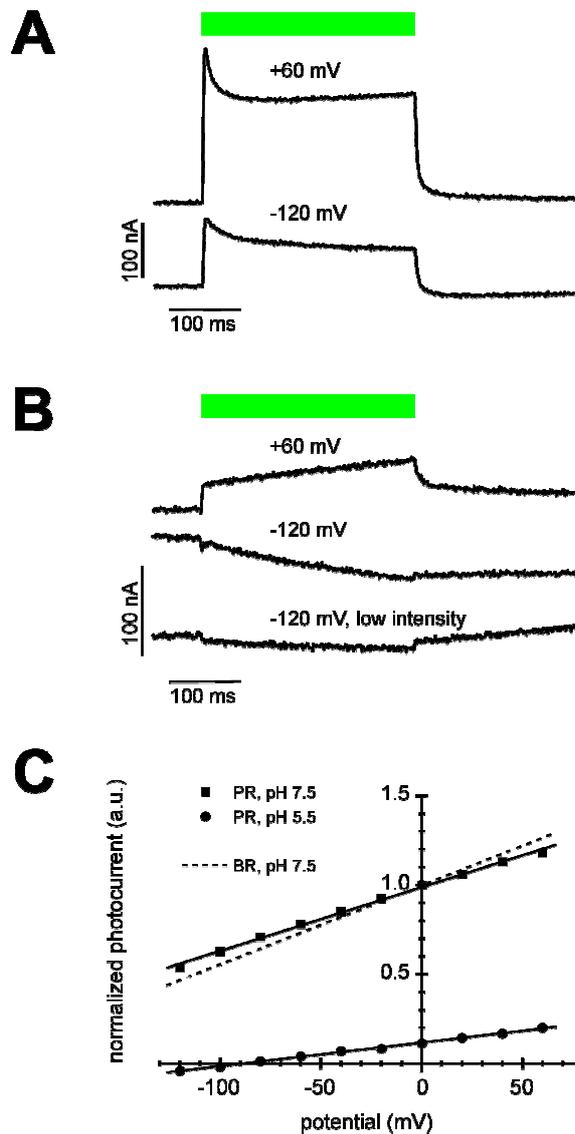


Abbildung 2.22: Spannungsabhängigkeit der Photoströme von Proteorhodopsin exprimiert in Oozyten von *Xenopus laevis* bei einem extrazellulären pH-Wert von (A) 7.5 und (B) 5.5, aufgezeichnet an derselben Zelle. Die grünen Balken bezeichnen die Periode der Belichtung mit grünem Licht. Das Membranpotential ist über den jeweiligen Strömen angegeben. Zu beachten ist, dass die unterste Kurve in (B) bei niedriger Lichtintensität (10 %) aufgezeichnet wurde. Die I-U-Kennlinie der stationären Photoströme ist in Abbildung (C) dargestellt für pH 7.5 (Quadrat) und pH 5.5 (Kreise). Alle Ströme wurden normiert auf den Photostrom bei pH 7.5 und 0 mV. Die entsprechende I-U-Kennlinie, die unter identischen Bedingungen für BR gemessen wurde (siehe oben), ist als gestrichelte Linie zum Vergleich angegeben.

Die normierte I-U-Kennlinie von BR (siehe oben) ist als gestrichelte Linie zum Vergleich angegeben und macht deutlich, dass Proteorhodopsin verglichen mit BR<sub>WT</sub> bei pH 7.5 sogar ein zu negativeren Potentialen verschobenes apparentes Umkehrpotential aufweist. Dieses Resultat unterstreicht umso mehr, dass Proteorhodopsin wie BR eine effiziente Protonenpumpe ist und damit in der Lage, stark hyperpolarisierende Membranpotentiale zu generieren.

Bei pH 5.5 sind die Photoströme kleiner, die I-U-Kennlinie ist ebenfalls linear und bei Membranpotentialen von unter  $-80$  mV konnten einwärtsgerichtete Pumpströme beobachtet werden. Die beiden oberen Stromsignale in Abbildung 2.22 wurden an derselben Oozyte mit 100 % Lichtenergie aufgenommen, so dass die absoluten Photoströme verglichen werden konnten. Abschwächung der Belichtung führte – wie in den BLM-Experimenten – zu größeren einwärtsgerichteten Strömen (Abbildung 2.22 B, unteres Stromsignal). Uninjizierte Kontrolloozyten derselben Präparation zeigten keine lichtinduzierten Ströme (Daten nicht gezeigt). Neben pH- und Lichtintensität ist also auch das Membranpotential in der Lage, die Pumprichtung des Proteorhodopsin-Photostroms umzukehren.

## 4 Diskussion

### 4.1 Bakteriorhodopsin: Regulation durch das elektrochemische Potential

#### 4.1.1 Einleitung

In HEK-293-Zellen und *Xenopus*-Oozyten exprimiertes Bakteriorhodopsin ermöglichte die Untersuchung der lichtinduzierten Pumpströme unter kontrollierten Bedingungen über einen Spannungsbereich von  $-160$  mV bis  $+60$  mV und einen pH-Bereich von 5.5 bis 8.5. Obwohl Spannungen zwischen  $-250$  mV und  $+150$  mV möglicherweise detailliertere Aussagen über die Abhängigkeit der elektrogenen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin von Protonengradienten ( $\Delta\text{pH}$ ) und elektrischer Spannung ( $\Delta\Phi$ ) zuließen (Sättigungsverhalten und Verhalten beim apparenten Umkehrpotential), kann – auch ohne den kompletten Spannungsbereich erschließen zu können – ein konsistentes Modell für die Regulation des Protonentransports von Bakteriorhodopsin durch  $\Delta\text{pH}$  und  $\Delta\Phi$  (zusammen  $\Delta\psi$ ) postuliert werden.

#### 4.1.2 Der Einfluss von $\Delta\text{pH}$ auf den Protonentransport ist geringer als thermodynamisch möglich

Abbildung 2.5 zeigt den Einfluss der Spannung und des  $\Delta\text{pH}$  auf die stationären Pumpströme von Bakteriorhodopsin. Der transiente Strom ergibt sich aus der Ladungsbewegung bei Deprotonierung der Schiffbase, d.h. er zeigt die Bildung des M-Intermediats. Da dieser Prozess nur zu einem kleinen Teil zu der verschobenen Gesamtladung während des Pumpzyklus beiträgt [158,181], zeigt er nur eine schwache Spannungsabhängigkeit, während die Abhängigkeit vom extrazellulären pH deutlicher ausgeprägt ist (siehe Pfeile in Abbildung 2.5 A und B). Der stationäre Strom ändert sich dagegen drastisch mit  $\Delta\text{pH}$  und  $\Delta\Phi$ , da er an den elektrogenen und geschwindigkeitslimitierenden Zerfall aus dem M-Intermediat gekoppelt ist [158,181].

Das I-U-Verhalten über den messbaren Spannungsbereich ist auch in Gegenwart eines angelegten Protonengradienten annähernd linear. Aus der linearen Extrapolation der I-U-Kennlinie zum Nullstrom hin kann ein apparentes Umkehrpotential ermittelt werden. Es wird deutlich, dass das elektrische Feld einen stärkeren Effekt auf das apparente Umkehrpotential hat als der Protonengradient. Ein  $\Delta\text{pH}$  von zwei Maßeinheiten führt zu einer Verschiebung des apparenten Umkehrpotentials von lediglich 68 mV, anstelle der aufgrund der Nernst-Gleichung erwarteten 116 mV. Der Grund für dieses Verhalten ist vermutlich die Ladungsverschiebung innerhalb des Proteins, die unter einem Protonengradienten kaum verändert abläuft, aber von einem elektrischen Feld stark beeinflusst wird. Für einen gegen die Pumprichtung gerichteten  $\Delta\text{pH}$  sind die I-U-Kurven im Wesentlichen parallel. Bei einem extrazellulären pH von 8.5 (ein  $\Delta\text{pH}$  in der Richtung des Pumpprozesses) ist die Steigung der I-U-Kurve jedoch flacher. Bei stark positiven Potentialen erkennt man ein beginnendes Sättigungsverhalten des Pumpstroms. Unter diesen Bedingungen wird die Wechselzahl der Pumpe derart erhöht, dass die Lichtabsorption oder ein nicht elektrogener Schritt an der Geschwindigkeitslimitierung des Reaktionszyklus beteiligt wird, und eine weitere Erhöhung der Spannung keine weitere Erhöhung des Stroms bewirken kann. Der linear extrapolierte Wert zum apparenten Umkehrpotential zeigt dennoch die erwartete Verschiebung in Richtung negativer Werte. Zusammenfassend zeigt sich für den Einfluss von  $\Delta\text{pH}$  auf den BR-Pumpstrom, dass die Verschiebung der I-U-Kennlinie sich qualitativ wie erwartet verhält, der Effekt jedoch quantitativ kleiner ist, als auf Grundlage rein thermodynamischer Überlegungen möglich wäre.

### **4.1.3 Die Regulation des BR-Transportzyklus**

Die I-U-Kurven können in erster Näherung durch die Spannungsabhängigkeit der langsamen Komponente des  $M_2$ -Zerfalls ( $\tau_2$ ) erklärt werden. Abbildung 2.6 D verdeutlicht, dass die Spannungsabhängigkeit der langsamen Zerfallskomponenten nach Belichtungsende ( $\tau_2$ ) selbst zur Erklärung der I-U-Kurven unter angelegten pH-Gradienten in erster Näherung ausreicht. Auch hier ist eine Tendenz zur Sättigung bei positiven Potentialen und pH 8.5 sichtbar. Jedoch ist die Steigung der I-U-Kurve um den Faktor 1.3 steiler als die Steigung der  $1/\tau_2$ -U-Kurve. Daraus ergibt sich, dass noch

ein anderer – indirekt zu beobachtender Prozess – zur spannungsabhängigen Regulation des Pumpstroms beiträgt.

Elektrische Messungen deuten bei negativen Potentialen auf eine Anreicherung eines M-Intermediats hin, welches mit einer Zeitkonstante von mehreren 100 ms zerfällt. Dieser Zerfall eines M-Intermediats mit extrem großen Zeitkonstanten von bis zu 700 ms wurde bereits in einer früheren Publikation nachgewiesen [156]. Da dieser Zerfall pH-abhängig ist, wurde dort argumentiert, dass der Photozyklus im  $M_1$ -Zustand festgehalten wird, in dem der  $pK_a$  der Schiffbase unter 4 liegt und diese nach extrazellulär orientiert bleibt. Die gewöhnliche Reprotonierung der Schiffbase von der intrazellulär gelegenen Gruppe D96 erfolgt daher nur mit geringer Wahrscheinlichkeit und sehr langsam, wogegen die Reprotonierung von der extrazellulär gelegenen Gruppe D85 begünstigt wird. Als Folge davon zerfällt  $M_1$  über einen nichttransportierenden „Kurzschlusszyklus“, in dem Deprotonierung und Reprotonierung der Schiffbase nach bzw. von der extrazellulären Seite auftreten, zurück in den bR-Grundzustand. Dieses langsam zerfallende  $M_1$ -Intermediat wurde verstärkt bei negativen Potentialen gefunden (Abbildung 2.7). In der vorliegenden Arbeit konnte der langsame Bestandteil, der bei  $-120$  mV mit Zeitkonstanten  $\tau_3$  von ca. 380 ms zerfiel, bereits bei 0 mV ( $\tau_3 \sim 200$  ms) und sogar bei positiven Spannungen ( $\tau_3 \sim 150$  ms,  $+40$  mV; Abbildung 2.7 C) gefunden werden, wenn auch mit verhältnismäßig kleiner Amplitude. Wäre ein solch langsames Ereignis Bestandteil eines unidirektionalen, unverzweigten BR-Reaktionszyklus, so könnten die experimentell bestimmten Wechselzahlen von  $50 - 100 \text{ s}^{-1}$  [181] nicht erklärt werden. Kombiniert mit dem Befund, dass sich die Steigung der I-U-Kurve von der der  $1/\tau_2$ -U-Kurve signifikant unterscheidet, deutet alles darauf hin, dass der Photozyklus über ein langsam zerfallendes,  $M_1$ -ähnliches Intermediat (im Folgenden  $M_1^*$ ) aufgespalten sein muss, da sich im Rahmen eines unidirektionalen, unverzweigten Reaktionsschemas zwangsläufig eine dramatische Anreicherung von  $M_1$  und eine extrem niedrige Wechselzahl ergäbe.

Vergleicht man die Menge an gebildetem M-Intermediat in elektrische Messungen bei unterschiedlichen Potentialen (Abbildung 2.7:  $+40$  mV mit  $-120$  mV), zeigt sich die früher bereits beobachtete Zunahme des  $M_1^*$ -Intermediats bei negativen Potentialen. Während grüner

Hintergrundbelichtung verursacht ein blauer Laserblitz eine Ladungsverschiebung, die bei  $-120$  mV beinahe doppelt so groß ausfällt wie bei  $+40$  mV (Abbildung 2.8). Bei einem Potential von  $-120$  mV müssen die meisten BR-Moleküle im  $M_1^*$ -Intermediat vorliegen, da durch einen blauen Laserblitz 100 ms nach Belichtungsende ein transienter Strom mit noch ca. 50 % der Amplitude des transienten Stroms während der Belichtung hervorgerufen wird. Zu diesem Zeitpunkt reagieren die Moleküle, die über das  $M_2$ -Intermediat elektrogen in den bR-Zustand zerfallen sind, auf blaues Licht bereits wieder mit einem auswärtsgerichteten Photostrom, so dass diese 50 % sogar als untere Grenze betrachtet werden können.

Der angesprochenen früheren Publikation [156] zufolge, erschienen die Zeitkonstanten der langsamen Prozesse  $\tau_2$  und  $\tau_3$  im Rahmen der Messgenauigkeit als spannungsunabhängig, obwohl es sich bei den zugrunde liegenden Prozessen um stark elektrogene Reaktionen handelt. Die hier vorgestellte Analyse mit verbesserter Zeitauflösung erlaubte deutliche, potentialabhängige Änderungen dieser beiden langsameren Zeitkonstanten zu erkennen, während  $\tau_1$  nach wie vor durch die noch bestehenden experimentellen Beschränkungen nicht exakt aufgelöst werden kann, und folglich keine Aussage über ihre Spannungsabhängigkeit getroffen werden kann. Damit ergibt sich ein besser verständliches kinetisches Bild, denn ein durch negative Potentiale verlangsamter  $M_2$ -Zerfall ( $\tau_2$ ) erklärt eine Anreicherung von  $M_1$ - bzw.  $M_1^*$ -Intermediat und eine mögliche Regulation durch dieses Intermediat über einen langsamen Zerfall in einem nichttransportierenden „Kurzschlusszyklus“.

Um den langsamsten Prozess, charakterisiert durch  $\tau_3$ , durch eine weitere Methode unabhängig zu bestimmen, wurde die Kinetik des Zerfalls des M-Intermediats spektroskopisch an Purpurchromophoren gemessen, an denen kein Spannungsabfall über die Membran auftreten kann. Bei genauer Betrachtung der Absorptionsänderung konnte ein Prozess mit einer Zerfallszeit von ca. 250 ms (mit einer relativen Amplitude von ca. 1 % des Gesamtsignals) gefunden werden, wodurch die elektrischen Daten (Abbildung 2.8 B) überzeugend bestätigt wurden. Trotz der Ähnlichkeiten zwischen den BR-Präparationen aus Purpurchromophoren und HEK-293-Zellen ist festzuhalten, dass in HEK-293-Zellen selbst bei  $+40$  mV noch ein deutlich größerer Anteil langsam zerfallenden  $M_1^*$ -Intermediats vorliegt als in Membranfragmenten. Die anscheinend erhöhte Menge von  $M_1$  in heterolog exprimiertem

Bakteriorhodopsin im Vergleich zu Bakteriorhodopsin in Purpurmembranen, kann möglicherweise auf Unterschiede der intrinsischen Membranpotentiale zurückgeführt werden, die durch die asymmetrische Verteilung unterschiedlich geladener Lipide zustande kommen.

Werden spektroskopische Messungen an Proteoliposomen statt an Purpurmembranen durchgeführt, entsteht bei Belichtung dieser BR-Proteoliposomen ein elektrisches Potential, welches den M-Zerfall behindert ( $\tau \sim 90$  ms) und folglich den relativen Anteil an M-Intermediat vergrößert. Durch Zugabe von Ionophoren lässt sich dieses Potential kurzschließen, woraufhin der M-Zerfall Relaxationszeiten wie in Purpurmembranen zeigt ( $\tau \sim 10$  ms, Abbildung 2.8 C).

Auch in spektroskopischen Messungen an in Oozyten exprimiertem Bakteriorhodopsin, wurde ein langlebiges M-Intermediat gefunden (Abbildung 2.8 A), jedoch mit deutlich größerer Amplitude, was (neben einer Erklärung durch intrinsische Membranpotentiale) wie folgt auf Anregung von in intrazellulären Kompartimenten vorliegendem Bakteriorhodopsin zurückgeführt werden kann: Aus Absorptionsexperimenten kann die Zahl an BR-Molekülen innerhalb eines Oozyte errechnet werden ( $\epsilon = 63.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), während die Zahl an Molekülen innerhalb der Plasmamembran aufgrund des Photostrom abgeschätzt werden kann. Die Abschätzung ergibt, dass eine Oozyte insgesamt nahezu  $10^{11}$  BR-Moleküle enthält, von denen lediglich etwa 10 % in der Plasmamembran lokalisiert sind. Während das in Spannungsklemme-Experimenten angelegte elektrische Feld nur diese 10 % der BR-Moleküle beeinflusst, regt das Anregungslicht alle BR-Moleküle innerhalb der Oozyte an, was zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über die Membranen der intrazellulären Organellen führt. Unter der Annahme, dass dieses Bakteriorhodopsin ähnlich orientiert ist wie das in der Plasmamembran befindliche (wobei das Lumen der Organellen topologisch äquivalent zum Äußeren der Zelle ist), würde das sich gegen die Pumprichtung aufbauende elektrochemische Potential zu einer Verlangsamung des M-Zerfalls führen. Unter der Annahme, dass Bakteriorhodopsin ein Potential von ungefähr 150 mV über die Organellmembranen aufbaut, ist die relative Amplitude des langsamen Bestandteils  $\tau_3$  von ca. 60 % in der Absorptionsmessung etwa übereinstimmend mit der Spannungsabhängigkeit der stationären Pumpenströme bei den gleichen Potentialunterschieden (Abbildung 2.7). Durch die Spannungsklemme dagegen können die spektroskopischen Eigenschaften

kaum beeinflusst werden, weil nur 10 % der BR-Moleküle in der Plasmamembran vorliegen. Zusammengenommen illustrieren diese Experimente den Einfluss der Spannung auf die Anreicherung eines langsam zerfallenden M-Intermediats ( $M_1^*$ ) auch mit spektroskopischen Methoden.

#### **4.1.4 Optoelektrische Eigenschaften von Bakteriorhodopsin**

Wie in Abbildung 2.10 gezeigt, kann Bakteriorhodopsin nicht nur durch blaues Licht, sondern auch durch einen depolarisierenden Spannungssprung vom M-Zustand in den bR-Zustand überführt werden. Eine Analyse der optoelektrischen Messungen ergibt für den  $M_2$ -Zerfall ( $\tau_2$ ) eine Zeitkonstante von 30 ms und für den  $M_1^*$ -Zerfall ( $\tau_3$ ) eine Zeitkonstante von 460 ms (nach einem Spannungssprung von  $-120$  mV nach  $+40$  mV bei pH 7.5). Unter stationärer Belichtung und negativen Potentialen kann Bakteriorhodopsin für einige 100 ms im  $M_1^*$ -Zustand festgehalten werden. Durch Depolarisierung der Zelle zu 0 mV oder zu positiven Potentialen fällt das Molekül unter Ladungsverschiebung zurück in den bR-Grundzustand. Es kann dabei nicht unterschieden werden, ob der durch den Spannungssprung verursachte transiente Strom vom Übergang  $M_1^* \rightarrow M_2$  herrührt oder (falls dieser schneller ist als die Zeitauflösung des Messaufbaus) der Zerfall  $M_2 \rightarrow$  bR beobachtet wird.

Im Gegensatz zu der blaulichtinduzierten Reprotonierung der Schiffbase von der extrazellulären Seite, beschreibt die Ladungsverschiebung bei Spannungssprung-Experimenten (zumindest zum Teil) die Reprotonierung von der intrazellulären Seite, da die Richtung des Stroms nach depolarisierenden Spannungssprüngen der Richtung des Protonenpumpens entspricht. Daraus folgt, dass nach depolarisierenden Spannungssprüngen das  $M_1^*$ -Intermediat abgebaut und  $M_1$  gebildet wird, welches über  $M_2$  in der üblichen Weise nach bR zerfällt. Dies deutet darauf hin, dass depolarisierende Spannungssprünge den molekularen Schalter (*molecular switch*) aktivieren, der die Zugänglichkeit der Schiffbase für Protonen regelt.

### **4.1.5 Physiologische Betrachtungen**

Das Aufspalten des Photozyklus bei negativen Potentialen in ein langsam zerfallendes Intermediat ( $M_1^*$ ) könnte eine zusätzliche Möglichkeit zur Regulierung der Pumpe durch  $\Delta\Phi$  bei negativen Potentialen sein. In einem solchen Modell müsste der geschwindigkeitslimitierende Schritt im Photozyklus nicht als so sehr verlangsamt angenommen werden, um die Verringerung des Pumpstroms bei negativen Potentialen zu erklären. Der  $M_1^*$ -Zustand, der bei hyperpolarisierenden Potentialen vorliegt, aber bei Potentialen größer 0 mV beinahe völlig entvölkert ist, könnte als „Reservoir“ dienen, das sich füllt, wenn die Membran hyperpolarisiert ist, und entleert, sobald Depolarisation auftritt (siehe Spannungssprung-Experimente). Der physiologische Vorteil läge darin, dass Halobakterien Bakteriorhodopsin in solch einem „energetisierten“  $M_1^*$ -Zustand speichern könnten. Unter Bedingungen, die zu Depolarisation führen (z.B. unzulängliche Belichtung), kann dieses „Reservoir“ auch ohne vorherige Belichtung wieder in den normalen Pumpzyklus eintreten und zur Repolarisation beitragen. In entsprechender Weise könnte dieser Prozess auch als Adaptionsmechanismus bei hohen Lichtintensitäten dienen, bei denen es zu übermäßiger Hyperpolarisation der Plasmamembran kommen könnte. Zusätzlich zu dieser Aufspaltung des Photozyklus in einen Zweig mit stabilisiertem  $M_1^*$ -Intermediat, erfolgt die Regulation insbesondere bei weniger negativen oder bei positiven Potentialen durch eine Beschleunigung des  $M_2$ -Zerfalls. Dies wird durch Messungen an Purpurmembranen unterstützt, an denen eine Potentialdifferenz von 0 mV anliegt und nur 1 % des Absorptionssignals den langsamsten Zerfall ( $\tau_3$ ) zeigt.

### **4.1.6 Zusammenfassung**

Als Schlussfolgerung können die Resultate durch das Reaktionsschema in Abbildung 2.23 beschrieben werden.

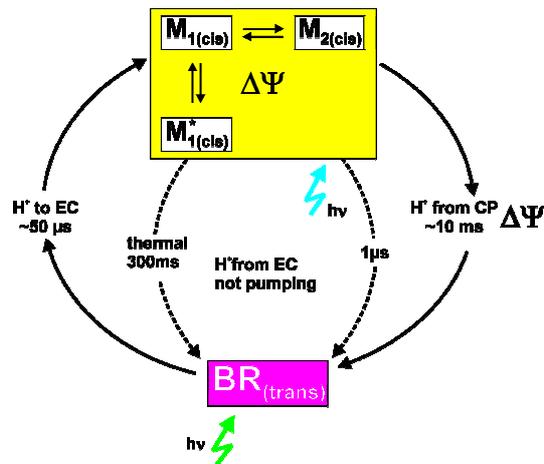


Abbildung 2.23: Reaktionsmodell für den BR-Transportzyklus. EC = extrazellulär, CP = cytoplasmatisch, intrazellulär,  $\Delta\Psi$  bezeichnet eine Regulation durch das elektrochemische Potential, *cis* und *trans* beziehen sich auf die Konformation des Retinals

Der protonentransportierende Reaktionszyklus zeigt eine Spannungsabhängigkeit, die durch den Zerfall  $M_2 \rightarrow bR$  geregelt wird, dessen Zerfallszeitkonstanten Werte von 20 ms (+60 mV) bis 80 ms (−160 mV) annehmen.

Zusätzlich erlaubt ein Aufspalten des Transportzyklus im M-Intermediat die Regulation des Protonenpumpens durch einen nichttransportierenden „Kurzschlusszyklus“, in welchem ein langsam zerfallendes  $M_1^*$ -Intermediat gebildet wird. Im  $M_1^*$ -Zustand muss die Protonenzugänglichkeit der Schiffbase extrazellulär orientiert sein, und der  $pK_a$  der Schiffbase muss ähnlich wie in  $M_1$  sein. Dies wird auch durch Ergebnisse aus einer früheren Publikation unterstützt, in der gezeigt wird, dass die Reprotonierung von  $M_1^*$  über D85 auftritt und stark vom extrazellulären pH abhängig ist [156]. Die Zeitkonstante des Zerfalls aus  $M_1^*$  reicht von 150 ms (+40 mV) bis 380 ms (−120 mV).

Das in spannungsabhängiger Weise unter Belichtung gebildete  $M_1^*$ -Intermediat kann durch depolarisierende Potentiale in Abwesenheit von Licht in den bR-Grundzustand überführt werden (über  $M_1$  und  $M_2$ ) und illustriert damit die optoelektrischen Eigenschaften von Bakteriorhodopsin. Folglich weist das Retinalprotein Bakteriorhodopsin alle Eigenschaften eines optoelektrischen Schaltelements auf.

## **4.2 Bakteriorhodopsin: M-stabilisierende oder destabilisierende Mutanten**

### **4.2.1 Einleitung**

Die in diesem Abschnitt untersuchten BR-Mutanten wurden aufgrund der Tatsache, dass sie das M- oder N-Intermediat anreichern, für umfangreiche strukturelle Studien dieser Intermediate genutzt [142,143,145-148]. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig ihre Protonentransporteigenschaften charakterisiert, wodurch tiefere Einblicke in die Regulationsprozesse des BR durch Akkumulation oder Depletierung des M-Intermediats ermöglicht wurden. Die durchgeführten Experimente erlauben neue Interpretationen in einer anhaltenden Kontroverse darüber, welchen Einfluss strukturelle Änderungen auf den Protonentransport und seine Vektorialität haben.

### **4.2.2 Klassifizierung der Mutanten**

Die erste Gruppe der Mutanten ( $BR_{F171C}$  und  $BR_{F219L}$ ) entvölkert das M-Intermediat und reichert das N-Intermediat an. Die Photoströme dieser Mutanten liegen in derselben Größenordnung wie die von  $BR_{WT}$ , ihre Spannungsabhängigkeit jedoch ist – obwohl im erschließbaren Spannungsbereich immer noch linear – reduziert, was sich in flacheren I-U-Kurven äußert. Dies führt zu einem im Vergleich zu  $BR_{WT}$  nach negativen Potentialen verschobenen apparenten Umkehrpotential und deutet darauf hin, dass es sich bei diesen Mutanten um Protonenpumpen handelt, die sogar gegen ein größeres elektrochemisches Potential anpumpen können als  $BR_{WT}$ , obwohl die Wechselzahl bei 0 mV nicht erhöht ist. Während für  $BR_{F219L}$  die Verschiebung des apparenten Umkehrpotentials sehr klein ist (~ 6 mV), ist sie für  $BR_{F171C}$  deutlicher (~ 58 mV). Einhergehend mit diesem Effekt kann bei beiden Mutanten nur eine geringere Anreicherung des M-Intermediats nachgewiesen werden als bei  $BR_{WT}$ . Bei  $BR_{F171C}$  kann durch blaue Laserblitze überhaupt kein M-Intermediat nachgewiesen werden. Dies allerdings bedeutet nicht, dass kein M-Intermediat gebildet wird, sondern, dass dieses zu kurzlebig ist, um detektiert zu werden. Des Weiteren sind beide Mutanten durch einen beschleunigten Zerfall des stationären Photostroms nach Belichtungsende gekennzeichnet, was aber nicht auf einer signifikanten

Änderung der Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  beruht, sondern auf der Vergrößerung der relativen Amplitude der schnelleren Komponente  $\tau_1$ .

Die zweite Gruppe von Mutanten besteht aus bei  $BR_{D96N}$ ,  $BR_{D96G}$  und der „Tripel“-Mutante  $BR_{D96G,F171C,F219L}$ , welche unter Belichtung das M-Intermediat stark anreichern. Alle diese Mutanten zeichnen sich durch einen deutlich reduzierten (mindestens um den Faktor 20), aber signifikant nachweisbaren, stationären Photostrom aus, welcher mit einer drastisch erhöhten Zeitkonstante des Zerfalls aus dem M-Intermediat, also des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts, einhergeht ( $\tau_2 > 300$  ms). Wie aus spektroskopischen Messungen erwartet, erzeugen die Mutanten  $BR_{D96N}$ ,  $BR_{D96G}$  und  $BR_{D96G,F171C,F219L}$  unter Hintergrundbelichtung eine starke Anreicherung des M-Intermediats, angezeigt durch blaulichtblitzinduzierte, einwärtsgerichtete transiente Ströme. In Blaulichtblitz-Experimenten konnte gezeigt werden, dass das M-Intermediat mit Zeitkonstanten ( $\tau_3$ ) von mehreren 100 ms zerfällt ( $BR_{D96N} > 300$ ms,  $BR_{D96G} > 800$  ms,  $BR_{D96G,F171C,F219L} > 1000$  ms). Diese Daten stimmen mit spektroskopischen Messungen von Tittor et al. [159] überein ( $BR_{D96N}$ ,  $BR_{D96G} > 500$  ms). Die beobachteten kleinen stationären Photoströme beruhen also nicht etwa auf einer stark reduzierten Expressionsdichte der genannten Mutanten, sondern auf einer Verlangsamung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts. Dies ergibt sich auch aus einer einfachen Berechnung der Anzahl der BR-Moleküle in der Plasmamembran der Oozyten. Dieser Expressionswert kann folgendermaßen abgeschätzt werden: Die langsame Phase der Ausschaltkinetik  $\tau_2$  stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Transportzyklus dar. Die Wechselzahl der jeweiligen BR-Mutante muss niedriger sein als  $1/\tau_2$ . Daher kann eine untere Grenze für die Anzahl  $N$  der BR-Moleküle nach der folgenden Formel abgeschätzt werden (Gleichung 2.3):

$$N = \frac{I_{stat} \cdot \tau_2}{\varepsilon} \quad (2.3)$$

( $I_{stat}$  = stationärer Photostrom;  $\tau_2$  = geschwindigkeitsbestimmende Zeitkonstante;  $\varepsilon = 1.602 \times 10^{-19}$  C, Elementarladung)

Die sich ergebenden Werte für N sind in Tabelle 2.2 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Expressionswerte maximal um den Faktor 3 variieren, womit die viel stärker reduzierten stationären Photoströme der M-stabilisierenden Mutanten nicht erklärt werden können. Es muss daher gefolgert werden, dass diese Mutanten schwächere Protonenpumpen sind als BR<sub>WT</sub>. Dies findet noch deutlicher Ausdruck in der Form der I-U-Kurven dieser Mutanten. Im Spannungsbereich von 0 mV bis +60 mV können die I-U-Kurven näherungsweise als linear angenommen werden. Die Steigungen wachsen dabei in der Reihenfolge: BR<sub>WT</sub> < BR<sub>D96G,F171C,F219L</sub> < BR<sub>D96N</sub> < BR<sub>D96G</sub>. Infolgedessen ist auch das apparente Umkehrpotential (bestimmt aus der linearen Extrapolation der Werte zwischen 0 mV und +60 mV) zu Spannungen von ungefähr -50 mV verschoben. Dies macht deutlich, dass nicht nur die Wechselzahl dieser Mutanten stark reduziert ist, sondern noch viel drastischer ihre Fähigkeit, einen elektrochemischen Protonengradienten zu generieren. Interessanterweise weichen die I-U-Kennlinien im Bereich sehr kleiner Ströme, also bei negativen Potentialen, stark vom linearen Verhalten ab und verlaufen asymptotisch bezüglich der Stromnulllinie. Während bei Messungen mit BR<sub>WT</sub> der erschließbare Spannungsbereich in Zwei-Elektroden Spannungsklemme-Experimenten nicht erlaubt, das Verhalten der Protonenpumpe BR nahe am Umkehrpotential zu untersuchen, ist bei den M-stabilisierenden Mutanten die I-U-Kennlinie stark genug zu positiven Potentialen verschoben, um Abweichungen vom linearen Verhalten deutlich erkennen zu können. Die Stromrichtung kann durch das Anlegen eines Membranpotentials nicht umgekehrt werden. Dieses Verhalten wird für eine vektorielle Protonenpumpe wie BR aus kinetischen und thermodynamischen Gründen erwartet. Im Fall von BR liegt die Vektorialität darin begründet, dass nur die initiale Photoanregung des Reaktionszyklus reversibel ist, schon nach diesem Schritt geht soviel Energie verloren, dass die anschließende Relaxation zurück zu bR thermisch nach der Vorgabe der Entropie abläuft.

### **4.2.3 Das M-Intermediat als „Sensor“ des Membranpotentials**

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Fähigkeit der Mutanten, das M-Intermediat zu stabilisieren oder zugunsten des N-Intermediats zu destabilisieren, direkt mit der Lebensdauer von M korreliert. Die Mutanten BR<sub>D96N</sub>, BR<sub>D96G</sub> und BR<sub>D96G,F171C,F219L</sub> erreichen M-Anreicherung durch eine stark verlängerte Lebensdauer von M. Die Mutanten BR<sub>F171C</sub> und BR<sub>F219L</sub> akkumulieren N durch einen

schnelleren M-Zerfall, wobei sich der Gesamtzerfall  $M \rightarrow BR$  über N und O nicht signifikant ändert, denn die Zeitkonstanten der Photostrom-Zerfallskinetik differieren nicht signifikant von  $BR_{WT}$ .

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Spannungsabhängigkeit des BR-Photozyklus auf zwei Effekten basiert. Zum Einen auf einer Regulation der Zerfallskinetik aus dem hauptelektrogenen Ereignis des Photozyklus  $M \rightarrow bR$ . Zum Anderen auf einem Aufspalten des Zyklus im M-Intermediat in einen nichttransportierenden „Kurzschlusszyklus“ mit einem stabilisierten  $M_1$ -Intermediat ( $M_1^*$ ). Eine Regulation durch Aufspalten in diesen „Kurzschlusszyklus“ ist abhängig von der Menge an M, die während des Photozyklus gebildet wird. Daher hat die Lebensdauer von M starken Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit des Protonenpumpens, was durch die untersuchten Mutanten mit verschiedenen Lebensdauern von M bestätigt wird. Mutanten, die keine ( $BR_{F171C}$ ) oder nur geringe ( $BR_{F219L}$ ) Anreicherung des M-Intermediats aufweisen, zeigen eine flachere, Mutanten mit einer starken Anreicherung des M-Intermediats ( $BR_{D96N}$ ,  $BR_{D96G}$  und  $BR_{D96G,F171C,F219L}$ ) eine steilere I-U-Kurve als  $BR_{WT}$ . Die Steigung der I-U-Kurve der Mutanten geht einher mit einem Anstieg der Lebensdauer von M und wächst in der Reihenfolge:  $BR_{F171C} < BR_{F219L} < BR_{WT} < BR_{D96G,F171C,F219L} < BR_{D96N} < BR_{D96G}$ . Der Spannungsdetektionsmechanismus von BR ist demzufolge sensitiv auf die Lebensdauer des M-Intermediats. Dieses Verhalten entspricht dem der sensorischen Rhodopsine. Dort tritt während des Photozyklus ein langlebiges, dem M-Intermediat analoges Intermediat auf, und die Spannungsabhängigkeit folgt steilen I-U-Kennlinien [201].

Es ergibt sich die Frage, warum ein Verhalten wie das durch die Mutation F171C eingeführte, von der Evolution nicht für die Realisierung effizienten Protonenpumpens durch das BR-Molekül genutzt wurde, denn offensichtlich wäre die Mutante  $BR_{F171C}$  in der Lage, ein weitaus größeres Potential über die Plasmamembran der Halobakterien zu generieren, ohne jedoch bei einem Potential von 0 mV eine größere Wechselzahl aufzuweisen. Eine Erklärung hierfür kann aus der Beobachtung gewonnen werden, dass die I-U-Kennlinie der Mutante  $BR_{F171C}$  die Spannungsabhängigkeit von  $1/\tau_2$  von  $BR_{WT}$  widerspiegelt. Beide erreichen apparente Umkehrpotentiale von  $-280$  mV (vergleiche Abbildung 2.14 mit Abbildung 2.5 D). Dies würde allerdings nach sich ziehen, dass der hauptelektrogene Schritt während des  $M \rightarrow bR$  Zerfalls ( $\tau_2$ ) bei allen Potentialen geschwindigkeitsbestimmend wäre. Durch die

kurze Lebensdauer von M kann in der Mutante BR<sub>F171C</sub> der zweite Regulationsmechanismus durch ein Aufspalten des Pumpzyklus in M<sub>1</sub> nicht verwirklicht werden. Vielleicht ist gerade in diesem Mechanismus der entscheidende Selektionsvorteil zu sehen, denn er erlaubt den Halobakterien eine effizientere Regulation des Pumpzyklus bei gleichzeitiger Anreicherung eines „Reservoirs energetisierter BR-Moleküle“.

#### **4.2.4 BR<sub>F171C</sub> erlaubt eine stärkere Akkumulation von N als BR<sub>F219L</sub>**

Da die Mutanten BR<sub>F171C</sub> und BR<sub>F219L</sub> das N-Intermediat anreichern, wurden sie für die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur dieses Intermediats genutzt. Elektrophysiologische Untersuchungen unter identischen Bedingungen ergaben jedoch eine unterschiedliche Anreicherung des N-Intermediats in beiden Mutanten (Abbildung 2.13). Da für die Mutante BR<sub>F171C</sub> keine blaulichtinduzierten Einwärtsströme gefunden werden konnten, steht zu vermuten, dass diese Mutante während konstanter Belichtung das M-Intermediat nicht über die Nachweisgrenze anreichert. Dieses Ergebnis liegt auf einer Linie mit den Ergebnissen der Strukturanalyse [142,145]. Die Autoren Kataoka und Kamikubo nutzten die Mutante für die Bestimmung der N-Struktur und gaben an, dass sich sämtliche Protein-Moleküle in diesem Zustand befanden. Elektrische Messungen der blaulichtblitzinduzierten transienten Ströme der Mutante BR<sub>F219L</sub> zeigen, dass diese Mutante das N-Intermediat nicht zu vergleichbar hohen Konzentrationen anreichert, da ein deutlicher Anteil an M-Intermediat gefunden wurde. Dieselbe Beobachtung wurde von Vonck gemacht, die diese Mutante zur Bestimmung der Struktur des N-Intermediats nutzte [143]. Nur 33 % der BR<sub>F219L</sub>-Moleküle befanden sich gleichzeitig im N-Zustand, während der Rest im M-Intermediat verblieb [144]. Von Vonck wurden zur Erklärung dieses Verhaltens die großen strukturellen Änderungen während der Bildung des N-Intermediats herangezogen. In der Purpurmembran könnte demnach zur selben Zeit nur jeweils ein Molekül pro Trimer die großen Konformationsänderungen auf dem Weg zum N-Intermediat durchlaufen, womit kooperative Effekte des BR erklärt werden könnten. Da jedoch die Mutante BR<sub>F171C</sub> unter den identischen experimentellen Bedingungen der Oozyten-Messungen das N-Intermediat zu einer deutlich größeren Menge anreicherte als BR<sub>F219L</sub>, scheint eine sterische Behinderung zwischen verschiedenen BR-Molekülen die N-Anreicherung nicht zu limitieren.

#### **4.2.5 Frühes (M<sub>1</sub>) und spätes (M<sub>2</sub>) M-Intermediat – die Mutanten BR<sub>D96N</sub> und**

##### **BR<sub>D96N</sub>**

Die Einzelmutanten BR<sub>D96N</sub> und BR<sub>D96G</sub> akkumulieren unter Belichtung das M-Intermediat. Dieses Phänomen wurde auch in vielen anderen Publikationen beschrieben [146,147,158,159]. In Strukturarbeiten von Luecke et al. bzw. Subramaniam et al. [146,147] wurden die strukturellen Änderungen in BR<sub>D96G</sub> einem frühen M-Intermediat, wie dem M<sub>1</sub>-Intermediat, die strukturellen Änderungen in BR<sub>D96N</sub> einem späten M-Intermediat, wie dem M<sub>2</sub>-Intermediat, zugeordnet. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Konformationen M<sub>1</sub> und M<sub>2</sub> betrifft die Richtung der Zugänglichkeit der Schiffbase für Protonen. Eine Umorientierung der Schiffbasen-Zugänglichkeit kann auch durch ein elektrisches Feld verursacht werden (siehe vorangegangenes Kapitel und [156]). Unabhängig jedoch von den Gründen für die Vorzugsorientierung der Schiffbase (Mutation oder elektrisches Feld) konnte die Reprotonierung der Schiffbase durch Blaulichtblitze in den vorgestellten elektrischen Experimenten stets nur von der extrazellulären Seite erfolgen (D85) und war damit unabhängig von der vorhergesagten unterschiedlichen Orientierung der Schiffbase in den Intermediaten M<sub>1</sub> und M<sub>2</sub>.

#### **4.2.6 Protonentransport trotz des Ausbleibens substantieller Konformationsänderungen – die „Tripel“-Mutante BR<sub>D96G,F171C,F219</sub>**

Die stärksten Veränderungen der Eigenschaften der Photoströme verglichen mit BR<sub>WT</sub> wurden bei der „Tripel“-Mutante BR<sub>D96G,F171C,F219</sub> gefunden. Dieses Konstrukt sorgte für Aufsehen, weil von ihm berichtet wurde, dass es Protonen ähnlich effizient wie der Wildtyp pumpt, obwohl damit keine detektierbaren strukturellen Änderungen im Protein einhergehen [160]. Es zeigte sich, dass die BR<sub>D96G,F171C,F219</sub> den größten Teil der strukturellen Änderungen, die für BR<sub>WT</sub> erst im M-Intermediat auftreten, schon im Grundzustand aufweist. Dies eröffnete eine Diskussion darüber, wie wichtig Konformationsänderungen für den Ionentransport tatsächlich sind. Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die „Tripel“-Mutante eine viel schwächere Protonenpumpe als BR<sub>WT</sub> ist. Die stationären Pumpströme sind klein (~ 5 % im Vergleich mit BR<sub>WT</sub> bei 0 mV), und die Fähigkeit,

Protonen gegen einen großen elektrochemischen Gradienten zu pumpen, ist verringert, worauf die stark zu positiven Potentialen verschobene I-U-Kennlinie schließen läßt. Die Eigenschaften der „Tripel“-Mutante basieren offenbar zu großen Teilen auf der Mutation D96G, welche die primäre Protonendonator-Gruppe für die Reprotonierung der Schiffbase entfernt. Die kleinen Photoströme sind mit den hohen Zeitkonstanten des geschwindigkeitslimitierenden Schritts konsistent. Diese Daten widersprechen denen von Tittor et al. [160], denen zufolge die „Tripel“-Mutante 66 % der Aktivität von BR<sub>WT</sub> aufbringt. Dies ist erstaunlich, da der von diesen Autoren bestimmte Wert für die Wechselzahl der „Tripel“-Mutante von ca. 2 s<sup>-1</sup> (125 H<sup>+</sup>/BR pro min bei pH 6) gut mit dem in der vorliegenden Arbeit für  $\tau_2$  bestimmten Wert von > 250 ms und der im Vergleich zu BR<sub>WT</sub> auf 5 % reduzierten Wechselzahl (~ 2 s<sup>-1</sup>) übereinstimmt. Dagegen scheint die Wechselzahl für BR<sub>WT</sub> von Tittor et al. zu niedrig bestimmt worden zu sein, denn der ermittelte Wert von ca. 5 s<sup>-1</sup> (250 – 300 H<sup>+</sup>/BR pro min bei pH 7) widerspricht generell akzeptierten Wechselzahlen von 50 – 100 s<sup>-1</sup> [181]. Eine Begründung hierfür können die experimentellen Bedingungen in der genannten Arbeit sein, die Lichtsättigung nahezu unmöglich machen, wodurch die Lichtabsorption geschwindigkeitsbegrenzend wird. Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass die „Tripel“-Mutante eine weitaus schwächere Protonenpumpe als BR<sub>WT</sub> ist, und dabei nicht nur eine deutlich verringerte Wechselzahl aufweist, sondern zudem aktiven Ionentransport nur gegen einen deutlich reduzierten elektrochemischen Gradienten ausführen kann.

#### **4.2.7 Protonierungszustände der Schiffbase**

Die Bildung des M-Zustands scheint in der „Tripel“-Mutante verlangsamt zu sein, was aus dem verlangsamt transienten Stromsignal zu Belichtungsbeginn abgeleitet werden kann. Diese Interpretation stimmt mit spektroskopischen Daten von Tittor et al. [160] überein, die ebenso eine verlangsamte Bildung des M-Intermediats zeigten (1 ms statt 50 µs bei BR<sub>WT</sub>). Dieses Verhalten kann wie folgt erklärt werden: In Abbildung 2.24 sind die Abstände zwischen der Schiffbase und den Sauerstoff-Atomen der Carboxyl-Gruppe des D85 für BR<sub>WT</sub> und BR<sub>D96G,F171C,F219</sub> dargestellt (nach den Strukturen der Proteindatenbank 1CWQ [135] und 1FBB bzw. 1FBK [148]). Die Strukturen des Grundzustands und des M-Intermediats von BR<sub>WT</sub> von Sass et al. [135] zeigen, dass die Reaktion bR

→ M mit einer Vergrößerung des Abstands zwischen D85 und der Schiffbase einhergeht (Abbildung 2.24 A,C). Die Struktur von BR<sub>D96G,F171C,F219</sub> [148] verdeutlicht, dass der Abstand zwischen D85 und der Schiffbase in der „Tripel“-Mutante schon im Grundzustand vergrößert ist, und der cytoplasmatische Protonenzugangsweg geöffnet ist (Abbildung 2.24 B,D). Der vergrößerte Abstand zwischen D85 und der Schiffbase verringert die Wahrscheinlichkeit einer Deprotonierung nach D85. Zusätzlich ist kein Proton an der primären Protonendonator-Position vorhanden, da D96 zu einem Glycin mutiert ist. Das fehlende Proton in Aminosäureposition 96 – zusammen mit strukturellen Änderungen des cytoplasmatischen Protonenzugangswegs – könnte weiterhin zu Änderungen der pK<sub>a</sub>-Werte der Schiffbase führen und so zusätzlich die Deprotonierungswahrscheinlichkeit in Richtung D85 herabsetzen.

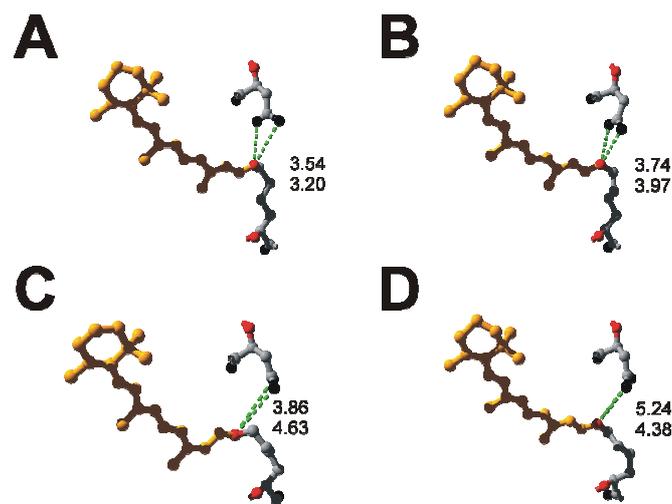


Abbildung 2.24: Abstände der Schiffbase vom primären Protonenakzeptor D85 im Grundzustand (bR) und im deprotonierten Zustand (M) in BR<sub>WT</sub> und in der „Tripel“-Mutante BR<sub>D96G,F171C,F219</sub> (A) BR<sub>WT</sub> im bR-Zustand in der Struktur von Sass et al. [135] (PDB Struktureintrag 1CWQ); (B) BR<sub>WT</sub> im bR-Zustand in der Struktur von Subramaniam et al. [202] (PDB Struktureintrag 1FBB); (C) BR<sub>WT</sub> im M-Zustand nach Schockfrieren in der Struktur von Sass et al. [135] (PDB Struktureintrag 1CWQ); (D) BR<sub>D96G,F171C,F219</sub> im bR-Zustand in der Struktur von Subramaniam et al. [202] (PDB Struktureintrag 1FBK). Oben rechts im Bild ist jeweils der primäre Protonenakzeptor D85 dargestellt, links der Chromophor Retinal (gelb) und in der Mitte die Schiffbasen-Bindung zu K216 (rechts unten).

Wie in den elektrischen Messungen beobachtet werden konnte, ist die Reprotonierung der Schiffbase in BR<sub>D96G,F171C,F219</sub> im Vergleich zu BR<sub>WT</sub> ebenfalls verlangsamt. Dieses Verhalten kann durch den Effekt der Mutation D96G erklärt werden und entspricht einer reduzierten Reprotonierungswahrscheinlichkeit der Schiffbase von der intrazellulären Seite.

Ein anderes erstaunliches Resultat ist, dass in BR<sub>D96G,F171C,F219</sub> die Schiffbase auch ohne Vorbelichtung nicht zu 100 % protoniert zu sein scheint. Blaulichtblitze ohne Vorbelichtung können typische einwärtsgerichtete transiente Ströme hervorrufen, wie sie für alle anderen Mutanten nur infolge von Vorbelichtung zu beobachten waren. Eventuell basiert dieses Verhalten auf veränderten pK<sub>a</sub>-Werten der Schiffbase bzw. ihrer Gegenionen. Demnach könnte ein thermisches Gleichgewicht zwischen einem Zustand mit protonierter Schiffbase (wie in BR<sub>WT</sub>) und einem Zustand mit deprotonierter Schiffbase und protoniertem D85 herrschen. Entsprechendes läßt ein absorptionspektroskopisches Experiment vermuten, in dem die Absorption unbelichteter Purpurchromophore der „Tripel“-Mutante bei 400 nm im Vergleich zum Wildtyp verhältnismäßig groß war (Daten nicht gezeigt). Vom protonierten D85 könnte das Proton dann nach einem Blaulichtblitz wieder durch die Schiffbase aufgenommen werden. Dieses Resultat unterstreicht, wie die geringfügigen Veränderungen der strukturellen Eigenschaften der „Tripel“-Mutante die Vektorialität der Pumpe insofern „schwächen“ könnten, als sie die Protonierungsreaktionen im Umfeld der Schiffbase in der „Tripel“-Mutanten weniger gerichtet als in BR<sub>WT</sub> machen.

#### **4.2.8 Konformationsänderungen als Grundlage der Vektorialität**

Die biophysikalischen Eigenschaften der BR-Mutanten, die hier untersucht wurden, erlauben Rückschlüsse darauf, wie strukturelle Änderungen während des Reaktionszyklus von BR<sub>WT</sub> effizienten vektoriellen Transport begründen können. BR<sub>WT</sub> führt große strukturelle Änderungen in einer genau abgestimmten Weise durch. Dieser fein abgestimmte Mechanismus bestimmt die geordnete De- und Reprotonierung der Schiffbase und begründet damit die Richtung des Transports und effektive Energietransduktion. Dies erlaubt BR Protonen gegen große elektrochemische Gradienten zu pumpen. Mit Bildung des M-Intermediats vergrößert sich die Distanz zwischen D85 und der Schiffbase (Abbildung 6 A,C). Der sich ergebende Abstand ist vergleichbar mit dem Abstand, der in der „Tripel“-Mutante schon im Grundzustand zwischen D85 und der Schiffbase zu beobachten ist (Abbildung 2.24 C D).

Die unterschiedlichen Distanzen zwischen D85 und der Schiffbase in den unterschiedlichen Mutanten und Zuständen, erklären nicht nur die verlangsamte Deprotonierung der Schiffbase nach D85 in  $BR_{D96G,F171C,F219L}$ , sondern auch das Unterdrücken der Schiffbasen-Reprotonierung von D85 in  $BR_{WT}$ . In den frühen Photozyklus-Intermediaten ist Protonentransfer von der Schiffbase nach D85 wahrscheinlich. Die strukturellen Änderungen während des Reaktionszyklus verhindern durch die Vergrößerung des Abstands zwischen beiden im weiteren Verlauf des Reaktionszyklus eine Rückkehr des Protons von D85 zur Schiffbase. Die großen Konformationsänderungen der Helices F und G erleichtern zudem die nachfolgende Reprotonierung von D96 durch eine Öffnung des cytoplasmatischen Protonenzugangswegs.

Es wird offensichtlich, dass die Konformationsänderungen, die zu einer Öffnung des cytoplasmatischen Protonenzugangswegs nach Deprotonierung der Schiffbase und der Änderung ihrer Zugänglichkeit von extrazellulär nach cytoplasmatisch führen, für den effizienten Protonentransport des Wildtyps vorteilhaft sind. Die Konformationsänderungen betonen somit die Zugänglichkeitsänderung der Schiffbase während des molekularen Schaltereignisses  $M_1 \rightarrow M_2$  und erlauben somit  $BR_{WT}$  Protonen gegen einen weitaus größeren elektrochemischen Gradienten zu pumpen als die „Tripel“-Mutante.

#### **4.2.9 Zusammenfassung**

Die BR-Mutanten  $BR_{D96N}$ ,  $BR_{D96G}$ ,  $BR_{F171C}$ ,  $BR_{F219L}$  und  $BR_{D96G,F171C,F219L}$ , die vornehmlich genutzt wurden, um die Struktur von Photozyklus-Intermediaten zu bestimmen, sind zum Protonentransport in der Lage, wenn auch mit stark veränderten Pumpeigenschaften.

Die I-U-Kennlinie wird durch die Lebensdauer des M-Intermediats charakterisiert. Die Akkumulation von M und die Steigung der I-U-Kennlinie folgt der Reihe  $BR_{F171C} > BR_{F219L} > BR_{WT} > BR_{D96N} > BR_{D96G}$ . Interessanterweise ist dieses ursprünglich an  $BR_{WT}$  gezeigte Verhalten auch für Mutanten mit einer veränderten Lebensdauer des M-Intermediats konsistent.

Die „Tripel“-Mutante BR<sub>D96G,F171C,F219L</sub> zeigt Pumpeigenschaften, die sich auf die der Einzelmutanten zurückführen lassen. Elektrische und spektroskopische Messungen zeigen eine verlangsamte Bildung des M-Intermediats, die auf einer vergrößerten Entfernung zwischen Schiffbase und primärem Protonenakzeptor D85 basiert. Auch die Reprotonierungsreaktion der Schiffbase aus der cytoplasmatischen Richtung ist durch die Mutation D96G stark verlangsamt. Da in der „Tripel“-Mutante der cytoplasmatische Protonenzugangsweg auch im Grundzustand offen ist und D85 weiter von der Schiffbase entfernt ist als in BR<sub>WT</sub>, sind sowohl die Effizienz des Protonenpumpens, als auch die Fähigkeit zum Aufbau großer Membranpotentiale verringert.

Für den Einfluss Konformationsänderungen auf die Vektorialität bedeutet dies, dass im Rahmen der Bildung von M die Öffnung des cytoplasmatischen Protonenzugangswegs die Schiffbase von D85 weg bewegt. Dies beeinflusst die Richtung der Reprotonierung der Schiffbase beim Zerfall des M-Intermediats und damit die Vektorialität des Transports. Aus der Richtung des primären Protonenakzeptors D85 wird die Reprotonierung der Schiffbase erschwert, während sie aus der Richtung des primären Protonendonors D96 durch Öffnung des cytoplasmatischen Protonenzugangskanals erleichtert wird.

## 4.3 Proteorhodopsin

### 4.3.1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Proteorhodopsin als eine lichtgetriebene Protonenpumpe arbeiten, jedoch im Gegensatz zu BR seine Vektorialität pH-abhängig umkehren kann. Bei alkalischem pH ist es eine auswärtsgerichtete Protonenpumpe, während sich bei azidischem pH die Pumprichtung umkehrt. Dabei spielt der Protonierungszustand der Aminosäure D97 eine entscheidende Rolle für die Richtung des Protonentransports.

### 4.3.2 Die Rolle von D97, dem primären Protonenakzeptor von Proteorhodopsin

Aus der strukturellen Homologie zu D85 von BR kann abgeleitet werden, dass in Proteorhodopsin die Aminosäure D97 als primärer Protonenakzeptor des Schiffbasen-Protons fungieren muss. D97 in Proteorhodopsin hat einen  $pK_a$ -Wert von 7.68, wie durch die Analyse von Absorptionsspektren bei verschiedenen pH-Werten bestimmt werden kann (Abbildung 2.16 A). Dieser Wert ist viel höher als der für D85 in BR anhand des Purpur-zu-Blau-Übergangs bestimmte ( $pK_a = 2.6$ , [188,189]). Weitere Evidenz für die entscheidende Rolle von D97 lieferten FT-IR-spektroskopische Daten, die pH-abhängige Differenzbanden bei ähnlichen Frequenzen wie BR aufweisen. Die beobachteten pH-Abhängigkeiten deuten auf einen  $pK_a$  für D97 hin, der dem mit UV/VIS-Spektroskopie bestimmten entspricht. Der Protonierungszustand von D97 ist der einzige FT-IR-spektroskopisch detektierbare Unterschied zwischen der auswärtspumpenden, alkalischen Form und der einwärts pumpenden, azidischen Form von Proteorhodopsin.

Bei pH-Werten um den  $pK_a$ -Wert von D97 zeigen Proteorhodopsin-Photoströme ein biphasisches Verhalten. Bei pH-Werten zwei Einheiten darüber oder darunter sind die Pumpströme auswärts bzw. einwärtsgerichtet. Bei azidischem pH kann D97 des Proteorhodopsins aufgrund des erhöhten  $pK_a$ -Werts dieser Gruppe nicht länger als primärer Protonenakzeptor für das Schiffbasen-Proton dienen. Daher könnte die Protonenfreisetzung in die andere Richtung erfolgen, was auch die Umkehr des Photostroms erklären würde. Interessanterweise kann gerade in cytoplasmatischer Richtung ein strukturell sehr signifikanter Unterschied zwischen BR und Proteorhodopsin gefunden werden. Die

homologe Aminosäure zu D96, die in BR als primärer Protonendonator fungiert, ist E108 in Proteorhodopsin. Dass Mutationen der Aminosäureposition 96 in BR generell einen starken Einfluss auf die Pumpaktivität von BR haben, konnte im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden. Die Mutation Asp → Glu ist eine konservative Punktmutation, aber die größere Seitenkette des Glutamats verglichen mit der des Aspartats scheint strukturelle Änderungen im cytoplasmatischen Kanal hervorzurufen, welche einwärtsgerichtetes Protonenpumpen erleichtern. Obwohl E108 ständig protoniert zu sein scheint (auf Grundlage der FT-IR-Daten ist der  $pK_a$  von E108 größer als 8.5), kommt es zu einem kontinuierlichen Protonentransfer – selbst bei niedrigem pH. FT-IR-Daten deuten darauf hin, dass das Proton von E108 in stärkere Wasserstoffbrücken-Bindungen eingebunden ist, als das von D96 in BR. Dieses würde ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk für einwärtsgerichtetes Protonentransport zur Verfügung stellen und daher einwärtsgerichtete stationäre Ströme erlauben.

Die Interpretation, dass es sich bei der Umkehr des Pumpstroms von Proteorhodopsin durch die pH-Änderung von 10 nach 5 um ein Artefakt handelt, welches auf einem Gemisch aus *inside-out* und *outside-out* orientiertem Protein basiert, kann ausgeschlossen werden. Die grundsätzlich mögliche Annahme, dass das Protonenpumpen pH-abhängig von der einen oder anderen Spezies ausgeführt und somit eine pH-abhängige Umkehr des Pumpstroms hervorgerufen würde, kann aufgrund der folgenden Beobachtungen ausgeschlossen werden:

- A) In Gegenwart von Ionophoren ist jeder pH-Gradient und jedes elektrische Potential über die Membran aufgehoben, was eine bevorzugte Aktivierung nur einer Subpopulation ausschließt.
- B) Die Polarität der transienten Ströme durch blaue Laserblitze während Hintergrundbeleuchtung ist immer negativ und ändert ihr Vorzeichen nicht pH-abhängig. Da dieses Signal die Reprotonierung der Schiffbase von der extrazellulären Seite widerspiegelt, sollte die bevorzugte Aktivierung jeweils einer von beiden unterschiedlich orientierten Proteinsubpopulationen auch eine Umkehr dieses Signals erwarten lassen. Dieses wurde nicht beobachtet.
- C) In *Xenopus*-Oozyten exprimiertes Proteorhodopsin generierte Photoströme, die ebenso durch pH- und Potentialänderung umgekehrt werden konnten. In den oben beschriebenen Oozyten-

Experimenten und auch in Arbeiten an *Natronobacterium pharaonis* SR11 [201] traten diese Proteine in derselben Orientierung wie in nativen Halobakterien auf. Auch für Proteorhodopsin kann angenommen werden, dass die Orientierung der in nativen Bakterien entspricht.

- D) Schließlich kann eine Umkehr der Pumprichtung durch eine pH-abhängige Änderung der Ionenspezifität (wie z.B. gefunden für den Chlorid- bzw. Protonentransport von Halorhodopsin [203] und der BR-Mutanten D85T [204,205]) ausgeschlossen werden. Unter Zugabe von Triphenylzinn als  $\text{Cl}^-$ -transportierendem Ionophor [199,206] konnte keine Chloridabhängigkeit der Photoströme beobachtet werden.

### **4.3.3 M-ähnliche Intermediate, der Blaulichteffekt**

In Photostrommessungen bei pH 10 konnte ein Blaulichteffekt beobachtet werden, der in einer Verminderung der stationären Photoströme oder in großen blaulichtblitzinduzierten transienten Strömen mit umgekehrter Polarität bezüglich der stationären Photoströme bestand. Dieses Verhalten beruht auf blaulichtinduzierter Reprotonierung der deprotonierten Schiffbase im M-Intermediat vom primären Protonenakzeptor D85. Durch zeitaufgelöste Spektroskopie konnte ein M-ähnliches Intermediat mit einer Lebensdauer von 1 ms bei pH 10 gefunden werden. Bei pH 5 dagegen, bei welchem vorzugsweise die azidische Form des Proteorhodopsin vorliegt, konnte ein solches Intermediat nicht detektiert werden (Abbildung 2.17 A). In Übereinstimmung damit konnte bei pH 5.2 auch nur ein sehr kleiner blaulichtblitzinduzierter transienter Photostrom detektiert werden, was impliziert, dass ein M-ähnliches Intermediat – wenn überhaupt – nur in sehr kleinen Konzentrationen vorliegt (Abbildung 2.19 D). In ähnlicher Weise wurde ein solches Verhalten bei der BR-Mutante  $\text{BR}_{\text{F171C}}$  gefunden. Da bei pH 5.2 auch noch 2 % des Proteins in der alkalischen Form vorliegen (siehe Titrationskurve in Abbildung 2.16 A), könnte der beobachtete blaulichtblitzinduzierte transiente Strom auf dem Beitrag dieser alkalischen Form beruhen, und muß nicht in einem tatsächlichen Blaulichteffekt der azidischen Form begründet sein. Dennoch schließen die Beobachtungen nicht aus, dass ein M-Intermediat auch bei azidischem pH gebildet wird. Falls das M-ähnliche Intermediat eine

kurze Lebensdauer hätte ( $< \mu\text{s}$ ), wäre es sowohl mit spektroskopischen als auch elektrischen Detektionsmethoden nicht zu erfassen.

#### **4.3.4 Intensitätsabhängigkeit: Hinweise auf einen Zwei-Photonen-Prozess**

Ein interessantes Phänomen ist die Intensitätsabhängigkeit der Proteorhodopsin Photoströme. Unabhängig vom pH ergaben die Daten zeitaufgelöster Spektroskopie einen geschwindigkeitslimitierenden Schritt von 40 ms. Die Intensitätsabhängigkeit bei hohem und niedrigem pH ergab einen sättigenden Einwärtsstrom (sichtbar bei niedrigem pH) und einen nichtsättigenden, auswärtsgerichteten Strom (Abbildung 2.20). Unterschiedliche molare Extinktionskoeffizienten der azidischen und der alkalischen Spezies als Erklärung für dieses Verhalten können ausgeschlossen werden (siehe oben). Die beobachtete Intensitätsabhängigkeit könnte darauf beruhen, dass für den einwärtsgerichteten Photostrom der azidischen Form ein Ein-Photonen-Prozess ausreichend ist, während der auswärtsgerichtete Strom der alkalischen Form auf einem Zwei-Photonen-Prozess beruht. Dabei würde die sequentielle Absorption von zwei Photonen (eins im Grundzustand und eins im weiteren Verlauf des Reaktionszyklus) eine Beschleunigung des Reaktionszyklus begründen (Abbildung 4.4). Dieses könnte auch das beobachtete Nichtsättigungsverhalten der alkalischen Form von Proteorhodopsin erklären. Ein ähnliches Zwei-Photonen-Phänomen wurde auch für das Sensorische Rhodopsin II aus *Natronobacterium pharaonis* beobachtet [207].

Die Interpretation des Zwei-Photonen-Prozesses wird durch Messungen mit laserblitzinduzierten Photoströmen unterstützt. Wird Proteorhodopsin bei  $\text{pH} > 7$  mit grünen Lichtblitzen angeregt, ergeben sich transiente Photoströme, die verglichen mit den stationären Photoströmen relativ klein sind. Im Gegensatz dazu sind laserblitzinduzierte Photoströme von BR normalerweise mindestens 5 mal größer als die stationären Photoströme [200] (Abbildung 2.7). In der azidischen Form von Proteorhodopsin konnte schon ein blauer Lichtblitz große transiente Photoströme auslösen – in ähnlicher Weise wie ein grüner Lichtblitz. Die geringe Amplitude des laserblitzinduzierten Photostroms der alkalischen Form von Proteorhodopsin könnte damit erklärt werden, dass die

Anregung mit nur einem Photon nicht zum Durchlaufen eines kompletten Photozyklus ausreicht. Stattdessen würden Abgabe und Aufnahme des Protons von der Schiffbase zur extrazellulären Seite erfolgen.

#### **4.3.5 Transportmoden**

Die Absorption eines Photons durch Proteorhodopsin induziert die Isomerisierung des Retinals, woraufhin die Schiffbase deprotoniert wird und D97 als primärer Protonenakzeptor fungiert. Während dieses Prozesses wird ein  $M_1$ -artiges Intermediat gebildet, wobei die Protonenbindungsstelle der Schiffbase zur extrazellulären Seite orientiert ist (im Folgenden als  $M_{EC}$  bezeichnet). Im transportierenden Photozyklus von BR erfolgt dann die Reaktion zu  $M_2$  – mit Änderung der Schiffbasen-Zugänglichkeit zur cytoplasmatischen Seite – gefolgt von einer Relaxation in den Grundzustand über die Intermediate N und O. Die beobachteten Lichtintensitätsabhängigkeiten lassen vermuten, dass nach der Absorption nur eines Photons in Proteorhodopsin ein BR-analoger, transportierender Photozyklus nur mit geringer Wahrscheinlichkeit erfolgt. Aufgrund des hohen  $pK_a$  des D97 wird danach insbesondere bei einem niedrigen pH-Wert ( $< pK_a$ ) mit hoher Wahrscheinlichkeit wieder ein Proton von der extrazellulären Seite aufgenommen, und der Zyklus verläuft über ein O-ähnliches Intermediat in den PR-Grundzustand. Ähnlich wie in BR findet auch in Proteorhodopsin ein Aufspalten des Pumpzyklus in einen nichttransportierenden „Kurzschlusszyklus“ in einem  $M_{EC}$ -Zustand statt. Diese Interpretation erscheint plausibel, nachdem für BR gezeigt werden konnte, dass eine Arretierung in einem  $M_1$ -Intermediat durch das Potential und ein Zerfall aus diesem  $M_1$ -Intermediat zurück in den Grundzustand über einen nichtpumpenden „Kurzschlusszyklus“ möglich ist. Mechanistisch bedeutet dies, dass sich in Proteorhodopsin der  $pK_a$  der Schiffbase während des Photozyklus in Analogie zu BR von einem hohen auf einen niedrigen Wert und zurück ändern muss [127].

Unter stationären Lichtbedingungen bei  $pH > 7.5$  konnten große Proteorhodopsin-induzierte stationäre Photoströme beobachtet werden, die möglicherweise durch Absorption eines zweiten Photon im N- oder O-Intermediat ermöglicht werden. Dadurch erfolgt die Reprotonierung der Schiffbase von der

cytoplasmatischen Seite in  $M_{CP}$ , einem  $M_2$ -ähnlichen Intermediat mit Zugänglichkeit zur cytoplasmatischen Seite. Das zweite Photon beschleunigt den Transportzyklus durch eine Verschiebung des  $M_{EC}$ - $M_{CP}$ -Gleichgewichtes nach  $M_{CP}$  auf Grundlage des in Abbildung 4.4 A dargestellten Reaktionsschemas [156].

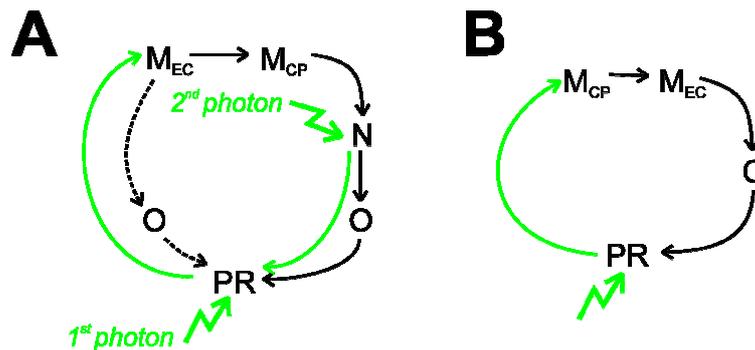


Abbildung 4.4: Reaktionsschema für den Proteorhodopsin Transportzyklus für (A) die alkalische Form und (B) die azidische Form.

Für das einwärtsgerichtete Protonenpumpen der azidischen Form von Proteorhodopsin wird dagegen das in Abbildung 4.4 B dargestellte Modell vorgeschlagen. Obwohl ein M-ähnliches Intermediat sowohl spektroskopisch als auch elektrisch nicht gefunden werden konnte, muss die Existenz eines Intermediats mit deprotonierter Schiffbase, welches zusätzlich seine Zugänglichkeit von EC nach CP verschieben kann, angenommen werden. Die Lebensdauer dieses Intermediats sollte dann im  $\mu$ s-Bereich liegen. Nach initialer Isomerisierung der Schiffbase, wird das Proton zur cytoplasmatischen Seite freigesetzt, und ein M-ähnliches Intermediat mit Zugänglichkeit zur cytoplasmatischen Seite ( $M_{CP}$ ) entsteht. Nach dem „Umschalten“ nach  $M_{EC}$  wird ein Proton von der extrazellulären Seite aufgenommen, und das Molekül fällt in den PR-Grundzustand zurück.

#### 4.3.5.1 Spannungabhängigkeit

In *Xenopus*-Oozyten exprimiertes Proteorhodopsin erlaubt die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der beiden unterschiedlichen Formen. Proteorhodopsin hat die einzigartige Eigenschaft, dass es seine Protonenpumprichtung durch Anlegen eines elektrischen Felds umkehren kann. Abhängig von der Polarität des angelegten elektrischen Felds konnte entweder die alkalische

Form aktiviert und die azidische Form inhibiert werden, oder umgekehrt. Bei einem extrazellulären pH von 7.5 kann die Spannungsabhängigkeit der auswärtsgerichteten Protonenpumpe dargestellt werden. Die I-U-Kennlinie ist linear wie für BR und ihre Extrapolation ergibt ein apparentes Umkehrpotential von ungefähr  $-260$  mV. Bei einem extrazellulären pH von 5.5 ist die I-U-Kennlinie immer noch linear, aber der Pumpstrom kehrt bereits bei  $-80$  mV seine Polarität um. Wie aus den BLM-Experimenten erwartet werden kann, ist der Pumpstrom bei hohen Lichtintensitäten aufgrund der unterschiedlichen Lichtabhängigkeiten der beiden Proteorhodopsin-Formen auswärtsgerichtet, denn während die azidische Form schon in Lichtsättigung ist, trifft das auf die alkalische aufgrund des Zwei-Photonen-Prozesses noch nicht zu. Selbst bei pH 5.5 sind immer noch 5 % der alkalischen Form vorhanden und tragen zum Gesamtstrom bei. Bei niedrigeren Lichtintensitäten, bei denen beide Populationen im nichtsättigenden Bereich arbeiten, wird der relative Beitrag der azidischen Form und des von ihr generierten Einwärtsstroms größer. Daher verschiebt sich das apparente Umkehrpotential bei niedrigen Lichtintensitäten zu einem weniger negativen Potential. Wichtig ist auch, den in Oozyten-Messungen bei pH 5.5 bestehenden Protonengradienten zu beachten, der ein zusätzliches elektrochemisches Potential über die Plasmamembran generiert. Das führt bei einem intrazellulären pH von 7.5 zu zusätzlichen 118 mV (nach der Nernst-Gleichung). Dies ist allerdings immer noch nicht ausreichend, um die Unterschiede zwischen den apparenten Umkehrpotentialen bei pH 7.5 ( $-260$  mV) und pH 5.5 ( $-80$  mV) zu erklären. Die übrige Differenz von ungefähr 60 mV ist wahrscheinlich auf den Beitrag der azidischen Form von Proteorhodopsin zurückzuführen, was andeutet, dass diese Form eine vergleichsweise schwache Ionenpumpe ist, denn sie kann nur ein relativ geringes elektrochemisches Potential generieren.

#### **4.3.5.2 Physiologische Überlegungen**

Die hier präsentierten Daten belegen, dass Proteorhodopsin wie BR als eine effiziente Protonenpumpe arbeiten kann, was auf eine primäre Rolle in der Energetisierung der Zellmembran hindeutet. Wie jedoch kann das mit der Fähigkeit des Proteins, die Pumprichtung umzukehren, in Einklang gebracht werden? Falls Proteorhodopsin in erster Linie die Rolle als Protonentransporter erfüllt, könnte die Existenz von zwei Formen, die in unterschiedliche Richtungen pumpen, eine

bessere Regulation des Membranpotentials der Bakterien ermöglichen. Bei einem realistischen Umgebungs-pH von 8.1 (Meerwasser), befinden sich etwa 30 % des Proteorhodopsins in der azidischen Form und würden Einwärtstransport vermitteln. Weiterhin deutet der beobachtete Zwei-Photonen-Prozess auf einen zusätzlichen Regulationsmechanismus hin. Die Homologie von Proteorhodopsin mit den sensorischen Rhodopsinen, welche als primäre Photorezeptoren sensorische Funktionen erfüllen, könnte allerdings auch auf eine Bedeutung des Proteorhodopsins in der Lichtwahrnehmung hindeuten. Generell erlauben Zwei-Photonen-Prozesse Informationen über einen großen Intensitätsbereich zu verarbeiten. Daher wurde solch ein Mechanismus auch schon für das Sensorische Rhodopsin II aus *Natronobacterium pharaonis* vorgeschlagen [207].

#### **4.3.6 Zusammenfassung**

Proteorhodopsin kann – abhängig vom Umgebungs-pH – als eine auswärts- oder einwärtsgerichtete, lichtgetriebene Protonenpumpe arbeiten. Der Protonierungszustand von D97 ( $pK_a$  7.68) ist entscheidend für dieses bifunktionale Verhalten. D97 dient unter alkalischen Bedingungen als primärer Protonenakzeptor des Schiffbasen-Protons. Azidische Bedingungen führen zur Protonierung von D97 und erzwingen damit einwärtsgerichteten Protonentransport.

Die Lichtintensitätsabhängigkeit der Pumpströme lässt vermuten, dass der Pumpzyklus der azidischen Form von Proteorhodopsin von einem Photon getrieben ist, während der Pumpzyklus der alkalischen Form die sequentielle Absorption von zwei Photonen erfordert und damit das Verhältnis zwischen nichttransportierendem und transportierendem Zyklus verändert.

Da Proteorhodopsin bei pH-Werten, denen marine Bakterien ausgesetzt sind, als effiziente Protonenpumpe arbeitet, könnte es die Grundlage für Photoautotrophie dieser Organismen darstellen, indem es den elektrochemischen Gradienten für die ATP-Synthese zur Verfügung stellt. Die Fähigkeit, die Pumprichtung umzukehren, und der Zwei-Photonen-Prozess, erweitern die Möglichkeiten zur Regulation des Membranpotentials.

## Literaturverzeichnis

# Literaturverzeichnis

- [1] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1994) Garland Publishing, Inc., New York.
- [2] Mitchell, P. (1961) Coupling of Phosphorylation to electron and hydrogen transport by a chemi-osmotic type of mechanism *Nature* 191, 144-148.
- [3] Dean, R.B. (1941) Theories of electrolyte equilibrium in muscle. *Biol. Symp.* 3, 331-348.
- [4] Schatzmann, H.J. (1953) Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium und Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 11, 346-354.
- [5] Skou, J.C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves *Biochim Biophys Acta* 23, 394-401.
- [6] Jørgensen, P.L. (1975) Purification and characterization of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase. V. Conformational changes in the enzyme Transitions between the Na-form and the K-form studied with tryptic digestion as a tool *Biochim Biophys Acta* 401, 399-415.
- [7] Post, R.L., Hegyvary, C. and Kume, S. (1972) Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase *J Biol Chem* 247, 6530-40.
- [8] Albers, R.W. (1967) Biochemical aspects of active transport *Ann Rev Biochem* 36, 727-756.
- [9] Jørgensen, P.L. and Andersen, J.P. (1988) Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins *J Membr Biol* 103, 95-120.
- [10] Karlisch, S.J. and Yates, D.W. (1978) Tryptophan fluorescence of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase as a tool for study of the enzyme mechanism *Biochim Biophys Acta* 527, 115-30.
- [11] Karlisch, S.J., Yates, D.W. and Glynn, I.M. (1978) Conformational transitions between Na<sup>+</sup>-bound and K<sup>+</sup>-bound forms of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase, studied with formycin nucleotides *Biochim Biophys Acta* 525, 252-64.
- [12] Karlisch, S.J. (1980) Characterization of conformational changes in (Na,K) ATPase labeled with fluorescein at the active site *J Bioenerg Biomembr* 12, 111-36.
- [13] Läuger, P. (1991) in: *Electrogenic Ion Pumps*, pp. 168 - 306 Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- [14] Glynn, I.M. (1985) in: *The Enzymes of Biological Membranes*, pp. 35-114 (Martinosi, A.N., Ed.) Plenum Press, New York-London.
- [15] Koenderink, J.B., Swarts, H.G., Stronks, H.C., Hermsen, H.P., Willems, P.H. and De Pont, J.J. (2001) Chimeras of X<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPases. The M1-M6 region of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase is required for Na<sup>+</sup>-activated ATPase activity, whereas the M7-M10 region of H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase is involved in K<sup>+</sup> de-occlusion *J Biol Chem* 276, 11705-11.
- [16] Skou, J.C. and Esmann, M. (1992) The Na,K-ATPase *J Bioenerg Biomembr* 24, 249-61.
- [17] Garrahan, P.J. and Glynn, I.M. (1967) The stoichiometry of the sodium pump *J Physiol* 192, 217-35.
- [18] Garrahan, P.J. and Glynn, I.M. (1967) The incorporation of inorganic phosphate into adenosine triphosphate by reversal of the sodium pump *J Physiol* 192, 237-56.
- [19] Friedrich, T. and Nagel, G. (1997) Comparison of Na<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase pump currents activated by ATP concentration or voltage jumps *Biophys J* 73, 186-94.
- [20] Nakao, M. and Gadsby, D.C. (1986) Voltage dependence of Na translocation by the Na/K pump *Nature* 323, 628-30.
- [21] Rakowski, R.F. (1993) Charge movement by the Na/K pump in *Xenopus* oocytes *J Gen Physiol* 101, 117-44.
- [22] Hilgemann, D.W. (1994) Channel-like function of the Na,K pump probed at microsecond resolution in giant membrane patches *Science* 263, 1429-32.
- [23] Fendler, K., Grell, E., Haubs, M. and Bamberg, E. (1985) Pump currents generated by the purified Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase from kidney on black lipid membranes *Embo J* 4, 3079-85.
- [24] Fendler, K., Jaruschewski, S., Hobbs, A., Albers, W. and Froehlich, J.P. (1993) Pre-steady-state charge translocation in NaK-ATPase from eel electric organ *J Gen Physiol* 102, 631-66.

## Literaturverzeichnis

- [25] Holmgren, M., Wagg, J., Bezanilla, F., Rakowski, R.F., De Weer, P. and Gadsby, D.C. (2000) Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Nature 403, 898-901.
- [26] Beguin, P., Wang, X., Firsov, D., Puoti, A., Claeys, D., Horisberger, J.D. and Geering, K. (1997) The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function Embo J 16, 4250-60.
- [27] Meij, I.C. et al. (2000) Dominant isolated renal magnesium loss is caused by misrouting of the Na(+),K(+)-ATPase gamma-subunit Nat Genet 26, 265-6.
- [28] Minor, N.T., Sha, Q., Nichols, C.G. and Mercer, R.W. (1998) The gamma subunit of the Na,K-ATPase induces cation channel activity Proc Natl Acad Sci U S A 95, 6521-5.
- [29] Shull, G.E., Schwartz, A. and Lingrel, J.B. (1985) Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)ATPase deduced from a complementary DNA Nature 316, 691-5.
- [30] Shull, G.E., Lane, L.K. and Lingrel, J.B. (1986) Amino-acid sequence of the beta-subunit of the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)ATPase deduced from a cDNA Nature 321, 429-31.
- [31] Maunsbach, A.B., Skriver, E. and Hebert, H. (1991) Two-dimensional crystals and three-dimensional structure of Na,K-ATPase analyzed by electron microscopy Soc Gen Physiol Ser 46, 159-72.
- [32] Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution Nature 405, 647-55.
- [33] Sweadner, K.J. and Donnet, C. (2001) Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca(2+)-ATPase of the sarcoplasmic reticulum Biochem J 356, 685-704.
- [34] Wallick, E.T. and Schwartz, A. (1988) Interaction of cardiac glycosides with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Methods Enzymol 156, 201-13.
- [35] Yoda, A. and Yoda, S. (1982) Interaction between ouabain and the phosphorylated intermediate of Na,K-ATPase Mol Pharmacol 22, 700-5.
- [36] O'Brien, W.J., Wallick, E.T. and Lingrel, J.B. (1993) Amino acid residues of the Na,K-ATPase involved in ouabain sensitivity do not bind the sugar moiety of cardiac glycosides J Biol Chem 268, 7707-12.
- [37] Price, E.M. and Lingrel, J.B. (1988) Structure-function relationships in the Na,K-ATPase alpha subunit: site-directed mutagenesis of glutamine-111 to arginine and asparagine-122 to aspartic acid generates a ouabain-resistant enzyme Biochemistry 27, 8400-8.
- [38] Schweigert, B., Lafaie, A.V. and Schwarz, W. (1988) Voltage dependence of the Na-K ATPase: measurements of ouabain-dependent membrane current and ouabain binding in oocytes of *Xenopus laevis* Pflugers Arch 412, 579-88.
- [39] Coppi, M.V., Compton, L.A. and Guidotti, G. (1999) Isoform-specific effects of charged residues at borders of the M1-M2 loop of the Na,K-ATPase alpha subunit Biochemistry 38, 2494-505.
- [40] Croyle, M.L., Woo, A.L. and Lingrel, J.B. (1997) Extensive random mutagenesis analysis of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha subunit identifies known and previously unidentified amino acid residues that alter ouabain sensitivity-implications for ouabain binding Eur J Biochem 248, 488-95.
- [41] Emanuel, J.R., Graw, S., Housman, D. and Levenson, R. (1989) Identification of a region within the Na,K-ATPase alpha subunit that contributes to differential ouabain sensitivity Mol Cell Biol 9, 3744-9.
- [42] Lingrel, J.B. (1992) Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression J Bioenerg Biomembr 24, 263-70.
- [43] Schultheis, P.J. and Lingrel, J.B. (1993) Substitution of transmembrane residues with hydrogen-bonding potential in the alpha subunit of Na,K-ATPase reveals alterations in ouabain sensitivity Biochemistry 32, 544-50.
- [44] Canessa, C.M., Horisberger, J.D., Louvard, D. and Rossier, B.C. (1992) Mutation of a cysteine in the first transmembrane segment of Na,K-ATPase alpha subunit confers ouabain resistance Embo J 11, 1681-7.
- [45] Canessa, C.M., Horisberger, J.D. and Rossier, B.C. (1993) Mutation of a tyrosine in the H3-H4 ectodomain of Na,K-ATPase alpha subunit confers ouabain resistance J Biol Chem 268, 17722-6.

## Literaturverzeichnis

- [46] Feng, J. and Lingrel, J.B. (1994) Analysis of amino acid residues in the H5-H6 transmembrane and extracellular domains of Na,K-ATPase alpha subunit identifies threonine 797 as a determinant of ouabain sensitivity *Biochemistry* 33, 4218-24.
- [47] Palasis, M., Kuntzweiler, T.A., Arguello, J.M. and Lingrel, J.B. (1996) Ouabain interactions with the H5-H6 hairpin of the Na,K-ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain *J Biol Chem* 271, 14176-82.
- [48] Lutsenko, S. and Kaplan, J.H. (1994) Molecular events in close proximity to the membrane associated with the binding of ligands to the Na,K-ATPase *J Biol Chem* 269, 4555-64.
- [49] Lutsenko, S., Anderko, R. and Kaplan, J.H. (1995) Membrane disposition of the M5-M6 hairpin of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase alpha subunit is ligand dependent *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7936-40.
- [50] Mikhailova, L., Mandal, A.K. and Arguello, J.M. (2002) Catalytic Phosphorylation of Na,K-ATPase Drives the Outward Movement of Its Cation-Binding H5-H6 Hairpin *Biochemistry* 41, 8195-202.
- [51] Klodos, I. (1994) in: V, pp. 517-528 (Bamberg, E. and Schoner, W., Eds.) Steinkopff, Darmstadt.
- [52] Smirnova, I.N. and Faller, L.D. (1993) Mechanism of K<sup>+</sup> interaction with fluorescein 5'-isothiocyanate-modified Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase *J Biol Chem* 268, 16120-3.
- [53] Glynn, I.M., Hara, Y., Richards, D.E. and Steinberg, M. (1987) Comparison of rates of cation release and of conformational change in dog kidney Na, K-ATPase *J Physiol* 383, 477-85.
- [54] Kane, D.J., Fendler, K., Grell, E., Bamberg, E., Taniguchi, K., Froehlich, J.P. and Clarke, R.J. (1997) Stopped-flow kinetic investigations of conformational changes of pig kidney Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase *Biochemistry* 36, 13406-20.
- [55] Taniguchi, K. and Mårdh, S. (1993) Reversible changes in the fluorescence energy transfer accompanying formation of reaction intermediates in probe-labeled (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase *J Biol Chem* 268, 15588-94.
- [56] Cha, A. and Bezanilla, F. (1997) Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K<sup>+</sup> channel with fluorescence *Neuron* 19, 1127-40.
- [57] Mannuzzu, L.M., Moronne, M.M. and Isacoff, E.Y. (1996) Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating *Science* 271, 213-6.
- [58] Toyoshima, C. and Nomura, H. (2002) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium *Nature* 418, 605-11.
- [59] Cha, A., Snyder, G.E., Selvin, P.R. and Bezanilla, F. (1999) Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy *Nature* 402, 809-13.
- [60] Sonnleitner, A., Mannuzzu, L.M., Terakawa, S. and Isacoff, E.Y. (2002) Structural rearrangements in single ion channels detected optically in living cells *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12759-64.
- [61] Stürmer, W., Bühler, R., Apell, H.J. and Läuger, P. (1991) Charge translocation by the Na,K-pump: II. Ion binding and release at the extracellular face *J Membr Biol* 121, 163-76.
- [62] Clarke, R.J., Kane, D.J., Apell, H.J., Roudna, M. and Bamberg, E. (1998) Kinetics of Na<sup>(+)</sup>-dependent conformational changes of rabbit kidney Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase *Biophys J* 75, 1340-53.
- [63] Geibel, S., Barth, A., Amslinger, S., Jung, A.H., Burzik, C., Clarke, R.J., Givens, R.S. and Fendler, K. (2000) P(3)-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-oxo]ethyl ATP for the rapid activation of the Na<sup>(+)</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase *Biophys J* 79, 1346-57.
- [64] Humphrey, P.A., Lüpfer, C., Apell, H.J., Cornelius, F. and Clarke, R.J. (2002) Mechanism of the rate-determining step of the Na<sup>(+)</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase pump cycle *Biochemistry* 41, 9496-507.
- [65] Kane, D.J., Grell, E., Bamberg, E. and Clarke, R.J. (1998) Dephosphorylation kinetics of pig kidney Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase *Biochemistry* 37, 4581-91.
- [66] Lin, S.H., Smirnova, I.N., Kasho, V.N. and Faller, L.D. (1997) Eosin, energy transfer, and RH421 report the same conformational change in sodium pump as fluorescein *Ann N Y Acad Sci* 834, 442-4.
- [67] Lüpfer, C., Grell, E., Pintschovius, V., Apell, H.J., Cornelius, F. and Clarke, R.J. (2001) Rate limitation of the Na<sup>(+)</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase pump cycle *Biophys J* 81, 2069-81.
- [68] Freedman, J.C. and Novak, T.S. (1989) Optical measurement of membrane potential in cells, organelles, and vesicles *Methods Enzymol* 172, 102-22.

## Literaturverzeichnis

- [69] Grinvald, A., Fine, A., Farber, I.C. and Hildesheim, R. (1983) Fluorescence monitoring of electrical responses from small neurons and their processes *Biophys J* 42, 195-8.
- [70] Muller, W., Windisch, H. and Tritthart, H.A. (1986) Fluorescent styryl dyes applied as fast optical probes of cardiac action potential *Eur Biophys J* 14, 103-11.
- [71] Clarke, R.J. and Kane, D.J. (1997) Optical detection of membrane dipole potential: avoidance of fluidity and dye-induced effects *Biochim Biophys Acta* 1323, 223-39.
- [72] Stürmer, W., Apell, H.J., Wuddel, I. and Läuger, P. (1989) Conformational transitions and change translocation by the Na,K pump: comparison of optical and electrical transients elicited by ATP-concentration jumps *J Membr Biol* 110, 67-86.
- [73] Heyse, S., Wuddel, I., Apell, H.J. and Stürmer, W. (1994) Partial reactions of the Na,K-ATPase: determination of rate constants *J Gen Physiol* 104, 197-240.
- [74] Bühler, R. and Apell, H.J. (1995) Sequential potassium binding at the extracellular side of the Na,K-pump *J Membr Biol* 145, 165-73.
- [75] Bühler, R., Stürmer, W., Apell, H.J. and Läuger, P. (1991) Charge translocation by the Na,K-pump: I. Kinetics of local field changes studied by time-resolved fluorescence measurements *J Membr Biol* 121, 141-61.
- [76] Butscher, C., Roudna, M. and Apell, H. (1999) Electrogenic partial reactions of the SR-Ca-ATPase investigated by a fluorescence method *J Membr Biol* 168, 169-81.
- [77] Schwappach, B., Stürmer, W., Apell, H.J. and Karlish, S.J. (1994) Binding of sodium ions and cardiotonic steroids to native and selectively trypsinized Na,K pump, detected by charge movements *J Biol Chem* 269, 21620-6.
- [78] Clarke, R.J. and Apell, H.J. (1989) A stopped-flow kinetic study of the interaction of potential-sensitive oxonol dyes with lipid vesicles *Biophys Chem* 34, 225-37.
- [79] Apell, H.J., Nelson, M.T., Marcus, M.M. and Läuger, P. (1986) Effects of the ATP, ADP and inorganic phosphate on the transport rate of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-pump *Biochim Biophys Acta* 857, 105-15.
- [80] Hu, Y.K. and Kaplan, J.H. (2000) Site-directed chemical labeling of extracellular loops in a membrane protein. The topology of the Na,K-ATPase alpha-subunit *J Biol Chem* 275, 19185-91.
- [81] Lorenz, C., Pusch, M. and Jentsch, T.J. (1996) Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13362-6.
- [82] Grygorczyk, R., Hanke-Baier, P., Schwarz, W. and Passow, H. (1989) Measurement of erythroid band 3 protein-mediated anion transport in mRNA-injected oocytes of *Xenopus laevis* *Methods Enzymol* 173, 453-66.
- [83] Hu, Y.K., Eisses, J.F. and Kaplan, J.H. (2000) Expression of an active Na,K-ATPase with an alpha-subunit lacking all twenty-three native cysteine residues *J Biol Chem* 275, 30734-9.
- [84] Hasler, U., Wang, X., Crambert, G., Beguin, P., Jaisser, F., Horisberger, J.D. and Geering, K. (1998) Role of beta-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase *J Biol Chem* 273, 30826-35.
- [85] Geering, K., Theulaz, I., Verrey, F., Hauptle, M.T. and Rossier, B.C. (1989) A role for the beta-subunit in the expression of functional Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in *Xenopus* oocytes *Am J Physiol* 257, C851-8.
- [86] Horisberger, J.D. and Kharoubi-Hess, S. (2002) Functional differences between alpha subunit isoforms of the rat Na,K-ATPase expressed in *Xenopus* oocytes *J Physiol* 539, 669-80.
- [87] Arguello, J.M., Peluffo, R.D., Feng, J., Lingrel, J.B. and Berlin, J.R. (1996) Substitution of glutamic 779 with alanine in the Na,K-ATPase alpha subunit removes voltage dependence of ion transport *J Biol Chem* 271, 24610-6.
- [88] Rakowski, R.F., Vasilets, L.A., LaTona, J. and Schwarz, W. (1991) A negative slope in the current-voltage relationship of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump in *Xenopus* oocytes produced by reduction of external [K<sup>+</sup>] *J Membr Biol* 121, 177-87.
- [89] Arguello, J.M. and Kaplan, J.H. (1994) Glutamate 779, an intramembrane carboxyl, is essential for monovalent cation binding by the Na,K-ATPase *J Biol Chem* 269, 6892-9.
- [90] Peluffo, R.D., Arguello, J.M. and Berlin, J.R. (2000) The role of Na,K-ATPase alpha subunit serine 775 and glutamate 779 in determining the extracellular K<sup>+</sup> and membrane potential-dependent properties of the Na,K-pump *J Gen Physiol* 116, 47-59.

## Literaturverzeichnis

- [91] Peluffo, R.D., Arguello, J.M., Lingrel, J.B. and Berlin, J.R. (2000) Electrogenic sodium-sodium exchange carried out by Na,K-ATPase containing the amino acid substitution Glu779Ala J Gen Physiol 116, 61-73.
- [92] Peluffo, R.D., Lingrel, J.B., Arguello, J.M. and Berlin, J.R. (1997) Changes to Na,K-ATPase alpha-subunit E779 separate the structural basis for VM and ion dependence of Na,K-pump current Ann N Y Acad Sci 834, 339-42.
- [93] Koenderink, J.B., Geibel, S., Grabsch, E., de Pont, J.J., Bamberg, E. and Friedrich, T. (2002) Two-Electrode Voltage Clamp Analysis of Na,K-ATPase Asparagine 776 Mutants Ann N Y Acad Sci akzeptiert.
- [94] Hu, Y.K., Geibel, S., Fendler, K., Bamberg, E. and Kaplan, J.H. (2001) Pre-steady-state charge translocation kinetics of Na,K-ATPase expressed in baculovirus-infected insect cells. Biophys. J. (Annual Meeting Abstracts), 36a.
- [95] Geibel, S., Friedrich, T., Ormos, P., Wood, P.G., Nagel, G. and Bamberg, E. (2001) The voltage-dependent proton pumping in bacteriorhodopsin is characterized by optoelectric behavior Biophys J 81, 2059-68.
- [96] Bahinski, A., Nakao, M. and Gadsby, D.C. (1988) Potassium translocation by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump is voltage insensitive Proc Natl Acad Sci U S A 85, 3412-6.
- [97] Hilgemann, D.W. (1997) Recent electrical snapshots of the cardiac Na,K pump Ann N Y Acad Sci 834, 260-9.
- [98] Lafaire, A.V., Schweigert, B. and Schwarz, W. (1988) Binding of ouabain to the Na-K-ATPase in oocytes of *Xenopus laevis* is voltage-independent Prog Clin Biol Res 268B, 409-16.
- [99] Zillikens, S., Gisselmann, G. and Glitsch, H.G. (2000) The current produced by the E779A mutant rat Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup> pump alpha1-subunit expressed in HEK 293 cells Biochim Biophys Acta 1509, 155-66.
- [100] Feng, J. and Lingrel, J.B. (1995) Functional consequences of substitutions of the carboxyl residue glutamate 779 of the Na,K-ATPase Cell Mol Biol Res 41, 29-37.
- [101] Escobar, A.L., Monck, J.R., Fernandez, J.M. and Vergara, J.L. (1994) Localization of the site of Ca<sup>2+</sup> release at the level of a single sarcomere in skeletal muscle fibres Nature 367, 739-41.
- [102] Borlinghaus, R., Apell, H.J. and Läuger, P. (1987) Fast charge translocations associated with partial reactions of the Na,K-pump: I. Current and voltage transients after photochemical release of ATP J Membr Biol 97, 161-78.
- [103] Moral, Z. et al. (2001) Regulation of ROMK1 channels by protein-tyrosine kinase and -tyrosine phosphatase J Biol Chem 276, 7156-63.
- [104] Schwartz, A., Lindenmayer, G.E. and Allen, J.C. (1975) The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects Pharmacol Rev 27, 3-134.
- [105] Hansen, O. (1984) Interaction of cardiac glycosides with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced inotropy Pharmacol Rev 36, 143-63.
- [106] Lafaire, A.V. and Schwarz, W. (1986) Voltage dependence of the rheogenic Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in the membrane of oocytes of *Xenopus laevis* J Membr Biol 91, 43-51.
- [107] Young, H.S., Xu, C., Zhang, P. and Stokes, D.L. (2001) Locating the thapsigargin-binding site on Ca<sup>(2+)</sup>-ATPase by cryoelectron microscopy J Mol Biol 308, 231-40.
- [108] Apell, H.J., Haring, V. and Roudna, M. (1990) Na,K-ATPase in artificial lipid vesicles. Comparison of Na,K and Na-only pumping mode Biochim Biophys Acta 1023, 81-90.
- [109] Babes, A. and Fendler, K. (2000) Na<sup>(+)</sup> transport, and the E(1)P-E(2)P conformational transition of the Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase Biophys J 79, 2557-71.
- [110] Nagel, G., Fendler, K., Grell, E. and Bamberg, E. (1987) Na<sup>+</sup> currents generated by the purified (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase on planar lipid membranes Biochim Biophys Acta 901, 239-49.
- [111] Apell, H.J., Borlinghaus, R. and Läuger, P. (1987) Fast charge translocations associated with partial reactions of the Na,K-pump: II. Microscopic analysis of transient currents J Membr Biol 97, 179-91.
- [112] Gadsby, D.C., Nakao, M. and Bahinski, A. (1989) Voltage dependence of transient and steady-state Na/K pump currents in myocytes Mol Cell Biochem 89, 141-6.

## Literaturverzeichnis

- [113] Gadsby, D.C., Nakao, M. and Bahinski, A. (1991) Voltage-induced Na/K pump charge movements in dialyzed heart cells Soc Gen Physiol Ser 46, 355-71.
- [114] Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* Nat New Biol 233, 149-52.
- [115] Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A.M., Bamberg, E. and Hegemann, P. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae Science 296, 2395-8.
- [116] Bogomolni, R.A. and Spudich, J.L. (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium* Proc Natl Acad Sci U S A 79, 6250-4.
- [117] Schäfer, G., Engelhard, M. and Muller, V. (1999) Bioenergetics of the Archaea Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 570-620.
- [118] Spudich, J.L., Yang, C.S., Jung, K.H. and Spudich, E.N. (2000) Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans Annu Rev Cell Dev Biol 16, 365-92.
- [119] Michel, H. and Oesterhelt, D. (1976) Light-induced changes of the pH gradient and the membrane potential in *Halobacterium halobium* FEBS Lett 65, 263-266.
- [120] Stoeckenius, W. and Rowen, R. (1967) A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration J Cell Biol 34, 365-93.
- [121] Wolf, G. (2001) The discovery of the visual function of vitamin A J Nutr 131, 1647-50.
- [122] Kühne, W. (1882) Beiträge zur Optochemie. Untersuchungen aus dem physiologischen Institute der Universität Heidelberg 4, 169-249.
- [123] Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1973) Functions of a new photoreceptor membrane Proc Natl Acad Sci U S A 70, 2853-7.
- [124] Racker, E. and Stoeckenius, W. (1974) Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation J Biol Chem 249, 662-3.
- [125] Lozier, R.H., Bogomolni, R.A. and Stoeckenius, W. (1975) Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium Halobium* Biophys J 15, 955-62.
- [126] Lanyi, J.K. and Váró, G. (1996) The Photocycles of Bacteriorhodopsin Israel J. Chem. 35, 365-386.
- [127] Druckmann, S., Ottolenghi, M., Pande, A., Pande, J. and Callender, R.H. (1982) Acid-base equilibrium of the Schiff base in bacteriorhodopsin Biochemistry 21, 4953-9.
- [128] Sheves, M., Albeck, A., Friedman, N. and Ottolenghi, M. (1986) Controlling the pKa of the bacteriorhodopsin Schiff base by use of artificial retinal analogues Proc Natl Acad Sci U S A 83, 3262-6.
- [129] Karvaly, B. and Dancsházy, Z. (1977) Bacteriorhodopsin: a molecular photoelectric regulator. Quenching of photovoltaic effect of bimolecular lipid membranes containing bacteriorhodopsin by blue light FEBS Lett 76, 36-40.
- [130] Ormos, P., Dancsházy, Z. and Karvaly, B. (1978) Mechanism of generation and regulation of photopotential by bacteriorhodopsin in bimolecular lipid membrane Biochim Biophys Acta 503, 304-15.
- [131] Oesterhelt, D. and Hess, B. (1973) Reversible photolysis of the purple complex in the purple membrane of *Halobacterium halobium* Eur J Biochem 37, 316-26.
- [132] Ormos, P., Dancsházy, Z. and Keszthelyi, L. (1980) Electric response of a back photoreaction in the bacteriorhodopsin photocycle Biophys J 31, 207-13.
- [133] Henderson, R. and Unwin, P.N. (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy Nature 257, 28-32.
- [134] Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J.P. and Lanyi, J.K. (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution J Mol Biol 291, 899-911.
- [135] Sass, H.J., Büldt, G., Gessenich, R., Hehn, D., Neff, D., Schlesinger, R., Berendzen, J. and Ormos, P. (2000) Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin Nature 406, 649-53.
- [136] Landau, E.M. and Rosenbusch, J.P. (1996) Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins Proc Natl Acad Sci U S A 93, 14532-5.
- [137] Essen, L., Siegert, R., Lehmann, W.D. and Oesterhelt, D. (1998) Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex Proc Natl Acad Sci U S A 95, 11673-8.

## Literaturverzeichnis

- [138] Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E. and Downing, K.H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy J Mol Biol 213, 899-929.
- [139] Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Feigina, M.Y., Kiselev, A.V. and Lobanov, N.A. (1979) The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview FEBS Lett 100, 219-24.
- [140] Khorana, H.G., Gerber, G.E., Herlihy, W.C., Gray, C.P., Anderegg, R.J., Nihei, K. and Biemann, K. (1979) Amino acid sequence of bacteriorhodopsin Proc Natl Acad Sci U S A 76, 5046-50.
- [141] Khorana, H.G. (1988) Bacteriorhodopsin, a membrane protein that uses light to translocate protons J Biol Chem 263, 7439-42.
- [142] Kataoka, M. and Kamikubo, H. (2000) Structures of photointermediates and their implications for the proton pump mechanism Biochim Biophys Acta 1460, 166-76.
- [143] Vonck, J. (2000) Structure of the bacteriorhodopsin mutant F219L N intermediate revealed by electron crystallography Embo J 19, 2152-60.
- [144] Vonck, J. (1996) A three-dimensional difference map of the N intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle: part of the F helix tilts in the M to N transition Biochemistry 35, 5870-8.
- [145] Kamikubo, H., Kataoka, M., Váró, G., Oka, T., Tokunaga, F., Needleman, R. and Lanyi, J.K. (1996) Structure of the N intermediate of bacteriorhodopsin revealed by x-ray diffraction Proc Natl Acad Sci U S A 93, 1386-90.
- [146] Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J.P. and Lanyi, J.K. (1999) Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution Science 286, 255-61.
- [147] Subramaniam, S. et al. (1999) Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle J Mol Biol 287, 145-61.
- [148] Subramaniam, S. and Henderson, R. (2000) Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin Nature 406, 653-7.
- [149] Kühlbrandt, W. (2000) Bacteriorhodopsin--the movie Nature 406, 569-70.
- [150] Quintanilha, A.T. (1980) Control of the photocycle in bacteriorhodopsin by electrochemical gradients FEBS Lett 117, 8-12.
- [151] Groma, G.I., Helgerson, S.L., Wolber, P.K., Beece, D., Dancshazy, Z., Keszthelyi, L. and Stoeckenius, W. (1984) Coupling between the bacteriorhodopsin photocycle and the protonmotive force in Halobacterium halobium cell envelope vesicles. II. Quantitation and preliminary modeling of the M---bR reactions Biophys J 45, 985-92.
- [152] Dancsházy, Z., Helgerson, S.L. and Stoeckenius, W. (1983) Coupling between the bacteriorhodopsin photocycle kinetics and the protonmotive force 1. Single flash measurements in *Halobacterium halobium* cells Photobiochem. Photobiophys. 5, 347-357.
- [153] Westerhoff, H.V. and Dancsházy, Z. (1984) Keeping a light-driven proton pump under control TIBS 9, 112-117.
- [154] Bamberg, E. and Fahr, A. (1980) Photocurrents induced on black lipid membranes by purple membranes: a method of reconstitution and a kinetic study of the photocurrents Ann N Y Acad Sci 358, 324-7.
- [155] Braun, D., Dencher, N.A., Fahr, A., Lindau, M. and Heyn, M.P. (1988) nonlinear voltage dependence of the light driven pump current of bacteriorhodopsin Biophys J 53, 617-621.
- [156] Nagel, G., Kelety, B., Möckel, B., Büldt, G. and Bamberg, E. (1998) Voltage dependence of proton pumping by bacteriorhodopsin is regulated by the voltage-sensitive ratio of M1 to M2 Biophys J 74, 403-12.
- [157] Nagel, G., Möckel, B., Büldt, G. and Bamberg, E. (1995) Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H<sup>+</sup> pumping FEBS Lett 377, 263-6.
- [158] Butt, H.J., Fendler, K., Bamberg, E., Tittor, J. and Oesterhelt, D. (1989) Aspartic acids 96 and 85 play a central role in the function of bacteriorhodopsin as a proton pump Embo J 8, 1657-63.
- [159] Tittor, J., Soell, C., Oesterhelt, D., Butt, H.J. and Bamberg, E. (1989) A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96---Asn is fully reactivated by azide Embo J 8, 3477-82.

## Literaturverzeichnis

- [160] Tittor, J., Paula, S., Subramaniam, S., Heberle, J., Henderson, R. and Oesterhelt, D. (2002) Proton translocation by bacteriorhodopsin in the absence of substantial conformational changes *J Mol Biol* 319, 555-65.
- [161] Beja, O. et al. (2000) Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea *Science* 289, 1902-6.
- [162] Beja, O., Spudich, E.N., Spudich, J.L., Leclerc, M. and DeLong, E.F. (2001) Proteorhodopsin phototrophy in the ocean *Nature* 411, 786-9.
- [163] Dioumaev, A.K., Brown, L.S., Shih, J., Spudich, E.N., Spudich, J.L. and Lanyi, J.K. (2002) Proton transfers in the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin *Biochemistry* 41, 5348-58.
- [164] Krebs, R.A., Alexiev, U., Partha, R., DeVita, A. and Braiman, M.S. (2002) Detection of fast light-activated H<sup>+</sup> release and M intermediate formation from proteorhodopsin *BMC Physiol* 2, 5.
- [165] Shull, G.E. (1990) cDNA cloning of the beta-subunit of the rat gastric H,K-ATPase *J Biol Chem* 265, 12123-6.
- [166] Bieszke, J.A., Spudich, E.N., Scott, K.L., Borkovich, K.A. and Spudich, J.L. (1999) A eukaryotic protein, NOP-1, binds retinal to form an archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment *Biochemistry* 38, 14138-45.
- [167] Prodromou, C. and Pearl, L.H. (1992) Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis *Protein Eng* 5, 827-9.
- [168] Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA *Mol Cell Biol* 7, 2745-52.
- [169] Hohenfeld, I.P., Wegener, A.A. and Engelhard, M. (1999) Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli* *FEBS Lett* 442, 198-202.
- [170] Shimono, K., Furutani, Y., Kandori, H. and Kamo, N. (2002) A pharaonis Phoborhodopsin Mutant with the Same Retinal Binding Site Residues As in Bacteriorhodopsin *Biochemistry* 41, 6504-6509.
- [171] Shimono, K., Iwamoto, M., Sumi, M. and Kamo, N. (1997) Functional expression of pharaonis phoborhodopsin in *Escherichia coli* *FEBS Lett* 420, 54-6.
- [172] Kates, M., Kushwaha, S.C. and Sprott, G.D. (1982) Lipids of Purple Membrane from Extreme Halophiles and of Methanogenic Bacteria *Meth. Enzymology* 88.
- [173] Friedrich, T., Geibel, S., Kalmbach, R., Chizhov, I., Ataka, K., Heberle, J., Engelhard, M. and Bamberg, E. (2002) Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality *J Mol Biol* 321, 821-38.
- [174] Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches *Pflugers Arch* 391, 85-100.
- [175] Bamberg, E., Alpes, H., Apell, H.J., Bradley, R., Harter, B., Quelle, M.J. and Urry, D.W. (1979) Formation of ionic channels in black lipid membranes by succinic derivatives of gramicidin A *J Membr Biol* 50, 257-70.
- [176] Bamberg, E., Dencher, N.A., Fahr, A. and Heyn, M.P. (1981) Transmembranous incorporation of photoelectrically active bacteriorhodopsin in planar lipid bilayers *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7502-6.
- [177] Neher, E., Sakmann, B. and Steinbach, J.H. (1978) The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes *Pflugers Arch* 375, 219-28.
- [178] Methfessel, C., Witzemann, V., Takahashi, T., Mishina, M., Numa, S. and Sakmann, B. (1986) Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels *Pflugers Arch* 407, 577-88.
- [179] Adam, G., Läuger, P. and Stark, G. (1995) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- [180] Kaim, G. and Dimroth, P. (1998) Voltage-generated torque drives the motor of the ATP synthase *Embo J* 17, 5887-95.

## Literaturverzeichnis

- [181] Müller, K.H., Butt, H.J., Bamberg, E., Fendler, K., Hess, B., Siebert, F. and Engelhard, M. (1991) The reaction cycle of bacteriorhodopsin: an analysis using visible absorption, photocurrent and infrared techniques *Eur Biophys J* 19, 241-251.
- [182] Chizhov, I., Chernavskii, D.S., Engelhard, M., Mueller, K.H., Zubov, B.V. and Hess, B. (1996) Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle *Biophys J* 71, 2329-45.
- [183] Brown, L.S., Dioumaev, A.K., Lanyi, J.K., Spudich, E.N. and Spudich, J.L. (2001) Photochemical reaction cycle and proton transfers in *Neurospora* rhodopsin *J Biol Chem* 276, 32495-505.
- [184] Bieszke, J.A., Braun, E.L., Bean, L.E., Kang, S., Natvig, D.O. and Borkovich, K.A. (1999) The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8034-9.
- [185] Scharf, B., Hess, B. and Engelhard, M. (1992) Chromophore of sensory rhodopsin II from *Halobacterium halobium* *Biochemistry* 31, 12486-92.
- [186] Metzler, D.E. and Harris, C.M. (1978) Shapes of spectral bands of visual pigments *Vision Res* 18, 1417-20.
- [187] Birge, R.R. (1990) Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin *Biochim Biophys Acta* 1016, 293-327.
- [188] Metz, G., Siebert, F. and Engelhard, M. (1992) High-resolution solid state <sup>13</sup>C NMR of bacteriorhodopsin: characterization of [4-<sup>13</sup>C]Asp resonances *Biochemistry* 31, 455-62.
- [189] Fischer, U. and Oesterhelt, D. (1979) Chromophore equilibria in bacteriorhodopsin *Biophys J* 28, 211-30.
- [190] Szaraz, S., Oesterhelt, D. and Ormos, P. (1994) pH-induced structural changes in bacteriorhodopsin studied by Fourier transform infrared spectroscopy *Biophys J* 67, 1706-12.
- [191] Aton, B., Doukas, A.G., Callender, R.H., Becher, B. and Ebrey, T.G. (1977) Resonance Raman studies of the purple membrane *Biochemistry* 16, 2995-9.
- [192] Gerwert, K., Ganter, U.M., Siebert, F. and Hess, B. (1987) Only water-exposed carboxyl groups are protonated during the transition to the cation-free blue bacteriorhodopsin. *FEBS Lett* 213, 39-44.
- [193] Braiman, M.S., Dioumaev, A.K. and Lewis, J.R. (1996) A large photolysis-induced pKa increase of the chromophore counterion in bacteriorhodopsin: implications for ion transport mechanisms of retinal proteins *Biophys J* 70, 939-47.
- [194] Zscherp, C. and Heberle, J. (1997) Infrared difference spectra of the intermediates L, M, N, and O of the bacteriorhodopsin photoreaction obtained by time-resolved attenuated total reflection spectroscopy *J. Phys. Chem. B* 101, 10542-10547.
- [195] Zscherp, C., Schlesinger, R. and Heberle, J. (2001) Time-resolved FT-IR spectroscopic investigation of the pH-dependent proton transfer reactions in the E194Q mutant of bacteriorhodopsin *Biochem Biophys Res Commun* 283, 57-63.
- [196] Zscherp, C., Schlesinger, R., Tittor, J., Oesterhelt, D. and Heberle, J. (1999) In situ determination of transient pKa changes of internal amino acids of bacteriorhodopsin by using time-resolved attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5498-503.
- [197] Fahmy, K., Weidlich, O., Engelhard, M., Sigrist, H. and Siebert, F. (1993) Aspartic acid-212 of bacteriorhodopsin is ionized in the M and N photocycle intermediates: an FTIR study on specifically <sup>13</sup>C-labeled reconstituted purple membranes *Biochemistry* 32, 5862-9.
- [198] Gerwert, K., Hess, B., Soppa, J. and Oesterhelt, D. (1989) Role of aspartate-96 in proton translocation by bacteriorhodopsin *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4943-7.
- [199] Bamberg, E., Hegemann, P. and Oesterhelt, D. (1984) The Chromoprotein of Halorhodopsin Is the Light-Driven Electrogenic Chloride Pump in *Halobacterium halobium* *Biochemistry* 23, 6216-6221.
- [200] Fahr, A., Läger, P. and Bamberg, E. (1981) Photocurrent Kinetics of Purple-Membrane Sheets Bound to Planar Bilayer Membranes *J. Membrane Biol.* 60.
- [201] Schmies, G., Engelhard, M., Wood, P.G., Nagel, G. and Bamberg, E. (2001) Electrophysiological characterization of specific interactions between bacterial sensory rhodopsins and their transducers *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1555-9.

## Literaturverzeichnis

- [202] Subramaniam, S. and Henderson, R. (1999) Electron crystallography of bacteriorhodopsin with millisecond time resolution *J Struct Biol* 128, 19-25.
- [203] Bamberg, E., Tittor, J. and Oesterhelt, D. (1993) Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 639-43.
- [204] Sasaki, J., Brown, L.S., Chon, Y.S., Kandori, H., Maeda, A., Needleman, R. and Lanyi, J.K. (1995) Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump *Science* 269, 73-5.
- [205] Tittor, J., Haupts, U., Haupts, C., Oesterhelt, D., Becker, A. and Bamberg, E. (1997) Chloride and proton transport in bacteriorhodopsin mutant D85T: different modes of ion translocation in a retinal protein *J Mol Biol* 271, 405-16.
- [206] Bamberg, E., Hegemann, P. and Oesterhelt, D. (1984) Reconstitution of halorhodopsin in black lipid membranes *Prog Clin Biol Res* 164, 73-9.
- [207] Schmies, G., Luttenberg, B., Chizhov, I., Engelhard, M., Becker, A. and Bamberg, E. (2000) Sensory rhodopsin II from the haloalkaliphilic natronobacterium *pharaonis*: light-activated proton transfer reactions *Biophys J* 78, 967-76.

# Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ernst Bamberg, der mich großzügig und mit voller Unterstützung betreut hat. Herrn Dr. Thomas Friedrich danke ich herzlich für die teilnehmende und begeisterte Betreuung und für die stetige Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Dr. Georg Nagel bedanke ich mich für die Einführung in die verschiedensten Clamp-Techniken.

Dr. Phil Wood und Barbara Legrum danke ich für die Bereitstellung des Ur-BR-Klons und die Unterstützung in der Molekularbiologie.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Klaus Fendler für die vielstmalige Erklärung selbst der komplexesten kinetischen Modelle.

Prof. Dr. Jack H. Kaplan und Yi-Kang Hu danke ich für die Einführung in die Welt des Baculovirus und die Biochemie der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase und damit für einen wunderschönen Sommer in Portland/Oregon.

Jan B. Koenderink möchte ich für die vielen spätabendlichen  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase Diskussionen danken und für die hervorragende Zusammenarbeit.

Mein allerherzlichster Dank gilt natürlich allen Kollegen, Freunden und Gästen der Arbeitsgruppe Bamberg, die mir nicht nur die Arbeit im Fluoreszenzlabor weniger düster erscheinen ließen, sondern darüber hinaus für viele erinnerungswürdige Abende gesorgt haben. Hervorheben möchte ich dabei Anja Becker und Eva Grabsch, denen ich für unendliche Hilfe im Labor und für viele lange Gespräche danke. Bei Heidi Bergemann bedanke ich mich für die nicht aufzählbaren kleinen Gefälligkeiten und Hilfen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, für ihre liebevolle Förderung meiner langen Ausbildungszeit.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Sven Geibel

Geburtsdatum und -Ort: 20.02.´74 in Groß-Gerau

## Ausbildung

06/93 Abitur, Friedrich-Dessauer-Gymnasium (Frankfurt am Main)

07/93 – 06/94 Wehrdienst in Bruchsal (Baden-Württemberg)

10/94 Beginn des Biologie-Studiums an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität (Frankfurt am Main)

09/96 Diplomvorprüfung

04/98 Diplomhauptprüfung

06/98 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysik (Frankfurt am Main)  
„p-Hydroxyphenacyl-caged ATP: zeitaufgelöste Strom- und Fluoreszenzmessungen an der Na,K-ATPase“

01/99 Diplomvergabe

03/99 Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysik (Frankfurt am Main)

