

Der Pumpenzyklus der Na,K-ATPase:

Eine Charakterisierung von Sekundärstruktur- und Proteinmikroumgebungsänderungen mittels reaktionsinduzierter und zeitaufgelöster FTIR-Differenzspektroskopie

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main**

von

**Michael Stolz
aus Frankfurt am Main**

Frankfurt am Main 2006

(DF1)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. E. Bamberg
Prof. Dr. A. Barth

Datum der Disputation:

Danksagung

Herrn Dr. E. Grell möchte ich für die Themenstellung, die intensive Betreuung und stetige wohlwollende Förderung sowie ständige Diskussionsbereitschaft danken. Besonders seine zahlreichen wissenschaftlichen als auch technischen Hilfestellungen und in jeglicher Hinsicht gewährte großzügige Unterstützung trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. A. Barth, The Arrhenius Laboratories for Natural Sciences der Universität Stockholm, möchte ich für die Einführung in die FTIR Rapid Scan Spektroskopie sowie die Betreuung der IR-Arbeiten -trotz der Distanz zwischen Stockholm und Frankfurt- danken. Seine zahlreichen Tips und Ratschläge waren mir eine große Hilfe.

Herrn Prof. Dr. E. Bamberg, MPI für Biophysik, danke ich für die Übernahme der Betreuung und Bewertung dieser Dissertation von seiten der Universität Frankfurt sowie für anregende Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. W. Mäntele, Institut für Biophysik der Universität Frankfurt, danke ich für seine große Unterstützung und zahlreichen Diskussionen sowie die Möglichkeit, seine Geräte und sein Labor nutzen zu dürfen. Des weiteren möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Instituts für Biophysik der Universität Frankfurt für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für zahlreiche gesellige Mittagessen bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Grell, die mich tatkräftig bei meiner Arbeit unterstützt haben. Frau A. Schacht möchte ich für zahlreiche Proteinpräparationen und unzählige Handgriffe im Laboralltag und Herrn E. Lewitzki für die Einführung in die Spektrofluorimetrie sowie alle guten Ratschläge danken.

Herrn Prof. Dr. W. Schwarz möchte ich für die Möglichkeit danken, biochemisch in seinem Labor zu arbeiten sowie für fachliche Diskussionen. Des weiteren danke ich ihm für zahlreiche Einladungen zu geselligen Events in seiner Arbeitsgruppe. Danken möchte ich ebenfalls allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Schwarz für die freund-

liche Aufnahme und gute Atmosphäre. Frau H. Fotis danke ich besonders für die Einführung in die in vitro Proteinphosphorylierung.

Frau Prof. L. Vasilets, Universität Halle, danke ich für zahlreiche fachliche Diskussionen und gute Ratschläge bezüglich in vitro Proteinphosphorylierung.

Danken möchte ich der Werkstatt am Max-Planck-Institut für Biophysik und hier insbesondere Herrn R. Bergbauer, Herrn J. Reichert sowie Herrn O. Bauer für die Planung und den Bau des Probenwechslers für den IR-Versuchsaufbau. Ohne diese tatkräftige Hilfe wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. J. Corrie, National Institute of Medical Research London, möchte ich für die Zurverfügungstellung zahlreicher geschützter Verbindungen für die IR-Spektroskopie danken.

Herrn Prof. Dr. R. Warmuth, The State University of New Jersey, danke ich für die Synthese sowie die analytische Charakterisierung eines neuen geschützten ATP.

Herrn M. Weimar danke ich für die Synthese, Reinigung sowie Charakterisierung einer geschützten Ammoniumverbindung.

Den Herren A. Geoffroy, N. Martin und D. Richner der Solvias AG in Basel danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den kalorimetrischen und rheologischen Messungen.

Herrn Prof. Dr. R. Kolbesen möchte ich für die Durchführung von Calcium-Spurenbestimmung mittels der TXRF-Spektrometrie danken. Hier danke ich insbesondere Frau C. Rittmayer für zahlreiche Calcium-Bestimmungen.

Für viele hervorragende zeichnerische Ideen sowie deren Umsetzung und eine große Portion Geduld möchte ich mich bei Frau H. Volk bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei allen Diplomanden, Doktoranden und Postdoktoranden sowie allen Mitarbeitern für das angenehme Arbeitsklima und eine gute Zeit am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main bedanken.

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

C. Carrer, M. Stolz, E. Lewitzki, C. Rittmeyer, B. O. Kolbesen, E. Grell (2006) Removing coordinated metal ions from proteins. A fast and mild method in aqueous solution. *Anal. Bioanal. Chem.* (submitted).

M. Stolz, E. Lewitzki, W. Mäntele, A. Barth and E. Grell (2005) Inhibition and partial reactions of Na,K-ATPase studied by FTIR difference spectroscopy. *Biopolymers* (in press, DOI: 10.1002 / bip.20427).

E. Grell, E. Lewitzki, A. Schacht and M. Stolz (2004) Nucleotide/Protein Interaction: Energetic and structural features of Na,K-ATPase. *J. Ther. Anal. Cal.* 77, 471-481.

M. Stolz, E. Lewitzki, E. Schick, M. Mutz, and E. Grell (2003) Calorimetry of Na,K-ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 986, 245-246.

1	Einleitung.....	6
1.1	Die Na,K-ATPase.....	6
1.1.1	Kationen-transportierende ATPasen.....	6
1.1.2	Funktion	6
1.1.3	Reaktionszyklus	8
1.1.4	Struktur	10
1.2	Die Infrarot-Spektroskopie zur Untersuchung von Proteinen.....	14
1.2.1	IR Spektroskopie – Grundlagen.....	14
1.2.2	Infrarotspektroskopie an Proteinen	17
1.2.3	Reaktionsinduzierte Infrarot-Differenzspektroskopie.....	18
1.3	Zielsetzung.....	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Biochemische Methoden.....	23
2.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
2.1.2	Western-Blotting.....	24
2.1.3	Immunochemische Verfahren	25
2.1.4	In vitro Phosphorylierung/Dephosphorylierung der Na,K-ATPase.....	25
2.1.5	Bestimmung der enzymatischen ATP-Hydrolyseaktivität	26
2.1.5.1	Phosphatbestimmung	26
2.1.5.2	Gekoppelter Aktivitätstestest.....	26
2.1.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
2.1.6.1	Lowry-Assay	27
2.1.6.2	Bio-Rad Protein Assay	28
2.1.6.3	Spektralphotometrische Proteinbestimmung.....	28
2.2	Biophysikalische Methoden	28
2.2.1	FTIR-Spektroskopie.....	28
2.2.1.1	Zeitaufgelöste FTIR-Messungen	30
2.2.1.2	Versuchsaufbau	31
2.2.1.3	Photolyse der geschützten Verbindungen	33
2.2.1.4	Probenpräparation.....	33
2.2.1.5	Normierung auf gleiche ATPase-Konzentration	35
2.2.1.6	Photolysekorrektur	35
2.2.1.7	Berechnung und Zuordnung von Differenzspektren	36
2.2.1.8	Berechnung des COBSI-Index	37
2.2.1.9	Auswertung kinetischer Daten	38
2.2.2	Spurenbestimmung von Alkali- und Erdalkaliionen	38
2.2.3	Fluoreszenz-Spektroskopie	39
2.2.3.1	Gleichgewichtsmessungen	39
2.2.3.2	Kinetische Messungen.....	39
2.2.4	Kalorimetrie	40
2.2.5	UV/VIS-Spektroskopie.....	41
2.2.6	Viskositätsmessungen.....	42
2.3	Material	43
2.3.1	Chemikalien, Proteine.....	43

2.3.2	Ca-ATPase	45
2.3.3	Na,K-ATPase	47
2.3.3.1	Isolierung der gereinigten Na,K-ATPase	47
2.3.3.2	Solubilisierung der gereinigten Na,K-ATPase	49
2.3.3.3	Markierung der Na,K-ATPase mit FITC	50
2.3.3.4	Fluoreszenzmarkierung der Na,K-ATPase mit RH421	51
2.3.3.5	Herstellung von Oligomycin-Na,K-ATPase	51
2.3.4	Geschützte Verbindungen	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Infrarot-Spektroskopie	54
3.1.1	Kontrollversuche	54
3.1.1.1	Photolysekontrolle und -korrektur	54
3.1.1.2	ATPase-Kontrollen	57
3.1.2	Nukleotidbindung an die Na,K-ATPase	58
3.1.2.1	ATP-Beladung	58
3.1.2.2	ADP-Bindung	63
3.1.2.3	AMPPNP-Bindung	65
3.1.3	Die Phosphorylierung der Na,K-ATPase in Gegenwart von 1,2 M Na⁺: E1P-Bildung	67
3.1.4	Die Differenz aus E1P-Bildung und ATP-Beladung: Phosphorylierung	71
3.1.5	Die Phosphorylierung der Na,K-ATPase in Gegenwart von 130 mM Na⁺: E2P-Bildung	73
3.1.6	Die Differenz aus E2P- und E1P-Bildung: Phosphoenzym-Konversion	77
3.1.7	Na,K-ATPase katalysierte ATP-Hydrolyse	80
3.1.8	IR-spektroskopische Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Na,K-ATPase	83
3.1.9	Die Zuordnung von Phosphatschwingungen: E1P- und E2P-Bildung mittels [γ-¹⁸O₃] caged ATP	85
3.1.10	Rück-Phosphorylierung	88
3.1.11	Ammoniumbindung	90
3.1.12	Das inhibierte Enzym	93
3.1.12.1	Ouabain	93
3.1.12.2	Oligomycin	95
3.1.13	Vergleich der Na,K-ATPase aus Ente, Hai und Schwein	97
3.1.14	Der Einsatz von N⁹-NPE-caged ATP	103
3.1.14.1	Photolyse von N ⁹ -NPE-caged ATP	104
3.1.14.2	ATP-Bindung an die Na,K-ATPase	106
3.1.14.3	E2P-Bildung	108
3.2	Ergänzende Untersuchungen mit anderen Methoden	110
3.2.1	Ammoniumbindung an die Na,K-ATPase	110
3.2.2	Ouabain-Bindung an die Na,K-ATPase	112
3.2.3	Überprüfung der Einsatzfähigkeit des N⁹-NPE-caged ATP zur Untersuchung der Na,K-ATPase	114
3.3	Eigenschaften der Na,K-ATPase in IR-Proteinfilmen	117
3.3.1	Viskositätsmessungen in hochkonzentrierter Enzymsuspension	117

3.3.2	Aktivitätsuntersuchungen in Abhängigkeit von der Viskosität.....	119
3.3.3	Abhängigkeit der Kinetik der Eosin-Bindung von der Viskosität	121
3.3.4	Kalorimetrische Untersuchungen an der Na,K-ATPase in Proteinfilm.....	122
4	Diskussion	125
4.1	Der IR-spektroskopische Vergleich von Teilreaktionen der Na,K-ATPase	125
4.1.1	Nukleotid-Bindung	128
4.1.2	E1P-, E2P-Bildung und enzymatisch katalysierte ATP-Hydrolyse	133
4.1.3	Die Inhibition der Na,K-ATPase durch Ouabain.....	142
4.2	Spezielle Eigenschaften des IR-Proteinfilms.....	143
4.3	IR-spektroskopischer Vergleich der Na,K-ATPase mit der Ca-ATPase.....	144
4.3.1	ATP-Bindung	145
4.3.2	Phosphorylierung	148
4.3.3	Phosphoenzym-Konversion	151
5	Zusammenfassung	153
6	Anhang.....	156
6.1	Posttranslationale Modifikation der Na,K-ATPase	156
6.1.1	In vitro Dephosphorylierung	156
6.1.2	In vitro Phosphorylierung	158
6.2	Die Ca ²⁺ -Bindung und -Dissoziation an die Ca-ATPase	160
6.2.1	Vesikuläre Ca-ATPase	161
6.2.2	DOC-behandelte Ca-ATPase.....	162
6.2.3	Solubilisierete Ca-ATPase	163
6.2.4	RR 120 gereinigte Ca-ATPase.....	164
7	Literaturverzeichnis	166

Abkürzungsverzeichnis

AS	: Aminosäure
AI/II	: Amid I/II-Schwingung
ADP/ATP	: Adenosindiphosphat/Adenosintriphosphat
AMPPNP	: 5'-Adenyl-imido-diphosphat
ATPase	: Adenosintriphosphatase
BCIP	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
cATP	: caged ATP
CDTA	: 1,2-Diamino-cyclohexan-tetraessigsäure
C ₁₂ E ₈	: Octaethylenglycol-mono-n-dodecylether
DSC	: <u>D</u> ifferential <u>S</u> canning <u>C</u> alorimetry
DTT	: 1,4-Dithio-DL-threitol
DMB	: Dimethoxy-bezoyl-Schutzgruppe
DOC	: Deoxycholat
E	: Enzym: Na,K-ATPase
EDTA	: Ethylen-diamin-tetraessigsäure
EtOH	: Ethanol
FTIR	: Fourier-Transformation-Infrarot
FITC	: Fluorescein-5'-isothiocyanat (Isomer I)
FI	: Fluoreszenzintensität
HEPES	: 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
IR	: Infrarot
k _A	: Assoziationskonstante
LDH	: Lactatdehydrogenase
MeOH	: Methanol
MES	: 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	: 3-(N-morpholino)propansulfonsäure
MWM	: Molekulargewichtsmarker
NADH	: Nicotinamid-Adenin-dinukleotid, reduzierte Form
NAD ⁺	: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NBT	: Nitroblau-tetrazolin
NPE	: (1-(2-nitro-phenyl)ethyl)-Schutzgruppe
O	: Ouabain
Om	: Oligomycin

P_i	: Anorganisches Phosphat
PAGE	: <u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> elee <u>l</u> ektrophorese
PEP	: Phosphoenolpyruvat
PK	: Proteinkinase
PP	: Proteinphosphatase
PVDF	: Polyvinyl-difluorid
PyK	: Pyruvatkinase
Py	: Pyruvat
R	: Ribose
RFI	: <u>R</u> elative <u>F</u> luoreszenz- <u>I</u> ntensität
RH421	: N-(4-Sulfobutyl)-4-(4-(p-dipentylaminophenyl)butadieyl)pyridin
RSA	: Rinderserum-Albumin
SDS	: Natriumdodecylsulfat
TCA	: Trichloressigsäure
Tris	: Tris(hydroxymethyl)aminomethan
(w/w)	: Gewicht/Gewicht
(w/v)	: Gewicht/Volumen
v_{as}	: Asymmetrische Valenzschwingung
v_s	: Symmetrische Valenzschwingung
δ	: Deformationsschwingung
$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: Anregungs-/Emissionswellenlänge

1 Einleitung

1.1 Die Na,K-ATPase

1.1.1 Kationen-transportierende ATPasen

Enzyme, die ATP als Energieüberträger nutzen und es dabei hydrolytisch spalten, bezeichnet man als ATPasen. Eine spezielle Klasse dieser Enzyme sind die Kationen-transportierenden ATPasen (Skou, 1988). Sie spielen eine essentielle Rolle im Aufbau und in der Erhaltung von Ionengradienten zwischen unterschiedlichen Zellkompartimenten und Außenmedien. Es werden drei Klassen von Kationen-transportierenden ATPasen unterschieden:

a) P-ATPasen

P-ATPasen bilden ein kovalent gebundenes Phosphoaspartat-Intermediat. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie vermitteln den aktiven Kationentransport biologisch relevanter Kationen durch Zellmembranen. Vertreter sind unter anderem die ubiquitäre Na,K-ATPase, die gastrische H/K-ATPase und die Ca-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums.

b) F-ATPasen

Im Gegensatz zu den P-ATPasen bilden die F-ATPasen kein kovalent gebundenes Phospho-Intermediat. Sie sind sowohl zur ATP-Hydrolyse als auch zur ATP-Synthese -ihrer Hauptaufgabe- befähigt.

c) V-ATPasen

Vakuoläre ATPasen haben einen der F-ATPasen ähnlichen Funktionsmechanismus und molekularen Aufbau. Im Kontrast zu den F-ATPasen fungieren sie aber ausschließlich als ATP-getriebene Protonenpumpen.

1.1.2 Funktion

Die weit verbreiteten P-ATPase Gene findet man in Eukaryonten, Prokaryonten und Archaeen. Basierend auf genetischen Vergleichen kann die P-ATPase-Familie in fünf verschiedene Äste aufgeteilt werden (Møller et al., 1996). Innerhalb einer Unterfamilie erfolgt

eine weitere Aufteilung nach transportierten Kationen. Während die Ca-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums der Unterfamilie IIA zugehörig ist, zählt die Na,K-ATPase und die gastrische H/K-ATPase zur Kategorie IIC. Die ubiquitäre Na,K-ATPase ist ein integrales Membranprotein, welches in nahezu allen Vertebratenzellen für den Aufbau und die Erhaltung eines elektrochemischen Membranpotentials verantwortlich ist. Während eines Pumpenzyklus befördert das Enzym 3 Na⁺-Ionen aus der Zelle hinaus und 2 K⁺-Ionen in die Zelle hinein. Dieser Transport ist elektrogen (Garrahan und Glynn, 1967), da bei jedem Zyklus eine positive Netto-Ladung über die Membran transportiert wird. Durch die Na,K-ATPase wird über die Zellmembran sowohl ein K⁺-Gradient als auch ein Na⁺-Gradient mit unterschiedlichen Vorzeichen aufrecht erhalten. Hierbei beträgt die extrazelluläre Natriumkonzentration und die intrazelluläre Kaliumkonzentration in beiden Fällen ca. 140 mM (Abb. 1.1). Es entsteht ein elektrisches Ruhepotential, das intrazellulär etwa -80 mV beträgt. Zum Membranpotential trägt ferner - allerdings untergeordnet - das K⁺-, das Na⁺- und Chloriddiffusionspotential bei (Chlorid ist intrazellulär in geringerer Konzentration als extrazellulär vorhanden).

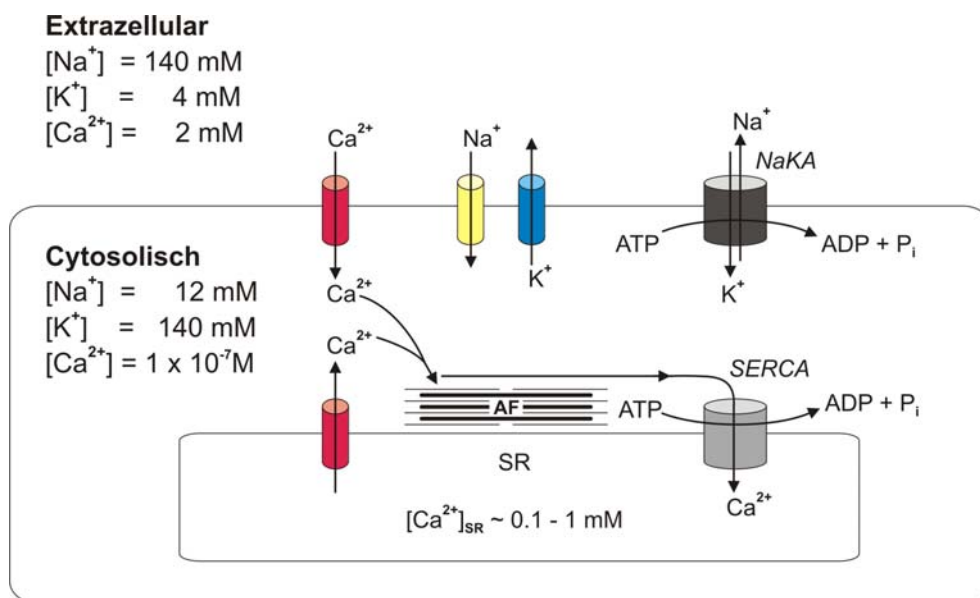


Abb. 1.1: Der Transport von Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ in der Zelle (am Beispiel einer Muskelzelle): **NaKA**: Na,K-ATPase, **SR**: Sarkoplasmatisches Retikulum, **SERCA**: Ca-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, **AF**: Actomyosin-Filamente, die farbigen Zylinder symbolisieren jeweils das ganze Enzym. Funktionsbeispiel: In einer exzitatorischen Zelle wird durch ein ankommendes Aktionspotential ein Na⁺-Einfluß durch die Öffnung spannungsgeregelter Na⁺-Kanäle induziert, der seinerseits wiederum ein Öffnen der Ca²⁺- und K⁺-Kanäle in der Plasmamembran verursacht. Ca²⁺ strömt in die Zelle ein und führt zur Öffnung der Ca²⁺-Kanäle im SR. Die hohe Ca²⁺-Konzentration im Cytosol führt zu einer Kontraktion der Actomyosin-Filamente. Die Na,K-ATPase und die Ca-ATPase stellen nun die im Ausgangszustand herrschenden Konzentrationen an Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ wieder her (Konzentrationsangaben aus Kocheharov, 2001).

Das elektrochemische Potential wird von tierischen Zellen zur osmotischen Kontrolle des Wassergehalts, elektrischen Erregbarkeit von Nervenzellen, Muskelkontraktion und zum aktiven Transport von Glucose und Aminosäuren genutzt.

1.1.3 Reaktionszyklus

Entdeckt wurde die Na,K-ATPase 1957 von J. Skou. Er beschrieb den Effekt von unterschiedlichen Kationen auf ein Enzym aus der Mikrosomalfraktion von Nervenzellen einer bestimmten Krebsgattung (Skou, 1957). Etwa zehn Jahre später schlugen Albers und Post (Albers, 1967, Post et. al., 1969) Modelle zur Erklärung des Reaktionszyklus der Na,K-ATPase vor. Die Nomenklatur dieser beiden Modelle beruhte hauptsächlich auf kinetischen Betrachtungen der Phosphorylierung/Dephosphorylierung in Abhängigkeit vom kationischen Medium (Na⁺/K⁺-Abhängigkeit). Ein struktureller Bezug der E1/E2-Nomenklatur wurde erstmals durch Jørgensen (1975) hergestellt. Dem unterschiedlichen Verdauungsmuster im SDS-Gel nach Proteaseverdau wurden hier zwei unterschiedliche strukturelle Konformationen des Enzyms (E1 und E2) zugeordnet. Diese beiden Konformationen haben sowohl unterschiedliche Affinitäten zu Nukleotiden als auch zu K⁺ und Na⁺. Später wurde klar, daß der Pumpenzyklus noch weitere Zwischenschritte beinhaltet (Jencks, 1989). Die E1/E2 Nomenklatur wird allgemein zur Charakterisierung bestimmter Enzymzustände angewandt.

Die einzelnen Schritte im Reaktionszyklus (Abb. 1.2) werden im folgenden kurz erläutert. Alle Schritte in diesem Reaktionszyklus sind reversibel, so daß er unter speziellen Bedingungen *in vitro* auch in entgegengesetzter Richtung, also unter Bildung von ATP durchlaufen werden kann. In Abhängigkeit vom Kationenmedium unterscheidet man den in Anwesenheit von K⁺, Na⁺ und Mg²⁺ ablaufenden Gesamtzyklus von dem -nur in Anwesenheit von Na⁺ und Mg²⁺ ablaufenden- kleinen Na⁺-Zyklus (Abb. 1.2 durchgezogener bzw. gestrichelter Kreis). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Zyklus in Anwesenheit von Kalium ist der Konformationsübergang von E2(K⁺) nach E1·ATP·K⁺ (Kane et al., 1998). Im kleinen Na⁺-Zyklus hingegen (gestrichelter Kreis in Abb. 1.2) wird der geschwindigkeitsbestimmende Schritt durch den Übergang E2-P nach E2 flankiert (Lüpfert et al., 2001). Okklusion bedeutet in diesem Zusammenhang der Übergang von Na⁺ und K⁺ von dem wässrigen Medium in die Membranphase. Dort sind diese Kationen gegenüber dem Außenmedium abgeschirmt (Skou, 1988).

- Die Na,K-ATPase bindet in Anwesenheit von Mg^{2+} auf der intrazellulären Seite mit hoher Affinität ein Molekül ATP, drei Na^+ und erreicht somit den Zustand $E1 \cdot ATP \cdot Na_3^+$.
- In diesem Zustand wird das Enzym phosphoryliert; ADP dissoziiert und die drei Na^+ werden unter Ausbildung des Intermediats $E1-P(Na_3^+)$ okkludiert.
- Daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung unter Bildung von $E2-P(Na_3^+)$ und einer nachfolgenden Erniedrigung der Affinität für Na^+ , das auf der extrazellulären Seite dissoziieren kann.
- Extrazellulär erfolgt in Anwesenheit von K^+ eine hoch affinen Bindung von zwei K^+ an $E2-P$, welche die Dephosphorylierung der Na,K-ATPase einleitet und zur Okklusion beider K^+ führt ($E2(K_2^+)$).
- In Anwesenheit von K^+ führt die nieder affine ATP-Bindung zur Konformationsänderung in den $E1 \cdot ATP \cdot K_2^+$ -Zustand und zur anschließenden Freisetzung der zwei gebundenen K^+ in das Cytoplasma. Damit ist der Zyklus wieder an seinem Ausgangspunkt angelangt.

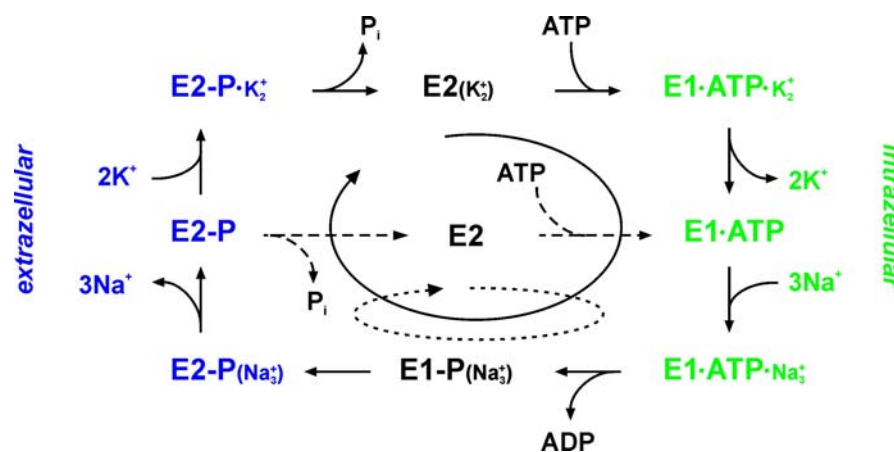


Abb. 1.2: Modifiziertes Albers-Post Schema des Kationentransports der Na,K-ATPase. E: Enzym, E2-P: Kovalente Bindung zwischen E und P, E1-ATP: Nichtkovalente Bindung zwischen E und ATP, (Na^+), (K^+) symbolisiert die okkludierten Kationen.

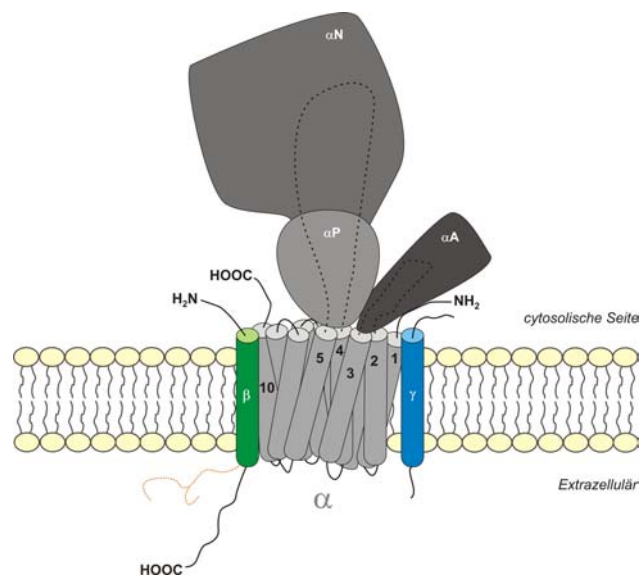
Angemerkt sei hier, daß es auch möglich ist den phosphorylierten Zustand EP durch die Phosphorylierung mittels anorganischem Phosphat P_i und Mg^{2+} zu erreichen (Post et al.,

1975, Schuurmans Stekhoven et al., 1981). Das Produkt dieser sogenannten „backdoor Phosphorylierung“ wird ebenfalls dem E2P-Zustand zugerechnet (Apell et al., 1996).

1.1.4 Struktur

Die Na,K-ATPase stellt mit etwa 155 kDa den größten Proteinkomplex innerhalb der Familie der P-Typ Kationenpumpen dar. Er besteht aus drei Untereinheiten, wobei die kleinste funktionelle Gruppierung ein Heterodimer, bestehend aus der α - und β -Untereinheit, ist (Jørgensen et al., 1988). Die schwere α -Untereinheit (etwa 113 kDa) stellt mit ihren Phosphorylierungs- und Bindungsstellen für Na^+ , K^+ , ATP und Inhibitoren die katalytische Untereinheit dar. Dem entgegen nimmt die partiell glucosilierte β -Untereinheit mit ungefähr 35 kDa regulatorische Aufgaben wahr. Sie scheint für die Zielsteuerung und die Faltung des Proteins in die Plasmamembran verantwortlich zu sein (Geering, 2001). Die wesentlich kleinere γ -Untereinheit (~ 7 kDa) gehört zur Familie der sogenannten Ionen-transport regulierenden FXYD-Proteinfamilie. Auch sie scheint gewebespezifische regulatorische Funktionen in Bezug auf die Aktivität und die Na^+ , K^+ und ATP Affinität auszuüben (Cornelius et al., 2003). Abb. 1.3 zeigt ein Modell zur Topologie der Na,K-ATPase. Das C-terminale sowie das N-terminale Ende der aus zehn Transmembransegmenten zusammengesetzten α -Untereinheit liegt auf der cytoplasmatischen Seite (Sweadner et al. 2001). Sowohl die Phosphorylierungsstelle Asp 369 als auch die ATP-Bindungsstelle liegen auf der großen cytoplasmatischen Schleife zwischen den Transmembransegmenten vier und fünf. Die β - und die γ -Untereinheit besitzt jeweils nur ein Transmembransegment.

Abb. 1.3: Schematisches Modell der Na,K-ATPase.



Bis heute ist in Säugetieren die Existenz vier verschiedener Isoformen der α -Untereinheit und dreier Isoformen der β -Untereinheit bekannt. Diese Isoformen unterscheiden sich durch unterschiedliche Affinitäten für Substrat, Na^+ , K^+ und Inhibitoren (Crambert et al. 2000). Durch die Kombination verschiedener Isoformen kommt es zu einer Vielzahl von Na,K-ATPase Isozymen, die gewebe- und zellspezifisch exprimiert werden. Eine zentrale Frage in der Physiologie des aktiven Na^+ - und K^+ -Transports ist die Steuerung der Expression dieser Isoenzyme und den damit verbundenen spezifischen Eigenschaften sowohl in Bezug auf die posttranslationale Modifikation als auch auf die Kurz- und Langzeitregulation (Therien and Blostein, 2000).

Zum detaillierten Verständnis des Reaktionszyklus und der physiologischen Regulation der Na,K-ATPase sind jedoch hochauflösende molekulare Strukturinformationen unabdingbar. Trotz intensiver Anstrengungen verschiedener Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet (Deguchi et al. 1977, Skriver et al. 1981, Maunsbach et al. 1991) liegen bis heute nur elektronenmikroskopische Bildrekonstruktionen mit einer Auflösung von 11 Å vor (Rice et al. 2001, Hebert et al. 2001). Jedoch gelang es Toyoshima und seinen Mitarbeitern zwischen 2000 und 2004 (Toyoshima et al., 2000, 2002, 2004a, 2004b), die atomare Struktur der eng verwandten Ca-ATPase in fünf verschiedenen Zuständen zu bestimmen. Diese fünf Kristallstrukturen bilden einen wichtigen Aspekt für eine detaillierte Analyse des konformativen Wechsels innerhalb des Reaktionszyklus. Während sich die Na,K-ATPase aus drei Untereinheiten zusammensetzt, besteht die Ca-ATPase aus nur einer Untereinheit von etwa 110 kDa. Eine große Übereinstimmung der Primärstrukturen, übereinstimmende Hydrophobizitätsprofile und Studien zur Proteasezugänglichkeit der Proteinstruktur rechtfertigen eine Anpassung der Primärstruktur der α -Untereinheit der Na,K-ATPase an die dreidimensionale Struktur der Ca-ATPase (Sweadner et al. 2001).

Kristallstruktur der Ca-ATPase

Im folgenden werden zwei Kristallstrukturen der Ca-ATPase , die das Enzym in verschiedenen Zuständen zeigen, beschrieben (Abb. 1.4). Zum einen ist dies der mit Ca^{2+} beladene Zustand E1Ca_2 (Toyoshima et al., 2000) und zum anderen der mit Thapsigargin (TG) stabilisierte E2TG -Zustand (Toyoshima et al., 2002). Die α -Untereinheit der Na,K-ATPase setzt sich wie die Ca-ATPase aus zwei Teilen zusammen (Jørgensen et al. 2003): Der für den Kationentransport zuständige, aus zehn Helices bestehende Transmembranabschnitt, sowie der, aus drei globulären Domänen zusammengesetzte cytoplasmatische Teil. Hierbei

werden die A- (actuator), die P- (phosphorylation) und die N-Domäne (nucleotide-binding) unterschieden.

Die A-Domäne

Die A-Domäne besteht aus einem N-terminalen Teil der Polypeptidkette und der Schleife zwischen M2 und M3. Diese Domäne, die durch drei Schleifen mit dem Transmembranteil verbunden ist, stellt innerhalb des E1Ca₂-Zustandes eine isolierte Region dar. Beim Übergang in den E2(TG)-Zustand erfährt sie eine Rotation um eine vertikale Achse von annähernd 110° und eine starke Wechselwirkung mit der N- und P-Domäne.

Die P-Domäne

Das Zentrum des cytoplasmatischen Kopfstückes ist die P-Domäne, die den zu phosphorylierenden Rest Asp 351 enthält. Die P-Domäne enthält sieben ineinander verwobene parallele β -Faltblätter, die mit acht kurzen α -Helices vergesellschaftet sind.

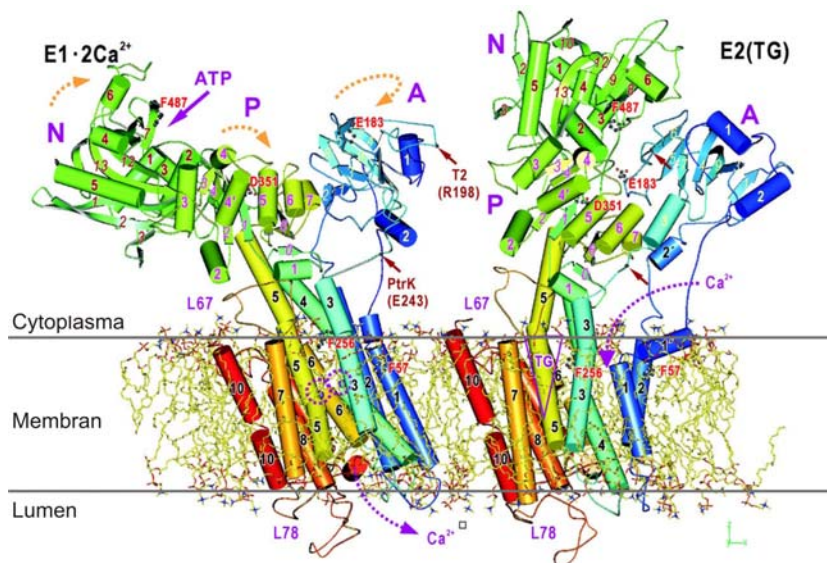


Abb. 1.4: Kristallstruktur der SR Ca-ATPase in Ca²⁺-gebundener Form (E1Ca²⁺) und in Abwesenheit von Ca²⁺: E2(TG), aber in Anwesenheit von Thapsigargin (TG), einem spezifischen Inhibitor der Ca-ATPase, der den E2-Zustand des Enzyms stabilisiert (nach Toyoshima et al. 2002).

Der Rest Asp 351 ist am Ende des C-terminalen β -Stranges positioniert. Eine ähnliche Anordnung findet man in Nukleotid bindenden Proteinen mit Rossmannfaltung. Die um das Zentrum Asp 351 befindlichen Aminosäurereste bilden eine stark negativ geladene Oberfläche, die für Wasser zugänglich ist.

Die N-Domäne

Die N-Domäne ist die größte der drei cytoplasmatischen Domänen und fügt sich in die Sequenz der P-Domäne ein. Sie besteht aus sieben ineinander verwobenen antiparallelen β -Faltblättern, die jeweils von zwei Bündeln mit α -Helices unterschiedlicher Orientierung durchsetzt sind. Die in die ATP-Bindung involvierten Aminosäurereste bilden eine positiv geladene Bindungstasche. Während des Übergangs zu E2(TG) erfährt die N-Domäne eine große konformative Änderung um eine horizontale Achse von annähernd 90° .

Ca^{2+} -Bindungsstellen

Wie aus Abb. 1.4 und 1.5 zu erkennen ist, existieren zwei unterschiedliche Ca^{2+} -Bindungsstellen, wobei II näher am Cytoplasma lokalisiert ist als I. Die beiden Ca^{2+} -Bindungsstellen werden aus Aminosäureresten der Transmembransegmente M4/5/6 und M8 gebildet. Die Koordinationssphäre der Ca^{2+} -Bindungsstelle I wird hauptsächlich durch Sauerstoffatome der Aminosäureseitenreste Asn 768, Glu 771 (M5), Glu 908 (M8) und Thr 799, Asp 800 (M6) gebildet. Bei Bindungsstelle II geschieht dies durch die Reste Glu 309 (M4), Asp 800 und Asn 796 (M6). Im Gegensatz zur Bindungsstelle I sind an der Ca^{2+} -Koordination auch Carbonylsauerstoffe der Hauptkette der Aminosäuren Val 304, Ala 305 und Ile 307 (M4) beteiligt (symbolisiert durch rote Kreise in Abb. 1.5 rechts).

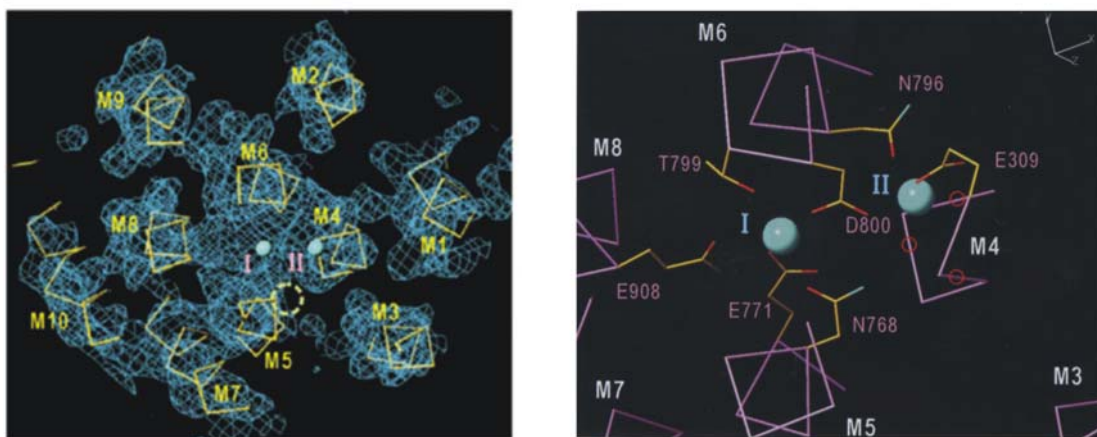


Abb. 1.5: Anordnung der Transmembranhelices und Ca^{2+} -Bindungsstellen des E1-Zustandes nach Toyoshima et al. 2000 (aus cytosolischer Richtung blickend, genauere Angaben siehe Text).

1.2 Die Infrarot-Spektroskopie zur Untersuchung von Proteinen

Während die Strukturbiologie mit ihren sehr anschaulichen aber statischen Bildern eine wichtige Grundlage zum Verständnis der Funktion und zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen darstellt, lassen sich präzise mechanistische Fragestellungen oft nur unter Anwendung spektroskopischer Methoden beantworten. Sie ergänzen die „starre“ Struktur mit Informationen über Reaktivität, Funktion und Dynamik.

1.2.1 IR Spektroskopie – Grundlagen

Absorbiert ein Molekül Licht im infraroten Spektralbereich, geht es in einen höher angeregten Schwingungszustand über. Der spektrale Bereich der IR-Strahlung erstreckt sich dabei auf Wellenlängen zwischen 0,8 und 50 μm . Innerhalb dieses Bereichs erfolgt eine Aufteilung zwischen nahem (NIR: 0,8 – 2,5 μm), mittlerem (MIR: 2,5 – 25 μm) und fernem Infrarot (FIR: 25 – 50 μm). Statt der Wellenlänge λ wird häufig die zur Frequenz und damit zur Energie proportionale Wellenzahl $\tilde{\nu}$ verwendet, die als Reziprokwert von λ definiert ist und in der Einheit cm^{-1} angegeben wird.

Der klassische Oszillator

Um die Vorgänge bei der Entstehung eines IR-Spektrums verständlich zu machen, werden die Atome als Punktmassen behandelt. Somit kann die Schwingung in einem zweiatomigen Molekül gemäß Abb. 1.6 beschrieben werden. Dabei besteht das Molekül aus den Massen m_1 und m_2 , die durch eine elastische Feder verbunden sind (a). Wird der Gleichgewichtsabstand r_0 der beiden Massen um den Betrag x_1 und x_2 gedehnt (b), entsteht eine rücktreibende Kraft K . Beim Loslassen schwingt das System um die Gleichgewichtslage r_0 . Unter Berücksichtigung des Hooke'schen Gesetzes für die rücktreibende Kraft k läßt sich die potentielle Energie und damit auch die Schwingungsfrequenz eines solchen zweiatomigen Moleküls berechnen:

$$\nu_{osc} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{mit} \quad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{(m_1 + m_2)} \quad (1)$$

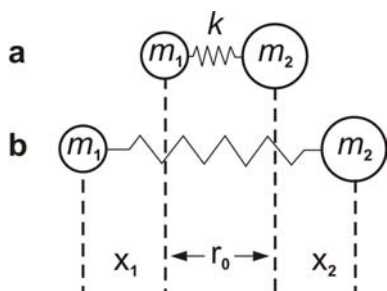


Abb. 1.6: Mechanisches Modell eines schwingenden zweiatomigen Moleküls (Auslenkung $\Delta r = x_1 + x_2$). Das Molekül besteht aus den Massen m_1 und m_2 , die durch eine elastische Feder verbunden sind (a). Wird der Gleichgewichtsabstand r_0 der beiden Massen um den Betrag $x_1 + x_2$ ausgedehnt (b), entsteht die rücktreibende Kraft K .

Die Schwingungsfrequenz ν ist demnach umso höher, je größer die Kraftkonstante k , das heißt, je stärker die Bindung ist. Des weiteren folgt, je kleiner die schwingenden Atommassen sind, um so höher liegt die Frequenz ν .

Der Harmonische und Anharmonische Oszillator

Beim Übergang von diesem klassischen mechanischen Modell zum zweiatomigen Molekül sind noch einige Modifikationen zu berücksichtigen, die die Realität besser beschreiben. Dazu gehört die Berücksichtigung der Quantenmechanik. Diese besagt, daß im molekularen Bereich die Energie nur in bestimmten Portionen, den Quanten, absorbiert werden kann. Für dieses Modell des sogenannten „*Harmonischen Oszillators*“ ergeben sich aus Sicht der Quantenmechanik weitere Regeln. Nach Lösen der Schrödingergleichung ergeben sich für verschiedene Schwingungsniveaus des Moleküls folgende in Betracht kommende Energieeigenwerte:

$$E_{\text{vib}} = h\nu_{\text{osc}} \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad (2)$$

$n = 0, 1, 2$

Energieniveaus des Harmonischen Oszillators

n : Schwingungsquantenzahl
 h : Planck-Wirkungsquantum
 E_{vib} : Schwingungsenergie

Der Übergang von $n = 0$ nach $n = 1$ ist die Grundschiwingung oder Normalschiwingung, von $n = 0$ nach $n = 2$ handelt es sich um die erste Oberschiwingung.

Die Realität hingegen wird besser mit dem Modell des „*Anharmonischen Oszillators*“ beschrieben. Es berücksichtigt die Möglichkeit eines Bindungsbruches. Die Wahrscheinlichkeiten der Übergänge zwischen den einzelnen Energieniveaus und damit die Intensität der Absorptionsbanden nehmen mit zunehmender Größe des Quantensprungs stark ab.

Generell hängen Auftreten und Intensität der Absorptionsbanden von der Änderung des Dipolmomentes während der Schwingung des Moleküls ab.

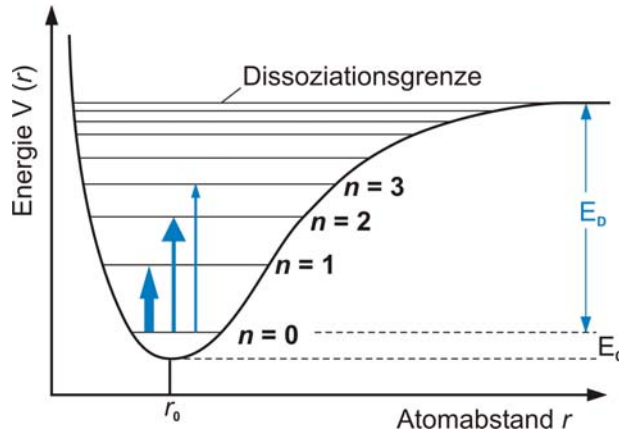


Abb. 1.7: Potentialkurve des Anharmonischen Oszillators (E_0 : Nullpunktsenergie; E_D : Dissoziationsenergie, die unterschiedliche Pfeilstärke entspricht unterschiedlichen Übergangswahrscheinlichkeiten)

Als wichtigste Konsequenz der Auswahlregeln folgt, daß in einem Molekül mit Symmetriezentrum alle Schwingungen, die symmetrisch zu diesem Zentrum erfolgen, nicht IR-aktiv sind.

Die Klassifizierung der Normalschwingungen erfolgt in zwei Untergruppen.

1. Schwingungsform:

- Valenzschwingungen ν (Änderung der Bindungslänge/n)
- Deformationsschwingungen δ (Änderung der/des Bindungswinkel/s)

2. Symmetrieverhalten:

- Symmetrische Schwingungen s (Erhalt der Molekülsymmetrie)
- Asymmetrische Schwingungen as (Verlust eines oder mehrerer Symmetrieelemente)
- Entartete Schwingungen e (Unterschiedliche Schwingungen, die wegen gleichen Energiegehalts bei der selben Frequenz absorbieren und daher nur zu einer Absorptionsbande führen).

1.2.2 Infrarotspektroskopie an Proteinen

Die Infrarotspektroskopie an Proteinen erlaubt sowohl Aussagen über Struktur und Umgebung des Proteinrückrats als auch über Aminosäureseitenketten (Arrondo et al., 1992). Die Carboxylgruppe einer Aminosäure wird über eine Peptidbindung mit der Aminogruppe der nachfolgenden Aminosäure verbunden. Diese Peptidbindung bildet die kleinste sich wiederholende Einheit eines Proteins (Abb. 1.8). Die Schwingungen der Atome dieses Polypeptidrückrats koppeln über einen großen Molekülbereich miteinander. Charakteristische Gerüstschwingungen, die Informationen über die Sekundärstruktur des Proteins liefern, sind die Folge.

Absorptionsbanden der Peptidgruppe

Das Absorptionsspektrum eines Proteins wird von Gerüstschwingungen dominiert. Einer hypothetischen freien, planaren Peptidgruppe können neun Schwingungsmoden zugeordnet werden, die mit abnehmender Wellenzahl der Absorptionsbande als Amid A, B und Amid I – VII bezeichnet werden (Arrondo et al., 1992).

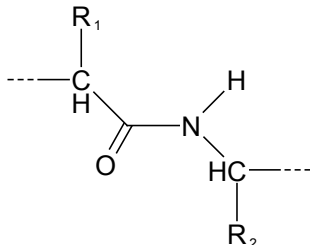


Abb. 1.8: Peptidbindung, R₁, R₂: Aminosäureseitenkette

Für Strukturuntersuchungen ist im überwiegenden Maße die Amid I-Schwingung (Tab. 1) von Bedeutung, da ihre Lage direkt mit der Sekundärstruktur des Proteins korreliert werden kann (Tab. 1). Ihre potentielle Energie besteht dabei zu 80 % aus der C=O Valenzschwingung der Carbonylpeptidgruppe.

Sekundärstruktur	Bandenposition in H ₂ O / cm ⁻¹	
	Mittelwert	Bereich
α-Helix	1654	1648-1657
β-Faltblatt	1633	1623-1641
	1684	1674-1695
Schleifen	1672	1662-1686
Ungeordnet	1652	1642-1657

Tab. 1.1: Die Amid I-Schwingung: Absorptionsbereiche verschiedener Sekundärstrukturelemente (Goormaghtigh et al., 1994).

Der wesentliche Grund der Aufspaltung der Amid I-Absorption aufgrund unterschiedlicher Sekundärstrukturelemente besteht in der sogenannten Übergangsdipolmomentkopplung (Barth et al., 2002). Dies ist ein Resonanzphänomen zwischen benachbarten oszillierenden Dipolen der Amid Gruppen, welches von ihrer Orientierung und Distanz (Reichweite: ~ 8 Å) abhängt. Die Amid II-Bande läßt sich im Bereich um 1550 cm^{-1} lokalisieren. Sie entsteht durch Koppelung der C-N Valenz-, C-O Deformations- und C-N-Streckschwingung.

Absorptionen der Aminosäureseitenketten

Die Seitenketten der Aminosäuren führen Gruppenschwingungen aus, die in charakteristischen Banden im IR-Spektrum resultieren. Um ihre Schwingungsfrequenzen zu ermitteln, wurden zahlreiche Versuche mit Aminosäuren in wäßriger Lösung durchgeführt (Venyaninov und Kalnin, 1990, Chirgadze et al., 1975). Die Lage und Intensität der Banden können sich allerdings durch Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung verändern, so daß die Werte nur als Anhaltspunkte zu verstehen sind.

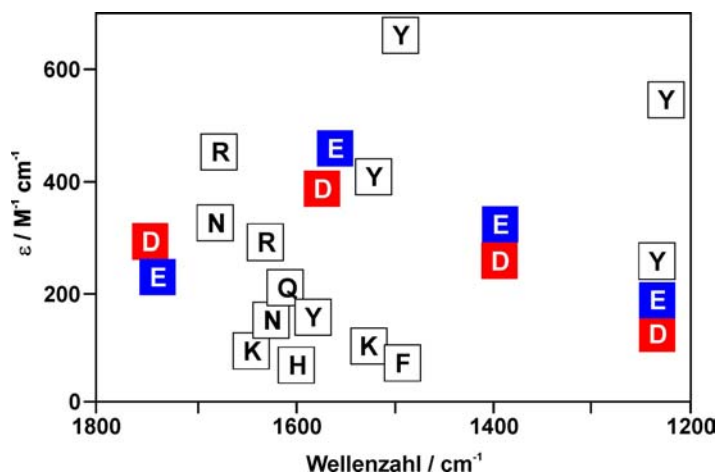


Abb. 1.9: Lage und Intensität der Absorptionsbanden ausgesuchter Aminosäureseitenketten. Die beiden Seitenketten Asparaginsäure und Glutaminsäure sind aufgrund ihrer Wichtigkeit farbig hervorgehoben (Extinktionskoeffizienten aus Barth, 2000a).

1.2.3 Reaktionsinduzierte Infrarot-Differenzspektroskopie

Absorptionsspektren enthalten eine große Anzahl überlappender Banden und werden bei Proteinen hauptsächlich zur Sekundärstrukturanalyse verwendet. Beiträge einzelner Molekülbestandteile oder durch Reaktion im Protein induzierte Absorptionsänderungen sind im Vergleich zur Gesamtintensität des Absorptionsspektrums verschwindend gering. Eine elegante und effektive Lösung bietet hier die Differenzspektroskopie (Mäntele, 1993). Ur-

sprünglich entwickelt wurde diese Technik zur Untersuchung lichtinduzierter Reaktionen photoaktiver Proteine wie z. B. Rhodopsin. (Siebert et al., 1983) Ab dem Beginn der 90er Jahre wird diese Methode ebenfalls zur Erforschung von Redoxproteinen in elektrochemischen Zellen (Cytochrom C, Moss et al, 1990) und einer Vielzahl von anderen Proteinen in Verbindung mit photolabilen Substratmolekülen eingesetzt (Ca-ATPase, Barth et al., 1991). In den letzten 20 Jahren hat sich die Sensitivität der IR-Spektroskopie, bedingt durch verbesserte Detektoren, den Einsatz der FTIR (vgl. 2.2.1) und neuer Meßtechniken soweit verbessert, daß an Proteinen nun auch Beiträge einzelner Bindungen im Vergleich zur totalen Absorption detektierbar sind. Ausgedrückt in Absorptionseinheiten heißt dies am Beispiel einer Peptidcarbonylgruppe ein Zahlenwert von $1/10^4$.

Das Prinzip der reaktionsinduzierten Infrarot Differenzspektroskopie wird anhand von Abb. 1.10 illustriert. Der Pumpenzyklus bzw. spezifische Teilreaktionen werden mittels Substratfreisetzung gestartet. Dies erfolgt z. B. durch Abspaltung einer Schutzgruppe mit einem Lichtblitz. Die dabei zum Einsatz kommenden chemischen Verbindungen werden als sogenannte „caged Verbindungen“ – das sind geschützte Substrate – bezeichnet.



Abb. 1.10: Versuchskonzept der in situ induzierten Reaktion mittels caged ATP (Mit freundlicher Genehmigung von A. Barth).

Die Generierung der Differenzspektren erfolgt dabei durch Differenzbildung aus zwei Absorptionsspektren, die das Enzym jeweils in einem unterschiedlichen Zustand charakterisieren (Abb. 1.11). Das Absorptionsspektrum eines definierten Ausgangszustands des Proteins (A) wird aufgezeichnet. Danach erfolgt der Start einer Reaktion und das Protein gelangt in den Endzustand E (Abb. 1.11 rechts). Die Proteinreaktion wird dabei – ohne die Probe von außen zu verändern – direkt in der Meßzelle gestartet. Bei der hier angewandten

Technik werden Hintergrundabsorptionen sowie Beiträge von nicht an der Reaktion beteiligten Komponenten wie Puffer und Detergentien eliminiert. Die kleinen Absorptionsunterschiede des Übergangs von A nach E werden anhand der beiden Absorptionsspektren nicht deutlich. Erst nach Differenzbildung wird der Unterschied zwischen den Absorptionsspektren der unterschiedlichen Proteinzustände in Form eines Differenzspektrums klar. Das Auftreten von Differenzbanden kann unterschiedliche Ursachen haben. Abb. 1.10 zeigt vier verschiedene Beispiele. Bei chemischen Reaktionen (z.B. Phosphorylierung/Protonierung) werden funktionelle Gruppen ineinander umgewandelt, wobei sich die Absorptionsspektren der Edukte meistens von denen der Produkte unterscheiden.

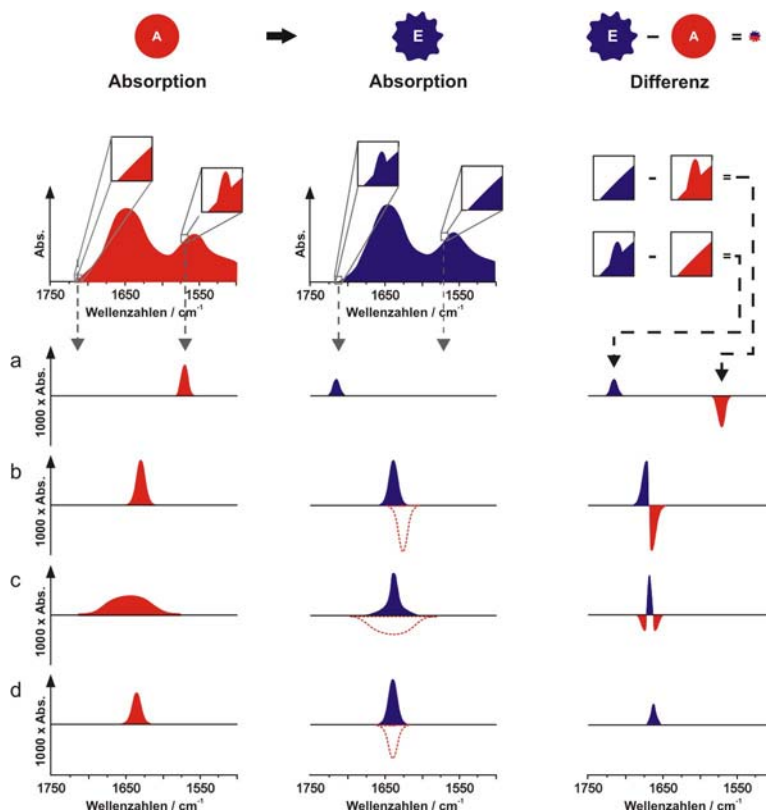


Abb. 1.11: Die Entstehung von Differenzbanden bei der Infrarot-Differenzspektroskopie. A: Ausgangszustand des Proteins, E: Endzustand des Proteins nach erfolgter Reaktion, E-A: Differenzspektrum, a-e: Entstehung der Form von Differenzbanden.

(Y-Achsenabschnitt bei den Beispielen a-e ist vergrößert) Zur Veranschaulichung der Subtraktion sind die negativen Anfangszustände (A, rot) gestrichelt in die Endzustände (E) eingetragen. Bei den Differenzbanden (E-A) sind die Banden, die auf den Anfangszustand zurückzuführen sind in rot und die Banden, die auf den Endzustand zurückzuführen sind in blau dargestellt. Nähere Erläuterungen im Text.

Im Differenzspektrum der Reaktion zeigt sich die verschwindende Eduktgruppe als negatives Signal (rot), während sich die entstehende Produktgruppe als positives Signal (blau) zeigt. In der folgenden Auflistung werden exemplarisch die in Abb. 1.10 a-d dokumentierten Beispiele erläutert.

a) Phosphorylierung oder Protonierung

- b) Dicht beieinander liegende Absorption von Anfangszustand und Endzustand (z. B. Änderung der Sekundärstrukturelemente)
- c) Abnahme der spektralen Bandbreite einer Absorption im Endzustand im Vergleich zum Anfangszustand (z. B. Rückgang der konformativen Flexibilität, Entstehung einer definierteren Struktur)
- d) Änderung eines Absorptionskoeffizienten einer sowohl im Ausgangszustand als auch im Endzustand erscheinenden Absorption

1.3 Zielsetzung

Aufbauend auf methodischen Vorarbeiten zur Probenpräparation durch D. Thoenges (Thoenges et al., 2002) soll die methodische Entwicklung der reaktionsinduzierten und zeitaufgelösten FTIR-Spektroskopie für die Na,K-ATPase weitergeführt werden. Sowohl die Reproduzierbarkeit der Resultate als auch ein hoher Probendurchsatz soll erreicht werden. Infolgedessen ist die Planung, der Bau und die Implementierung eines Probenwechslersystems vorgesehen. Als Ausgangsmaterial zur Untersuchung soll hochreine Na,K-ATPase, eingebettet in Membranfragmente - hauptsächlich aus der Schweineiere - (Jørgensen, 1974a) verwendet werden. Dabei ist es essentiell, daß die enzymatische Aktivität des Enzyms während und nach der Herstellung der hochreinen und hochkonzentrierten Proteinproben für die IR-Spektroskopie (Proteinfilme) aufrechterhalten wird. Die Überprüfung der enzymatischen Aktivität soll sowohl innerhalb der Proteinfilme IR-spektroskopisch als auch mittels eines Standardenzymtests in Suspension - unter Annäherung an die Bedingungen der IR-Probenform - erfolgen. Dabei soll eine mögliche Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Viskosität des Probenmediums untersucht werden. Des weiteren wird die Stabilität der Proteinfilme, insbesondere bezüglich der Denaturierungstemperatur im Vergleich zum Protein in Suspension Gegenstand der Untersuchungen sein.

Die besondere Leistungsfähigkeit der IR-Differenzspektroskopie liegt in der Möglichkeit der Registrierung von sehr kleinen Zustandsänderungen des Proteins und seiner Mikroumgebung. So können Zustandsänderungen einzelner Aminosäurereste des Proteins, wie dies z. B. bei der Änderung des Protonierungsgrades von Carboxylseitenketten, aber auch bei sehr kleinen Sekundärstrukturänderungen der Fall ist, detektiert werden. Diese Zustandsänderungen sollen bei unterschiedlichen Teilreaktionen innerhalb des E1/E2-Reaktionsmodells charakterisiert werden. Der Focus wird dabei auf der Nukleotid-

Bindung, der Phosphorylierung und der Phosphoenzym-Konversion liegen. Um diese Zustandsänderungen mittels der IR-Differenzspektroskopie beobachten zu können, bedarf es der Generierung spezifischer Anfangs- und Endzustände, die das Enzym vor und nach erfolgter Teilreaktion einnimmt. Diese bestimmten Enzymzustände sollen mittels der Wahl spezifischer Pufferzusammensetzungen definiert werden. Gestartet wird die Zustandsänderung mit Hilfe eines UV-Blitzes und somit der Abspaltung der Schutzgruppe von ATP. Untersucht werden soll aber auch die Bindung der nicht durch das Enzym spaltbaren Nucleotide ADP und AMPPNP. Nach dem Erhalt spezifischer Differenzspektren für bestimmte Teilreaktionen soll auch der Inhibitionsmechanismus bestimmter Inhibitoren, wie z. B. Ouabain, auf die Na,K-ATPase überprüft werden. Mit Hilfe der IR-Differenzspektroskopie sollen Sekundärstrukturänderungen in Folge der verschiedenen Teilreaktionen untersucht werden. Des Weiteren ist die Protonierung/Deprotonierung und somit die Änderung des Ladungszustandes von Aminosäureseitenketten, die als potentielle Koordinationsstellen von Na^+ und K^+ fungieren (Ogawa und Toyoshima, 2002), von besonderem Interesse.

Der Reaktionszyklus der Ca-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums - ein der Na,K-ATPase eng verwandtes Membranprotein - wurde bereits extensiv mit der zeitaufgelösten IR-Differenzspektroskopie (Barth et al., 2000b) charakterisiert. Von der Ca-ATPase liegen auch hochaufgelöste Kristallstrukturen in unterschiedlichen Enzymzuständen vor (Toyoshima et al., 2004b). Die bei der Ca-ATPase erhaltenen Differenzspektren sollen mit den bei der Na,K-ATPase ermittelten Differenzspektren, insbesondere unter dem Aspekt der Sekundärstrukturänderung und Protonierung/Deprotonierung von Aminosäureseitenketten innerhalb des gemeinsamen E1/E2-Reaktionsmodells, verglichen werden. Dies ist deshalb von großem Interesse, weil aufgrund der engen Verwandtschaft dieser Enzyme - beide sind P-ATPasen - viele strukturelle und mechanistische Erkenntnisse, die bei der Ca-ATPase mittels der Kristallstrukturen gefolgert wurden, auf die Na,K-ATPase übertragen werden (Jørgensen et al., 2003a). Auf der Basis der erhaltenen IR-Differenzspektren beider ATPasen soll in diesem Zusammenhang auch die Plausibilität einer solchen Übertragung von Erkenntnissen diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Biochemische Methoden

2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden mit dem Mini-Protean[®] 3- und Protean[®] II xi-System der Firma Bio-Rad durchgeführt. Die dort verwendeten Puffersysteme greifen auf eine Originalvorschrift von Laemmli (Laemmli, 1970) zurück. Wenn nicht gegenteilig erwähnt, wurden die Vorschriften des Herstellers zum jeweiligen System eingehalten.

a) Gelpräparation

Die Dicke der gegossenen Gele betrug bei beiden Systemen 1 mm. Während das Sammelgel bei beiden Systemen 4 % (w/v) Acrylamid enthielt, wurde das Trenngel den jeweiligen Erfordernissen angepaßt (7 – 14 % (w/v) Acrylamid).

b) Probenvorbereitung

Während bei der Verwendung des Protean[®] II xi-Systems Mercaptoethanol als reduzierendes Agens im Probenpuffer zur Anwendung kam, wurde dieses beim Mini-Protean[®] 3-System aus Toxizitätsgründen durch DTT ersetzt. Bei beiden Systemen wurde folgende Probenpufferkonzentration erreicht:

Tris/HCl.....	63 mM	(pH 6,8)
MercaptoEtOH	5 % (v/v) oder	
DTT.....	70 mM	
Glycerin.....	5 % (w/v)	
SDS.....	2 % (w/v)	
Bromphenolblau.....	0,005 % (w/v)	

c) Elektrophorese

Laut Herstellervorschrift

d) Proteinfärbung

Die Proteinfärbung im Gel erfolgte bei beiden Systemen nach der Vorschrift des Protean[®] II xi-Systems.

e) *Geltrocknung*

Zur Dokumentation wurden die Gele auf ein grobporiges Stück Löschpapier gelegt und auf einem Temperiertisch (Biotech-Fischer) unter Anlegung eines Vakuums von ~ 10 mbar für etwa 45 Minuten bei 50 °C getrocknet.

2.1.2 Western-Blotting

Um die Proteinuntereinheiten nach erfolgter SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf PVDF-Membranen zu übertragen, wurde eine Halbtrockenzelle (Semi Dry Blotter PEGA-SUS) der Firma Phase verwendet.

a) *Blot-Vorbereitung*

PVDF-Membran 1 min in MeOH waschen

PVDF-Membran 2 min in H₂O waschen

PVDF-Membran 15-20 min in Puffer 2 inkubieren

b) *Blot-Sandwich (wird nacheinander auf Kathode aufgelegt)*

1 dünnes Filter (Vorinkubation mit Puffer 3)

1 dickes Filter (Vorinkubation mit Puffer 3)

1 SDS-Gel (befeuchtet mit Puffer 2)

1 PVDF-Membran (vorbehandelt)

1 dickes Filterpapier (Vorinkubation mit Puffer 2)

2 dünne Filterpapiere (Vorinkubation mit Puffer 1)

c) *Blotten*

60 min bei RT, Strom: Gel-Fläche (cm²)·0,8 = mA (BioRad Power-supply)

d) *Puffer*

- | | | | |
|----|--|----|--|
| 1. | 0,3 M Tris/Cl pH 10,4
20 % (w/v) MeOH | 2. | 25 mM Tris/Cl pH 10,4
20 % (w/v) MeOH |
| 3. | 25 mM Tris/Cl pH 9,4
20 % (w/v) MeOH | | |

2.1.3 Immunochemische Verfahren

Zum Nachweis von phosphorylierten Serin- bzw. Threoninresten wurde ein anti-Phosphoserin bzw. anti-Phosphothreonin Antikörper verwendet. Als sekundärer Antikörper diente ein mit alkalischer Phosphatase gekoppeltes Konjugat. Die Visualisierung erfolgte schließlich mit dem Farbsystem BCIP/NBT. Die entsprechenden Versuchsprotokolle wurden im Fall der Phosphoantikörper von der Firma Biomol und bei den sekundären Antikörpern von Jackson ImmunoResearch Laboratories übernommen. Bei der Visualisierung durch das Farbsystem BCIP/NBT kam eine Vorschrift der Herstellerfirma Promega zum Einsatz.

2.1.4 In vitro Phosphorylierung/Dephosphorylierung der Na,K-ATPase

Die Reaktionen der Na,K-ATPase mit den Proteinkinasen erfolgt nach einer Vorschrift von Vasilets (1997). Die Reaktion der Na,K-ATPase mit der Proteinphosphatase PP2B wird nach folgendem Schema durchgeführt:

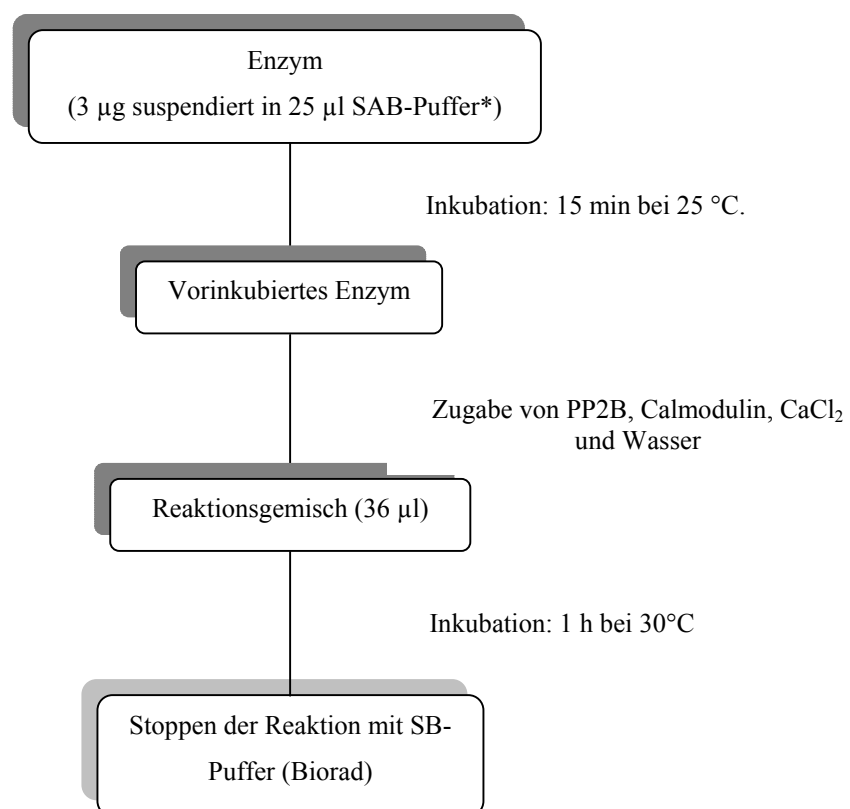


Abb. 2.1: Proteindephosphorylierung an Serin/Threonin mittels Proteinphosphatasen. *SAB-Puffer: 30 mM Tris/HCl, 20 mM MgCl₂, 4 mM EDTA, pH 7,5.

2.1.5 Bestimmung der enzymatischen ATP-Hydrolyseaktivität

2.1.5.1 Phosphatbestimmung

Die Na^+ - und K^+ -abhängige Hydrolyse von ATP durch die Na,K-ATPase erfolgte durch Differenzmessung von freierwerdendem, anorganischem Phosphat. Zur Bestimmung der Untergrundaktivität wurde der Ansatz mit Ouabain versetzt. Der Testansatz mit einem Volumen von 2 ml enthielt Reagenzien in folgenden Konzentrationen:

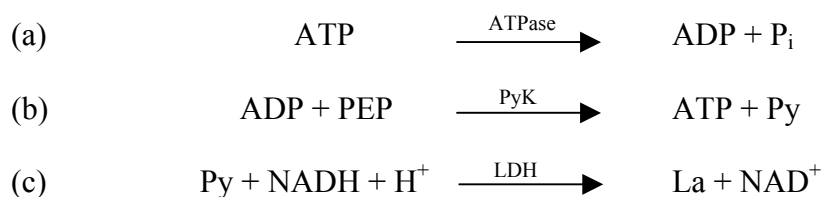
Histidin/HCl.....	30 mM	(pH 7,5, 37°C)
NaCl.....	130 mM	
KCl.....	20 mM	
MgCl ₂	3 mM	
ATP _{2Na}	3 mM	
Ouabain.....	1 mM	(nur für Blindprobe)
Enzym.....	2,5 - 5 µg/ml	

Der Testansatz wurde 3 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet. Nach 1, 3 und 5 min wurde ein Aliquot von je 0,5 ml entnommen und zum Stoppen der Reaktion mit je 50 µl 50 % (w/v) TCA versetzt. Die Bestimmung des freigesetzten Orthophosphats erfolgte nach Fiske und Subbarow (1925). Die Eichung des Systems wurde mit KH_2PO_4 durchgeführt.

2.1.5.2 Gekoppelter Aktivitätstest

Grundlage dieses Enzymtests ist die Koppelung der ATP-Hydrolyse mit einer Farbreaktion. Die Durchführung und Auswertung des Tests erfolgte nach einer leicht modifizierten Vorschrift von Norby (1988). Eine Abfolge der Reaktionen ist im folgenden Überblick dargestellt.

Reaktionsschema



Detektiert wird die zeitbezogene Absorptionsabnahme bei 340 nm (Reaktion c). Der Testansatz mit einem Volumen von 1 ml enthielt Reagenzien in folgenden Konzentrationen:

Histidin/HCl.....	30 mM	(pH 7,5, 37°C)
NaCl.....	130 mM	
KCl.....	20 mM	
MgCl ₂	3 mM	
ATP _{2Na}	3 mM	
Ouabain.....	1 mM	(nur für Blindprobe)
Enzym.....	1 µg/ml	
PEP.....	0,6 mM	
NADH.....	0,2 mM	
PyK.....	7,0 U/ml	
LDH.....	16,8 U/ml	

Nach 3 minütiger Inkubation wurde der Testansatz mit ATP versetzt, umgerührt (Plastikspatel) und umgehend bei $\lambda = 340$ nm im Spektrometer vermessen. Bei beiden Aktivitätstests wurde je nach Bedarf der Puffer bzw. die Temperatur variiert.

2.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.1.6.1 Lowry-Assay

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Originalvorschrift von Lowry et al. Hierzu wurden jeweils 200 µl proteinhaltige Proben mit je 2 ml 5 % iger (w/v) TCA versetzt und somit das Protein für 30 min auf Eis ausgefällt. Darauf hin erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 1800 g. Das Pellet wurde in 0,4 ml 1 M NaOH resuspendiert und 30 min bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Eine weitere Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur schloss sich nach Zugabe von 0,3 ml H₂O und 3 ml Reaktionslösung c) an. Daraufhin wurde der Ansatz mit 0,3 ml Folinreagenz versetzt und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Extinktion dieses Testansatzes erfolgte bei einer Wellenlänge von 750 nm. Die Berechnung der Proteinkonzentration wurde mittels einer mit BSA aufgenommenen Eichreihe durchgeführt.

Reaktionslösungen (in H₂O):

- a) Na₂CO₃.....2 %
Na₂-Tartrat x H₂O.....0,05 %
- b) CuSO₄ x 5 H₂O.....0,1 %
- c) 1:10 Verdünnung von a) mit b) [alle Angaben in (w/v)]

2.1.6.2 Bio-Rad Protein Assay

Der Bio-Rad Protein Assay basiert auf einer ursprünglich von Bradford (1976) gemachten Entdeckung, daß sich das Extinktionsmaximum einer sauren Coomassie Brilliant Blaulösung verschiebt. Die Proteinbestimmung erfolgte in Anlehnung an die Microassay-Vorschrift (Bio-Rad Produktnummer: 500-0001). Dazu wurden je 20 µl Probe (2 - 8 µg Enzym) mit 980 µl Blaulösung (1:5 Verdünnung des Konzentrats mit H₂O) versetzt und gemischt. Die Extinktion des Protein-Farbstoff-Komplexes wurde nach 5 min bei 595 nm gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels einer mit BSA aufgenommenen Eichreihe. Diese Methode konnte nicht zur Konzentrationsbestimmung von solubilisierten Enzymen herangezogen werden.

2.1.6.3 Spektralphotometrische Proteinbestimmung

Die Konzentration der mit C₁₂E₈ solubilisierten Na,K-ATPase kann über die Absorption bei 280 nm bestimmt werden (Esmann, 1988). Eine Lösung mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml besitzt bei d = 1 cm eine optische Dichte von 1,0. Für die gereinigte, nicht solubilierte Na,K-ATPase war diese Methode der Proteinbestimmung aufgrund des hohen Streulichtanteils bei 280 nm nicht anwendbar.

2.2 Biophysikalische Methoden

2.2.1 FTIR-Spektroskopie

Moderne Infrarotspektrometer arbeiten nach dem Fourierprinzip. Im Gegensatz zu dispersiven Spektrometern mit einem Monochromator arbeitet ein FTIR-Spektrometer mit einer polychromatischen IR-Strahlung in Verbindung mit einem Michelson-Interferometer (Günzler und Böck, 1983). Gegenüber der dispersiven IR-Spektroskopie zeichnet sich die FTIR-Spektroskopie durch drei Vorteile aus:

- Zeitersparnis: Alle Wellenlängen der breitbandigen IR-Quelle werden gleichzeitig gemessen (Multiplexvorteil)
- Besseres Signal/Rausch-Verhältnis: Die Intensitätsausnutzung der IR-Strahlenquelle ist effektiver, da es keine Spalte gibt, die den Strahl begrenzen (Jacquinotvorteil).

- Hohe Genauigkeit bei der Wellenlängenbestimmung: Kontrolle der Spiegelposition im Michelson Interferometer durch einen HeNe-Laser (Connesvorteil)

Im FTIR-Spektrometer wird das Spektrum der Probe nicht direkt gemessen. Statt dessen erhält man zunächst ein Interferogramm, das mittels einer Fouriertransformation in ein Spektrum umgewandelt wird.

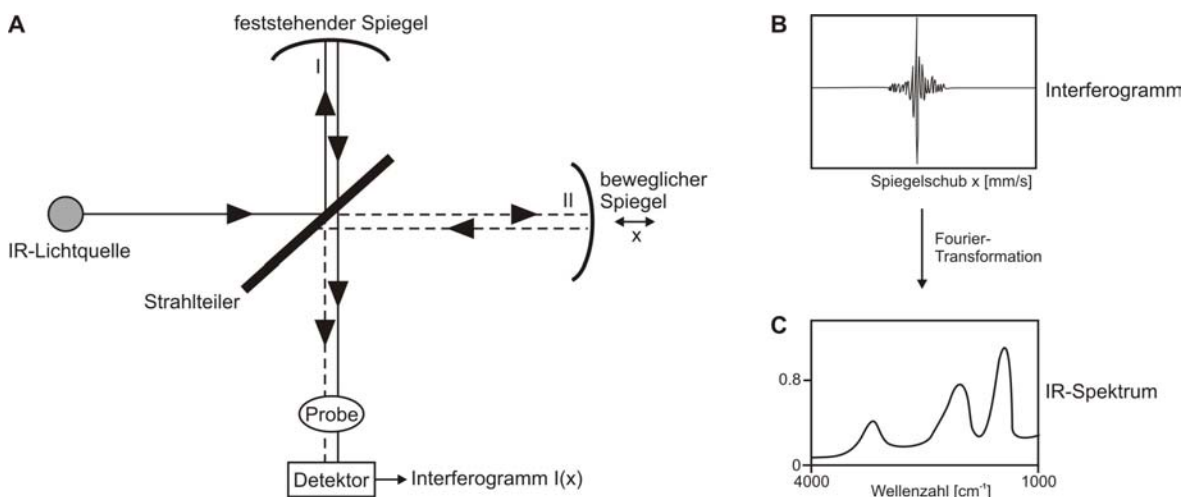


Abb. 2.2: Schema zur Entstehung eines IR-Spektrums. (A) Michelson-Interferometer (B) Interferogramm (C) IR-Spektrum.

Das Michelson-Interferometer (Abb. 2.2 A)

Die von einer polychromatischen IR-Quelle abgegebene Strahlung wird durch einen Strahlenteiler zu gleichen Anteilen jeweils auf einen feststehenden und einen beweglichen Spiegel geleitet (Günzler und Böck, 1983). Aufgrund der Bewegung des Spiegels erfährt dieser Teilstrahl gegenüber dem anderen Teilstrahl eine Phasenverschiebung. Nach der Reflexion und erneutem Durchgang durch den Strahlenteiler interferieren die beiden Teilstrahlen. Nach Durchdringen der Probe wird die resultierende Strahlenintensität in Abhängigkeit von der Zeit bzw. der Spiegelposition des beweglichen Spiegels vom Detektor registriert und liefert das Interferogramm. Für $\Delta x = 0$ erhält man aufgrund der konstruktiven Interferenz für alle Wellenlängen maximale Intensität. Zur Kontrolle der Spiegelposition wird die monochromatische Strahlung eines HeNe-Lasers ($\lambda = 633 \text{ nm}$) ebenfalls in das Interferogramm mit eingekoppelt. An den Nulldurchgängen des Laserinterferograms lässt sich die

Position des Spiegels berechnen. An diesen Stellen, welches als Triggersignal bei der Datenaufnahme dient, wird das Interferogramm digitalisiert.

Fouriertransformation

Jeder Meßpunkt des Interferogramms enthält Informationen über alle Frequenzen des vermessenen Spektralbereichs. Im IR-Spektrum dagegen interessiert die Abhängigkeit der Signalintensität von jeder einzelnen Frequenz. Dazu wird das Interferogramm einer Fouriertransformation unterzogen. Die Intensität am Detektor $I(x)$ als Funktion der Spiegelposition (Interferogramm) und die Intensität $S(\tilde{\nu})$ als Funktion der Wellenzahl (Einkanalspektrum) stellen ein Fouriertransformationspaar dar:

$$I(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} I(x) \cdot \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx \quad (3)$$

In der Praxis wird kein kontinuierliches Interferogramm unendlicher Ausdehnung gemessen. Dadurch wird die Auflösung des Systems begrenzt und es kann bei Fouriertransformation zu Artefakten kommen. Über geeignete Apodisationsfunktionen versucht man die Fehler, die durch die endlichen Integralgrenzen entstehen, zu korrigieren. Wegen der endlichen Abstände der Stützpunkte des Interferogramms kommt es in der Praxis ferner zu einer Erniedrigung der spektralen Auflösung. Diesem kann durch das Anhängen von Nullen an das Interferogramm (Zerofilling), was einer Interpolation zwischen den Stützpunkten entspricht, entgegengetreten werden.

2.2.1.1 Zeitaufgelöste FTIR-Messungen

In dieser Arbeit kam die Rapid-Scan-Technik zum Einsatz (Siebert, 1995). Die Datenaufnahme des Interferograms erfolgt sowohl bei der Vor- als auch bei der Rückwärtsbewegung des Spiegels. Durchgeführt wurden die Messungen an einem modifizierten IFS 66 Spektrometer der Firma Bruker Optik (Barth et al., 1996), welches zur Erhöhung der Sensitivität mit einem stickstoffgekühlten HgCdTe-Detektor ausgestattet war. Die Zeit und somit die maximale Zeitauflösung, die für einen Interferometerzyklus benötigt wurde, betrug 65 ms bei einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} . Als Fourierparameter wurden eine Blackman-Harris-4-Term Apodisationsfunktion und ein Zerofillingfaktor von zwei verwendet. Die limitierenden Faktoren dieser Technik sind die Geschwindigkeit des bewegten Spiegels sowie die Datenaufnahme und die Digitalisierung.

Abb. 2.3 zeigt ein auf die ATPase zugeschnittenes Standardmeßprogramm. Die Messung wurde mit der Aufnahme eines über 300 Scans gemittelten Referenzspektrums gestartet, welches den Ausgangszustand des Systems charakterisiert (RB). Dann kam es zur Freisetzung des Nukleotids mittels eines Laserblitzes. Nach dem Blitz wurde die Zeit auf „0“ gesetzt. Nacheinander erfolgte daraufhin die Aufnahme von 10 Spektren mittels 1 Scan (B1), 10 Spektren gemittelt über 4 Scans (B2), 10 Spektren gemittelt über 40 Scans und 10 Spektren gemittelt über 300 Scans (B4). Die entsprechenden Zeitintervalle sind in Abb. 2.3 auf der Achse Zeit/s abgebildet. Die Meßtemperatur variierte zwischen 0 und 15°C.

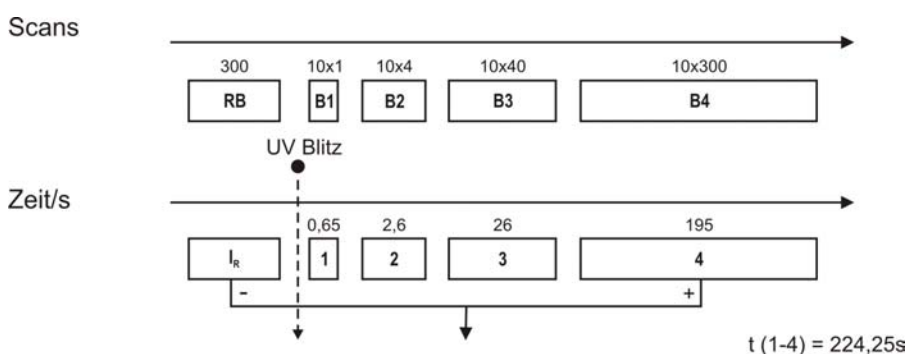


Abb. 2.3: Datenaufnahme bei zeitaufgelösten FTIR-Messungen. RB: Referenzblock, B1...: Block 1..., nähere Erläuterungen im Text.

Die Differenzspektren wurden schließlich durch Subtraktion des Referenzspektrums (RB) von den Spektren B1 - B4 mittels der Gerätesoftware berechnet. Alle im Ergebnisteil gezeigten Differenzspektren sind Mittelwertspektren, die wiederum aus Differenzspektren von mindestens 3 unabhängig voneinander hergestellten Einzelproben erzeugt wurden.

2.2.1.2 Versuchsaufbau

Durchgeführt wurden die IR-Messungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Mäntele am Institut für Biophysik der Universität Frankfurt. Dabei wurde der dort installierte Versuchsaufbau eines modifizierten IFS 66 Spektrometers der Firma Bruker Optik verwendet (Barth et al., 1996). Der IR-Meßplatz besteht im wesentlichen aus drei Hauptkomponenten:

- (1) IR-Gerät mit Probenwechsler

- (2) Excimer-Laser
- (3) PC zur Visualisierung der Daten und Netzwerkanschluss

Die detaillierte Anordnung der einzelnen Komponenten ist in Abb. 2.4 wiedergegeben. Der Probenwechsler stellt eine Neukonstruktion dar, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und implementiert wurde (Eigenbau am MPI für Biophysik mit R. Bergbauer, J. Reichert, F. Baur und E. Grell).

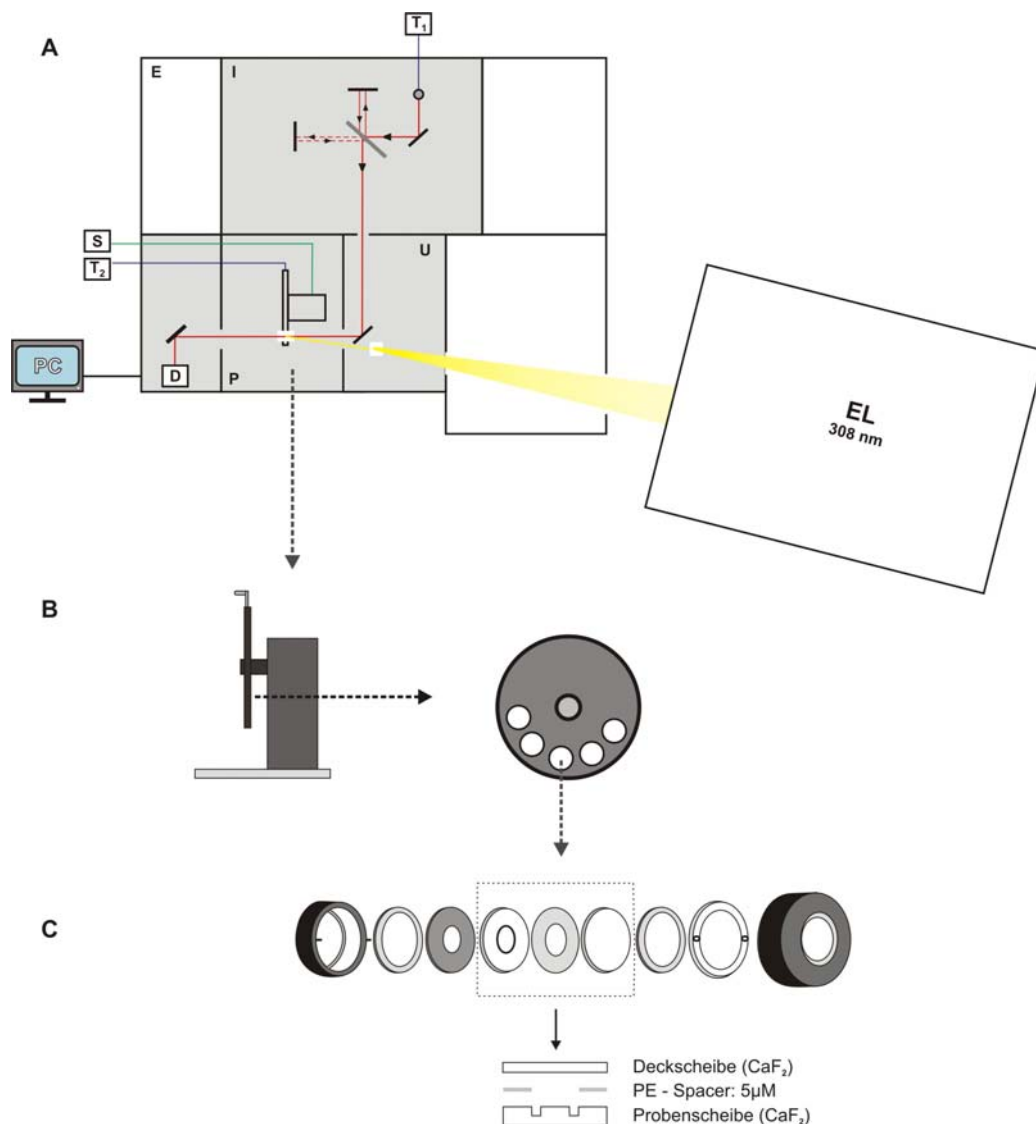


Abb. 2.4: Versuchsaufbau. **(A)** Meßapparatur. D: Detektor, E: Elektronik, EL: Excimerlaser, I: Interferometer (Detailansicht siehe Abb. 2.1 A), PC: Personal-Computer, P: Probenraum, S: Steuerung, T₁: Thermostatisierung der IR-Quelle, T₂: Thermostatisierung des Probenwechslers, U: Umlenkraum: Sammellinse für EL. Grau unterlegte Bereiche: Mit trockener Luft gespülte Kompartimente. **(B)** Probenwechsler **(C)** Probenhalter. Reihenfolge der Bauelemente von links: Einsatz, Teflonring, Teflonblende, Probenscheibe (CaF₂), Polyethylen-Spacer, Deckscheibe (CaF₂), Teflonring, Fixierring, Aufsatz.

2.2.1.3 Photolyse der geschützten Verbindungen

Die Abspaltung der Schutzgruppe von den geschützten Nukleotiden erfolgte photochemisch mittels eines Laserblitzes bei 308 nm. Zum Einsatz kam hier ein Excimer Laser der Firma Radiant dyes vom Typ RD-EXC-200. Bei diesem System war das Lasermedium eine Gasmischung aus HCl/H₂/Ne/Xe, welches etwa alle zwei Monate ausgetauscht werden mußte. Der Laserblitz selbst wurde durch ein Hochspannungspuls (max. 30 kV) initialisiert. Die maximal abgegebene Energie war mit $\sim 180 \text{ mJ/cm}^2$ bei 30 kV sehr hoch. Es bedurfte einer Feinabstimmung des Lasers auf das biologische System, um die Probe nicht durch zu hohe Energieeinstrahlung zu schädigen. Als besonders vorteilhaft stellte sich das zweimalige Blitzen bei mittlerer Energie innerhalb von 50 ms heraus. Dadurch wurden $\sim 75 \%$ des Nukleotids freigesetzt. Abb. 2.5 zeigt die photochemische Freisetzung von ATP aus P³-(1-(2-nitro-phenyl)ethyl)-Adenosin-5'-triphosphat (NPE-caged ATP, Barth et al., 1995).

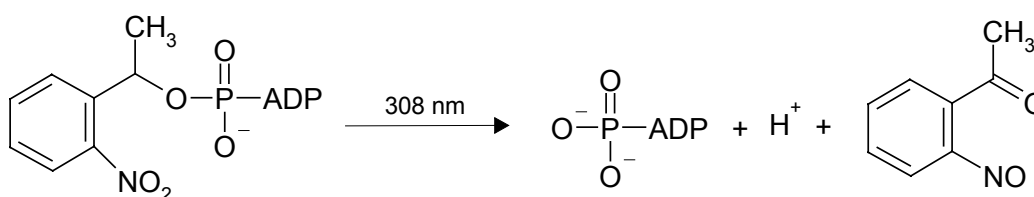


Abb. 2.5: Photochemische Freisetzung von ATP aus NPE-caged ATP. Nicht berücksichtigt sind hier die Folgereaktionen, die das im Reaktionsansatz befindliche Antioxidans DTT mit der freigesetzten Schutzgruppe eingeht (Barth et al., 1997).

2.2.1.4 Probenpräparation

Für die hier durchgeführten IR-Durchlichtuntersuchungen ist der Einsatz von hoch konzentrierten Na,K-ATPase Proben aufgrund des großen Wasserhintergrundes notwendig. Die Amid I-Schwingung des Proteins wird bei 1644 cm^{-1} von einer starken Deformationsschwingung des Wassers (Venyaminov und Prendergast, 1997) überlagert. Im Vergleich zu den Aminosäureseitenketten hat diese Wasserschwingung mit $20 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ einen schwachen Extinktionskoeffizienten, der aber bereits bei einer Schichtdicke von $10 \mu\text{m}$ in Proteinproben aufgrund des hohen Wassergehaltes zu einer Extinktion von 1 führt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine optische Weglänge von $5 \mu\text{m}$ gewählt.

Die IR-Proben wurden durch Vakuum-Trocknung bei 10°C auf einem CaF₂-Fenster hergestellt (Abb. 2.4 C). Dazu wurde eine Enzymsuspension ($150 \mu\text{g}$ Enzym) mit den jeweiligen

kationischen und sonstigen Zusätzen (DTT, EDTA, Glycerin, caged Verbindung) auf die innere Fläche der Probenscheibe pipettiert (Durchmesser 8 mm). Die so beladene Probenscheibe wurde in eine kleine Vakuumkammer gegeben. Nach Anlegen eines Vakuums von ca. 25 mbar wurde das Volumen der Probe auf 1 μl reduziert. Schließlich wurde ein 5 μm dicker Polyethylenspacer und die Deckscheibe auf die Probenscheibe aufgelegt und die Probe somit verschlossen.

Puffermedien für Protein- und Kontrollproben

In Abhängigkeit von der betrachteten Teilreaktion im Pumpenzyklus variierte das ionische Medium. Die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Proben und die daraus zu erwartenden akkumulierenden Zustände sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt (Post und Suzuki, 1991 sowie Zitate darin, Nørby et al., 1983, Lüpfert et al., 2001, Kong & Clarke, 2004).

Probenname	Akkumulierter Zustand	Ablaufende Teilreaktionen	Name der Teilreaktion/en	Kationenmedium ^{*)}		
				K [mM]	Mg ¹⁾ [mM]	Na [mM]
Typ 0	E1N	E1cN \rightarrow E1N	Nukleotidbindung	-	-	130
Typ 1	E1P	E1cATP \rightarrow E1ATP \rightarrow E1P	E1P-Bildung	-	3	1200
Typ 2	E2P	E1cATP \rightarrow P \rightarrow E2P	E	-	3	130
Typ 3	E2	Zyklus	Zyklus	15	3	130

Tab. 2.1: Abkürzungen: E: Enzym, E1P: Phosphorylierter Enzymzustand E1, E2P: Phosphorylierter Enzymzustand E2, N: Nukleotid, cN: caged Nukleotid, cATP: caged ATP, detaillierte Erklärung der Enzymzustände in Abschnitt 1.1.3. *) Alle Medien enthalten: 150 mM HEPES/Tris pH 7,5, 1 mM ATPase, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged Nukleotid, Typ 0: 20 mM EDTA, Typ 1-3: 2 mM EDTA, Temperatur: 0-15°C. Angaben basieren auf 1 μl Probenvolumen.¹⁾: Freie Konzentration, berechnet mit dem Programm Hyss2 (Alderighi et al., 1999) unter Verwendung der in Martell und Smith (1974) aufgeführten Gleichgewichtskonstanten. Unter den verwendeten Bedingungen beträgt die totale Mg²⁺-Konzentration 8 mM.

Die Durchführung von Kontrollversuchen diente sowohl der Detektion von Photolysesignalen durch die caged Verbindungen in Abwesenheit von Protein als auch der Überprüfung der Zuordnung von Differenzsignalen in Gegenwart von ATPase. Hier kamen verschieden Inhibitoren wie Ouabain, Oligomycin und Vanadat (Hansen, 1984, Homareda, 1999, Beaugé, 1988) als auch das FITC-Enzym (Kapitel 2.3.3.3) zum Einsatz. Eine weitere Möglichkeit, um Teilreaktionen im Zyklus der Pumpe zu unterdrücken, stellte eine spezielle Auswahl des kationischen Mediums dar (Schuurmans Stekhoven et al., 1981).

2.2.1.5 Normierung auf gleiche ATPase-Konzentration

Soweit nicht anders erwähnt, enthielt jede ATPase-Probe 150 µg Protein, was einer Proteinkonzentration von 1 mM in 1 µl Probenvolumen entspricht. Aufgrund der präparativen Rahmenbedingungen war es allerdings nicht immer möglich genau diese Konzentration zu erreichen. Sowohl wegen dieser speziellen Umstände als auch wegen der besseren Vergleichbarkeit zwischen H₂O- und D₂O-Proben wurden die Differenzspektren auf eine identische Proteinkonzentration normiert (Barth und Mäntele, 1998). Diese Normierung erfolgte bei den in H₂O aufgenommenen Differenzspektren aufgrund der niedrigeren H₂O-Sensitivität anhand der Amid II- und bei den in D₂O aufgenommenen Differenzspektren mittels der Amid I-Bande. In H₂O aufgenommene Differenzspektren wurden auf eine Amid II-Absorption von $0,26 \pm 0,03$ (Schwein), $0,26 \pm 0,03$ (Ente) und $0,21 \pm 0,03$ (Hai) normiert. Als Grundlage zur Ermittlung des Normierungsfaktors bei der Amid II-Absorption diente die Differenz in der Absorption zwischen 1549 und 1495 cm⁻¹. Die in D₂O aufgenommenen Differenzspektren wurden auf eine Amid I-Absorption von $0,47 \pm 0,07$ (Differenz in der Absorption zwischen 1704 und 1649 cm⁻¹) normiert. Mit dem so erhaltenen Faktor wurden die entsprechenden Differenzspektren multipliziert. Die zur Normalisierung herangezogenen Bezugswerte wurden über eine Mittelung von jeweils ~ 30 identisch präparierten Proben im gleichen Medium bestimmt.

2.2.1.6 Photolysekorrektur

Differenzspektren, die direkt aus der Messung von proteinhaltigen Proben nach erfolgter Substratfreisetzung resultieren, erhalten die Terminologie *unkorrigierte ATPase-Differenzspektren*. Differenzspektren hingegen, die aus der Messung von Proben ohne Protein, aber mit geschützten Substraten stammen, werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit *Photolyse-Differenzspektren* genannt. Signale, die ausschließlich auf die Photolyse von geschützten Verbindungen zurückzuführen sind, werden als *Photolysebanden* bezeichnet. Um photolysesignalfreie ATPase-Differenzspektren zu erhalten, werden im folgenden zwei unterschiedliche Verfahren der Korrektur erläutert. Solche Differenzspektren werden *photolysekorrigierte ATPase-Differenzspektren* genannt.

- (a) Subtraktion eines Photolyse-Differenzspektrums von einem unkorrigierten ATPase-Differenzspektrum

Für jede ATPase-Probe wurden die Photolyse-Differenzspektren mit dem jeweiligen geschützten Substrat im gleichen Reaktionsmedium, bei gleicher Temperatur und im gleichen zeitlichen Aufnahmemodus gesondert untersucht. Das Photolyse-Differenzspektrum wurde vor der Subtraktion mittels der Photolysebanden bei 1526 und 1346 cm^{-1} auf das unkorrigierte ATPase-Differenzspektrum normiert. Die Bestimmung des Normierungsfaktors erfolgte bei NPE-caged ATP auch unter Verwendung des [^{15}N]NPE-caged ATP (Von Germar et al., 2000). Wegen der Markierung des Stickstoffs an der Nitrofunktion des caged ATP verschieben sich die Photolysebanden von 1526 cm^{-1} nach 1499 und von 1346 nach 1325 cm^{-1} . Diese Verschiebung erlaubt die Identifikation von Proteinbanden in der Region um 1526 und 1346 cm^{-1} .

- (b) Im Fall der zeitaufgelösten FTIR-Spektroskopie, d.h. wenn im Gegensatz zur steady state FTIR-Spektroskopie die Zeitauflösung ausreicht, um transiente Zustände zu beobachten, kann die Photolysekorrektur in situ erfolgen (Barth et al., 1996). Durch die Subtraktion zweier im zeitlichen Verlauf nacheinander aufgenommener Differenzspektren werden die Photolysebanden eliminiert.

2.2.1.7 *Berechnung und Zuordnung von Differenzspektren*

Ein Differenzspektrum entsteht durch die Subtraktion zweier Absorptionsspektren der selben Probe. Dabei wird das Absorptionsspektrum des Anfangszustandes von dem Absorptionsspektrum des Endzustandes subtrahiert. Das so berechnete Differenzspektrum charakterisiert den Übergang vom Anfangszustand zum Endzustand. Alle Zustände, die von dem System zwischen Anfangs- und Endzustand eingenommen werden, sind per Definition Übergangszustände. Bei dem hier betrachteten System der Na,K-ATPase reichte die Zeitauflösung meistens nicht aus, um alle Übergangszustände zeitlich aufzulösen. Die Berechnung der Differenzspektren wird anhand von Abb. 2.6 verdeutlicht. Um Differenzspektren verschiedener Teilreaktionen berechnen zu können, werden Proben mit spezifischer Pufferzusammensetzung hergestellt (vgl. 2.2.1.3).

Rein formal können somit Differenzspektren bestimmter Teilreaktionen, die zeitlich nicht auflösbar sind, berechnet werden. Die in Abb. 2.6 schwarz gekennzeichneten Teilreaktionen (ATP-Beladung, E1P-Bildung, E2P-Bildung) können direkt ermittelten Differenzspektren zugeordnet werden, während das bei den blau gekennzeichneten Teilreaktionen nur durch die Bildung eines Doppeldifferenzspektrums möglich ist. Ein Doppeldifferenzspek-

trum entsteht durch die Subtraktion zweier Differenzspektren unterschiedlicher Proben. Dies ist sowohl bei der Phosphorylierung als auch bei der Phosphoenzym-Konversion der Fall. Bei der zeitaufgelösten FTIR-Spektroskopie hingegen können diese Übergangszustände direkt beobachtet werden. Bei einer ausreichenden Zeitauflösung wäre es somit möglich innerhalb des Differenzspektrums der E2P-Bildung auch das Differenzspektrum der ATP-Beladung und der E1P-Bildung zu erhalten.

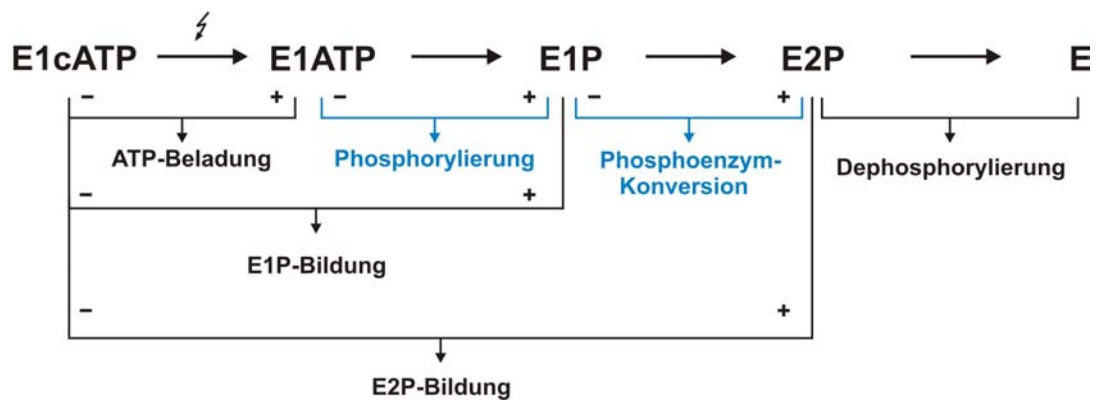


Abb. 2.6: Berechnung von Differenzspektren, E: Enzym, cATP: caged ATP, E1P-Bildung: ATP-Beladung + Phosphorylierung, E2-P-Bildung: ATP-Beladung + Phosphorylierung + Phosphoenzym-Konversion, innerhalb einer blauen oder schwarzen Klammer bezeichnet “-“ den Referenzzustand (Absorptionsspektrum) und “+“ den Endzustand (Absorptionsspektrum).

2.2.1.8 Berechnung des COBSI-Index

Um Änderungen in der Sekundärstruktur des Proteingrundgerüsts als Folge der Teilreaktionen quantifizieren und vergleichen zu können, wird hier der COBSI-Index eingeführt (Barth et al., 1996). Als Grundlage zur Berechnung des COBSI-Index (Change of backbone structure and interaction Index) dient die Absorption in der Amid I-Region. Er setzt die integrale Absorptionsänderung der betrachteten Teilreaktion in das Verhältnis zur Gesamtabsorption des Proteins zwischen 1610 und 1700 cm^{-1} .

$$\text{COBSI - Index} = \frac{\int_{1610}^{1700} 0,5 |\Delta Abs| d\tilde{\nu}}{\int_{1610}^{1700} Abs d\tilde{\nu}} \quad (4)$$

Grundsätzlich können mit dieser spektroskopischen Methode nur die Netto-Sekundärstrukturänderungen detektiert werden (Barth et al., 1996). Die Integrale Gesamtabsorption des Proteins bezieht sich dabei auf eine komplett eingetrocknete Proteinprobe (150 µg Protein). Es wurde der arithmetische Mittelwert von 13 Proben aus drei unterschiedlichen Präparationen in Verbindung mit einem vor den HgCdTe Detektor geschalteten 2500 cm⁻¹ Filter verwendet. Ein vollständiger Wechsel der Sekundärstruktur eines Proteins (z. B. 100 % α -Helix \rightarrow 100 % β -Faltblatt) hat eine Änderung des COBSI-Index in der Größenordnung um 0,4 zur Folge (Barth et al., 1996). Das heißt, bei einer Sekundärstrukturänderung, die alle Aminosäuren gleichermaßen mit einbezieht, werden etwa 40 % der integralen Absorption zwischen 1610 und 1700 cm⁻¹ neu verteilt. Bezieht man sich bei dem COBSI-Index auf einen Wert von $7 \cdot 10^{-4}$, wie das bei der Phosphoenzym-Konversion der Fall ist, bedeutet das, daß rein rechnerisch etwa 0,2 % der Na,K-ATPase von der Sekundärstrukturänderung betroffen ist (~ 3 Aminosäuren). Aufgrund der verwendeten Methode unterliegt der aus dem COBSI-Index ermittelte prozentuale Wert der Sekundärstrukturänderung einer Schwankung von etwa $\pm 0,1$ % beträgt (Barth et al., 1996).

2.2.1.9 Auswertung kinetischer Daten

Zur Beurteilung des kinetischen Verhaltens bestimmter Reaktionen wurden die integrierten Intensitäten spezifischer Markerbanden herangezogen. Durch die Integration konnte das Signal/Rausch-Verhältnis wesentlich verbessert werden. Die Integration zwischen zwei Wellenzahlen erfolgte mittels Zuhilfenahme einer durch zwei oder vier Punkte verlaufenden Basislinie (Integrationsmethode C/E des Programms OPUS 4.0.24 der Firma Bruker Optik). Bei der Ermittlung der spezifischen enzymatischen Aktivität der Na,K-ATPase wurde die Bande zwischen 1260 und 1224 cm⁻¹ mit den Stützpunkten 1296 und 1168 cm⁻¹ herangezogen. Die weitere Auswertung erfolgte in Anlehnung an die Veröffentlichung von Thönges und Barth (2002).

2.2.2 Spurenbestimmung von Alkali- und Erdalkalitionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Metallspuren der Elemente Calcium und Kalium bestimmt. Bei Calcium erfolgten diese Bestimmungen bei Wasser (Millipore, System academic), von den benutzten Pufferlösungen und von Enzymsuspensionen der Ca-ATPase. Der Ca²⁺-Gehalt der Proben wurde mittels der TXRF-Spektrometrie (Klockenkämper, 1997) am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität Frankfurt bestimmt.

Durchgeführt wurden die Messungen von C. Rittmeyer im Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Kolbesen. Die Bestimmung von Kalium in den Pufferlösungen für die Na,K-ATPase erfolgte mittels der Atom-Absorptions-Spektrometrie am MPI für Biophysik. Zur Atomisierung wurde hier ein Zerstäuber-Brennersystem mit Luft/Acetylen-Flamme verwendet. Zum Einsatz gelangte hier ein Atom-Absorptions-Spektrometer der Firma Perkin Elmer vom Typ Analyst 200. Die Auswahl der entsprechenden Wellenlängen zur Detektion der jeweiligen Elemente erfolgte nach Herstellervorgaben.

2.2.3 Fluoreszenz-Spektroskopie

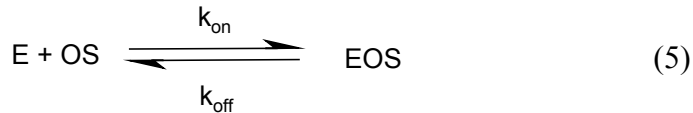
2.2.3.1 Gleichgewichtsmessungen

Zur Überprüfung spezifischer Reaktionsbedingungen wurden Gleichgewichtsfluoreszenzmessungen mit FITC-Na,K-ATPase (vgl. Kapitel 2.3.3.3) und mit RH421 markierter Na,K-ATPase (vgl. Kapitel 2.3.3.4) durchgeführt. Hierfür wurde ein, im Rahmen einer Dissertation (Mezele, 1988) optimiertes Spektrofluorimeter der Firma Spex (Fluorolog 212) verwendet. Als Lichtquelle diente eine Xenonlampe. Die Thermostatisierung des Küvettenhalters erfolgte über einen externen Kryostaten. Zur Verwendung kamen Fluoreszenzküvetten mit optischen Weglängen zwischen 1 und 0,5 cm. Die Proteinsuspensionen wurden während der Messung mit einem Magnetrührer kontinuierlich durchmischt. Die schrittweise Zugabe der Titranten erfolgte nach Äquilibration der vorgelegten Enzymsuspension bis auf ein stabiles Fluoreszenzniveau. Nach jeder Zugabe wurde solange gewartet, bis wieder ein stabiles Fluoreszenzniveau erreicht wurde. Die Integrationszeit betrug 2 s. Die Gleichgewichtskonstanten wurden aus den an die Meßdaten angepaßten Titrationskurven mittels des Programms KOD 11 (Schmid et al.) für das 1:1 Bindungsmodell (vgl. Kapitel 6.2.1) und KOE 21 (Mager et al.) für das 1:2 Bindungsmodell ermittelt.

2.2.3.2 Kinetische Messungen

Zeitabhängige Fluoreszenzmessungen im Millisekunden bis Sekundenbereich wurden mittels einer Zweikomponenten Micro-stopped-flow-Anlage DX 17 MV mit Fluoreszenz- und Absorptionsdetektion der Firma Applied Photophysics durchgeführt. Als Lichtquelle wurde eine Wolfram-Lampe verwendet. Über einen Gittermonochromator der Firma Kratos (Modell GM 250) wurde die gewünschte Anregungswellenlänge selektiert. Zur Verhinderung der Detektion des Anregungslichtes wurde vor dem Fluoreszenzdetektor ein Kanten-

filter zwischengeschaltet, der das Anregungslicht ausblendetete. Die Meßzelle wurde über einen externen Thermostaten temperiert.



Das für ein Experiment erforderliche Lösungsvolumen betrug pro Reaktandenlösung $\sim 50 \mu\text{l}$. Die Reaktanden wurden im Verhältnis 1:1 mit einem Druck von 6 bar gemischt. Die Totzeit der Meßapparatur wurde vom Hersteller mit 1,5 ms angegeben. Durchgeführt wurden diese Messungen in Zusammenarbeit mit E. Lewitzki in der Arbeitsgruppe Grell.

Eosin (OS) bindet in Gegenwart von Na^+ mit ähnlich hoher Affinität wie das ATP an die Nukleotidbindungsstelle der Na,K-ATPase ((5), Esmann und Fedosova, 1997). Dabei verändert es seine Fluoreszenzeigenschaften. Die Eosin-Bindung an die Na,K-ATPase stellt somit ein Modellsystem zur Untersuchung der ATP-Bindung an die Na,K-ATPase dar. Die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten k_{on} der Eosin-Bindung an die Na,K-ATPase bei definierter Viskosität erfolgte mittels einer Versuchsreihe, bestehend aus vier Einzelversuchen. Innerhalb einer Versuchsreihe blieb die Enzymkonzentration konstant während die Eosinkonzentration variiert wurde. Die zeitaufgelöste Änderung der Fluoreszenz (F) läßt sich mit Hilfe einer monoexponentiellen Funktion, die die Abklingzeit τ besitzt, anpassen (6).

$$\frac{\Delta F}{dt} = A \cdot e^{-\frac{1}{\tau}t} \quad (6) \quad \frac{1}{\tau} = k_{\text{obs}} \quad (\text{reziproke Abklingzeit})$$

Aus der Auftragung von k_{obs} gegen die Eosinkonzentration ergibt sich das k_{on} als Steigung einer Gerade.

2.2.4 Kalorimetrie

Zur Bestimmung von Denaturierungstemperaturen unterschiedlicher Proteinpräparationen kam die Dynamische Differenzkalorimetrie (**D**ifferential **S**canning **C**alorimetry, DSC) zum

Einsatz. Prinzipiell wird mit der DSC der Wärmefluß, der mit einem thermischen Übergang gekoppelt ist, gemessen. Um diese Übergangstemperatur zu detektieren, wird ein Temperaturlauf über einen definierten Bereich durchgeführt. In Abhängigkeit von der Beschaffenheit der zu untersuchenden Probe wurden zwei verschiedene Apparaturen verwendet. Zum Einen war dies ein Perkin Elmer DSC 2 Kalorimeter zur Messung von hochkonzentrierten Proteinfilmen und Proteinsedimenten und zum Anderen ein MicroCal MCS DSC-Gerät zur Messung von verdünnten Proteinsuspensionen, die in der Konsistenz mit einer Lösung identisch sind. Durchgeführt wurden diese Messungen in Zusammenarbeit mit E. Grell und A. Geoffroy bei der Solvias AG in Basel. Bei dem DSC-Kalorimeter der Firma MicroCal erfolgte die Füllung der fest im Gerät eingebauten Kapillarzelle aus Tantal mittels einer Hamilton-Spritze, die eine lange Metallkanüle besaß. Das Probenvolumen betrug 1,3 ml. Alle Messungen erfolgten gegen eine Referenz (Puffer ohne Protein). Die Spannweite eines typischen Temperaturlaufs reichte von 5-90°C, bei einer Geschwindigkeit von 0,5°C/min. Um reversible von irreversiblen Effekten unterscheiden zu können, wurde der Temperaturlauf jeder Probe nach Abkühlung auf die Ausgangstemperatur einmal wiederholt.

Das Probengefäß des Perkin Elmer Gerätes war ein kleines Aluminiumkapselgefäß, ($d = 5$ mm) welches mit ca. 15 mg Festsubstanz (Proteinsediment nach Ultrazentrifugation bzw. nach Vakuumtrocknung, vgl. 2.2.1.3) befüllt werden konnte. Als Referenzprobe diente ein leeres Aluminiumgefäß. Die Überprüfung der Reversibilität erfolgte analog zum MicroCal-Gerät. In beiden Fällen wurden die Enthalpien aus den gemessenen Thermogrammen mittels der jeweils zu dem Gerät gehörigen Software ermittelt.

2.2.5 UV/VIS-Spektroskopie

Zur Konzentrationsbestimmung von Substanzen in Lösung aller Art, die im Bereich zwischen 200-700 nm absorbieren, wurde ein UV/VIS-Spektrometer der Firma Varian (Cary 100) mit modifiziertem und temperierbarem Probenhalter verwendet. Auf der Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes konnten somit die Konzentrationen mittels Gleichung (7) berechnet werden. Mittels der vom Hersteller mitgelieferten Software (CaryWinUV 2.0 von Varian) konnten auch zeitliche Abhängigkeit der Absorption bei jeweils einer Wellenlänge detektiert und ausgewertet werden. Je nach genutzter Wellenlänge kamen sowohl Quarz als auch Kunststoffküvetten zum Einsatz.

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (7)$$

ε	: Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]
c	: Konzentration [M]
d	: Schichtdicke [cm]
E	: Extinktion
I_0	: Intensität des einfallenden Lichtes
I	: Intensität des ausfallenden Lichtes

2.2.6 Viskositätsmessungen

Die Messung der Viskosität wurde mit einem Rotationsviskosimeter der Firma Rheologica (G.16.VIS.S003) bei Temperaturen zwischen 15 und 25°C durchgeführt. Das Viskosimeter bestand aus einem konzentrischen Zylinder in dem sich die Probe befand. Während der Messung tauchte in diese Probe von oben kommend ein metallener Kegel. Der äußere Zylinder war starr während sich der innere Kegel drehte. Die Geschwindigkeit, mit der sich der innere Kegel in der Probe drehte, die sogenannte Scherrate, konnte verändert werden. Das Drehmoment auf die Probe (Scherspannung), ausgeübt durch den inneren Kegel, wird während der Messung aufgezeichnet. Die Viskosität wurde bei der Messung in Abhängigkeit von der Scherspannung aufgezeichnet. Durchgeführt wurden die Viskositätsmessungen in Zusammenarbeit mit E. Grell und N. Martin bei der Solvias AG in Basel.

2.3 Material

2.3.1 Chemikalien, Proteine

(1) *Anorganische Salze*

CaCl₂ (suprapure[®] Merck)
KCl (suprapure[®] Merck)
KClO₄ (ultra, Sigma)
MgCl₂, p.a. (Merck)
Mg(ClO₄)₂·x1,8 H₂O (puriss. p.a., Sigma)
NaCl (suprapure[®] Merck)
NaClO₄·xH₂O (puriss. p.a., Sigma)

(2) *Antikörper*

anti-Phosposerin, Maus, Clone 4A3, monoclonal IgM (Biomol)
anti-Phosposerin, Maus, clone 1E11, monoclonal IgG (Biomol)
Anti-Maus IgM-Alkalische Phosphatase (Jackson ImmunoResearch)
Anti-Maus IgG-Alkalische Phosphatase (Jackson ImmunoResearch)
BCIP/NBT (Promega)

(3) *Detergenzien*

C₁₂E₈ (Nikkol Chemicals)
DOC (MicroSelect, Fluka)
SDS (MicroSelect, Fluka)
TritonX100 (MicroSelect, Fluka)

(4) *Enzyme*

AP aus Schafsdarm, Grad I (Roche Diagnostics)
Calmodulin aus Rinderherz (Calbiochem)
LDH (Roche Diagnostics)
PK (Roche Diagnostics)
PKA, katalytische Untereinheit Rinderherz (Calbiochem)
PKC, Rattenhirn (Calbiochem)
PKG, Isoform I α rekombinant (Calbiochem)
PP₁, katalytische Untereinheit γ -Isoform, menschlich, rekombinant (Calbiochem)
PP_{2A} aus menschlichen roten Blutzellen (Upstate biotechnology)
PP_{2B}, menschlich, rekombinant (Calbiochem)

(5) *Lösungsmittel*

Aceton (p.a., Fluka)
DMF (p.a., Fluka)
DMSO (p.a., Fluka)
Ethanol (p.a., Fluka)

(6) *Fluoreszenzfarbstoffe*

FITC, Isomer I (Merck)
NBD (Molecular Probes)
NPN (Molecular Probes)
Indo I (Molecular Probes)
Oregon-Green-BAPTA (Molecular Probes)

RH421 (Molecular Probes)

(7) *Inhibitoren*

Antipain (Fluka)
Leupeptin (Fluka)
Ouabain (Fluka)
Pefabloc[®] (Fluka)
Thapsigargin (Sigma)
Oligomycin (Calbiochem)

(8) *Komplexbildner*

Cryptand [2,2,2] (Merck)
EDTA (freie Säure, MicroSelect, Fluka)
EGTA (freie Säure, MicroSelect, Fluka)

(9) *Puffer*

Histidin (MicroSelect, Fluka)
HEPES (freie Säure, MicroSelect, Fluka)
Imidazol (MicroSelect, Fluka)
MES (freie Säure, MicroSelect, Fluka)
MOPS (freie Säure, MicroSelect, Fluka)
Tris (MicroSelect, Fluka)

(10) *Sonstiges*

A23187 (Calbiochem)
APS (MicroSelect, Fluka)
DTT (MicroSelect, Fluka)
H₃PO₄ ultra (Sigma)
Glycerin (MicroSelect, Fluka)
Kationenaustauscher Dowex HCR-W (Dow-Chemicals)
Mercaptoethanol (MicroSelect, Fluka)
Molekulargewichtsmarker, Roti[®]-Mark STANDARD (Roth)
Reactive Red 120-Agarose (Sigma)
RSA, Rinderserum-Albumin für die Molekularbiologie (Serva)
TCA (MicroSelect, Fluka)
TEMED (MicroSelect, Fluka)
Trehalose D(+)(MicroSelect, Fluka)

(11) *Substrate*

AMPPNP, Li-Salz (Sigma)
ATP (DiNa-Salz, SigmaUltra, Sigma)
NADH (Roche Diagnostics)
NPE-caged Phosphat, DiAmmoniumsalz (Molecular Probes)
NPE-caged ADP, MonoKaliumsalz (Molecular Probes)
PEP (Roche Diagnostics)

(12) *Wasser*

Millipore, System academic: Widerstand = 18,4 MΩ

2.3.2 Ca-ATPase

Als Rohmaterial zur Präparation der Ca-ATPase des glatten endoplasmatischen Retikulums (smooth endoplasmic reticulum Ca-ATPase: SERCa) diene Muskelfleisch aus Kaninchen. Die Ca-ATPase, die angereichert in vesikulärer Form vorliegt (Produkt I + II, Abb. 2.7), wurde nach einer Vorschrift von Champeil et al. (1978) präpariert. Darüber hinaus erfolgten je nach Verwendungszweck zwei weitere Reinigungsschritte. Zum einen war das die extraktive Solubilisierung von Fremdprotein nach Meisner et al. (1973) und zum anderen war das eine Solubilisierung mit anschließender Affinitätschromatographie (Coll und Murphy, 1984).

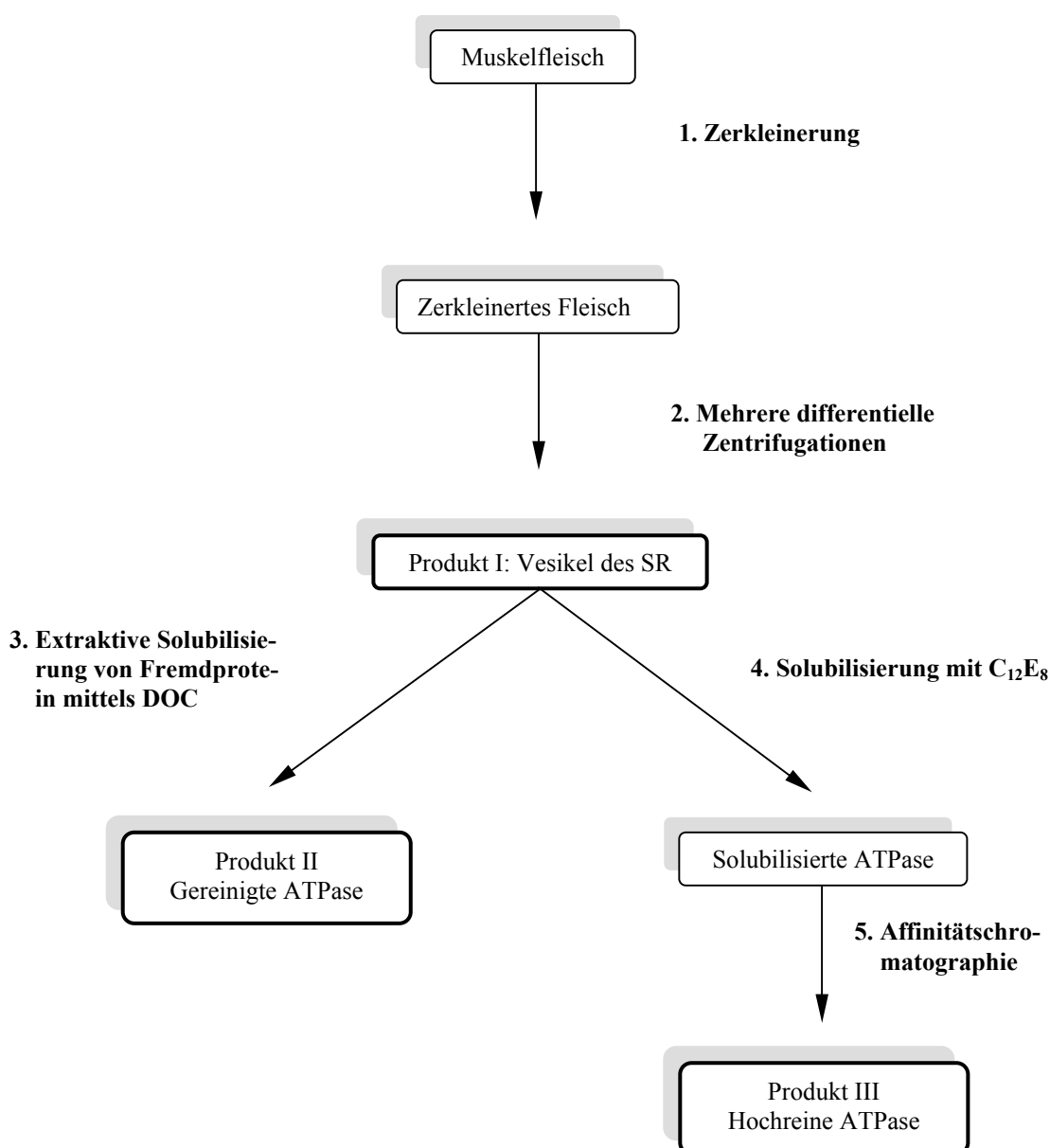


Abb. 2.7: Präparationsschema der Ca-ATPase.

Die spezifischen Aktivitäten der Produkte I-III wurden mittels des gekoppelten Aktivitätstests nach den Bedingungen von Petithory und Jencks (1988) bestimmt.

	Vesikuläre Ca-ATPase	DOC-behandelte Ca-ATPase	C ₁₂ E ₈ solubilisierter Ca-ATPase	RR120 gereinigte Ca-ATPase
Spezifische Aktivität	1,3-2,0*	~12*	~15*	~18*

Tab. 2.2: Vergleich der spezifischen Aktivitäten verschiedener Ca-ATPase-Präparationen. *Bei 37°C, Zahlenangabe in $\mu\text{mol P}_i \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Während die vesikuläre Ca-ATPase eine Reinheit von ~70 % (Meissner et al., 1973) aufweist, kann die Reinheit mit dem DOC-behandelten Material auf ~90 % und mit dem chromatographisch gereinigtem Material auf ~99,5 % gesteigert werden. Die Reinheit der unterschiedlichen Präparationen kann anhand eines SDS-Gels (Abb. 2.8) dokumentiert werden. Hieraus wird ersichtlich, daß das vesikuläre Rohmaterial (1) noch einen erheblichen Fremdproteinanteil gegenüber dem DOC-behandelten (4) und chromatographisch gereinigten Enzym (3) aufweist. Die Ca-ATPase ist in allen Präparationen (nahe der Markerbande 97 kDa) deutlich zu erkennen.

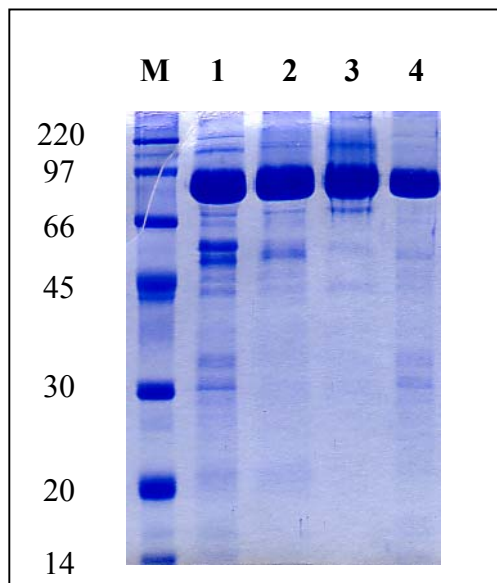


Abb. 2.8: SDS-PAGE verschiedener Ca-ATPase-Präparationen. M: Molekulargewichtsmarker (Zahlenangaben in kDa), 1: Vesikel des SR, 2: C₁₂E₈-solubilisierteres Material, 3: Chromatographisch gereinigtes Material, 4: DOC-behandeltes Material.

2.3.3 Na,K-ATPase

2.3.3.1 *Isolierung der gereinigten Na,K-ATPase*

Die Isolierung der gereinigten Na,K-ATPase erfolgte nach einer Vorschrift von Jørgensen (1974 a, b) aus drei verschiedenen tierischen Ressourcen:

- Schweineniere
- Salzdrüse des Dornhais
- Salzdrüse der Ente

Das folgende Präparationsschema zeigt die wichtigsten Stufen der Isolation am Beispiel des meist verwendeten Rohmaterials, der Schweineniere.

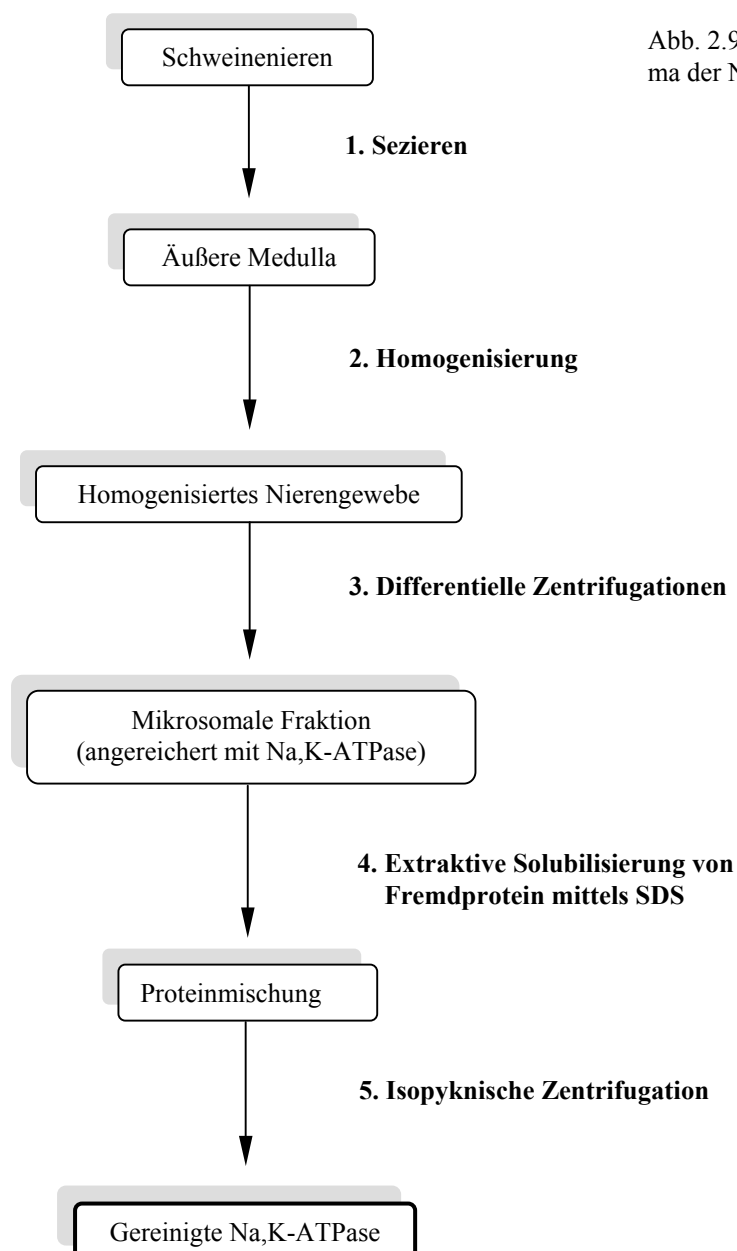


Abb. 2.9: Präparationsschema der Na,K-ATPase.

Das so gereinigte Enzym liegt in seiner ursprünglichen, gerichteten Orientierung eingebettet in offenen Membranfragmenten vor (Deguchi et al., 1977). Diese Membranfragmente sind sowohl scheibenförmig als auch leicht gekrümmt und besitzen bei der aus der Schweineiere isolierten Na,K-ATPase einen Durchmesser zwischen 100 und 600 nm. Die hydrophoben Randbereiche der Membranfragmente werden durch ein zugegebenes Detergens von der wässrigen Umgebung abgeschirmt (Abb. 2.10).

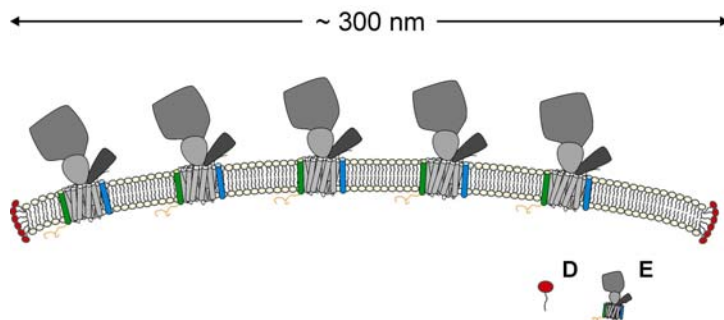


Abb. 2.10: Schematisches Modell eines Na,K-ATPase Membranfragments. D: Detergensmolekül, E: Na,K-ATPase.

Mit der hier verwendeten Präparationsmethode kann das Enzym aus der Salzdrüse des Dornhais mit einer Reinheit von 90 – 95 % (Skou und Esmann, 1979), aus der Salzdrüse der Ente mit ~95 % (Martin undb Sachs, 1999) und aus den Nieren von Schweinen mit einer Reinheit von 95 – 100 % (Jørgensen, 1982) isoliert werden.

Die mittlere spezifische ATPase-Aktivität der gereinigten Na,K-ATPase betrug bei der Haipräparation zwischen 30 und 36, der Schweineenzympräparation zwischen 34 und 40 und der Entenenzympräparation etwa $50 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Die enzymatische Aktivität in Anwesenheit von 1 mM Ouabain war im Regelfall $< 1 \%$. Das Enzym konnte auf Eis ohne eine Abnahme der ATPase Aktivität für 2 – 3 Wochen gelagert werden.

Alle Puffer wurden K^+ -frei, also ohne die direkte Benutzung der pH-Elektrode, hergestellt. Zur pH-Einstellung einer Stammlösung wurden zwei Aliquots identisch behandelt. Die pH-Messung mittels der Elektrode erfolgte aber immer nur bei einem Aliquot. Von der K^+ -freien Stammlösung wurde zwecks Überprüfung des pH-Wertes letztendlich ein kleiner Teil abgezweigt, der nicht mehr verwendet wurde. Die Enzymkonzentration betrug hier 2 – 3 mg/ml.

Schwein, Ente:

Imidazol/HCl.....25,0 mM
 DTT.....0,2 mM
 EDTA.....1,0 mM
 (pH 7,5)

Hai:

Histidin/HCl.....25,0 mM
 EDTA.....0,1 mM
 Glycerin.....25 % (w/w)
 (pH 6,8)

Für die IR-Spektroskopie wurden diese Ansätze erneut zweimal mit 5 mM Hepes/Tris (pH 7,5) gewaschen und anschließend auf eine Konzentration von ca. 6 mg/ml gebracht. Diese wurde durch zweimaliges 30 minütiges Zentrifugieren bei 204.000 g (4°C) und darauffolgendes 15 minütiges Resuspendieren in 3 ml IR-Puffer bei Raumtemperatur erreicht. Der Rückstand der letzten Zentrifugation wurde dann in einer, den eingesetzten Proteinmengen entsprechend berechneten Menge an Puffer aufgenommen. Nach 3 stündigem Quellen dieser Proteinsuspension auf Eis und unter mehrmaligem Umrühren wurde eine Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad System durchgeführt. Die so hergestellte Enzymsuspension wurde zur IR-Probenpräparation verwendet.

Puffer für IR-Messungen

HEPES/Tris.....5,0 mM (pH 7,5 bei jeweiligen Meßtemperatur)

2.3.3.2 Solubilisierung der gereinigten Na,K-ATPase

Die Na,K-ATPase aus der Salzdrüse des Dornhais wurde bei niedriger Ionenstärke in Anlehnung an die Vorschrift von Esmann et al. (1979) solubilisiert. Dazu wurde die Präparation der Na,K-ATPase wie in 2.3.2.1 beschrieben für die IR-Spektroskopie vorbereitet. Dann wurde zu einer Volumeneinheit Na,K-ATPase eine Volumeneinheit C₁₂E₈ in gleichem Puffer unter Rühren auf Eis hinzugegeben. Das molare Verhältnis von C₁₂E₈ zu Protein nach der Mischung betrug 750. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 280.000 g bei 8°C für 60 min. Der Überstand wurde abgenommen und zur IR-Probenpräparation verwendet. Abb. 2.11 zeigt die aus unterschiedlichen Rohmaterialien präparierte Na,K-ATPase nach elektrophoretischer Auftrennung. Deutlich zu erkennen sind hier die α - und β -Untereinheit (~110 bzw. ~45 kDa). Aus der Glycosilierung der β -Untereinheit resultiert ein erhöhtes Molekulargewicht. Das durch die Sequenz vorgegebene Molekulargewicht der unglycosilierten β -Untereinheit beträgt 35 kDa (Swiss Prot (2005): ATNB_Pig (β_1)). Sehr schwach zu erkennen ist im Bereich um 14 kDa die γ -Untereinheit, welche je nach Organismus diffuser (Schwein: 1, Hai: 3, 4) bzw. schärfer (Ente: 2) erscheint.

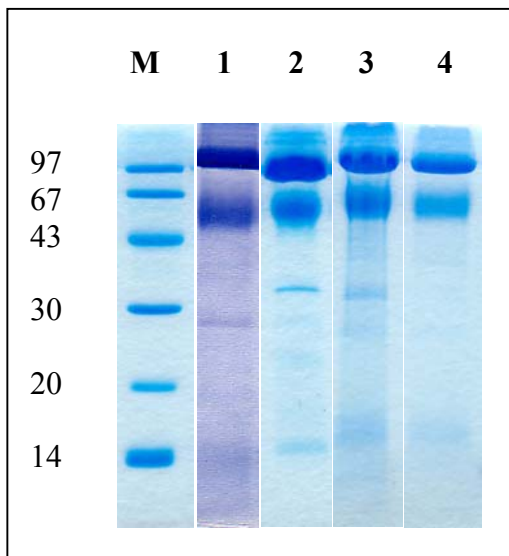


Abb. 2.11: SDS-PAGE verschiedener Na,K-ATPase-Präparationen. M: Molekulargewichtsmarker (Zahlenangaben in kDa) 1: Na,K-ATPase aus der Schweineiere, 2: Na,K-ATPase aus der Salzdrüse der Ente, 3: Na,K-ATPase aus der Salzdrüse des Dornhais, 4: Solubilisierte ($C_{12}E_8$) Na,K-ATPase aus der Salzdrüse des Dornhais.

2.3.3.3 *Markierung der Na,K-ATPase mit FITC*

Die kovalente Verknüpfung des Fluoreszenzmarkers FITC mit der gereinigten Na,K-ATPase erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Karlish (1979). Die entsprechenden Zentrifugationen erfolgten jeweils bei 234.000 g und 4°C über einen Zeitraum von 30 Minuten. In der folgenden Übersicht sind die genauen Umstände der Kopplungsreaktion aufgeführt.

- 1) *Überführung des Enzyms in das Reaktionsmedium*
(100 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 9,2)
- 2) *Inkubation mit FITC bei 25°C für 30 min*
($c_{\text{Enzym}} = 0,5 \text{ mg/ml}$; $c_{\text{FITC}} = 150 \text{ }\mu\text{M}$)
- 3) *Stoppen der Reaktion*
(Verdünnung: 1:2 mit Imidazol/HCl pH 6,5, 1 mM EDTA)
- 4) *Waschen (2 Mal) bei 37°C*
(Pufferzusammensetzung hängt von Problemstellung ab)
- 5) *Aufnahme in Meßpuffer*
(Pufferzusammensetzung hängt von Problemstellung ab)

Von der FITC-Enzymsuspension wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen, um über die OD bei 500 nm die Menge des kovalent an die Na,K-ATPase gebundenen FITC's ($\epsilon_{500 \text{ nm}} = 71500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) abschätzen zu können. Typischerweise wurde ein Wert von $\sim 0,8$

Äquivalenten FITC pro Enzym ermittelt. Zur Beurteilung der K^+ -Bindungseigenschaft des FITC-Enzyms wurde der für die Zugabe von 3 mM K^+ spezifische Fluoreszenzabfall genutzt. Die ATPase-Aktivität des FITC-Enzyms lag bei ca. $2 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$.

2.3.3.4 *Fluoreszenzmarkierung der Na,K-ATPase mit RH421*

Der Fluoreszenzfarbstoff RH421 bindet aufgrund seines amphiphilen Charakters reversibel und mit hoher Affinität an die Membran der gereinigten Na,K-ATPase (Forbush und Klotz, 1991). In dieser Arbeit wurden RH421 Konzentrationen von $\sim 500 \text{ nM}$ bei Enzymkonzentrationen von ca. $0,25 \mu\text{M}$ verwendet.

2.3.3.5 *Herstellung von Oligomycin-Na,K-ATPase*

Das Antibiotikum Oligomycin ist ein Inhibitor der Na,K-ATPase und reduziert deren ATPase-Aktivität auf etwa 10 % des nach der Enzympräparation bestimmten Maximalwertes (Fahn et al., 1966). Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von Oligomycin wird zur Bindung des Oligomycins an die Na,K-ATPase folgendes Versuchsschema durchlaufen:

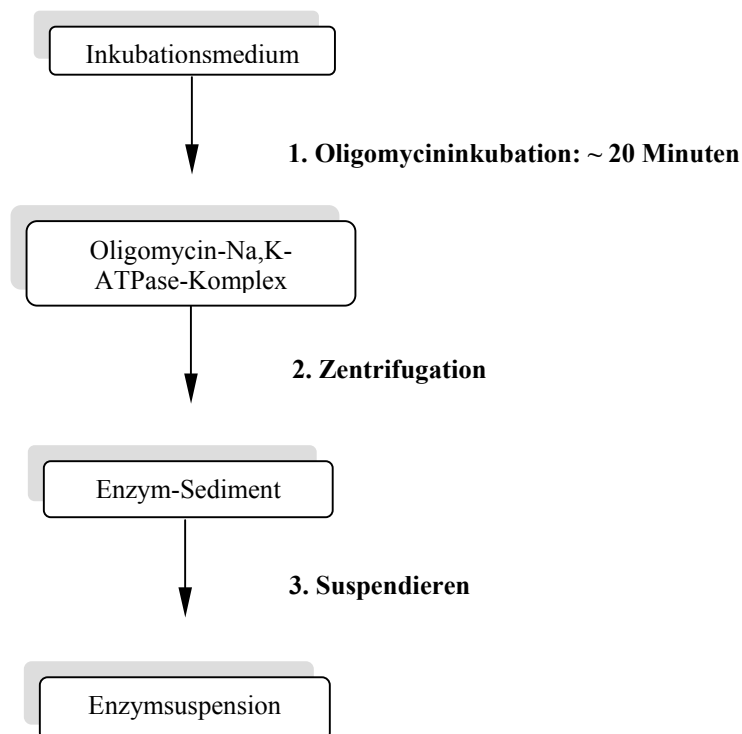


Abb. 2.12: Oligomycinbindung an die Na,K-ATPase

Da auch in der Endsuspension noch Reste freien Oligomycins vorhanden sind, kann bei einer Dissoziationskonstante des Enzym-Oligomycinkomplexes von etwa 1 μM (Esmann, 1991) von einer gesättigten Enzym-Oligomycin-Bindung ausgegangen werden. Das molare Verhältnis Oligomycin/Enzym betrug in der Inkubationslösung 337/1. Die Inkubation wurde in den jeweiligen enzymspezifischen Standardpuffern (Kapitel 2.3.3.1) durchgeführt. Die Restaktivität nach der Oligomycinbehandlung betrug etwa 9 % des nach der Enzympräparation bestimmten Maximalwertes. Zur IR-spektroskopischen Vermessung wurde die hier erhaltene Enzymsuspension gemäß Kapitel 2.3.3.1 umgepuffert.

2.3.4 Geschützte Verbindungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene geschützte Verbindungen (sogenannte „caged“ Verbindungen) verwendet und getestet. Aus diesen geschützten Verbindungen wird durch Abspaltung der Schutzgruppe mittels Photolyse jeweils eine Substanz freigesetzt, die für der Na,K-ATPase als Substrat dient (vgl. Kapitel 2.2.1.2) An dieser Stelle soll sowohl auf die Struktur (Abb. 2.13) als auch auf die Herkunft dieser Substanzen eingegangen werden. Die Verbindungen (1)-(8) enthalten jeweils die gleiche Schutzgruppe (1-(2-nitrophenyl) ethyl). Bei Derivat (8) ist die Schutzgruppe nicht über das dritte Phosphat, sondern über die exocyclische Aminofunktion des Adeninrings mit dem Nukleotid verknüpft. Verbindung (9) enthält die Schutzgruppe P³-3',5'-dimethoxybenzoin. Die Verbindungen (1)-(6) wurden prinzipiell nach einer Vorschrift von Walker et al. (1988) synthetisiert. Die Herstellung von Derivat (9) erfolgte nach einer Vorschrift von Thirlwell et al. (1994). Die Synthese und die Charakterisierung der verwendeten Substanzen (1)-(6) und (9) wurde von J. Corrie ausgeführt (National Institute for Medical Research, London).

Die Synthese von Verbindung (7) erfolgte durch M. Weimar (Institut für Organische Chemie, Universität Frankfurt) nach einer Vorschrift von Oelschläger et al. (1986). Derivat (8) wurde von R. Warmuth (Rutgers, The State University of New Jersey, USA) zur Verfügung gestellt.

- (1) *NPE-caged ATP*
- (2) *[¹⁵N]NPE-caged ATP*
- (3) *[γ -¹⁸O₃]NPE-caged ATP*

- (4) *NPE-caged AMPPNP*
- (5) *NPE-caged ADP*
- (6) *NPE-caged Pi*
- (7) *NPE-caged NH₄⁺*
- (8) *N⁹-NPE-caged ATP*
- (9) *DMB-caged ATP*

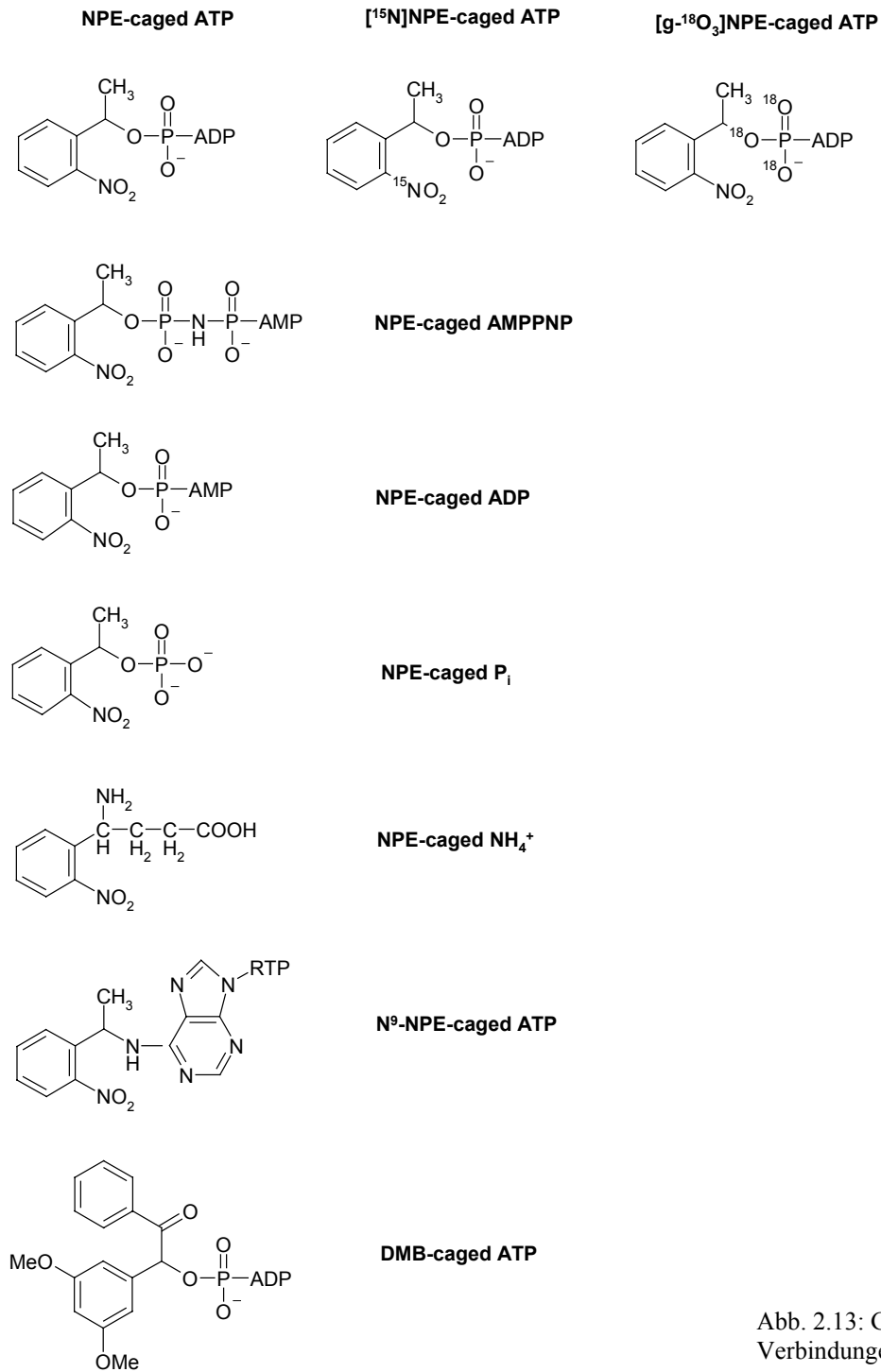


Abb. 2.13: Geschützte Verbindungen

3 Ergebnisse

3.1 Infrarot-Spektroskopie

3.1.1 Kontrollversuche

Die proteinhaltigen Proben enthalten zum Start der gewünschten Teilreaktion der Na,K-ATPase das entsprechende Substrat in geschützter Form. Dieses Substrat wird durch Photolyse der Schutzgruppe freigesetzt. Die Photolyse des Substrats alleine – also ohne die Anwesenheit von Enzym – verursacht bereits ein Differenzspektrum. Das heißt, die Durchführung von Kontrollversuchen dient der Detektion von Photolysesignalen durch die Photolyse der Schutzgruppe in Abwesenheit von Protein.

Aber auch zur Überprüfung der Herkunft von Differenzsignalen in Gegenwart von ATPase dienen die Kontrollversuche. So können durch eine spezifische Wahl des Reaktionsmediums (Kapitel 2.2.1.3) oder Zugabe spezifischer Inhibitoren wie Ouabain, Oligomycin oder Vanadat (Hansen, 1984, Homareda, 1999, Beaugé, 1988) bestimmte Teilreaktionen unterdrückt werden. Dies eröffnet die Möglichkeit einer detaillierten Signalzuordnung.

3.1.1.1 *Photolysekontrolle und -korrektur*

Ein unkorrigiertes ATPase-Differenzspektrum enthält sowohl Differenzsignale, die aus der enzymatischen Reaktion resultieren als auch Differenzsignale der Photolyse der geschützten Verbindung. Um aus den *unkorrigierten ATPase-Differenzspektren* die *photolysekorrigierten ATPase-Differenzspektren* zu erhalten, wird eine Korrektur durchgeführt. Dazu wird von einem *unkorrigierten ATPase-Differenzspektrum* ein *Photolyse-Differenzspektrum* subtrahiert. Dieses Photolyse-Differenzspektrum enthält ausschließlich Differenzbanden, die auf die Photolyse der geschützten Verbindung zurückzuführen sind. Die Photolyse-Differenzspektren wurden von der Freisetzung jeder geschützten Verbindungen aufgenommen. Das Bandenprofil solcher Photolyse-Differenzspektren ist von der jeweiligen Schutzgruppe abhängig.

Als ausgesuchtes Beispiel wird hier das Photolyse-Differenzspektrum von NPE-caged ATP besprochen. Abb. 3.0 (A) zeigt ein ATP-Photolyse-Differenzspektrum, aufgenommen 1,95 s nach dem Photolyseblitz. Die positiven Signale werden hierbei mit dem Erscheinen der in Abb. 3.0 (B) blau markierten funktionellen Gruppen korreliert, während die negativen Signale mit den in Abb. 3.1 (B) rot markierten verschwindenden funktionellen Gruppierungen in Verbindung gebracht werden. Im Gegensatz zu allen anderen auftretenden

Signalen zeigt die positive Bande bei 1640 cm^{-1} auch 100 ms nach dem Photolyseblitz einen zeitabhängigen Verlauf.

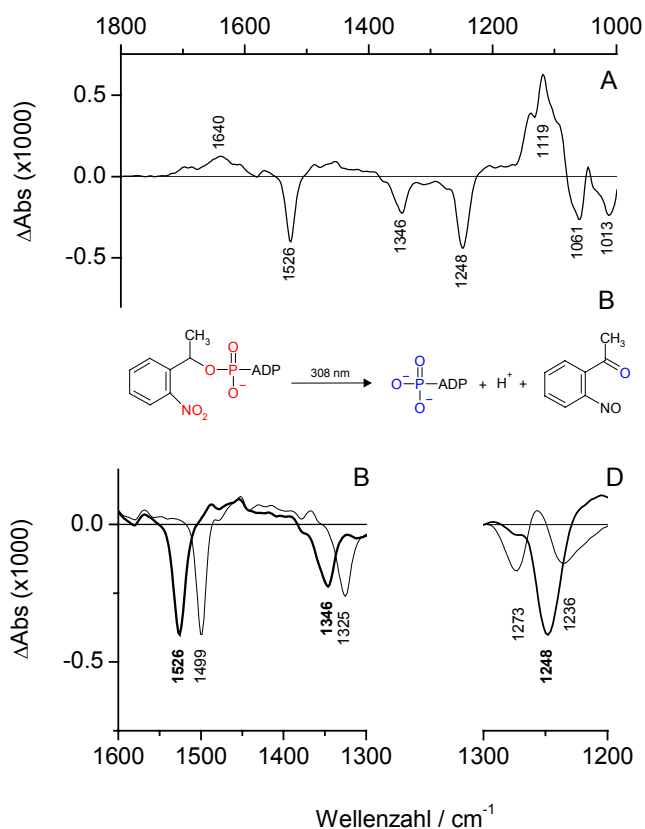


Abb. 3.0: Photolyse von NPE-caged ATP in 150 mM HEPES pH 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 5 mM caged ATP, 130 mM NaCl bei 15°C . Differenzspektren wurden 1,95 s nach ATP-Freisetzung aufgenommen. **(A)** Photolyse-Differenzspektrum ohne Mg^{2+} im Reaktionsmedium **(B)** Photolyse von NPE-caged ATP. **(C)** Dick gezeichnete Kurve: Probe enthält caged ATP, dünn gezeichnete Kurve: Probe enthält ^{15}N -NPE-caged ATP **(D)** Dick gezeichnete Kurve: Probe enthält kein Mg^{2+} , dünn gezeichnete Kurve: Probe enthält 3 mM freies Mg^{2+} .

Die breite Absorption bei 1640 cm^{-1} liegt im Bereich von $\nu(\text{C}=\text{O})$ und $\nu(\text{C}=\text{N})$. Ihre spektrale Bandbreite sowie die zeitabhängige Amplitude (0,1 – 224 s) deuten auf ein sich änderndes Produktgemisch hin. Die abgespaltene Schutzgruppe enthält eine Carbonylfunktion, die im weiteren zeitlichen Verlauf mit DTT sowohl zu offenkettigen als auch cyclischen Addukten reagiert (Barth et al., 1997). Die scharfen negativen Absorptionen bei 1526 und 1346 cm^{-1} werden den zu erwartenden asymmetrischen und symmetrischen Streck-schwingungen der verschwindenden Nitrofunktion im Edukt zugeordnet (Barth et al., 1995). Die Signale im Bereich zwischen 1260 und 1000 cm^{-1} liegen im Bereich von Phosphatschwingungen. Während das negative Signal bei 1248 cm^{-1} einer $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2)^-$ zugeordnet wird, kann das positive Signal bei 1119 cm^{-1} der $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_3)^{2-}$ zugeschrieben werden. Somit läßt sich die positive Bande bei 1119 cm^{-1} mit der Entstehung der freien $\gamma\text{-PO}_3^{2-}$ -Funktion im ATP korrelieren. Das negative Signal bei 1248 cm^{-1} hingegen wird mit dem Verlust der

gebundenen γ - PO_3^- -Funktion als auch mit der Modifikation des PO_2^- Schwingungssystems des α - und β -Phosphats im caged ATP in Verbindung gebracht. Das negative Signal bei 1061 cm^{-1} wurde als $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ zusammen mit der Entstehung eines aci-nitro Intermediates identifiziert, während die negative Bande bei 1013 cm^{-1} einer Gerüstschwingung C-O und P-O des caged ATP zugeordnet werden konnte (Barth et al., 1995). Welche Konsequenzen die Zugabe von Mg^{2+} auf die Lage der $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ bei 1248 cm^{-1} hat, wird durch Abb. 3.0 (D) demonstriert. Durch die Koordination von Mg^{2+} an die Phosphatgruppen wird ein nichtauflösbares Signal unterschiedlicher $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ bei 1248 cm^{-1} aufgespalten und es können nach Mg^{2+} -Zugabe zwei deutlich unterscheidbare Signale detektiert werden.

Zur Überprüfung der richtigen Photolysekorrektur der unkorrigierten ATPase-Differenzspektren wird das isopenmarkierte ^{15}N -NPE-caged ATP verwendet. Wegen der Isopenmarkierung des Stickstoffs an der Nitrofunktion des caged ATP verschieben sich die Photolysebanden von 1526 nach 1499 cm^{-1} und von 1346 nach 1325 cm^{-1} (Abb. 3.0 (C)). Diese Verschiebung ermöglicht die Identifikation von Proteinbanden in der Region um 1526 und 1346 cm^{-1} . Anhand von Abb. 3.1 (A) wird die Photolysekorrektur mittels der Doppeldifferenzbildung nach Abschnitt 2.2.1.6 a) verdeutlicht. Gezeigt wird hier die Anpassung eines Photolyse-Differenzspektrums an ein unkorrigiertes ATPase-Differenzspektrum. Diese Anpassung geschieht mittels der Photolysebanden bei 1526 und 1346 cm^{-1} . In einem zweiten Schritt wird das angepasste Photolyse-Differenzspektrum von dem unkorrigierten ATPase-Differenzspektrum subtrahiert. Das resultierende photolysekorrigierte ATPase-Differenzspektrum in Abb. 3.1 (B) weist im Bereich oberhalb von 1300 cm^{-1} - abgesehen von den Photolysebanden - nur sehr geringe Unterschiede im Vergleich zu dem unkorrigierten Differenzspektrum auf. Unterhalb von 1300 cm^{-1} dominieren Banden, die der photolytischen Freisetzung des ATP zugeordnet werden können. Bei der so beschriebenen Photolysekorrektur können bereits kleine Änderungen in der Bandenposition und der Amplitude Artefakte im Wellenlängenbereich von $1300 - 1000\text{ cm}^{-1}$ bei der Subtraktion verursachen. Abb. 3.1 (C) und (D) zeigt die mit ^{15}N -NPE-caged ATP durchgeführte Photolysekorrektur. Somit wird sichergestellt, daß keine Proteindifferenzbanden in der Region zwischen 1526 und 1346 cm^{-1} eliminiert werden. Der Vergleich zwischen diesen beiden photolysekorrigierten Differenzspektren (Abb. 3.1 (B) und (C)) führt allerdings aufgrund von Grundlinienschwankungen in diesem spektralen Bereich zu leicht veränderten Signalamplituden.

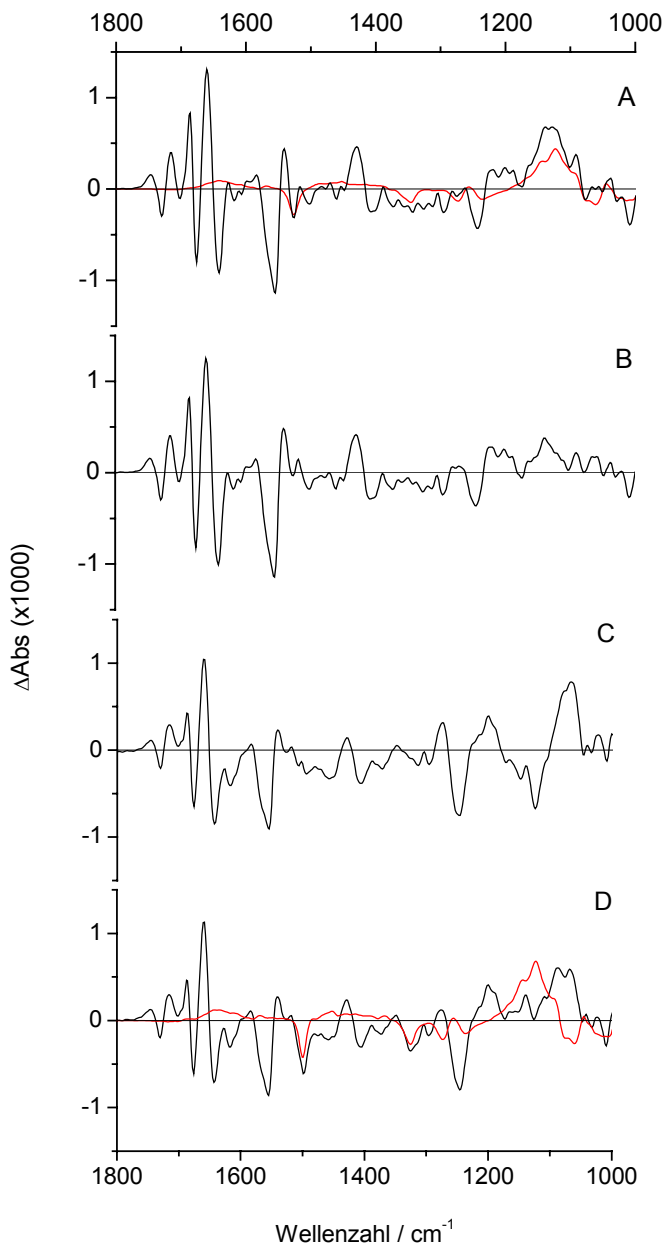


Abb. 3.1: Photolysekorrektur von unkorrigierten ATPase-Differenzspektren mittels der Photolyse-Differenzspektren von NPE-caged ATP und [^{15}N]NPE-caged ATP.

1 mM Na,K-ATPase aus der Schweineniere in 150 mM HEPES pH 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 5 mM caged ATP, 130 mM NaCl, 3 mM freies Mg^{2+} bei 15°C aufgenommen 1,95 s nach ATP-Freisetzung.

(A) NPE-caged ATP: Schwarze Linie: Unkorrigiertes ATPase-Differenzspektrum. Rote Linie: Photolyse-Differenzspektrum von caged ATP.

(B) NPE-caged ATP: Photolysekorrigiertes ATPase-Differenzspektrum (E2P-Bildung) ((A) schwarz – (A) rot).

(C) [^{15}N]NPE-caged ATP: Photolysekorrigiertes ATPase-Differenzspektrum (E2P-Bildung) ((D) schwarz – (D) rot).

(D) [^{15}N]NPE-caged ATP: Schwarze Linie: Unkorrigiertes ATPase-Differenzspektrum (E2P-Bildung). Rote Linie: Photolyse-Differenzspektrum von caged ATP.

3.1.1.2 ATPase-Kontrollen

Zur Überprüfung der Herkunft von Differenzsignalen in Gegenwart von ATPase dienten die Kontrollversuche. Durch eine spezifische Wahl des Reaktionsmediums (Kapitel 2.2.1.4) oder Zugabe verschiedener spezifischer Inhibitoren wie Ouabain, Oligomycin oder Vanadat (Hansen, 1984, Homareda, 1999, Beaugé, 1988) können bestimmte Teilreaktionen unterdrückt werden. Dies eröffnet die Möglichkeit einer detaillierten Signalzuordnung. Die

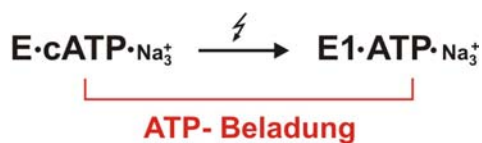
Beschreibung der Differenzspektren dieser Kontrollversuche geschieht jeweils im Kontext zu den thematisierten Teilreaktionen innerhalb des Reaktionszyklus der Na,K-ATPase.

3.1.2 Nukleotidbindung an die Na,K-ATPase

Es werden die Bindungen von ATP, ADP und AMPPNP an die Na,K-ATPase untersucht. Alle drei Substanzen sind mit der (1-(2-nitrophenyl)thyl)-Schutzgruppe geschützt.

3.1.2.1 ATP-Beladung

Das hier verwendete NPE-caged ATP wurde bereits bei verschiedenen Untersuchungen der Na,K-ATPase, insbesondere in Zusammenhang mit der „black lipid membran“ Technik, eingesetzt (Fendler et al., 1998). Eine Besonderheit des NPE-caged ATP besteht in der hohen Affinität an die Na,K-ATPase (Forbush, 1984). Diesem Umstand wird mit der Symbolik E·cATP und der Bezeichnung ATP-Beladung Rechnung getragen.



Schema 1: ATP-Beladung der Na,K-ATPase. E: Enzym, E1: Enzym im Zustand E1, cATP: caged ATP, E1·ATP·Na₃⁺: Enzym im Zustand E1 mit gebundenem ATP und 3 Na⁺.

Um eine ATP-Beladung ohne Phosphorylierungsreaktion zu erreichen, wurde ein kationisches Medium ohne Mg²⁺ gewählt (Nørby und Jensen, 1971). Dazu war es notwendig auch Spuren von Magnesium durch Zugabe von EDTA zu entfernen. Dazu mußten EDTA-Konzentration zwischen 10 und 20 mM gewählt werden. Unterhalb von 10 mM EDTA traten die für die E2P-Bildung typischen Bandenprofile im Bereich zwischen 1800 und 1300 cm⁻¹ auf. Um eine differenzierte Bandenzuordnung im Amid I/II-Bereich in Hinblick auf die Unterscheidung zwischen Sekundärstrukturveränderung und AS-Seitenkettenabsorption machen zu können, wurden sowohl Proben in H₂O als auch in D₂O vermessen. Die Überprüfung der Annahme, ob die beobachteten Differenzsignale die ATP-Beladung darstellen, wurde mittels zweier Kontrollexperimente durchgeführt. Abb. 3.2 (C) zeigt ein Basislinienkontrollspektrum. Durch ein Basislinienkontrollspektrum kann die zeitliche Veränderung der Proben ohne ATP-Freisetzung, welche eine potentielle Ursache für die

Entstehung von Differenzsignalen sein könnte, abgeschätzt werden. Die Aufnahme einer solchen Basislinienkontrolle erfolgte von jeder Probe.

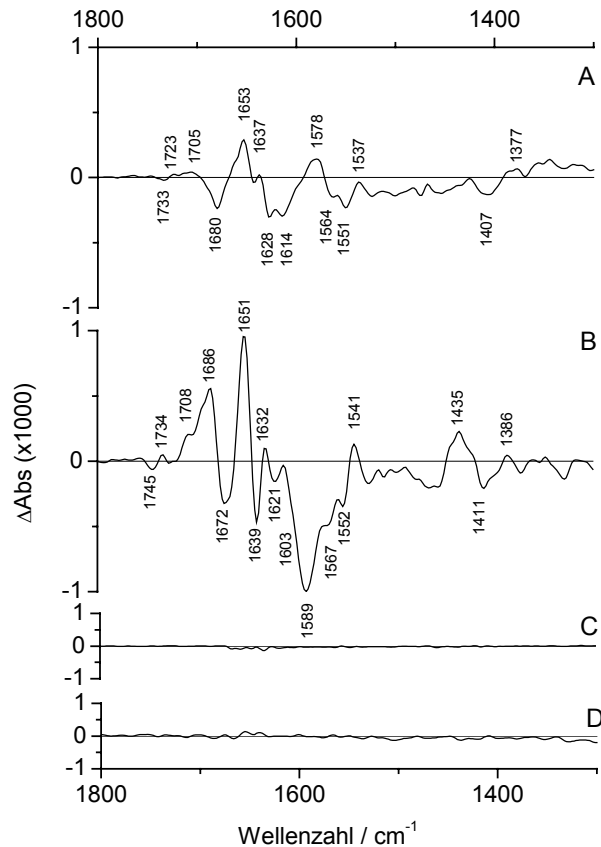


Abb. 3.2: ATP-Beladung in H₂O und D₂O, photolysekoriert. Schweineierenenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH (pD) 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 20 mM EDTA, 5 mM caged ATP und 130 mM NaCl bei 15°C. Differenzspektren wurden 1,95 s nach ATP-Freisetzung aufgenommen. **(A)** ATP-Beladung in H₂O **(B)** ATP-Beladung in D₂O **(C)** Basislinienkontrollspektrum Dieselben Proben wie **(A)** aber ohne Photolyseblitz. **(D)** Kationenkontrolle in H₂O: Probe enthält kein Na⁺.

Ein weiteres Kontrollexperiment war die Unterdrückung der Bindung des ATP an die Na,K-ATPase nach dessen Freisetzung durch die bestimmte Wahl des kationischen Mediums (Abb. 3.2 **(D)**: Kationenkontrolle). Bei dieser Reaktionsführung war im Reaktionsmedium weder Mg²⁺ noch Na⁺ enthalten. Abb. 3.2 **(D)** zeigt ein Differenzspektrum, welches unter diesen Bedingungen 1,95 s nach ATP-Freisetzung aufgenommen worden ist. Es zeigt keinerlei Banden im Bereich zwischen 1800 – 1300 cm⁻¹. Das heißt, es haben keine detektierbaren Zustandsänderungen des Enzyms nach der Freisetzung von ATP stattgefunden. Bei der Beschreibung der Differenzspektren der ATP-Beladung wird in zwei Schritten vorgegangen. Als erstes erfolgt eine Charakterisierung des sekundärstrukturelevanten Amid I/II-Bereichs. Der zweite Punkt beschäftigt sich mit Absorptionsänderungen, die durch individuelle AS-Seitenketten verursacht werden

Amid I/II

Im Amid I-Bereich ($1700 - 1610 \text{ cm}^{-1}$) sind in H_2O positive und negative Banden mit einer maximalen Amplitude von 0,3 mOD zu erkennen (Abb. 3.2 (A)). Bei dem Vergleich mit den in D_2O aufgenommenen Differenzspektren fällt auf, daß sich sowohl das Bandenprofil als auch die Amplituden voneinander unterscheiden. Dies deutet auf eine Überlagerung von Amid I-Moden und AS-Seitenkettenabsorptionen hin. Die größere Intensität der Signale in D_2O ist möglicherweise auf weniger Überlappung von positiven mit negativen Banden, hervorgerufen durch eine Isotopenverschiebung, zurückzuführen. Änderungen in der α -helikalen Struktur kann eine Ursache für die positiven Banden bei 1653 cm^{-1} (D_2O : 1651 cm^{-1}) sein. Die positive Bande bei 1637 cm^{-1} (D_2O : 1632 cm^{-1}) hingegen deutet auf eine Modifikation in β -Faltblatt-Strukturelementen hin. Das positive Signal in D_2O bei 1686 cm^{-1} unterstützt diese Hypothese. Das Fehlen eines positiven Signals in H_2O um 1690 cm^{-1} kann auf eine Überlappung mit einer negativen Bande in diesem Bereich (z. B. $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$ Arg oder $\nu(\text{C}=\text{O})$ Asn) zurückzuführen sein. Das positive Signal bei 1578 cm^{-1} in H_2O liegt sowohl im Bereich einer möglichen Amid II-Schwingung als auch einer $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$. Der Blick auf das in D_2O aufgenommene Differenzspektrum, in dem bei 1435 cm^{-1} ein positives Signal sichtbar wird (Amid II'-Signal), welches im H_2O nicht erkennbar ist, stützt die These, daß es sich bei der positiven Bande bei 1578 cm^{-1} in H_2O um eine Amid II-Schwingung handelt. Das stark negative Signal in D_2O bei 1589 cm^{-1} liegt im Absorptionsbereich von $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$. Die Tatsache, daß in diesem Spektralbereich in H_2O keine negative Bande zu sehen ist, könnte auf eine Überlappung dieser Schwingung mit dem Amid II-Signal hindeuten. Der Absorptionskoeffizient der $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ in D_2O ist um den Faktor 2,5 größer als in H_2O (Barth, 2000). Auch dieser Sachverhalt in Zusammenhang mit den experimentellen Befunden stützt die These, daß es sich bei der positiven Bande bei 1578 cm^{-1} in H_2O um eine Überlagerung von Amid II-Schwingung und

ATP-Beladung		
H_2O	D_2O	Potentielle Zuordnung
1733 (-)	1745 (-)	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1723 (+)	1734 (+)	
1705 (+)	1708 (+)	
-	1686 (+)	AI
1680 (-)	1603 (-)	$\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$
-	1672 (-)	
1653 (+)	1651 (+)	AI
-	1639 (-)	
1637 (+)	1632 (+)	
1614 (-)	1621 (-)	AII
1578 (+)	-	
-	1435 (+)	
1628 (-)	1589 (-)	$\nu_{\text{s}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$
1564 (-)	1567 (-)	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1551 (-)	1552 (-)	
-	1541 (+)	
1407 (-)	1411 (-)	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
1377 (+)	1386 (+)	

Tab. 3.1: Zuordnung von IR-Differenzsignalen bei der ATP-Beladung.

$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ handelt. Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß während der ATP Beladung nur ein sehr kleiner Teil der Aminosäuren der Na,K-ATPase an Sekundärstrukturänderungen beteiligt ist (0,05 %). Die Sekundärstrukturanteile des Enzyms bleiben also nahezu unverändert.

Individuelle AS-Seitenketten

Signale, die oberhalb von 1700 cm^{-1} detektiert werden, können mit der $\nu(\text{C}=\text{O})$ der protonierten Seitenketten der Aminosäuren Asp oder Glu korreliert werden (Venyaminov und Kalnin, 1990, Chirgadze et al., 1975). Bei der ATP-Beladung in H_2O wurden drei sehr kleine Signale in diesem Bereich beobachtet. Die negative bei 1733 und die positive Bande bei 1723 cm^{-1} sind von der Intensität etwa gleich groß. Die breite positive Absorption bei 1705 cm^{-1} liegt ebenfalls in dem potentiellen Bereich einer $\nu(\text{C}=\text{O})$. Aufgrund der unmittelbaren Nähe zum Amid I-Bereich könnte diese Bande auch auf eine Überlagerung von negativen und positiven Banden am oberen Ende des Amid I-Bereichs zurückzuführen sein. Vergleicht man die real gemessene Absorptionsänderung bei der Wellenzahl 1723 cm^{-1} mit der theoretisch berechneten Amplitude der $\nu(\text{C}=\text{O})$ unter Beteiligung einer einzelnen AS bei der vollständigen Protonierung des Seitenkettenrestes Asp oder Glu, so kommt man auf ein Verhältnis von $\sim 0,2$ (Absorptionskoeffizienten aus Barth, 2000, $d = 5 \mu\text{m}$, $c = 1 \text{ mM}$). Das heißt, etwa 20 % einer Asp- oder Glu-Seitenkette wären bei der Annahme einer Protonierung am Zustandekommen der beobachteten Absorption beteiligt. Das in D_2O aufgenommene Differenzspektrum (Abb. 3.2 **(B)**) zeigt oberhalb von 1700 cm^{-1} ein Bandenprofil von ähnlicher Symmetrie, aber mit einer Isotopenverschiebung zu höheren Wellenzahlen bei deutlich größerer Signalamplitude. Die Symmetrie von zwei benachbarten Banden unterschiedlichen Vorzeichens kann ein Hinweis auf die Ursache dieser Absorption sein. Bei den in D_2O aufgenommenen Differenzspektren sind die positive bei 1734 und die negative Bande bei 1745 cm^{-1} annähernd punktsymmetrisch angeordnet. Solch eine Symmetrie kann – vorausgesetzt es existieren keine Bandenüberlagerungen vorhanden – ein Hinweis für die Anzeige einer Umgebungsveränderung im Umfeld einer protonierten Carboxylfunktion sein. Gleiches gilt für die beiden Banden bei 1733 und 1723 cm^{-1} in H_2O .

Alternativ dazu könnten die beiden Signale mit entgegengesetztem Vorzeichen auch die $\nu(\text{C}=\text{O})$ zweier unterschiedlicher Seitenkettenreste (Asp oder Glu) repräsentieren. In diesem Fall würde das positive Signal die Protonierung einer Seitenkette und das negative Signal eine entsprechende Deprotonierung darstellen. Aber auch die Veränderung des Ab-

sorptionskoeffizienten an verschiedenen Carboxylgruppen zweier unterschiedlicher Seitenkettenreste könnte die Ursache dieser beiden Signale sein (Kap. 1.2.3) Das Bandenprofil in D₂O zwischen 1700 und 1686 cm⁻¹ unterscheidet sich deutlich von dem in H₂O aufgenommenen Differenzspektrum. Grund hierfür kann die Isotopenverschiebung einer ν_{as} (CN₃H₅⁺) eines Arg oder einer $\nu(\text{C}=\text{O})$ eines Asn sein. Die $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ der deprotonierten Asp- und Glu-Reste absorbieren jeweils etwa bei 1580 und 1560 cm⁻¹ (um 1584 und 1567 cm⁻¹ in D₂O, Venyaminov und Kalnin, 1990, Chirgadze et al., 1975). In H₂O (Abb. 3.2 (A)) sind zwei negative Banden bei 1564 und 1551 cm⁻¹ (D₂O: 1567 und 1552 cm⁻¹) zu erkennen. Vermutlich kommt es hier zu einer Überlagerung mit der positiven AII-Bande bei 1578 cm⁻¹, was insbesondere die Amplitude und die Lage des negativen Signals bei 1564 cm⁻¹ beeinflussen wird. Das heißt, beide negative Signale, sowohl in H₂O als auch D₂O sind im Bereich möglicher $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$. Diese beiden negativen Banden isoliert betrachtet können dahin gehend interpretiert werden, daß während der ATP-Beladung eine Protonierung der Carboxylgruppe von Asp oder Glu stattfindet. In D₂O wird in direkter Nachbarschaft zu diesen negativen Signalen bei 1567 und 1552 cm⁻¹ ein positives Signal bei 1541 cm⁻¹ detektiert. Dieses positive Signal in Verbindung mit den beiden negativen Signalen kann ein Hinweis auf eine Umgebungsänderung in der direkten Nachbarschaft einer COO⁻-Funktion sein. Alternativ hierzu könnte das positive Signal bei 1541 cm⁻¹ die $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ eines im Rahmen des Bindungsprozesses deprotonierten Asp- oder Glu-Seitenkettenrestes sein. Die größere Amplitude der negativen Banden in D₂O bei 1567 und 1552 cm⁻¹ im Vergleich zum Differenzspektrum in H₂O ist in Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen stärkeren Absorption der $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ in D₂O (Asp: $\epsilon(\text{H}_2\text{O})$, 380 M⁻¹ cm⁻¹; $\epsilon(\text{D}_2\text{O})$, 820 M⁻¹ cm⁻¹; Glu: $\epsilon(\text{H}_2\text{O})$, 470 M⁻¹ cm⁻¹; $\epsilon(\text{D}_2\text{O})$, 830 M⁻¹ cm⁻¹, Venyaminov and Kalnin, 1990, Chirgadze et al., 1975).

In Abb. 3.2 (A) und (B) wird bei 1407 cm⁻¹ (D₂O: 1411 cm⁻¹) eine negative Bande detektiert. In direkter Nachbarschaft zu dieser negativen Banden, nämlich bei 1377 cm⁻¹ (D₂O: 1386 cm⁻¹), wird eine positive Bande beobachtet. Bei Wellenzahlen von ~ 1404 bzw. 1402 cm⁻¹ (ca. 1407 bzw. 1404 cm⁻¹ in D₂O) absorbieren die $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ der beiden deprotonierten Glu- und Asp-Reste (Barth, 2000). Das Bandenprofil kann auch hier auf eine Umgebungsänderung in der direkten Nähe der entsprechenden funktionellen Gruppe hindeuten. Andererseits wäre aber auch die Deprotonierung/Protonierung zweier unterschiedlicher Seitenketten sowie die Änderung des Absorptionskoeffizienten ebenfalls zweier unterschiedlicher Seitenketten eine mögliche Erklärung.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß es Hinweise auf die Beteiligung von Seitenketten-carboxylgruppen bei der ATP-Beladung gibt. Die schwachen Absorptionen, gerade im Bereich $> 1700 \text{ cm}^{-1}$ deuten auf eine Änderung der Umgebung in der unmittelbaren Nähe einer Carboxylfunktion der Seitenreste Asp oder Glu hin.

Wie schon bei der Charakterisierung des Amid I-Bereichs angedeutet, liegt bei den in H_2O aufgenommenen Differenzspektren die negative Bande bei 1680 cm^{-1} im Absorptionsbereich einer $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$ von Arg. (Venyaminov und Kalnin, 1990, Chirgadze et al., 1975). Das Verschwinden dieser negativen Bande und das Erscheinen einer negativen Bande bei 1603 cm^{-1} in D_2O sind Hinweise darauf, daß es sich bei diesem Bandenpaar um eine $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$ handelt. Das negative Signal in H_2O bei 1628 cm^{-1} (D_2O : 1589 cm^{-1}) liegt im Bereich der $\nu_{\text{s}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$ von Arg. Das Verschwinden dieses Signals in H_2O und das gleichzeitige Entstehen des negativen Signals bei 1589 cm^{-1} in D_2O sind ebenfalls Hinweise auf die Beteiligung eines Arg-Restes bei der Beladung mit ATP.

3.1.2.2 ADP-Bindung

In Abb. 3.3 werden Differenzspektren der ADP-Bindung nach photolytischer Freisetzung des Nukleotids aus NPE-caged ADP gezeigt. Die Messungen wurden sowohl in H_2O als auch in D_2O durchgeführt.

Amid I/II

Im Bereich zwischen 1700 und 1610 cm^{-1} sind in H_2O und D_2O schwache Banden mit einer maximalen Amplitude von $0,4 \text{ mOD}$ zu erkennen. Bei dem in H_2O aufgenommenen Differenzspektrum liegen die negativen Banden bei 1688 und 1628 cm^{-1} im Absorptionsbereich von β -Faltblatt-Strukturen. Die beiden in Abb. 3.3 (A) bezeichneten positiven Signale bei 1672 und 1641 cm^{-1} sind zu schwach, um einen Aussagewert zu haben. Im Amid II-Bereich kann sowohl eine positive (1574 cm^{-1}) als auch eine negative Bande (1551 cm^{-1}) detektiert werden. Da diese beiden Banden auch im Bereich von $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ liegen, wird in diesem Zusammenhang das in D_2O aufgenommene Differenzspektrum zur Bandenzuordnung herangezogen. Das Fehlen des positiven Signals bei 1574 cm^{-1} in D_2O deutet daraufhin, daß es sich bei dieser Absorption in H_2O um eine Amid II-Schwingung handelt. Die nur minimale Verschiebung der Bandenlagen in D_2O im Vergleich zu H_2O legt den Schluß nahe, daß die beobachteten schwachen Differenzbanden Sekundärstrukturelementen zuzuordnen sind (Tab. 3.2). Anhand der experimentellen Befunde gibt es im Amid I-Bereich

Anzeichen für Sekundärstrukturänderungen des Enzyms während der ADP-Bindung. Diese Änderungen sind allerdings sehr klein (0,05 %).

Individuelle AS-Seitenketten

Oberhalb von 1700 cm^{-1} wird ein schwaches Signal bei 1723 cm^{-1} (D_2O : 1705 cm^{-1}) detektiert. Diese liegt im Bereich von $\nu(\text{C}=\text{O})$ der Seitenkettenreste Asp und Glu.

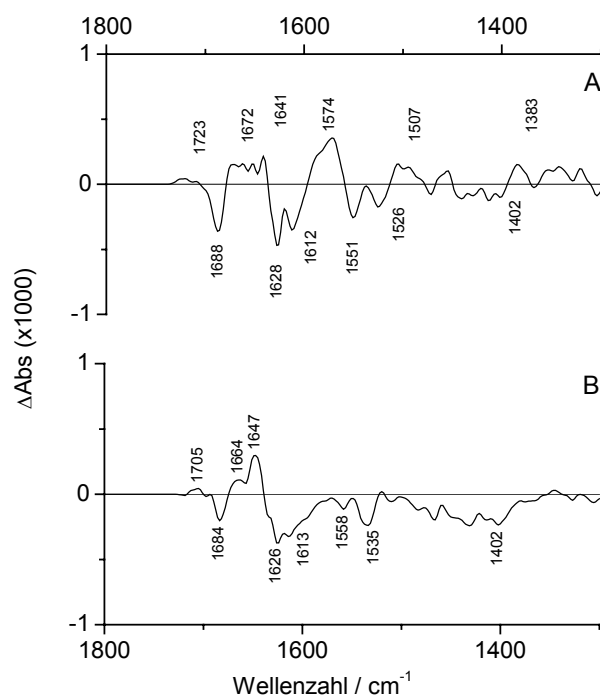


Abb. 3.3: ADP-Bindung in H_2O und D_2O , photolysekoriert. Schweineierenenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH (pD) 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 20 mM EDTA, 5 mM caged ATP, 130 mM NaCl bei 15°C . Differenzspektren wurden 1,95 s nach ADP-Freisetzung aufgenommen. **(A)** ADP-Bindung in H_2O **(B)** ADP-Bindung in D_2O .

Sowohl die positive bei 1574 cm^{-1} (D_2O : nicht vorhanden) als auch die negative Bande 1551 cm^{-1} (D_2O : 1558 cm^{-1}) liegen im spektralen Bereich der Amid II-Bande und $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ möglicher Asp/Glu-Reste. Wie schon bei der Charakterisierung des Amid I/II-Bereiches ausgeführt, stellt die Bande bei 1574 cm^{-1} wahrscheinlich im überwiegendem Maße ein Amid II-Signal dar. Im Bereich um 1400 cm^{-1} werden negative (H_2O : 1402 cm^{-1} , D_2O : 1402 cm^{-1})

ADP-Bindung		
H_2O	D_2O	Potentielle Zuordnung
1723 (-)	1705 (-)	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1688 (-)	1684 (-)	AI
1672 (+)	1664 (+)	
1641 (+)	1647 (+)	
1628 (-)	1626 (-)	
1612 (-)	1613 (-)	
1574 (+)	-	AII
1551 (-)	1558 (-)	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1526 (-)	1535 (-)	?
1507 (+)	-	
1402 (-)	1402 (-)	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
1383 (+)	-	

Tab. 3.2: Zuordnung von IR-Differenzsignalen bei der ADP-Bindung.

und positive Banden sichtbar (H_2O : 1383 cm^{-1}). Eine Möglichkeit der Interpretation dieses Bandenprofils ist die Protonierung eines Asp/Glu-Restes. Eine Alternativerklärung wäre eine Umgebungsänderung an einer Carbonylfunktion protonierter Seitenreste. In Anbetracht der beobachteten Amplituden ist eine Umgebungsänderung an einer Carbonylfunktion die wahrscheinlichste Erklärung. Vergleicht man hier die real gemessene Absorptionsänderung bei der Wellenzahl 1723 cm^{-1} mit der zu erwartenden Amplitude der $\nu(\text{C}=\text{O})$ bei der Beteiligung einer Seitenkette/Protomer bei der vollständigen Protonierung, so kommt man auf ein Verhältnis von $\sim 0,4$ (Absorptionskoeffizienten aus Barth, 2000 für $d = 5\text{ }\mu\text{m}$ und $c = 1\text{ mM}$). Das heißt, etwa 0,4 AS/Protomer sind bei der Annahme einer Protonierung am Zustandekommen dieser Absorption beteiligt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es Hinweise auf die Beteiligung von Carboxylgruppen an Seitenkettenresten bei der ADP-Bindung gibt. Der Vergleich mit ATP und AMPPNP sowie den daraus gezogenen Schlußfolgerungen wird in Kapitel 4.1.1 diskutiert.

3.1.2.3 *AMPPNP-Bindung*

Das im Vergleich zu ATP nahezu nicht hydrolysierbare Nukleotid AMPPNP wurde ebenfalls mittels eines Laserblitzes aus NPE-caged AMPPNP freigesetzt. Abb. 3.4 zeigt Differenzspektren, die sowohl in H_2O als auch in D_2O aufgenommen wurden.

Amid I/II

Im Amid I-Bereich werden positive und negative Banden mit einer maximalen Amplitude von 0,6 mOD detektiert. Während die kleinen positiven Signale bei 1694 cm^{-1} (D_2O : 1691 cm^{-1}) und 1635 cm^{-1} (D_2O : 1635 cm^{-1}) im Absorptionsbereich von β -Faltblatt-Strukturelementen liegen, gibt das positive Signal bei 1651 cm^{-1} (D_2O : 1647 cm^{-1}) einen Hinweis auf die Änderung einer α -helicalen Struktur. Im Bereich der Amid II-Schwingung ist eine positive Bande bei 1551 cm^{-1} (D_2O : 1551 cm^{-1}) und eine negative Bande bei 1534 cm^{-1} (D_2O : 1533 cm^{-1}) zu erkennen. Der Vergleich mit den in D_2O aufgenommenen Differenzspektren (Abb. 3.4 **(B)**), in dem diese Banden annähernd bei der gleichen Wellenzahl detektierbar sind, deutet darauf hin, daß es sich bei den Signalen in H_2O nicht um ein Amid II-Signal handelt. Bei der Annahme eines Amid II-Signals müßte in D_2O ein Amid II'-Signal bei etwa 1450 cm^{-1} auftreten. Dies ist nicht der Fall. Auch bei der AMPPNP-Bindung sind während des Bindungsvorgangs nur wenige Aminosäuren der Na,K-ATPase

an Sekundärstrukturänderungen beteiligt (0,05 %). Die Sekundärstrukturanteile des Enzyms bleiben also nahezu unverändert.

Individuelle AS-Seitenketten

Oberhalb von 1700 cm^{-1} sind in H_2O zwei deutliche Signale zu erkennen, die sich beide im Bereich von $\nu(\text{C}=\text{O})$ der protonierten Seitenketten Asp und Glu befinden.

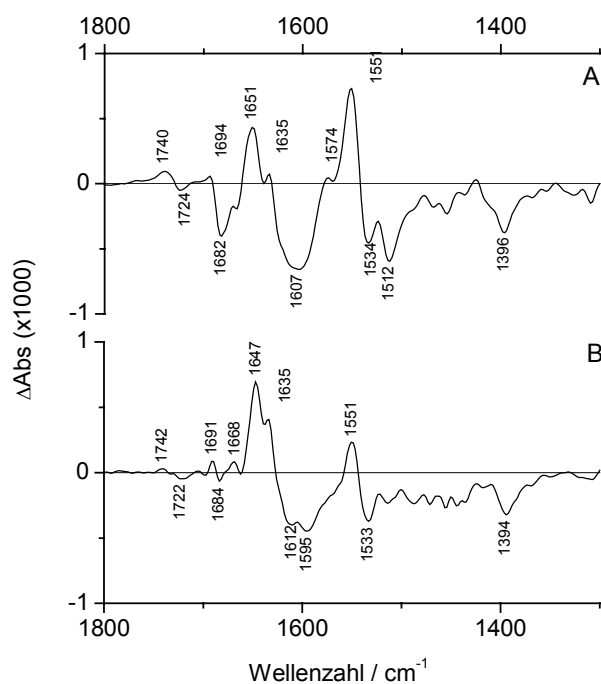


Abb. 3.4: AMPPNP-Bindung in H_2O und D_2O , photolysekorrigiert. Schweinenierenenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH (pD) 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 20 mM EDTA, 5 mM caged ATP, 130 mM NaCl bei 15°C . Differenzspektren wurden 1,95 s nach AMPPNP-Freisetzung aufgenommen. **(A)** AMPPNP-Bindung in H_2O **(B)** AMPPNP-Bindung in D_2O .

Bei der Annahme einer vollständigen Protonierung eines Carboxylseitenrestes entspricht die gemessene Amplitude der positiven Bande bei 1740 cm^{-1} (D_2O : 1742 cm^{-1}) in etwa dem Beitrag einer AS-Seitenkette /Protomer (Absorptionskoeffizienten aus Barth, 2000, für $d = 5\text{ }\mu\text{m}$, $c = 1\text{ mM}$). Bei 1724 cm^{-1} (D_2O : 1722 cm^{-1}) hingegen wird ein negatives Signal mit einer etwa halb so großen Amplitude detektiert. Die Signale im Bereich zwischen 1600 und

AMPPNP-Bindung		
H_2O	D_2O	Potentielle Zuordnung
1740 (+)	1742 (+)	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1724 (-)	1722 (-)	
1694 (+)	1691 (+)	AI
1682 (-)	1684 (-)	
1651 (-)	1647 (-)	
1635 (-)	1635 (-)	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1607 (-)	1612 (-)	
-	1595 (-)	?
1551 (+)	1551 (+)	
1534 (-)	1533 (-)	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
1512 (-)	-	
1396 (-)	1394 (-)	

Tab. 3.3: Zuordnung von IR-Differenzsignalen bei der AMPPNP-Bindung.

1534 cm^{-1} liegen sowohl im Absorptionsbereich der Amid II-Schwingung als auch im Bereich der $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ deprotonierter Asp- und Glu-Reste. Aufgrund der im Amid I/II-Teil erläuterten Vergleiche zwischen den in H_2O und D_2O aufgenommenen Differenzspektren wird angenommen, daß es sich bei diesen Signalen im wesentlichen um eine $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ handelt. Diese These wird auch durch das Auftreten des negativen Signals bei 1396 cm^{-1} (D_2O : 1394 cm^{-1}) gestützt. Es befindet sich im Absorptionsbereich von $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$.

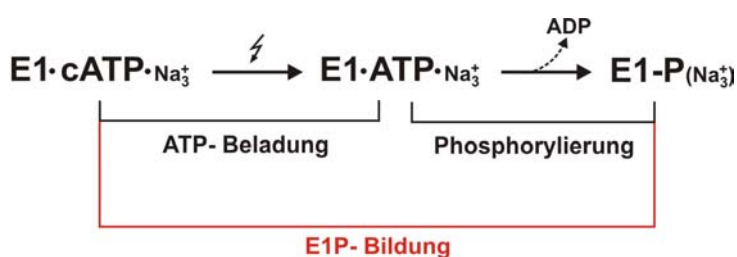
Zusammenfassend gesagt gibt es Hinweise auf die Beteiligung von Carboxylseitengruppen bei der AMPPNP-Bindung, die entweder auf eine Protonierung und/oder eine starke Veränderung in deren nächster Umgebung hindeuten.

Auf eine Beteiligung eines Lys bei der AMPPNP-Bindung deutet die Signalposition des negativen Signals bei 1512 cm^{-1} hin. Es liegt im Absorptionsbereich der $\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3^+)$ eines protonierten Lys-Restes.

Ein detaillierter Vergleich zwischen den drei Nukleotiden ATP, ADP und AMPPNP wird in Kapitel 4.1.1 diskutiert. Dort werden auch weitergehende molekulare Interpretationen bei der Bindung der verschiedenen Nukleotide in Bezug auf Sekundärstrukturänderungen und der Beteiligung von Carboxylseitenketten vorgeschlagen.

3.1.3 Die Phosphorylierung der Na,K-ATPase in Gegenwart von 1,2 M Na^+ : E1P-Bildung

In Abhängigkeit vom ionischen Medium kann die Bildung unterschiedlicher Reaktionsprodukte beeinflusst werden (Kapitel 2.2.1.4). Um eine Akkumulierung des E1P-Zustandes zu erreichen, wurde eine Na^+ -Konzentration von 1,2 M gewählt (Post und Suzuki, 1991 und Zitate darin). Nach der Freisetzung des ATP erfolgt zunächst die ATP-Beladung (Schema 2). In einem zweiten Schritt kommt es zur Phosphorylierung des Enzyms.



Schema 2: E1P-Bildung der Na,K-ATPase. E1: Enzym im Zustand E1, cATP: caged ATP, E1 · ATP · Na₃⁺: Enzym im Zustand E1 mit gebundenem ATP und 3 Na⁺, E1-P(Na₃⁺): Phosphoryliertes Enzym im Zustand E1 mit 3 okkludierten Na⁺-Ionen.

Während dieser Phosphorylierung wird Na^+ okkludiert (Kapitel 1.1.3). Aufgrund der hohen Na^+ -Konzentration von 1,2 M akkumuliert der Na^+ -okkludierte Zustand ($\text{E1-P}(\text{Na}_3^+)$).

Bei der Beschreibung der Differenzspektren wird auch hier in zwei Schritten vorgegangen. Zuerst erfolgt eine Charakterisierung des sekundärstrukturelevanten Amid I/II-Bereichs. Danach wird auf Absorptionsänderungen, die durch individuelle AS-Seitenketten verursacht werden, eingegangen. Um eine differenzierte Bandenzuordnung im Amid I/II-Bereich in Hinblick auf die Unterscheidung zwischen Sekundärstrukturänderung und AS-Seitenkettenabsorptionen machen zu können, wurden die Proteinproben in H_2O - und in D_2O -Medien vermessen.

Amid I/II

Im Amid I-Bereich sind in H_2O und D_2O sowohl positive als auch negative Banden mit einer maximalen Amplitude von 0,7 mOD zu erkennen (Abb. 3.5 (A)). Der Vergleich von Differenzspektren, die in H_2O und D_2O aufgenommen wurden, zeigt, daß sich sowohl das Bandenprofil als auch die Amplituden voneinander unterscheiden. Dies deutet auf eine Überlagerungen von Amid I-Moden und individuellen Seitenkettenabsorptionen hin. Die größere Intensität der Signale in D_2O ist möglicherweise auf eine geringere Überlappung von positiven mit negativen Banden, hervorgerufen durch eine Isotopenverschiebung, zurückzuführen. In H_2O werden bei 1688, 1653 und 1632 cm^{-1} jeweils positive Banden detektiert. Jede dieser drei Banden liegt in dem Absorptionsbereich von Sekundärstrukturelementen.

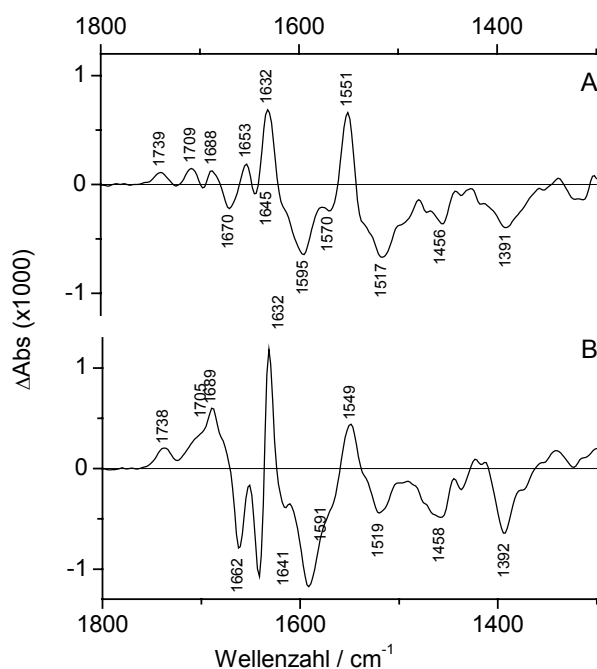


Abb. 3.5: E1P-Bildung in H_2O und D_2O , photolysekorrigiert. Schweineierenenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH (pD) 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP, 3 mM freiem Mg^{2+} , 1200 mM NaCl bei 5°C . Differenzspektren wurden 1,95 s nach ATP-Freisetzung aufgenommen. (A) E1P-Bildung in H_2O (B) E1P-Bildung in D_2O .

Während das positive Signal bei 1688 cm^{-1} (D_2O : 1689 cm^{-1}) im spektralen Bereich der Nebenbande von β -Faltblättern liegt, absorbiert das positive Signal bei 1632 cm^{-1} (D_2O : 1632 cm^{-1}) im spektralen Abschnitt der Hauptbande von β -Faltblättern. Die beiden negativen Signale in D_2O bei 1662 und 1641 cm^{-1} , die in H_2O bei dieser Position nicht detektierbar sind, geben einen Hinweis auf die Beteiligung von Schwingungen individueller Seitenkettenreste an diesen Absorptionen. Sie liegen beide im Bereich von $\nu(\text{C}=\text{O})$ Asn/ Gln bzw. $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$ Arg. Das im Vergleich dazu aufgenommene Differenzspektrum in D_2O zeigt ein positives Signal bei 1689 cm^{-1} und unterstützt somit diese Hypothese. Die Ursache der Verstärkung der Amplitude in D_2O könnte aber lediglich in einer Überlagerung von einem positiven (1688 cm^{-1}) mit einem negativen Signal (1670 cm^{-1}) in H_2O liegen. Im H_2O -haltigen Medium wird im Differenzspektrum bei 1551 cm^{-1} ein positives Signal registriert, das in D_2O bei 1549 cm^{-1} detektiert werden kann. Die Tatsache, daß dieses Signal in D_2O nicht verschwindet, deutet darauf hin, daß es sich hierbei nicht um eine Amid II-Schwingung handelt. In diesem Falle würde in D_2O das Amid II'-Signal bei etwa 1450 cm^{-1} zu detektieren sein, was nicht der Fall ist.

Abschließend ist festzuhalten, daß bei der EIP-Bildung nur ein sehr kleiner Teil der Aminosäuren der Na,K-ATPase an Sekundärstrukturänderungen beteiligt ist (0,07 %). Die Sekundärstrukturanteile des Enzyms bleiben also nahezu unverändert. Eine erweiterte Diskussion dieser Ergebnisse erfolgt in Kapitel 4.1.2.

Individuelle AS-Seitenketten

In dem für die $\nu(\text{C}=\text{O})$ charakteristischen Absorptionsbereich der protonierten Carboxylseitenketten von Asp und Glu sind zwei positive Signale zu erkennen; das eine bei 1739 cm^{-1} (D_2O : 1738 cm^{-1}) und das andere bei 1709 cm^{-1} (D_2O : 1705 cm^{-1}). Vergleicht man die Amplitude der Signale bei den Wellenzahlen 1739 und 1709 cm^{-1} mit der berechneten Amplitude einer einzelnen $\nu(\text{C}=\text{O})$ bei der Beteiligung einer Carboxylseitenkette während der vollständigen Protonierung bzw. Phosphorylierung, so ergibt sich folgendes Bild: Sowohl das Signal bei 1739 cm^{-1} als auch bei 1709 cm^{-1} kann durch die Beteiligung einer einzelnen AS hervorgerufen werden (Absorptionskoeffizienten aus Barth, 2000, für $d = 5\text{ }\mu\text{m}$ und $c = 1\text{ mM}$). Eines dieser beiden Signale wird dem phosphorylierten Seitenkettenrest Asp 369 zugeordnet. Die andere Bande ist möglicherweise auf eine gleichzeitig stattfindende Protonierung eines Asp- oder Glu-Restes zurückzuführen. Die drei im H_2O -Medium auftretenden Signale im Bereich von $1600 - 1551\text{ cm}^{-1}$ werden aufgrund des Vergleichs mit den in D_2O aufgenommenen Differenzspektren der $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ den Resten Asp und/oder Glu zu-

geordnet. Das negative Signal bei 1595 und 1570 cm^{-1} (D_2O : 1591 cm^{-1}) wird jeweils einer im Endzustand nicht mehr vorhandenen COO^- -Funktion zugeschrieben. Die Frage jedoch, ob es sich bei diesen drei Signalen zwischen 1600 und 1551 cm^{-1} um die Signale von drei oder zwei unterschiedlichen Aminosäuren handelt, kann hier nicht eindeutig beantwortet werden.

Eine negatives Signal in direkter Nachbarschaft zu einem positiven kann auch auf eine Umgebungsänderung an einem Seitenkettenrest zurückzuführen sein. In Bezug auf die unterschiedlichen Amplituden in H_2O im Vergleich zu D_2O ist anzumerken, daß die Extinktionskoeffizienten der $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ in D_2O größer sind als in H_2O (Asp: $\epsilon(\text{H}_2\text{O})$, 380 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$; $\epsilon(\text{D}_2\text{O})$, 820 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$; Glu: $\epsilon(\text{H}_2\text{O})$, 470 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$; $\epsilon(\text{D}_2\text{O})$, 830 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, Venyaminov and Kalnin, 1990, Chirgadze et al., 1975). Die experimentellen Befunde in Bezug auf das negative Signal bei 1591 cm^{-1} zeigen dieses Verhalten. Wie schon bei der Beschreibung des Amid I/II-Bereichs ausgeführt, repräsentiert die positive Bande bei 1551 cm^{-1} im überwiegenden Maße eine $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und keine Amid II-Schwingung. Die Lage des negativen Signals bei 1391 cm^{-1} (D_2O : 1392 cm^{-1}) ist typisch für den Absorptionsbereich von $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$. Das Verschwinden dieses Signals in Kombination mit dem Erscheinen der $\nu(\text{C}=\text{O})$ kann sowohl mit der Phosphorylierung als auch mit der Protonierung eines Asp und/oder Glu korreliert werden.

In der Zusammenfassung ergibt sich folgendes Bild: Die Phosphorylierung des Asp 369 kann oberhalb von 1700 cm^{-1} detektiert werden. Aufgrund eines zweiten positiven Signals in diesem Bereich gibt es Hinweise, daß es parallel zu der Phosphorylierung zu einer weiteren Protonierung des Enzyms kommt. Des weiteren gibt es ebenfalls Evidenzen auf eine Umgebungsveränderung in der direkten Nachbarschaft zu einer oder mehrerer Carboxylseitengruppen.

Bei 1517 cm^{-1} (D_2O : 1519 cm^{-1}) wird ein starkes negatives Signal beobachtet. Dieses liegt im Absorptionsbereich der $\nu(\text{C}=\text{C})$ eines aromatischen Ringes. Aufgrund der Position deutet diese Bande auf die Beteili-

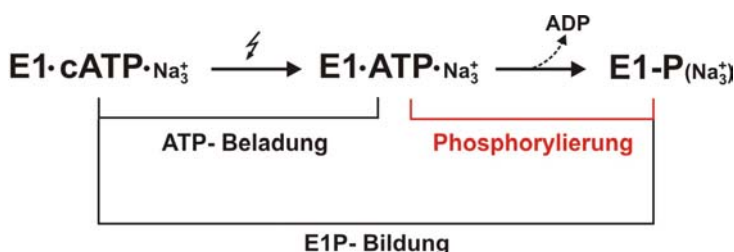
E1P-Bildung		
H_2O	D_2O	Potentielle Zuordnung
1739 (+)	1738 (+)	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1709 (+)	1705 (+)	
1688 (+)	1689 (+)	AI
1670 (-)	1662 (-)	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$
1653 (+)	-	AI
-	1641 (-)	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$
1632 (+)	1632 (+)	AI
1595 (-)	1591 (-)	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1570 (-)	-	
1551 (+)	1549 (+)	
1517 (-)	1519 (-)	$\nu(\text{C}=\text{C})$
1456 (-)	1458 (-)	?
1391 (-)	1392 (-)	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$

Tab. 3.4: Zuordnung von IR-Differenzsignalen bei der E1P-Bildung.

gung eines Tyr-Restes hin. (Venyaminov and Kalnin, 1990, Chirgadze et al., 1975, Takeuchi et al, 1988, Dollinger et al., Rothschild et al., 1986).

3.1.4 Die Differenz aus E1P-Bildung und ATP-Beladung: Phosphorylierung

Die Differenzspektren der E1P-Bildung und der ATP-Beladung wurden in den beiden vorhergehenden Kapiteln beschrieben. Anhand von Schema 3 werden die Teilreaktionen, die bei der ATP-Beladung und der E1P-Bildung ablaufen, dargestellt. Formal besteht nun die Möglichkeit aus den Differenzspektren der E1P-Bildung und der ATP-Beladung das Differenzspektrum der Phosphorylierung zu berechnen.



Schema 3: Phosphorylierung der Na,K-ATPase. E1: Enzym im Zustand E1, cATP: caged ATP, E1·ATP·Na₃⁺: Enzym im Zustand E1 mit gebundenem ATP und 3 Na⁺, E1-P(Na₃⁺): Phosphoryliertes Enzym im Zustand E1 mit 3 okkludierten Na⁺-Ionen.

Dies geschieht mittels Subtraktion des Differenzspektrums der ATP-Beladung von dem Differenzspektrum der E1P-Bildung. Das resultierende Differenzspektrum stellt die reine Phosphorylierungsreaktion dar (E1·ATP·Na₃⁺ → E1-P(Na₃⁺)).

Wie man anhand von Abb. 3.6 erkennt, sind sich die durch Subtraktion zweier Differenzspektren erzeugten Differenzspektren der Phosphorylierung und der E1P-Bildung sehr ähnlich. Die Unterschiede liegen hauptsächlich in den Signalamplituden. Dieser Umstand liegt im wesentlichen an

Phosphorylierung		
H ₂ O	D ₂ O	Potentielle Zuordnung
1739 (+)	1739 (+)	ν(C=O)
1709 (+)	1711 (+)	
1688 (+)	1688 (+)	AI
1670 (-)	1662 (-)	ν(C=O), ν _{as} (CN ₃ H ₅ ⁺)
1653 (+)	-	
-	1641 (-)	ν(C=O), ν _{as} (CN ₃ H ₅ ⁺)
1632 (+)	1632 (+)	AI
1595 (-)	1591 (-)	ν _{as} (COO ⁻)
1570 (-)	-	
1551 (+)	1549 (+)	ν(C=C)
1516 (-)	1522 (-)	
1456 (-)	1458 (-)	?
1391 (-)	1394 (-)	ν _s (COO ⁻)

Tab. 3.5: Zuordnung von IR-Differenzsignalen bei der Phosphorylierung.

dem Differenzspektrum der ATP-Beladung, welches unter E1-Bedingungen nur sehr kleine Signale aufweist. Somit ergibt sich bei den berechneten Differenzspektren der Phosphorylierung in H_2O und D_2O in Bezug auf die Bandenzuordnung kein Unterschied zu dem Differenzspektrum der E1P-Bildung (Kapitel 3.1.3).

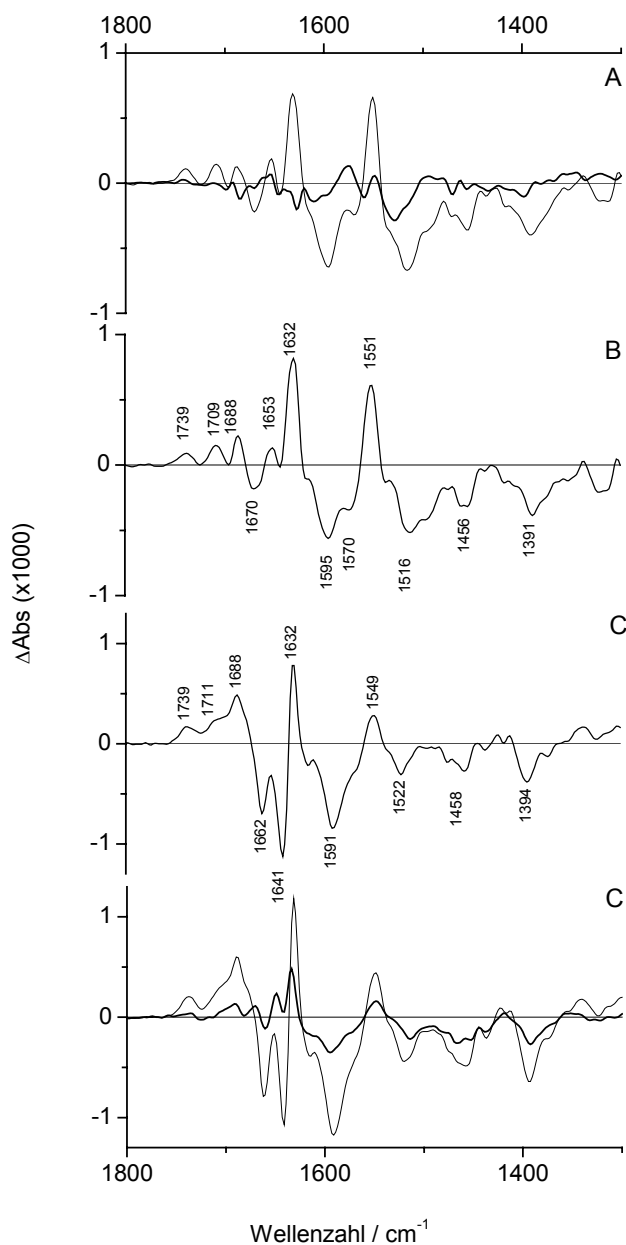
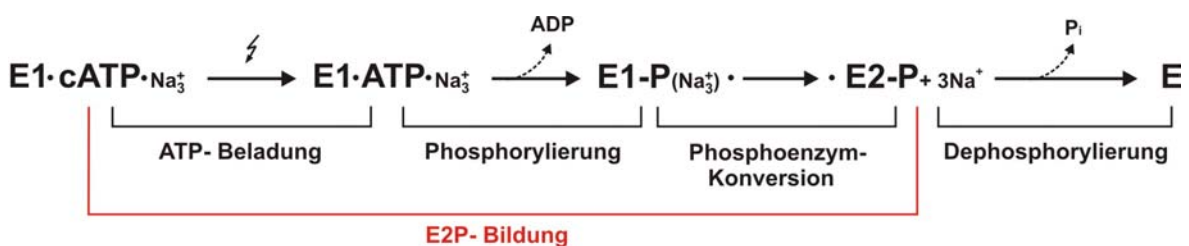


Abb. 3.6: Phosphorylierung in H_2O und D_2O , photolysekorrigiert. Schweinenierenenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH (pD) 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP, 1200 mM NaCl bei 5°C . Differenzspektren wurden 1,95 s nach ATP-Freisetzung aufgenommen. **(A)** Dünne Linie: E1P-Bildung in 2 mM EDTA und 3 mM freiem Mg^{2+} , dicke Linie: ATP-Beladung in 20 mM EDTA (H_2O). **(B)** Phosphorylierung in H_2O , ($\text{E1}\cdot\text{ATP}\cdot\text{Na}_3^+ \rightarrow \text{E1}\cdot\text{P}(\text{Na}_3^+)$), berechnet durch Subtraktion des Differenzspektrums der ATP-Beladung von dem Differenzspektrum der E1P-Bildung (vgl. Schema 3) **(C)** Phosphorylierung in D_2O , $\text{E1}\cdot\text{ATP}\cdot\text{Na}_3^+ \rightarrow \text{E1}\cdot\text{P}(\text{Na}_3^+)$. Die Berechnung erfolgte äquivalent zu **(B)** **(D)** Dünne Linie: E1P-Bildung in 2 mM EDTA und 3 mM freiem Mg^{2+} , dicke Linie: ATP-Beladung in 20 mM EDTA (D_2O).

3.1.5 Die Phosphorylierung der Na,K-ATPase in Gegenwart von 130 mM Na⁺: E2P-Bildung

Durch eine entsprechende Wahl der ionischen Zusammensetzung des Puffermediums kann in einem bestimmten zeitlichen Rahmen die bevorzugte Bildung spezieller Intermediate des Reaktionszyklus erreicht werden. Um eine Akkumulierung des E2P-Zustandes zu erreichen, wurde im Gegensatz zur E1P-Bildung eine niedrigere Na⁺-Konzentration, nämlich 130 mM gewählt (Nørby et al., 1983). Die somit ablaufende Reaktionsfolge ist in Schema 4 aufgezeichnet.



Schema 4: E2P-Bildung der Na,K-ATPase. cATP: caged ATP, $E1 \cdot ATP \cdot Na_3^+$: Enzym im Zustand E1 mit gebundenem ATP und 3 Na⁺, $E1-P(Na_3^+)$: Phosphorylierter Na⁺-okkludierter E1-Zustand der Na,K-ATPase, E2-P: Phosphorylierter E2-Zustand.

Auch hier werden zur detaillierten Untersuchung Messungen in H₂O und D₂O durchgeführt. Abb. 3.7 (D) zeigt ein Kontrolldifferenzspektrum, welches mit FITC-Enzym aufgenommen wurde. Durch die kovalente Verknüpfung des FITC mit Lys 501 ist die Na,K-ATPase nicht mehr in der Lage ATP zu binden (Karlsh, 1980). Dies führt zur Inhibition der ATPase-Aktivität. Deshalb wird die FITC-markierte ATPase für diesen Kontrollversuch genutzt. Im Bereich zwischen 1800 und 1300 cm⁻¹ sind keinerlei Signale detektierbar. Daraus folgt, daß keine Bindung des freien ATP und somit keine Phosphorylierung des FITC-Enzyms erfolgen kann. Somit können die mit dem unmodifizierten Enzym gemessenen Differenzspektren den postulierten biochemischen Prozessen zugeordnet werden.

Abb. 3.7 (A) und (C) zeigen Differenzspektren derselben Probe, aber aufgenommen zu verschiedenen Zeiten nach der ATP-Freisetzung. Während Differenzspektrum (A) in Abb. 3.7 1,95 s nach der ATP-Freisetzung aufgezeichnet wurde, entstand Differenzspektrum (C) in Abb. 3.7 nach 409,5 s. Das Verschwinden der Signale bedeutet, daß sich der Zustand vor der ATP-Freisetzung (also der Referenzzustand) und der Zustand zum Zeitpunkt $t = 409,5$ s nach der Freisetzung sehr ähnlich sein müssen. Dies ist plausibel, da nach 1,95 s

hauptsächlich die phosphorylierte Form des Enzyms und nach 409,5 s überwiegend wieder die dephosphorylierte Form, wie sie auch im Referenzzustand vorlag, dominiert.

Amid I/II

Im Amid I-Bereich sind in H_2O sowohl positive als auch negative Banden mit einer maximalen Amplitude von 1,5 mOD zu erkennen (Abb. 3.7 (A)). Bei dem Vergleich mit den in D_2O aufgenommenen Differenzspektren ist zu erkennen, daß sich sowohl das Bandenprofil als auch die Amplituden voneinander unterscheiden. Die größere Intensität der Signale in H_2O ist möglicherweise auf weniger Überlappung von positiven mit negativen Banden zurückzuführen. In H_2O sind bei 1686 und 1661 cm^{-1} positive Banden zu erkennen. Während das positive Signal bei 1686 cm^{-1} (D_2O : 1688 cm^{-1}) im Absorptionsbereich der Nebenbande von β -Faltblättern liegt, absorbiert das positive Signal bei 1661 cm^{-1} (D_2O : 1655 cm^{-1}) im spektralen Abschnitt von α -Helices bzw. Schleifen.

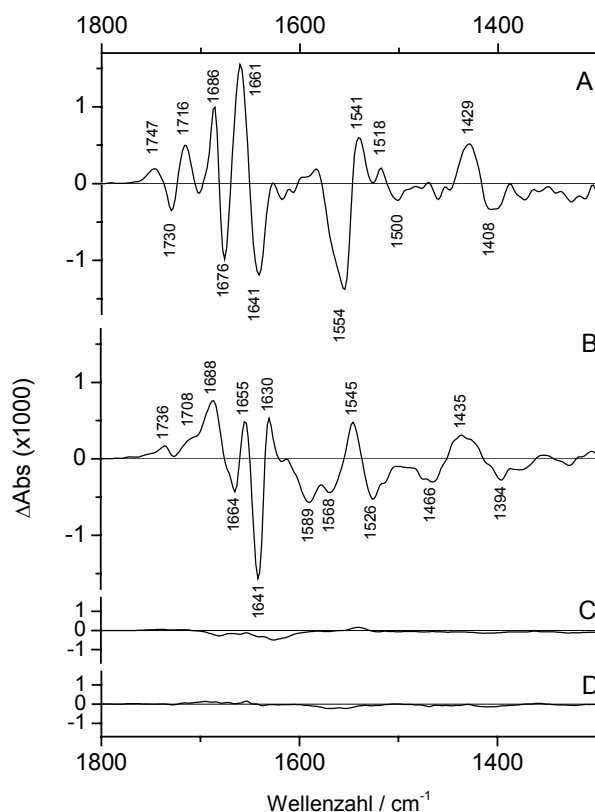


Abb. 3.7: E2P-Bildung in H_2O und D_2O , photolysekorrigiert. Schweineierenenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH (pD) 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP, 2 mM EDTA, 3 mM freies Mg^{2+} , 130 mM NaCl bei 15°C. (A) E2P-Bildung, 1,95 s nach ATP-Freisetzung (H_2O) (B) E2P-Bildung, 1,95 s nach ATP-Freisetzung (D_2O) (C) E2P-Bildung, 409,5 s nach ATP-Freisetzung (H_2O) (D) FITC-markierte ATPase, 1,95 s nach ATP-Freisetzung (H_2O).

Unter der Annahme, daß es sich bei dem positiven Signal bei 1686 cm^{-1} um die Absorption durch ein β -Faltblatt handelt, müßte im Bereich um 1633 cm^{-1} die Hauptbande dieses

Strukturelementes zu detektieren sein. Da in der unmittelbaren Nähe zu dieser Wellenzahl keinerlei positive Banden zu erkennen sind, werden zwei Möglichkeiten favorisiert. Erstens, die positive Hauptbande dieses Strukturelements wird überlagert durch eine negative Bande in diesem Spektralbereich oder zweitens, die positive Bande bei 1688 cm^{-1} ist keinem β -Faltblatt zuzuordnen. Für die erste Hypothese spricht die Tatsache, daß in D_2O ein positives Signal bei 1630 cm^{-1} auftritt. Die starke spektrale Verschiebung der negativen Bande bei 1676 cm^{-1} (D_2O : 1664 cm^{-1}) deutet auf die Beteiligung von individuellen AS-Seitenketten an diesem Signal hin. In H_2O

wird bei 1541 cm^{-1} (D_2O : 1545 cm^{-1}) ein positives Signal registriert. Hierbei handelt es sich nicht um eine Amid II-Schwingung. Wäre dies der Fall, müßte in D_2O diese Absorption verschwinden und das sogenannte Amid II'-Signal bei etwa 1450 cm^{-1} zu sehen sein, was nicht der Fall ist. Das positive Signal bei 1435 cm^{-1} stellt ein nicht neu auftretendes, sondern im Vergleich zu den in H_2O aufgenommenen Differenzspektren ein um 6 cm^{-1} nach oben verschobenes Signal dar, welches im spektralen Bereich von $\nu_s(\text{COO}^-)$ liegt.

Abschließend ist festzuhalten, daß bei der E2P-Bildung ebenfalls nur ein sehr kleiner Teil der Aminosäuren der Na,K-ATPase an Sekundärstrukturänderungen beteiligt ist (0,2 %). Die Sekundärstrukturanteile des Enzyms bleiben also auch hier nahezu unverändert.

Individuelle AS-Seitenketten

Oberhalb von 1700 cm^{-1} sind in H_2O drei Signale detektiert worden: 1747 cm^{-1} (D_2O : 1736 cm^{-1}), 1730 cm^{-1} und 1716 cm^{-1} (D_2O : 1708 cm^{-1}). Zu der negativen Bande bei 1730 cm^{-1} gibt es bei den in D_2O aufgenommenen Differenzspektren keine entsprechenden Signale. Alle beschriebenen Signale befinden sich im spektralen Bereich der $\nu(\text{C}=\text{O})$ der Seitenkettenreste Asp und Glu. Der Vergleich der beobachteten mit den berechneten Amplituden der $\nu(\text{C}=\text{O})$ für die Beteiligung eines Asp oder Glu bei der Protonierung bzw. Phosphorylierung ergibt folgendes Bild: Das Signal bei 1747 cm^{-1} kann durch die Beteiligung eines,

E2P-Bildung		
H_2O	D_2O	Potentielle Zuordnung
1747 (+)	1736 (+)	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1730 (-)	-	
1716 (+)	1708 (+)	AI
1686 (+)	1688 (+)	
1676 (-)	1664 (-)	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$
1661 (+)	1655 (+)	
1641 (-)	1641 (-)	AI
-	1630 (+)	
-	1589 (-)	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1554 (-)	1568 (+)	
1541 (+)	1545 (+)	?
1518 (+)	1526 (-)	
1500 (-)	-	$\nu_s(\text{COO}^-)$
1429 (+)	1435 (+)	
1408 (-)	1394 (-)	

Tab. 3.6: Zuordnung von IR-Differenzsignalen bei der E2P-Bildung.

das Signal bei 1730 cm^{-1} durch die Beteiligung von zwei und das Signal bei 1716 cm^{-1} durch die Beteiligung von drei Seitenkettenresten Asp oder Glu entstanden sein (Absorptionskoeffizienten aus Barth, 2000 für $d = 5\text{ }\mu\text{m}$, $c_{\text{Enzym}} = 1\text{ mM}$). Diese Abschätzungen erfolgen unter der Grundvoraussetzung, daß an der Entstehung der Signale keine Überlagerungen von positiven und negativen Banden beteiligt sind. Eines der beiden positiven Signale wird der $\nu(\text{C=O})$ des phosphorylierten Seitenkette Asp 369 zugeordnet. Unter Berücksichtigung der rechnerisch abgeschätzten Amplituden kommt für die Phosphorylierung bei 1716 cm^{-1} allerdings nicht die gesamte Amplitude in Betracht, sondern nur etwa $1/3$. Das heißt, es ist wahrscheinlich, daß während der E2P-Bildung ebenfalls Protonierung und/oder Deprotonierung bzw. Umgebungsänderungen an einer C=O-Funktion eines Asp- und/oder Glu-Seitenkettenrestes stattfinden. Zusätzlich bestätigt wird diese Hypothese durch das negative Signal bei 1554 cm^{-1} (D_2O : 1589 und 1568 cm^{-1}) und das positive Signal bei 1541 cm^{-1} (D_2O : 1545 cm^{-1}). Diese beiden Signale liegen im Absorptionsbereich von $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$. Wie schon bei der Beschreibung des Amid I/II-Bereichs ausgeführt, repräsentiert die positive Bande bei 1541 cm^{-1} im überwiegenden Maße eine $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und keine Amid II-Schwingung. Die Lage des positiven und negativen Signals bei 1429 bzw. 1408 cm^{-1} (D_2O : 1435 bzw. 1394 cm^{-1}) ist typisch für den Absorptionsbereich von $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$. Das Verschwinden dieses Signals in Kombination mit dem Erscheinen der $\nu(\text{C=O})$ kann sowohl mit der Phosphorylierung als auch mit der Protonierung der Seitenkettenreste Asp oder Glu korreliert werden.

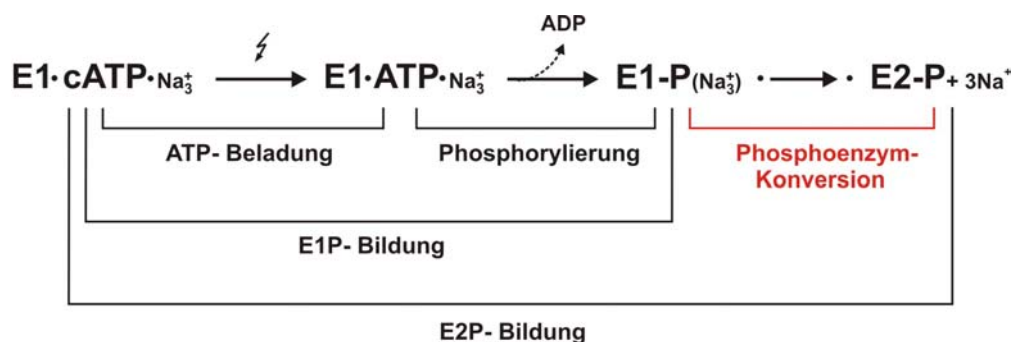
Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Phosphorylierung des Asp 369 oberhalb von 1700 cm^{-1} detektiert werden kann. Aufgrund weiterer positiver und negativer Signale in diesem Bereich gibt es Hinweise, daß es neben der Phosphorylierung zu weiteren Protonierung und Deprotonierung bzw. starken Umgebungsveränderungen in der direkten Nachbarschaft zu einer oder mehrerer Carboxylseitengruppen des Enzyms kommt. Eine weitergehende Diskussion dieser Ergebnisse sowie ein Vergleich zwischen E1P- und E2P-Bildung erfolgt in Kapitel 4.1.2.

Wie schon bei der Beschreibung des Amid I-Bereichs erwähnt, ist die starke Isotopenverschiebung der negativen Bande bei 1676 cm^{-1} (D_2O : 1664 cm^{-1}) ein Hinweis auf die Beteiligung von individuellen Seitenketten an der Entstehung dieses Signals. Dieses negative Signal liegt im spektralen Bereich der $\nu(\text{C=O})$ von Asn und Gln bzw. $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$ von Arg. Somit gibt es Hinweise, die auf eine Beteiligung der Seitenkettenreste von Asn/Gln und Arg bei der E2P-Bildung schließen lassen.

Bei den in H_2O aufgenommenen Differenzspektren wird bei 1518 cm^{-1} ein positives und bei 1500 cm^{-1} ein negatives Signal beobachtet. Beide liegen im Absorptionsbereich der $\nu(\text{C}=\text{C})$ eines aromatischen Ringes und würden somit auf die Beteiligung eines Tyr hindeuten (Venyaminov and Kalnin, 1990, Chirgadze et al., 1975). Aufgrund des Fehlens eines Signals in D_2O in dieser Region gibt es jedoch keine weitergehenden Evidenzen für diese These.

3.1.6 Phosphoenzym-Konversion

Mit Hilfe der Differenzspektren der E1- und der E2-Bildung kann formal das Differenzspektrum der Phosphoenzym-Konversion berechnet werden. Anhand von Schema 5 werden die Teilreaktionen, die während der E1- und der E2P-Bildung ablaufen dargestellt. Die Berechnung des Differenzspektrums der Phosphoenzym-Konversion geschieht durch Subtraktion des Differenzspektrums der E1-Bildung von dem Differenzspektrum der E2P-Bildung.



Schema 5: Phosphoenzym-Konversion der Na,K-ATPase. cATP: caged ATP, $\text{E1-P}(\text{Na}_3^+)$: Phosphorylierter und Na^+ -okkludierter E1-Zustand, E2-P: Phosphorylierter E2-Zustand.

Das resultierende Differenzspektrum stellt die Phosphoenzym-Konversion dar ($\text{E1-P}(\text{Na}_3^+) \rightarrow \text{E2-P} + 3\text{Na}^+$). Es enthält sowohl den postulierten Konformationsübergang von E1 nach E2 als auch die Na^+ -Freisetzung aus der Membranregion (Deokklusion). Wie anhand von Abb. 3.8 zu erkennen ist, sind sich die Differenzspektren der Phosphoenzym-Konversion und der E2P-Bildung sehr ähnlich. Die Unterschiede liegen hauptsächlich in den Signalamplituden. Das heißt, daß das Differenzspektrum der E2P-Bildung durch die Phosphoenzym-Konversion und nicht durch die Phosphorylierung dominiert wird. Eine weitergehende Diskussion dieses Sachverhalts folgt in Kapitel 4.1.2. In der Beschreibung des Diffe-

renzspektrums der Phosphoenzym-Konversion werden hauptsächlich die Unterschiede zum Differenzspektrum der E2P-Bildung herausgearbeitet.

Amid I/II

Die Unterschiede im Amid I-Bereich sind sehr gering. Um den spektralen Bereich bei 1628 cm^{-1} sind Differenzen in der Amplitude festzustellen, welche aber zu keinem Vorzeichenwechsel des Signals führen. Da in diesem Spektralbereich sowohl unterschiedliche AS-Seitenkettenreste als auch β -Faltblatt-Strukturelemente absorbieren, kann hier keine qualitative Aussage gemacht werden. In Bezug auf den Amid II-Bereich sind Unterschiede zwischen 1518 und 1500 cm^{-1} zu sehen. Sowohl bei der E1P- als auch bei der E2P-Bildung wurden Änderungen in diesem Bereich nicht auf Amid II-Moden zurückgeführt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß zwischen E2P-Bildung und Phosphoenzym-Konversion nur vernachlässigenswert kleine Unterschiede in der Größe der Sekundärstrukturänderung existieren. In beiden Fällen sind diese als sehr klein einzustufen (0,2 % der Aminosäuren der Na,K-ATPase).

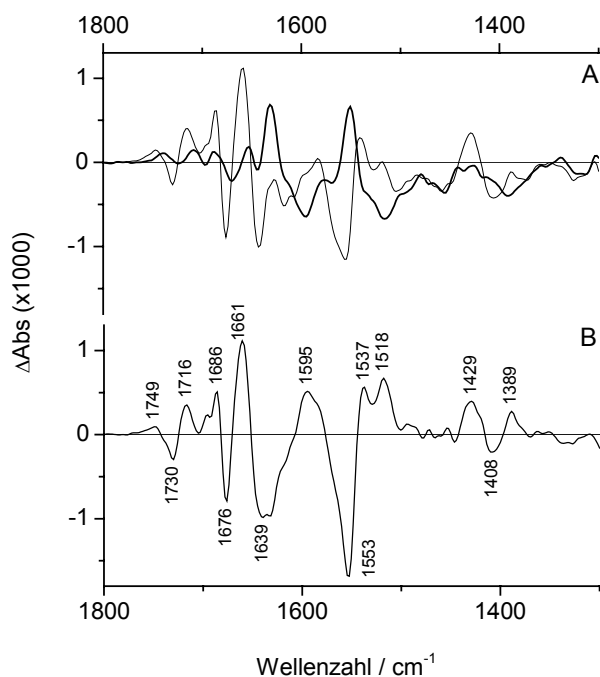


Abb. 3.8: Phosphoenzym-Konversion in H_2O , photolysekorrigiert. Schweinenierenenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP, 2 mM EDTA, 3 mM freies Mg^{2+} bei 5°C . Differenzspektren wurden 1,95 s nach ATP-Freisetzung aufgenommen. **(A)** Dünne Linie: E2P-Bildung in 130 mM Na^+ , dicke Linie: E1P-Bildung in 1200 mM Na^+ **(B)** Phosphoenzym-Konversion ($\text{E1-P} (\text{Na}_3^+) \rightarrow \text{E2-P} + 3\text{Na}^+$), berechnet durch Subtraktion des Differenzspektrums der E1P-Bildung von dem Differenzspektrum der E2P-Bildung.

Individuelle AS-Seitenketten

Oberhalb von 1700 ($\nu(\text{C}=\text{O})$ Asp, Glu), zwischen 1600 und 1550 (potentiell $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ Asp, Glu) sowie im Bereich um 1400 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ Asp, Glu) gibt es sowohl kleine Unterschiede in der Signallage als auch in der Signalamplitude.

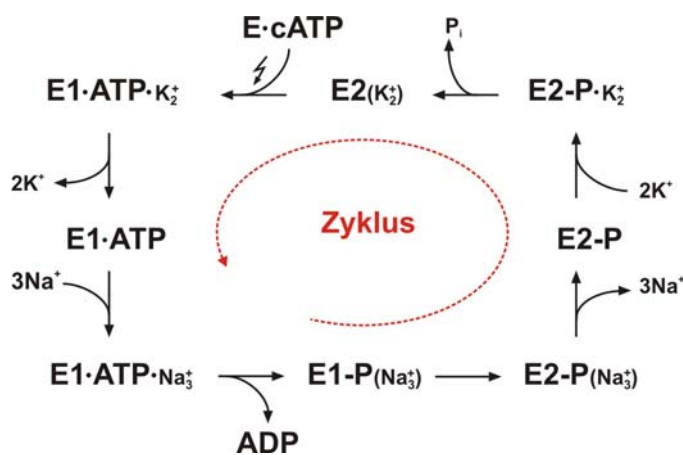
Aufgrund der Differenzbildung (E2P-Bildung - E1P-Bildung) enthält das Differenzspektrum der Phosphoenzym-Konversion keinerlei Anteile der Phosphorylierung des Seitenkettenrestes Asp 369. Somit enthält das Differenzspektrum der Phosphoenzym-Konversion oberhalb von 1700 cm^{-1} nur Signale, die mit der Protonierung/Deprotonierung bzw. Umgebungsänderungen in unmittelbarer Nähe der Seitenkettencarboxylgruppen von Asp und/oder Glu verknüpft sind. In Bezug auf die Unterschiede der Amplituden ist der Bereich zwischen 1600 und 1550 cm^{-1} am stärksten betroffen, wobei das positive Signal bei 1595 cm^{-1} bei der E2P-Bildung nicht auftritt (Abb. 3.8 (A)). Dieses Signal bei 1595 cm^{-1} liegt ebenfalls im Bereich von $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ (Asp, Glu) und könnte auf eine Deprotonierung eines Carboxylrestes hindeuten. In Zusammenhang mit der negativen Bande bei 1553 cm^{-1} könnte dieses Signalprofil allerdings auch als starke Umgebungsänderung in der unmittelbaren Nähe einer oder mehrerer deprotonierter Carboxylgruppen der Seitenkettenreste Asp und/oder Glu gewertet werden. Eine solche Umgebungsänderung ist z. B. die Deokklusion von Na^+ . Untermuert wird diese Hypothese durch das Auftreten einer positiven Bande bei 1389 cm^{-1} , welche eine mögliche $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ der Seitenkettencarboxylgruppe Glu oder Asp darstellt. Auch diese positive Bande stellt in Verbindung mit dem negativen Signal bei 1408 cm^{-1} einen Hinweis auf eine starke Umgebungsänderung in direkter Nachbarschaft der Carboxylgruppen der Seitenketten Asp und/oder Glu dar. Weitergehende Aspekte in Bezug auf die Na^+ -Deokklusion werden in Zusammenhang mit dem Vergleich zwischen Ca-ATPase und Na,K-ATPase in Kapitel 4.2.3 diskutiert.

E2P-Bildung / Phosphoenzym-Konversion		
E2P	Konversion	Potentielle Zuordnung
1747 (+)	1749 (+)	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1730 (-)	1730 (-)	
1716 (+)	1716 (+)	AI
1686 (-)	1686 (-)	
1676 (-)	1676 (-)	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$
1661 (+)	1661 (+)	AI
1641 (-)	1639 (-)	
-	1595 (+)	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1554 (-)	1553 (-)	
1541 (+)	1538 (+)	?
-	1518 (+)	
1429 (+)	1429 (+)	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
1408 (-)	1408 (-)	
-	1389 (+)	

Tab. 3.7: Zuordnung von IR-Differenzsignalen bei der E2P-Bildung und Phosphoenzym-Konversion.

3.1.7 Na,K-ATPase katalysierte ATP-Hydrolyse

Durch Modifikationen des kationischen Mediums ist eine Steuerung des Reaktionsablaufs innerhalb des Reaktionszyklus der Na,K-ATPase möglich. In Anwesenheit von K^+ , Mg^{2+} und Na^+ läuft der gesamte Reaktionszyklus des Enzyms ab (Schema 6). Dabei entsprechen die angegebenen Kationenkonzentrationen denen des Standardenzymtests zur Bestimmung der spezifischen ATP-Hydrolyseaktivität. Die ATP-Hydrolyse kann anhand der Phosphatgruppenschwingungen zwischen 1300 und 1000 cm^{-1} detektiert werden. Somit besteht die Möglichkeit, die Enzym katalysierte ATP-Hydrolyse direkt in dem Proteinfilm zu detektieren.



Schema 6: Reaktionszyklus der Na,K-ATPase. cATP: caged ATP, E: Enzym, E1-P(Na_3^+): Phosphorylierter und Na^+ -okkludierter E1-Zustand, E2(K_2^+): K^+ -okkludierter E2-Zustand.

In Abb. 3.9 werden zwei Differenzspektren gezeigt, die während zwei verschiedenen Zeitintervallen nach der ATP-Freisetzung aufgenommen worden sind. Des Weiteren wird ein Kontrollexperiment mit Vanadat, das die ATPase-Aktivität inhibiert und die ATP-Bindung (Beaugé, 1988) an die Pumpe unterbindet, vorgestellt. Dieses Differenzspektrum zeigt keinerlei Signale über den gesamten Spektralbereich. Das heißt, unter diesen Bedingungen findet weder ATP-Beladung, Phosphorylierung, Protonierung, Sekundärstrukturänderungen noch ATP-Hydrolyse statt.

Amid I/II

Zur Signalcharakterisierung wird das auf den Zeitpunkt $1,95\text{ s}$ gemittelte, nach der ATP-Freisetzung aufgenommene Differenzspektrum herangezogen. Im Amid I-Bereich sind in H_2O sowohl positive als auch negative Banden mit einer maximalen Amplitude von $0,7\text{ mOD}$ zu erkennen (Abb. 3.9 (A)). Der Vergleich zwischen den in H_2O und D_2O aufge-

nommenen Differenzspektren zeigt eine große Diskrepanz bezüglich des detektierten Bandenprofils. Dies kann ein Hinweis auf Überlagerungen von Signalen von Sekundärstrukturelementen mit individuellen Aminosäuren sein. In H_2O sind bei 1686 und 1661 cm^{-1} positive Banden zu erkennen. Während das positive Signal bei 1686 cm^{-1} (D_2O : 1688 cm^{-1}) im Absorptionsbereich der Nebenbande von β -Faltblättern liegt, absorbiert das positive Signal bei 1661 cm^{-1} in der spektralen Region von α -Helices bzw. ungeordneten Strukturelementen (z. B. Schleifen). Unter der Annahme, daß es sich bei dem positiven Signal bei 1686 cm^{-1} um die Absorption eines β -Faltblatts handelt, müßte im Bereich um 1633 cm^{-1} die Hauptbande dieses Strukturelementes zu detektieren sein. Da in der unmittelbaren Nähe zu 1633 cm^{-1} keinerlei positive Banden zu erkennen sind, werden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen. Erstens, die positive Hauptbande dieses Strukturelements wird überlagert durch eine negative Bande in diesem Spektralbereich oder zweitens, die positive Bande bei 1688 cm^{-1} ist kein Signal, welches durch ein β -Faltblatt verursacht wird.

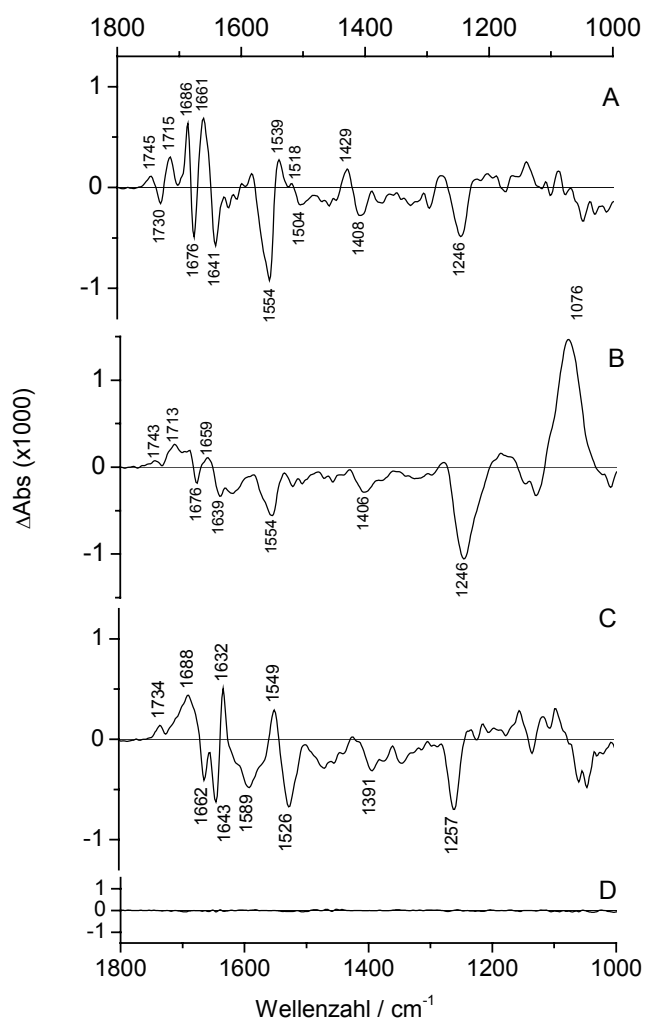


Abb. 3.9: Na,K-ATPase katalysierte ATP-Hydrolyse in H_2O und D_2O , photolysekorrigiert. Schweineierenenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH (pD) $7,5$, 20% (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP, 2 mM EDTA, 3 mM freies Mg^{2+} , 130 mM NaCl und 15 mM K^+ bei 5°C . (A) ATP-Hydrolyse, $1,95 \text{ s}$ nach ATP-Freisetzung (H_2O) (B) ATP-Hydrolyse, $321,8 \text{ s}$ nach ATP-Freisetzung (H_2O) (C) ATP-Hydrolyse, $1,95 \text{ s}$ nach ATP-Freisetzung (D_2O) (D) ATP-Hydrolyse-Kontrolle, enthält zusätzlich 4 mM Vanadat, $16,3 \text{ s}$ nach ATP-Freisetzung (H_2O).

Favorisiert wird hier die erste Möglichkeit. Der Grund hierfür liegt im Auftreten des positiven Signals bei 1632 cm^{-1} in D_2O , welches in dem für β -Faltblattstrukturen charakteristischen spektralen Bereich liegt. Die starke Verschiebung der negativen Bande bei 1676 cm^{-1} (D_2O : 1662 cm^{-1}) deutet auf die Beteiligung von individuellen Seitenkettenresten an diesem Signal hin. Dieses negative Signal liegt im Bereich von $\nu(\text{C}=\text{O})$ Asn/Gln bzw. $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$ Arg. In H_2O wird bei 1541 cm^{-1} (D_2O : 1549 cm^{-1}) ein positives Signal registriert. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich nicht um eine Amid II-Mode. Wäre dies der Fall, müßte in D_2O dieses Signal verschwinden und das sogenannte AII'-Signal bei etwa 1450 cm^{-1} zu sehen sein, was nicht der Fall ist. Zusammenfassend ist festzuhalten, daß unter den Bedingungen zum Ablauf der enzymatisch katalysierte ATP-Hydrolyse ebenfalls ein nur sehr kleiner Teil der Aminosäuren der Na,K-ATPase an Sekundärstrukturänderungen beteiligt ist (0,1 %). Die Sekundärstrukturanteile des Enzyms bleiben also auch hier nahezu unverändert.

Individuelle AS-Seitenketten

Im Absorptionsbereich möglicher $\nu(\text{C}=\text{O})$ der Seitenkettenreste Asp und Glu oberhalb von 1700 cm^{-1} sind bei den in H_2O aufgenommenen Differenzspektren drei Signale detektiert worden: 1744 cm^{-1} (D_2O : 1734 cm^{-1}), 1730 cm^{-1} und 1716 cm^{-1} (D_2O : 1708 cm^{-1}). Zu der negativen Bande bei 1730 cm^{-1} gibt es in D_2O kein entsprechendes Signal.

Auch hier zeigt eine Abschätzung der beteiligten Seitenkettenreste an der Amplitude dieser Signale ähnliche Werte wie bei der E2P-Bildung. Eines von beiden positiven Signalen oberhalb von 1700 cm^{-1} wird dem phosphorylierten Seitenkettenrest Asp 369 zugeordnet. Bestätigt wird diese Hypothese ebenfalls durch das Auftreten des breiten negativen Signals bei 1554 cm^{-1} (D_2O : 1589) und des positiven Signals bei 1539 cm^{-1} (D_2O : 1549 cm^{-1}). Diese beiden Signale liegen im Absorptionsbereich von $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$. Wie schon bei der Beschreibung des Amid I/II-Bereichs ausgeführt, zeigt die positive Bande bei 1539 cm^{-1} im

Na,K-ATPase katalysierte ATP-Hydrolyse		
H_2O	D_2O	Potentielle Zuordnung
1745 (+)	1734 (+)	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1730 (-)	-	
1715 (+)	~ 1700 (+)	
1686 (+)	1688 (+)	AI
1676 (-)	1662 (-)	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$
1661 (+)	-	AI
1641 (-)	1643 (-)	
-	1632 (+)	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1554 (-)	1589 (-)	
1539 (+)	1549 (+)	?
1504 (-)	1526 (-)	
1429 (+)	-	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
1408 (-)	1391 (-)	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$
1246 (-)	1257 (-)	
1076 (+)	-	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_3^{2-})$

Tab. 3.8: Zuordnung von IR-Differenzsignalen bei der Na,K-ATPase katalysierten ATP-Hydrolyse.

überwiegenden Maße eine $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und keine AII-Schwingung. Die Lage des positiven und negativen Signals bei 1429 bzw. 1408 cm^{-1} (D_2O : 1406 cm^{-1}) ist typisch für den Absorptionsbereich von $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$. Das Verschwinden dieser Schwingung in Kombination mit dem Erscheinen der $\nu(\text{C}=\text{O})$ kann sowohl mit der Phosphorylierung als auch mit der Protonierung der Seitenkettenreste Asp und/oder Glu korreliert werden. Wie schon bei der Beschreibung des Amid I-Bereichs erwähnt, kann die starke Verschiebung der negativen Bande bei 1676 cm^{-1} (D_2O : 1662 cm^{-1}) ein Hinweis auf die Beteiligung von individuellen Seitenketten an diesem Signal sein. Dieses negative Signal liegt im spektralen Bereich der $\nu(\text{C}=\text{O})$ von Asn und Gln bzw. $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$ von Arg. Somit gibt es Hinweise, die auf eine Beteiligung der Seitenkettenreste von Asn/Gln und Arg bei der Na,K-ATPase katalysierten ATP-Hydrolyse schließen lassen.

Bei den in H_2O aufgenommenen Differenzspektren wird bei 1518 ein positives und bei 1500 cm^{-1} ein negatives Signal beobachtet. Beide liegen im Absorptionsbereich der $\nu(\text{C}=\text{C})$ eines aromatischen Ringes und würden somit auf die Beteiligung eines Tyr hindeuten (Venyaminov and Kalnin, 1990, Chirgadze et al., 1975). Aufgrund des Fehlens eines Signals in D_2O in dieser Region gibt es jedoch keine weitergehenden Evidenzen für diese These.

Zusammenfassend wird festgehalten, daß es bezüglich des Bandenprofils eine große Übereinstimmung zwischen den Differenzspektren der E2P-Bildung und den Differenzspektren unter Zyklusbedingungen gibt. Eine weitergehende Diskussion dieses Aspekts findet in Kapitel 4.1.2 statt.

Phosphatgerüst

Änderungen im Phosphatgerüst von ATP können anhand des Spektralbereichs unterhalb von 1300 cm^{-1} detektiert werden. Der Verbrauch an ATP und die Bildung von freiem Phosphat wird in Abb. 3.9 (B) dokumentiert. Dabei stellt das negative Signal bei 1246 cm^{-1} den Verbrauch von ATP dar ($\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$), während das positive Signal bei 1076 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{PO}_3^{2-})$) die Bildung von freiem Phosphat signalisiert. Eine quantitative Bestimmung der spezifischen ATPase-Aktivität findet in Kapitel 3.1.8 statt.

3.1.8 IR-spektroskopische Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Na,K-ATPase

Anhand der Phosphatschwingungen kann, wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben, der Verbrauch an ATP bzw. die Bildung von freiem Phosphat bestimmt werden. Da die Aktivität der

Na,K-ATPase mit der Hydrolyse von ATP gekoppelt ist, wird durch die zeitliche Detektion der Phosphatschwingungen eine Bestimmung der enzymatischen Aktivität direkt in der IR-Probe ermöglicht. Grundsätzlich kommen zur Analyse der ATP-Hydrolyse zwei unterschiedliche Phosphatschwingungen in Betracht (vgl. Abb. 3.9 (B)). Aufgrund der größeren zeitlichen Stabilität der Bande bei 1246 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$) in Bezug auf eine konstante Wellenzahl wird diese Schwingung, welche den Verbrauch von ATP anzeigt, zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität herangezogen. Die Endkonzentration an freigesetztem ATP in der Probe betrug nach einem Laserblitz $2,8\text{ mM}$ bei 5°C . Dies entspricht einem Anteil von freigesetztem ATP aus caged ATP von 56% . Bestimmt wurde dieser Wert anhand der $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ von caged ATP bei 1526 cm^{-1} . Das Probenvolumen wurde als $1\text{ }\mu\text{l}$ angenommen und die Enzymkonzentration betrug 1 mM . Als Meßkriterium zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde die Fläche zwischen 1260 und 1224 cm^{-1} herangezogen. Die Grundlinie wurde zwischen 1296 und 1168 cm^{-1} gezogen (Integrationsmethode „C“ OPUS 4.0.24 der Firma Bruker Optik).

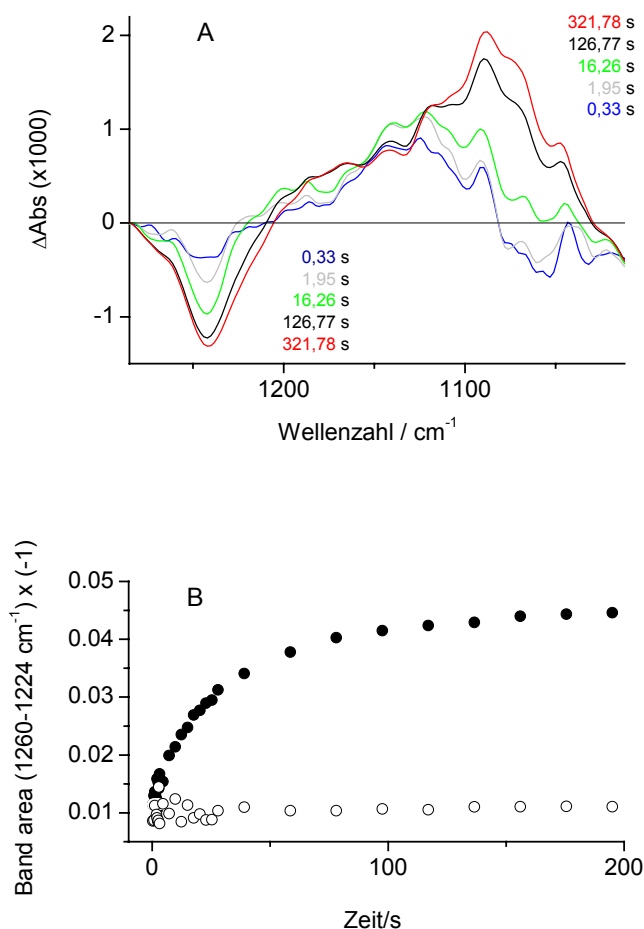


Abb. 3.10.: Bestimmung der enzymatischen ATPase-Aktivität der Na,K-ATPase in der IR-Probe (A) ATP-Hydrolyse in H_2O , nicht photolysekorrigiert. Schweineierenenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH $7,5$, 20% (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP, 2 mM EDTA, 3 mM freies Mg^{2+} , 130 mM NaCl und 20 mM K^+ bei 5°C . Fünf aufeinander folgende Differenzspektren zeigen den Fortschritt der Hydrolyse. Die Durchschnittszeiten der aufgenommenen Differenzspektren sind in der Abbildung vermerkt. (B) Kinetik der ATP-Hydrolyse unter Verwendung der $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ bei 1246 cm^{-1} . ● Aktivitätsmessung ○ Kontrollmessung nach ATP-Freisetzung aber in Gegenwart von 4 mM Vanadat im Reaktionsmedium.

Die quantitative Auswertung der spezifischen Aktivität erfolgte nach Thoenges und Barth (2002). Anhand des zeitlichen Verlaufs der nicht photolysekorrigenen Differenzspektren im Bereich der Phosphatschwingungen in Abb. 3.10 (A) wird ersichtlich, daß es in Anwesenheit der Na,K-ATPase zu einer Hydrolyse des freigesetzten ATP kommt. Um zu bestätigen, daß es sich dabei um eine durch die Na,K-ATPase katalysierte Reaktion handelt, wurde ein Kontrollversuch mit dem spezifischen Inhibitor Vanadat durchgeführt. Bei Anwesenheit dieses Inhibitors konnte keinerlei Hydrolyseaktivität detektiert werden (Abb. 3.9 (D) und 3.10 (B)). Dies führt zu dem Schluß, daß das Enzym in der IR-Probe (Proteinfilm) unter den verwendeten Bedingungen hydrolytisch aktiv ist. Unabhängig durchgeführte Untersuchungen, die die spezifische Aktivität der Na,K-ATPase nach der Proteinfilmpräparation mit resuspendiertem Enzym mittels eines Phosphattests charakterisieren (Thoenges et al., 2002), bestätigen die Aussage, daß das Enzym im Proteinfilm enzymatisch aktiv ist. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität ergibt bei dem vermessenen Schweineenzym bei 5°C einen Wert von 9 nmol P_i mg⁻¹ min⁻¹. Bei 15°C sind es 34 nmol P_i mg⁻¹ min⁻¹. Im Vergleich dazu beträgt die spezifische Aktivität, die in dem routinemäßig durchgeführten Phosphattest direkt nach der Präparation der Na,K-ATPase bei 37°C durchgeführt wurde, 34 µmol P_i mg⁻¹ min⁻¹. Vergleichsmessungen der spezifischen Aktivität unter Standardbedingungen bei 5° und 15°C in Annäherung an die Bedingungen im Proteinfilm, zeigten Hydrolysewerte in der gleichen Größenordnung (Abschnitt 3.3.2).

3.1.9 Die Zuordnung von Phosphatschwingungen: E1P- und E2P-Bildung mittels [γ -¹⁸O₃] caged ATP

Um die Phosphatschwingungen im Detail zu untersuchen, wurde isotopenmarkiertes NPE-caged ATP eingesetzt. Dieses war am γ -Phosphat, mit Ausnahme des verbrückenden Sauerstoffs, ¹⁸O markiert (Barth et al., 1995). Die Isotopenmarkierung führt zu einer Verschiebung der Phosphatschwingungen im Bereich zwischen 1300 und 1000 cm⁻¹ und leistet somit einen wichtigen Beitrag zur eindeutigen Bandenzuordnung in diesem Spektralbereich. In Abb. 3.11 (B) und (C) sind die Differenzspektren der E1P- und E2P-Bildung nach Freisetzung von ATP und [γ -¹⁸O₃] ATP gegenübergestellt. Aus Vergleichsgründen werden zunächst die Photolyse-Differenzspektren von caged ATP und [γ -¹⁸O₃] caged ATP charakterisiert (Abb. 3.11 (A)). Spektrale Unterschiede können im Bereich der Phosphatschwingungen unterhalb von 1300 cm⁻¹ detektiert werden. Nach der Freisetzung des nicht markierten ATP können die negativen Signale bei 1273 und 1236 cm⁻¹ einer $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2)^-$ und das positive Signal bei 1119 cm⁻¹ einer $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_3)^{2-}$ zugeordnet werden. Somit kann die positive

Bande bei 1119 cm^{-1} mit der Entstehung der freien $\gamma\text{-PO}_3^{2-}$ -Funktion im ATP korreliert werden. Die negativen Signale bei 1273 und 1236 cm^{-1} hingegen werden mit dem Verlust des gebundenen γ -Phosphats als auch mit der Modifikation des PO_2^- Schwingungssystems des α - und β -Phosphats im caged ATP in Verbindung gebracht (Kapitel 3.1.1.1).

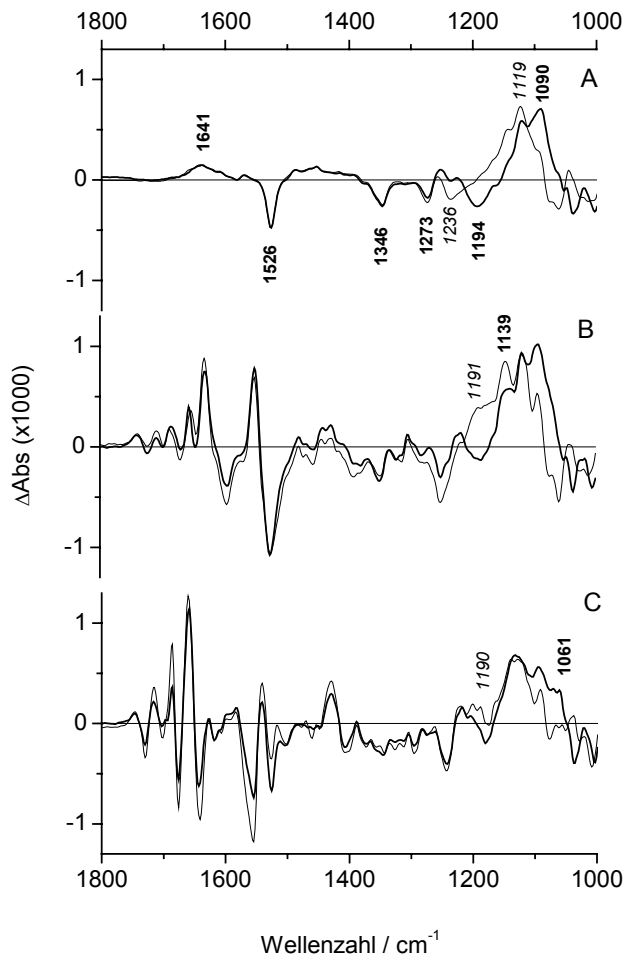


Abb. 3.11: Vergleich der Differenzspektren der E1P- und E2P-Bildung nach Freisetzung von ATP und $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]\text{ATP}$, nicht photolysekorrigiert. Schweineleberenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH $7,5$, 20% (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP oder $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ caged ATP, 2 mM EDTA, 3 mM freies Mg^{2+} bei 15°C in H_2O . Differenzspektren wurden $1,95\text{ s}$ nach ATP-Freisetzung aufgenommen. (A) Photolyse-Differenzspektren von ATP (ohne Enzym) mit 130 mM Na^+ . Dicke Linie: Probe enthält $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ caged ATP. Dünne Linie: Probe enthält nicht markiertes caged ATP (B) E1P-Bildung mit $1,2\text{ M}$ Na^+ . Dicke Linie: Probe enthält $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ caged ATP. Dünne Linie: Proben enthält caged ATP (C) E2P-Bildung mit 130 mM Na^+ . Dicke Linie: Probe enthält $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ caged ATP. Dünne Linie: Probe enthält caged ATP. *Dünn, kursive Wellenzahlenangaben* beziehen sich auf dünn gezeichnete Differenzspektren, während sich **dicke Wellenzahlenangaben** auf dick gezeichnete Differenzspektren beziehen.

Das heißt, aufgrund der Isotopenverschiebung des negativen Signals bei 1236 cm^{-1} (Abb. 3.11 (A)) kann das Signal bei 1194 cm^{-1} auf die $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ der gebundenen γ -Phosphatfunktion im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ caged ATP zurückgeführt werden. Wegen der Isotopenverschiebung des positiven Signals bei 1119 cm^{-1} kann das Signal bei 1090 cm^{-1} der $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_3^{2-})$ der freien $\gamma\text{-PO}_3^{2-}$ -Funktion im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ ATP zugeordnet werden. Zur Klärung weiterer Details, insbesondere der Signalfeinstruktur zwischen 1300 und 900 cm^{-1} , sei hier auf Barth et al. (1995) verwiesen. Bei der Analyse der Differenzspektren der E1P-Bildung nach Freisetzung von

ATP und $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ ATP (Abb. 3.11 **(B)**) fällt die exzellente spektrale Übereinstimmung der Signale und Amplituden im Bereich oberhalb von 1300 cm^{-1} auf. Unterschiede in den Amplituden der Signale sind hier möglicherweise auf Grundlinienschwankungen zurückzuführen.

Unterhalb von 1300 cm^{-1} hingegen sind deutliche Unterschiede im Bandenprofil zu erkennen. Da es im Spektralbereich zwischen 1300 und 1000 cm^{-1} ein Vielzahl von Beiträgen unterschiedlicher Phosphatschwingungen gibt, ist es schwierig eine genaue Zuordnung zu treffen. Vergleicht man jedoch das Photolyse-Differenzspektrum des caged ATP von markiertem und nicht markiertem caged ATP einerseits und die Differenzspektren der E1P-Bildung andererseits, so fällt der Focus auf zwei positive Signale: 1191 cm^{-1} bei der Freisetzung von ATP und 1139 cm^{-1} bei der Freisetzung von $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ ATP. Diese beiden Signale dürften von der gleichen Gruppe stammen, vermutlich die $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_3)^{2-}$ des Phosphoenzyms E1P.

Vergleicht man hingegen die Differenzspektren der E2P-Bildung nach Freisetzung von ATP und $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ ATP (Abb. 3.11 **(C)**), so können unterhalb von 1300 cm^{-1} deutlich geringere Abweichungen zwischen nicht markiertem und $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ ATP detektiert werden. Bei 1061 cm^{-1} tritt nach der Freisetzung von $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ ATP ein positives Signal auf, welches nach der Freisetzung von ATP nicht zu erkennen ist. Es kann jedoch kein entsprechendes eindeutiges Signal nach der Freisetzung von ATP detektiert werden, auf welches das Signal bei 1061 cm^{-1} nach $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ ATP-Freisetzung durch Isotopenverschiebung zurückgeführt werden könnte. Das sehr kleine positive Signal bei 1190 cm^{-1} nach ATP-Freisetzung könnte in Analogie zu dem Differenzspektrum der E1P-Bildung noch einen kleinen Anteil E1P-Phosphoenzym anzeigen. In Abb. 3.12 sind die photolysekorrigierten Differenzspektren der E1P- und E2P-Bildung nach Freisetzung von ATP und $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ ATP gegenübergestellt. Bei der E1P-Bildung bestätigt sich das durch die nicht korrigierten Differenzspektren gezeichnete Bild bezüglich der Signallage und Interpretation unterhalb von 1300 cm^{-1} . Bei den photolysekorrigierten Differenzspektren der E1P-Bildung wird nach ATP-Freisetzung ein positives Signal bei 1195 cm^{-1} (nicht korrigiert: 1191 cm^{-1}) und nach $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ ATP-Freisetzung bei 1151 cm^{-1} (nicht korrigiert: 1139 cm^{-1}) detektiert. Aufgrund der Photolysekorrektur kann es zu solchen Signalverschiebungen kommen. Bei den photolysekorrigierten Differenzspektren der E2P-Bildung hingegen kann aufgrund der Signallagen und Amplituden keine eindeutige Aussage bezüglich der Isotopenverschiebung gemacht werden. Möglicherweise haben sich durch die Photolysekorrektur hier Artefakte gebildet. Auch der

Vergleich zwischen photolysekorrigierten und nicht korrigierten Differenzspektren zeigt bezüglich der Signallagen kein eindeutiges Bild.

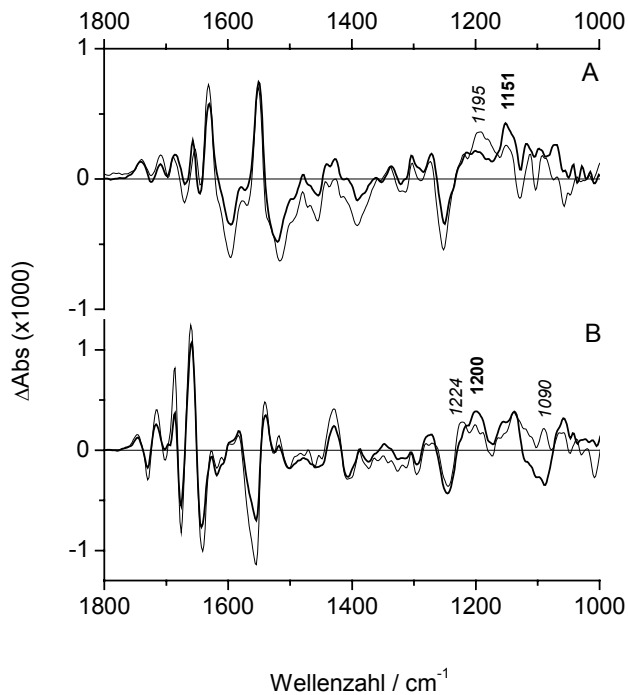
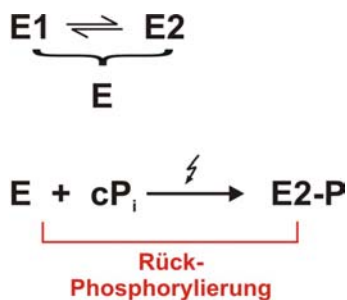


Abb. 3.12: Vergleich von Differenzspektren der E1P- und E2P-Bildung nach Freisetzung von ATP und $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ ATP, photolysekorrigiert. Schweineierenenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP oder $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ caged ATP, 2 mM EDTA, 3 mM freies Mg^{2+} bei 15°C in H_2O . Spektren wurden 1,95 s nach ATP-Freisetzung aufgenommen. (A) E1P-Bildung mit 1,2 M Na^+ . **Dicke Linie:** Probe enthält $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ caged ATP, dünne Linie: Probe enthält caged ATP (B) E2P-Bildung mit 130 mM Na^+ . Dicke Linie: Probe enthält $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_3]$ ATP, dünne Linie: Probe enthält caged ATP. *Dünn, kursive Wellenzahlenangaben* beziehen sich auf dünn gezeichnete Differenzspektren während sich **dicke Wellenzahlenangaben** auf dick gezeichnete Differenzspektren beziehen.

3.1.10 Rück-Phosphorylierung

Die Phosphorylierung der Na,K-ATPase durch P_i in der Anwesenheit von Mg^{2+} wird als sogenannte Rück-Phosphorylierung bezeichnet. Es wird davon ausgegangen, daß beide Phosphoenzyme dasselbe Acylphosphat bilden (Bonting et al., 1979). Trotz dieses Umstandes zeigen beide Phosphoenzyme ein unterschiedliches kinetisches Verhalten, speziell in Bezug auf die K^+ -sensitive Dephosphorylierung (Post et al., 1975). Des weiteren ist ein unterschiedliches Verhalten bezüglich des fluorimetrischen Nachweises der Phosphoenzyymbildung mittels RH421 detektiert worden (Fedosova et al., 1998). Es stellt sich somit die Frage nach der konformativen Kongruenz der phosphorylierten Zustände. Die E2P-Bildung mittels des hier verwendeten caged Phosphat (Kapitel 2.3.4) und dem RH421-Detektionssystem wurde bereits in der Literatur beschrieben (Apell et al., 1996). Durch eine entsprechende Wahl der kationischen Zusammensetzung des Probenmediums kann in

einem bestimmten zeitlichen Rahmen die bevorzugte Bildung spezieller Intermediate des Reaktionszyklus erreicht werden. Um eine Akkumulierung des E2P-Zustandes mittels Phosphorylierung durch Phosphat zu erreichen, wurde in Abwesenheit von Na^+ eine Mg^{2+} -Konzentration von 5 mM gewählt (Schuurmans Stekhoven et al., 1980). Somit ergibt sich die in Reaktionsschema 7 aufgeführte Reaktionsfolge (Apell et al., 1996). Dabei wird ein unbestimmtes Gleichgewicht zwischen E1 und E2 mit E bezeichnet.



Schema 7: Rück-Phosphorylierung, E: Enzym, cP_i : caged P_i , E2-P: Phosphoryliertes Enzym im Zustand E2.

Um die Richtigkeit der Phosphorylierungsbedingungen unter Verwendung des caged Phosphat zu überprüfen, wurden zwei Kontrollversuche durchgeführt. Zum einen war dies ein Versuch ohne Mg^{2+} und zum anderen mit Na^+ und Mg^{2+} im Puffermedium. In beiden Medien sollte es zu keiner Rück-Phosphorylierung kommen. Das Differenzspektrum, welches unter Phosphorylierungsbedingungen aufgenommen worden ist (Abb. 3.13 (A)), zeigt in den Bereichen zum Nachweis der Phosphorylierung von Asp/Glu ($> 1700 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1550 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$) und 1400 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$) deutliche Signale. Ähnlich deutliche Signale in der gleichen Region wurden aber auch bei einem der beiden Referenzversuche in Abb. 3.13 (C) beobachtet und in etwas abgeschwächter Form ebenfalls bei einem weiteren Referenzversuch (Abb. 3.13 (B)). Der Vergleich der Differenzspektren der Referenzversuche und der Phosphorylierungsversuche zeigt keine signifikanten Unterschiede und läßt deshalb den Schluß zu, daß es unter den gewählten Bedingungen zu keiner Rück-Phosphorylierung des Enzyms gekommen ist. Eine mögliche Erklärung dieses Umstandes wäre die, daß unter den hier gewählten Bedingungen bereits das caged Phosphat als Substrat zur Phosphorylierung der Na,K-ATPase dient (ähnlich dem para-Nitrophenylphosphat). Somit wäre das Enzym schon vor der Freisetzung des Phosphats phosphoryliert. Anhand von Abb. 3. 13 (A) - (C) ist jedoch auch ersichtlich, daß nach der Freisetzung von

Phosphat Differenzspektren aufgezeichnet werden können. Dies könnte mit der Existenz einer Phosphatbindungsstelle an der Na,K-ATPase in Verbindung gebracht werden.

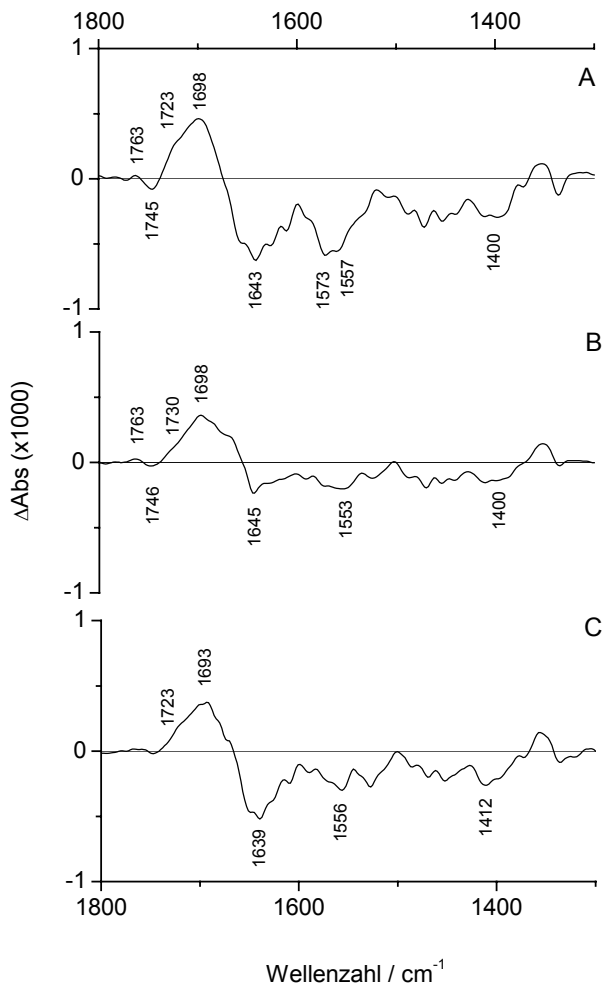
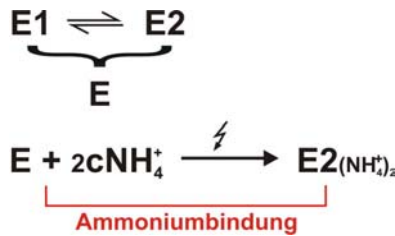


Abb. 3.13: Rück-Phosphorylierung in H₂O, photolysekorrigiert. Schweinehirnenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged P_i bei 5°C. Differenzspektren wurden 1,95 s nach P_i-Freisetzung aufgenommen. **(A)** 5 mM freies Mg²⁺ und 2 mM EDTA **(B)** Referenzversuch: 20 mM EDTA **(C)** 5 mM freies Mg²⁺, 130 mM Na⁺ und 2 mM EDTA.

3.1.11 Ammoniumbindung

Aufgrund der sehr ähnlichen Ionenradien und der gleichen Ladung der beiden Kationen K⁺ und NH₄⁺ (151 pm bzw. 148 pm, Hollemann-Wiberg, 1995) binden beide selektiv an die Na,K-ATPase (Grell et al., 1991). Die mittels FITC-Na,K-ATPase ermittelten Daten zeigen für K⁺ und NH₄⁺ eine Bindungsstöchiometrie von 2:1 an das Enzym. Das heißt, zur Charakterisierung der K⁺-Bindung an die Na,K-ATPase können Vergleichversuche, die die NH₄⁺-Bindung an das Enzym beschreiben, herangezogen werden. Zudem ist der syntheti-

sche Zugang zu den geschützten Ammoniumverbindungen leichter als zu den geschützten K^+ -Verbindungen.



Schema 8: Ammoniumbindung, E: Enzym, cNH_4^+ : caged Ammonium, $\text{E2}(\text{NH}_4^+)_2$: Ammonium-okkludiertes Enzym im Zustand E2.

Während die geschützten Ammoniumverbindungen in einem einzigen Reaktionsschritt mit anschließender Reinigung hergestellt werden können (Oelschläger et al., 1986), sind zur Synthese der geschützten K^+ -Verbindungen (Cryptanden) mehrere Arbeitsschritte notwendig. Des weiteren werden die Ammoniumverbindungen mit der gleichen Schutzgruppe geschützt wie das ATP (Strukturformeln in Kapitel 2.3.4).

Um einen möglichen Effekt des NH_4^+ nach der Freisetzung auf die Na,K-ATPase IR-spektroskopisch beobachten zu können, wird in Abwesenheit oder bei sehr kleinen Konzentrationen an Na^+ gearbeitet. Unter diesen Bedingungen ist die Affinität von NH_4^+ an die Na,K-ATPase am höchsten (Grell et al., 1994b). Abb. 3.14 (A) und (B) zeigen Differenzspektren, die unter solchen Bedingungen aufgenommen worden sind. Als Referenzversuch wurde eine Versuchsführung in einem Puffermedium mit hoher Na^+ -Konzentration gewählt (Abb. 3.14 (C)). Wie aus Abb. 3.14 (A) und (B) hervorgeht, können nach der Freisetzung von NH_4^+ weder in den für die Sekundärstruktur relevanten Amid I/II- noch in den für Protonierungs- und Phosphorylierungsreaktionen charakteristischen Bereichen Signale detektiert werden. Wenn man davon ausgeht, daß es nach der Ammoniumfreisetzung zu einer Okklusion des Ammoniums kommt (Schema 8), würde es innerhalb der Membranregion der Na,K-ATPase zu einer Kationenkoordination durch Aminosäuren kommen. Falls an dieser Kationenkoordination Asp, Glu, Asn oder Gln beteiligt sein sollten, müßte man dies im Differenzspektrum der Ammoniumbindung detektieren können. Da dies aufgrund der aufgenommenen Differenzspektren (3.14 (A) und (B)) nicht der Fall ist, kann eine Beteiligung der besagten Aminosäuren unter den hier gewählten Bedingungen ausgeschlossen werden. Dies steht allerdings in Widerspruch zu den in der Literatur aufgezeigten Model-

len. Laut Homologiemodellen der Kationenbindungsstellen der Na,K-ATPase, die auf den Kristallstrukturen der Ca-ATPase beruhen (Ogawa und Toyoshima, 2002, Jørgensen et al., 2003a) sind die Na⁺-Bindungsstellen I und II identisch mit den beiden K⁺-Bindungsstellen.

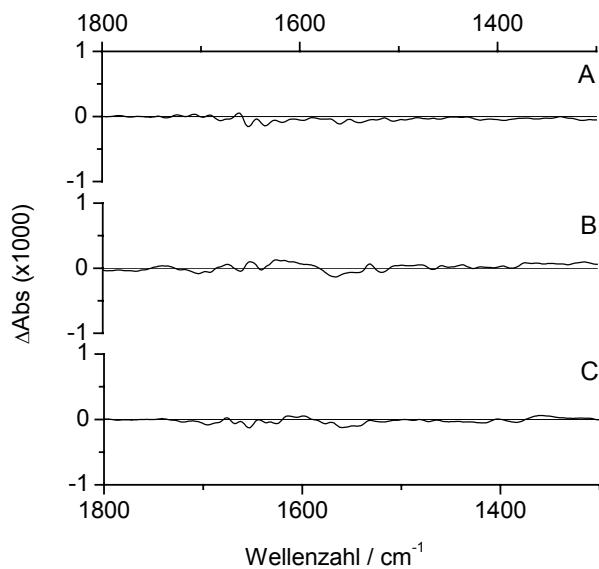


Abb. 3.14: Ammoniumbindung an die Na,K-ATPase (H₂O), photolysekorrigiert. Probe enthält Schweinenierenenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 mM caged NH₄⁺ bei 5°C. Differenzspektren wurden 1,95 s nach NH₄⁺-Freisetzung aufgenommen.

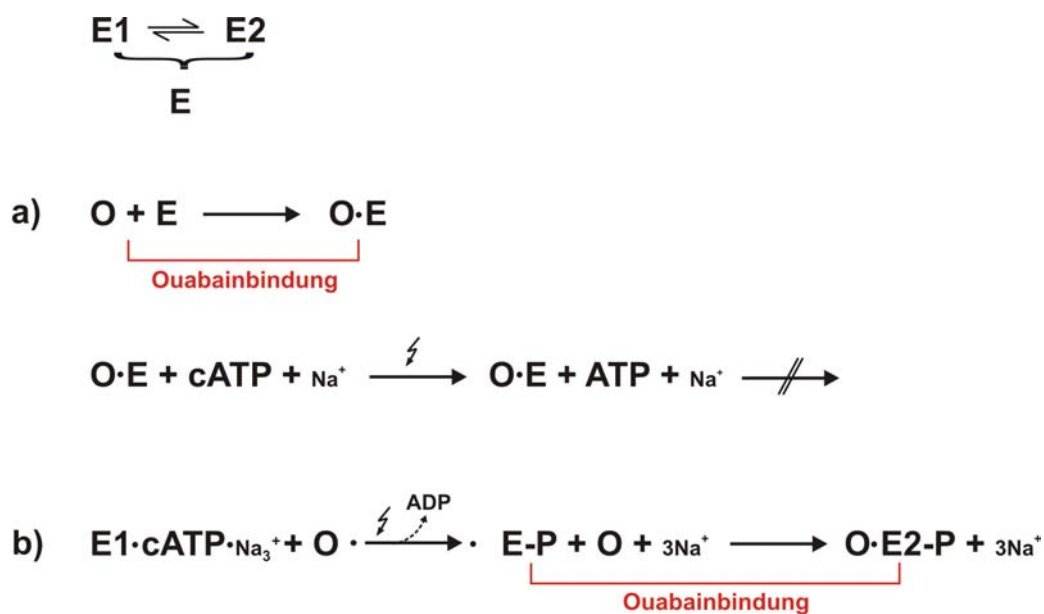
(A) Ammoniumbindung (B) Ammoniumbindung, Probe enthält zusätzlich 3 mM Na⁺ und 3 mM freies Mg²⁺ (C) Referenzversuch: Probe enthält zusätzlich 130 mM Na⁺ und 3 mM freies Mg²⁺

Das heißt, an der Kationenkoordination in der Membran der Na,K-ATPase wären im wesentlichen Asp, Glu und Asn beteiligt. Bei der Na⁺-Okklusion, die bei der Na,K-ATPase mit der Phosphorylierung verbunden ist, kann dies durch die Differenzspektren der E1P-Bildung bestätigt werden (Kapitel 3.1.3 und 4.1.2). Da sich die Differenzspektren der Ammoniumbindung und der E1P-Bildung extrem stark voneinander unterscheiden, kann aufgrund der hier erhaltenen Differenzspektren nicht davon ausgegangen werden, daß die Bindungsstellen von NH₄⁺ und somit K⁺ und Na⁺ in der Membranregion der Na,K-ATPase identisch sind. Verunreinigungen der geschützten Ammoniumverbindung durch Ammonium können aufgrund von Vergleichsversuchen mit FITC-Na,K-ATPase (Kapitel 3.2.1) mit höchstens 10 % angegeben werden. Aufgrund der hohen Enzymkonzentration von 1 mM in den IR-Filmproben würde diese allerdings nicht ins Gewicht fallen.

3.1.12 Das inhibierte Enzym

3.1.12.1 Ouabain

Kationentransport und enzymatische Aktivität der Na,K-ATPase werden durch das Herzglycosid Ouabain inhibiert. Zur selektiven und hochaffinen Bindung von Ouabain muß Mg^{2+} als Minimalkriterium anwesend sein, wohingegen K^+ einen antagonistischen Effekt hat. Ouabain bindet mit hoher Affinität an phosphorylierte Zustände des Enzyms (Hansen et al., 1984). Dabei wird die sehr langsame Bindungsrate einem, während des Bindungsprozesses stattfindenden, konformativen Wechsels des Enzyms zugeschrieben (Lewitzki et al., 1994). Trotz einer Vielzahl von durchgeführten Studien kann bis heute nicht sicher gesagt werden, ob eine Phosphorylierung des Enzyms nach Ouabainbindung möglich ist (Überblick in Hansen et al., 1984). In einer Folgestudie wird angenommen, daß dieser Ouabain-Enzym-Komplex phosphoryliert werden kann (Askari et al., 1988).



Schema 9: Ouabainbindung und Phosphorylierung, E: Enzym, O: Ouabain, cATP: caged ATP. a) und b) zeigen die in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten der Enzymphosphorylierung in Gegenwart von Ouabain. Möglichkeit b) kann mittels der IR-Differenzspektroskopie verifiziert werden, a) kann ausgeschlossen werden.

Die IR-Differenzspektroskopie bietet in diesem Zusammenhang eine Detektionsmöglichkeit zur Verifizierung der Phosphorylierung des Ouabain-Enzym-Komplexes. Zur Untersuchung dieser Thematik werden hier zwei unterschiedliche Na^+ -Konzentrationen gewählt.

Aus Vergleichsgründen zum Standardaktivitätstest, bei dem das Enzym komplett inaktiviert ist, (130 mM Na^+ , 3 mM Mg^{2+} und 20 mM K^+) werden hier zum einen 130 mM und zum anderen 20 mM Na^+ ausgewählt. Beide Na^+ -Konzentrationen führen ohne Ouabainzugabe zu typischen Differenzspektren der E2P-Bildung (Abb. 3.15 (A) schwarz und (B) schwarz). Nach 30-minütiger Vorinkubation mit Ouabain ergeben sich jedoch für die beiden unterschiedlichen Na^+ -Konzentrationen stark abweichende Differenzspektren (Abb. 3.15. (A) rot für 130 mM Na^+ bzw. (B) rot für 20 mM Na^+). Während bei einer Na^+ -Konzentration von 130 mM ein typisches Differenzspektrum der E2P-Bildung, wenn auch mit niedrigerer Amplitude als ohne Ouabain detektiert wird, zeigt die Probe mit einer Na^+ -Konzentration von 20 mM kein Differenzspektrum. Erfolgt hingegen bei der hohen Na^+ -Konzentration eine 30-minütige Vorinkubation mit Ouabain aber ohne Na^+ (erst danach wird das Na^+ hinzugegeben) verringert sich die Amplitude des Differenzspektrums der E2P-Bildung noch weiter (Abb. 15 (A) grün). Aufgrund von Fluoreszenzvergleichsversuchen (Kapitel 3.2.2) kann davon ausgegangen werden, daß bei einer Na^+ -Konzentration von 130 mM keine hochaffine Ouabainbindung mehr stattfindet. Dementsprechend wird bei einer Na^+ -Konzentration von 130 mM nur vereinzelt Ouabain gebunden sein. Die ouabainfreien Enzymmoleküle könnten phosphoryliert werden und es käme somit, im Vergleich zu der ouabainfreien Probe zu einer Verringerung der Signalamplitude im Differenzspektrum.

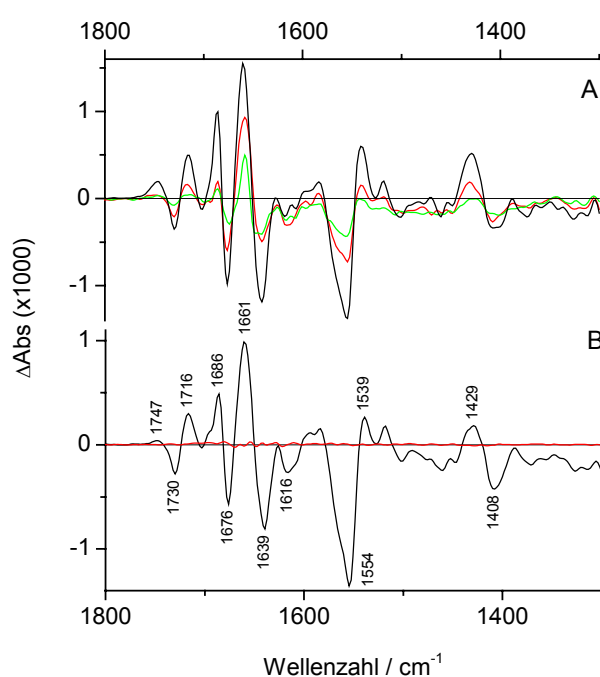
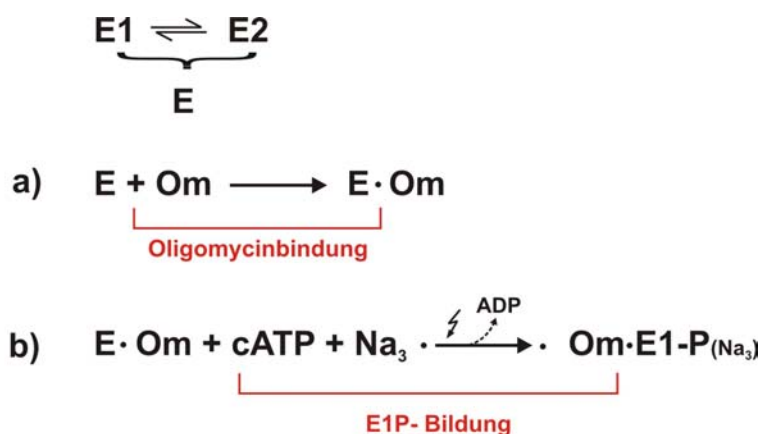


Abb. 3.15: E2P-Bildung mit und ohne Ouabain bei verschiedenen Na^+ -Konzentrationen, photolysekoriert (H_2O). Schweinenierenenzym 1 mM in $150 \text{ mM HEPES pH } 7,5$, $20 \text{ \% (w/v) Glycerin}$, 5 mM DTT , 5 mM caged ATP , 2 mM EDTA , $3 \text{ mM freies Mg}^{2+}$, bei 5°C . (A) ATPase-Probe enthält 130 mM Na^+ mit oder ohne Ouabain (5 mM). Schwarze Linie: Probe enthält kein Ouabain. Grüne Linie: Probe wurde 30 min mit Ouabain aber ohne Na^+ vor der Aufkonzentrierung inkubiert. Rote Linie: Probe wurde 30 min mit Ouabain und Na^+ vor der Aufkonzentrierung inkubiert. Differenzspektren wurden $1,95 \text{ s}$ nach ATP-Freisetzung aufgezeichnet. (B) Probe enthält 20 mM Na^+ mit oder ohne Ouabain. Rote Linie: Probe enthält 5 mM Ouabain . Schwarze Linie: Probe enthält kein Ouabain. Spektren wurden $16,3 \text{ s}$ nach ATP-Freisetzung aufgenommen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß es nach einer hochaffinen Bindung von Ouabain an die Na,K-ATPase zu keiner Phosphorylierung des Enzyms kommt. Da im Standardenzymtest sowohl 130 mM Na⁺ als auch 20 mM K⁺ vorliegen und unter diesen Bedingungen keine Bindung von Ouabain an das Enzym möglich ist, muß davon ausgegangen werden, daß unter ATP-Hydrolysebedingungen die hochaffine Ouabainbindung an das Phosphoenzym stattfindet.

3.1.12.2 Oligomycin

Oligomycin inhibiert die ATPase-Aktivität der Na,K-ATPase. Dabei wurde eine maximale Inhibition von 80 % beobachtet (Creighton, 1999). Inhibiert wird der Na⁺-Translokationsschritt: E1-P(Na₃) → E2-P + 3 Na⁺ (Arato-Oshima, et al. 1996). Die Na⁺-Ionen dieses E1-P(Na₃)-Intermediats werden aufgrund ihrer transienten Einschließung in eine Kavität der Na,K-ATPase als okkludiert bezeichnet (Glynn et al., 1984).



Schema 10: Oligomycinbindung, E: Enzym, Om: Oligomycin, cATP: caged ATP, Om-E1-P(Na₃): Oligomycin gebundenes und phosphoryliertes Enzym, bei dem Na⁺ okkludiert ist. a) Oligomycinbindung, b) Phosphorylierung des Oligomycin-Enzym-Komplexes.

Damit bietet sich mittels des Einsatzes von Oligomycin eine interessante Möglichkeit zur Erlangung eines definierten Endzustandes des Enzyms nach ATP-Freisetzung. In Kapitel 3.1.3 wurde der Enzymzustand E1-P(Na₃) nach ATP-Freisetzung durch eine Na⁺-Konzentration von 1200 mM Na⁺ erreicht. In Abb. 3.16 werden Differenzspektren dieser beiden unterschiedlichen Wege zum Erreichen des E1-P(Na₃)-Zustandes verglichen. Dabei sind in

Bezug auf die Bandenpositionen Gemeinsamkeiten mit schwarzen Bezeichnungen versehen, während signifikante Unterschiede rot gekennzeichnet sind.

Amid I/II

Während im oberen Amid I-Bereich ($1700\text{-}1668\text{ cm}^{-1}$) starke Diskrepanzen zu erkennen sind, können im unteren Amid I-Bereich ($1660\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) nur kleine Unterschiede detektiert werden. Dabei verhält sich der Kurvenverlauf der beiden Differenzspektren im oberen Amid I-Bereich konträr zueinander. Es ist jedoch möglich, daß bei dem Oligomycin behandelten Enzym das stark negative Signal bei 1695 cm^{-1} keine Amid I-Schwingung, sondern ein Ausläufer einer $\nu(\text{C}=\text{O})$ ist. Im unteren Amid I-Bereich ist, abgesehen von der Signalamplitude, eine große Übereinstimmung vorhanden.

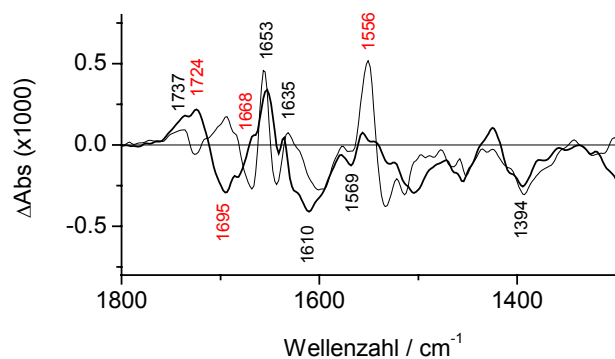


Abb. 3.16: EIP-Bildung mit und ohne Oligomycin, photolysekorrigiert (H_2O). Haidrüsenenzym 1 mM in 150 mM HEPES pH $7,5$, 20% (w/v) Glycerin, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP, 3 mM freies Mg^{2+} , bei 15°C . Differenzspektren wurden $1,95\text{ s}$ nach ATP-Freisetzung aufgenommen. **Dicke Linie:** Probe enthält Oligomycin (etwa äquimolar zum Enzym, siehe Kapitel 2.3.3.5) und 130 mM Na^+ Dünne Linie: Probe enthält 1200 mM Na^+ . Die roten Signalbezeichnungen geben signifikante Unterschiede an, während die schwarzen Signalbezeichnungen Gemeinsamkeiten der beiden Proben wiedergeben.

Individuelle AS-Seitenketten

In dem für die $\nu(\text{C}=\text{O})$ charakteristischen Absorptionsbereich oberhalb von 1700 cm^{-1} ist bei 1737 cm^{-1} bei beiden Differenzspektren ein positives Signal zu erkennen (Abb. 3.16). Bei dem mit Oligomycin behandelten Enzym ist des weiteren ein stark positives Signal bei 1724 cm^{-1} zu beobachten, gefolgt von einem stark negativen Signal bei 1695 cm^{-1} . Die Symmetrie diesen Bandenpaares kann auf Umgebungsveränderung im Bereich der Seiten-carboxylgruppen von Asp bzw. Glu hindeuten. Im Bereich möglicher $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ zeigt sich bei 1556 cm^{-1} eine starke Diskrepanz. Während bei der mit Oligomycin behandelten $\text{Na}_2\text{K-ATPase}$ kein Signal zu sehen ist, kann bei der oligomycinfreien ATPase ein stark positives Signal detektiert werden. Ein positives Signal in diesem Zusammenhang deutet auf eine

Deprotonierung der Seitenkettencarboxylreste Asp und/oder Glu hin. Diese Deprotonierung könnte in direktem Zusammenhang mit der Okklusion von Na^+ stehen. In der Literatur wird der Effekt von Oligomycin auf die Na,K-ATPase diskutiert. Dabei wird davon ausgegangen, daß bei der Na,K-ATPase nach Oligomycinbehandlung das Na^+ in okkludierter Form vorliegt (Arato-Oshima, et al. 1996). Genau dieser Unterschied im Ausgangszustand könnte die Ursache für die Diskrepanz dieser beiden Differenzspektren bei 1556 cm^{-1} sein. Nach dieser Annahme zeigt die E1P-Bildung ohne Oligomycin sowohl die Phosphorylierung als auch die Na^+ -Okklusion, während bei der E1P-Bildung mit Oligomycin-Enzym-Komplex nur die Phosphorylierung zu sehen ist. Infolgedessen kann das positive Signal bei 1556 cm^{-1} auf eine Komplexierung von Na^+ an die Seitenkettencarboxylgruppen von Asp und/oder Glu zurückgeführt werden. Bei der Diskussion der Kationenkoordination in der Transmembranregion der Na,K-ATPase in Kapitel 4.1.2 wird dieser Aspekt eine Rolle spielen.

3.1.13 Vergleich der Na,K-ATPase aus Ente, Hai und Schwein

In der vorliegenden Arbeit wurde die Na,K-ATPase aus drei unterschiedlichen Organismen untersucht. Die bis hierhin vorgestellten Ergebnisse bezogen sich fast ausschließlich auf das Schweinenierenenzym. Des weiteren wurde die Na,K-ATPase aus der Salzdrüse des Dornhais sowie aus der Salzdrüse der Ente vermessen. Im folgenden werden die Differenzspektren der Na,K-ATPase katalysierten ATP-Hydrolyse, der E2P-Bildung, der E1P-Bildung und der ATP-Beladung aus diesen drei verschiedenen Ausgangsmaterialien miteinander verglichen. Die Messungen an dem Enzym aus der Ente und dem Hai wurden sowohl in H_2O als auch in D_2O durchgeführt. Aufgrund des problematischen Vergleichs zwischen den in H_2O und D_2O aufgenommenen Differenzspektren beim Schweinenierenenzym (Kapitel 4.1), wird hier auf eine Darstellung der in D_2O aufgenommenen Differenzspektren verzichtet. Alle hier verglichenen Differenzspektren wurden in den gleichen Zeiträumen nach der ATP-Freisetzung und bei gleicher Temperatur aufgenommen. Die ermittelten Differenzspektren wurden anhand der Amid II-Absorption auf gleiche Proteinkonzentrationen normiert (Kapitel 2.2.1.5).

Enzymatische katalysierte ATP-Hydrolyse

In Anwesenheit von K^+ , Mg^{2+} und Na^+ läuft nach Freisetzung des ATP der gesamte Reaktionszyklus des Enzyms ab. Unter diesen Hydrolysebedingungen erfolgte die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Na,K-ATPase direkt in der IR-Probe (Kapitel 3.1.8). In Abb.

3.17 (A) - (C) kann anhand der $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ bei 1246 cm^{-1} eine Abschätzung der jeweiligen enzymatischen Aktivitäten vorgenommen werden. Die Na,K-ATPase aus allen drei biologischen Quellen ist unter den hier verwendeten Bedingungen zu Beginn der Messungen enzymatisch aktiv. Im direkten Vergleich zeigt das Entenzym den höchsten Stoffumsatz, gefolgt vom Schweine- und Haienzym. Das Haienzym nimmt insofern eine Sonderrolle ein, da es nur zu Beginn der Messung über einen Zeitraum von etwa 5 s enzymatisch aktiv zu sein scheint. In Tab. 3.9 ist eine Auflistung der spezifischen Aktivität der Na,K-ATPase unter IR-Bedingungen aus den drei verschiedenen Enzymquellen dargestellt. Bezüglich des Signalprofils sind zwischen dem Enzym aus der Ente und dem Schwein sehr große Gemeinsamkeiten festzustellen (Abb. 3.17 (A) und (B)). Dies gilt sowohl für die sekundärstrukturrelevanten Amid I/II-Bereiche ($1700\text{-}1610$ bzw. ~ 1550) als auch für die zur Detektion von Phosphorylierung und Protonierung relevanten Bereiche ($>1700 \text{ cm}^{-1}$: $\nu(\text{C=O})$), $1580 - 1530 \text{ cm}^{-1}$: $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$: $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$).

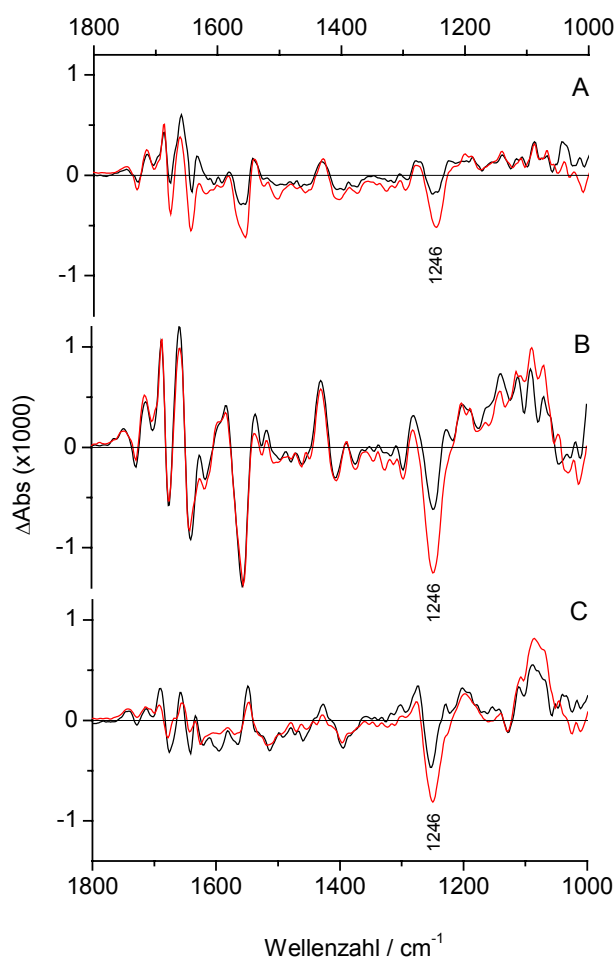


Abb. 3.17: Na,K-ATPase katalysierte ATP-Hydrolyse, photolysekorrigiert (H_2O). Enzymkonzentration 1 mM in 150 mM HEPES pH 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP, 2 mM EDTA, 3 mM freies Mg^{2+} , 130 mM NaCl und 20 mM KCl bei 15°C . Differenzspektren wurden 0,33 s (schwarz) und 1,95 s (rot) nach ATP-Freisetzung aufgenommen. (A) Schweinenierenenzym (B) Entendrüsenenzym (C) Haidrüsenenzym.

Die Region $< 1300 \text{ cm}^{-1}$, in der vorwiegend Phosphatschwingungen detektiert werden, unterscheidet sich unterhalb von 1200 cm^{-1} deutlich voneinander.

Ein wesentlicher Grund hierfür könnte in der Artefaktbildung liegen, hervorgerufen durch die in diesem Bereich schwierig durchzuführende Photolysekorrektur. Große Unterschiede der hier

vorgestellten Differenzspektren sind in den unterschiedlichen Signalamplituden zu beobachten. Dabei ist festzuhalten, daß die größte Signalamplitude dem Entenzym, gefolgt von dem Schweineenzym und dem Haienzym zuzuordnen ist. Das Verhältnis der Signalamplituden zwischen Ente, Schwein und Hai kann hierbei mit 3:2:1 angegeben werden (Abschätzung anhand des Signals bei 1657 cm^{-1}). Eine Ursache für diesen Unterschied könnte in der Natur der untersuchten Präparationen liegen. Bei der Untersuchung der spezifischen ATPase-Aktivität und der Phosphorylierungskapazität in verdünnter Suspension wird für das Entenzym ebenfalls ein größerer Wert angegeben als für Präparationen aus anderen tierischen Quellen (Martin und Sachs, 1999). Da die Differenzspektren jeder Probe auf die gleiche Proteinkonzentration normiert wurden (Kapitel 2.2.1.5), können die hier gemessenen Unterschiede in der Signalamplitude nicht auf variierende Proteinkonzentrationen zurückgeführt werden.

E2P-Bildung

Bei den Differenzspektren der E2P-Bildung ist bezüglich des Signalprofils eine große Übereinstimmung festzustellen (Abb. 3.18 (A)-(C)). Dies gilt sowohl für die sekundärstrukturelevanten Amid I/II -Bereiche ($1700\text{-}1610 \text{ cm}^{-1}$ bzw. $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$) als auch für die zur Detektion von Protonierung und Phosphorylierung relevanten Bereiche ($>1700 \text{ cm}^{-1}$: $\nu(\text{C=O})$, $1580 - 1530 \text{ cm}^{-1}$: $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$). Vergleicht man das Entenzym mit dem Schweineenzym, so können Bereiche unterschiedlicher Amplitudenverhältnissen beobachtet werden. Während im spektralen Abschnitt potentieller $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ annähernd gleiche Amplituden zu beobachten sind, kann im Bereich oberhalb von 1700 cm^{-1} ($\nu(\text{C=O})$) ein Unterschied in der Amplitude detektiert werden. Beim Schweineenzym kann bei 1716 cm^{-1} eine vom Betrag her doppelt so große Amplitude detektiert werden wie bei dem Entenzym. Bei dem Entenzym hingegen können in die

Bestimmung der spezifischen Aktivitäten ($\text{nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$)			
	Ente	Hai	Schwein
5°C	109	-	9
15°C	330	nicht auswertbar*	34

Tab. 3.9: Bestimmung der spezifischen Aktivitäten aus verschiedenen Enzymquellen. *Anfangsaktivität ist vorhanden; aber nach $\sim 5 \text{ s}$ Einbruch der enzymatischen Aktivität.

sem spektralen Abschnitt zwei nebeneinander liegende positive Signale beobachtet werden (1716 cm^{-1} und 1700 cm^{-1}).

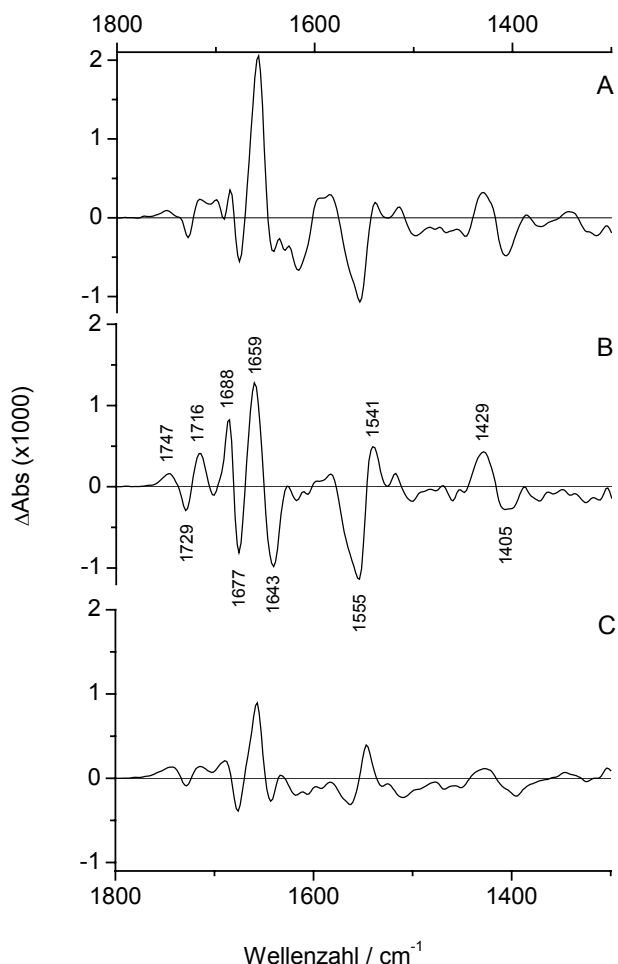


Abb. 3.18: E2P-Bildung, photolysekorrigiert (H_2O). Enzymkonzentration 1 mM in 150 mM HEPES, pH 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP, 2 mM EDTA, 3 mM freies Mg^{2+} und 130 mM NaCl bei 15°C . Differenzspektren wurden 1,95 s nach ATP-Freisetzung aufgenommen. (A) Entendrüsenzym (B) Schweinenierenenzym (C) Haidrüsenzym

Dieses Phänomen kann auf eine veränderte Umgebung bei ein und der selben Gruppe (Asp bzw. Glu) im Vergleich zum Schweineenzym hindeuten. Im sekundärstrukturelevanten Amid I-Bereich hingegen zeigt das Entenzym eine um den Faktor 1,5 größere Signalamplitude. Unterhalb von 1700 cm^{-1} kann bei dem Haienzym eine im Vergleich zum Enten- und Schweineenzym annähernd halbierte Amplitude der Signale beobachtet werden.

E1P-Bildung

In Bezug auf die Signalprofile sind sich die Differenzspektren der drei untersuchten Enzyme aus den unterschiedlichen Quellen über große Bereiche recht ähnlich (Abb. 3.19 (A)-(C)). Unterschiede im Vergleich zum Enten- und Schweineenzym sind bei dem Haienzym im Bereich um 1700 cm^{-1} zu erkennen. Es könnte sich dabei lediglich um eine Verschiebung

bung eines positiven Signals um wenige cm^{-1} handeln, was schließlich in dem bestehenden Bandenprofil zum Ausdruck käme. Bezüglich der Signalamplituden bestehen Unterschiede in den lokalen Minima und Maxima. In der maximal beobachteten Amplitude der detektierten Signale besteht bei den Differenzspektren der E1P-Bildung die größte, bis jetzt bei diesem Vergleich registrierte Übereinstimmung.

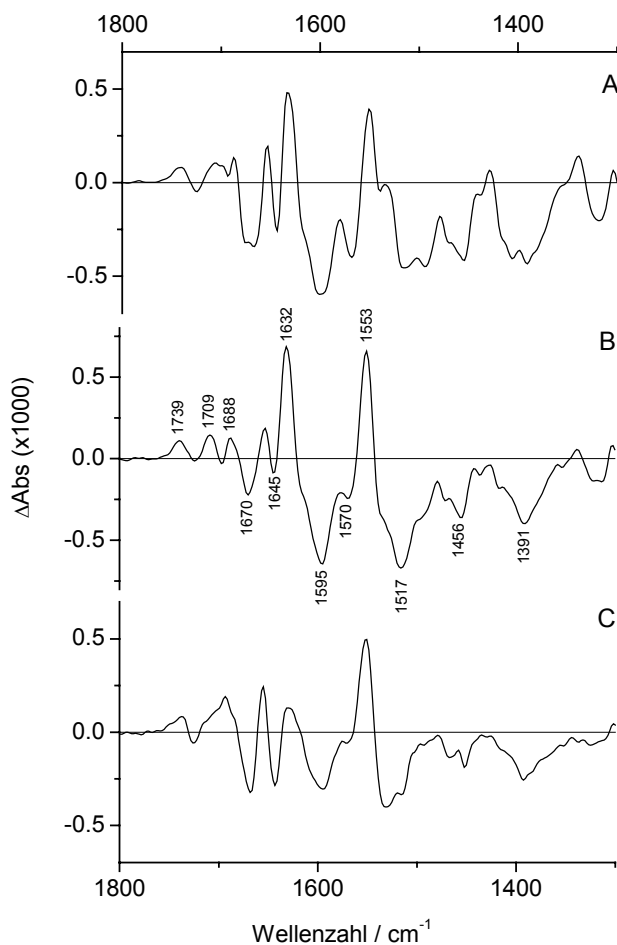


Abb. 3.19: E1P-Bildung, photolysekorrigiert (H_2O). Enzymkonzentration 1 mM in 150 mM HEPES pH 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP, 2 mM EDTA, 3 mM freies Mg^{2+} und 1200 mM NaCl. Differenzspektren wurden 1,95 s nach ATP-Freisetzung aufgenommen. **(A)** Entendrüsenenzym (5°C) **(B)** Schweinenierenenzym (5°C) **(C)** Haidrüsenenzym (15°C).

ATP-Beladung

In Abb. 3.20 **(A)-(C)** sind die Differenzspektren der ATP-Beladung der Enzyme aus den drei verschiedenen Ressourcen abgebildet. Bezüglich des Signalprofils ist hier eine große Übereinstimmung festzustellen. Es sind nur minimale Abweichungen im Amid I-Bereich zu beobachten. Bei allen drei Enzymen sind Hinweise auf die Beteiligung von Seitenkettencarboxylgruppen von Asp und/oder Glu bei der ATP-Beladung zu erkennen (>1700

cm^{-1} : $\nu(\text{C}=\text{O})$, $1580 - 1530 \text{ cm}^{-1}$: $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$). Diese Beteiligung scheint bei dem Haienzym am geringsten und bei dem Entenzym am stärksten ausgeprägt zu sein. Was unter der Beteiligung von Asp bzw. Glu bei der ATP-Beladung im Detail zu verstehen ist, wird in Kapitel 4.1.1 erläutert. In Bezug auf die Signalamplituden zeigt das Entenzym im Amid I-Bereich den größten Betrag, gefolgt von dem Hai- und Schweineenzym.

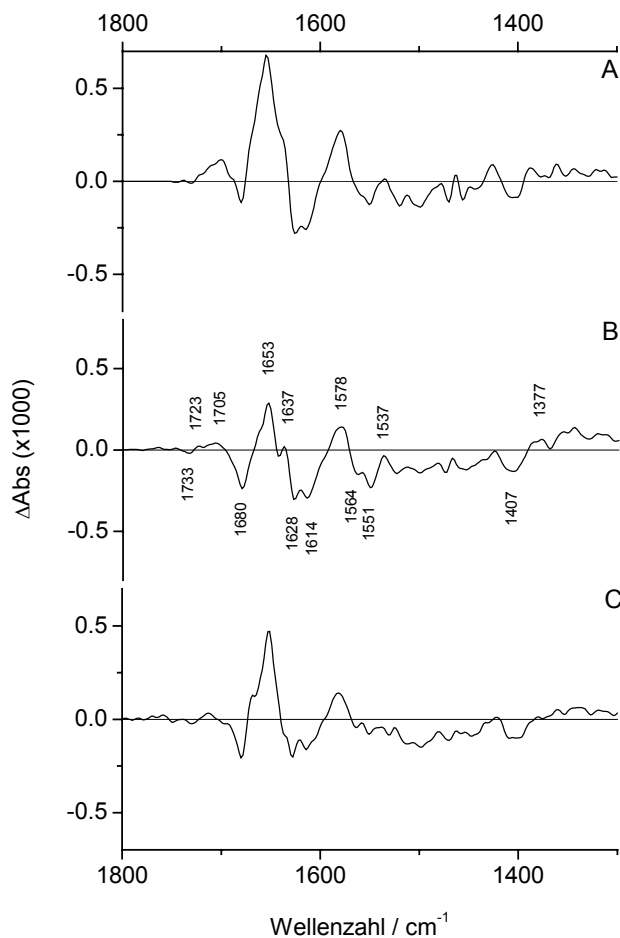


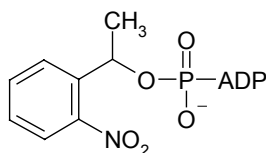
Abb. 3.20: ATP-Beladung; photolysekorrigiert (H_2O). Enzymkonzentration 1 mM in 150 mM HEPES pH 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 5 mM caged ATP, 20 mM EDTA und 130 mM NaCl bei 15°C . Differenzspektren wurden 1,95 s nach ATP-Freisetzung aufgenommen. (A) Entendrüsenzym (B) Schweineierenenzym (C) Haidrüsenzym.

In der Zusammenfassung des Vergleichs der drei untersuchten Enzyme läßt sich festhalten, daß das Haidrüsenzym in den hochkonzentrierten Proteinfilmen das instabilste ist. Dies konnte anhand der Bestimmung der spezifischen ATPase-Aktivität gezeigt werden. Diese These wird auch durch unabhängig durchgeführte Untersuchungen, die die spezifische ATPase-Aktivität des Enzyms nach der Proteinfilmpräparation mit resuspendiertem Enzym

mittels eines Phosphattests charakterisieren, bestätigt (Thoenges et al., 2002). Bei dem Enten- und Schweineenzym hingegen akkumuliert bei der enzymatisch katalysierten ATP-Hydrolyse der gleiche Enzymzustand (Diskussion in Kapitel 4.1.2). Bei der E2P-Bildung scheint bei allen drei unterschiedlichen Enzymen der gleiche Enzymzustand zu akkumulieren. Auch für die ATP-Beladung scheint dies zuzutreffen. Zur Untersuchung von Teilreaktionen innerhalb des Reaktionszyklus der Na,K-ATPase scheint somit auch das Haienzym tauglich zu sein, da die Instabilität des Enzyms erst beim Ablauf des kompletten Reaktionszyklus zum tragen kommt. Die Diskussion der bei den Teilreaktionen akkumulierten Enzymzustände erfolgt in Kapitel 4.1

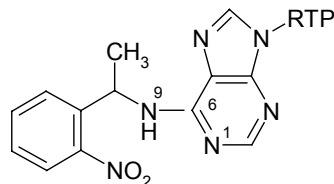
3.1.14 Der Einsatz von N⁹-NPE-caged ATP

Eine Besonderheit des NPE-caged ATP ist die Eigenschaft, daß es an die Na,K-ATPase bindet (Forbush, 1984). Dabei handelt es sich um eine Bindung an die Nukleotidbindungsstelle der Na,K-ATPase. Die ATP-Freisetzung erfolgt somit hauptsächlich durch Photolyse des in der Bindungsstelle gebundenen geschützten Liganden. Eventuell stattfindende Konformationsänderungen des Enzyms bei der Bindung des ATP könnten somit nicht IR-spektroskopisch detektiert werden. Es wäre somit wünschenswert, ein geschütztes ATP zu haben, welches eine niedrigere Affinität zur Na,K-ATPase hat, als das NPE-caged ATP.



NPE-caged ATP

Abb. 3.21: Strukturformel von NPE-caged ATP und N⁹-NPE-caged ATP.



N⁹-NPE-caged ATP

Aufgrund der chemischen Struktur des NPE-caged ATP ist möglicherweise davon auszugehen, daß eine andere Verknüpfung der Schutzgruppe mit dem ATP, nämlich am Adenin-

rest, zu einer Verringerung der Bindung an die Nukleotidbindungsstelle des Enzyms führt. Diese Idee ist im N^9 -NPE-caged ATP (Abb. 3.21) realisiert.

3.1.14.1 Photolyse von N^9 -NPE-caged ATP

Neben der biochemischen Charakterisierung (Kapitel 3.2.3) stellt sich die Frage nach der IR-spektroskopischen Eignung von N^9 -NPE-caged ATP zur Untersuchung des Reaktionszyklus der Na,K-ATPase. Hierbei ist hauptsächlich das spektroskopische Verhalten nach der photolytischen Abspaltung der Schutzgruppe im Bereich zwischen 2000 und 1000 cm^{-1} von Interesse. Bei der Analyse der Differenzspektren der Photolyse des caged ATP in H_2O und D_2O können positive und negative Signale detektiert werden (Abb. 3.22 (A) und (B)). Dabei zeigen die beiden negativen Signale bei 1527 cm^{-1} (D_2O : 1527 cm^{-1}) und 1356 cm^{-1} (D_2O : 1356 cm^{-1}) keinen auflösbaren zeitlichen Verlauf. Beide Signale liegen im Bereich von $\nu(\text{NO}_2)$. Da es sich bei N^9 -NPE-caged ATP um die gleiche Schutzgruppe handelt wie bei NPE-caged ATP, sollte auch mit einer analogen Photochemie in Bezug auf die sich abspaltende Schutzgruppe zu rechnen sein (Abb. 2.4). Dementsprechend wird das negative Signal bei 1527 und 1356 cm^{-1} einer $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ bzw. einer $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$ der Nitrofunktion im Edukt zugeordnet.

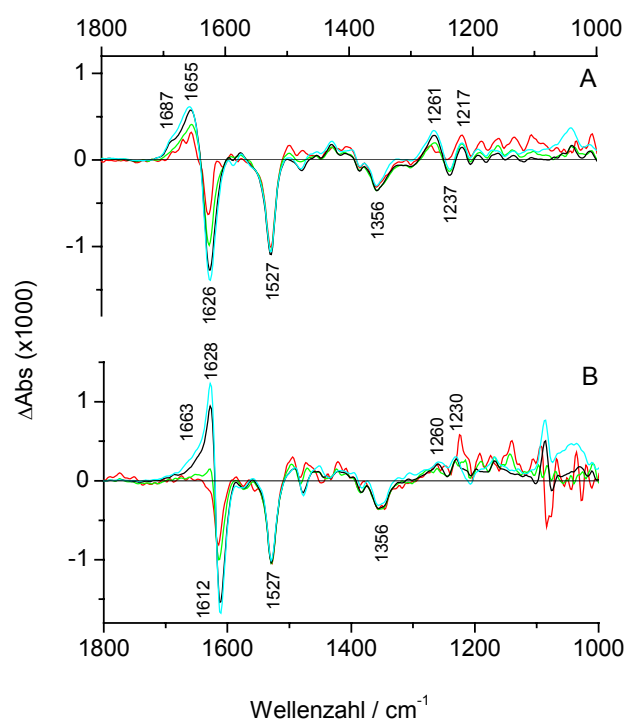


Abb. 3.22: Photolyse von N^9 -NPE-caged ATP. Probe enthält 150 mM HEPES, pH (pD) 7,5, 20 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 3 mM freies Mg^{2+} , 5 mM caged ATP und 130 mM NaCl. Differenzspektren wurden 0,33 s (rot), 1,95 s (grün), 16,3 s (schwarz) und 126,8 s (blau) nach ATP-Freisetzung aufgenommen. (A) Probe in H_2O bei 15°C (B) Probe in D_2O bei 5°C.

Auch bei der Photolyse des NPE-caged ATP zeigen die Signale bei 1527 cm^{-1} und 1356 cm^{-1} keine Zeitabhängigkeit (Barth et al., 1997).

Die drei im Amid I-Bereich auftretenden Signale in H_2O zwischen 1687 und 1626 cm^{-1} (D_2O : zwischen 1653 und 1612 cm^{-1}) zeigen hingegen eine starke Zeitabhängigkeit (Abb. 3.22). Bei der Photolyse des NPE-caged ATP (Abb. 3.1), welches über eine Phosphatgruppe mit der Schutzgruppe verknüpft ist, können keine analogen Signale detektiert werden. Das heißt, die im Amid I-Bereich auftretenden Signale sind auf Bindungsbrüche bzw. -knüpfungen, die in Zusammenhang mit der sich unterscheidenden Verknüpfung des ATP mit der Schutzgruppe stehen, zurückzuführen. Im Focus steht hier die mit dem Adenin an C6 verknüpfte Aminofunktion. Diese stellt im N^9 -NPE-caged ATP eine sekundäre Aminogruppe dar, während sie nach Abspaltung der Schutzgruppe in eine primäre Aminogruppe übergegangen sein sollte. Da diese Aminofunktion direkt mit dem aromatischen Adenin verknüpft ist, können auch Änderungen in den Schwingungsmoden der $\nu(\text{C}=\text{N})$ innerhalb des Adenins Folge der Photolyse des N^9 -NPE-caged ATP sein. Alle drei Signale im Amid I-Bereich liegen sowohl im Absorptionsbereich von $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{N})$ als auch von $\delta(\text{N-H})$. In der Literatur werden die Absorptionsspektren von Adenosin in H_2O und D_2O beschrieben (Shimanouchi, 1964). Demnach findet in H_2O eine starke Koppelung zwischen der $\delta(\text{N-H})$ der entstehenden Aminofunktion und der $\nu(\text{C}=\text{N})$ der im Adenin geknüpften Doppelbindung zwischen N_1 und C_6 statt. Dies hat zur Folge, daß die unterschiedlichen Molekülschwingungen nur ein Signal ergeben. Bei der Photolyse des N^9 -NPE-caged ATP ist aufgrund des Vergleichs mit der Photolyse des NPE-caged ATP damit zu rechnen, daß es auch zu der Bildung einer Carbonylfunktion an der abgespaltenen Schutzgruppe kommt (vgl. Abb. 3.1). Auch die $\nu(\text{C}=\text{O})$ dieser Carbonylfunktion würde im Bereich um 1650 cm^{-1} absorbieren. In den Absorptionsspektren von Adenosin bei pH 7 (Shimanouchi, 1964) wird in H_2O bei 1650 cm^{-1} und in D_2O bei 1627 cm^{-1} eine Absorption detektiert, die einer gekoppelten Schwingung von $\delta(\text{N-H})$ und $\nu(\text{C}=\text{N})$ innerhalb des Adenins zugeordnet wird. Diese Signale im Absorptionsspektrum liegen genau in der spektralen Region, wo auch im Differenzspektrum bei der Photolyse von N^9 -NPE-caged ATP Signale beobachtet werden (Abb. 3.22 und Tab. 3.10). Das positive Signal in H_2O bei 1687

Photolyse des N^9 -NPE-caged ATP		
H_2O	D_2O	Potentielle Zuordnung
1687 (+)	1663 (+)	$\delta(\text{N-H})$
1655 (+)	1628 (+)	
1626 (-)	1612 (-)	
1527 (-)	1527 (-)	$\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$
1356 (-)	1356 (-)	$\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$
1261 (+)	1230 (+)	$\nu(\text{C}-(\text{NH}_2))$

Tab. 3.10: Zuordnung von IR-Differenzsignalen bei der Photolyse des N^9 -NPE-caged ATP.

cm^{-1} (D_2O : 1663 cm^{-1}) liegt im Bereich der $\nu(\text{C}=\text{O})$ der entstehenden Carbonylfunktion bei der abgespaltenen Schutzgruppe (Abb. 3.1). Die Kinetik (2- 127 s) des positiven und negativen Signals bei $1655/1626 \text{ cm}^{-1}$ (D_2O : $1628/1612 \text{ cm}^{-1}$; Abb. 3.22 **(B)**) deutet auf eine langsame Freisetzung von ATP bzw. im Vergleich zur Photolyse von NPE-caged ATP auf ein zusätzlich auftretendes Intermediat hin.

In der Zusammenfassung kann festhalten werden, daß sich das N^9 -NPE-caged ATP aufgrund der starken positiven und negativen Signale im Amid I-Bereich nur begrenzt für die IR-spektroskopische Untersuchung der Na,K-ATPase eignet. Im Vergleich zum NPE-caged ATP deuten die Differenzspektren der Photolyse des N^9 -NPE-caged ATP auf eine verlangsamte Freisetzung bzw. auf zusätzlich auftretende Intermediate, die in Zusammenhang mit der veränderten Verknüpfung des ATP mit der Schutzgruppe stehen, hin.

3.1.14.2 ATP-Bindung an die Na,K-ATPase

Da das N^9 -NPE-caged ATP deutlich schwächer an die Na,K-ATPase bindet als das NPE-caged ATP (Kapitel 3.2.3), ist es zur Untersuchung der ATP-Bindung an das Enzym trotz der in Kapitel 3.1.14.1 aufgeführten Nachteile von Interesse. In Abb. 3.23 wird die ATP-Bindung an die Na,K-ATPase nach Abspaltung der N^9 -NPE- und der NPE-Schutzgruppe miteinander verglichen. Wegen der ungünstigen Photolysekorrektur beim N^9 -NPE-caged ATP werden unkorrigierte ATPase-Differenzspektren der ATP-Bindung gezeigt. Aufgrund des Vergleichs mit dem Differenzspektrum der Photolyse von N^9 -NPE-caged ATP (Abb. 3.23, rote Linie) ist eine Bestimmung der durch die ATP-Enzym-Wechselwirkung hervorgerufenen spektralen Veränderungen möglich. Zunächst wird die ATP-Bindung an die Na,K-ATPase nach Abspaltung der N^9 -NPE-Schutzgruppe beschrieben, während ein Vergleich mit der ATP-Beladung nach Abspaltung der NPE-Schutzgruppe am Ende dieses Kapitels erfolgt.

Amid I/II

In H_2O (Abb. 3.23 **(B)**) ist bei 1656 cm^{-1} (D_2O : 1656 cm^{-1}) ein positives und bei 1623 cm^{-1} (D_2O : 1606 cm^{-1}) ein negatives Signal zu erkennen. Vergleicht man diese Signal-

ATP-Bindung		
H_2O	D_2O	Potentielle Zuordnung
1743 (-)	1740 (-)	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1726 (+)	1723 (+)	
1656 (+)	1656 (+)	AI / $\delta(\text{N}-\text{H})$
1623 (-)	1606 (-)	$\delta(\text{N}-\text{H})$
1582 (-)	1581 (-)	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1527 (-)	1527 (-)	$\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$
1381 (+)	1384 (+)	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
1349 (+)	1349 (+)	$\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$

Tab. 3.11: Zuordnung von IR-Differenzsignalen bei der ATP-Bindung an die Na,K-ATPase nach Photolyse von N^9 -NPE-caged ATP.

positionen und Amplituden mit dem in rot gezeichneten Differenzspektrum der Photolyse des N⁹-NPE-caged ATP, so ist eine große Übereinstimmung festzustellen. Des Weiteren zeigen die beiden Signale bei 1656 cm⁻¹ und 1623 cm⁻¹ den gleichen kinetischen Verlauf wie die auftretenden Signale im Differenzspektrum der ATP-Freisetzung in Abb. 3.22 (A). Im Amid II-Bereich um 1550 cm⁻¹ sind keine Signale zu erkennen.

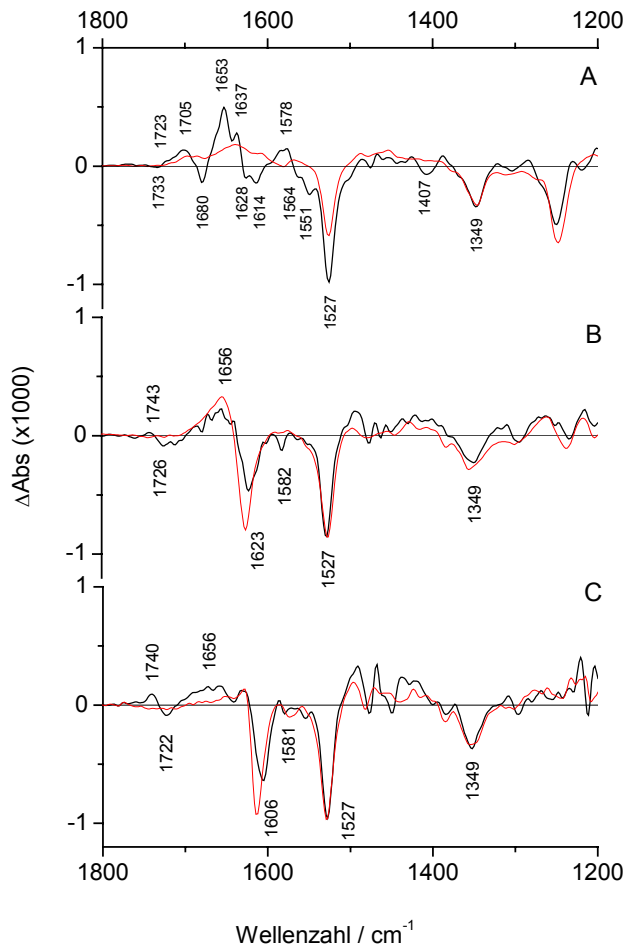


Abb. 3.23: Vergleich der ATP-Bindung nach Abspaltung der N⁹-NPE- und NPE-Schutzgruppe (Schweinenierenzym, 1 mM). Differenzspektren wurden 1,95 s nach Photolyse aufgenommen. Zusammensetzung des ionischen Mediums in Kapitel 3.1.2.1.

(A) ATP-Beladung nach Abspaltung der NPE-Schutzgruppe in H₂O bei 15°C. Schwarz: ATP-Beladung, nicht photolysekorrigiert, rot: Photolyse-Differenzspektrum ohne Enzym.

(B) ATP-Bindung nach Abspaltung der N⁹-NPE-Schutzgruppe in H₂O bei 5°C. Schwarz: ATP-Bindung, nicht photolysekorrigiert, rot: Photolyse-Differenzspektrum von N⁹-NPE-caged ATP ohne Enzym.

(C) ATP-Bindung nach Abspaltung der N⁹-NPE-Schutzgruppe in D₂O bei 5°C. Schwarz: ATP-Bindung, nicht photolysekorrigiert, rot: Photolyse-Differenzspektrum von N⁹-NPE-caged ATP ohne Enzym.

Somit ist der Hauptanteil der im Amid I- und II-Bereich detektierten Signale auf die Abspaltung der Schutzgruppe und ATP-Freisetzung aber nicht auf Änderungen in der Sekundärstruktur der Na,K-ATPase zurückzuführen. In der Zusammenfassung läßt sich festhalten, daß annähernd keine Sekundärstrukturänderungen des Enzyms als Folge der ATP-Bindung nach der Photolyse von N⁹-NPE-caged ATP detektierbar sind.

Individuelle AS-Seitenketten

Bei der ATP-Bindung in H₂O können zwei kleine Signale im Bereich oberhalb von 1700 cm⁻¹ beobachtet werden. Das positive Signal bei 1743 cm⁻¹ (D₂O: 1740 cm⁻¹) und das negative Signal bei 1726 cm⁻¹ (D₂O: 1722 cm⁻¹) liegen beide im Bereich möglicher $\nu(\text{C}=\text{O})$ der Seitenkettencarboxylgruppen Asp und Glu. Das bei 1582 cm⁻¹ (D₂O: 1581 cm⁻¹) detektierte negative Signal ist ein Hinweis auf eine $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ von Asp oder Glu.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß es Hinweise auf die Beteiligung von Seitenkettencarboxylgruppen von Asp und/oder Glu bei der ATP-Bindung gibt, die entweder auf eine Änderung in deren Umgebung oder Protonierung hindeuten. Abschätzungen der Signalamplitude im Bereich der $\nu(\text{C}=\text{O})$ weisen darauf hin, daß etwa 20 % einer Asp- oder Glu-Seitenkette an einer Protonierung beteiligt wäre. Dieser niedrige Prozentsatz läßt eine Umgebungsänderung in der Nachbarschaft einer oder mehrerer Carboxylgruppen wahrscheinlicher erscheinen als eine Protonierung.

Vergleich von N⁹-NPE-caged ATP mit NPE-caged ATP

Während nach Abspaltung der N⁹-NPE-Schutzgruppe im Amid I-Bereich überwiegend Signale auftreten, die auf die Photolyse des N⁹-NPE-caged ATP zurückzuführen sind, können nach Abspaltung der NPE-Schutzgruppe kleine Signale im Amid I-Bereich detektiert werden, die auf ATP-Enzym-Interaktionen zurückzuführen sind (vgl. Kapitel 3.1.2.1). In den für die $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ charakteristischen Wellenzahlbereichen zeigen sich sowohl nach Abspaltung der N⁹-NPE- als auch nach Abspaltung der NPE-Schutzgruppe Signale. Im Fall des NPE-caged ATP sind diese Signale allerdings stärker ausgeprägt. Es läßt sich somit zusammenfassend festhalten, daß der Einsatz beider geschützter ATP-Derivate keine Hinweise auf signifikante Sekundärstrukturänderungen während der ATP-Bindung an die Na,K-ATPase liefert. Bei beiden geschützten ATP-Derivaten ist hingegen nach ATP-Freisetzung eine Änderung der Umgebung in der direkten Nachbarschaft der Seitenketten von Asp/Glu detektierbar. Diese Änderungen können z. B. mit der Modifikation von Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken unter der Beteiligung von Asp/Glu erklärt werden.

3.1.14.3 E2P-Bildung

Um eine Akkumulierung des E2P-Zustandes zu erreichen, wird hier die gleiche ionische Zusammensetzung des Reaktionsmediums wie bei den Versuchen mit NPE-caged ATP gewählt (Kapitel 3.1.5). Aufgrund der ungünstigen Photolysekorrektur bei der Verwen-

dung des N⁹-NPE-caged ATP wird auch hier ein unkorrigiertes Differenzspektrum der E2P-Bildung gezeigt.

Amid I/II

Bei der E2P-Bildung in H₂O ist bei 1676 cm⁻¹ und bei 1653 cm⁻¹ ein positives sowie bei 1626 cm⁻¹ ein negatives Signal zu beobachten. Vergleicht man die Signalpositionen und Amplituden mit dem rot gezeichneten Differenzspektrum der Photolyse, so sind viele Übereinstimmungen festzustellen.

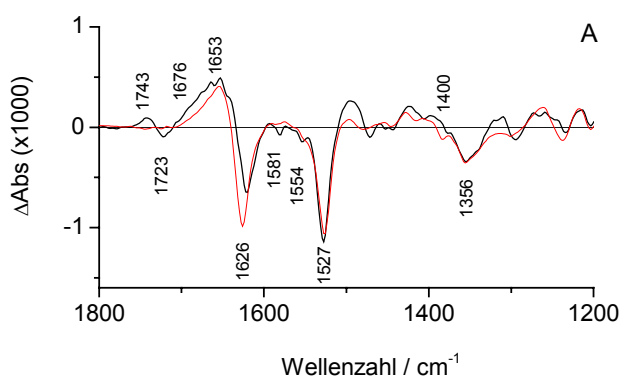


Abb. 3.24: E2P-Bildung in H₂O (Schweine-nierenenzym, 1 mM bei 15°C) Differenzspektra wurden 1,95 s nach Photolyse aufgenommen. Zusammensetzung des ionischen Mediums in Kapitel 3.1.5.

(A) Schwarz: E2P-Bildung, nicht photolyse-korrigiert, rot: Photolyse-Differenzspektrum von N⁹-NPE-caged ATP ohne Enzym.

Des weiteren zeigen diese drei Signale bei 1676 cm⁻¹, 1653 cm⁻¹ und 1626 cm⁻¹ den gleichen zeitlichen Verlauf wie die im Differenzspektrum der Photolyse detektierten Signale in Abb. 3.22 (A).

Der Hauptanteil der im Amid I- und II-Bereich detektierten Signale ist somit auf die ATP-Freisetzung und nicht auf Änderungen in der Sekundärstruktur der Na,K-ATPase zurückzuführen. Es sind annähernd keine Sekundärstrukturänderungen des Enzyms nach der Photolyse des N⁹-NPE-caged ATP detektierbar.

Individuelle AS-Seitenketten

Im spektralen Bereich oberhalb von 1700 cm⁻¹, der signifikant für das Auftreten von ν(C=O) der Seitenkettencarboxylgruppen Asp und Glu ist, können zwei

E2P-Bildung	
H ₂ O	Potentielle Zuordnung
1743 (+)	ν(C=O)
1723 (-)	
1708 (+)	
1676 (+)	AI / δ(N-H)
1653 (+)	
1626 (-)	ν _{as} (COO ⁻)
1581 (-)	
1554 (-)	ν _{as} (NO ₂)
1527 (-)	
~1400 (+/-)	ν _s (COO ⁻)
1349 (+)	ν _s (NO ₂)

Tab. 3.12: Zuordnung von IR-Differenzsignalen bei der E2P-Bildung.

Signale detektiert werden. Ein positives Signal bei 1743 cm^{-1} und ein negatives Signal bei 1723 cm^{-1} . Die negativen Signale bei 1582 cm^{-1} und 1554 cm^{-1} sind Hinweise auf eine $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ der deprotonierten Seitenkettencarboxylgruppen Asp und/oder Glu. Im Bereich um 1400 cm^{-1} ist sowohl ein schwaches positives als auch ein schwaches negatives Signal zu erkennen. Beide sind Hinweise auf eine $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ der Seitenkettencarboxylgruppen Asp und/oder Glu.

In der Zusammenfassung ist festzuhalten, daß es nur schwache Evidenzen auf Phosphorylierung des Enzyms an Asp 369 gibt. Die Detektion der Phosphorylierung ist unter Verwendung von N^9 -NPE-caged ATP unter den gewählten Bedingungen nicht so eindeutig wie bei NPE-caged ATP (Kapitel 3.1.5). Der Unterschied zwischen dem Differenzspektrum der ATP-Bindung und der E2P-Bildung bei N^9 -NPE-caged ATP ist nicht sehr groß. Das wirft die Frage auf, ob es bei den hier gewählten Bedingungen zu einer Phosphorylierung des Enzyms gekommen ist. Aufgrund der Zusammensetzung des ionischen Mediums (vgl. Kapitel 3.1.5) ist davon auszugehen, daß es unter den gewählten Bedingungen zu einer Phosphorylierung des Seitenkettenrestes Asp 369 kommt. Eine Freisetzung von ATP als Folge der Photolyse von N^9 -NPE-caged ATP wurde durch Aktivitätstests der Na,K-ATPase mit photolysierten N^9 -NPE-caged ATP nachgewiesen (Kapitel 3.2.3). Auch IR-spektroskopisch kann auf die Freisetzung von ATP aus N^9 -NPE-caged ATP geschlossen werden. Bei der Photolyse von NPE-caged ATP wird durch das Auftreten der beiden negativen Signale bei 1527 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$) und 1349 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$) auf die Freisetzung von ATP geschlossen (Barth et al., 1997). Das Auftreten dieser beiden negativen Banden signalisiert das Verschwinden der Nitrogruppe im NPE-caged ATP (Kapitel 3.1.1.1). Unter der Annahme der gleichen photochemischen Prozesse wie bei der Photolyse des N^9 -NPE-caged ATP signalisieren diese beiden negativen Signale die Freisetzung von ATP. Zur detaillierten Untersuchung der E2P-Bildung mittels des Einsatzes von N^9 -NPE-caged ATP wären weitergehende Untersuchungen notwendig.

3.2 Ergänzende Untersuchungen mit anderen Methoden

3.2.1 Ammoniumbindung an die Na,K-ATPase

Aufgrund der ähnlichen Ionenradien und der gleichen Ladung der beiden Kationen K^+ und NH_4^+ (133 pm bzw. 143 pm, Hollemann-Wiberg, 1995) binden beide Ionen selektiv an die Na,K-ATPase (Grell et al., 1991). Die mittels FITC-Na,K-ATPase gewonnenen Daten zei-

gen für beide Kationen jeweils eine Bindungsstöchiometrie von 2:1 an das Enzym. Das bedeutet, daß zur Charakterisierung der K^+ -Bindungsstelle an die Na,K-ATPase auch Vergleichversuche, die die NH_4^+ -Bindungsversuche an das Enzym beschreiben, herangezogen werden können. Zur Detektion der Ammoniumbindung an die Ionenpumpe stellt die FITC-Na,K-ATPase ein geeignetes Detektionssystem dar. Bei der Zugabe von NH_4Cl zu einer Suspension der FITC-Na,K-ATPase nimmt die Fluoreszenzintensität des beobachteten Systems ab. Das bei den IR-spektroskopischen Untersuchungen eingesetzte, geschützte Ammonium wurde mittels FITC-Na,K-ATPase auf seine Eignung zur Detektion der Ammoniumbindung geprüft. Dabei sollte im wesentlichen die Frage nach möglichem freien Ammonium in der geschützten Ammoniumbindung beantwortet werden. Zur Klärung dieser Frage wurden drei Titrationen der FITC-Na,K-ATPase mit jeweils verschiedenen Substraten durchgeführt: NH_4Cl , caged NH_4^+ (belichtet) und caged NH_4^+ (unbelichtet, Abb. 3.25).

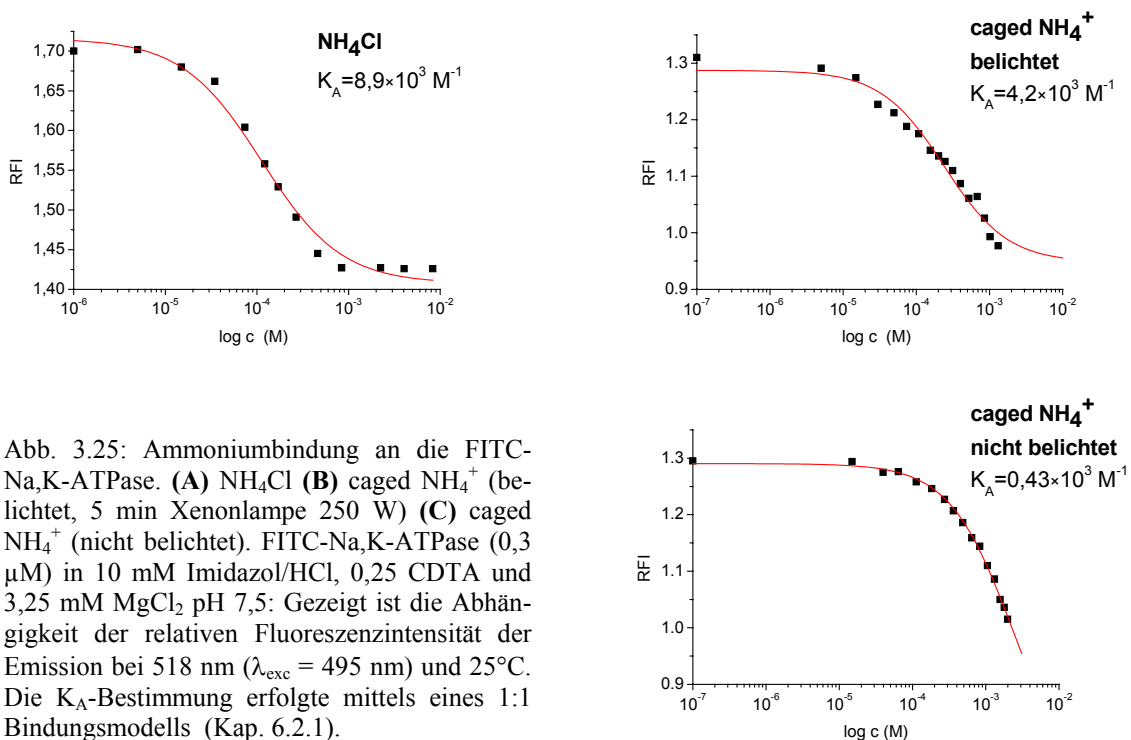


Abb. 3.25: Ammoniumbindung an die FITC-Na,K-ATPase. (A) NH_4Cl (B) caged NH_4^+ (belichtet, 5 min Xenonlampe 250 W) (C) caged NH_4^+ (nicht belichtet). FITC-Na,K-ATPase (0,3 μM) in 10 mM Imidazol/HCl, 0,25 CDTA und 3,25 mM $MgCl_2$ pH 7,5: Gezeigt ist die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität der Emission bei 518 nm ($\lambda_{exc} = 495$ nm) und 25°C. Die K_A -Bestimmung erfolgte mittels eines 1:1 Bindungsmodells (Kap. 6.2.1).

Bei allen drei Titranden wurden die Affinitäten zur FITC-Na,K-ATPase bestimmt. Dabei ergab sich für das belichtete caged NH_4^+ , welches hauptsächlich freies NH_4^+ enthalten sollte, eine 10-fach höhere Affinität als für das unbelichtete caged NH_4^+ . Das heißt, durch die

Belichtung von caged NH_4^+ ist es zu einer Freisetzung von NH_4^+ gekommen. Im Vergleich zu NH_4Cl besitzt das belichtete caged NH_4^+ eine halb so hohe Affinität. Ein Grund hierfür könnte darin liegen, daß ein kleiner Teil des caged NH_4^+ nicht photolysiert wurde. Aber auch das caged NH_4^+ hat mit $K_A = 0,43 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ eine Affinität zur Na,K-ATPase. Eine plausible Erklärung wäre, daß bereits das caged NH_4^+ mit einer Affinität von $K_A = 0,43 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ an die Na,K-ATPase bindet. Des weiteren käme aber auch eine Verunreinigung des caged NH_4^+ durch freies Ammonium von circa 10 % als Erklärung der experimentellen Befunde in Betracht. Durch IR-Absorptionsspektren konnte ebenfalls keine Antwort auf die Frage gefunden werden, ob das caged NH_4^+ durch freies Ammonium verunreinigt war. Durch freies Ammonium im caged NH_4^+ könnte es bei der IR-Differenzspektroskopie bereits vor der Ammoniumfreisetzung zur Ammoniumbindung durch die Na,K-ATPase kommen und eventuelle Zustandsänderungen am Enzym könnten so nicht mehr beobachtet werden. Da bei der IR-Differenzspektroskopie allerdings Proteinkonzentrationen von 1 mM vorliegen, würde eine Verunreinigung des caged NH_4^+ durch 10 % freies Ammonium eine Detektion der Zustandsänderung am Enzym nicht verhindern. Auch durch die Bindung des caged NH_4^+ an die Na,K-ATPase könnten Zustandsänderungen am Enzym hervorgerufen werden, die nach der Ammoniumfreisetzung durch die IR-Differenzspektroskopie nicht mehr detektierbar wären. Da aber davon ausgegangen werden kann, daß das Ammonium von der Na,K-ATPase okkludiert wird und die Wahrscheinlichkeit als gering erachtet wird, daß es zu einer Okklusion des caged NH_4^+ kommt, sollte die caged NH_4^+ -Bindung an das Enzym zu keiner Verhinderung der Detektion der NH_4^+ -Okklusion fähig sein dürfen.

3.2.2 Ouabain-Bindung an die Na,K-ATPase

Der Klärung der Frage, ob eine Phosphorylierung des Ouabain-Enzym-Komplex möglich ist, geht die Wahl der geeigneten Bedingungen zur Bildung des Ouabain-Enzym-Komplexes voraus. Während die Überprüfung der Phosphorylierung mittels der IR-Differenzspektroskopie stattfand, wurde die Wahl der geeigneten Bedingungen zur Bildung des Ouabain-Enzym-Komplexes mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen der FITC-Na,K-ATPase ermittelt. Ouabain bindet in Anwesenheit von Mg^{2+} hochaffin an die Na,K-ATPase (Hansen et al., 1984). Zur Klärung der Frage ob dieser Ouabain-Enzym-Komplex phosphoryliert werden kann, ist es entscheidend, den Einfluß von Na^+ auf die Ouabain-Enzym-Bindung zu verstehen. Um einen möglichen Einfluß der Na^+ -Konzentration auf die Oua-

bain-Bindung zu untersuchen, wurden Fluoreszenzmessungen mittels FITC-Na,K-ATPase durchgeführt. Die FITC-Fluoreszenzintensität der Na,K-ATPase wird durch die Bindung von Ouabain vermindert (Hegyvary und Jørgensen, 1981). Diese Intensitätsunterschiede sind auf einen statischen Lösungsprozeß durch Ouabain zurückzuführen. Weder die Fluoreszenzabklingzeiten noch die pK_a -Werte des kovalent gebundenen Fluorophors werden durch die Ouabain-Bindung beeinflusst (Grell et al., 1994, Lewitzki et al. 1998). Zur Untersuchung des Einflusses von Na^+ auf die hochaffine Ouabain-Bindung an das FITC-Enzym wurden drei verschiedene Na^+ -Konzentrationen gewählt (Abb. 3.26).

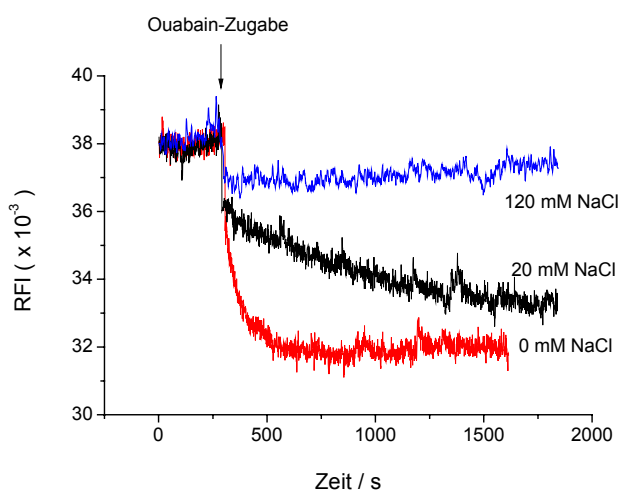


Abb. 3.26: Ouabain-Bindung (0,2 mM) an die FITC-Na,K-ATPase (0,3 μ M) in 10 mM Imidazol/HCl, 0,25 mM CDTA und 3,25 mM $MgCl_2$ pH 7,5 in Abwesenheit und in Anwesenheit verschiedener NaCl-Konzentrationen: Gezeigt ist die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität der Emission bei 518 nm ($\lambda_{exc} = 495$ nm) und 25°C. Der Pfeil markiert die Zugabe der konzentrierten Ouabain-Lösungen, die zu einer Verdünnung der Probe führt (Blaue Linie zeigt nur Verdünnungseffekt).

Während ohne Na^+ und bei der Anwesenheit von nur 20 mM Na^+ die hochaffine Ouabain-Bindung beobachtet wurde, war diese bei 120 mM Na^+ nicht mehr zu detektieren. Des Weiteren fiel auf, daß bei 20 mM Na^+ die Ouabain-Bindung wesentlich langsamer verlief als ohne Na^+ . Um also sicherzustellen, daß ein Ouabain-Enzym-Komplex gebildet wird, darf höchstens 20 mM Na^+ im Reaktionsmedium zugegen sein. Hintergrund dessen ist die Tatsache, daß zur Phosphorylierung des Enzyms die Anwesenheit von Na^+ und Mg^{2+} zwingend erforderlich ist. Zur Durchführung der IR-Differenzmessungen wird also eine Na^+ -Konzentration von 20 mM gewählt. Diese Konzentration reichte aus, um nach der ATP-Freisetzung Differenzspektren der E2P-Bildung zu erzielen (Abb. 3.15 (B)). Da standardmäßig aber eine Na^+ -Konzentration von 120 mM zur Erzeugung der Differenzspektren der E2P-Bildung verwendet wurde, sollte hier auch überprüft werden, wie lange der Enzym-Ouabain-Komplex nach der Zugabe von 120 mM Na^+ stabil bleibt. Dazu wird der Ouabain-FITC-Enzym-Komplex vorgelegt und NaCl hinzugegeben (Abb. 3.27). Etwa 100 Mi-

nuten nach der Na^+ -Zugabe ist noch die Hälfte des Ouabain-FITC-Enzym-Komplexes vorhanden. Da bei der IR-Spektroskopie aufgrund der Notwendigkeit der Trocknung des Probenraums etwa 60 min vom Zeitpunkt der Probenpräparation bis zum Zeitpunkt der Messung vergehen, liegt zum Zeitpunkt der IR-Messung bei 120 mM Na^+ kein vollständiger Enzym-Ouabain-Komplex mehr vor.

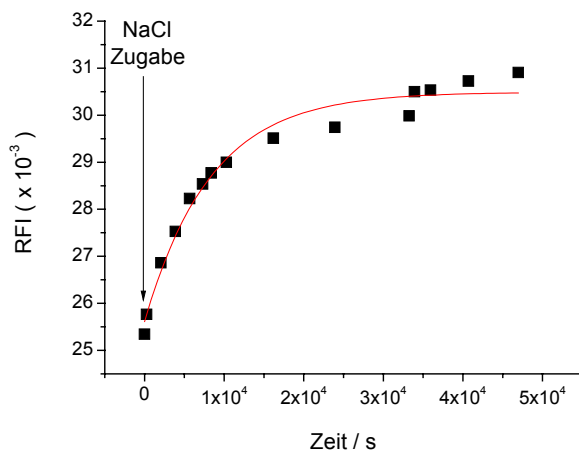


Abb. 3.27: Dissoziation des Ouabains von dem vorgelegten FITC-Na,K-ATPase-Ouabain-Komplex nach Na^+ -Zugabe. Reaktionsmedium: 10 mM Imidazol/HCl, 0,25 CDTA und 3,25 mM MgCl_2 pH 7,5, 0,3 μM Enzym, 0,2 mM Ouabain und 120 mM NaCl nach der Zugabe. Gezeigt ist die Zeitabhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität bei 25°C. Die Anpassung mit einer monoexponentiellen Funktion ergibt eine Zeitkonstante von 8300 Sekunden.

Dementsprechend kann unter diesen Bedingungen auch nicht die Phosphorylierungsfähigkeit des Enzym-Ouabain-Komplexes überprüft werden (vgl. Abb. 3.15 (B)).

3.2.3 Überprüfung der Einsatzfähigkeit des N^9 -NPE-caged ATP zur Untersuchung der Na,K-ATPase

Eine Besonderheit des NPE-caged ATP ist die Eigenschaft, daß es an die Na,K-ATPase bindet (Forbush, 1984). Dabei handelt es sich um eine Bindung an die Nukleotidbindungsstelle der Na,K-ATPase. Das heißt, die ATP-Freisetzung erfolgt nach Photolyseblitz an dieser Bindungsstelle. Aufgrund der chemischen Struktur des NPE-caged ATP (Abb. 3.21) ist möglicherweise davon auszugehen, daß eine andere Verknüpfung der Schutzgruppe mit dem ATP, nämlich am Adeninrest, zu einem besseren Schutz vor der Bindung an die Nukleotidbindungsstelle des Enzyms führt. Diese Idee ist im N^9 -NPE-caged ATP (Abb. 3.21) realisiert. Die Frage nach der Richtigkeit dieser Annahme wurde mittels der Durchführung von Bindungsstudien an die Na,K-ATPase überprüft. Da im N^9 -NPE-caged ATP das γ -Phosphat ungeschützt vorliegt, stellt sich die Frage, ob diese Verknüpfung mit der Schutz-

gruppe einen effektiven Schutz vor der Hydrolyse des ATP bietet. Diese Frage wurde anhand von Aktivitätsstudien beantwortet.

Aktivitätsstudien

Mit Hilfe von Aktivitätsuntersuchungen wird hier die grundsätzliche Eignung des N⁹-NPE-caged ATP als geschütztes ATP überprüft. Dabei wird der Schutz vor enzymatischer Hydrolyse durch die eingeführte Schutzgruppe sowie die Abspaltung der Schutzgruppe durch Photolyse untersucht. Die enzymatische Aktivität des Schweinenierenenzym wurde mit ATP, N⁹-NPE-caged ATP und NPE-caged ATP gemessen. Diese Bestimmung erfolgte mittels des durch die ATPase freigesetzten P_i aus ATP (vgl. Kapitel 2.1.5.1). Die Aktivität der ATPase ergibt sich schließlich aus der ermittelten Steigung der Kurve. Abb. 3.28 zeigt die Kinetik der P_i-Bildung der unterschiedlichen ATP-Derivate.

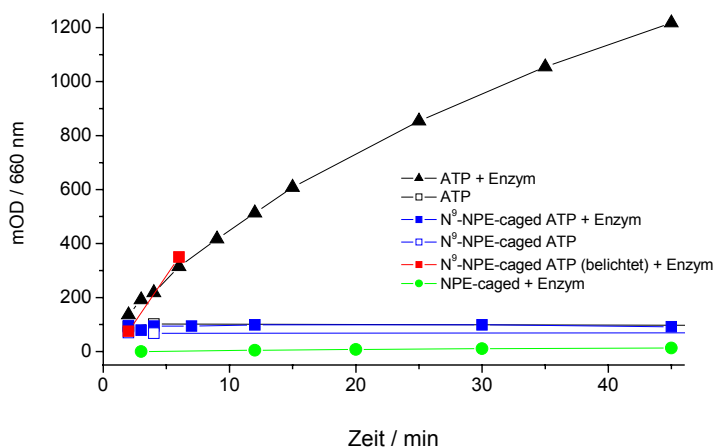


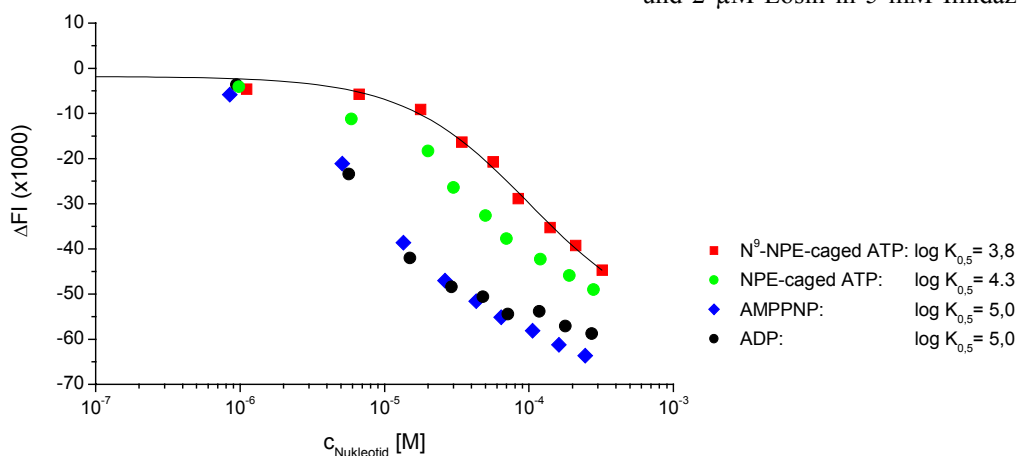
Abb. 3.28: Kinetik der P_i-Bildung verschiedener ATP Derivate. Konzentration ATP, NPE-caged ATP = 3 mM, (25°C), N⁹-NPE-caged ATP = 1 mM (37°C). Belichtung 90 Minuten mit Xenon-Lampe (250 W) bei 12°C.

Während bei ATP ein nahezu kontinuierlicher Anstieg der Konzentration an freiem Phosphat zu verzeichnen ist, kann sowohl bei N⁹-NPE-caged ATP als auch bei NPE-caged ATP keine Freisetzung von P_i detektiert werden. Diese experimentellen Befunde zeigen, daß es zu keiner hydrolytischen Spaltung des N⁹-NPE-caged ATP unter den angegebenen Bedingungen durch die Na,K-ATPase kommt. Der Substratschutz durch diese Schutzgruppe ist also wirksam. Bei der Photolyse des N⁹-NPE-caged ATP hingegen kommt es zu einer erfolgreichen Abspaltung der Schutzgruppe und zur Freisetzung des ATP, welches durch die Na,K-ATPase zu P_i und ADP hydrolysiert wird. Somit ist das N⁹-NPE-caged ATP grundsätzlich zur Untersuchung der Na,K-ATPase geeignet.

Nukleotid-Bindungsstudien

Die Affinitäten der verschiedenen geschützten ATP-Derivate wurden mittels Bindungskompetition zwischen Eosin und den entsprechenden Derivaten ermittelt. Eosin bindet in Gegenwart von Na^+ hochaffin an die Nukleotidbindungsstelle der Na,K-ATPase. Die Dissoziationskonstante des Na,K-ATPase-Eosin-Komplexes beträgt 10^{-6} M ($\log K_{\text{Eosin}} = 6,0$, Esmann und Fedosova, 1997). Die Eosinbindung kann als Fluoreszenzintensitätserhöhung gegenüber dem freien Eosin detektiert werden. Abb. 3.29 zeigt die Kompetitionstitration des Na,K-ATPase-Eosin-Komplexes mit vier verschiedenen Nukleotiden. Zu dem vorgelegten Na,K-ATPase-Eosin-Komplex wurden verschiedene Nukleotide hinzutitriert. Dadurch erfolgte eine Verdrängung des Eosins aus dem Komplex. Verglichen wurden die Konzentrationen der aufgeführten Nukleotide, bei denen die Hälfte des Eosins aus dem Na,K-ATPase-Eosin-Komplex verdrängt worden war ($K_{0,5}$ -Werte).

Abb. 3.29: Kompetitionstitration des Na,K-ATPase-Eosin-Komplexes mit verschiedenen Nukleotiden. $1,5 \mu\text{M}$ Schweinenierenenzym und $2 \mu\text{M}$ Eosin in 5 mM Imidazol/HCl pH



Die Affinitäten von ADP und AMPPNP an die ATPase sind etwa gleich groß ($\log K_{0,5} = 5,0$). Diese Werte decken sich mit den Resultaten aus kalorimetrischen Studien (Stolz et al., 2003). Das NPE-caged ATP bindet etwa $5,5 \times$ und das $\text{N}^9\text{-NPE-caged ATP}$ circa $16 \times$ schwächer als ADP. Damit wird das $\text{N}^9\text{-NPE-caged ATP}$ etwa $3 \times$ schwächer gebunden als das NPE-caged ATP. Aufgrund der schwächeren Wechselwirkung des $\text{N}^9\text{-NPE-caged ATP}$ im Vergleich zum NPE-caged ATP mit der Nukleotidbindungsstelle der Na,K-ATPase kann davon ausgegangen werden, daß Zustandsänderungen, die bei der Bindung des ATP,

welches nach Abspaltung der N⁹-NPE-Schutzgruppe freigesetzt wurde, mittels der IR-Differenzspektroskopie detektierbar sind.

3.3 Eigenschaften der Na,K-ATPase in IR-Proteinfilmen

Bei der IR-Spektroskopie ist es aufgrund der Überlagerung des Amid I-Bereichs mit einer Deformationsschwingung des H₂O bei 1650 cm⁻¹ (Venyaminov & Prendergast, 1997) notwendig, hochkonzentrierte Proteinproben mit einer optischen Weglänge von maximal 10 µm zu präparieren. Diese spezielle Probenform, in der die Proteinkonzentration etwa 1 mM beträgt, wird als sogenannter „Proteinfilm“ bezeichnet. Zusätzlich ist es bei der IR-Probenpräparation zur Erhaltung der enzymatischen Aktivität der Na,K-ATPase erforderlich, Glycerin als stabilisierendes Kosolvent zu verwenden. Aufgrund dieser speziellen Bedingungen ist es naheliegend, die Frage zu stellen, ob sich bestimmte Eigenschaften des Enzyms in diesen Proteinfilmen ändern. Zur Beantwortung dieser Frage wurden verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften der Na,K-ATPase unter diesen Bedingungen untersucht. Da diese spezielle Probenform aufgrund ihrer Konsistenz nur schwierig zu handhaben ist, gestalteten sich diese Untersuchungen als äußerst aufwendig.

3.3.1 Viskositätsmessungen in hochkonzentrierter Enzymsuspension

Aufgrund der augenscheinlich hohen Viskosität der IR-Proteinfilme und den daraus erwarteten Auswirkungen, z. B. auf die spezifische Aktivität der Na,K-ATPase, wurde die Viskosität von hochkonzentrierten Enzymsuspensionen untersucht. Abb. 3.30 zeigt die Viskositäten der Puffermedien ohne Enzym in Abhängigkeit von der Scherspannung bei 25° und 15°C. Dabei war keine Abhängigkeit der Viskosität von der Scherspannung detektierbar. Durch ein solches Verhalten zeichnen sich die sogenannten „Newtonschen Flüssigkeiten“ aus (Kulicke, 1986; Rheologica instruments, 2005). Anhand von Abb. 3.30 (A) und (B) ist eine starke Temperaturabhängigkeit der Viskosität erkennbar. Die Viskosität des Puffermediums bei 25°C betrug $1,75 \cdot 10^{-3}$ Pa s. In der Literatur wird ein Wert von $1,54 \cdot 10^{-3}$ Pa s bei 15°C für eine 20 %ige (w/w) Glycerin-Wassermischung angegeben. Der hier detektierte, um 12 % höhere Wert ist wahrscheinlich auf die hohe Salzkonzentration von 150 mM Hepes/Tris zurückzuführen. Abb. 3.31 zeigt die Viskositäten der Na,K-ATPase in Suspension bei unterschiedlichen Konzentrationen. Dabei ist zu erkennen, daß sich die Eigenschaften der Enzymsuspension mit steigender Proteinkonzentration verändern. Während sich die niederkonzentrierte Suspension wie eine Newtonsche Flüssigkeit verhält (Abb.

3.30 (A)), ist dies bei der hochkonzentrierten Suspension nicht mehr der Fall (Abb. 3.31 (B)).

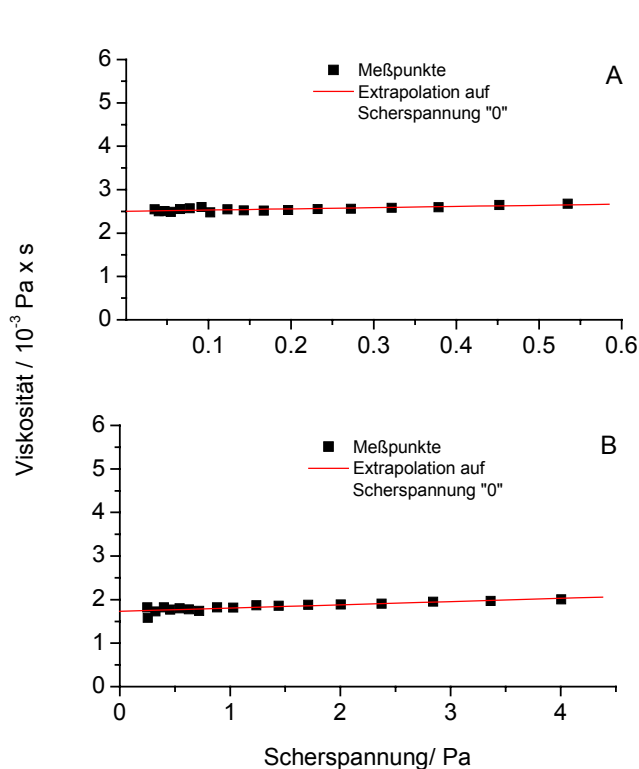


Abb. 3.30: Viskositäten des verwendeten Puffermediums, gemessen bei zwei verschiedenen Temperaturen; 150 mM HEPES/Tris pH 7,5 und 20 % (w/w) Glycerin (A) 15°C (B) 25°C.

Die Viskosität bei der hochkonzentrierten Enzymsuspension ist stark abhängig von der Scherrate. Ein solches Verhalten ist unter anderem typisch für die Zerstörung von großen geordneten Aggregaten oder für die Orientierung von langen kettenförmigen Polymersträngen aufgrund der Reibung (Kulicke, 1986). Beides könnte unter diesen Meßbedingungen der Fall sein. Von Interesse ist allerdings die Viskosität des Meßsystems im Ruhezustand, also bei einer Scherspannung von 0. Um Daten dieser sogenannten „apparenten Viskosität“ zu erhalten, wird die scherspannungsabhängige Viskosität auf eine Scherspannung von 0 extrapoliert. Dies ist anhand von Abb. 3.31 (C) mittels einer biexponentiellen Extrapolation ausgeführt. Der auf eine Scherspannung von 0 extrapolierte Viskositätswert der Enzymsuspension einer Konzentration von 18,7 mg/ml (120 μ M) beträgt $115 \cdot 10^{-3}$ Pa·s. Eine lineare Hochrechnung dieses Wertes auf eine Enzymkonzentration von 1 mM, wie dies bei den IR-Filmproben der Fall ist, ergibt unter Berücksichtigung des Blindwertes des Puffers ($2,5 \cdot 10^{-3}$ Pa s) einen Wert von $940 \cdot 10^{-3}$ Pa s bei 15°C. Dies entspricht im Vergleich der Viskosität einer 96 % igen (w/w) Glycerin/Wassermischung bei einer Temperatur von 15°C (Segur und Oberstar, 1951).

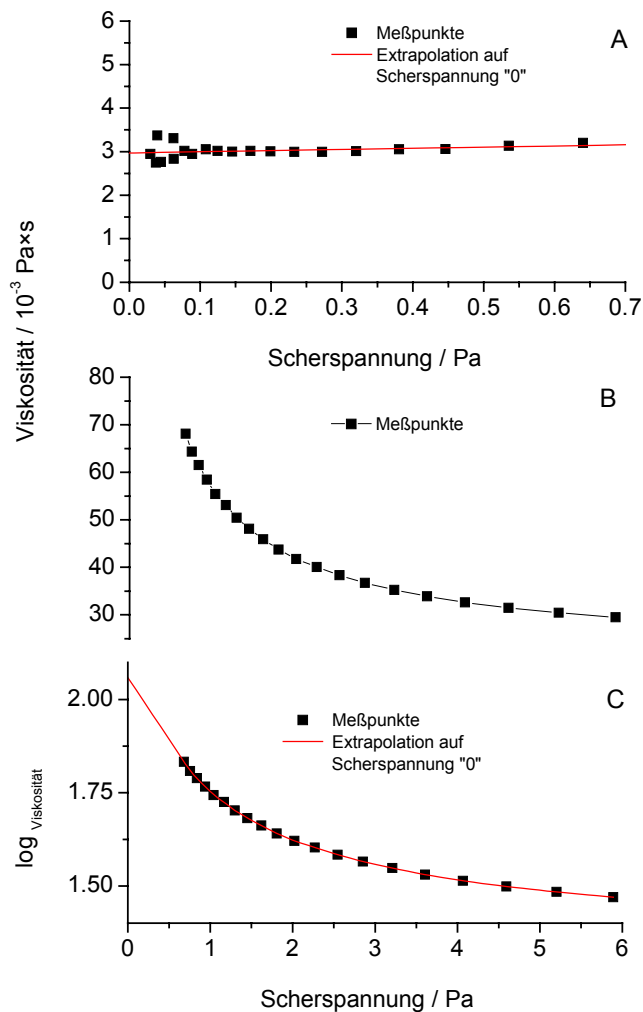


Abb. 3.31: Viskositäten der Na,K-ATPase in Suspension bei unterschiedlichen Konzentration, Schweinenierenenzym in 150 mM Hapes/Tris pH 7,5 und 20 % (w/v) Glycerin. **(A)** Probe enthält 5,0 mg/ml (32 μ M) Enzym, gemessen bei 25°C **(B)** Probe enthält 18,6 mg/ml (120 μ M) Enzym, gemessen bei 15°C **(C)** dieselbe Probe wie (B) aber halblogarithmische Auftragung.

3.3.2 Aktivitätsuntersuchungen in Abhängigkeit von der Viskosität

Aufgrund der sehr hohen Viskosität der Proteinfilme wird die spezifische ATPase-Aktivität der Na,K-ATPase in Abhängigkeit von der Viskosität untersucht. Zur Variation der Viskosität wurden verschieden konzentrierte Sucroslösungen verwendet. Auf eine Vermessung von Sucroslösungen oberhalb von 50 % wurde wegen der schlechten Handhabbarkeit dieser Lösungen verzichtet. In Abb. 3.32 ist eine Viskositätsabhängigkeit der spezifischen ATPase-Aktivität dargestellt. Bereits bei einer Viskosität von $9,7 \cdot 10^{-3}$ Pa s ist die spezifische Aktivität der Na,K-ATPase auf etwa 4 % der Ausgangsaktivität abgesunken. Um eine bessere Vorstellung in Bezug auf absolute Zahlenwerte der spezifischen Aktivität in Annäherung an die IR-Probenbedingungen zu erhalten, wurden Aktivitätsmessungen in einem den IR-Proben äquivalenten Medium durchgeführt.

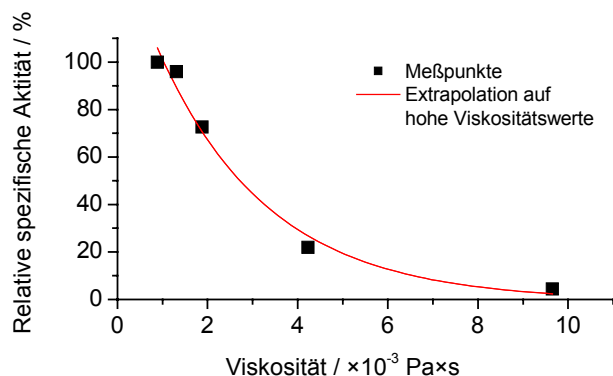


Abb. 3.32: Viskositätsabhängigkeit der spezifischen ATP-Hydrolyseaktivität des Schweinenierenenzym bei 30°C. Die Bedingungen entsprechen dem Standardzymtest (Kapitel 2.1.5.1). Zur Erhöhung der Viskosität wurden den Medien die in der obenstehenden Tabelle (Handbook of Biochemistry, 1970) aufgeführten Mengen an Sucrose hinzugegeben. Der Beitrag der Salze zur Viskosität ist vernachlässigt.

Die so erhaltenen Werte sollen als grober Anhaltspunkt im Vergleich zu den durch die IR-Spektroskopie erhaltenen Aktivitätsdaten dienen. Wie anhand von Abb. 3.33 zu erkennen ist, sinkt die spezifische ATP-Hydrolyseaktivität unter den gewählten Bedingungen bereits bei 5°C auf einen absoluten Wert von $0,3 \mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Unter Berücksichtigung des Umstandes, daß die Viskosität dieses Mediums etwa bei $2 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$ liegt, kommt man unter Zuhilfenahme der in Abb. 3.32 abgeschätzten Viskositätsabhängigkeit der ATP-Hydrolyseaktivität (monoexponentieller Abfall) auf einen Stoffumsatz im Bereich von $\text{nmol Pi mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Der IR-spektroskopisch ermittelte Wert der spezifischen ATP-Hydrolyseaktivität bei 5°C betrug $9 \text{ nmol Pi mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (vgl. 2.1.14).

Sucrose / % (w/w)	Viskosität / $\cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$
4	0,89
17	1,31
25	1,88
40	4,23
50	9,65

Tab 3 Zuordnung der Viskosität zu versch. Konzentrationen Sucrose (30°C)

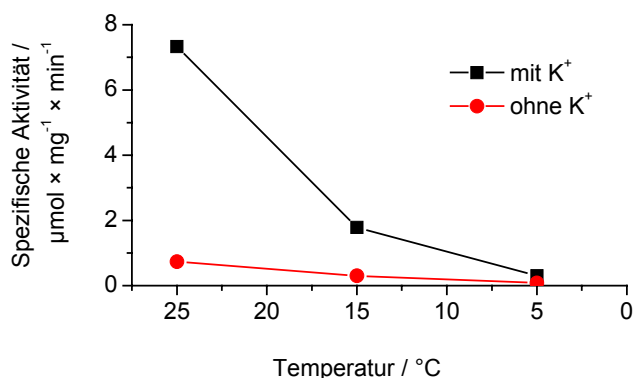


Abb. 3.33: Temperaturabhängigkeit der spezifischen ATP-Hydrolyseaktivität in einem den IR-Proben äquivalenten Puffermedium. Schweinenierenenzym (40 nM) in 150 mM HEPES/Tris pH 7,5, 1 mM DTT, 20 % (w/v) Glycerin (entspricht einer Viskosität von $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$ bei 20°C), mit oder ohne 20 mM KCl, 3 mM MgCl_2 und 130 mM NaCl. Die weiteren Details der Versuchsführung entsprechen dem Standardzymtest (Kapitel 2.1.5.1).

Das heißt, nach dieser groben Abschätzung ist die ermittelte spezifische ATP-Hydrolyseaktivität in den IR-Proben realistisch. In der Zusammenfassung ergeben sich zwei wesentliche Faktoren, von denen die spezifische Aktivität abhängt. Zum einen ist dies die Viskosität und zum anderen die Temperatur. Die Abschätzung der spezifischen Aktivität der Na,K-ATPase in den IR-Proteinfilmern mittels des Standardaktivitätstests stimmt mit den IR-spektroskopisch ermittelten Werten in den Proteinfilmern gut überein.

3.3.3 Abhängigkeit der Kinetik der Eosin-Bindung von der Viskosität

Wie in Kapitel 3.2.2 erläutert, stellt die Eosin-Bindung an die Na,K-ATPase ein der ATP-Bindung verwandtes System dar. Aufgrund der starken Viskositätsabhängigkeit der spezifischen Aktivität der Na,K-ATPase wird auch eine Viskositätsabhängigkeit der Kinetik der Eosin-Bindung an das Enzym erwartet. Die Abhängigkeit der Kinetik der Eosin-Bindung von der Viskosität wird hier mittels Stopped-flow-Messungen untersucht (Kapitel 2.2.3.2). Die dabei erhaltenen Ergebnisse lassen sich auf die Kinetik der ATP-Bindung an die Na,K-ATPase übertragen. Zur Variation der Viskosität wurden verschieden konzentrierte Sucroslösungen verwendet. Abb. 3.34 zeigt die Viskositätsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten (k_{on}) der Eosin-Bindung an die Na,K-ATPase. Vergleicht man die Tendenz der hier detektierten Viskositätsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Eosinbindung an die Na,K-ATPase mit der durch die Viskosität bedingte Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten bei einer diffusionskontrollierten Reaktion, so ergibt sich eine erstaunliche Parallele. Die Beträge der Konstanten nehmen etwa mit der Beziehung $1/x$ ab, wobei x die Viskosität darstellt. Die Abschätzung der viskositätsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten einer diffusionskontrollierten Reaktion ergibt sich durch das Einsetzen der Stokes-Einstein Beziehung in die Gleichung von Smoluchowski (Adam et al., 1995).

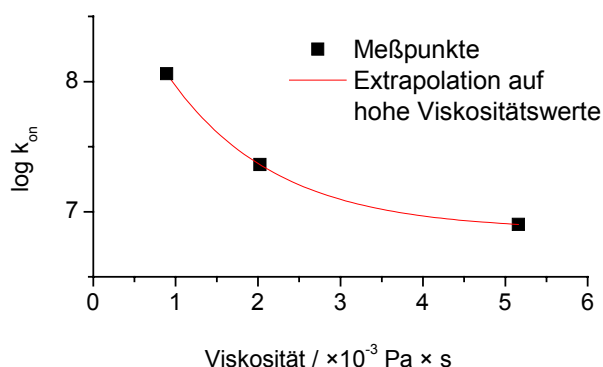


Abb. 3.34 Viskositätsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten (k_{on}) der Eosin-Bindung an die Na,K-ATPase bei 25°C. Schweineierenenzym (0,15 mM) in 10 mM HEPPEs/Tris pH 7,5, 30 mM NaCl. (Eosinkonzentration: 0,15 – 2,85 μ M, $\lambda_{em} > 520$ nm, $\lambda_{exc} = 495$ nm)

Viskositäten: 0 % Sucrose = 0,89 $\cdot 10^{-3}$ Pa s
 25 % Sucrose = 2,12 $\cdot 10^{-3}$ Pa s
 40 % Sucrose = 5,16 $\cdot 10^{-3}$ Pa s

Im Fall der Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten (k_{on}) der Eosin-Bindung an die Na,K-ATPase heißt das, daß bei einer Viskosität von $1000 \cdot 10^{-3}$ Pa s ein k_{on} von $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ resultiert. Die Viskosität von $1000 \cdot 10^{-3}$ Pa s entspricht dabei dem in den IR-Proteinfilmen abgeschätzten Wert der Viskosität (Kapitel 3.3.1) In der Zusammenfassung läßt sich festhalten, daß es einen großen Einfluß der Viskosität auf die Kinetik der Eosin-Bindung und somit auf die Kinetik der ATP-Bindung an die Na,K-ATPase gibt. Weitere Beispiele für diffusionskontrollierte Reaktionen sind die Komplexbildung von Metallen wie Na^+ bzw. K^+ an die Transportproteine Monactin bzw. Valinomycin. Dabei ist der Zahlenwert von k_{on} für die Na^+ - bzw. K^+ -Bindung an Monactin bzw. Valinomycin mit $3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) in der gleichen Größenordnung wie bei der Eosin-Bindung bei niedrigster Viskosität an die Na,K-ATPase.

3.3.4 Kalorimetrische Untersuchungen an der Na,K-ATPase in Proteinfilmen

In diesem Abschnitt werden Eigenschaften der Na,K-ATPase in Suspension, im Sediment nach Ultrazentrifugation und in hochkonzentrierten Proteinfilmen in Bezug auf die thermische Denaturierung gegenübergestellt. Die thermische Denaturierung wird hier als Kriterium zur Charakterisierung des Zustands der Na,K-ATPase eingesetzt. Es soll somit der Frage nachgegangen werden, ob es aufgrund der Dehydratisierung der Proteinprobe zu signifikanten Unterschieden im thermischen Verhalten zwischen den verschiedenen Probenpräparationen kommt. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Proteinfilmen, wird auch bei den kalorimetrischen Untersuchungen ein möglicher Einfluß dieses Parameters untersucht. Ausgangspunkt sollen hier die, vor der Proteinfilmpräparation herrschenden, niedrigen Salzkonzentrationen sein. Abb. 3.35 zeigt die Thermogramme der Na,K-ATPase in Suspension und im Sediment nach Ultrazentrifugation bei niedrigen Salzkonzentrationen. Die Denaturierungsenthalpie beträgt in beiden Fällen etwa 1,8 MJ/mol. Dies ist konsistent mit vorher durchgeführten Studien (Stolz et al, 2003). Die höhere Denaturierungstemperatur im Sediment kann hauptsächlich auf ein niedrigeres Verhältnis von Wasser zu Protein im Vergleich zur Suspension zurückgeführt werden. Die Denaturierung der Na,K-ATPase ist irreversibel.

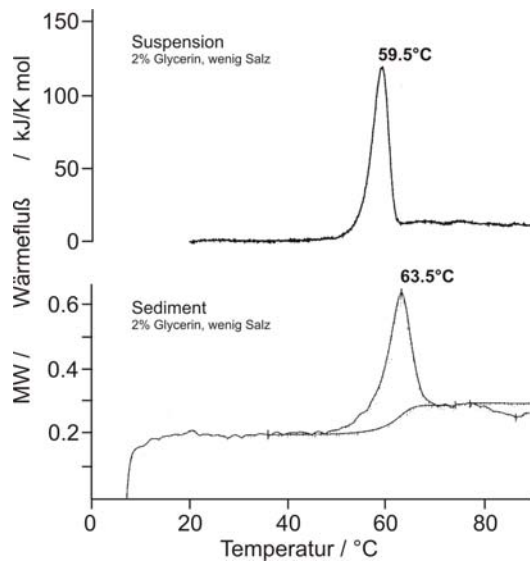


Abb. 3.35: DSC-Thermogramme der Na,K-ATPase, aufgenommen bei niedriger Salzkonzentration in Suspension (oben) und im Sediment (unten). Schweineierenenzym ($c_{\text{Suspension}} = 15 \mu\text{M}$, $c_{\text{Sediment}} = \sim 120 \mu\text{M}$) in 10 mM HEPES/Tris pH 7,27, 13 mM NaCl, 0,8 mM MgCl_2 , 0,2 mM EDTA und 2 % (w/v) Glycerin.

Um sich sukzessive den unter den Proteinfilmern herrschenden Bedingungen anzunähern, erfolgte als nächster Schritt die Erhöhung der Salzkonzentration.

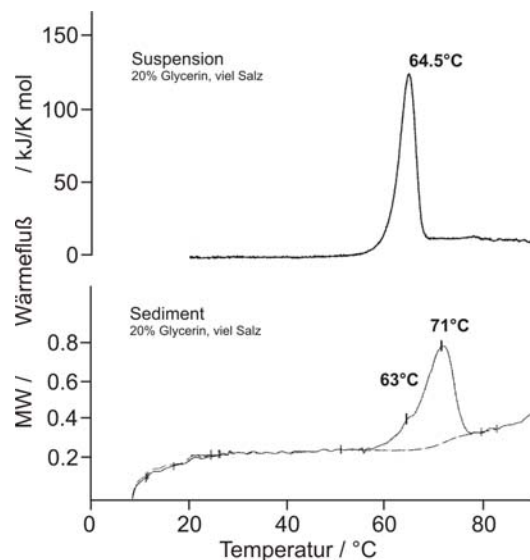


Abb. 3.36: DSC-Thermogramme der Na,K-ATPase, aufgenommen bei hoher Salzkonzentration in Suspension (oben) und im Sediment (unten). Schweineierenenzym ($c_{\text{Suspension}} = 15 \mu\text{M}$, $c_{\text{Sediment}} = \sim 120 \mu\text{M}$) in 100 mM HEPES/Tris pH 7,27, 130 mM NaCl, 8 mM MgCl_2 , 2 mM EDTA und 20 % (w/v) Glycerin.

Abb. 3.36 zeigt die Thermogramme der Suspension und des Sediments, welche bei hohen Salz- und Glycerinkonzentrationen aufgenommen wurden. Im Vergleich zur Niedrigsalzmessungen entspricht das einer um 5°C höheren Übergangstemperatur, welche vorwiegend

dem erhöhten Gehalt an Glycerin zugeordnet wird. Das Sediment hingegen wird durch eine Hauptumwandlung (71°C) und einen Nebenumwandlung (63°C) charakterisiert. Der Gesamtübergang ist wesentlich breiter als bei der Suspension. Es wird angenommen, daß die höhere Denaturierungstemperatur des Hauptübergangs im Sediment im wesentlichen auf ein niedrigeres Verhältnis von Wasser zu Protein im Vergleich zur Suspension zurückgeführt werden kann. Wird eine Enzymsuspension mit niedrigem Salzgehalt (Abb. 3.35, oben) mittels Vakuum bei 10°C auf eine Konzentration von etwa 1 mM gebracht, so erhält man die bei der IR-Spektroskopie verwendeten hochkonzentrierten Proteinfilm. Das Thermogramm einer solchen hochkonzentrierten Filmprobe ist in Abb. 3.37 dargestellt.

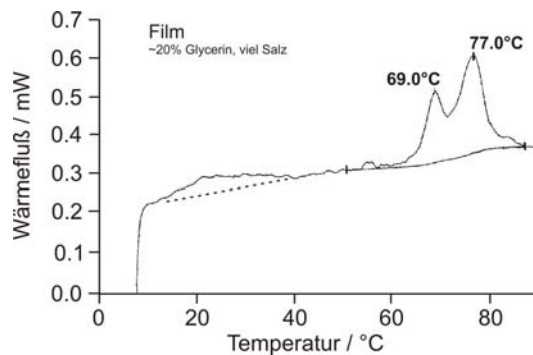


Abb. 3.37: DSC-Thermogramm der Na,K-ATPase, aufgenommen bei hoher Salzkonzentration in hochkonzentrierter Filmform. Schweinenierenenzym 1 mM in 100 mM HEPES/Tris pH 7,27, 130 mM NaCl, 8 mM MgCl₂, 2 mM EDTA und 20 % (w/v) Glycerin.

Dabei können klar zwei getrennte Übergänge beobachtet werden. Die Gesamtenthalpie des thermischen Übergangs ist ähnlich dem in Suspension beobachteten Wert. Eine Erklärung für diese beiden getrennten Übergänge ist die Existenz von zwei Proteinbereichen unterschiedlichen Hydratationsgrades. Diese zwei Proteinbereiche könnten in den extrazellulären Proteindomänen der Na,K-ATPase lokalisiert sein. Die Ursache für die wesentlich größeren Wechselwirkungen zwischen diesen Proteindomänen wird in der höheren Packungsdichte im Proteinfilm vermutet. Die hohe Übergangstemperatur wäre dementsprechend demjenigen Übergang mit dem geringeren Hydratationsgrad zuzuordnen. Zusätzlich ist ein weiterer Übergang bei etwa 20°C, der allerdings reversibel ist, zu beobachten. Dieser ist möglicherweise der Lipidmatrix zuzuordnen. Auch ein Verschwinden der Kooperativität im Denaturierungsprozeß zwischen α - und β -Untereinheit wäre eine Erklärung der beiden benachbarten Übergänge. Die Flächenverhältnisse zwischen den beiden Übergängen bei 77°C und 69°C entsprechen allerdings nicht dem Verhältnis der Molekulargewichte der beiden Untereinheiten.

4 Diskussion

Ein primäres Ziel dieser Arbeit war die methodische Entwicklung der reaktionsinduzierten und zeitaufgelösten FTIR-Differenzspektroskopie für die Na,K-ATPase. Es wird hier zum ersten Mal eine umfassende IR-spektroskopische Beschreibung der verschiedenen Teilreaktionen innerhalb des E1/E2-Reaktionsmodells der Na,K-ATPase präsentiert. In diesem Zusammenhang ist besonders auf die erfolgreiche Etablierung eines Probenwechslersystems für den erhöhten Probandurchsatz zur Messung von einzelnen Proben hinzuweisen, durch welche die umfangreiche Bearbeitung dieses Themengebietes erst ermöglicht wurde. Die nachfolgende Diskussion gliedert sich in drei Abschnitte. Als erstes werden die für die unterschiedlichen Teilreaktionen erhaltenen IR-Differenzspektren bezüglich Sekundärstrukturänderungen, Protonierungs- und Phosphorylierungsreaktionen miteinander verglichen. Dabei soll auch auf den Unterschied zwischen den in H₂O und D₂O aufgenommenen Differenzspektren eingegangen werden. Der zweite Abschnitt der Diskussion stellt einen Vergleich der IR-Differenzspektren der Na,K-ATPase und Ca-ATPase dar. Auch hierbei werden Sekundärstrukturänderungen, Protonierungs- und Phosphorylierungsreaktionen innerhalb des E1/E2-Reaktionsmodells miteinander verglichen. Im dritten Teil werden signifikante physikalische und chemische Eigenschaften der hochkonzentrierten IR-Proteinfilm im Vergleich zu verdünnten Proteinsuspensionen diskutiert.

4.1 Der IR-spektroskopische Vergleich von Teilreaktionen der Na,K-ATPase

Grundlage der mechanistischen Untersuchung stellt das erweiterte Albers-Post Schema dar (Abb. 4.1). Durch eine spezifische Wahl der ionischen Zusammensetzung des Reaktionsmediums kann eine bevorzugte Bildung spezieller Intermediate innerhalb des Reaktionszyklus erreicht werden. Bei den mechanistischen Untersuchungen der letzten drei Dekaden gelangten die unterschiedlichsten biochemischen und biophysikalischen Methoden zum Einsatz. Zur Bestimmung von kinetischen Parametern innerhalb des Reaktionszyklus der Na,K-ATPase wurden im wesentlichen drei verschiedene Detektionskonzepte zum Nachweis spezifischer Intermediate verwendet:

1. Fluorimetrische Methoden (Sogenannte „Stopped Flow“ Messungen z. B. unter

Verwendung des potentialabhängigen Farbstoffes RH421 oder FITC, z. B. Forbush und Klodos, 1991 bzw. Grell et al., 1994)

2. Radioaktive Methoden (Sogenannte „Quenched Flow“ oder „Rapid Filtration“ Messungen z. B. unter Verwendung der radioaktiven Isotope [^{32}P]ATP oder [^{32}P], z. B. Nørby et al., 1983 bzw. Post et al., 1975)
3. Elektrische Methoden (Sogenannte „BLM“ (Black lipid membrane) oder elektro-physiologische Messungen, z. B. Nagel et al., 1987 bzw. Hilgemann, 1989)

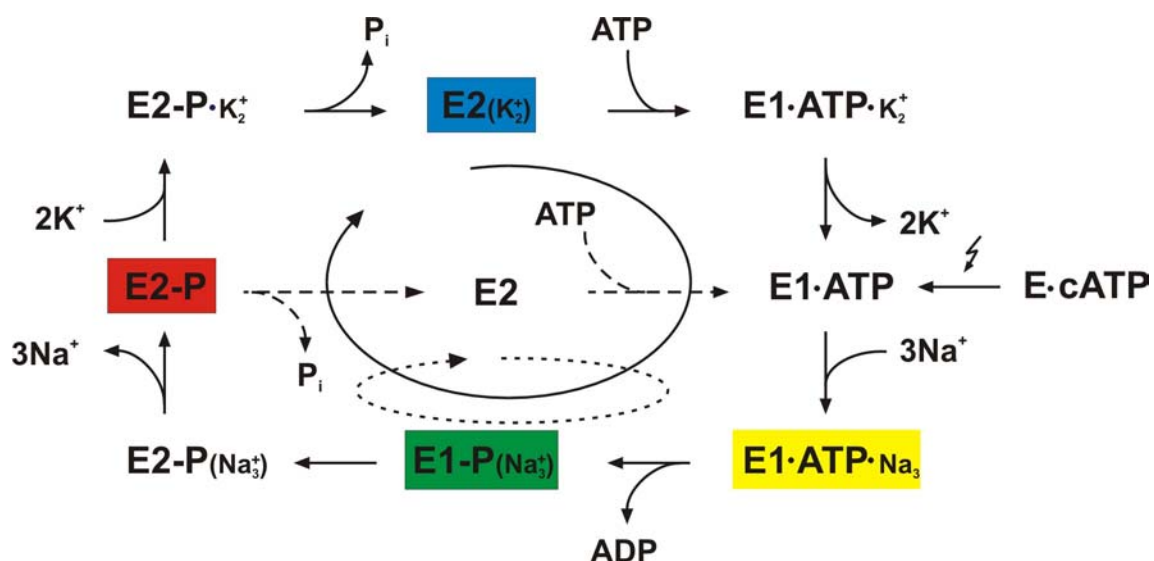


Abb. 4.1: Modifiziertes Albers-Post Schema des Kationentransports der Na,K-ATPase. E: Enzym, E2-P: Kovalente Bindung zwischen E und P, E1-ATP: Nicht-kovalente Bindung zwischen E und ATP, (Na^+), (K^+) symbolisiert die okkludierten Kationen. Die farbig hinterlegten Bezeichnungen geben die jeweils akkumulierten Enzymzustände bei bestimmten Teilreaktionen an. Gelb: ATP-Beladung, grün: E1P-Bildung, rot: E2P-Bildung, blau: Enzymatisch katalysierte ATP-Hydrolyse. E-cATP: caged ATP gebundener Ausgangszustand bei der ATP-Beladung, E1P- und E2P-Bildung.

Bei dem überwiegenden Teil der hier durchgeführten IR-Messungen war es nicht möglich, Differenzspektren transienter Intermediate zeitlich aufzulösen. Auch ein Absenken der Meßtemperatur auf 0°C brachte keine signifikante Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit, so daß die Zeitauflösung des Versuchsaufbaus (65 ms) ausgereicht hätte, transiente Zustände aufzulösen. Durch eine individuelle Auswahl der Reaktionsmedien war es möglich, spezifische Enzym-Zustände zu akkumulieren. Abb. 4.1 zeigt die bei der IR-Differenzspektroskopie angenommenen, akkumulierten Zustände.

Die Geschwindigkeitskonstante der ATP-Bindung wird in der Literatur relativ einheitlich mit einem Wert von etwa $1,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ angegeben (Froehlich et al, 1976). Bei einer Affinität von $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Schuermans Stekhoven et al., 1981) ist davon auszugehen, daß unter den gewählten Bedingungen der $\text{E1} \cdot \text{ATP} \cdot \text{Na}_3^+$ -Zustand akkumuliert. Die Enzymphosphorylierung, die mit der Anwesenheit von Na^+ und Mg^{2+} verknüpft ist, führt je nach Höhe der eingesetzten Na^+ -Konzentration zu verschiedenen Phosphoenzymzuständen. Bei hohen Na^+ -Konzentrationen ($>1000 \text{ mM}$) resultiert der E1P-, während bei niedrigen Na^+ -Konzentrationen ($<130 \text{ mM}$) bevorzugt der E2P-Zustand gebildet wird. In den Proben zur E1P-Bildung ist die Dephosphorylierung des Phosphoenzyms E1P geschwindigkeitsbestimmend (Nørby et al, 1983) und somit kommt es zur E1P-Akkumulierung. In den Proben zur E2P-Bildung hingegen, die in Abb. 4.1 durch den kleinen Zyklus (gestrichelter Kreis) beschrieben wird, ist innerhalb des betrachteten Zeitintervalls die Dephosphorylierung des Phosphoenzyms E2P geschwindigkeitsbestimmend (Nørby et al., 1983, Cornelius et al., 1998) und somit kommt es zur E2P-Akkumulierung. Bei zeitaufgelösten Untersuchungen zur E2P-Bildung gibt es bezüglich des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes in der Literatur unterschiedliche Auffassungen. Während bei Heyse et al. (1994) die Phosphoenzym-Konversion ($\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$) mit einer Ratekonstante von 22 s^{-1} als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt angesehen wird, favorisieren Kane et al. (1997) die Phosphorylierung (Ratekonstante: 180 s^{-1}). Keillor und Jencks (1996) hingegen halten eine konformative Änderung des ATP-gebundenen Intermediats $\text{E} \cdot \text{ATP} \cdot \text{Na}_3^+$ vor dem Phosphorylierungsschritt für geschwindigkeitsbestimmend. Cornelius (1999) hat in diesem Zusammenhang Hinweise auf eine Temperatursensitivität des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes innerhalb der Phosphorylierung. Während bei 5°C die Phosphoenzym-Konversion ($\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$) geschwindigkeitsbestimmend ist, sei dies bei 15°C die Phosphorylierung. Bei der enzymatisch katalysierten ATP-Hydrolyse, die in der Anwesenheit von K^+ abläuft, (Abb. 4.1, durchgezogener Kreis: Großer Zyklus) ist nach übereinstimmender Literaturliteraturaussage der akkumulierende Zustand $\text{E2}_{(\text{K}_2^+)}$. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird hier mit einer Ratekonstante von 65 s^{-1} (24°C) angegeben (Lüpfert et al., 2001).

Der Vorteil der Infrarotspektroskopie liegt vor allem in der Möglichkeit, Sekundärstrukturänderungen sowie Protonierungs- und Phosphorylierungsreaktionen zu detektieren. Als quantitatives Kriterium zum Vergleich von Sekundärstrukturänderungen wird der COBSI-Index (Change of backbone structure and interaction Index) verwendet (Kapitel 2.2.1.8). Dieser Index wird anhand des Amid I-Bereichs (blaue Wellenzahlkennzeichnung in Abb. 4.5) ermittelt. Aussagen über Protonierungs- und Phosphorylierungsreaktionen sowie Mo-

difikationen von Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken werden anhand von drei verschiedenen spektralen Regionen gemacht: 1. 1700 – 1800 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$): Rote Kennzeichnung in Abb. 4.5, 2. 1530 – 1600 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$): Grüne Kennzeichnung in Abb. 4.5 und 3. 1380 – 1430 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$): Schwarze Kennzeichnung in Abb. 4.5.

4.1.1 Nukleotid-Bindung

In Abb. 4.2 und 4.3 werden die Bindungen der drei Nukleotide ADP, ATP und AMPPNP an die Na,K-ATPase gegenüber gestellt. Während ADP und AMPPNP nicht in der Lage sind, das Enzym an Asp 369 zu phosphorylieren, ist dies bei ATP unter bestimmten Bedingungen der Fall. Bezüglich des ATP wurden hier nicht phosphorylierende Bedingungen gewählt.

Sekundärstrukturänderungen

Mit Hilfe des COBSI-Index ist es möglich, die Anzahl der an der Sekundärstrukturänderung beteiligten Aminosäuren zu berechnen. Grundlage dieser Berechnung ist die Annahme eines Molekulargewichtes für die Na,K-ATPase von 154.383 Da und einer Aminosäureanzahl von 1382 (Swiss Prot (2005): A1A1_Pig (α_1), ATNB_Pig (β_1) und ATNG_Bovin (FXVD2)). Bei einem COBSI-Index von $2 \cdot 10^{-4}$ ist bei den oben gemachten Annahmen rein rechnerisch weniger als eine Aminosäure an der Sekundärstrukturänderung im Enzym beteiligt. Der Unterschied zwischen den beiden COBSI-Indizes der ATP-Beladung bei der NPE-Schutzgruppe (Tab. 4.1) liegt in den verschiedenen Na^+ -Konzentrationen begründet, unter denen die ATP-Beladung durchgeführt wurde. Während die hohe Na^+ -Konzentration bei einer weitergehenden Phosphorylierung zu einer Akkumulierung des E1P-Zustandes führt, kommt es bei einer niedrigen Na^+ -Konzentration zu einer Akkumulierung des E2P-Zustandes. Der niedrigere COBSI-Index im Fall der hohen Na^+ -Konzentration steht möglicherweise mit der Abschirmung von negativen Ladungen im ATP durch Na^+ und den damit verbundenen geringeren Wechselwirkungen von ATP und einem Arg an der Nukleotidbindungsstelle des Proteins in Verbindung. Da die Wechselwirkung zwischen Arg und ATP ebenfalls in dem für den COBSI-Index relevanten Amid I-Bereich detektiert wird (Kapitel 3.1.2.1) kann die Erhöhung der Na^+ -Konzentration einen Effekt auf den COBSI-Index haben. Die Gesamtsekundärstruktur der Na,K-ATPase bleibt bei der ATP-Beladung aber bei beiden Na^+ -Konzentrationen nahezu unverändert. Vergleicht man die

gleichet man die COBSI-Indizes der Nukleotid-Bindungen in H₂O miteinander, so fällt auf, daß sich alle ermittelten Werte in der gleichen Größenordnung bewegen.

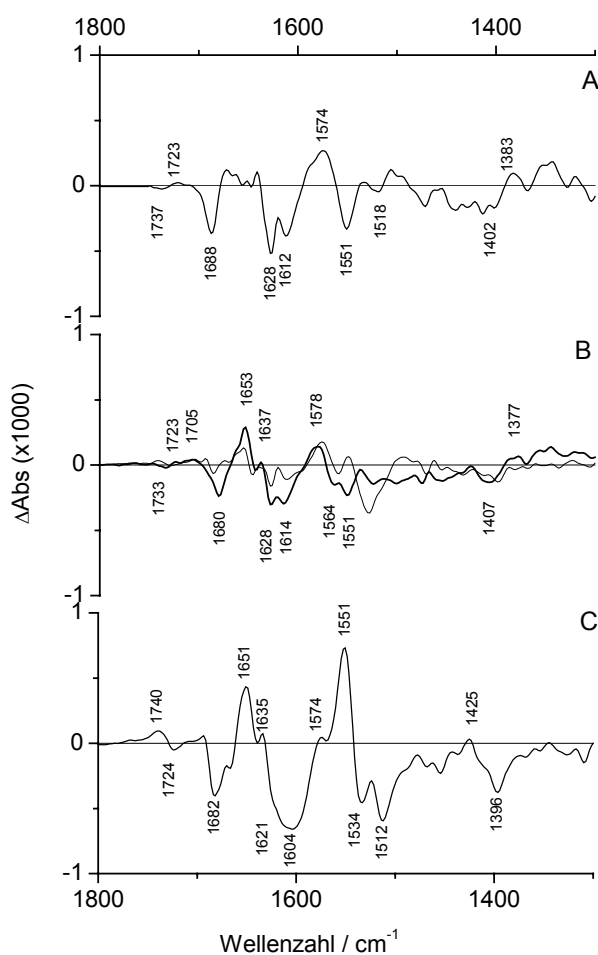


Abb. 4.2: ADP-, ATP- und AMPPNP-Bindung in H₂O, photolysekorrigiert. **(A)** ADP-Bindung **(B)** ATP-Beladung, dicke Linie: 130 mM NaCl, Signalbezeichnungen beziehen sich auf dicke Linie, dünne Linie: 1,2 M NaCl **(C)** AMPPNP-Bindung. Detaillierte Angaben bezüglich der Zusammensetzung des ionischen Mediums können den Abb. 3.3-3.5 entnommen werden.

AMPPNP scheint bei der Bindung eine etwas größere Sekundärstrukturänderung zu verursachen wie ATP und ADP. Vergleicht man die COBSI-Indizes der Nukleotid-Bindungen in H₂O und D₂O so kann bei ADP und AMPPNP eine große Übereinstimmung festgestellt werden, während dies bei ATP nicht der Fall ist (Tab. 4.1). Bei NPE-caged ATP (E2) kann zwischen H₂O und D₂O ein Unterschied im COBSI-Index um den Faktor 2,3 festgestellt werden. Aufgrund dieser Diskrepanz und des stark veränderten Signalprofils (Abb. 4.2 **(B)**) im Vergleich zu Abb. 4.3 **(B)**) stellt sich die Frage, ob in D₂O die gleiche Reaktion abläuft wie in H₂O. Da hier Differenzen zwischen zwei Zuständen betrachtet werden, könnte sich auch der Anfangs- oder der Endzustand in den beiden Medien unterscheiden. Es wäre denkbar, daß es aufgrund des D₂O-Austauschs zu einer Modifikation der Struktur des En-

zyms kommt und somit zu einem veränderten ATP-Beladungsereignis im Vergleich zu H₂O.

Da das NPE-caged ATP bereits an die Nukleotidbindungsstelle der Na, K-ATPase mit hoher Affinität bindet (Forbush, 1984), können potentielle Konformationsänderungen des Enzyms, die durch die Bindung des

ATP an das Enzym erfolgen könnten, nicht detektiert werden. Diesem Umstand wird mit der Symbolik E·cATP (Abb. 4.1 und 4.4) und der Bezeichnung ATP-Beladung Rechnung getragen. Aus diesem Grund wurden zur Detektion der ATP-Bindung noch zwei weitere geschützte ATP-Derivate mit wesentlich geringerer Affinität zur Na,K-ATPase eingesetzt (N⁹-NPE- und DMB-caged ATP, Sokolov et al., 1998). Die COBSI-Indizes der ATP-Bindung unter Verwendung dieser beiden Derivate zeigen jedoch keine größeren Werte im Vergleich zum NPE-caged ATP. Die Schlußfolgerung daraus ist, daß es im Zuge der ATP-Bindung zu keiner signifikanten Sekundärstrukturänderung in der Na,K-ATPase kommt. In einem Modell bei Fendler et al. (1993) wird davon ausgegangen, daß das NPE-caged ATP in Lösung photolysiert wird und daß daraufhin das freigesetzte ATP an die Na,K-ATPase bindet, nachdem das NPE-caged ATP von dem Enzym abdiffundiert ist. Für die IR-Differenzspektroskopie hat diese Annahme allerdings keine Konsequenzen, da der Ausgangszustand (E·cATP) und Endzustand nach der Photolyse (E·ATP) unverändert bleibt.

Änderungen an individuellen Aminosäureseitenketten: Protonierungsgrad, Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken

Betrachtet man die Differenzspektren der Nukleotidbindung von AMPPNP, ADP und ATP an die Na,K-ATPase so sind deutliche Hinweise auf Änderungen an den Seitenkettencarboxylgruppen der Aminosäuren Asp und/oder Glu detektierbar. Da hier Protonierungs- und Phosphorylierungsreaktionen anhand der gleichen Schwingungen detektiert werden ($\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$), ist bei parallel auftretenden Reaktionen eine differenzierte Zuordnung schwierig. Im Fall der Nukleotid-Bindung in H₂O ist es allerdings eine Phosphorylierungsreaktion auszuschließen.

COBSI-Indizes / ·10 ⁻⁴ Nukleotidbindung			
Nukleotid	Schutzgruppe	H ₂ O	D ₂ O
ADP	NPE	1,9	1,6
ATP (E2)	NPE	1,6	3,6
ATP (E1)	NPE	1,0	1,6
AMPPNP	NPE	2,4	2,3
ATP (E2)	N ⁹ -NPE	1,5	1,1
ATP (E2)	DMB	-	1,3

Tab. 4.1: COBSI-Indizes der Nukleotidbindungen

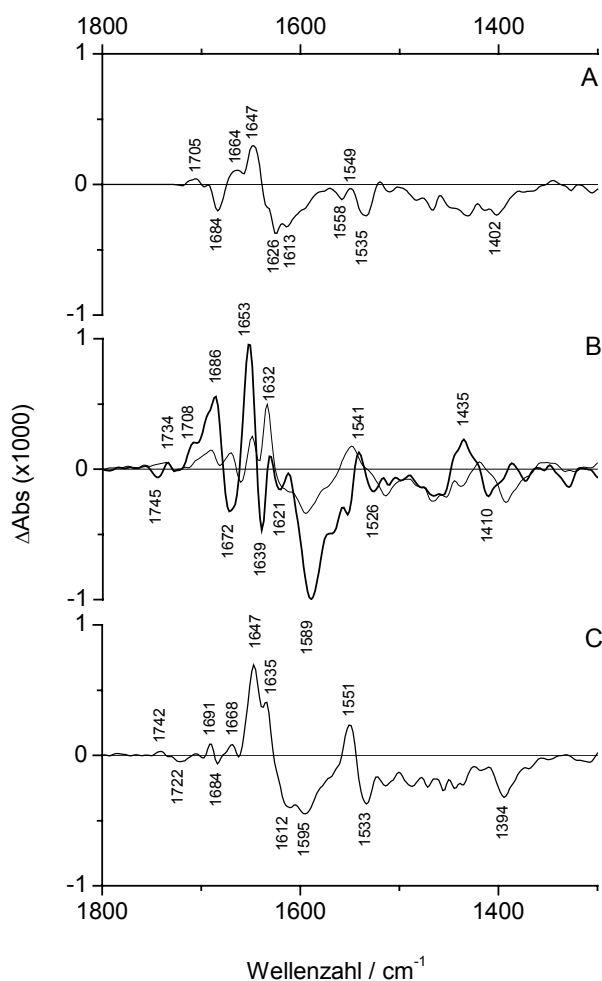


Abb. 4.3: ADP-, ATP- und AMPPNP-Bindung in D_2O , photolysekorrigiert. **(A)** ADP-Bindung **(B)** ATP-Beladung: Dicke Linie: 130 mM NaCl, Signalbezeichnungen beziehen sich auf dicke Linie, dünne Linie: 1,2 M NaCl **(C)** AMPPNP-Bindung. Detaillierte Angaben bezüglich der Zusammensetzung des ionischen Mediums können den Abb. 3.3-3.5 entnommen werden.

Zum einen ergibt sich dies bei der ATP-Beladung aus dem gewählten Reaktionsmedium (Abwesenheit von Mg^{2+} , Nørby und Jensen, 1971) und zum anderen bei ADP und AMPPNP aus der Natur der Nukleotide. Ein weiteres Indiz für die Annahme, daß es sich bei den beobachteten Signalen der ATP-Beladung in H_2O (Abb. 4.2 **(B)**) bei 1723 cm^{-1} und 1737 cm^{-1} um keine Schwingungsmoden der phosphorylierten Asp/Glu-Seitenkettenreste handelt, ist das erneute Auftreten dieser Signale bei der ADP-Bindung. Dies trifft auch für die Signale bei 1551 cm^{-1} und im Bereich um 1400 cm^{-1} zu. Dementsprechend können die Signale oberhalb von 1700 cm^{-1} bei der ATP-Beladung entweder auf eine Protonierung der Seitenkettencarboxylgruppen von Asp/Glu oder auf eine Änderung in deren nächster Umgebung zurückzuführen sein. Bei der ATP-Bindung mittels N^9 -NPE-caged ATP sind ebenfalls Signale in diesem Spektralbereich sichtbar. Aufgrund der durchgeführten Modellrechnung (Kapitel 3.1.2.1) wären bei der Annahme einer Protonierung von Asp oder Glu etwa 0,2 Aminosäuren/Protomer beteiligt. Das heißt, man kann in diesem Zusammenhang

höchstens von einer partiellen Protonierung sprechen. Eine Umgebungsänderung an einem Asp- oder Glu-Seitenkettenrest bedeutet z. B. die Knüpfung von Wasserstoffbrücken oder Salzbrücken. Aber auch eine Änderung in der Stärke einer dieser beiden Bindungsarten zur Stabilisierung des ATP an der Nukleotidbindungsstelle wäre möglich. Bei der hier eingesetzten Methode können Wasserstoffbrücken und Salzbrücken unter Beteiligung der Seitenkettenreste Asp und Glu detektiert werden. Während es unter Beteiligung von protoniertem Asp und Glu zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken kommen kann, die anhand der $\nu(\text{C}=\text{O})$ detektierbar sind, kommt es bei Beteiligung von deprotoniertem Asp oder Glu zur Ausbildung von Salzbrücken, die mittels der $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ identifiziert werden können. In wäßrigem Medium bei pH 7,5 ist aufgrund der pK-Werte der Seitenketten von Asp und Glu hauptsächlich mit deprotonierten Resten zu rechnen, während im Inneren einer Membran oder Proteindomäne auch protonierte Seitenkettenreste zugegen sein könnten. Sowohl bei der ATP-Beladung als auch bei der ADP-Bindung (Abb. 4.2 (A) und (B)) sind im Bereich potentieller $\nu(\text{C}=\text{O})$ ($>1700\text{ cm}^{-1}$) und $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ bei $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ jeweils ein positives Signal bei hoher Wellenzahl in Verbindung mit einem negativen Signal bei niedriger Wellenzahl zu sehen. Im Bereich potentieller $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ($\sim 1580\text{ cm}^{-1}$) sind ebenfalls positive und negative Signale direkt nebeneinander detektiert worden. Da es in diesem spektralen Bereich aber zu einer Überschneidung mit dem Amid II-Bereich kommt, ist dort eine differenzierte Zuordnung schwieriger. Bei der Bildung von Wasserstoff- oder Salzbrücken kommt es innerhalb eines Seitenkettenrestes von Asp oder Glu zu einer Schwächung der C-O-Bindung, was zu einer Verschiebung der Absorption zu kleineren Wellenzahlen der betreffenden Schwingung führt. Im Differenzspektrum führt das schließlich zu einem negativen und positiven Signal in direkter Nachbarschaft. Bei den Differenzspektren der Bindung von ADP und ATP gibt es sowohl Hinweise auf Knüpfung von Wasserstoff- als auch Salzbrücken unter Beteiligung von Asp und/oder Glu. Aufgrund der betrachteten Teilreaktion der ATP-Beladung ist es wahrscheinlich, daß die detektierten Änderungen bezüglich der Wasserstoff- und Salzbrücken direkt an der Nukleotidbindungsstelle innerhalb der N-Domäne der Na,K-ATPase lokalisiert sind. Aufgrund von Mutationen innerhalb der N-Domäne der Na,K-ATPase und Homologiemodellen zur Ca-ATPase (Jacobsen et al., 2002) vermutet Jørgensen et al. (2003a) auch eine Beteiligung von Wasserstoffbrückenbindungen an der Bindung des ATP an die Na,K-ATPase, insbesondere von Lys 501 mit Glu 446.

Das Signalprofil des Differenzspektrums der AMPPNP-Bindung in H_2O (Abb. 4.2 (C)) hingegen deutet aufgrund der größeren Signalamplitude im Bereich der $\nu(\text{C}=\text{O})$ und

$v_{as}(\text{COO}^-)$ eher auf eine Protonierung eines Asp und/oder Glu hin. Es unterscheidet sich deutlich von den Differenzspektren der ATP- und ADP-Bindung. Das deutet auf eine andere Form der Wechselwirkung mit der Nukleotidbindungsstelle des Enzyms hin. Zusammenhängen könnte dies mit der verbrückenden Imidogruppe im AMPPNP. Das dort gebundene positivierte H-Atom könnte mit der Nukleotidbindungsstelle des Enzyms andersartig interagieren als das bei ATP an der gleichen Stelle lokalisierte negativ geladene Sauerstoffatom. Aber auch die unterschiedlichen pK_a Werte von ATP und AMPPNP könnten hier einen Beitrag leisten (Yount et al., 1971). Während das ATP bei pH 7,5 am γ -Phosphat vollständig deprotoniert ist, scheint beim AMPPNP mindestens ein Sauerstoffatom protoniert zu sein. Auch das führt zu einer anderen Form der Wechselwirkung mit der Nukleotidbindungsstelle wie beim ATP.

Bei allen Differenzspektren der drei unterschiedlichen Nukleotide gibt es Hinweise auf die Beteiligung von Arg bei der Nukleotid-Bindung (Kapitel 3.1.2.1 - 3.1.2.3). Als positiv geladener Seitenkettenrest stabilisiert das Arg so die negativen Ladungen des ATP, ADP und AMPPNP. Dabei handelt es sich nach Mutationsstudien um Arg 544 (Jacobsen et al., 2002), welches durch elektrostatische Wechselwirkung das β - und γ -Phosphat in der Nukleotidbindungsstelle fixiert.

4.1.2 E1P-, E2P-Bildung und enzymatisch katalysierte ATP-Hydrolyse

In diesem Kapitel werden verschiedene Teilreaktionen innerhalb des Reaktionszyklus der Na,K-ATPase gegenüber gestellt. Bezüglich des Vergleichs der Sekundärstrukturänderung dient auch hier der COBSI-Index. Als weiteres Kriterium werden die für die Schwingungsmoden der Protonierung und Phosphorylierung charakteristischen, spektralen Bereiche verglichen. Aber auch ein Vergleich des gesamten Bandenprofils und somit die Ähnlichkeit der Differenzspektren soll überprüft werden. In Abb. 4.4 sind die IR-spektroskopisch detektierten Teilreaktionen der Na,K-ATPase dargestellt. Anhand der Gegenüberstellung der Differenzspektren (Abb. 4.5) fällt auf, daß die ATP-Beladung, die E1P-Bildung und die E2P-Bildung deutlich unterscheidbare Differenzspektren liefern. Das Differenzspektrum der enzymatisch katalysierten Hydrolyse von ATP (Abb. 4.5 (D)) hingegen zeigt in Bezug auf das Bandenprofil eine signifikante Ähnlichkeit zum Differenzspektrum der E2P-Bildung (Abb. 4.5 (C)). Ein Unterschied wird nur in der Amplitude der Signale sichtbar. Die ist bei dem Differenzspektrum der enzymatisch katalysierten Hydrolyse von ATP etwa halb so groß wie bei der E2P-Bildung.

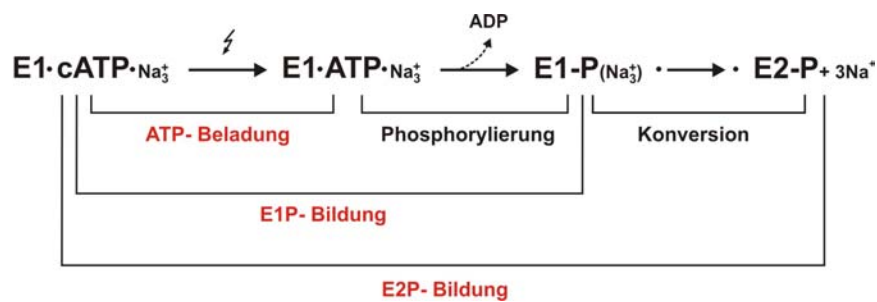


Abb. 4.4: IR-spektroskopisch detektierte Teilreaktionen innerhalb des erweiterten Albers-Post Reaktionsschemas für die Na,K-ATPase. Erläuterung zur Symbolik in Abb. 4.1.

Daraus folgt, daß sowohl bei dem Differenzspektrum der E2P-Bildung als auch bei der enzymatisch katalysierten Hydrolyse von ATP (Großer Zyklus in Abb. 4.1) annähernd der gleiche Zustand akkumuliert. Wie bereits in Zusammenhang mit den in der Literatur diskutierten geschwindigkeitsbestimmenden Schritten (Kapitel 4.1) ausgeführt, sollte dies nicht der Fall sein.

Eine eventuelle K⁺-Verunreinigung der E2P-Proben müßte, um ein Ablaufen des großen Zyklus der ATPase zu ermöglichen, sehr groß sein, weil die Enzymkonzentration mit 1 mM äußerst hoch ist. Des weiteren sprechen Kontrollversuche, die mit einem K⁺-Komplexbildner (Cryptand [2,2,2]) durchgeführt wurden, gegen eine Kontamination durch K⁺. In Anwesenheit von 5 mM Cryptand bei pH 7,5 wurde das gleiche Differenzspektrum der E2P-Bildung erhalten wie ohne Cryptand. Außerdem wurde in Gegenwart von K⁺ eine IR-spektroskopisch bestimmte ATPase-Aktivität des Enzyms gemessen. Die Ergebnisse dieser IR-spektroskopisch bestimmten spezifischen Aktivität liegen in der gleichen Größenordnung wie die durch Annäherung an die Proteinfilmte gemachten Abschätzungen der spezifischen Aktivität in verdünnter Suspension (Kapitel 3.3.2).

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Klärung der Ähnlichkeit der Differenzspektren der E2P-Bildung und der enzymatisch katalysierten Hydrolyse von ATP liegt in der Möglichkeit, daß unter den hier gewählten IR-spektroskopischen Bedingungen die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte und somit die akkumulierten Zustände nicht korrekt zugeordnet wurden. Bei der Phosphorylierung der Na,K-ATPase in Gegenwart von 130 mM Na⁺ und 3 mM Mg²⁺ kommt es zur E2P-Bildung. Bei dieser E2P-Bildung gibt es bezüglich des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes unterschiedliche Auffassungen in der Literatur. Zum einen

ist dies die Akkumulierung des E2P-Zustandes, wie sie z. B. von Nørby et al. (1983) und Clarke et al. (1998) vorgeschlagen wird und zum anderen ist dies die Akkumulierung des E1P-Zustands wie sie von Heyse et al. (1994) favorisiert wird. Keillor und Jencks (1996) hingegen halten eine konformative Änderung des ATP-gebundenen Intermediats E·ATP vor dem Phosphorylierungsschritt für geschwindigkeitsbestimmend. Im Fall einer E1P-Akkumulierung müßte aber das gleiche Differenzspektrum wie bei der Phosphorylierung mit 1,2 M Na⁺ (E1P-Bildung, Abb. 4.5 (B)) zu sehen sein, welches nicht der Fall ist. Die Akkumulierung eines ATP-gebundenen Intermediats E·ATP hingegen müßte das gleiche Differenzspektrum wie bei der ATP-Beladung (Abb. 4.5 (A)) ergeben. Auch dies ist nicht der Fall. Cornelius (1999) hat in diesem Zusammenhang Hinweise auf eine Temperatursensitivität des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes innerhalb der Phosphorylierung des Enzyms in Gegenwart von 130 mM Na⁺. Während bei 5°C die Phosphoenzym-Konversion (E1P → E2P) geschwindigkeitsbestimmend ist, sei dies bei 15°C die Phosphorylierung. Dies wiederum hätte zur Folge, daß sich das Differenzspektrum der Phosphorylierung in 130 mM Na⁺ bei 15°C (E2P-Bildung, Abb. 4.5 (C)) bei einer Herabsetzung der Temperatur auf 5°C in ein Differenzspektrum der Phosphorylierung bei 1,2 M Na⁺ (E1P-Bildung, Abb. 4.5 (B)) umwandeln müßte. Auch dies ist nicht der Fall. Betrachtet man des weiteren den zeitlichen Verlauf der Differenzspektren der Phosphorylierung bei 130 mM Na⁺ (E2P-Bildung, Abb. 3.7 (A) und (C)) so ist festzuhalten, daß sich ab dem Zeitpunkt 2 s nach der Photolyse des caged ATP das Bandenprofil nicht mehr ändert, sondern nur die Amplituden der Signale. Im Zeitraum bis 400 s nach der Photolyse nimmt der Betrag der Signalamplitude zwischen 1530 cm⁻¹ und 2000 cm⁻¹ auf annähernd 0 ab. Das heißt, zu diesem Zeitpunkt ist das System wieder in den Ausgangszustand zurückgekehrt. Dies ist E·cATP. Dementsprechend zeigt der Zeitraum, in dem nur die Amplitude der Signale abnimmt, die spontane Dephosphorylierung des E2P-Zustandes. Das Differenzspektrum der enzymatisch katalysierten Hydrolyse zeigt annähernd das gleiche Bandenprofil wie die E2P-Bildung, aber bei halber Signalamplitude (Abb. 4.5 (D) und (C)). Eine Erklärung dieses Phänomens wäre, daß es sich bei dem Differenzspektrum der enzymatisch katalysierten Hydrolyse der Na,K-ATPase um ein Mischdifferenzspektrum handelte. Das wäre u. a. der Fall, wenn die zwei langsamsten Reaktionsschritte im großen Zyklus etwa gleich schnell sein würden. Die Folge wäre, daß zwei Zustände etwa gleich stark besetzt wären. In Kapitel 3.1.11 wird die Ammoniumbindung, die mit der K⁺-Bindung an die Na,K-ATPase verglichen werden kann, untersucht. Das Differenzspektrum der Ammoniumbindung ist gleich der Basislinie. Der Endzustand dieser Reaktion ist E2(NH₄⁺)₂. Dieser Zustand wieder-

um ist gleichzusetzen mit dem Zustand $E2(K^+)$. Eine Mischung aus dem Differenzspektrum der E2P-Bildung und der $E2(K^+)_2$ -Bildung ergäbe ein Differenzspektrum vom Profil der E2P-Bildung, aber mit der halben Amplitude. Dies ist der Fall. Hinweise auf Änderungen der Reaktionskinetik bei der enzymatisch katalysierten Hydrolyse von ATP zeigen bereits die Messungen der spezifischen Aktivität der Na,K-ATPase unter Annäherung an die Bedingungen der Proteinfilme (Kapitel 3.3.2). Diese Viskositätsabhängigkeit der spezifischen Aktivität der Na,K-ATPase kann auch bedeuten, daß sich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt innerhalb dieser Reaktionsfolge ändert. Dies wird hier als wahrscheinlich angenommen.

Durch Nørby et al. (1983) wurde eine Erweiterung des Albers-Post Modells (Abb. 4.1) durch ein drittes Phosphointermediat neben E1P und E2P vorgeschlagen. Ausschlaggebend für diese Erweiterung waren Ergebnisse der kinetischen Charakterisierung der Phosphoenzymbildung. Diese Theorie wurde durch Yoda und Yoda (1986, 1987a, 1987b und 1988) weiterentwickelt. Yoda und Yoda schlugen folgende Reaktionssequenz vor: $E1ATP \rightarrow E1P \rightarrow E^*P \rightarrow E2P$. Dabei ist E1P das ADP-sensitive, E2P das K^+ -sensitive und E*P ein sowohl ADP-sensitives als auch K^+ -sensitives Phosphoenzym. Ein wichtiger Befund in diesem Zusammenhang ist der, daß der Reaktionsschritt $E^*P \rightarrow E2P$ wesentlich langsamer ist als $E1P \rightarrow E^*P$. In Tab. 4.2 sind die EP-Zusammensetzungen nach Yoda und Yoda bei drei verschiedenen Na^+ -Konzentrationen aufgeführt. Bei der IR-Differenzspektroskopie wurden in etwa die gleichen Na^+ -Konzentrationen für die Phosphorylierung verwendet (20 mM, 130 mM und 1200 mM). Da auch der Zeitpunkt der Analyse des Phosphoenzyms und die Meßtemperatur übereinstimmen, ist es möglich zu prüfen, ob das Konzept von Yoda und Yoda anhand der verschiedenen Differenzspektren nachvollzogen werden kann. Dies gelänge natürlich nur für den Fall, in dem sich die Differenzspektren der Phosphorylierung bei den verschiedenen Na^+ -Konzentrationen -ausgehend vom Ausgangszustand- unterscheiden würden. Im folgenden soll die Nomenklatur der Phosphoenzyme von Yoda und Yoda auf die hier gemessenen Differenzspektren übertragen werden. Nach Yoda und Yoda (Tab. 4.2) wäre das hier bezeichnete Differenzspektrum der E2P-Bildung, welches bei einer Na^+ -Konzentration von 130 mM aufgenommen wurde, hauptsächlich ein Differenzspektrum der E*P-Bildung (Abb. 4.5 (C)). Das Differenzspektrum der E1P-Bildung - aufgenommen bei einer Na^+ -Konzentrationen von 1,2 M- wäre auch nach Yoda und Yoda ein Differenzspektrum der E1P-Bildung (Abb. 4.5 (B)). Das Differenzspektrum der E2P-

Bildung, welches bei einer Na^+ -Konzentration von 20 mM aufgenommen wurde (Abb. 3.15 **(B)**), wäre nach Yoda und Yoda ein Differenzspektrum der E2P-Bildung. In diesem Zusammenhang müßten allerdings die experimentellen Befunde dahingehend interpretiert werden, daß das Differenzspektrum der E2P-

Bildung und der E*P-Bildung weitgehend identisch seien. Zur Erklärung des Differenzspektrums der enzymatisch katalysierten Hydrolyse von ATP müßte auch hier eine Änderung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes unter IR-spektroskopischen Bedingungen angenommen werden. Des weiteren müßte davon ausgegangen werden, daß das detektierte Differenzspektrum der enzymatisch katalysierten ATP-Hydrolyse eine Mischung zweier Differenzspektren darstellte. Das heißt, durch die Annahme eines weiteren Intermediats (E*P) wird die Deutung der Differenzspektren zusehends komplexer und nicht verständlicher. Es gibt somit keine weitergehenden Evidenzen für die Existenz eines Phosphoenzyms E*P.

Sekundärstrukturänderungen

Wie anhand von Abb. 4.5 und den daraus ermittelten COBSI-Indizes (Tab. 4.3) ersichtlich ist, wird in H_2O für die E2P-Bildung die größte Sekundärstrukturänderung detektiert. Ein COBSI-Index mit dem Zahlenwert von $7 \cdot 10^{-4}$ heißt, daß 0,2 % und somit etwa 3 Aminosäuren der Na,K-ATPase an dieser Sekundärstrukturänderung beteiligt sind. Die Reihenfolge der Beträge der COBSI-Indizes ist folgende:

E2P-Bildung > E1P-Bildung > ATP-Beladung

Das schließt allerdings nicht die Bewegung von flexiblen Elementen innerhalb der Tertiärstruktur der α -Untereinheit aus. Zur Bewegung von Proteindomänen müssen an den sogenannten „hinge-Regionen“ (Gelenkregionen) nur wenige Aminosäuren beteiligt sein. Diese Bewegungen der A-, N- und P-Domäne relativ zueinander über große Distanzen (bis 50 Å) werden innerhalb des Reaktionszyklus der Ca-ATPase angenommen (Toyoshima et al., 2004b). Das Differenzspektrum der ATP-Beladung beinhaltet die Freisetzung von ATP an der Nukleotidbindungsstelle der Na,K-ATPase (Abb. 4.5 **(A)**). Dem in Abb. 4.5 **(B)** ge-

Phosphoenzym	20 mM Na^+	130 mM Na^+	800 mM Na^+
E1P	13 %	25 %	80 %
E*P	20 %	64 %	18 %
E2P	67 %	11 %	2 %

Tab. 4.2: Zusammensetzung des Phosphoenzyms nach Yoda und Yoda (1986). Zeitpunkt der Analyse ist 2 s nach Start der Phosphorylierungsreaktion bei 3°C.

zeigten Differenzspektrum der E1P-Bildung hingegen wird eine Reaktionssequenz mit mehreren Einzelreaktionen zugeordnet.

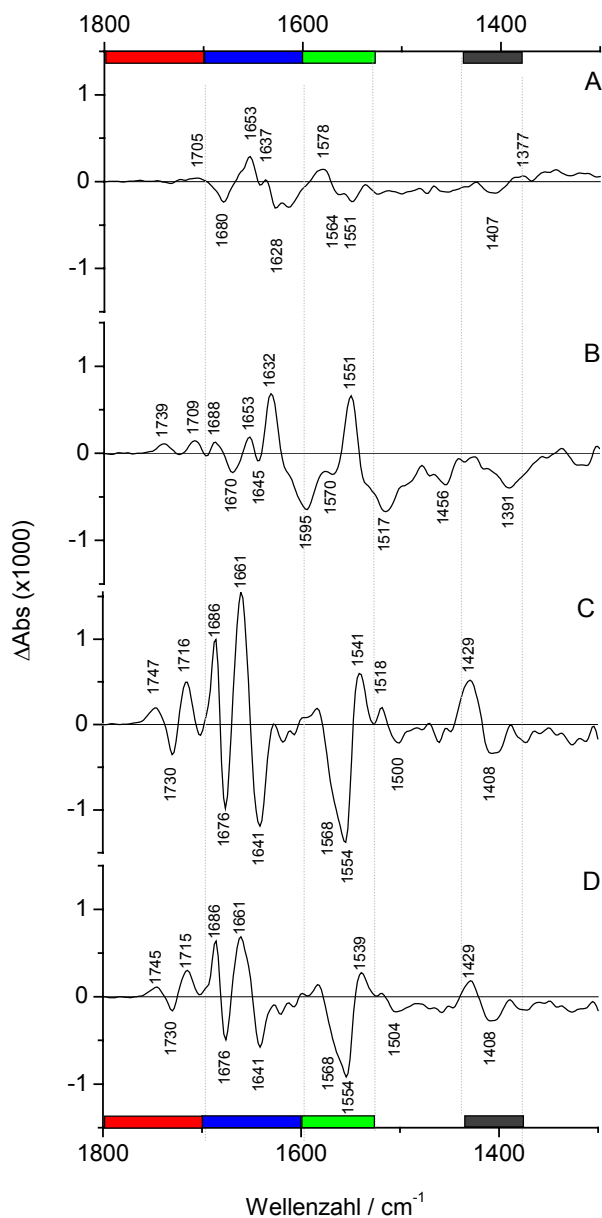


Abb. 4.5: Der Reaktionszyklus der Na,K-ATPase (Schweinenierenenzym in H_2O , photolysekorrigiert). Differenzspektren wurden 1,95 s nach ATP-Freisetzung aufgezeichnet (A) ATP-Beladung (B) E1P-Bildung (C) E2P-Bildung (D) Enzymatisch katalysierte ATP-Hydrolyse. Die genaue Zusammensetzung des ionischen Mediums ist in den Kapiteln 3.1.2-3.1.7 erläutert.

Dort findet sowohl eine Phosphorylierung des Enzyms an Asp 369 als auch die Okklusion von Na^+ statt. Betrachtet man hingegen das Differenzspektrum der E2P-Bildung (Abb. 4.5 (C)), so wird die Anzahl der dort ablaufenden Einzelschritte noch zahlreicher.

Innerhalb des E1/E2-Modells findet hier sowohl die Phosphorylierung an Asp 369, die Na⁺-Okklusion als auch eine nachfolgende Konformationsumwandlung (Phosphoenzym-Konversion) und die Na⁺-Deokklusion statt. Diese ablaufende Prozesse sind in der Abb. 4.4 verdeutlicht. Betrachtet man die reinen Zahlenwerte des COBSI-Index, so kann dem Differenzspektrum der E2P-Bildung die größte Sekundärstrukturänderung zugeordnet werden. Alle für die verschiedenen Teilreaktionen errechneten COBSI-Indizes zeigen jedoch, daß die Größenordnung der Sekundärstrukturänderung gleich ist. Aus den COBSI-Indizes kann die Anzahl der an der Sekundärstrukturänderung beteiligten Aminosäuren berechnet werden (ATP-Beladung: < 1 AS, E1P-Bildung: ~ 1 AS und E2P-Bildung: ~ 3 AS (H₂O)). Aufgrund der angewendeten Methode ist der aus dem COBSI-Index ermittelte Zahlenwert der an der Sekundärstrukturänderung beteiligten Aminosäuren mit einer Unsicherheit von bis zu 50 % behaftet (Barth et al., 1996). Anhand der hier ermittelten Werte für die an der Sekundärstrukturänderung beteiligten Aminosäuren kann nicht zwischen großem und kleinem Konformationsübergang innerhalb des Reaktionszyklus der Na,K-ATPase differenziert werden. Betrachtet man die in D₂O aufgenommenen Differenzspektren, so ergibt sich sowohl aufgrund des Signalprofils als auch bei dem Vergleich der COBSI-Indizes ein anderes Bild wie in H₂O. Die Ähnlichkeit der E1P- und E2P-Bildungsspektren bezüglich der COBSI-Indizes sind groß. Das Bandenprofil der Differenzspektren der E1P-Bildung, der E2P-Bildung und der ATP-Hydrolyse (Abb. 4.6 **(B)**, **(C)** und **(D)**) ist sehr ähnlich. Dieses Profil deutet darauf hin, daß bei allen drei Teilreaktionen in D₂O die gleichen Ausgangs- und Endzustände existent sind. Vergleicht man hingegen die COBSI-Indizes gleicher Teilreaktionen in D₂O und H₂O, so werden bei der ATP-Beladung und E1P-Bildung in D₂O mehr als doppelt so große COBSI-Indizes gefunden wie in H₂O, während bei der enzymatisch katalysierten ATP-Hydrolyse und der E2P-Bildung der Unterschied kleiner als 10 % ist. Des weiteren ergibt die IR-spektroskopische Bestimmung der spezifischen Aktivität in D₂O einen deutlich geringeren Wert als in H₂O. Die Eigenschaften der in D₂O aufgenommenen Differenzspektren deuten darauf hin, daß ein Vergleich mit den in H₂O aufgenommenen Differenzspektren problematisch ist.

COBSI-Indizes / ·10 ⁻⁴ Teilreaktionen		
Reaktion	H ₂ O	D ₂ O
ATP-Beladung	1,6	3,6
E1P-Bildung	2,3	2,8
E2P-Bildung	6,3	5,8
ATP-Hydrolyse	3,9	3,3

Tab. 4.3: COBSI-Indizes der Na,K-ATPase-Teilreaktionen.

Änderungen an individuellen Aminosäureseitenketten: Phosphorylierung, Protonierung und Kationenkoordination

Neben der Detektion der Phosphorylierung an Asp 369 werden Protonierungen bzw. Deprotonierungen sowie Umgebungsänderungen an Asp/Glu, die in Zusammenhang mit der Kationenkoordination von Na^+ stehen, diskutiert. Es wird angenommen, daß die Bindungsstellen für Na^+ und K^+ bei der Na,K-ATPase durch die gleichen Aminosäuren gebildet werden wie bei der Ca-ATPase (Abb. 4.9, Ogawa und Toyoshima, 2002, Jørgensen et al., 2003a). Sowohl bei der Na^+ -Okklusion als auch bei der Na^+ -Deokklusion stellt sich die Frage nach dem molekularen Mechanismus der Kationenkoordination.

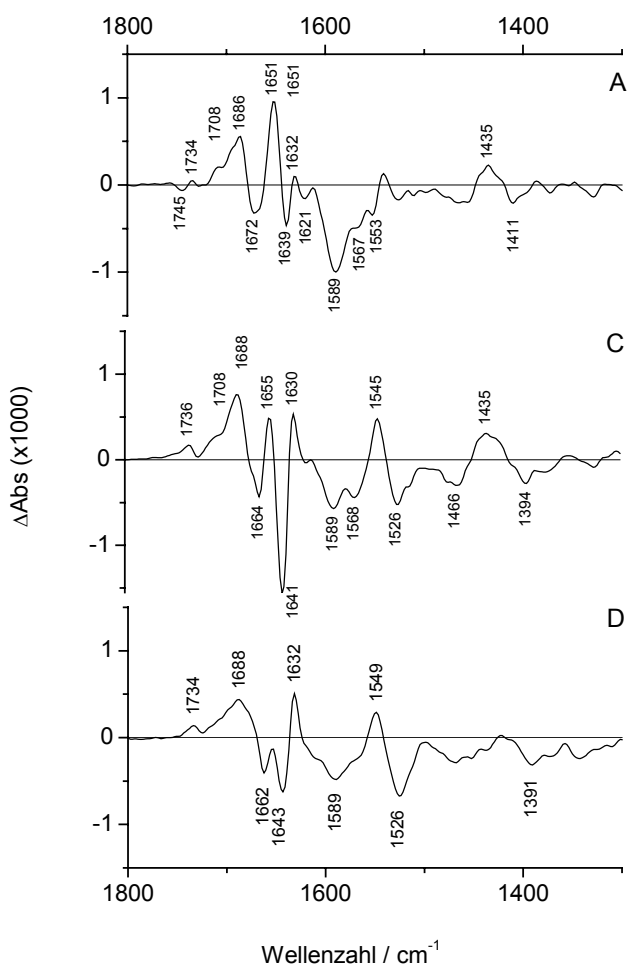


Abb. 4.6: Der Reaktionszyklus der Na,K-ATPase (Schweinenierenenzym in D_2O , photolysekorrigiert). Differenzspektren wurden 1,95 s nach ATP-Freisetzung aufgezeichnet (A) ATP-Beladung (B) E1P-Bildung (C) E2P-Bildung (D) Enzymatisch katalysierte ATP-Hydrolyse. Die genaue Zusammensetzung des ionischen Mediums ist in den Kapiteln 3.1.2-3.1.7 erläutert.

Insbesondere die Änderungen des Protonierungszustandes der Kationenbindungsstellen (Asp und Glu) sowie die Na^+ -Koordinierung an protonierten und deprotonierten Asp- und Glu-Seitenkettenresten können hier detektiert werden. Bei der E1P-Bildung in H_2O (Abb.

4.5 (B)) kommt es sowohl zur ATP-Beladung, zur Phosphorylierung als auch zur Okklusion von Na^+ -Ionen. Da mögliche Änderungen im Protonierungszustand der kationenkoordinierenden Gruppen Asp/Glu im gleichen spektralen Bereich wie die Phosphorylierung detektiert werden, ist eine differenzierte Zuordnung schwierig. Die Phosphorylierung eines deprotonierten Asp 369 sollte mit drei Signalen verbunden sein: 1. Ein positives Signal zwischen 1700 und 1800 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$), 2. ein negatives Signal zwischen 1530 und 1600 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$) und 3. ein negatives Signal zwischen 1380 und 1430 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$). In diesen spektralen Bereichen wurden bei der E1P-Bildung entsprechende Signale gefunden. Im Detektionsbereich möglicher $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ zwischen 1600 und 1530 cm^{-1} werden sowohl zwei negative als auch ein positives Signal in direkter Nachbarschaft detektiert. Zur differenzierten Beschreibung der Herkunft dieser Signale konnte ein mit Oligomycin behandeltes Enzym einen Beitrag leisten (Kapitel 3.1.12.2). Demzufolge könnte das positive Signal bei 1551 cm^{-1} auf eine Deprotonierung der Na^+ -komplexierenden Reste Asp/Glu zurückgeführt werden. Da allerdings im Falle der Differenzspektren der E1P-Bildung das positive Signal bei 1551 cm^{-1} und das negative Signal bei 1570 cm^{-1} in direkter Nachbarschaft liegen, wäre auch die Anzeige einer Umgebungsänderung in direkter Nachbarschaft zu einem deprotonierten Asp/Glu Seitenkettencarboxylrest ohne Protonierung der betreffenden Reste denkbar. Eine solche Umgebungsänderung wäre zum Beispiel die Okklusion bzw. die Koordination von Na^+ an Asp und/oder Glu. Durch die Koordination von Na^+ an eine deprotonierte Seitenkette von Asp oder Glu würde die Bindung innerhalb der COO^- -Gruppe geschwächt, was sich durch eine Absorption der $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ bei kleinerer Wellenzahl widerspiegeln würde. Im Differenzspektrum ergäbe dies ein negatives Signal bei hoher Wellenzahl neben einem positiven Signal bei niedriger Wellenzahl. Das entspricht dem beobachteten Signalprofil (1595 cm^{-1} (-), 1570 cm^{-1} (-) und 1551 cm^{-1} (+)). Aufgrund des Signalprofils oberhalb von 1700 cm^{-1} und zwischen 1560 und 1610 cm^{-1} kann davon ausgegangen werden, daß es neben der Phosphorylierung an Asp 369 zu einer Protonierung an Asp oder Glu kommt. Dies wäre im Rahmen der Na^+ -Koordination an Asp und Glu allerdings ungewöhnlich, da die protonierten Seitenkettenreste von Asp und Glu eine niedrigere Affinität für Kationen besitzen als unprotonierte Reste.

Das Differenzspektrum der E2P-Bildung (Abb. 4.5 (C)) zeigt die ATP-Beladung, die Phosphorylierung und die Phosphoenzym-Konversion. Dementsprechend enthält das Differenzspektrum keine Anteile der Kationenokklusion oder -deokklusion. Dennoch beinhaltet das Differenzspektrum der E2P-Bildung Informationen über die Transformation der Kationenbindungsstellen von E1 \rightarrow E2. Während E1 den Na^+ -affinen Zustand darstellt, reprä-

sentiert E2 den K^+ -affinen Zustand der Na,K-ATPase. Eine mögliche Bandenzuordnung wäre folgende: Das Signaltrio bei 1747 cm^{-1} (+), $\sim 1568\text{ cm}^{-1}$ (-) und 1408 cm^{-1} (-) wird der Phosphorylierung von Asp 369 zugeordnet. Die Signale bei 1730 cm^{-1} (-), 1716 cm^{-1} (+) ($\nu(\text{C}=\text{O})$ Asp/Glu), $\sim 1554\text{ cm}^{-1}$ (-), 1541 cm^{-1} (+) ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ Asp/Glu) sowie 1429 cm^{-1} (+) und teilweise auch 1408 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ Asp/Glu) können mit Modifikationen an den Kationenbindungsstellen in Verbindung gebracht werden. Aufgrund des Signalprofils kann jedoch keine eindeutige Zuordnung bezüglich der molekularen Vorgänge an den Seitenkettengruppen von Asp und Glu gemacht werden. Das Signalprofil oberhalb von 1700 cm^{-1} könnte sowohl die Kombination von einer Protonierung mit einer Deprotonierung an den Seitenketten von Asp/Glu, aber auch die Bildung einer Wasserstoffbrücke unter Beteiligung von protoniertem Asp und/oder Glu sein. Das Signalprofil um 1550 cm^{-1} und um 1400 cm^{-1} weist ebenfalls auf eine Protonierung und Deprotonierung an den Seitenketten von Asp/Glu hin. Eine ebenso wahrscheinliche Möglichkeit wäre aber auch die Bildung einer Salzbrücke unter Beteiligung von deprotoniertem Asp und/oder Glu. In der Zusammenfassung läßt sich festhalten, daß mit der Transformation der Bindungsstellen von E1 \rightarrow E2 Veränderungen an den Seitenketten von Asp und/oder Glu einhergehen, die auf eine Neuorganisation der Kationenbindungsstellen der Na,K-ATPase schließen lassen.

4.1.3 Die Inhibition der Na,K-ATPase durch Ouabain

Trotz einer Vielzahl von durchgeführten Studien konnte in der Vergangenheit nicht sicher gesagt werden ob eine Phosphorylierung des Enzyms an Asp 369 nach Ouabainbindung möglich ist (Überblick in Hansen et al., 1984). In einer neueren Studie wird angenommen, daß dieser Ouabain-Enzym-Komplex phosphoryliert werden kann (Askari et al., 1988). Die IR-Differenzspektroskopie bietet in diesem Zusammenhang eine interessante Detektionsmethode zur Überprüfung der Phosphorylierungsfähigkeit des Ouabain-Enzym-Komplexes. In Kombination mit Fluoreszenzmessungen der FITC-Na,K-ATPase zur Charakterisierung von Enzymzuständen, konnte ein Modell zum Mechanismus der Ouabain-Inhibition der Na,K-ATPase entwickelt werden (Stolz et al., 2005). Aufgrund der experimentellen Befunde (Kapitel 3.1.12.1 und 3.2.2) kann zusammengefaßt werden, daß es nach einer hochaffinen Bindung von Ouabain an die Na,K-ATPase zu keiner Phosphorylierung des Enzyms kommen kann. Die Anwesenheit von K^+ und Konzentrationen an Na^+ von 130 mM verhindern jedoch eine hochaffine Ouabain-Bindung an das Enzym. Aus der Literatur ist bekannt (Hansen et al., 1984), daß eine hochaffine Ouabain-Bindung an phosphorylierte

Enzymzustände möglich ist. Da im Standardenzymtest sowohl 130 mM Na⁺ als auch 20 mM K⁺ vorliegen, muß davon ausgegangen werden, daß bei der enzymatisch katalysierten ATP-Hydrolyse die hochaffine Ouabain-Bindung an das Phosphoenzym stattfindet und nicht an das unphosphorylierte Enzym.

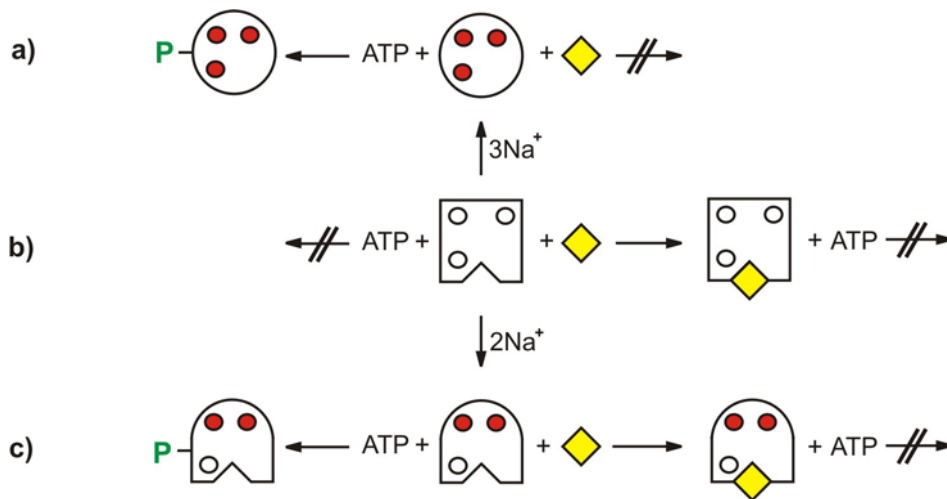


Abb. 4.7: Die Ouabain-Bindung an die Na,K-ATPase in Abhängigkeit von der Na⁺-Konzentration und die daraus resultierenden Folgen für die Phosphorylierung des Enzyms an Asp 369 innerhalb des Pumpenzyklus. (a, c, linke Seite): Nur Na⁺ (●)-gebundene Zustände können mittels ATP phosphoryliert (P-) werden. (b, c, rechte Seite) Nur Konformationen mit entweder keinem oder 2 gebundenen Na⁺ ermöglichen eine hochaffine Ouabainbindung (◆) Beide Ouabain gebundene Zustände können nicht durch ATP phosphoryliert werden. Bei allen hier dargestellten Vorgängen ist Mg²⁺ erforderlich.

4.2 Spezielle Eigenschaften des IR-Proteinfilms

Die bei der IR-Spektroskopie verwendete Probenform der Proteinfilme zeichnet sich durch eine hohe Viskosität aus ($\sim 940 \cdot 10^{-3}$ Pa s bei 15°C). Aufgrund der Durchführung von viskositätsabhängigen Untersuchungen der spezifischen Aktivität mittels eines Standardaktivitätstests (Kapitel 3.3.2) konnte eine Abschätzung der Aktivität in den Proteinfilmen vorgenommen werden. Dieser abgeschätzte Wert der spezifischen Aktivität lag in der gleichen Größenordnung wie der in den Filmproben IR-spektroskopisch ermittelte Wert. Bei der Kinetik der Eosinbindung an die Na,K-ATPase, die mit der ATP-Bindung an das Enzym verglichen werden kann, ist ebenfalls eine Viskositätsabhängigkeit festgestellt worden. Anhand dieser experimentellen Befunde wird deutlich, daß ein direkter Vergleich von ki-

netischen Parametern der Na,K-ATPase in verdünnter Suspension und in den viskosen Proteinfilmern nicht sinnvoll ist. Des Weiteren deutet die Ähnlichkeit der Differenzspektren der E2P-Bildung und der enzymatisch katalysierten ATP-Hydrolyse auf eine Änderung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes innerhalb des Reaktionszyklus des Enzyms hin (Kapitel 4.1.2). Auch diese Änderung könnte viskositätsabhängig sein. Ein weiteres Merkmal der Proteinfilme ist ein im Vergleich zur Suspension stark reduzierter Wassergehalt. Daraus ergibt sich auch ein stark herabgesetzter Hydratationsgrad des Enzyms. Die Auswirkungen des reduzierten Wassergehalts auf die thermische Denaturierung der Na,K-ATPase konnten mittels der DSC-Kalorimetrie untersucht werden. Während bei der thermischen Denaturierung der Na,K-ATPase in verdünnter Suspension eine Übergangstemperatur detektiert werden kann (59,5°C), können in dem konzentrierten Proteinfilm zwei Übergänge beobachtet werden (69°C und 77°C). Die zwei im Proteinfilm auftretenden thermischen Übergänge deuten auf veränderte Wechselwirkungen in den extrazellulären Proteindomänen aufgrund der Dehydratisierung des Enzyms in dieser speziellen Probenform hin. Möglicherweise wird das veränderte Denaturierungsverhalten durch die Übereinanderschichtung der Membranscheiben verursacht. Es ist aber zu bedenken, daß sich der Zustand des Enzyms in Suspension im Vergleich zum Zustand in der lebenden Zelle ebenfalls stark voneinander unterscheidet. Es stellt sich somit die Frage nach dem geeigneten Referenzzustand und inwieweit die Ergebnisse bezüglich des Proteinfilms unter diesem Gesichtspunkt zu bewerten sind. Es bleibt festzuhalten, daß sich das thermische Denaturierungsverhalten, die spezifische Aktivität und die Kinetik der Eosinbindung an die Na,K-ATPase im Proteinfilm und in verdünnter Suspension deutlich voneinander unterscheiden.

4.3 IR-spektroskopischer Vergleich der Na,K-ATPase mit der Ca-ATPase

Die Ca-ATPase ist wie die Na,K-ATPase eine P-Typ-ATPase. Beide gehören zur Unterfamilie II dieser Kationen transportierenden Enzyme. Gegenwärtig liegen Kristallstrukturen der Ca-ATPase in verschiedenen Enzymzuständen vor (z. B. Toyoshima et al., 2004b). Die genaue Zuordnung dieser kristallisierten Zustände zu bestimmten Intermediaten innerhalb des E1/E2-Reaktionsschemas ist derzeit umstritten (Picard et al., 2005). Von der Na,K-ATPase liegen ebenfalls Kristallstrukturdaten, allerdings in wesentlich gröberer Auflösung vor (Hebert et al. 2001, Rice et al., 2001). Aufgrund großer Übereinstimmungen in der Grobstruktur, der ausgeprägten Verwandtschaft beider Enzyme sowie signifikanter

Sequenzhomologien wurden in der Literatur Homolgiemodelle für die Na,K-ATPase zur Untersuchung des Kationentransportmechanismus entworfen (Ogawa und Toyoshima, 2002, Jørgensen et al., 2003a).

Für beide Enzyme liegen jetzt IR-Differenzspektren verschiedener Teilreaktionen innerhalb des gemeinsamen E1/E2-Reaktionsmodells vor. Es bietet sich somit die Möglichkeit des direkten Vergleichs gleicher Teilreaktionen beider Enzyme. Verglichen werden hier die ATP-Bindung, die aufgrund der hohen Affinität des NPE-caged ATP an die Na,K-ATPase ATP-Beladung genannt wird, die Phosphorylierung und die Phosphoenzym-Konversion. Bei beiden Enzymen wurde die gleiche geschützte Verbindung eingesetzt (NPE-caged ATP). Zum direkten Vergleich der Differenzspektren wurden diese anhand der Amid II-Absorption normiert. Bei diesem Vergleich wurde sowohl das unterschiedliche Molekulargewicht als auch der unterschiedliche Reinheitsgrad der Präparation beider Enzyme berücksichtigt. Des Weiteren wurde angenommen, daß beide ATPasen in den Präparationen vollständig enzymatisch aktiv gewesen sind. Als Hilfsmittel zur Quantifizierung der Sekundärstrukturänderung dient der COBSI-Index (Barth et al., 1996).

Abb. 4.8 zeigt den Vergleich der Differenzspektren von drei Teilreaktionen beider Enzyme. Dabei sind die Differenzspektren der Na,K-ATPase in rot und die der Ca-ATPase in schwarz gezeichnet. Wie anhand von Abb. 4.8 ersichtlich ist, sind die Amplituden beider Enzyme in der gleichen Größenordnung und somit direkt miteinander vergleichbar. Während die größten detektierten Sekundärstrukturänderungen bei den Teilreaktionen der Ca-ATPase in der Größenordnung von 0,3 % (~ 3 Aminosäuren) liegen (Barth et al., 1996), beträgt dieser Wert bei der Na,K-ATPase 0,2 % (~ 3 Aminosäuren). Das heißt, die Sekundärstrukturen beider Enzyme bleiben bei den Teilreaktionen weitgehend konserviert. Das heißt allerdings nicht, daß keine Domänenbewegungen innerhalb der Tertiärstruktur der α -Untereinheit beider Enzyme möglich wären. Zur Bewegung dieser großen Proteindomänen an den sogenannten „hinge-Regionen“ (Gelenkregionen) müssen nur wenige Aminosäuren beteiligt sein. Diese Bewegungen der A-, N- und P-Domäne relativ zueinander über große Distanzen (bis zu 50 Å) werden innerhalb des Reaktionszyklus der Ca-ATPase angenommen (Toyoshima et al., 2004b).

4.3.1 ATP-Bindung

Die deutlichsten Unterschiede in den Differenzspektren beider Enzyme sind bei der ATP-Bindung (Abb. 4.8 (A)) erkennbar. Während bei der Na,K-ATPase annähernd keine Signale detektierbar sind, können bei der Ca-ATPase dort große Signale beobachtet wer-

den. Bei der Na,K-ATPase bleibt die Sekundärstruktur nahezu unverändert (Tab. 4.4: Ein COBSI-Index von $1 \cdot 10^{-4}$ entspricht etwa der Beteiligung von 0,5 Aminosäure/Protomer an der Sekundärstrukturänderung). Die Ursache für die Entstehung des Differenzspektrums der ATP-Bindung liegt im Unterschied zwischen dem ATP-gebundenen und ATP-ungebundenen Zustand des Enzyms. Im Gegensatz zu der Ca-ATPase bindet das NPE-caged ATP bereits an die Nukleotidbindungstasche der Na,K-ATPase (Forbush, 1984). Allein diese Tatsache zeigt einen deutlichen Unterschied zur Ca-ATPase. Dementsprechend könnten aufgrund der Freisetzung des ATP an der Nukleotid-Bindungsstelle der Na,K-ATPase potentielle Konformationsänderungen, die aus der eigentlichen Bindung des ATP an die Nukleotidbindungsstelle resultierten, nicht detektiert werden. Deshalb wurden drei verschiedene ATP-Derivate verwendet, von denen zwei eine wesentlich geringere Affinität an die Na,K-ATPase besaßen als das NPE-caged ATP (DMB- bzw. N^9 -NPE-caged ATP). Nach Abspaltung der Schutzgruppe von diesen beiden Derivaten konnten bei der ATP-Bindung an das Enzym, im Vergleich zum NPE-caged ATP, jedoch keine größeren Sekundärstrukturänderungen detektiert werden (Kapitel 4.1.1). Dies führt zu dem Schluß, daß bei der ATP-Bindung an die Na,K-ATPase in Relation zu den anderen beobachteten Teilreaktionen kleine Sekundärstrukturänderungen stattfinden. Bei der Ca-ATPase hingegen können bei der ATP-Bindung die größten Sekundärstrukturänderungen detektiert werden (Abb 4.8 (A) und Tab. 4.4). Dies bestätigt auch ein Modell von Toyoshima et al. (2004b), demzufolge bei der ATP-Bindung an die Ca-ATPase große Bewegungen der N- und P-Domäne stattfinden. Grundlage dieser Annahme ist jedoch eine Kristallstruktur, die den Zustand $E1 \cdot Ca_2$ zeigen soll, aber das Nukleotid TNPAMP gebunden hat. Bei der Na,K-ATPase hingegen sind diesbezüglich keine Kristallstrukturdaten mit ähnlich hoher Auflösung publiziert. Es gibt jedoch zahlreiche Untersuchungen mit fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Derivaten (FITC und 8-Azido ATP) sowie Mutationsstudien, die die Beteiligung verschiedener Aminosäuren bei der Bindung des ATP an die ATPase belegen (Karlsh, 1980, Hinz et al., 1990 bzw. Jacobsen et al., 2002). Als besonders wichtig für die Bindung von ATP ist bei beiden ATPasen ein Arg (Na,K-ATPase: Arg 544, Ca-ATPase: Arg 560), welches zur Stabilisierung des β - und γ -Phosphats dient. Da die Detektion der Beteiligung von Arg bei der ATP-Bindung an die ATPasen ebenfalls in dem für die Sekundärstrukturänderung relevanten Amid I-Bereich stattfindet, ist ein IR-spektroskopischer Nachweis schwierig. Da aber bei Na,K-ATPase unter den gewählten Bedingungen keine großen Sekundärstrukturänderungen bei der ATP-Beladung detektiert werden können, gibt es dort Evidenzen für die Beteiligung von Arg (Kapitel 3.1.2.1).

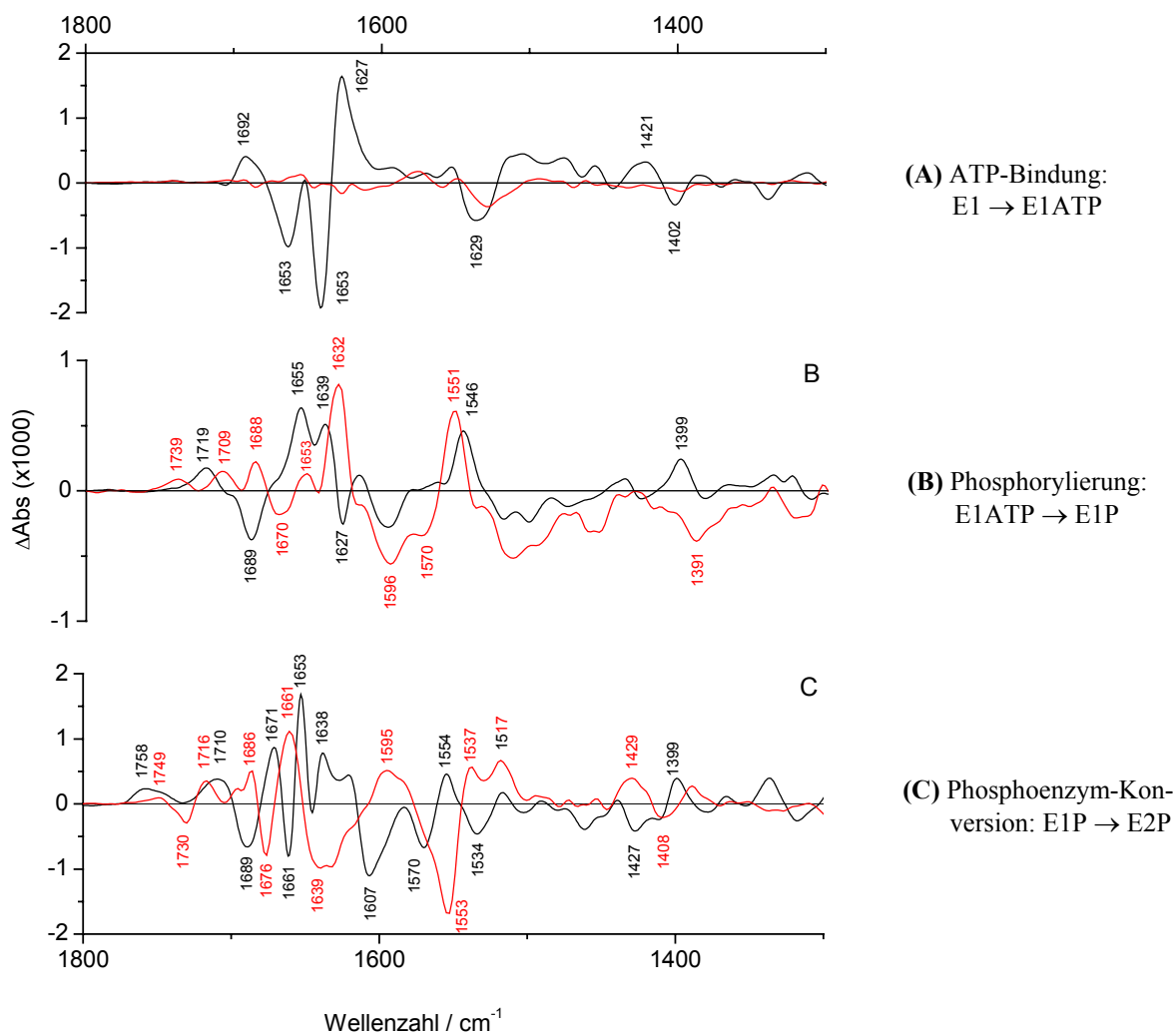


Abb. 4.8: Vergleich von IR-Differenzspektren der Na,K-ATPase und Ca-ATPase, photolysekorrigiert. **Rotes Differenzspektrum: Na,K-ATPase**, schwarzes Differenzspektrum: Ca-ATPase, Differenzspektren beider Enzyme sind auf Amid II = 0,26 normiert. Puffermedien Na,K-ATPase (5°C): Kapitel 3.1.2-3.1.5, Puffermedien Ca-ATPase (1°C): Barth et al., 1996.

Bei NMR-Strukturuntersuchungen an der isoliert exprimierten N-Domäne der Na,K-ATPase im ATP-gebundenen und -ungebundenen Zustand konnten kleine Strukturänderungen detektiert werden (Hilge et al., 2003). Inwieweit diese jedoch für das komplette Enzym relevant sind, konnte auch bei einer nachfolgenden Homologiemodellierung, der die Ca-ATPase-Struktur zugrunde lag, nicht klar beurteilt werden.

4.3.2 Phosphorylierung

Abb. 4.8 (B) zeigt die Phosphorylierung der Na,K-ATPase (vgl. Kapitel 3.1.4) und Ca-ATPase. Die Signalamplituden der Differenzspektren beider ATPasen sind über den gesamten beobachteten Spektralbereich von der gleichen Größenordnung. Bezüglich des Signalprofils ergeben sich jedoch im Detail Unterschiede.

Sekundärstrukturänderung

Das bei der Phosphorylierung detektierte Ausmaß der Sekundärstrukturänderung ist bei beiden Enzymen etwa gleich (0,1 % des Enzyms). Die spektroskopische Charakterisierung der Sekundärstrukturänderungen im Amid I-Bereich ergibt jedoch ein sich unter-

Na,K-ATPase – Ca-ATPase COBSI-Indizes / $\cdot 10^{-4}$ (H ₂ O)		
Reaktion	Na,K-ATPase	Ca-ATPase*
ATP-Bindung	1	10
Phosphorylierung	3	4
Phosphoenzym-Konversion	7	8

Tab. 4.4 *Barth et al., 1996

scheidendes Bild. Während im spektralen Bereich von β -Faltblättern bei der Ca-ATPase ein positives und zwei negative Signale auftreten (1639 cm^{-1} bzw. 1689 und 1627 cm^{-1}), können bei der Na,K-ATPase hier zwei positive Signale (1688 und 1632 cm^{-1}) detektiert werden. In diesem Zusammenhang lassen sich negative Banden mit dem Verlust des jeweiligen Sekundärstrukturelementes im Endzustand im Vergleich zum Ausgangszustand korrelieren. Wie diese konträren Signale molekular zu interpretieren sind, ist an dieser Stelle nicht eindeutig zu beantworten. Möglicherweise finden konformative Änderungen, die bei der Ca-ATPase mit der ATP-Bindung gekoppelt sind, bei der Na,K-ATPase erst bei der Phosphorylierung statt. Ein Hinweis, der für eine solche Hypothese spricht, ist die Signallage innerhalb des Amid I-Bereichs des Differenzspektrums der ATP-Bindung der Ca-ATPase. Die positiven Signale innerhalb des Differenzspektrums der Ca-ATPase (Abb. 4.8 (A), 1692 und 1627 cm^{-1}) entsprechen in etwa den bei der Phosphorylierung der Na,K-ATPase detektierten Signalen (Abb. 4.8 (B) 1688 und 1632 cm^{-1}). Zusammenfassend ist festzuhalten, daß bei beiden ATPasen die Sekundärstruktur als Folge der Phosphorylierung nahezu ungestört bleibt. Bei der Ca-ATPase entspricht dies den Schlußfolgerungen, die aus dem Vergleich der beiden kristallisierten Zustände E1ATP und E1P gezogen werden können (Toyoshima et al., 2004b). In Folge der Phosphorylierung werden dort keine Bewegungen der A-, N- und P-Domänen beobachtet.

Änderungen an individuellen Aminosäureseitenketten: Phosphorylierung, Protonierung und Kationenkoordination

Während der Phosphorylierung werden bei der Ca-ATPase zwei Ca^{2+} - und bei der Na,K-ATPase drei Na^+ -Ionen okkludiert. In beiden Fällen wird angenommen, daß an der Kationenkoordination im Inneren der Membran die Aminosäureseitenketten von Asp, Glu und Asn beteiligt sind (Abb. 4.9, aus Ogawa und Toyoshima, 2002). Dies ist insofern leicht einsichtig, da die unter physiologischem pH-Wert normalerweise deprotonierten Aminosäurereste in der Lage sind, eine gute Koordinationssphäre für Erdalkali- und Alkaliionen auszubilden. Es stellt sich somit die Frage nach der Kationenselektivität. Betrachtet man die Affinitäten der Alkali- und Erdalkaliionen zu deprotonierten Carboxylgruppen im Vergleich zu protonierten Carboxylgruppen, so läßt sich festhalten, daß die Affinitäten zu den deprotonierten Carboxylgruppen wesentlich höher sind als zu den protonierten Carboxylgruppen. Die Selektivität für Alkaliionen ist bei protonierten Carboxylgruppen allerdings höher (Lehn, 1973). Das heißt, protonierte Carboxylgruppen würden die Alkaliionen mit einer höheren Selektivität binden wie Erdalkaliionen. Ein anderer Selektionsschritt ist die Unterscheidung zwischen verschiedenen Alkaliionen. Studien, die an selektiven K^+ -Kanälen durchgeführt wurden, gehen dabei von einer besonderen Funktion der Hydrathülle der Alkaliionen und deren Dipolwechselwirkungen mit Carbonylgruppen innerhalb des Kanals aus (Bernèche und Roux, 2001). Bei den K^+ -Ionen wird die Hydrathülle während des Eintritts in den Ionenkanal entfernt.

Bezüglich der Kationengröße ist die Annahme am wahrscheinlichsten, daß Na^+ und Ca^{2+} um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren (Ionenradien: $\text{Na}^+ = 98$ pm, $\text{K}^+ = 133$ pm, $\text{Mg}^{2+} = 78$ pm, $\text{Ca}^{2+} = 106$ pm, Hollemann-Wiberg, 1995). Aber auch Mg^{2+} wäre je nach Selektivität eines Kationenfilters noch als Konkurrent vorstellbar. Die intrazellulären Konzentrationen von Ca^{2+} sind zwar sehr klein ($0,1 \mu\text{M}$), aber in manchen spezialisierten Zellkompartimenten kann diese durchaus auf 1 mM ansteigen. Mg^{2+} ist generell in millimolaren Konzentrationen im Cytosol anwesend und somit als potentieller Ligand immer zugegen. Eine theoretisch denkbare Möglichkeit eines Kationenselektivitätsfilters zwischen Alkali und Erdalkaliionen wäre z. B. die Protonierung von Carboxylresten zur Erhöhung der Affinität von Alkaliionen im Vergleich zu Erdalkaliionen. Wenn man dieses Modell der Kationenselektivität als Hypothese annimmt, müßten Unterschiede in den Differenzspektren der Kationenokklusion und -deokklusion bei Ca-ATPase und Na,K-ATPase sichtbar sein. Vergleicht man die Differenzspektren der Phosphorylierung beider Enzyme (Abb. 4.8 (B)), so sind im Absorptionsbereich potentieller $\nu(\text{C}=\text{O}) > 1700 \text{ cm}^{-1}$ bei der Na,K-

ATPase zwei und bei der Ca-ATPase ein positives Signal zu erkennen. Im Fall der Ca-ATPase wird dieses eine positive Signal der $\nu(\text{C}=\text{O})$ des phosphorylierten Asp 351 zugeordnet (Barth et al., 1998). Bei der Na,K-ATPase hingegen wird nur eines der beiden positiven Signale der Phosphorylierung des Asp 369 zugeordnet, während das verbleibende Signal die Protonierung eines Carboxylseitenkettenrestes darstellen könnte. Dementsprechend sind bei der Na,K-ATPase auch im spektralen Bereich potentieller $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ zwei negative Signale detektierbar (1596 und 1570 cm^{-1}), während es bei Ca-ATPase nur eines ist (1596 cm^{-1}).

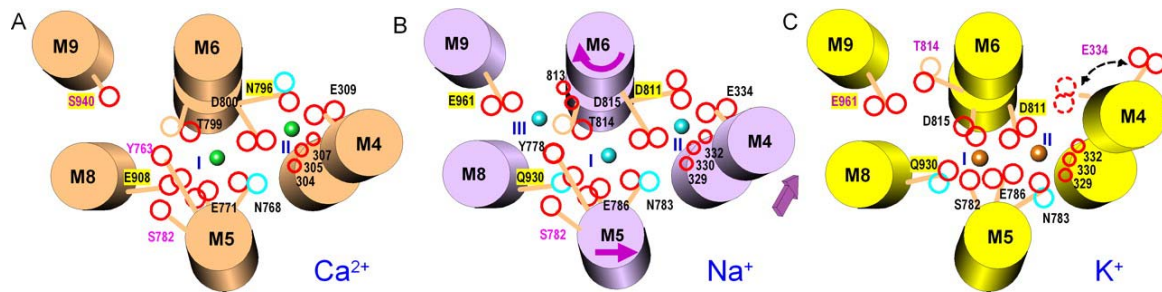


Abb. 4.9: Schema der Ca²⁺-Bindungsstellen der Ca-ATPase (A) und Na⁺- (B) sowie K⁺-Bindungsstellen (C) bei der Na,K-ATPase nach Ogawa und Toyoshima, 2002. Die Transmembrandomänen werden aus der Richtung des Cytoplasmas gezeigt. Rote Kreise: Sauerstoff, blaue Kreise: Stickstoff, orangefarbene Kreise: Kohlenstoff. Unterschiede in den Aminosäuren bei Ca-ATPase und Na,K-ATPase werden durch gelben Hintergrund innerhalb des Buchstabencodes wiedergegeben.

Während Barth et al. (1998) die Signale bei 1596 und 1546 cm^{-1} auf die $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ in Zusammenhang mit der Phosphorylierung von Asp 351 zurückführt, gibt es bei der Na,K-ATPase aufgrund der E1P-Bildung in Gegenwart von Oligomycin starke Evidenzen für einen Zusammenhang zwischen Na⁺-Okklusion und dem positiven Signal bei 1551 cm^{-1} (Kap. 3.1.12.2). Dieses zeigt vermutlich das Erscheinen der Na⁺-chelatisierenden Carboxylgruppe(n) an (vgl. Kapitel 4.1.2). Zusammenfassend ist festzuhalten, daß es im Differenzspektrum der Phosphorylierung beider ATPasen zu einem sich deutlich unterscheidenden Signalprofil oberhalb von 1700 cm^{-1} kommt, welches auf verschiedene Mechanismen der Kationenkoordination hinweisen kann.

4.3.3 Phosphoenzym-Konversion

In Abb. 4.8 (C) wird die Phosphoenzym-Konversion der Na,K-ATPase und Ca-ATPase verglichen. Die Signalamplituden beider ATPasen weisen über den beobachteten Spektralbereich die gleiche Größenordnung auf. Bezüglich der Signalpositionen ergeben sich jedoch im Detail große Unterschiede.

Sekundärstrukturänderung

Das bei der Phosphoenzym-Konversion detektierte Ausmaß der Sekundärstrukturänderung bewegt sich bei beiden ATPasen in der gleichen Größenordnung. Während bei der Na,K-ATPase etwa 0,2 % des Enzyms (~ 3 Aminosäuren/Protomer) die Sekundärstruktur ändert, ist das bei der Ca-ATPase etwa bei 0,3 % (~ 3 Aminosäuren/Enzym) der Fall. Der detaillierte Vergleich der Signale beider Enzyme im Amid I-Bereich ergibt bei der Phosphoenzym-Konversion ein konträres Bild. So ist bei jedem Signal der Na,K-ATPase zwischen 1700 und 1610 cm^{-1} auch ein Signal bei der Ca-ATPase zu erkennen (Abb. 4.8 (C)) - aber mit umgekehrten Vorzeichen. Dieses Ergebnis deutet auf unterschiedliche Strukturrelaxationen beider Enzyme während der Phosphoenzym-Konversion hin. In der Literatur wird der Ca-ATPase bei der Phosphoenzym-Konversion eine Drehung der A-Domäne um 110° und eine Knickbewegung der Transmembransegmente 5 und 4 zugeordnet (Toyoshima et al., 2004b). Homologiemodelle (Ogawa und Toyoshima, 2002) gehen bei der Na,K-ATPase von einer ähnlichen Bewegung aus.

Änderungen an individuellen Aminosäureseitenketten: Protonierung und Kationen-Deokklusion

Die Phosphoenzym-Konversion beinhaltet sowohl bei der Ca-ATPase als auch bei der Na,K-ATPase die Kationenfreisetzung aus der Membranregion. Somit ändert sich bei beiden Enzymen die Koordinationssphäre der kationenchelatisierenden Gruppen. In beiden Fällen handelt es sich hierbei wahrscheinlich um Asp, Glu, Asn und Gln (Gln nur bei der Na,K-ATPase) der Transmembransegmente 4, 5, 6 und 8 (Jørgensen et al., 2003a, Ogawa und Toyoshima, 2002). Im spektralen Bereich potentieller $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ werden bei der Ca-ATPase jeweils ein negatives und ein positives Signal detektiert (1570/1554 cm^{-1} bzw. 1427/1399 cm^{-1}). Beide Signalpaare werden bei Barth (1999) der Ca^{2+} -Freisetzung aus den chelatisierenden Gruppen zugeordnet. Die Differenzspektren der Na,K-ATPase zeigen in diesen Bereichen ebenfalls positive und negative Signale, deren Bandenlage allerdings deutlich von der der Ca-ATPase abweicht. Ein Vergleich von

Phosphorylierung und Phosphoenzym-Konversion der Na,K-ATPase (Abb. 4.8 **(B)** und **(C)**) im Bereich potentiell auftretender $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ zwischen 1530 und 1600 cm^{-1} zeigt das Auftreten eines konträren Bandenprofils (Phosphorylierung 1596 (-), 1570 (-) und 1551 (+) cm^{-1} , Phosphoenzym-Konversion: 1595 (+) und 1553 (-)). Da bei der Phosphorylierung und der Phosphoenzym-Konversion konträre Ereignisse bezüglich der Kationenkoordination angenommen werden (Okklusion bzw. Deokklusion von Na^+), ist davon auszugehen, daß diese Änderungen an den kationenkoordinierenden Gruppen (u. a. Asp und Glu) auch direkt detektiert werden können. Somit ist es wahrscheinlich, daß die Na^+ -Okklusion und Deokklusion durch konträre Signalprofile angezeigt werden. Die zwei positiven Signale des Differenzspektrums der Phosphoenzym-Konversion der Ca-ATPase im Absorptionsbereich potentieller $\nu(\text{C}=\text{O})$ ($> 1700 \text{ cm}^{-1}$) werden durch Barth (1999) mit der Protonierung zweier Carboxylatgruppen und dem Protonengegentransport in Verbindung gebracht. Auch das Differenzspektrum der Na,K-ATPase zeigt in diesem Bereich zwei positive Signale, allerdings in Verbindung mit einem negativen Signal (1730 cm^{-1}). Dieser Unterschied läßt keinen eindeutigen Schluß auf eine Protonierung mehr zu. Diese Signalsymmetrie oberhalb von 1700 cm^{-1} könnte sowohl auf eine gleichzeitig stattfindende Protonierung und Deprotonierung an Asp/Glu als auch auf eine Umgebungsänderung in direkter Nähe zu protonierten Asp/Glu in Kombination mit einer Protonierung von Asp/Glu hinweisen. Unter einer Umgebungsänderung eines protonierten Asp/Glu kann in diesem Zusammenhang die Deokklusion von Na^+ angesehen werden. Unter der Annahme, daß Na^+ durch eine Carbonylgruppe eines protonierten Asp/Glu koordiniert wird, findet bei der Deokklusion von Na^+ eine Stärkung der Carbonylbindungen statt, was sich durch die Absorption der $\nu(\text{C}=\text{O})$ bei einer höheren Wellenzahl widerspiegelt (Signallage bei 1749 und 1730 cm^{-1}). Das Signalprofil im Bereich von $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ und $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ weist entweder auf eine Na^+ -Deokklusion an deprotonierten Asp/Glu oder auf eine Protonierung und Deprotonierung von Asp/Glu hin. Aufgrund des Signalprofils wird davon ausgegangen, daß es bei der Phosphoenzym-Konversion zu einer Protonierung an Asp und/oder Glu kommt. Anhand des Signalprofils kann nicht eindeutig gesagt werden, ob die Na^+ -Deokklusion an protonierten oder deprotonierten Asp/Glu stattfindet. Zusammenfassend ist festzuhalten, daß sich das Signalprofil der Differenzspektren der Phosphoenzym-Konversion beider ATPasen im gesamten beobachteten Spektralbereich deutlich voneinander unterscheidet. Dies deutet auf andere molekulare Vorgänge sowohl bei der Kationenkoordination als auch bei der Konformationsänderung von E1 \rightarrow E2 hin.

5 Zusammenfassung

Die Na,K-Pumpe ist ein integrales Membranenzym und gehört zur Gattung der P-Typ-ATPasen. Das Enzym setzt bei der Hydrolyse von ATP die resultierende freie Energie in aktiven Transport zur Errichtung eines Na^+/K^+ -Konzentrationsgradienten über der jeweiligen Plasmamembran um. Diese Funktion wird mit einer strukturellen Alternierung zwischen zwei Hauptkonformationen E1 und E2 des Enzyms in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Charakterisierung von Sekundärstruktur- und Proteinmikroumgebungsänderungen bei Teilreaktionen der Na,K-ATPase mittels reaktionsinduzierter und zeitaufgelöster FTIR-Differenzspektroskopie. Die hier verwendete IR-Durchlichttechnik setzt voraus, daß das zu untersuchende Enzym in hochreiner, hochkonzentrierter (1 mM) und aktiver Form in einen Proteinfilm in Gegenwart eines geschützten, photolytisch spaltbaren ATP-Derivats (caged ATP) überführt werden kann. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine umfassende IR-spektroskopische Beschreibung von einzelnen Teilreaktionen innerhalb des E1/E2-Reaktionsmodells der Na,K-ATPase durchgeführt. Die Untersuchung des Enzyms in Form eines Proteinfilms mit einer Schichtdicke von etwa 5 μm ist aufgrund der hohen Hintergrundabsorption des Wassers und der geringen Extinktionskoeffizienten der Proteinschwingungsmoden erforderlich. Der überwiegende Teil der Messungen wurde mit (1-(2-nitrophenyl)ethyl)-caged ATP und Schweinenierenenzym bei 5° und 15°C durchgeführt. Nach Abspaltung der Schutzgruppe mittels eines UV-Blitzes und somit der Freisetzung von ATP wurden zeitabhängig (Millisekunden bis Sekunden) die Differenzspektren verschiedener Teilreaktionen im Bereich von 2000 bis 950 cm^{-1} ermittelt. Der große Vorteil dieser Technik besteht in der Möglichkeit der Registrierung von Zustandsänderungen einzelner Aminosäuren des Proteins, in Bezug auf die Sekundärstruktur, Phosphorylierung, Protonierung und Kationenkoordination. Besonders gut können Änderungen an den Seitenketten der Aminosäuren Aspartat und Glutamat detektiert werden. Die enzymatische ATP-Hydrolyseaktivität der Na,K-ATPase wurde in den Proteinfilmen IR-spektroskopisch anhand der $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ bei 1246 cm^{-1} bestimmt. Die Messungen der spezifischen Aktivität von Schweinenierenenzym ergab bei 15°C einen Wert von 34 $\text{nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Vergleichsmessungen, die mit einem Standardaktivitätstest in Annäherung an die Proteinfilmbedingungen durchgeführt wurden, ergaben Ergebnisse von der gleichen Größenordnung. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des kationischen Mediums konnten nach der photochemischen Freisetzung von ATP IR-Differenzspektren von drei verschiedenen Teilreaktionen untersucht werden: (1) ATP-Bindung, (2) Bildung des Phosphoenzyms

E1P, (3) Bildung des Phosphoenzyms E2P. Des weiteren wurden Differenzspektren der AMPPNP-Bindung, der ADP-Bindung und der Ammoniumbindung, die mit der K^+ -Bindung vergleichbar ist, ermittelt. Alle Teilreaktionen führten zu unterschiedlichen Differenzspektren, die charakteristisch für die jeweiligen Zustandsänderungen sind. Durch geeignete Differenzbildung konnten ebenfalls die Differenzspektren der Phosphorylierung ($EATP \rightarrow E1P$) und der Phosphoenzym-Konversion ($E1P \rightarrow E2P$) berechnet werden. Sekundärstrukturänderungen können bei der IR-Spektroskopie innerhalb des Amid I-Bereichs zwischen 1700 und 1610 cm^{-1} detektiert werden. Die Ergebnisse der IR-Differenzspektroskopie zeigen, daß die Sekundärstruktur der Na,K-ATPase bei allen untersuchten Teilreaktionen weitgehend konserviert bleibt. Unter den ermittelten Differenzspektren der Teilreaktionen resultiert die größte Netto-Sekundärstrukturänderung in einer Größenordnung von etwa $0,2\%$ (~ 3 Aminosäuren/Protomer) bei der E2P-Bildung. Als Folge der Bindung von ATP und ADP an das Enzym gibt es Evidenzen für die Beteiligung von Arginin. Die Bindung von AMPPNP an die Na,K-ATPase hingegen zeichnet sich klar durch andere molekulare Wechselwirkungen unter Beteiligung von Asp und/oder Glu aus. Die Phosphorylierung der Na,K-ATPase in Gegenwart von $1,2\text{ M Na}^+$ (E1P-Bildung) kann anhand von zwei Signalen der $\nu(C=O)$ bei 1739 und 1709 cm^{-1} , wobei eines der phosphorylierten Seitenkette Asp 369 zugeordnet wird, detektiert werden. Das zweite Signal wird der Protonierung eines Seitenkettenrestes Asp oder Glu zugerechnet, welches in Verbindung mit der Na^+ -Okklusion bei der E1P-Bildung stehen dürfte. Weitere Signale, die in Zusammenhang mit den molekularen Vorgängen bei der Phosphorylierung und Na^+ -Koordination stehen, können in der spektralen Region um 1550 cm^{-1} ($\nu_{as}(COO^-)$) und 1400 cm^{-1} ($\nu_s(COO^-)$) detektiert werden. Das Differenzspektrum der Phosphorylierung der Na,K-ATPase in Gegenwart von 130 mM Na^+ (E2P-Bildung) enthält keine Beiträge der Kationenokklusion oder -deokklusion. Dennoch enthält das Differenzspektrum der E2P-Bildung die Information über die Transformation der Kationenbindungsstellen von E1 \rightarrow E2. Während E1 den Na^+ -affinen Zustand darstellt, repräsentiert E2 den K^+ -affinen Zustand der Na,K-ATPase. Das Signalprofil der Differenzspektren der E2P-Bildung unterscheidet sich stark von dem der E1P-Bildung. Neben der Phosphorylierung an Asp 369, die auch hier oberhalb von 1700 cm^{-1} anhand eines $\nu(C=O)$ -Signals detektiert wird, können weitere positive und negative Signale sowohl oberhalb von 1700 cm^{-1} als auch im Bereich um 1550 cm^{-1} ($\nu_{as}(COO^-)$) und 1400 cm^{-1} ($\nu_s(COO^-)$) nachgewiesen werden. Bei der Transformation der Kationenbindungsstellen von E1 \rightarrow E2 können somit starke Änderungen an den Seitenketten von Asp und/oder Glu detektiert werden, die auf eine Neuorganisation der Kationenbindungs-

stellen der Na,K-ATPase schließen lassen. An dieser Neuorganisation sind sowohl Änderungen des Protonierungszustandes als auch Änderungen in der Koordinationssphäre der kationenkoordinierenden Gruppen Asp und/oder Glu beteiligt. Da von der Na,K-ATPase keine hochauflösenden Kristallstrukturen existieren, wurden die Kristallstrukturen der Ca-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, ebenfalls eine P-Typ-ATPase, zur Erläuterung des Mechanismus der Kationenbindung herangezogen (Toyoshima et al., 2004b). Zur Ca-ATPase existieren bereits analoge IR-Differenzuntersuchungen. Dies bot die Möglichkeit des direkten Vergleichs gleicher Teilreaktionen innerhalb des gemeinsamen E1/E2-Reaktionsmodells. Dieser Vergleich zeigt, daß die Sekundärstrukturen beider Enzyme bei den jeweiligen Teilreaktionen weitgehend konserviert bleiben. Bei der Ca-ATPase können die größten Netto-Sekundärstrukturänderungen von etwa 0,3 % des Enzyms (~3 Aminosäuren/Enzym) als Folge der ATP-Bindung beobachtet werden (Barth et al., 1996). Bei dieser Teilreaktion werden bei der Na,K-ATPase die kleinsten Sekundärstrukturänderungen detektiert. Beim Vergleich der Signalprofile beider Enzyme weist der sekundärstrukturelevante Amid I-Bereich bei der Phosphoenzym-Konversion auf konträre Strukturrelaxationen hin. Die Differenzspektren der Ca-ATPase im Vergleich zur Na,K-ATPase deuten auf eine sich unterscheidende Kationenkoordination hin. Durch eine Kombination der Resultate von IR-Differenz- und Fluoreszenzspektroskopie der FITC-Na,K-ATPase zur Charakterisierung von Enzymzuständen, konnte ein Modell zum Mechanismus der Inhibierung der Na,K-ATPase durch das Herzglucosid Ouabain postuliert werden. Durch Fluoreszenzmessungen an der FITC-Na,K-ATPase konnte gezeigt werden, daß Ouabain in Gegenwart von 20 mM Na⁺ an das Enzym bindet, was bei 130 mM Na⁺ nicht mehr der Fall ist. Aufgrund von IR-Differenzsignalen der E2P-Bildung, aufgenommen bei 20 mM Na⁺, ist es möglich, oberhalb von 1700 cm⁻¹ ($\nu(\text{C}=\text{O})$), bei 1554 cm⁻¹ ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$) und bei 1408 cm⁻¹ ($\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$) zwischen der an Asp 369 phosphorylierten und unphosphorylierten Na,K-ATPase zu unterscheiden. Nach Ouabain-Zugabe hingegen konnten diese Signale nicht mehr detektiert werden. Bezüglich der Inaktivierung des Enzyms im Standardaktivitätstest, für dessen Ablauf Na⁺-Konzentrationen von um die 130 mM eingesetzt werden, kann gefolgert werden, daß Ouabain nicht an das freie, sondern an das phosphorylierte Enzym bindet und somit die Inaktivierung der Na,K-ATPase nach sich zieht.

6 Anhang

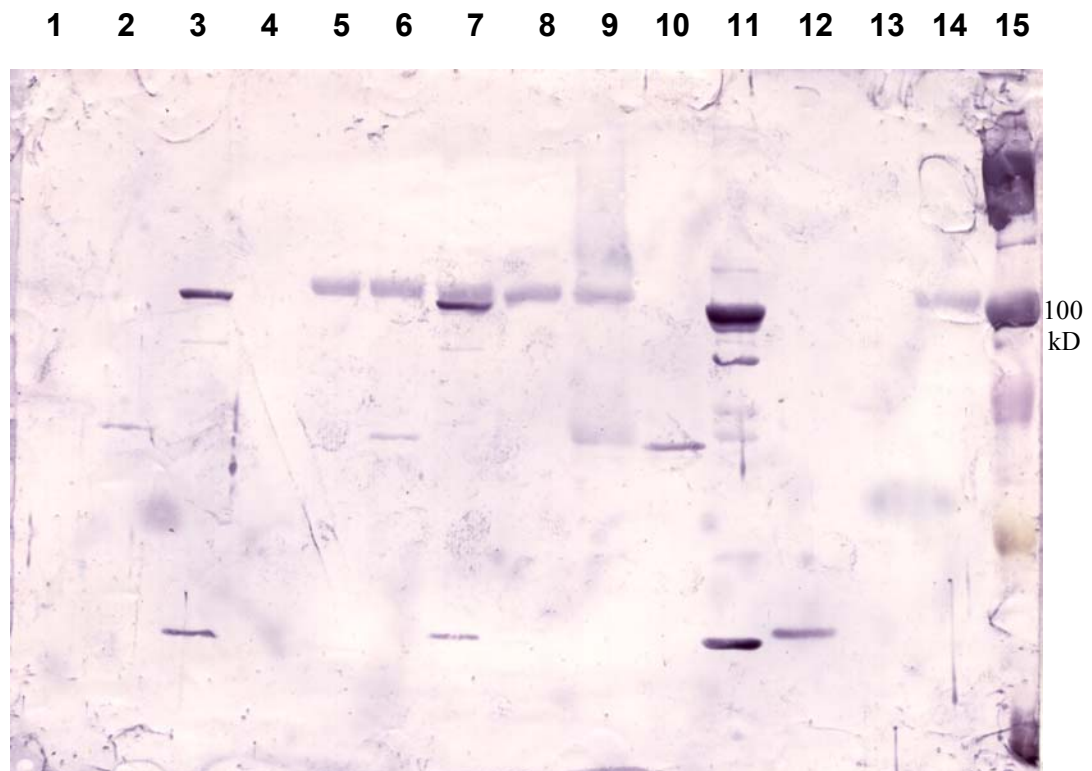
6.1 Posttranslationale Modifikation der Na,K-ATPase

Sowohl in vitro als auch in vivo Versuche haben gezeigt, daß bestimmte Serinseitenkettenreste der α -Untereinheit der Na,K-ATPase ein Substrat für Proteinkinasen darstellen (Bequin et al., 1994, Feschenko und Sweadner, 1994, Vasilets, 1997). Diese Phosphorylierungen des Enzyms haben je nach untersuchtem Gewebe unterschiedliche Auswirkung auf die Aktivität der Ionenpumpe. Dabei werden grundsätzlich zwei verschiedene Wirkmechanismen vermutet: Zum einen ist dies eine gewebespezifische, direkte Auswirkung der Phosphorylierung auf die ATPase-Aktivität bzw. Kationenaffinität (Cornelius et al., 1996) und zum anderen ist das ein Effekt auf die intrazelluläre Lokalisierung der Na,K-ATPase (Pedemonte und Bertorello, 2001). Als Detektionsmethode zur Erkennung der Phosphorylierung an AS-Seitenkettenresten diente in der Vergangenheit hauptsächlich radioaktiv markiertes [γ - 32 P]ATP (Chibalin et al., 1993). Es gibt nun auch vermehrt die Möglichkeit alternativer Detektionsmethoden in Form von phospho-spezifischen Antikörpern. Hierbei erkennen Antikörper phosphorylierte Serinseitenketten innerhalb bestimmter AS-Sequenzen. In diesem Zusammenhang wiesen immunologische Untersuchungen an der gereinigten Na,K-ATPase aus der Schweineniere sowie aus der Salzdrüse des Dornhais auf eine partielle Phosphorylierung des isolierten Materials an einem oder mehreren Serinresten hin (Fotis et al., 2001). Experimentelle Befunde deuteten darauf hin, daß hohe PP2B-Konzentrationen zu einer möglichen Dephosphorylierung des Enzyms an diesen Serinresten führen (Fotis et al., 2001). Deshalb wurde hier die Wirkung der Proteinphosphatasen PP2B, PP2A, PP1 und AP auf die isolierte Na,K-ATPase untersucht. Des weiteren sollte die in der Literatur beschriebene Phosphorylierung und somit eine weitere Erhöhung des scheinbaren Phosphorylierungsgrades des Ausgangsmaterials mit Hilfe von Proteinkinasen verifiziert werden. Hierzu war es notwendig, entsprechende Versuchsprotokolle auszuarbeiten und zu optimieren. Der Nachweis der Phosphorylierung an Serin- bzw. Threoninseitenkettenresten erfolgte mittels Immunfärbung nach Western-Blotting und SDS-PAGE (vgl. 2.1.1 – 2.1.4).

6.1.1 In vitro Dephosphorylierung

In Abb. 6.1 werden Auszüge aus den Ergebnissen der Dephosphorylierungsversuche an der Na,K-ATPase (Hai) mittels der Proteinphosphatasen PP1, PP2A, PP2B und AP ge-

zeigt. Gefärbte Bereiche auf dem Blot sollen das an Serinresten phosphorylierte Probenmaterial anzeigen. Unterschiede in der Intensität der Bandenfärbung geben einen Hinweis auf den Phosphorylierungsgrad. Probe 5 und 14 enthalten nur Na₂K-ATPase und stellen somit die Referenzkontrollen dar. Aufgrund der Färbung der Proteinbande bei etwa 110 Kd (α -Untereinheit der Na₂K-ATPase) wird auf eine Phosphorylierung dieser Untereinheit an Serinresten geschlossen.



NKA	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
PP1¹⁾	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	3,0	-	-	-
PP2A²⁾	-	-	0,2	-	-	-	0,2	-	-	-	1,0	-	-	-	-
PP2B³⁾	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	-	-
CaM⁴⁾	-	50	-	-	-	50	-	-	-	50	-	-	-	-	-
AP⁵⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-
CaCl	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
NaCl	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
RSA⁶⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-
PK⁷⁾	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MWM⁸⁾	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

¹⁾ Angabe in μg , ²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ Angaben in Units, ⁶⁾ Angabe in pmol, ⁷⁾ Positivkontrolle phosphorylierter Enzyme, ⁸⁾ Molekulargewichtsmarker.

Abb. 6. 1: Western Blot der in vitro Dephosphorylierungsversuche an der Na₂K-ATPase (Hai) mit den Proteinphosphatasen PP1, PP2A, PP2B, AP.

Die Proben 7-9 enthalten sowohl die Na,K-ATPase als auch verschiedene Phosphatasen. Die Proben 1-4 und 10-13 sind Phosphatasereferenzkontrollen. Im Vergleich zur Probe 5 zeigen die Proben 6-9 keine geringere Bandenfärbung im Bereich um 110 kDa. Dieser experimentelle Befund wird dahingehend interpretiert, daß keinerlei Dephosphorylierung der α -Untereinheit der Na,K-ATPase durch die Phosphatasen stattgefunden hat. Im Rahmen der Optimierung wurden zahlreiche Parameter verändert und modifiziert. Dazu zählten u. a. die Konzentrationen der Ionenpumpe, der Phosphatasen, der Hilfssubstrate, die Inkubationszeiten des Reaktionsgemisches sowie die Bedingungen des Farbnachweises mittels der verwendeten Antikörper.

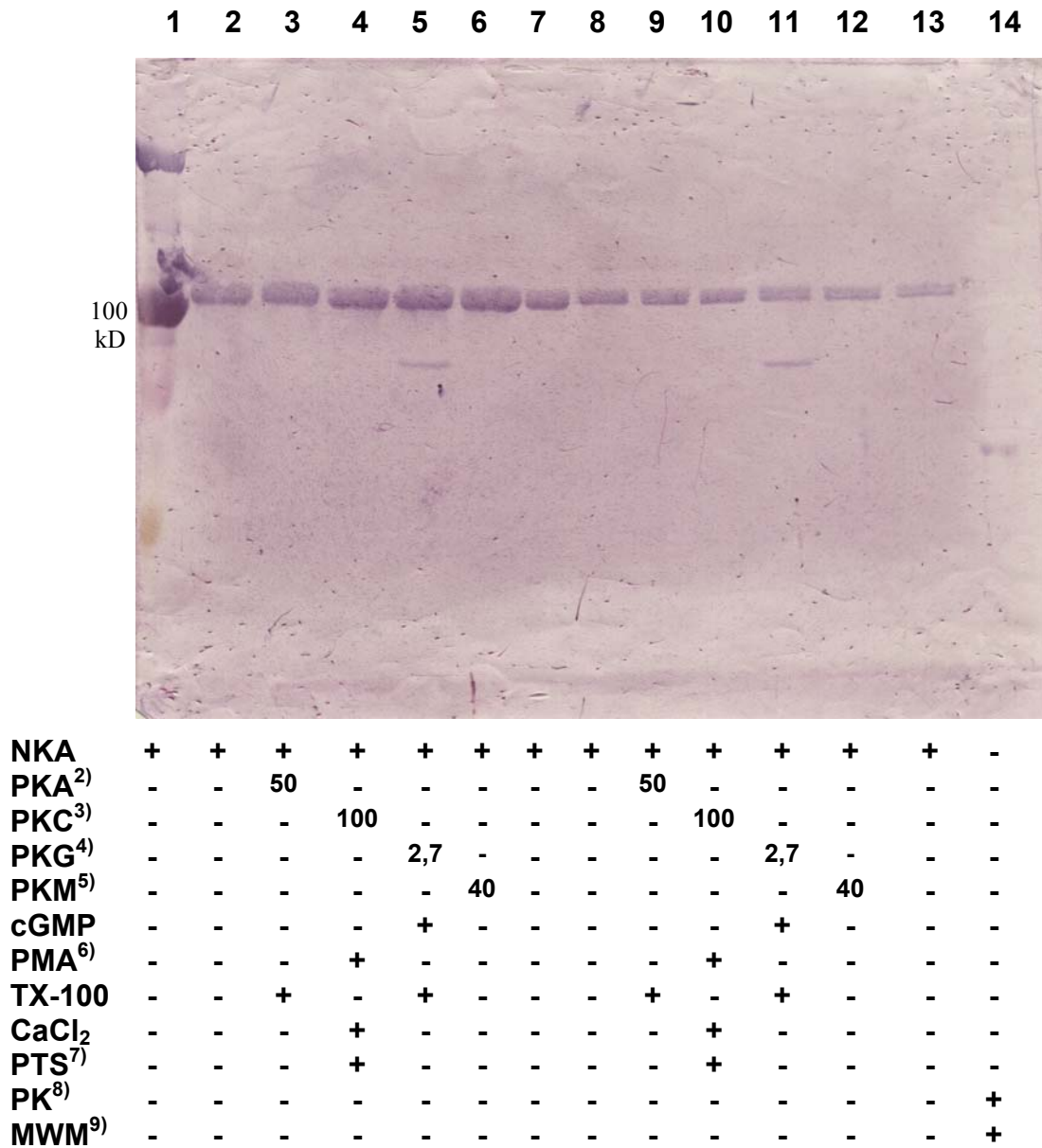
Zusammenfassend ist festzuhalten, daß es mit den phospho-spezifischen Antikörpern nicht gelungen ist, eine Dephosphorylierung der an Serinresten phosphorylierten α -Untereinheit der Na,K-ATPase durch Proteinphosphatasen nachzuweisen. Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen wurde sowohl Haienzym als auch Schweineenzym verwendet.

6.1.2 In vitro Phosphorylierung

Im folgenden werden die Ergebnisse der in vitro Phosphorylierung der α -Untereinheit der Na,K-ATPase mit den Proteinkinasen PKA, PKC, PKM und PKG vorgestellt. Dabei kam die schon bei der Dephosphorylierung vorgestellte Detektionsmethode zum Einsatz. Abb. 6.2 zeigt eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse. Die Proteinreferenzkontrollen werden durch die Proben 2, 7, 8 und 11 dargestellt. Die dort detektierte Bandenfärbung im Bereich um die 110 kDa ist ein Maß für den Phosphorylierungszustand der α -Untereinheit der Na,K-ATPase. Im Falle einer nachfolgenden Phosphorylierung der α -Untereinheit müßte also mit einer Erhöhung des Färbungsniveaus zu rechnen sein. Während das bei den kinasenhaltigen Proben 4-6 scheinbar der Fall ist, kann dies bei den Proben 10-12, die einen niedrigeren Gehalt an Na,K-ATPase im Reaktionsansatz aufwiesen, nicht bestätigt werden. Die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse stellte sich aufgrund der nur minimalen Farbintensitätsunterschiede als sehr schwierig dar. Auch hier wurden im Rahmen der Optimierung zahlreiche Parameter verändert und modifiziert. Dazu zählten u. a. die Konzentrationen der Ionenpumpe, der Kinasen, der Hilfssubstrate, die Inkubationszeiten des Reaktionsgemisches sowie die Bedingungen des Farbnachweises mittels der verwendeten Antikörper.

In der Zusammenfassung läßt sich festhalten, daß es schwache Hinweise auf die Phosphorylierung von Serinseitenkettenresten bei der α -Untereinheit der Na,K-ATPase durch Pro-

teinkinasen gibt. Dieser Befund ist allerdings in der Literatur schon seit Beginn der 90er Jahre (Chibalin et al., 1992) bekannt.



1) Auftragsmenge Proben 1-6: 3 µg, Proben 7-12: 1 µg

2) Angabe in Unit

3) Angabe in ng

4) Angabe in kUnit

5) Angabe in ng

6) Phorbol 12-myristyl 13-acetat

7) Phosphatidylserin (Beschallte Suspension)

8) Phosphorylierte Enzyme der Firma Biomol

9) Molekulargewichtsmarker

Abb. 6. 2: Western Blot der in vitro Phorylierungsversuche an der Na,K-ATPase (Hai) mit den Proteinkinase PKA, PKC, PKM, PKG.

In Bezug auf das Detektionssystem muß festgehalten werden, daß es unter den hier gewählten Bedingungen nicht die Leistungsfähigkeit entfalten konnte, die erhofft worden war. Gerade der Farbintensitätsunterschied zwischen dem laut Antikörperanzeige phosphorylierten Ausgangsmaterial und der durch die Proteinkinase C, M und G phosphorylierten α -Untereinheit der Na,K-ATPase war zu schwach, um gesicherte Aussagen machen zu können. Als Grundlage der Untersuchungen diente auch hier sowohl Haienzym als auch Schweineenzym.

6.2 Die Ca^{2+} -Bindung und -Dissoziation an die Ca-ATPase

Gegenwärtig liegen fünf verschiedene Kristallstrukturen der Ca-ATPase des sarcoplasmatischen Reticulums in jeweils unterschiedlichen Enzymzuständen vor (Toyoshima et al., 2000, Toyoshima et al., 2002, Toyoshima et al., 2004). In Abschnitt 1.1.4 wird der Ca^{2+} beladene $\text{E1}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$ und der Ca^{2+} freie E2(TG) Zustand vorgestellt. Hierbei wird auch auf die atomare Beschaffenheit der Ca^{2+} -Bindungsstellen eingegangen. Aufgrund aktueller Untersuchungen (Picard et al., 2005) ist allerdings davon auszugehen, daß es bei wenigstens zwei dieser Kristallstrukturen ($\text{E1}\cdot\text{AMPPCP}$ (E1ATP) und $\text{E1}\cdot\text{AlF}_x\cdot\text{ADP}$ ($\text{E1P}\cdot\text{ADP}$)) berechnete Zweifel an der Richtigkeit der unter Kristallisationsbedingungen angenommenen Zustände gibt. Da es sich bei Kristallstrukturen um statische Momentaufnahmen handelt, müssen zur Erforschung des Mechanismus der Ca^{2+} -Bindung auch zeit aufgelöste Methoden zum Einsatz kommen. Zur Untersuchung der Ca^{2+} -Bindung und -Dissoziation wurden deshalb in den letzten drei Dekaden zahlreiche kinetische Messungen durchgeführt (z. B.: Dupont, 1977, Inesi et al., 1980, Petithory und Jencks, 1988, Orłowski und Champeil, 1991, Henderson et al., 1994, Champeil et al., 1997, Peinelt und Apell, 2005). Eine umfassende kinetische Charakterisierung steht allerdings bis heute noch aus. Insbesondere Hochdruck Stopped-flow Experimente, die Rückschlüsse auf Aktivierungsvolumina und mögliche Konformationsänderungen des Enzyms innerhalb des Pumpenzyklus zulassen würden, sind bislang nicht durchgeführt worden. Bei der Na,K-ATPase hingegen wurden solche Experimente bereits erfolgreich abgeschlossen (Grell et al., 2003, Schick, 1999).

Um zeitliche Verläufe bei der Ca^{2+} -Bindung oder -Dissoziation an der Ca-ATPase detektieren zu können, bediente man sich hauptsächlich der Messung von intrinsischen Fluoreszenzänderungen in Verbindung mit einem Ca^{2+} /EGTA-Puffersystem. Als biologisches Ausgangsmaterial solcher Untersuchungen wurde größtenteils die vesikuläre und die mit

dem Detergenz DOC behandelte Ca-ATPase verwendet. Während die vesikuläre Ca-ATPase eine Reinheit von $\sim 70\%$ (Champeil et al., 1978) aufweist, kann die Reinheit mit dem DOC behandelten Material auf $\sim 90\%$ (Meisner et al., 1973) und mit einem affinitätschromatographisch gereinigtem Material auf $99,5\%$ gesteigert werden (Coll & Murphy, 1984, Details zu den unterschiedlichen Präparationen siehe Abschnitt 2.3.2).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Eignung des in $C_{12}E_8$ solubilisierten und des affinitätschromatographisch gereinigten Enzyms als Ausgangsmaterial zur Untersuchung der Ca^{2+} -Bindung überprüft werden. Dazu war es notwendig, die bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zu reproduzieren und weitergehende Experimente durchzuführen.

6.2.1 Vesikuläre Ca-ATPase

Abb. 6.3 zeigt eine Gleichgewichtstitration der vesikulären Ca-ATPase (SDS-Gel und spezifische Aktivität: Abschnitt 2.3.2). Zur genauen Ca^{2+} -Einstellung wurde das Puffersystem EGTA/ Ca^{2+} verwendet. Die Berechnung der jeweiligen Metallkonzentrationen erfolgte mittels eines speziellen Programms (CAMG, 1994). Die Richtigkeit der freien Ca^{2+} -Konzentrationen wurde durch Einsatz des Fluoreszenzindikators Oregon Green BABTA überprüft. Während es bei der Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration zu einer Reduktion der intrinsischen Fluoreszenz kam, wurde eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration durch einen Anstieg der Fluoreszenz angezeigt. Mg^{2+} hingegen zeigte keinen Effekt. Die in Abb. 6.3 erkennbare Fluoreszenzabnahme bei der Mg^{2+} -Zugabe ist ausschließlich auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen.

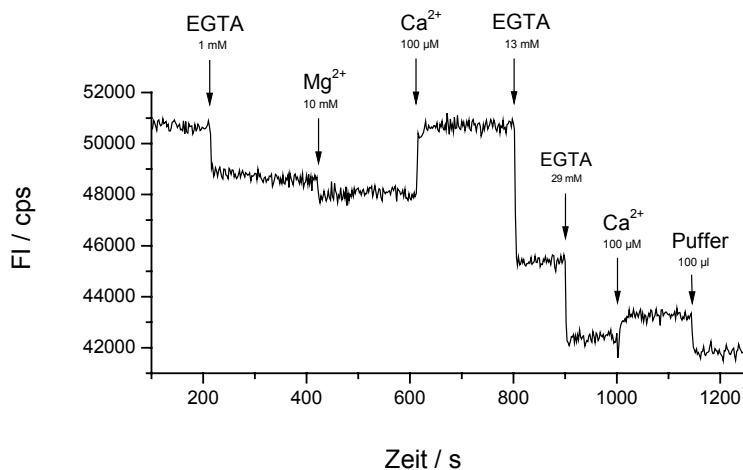
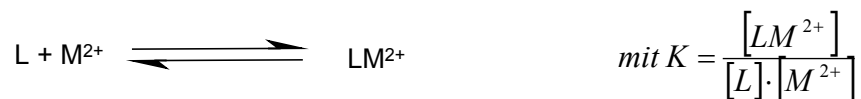


Abb. 6.3: Der Effekt von Ca^{2+} und Mg^{2+} auf die intrinsische Fluoreszenz der Ca-ATPase, $0,55\ \mu$ M vesikuläre Ca-ATPase in 150 mM MES/Tris pH 6,0. λ_{exc} : 290 nm, λ_{em} : 338 nm, die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen nach der jeweiligen Zugabe.

In einem zweiten Schritt erfolgte eine genaue fluorimetrische Titration mit CaCl_2 (Abb. 6.4). Die Fluoreszenzänderungen während der Ca^{2+} -Bindung werden hier zur Bestimmung der scheinbaren Bindungsaffinitäten ausgenutzt. Die Bildung eines 1:1-Komplexes eines Liganden L (hier Ca-ATPase) mit einem Kation M^{2+} (hier Ca^{2+}) kann folgendermaßen beschrieben werden:



Die scheinbare Assoziationskonstante K wurde aus der an die Meßdaten angepaßten Titrationskurve mit Hilfe des Programms KOD11 (Schmid et al.) für das 1:1 Bindungsmodell ermittelt. Die Fluoreszenzänderung bei der Ca^{2+} -Dissoziation betrug etwa 12 %.

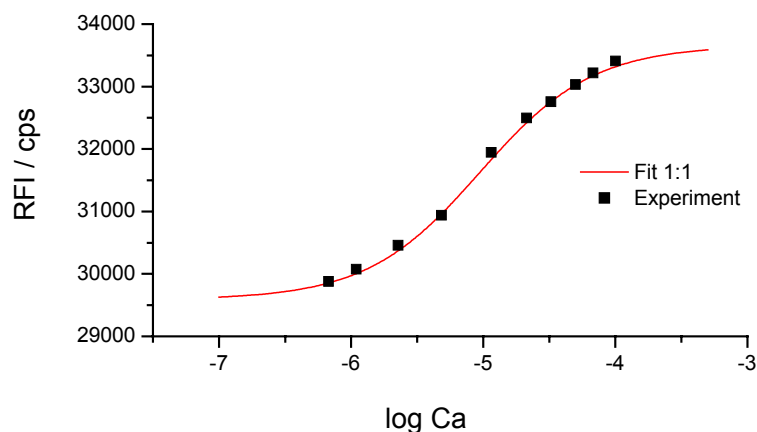


Abb.6.4: Fluorimetrische Titration der vesikulären Ca-ATPase ($0,46 \mu\text{M}$) mit CaCl_2 in 150 mM MES/Tris pH 6,0. λ_{exc} : 290 nm , λ_{em} : 338 nm (verdünnungskorrigiert). Die rote Linie zeigt einen Fit mittels des 1:1 Bindungsmodells. $K = 1,089 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

6.2.2 DOC-behandelte Ca-ATPase

Bei der DOC behandelten Ca-ATPase (SDS-Gel und Aktivität: Abschnitt 2.3.2) wurden ebenfalls Gleichgewichtstitrationen zur Untersuchung des Effekts von Ca^{2+} auf die intrinsische Fluoreszenz des Enzyms durchgeführt (Abb. 6.5). In Bezug auf das Fluoreszenzverhalten erkennt man bei steigender bzw. sinkender Ca^{2+} -Konzentration das gleiche Verhalten wie bei der vesikulären Ca-ATPase.

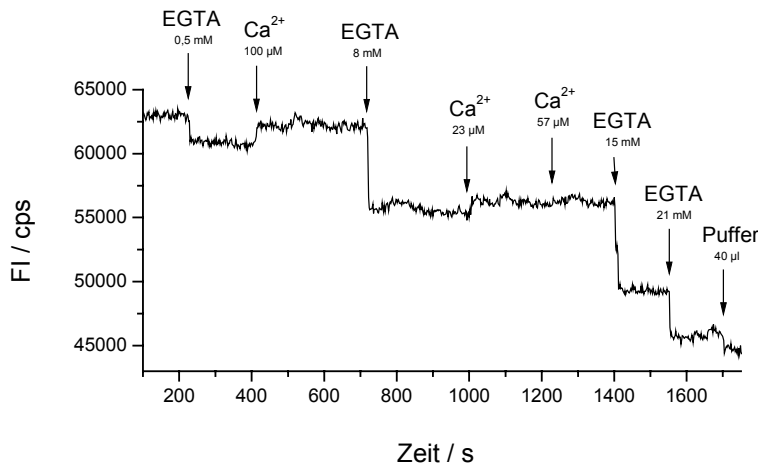


Abb. 6.5: Der Effekt von Ca^{2+} auf die intrinsische Fluoreszenz der DOC behandelten Ca-ATPase, $0,9 \mu\text{M}$ DOC behandelte Ca-ATPase in 150 mM MES/Tris pH $6,0$. λ_{exc} : 290 nm , λ_{em} : 338 nm , die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen nach der jeweiligen Zugabe.

6.2.3 Solubilisierte Ca-ATPase

Die in C_{12}E_8 solubilisierte Ca-ATPase zeigte im Vergleich zu den beiden vorher charakterisierten Präparationen ein deutlich verändertes Verhalten. Dies zeigte sich u. a. an einer erhöhten spezifischen Aktivität (Kapitel 2.3.2). In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß das in Abwesenheit von Ca^{2+} solubilisierte Enzym innerhalb von wenigen Minuten seine komplette ATPase-Aktivität verlor (Daten nicht gezeigt). Dieser experimentelle Befund deutet bereits auf ein Problem bei den Fluoreszenzuntersuchungen hin, da nämlich dort die Ca^{2+} -Konzentration über einen großen Konzentrationsbereich verändert wurde.

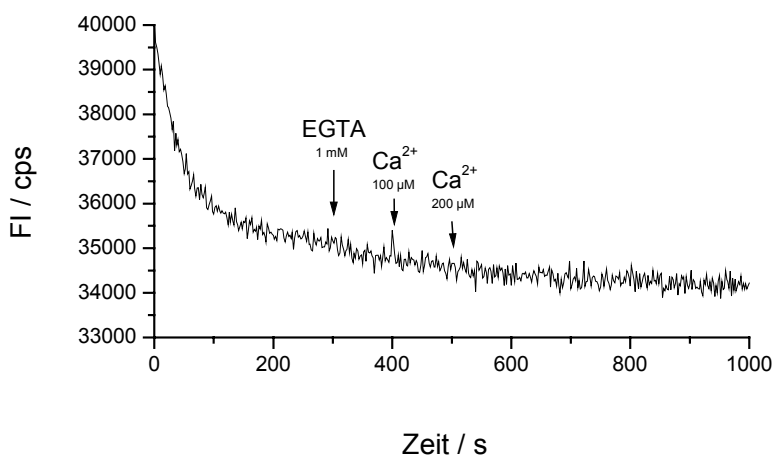


Abb. 6.6: Der Effekt von Ca^{2+} auf die intrinsische Fluoreszenz der solubilierten Ca-ATPase, $0,7 \mu\text{M}$ solubilisierte Ca-ATPase in 150 mM MES/Tris pH $6,0$ und $200 \mu\text{M}$ C_{12}E_8 . λ_{exc} : 290 nm , λ_{em} : 338 nm . Startkonzentration Ca^{2+} bei $t=0$ $\sim 2 \mu\text{M}$, die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen nach der jeweiligen Zugabe.

Tatsächlich zeigte die solubilisierte Ca-ATPase auch in Bezug auf das Fluoreszenzverhalten bei der Ca^{2+} -Bindung deutlich veränderte Eigenschaften. Eines der Hauptprobleme stellte die mangelnde Grundlinienstabilität bei der solubilisierten Ca-ATPase unter den verwendeten Bedingungen dar (Abb. 6.6). Möglicherweise spielte hier die niedrige Ca^{2+} -Konzentration und die daraus resultierende Instabilität des Enzyms eine Rolle. Bei der in Abb. 6.6 gezeigten Titration betrug die Startkonzentration an Ca^{2+} etwa $2 \mu\text{M}$. Startkonzentrationen von etwa $100 \mu\text{M}$ zeigten eine bessere, aber für Fluoreszenztitrationen immer noch inakzeptable Grundlinienschwankungen. Des Weiteren konnten gar keine oder nur sehr kleine Fluoreszenzeffekte bei der Ca^{2+} -Bindung bzw. Dissoziation detektiert werden (Abb. 6.6 und 6.7). Ein weiteres, nicht minder wichtiges Problem stellte die mangelnde Reproduzierbarkeit der Resultate dar.

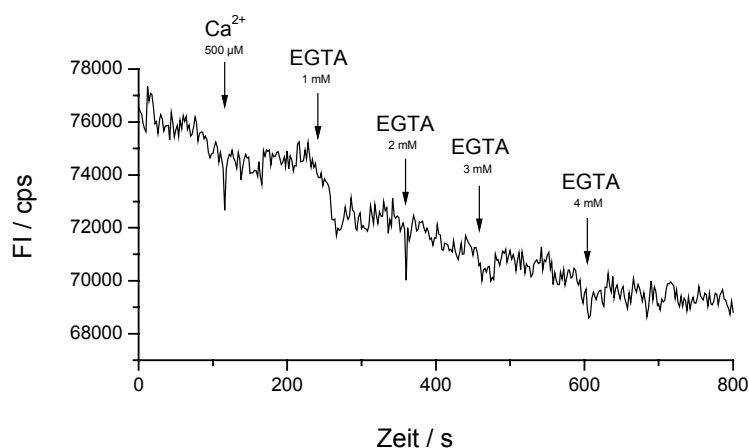


Abb. 6.7: Gleichgewichtstitration: Der Effekt von Ca^{2+} auf die intrinsische Fluoreszenz, $0,9 \mu\text{M}$ solubilisierte Ca-ATP-ase in 150 mM MES/Tris pH 6,0 und $200 \mu\text{M}$ C_{12}E_8 . λ_{exc} : 290 nm , λ_{em} : 338 nm . Startkonzentration Ca^{2+} bei $t = 0 \text{ s}$: $\sim 2 \mu\text{M}$, die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen nach der jeweiligen Zugabe.

Im Rahmen der Optimierung dieses Systems wurden zahlreiche Parameter wie Ca^{2+} -Konzentration, Enzymkonzentration sowie Detergenzkonzentration variiert. Es ist jedoch nicht gelungen, geeignete Bedingungen bezüglich der Grundlinienstabilität, der Reproduzierbarkeit und der Fluoreszenzänderung bei der Ca^{2+} -Bindung/Dissoziation zu finden, die für eine erfolgreiche Untersuchung dieses Systems notwendig gewesen wären.

6.2.4 RR 120 gereinigte Ca-ATPase

Die affinitätschromatographisch gereinigte Ca-ATPase stellte die reinste Präparation der hier isolierten Ausgangsmaterialien dar (SDS-Gel und Aktivität: Abschnitt 2.3. 2). Prinzipiell handelt es sich auch bei dieser Präparation um eine in C_{12}E_8 solubilisierte Ca-ATPase.

Damit verknüpft waren aber auch die schon in Kapitel 6.2.3 geschilderten Probleme bei der Stabilität des Enzyms.

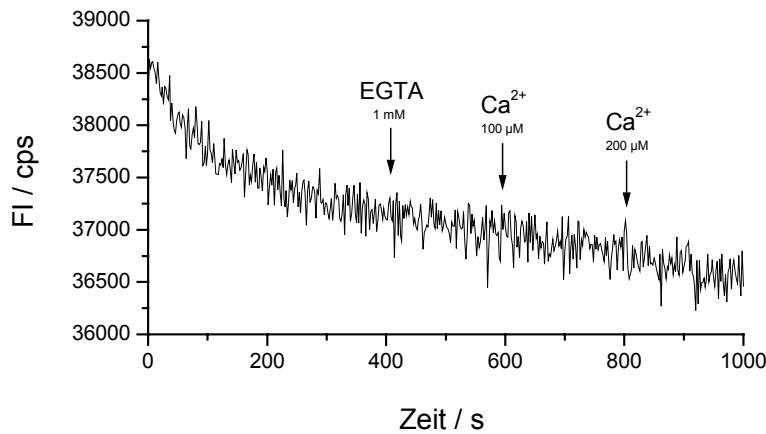


Abb. 6.8: Der Effekt von Ca^{2+} auf die intrinsische Fluoreszenz, $0,7 \mu\text{M}$ RR120 gereinigte Ca-ATPase in 150 mM MES/Tris pH 6,0 und $200 \mu\text{M}$ C_{12}E_8 . λ_{exc} : 290 nm , λ_{em} : 338 nm . Startkonzentration Ca^{2+} bei $t=0 \sim 2 \mu\text{M}$, die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen nach der jeweiligen Zugabe.

Tatsächlich zeigten sich bei den fluorimetrischen Untersuchungen des RR120 aufgereinigten Materials (Abb. 6.8) die gleichen Probleme wie bei der solubilisierten Präparation (Abb. 6.6). Auch im Rahmen der Optimierung dieses Systems wurden zahlreiche Parameter wie Ca^{2+} -Konzentration, Enzymkonzentration sowie Detergenzkonzentration variiert. Es ist jedoch nicht gelungen, geeignete Bedingungen bezüglich der Grundlinienstabilität, der Reproduzierbarkeit und der Fluoreszenzänderung bei der Ca^{2+} -Bindung bzw. Dissoziation zu finden, die für eine erfolgreiche Untersuchung dieses Systems notwendig gewesen wären.

Zusammenfassend muß festgehalten werden, daß sich sowohl die solubilierte als auch die solubilisierte und affinitätschromatographisch gereinigte Präparation der Ca-ATPase nicht dazu eignen, die Ca^{2+} -Bindung mittels intrinsischer Fluoreszenz zu detektieren. Zum einen könnte der Grund dafür in der Instabilität bezüglich der ATPase-Aktivität des solubilierten Materials liegen und zum anderen aber auch an den Eigenschaften des solubilierten Materials an sich. Da durch die Solubilisierung ein Großteil der natürlichen Phospholipidschicht entfernt worden ist, könnte die künstliche Detergenzumgebung dafür verantwortlich sein, daß aufgrund veränderter räumlicher Anordnungen z. B. der Tryptophanreste im Enzym keine oder nur extrem kleine Fluoreszenzänderungen bei der Ca^{2+} -Bindung detektiert werden können.

7 Literaturverzeichnis

- Adam, Lauger, Stark** (1995) *Physikalische Chemie und Biophysik*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Albers, R.W.** (1967) Biochemical Aspects of active transport. *Annu. Rev. Biochem.* **36**, 727-757.
- Alderighi, L. et al.** (1999) Hyperquad Simulation and Speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coord. Chem. Revs.*, **184**, 311-318.
- Apell, H-J. et al.** (1996) Kinetics of the Phosphorylation of Na,K-ATPase by Inorganic Phosphate Detected by a Fluorescence Method. *Biochemistry* **35**, 10922-10930.
- Arato-Oshima, T. et al.** (1996) Mechanism Responsible for Oligomycin-induced Occlusion of Na⁺ within Na/K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **271**, 25604-25610.
- Arrondo J. L. R. et al.** (1992) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**, 23-56.
- Askari, A et al.** (1988) Ligand binding sites of the ouabain-complexed (Na⁺ + K⁺)-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **263**, 235-242.
- Barth, A. et al.** (1991) Infrared spectroscopic signals arising from ligand binding and conformational changes in the catalytic cycle of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1057**, 115-123.
- Barth, A. et al.** (1994) Changes of protein structure, nucleotide microenvironment, and Ca²⁺ binding states in the catalytic cycle of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. Investigation of nucleotide binding, phosphorylation and phosphoenzyme conversion by FTIR difference spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1194**, 75-91.
- Barth, A. et al.** (1995) Photochemical release of ATP from "caged ATP" studied by time-resolved Infrared spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10311-10316.
- Barth, A. et al.** (1996) Time-resolved infrared spectroscopy of the Ca²⁺ ATPase: The enzyme at work. *J. Biol. Chem.* **271**, 30637-30646.
- Barth, A. et al.** (1997) Ca²⁺ release from the phosphorylated and unphosphorylated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase results in parallel structural changes. An infrared spectroscopic study. *J. Biol. Chem.* **272**, 25507-25510.
- Barth, A. et al.** (1997) Time-resolved infrared spectroscopy of intermediates and products from photolysis of 1-(2-nitrophenyl)ethyl phosphates: Reaction of the 2-nitrosoacetophenone byproduct with thiols. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 4149-4159.
- Barth, A. & Mantele, W.** (1998) ATP-Induced phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase: Molecular interpretation of infrared difference spectra. *Biophys. J.* **75** 538-544.

- Barth, A.** (1999) Phosphoenzyme conversion of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Molecular interpretation of infrared difference spectra. *J. Biol. Chem.* **274**, 22170-22175.
- Barth, A.** (2000a) The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **74**, 141-173.
- Barth, A.** (2000b) Substrate binding and enzyme function investigated by infrared spectroscopy. *FEBS Letters* **477**, 151-156.
- Barth, A.** (2002) What vibration tell us about proteins. *Quart. Rev. Biophys.* **35**, 369-430.
- Beaugé, L.** (1988) Inhibition of translocation reactions by vanadate. *Methods Enzymol.*, **156**, 251-267.
- Beguin, P. et al.** (1994) Phosphorylation of Na,K-ATPase alpha-subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 24437-24445.
- Berberián, G. and Beaugé, L.** (1991) Phosphorylation of Na,K-ATPase by acetyl phosphate and inorganic phosphate. Sidedness of Na^+ , K^+ and nucleotide interactions and related enzyme conformations. *Biochim. Biophys. Acta* **1063**, 217-225.
- Bonting, S.L. et al.** (1979) The low energy phosphorylated intermediate of Na,K-ATPase. In Na,K-ATPase: Structure and kinetics. *Skou, J.C. & Nørby, J.G., Eds., Academic Press, New York*, 317-330.
- Bernèche, S. and Roux, B.** (2001) Energetics of ion conduction through the K^+ channel. *Nature* **414**, 73-77.
- Bradford, M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Cantley, L.C.** (1977) Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.*, **252**, 7421-7423.
- Champeil, P. et al.** (1978) Sarcoplasmic Reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* **253**, 1179-1186.
- Champeil, P. et al.** (1997) Dissociation of Ca^{2+} from Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase and Changes in Fluorescence of Optically Selected Trp Residues. Effects of KCl and NaCl and Implications for Substeps in Ca^{2+} Dissociation. *Biochemistry* **41**, 1267-1273.
- Campos, M. and Beauge, L.** (1994) Na^+ -ATPase activity of Na^+ , K^+ -ATPase. Reactivity of the E2 form during Na^+ -ATPase turnover. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18028-18036.
- Chibalin, A.V. et al.** (1992) Phosphorylation of Na,K-ATPase alpha-subunits in microsomes and in homogenates of *Xenopus* oocytes resulting from the stimulation of protein kinase A and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **267**, 22378-22384.

Chibalin, A.V. et al. (1993) Phosphorylation of Na,K-ATPase by Ca, Phospholipid-Dependent and cAMP-Dependent Protein Kinases. Mapping of the Region Phosphorylated by Ca, Phospholipid-Dependent Protein Kinase. *J. Bioenerg. Biomem.* **25**, 61-66.

Chirgadze, Y.N., Fedorov, O.V. and Trushina, N.P. (1975) Estimation of amino acid residue side-chain absorption in the infrared spectra of protein solutions in heavy water. *Biopolymers.* **14**, 679-694.

Clarke, R.J. et al. (1998) Kinetics of Na⁺-Dependent Conformational Changes of Rabbit Kidney Na⁺,K⁺-ATPase. *Biophys. J.* **75**, 1340-1353.

Coll, R.J. and Murphy, A. J. (1984) Purification of the CaATPase of Sarcoplasmic Reticulum by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **259**, 14249-14254.

Cornelius, F., et al. (2003) Functional modulation of the sodium pump. *News Physiol. Sci.* **18**, 119-124.

Cornelius, F., et al. (1998) E₂P Phosphoforms of Na,K-ATPase. II. Interaction of Substrate and Cation-Binding Sites in P_i Phosphorylation of Na,K-ATPase. *Biochemistry*, **37**, 16686-16696.

Cornelius, F., et al. (1996) Functional regulation of reconstituted Na,K-ATPase by protein kinase A phosphorylation. *FEBS Letters* **380**, 277-280.

Crambert, G. et al. (2000) Transport and Pharmacological Properties of Nine Different Human Na,K-ATPase Isozymes. *J. Biol. Chem.* **275**, 1976-1986.

CRC Handbook of Biochemistry (1970) 2nd Edition, Ed. Sober, A.H. CRC Press, Inc, Ohio, USA.

CRC Handbook of Chemistry and Physics (1977-78) 58th Edition, Ed. Weast, R.C. CRC Press, Inc, Ohio, USA.

Creighton, T. E. (1999) Oligomycin. *Encyclopedia Mol.Biol.*, John Wiley & Sons, Inc., New York, V 1, 1698-1700.

Deguchi, N., Jorgensen, P.L. and Maunsbach, A.B. (1977) Ultrastructure of the sodium pump: Comparison of thin sectioning, negative staining, and freeze-fracture of purified, membrane-bound (Na⁺, K⁺)-ATPase. *J. Cell. Biol.* **75**, 619-634.

Dollinger, G. et al. (1986) Fourier transform infrared difference spectroscopy of bacteriorhodopsin and its photoproducts regenerated with deuterated tyrosine. *Biochemistry* **25**, 6524-6533.

Dupont, Y. (1977) Kinetics and Regulation of Sarcoplasmic Reticulum ATPase. *Eur. J. Biochem.*, **72**, 185-190.

Esmann, M. und Fedosova, N.U. (1997) Eosin as a probe for conformational transitions and nucleotide binding in Na,K-ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **834**, 310-321.

- Esmann, M. et al.** (1991) Oligomycin interaction with Na⁺,K⁺-ATPase: Oligomycin binding and dissociation are slow processes. *Biochim. Biophys. Acta* **1064**, 31-36.
- Esmann, M. et al.** (1979) Solubilization and molecular weight determination of the Na⁺,K⁺-ATPase from rectal glands of squalus acanthias. *Biochim. Biophys. Acta* **567**, 410-420.
- Esmann, M.** (1988) Solubilization of Na⁺,K⁺-ATPase. *Meth. Enzymol.* **156**, 72-79.
- Fahn, S. et al.** (1966) Sodium-Potassium-activated Adenosine Triphosphatase of *Electrophorus* Electric Organ. I. AN ASSOCIATED SODIUM-ACTIVATED TRANSPHOSPHORYLATION. *J. Biol. Chem.* **241**, 1882-1889.
- Fedosova, N. et al.** (1998) E₂P Phosphoforms of Na,K-ATPase. I. Comparison of Phosphointermediates formed from ATP and P_i by Their Reactivity toward Hydroxylamine and Vanadate. *Biochemistry* **37**, 13634-13642.
- Fedosova, N. et al.** (2002) Nucleotide Binding to Na,K-ATPase: The Role of Electrostatic Interactions. *Biochemistry* **41**, 1267-1273.
- Fendler, K. et al.** (1998) Investigation of charge translocation by ion pumps and carriers using caged substrates. *Meth. Enzymol.* **291**, 289-306.
- Fendler, K. et al.** (1993) Pre-steady-state charge translocation in NaK-ATPase from eel electric organ. *J. Gen. Physiol.* **102**, 631-666.
- Fendler, K. et al.** (1985) Pump currents generated by the purified Na⁺K⁺-ATPase from kidney on black lipid membranes. *EMBO J.* **4**, 3079-3085.
- Flemming, C.** (1999) Determination in phosphorylation of shark rectal Na,K-ATPase by ATP: Temperature sensitivity and effects of ADP. *Biophys. J.* **77**, 934-942.
- Fiske, C. and Subbarow, Y.** (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375-400.
- Feschenko, M.S. & Sweadner, K.J.** (1994) Conformation-dependent Phosphorylation of Na,K-ATPase by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* **269**, 30436-30444.
- Forbush, B. III.** (1984) Na⁺ movement in a single turnover of the Na pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 5310-5314.
- Forbush, B., III, & Klodos, I.** (1991) Rate-limiting steps in Na translocation by the Na/K-pump. In *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation* (Kaplan, J. H., & DeWeer, P., eds.) 211-225, Rockefeller University Press, New York.
- Fotis, H. et al.** (2001) Unveröffentlichte Laboraufzeichnungen.
- Froehlich, J.P.** (1976) Evidence for a new intermediate state in mechanism of (Na⁺⁺K⁺)-adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **251**, 2186-2188.

- Garrahan, P.J and Glynn, I.M.** (1967) The stoichiometry of the sodium pump. *J. Physiol.* 192: 217-235.
- Geering, K. et al.** (2001) The functional role of β subunits in oligomeric P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 425-438.
- Germar von, F. et al.** (2000) Structural changes of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase upon nucleotide binding studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biophys. J.* **78**, 1531-1540.
- Gibbs, R. et al.** (1965) Preparation, Assay, and Properties of an Na^{+} - and K^{+} -requiring Adenosine Triphosphatase from Beef Brain. *J. Biol. Chem.* **240**, 2181-2187.
- Glynn, I.M. et al.** (1984) The occlusion of sodium ions within the mammalian sodium-potassium pump: its role in sodium transport. *J. Physiol. (Lond)* **351**, 531-547.
- Goormaghtigh et al.** (1994) Detremination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange. *Subcell. Biochem.* **23**, 363-403.
- Goormaghtigh et al.** (1994) Detremination of soluble and membrane proteinstructure by Fourier transform infrared spectroscopy III. Secondary structures. *Subcell. Biochem.* **23**, 405-450.
- Günzler, H. & Böck, H.** (1983) IR-Spektroskopie: Eine Einführung. 2. Auflage, VCH Weinheim.
- Grell, E. et al.** (2004) Nucleotide/Protein Interaction: Energetic and structural features of Na,K-ATPase. *J. Ther. Ana. Cal.* **77**, 471-481.
- Grell, E. et al.** (2003) High-Pressure Stopped-Flow Studies to Characterize Transient Conformational Transitions of a Membrane Enzyme: Na,K-ATPase. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, 207-213.
- Grell, E. et al.** (2001) Membrane receptor calorimetry: cardiac glycoside interaction with Na,K-ATPase. *Thermochim. Acta* **380**, 245-254.
- Grell E. et al** (1994, a) Towards an Understanding of the Fluorescence Intensity Changes Observed on FITC- Na^{+} , K^{+} -ATPase. *J. of Fluorescence*, 4, 251-254.
- Grell, E. et al.** (1994, b) Reassignment of cation-induced population of main conformational states of FITC- $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase as detected by fluorescence spectroscopy and characterized by equilibrium binding studies. *The Sodium Pump: Structure hormonal control and its role in disease*. Eds. Bamberg, E. und Schoner, W. Springer, New York, 617-620.
- Grell, E. et al.** (1991) Precision Titrations to Determine Affinity and Stoichiometry of Alkali, Alkaline Earth, and Buffer Cation Binding to Na,K-ATPase. *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation*, Eds. Kaplan, J.H. and DeWeer, P. The Rockefeller University Press, pp 441-445.

- Hansen, O.** (1984) Interactions of cardiac glycosides with (Na⁺+K⁺)-activated ATPase. *Pharmacological Reviews* **36**, (3) 143-163.
- Hartung, K. et al.** (1987) Electrical pump currents generated by the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum vesicles adsorbed on black lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **900**, 209-220.
- Hara, Y. and Nakao, M.** (1981) Sodium ion discharge from pig kidney Na⁺, K⁺-ATPase Na⁺-dependency of the E1P-E2P equilibrium in the absence of KCl. *J. Biochem.* **90**, 923-931.
- Hebert, H. et al.** (2001) Three dimensional structure of renal Na,K-ATPase from Cryo-electron Microscopy of two dimensional crystals. *J. Mol. Biol.* **314**, 479-494.
- Hegyvary, C. and Jørgensen, P.L.** (1981) Conformational changes of renal sodium plus potassium ion-transport adenosine triphosphatase labeled with fluorescein. *J. Biol. Chem.* **256**, 6296-6303.
- Henderson, I.M.J. et al.** (1994) Binding of Ca²⁺ to the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase of sarcoplasmic reticulum: equilibrium studies. *Biochem. J.* **297**, 615-624.
- Henderson, I.M.J. et al.** (1994) Binding of Ca²⁺ to the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase of sarcoplasmic reticulum: kinetic studies. *Biochem. J.* **297**, 625-636.
- Heyse, S. et al.** (1994) Partial reactions of the Na,K-ATPase: determination of rate constants. *J. Gen. Physiol.* **104**, 197-240.
- Hilge, M. et al.** (2003) ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na,K-ATPase. *Nature Structural Biology* **10**, 468-474.
- Hilgemann, D.W.** (1989) Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflügers Arch.* **415**, 247-249.
- Hinz H. R. et al.** (1990) Lysine 480 is an essential residue in the putative ATP site of lamb kidney (Na,K) ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**, 10260-10265.
- Hollemann-Wiberg,** (1995) Lehrbuch der Anorganische Chemie, 101. Auflage, Walter de Gruyter-Verlag, Berlin, New York.
- Homareda, H.** (1999) Oligomycin. In the Encyclopaedia of Molecular Biology (Creighton, T.E., eds.) 1698-1700, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Inesi, G. et al.** (1980) Cooperative Calcium Binding and ATPase Activation in Sarcoplasmic Reticulum Vesicles. *J. Biol. Chem.* **255**, 3025-3031.
- Jacobsen, M.D. et al.** (2002) Importance of Na,K-ATPase Residue α 1-Arg⁵⁴⁴ in the Segment Arg⁵⁴⁴-Asp⁵⁶⁷ for High-Affinity Binding of ATP, ADP, or MgATP. *Biochemistry* **41**, 1451-1456.
- Jencks, W.P.** (1989) Utilization of binding energy and coupling rules for active transport and other vectorial process. *Methods Enzymol.* **171**, 145-164.

- Jørgensen P.L. et al.** (2003a) Structure and mechanism of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 817-849.
- Jørgensen, P.L. et al.** (2003b) Mechanism of the Na⁺, K⁺ pump protein structure and conformations of the pure (Na⁺ + K⁺)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **694**, 27-68.
- Jørgensen, P.L.** (1974a) Purification and characterisation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase (III.). *Biochim. Biophys. Acta* **356**, 36-52.
- Jørgensen, P.L.** (1974b) Purification and characterisation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase (IV.). *Biochim. Biophys. Acta* **356**, 53-67.
- Jørgensen, P.L.** (1975) Purification and characterisation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase (V.). *Biochim. Biophys. Acta* **401**, 399-415.
- Jørgensen, P.L.** (1982) Mechanism of the Na⁺, K⁺ pump protein structure and conformations of the pure (Na⁺ + K⁺)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **694**, 27-68.
- Kane, D.J. et al.** (1998) Dephosphorylation kinetics of pig kidney Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochemistry* **37**, 4581-4591.
- Kane, D.J. et al.** (1997) Stopped flow kinetic investigations of conformational changes of pig kidney Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochemistry* **36**, 13406-13420.
- Kaplan, J. H., B. et al.** (1978) Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry*, **17**, 1929-1935.
- Karlish, S.J.D.** (1979) Cation induced conformational states of Na,K-ATPase studied with fluorescent probes. Na,K-ATPase: Structure and kinetics. (Skou, J.C. & Nørby, J.G., Eds.), pp 115-128, Academic press, New York.
- Karlish, S.J.D.** (1980) Characterisation of conformational changes in (Na,K) ATPase labeled with fluorescein at the active side. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **12**, 111-136.
- Klockenkämper, R.** (1997) Total -Reflection X-Ray Fluorescence Analysis. Wiley-Interscience.
- Kochegarow, A.A.** (2001) Modulators of ion-transporting ATPases. *Exp. Opin. Ther. Patents* **11** (5) 825-859.
- Kong, B.J. and Clarke, R.J.** (2004) Identification of Potential Regulatory Sites of the Na⁺,K⁺-ATPase by Kinetic Analysis. *Biochemistry* **43**, 2241-2250.
- Kulicke, W.-M.** (1986) Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen, Hüthig & Wepf, Heidelberg.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lehn, J.-M. (1973) Design of organic complexing agents. Strategies towards properties. *Structure and Bonding*, **16**, 1-69.

Lewitzki, E. et al. (1998) Characterizing Protein Conformational Transitions of Na,K-ATPase with Antibodies by Fluorescence Spectroscopy *J. of Fluorescence*, **8**, 287-290.

Lüpfert, C. et al. (2001) Rate limitation of Na⁺,K⁺-ATPase pump cycle. *Biophys. J.* **81**, 2069-2081.

Mager, G. et al. Unveröffentlichtes Programm, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main.

Mäntele, W. (1993) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 197-202.

Martell, A. and Smith R. (1974) Critical stability constants. *Volume 1 and 3. Plenum Press, New York.*

Martin, D.W. & Sachs, J.R. (1999) Preparation of Na⁺,K⁺-ATPase with near maximal specific activity and phosphorylation capacity: Evidence that the reaction mechanism involves all of the sites. *Biochemistry* **38**, 7485-7497.

Maunsbach, A.B. et al. (1991). Two-dimensional Crystals and Three-dimensional Structure of Na,K-ATPase Analyzed by Electron Microscopy. *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation*, Eds. Kaplan, J.H. and DeWeer, P. The Rockefeller University Press, pp 159-172.

Meissner, G. et al. (1973) Isolation of Sarcoplasmic Reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca²⁺-pump and Ca²⁺-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 246-269.

Møller, J.V. et al. (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 1-51.

Moss, D. et al. (1990) Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared and protein electrochemistry. Evaluation of the technique with cytochrome *c*. *Eur. J. Biochem.*, **187**, 565-572.

Nagel, G. et al. (1987) Na⁺ currents generated by the purified (Na⁺ + K⁺)-ATPase on planar lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **901**, 239-249.

Nørby, J.G. and Jensen, J. (1971) Binding of ATP to brain microsomal ATPase Determination of the ATP-binding capacity and the dissociation constant of the enzyme-ATP complex as a function of K⁺ concentration. *Biochim. Biophys. Acta* **233**, 104-116.

Nørby, J.G. et al. (1983) Kinetics of Na-ATPase activity by the Na,K Pump. Interactions of the phosphorylated intermediates with Na⁺, Tris⁺, and K⁺. *J. Gen. Physiol.* **82**, 725-759.

Nørby, J. G. (1988) Coupled Assay of Na⁺,K⁺-ATPase Activity. *Methods in Enzymology* **156**, 116-119.

- Oelschläger, O. et al.** (1986) Mechanismus der Eintopfsynthese der 3-Amino-3-(o-nitrophenyl)-propionsäure. *Arch. Pharm.* **319**, 488-492.
- Ogawa, H. and Toyoshima, C.** (2002) Homology modeling of the cation binding sites of Na⁺K⁺-ATPase. *PNAS* **99**, 15977-15982.
- Orlowski, S. and Champeil, P.** (1991) Kinetics of Calcium Dissociation from Its High-Affinity Transport Sites on Sarcoplasmic Reticulum ATPase.
- Pedemonte, C. H. and Bertorello, A. M.** (2001) Short-term regulation of the proximal tubule Na⁺,K⁺-ATPase: Increased/decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity mediated by protein kinase C isoforms. *J. Bioenerg. Biomem.* **33**, 439-447.
- Peinelt, C and Apell, H-J.,** (2005) Kinetics of Ca²⁺ Binding to the SR Ca-ATPase in the E₁ State. *Biophys. J.* **89**: 2427-2433.
- Petithory, J. R. and Jencks, W. P.** (1988) Sequential dissociation of calcium from the calcium adenosinetriphosphatase of sarcoplasmic reticulum and the calcium requirement for its phosphorylation by ATP. *Biochemistry* **27**, 5553-5564.
- Picard, M. et al.** (2005) The Average Conformation at Micromolar [Ca²⁺] of Ca²⁺-ATPase with Bound Nucleotide Differs from That Adopted with the Transition State Analog ADP·AlFx or with AMPPCP under Crystallization Conditions at Millimolar [Ca²⁺]. *J. Biol. Chem.*, **280**, 18745-18754.
- Post, R. L. et al.** (1969) Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase. *J. Gen. Physiol.* **54**, 306-326.
- Post, R.L. et al.** (1975) Phosphorylation by inorganic phosphate of sodium plus potassium ion transport adenosine triphosphatase. Four reactive states. *J. Biol. Chem.*, **250**, 691-701.
- Post, R.L. and Suzuki, K.** (1991) A Hofmeister Effect on the Phosphoenzyme of Na,K-ATPase. *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation* (Kaplan, J. H., & DeWeer, P., Eds.) pp 201-209, Rockefeller University Press, New York.
- Pratap, P.R. et al.** (2003) FTIR Study of ATP-induced changes in Na⁺/K⁺-ATPase from duck supraorbital glands. *Biophys. J.* **81**, 3707-3717.
- Rheologica instruments, AB.** (2005) Basic rheology manual. <http://www.reologica.com>.
- Rice W.J. et al.** (2001) Structure of Na⁺,K⁺ATPase at 11 Å resolution : Comparison with Ca-ATPase in E₁ and E₂ states. *Biophysiol. J.* **80**, 2187-2197.
- Rothschild, K. J. et al.** (1986) Evidence for a tyrosine protonation change during the primary phototransition of bacteriorhodopsin at low temperature. *Proc. Natl. Acad. USA.* **83**, 347-351.
- Segur, J.B and Oberstar, H.E.** (1951) Viscosity of Glycerol and Its Aqueous Solutions. *Ind. Eng. Chem.* **43**, 2117 – 2120.

Siebert, F. et al. (1983) Fourier-transform infrared spectroscopy applied to rhodopsin. *Eur. J. Biochem.*, **136**, 119-127.

Siebert, F. (1995) Infrared spectroscopy applied to biochemical and biological problems. *Meth. Enzymol.*, **246**, 119-127.

Schick, E. (1999) Die Na,K-ATPase in der mizellaren Phase: Eine strukturelle und funktionelle Charakterisierung. Dissertation. Shaker Verlag, Aachen.

Schmid, A. et al. Unveröffentlichtes Programm, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main.

Schuurmans Stekhoven, F.M.A.H. et al. (1981) Studies on (Na⁺ + K⁺)-activated ATPase XLV. Magnesium induces two low-affinity non-phosphorylating nucleotide binding sites per molecule. *Biochim. Biophys. Acta* **649**, 533-540.

Schuurmans Stekhoven, F.M.A.H. et al. (1980) Studies on (Na⁺ + K⁺)-activated ATPase. XLIV. Single phosphate incorporation during dual phosphorylation by inorganic phosphate and adenosine triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **597**, 100-111.

Schuurmans Stekhoven, F.M.A.H. et al. (1980) Studies on (Na⁺ + K⁺)-activated ATPase XLV. Magnesium induces two low-affinity non-phosphorylating nucleotide binding sites per molecule. *Biochim. Biophys. Acta* **649**, 533-540.

Shimanouchi, T. (1964) Infrared spectra of nucleic acids and related compounds. Advances in Chemical Physics. Vol 7. The structure and properties of Biomolecules and biological systems, Ed. Duchesue. Wiley Interscience, New York, pp 435-498.

Skou, J.C. (1957) The influence of some cations on an adenosine Triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 394-401.

Skou, J.C. (1988) Overview: The Na,K-Pump. *Meth. Enzymol.* **156**, 1-33.

Skriver, E. et al. (1991). Three-dimensional structure of Co(NH₃)₄ATP-induced Membrane Crystals of Na,K-ATPase. *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation*, Eds. Kaplan, J.H. and DeWeer, P. The Rockefeller University Press, pp 243-247.

Skou, J.C. and Esmann, M. (1979) Preparation of membrane-bound and of solubilized (Na⁺+K⁺)ATPase from rectal glands of *Squalus Acanthias*. *Biochim. Biophys. Acta* **567**, 436-444.

Sokolov, V.S. et al. (1998) Fast Transient Currents in Na,K-ATPase Induced by ATP Concentration Jumps from the P³-[1-(3',5'-Dimethoxyphenyl)-2-Phenyl-2-Oxo]ethyl Ester of ATP. *Biophys. J.* **74**, 2285-2298.

Stolz et al. (2003) Calorimetry of Na,K-ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **986**, 245-246.

Stolz et al. (2005) Inhibition and Partial Reactions of Na,K-ATPase Studied by FTIR Difference Spectroscopy. *Biopolymers, Published Online: 15 Dec 2005, DOI: 10.1002 / bip. 20427.*

- Sweadner K.J. et al.** (2001) Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **356**, 685-604.
- Swiss Prot**, (2005) Protein knowledgebase, <http://www.expasy.org/sprot>.
- Therien, A.G., and Blostein, R.** (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Cell Physiol.* **279**, C541-C566.
- Thoenges, D. and Barth, A.** (2002) Direct measurement of enzyme activity with infrared spectroscopy. *J. Biomol. Screening*, **7**, 353-357.
- Thoenges, D. et al.** (2002) Preparation of active enzyme samples for IR-studies of N^+/K^+ -ATPase. *Biopolymers*, **67**, 271-274.
- Taniguchi K. and Post R.L.** (1975) Synthesis of adenosine triphosphate and exchange between inorganic phosphate and adenosine triphosphate in sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **250**, 3010-3018.
- Thirlwill, H. et al.** (1994) Kinetics of relaxation from rigor of permeabilized fast-twitch skeletal fibers from the rabbit using a novel caged ATP and apyrase. *Biophys. J.* **67** 2436-2447.
- Toyoshima, C. et al.** (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405**, 647-655.
- Toyoshima, C. & Nomura, H.** (2002) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* **418**, 605-611.
- Toyoshima, C. & Inesi, G.** (2004) Structural basis of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 269-292.
- Toyoshima, C. & Mizutani, T.** (2004a) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* **430**, 529-535.
- Toyoshima, C. et al.** (2004b) Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* **432**, 361-368.
- Vasilets, L.A.** (1997) Diversity of regulatory Phosphorylation of the Na^+/K^+ -ATPase from mammalian kidneys and *Xenopus* oocytes by protein kinases: Characterization of the phosphorylation site for protein kinase C. *Cell. Physiol. Biochem.* **7**, 1-18.
- Venyaminov, S.Y., and Kalnin, N.N.** (1990) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H_2O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers*. **30**,1243-1257.
- Venyaminov, S.Y. & Prendergast, F.G.** (1997) Water (H_2O and D_2O) molar absorptivity in the 1000-4000 cm^{-1} range and quantitative Infrared Spectroscopy of aqueous solutions. *Anal. Biochem.* **248**, 234-245.

Walker, J.W. et al. (1988) Photolabile(1-(2-Nitrophenyl)ethyl phosphate esters of adenine nucleotide analogues. Synthesis and mechanism of photolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7170-7177.

Xu, K.J. (1989) Any of several lysines can react with 5'-isothiocyanatofluorescein to inactivate sodium and potassium ion activated adenosinetriphosphatase. *Biochemistry*, **28**, 5764-5772.

Yount, R. G. et al. (1971) Adenylyl imidiodiphosphate, an adenosine triphosphate analog containing a P-N-P linkage. *Biochemistry*, **10**, 2484 – 2489

Yoda, S. & Yoda, A. (1986) ADP- and K⁺-sensitive phosphorylated intermediate of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **261**, 1147-1152.

Yoda, S. & Yoda, A. (1987a) Phosphorylated intermediates of Na,K-ATPase proteoliposomes controlled by bilayer cholesterol. Interaction with cardiac steroid. *J. Biol. Chem.* **262**, 103-109.

Yoda, S. & Yoda, A. (1987b) Two different phosphorylation-dephosphorylation cycles of Na,K-ATPase proteoliposomes accompanying Na⁺ transport in the absence of K⁺. *J. Biol. Chem.* **262**, 110-115.

Yoda, S. & Yoda, A. (1988) Cytoplasmic K⁺ effects on phosphoenzyme of Na,K-ATPase proteoliposomes and on the Na⁺-pump activity. *J. Biol. Chem.* **263**, 10320-10325.

Zhongsen, Z. et al. (2000) Detailed Characterization of the Cooperative Mechanism of Ca²⁺ Binding and Catalytic Activation in the Ca²⁺ Transport (SERCA) ATPase. *Biochemistry*, **39** (30), 8758 –8767.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name : Michael Stolz
Geburtsdatum : 30.10.1971
Geburtsort : Düsseldorf
Staatsangehörigkeit : deutsch
Familienstand : ledig

Schulbildung

1978-1982 Grundschohle Bingen
1982-1991 Staatl. Stefan-George-Gymnasium Bingen

Wehrdienst

1991-1992

Hochschulausbildung

10/1992-09/2001 Studium der Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz
10/1992-02/1996 Grundstudium
05/1996-10/2000 Hauptstudium
11/2000-09/20001 Diplomarbeit am Institut für Biochemie unter Anleitung von
Prof. Dr. H.-J. Schäfer

Promotion

10/2001-12/2005 Dissertation am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frank-
furt am Main unter Anleitung von Dr. E. Grell