

Über Primärreaktionen beim Sehvorgang

Thermodynamischer und kinetischer Einfluß des pH-Wertes
auf die Metarhodopsin-I-II-Umwandlung
Protonenverbrauch als Auswirkung einer Konformationsänderung

Primary Reactions in the Visual Process
Thermodynamic and Kinetic Influence of pH on the Metarhodopsin I-II Transition
Proton Consumption as an Effect of a Conformation Change

Hinderk M. Emrich * und Roland Reich

Max-Volmer-Institut für physikalische Chemie und Molekularbiologie
der Technischen Universität Berlin

(Z. Naturforsch. **29 c**, 577–591 [1974] ; eingegangen am 2. Mai/6. Juni 1974)

Rhodopsin-photolysis, Photoreception, pH-Change, Proton-catalysis, Conformation-change

In isolated bovine rod outer segments metarhodopsin I–II absorption-changes are measured using rapid flash-photometry. The rapid H^+ -uptake accompanying this transition is measured using phthaleine pH-indicators.

1. The meta I–II equilibrium is pH-dependent in the same manner as the proton uptake (Figs 1, 14). This can be explained by the assumption that the meta II conformation is stabilized by the protonization of an amino-group, which in its protonized state cannot be re-enfolded into the hydrophobic core of the molecule, since it is too polar (Fig. 15). In the proposed model the conformation-regulating proton binding group is not in the chromophoric region of rhodopsin. This resolves the well known contradiction between the expected bathochromic and observed hypsochromic shift of meta II H^+ .

The model furthermore involves that the dissociation-constant of the protonized group differs from the measured apparent $pK = 6.3$.

2. The meta I–II transition is H^+ (and OH^-)-catalysed (Figs 4, 5). The kinetics show usually a characteristic deviation from a first-order process (Fig. 2). This can be explained by some inhomogeneity of the rhodopsin-molecules *e.g.* some differences in the shieldings of the catalytic centers from H^+ (and OH^-).

3. The activation energy decreases with increasing proton-concentration (Fig. 6). The protons seem to open a new reaction pathway with a smaller activation energy.

4. Triton X 100 and ethanol increase, sodium-desoxycholate slows down the velocity of the M-I-II-transition, whereas digitonin has only a small effect (Fig. 7).

5. The relaxation-velocity of the optical pH-signal depends on the structural state of the rhodopsin-containing substrate (Figs 10, 11). The outer membrane of the outer segment and the disc-membrane are regarded as possible H^+ -diffusion-barriers (Fig. 12), because the time lag between M_{II} -signal and pH-signal is nearly eliminated, when the membranes are destroyed by digitonin.

6. In some experiments, using successive non-saturating flashes, an initial H^+ -uptake of 2–3 H^+/M_{II} was observed (Fig. 17). After full-bleaching, however, the $\Sigma H^+/\Sigma M_{II}$ -ratio is one. The hypothesis of a conformational coupling of 2–3 rhodopsin-molecules is presented (Fig. 18). The possible existence of an “unfolded” state of rhodopsin is discussed on the basis of a photo-regeneration-experiment, in which no H^+ -release was observed (Figs 19, 20).

1. Grundlagen

1.1 Sonderstellung der Metarhodopsin-I-II-Umwandlung

Die Photolyse des Rhodopsins wird nach den Untersuchungen von Wald und Mitarbeitern¹ durch eine lichtinduzierte *cis-trans*-Isomerisierung des 11-

cis-Retinals eingeleitet, an die sich eine Kaskade von Dunkelreaktionen anschließt. Unter diesen Dunkelreaktionen nimmt die Umwandlung von Metarhodopsin I in Metarhodopsin II eine Sonderstellung ein, die auf folgenden Eigenschaften beruht:

a. Die Absorptionsbande von Metarhodopsin II ($\lambda_{\max} = 380 \text{ nm}$) ist gegenüber denen der vorher-

* Zur Zeit: Physiologisches Institut der Universität München, D-8000 München 2, Pettenkoferstr. 12.

Die Arbeit wurde durch ein Stipendium und eine Sachbeihilfe (Em/18) der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.



gehenden Stoffe (Rhodopsin: $\lambda_{\max} = 500 \text{ nm}$; Metarhodopsin I: $\lambda_{\max} = 480 \text{ nm}$) besonders stark verschoben.

b. Die Azomethin-Gruppe des im Rhodopsin enthaltenen Retinals wird beim Übergang von Metarhodopsin I in Metarhodopsin II für wäßrige Reduktionsmittel zugänglich^{2,3}.

c. Die Reaktionszeit der Metarhodopsin-I-II-Umwandlung liegt in der Größenordnung der Latenzzeit der visuellen Erregungsbildung¹. Die vorhergehenden Reaktionen verlaufen schneller.

Diese Befunde geben Anlaß zu der Vermutung¹, daß die bei der Metarhodopsin-I-II-Umwandlung auftretende Konformationsänderung der Auslöser für die visuelle Erregungsbildung ist.

1.2 Das chemische Gleichgewicht zwischen Metarhodopsin I und Metarhodopsin II

Nach Matthews *et al.*⁴ stellt sich zwischen Metarhodopsin I und Metarhodopsin II ein chemisches Gleichgewicht ein, dessen Lage von der Temperatur und vom pH-Wert abhängt. Steigende Temperatur und steigende H^+ -Konzentration verschieben das Gleichgewicht in Richtung Metarhodopsin II (s. auch Ostroy *et al.*⁵)*. Matthews *et al.*⁴ haben beobachtet, daß das Gleichgewicht im Sinne einer Titrationskurve vom pH-Wert abhängt, deren Wendepunkt bei pH 6,4 liegt. Von Radding und Wald⁶ war bereits 1956 gemessen worden, daß die Photolyse des Rhodopsins mit der (damals zeitlich nicht auflösbaren) Freisetzung einer Base (1 mol/mol Rhodopsin) einhergeht, deren (scheinbarer) pK-Wert mit etwa 6,6 bestimmt wurde (s. auch⁷). Von Matthews *et al.*⁴ wurden diese Befunde dahingehend gedeutet, daß die Metarhodopsin-I-II-Umwandlung mit der Exponierung einer protonenbindenden Gruppe mit dem pK-Wert 6,4 (möglicherweise Imidazol) verbunden ist, wobei die Protonenanlagerung die beobachtete spektrale Verschiebung bewirken soll. Eine Aussage über den Mechanismus, durch den die Protonen auf das Metarhodopsin-I-II-Gleichgewicht einwirken, wurde von Wald und Mitarbeitern nicht gemacht**. Von Emrich⁸ wurde die Verschiebung des Gleichgewich-

tes von Metarhodopsin II nach Metarhodopsin I mit steigendem pH-Wert und die Lage des Wendepunktes bei etwa pH 6,3 durch blitzlichtphotometrische Messungen (sowohl bei 2 °C als auch bei Zimmertemperatur) bestätigt. Zusätzlich wurde beobachtet, daß bei weiterer Steigerung des pH-Wertes das Gleichgewicht scheinbar wieder zum Metarhodopsin II hin verschoben wird. Die Exponierung protonenbindender Gruppen bei der Metarhodopsin-I-II-Umwandlung wurde sowohl durch Mikrotitration unbelichteter und belichteter Außensegment-Präparate als auch durch Messung der durch einen Blitz hervorgerufenen pH-Änderung bestätigt⁸.

1.3 Die lichtinduzierte schnelle Protonenaufnahme

Für die von Radding und Wald⁶ mit Hilfe der verwendeten Glaselektrode zeitlich nicht aufgelöste schnelle Protonenaufnahme wurde von Falk und Fatt⁹ durch Verwendung einer Pt-Elektrode*** eine Reaktionszeit in der zeitlichen Größenordnung der Metarhodopsin-I-II-Umwandlung gefunden. Auch von anderen Gruppen^{10,11} sind lichtinduzierte pH-Änderungen an Photorezeptor-Außensegmenten und Rhodopsin-Lösungen gemessen worden, wobei die genannten Aspekte bestätigt wurden.

Der Zusammenhang zwischen der pH-Abhängigkeit des Protonenverbrauchs ($-\Delta\text{H}^+$) und der pH-Abhängigkeit des Metarhodopsin-I-II-Gleichgewichtes wurde bisher nicht untersucht. Er ist – im Hinblick auf ein funktionelles Gesamtmodell der Metarhodopsin-I-II-Umwandlung – Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2. Methodik

2.1 Isolierung von Rinder-Stäbchen-Außensegmenten

Rinderaugen wurden im Schlachthof unmittelbar nach dem Tode des Tieres entnommen und sofort in einen schwarzen Plastikbeutel überführt. Die Augen wurden ca. 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur aufbewahrt und erst dann auf ca. 2 °C abgekühlt. Durch dieses Verfahren wird eine teilweise Resynthese von Rhodopsin ermöglicht. Bei schwachem Rotlicht (Osram-Lampe 4563) wurden je ca. 30

* Auch Glycerin und Neutralsalze verschieben das Gleichgewicht in Richtung Metarhodopsin II⁴.

** Offenbar wurde angenommen, daß das Metarhodopsin wie ein pH-Farbindikator anzusehen ist, bei dem die Protonisierung direkt das Farbzentrum beeinflusst. Deshalb ergab sich der Widerspruch, daß bei dem Bandenshift 480 → 380 nm eigentlich eine Deprotonisierung der

Azomethin-Gruppe der Schiffchen Base des Retinals zu erwarten wäre, während aber eine Protonen-Aufnahme gemessen wird.

*** Der Mechanismus, durch den die Pt-Elektrode unter den verwendeten Versuchsbedingungen pH-Änderungen anzeigt, wurde von Falk und Fatt nicht diskutiert.

Retinae präpariert und in 2 ml einer Salzlösung (0,9% NaCl, 0,04% KCl, 0,025% CaCl_2 , pH 7,0) 5 min vorsichtig gemörsert. Das Homogenat wurde mit 48 ml derselben Salzlösung (2 °C) durch zwei Schichten eines Nylontuches (Nytal 25 TI-35, Fa. Henry Simon Ltd., Textiles Dept., Chedale Heath, Stockport, Cheshire, G.B.) filtriert. Je 3 ml des Filtrates wurden in 16 Zellulosenitrat-Röhrchen ($5/8'' \times 3''$, Beckmann-Spinco No. 302235) auf je 3 ml einer Saccharose-Lösung ($d = 1,140$) geschichtet. Die Röhrchen wurden bei 4 °C im Schwenkrotor 12 min bei $30.000 \times g$ zentrifugiert. Im oberen Teil jedes Röhrchens befand sich nun eine tiefröte Schicht, die mit einer Injektionsspritze, deren Kanüle ($\phi = 0,8$ mm) am Ende um 90° gebogen war, abgesaugt wurde. Diese Lösung enthielt Außensegmente und Außensegment-Fragmente und wurde im Verhältnis 1:4 mit der Salzlösung (s. o.) verdünnt und 10 min bei $3000 \times g$ zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 7 ml derselben Salzlösung resuspendiert und in Proben à 0,2 ml in kleinen rotierenden Glasröhrchen in flüssigem N_2 schnell eingefroren. Die Röhrchen wurden unter flüssigem N_2 im Dunkeln aufbewahrt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Zählkammer (Neubauer), die Rhodopsinbestimmung nach McConnell¹².

2.2 Blitzlichtphotometrische Methodik

Als Meßapparatur wurde ein schnell registrierendes Blitzlichtphotometer nach Witt¹³ verwandt. Die optische Anregung erfolgte mit Hilfe einer Xenon-Blitzlampe (Osram XIE 200, elektrische Energie eines Blitzes 6 Wsec, Halbwertszeit eines Blitzes $2 \cdot 10^{-5}$ sec). Farbgläser [Balzers K_3 (Messung bei $\lambda = 595$ nm) bzw. Balzers Filtraflex 155/115 + Schott OG 4 + GG 10 (Messung bei $\lambda = 385 - 485$ nm)] vor der Blitzlampe und Interferenzfilter (Schott DAL-Serie) vor der Photokathode des SEV waren so aufeinander abgestimmt, daß eine optische Einstreuung des Blitzlichtes bei der Meßlichtwellenlänge weitgehend vermieden wurde. Bei Photolyse von Rhodopsin werden in der Meßprobe Absorptionsänderungen ΔA von ca. 1/1000 hervorgerufen. ΔA ist gleich der relativen Änderung der Meßlichtintensität $-\Delta I/I$ an der Photokathode und damit gleich der relativen Änderung der Spannungsamplitude am Arbeitswiderstand des SEV $-\Delta U/U$. Der SEV (EMI 9558 AQ) war mit einem Meßverstärker (DC bis 150 kHz, Verstärkung bis 60 db) DC-gekoppelt, wobei der Photostrom ($I_A =$

100 μA) durch eine Gegenspannung kompensiert wurde. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses war der Ausgang des Meßverstärkers mit einem digitalen Mittelwertrechner (Nuclear Data, ND-801 Enhancetron 1024) gekoppelt. Bei jeder Messung wurden bis zu 30 Einzelmessungen von einer Probe aufsummiert. Das Tiefpaßfilter war auf eine obere Grenzfrequenz von 1,4 bzw. 5 kHz eingestellt.

2.3 Anzahl der Messungen

Die Arbeit ist das Ergebnis der Erfahrung von 392 Einzelmessungen. Die in den Abbildungen dargestellten Punkte stellen jeweils Einzelmeßwerte dar. Die Ergebnisse der Abb. 1, 3, 20 wurden jeweils durch drei Meßreihen abgesichert. Eine Mittelung dieser Daten wurde aber nicht vorgenommen, da Meßreihen von verschiedenen Präparationen nicht direkt vergleichbar sind. Zur Anzahl der Messungen zu Abb. 17 s. Abschn. 4.3.

3. Experimentelle Befunde

3.1 Die Abhängigkeit des Metarhodopsin-I-II-Gleichgewichtes vom pH-Wert

Die Umwandlung von Metarhodopsin I in Metarhodopsin II kann entweder bei $\lambda = 480$ nm als Extinktionsabnahme von Metarhodopsin I oder bei $\lambda = 380$ nm als Extinktionszunahme von Metarhodopsin II optisch registriert werden*. Hierbei erfaßt die Messung die Bildung von Metarhodopsin II bis zur Einstellung des Gleichgewichtes $\text{MI} \rightleftharpoons \text{MII}$.

Die von Matthews *et al.*⁴ gezeigte pH-Abhängigkeit des Metarhodopsin-I-II-Gleichgewichtes hat zur Folge, daß bei pH 6 das meiste im Blitz photolytierte Rhodopsin in Metarhodopsin II umgewandelt wird, bei pH 8 dagegen nur ein geringer Prozentsatz. Die Abhängigkeit der Signalamplitude vom pH-Wert muß also das von Matthews *et al.*⁴ auf andere Weise gemessene M-I-II-Gleichgewicht widerspiegeln. Der linke Teil der Abb. 1 oben zeigt in der Tat einen ähnlichen Verlauf wie die von Matthews *et al.*⁴ gemessene Kurve. Aus dem rechten Teil der Abb. 1 (von Matthews *et al.* nicht gemessen) ergibt sich, daß bei hohen pH-Werten das Gleichgewicht scheinbar wieder auf die Seite von Metarhodopsin II verschoben wird. Eine modell-

* Da die Halbwertsbreite der Absorptionsbanden von Metarhodopsin I und Metarhodopsin II in der Größenordnung von 50 nm liegt (Matthews *et al.*⁴; stationäre Spektren; v. Sengbusch¹⁴; kinetisch separierte Differenzspektren), sind bei $\lambda = 380$ nm bzw. 480 nm nur gering-

füge gegenseitige Überlagerungen der Absorptionsbanden vorhanden. Die Messung bei 380 nm ist wegen der Forderung nach Vermeidung von Blitzlichtartefakten technisch einfacher, da die Blitzanregung im Bereich der Absorptionsbande von Rhodopsin erfolgen muß.

mäßige Deutung für das Eingreifen der Protonen in das Metarhodopsin-I-II-Gleichgewicht und die Veränderungen bei höherer Temperatur (Abb. 1 unten) wird in Kapitel 4.1 gegeben.

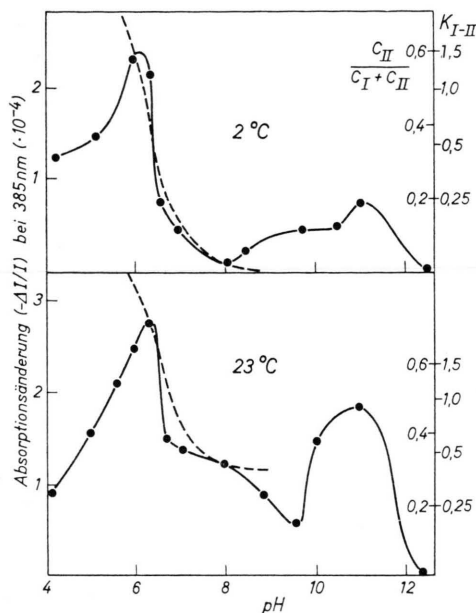


Abb. 1. Absorptionszunahme von Metarhodopsin II (385 nm) als Funktion des pH-Wertes bei Außensegment-Fragmenten. Rhodopsinkonz.: $4 \cdot 10^{-6}$ M, Pufferkonz.: $1,5 \cdot 10^{-1}$ M (Mc Ilvaine/Phosphat/Glycin). Gestrichelt: Nach Gln. (10) und (11) berechnete Kurven für $C_{II}/(C_I + C_{II})$ (rechte Ordinate: vgl. Abschn. 4.1). (Oben: Messungen bei 2 °C, unten: Messungen bei 23 °C.)

Setzt man voraus, daß die pro Blitz gebildete Metarhodopsin-Gesamtkonzentration $C_I + C_{II}$ vom pH-Wert unabhängig ist, so ist die in Abb. 1 als Funktion des pH-Wertes dargestellte M_{II} -Signalamplitude proportional dem M_{II} -Anteil der Metarhodopsin-Gesamtmenge (Maßstab rechts in Abb. 1):

$$-\frac{\Delta I}{I} (380 \text{ nm}) \sim \frac{C_{II}}{C_I + C_{II}}.$$

Da Gleichgewichtsmessungen unter den vorliegenden Meßbedingungen (ohne Detergentien) nicht vorliegen, ist man für die Bestimmung des Proportionalitätsfaktors auf Abschätzungen angewiesen (s. Abschn. 4.1).

Aus $C_{II}/(C_I + C_{II})$ kann die Gleichgewichtskonstante

$$K_{I-II} \equiv C_{II}/C_I \quad (1)$$

erhalten werden, die für die Diskussion der kinetischen Messungen (vgl. Abschn. 3.3) benötigt wird.

3.2 Das Zeitgesetz der Metarhodopsin-I-II-Umwandlung

Unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen bleibt die Protonenkonzentration im Verlauf der Reaktion praktisch konstant, so daß man für die Einstellung des Gleichgewichtes mit einem Zeitgesetz erster Ordnung rechnen kann. Für die Abweichung δ der Absorption von ihrem (bei $t \rightarrow \infty$ erreichten) Gleichgewichtswert gilt dann (mit

$$\left| \left(\frac{\Delta I}{I} \right)_t - \left(\frac{\Delta I}{I} \right)_\infty \right| \equiv \delta):$$

$$\delta(t) = \delta(t=0) \cdot e^{-kt} \quad (2)$$

bzw.

$$\ln \delta = -kt + \text{const.}$$

Die aus der Steigung von $\ln \delta$ als Funktion von t bestimmte Relaxations-Geschwindigkeitskonstante k für die Einstellung des Gleichgewichtszustandes ist gleich der Summe der Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion:

$$k = \vec{k} + \overleftarrow{k}. \quad (3)$$

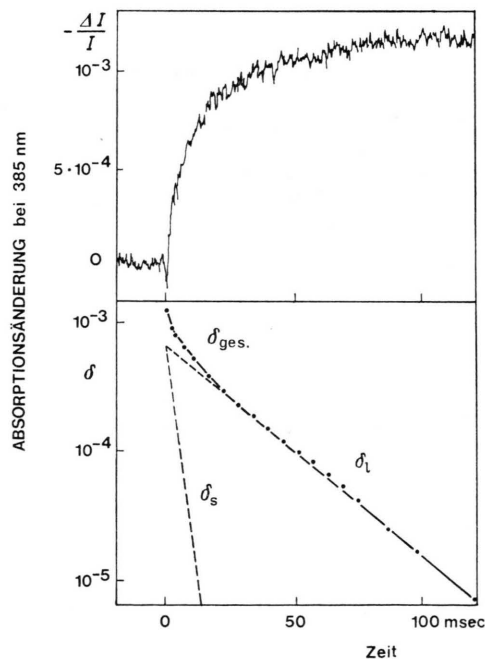


Abb. 2. Oben: Zeitlicher Verlauf der Absorptionszunahme $\Delta I/I$ von M_{II} (385 nm) nach einem Lichtblitz bei $t=0$. Unten: Halblogarithmische Auftragung der Abweichung δ der Absorption von ihrem Gleichgewichtswert ($t \rightarrow \infty$) als Funktion der Zeit. Schema der Separation der schnellen Phase durch Differenzbildung: Der lineare Bereich von $\log \delta(t)$ wird auf $t=0$ zurückextrapoliert, die Differenz $\delta_s(t)$ zwischen Kurve und Gerade zahlenmäßig abgelesen und für sich allein logarithmisch aufgetragen. Daß bei der vorliegenden Präparation die Anfangswerte von δ_l und δ_s übereinstimmen, ist Zufall.

Dieses einfache Zeitgesetz gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, daß alle Metarhodopsin-I-Moleküle die gleiche Struktur und örtliche Umgebung haben und sich somit auch mit der gleichen Geschwindigkeitskonstante in Metarhodopsin II um-

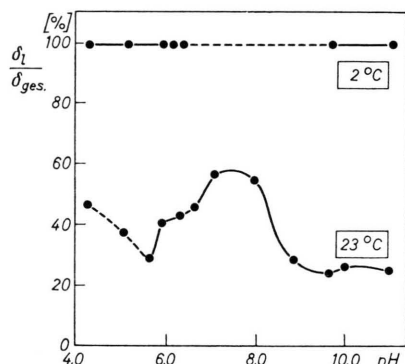


Abb. 3. Prozentualer Anteil der langsamen Phase an der Gesamtamplitude für $t=0$ bei 2°C und 23°C . Sonstige Daten entsprechen Abb. 1.

wandeln. Andernfalls muß man mit einer additiven Überlagerung von vielen Zeitgesetzen nach Gl. (2) mit verschiedenen Werten von $\delta(t=0)$ und k rechnen. Auf diese Weise können die gemessenen Abklingkurven ein Zeitgesetz höherer Ordnung vortäuschen.

Bei tiefen Temperaturen finden wir für die Metarhodopsin-I-II-Umwandlung ein Zeitgesetz erster Ordnung, bei höherer Temperatur dagegen in der Regel eine scheinbar höhere Reaktionsordnung (Abb. 2 und 3)*. Wenn man diese näherungsweise durch das Modell von nur zwei überlagerten Reaktionsgeschwindigkeiten interpretiert, so kann man die beiden zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten im Prinzip auf die in Abb. 2 unten dargestellte Weise separieren.

Diese beiden Geschwindigkeitskonstanten k_s und k_l sind in den Abb. 4–7 wiedergegeben**. Dabei stellen die Werte von k_s eine Art Mittelwert dar, da sich bei der Auftragung von $\ln(\delta - \delta_l)$ gegen t im allgemeinen keine streng lineare Beziehung ergibt.

* Auch Ostroy *et al.*⁵ haben die von ihnen beobachtete scheinbare Reaktion höherer Ordnung als Überlagerung mehrerer Zeitgesetze erster Ordnung von verschiedenen Komponenten interpretiert. Formal könnte man die Reaktion auch als eine Reaktion zweiter Ordnung auswerten¹⁴, wobei als zweiter Reaktionspartner für das Metarhodopsin-I-Molekül das H^+ anzusprechen wäre. Eine Überschlagsrechnung zeigt jedoch, daß die H^+ -Konzentration in den gepufferten Lösungen im Verlauf der Reaktion praktisch konstant bleibt. Rapp¹⁵ beobachtete bei Temperaturen bis 38°C eine einphasige Reaktion erster Ordnung.

Die Funktion $\ln \delta_l(t)$ ist dagegen linear (vgl. Abb. 2). Daraus ist zu schließen, daß die Gruppe der nach einer gewissen Anfangszeit noch übrigbleibenden langsam reagierenden Moleküle in sich einheitlich ist, im Gegensatz zu den schneller reagierenden Molekülen. Bei 2°C wurde nur die langsame Komponente beobachtet. Als Maß für das Verhältnis langsam reagierender M_I -Moleküle zur Gesamtzahl umgewandelter M_I -Moleküle kann das Amplitudenverhältnis $\delta_l/\delta_{\text{ges.}}$ ($t=0$) angegeben werden.

Bei 2°C wurde nur eine langsame Phase gefunden. Bei 23°C hat $\delta_l/\delta_{\text{ges.}}$ bei neutralem pH den höchsten Wert und fällt zum sauren und zum alkalischen hin ab (Abb. 3)***.

3.3 Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert

Mit zunehmendem pH-Wert nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit sowohl der schnellen als auch der langsamen Phase zunächst ab und nach Durchlaufen eines Minimums wieder zu (Abb. 4). Das bedeutet, daß Protonen die Reaktionsgeschwindigkeit katalytisch erhöhen und daß OH^- -Ionen im alkalischen die Bildung einer Metarhodopsin-II-ähnlichen Substanz erleichtern****.

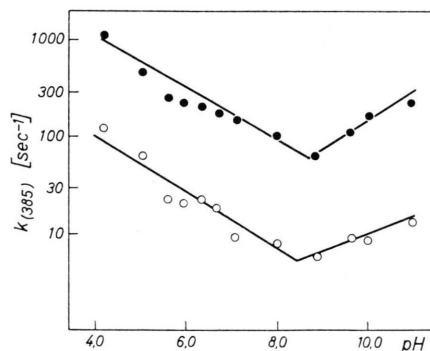


Abb. 4. Geschwindigkeitskonstante der Einstellung des M_I -II-Gleichgewichts als Funktion des pH-Wertes (23°C), gewonnen aus dem zeitlichen Verlauf der Absorptionsänderung bei 385 nm. Punkte, Schnelle Phase, Kreise: Langsame Phase. Sonstige Daten entsprechen Abb. 1.

** Die Indices s bzw. l bedeuten „schnell“ bzw. „langsam“.

*** Das (scheinbare) Wiederansteigen von $\delta_l/\delta_{\text{ges.}}$ im Bereich von pH 4–5 kann durch eine irreversible Denaturierung eines Teils der Rhodopsinmoleküle verursacht sein, die sich auch durch eine Verringerung der M_II -Gesamtamplitude im pH-Bereich 4–5 zu erkennen gibt (Abb. 1).

**** C. Helrich und G. Nöll¹⁶ finden durch mathematische Modellierung der M_I -II-Kinetik ebenfalls einen katalytischen Effekt bei der M_I -II-Umwandlung.

Die in Abb. 4 dargestellte Relaxations-Geschwindigkeitskonstante k ist gleich der Summe der Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion (vgl. Gl. (3)). Für eine genauere modellmäßige Interpretation muß man aber die Geschwindigkeitskonstante \vec{k} für die Hinreaktion als Funktion des pH-Wertes kennen. Zu deren Berechnung muß die in Abschnitt 3.1 dargestellte Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstante K_{I-II} vom pH-Wert berücksichtigt werden.

$$\text{Aus} \quad K_{I-II} = \vec{k}/\bar{k} \quad (4)$$

erhält man zusammen mit Gl. (3) für die Berechnung von \vec{k} aus k und K_{I-II} :

$$\vec{k} = k K_{I-II} / (K_{I-II} + 1). \quad (5)$$

Separiert man auf diese Weise die Geschwindigkeitskonstante \vec{k} , so erhält man das in Abb. 5 dargestellte Diagramm. Nach diesem Diagramm ist die Geschwindigkeitskonstante \vec{k} zusammengesetzt aus:

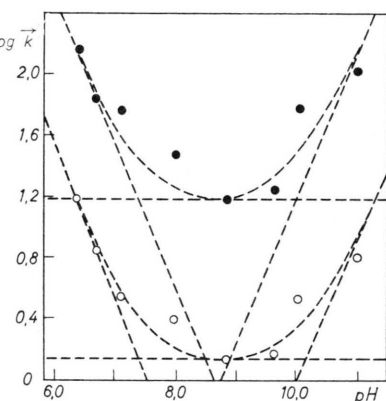


Abb. 5. Nach Gl. (5) separierte Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion $M_I \rightarrow M_{II}$ als Funktion des pH-Wertes. Für die Separierung wurden die in Abschn. 4.1 angenommenen Werte für K_{I-II} eingesetzt (rechte Ordinate Abb. 1). Daten aus Abb. 4.

stellte Diagramm. Nach diesem Diagramm ist die Geschwindigkeitskonstante \vec{k} zusammengesetzt aus:

$$\vec{k} = \vec{k}_0 + \vec{k}_{H^+} \cdot [H^+] + \vec{k}_{OH^-} \cdot [OH^-].$$

Die in Abb. 5 gestrichelten Kurven entsprechen den Zahlenwerten:

$$\vec{k}_s = 15,1 + 3,2 \cdot 10^8 [H^+] + 1,5 \cdot 10^5 [OH^-] \text{ (sec}^{-1}\text{)},$$

$$\vec{k}_l = 1,3 + 3,4 \cdot 10^7 [H^+] + 7,9 \cdot 10^3 [OH^-] \text{ (sec}^{-1}\text{)}.$$

Es liegt nahe, die in Abschnitt 3.2 besprochene Mehrphasigkeit der Metarhodopsin-I-II-Umwandlung bei Zimmertemperatur – bei Kenntnis der H^+ - und OH^- -Katalyse – so zu deuten, daß bei höherer Temperatur die Metarhodopsin-I-Moleküle für die katalytisch wirksamen H^+ - und OH^- -Ionen besser erreichbar sind und daher schneller reagieren. (Ver-

mutlich ist nicht nur der Frequenzfaktor für die Bildung des aktivierten, protonisierten Übergangszustandes erhöht, sondern zugleich auch noch die Aktivierungsenergie erniedrigt.) Nach Williams *et al.*¹⁷ führt Lipidzusatz zum verstärkten Auftreten der schnellen Phase, Delipidierung dagegen zum verstärkten Auftreten der langsamen Phase der Metarhodopsin-I-II-Umwandlung. Die Lipide stabilisieren hier offenbar eine Konformation, bei der das katalytische Zentrum für die Protonen besser zugänglich ist. Nach Applebury *et al.*¹⁸ führt jedoch Delipidierung (bei Anwesenheit von Dodecyl-dimethylaminoxid) zu einer starken Beschleunigung der Relaxationsgeschwindigkeit der M-I-II-Umwandlung, die nach Lipidzusatz wieder verschwindet. Nach unseren Befunden (Abb. 7, 8) ist anzunehmen, daß das verwendete Detergens für die Konformation und damit für die Zugänglichkeit des katalytischen Zentrums für Protonen eine entscheidende Rolle spielt.

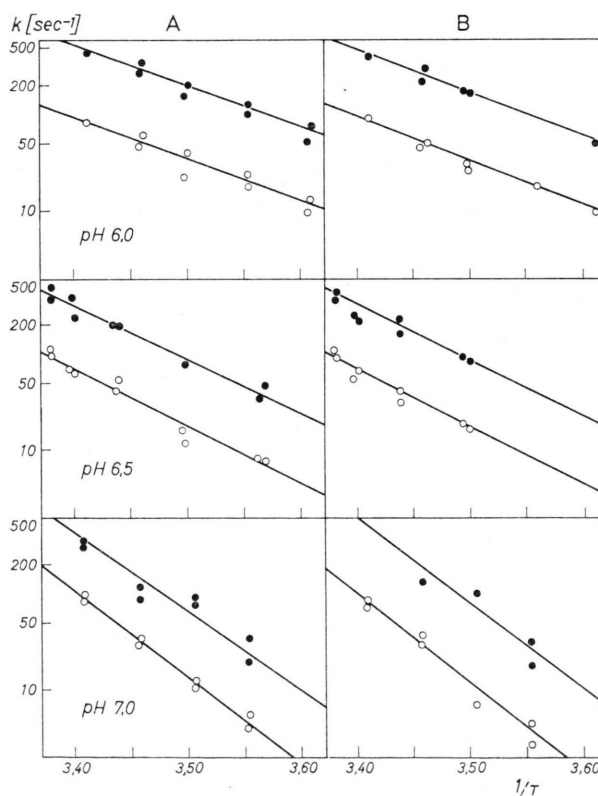


Abb. 6. Geschwindigkeitskonstante der Einstellung des $M_I \rightarrow M_{II}$ -Gleichgewichtes als Funktion der reziproken absoluten Temperatur bei pH 6,0; 6,5; 7,0. Punkte: schnelle Phase, Kreise: langsame Phase. A. Beginn der Ausbleichung: 1.–30. Blitz; B. Ende der Ausbleichung: 50.–80. Blitz. Pufferkonz.: $4 \cdot 10^{-3}$ M Phosphat.

3.4 Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur

Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der schnellen Phase stimmt mit derjenigen der langsamen Phase überein (Abb. 6). Eine Abhängigkeit von der Vorbelichtung wird bei der verwendeten Präparation nicht beobachtet: Die kinetischen Daten zu Beginn sukzessiver Photolyse mit Hilfe nicht-sättigender Blitze (erste 20 Blitze, A in Abb. 6) stimmen mit denen zum Schluß der Photolyse (B in Abb. 6) weitgehend überein. Dagegen wird die Temperaturabhängigkeit von k mit steigender Protonenkonzentration (beim Übergang von pH 7 über 6,5 nach 6,0) deutlich geringer. Dieser Befund kann dadurch erklärt werden, daß die Aktivierungsenergie durch H^+ -Katalyse verringert wird (vgl. Abschnitt 4.2).

3.5 Veränderungen der Reaktionsgeschwindigkeit bei Zusatz von Detergentien

Die örtliche Umgebung der Rhodopsinmoleküle beeinflusst die Geschwindigkeit der Einstellung des M-I-II-Gleichgewichts (Abb. 7). Während Zusatz von Digitonin die Reaktionsgeschwindigkeit nur geringfügig erhöht, führt Triton X-100, ebenso wie Äthanol, zu einer stärkeren Beschleunigung. Bei Zu-

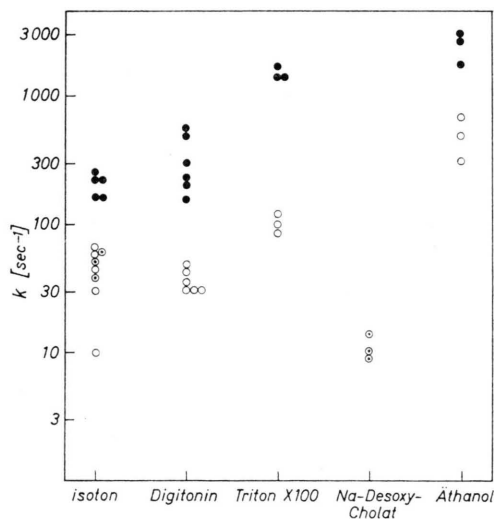


Abb. 7. Einfluß verschiedener Detergentien auf die Geschwindigkeitskonstante der Einstellung des M_I-II-Gleichgewichtes bei 21,5–23,0 °C, pH 7,3–7,5. Punkte: schnelle Phase; Kreise: langsame Phase; Kreise mit Punkt: 1-phasig. Digitonin: 0,5%; Triton X-100: 0,2%; Na-Desoxycholat: 0,5%; Äthanol: 6%.

satz von Na-Desoxycholat wird dagegen eine verlangsamt einphasige Reaktion erster Ordnung beobachtet.

Die beschleunigenden Detergentien erhöhen nicht nur die Geschwindigkeitskonstanten der beiden Phasen, sondern verschieben zusätzlich das Mengenverhältnis der beiden Phasen zugunsten der schnelleren. Dies geht aus der Abhängigkeit des Quotienten $\delta_1/\delta_{ges.}$ vom Detergentienzusatz hervor (Abb. 8): Zusatz von Digitonin erniedrigt den

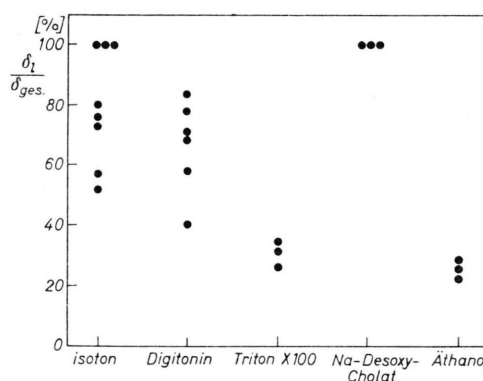


Abb. 8. Einfluß verschiedener Detergentien auf den prozentualen Anteil der langsamen Phase an der Gesamtamplitude für $t=0$. Daten wie Abb. 7.

Quotienten geringfügig, Triton X-100 und Äthanol erniedrigen ihn stärker. Na-Desoxycholat erhöht dagegen den Quotienten $\delta_1/\delta_{ges.}$ auf 100%. Der Zusatz von Na-Desoxycholat bewirkt offenbar einen Effekt, der der Delipidierung von Williams *et al.*¹⁷ entspricht: Das katalytische Zentrum wird für die Protonen unzugänglich gemacht. Die Wirkung von Triton X-100 und Äthanol kann dagegen als Verringerung der Abschirmung des katalytischen Zentrums verstanden werden („Auflockerung der Struktur“).

3.6 Die optische Messung der Protonenaufnahme

Die optische Registrierung von pH-Änderungen erfolgte unter Verwendung von pH-Indikatoren (Bromcresolgrün, Bromcresolpurpur, Nitrazingelb, Bromthymolblau, o-Kresolrot, Phenolphthalein, Thymolphthalein) im schwach gepufferten System¹⁹. Alle Registrierungen, sowohl an Außensegment-Fragmenten als auch an Rhodopsin-Lösungen, zeigten stets eine lichtinduzierte H^+ -Aufnahme, also

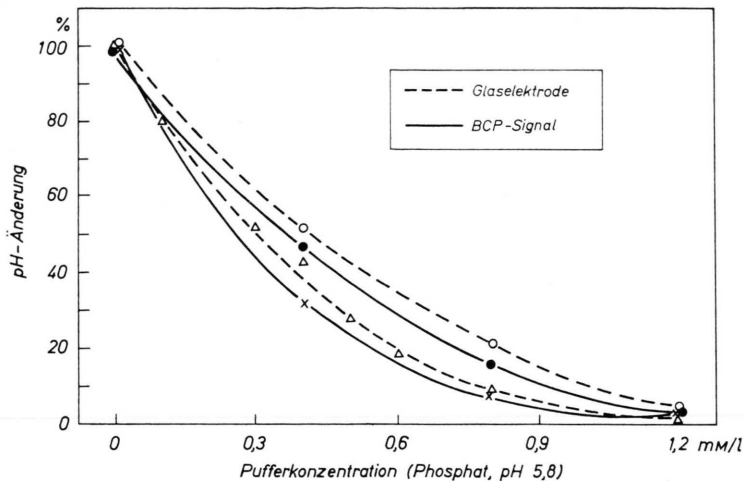
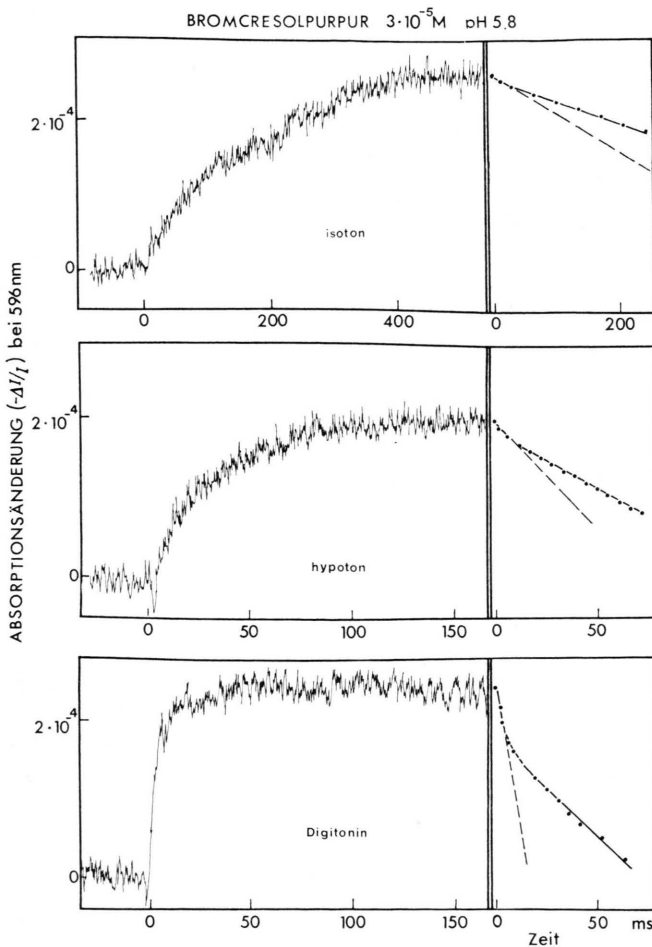


Abb. 9. Abhängigkeit der pH-Signalamplitude von der Pufferkonzentration. Offene Symbole: Glaselektrode; Punkte und Kreuze: Optische Messung unter Verwendung von Bromcresolpurpur als pH-Indikator; pH 5,8.



eine Zunahme des pH-Wertes an *. Um Konformations- bzw. Elektrochromie-Effekte als Ursache der Extinktionsänderungen auszuschließen, wurden die Signale in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration registriert und die Amplituden mit den pH-Änderungen verglichen, die unter identischen Bedingungen mit Hilfe der Glaselektrode ohne zeitliche Auflösung gemessen wurden (Abb. 9). Die Übereinstimmung der beiden Abhängigkeiten zeigt, daß die optischen Extinktionsänderungen tatsächlich pH-Änderungen anzeigen.

Die Relaxationsgeschwindigkeit der optischen pH-Signale hängt vom strukturellen Aufbau der rhodopsinhaltigen Strukturen ab. Bei weitgehend noch intakten Außensegment-Fragmenten (Saccharose-Zusatz, isotone Salzlösungen) werden außerordentlich lange Relaxationszeiten beobachtet. Die Kinetik ist ein- oder mehrphasig erster Ordnung (Abb. 10 oben, 11).

Nach hypoton-osmotischem Schock (phasenkontrastmikroskopisch sind keine Außensegmente mehr

Abb. 10. Zeitlicher Verlauf der Absorptionszunahme ($\Delta I/I$) des pH-Indikators Bromcresolpurpur ($3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) bei $\lambda = 596 \text{ nm}$ nach einem Lichtblitz bei $t = 0$. pH 5,8. Oben: NaCl-Konz.: 140 mval/l, Mitte: NaCl-Konz.: 0 mval/l, Unten: 0,1 ml Digitonin 1% + 0,2 ml Außensegmentsuspension, dann verdünnt auf 15 ml. Rechts: $\log \delta(t)$. Die Relaxationsgeschwindigkeit und die Mehrphasigkeit nehmen mit zunehmender Zerstörung der Außensegmentstrukturen zu.

* Von Shukolyukov und Etingof²⁰ wurden unter Verwendung von Bromthymolblau auch gegenteilige Effekte gemessen. Allerdings handelte es sich um steady-state Messungen (keine zeitliche Auflösung). Möglicherweise han-

delt es sich hier um langsame Effekte, die bei der vorliegenden Methodik nicht erfaßt werden können, oder um Transportphänomene an intakten Zellen.

sichtbar) und nach Digitonin-Zusatz wird die Relaxationszeit des pH-Signals in den Zeitbereich der M-I-II-Reaktion verschoben, die Kinetik ist mehrphasig (Abb. 10 Mitte, unten, 11). Das pH-Signal

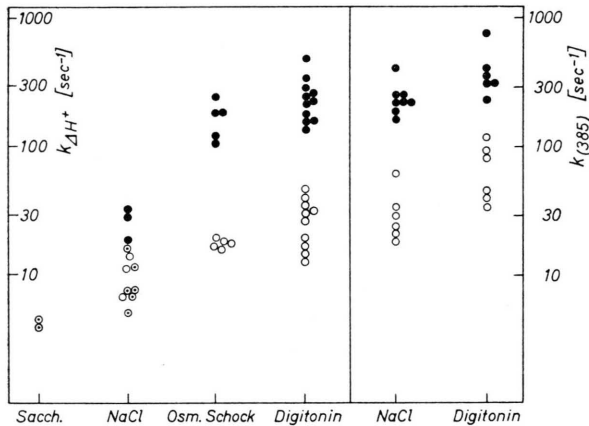


Abb. 11. Links: Veränderung der Geschwindigkeitskonstante der Relaxation des optischen pH-Signals durch osmotischen Schock und Digitonin-Zusatz. Rechts: Geschwindigkeitskonstante der Einstellung des M_I-II-Gleichgewichts vor und nach Digitonin-Zusatz (wie in Abb. 10 unten). pH 5,8–6,5; 20,0–21,0 °C. Punkte: schnelle Phase; Kreise: langsame Phase; Kreise mit Punkt: 1-phasig. Saccharose: 0,1 M; NaCl: 0,9%; Osm. Schock: aqua dest.

kann auch durch solche Stoffe beschleunigt werden, von denen bekannt ist, daß sie die Protonenpermeabilität von Membranen erhöhen, wie Gramicidin ($3 \cdot 10^{-6}$ M) oder CCCP ($5 \cdot 10^{-7}$ M).

Zur Deutung kann vermutet werden, daß die Indikatormoleküle nicht in das Innere der Außen-segment-Fragmente eindringen (Zeit zwischen Pipettage und Messung ca. $\frac{1}{2}$ bis 1 min) und daß zuerst ein H^+ - bzw. OH^- -Transport über die Außenmembran stattfinden muß, bis es zu einer Reaktion mit dem Indikatormolekül kommt.

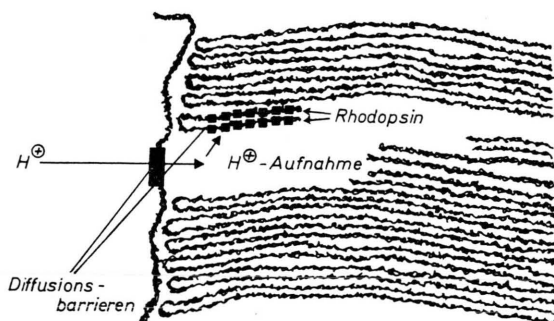


Abb. 12. Schema zum Verständnis der Strukturabhängigkeit der Relaxationsgeschwindigkeit des optischen pH-Signals.

Da andererseits nach Gefrierätz-elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Mason *et al.*²¹ das Rhodopsin auf der Innenseite der disc-Membran lokalisiert ist, kommt auch die disc-Membran selbst als Diffusionsbarriere in Betracht (Abb. 12).

Die Relaxationsgeschwindigkeitskonstanten k_s und k_l der pH-Signale nach Digitoninzusatz steigen analog zu den Relaxationsgeschwindigkeiten der der M-I-II-Reaktion (Abb. 4) mit steigender Protonenkonzentration an (Abb. 13).

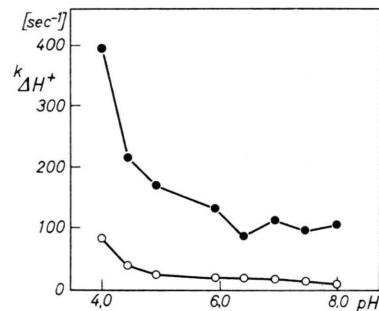


Abb. 13. Geschwindigkeitskonstante der Relaxation des optischen pH-Signals als Funktion des pH-Wertes. Punkte: schnelle Phase, Kreise: langsame Phase. 21,5 °C, Digitoninzusatz: 0,5%. Indikatoren: Kresolrot, Bromcresolpurpur, Bromcresolgrün: $3 \cdot 10^{-5}$ M.

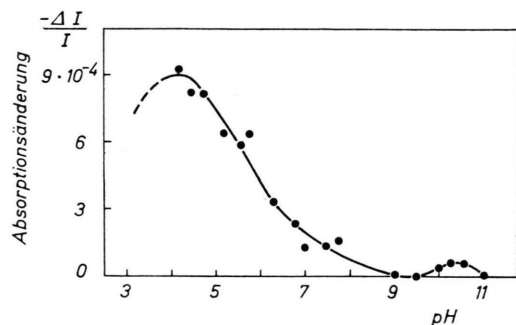


Abb. 14. Amplitude des optischen pH-Signals als Funktion des pH-Wertes ($\Delta I/I$ ist proportional dem ΔpH). Die pH-Abhängigkeit der Anzeigeempfindlichkeit der Indikatoren wurde berücksichtigt. Die Absorptionsänderungen von Phenolphthalein, o-Kresolrot, Thymolphthalein und Bromcresolgrün wurden durch Überlappungsmessungen auf diejenigen von Bromcresolpurpur (bei 595 nm und pH=5,8) bezogen. Aus⁸.

Messungen der ΔpH -Amplitude als Funktion des pH-Wertes (Abb. 14) (Verwendung verschiedener Indikatoren, Überlappungsmessungen) zeigen, daß die H^+ -Aufnahme im wesentlichen im sauren erfolgt, während im alkalischen nur eine geringfügige H^+ -Aufnahme stattfindet. Der Wendepunkt liegt bei

ca. pH 6.3. (Zusätzlich wird eine geringfügige H^+ -Aufnahme im Bereich von pH 10–11 beobachtet.) Dieses Resultat stimmt überein mit Glaselektroden-Messungen ohne zeitliche Auflösung von Mc Connel *et al.*⁷, wonach im sauren das $\Delta H^+/Rh$ -Verhältnis etwa 1,0 ist und nach Durchlaufen eines Wendepunktes bei ca. pH 6,0 im alkalischen gegen Null strebt. Vergleichende Mikrotitraktionen⁸ an unbelichteten und an belichteten Außensegment-Präparaten bei 2 °C zeigten eine Zunahme der Pufferkapazität nach Belichtung, die durch die Freisetzung einer Base mit dem scheinbaren pK 6,3 beschrieben werden kann, in Übereinstimmung mit den Messungen von Matthews *et al.*⁴.

4. Diskussion

4.1 Deutung für das Eingreifen der Protonen in das Metarhodopsin-I-II-Gleichgewicht

Wie in den Abschnitten 1.2 und 3.1 gezeigt wurde, wird im pH-Bereich zwischen 5,5 und 8,0 das Metarhodopsin-I-II-Gleichgewicht bei Erhöhung der H^+ -Konzentration zum Metarhodopsin II hin verschoben. Nach dem Le-Chatelier-Braunschen Prinzip vom kleinsten Zwang muß man daher fordern, daß bei der Bildung von M_{II} Protonen verbraucht werden. Wie aus Abschnitt 3.6 hervorgeht, ist das tatsächlich der Fall*.

Wo bleiben die verbrauchten Protonen? Im Anschluß an Matthews *et al.*⁴ kann man sich vorstellen, daß bei der Bildung der M_{II} -Struktur eine Base (etwa die Imidazol-Gruppe des Histidins) aus dem hydrophoben Inneren des Moleküls zur wäßrigen Außenphase hin orientiert wird und aus dieser ein H^+ anlagern kann.

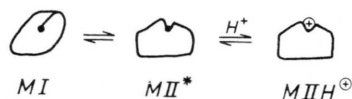


Abb. 15. Schema der Konformationsänderung bei der M_{I-II} -Umwandlung unter Bildung einer aufgefalteten Struktur (M_{II}^*). Der Punkt stellt die exponierbare Base dar. Die Protonisierung der Base führt zur „Arretierung“ der aufgefalteten Struktur. Es liegen zwei Gleichgewichte vor, von denen nur das zweite pH-abhängig ist.

* Unter einem „Zwang“ im Sinne von Le Chatelier wird meistens eine Temperaturerhöhung oder eine Druckerhöhung verstanden, der das System in derjenigen Richtung nachgibt, wie es Wärme oder Volumenarbeit aufnimmt. Der Zwang kann aber ebenso gut in einer Änderung des pH-Werts bestehen. Das Le Chateliersche Prinzip ist allgemein aus dem zweiten Hauptsatz ableitbar.

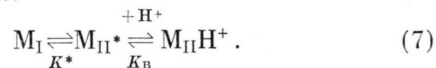
Warum wird durch die H^+ -Anlagerung das Gleichgewicht zum M_{II} hin verschoben? Solange die Base mit einem H^+ beladen ist, kann sie nicht wieder in das hydrophobe Innere des Moleküls zurückgefaltet werden, da sie zu polar ist, d. h. der M_{II} -Zustand wird durch die Protonisierung „arretiert“. Eine Rückreaktion zum M_I ist nur aus dem unprotonierten M_{II} -Zustand heraus möglich (Abb. 15).

Man kann die „Arretierung“ formal auch so beschreiben, daß die M_I -Konformation im protonisierten Zustand eine sehr hohe freie Energie besitzen würde. Daher liegt das Konformationsgleichgewicht der protonisierten Form ganz auf der Seite von $M_{II}H^+$. Andererseits liegt das Dissoziationsgleichgewicht in der M_I -Konformation ganz auf der Seite der Dissoziation der Protonen, was einem stark sauren pK-Wert entsprechen würde. Die protonisierte Form $M_{II}H^+$ liegt daher nur in extrem kleiner Konzentration vor. Die mit der Konformationsänderung einhergehende Ausfaltung der basischen Gruppe kann also formal auch als Änderung der Basenkonstante K_B dieser Gruppe um viele Zehnerpotenzen beschrieben werden.

Es ist anzunehmen, daß die spektrale Verschiebung der Absorptionsbande von 480 nach 380 nm auf der Spaltung und neuen Verknüpfung einiger konformativ wichtiger Bindungen beruht, die eine Strukturänderung des Gesamtmoleküls unter Ausfaltung der Base zwangsläufig zur Folge hat. Die nachgelagerte Aufnahme eines H^+ hat dagegen auf das beobachtete Absorptionsspektrum keinen direkten Einfluß, d. h. die protonisierte und die unprotonisierte Form tragen beide zu der beobachteten Absorption von M_{II} bei**. Bezeichnen wir die protonisierte Form mit $M_{II}H^+$, die unprotonisierte Zwischenform mit M_{II}^* , so gilt also für die aus dem Absorptionsspektrum ermittelte Konzentration von M_{II} :

$$C_{II} = C_{M_{II}^*} + C_{M_{II}H^+} \quad (6)$$

Dann gilt folgendes Reaktionsschema für das M_{I-II} -Gleichgewicht:



** Die Berechtigung für diese Annahme ergibt sich daraus, daß die beobachteten Absorptionsverschiebungen damit in groben Umrissen auf einfache Weise erklärt werden können, wie weiter hinten ersichtlich wird. Außerdem wird der in der Fußnote in Abschnitt 1.2 zitierte Widerspruch dabei vermieden.

Darin ist das durch die Gleichgewichtskonstante

$$K^* \equiv C_{M_{II}^*}/C_I \quad (8)$$

gegebene Gleichgewicht von der H^+ -Konzentration unabhängig. Die pH-Abhängigkeit des Gesamtgleichgewichtes ergibt sich aus der Basenkonstante

$$K_B \equiv \frac{C_{M_{II}H^+}}{C_{M_{II}^*} \cdot C_{H^+}} \quad (9)$$

Für die Gleichgewichtskonstante K_{I-II} erhält man durch Einsetzen von (6), (8) und (9) in (1):

$$K_{I-II} = K^* (1 + K_B C_{H^+}) \quad (10)$$

Die aus den Titrationskurven⁸ und Abb. 1 ablesbare Gleichgewichtskonstante ist also nicht mit $K_B \cdot C_{H^+}$ identisch, wie von Matthews *et al.*⁴ angenommen wurde. Mit Hilfe von Gl. (10) kann der in Abb. 1 dargestellte Verlauf von

$$\frac{C_{II}}{C_I + C_{II}} = \frac{K_{I-II}}{1 + K_{I-II}} \quad (11)$$

als Funktion des pH-Wertes im Bereich zwischen pH=6 und pH=8 qualitativ diskutiert werden:

Für $K_B \cdot C_{H^+} \gg 1$ wird aus (10)

$$K_{I-II} \approx K^* \cdot K_B \cdot C_{H^+},$$

und falls außerdem

$$K^* \cdot K_B \cdot C_{H^+} \gg 1,$$

wird aus (11)

$$\frac{C_{II}}{C_I + C_{II}} \approx 1.$$

Dieser Fall würde in Abb. 1 etwa bei pH=5 erreicht werden (gestrichelter Kurventeil). Tatsächlich fällt aber die Meßkurve unterhalb von pH=6 zum sauren hin ab. Das kann so gedeutet werden, daß hier das Rhodopsin bereits im Dunkeln teilweise zersetzt wird (Säuredenaturierung).

Für $C_{H^+} \cdot K_B \ll 1$ wird aus (10) $K_{I-II} \approx K^*$ und somit aus (11)

$$C_{II}/(C_I + C_{II}) \approx K^*/(1 + K^*).$$

Dieses ist der kleinste Wert, den der Bruchteil an Metarhodopsin II im Gleichgewicht annehmen kann. Das Modell erklärt also zwanglos den Befund, daß der Bruchteil $C_{II}/(C_I + C_{II})$ für große pH bei

23 °C nicht nahezu 0 wird (vgl. Abb. 1 unten), d. h. daß das Gleichgewicht durch Änderung des pH nicht mehr vollständig auf die Seite von Metarhodopsin I verschoben werden kann. Aus dem Wert von $C_{II}/(C_I + C_{II})$ bei pH 8 kann man den Wert von K^* für die jeweilige Temperatur etwa abschätzen und damit aus der Kurve auch K_B ermitteln*. Auf diese Weise gelangt man zu folgenden angenäherten Werten:

$$K^* (2^\circ \text{C}) \approx 0,005 \quad K_B (2^\circ \text{C}) \approx 10^{8,5}$$

$$K^* (23^\circ \text{C}) \approx 0,4 \quad K_B (23^\circ \text{C}) \approx 10^7.$$

Die mit diesen Werten nach Gln. (10) und (11) berechneten Kurven für $C_{II}/(C_I + C_{II})$ als Funktion des pH-Wertes sind in Abb. 1 gestrichelt gezeichnet. Das Wiederansteigen des Signals oberhalb von pH 8 (s. auch²²) kann nicht ohne Annahme einer alkali-induzierten Strukturänderung des Rhodopsins gedeutet werden, die im Modell nicht berücksichtigt wurde. Daher verlaufen die berechneten Kurven oberhalb von pH 8 (wie auch unterhalb von pH 6) ganz anders als die gemessenen.

Aus der Zunahme von K^* mit steigender Temperatur läßt sich nach der van't Hoffschen Gleichung die Reaktionsenthalpie ΔH^* abschätzen, die mit der Bildung von M_{II}^* aus M_I verbunden ist:

$$\Delta H^* \approx 2,3 R \frac{\log K_1^*/K_2^*}{1/T_2 - 1/T_1} \quad (12)$$

Aus den obigen Zahlenwerten ergibt sich $\Delta H^* \approx 31$ kcal. ΔH^* ist >0 , d. h. M_{II}^* ist energiereicher als M_I , darum nimmt die Gleichgewichtskonzentration $C_{M_{II}^*}$ mit steigender Temperatur zu. Dagegen ist die Protonisierung der Base wieder exotherm, $\Delta H_B < 0$. Die Enthalpieänderung der Gesamtreaktion von M_I bis $M_{II}H^+$ ist daher kleiner als ΔH^* (vgl. Abb. 16).

Es liegt nahe, analog zu ΔH^* auch ΔH_B aus der Temperaturabhängigkeit von K_B zu berechnen. Da-

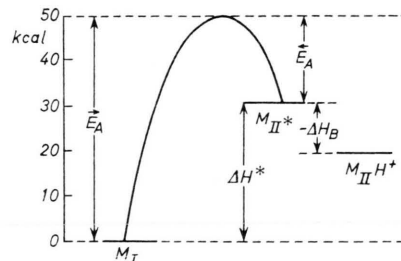


Abb. 16. Enthalpiediagramm der M_I - M_{II} -Umwandlung (vgl. Text Abschn. 4.1).

* Für $C_{H^+} = 1/K_B$ wird nämlich aus (10) $K_{I-II} = 2 K^*$, also $C_{II}/(C_I + C_{II}) = 2 K^*/(1 + 2 K^*)$. Der an dieser Stelle der Kurve abgelesene pH-Wert ist $-\log K_B$.

bei würde sich ein Wert von -23 kcal ergeben, der viel größer ist, als bekannte Reaktionsenthalpien für die Protonenaufnahme organischer Basen erwarten lassen (z. B. -11 kcal für Arginin²³). Die ungewöhnlich starke Temperaturabhängigkeit von K_B kann also nicht als bloße Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichtes entsprechend der van't Hoff'schen Gleichung beschrieben werden, sondern man muß annehmen, daß die Basenkonstante durch einen zusätzlichen, temperaturabhängigen Effekt verändert wird. Dieser könnte darin bestehen, daß der Grad der Ausfaltung der basischen Gruppe nach dem Übergang in die M_{II} -Konformation noch von der Temperatur abhängt: Wenn die protonisierte basische Gruppe sich mit steigender Temperatur ein wenig aus der wäßrigen Phase in hydrophobe Bereiche zurückzieht, dann muß die Dissoziation des Protons stärker zunehmen, als dies sonst mit steigender Temperatur der Fall wäre. Der Grund für das Versagen der van't Hoff'schen Gleichung liegt dann darin, daß es sich bei verschiedenen Temperaturen nicht exakt um die gleichen Reaktionspartner handelt.

Nimmt man für die Protonisierungsenthalpie einen Wert von $\Delta H_B \approx -11$ kcal an, so ergibt sich für die Reaktionsfolge in Gl. (7) das in Abb. 16 dargestellte Enthalpiediagramm. Die beiden (geschätzten) Aktivierungsenergien \bar{E}_A und \bar{E}_A sind vom pH-Wert abhängig. Zur exakten Bestimmung von \bar{E}_A bei einem bestimmten pH-Wert müßte die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante k für die Hinreaktion bekannt sein. k läßt sich im Prinzip aus der Relaxationsgeschwindigkeitskonstante k und der Gleichgewichtskonstante K_{I-II} nach Gl. (5) berechnen, jedoch konnten die dazu erforderlichen umfangreichen Meßprogramme bisher nicht ausgeführt werden. Der von v. Sengbusch¹⁴ aus der Temperaturabhängigkeit von k errechnete Wert $\bar{E}_A = 33$ kcal (aus Abb. 6 erhalten wir bei pH 6: 20 kcal, bei pH 6,5: 27 kcal, bei pH 7: 40 kcal) stellt weder \bar{E}_A noch \bar{E}_A dar. An Hand von Zahlenbeispielen läßt sich zeigen, daß dieser Wert wahrscheinlich näher an der kleineren der beiden Aktivierungsenergien liegt.

Es ist noch darauf hinzuweisen, daß die Temperaturabhängigkeit der formalen Geschwindigkeitskonstante k aus Gl. (4) keineswegs die Größe \bar{E}_A aus Abb. 16 liefern würde, weil M_{II} nur teilweise als M_{II}^* , teilweise aber als $M_{II}H^+$ vorliegt.

4.2 Zur Chemie der Metarhodopsin-I-II-Umwandlung

Der seit Matthews *et al.*⁴ bekannte Widerspruch, daß die Protonisierung von Metarhodopsin an Stelle der erwarteten bathochromen eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsbande bewirkt, wird im vorliegenden Modell dadurch gelöst, daß die das Gleichgewicht beeinflussenden Protonen an einer chemischen Gruppe angreifen, die vom Chromophor räumlich getrennt ist. Die chemische Natur dieser Gruppe kann aus dem scheinbaren pK-Wert von 6,3 nicht erschlossen werden, wie Matthews *et al.* dies mit der versuchsweisen Annahme der Imidazolgruppe des Histidins getan haben, da K_{I-II} wegen des Vorliegens von zwei Gleichgewichten nicht gleich $K_B \cdot C_{H^+}$ ist (vgl. 4.1) und da außerdem die lokale Basenkonstante K_B im Rhodopsin von derjenigen der freien Aminosäure in Lösung verschieden sein kann (eine hydrophobe Umgebung vermindert K_B). Es kommen deshalb anstelle von Histidin eher einige stärker basische Aminosäuren wie Arginin, Ornithin, Citrullin, Lysin, oder auch fest gebundene Phospholipide wie Phosphatidylserin²⁴ in Betracht.

Die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit im sauren (und alkalischen) (Abb. 4, 5), die bereits von v. Sengbusch beobachtet wurde, wird von uns als katalytischer Effekt der Protonen (und OH^- -Ionen) auf die Spaltung konformativ wichtiger Bindungen gedeutet. Welche Bindungen sind dies? Nach de Grip *et al.*²⁵ findet ohne Zusatz von Detergentien bei der Rhodopsin-Photolyse keine Exponierung von SH-Gruppen statt. Andererseits wird auch keine Transimidisierung des Retinals bis zur Stufe von M_{II} beobachtet²⁶. Es kann somit vermutet werden, daß es Wasserstoffbrückenbindungen sind, deren Spaltung bei der M_{I-II} -Konformationsänderung durch H^+ - (und OH^-)-Ionen katalytisch beschleunigt wird.

Besteht die Möglichkeit, daß die katalytische und die thermodynamische Wirkung der Protonen auf ein und denselben Mechanismus beruht? Geht man davon aus, daß das angelagerte Proton eine die M_{II} -Konformation „arretierende“ Wirkung hat, so bedeutet dies, daß die Einfaltung der protonisierten Base eine besonders hohe Energie erfordern würde. Dann aber kann der Zwischenzustand M_IH^+ keinen energetisch günstigen Reaktionsweg bedeuten, der für eine katalytische Wirkung der Protonen zu fordern ist. Daher ist nicht anzunehmen, daß der

katalytische Angriff der Protonen an der gleichen basischen Gruppe erfolgt, deren Protonisierung die M_{II} -Konformation arretiert.

Wie sich aus den Meßdaten von Matthews *et al.*⁴ entnehmen läßt, wird das M_I - M_{II} -Gleichgewicht durch Zugabe von Glycerin zum M_{II} hin verschoben, was vermutlich auf einer Zunahme von K^* beruht, die in diesem Falle durch Verminderung von ΔH^* verursacht ist: Daß Glycerin die Konformation von M_{II}^* begünstigt, kann daran liegen, daß das hydrophobe Innere von M_I , welches bei der Umwandlung zum M_{II}^* nach außen gefaltet wird, gegenüber Wasser eine höhere Grenzflächenenergie besitzt als gegenüber dem schwächer polaren Glycerin.

4.3 Konformative Kopplung von Rhodopsin-Molekülen

Die bisher dargestellten Befunde lassen im sauren stets eine 1:1-Stöchiometrie zwischen den gebildeten M_{II} -Molekülen und den aufgenommenen Protonen erwarten. Tatsächlich findet man nach voll-

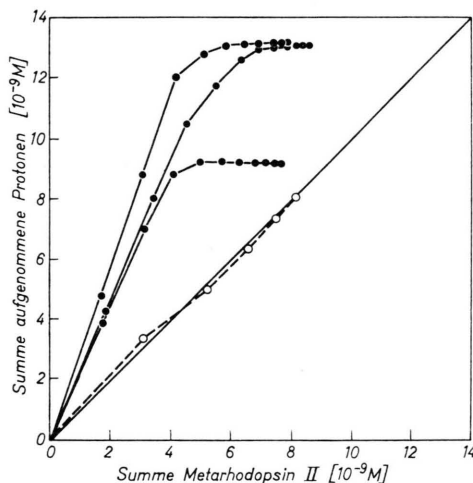


Abb. 17. Summe der bis zum jeweiligen Blitz aufgenommenen Protonen als Funktion der Summe der gebildeten M_{II} -Moleküle (summative Darstellung). Die ΔH^+ -Werte wurden aus den Amplituden von BCP-Signalen erhalten (Eichung durch Säureinjektion). Nach jeweils 10 Blitzen erfolgte Rückstellung des pH-Wertes auf pH 5,8; es wurden in Intervallen von je 10 Blitzen insgesamt 100 Blitze appliziert. Die ΔM_{II} -Werte (385 nm) wurden mit derselben Filterkombination bei Anwesenheit derselben BCP-Konz. ($3 \cdot 10^{-5} M$) gemessen, wie die ΔH^+ -Werte, wobei die BCP-Signale durch Pufferung unterdrückt wurden. Kreise: Werte nach Zusatz von 10% Äthanol.

* Rhodopsin selbst kann dagegen sehr wohl als „Nachbarmolekül“ eine verstärkte H^+ -Aufnahme verursachen. Die H^+ -Aufnahme kann auch durch Phospholipide erfolgen,

ständiger Ausbleichung des Rhodopsins, daß insgesamt etwa ebenso viele Protonen aus der Lösung verschwunden sind, wie M_{II} -Moleküle gebildet worden sind (^{4, 10}, eigene Messungen). Bei unvollständiger Ausbleichung ist das jedoch nicht immer der Fall: In Abb. 17 ist für sukzessive Photolyse mit einer Folge von (nichtsättigenden) Blitzen die Summe der bis zum jeweiligen Blitz aufgenommenen Protonen als Funktion von der Summe der gebildeten M_{II} -Moleküle dargestellt. Die Steigung $\Delta H^+/\Delta M_{II}$ dieser Kurven entspricht der Zahl der aufgenommenen Protonen pro gebildetes M_{II} -Molekül in der jeweiligen Einzelblitz-Gruppe. Man erkennt, daß in einigen Versuchsreihen zu Beginn der Ausbleichung 2–3 Protonen pro gebildetes M_{II} -Molekül aufgenommen werden, am Schluß der Ausbleichung dagegen fast gar keine mehr. Dieser Effekt zeigt sich bei der Auftragung der ΔpH -Amplitude als Funktion der Anzahl applizierter Blitze als charakteristische Abweichung von einer Exponentialfunktion. Diese Abweichung wurde in 7 von 10 derartigen Experimenten beobachtet. Bei drei Experimenten mit Zusatz von Äthanol und zwei Experimenten mit Digitoninzusatz wurde der Effekt nicht beobachtet. Eine Eichung $\Delta H^+/\Delta M_{II}$ wurde bei vier dieser Meßreihen vorgenommen (Abb. 17).

Da bei vollständiger Ausbleichung das $\Sigma \Delta H^+/\Sigma \Delta M_{II}$ -Verhältnis etwa 1,0 ist und da ferner – wie oben gezeigt – die Protonenaufnahme direkt auf das M_I - M_{II} -Gleichgewicht einwirkt, ist anzunehmen, daß die Protonen vom M_{II} aufgenommen werden und nicht von andersartigen „Nachbarmolekülen“ in der Membran*. Die einfachste Deutung für die dargestellten Experimente (Abb. 17) ist die, daß unter bestimmten Bedingungen bei Dunkeladaptation die Photolyse eines Rhodopsinmoleküls die

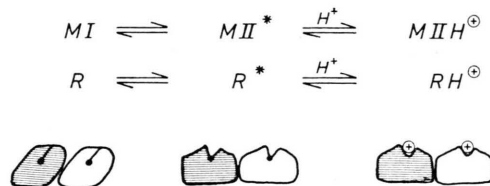


Abb. 18. Schema einer (hypothetischen) konformativen Kopplung von Rhodopsinmolekülen mit der Metarhodopsin- M_{II} -Konformationsänderung. Es wird angenommen, daß auch ungebleichtes Rhodopsin (Schraffierung) in die aufgefaltete Struktur übergehen kann und daß diese durch Protonisierung stabilisiert werden kann.

aber diese müßten im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 mit dem Rhodopsin gekoppelt sein.

Konformationsänderung und damit die Protonisierung von bis zu zwei benachbarten Rhodopsinmolekülen induzieren kann. Einen solchen Effekt würde man als „konformative Kopplung“ (Changeux) benachbarter Rhodopsinmoleküle (Abb. 18) bezeichnen, wie sie für den Acetylcholin-Rezeptor bereits beschrieben wurde^{27*}.

In diesem Falle müßte angenommen werden, daß auch das nicht photolysierte Rhodopsin in der „aufgefalteten Struktur“ von $M_{II}H^+$ existieren kann, ohne daß die Konformationsänderung einen wesentlichen Einfluß auf das Chromophorenzentrum ausübt. Die „aufgefaltete Struktur“ wäre eine notwen-

dige, aber keine hinreichende Bedingung für das Auftreten des M_{II} -Spektrums (380 nm).

Da die H^+ -Aufnahme bzw. -Abgabe eine vom Spektrum unabhängige Anzeige der Konformationsänderung darstellt, kann man nachprüfen, ob Rhodopsin wirklich in der aufgefalteten Konformation von M_{II} vorliegen kann. Bei Photoregeneration von Rhodopsin aus $M_{II}H^+$ wäre nämlich zu fordern, daß die Protonen wieder freigesetzt werden, falls das rückgebildete Rhodopsin nur in der „eingefalteten“, nicht protonisierten Konformation existieren kann. Zur Prüfung wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Photolysierte Außensegment-Präparate (im $M_{II}H^+$ -Zustand, pH 5,8) wurden einer Serie von 380 nm-Blitzen ausgesetzt. Das dabei erhaltene Differenzspektrum (Abb. 19) zeigt in Übereinstimmung mit Williams *et al.*²⁸ die Bildung von zwei Stoffen an, die bei $\lambda = 470$ nm bzw. $\lambda = 500$ nm maximal absorbieren. Unter diesen Bedingungen finden wir (unter Verwendung von Bromcresolpurpur als pH-Indikator) bei Belichtung mit 500 nm (Photolysephase, Abb. 20 oben) eine Protonenaufnahme, bei Belichtung mit 380 nm (Photoregenerationsphase, Abb. 20 unten) jedoch keine Protonenabgabe. Falls der bei $\lambda = 500$ nm absorbierende Stoff tatsächlich Rhodopsin ist, wie Williams *et al.*²⁸ annehmen, kann man daraus schließen, daß Rhodopsin auch in der aufgefalteten Struktur existieren kann.

* Es erscheint plausibel, daß eine solche Kopplung durch Äthanol aufgelöst werden kann (Abb. 17).

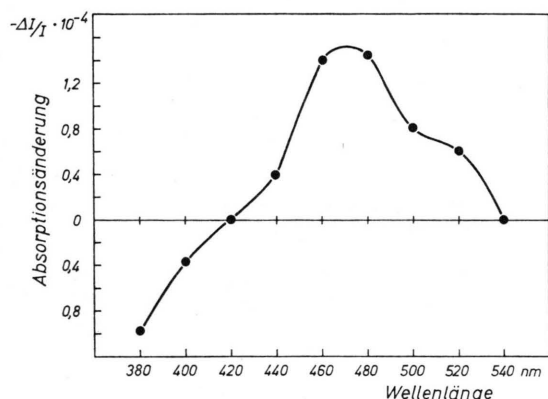


Abb. 19. Spektrum der Absorptionsänderung ($\Delta I/I$) für $t \rightarrow \infty$ einer frisch photolysierten Außensegment-Präparation nach einem kurzwelligen Lichtblitz ($\lambda_{\max} \approx 380$ nm, Schott UG 5). Es entstehen offenbar zwei Stoffe: $\lambda_{\max.1} \approx 470$ nm, $\lambda_{\max.2} \approx 500$ nm).

4.4 Zur visuellen Erregungsbildung

Definiert man als „Auslöser“ der visuellen Erregung denjenigen Reaktionsschritt, bei dem die

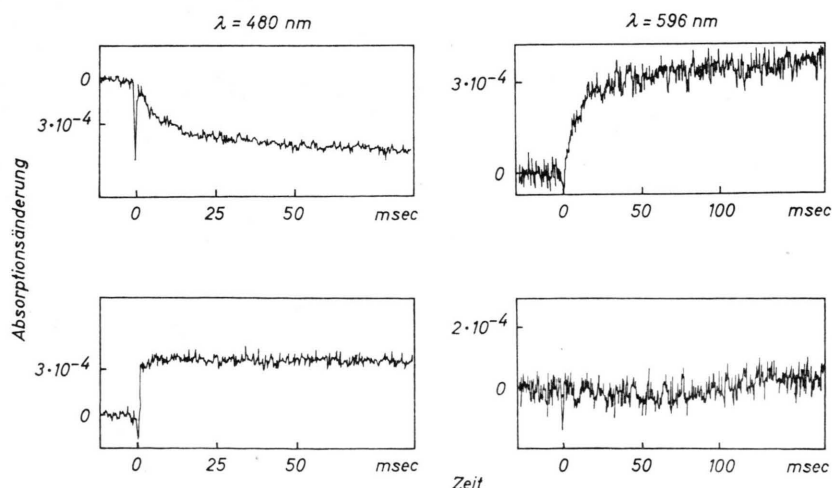


Abb. 20. Oben: normale Rhodopsin-Photolyse nach einem Blitz ($\lambda = 500-550$ nm) bei $t=0$. Links: Zeitlicher Verlauf der Absorptionsabnahme von M_I (480 nm); rechts: Absorptionszunahme von BCP bei $\lambda = 596$ nm. Unten: Photoregeneration einer frisch photolysierten Außensegment-Präparation mit Hilfe eines kurzwelligen Blitzes (Schott UG 5) bei $t=0$; links: zeitlicher Verlauf der Absorptionszunahme eines bei $\lambda = 480$ nm absorbierenden Stoffes; rechts: Fehlen eines optischen pH-Signals.

Information von der Kaskade der Dunkelreaktionen zum Membranprozeß übergeht, so ist zu vermuten, daß die M-I-II-Konformationsänderung diesen Auslöser repräsentiert¹. Der Gedanke, daß die pH-Änderung zwischen den „discs“ als Transmitter der visuellen Erregung fungiert, ist angesichts des geringen Verstärkungseffektes von 2–3 H⁺/MII schwer aufrecht zu halten, da diese Protonen leicht weggepuffert werden können. Es ist denkbar, daß die beobachtete Konformationsänderung eine Membranstrukturänderung induziert, die die von

Yoshikami und Hagins²⁹ beobachteten Ca²⁺-Effekte hervorruft: Die von Blasie³⁰ angenommene licht-induzierte Verringerung der negativen Ladung des Rhodopsins und das damit verbundene „Einsinken“ in die Membran paßt zu diesem Konzept und ist mit unserem Modell vereinbar*: Eine genauere Analyse der Beziehung zwischen M_{II}-Bildung und Ca²⁺-Freisetzung wird in verschiedenen Labors z. Zt. in Angriff genommen und wird klären, ob Ca²⁺ von Rhodopsin selbst freigesetzt werden kann oder von benachbarten Membranelementen.

* Man kann sich vorstellen, daß die Anlagerung eines Protons zur Neutralisation einer negativen Überschußladung führt.

Wir danken Herrn Prof. Dr. H. T. Witt für die freundliche Unterstützung der vorliegenden Untersuchungen.

- ¹ G. Wald, *Angew. Chem.* **80**, 857 [1968].
- ² M. Akhtar, P. T. Blosse, and (in part) P. B. Dewhurst, *Chem. Comm.* **13**, 631 [1967].
- ³ D. Bownds, *Nature* **216**, 1178 [1967].
- ⁴ R. G. Matthews, R. Hubbard, P. K. Brown, and G. Wald, *J. Gen. Physiol.* **47**, 215 [1963].
- ⁵ S. E. Ostroy, F. Erhardt, and E. W. Abrahamson, *Biochim Biophys. Acta* **112**, 265 [1966].
- ⁶ Ch. M. Radding and G. Wald, *J. Gen. Physiol.* **39**, 909 [1956].
- ⁷ D. G. McConnel, Ch. N. Rafferty, and R. A. Dilley, *J. Biol. Chem.* **243**, 5820 [1968].
- ⁸ H. M. Emrich, *Z. Naturforsch.* **26 b**, 352 [1971].
- ⁹ G. Falk and P. Fatt, *J. Physiol.* **183**, 211 [1966].
- ¹⁰ V. F. Antonov, A. L. Afanas'ev, M. A. Ostrovskii, and I. B. Fedorovich, *Biofizika* **16**, 78 [1971].
- ¹¹ I. A. Vorob'eva, *Biofizika* **15**, 571 [1970].
- ¹² D. G. McConnel, *J. Cell. Biol.* **27**, 459 [1965].
- ¹³ H. T. Witt, *Proc. Fifth Nobel Sympos. Almqvist and Wiksell*, 1967, p. 81.
- ¹⁴ G. v. Sengbusch, Dissertation, Aachen 1971; G. v. Sengbusch and H. Stieve, *Z. Naturforsch.* **26 b**, 488 [1971]; G. v. Sengbusch and H. Stieve, *Z. Naturforsch.* **26 b**, 861 [1971].
- ¹⁵ J. A. Rapp, Doctor Thesis, Case Western Reserve Univ. Cleveland (Ohio) 1971.
- ¹⁶ C. Helrich and G. Nöll, *Biophysics of Structure and Mechanism*, in press.
- ¹⁷ T. P. Williams, B. N. Baker, and J. H. McDowell, *Exp. Eye Res.* **18**, 69 [1974].
- ¹⁸ M. L. Applebury, D. M. Zuckerman, A. A. Lamola, and Th. M. Jovin, *Biochemistry* **13**, 3448 [1974].
- ¹⁹ B. Chance and L. Mela, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1243 [1966].
- ²⁰ S. A. Shukolyukov and R. N. Etingof, *Biofizika* **15**, 113 [1970].
- ²¹ W. T. Mason, R. S. Fager, and E. W. Abrahamson, *Nature* **247**, 188 [1974].
- ²² H. Stieve, M. Wilms, and G. Nöll, *Z. Naturforsch.* **28 c**, 600 [1973].
- ²³ S. Pelletier, Doctor Thesis, Paris 1960.
- ²⁴ W. J. de Grip, F. J. M. Daemen, and S. L. Bonting, *Biochim. Biophys. Acta* **323**, 125 [1973].
- ²⁵ W. J. de Grip, G. L. M. van de Laar, F. J. M. Daemen, and S. L. Bonting, *Biochim. Biophys. Acta* **325**, 315 [1973].
- ²⁶ S. L. Bonting, J. P. Rotmans, and F. J. M. Daemen, *Biochem. and Physiol. of Visual Pigments*, p. 39, Springer 1973.
- ²⁷ J.-P. Changeux and T. R. Podleski, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 944 [1968].
- ²⁸ T. P. Williams, *Vision Res.* **8**, 1457 [1968]; T. P. Williams, B. N. Baker, and D. J. Eder, *Biochem. and Physiol. of Visual Pigments*, p. 83, Springer 1973.
- ²⁹ S. Yoshikami and W. A. Hagins, *Biochem. and Physiol. of Visual Pigments*, p. 245, Springer 1973.
- ³⁰ J. K. Blasie, *Biophys. J.* **12**, 205 [1972].