Messung der Reaktionsenthalpie von Teilreaktionen der visuellen Kaskade

Digitale Dissertation

Dissertation **PDF-Version**

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Phys. Gabriele Tellgmann, geb. Weiss
geb. am 31.07.1969 in Hermannstadt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer
Dekanin der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. V. Bonacic-Koutecky

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Alfred Blume
2. Prof. Dr. Andreas Herrmann
3. Prof: Dr. Klaus-Peter Hofmann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.08.1998

Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einen weiteren Schritt zur Aufklärung der visuellen Kaskade beizutragen. Erstmals konnten die Enthalpieänderungen für den G-Protein-Zyklus und dessen Teilreaktionen im Titrationskalorimeter am rekonstituierten System bestimmt werden.

Der G-Protein-Zyklus

Der Photorezeptor Rhodopsin katalysiert in seinem lichtaktivierten Zustand (R*) die Aktivierung des G-Proteins Transducin (G_t) durch Austausch von GDP gegen GTP in der Nukleotidbindungstasche von Transducin. Durch die intrinsische GTPase des G-Proteins, wird GTP hydrolysiert und G_t kehrt in den inaktiven Zustand zurück. Die Titration von GTP zum Komplex aus lichtaktiviertem Rhodopsin und Transducin (R*G-Komplex) ergab für den gesamten G-Protein-Zyklus eine Reaktionsenthalpie von - 4.6 ± 0.8 kcal pro Mol GTP. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den in der Literatur aufgeführten Werten für die Reaktionsenthalpie der Hydrolyse von ATP zu ADP (- 4.9 kcal/Mol; Gajewski et al., 1986 [22]).

Die Teilreaktionen des G-Protein-Zyklus

Die Teilreaktionen des G-Protein-Zyklus waren nicht direkt durch Titrationsexperimente zugänglich. Durch Variation der Konzentrationen der einzelnen Reaktionspartner konnten jedoch die unterschiedlichen Phasen des Wärmesignals zu Teilschritten des Zyklus zugeordnet und deren Reaktionsenthalpien bestimmt werden.

- *Die R*G-Komplexbildung*

  Der Bindung von R* an G_{GDP} sind mehrere Reaktionen untrennbar überlagert. Die gemessene Enthalpieänderung von + 2.0 kcal/Mol ist die Summe der Wärmeänderungen durch Abgabe des an G_α gebundenen GDP, Bindung von R* an Transducin und die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den Rhodopsin Intermediaten MI- und MII-Rhodopsin bei dieser Bindung.

- *Die Komplexdissoziation*

  Unter Verwendung von GTPγS wurde für die Komplexdissoziation eine Enthalpieänderung von - 4.4 kcal/Mol ermittelt. Es ist zu beachten, daß dieser Teilschritt sich aus mehreren Reaktionen zusammensetzt. Dies sind die Bindung des zugegebenen GTPγS an den R*G-Komplex, die Dissoziation von R* und Transducin, die Trennung der Untereinheiten des G-Proteins und die Einstellung des MI-MII-Gleichgewichtes nach Freiwerden des Rhodopsins. Da die Wärmeänderung der genannten Reaktionen nicht separat bestimmt werden konnte, entspricht die im Kalorimeter gemessene Wärme der Summe der Enthalpieänderungen dieser Reaktionen.

- *Die Hydrolysereaktion von G_{GTP} zu G_{GDP}*

  Die Enthalpieänderung durch Hydrolyse des an Transducin gebundenen GTP zu GDP wurde aus der Gesamtwärme des Zyklus zu - 2.2 kcal/Mol errechnet.

Die Reaktionsenthalpie des gesamten Zyklus wird nur von der Energieabgabe des GTP bestimmt, dabei wird die Energie des GTP jedoch nicht vollständig bei der Hydrolyse des Transducin-gebundenen GTP zu GDP frei. Die Differenz zwischen der Gesamtenthalpieänderung und der Wärme, die bei Hydrolyse von G_t-gebundenem GTP frei wird, liegt in einer höheren inneren Energie von Transducin in der GTP-bindenden Konformation als im GDP-bindenden Zustand.

Inhalt

1. Einleitung 1

1.1 Die visuelle Kaskade 2

1.2 Vergleich mit der GTPase des Ras-Proteins..... 7

1.3 Die visuelle Kaskade in der Kalorimetrie 8

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit..... 11

1.5 Thermodynamische Grundlagen 12

2. Material und Methoden 16

2.1 Präparationen 16
2.1.1 Stäbchenaußensegmente 16
2.1.2 Gewaschene Diskmembranen 16
2.1.3 Opsin 17
2.1.4 Phosphoryliertes Rhodopsin..... 17
2.1.5 Transducin..... 18
2.1.6 Untereinheiten des Transducins..... 18
2.1.7 Arrestin 19
2.1.8 Phosphodiesterase..... 19

2.2 Methoden..... 20
2.2.1 Das Titrationskalorimeter 20
2.2.2 Das Fluoreszenzspektrometer 23

2.3 Konzeption eines Experiments und Probenvorbereitung 24

2.4 Vorversuche 26

3. Der gesamte G-Protein-Zyklus.....30

3.1 Titration von GTP zum R*G-Komplex 30

3.2 Enthalpieänderung des G-Protein-Zyklus..... 32

3.3 Vergleich mit der GTPase des Ras-Proteins..... 35

3.4 Variation der GTP-Konzentration 38
a. Kalorimetermessungen 38
b. Fluoreszenzmessungen 39
3.4.1 Doppelinjektionsprotokoll 41

3.5 Variation der G-Protein-Konzentration 45

3.6 Temperaturabhängigkeit der Enthalpieänderung des 47

4. Teilreaktionen im G-Protein-Zyklus.....49

4.1 Komplexbildung 50
4.1.1 Titration von Rhodopsin zu G-Protein 50
4.1.2 Variation der Rhodopsinkonzentration 52
a. Variation der Konzentration der Gewaschenen Membranen (WM) 52
b. Messungen mit Opsin 57
4.1.3 Variation der $G_{\beta\gamma}$-Konzentration 59

4.2 Komplexdissoziation 61
4.2.1 Betrachtung des exothermen Peaks des Wärmesignals 61
4.2.2 Messungen mit GTPγS 63
4.2.3 Einfluß des MI-MII-Gleichgewichtes auf das Wärmesignal 65

4.3 Die Hydrolysereaktion von G_{GTP} zu G_{GDP} 70

5. Kalorimetrische Untersuchung von weiteren Teilreaktionen der visuellen Kaskade 71

5.1 Bindung von Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin 71

5.2 Der G-Protein-Zyklus im Beisein von Phosphodiesterase 73

6. Diskussion 75

6.1 Der gesamte G-Protein-Zyklus 76
6.1.1 Berücksichtigung der Protonierungswärme des Puffers 79

6.2 Teilreaktionen 79
6.2.1 Komplexbildung 80
6.2.2 Komplexdissoziation 81
6.2.3 Die Hydrolysereaktion von G_{GTP} zu G_{GDP} 82
6.2.4 Bindung von Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin 83
6.2.5 Einfluß von PDE auf den G-Protein-Zyklus 83

6.3 Grenzen der Anwendbarkeit des Titrationskalorimeters 84

6.4 Ausblick 85

1. Einleitung

Höhere Organismen wandeln äußere Reize, wie zum Beispiel Licht oder Schall, durch Sinneszellen in elektrische Signale um, die an nachgeschaltete Nervenzellen weitergeleitet werden. Ein weitverbreiteter Weg zur Übersetzung externer in interne Signale bedient sich eines Rezeptors, der den äußeren Reiz registriert und eines Transmitters, der den Reiz an einen Effektor weiterleitet. Durch die Hintereinanderschaltung dieser drei Komponenten in einer Kaskade läßt sich eine sehr effiziente Verstärkung des Signals erzielen, die es ermöglicht, selbst kleinste Reize, beispielsweise einzelne Lichtquanten, wahrzunehmen.

Die visuelle Kaskade im Stäbchenaußensegment von Wirbeltieren, über die ein Lichtreiz in ein elektrisches Signal umgewandelt wird, ist eines der biochemisch am besten untersuchten biologischen Systeme und dient allgemein als Modell für das Studium von Signaltransduktionsvorgängen. Bei der Umwandlung von Licht in ein elektrisches Signal, wird das eintreffende Photon von dem Photorezeptor Rhodopsin registriert und über ein Guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein, Transducin) an den Effektor, die cGMP-Phosphodiesterase, weitergeleitet. Die visuelle Kaskade zeichnet sich gegenüber anderen biologischen Systemen, deren Signalumwandlung nach dem Rezeptor-Transmitter-Effektor Prinzip arbeitet dadurch aus, daß die beteiligten Proteine in ausreichender Menge zur Verfügung stehen und für biophysikalische und biochemische Untersuchungen leicht zugänglich sind.

Zum Verständnis der Wechselwirkungen der Komponenten der visuellen Kaskade ist die Kenntnis der thermodynamischen Parameter der einzelnen Reaktionen von entscheidender Bedeutung. Die Aufklärung dieser Zusammenhänge ist sehr komplex und durch kleine Reaktionswärmen zusätzlich erschwert. Bisher liegen daher keine Untersuchungen vor, die Aufschluß über Reaktionswärmen der Teilreaktionen bei der Signalumwandlung geben. Dies zu leisten ist die Motivation der vorliegenden Arbeit. Weiterentwickelte Präparationsmethoden und die Anwendung eines neuen, sehr empfindlichen Titrations-Mikro-Kalorimeters ermöglichen die Untersuchung bisher unzugänglicher Problemstellungen im Bereich kleiner Enthalpieänderungen in der visuellen Kaskade. Das konkrete Ziel ist die Aufklärung der Reaktionsenthalpien von Transducin in Wechselwirkung mit dem Rezeptor Rhodopsin (G-Protein-Zyklus).

Zunächst wird in einem einleitenden Kapitel ein Überblick über die visuelle Signaltransduktion und deren thermodynamische Untersuchung gegeben. Hierzu gehört neben der Beschreibung der einzelnen Komponenten der Kaskade und ihrem Zusammenwirken auch eine kurze Einführung in die Kalorimetrie und die Vorstellung der vor Beginn der Arbeit bekannten Ergebnisse zur

Thermodynamik des Sehvorgangs. Im Anschluß gibt das Kapitel einen kurzen Abriß über die zum Verständnis nötigen thermodynamischen Grundlagen. Die Präparation der untersuchten Proteine sowie die Funktionsweise und Handhabung der Meßgeräte wird im Teil 'Material und Methoden' beschrieben. Der Ergebnisteil der Arbeit gliedert sich in drei Kapitel. Zunächst werden Experimente vorgestellt, die den G-Protein-Zyklus in seiner Gesamtheit untersuchen (Kapitel 3), gefolgt von Betrachtungen der einzelnen Teilreaktionen (Kapitel 4). Daran schließen sich die Ergebnisse von Experimenten an, die an Proteinen der visuellen Kaskade außerhalb des G-Protein-Zyklus durchgeführt wurden (Kapitel 5). Die Diskussion (Kapitel 6) stellt die Meßergebnisse in einen Zusammenhang, erläutert ihre Bedeutung und bespricht offene Fragen.

1.1 Die visuelle Kaskade

In der Netzhaut von Wirbeltieren gibt es zwei Arten von Photorezeptoren, Sehstäbchen und Sehzapfen. Die Sehzapfen befinden sich hauptsächlich im Zentrum des Scharfsehens, im sogenannten gelben Fleck, die Stäbchen verteilen sich über die restliche Fläche der Retina. Es gibt drei Typen von Zapfen, die ihr Absorptionsmaximum bei verschiedenen Wellenlängen haben und so die Unterscheidung von Farben ermöglichen. Stäbchen sind für die Hell-Dunkel-Adaptation des Auges zuständig. Sie reagieren langsamer als die Zapfen, weisen aber eine sehr viel größere Empfindlichkeit auf.

Die Stäbchenzelle setzt sich aus einem Außen- und einem Innensegment zusammen (Abb. 1.1 A), die durch ein dünnes Cilium verbunden sind. Im Innensegment finden sich diejenigen Bestandteile, die für den Metabolismus einer Zelle notwendig sind, wohingegen im Außensegment die Signaltransduktion des Lichtes abläuft. Das Außensegment besteht aus einem Stapel dichtgepackter, flacher Vesikel, den sogenannten Disks. Eine schematische Darstellung eines Disks und der wichtigsten Komponenten der Signaltransduktion ist in Abbildung 1.1 B gegeben.

Das einfallende Licht trifft auf den Photorezeptor Rhodopsin, ein integrales Membranprotein. In den Diskmembranen ist Rhodopsin in hoher Konzentration (ca. 30000 Moleküle/μm^2) enthalten. Durch Bindung des belichteten Rezeptors, Rhodopsin (R*), an den Transmitter Transducin (G_t) wird das Signal zum Effektor, der cGMP Phosphodiesterase (PDE), weitergeleitet. Die aktive PDE spaltet cGMP zu 5'GMP. Das Absinken der cGMP-Konzentration in der Zelle führt zum Schließen der cGMP-regulierten Kationenkanäle in der Plasmamembran und somit zu einer Hyperpolarisation an der Membran. Dies ist das eigentliche elektrische Signal.

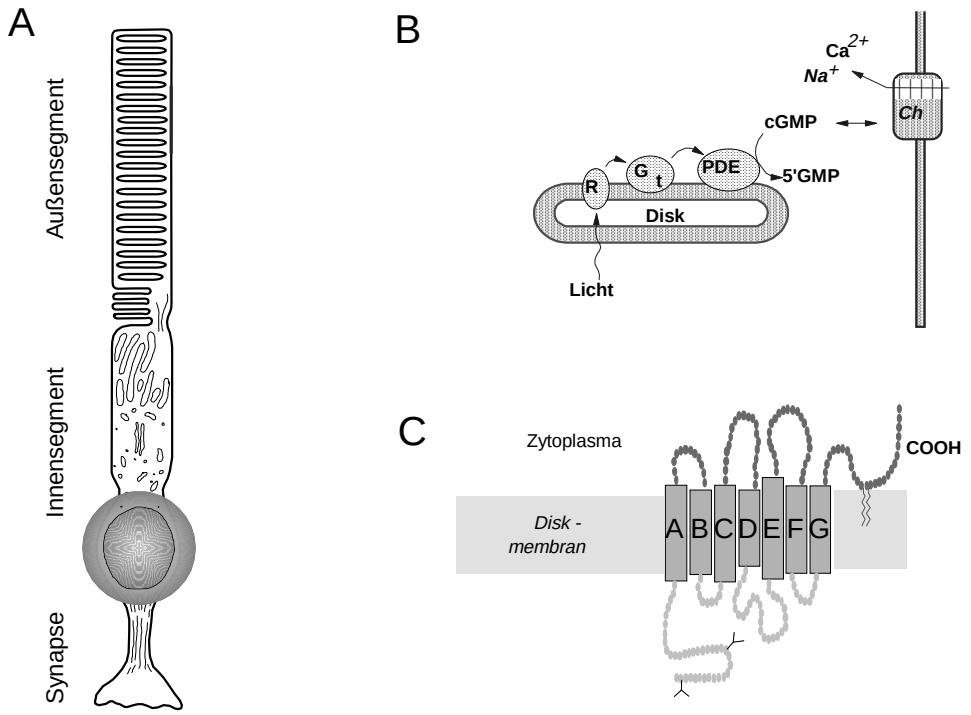


Abbildung 1

A Schema der Stäbchenzelle
Im Außensegment befinden sich stapelförmig angeordnete, scheibenförmigeVesikel, die sogenannten Disks, während das Innensegment die für den Metabolismus der Zelle notwendigen Bestandteile enthält.

B Schematische Darstellung eines Disks
Der Photorezeptor Rhodopsin (R), ein integrales Membranprotein, registriert den Lichtreiz und leitet ihn an den Transmitter Transducin (G_t) weiter. Über den Effektor, die cGMP-Phosphodiesterase (PDE), wird das Signal an den cGMP-abhängigen Kationenkanal (Ch) in der Membran des Außensegmentes übergeben. Mit abnehmender cGMP-Konzentration schließen sich die Kanäle und es kommt zur Hyperpolarisation an der Membran. Dies ist das eigentliche elektrische Signal.

C Schematische Darstellung von Rhodopsin
Rhodopsin ist ein 7-Helix-Rezeptor, bestehend aus sieben α-helikalen Bereichen (A-G), welche die Membran durchziehen. Sie sind sowohl auf der intradiskalen als auch auf der zytoplasmatischen Seite durch Peptidabschnitte, sogenannte Loops verbunden.

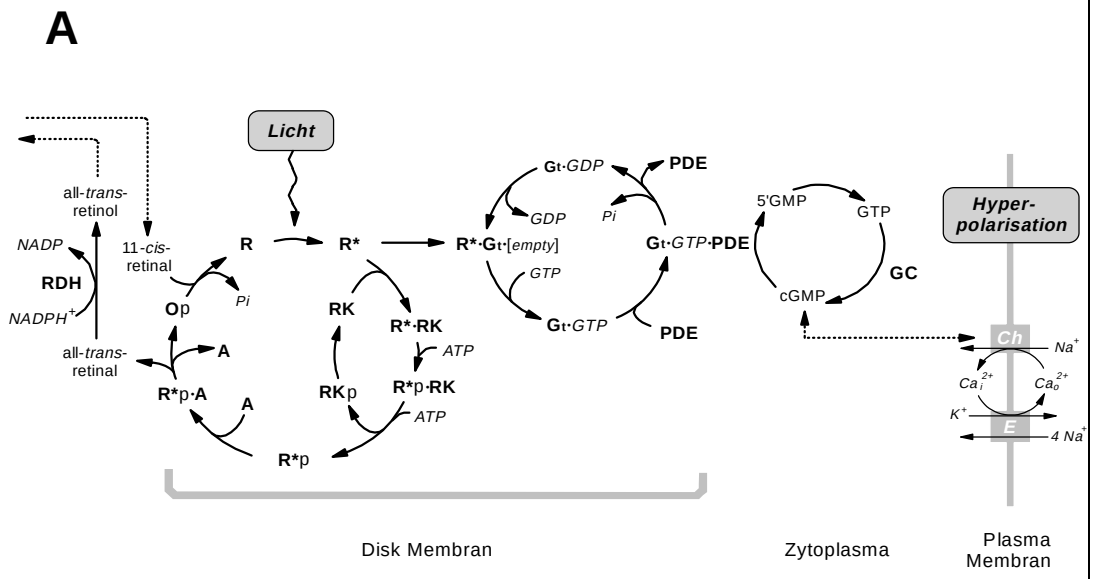
Rhodopsin

Der Photorezeptor Rhodopsin ist ein integrales Membranprotein (Molekulargewicht ~ 40 kDa) und gehört zur Familie der 7-Helix-Rezeptoren (siehe Abb. 1 C). Die einzelnen Helices, welche die Membran durchziehen, sind sowohl im intradiskalen Raum als auch im Zytoplasma durch Peptidabschnitte, die sogenannten Loops verbunden. Aufgrund einer Palmitoylierung von zwei nebeneinanderliegenden Cysteinen (Cys-322 und Cys-323) am C-terminalen Ende des Moleküls ist ein Teil des C-Terminus als weiterer Loop an der Diskmembran fixiert. An den Loops der zytoplasmatischen Seite finden die Wechselwirkungen des Rhodopsins mit anderen Proteinen statt.

Rhodopsin besteht aus dem Apo-Protein Opsin (348 Aminosäuren) und dem Chromophor 11-cis-Retinal, der sich im hydrophoben Inneren des Moleküls befindet. Das Retinal ist über eine Schiff-Base-Bindung an Lys-296 in der siebten Helix des Rhodopsins gebunden. Im Grundzustand wird die positiv geladene Schiff-Base von der negativ geladenen Aminosäure Glu-113 über elektrostatische Wechselwirkung stabilisiert (Sakmar et al. ,1989 [69]; Zhukovsky und Oprian, 1989[84]; Nathans, 1990 [61]; Lin et al., 1992 [50]). Bei Absorption eines Photons geht zunächst das gewinkelte 11-cis-Retinal in die gestreckte all-trans-Form über. Rhodopsin wird im Anschluß über mehrere Zwischenzustände aktiviert (Bathohodopsin, Lumirhodopsin, Metarhodopsin I (MI), Metarhodopsin II, (MII)) (Wald und Brown, 1958 [77], 1968 [78]; Yoshizawa und Shichida, 1982 [83]). Nach wenigen Millisekunden stellt sich ein Gleichgewicht zwischen MI und MII ein, dessen Lage sowohl vom pH-Wert als auch von der Temperatur abhängt (Matthews et al., 1963 [54]; Parkes und Liebman, 1984 [66]).

Beim Übergang von Meta-I- zu Meta-II-Rhodopsin, dem ersten gebleichten Zustand, wird die Schiff-Base deprotoniert, wobei es sich um eine Translokation des Protons innerhalb des Rhodopsins handelt (Ganter et al., 1989 [ ]). Nach einigen Minuten zerfällt MII zu Meta-Rhodopsin III bzw. Opsin und all-trans-Retinal. Das Absorptionsmaximum von Rhodopsin liegt bei 500 nm im Grundzustand und 380 nm in der gebleichten MII-Form.

Eine Deaktivierung des Rezeptors durch Zerfall wäre zu langsam, da die Lebensdauer von Metarhodopsin II im Bereich von einigen Minuten liegt. Die Abschaltung des aktiven Rhodopsins erfolgt durch Phosphorylierung über eine spezifische Kinase (Wilden et al., 1986 [80]). Vervollständigt wird die Deaktivierung durch die Bindung von Arrestin (Palczewski et al., 1992 [65]) an das phosphorylierte Rhodopsin. Arrestin bleibt an Rhodopsin gebunden, bis das all-trans-Retinal durch die Retinoldehydrogenase zu all-trans-Retinol reduziert ist. Dadurch dissoziiert Arrestin vom phosphorylierten Opsin (Hofmann et al., 1992 [33]). Phosphatase 2A dephosphoryliert Opsin (Fowles et al., 1989 [20]; Palczewski, 1989 [62]), das durch Regeneration mit 11-cis-Retinal wieder zu Rhodopsin wird (Bernstein et al., 1987 [5]; Jones et al., 1989 [39]).



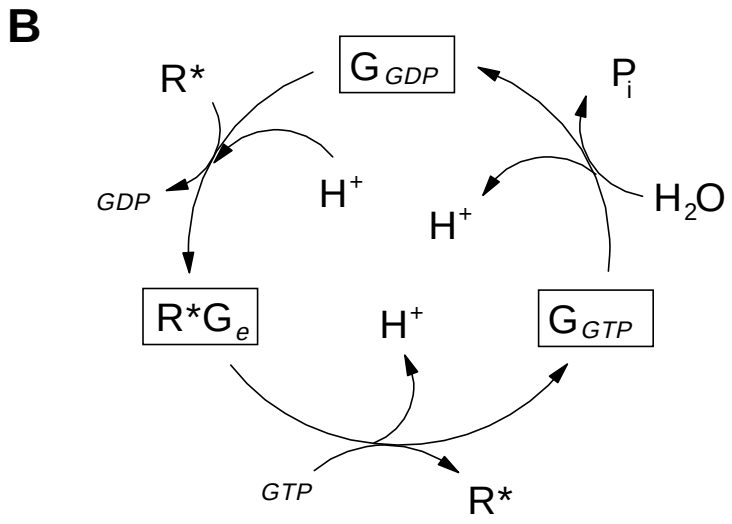


Abbildung 2

A Schematische Darstellung der visuellen Kaskade (aus Hofmann und Heck 1996)

RK Rhodopsinkinase, Rp phosphoryliertes Rhodopsin, A Arrestin, RDH Retinoldehydrogenase, Op phosphoryliertes Opsin, Ch Kationenkanal, E Na/Ca- Austauscher, GC Guanylatcyklase. Zur Erläuterung siehe Text.

B Schematische Darstellung des G-Protein-Zyklus der visuellen Kaskade

Lichtaktiviertes Rhodopsin (R) bindet an Transducin (G_{GDP}). Hierdurch wird die Nukleotidbindungstasche des G-Proteins geöffnet; das im inaktiven Zustand von G_t gebundene GDP wird frei und es bildet sich der stabile R*Gempty-Komplex. Durch Aufnahme von GTP wird Transducin in seinen aktiven Zu- stand (G_{GTP}) überführt. Die folgende Hydrolysereaktion des gebundenen GTP zu GDP bewirkt die Rückkehr von Gt in den inak tiven Ausgangszustand. Im Inneren des Kreises ist die Protonenaufnahme oder Abgabe der jeweiligen Schritte dargestellt.*

Transducin

Der Transmitter, der das Signal vom Rezeptor Rhodopsin zum Effektor, der cGMP-Phosphodiesterase weitergibt, ist Transducin, G_t. Transducin gehört der Familie der heterotrimeren G-Proteine an. Ein detaillierter Überblick hierzu findet sich bei Gilman, 1987 [24], Bourne et al. 1990 [8] und 1991 [9] oder bei Guderman et al., 1996 [25].

Transducin setzt sich aus der G_α-Untereinheit (39 kDa) und dem nichtdissoziierbaren Dimer aus G_β- und G_γ-Untereinheit (G_β 35 kDa, G_γ 5 kDa) zusammen und verfügt über GTPase-Aktivität. Die α-Untereinheit besitzt eine Nukleotidbindungsstelle, die GDP oder GTP binden kann. Hierbei stellt $G_{\alpha GTP}$ den aktiven, $G_{\alpha GDP}$ den inaktiven Zustand des Proteins dar.

Durch Bindung von G_t an aktiviertes Rhodopsin (R*) wird die Nukleotidbindungstasche der α–Untereinheit des Transducins geöffnet (Bennett und Dupont, 1985 [4]). Das im inaktiven Zustand von Transducin gebundene GDP kann dadurch mit der Außenphase equilibrieren und es bildet sich der Komplex aus Rhodopsin und Transducin (R*G-Komplex) mit leerer Nukleotidbindungstasche, der in Abwesenheit von GTP oder GDP stabil ist. In Anwesenheit von GTP bindet dieses an die G_α–Untereinheit und versetzt Transducin so in seinen aktiven Zustand. Diese Konformationsänderung von G_α führt zur Lösung der Komplexbindung sowie zur Trennung der G_α– und $G_{\beta\gamma}$-Untereinheiten. Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP führt die G_α-Untereinheit in den inaktiven Zustand zurück und ermöglicht dadurch die Reassoziation der Untereinheiten.

c-GMP-Phosphodiesterase

Der Effektor der visuellen Kaskade, die cGMP-Phosphodiesterase (PDE) besteht aus α-, β- und zwei γ- Untereinheiten (Baehr et al., 1979 [3]). Partielle Aktivierung der PDE erfolgt durch stöchiometrische Bindung der freien $G_{\alpha GTP}$-Untereinheit an eine der beiden γ-Untereinheiten (Hurley und Stryer, 1982 [37]). Zur vollständigen Aktivierung ist die Bindung von zwei $G_{\alpha GTP}$-Untereinheiten nötig. Die aktive Phosphodiesterase katalysiert die Hydrolyse von zytoplasmatischem cGMP zu 5' GMP. cGMP bewirkt, daß im Dunkeln die cGMP-abhängigen Kanäle in der Zellmembran des Stäbchenaußensegments offen gehalten werden. Durch Hydrolyse nimmt die cGMP-Konzentration in der Zelle ab, was zum Schließen der Kanäle führt. Hierdurch ist der Strom von Na^+- und Ca^{2+}-Ionen in einem Teil der Oberfläche der Zellmembran unterbrochen. Es kommt zu einer Hyperpolarisation an der Zellmembran. Dies ist das elektrische Signal der visuellen Kaskade. Die Guanylatzyklase, die von einem Ca^{2+}-bindenden Protein aktiviert wird, synthetisiert cGMP und sorgt damit für die Erhöhung der cGMP-Konzentration und die Öffnung der Kanäle (siehe hierzu Koch 1994 [44]).

Wie später gezeigt wird, spielen bei kalorimetrischen Messungen die aus der wäßrigen Lösung aufgenommenen oder abgegebenen Protonen eine wichtige Rolle. Für den G-Protein-Zyklus (siehe Abb. 2 B) , der in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht wird, sind die beteiligten Protonen im Inneren des Kreises der Abbildung dargestellt. Bei der Bildung des R*G-Komplexes wird ein Proton aufgenommen. Dies ist von Schleicher und Hofmann (1985 [70]) durch Messun-

gen der blitzlichtinduzierten pH-Änderung gezeigt worden. Durch Messungen in Anwesenheit von GTP konnte indirekt gezeigt werden, daß bei der Dissoziation des Komplexes ein Proton frei wird (Schleicher und Hofmann, 1985 [70]). Ferner ergibt sich aus der Bilanz der Hydrolyse die Abgabe eines weiteren Protons an die Umgebung, es gilt:

$$GTP + H_2O \rightarrow GDP + P_i + H^+ \tag{1.1}$$

1.2 Vergleich mit der GTPase des Ras-Proteins

Bindung und Hydrolyse von GTP spielen nicht nur bei der visuellen Signaltransduktion eine entscheidende Rolle, sondern auch bei einer Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel dem Zellwachstum. In diesem Fall ist das GTP-bindende Protein das sogenannte $p21^{ras}$, ein 21 kDa Protein. Ein detaillierter Überblick über Ras- und Ras-verwandte-Proteine, deren Präparation sowie über den Stand der Forschung in diesem System findet sich bei Campbell-Burk und Carpenter (1995) [ ], Denhardt (1996) [16]und Herrmann und Nassar (1997) [28].

Um die Enthalpieänderung, die durch die Hydrolyse von GTP hervorgerufen wird außerhalb der visuellen Kaskade zu untersuchen, wurden einige Kontrollexperimente am Ras-Protein durchgeführt.

Bei den meisten G-Proteinen, so auch beim Ras-Protein, katalysiert ein Austauschfaktor (guanosine nucleotide exchange factor, GEF) den Übergang vom inaktiven GDP-bindenden Zustand zum aktiven GTP-bindenden Zustand. Die Hydrolyse des Ras-gebundenen GTP wird durch ein GTPase aktivierendes Protein (GAP) reguliert, welches die intrinsische GTPase-Rate des $p21^{ras}$ stark erhöht. Im Ras_{GTP}-Zustand wird ein Effektor aktiviert (siehe hierzu Herrmann und Nassar 1997 [28]) , der das Signal zur nächsten Komponente der Kaskade weiterleitet. In Abbildung 3 ist der Zyklus des GDP-/GTP-Austauschs mit den beteiligten Komponenten schematisch dargestellt.

Beim Durchlaufen des GDP/GTP-Zyklus spielen die Raten der einzelnen Reaktionen eine sehr große Rolle für den richtigen zeitlichen Ablauf der Vorgänge in der Zelle. Je länger ein Protein im aktiven Zustand bleibt, desto länger wird das Signal weitergeleitet. Mutationen des Ras-Proteins senken dessen GTPase-Aktivität drastisch und führen so zu einem onkogenen Ras-Protein, das ein permanentes Wachstumssignal an die Zelle sendet.

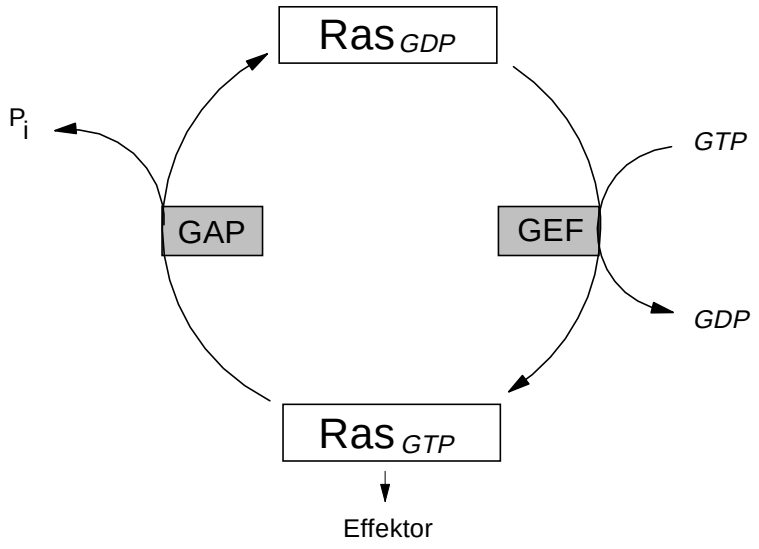


Abbildung 3
Schematische Darstellung des GDP/GTP-Zyklus beim Ras-Protein

Der Übergang vom inaktiven Ras_{GDP}- zum aktiven Ras_{GTP}-Zustand wird durch den Austauschfaktor (GEF) beschleunigt. Im aktiven Zustand kann das Ras-Protein mit verschiedenen Effektoren wechselwirken. Die intrinsische Deaktivierung des Proteins durch Hydrolyse ist sehr langsam und wird durch ein sogenanntes GAP-Protein beschleunigt.

1.3 Die visuelle Kaskade in der Kalorimetrie

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Aufklärung der Enthalpieänderungen von Reaktionen der visuellen Signaltransduktion. Insbesondere soll der G-Protein-Zyklus der Sehkaskade untersucht werden. In diesem Kapitel werden die bisher bekannten, thermodynamischen Messungen zum Sehvorgang beschrieben und deren Ergebnisse zusammengestellt.

Untersuchungen zur thermischen Stabilität von Rhodopsin

Die meisten bisherigen Veröffentlichungen zur Kalorimetrie an Proteinen der visuellen Kaskade berichten über Untersuchungen zur thermischen Stabilität von Rhodopsin und Opsin, die mit Hilfe eines Wärmestrom-Differenz-Kalorimeters (Differential Scanning Calorimeter, DSC) durchgeführt wurden. Bei einer DSC-Messung wird die Wärme gemessen, die bei Aufheizen bzw. Abkühlen einer Probe freigesetzt oder aufgenommen wird. Das Ergebnis gibt Informationen über die Phasenübergänge einer Substanz. Bei der Anwendung der DSC auf Proteine, läßt sich die Temperatur finden, bei der das untersuchte Protein denaturiert. Die Wärmestrom-Differenz-Kalorimetrie läßt sich nur auf Reaktionen anwenden, die durch Veränderung der Temperatur ausgelöst werden. Reaktionen die durch Wechselwirkung von Proteinen hervorgerufen werden,

sind mit dieser Methode nicht zugänglich. Die Ergebnisse der Messungen, die mit DSC-Geräten an Rhodopsin und Opsin durchgeführt wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Betrachtetes Protein		Denaturierungstemperatur und gemessene Wärme		Literaturquelle
Rhodopsin	pH 7.0	bei 72 °C		Miljanich et al., 1985 [57]
Rhodopsin	pH 6.8	bei 74 °C	+ 150 kcal/Mol	Shnyrov et al., 1988 [73]
Rhodopsin	pH 6.1	bei 71.4 °C	+ 167 kcal/Mol	McDowell et al., 1990 [55]
Rhodopsin	pH 6.1	bei 71.9 °C	+ 167 kcal/Mol	Khan et al., 1991 [43]
Opsin	pH 7.0	bei 57 °C		Miljanich et al., 1985 [57]
Opsin	pH 6.8	bei 59 °C	+ 117 kcal/Mol	Shnyrov et al., 1988 [73]
Opsin	pH 6.1	bei 55.3 °C	+ 124 kcal/Mol	McDowell et al., 1990 [55]
Opsin	pH 6.1	bei 55.9 °C	+124 kcal/Mol	Khan et al., 1991 [43]

Tabelle 1

Zusammenfassung der DSC-Untersuchungen zur thermischen Stabilität von Rhodopsin bzw. Opsin

Photokalorimetrie an der visuellen Kaskade

Weitere kalorimetrische Daten zur visuellen Kaskade (Cooper und Converse, 1976 [13]; Cooper, 1979 [14]; Cooper, 1981 [15]; Chabre und Vuong, 1992 [12]) wurden mit zwei verschiedenen Photokalorimetern aufgenommen. Das von Cooper verwendete Gerät war ein handelsübliches Kalorimeter der Firma LKB (Bromma, Schweden), welches zur Messung von photoneninduzierten Reaktionen umgebaut wurde. Chabre und Vuong setzten ein Filmkalorimeter ein, das in Eigenbauweise entstand (Vuong und Chabre, 1990 [75]).

Bei dem LKB-Batch-Kalorimeter handelt es sich um ein Gerät in Zwillingsbauweise (Probenzelle und Referenzzelle). Gemessen wird eine örtliche Temperaturdifferenz in ‘isoperiboler’ Betriebsart. Der Begriff isoperibol bedeutet gleichartige Umgebung und meint den Betrieb eines Kalorimeters bei konstanter Umgebungstemperatur und veränderlicher Temperatur des Meßsystems. Eine genauere Beschreibung dieses Kalorimeters findet sich bei Wadsö (1968) [82]. Cooper und Converse (1976) [13] beschreiben den Umbau des LKB-Batch Gerätes zum Photokalorimeter. Durch die Verwendung von Glasfasern, die das Licht in die Probenzelle führen, ist es möglich, die Enthalpieänderungen von photoneninduzierten Prozessen zu beobachten. Untersucht wurden Außensegmente der Sehstäbchen mit dem Ziel, die Wärme von Aktivierung und Zerfall des Rhodopsins zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Messungen bei tiefen Temperaturen (Cooper, 1979) [14] ermöglichten es, die Wärmeänderung für den Übergang von Rhodopsin nach Bathorhodopsin, einem Intermediat des Rhodopsins, zu bestimmen (siehe Tab. 2).

1990 findet sich bei Vuong und Chabre die Beschreibung eines selbstkonstruierten Kalorimeters dessen Wärmesensor ein PVDF-Film (Poyvinylidendifluorid) ist. Temperaturänderungen führen

zu Ladungsverschiebungen im Film, die einen Verschiebungsstrom erzeugen. Der Strom ist proportional zur Rate der Temperaturänderung. Dieser Eigenbau erlaubt die zeitabhängige Untersuchung von lichtgesteuerten Reaktionen, ist aber für die Betrachtung sehr langsamer Reaktionen ungeeignet, da adiabatische Betriebsbedingungen (kein Wärmeaustausch zwischen Meßsystem und Umgebung) nur für einen kurzen Zeitraum (80 sec) gewährleistet werden können.

Tabelle 2 faßt die kalorimetrisch gemessenen Werte für die Reaktionsenthalpie von Teilschritten der visuellen Kaskade zusammen. Da es sich nicht um Standardwerte der Enthalpieänderung handelt, sind die jeweiligen Meßbedingungen aufgeführt.

Betrachtete Reaktion		gemessene Enthalpieänd. ΔH in kcal/Mol	Literaturquelle
Rhodopsin $\rightarrow$ MI	pH 8, 3 °C	+ 16.8	Cooper & Converse, 1976 [13]
Rhodopsin $\rightarrow$ MII	pH 5.4, 3 °C	+ 27.0	Cooper & Converse, 1976 [13]
Rhodopsin $\rightarrow$ Opsin + Retinal	pH 5.4, 3 °C	+ 11.7	Cooper & Converse, 1976 [13]
MI $\rightarrow$ Opsin + Retinal	pH 8, 3 °C	+ 6	Cooper & Converse, 1976 [13]
MII $\rightarrow$ Opsin + Retinal	pH 5.4, 3 °C	-16	Cooper & Converse, 1976 [13]
MI $\rightarrow$ MII	pH 7, 3 °C	+ 10	Cooper & Converse, 1976 [13]
Rhodopsin $\rightarrow$ Bathorhodopsin Rhodopsin $\rightarrow$ Bathorhodopsin	pH 7, -196 °C -196 °C	+ 34.7 + 30	Cooper, 1979 [14] Chabre & Vuong, 1992 [12]
Bathorhodopsin $\rightarrow$ Meta II		- 15	Chabre & Vuong, 1992 [12]
Rhodopsin $\rightarrow$ Lumirhodopsin	pH 7.2, - 75 °C	+ 26.3	Cooper, 1981 [15]
$R^*G_{GTP} \rightarrow R^* + G_{GTP}$	pH 7.5, 23 °C	- 3	Chabre & Vuong, 1992 [12]
GTP $\rightarrow$ GDP + P_i	pH 7.5, 23 °C	- 4	Chabre & Vuong, 1992 [12]

Tabelle 2

Zusammenfassung der kalorimetrisch bestimmten Enthalpieänderungen für einzelneSchritte in der visuellen Kaskade

Aktivierungsenergien für Reaktionen der visuellen Kaskade

Die in Tabelle 1 und 2 vorgestellten Daten wurden an Proben aus Stäbchenaußensegmenten gemessen. Bisher sind am aus rekonstituierten System, das aus gereinigten Komponenten zusammengesetzt wurde nur Messungen zur Aktivierungsenergie durchgeführt worden. Hierbei

wurden die Aktivierungsenergien aus den Reaktionsraten berechnet, die in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen wurden. Tabelle 3 stellt die Ergebnisse zusammen.

Betrachtete Reaktion	Aktivierungs-energie in kcal/Mol	Literaturquelle
MI $\rightarrow$ MII_a	+ 38	Arnis & Hofmann, 1993 [2]
MII_a $\rightarrow$ MII_b	+ 14	Arnis & Hofmann, 1993 [2]
MII + G_{GDP} $\rightarrow$ MII·G_{empty}	+ 8.3	Kahlert & Hofmann, 1991 [41]
MII·G_{empty} $\rightarrow$ MII + G_{GTP}	+ 39	Kohl & Hofmann, 1987 [46] Kahlert & Hofmann, 1991 [41]
	Freie Aktivierungs-energie in kcal/Mol	
MI $\rightarrow$ MIIa pH 6.0, 5 °C pH 6.75, 5 °C pH 7.5, 5 °C	+ 16.0 + 13.6 + 12.6	Arnis & Hofmann, 1993 [2]
MIIa $\rightarrow$ MIIb pH 6.0, 5 °C pH 6.75, 5 °C pH 7.5, 5 °C	+ 7.6 + 6.7 + 5.7	Arnis & Hofmann, 1993 [2]

Tabelle 3

Zusammenfassung der ermittelten Aktivierungsenergien für Teilschritte der visuellen Kaskade

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit stellt Untersuchungen zur Messung der Reaktionsenthalpie am G-Protein-Zyklus der visuellen Kaskade vor. Das Ziel hierbei war, neben der Enthalpieänderung für den gesamten Zyklus, insbesondere die Reaktionswärmen der einzelnen Teilschritte zu ermitteln. Im Unterschied zu bisherigen kalorimetrischen Untersuchungen des G-Protein-Zyklus (Vuong und Chabre, 1990 [75],1991 [76]) wurde erstmalig ein rekonstituiertes System aus gewaschenen Diskmembranen und gereinigtem Transducin zugrunde gelegt. Dadurch konnten die Konzentrationen der beteiligten Proteine unabhängig voneinander variiert und Teilreaktionen separat betrachtet werden. Diese differenzierte Betrachtungsweise erlaubt es, Zusammenhänge zwischen den einzelnen Komponenten im G-Protein-Zyklus besser zu verstehen und Teilschritte zu isolieren.

Der methodische Fortschritt der Arbeit liegt in dem verwendeten Titrations- Mikro-Kalorimeter (genauere Beschreibung in Kapitel 2.2.1). Im Unterschied zu früheren Geräten (Überblick bei

Langerman und Biltonen, 1979 [49]) ist die Empfindlichkeit dieses Kalorimeters sehr viel größer, so daß einerseits die Enthalpieänderungen genauer bestimmt werden können und andererseits auch sehr kleine, bisher unzugängliche, Reaktionswärmen meßbar sind.
Im Vergleich zu vorhergehenden kalorimetrischen Experimenten wurden in der vorliegenden Arbeit die meisten Messungen nach einem neuen Konzept durchgeführt. Durch die Titration einer Komponente wurde ein Zyklus von Reaktionen ausgelöst. Dabei ist das betrachtete System vor und nach Durchlaufen des Zyklus im gleichen Zustand und die Messung läßt sich an derselben Probe mehrmals wiederholen.
Ferner wurde im Unterschied zu bisher beschriebenen Experimenten unter Verwendung dieses Titrationskalorimeters, nicht nur die gemessene Wärme sondern auch der zeitliche Verlauf des Wärmesignals interpretiert. Die gezielte Variation der Konzentration der beteiligten Proteine verändert den Verlauf des Wärmesignals. Dies erlaubt eine Aussage über den Einfluß des jeweiligen Proteins auf den Gesamtzyklus.

1.5 Thermodynamische Grundlagen

Die thermodynamische Analyse eines biologischen Systems trägt zur Aufklärung von Zusammenhängen und Wechselwirkungen innerhalb des Systems bei. Sie gibt Aufschluß über die treibenden Kräfte der Reaktionen, indem untersucht wird, in welche Richtung eine Reaktion abläuft, ob sie spontan abläuft, wie hoch die Aktivierungsenergie ist und wo das Gleichgewicht der Reaktion liegt.
Thermodynamische Systeme werden in drei verschiedene Klassen eingeteilt; man unterscheidet offene, geschlossene und isolierte Systeme. Ein isoliertes System hat mit seiner Umgebung keinerlei Verbindung, es findet weder ein Austausch von Teilchen noch von Energie statt. Im Falle eines geschlossenen Systems ist ein Energieaustausch mit der Umgebung erlaubt, jedoch kein Teilchenaustausch, wohingegen bei einem offenen System sowohl Energie als auch Teichen ausgetauscht werden können. Des weiteren wird ein thermodynamisches System durch Angabe der voneinander unabhängigen makroskopischen Zustandsgrößen Druck p, Temperatur T, Volumen V charakterisiert. Um eine Beschreibung der mikroskopischen Zustände eines Systems zu erhalten, greift man auf Wahrscheinlichkeiten zurück. Hierbei wird ein thermodynamisches System als Gesamtheit von sehr vielen Teilchen betrachtet. Den möglichen Zuständen dieser Teilchen wird eine Wahrscheinlichkeit P zugeordnet. Der Logarithmus von P multipliziert mit der Boltzmann-Konstante k wird als Entropie S definiert

$$S = k \ln P \tag{1.2}$$

Eine Zustandsänderung des Systems läßt sich durch die Angabe der Zustandsgrößen des Ausgangs- und Endzustandes beschreiben (im folgenden mit den Indizes ‘Ausg’ und ‘End’ bezeichnet).

Jedes thermodynamische System besitzt eine gewisse innere Energie U. Diese kann nur dadurch geändert werden, daß dem System von außen Energie zugeführt wird, bzw. das System Energie nach außen abgibt. Die zu- oder abgeführte Energie läßt sich aufteilen in Wärme Q und am System geleistete Arbeit W. Für die Änderung der inneren Energie gilt:

$$U_{End} - U_{Ausg} = Q + W \tag{1.3}$$

Dies entspricht der Aussage des ersten Hauptsatzes der Thermodynamik. In den meisten Fällen ist die am System geleistete Arbeit Volumenarbeit; hierfür gilt im Falle einer Kompression:

$$\Delta U = U_{End} - U_{Ausg} = Q - (p_{End}V_{End} - p_{Ausg}V_{Ausg}) \overset{p=konst.}{=} Q - p\Delta V \tag{1.4}$$

Um isobare Prozesse zu beschreiben, ist es günstiger, statt der inneren Energie die Enthalpie H des Systems zu betrachten. Die Enthalpie ist definiert als Summe aus innerer Energie U des Systems und der verrichteten Volumenarbeit

$$H = U + pV \tag{1.5}$$

Damit ergibt sich bei konstantem Druck

$$\Delta H = q = \frac{Q}{n} \tag{1.6}$$

q ist die Wärme normiert auf die Stoffmenge n. Die Enthalpieänderung entspricht der mit der Umgebung ausgetauschten Wärmemenge. Die bei den Experimenten im Kalorimeter gemessene Wärme Q entspricht dem Produkt aus ΔH und Stoffmenge.
In der Mechanik spricht man vom stabilen Gleichgewicht eines Systems, wenn ein Minimum der potentiellen Energie vorliegt. In der Thermodynamik gibt es in Abhängigkeit von den verschiedenen Zustandsgrößen unterschiedliche Formulierungen für die Energie. Daraus ergeben sich verschiedene Funktionen (freie Enthalpie G, freie Energie F), deren Minimum im Einzelfall untersucht werden muß. Hier sollen nur für den Fall des verwendeten Kalorimeters kurz die nötigen Grundlagen erläutert werden.

Das in dieser Arbeit verwendete MCS-Titrationskalorimeter (siehe Kapitel 2.2.1) kann als geschlossenes System betrachtet werden. Die Meßeinheit (Meßzellen und Titrationsspritze) erlaubt keinen Austausch von Materie mit der Umgebung, Energieaustausch hingegen ist möglich. Aufgrund der isotherm-isobaren Betriebsweise des Kalorimeters, ist das Gleichgewicht des Systems bestimmt durch das Minimum der freien Enthalpie G. Die freie Enthalpie ist definiert als Differenz von Enthalpie und dem Produkt aus Temperatur und Entropie:

$$G = H - T \cdot S \tag{1.7}$$

Aus der Differenz der freien Enthalpie von Ausgangs- und Endzustand lassen sich Aussagen über die treibenden Kräfte einer Reaktion treffen. Ist die freie Enthalpie des Ausgangszustandes größer als die des Endzustandes, also

$$\Delta G = \Delta G_{End} - \Delta G_{Ausg} < 0 \tag{1.8}$$

so läuft die Reaktion spontan ab. Man spricht im Falle von negativem ΔG von einer exergonischen Reaktion, für $\Delta G > 0$ von einer endergonischen Reaktion. Hierbei ist zu beachten, daß aus einer Aussage über ΔG keine zwingenden Schlüsse über die Veränderung der Enthalpie oder Entropie einer Reaktion gezogen werden können. Es gilt:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \tag{1.9}$$

Folglich sind Reaktionen denkbar, die spontan ablaufen und nur von einer Änderung der Entropie oder nur durch Wärmeabgabe getrieben sind. Eine Reaktion, bei der Wärme frei wird ($\Delta H < 0$) bezeichnet man als exotherm, einen Vorgang mit $\Delta H > 0$ als endotherm.

Häufig ist es einfacher, statt der energetischen Größen die Gleichgewichtskonstante zu bestimmen. Der Zusammenhang zwischen der Gleichgewichtskonstante K einer Reaktion und der Änderung der freien Enthalpie G unter chemischen Standardbedingungen (T = 298.15 K, p = 1 bar, Konzentrationen aller beteiligten Reaktionspartner 1 M) ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$\Delta G^0 = - RT \ln K \tag{1.10}$$

Hierbei ist R die Gaskonstante. Sind bei einer Reaktion Protonen beteiligt, so werden biochemische Standardbedingungen zugrunde gelegt. Hierbei gelten die obigen Bedingungen für Druck und Temperatur, nur die Konzentration der H^+-Ionen wird zu 10^{-7} M, entsprechend pH 7.0, angenommen. Die Angabe von ΔG für eine Konzentration von 1 M H^+-Ionen wäre wenig sinnvoll, da bei pH 0 die meisten Proteine denaturiert vorliegen.

Im allgemeinen Fall beliebiger Konzentrationen der Reaktionspartner ist ein zusätzlicher Term zu berücksichtigen. Für eine Reaktion

$$aA + bB + \ ... \ \rightarrow \ cC + dD + ... \tag{1.11}$$

ergibt sich für ΔG:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d \ ...}{[A]^a [B]^b \ ...} \tag{1.12}$$

Aus der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichskonstanten läßt sich nach der van´t-Hoff-Gleichung die Standardreaktionsenthalpie berechnen:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \tag{1.13}$$

Hierbei ist allerdings zu beachten, daß die kalorimetrisch gemessenen Werte nicht zwangsläufig mit den errechneten übereinstimmen (Fisher und Singh, 1995). Die Unterschiede liegen darin, daß die kalorimetrische Messung im Gegensatz zur Berechnung die Wärme sämtlicher beteiligten Effekte berücksichtigt (z. B. Reaktionen des Puffers oder Lösungsmittels, unbekannte Reaktionen, die Temperaturabhängigkeit von ΔH). Tatsächlich weichen die berechneten Enthal-

pieänderung in sehr vielen Fällen signifikant von den kalorimetrisch ermittelten Werten ab (Naghibi et al., 1995 [60]; Liu und Sturtevant, 1995 [52]).

2. Material und Methoden

2.1 Präparationen

Ziel dieses Kapitel ist, die Präparation und Reinigung der untersuchten Proteine zu beschreiben. Eine Aufstellung der verwendeten Chemikalien sowie die Zusammensetzung der Puffer finden sich im Anhang.

2.1.1 Stäbchenaußensegmente

Die Stäbchenaußensegmente (Rod Outer Segments, ROS) werden aus Augen von frisch geschlachteten Rindern präpariert (siehe auch Heck und Hofmann, 1993 [26]). Die Augen werden in einem lichtdichten Behälter gesammelt und unmittelbar unter Rotlicht (Rotfilter RG 650, Schott, Mainz) weiterverarbeitet. Die Rinderaugen werden an der der Netzhaut abgewandten Seite aufgeschnitten. Der Bulbus wird umgestülpt, so daß Linse und Glaskörper herausfallen. Die Retina kann nun vorsichtig zum Sehnerv hin zusammengeschoben und dort abgeschnitten werden. Sämtliche Präparationsschritte erfolgen auf Eis. Die Retinae werden in einer 45%igen Saccharose-Lösung in Puffer P gesammelt (ca. 1 ml Lösung pro Retina). Anschließend werden die Retinae 2 min geschüttelt. Durch das Schütteln wird das Cilium durchbrochen und so Außen- und Innensegment des Stäbchens voneinander getrennt. Nach einem Zentrifugationsschritt (2500×g, 5 min, 4 °C) wird die Suspension durch einen Baumwollfingerling gefiltert. Das Filtrat wird zu gleichen Teilen mit Puffer P aufgefüllt und erneut zentrifugiert (9000×g, 10 min, 4 °C). Das zurückbleibende Pellet wird in ca. 2 ml 45%iger Saccharose-Lösung aufgenommen.
Nun werden die Außensegmente auf einen dreistufigen Saccharosedichtegradienten (1.11 g/cm^3, 1.13 g/cm^3, 1.15 g/cm^3) aufgebracht. Nach der Zentrifugation bei 15000×g (20 min, 4 °C) werden die ROS aus der mittleren Bande abpipettiert, in Puffer P aufgenommen und erneut zentrifugiert (4500×g, 20 min, 4 °C). Das Pellet kann nun weiterverarbeitet oder mit wenig Überstand eingefroren werden. Aus 100 Retinae erhält man ROS mit einem Rhodopsinanteil von ca. 65 mg.
Wenn nicht ausdrücklich erwähnt, gehen die folgenden Präparationen von einer Menge an ROS aus, die ca. 80-100 Retinen entspricht.

2.1.2 Gewaschene Diskmembranen

Die Präparation von gewaschenen Diskmembranen (Washed Membranes, WM) erfolgt aus Stäbchenaußensegmenten. Die ROS werden 2 min auf einem Vibrationsschüttler bei höchster Stufe geschüttelt und bei 35000×g (20 min, 4 °C) zentrifugiert. Das Pellet wird in Extrakti-

onspuffer resuspendiert und bei 59000×g zentrifugiert (20 min, 4 °C). Dieser Waschschritt wird weitere zwei Mal durchgeführt. Das zurückbleibende Pellet wird in dem gewünschten Meßpuffer (ca. 10 ml) aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung von Rhodopsin in den gewaschenen Membranen erfolgt mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie. Im ungebleichten Grundzustand liegt das Absorptionsmaximum von Rhodopsin bei 500 nm. Durch Belichtung in Gegenwart von Hydroxylamin entsteht Opsin und all-trans-Retinaloxim, welches die stärkste Absorption bei 360 nm zeigt. Aus der Absorptionsdifferenz zwischen unbelichteter und durchgebleichter Probe läßt sich bei bekanntem Extinktionskoeffizient $\varepsilon(\lambda)$ (für Rhodopsin ε(500 nm) = 40600 $mol^{-1}cm^{-1}$) die Konzentration von Rhodopsin in der Probe berechnen. Aus einem Rhodopsinanteil von 65 mg in ROS erhält man ca. 45 mg WM.

2.1.3 Opsin

Opsin erhält man nach Belichtung aus Stäbchenaußensegmenten. Die ROS werden in Puffer A aufgenommen und unter Rühren 10 min bei Orangelicht belichtet (Filter OG 550, Schott, Mainz). Anschließend wird bei 35000×g für 20 min zentrifugiert. Zur Reinigung von Opsin wird das entstandene Pellet in Urea-Puffer resuspendiert, homogenisiert und mit der gleichen Menge Puffer B aufgefüllt. Nach der Zentrifugation (20 min, 35000×g) erfolgen mehrere Waschschritte. Zunächst wird 4 Mal in Puffer B gewaschen, anschließend erfolgen 4 Waschschritte mit Puffer C, 1 weiterer Waschschritt mit Puffer D und ein letzter mit Puffer E (zentrifugiert wird jeweils 20 min bei 35000×g und 4 °C). Zum Schluß wird die Probe in Puffer E resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung des Opsins erfolgt spektroskopisch über die Messung des Absorptionsmaximums bei 280 nm (ε(280 nm) = 81200 $mol^{-1}cm^{-1}$).

2.1.4 Phosphoryliertes Rhodopsin

Ausgehend von einer Präparation von Stäbchenaußensegmenten wird die phosphorylierte Form von Rhodopsin hergestellt. Die ROS werden dazu in einer Lösung aus 10 mM BTP (pH 7.5), 3 mM ATP, 1 mM Benzamidin, 5 mM $MgCl_2$ und 100 mM NaCl resuspendiert. Das Volumen ist so zu wählen, daß die Endkonzentration der ROS 1 mg/ml beträgt. Dann erfolgt die Belichtung der Probe bei 35 °C (im Wasserbad) mit einer 150-Watt-Lampe (45 min). Um aus dem so erhaltenen phosphorylierten Opsin wieder Rhodopsin herzustellen wird im Dunkeln mit 11-cis-Retinal regeneriert. Hierbei ist ein Konzentrationsverhältnis von eingesetzten ROS zu 11-cis-Retinal von 1:3 zu wählen. Die Probe wird für eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 35000×g (30 min, 4 °C) und anschließend zwei Waschschritte in 10 mM BTP und 100 mM NaCl bei 35000×g (jeweils 20 min bei 4 °C). Das zurückbleibende Pellet wird im gewünschten Meßpuffer resuspendiert.

2.1.5 Transducin

Das Prinzip der Präparation von Transducin beruht darauf, daß periphere Membranproteine bei Belichtung und unterschiedlicher Ionenstärke verschieden stark an die Diskmembran binden. Die hier beschriebene Reinigung erfolgt im wesentlichen nach dem von Fung (1983) [21] beschriebenen Verfahren.

Die ROS werden in wenigen ml Puffer I aufgenommen, homogenisiert und zweimal gewaschen (20 min, 35000×g, 4 °C). Das Pellet wird dann in Puffer II aufgenommen und 10 min unter Verwendung eines Orangefilters (OG 550, Schott, Mainz) auf Eis belichtet. Die Belichtung der Suspension bewirkt, daß Transducin an Rhodopsin bindet. Anschließend wird bei 68000×g für 30 min zentrifugiert. In einem weiteren Waschschritt mit Puffer II (68000×g, 30 min, 4 °C) können alle anderen peripheren Membranproteine entfernt werden; das zurückbleibende Pellet enthält das Transducin. Dieses wird in einer 200 µM Lösung von GTP in Puffer II resuspendiert und 10 min inkubiert. Dadurch wird die Bindung von Transducin und Rhodopsin gelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 68000×g (30 min, 4 °C) ist das G-Protein im Überstand isoliert. Der letzte Schritt wird noch einmal wiederholt. Die Überstände der beiden Schritte werden zusammen ein weiteres Mal zentrifugiert (150000×g, 30 min, 4 °C) um Membranreste vollständig zu entfernen. In einer Filtrationszelle (Amicon, Membranfilter YM 10) wird die Lösung, die das Transducin enthält auf ca. 3 ml eingeengt und anschließend über Nacht gegen den gewünschten Meßpuffer dialysiert. Durch die Dialyse ist gewährleistet, daß keine Pufferunterschiede zwischen Probe und Arbeitspuffer bestehen. Dies ist eine notwendige Voraussetzung für die Titrationskalorimetrie.

Die Konzentrationsbestimmung des Transducins wird mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Bei Bindung von GTP erfährt die G_α-Untereinheit eine Konformationsänderung, die eine Steigerung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des Transducins zur Folge hat (Faurobert et al. 1993 [18]). Die Fluoreszenzänderung ist allein bedingt durch die Änderung der Struktur des G_α, unabhängig von $G_{\beta\gamma}$, oder der Bindung an Rezeptor oder Effektor (Faurobert et al. 1993). Die α-Untereinheit des Transducins hat 2 Tryptophane, W127 und W207, wovon W207 für die Änderung verantwortlich ist (Faurobert et al. 1993 [18]).

Zur Bestimmung der Konzentration wird Transducin durch schrittweise Zugabe von GTPγS, dem nichthydrolysierbaren Analogon von GTP aktiviert. Dies führt zu einer stufenweisen Erhöhung der Intensität des Fluoreszenzlichts. Ist die Sättigung des Fluoreszenzsignals erreicht, so läßt sich aus der zugegebenen Konzentration an GTPγS, die gesuchte Transducin-Konzentration berechnen. Bei Einsatz von 65 mg Rhodopsin in ROS erhält man typischerweise ca. 3.5 mg Transducin.

2.1.6 Untereinheiten des Transducins

Um Transducin in seine Untereinheiten G_α und $G_{\beta\gamma}$ zu trennen werden statt der oben beschriebenen Dialyse zum Abschluß der G_t-Präparation zwei Waschschritte mit BTP-Puffer (20 mM BTP, pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$ und 2 mM; 35000×g, 20 min, 4 °C) durchgeführt. Danach wird das G-Protein auf eine HiTrap Blue-Sepharose Säule (Pharmacia) aufgetragen. Die Elution der $G_{\beta\gamma}$-Untereinheit erfolgt mit einem linearen Gradienten von 0-300 mM NaCl wogegen zur Elution von G_α eine Salzkonzentration von 1 mM NaCl verwendet wird (Wesseling-Resnick und Johnson, 1987 [79]). Anschließend werden die Proteinlösungen über Nacht gegen den gewünschten Arbeitspuffer dialysiert und in einem Centricon-Mikrokonzentrator eingeengt.

2.1.7 Arrestin

Arrestin wird nach einem von Palczewski et al. (1991) [63] entwickelten Verfahren präpariert. Die Reinigung erfolgt durch Affinitätssäulenchromatographie und nutzt dabei die Bindung von Arrestin an D-myo-Inositol Hexakisphosphat (InP_6) und Heparin.
Zunächst werden bei schwachem Rotlicht (Rotfilter RG 650, Schott) 50 Retinae in 50 ml Puffer F homogenisiert. Durch Zentrifugation bei 43500×g (25 min, 4 °C) können die löslichen Proteine von der Membran getrennt werden. Der so erhaltene Überstand wird auf eine DEAE-Zellulose-Säule (Whatmann DE52) aufgebracht. Nachdem die Haupthämoglobinbande mit 10 mM HEPES (pH 7.5) und 15 mM NaCl von der Säule eluiert wurde, erhält man Arrestin durch Elution mit einem Salzgradienten (0-150 mM NaCl). Die anschließende Reinigung von Arrestin erfolgt ebenfalls durch Affinitätschromatograpie. Zunächst wird Arrestin an eine Heparin-Sepharose-Säule (Pharmacia) gebunden, dann wird mit 10 mM HEPES (pH 7.5) und 150 mM NaCl gewaschen und schließlich mit InP_6 (0-8 mM InP_6-Gradient in 10 mM HEPES, pH 7.5, und 150 mM NaCl) das Protein wieder von der Säule eluiert. Um noch enthaltene Verunreinigungen zu entfernen wird das Arrestin über Nacht gegen 10 mM HEPES (pH 7.5) und 100 mM NaCl dialysiert und anschließend erneut über eine Heparin-Sepharose-Säule gereinigt.

2.1.8 Phosphodiesterase

Die Präparation der cGMP-Phosphodiesterase geschieht nach einem von Baehr et al. (1979) [3] angegebenen Verfahren. Die ersten Schritte sind identisch mit den bei der Transducin-Reinigung beschriebenen. Jedoch wird nach der Belichtung der ROS nicht das Pellet des anschließenden Zentrifugationsvorgangs weiterverwendet, sondern der Überstand, der die anderen peripheren Membranproteine enthält. Durch Zentrifugation (58000×g, 30 min, 4 °C) werden übrige Membranreste entfernt. In einer Ultrafiltrationszelle (Amicon, Membranfilter YM-30) wird der Überstand mit Puffer G gewaschen und eingeengt. Die Probe wird auf eine DEAE-Zellulose-Säule aufgetragen. Mit Puffer G werden die nicht gebundenen Proteine eluiert. Anschließend erhält man durch Elution mit einem linearen Salzgradienten (100 - 600 mM NaCl in Puffer G) die

PDE. Die PDE enthaltenden Fraktionen werden eingeengt, über Nacht gegen Puffer H dialysiert und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die anschließende Elution der gereinigten PDE erfolgt mit Puffer H.

2.2 Methoden

Das Ziel der Arbeit ist die Messung der Wärme der Teilschritte des G-Protein-Zyklus. Neben den Untersuchungen zur Enthalpieänderung der Reaktionen, die den Hauptteil der aufgenommenen Daten ausmachen, wurden auch einige Experimente in der Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Sie dienten als Kontroll- oder Vergleichsexperimente insbesondere im Hinblick auf die Kinetik der Reaktionen, die im Titrationkalorimeter nicht aufgelöst werden kann. Des weiteren wurde die Konzentration des Transducins mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Das verwendete Titrationskalorimeter bzw. Fluoreszenzspektrometer wird im folgenden beschrieben.

2.2.1 Das Titrationskalorimeter

Zur Messung der Enthalpieänderung einer Reaktion, wurde das Titrationskalorimeter MCS-ITC (Micro Calorimetry Systems, Isothermal Titration Calorimeter) der Firma MicroCal Inc. (Northampton, MA, USA) verwendet. Es handelt sich um ein Gerät, das in isothermer Betriebsart die Wärme durch elektrische Kompensation mißt. Hierzu wird die Temperaturdifferenz (ΔT) zwischen der Probenzelle und einer Referenzzelle (gefüllt mit Wasser oder Puffer) ständig gemessen. Die Genauigkeit der Temperaturmessung liegt im Bereich von 10^{-4} K. Um nach einer Reaktion das thermische Gleichgewicht zwischen den beiden Zellen wieder herzustellen, wird der Probenzelle ein zu ΔT proportionaler Regelstrom zugeführt. Die Regelleistung (der sogenannte Cell Feedback Current, CFB) wird zeitabhängig gemessen. Die Meßkurve, die sich hieraus für die Wärmeänderung der Reaktion ergibt, wird im folgenden als Signal oder Wärmesignal bezeichnet. Befindet sich das Gerät im thermischen Gleichgewicht, so ist der CFB konstant. Dies ergibt das Ausgangsniveau, die Basislinie, einer Messung. Durch Zutitrieren eines Reaktionspartners wird das thermische Gleichgewicht des Systems gestört. Der zuzuführende Regelstrom ist abhängig von der Art der ausgelösten Reaktion. Eine exotherme Reaktion, bei der Wärme frei wird, hat eine Verringerung des Regelstroms zur Folge (Wärmesignal ‘nach unten’), während bei einer endothermen Reaktion Wärme zugeführt werden muß und der kompensierende Strom erhöht wird (Signal nach ‘oben’). Um die Kompensation von sowohl exo- als auch endothermen Reaktionen zu ermöglichen, wird der Referenzzelle permanent ein konstanter Strom zugeführt.

Die Kalorimetereinheit setzt sich zusammen aus Referenz- und Probenzelle sowie der Titrationsspritze (siehe Abb. 4). Die beiden identischen scheibenförmigen Zellen bestehen aus einer

Nickel-Molybdän-Chrom-Legierung (hastelloy alloy C-276) mit sehr guter Wärmeleitfähigkeit und haben ein Volumen von je 1.34 ml. An der Außenseite der Zellen sind Wärmesensoren angebracht. Die Zellen befinden sich in einer isothermen Ummantelung, die allseitig von ca. 20 cm Isolationsmaterial umgeben ist. Sie sind zugänglich über lange dünne Röhren und zur Optimierung der Wärmeübertragung nicht herausnehmbar. Die Temperatur der Ummantelung ist regelbar und erlaubt so verschiedene Arbeitstemperaturen des Kalorimeters.

Die Titrationsvorrichtung besteht aus einer Halterung für die Titrationsspritze und einer Schrittmotorsteuerung, die den Stempel der Spritze entsprechend dem gewünschten Einspritzvolumen hinunterdrückt. Die Spritze hat eine sehr lange Nadel und ist am Ende als 'Paddel' ausgebildet. Durch kontinuierliches Drehen der Spritze während der Messung wird damit eine gleichmäßige Durchmischung der Probe gewährleistet. Die Drehfrequenz ist zwischen 100 rpm und 1500 rpm frei wählbar.

Die elektronische Steuereinheit des Kalorimeters ist an einen PC angeschlossen und wird über eine von der Herstellerfirma mitgelieferte Software (MCS-Observer) angesprochen. Dabei können die Parameter (zugespritztes Volumen, Dauer des Einspritzens und die Zeit zwischen zwei Injektionen) für die einzelnen Injektionen unabhängig voneinander variiert werden.

Das MCS-Titrationskalorimeter ist in der Literatur bei Livingstone (1996) [51] beschrieben. Eine ausführliche Beschreibung des sehr ähnlichen Vorgängermodells einschließlich Handhabung und computergestützter Datenauswertung findet sich bei Wiseman et al. 1989 [81].

Der Vorteil des MCS-ITC Gerätes gegenüber anderen Kalorimetern liegt in seiner hohen Empfindlichkeit (0.5 µcal), die es erlaubt, bisher unzugängliche, sehr kleine Enthalpieänderungen zu messen. Dies geht jedoch zu Lasten der zeitlichen Auflösung einer Reaktion.

Die bisher bekannten Anwendungen dieses Titrationskalorimeters beruhen auf der Interpretation der gemessenen Wärme, in den meisten Fällen handelt es sich dabei um die Reaktionswärme von Bindungsreaktionen. Eine Interpretation des Verlaufs des Wärmesignals, wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wird, ist nicht bekannt. Bei einer Bindungsreaktion wird mit jeder Injektion ein Anteil des vorgelegten Reaktionspartners gebunden, bis sämtliche zur Verfügung stehenden Bindungsstellen besetzt sind und die Reaktion beendet ist. Die Wärmesignale der Injektionen werden integriert und lassen sich als Bindungsisotherme darstellen. Bei der Diskussion der Meßwerte werden die gesuchten Parameter (ΔH, Anzahl der Bindungsstellen pro Molekül und Bindungskonstante) aus dem Verlauf der angepassten Bindungsisotherme errechnet.

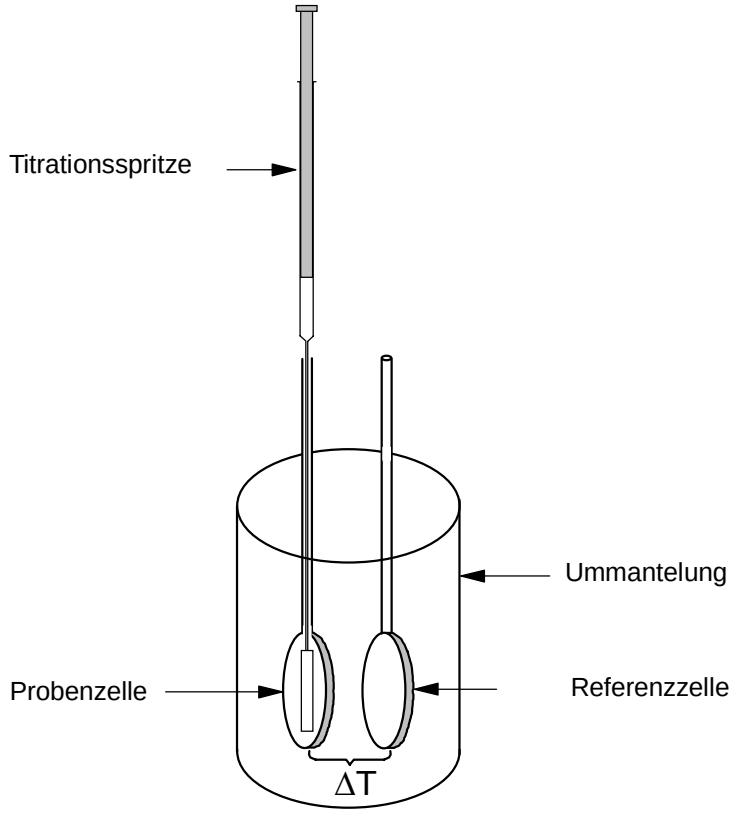


Abbildung 4
Schematische Darstellung der Meßeinheit des Kalorimeters

Die zwei identischen scheibenförmigen Zellen, Referenz- bzw. Probenzelle befinden sich in einer isothermen Ummantelung und sind über lange dünne Röhren zugänglich. Die Temperaturdifferenz ΔT zwischen den beiden Zellen wird ständig kontrolliert. Im Falle einer Reaktion wird die Veränderung der Wärme durch einen zu ΔT proportionalen Regelstrom, welcher der Probenzelle zugeführt wird, ausgeglichen.

Die Messungen der vorliegenden Arbeit unterscheiden sich von den typischen Bindungsmessungen, da hier ein Zyklus von Reaktionen betrachtet wird. Nach Durchlaufen des Zyklus befindet sich das System wieder im Ausgangszustand. Jede weitere Injektion löst erneut den ganzen Zyklus aus. Damit enthält das Wärmesignal jeder einzelnen Injektion die vollständige Information über die Enthalpieänderungen aller Reaktionen des Zyklus. Die Interpretation dieses Signals ist folglich sehr komplex.

2.2.2 Das Fluoreszenzspektrometer

Das Phänomen des Fluoreszenz besteht darin, daß eine Probe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird und bei der Rückkehr der Moleküle in den Grundzustand Licht einer größeren Wellenlänge emittiert wird. Ein Fluoreszenzspektrometer mißt die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes. In der vorliegenden Arbeit wurden Änderungen der intrinsischen Fluoreszenz des Transducins bei Zugabe von Nukleotiden betrachtet.
Bei dem verwendeten Fluoreszenzspektrometer handelt es sich um das Fluorolog II, ein Gerät der Firma SPEX, USA. Den schematischen Aufbau zeigt Abbildung 5.

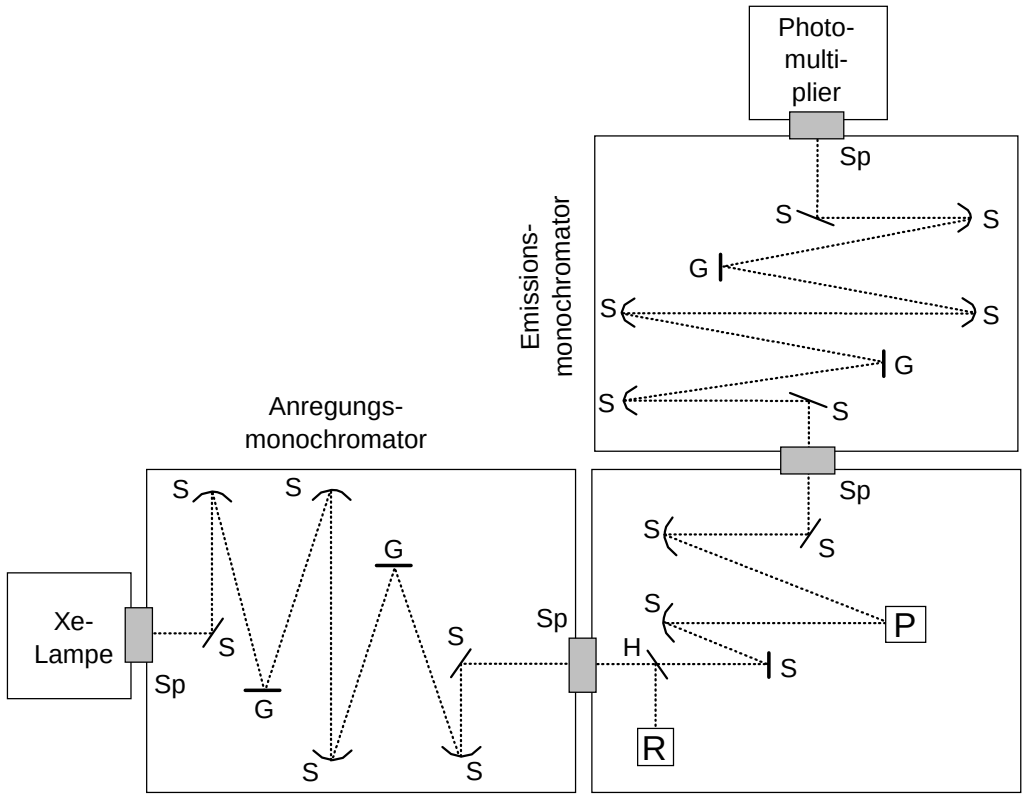


Abbildung 5
S Spiegel, Sp Spalt, G Gitter, R Referenzdetektor, P Probe, H Halbdurchlässiger Spiegel

Skizze des Aufbaus des Fluoreszenzspektrometers

Das Licht einer Xenonhochdrucklampe wird über einen Monochromator, der die Anregungswellenlänge bestimmt auf die Probe geleitet. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird über einen weiteren Monochromator auf einen Photomultiplier geschickt. Die Verwendung eines Referenzdetektors ermöglicht die Korrektur des Fluoreszenzsignals bezüglich Schwankungen der Lampenleistung.

Das Licht einer Xenonhochdrucklampe wird durch einen variablen Spalt auf einen Doppelmonochromator geschickt, der die Wellenlänge der Anregung der Probe bestimmt. Über einen

weiteren Spalt wird das Licht zum einen auf die Probenküvette abgebildet, zum anderen über einen halbdurchlässigen Spiegel auf einen Referenzdetektor geleitet. Durch die Verwendung des Referenzdetektors kann das Meßsignal um Schwankungen der Lampenintensität korrigiert werden. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird im 'Front Face'-Modus (Emissionswinkel 22.5° relativ zum einfallenden Licht), der für optisch dichtere Lösungen empfohlen wird, betrachtet und über einen zweiten Monochromator auf einen peltiergekühlten Photomultipier geleitet. Bei den hier vorgestellten Ergebnissen wurde bei fest vorgegebener Anregungs- und Emissionswellenlänge die zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität betrachtet.

Den Messungen der vorliegenden Arbeit liegt die intrinsische Fluoreszenzänderung der α-Untereinheit des Transducin bei Aktivierung zugrunde (siehe hierzu Higashijima et al., 1987 [30]; Phillips und Cerrione, 1988 [67]; Faurobert et al., 1993 [18]). Eine genauere Erklärung dieses Phänomens wurde bereits in Kapitel 2.1.5 gegeben. Die hier verwendete Einstellung der Wellenlänge des Anregungslichtes betrug 300 nm, das emittierte Fluoreszenzlicht wurde bei einer Monochromatoreinstellung von 340 nm detektiert.

Die Fluoreszenzmessungen wurden parallel zu den Kalorimeterexperimenten jeweils mit identischen Proben unter den gleichen Bedingungen durchgeführt Auf diese Weise ist die Vergleichbarkeit der Meßergebnisse gewährleistet und Fehler durch verschiedene Handhabung und Alterung der Proben können ausgeschlossen werden.

2.3 Konzeption eines Experiments und Probenvorbereitung

Bei der Konzeption eines Experimentes müssen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden. Zunächst müssen die Konzentrationen der beteiligten Reaktionspartner eine Enthalpieänderung hervorrufen, die im Rahmen der Genauigkeit des MCS-ITC detektiert werden kann. Dies ist aufgrund des recht großen Volumens der Meßzelle (1.34 ml, zum sorgfältigen Befüllen der Probenzelle sind jedoch mindestens 2 ml nötig) nicht immer möglich. Oft ist die Konzentration der zur Verfügung stehenden Proben nicht ausreichend um Wärmesignale zu bewirken, die vom Grundrauschen unterscheidbar sind.

Je nach zu messender Reaktion muß die Wahl der Pufferlösung sorgfältig geprüft werden. Reaktionen bei denen eine Aufnahme oder Abgabe von Protonen an die Umgebung stattfindet, können abhängig vom verwendeten Puffer unterschiedliche Protonierungswärmen hervorrufen. Tabelle 4 gibt einen Überblick über einige der häufig benutzten Puffer und die Enthalpieänderung ΔH_p bei der Aufnahme von Protonen. Diese Wärme muß bei der Berechnung der Reaktionswärme aus den gemessenen Daten entsprechend berücksichtigt werden.

Puffer	Enthalpieänderung durch Pufferprotonierung ΔH_p in kcal/Mol	Literaturquelle
Cacodylat	0	Millar et al., 1987 [58]
Imidazol	- 8.75	Millar et al., 1987 [58]
MOPS	- 5.29	Morin & Freire, 1991 [59]
Phosphatpuffer	- 1.22	Morin & Freire, 1991 [59]
Tricin	- 7.76	Morin & Freire, 1991 [59]
Tris	- 11.51	Morin & Freire, 1991 [59]

Tabelle 4

Zusammenstellung der Enthalpieänderung durch Protonierung für verschiedene Puffer

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Titrationskalorimeters (0.5 µcal) ergeben sich einige meßtechnische Probleme. Die Temperatur der zu messenden Probe muß beim Einfüllen in die Probenzelle möglichst nahe bei der eingestellten Arbeitstemperatur des Kalorimeters liegen, um das Temperaturgleichgewicht zwischen den Zellen und der Umgebung nicht zu stören. Besonders die Messung bei niedrigen Temperaturen (4 °C-10 °C) erfordert daher eine sehr sorgfältige Probenvorbereitung. Ferner ist zu berücksichtigen, daß die Probe vollständig luftblasenfrei in die Zelle eingefüllt werden muß. Hierzu wird der Probenpuffer vor Zugabe der Proteine für einige Minuten entgast. Von Einfüllen der Probe bis zum Beginn der ersten Injektion vergehen ca. 15 Minuten. Dies ist die Zeit, die das Gerät benötigt, um nach Einfüllen der Probe sein thermisches Gleichgewicht zu erreichen. In einem ersten Equilibrierungsschritt wird zunächst die Regelleistung ohne Rühren bestimmt. Im nächsten Schritt wird das Gleichgewicht bei rotierender Titrationsspritze eingestellt. Dies gewährleistet, daß die durch Rühren entstehende Wärme bei der Messung nicht berücksichtigt wird.

Für die Messungen an der visuellen Kaskade wurden zwei Puffersysteme mit unterschiedlichen Protonierungswärmen verwendet. (Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist im Anhang beschrieben.) Es handelt sich dabei zum einen um einen BTP-Puffer, zum anderen um einen Phosphatpuffer. Die Zusammensetzung der Puffer wurde so gewählt, daß pH-Wert und Ionenstärke gleich sind. Die jeweils gemessenen Protonierungswärmen werden in Kapitel 2.4 besprochen.

Für eine Messung in BTP-Puffer wurden sämtliche benötigten Präparationen und Lösungen in diesem Puffer bereitgestellt. Unterschiedliche Puffer in Titrationsspritze und Probenzelle sind für die kalorimetrischen Messungen nicht zulässig, da die Daten durch die Mischungswärme sehr stark verfälscht würden.

Bei der Mehrzahl der Experimente wurde in der Meßzelle des Kalorimeters der R*G-Komplex vorgegeben und der Ablauf des Zyklus durch Zugabe von GTP gestartet. Hierzu wurden gewaschene Diskmembranen nach dem Auftauen mit Ultraschall behandelt, um sicherzustellen, daß

sich nur kleine Membranteile in der Suspension befinden. Transducin wurde nach dem Auftauen kurz abzentrifugiert (15000×g, 5 min). Anschließend wurde die Konzentration an aktivierbarem G_t durch Fluoreszenzspektroskopie bestimmt.
Sämtliche Vorbereitungen der Proben erfolgte auf Eis. Die gewaschenen Membranen wurden stets bei Dunkelheit in Anwesenheit von G_t zur Probe gegeben, weil belichtetes Rhodopsin nur im Beisein von Transducin durch Bildung des R*G-Komplexes stabil ist. Danach wurde für 5 min bei Tageslicht belichtet, bevor die Probe in die Meßzelle des Kalorimeters eingefüllt wurde.

2.4 Vorversuche

Im Vorfeld der Experimente an der visuellen Kaskade wurden einige Versuchsreihen durchgeführt, die dazu dienten, die optimalen Meßbedingungen für die Arbeit mit dem MCS-Titrationskalorimeter zu finden. Dabei ist zu beachten, daß sowohl die Arbeitstemperatur des Kalorimeters, als auch injiziertes Volumen und Einspritzdauer einen Einfluß auf die Messung haben. Dies wirkt sich in der Mischungswärme aus, die frei wird, wenn eine Injektion erfolgt ist.

Einfluß der Temperatur
Wählt man die Arbeitstemperatur des Kalorimeters unterhalb der Raumtemperatur, so nimmt das Rauschen der Messung zu. Es ist jedoch notwendig, bei der Untersuchung der visuellen Kaskade niedrige Temperaturen zu wählen, um eine längere Lebensdauer der Proteine zu gewährleisten. Die nachfolgenden Experimente wurden bei 10 °C durchgeführt, sofern keine andere Temperatur angegeben ist.

Einfluß von injiziertem Volumen und Einspritzdauer
Die Mischungswärme nimmt mit dem Injektionsvolumen zu. Es ist daher erstrebenswert, die Konzentration des zutitrierten Reaktionspartners so zu wählen, daß ein möglichst kleines Volumen eine ausreichende Reaktionswärme hervorruft. In der Mehrzahl der Messungen wurden Injektionen von je 5 µl gewählt, die über eine Dauer von 10 s zugespritzt wurden. Man beobachtet, daß bei kürzeren Einspritzzeiten die freiwerdende Wärme deutlich größer ist, wohingegen längere Zeiten sich nicht merklich auswirken.

Einfluß der Konzentration
Bei Konzentrationsunterschieden zwischen Probe in der Meßzelle und Inhalt der Titrationsspritze addiert sich zur Mischungswärme die Verdünnungswärme. Abbildung 6 zeigt Experimente, bei denen verschiedene Konzentrationen von GTP zu Puffer titriert wurden. Die Zeitpunkte des Einspritzens sind jeweils durch Pfeile markiert. Bei GTP-Konzentrationen zwischen 3 mM und 1.5 mM überwiegt die endotherme Verdünnung die exotherme Mischung. Liegt die Konzentrationder GTP-Lösung bei 1 mM, so heben sich die beiden Wärmen annähernd auf.

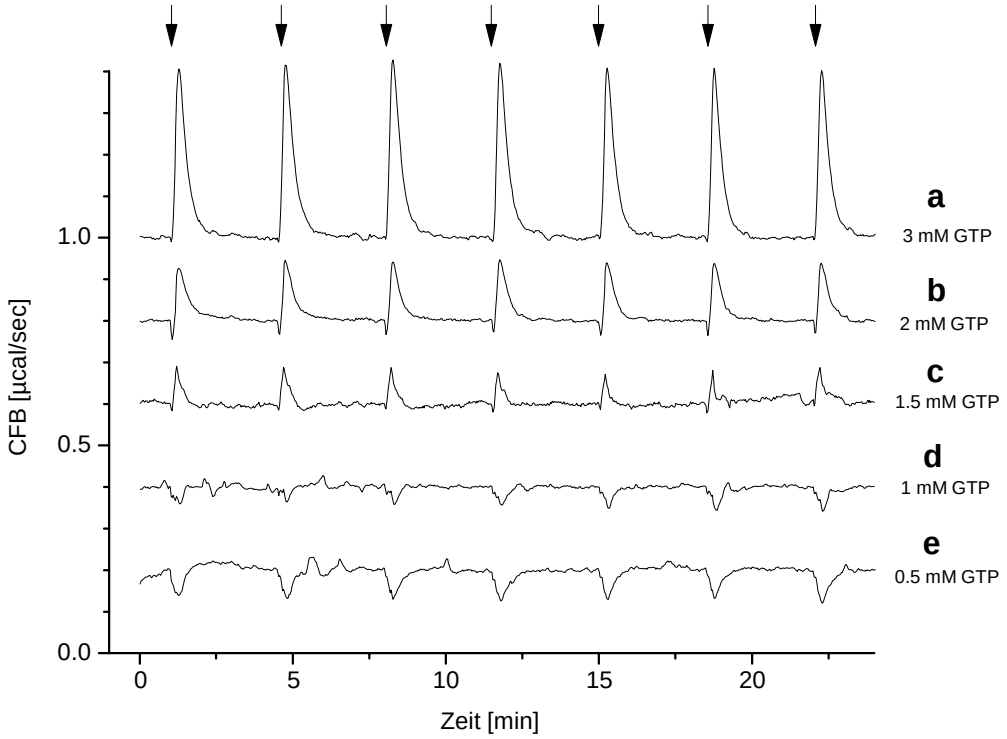


Abbildung 6
Konzentrationsabhängigkeit des Verdünnungsartefaktes

Injektionen von je 5 µl GTP-Lösung in BTP-Puffer wurden zu BTP-Puffer gegeben: Ausgangskonzentration der GTP-Lösung: 3 mM (a), 2 mM (b), 1.5 mM (c), 1 mM (d) und 0.5 mM (e). Für die folgenden Experimente wurde eine Ausgangskonzentration von 1 mM für die GTP-Lösung gewählt.

Bei niedrigeren Konzentrationen der GTP-Lösung fällt die Verdünnung nicht mehr ins Gewicht und es bleibt nur noch die Mischungswärme als Artefakt zu berücksichtigen. In den folgenden Experimenten wurde mit GTP-Lösungen von 0.8 mM und 1 mM gearbeitet. Bei einem Injektionsvolumen von 5 µl entspricht dies einer Konzentrationsänderung von 3 µM bzw. 3.5 µM in der Meßzelle. Die Fläche des Peaks, der durch die Verdünnung entsteht, kann durch eine Wärme von maximal 2 µcal abgeschätzt werden.

Um die Protonierungswärmen von BTP- und Phosphatpuffer zu messen wurde eine 1mM HCl-Lösung zu jedem der Puffer titriert. Die Bedingungen entsprachen denen, die im weiteren auch für die Experimente an der Kaskade gewählt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

Das obere Bild zeigt die Titration von Salzsäure zu Phosphatpuffer (a) im Vergleich zur Zugabe von HCl zu BTP-Puffer (b). Die Aufnahme von Protonen ruft in BTP-Puffer eine größere Wärme hervor, als in Phosphatpuffer. Integriert man das Wärmesignal einer Injektion über die Zeit, so

erhält man die Wärmeänderung, die von dieser Injektion hervorgerufen wurde (siehe hierzu Inset in Abb. 7). Damit entspricht die Fläche unter dem Signal der der zu- oder abgeführten Wärme.

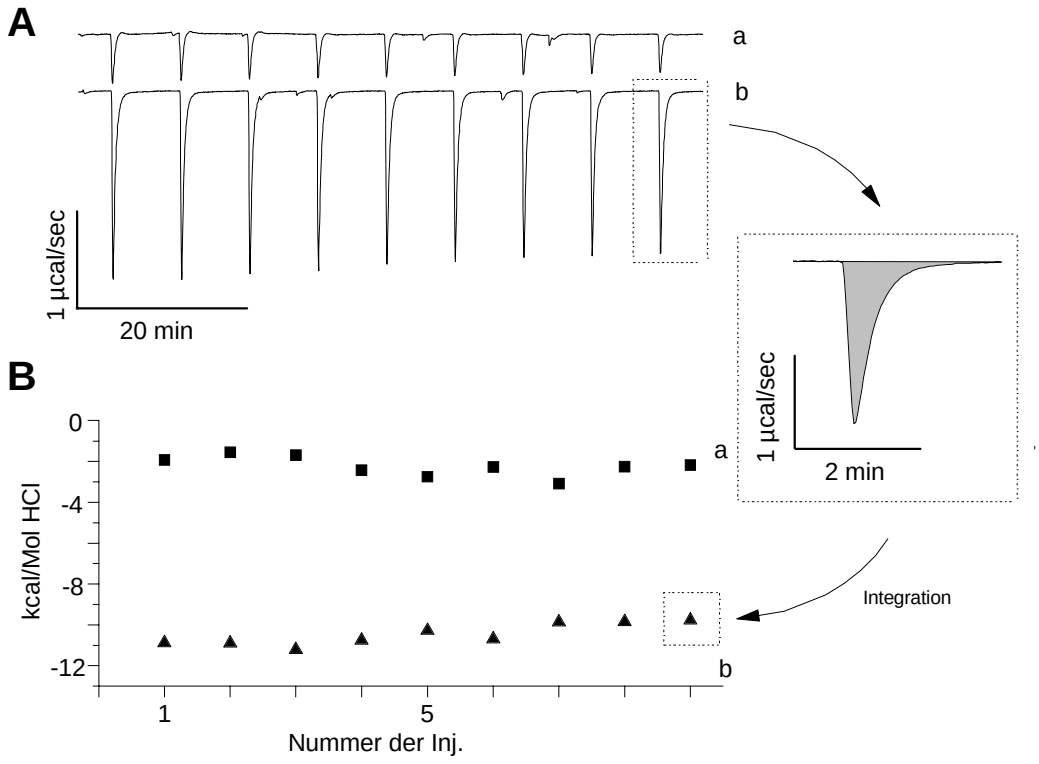


Abbildung 7
Darstellung der Protonierungswärme in Abhängigkeit vom Puffer bei 10 °C

A Titration von 5 µl einer 1 mM HCl-Lösung zu Phosphatpuffer (a) und zu BTP-Puffer (b)

B Gemessene Wärme pro Mol HCl aufgetragen gegen die Nummer der Injektionen für Phosphatpuffer (a) und BTP-Puffer (b)
Durch Integration des Wärmesignals über die Dauer der Reaktion, die durch eine Injektion ausgelöst wird, erhält man die Wärmeänderung, die durch diese Injektion bewirkt wurde. Sie entspricht der Fläche unter dem Signal (in der Vergrößerung schraffiert dargestellt).

Unter Berücksichtigung des Volumens V der Meßzelle und der Konzentrationsänderung Δc des injizierten Reaktionspartners in der Probenzelle, läßt sich die Enthalpieänderung ΔH pro Mol der zugespritzten Substanz berechnen:

$$\Delta H = \frac{Q}{V \cdot \Delta c} \tag{2.1}$$

Die so errechneten Werte sind in Abbildung 7 im unteren Bild dargestellt. Gemittelt über 5 Messungen zu je 10 Injektionen wurden folgende Enthalpieänderungen für die Protonierung der Puffer berechnet:

BTP-Puffer ΔH_p = -10.8 ± 0.5 kcal/Mol Protonen

Phosphat-Puffer ΔH_p = -2.1 ± 0.5 kcal/Mol Protonen

Diese Enthalpieänderung ist bei Reaktionen, an denen Protonen beteiligt sind entsprechend zu addieren oder zu subtrahieren.

3. Der gesamte G-Protein-Zyklus

In diesem Kapitel werden die Meßergebnisse von Titrationskalorimetrie und Fluoreszenzspektroskopie dargestellt, die bei vollständigem Durchlaufen des G-Protein-Zyklus aufgenommen wurden. Eine Unterteilung des G-Protein-Zyklus in Teilschritte und die genauere Betrachtung der einzelnen Reaktionen wird in Kapitel 4 vorgenommen.
Zur Untersuchung des gesamten Zyklus wurde eine Probe aus Rhodopsin in gewaschenen Membranen und Transducin vorgegeben. Durch Belichtung dieser Probe vor dem Einfüllen in die Kalorimeterzelle bildet sich der stabile R*G-Komplex. Bei Zugabe von GTP zum Komplex wird die α-Untereinheit des Transducins aktiviert, was zur Dissoziation der Komplexbildung und zur Trennung von G_α- und $G_{\beta\gamma}$-Untereinheit führt. Im weiteren Verlauf hydrolysiert das GTP in der Nukleotidbindungstasche des G-Proteins zu GDP und deaktiviert so G_α. Die G_α–und die $G_{\beta\gamma}$–Untereinheit reassoziieren anschließend wieder zum Holoprotein G_t, das erneut an das lichtaktivierte Rhodopsin bindet. Hiermit ist das System in den Ausgangszustand zurückgekehrt. Mit jeder neuen Injektion von GTP kann wieder der ganze Zyklus ausgelöst werden. Die Bindung von GTP an Transducin erfolgt stöchiometrisch im Verhältnis 1:1. Ist die zugegebene Konzentration an GTP höher als die vorgegebene Transducinkonzentration, so wird der Zyklus solange durchlaufen, bis das vorhandene GTP vollständig zu GDP hydrolysiert ist.

3.1 Titration von GTP zum R*G-Komplex

Zur Untersuchung des gesamten G-Protein-Zyklus wird in der Probenzelle des Kalorimeters Rhodopsin und Transducin vorgegeben und GTP dazutitriert. Abbildung 8 zeigt eine typische Messung des G-Protein-Zyklus (Spur d) und die zugehörigen Kontrollexperimente (Spuren a - c). Pro Injektion werden jeweils 5 µl einer 0.8 mM GTP-Lösung in BTP-Puffer (pH 7.5) zugespritzt. Dies entspricht einer Konzentration von 3 µM GTP in der Zelle. Spur a zeigt, daß bei Zugabe von GTP zu BTP-Puffer nur eine geringe Wärme frei wird, die auf Verdünnung und Mischung zurückzuführen ist. Ebensowenig ist bei Injektion von GTP zu 1 µM Transducin (Spur b) oder zu 1 µM aktiviertem Rhodopsin (Spur c) eine Reaktion zu sehen. Erst bei Vorgabe beider Proteine wird die Gesamtwärme des Zyklus frei (Spur d). In dieser Messung wurde ein Verhältnis von Rhodopsin zu G_t von 1:1 gewählt. Die zutitrierte Menge von GTP entspricht dem 3-fachen der Transducinkonzentration, so daß der Zyklus mehrfach durchlaufen werden muß, um das zugegebene GTP vollständig zu hydrolysieren. Das System befindet sich nach dem Verbrauch des zutitrierten GTP, d.h. nach der Hydrolyse wieder im Ausgangszustand. Eine weitere Injektion löst den gleichen Vorgang neu aus. Es ist folglich zu erwarten, daß die freigewordene

Wärme, repräsentiert durch die Fläche unter dem Wärmesignal (schraffiert gezeichnet), für alle Injektionen gleich bleibt. Dies wird durch die Messung bestätigt.

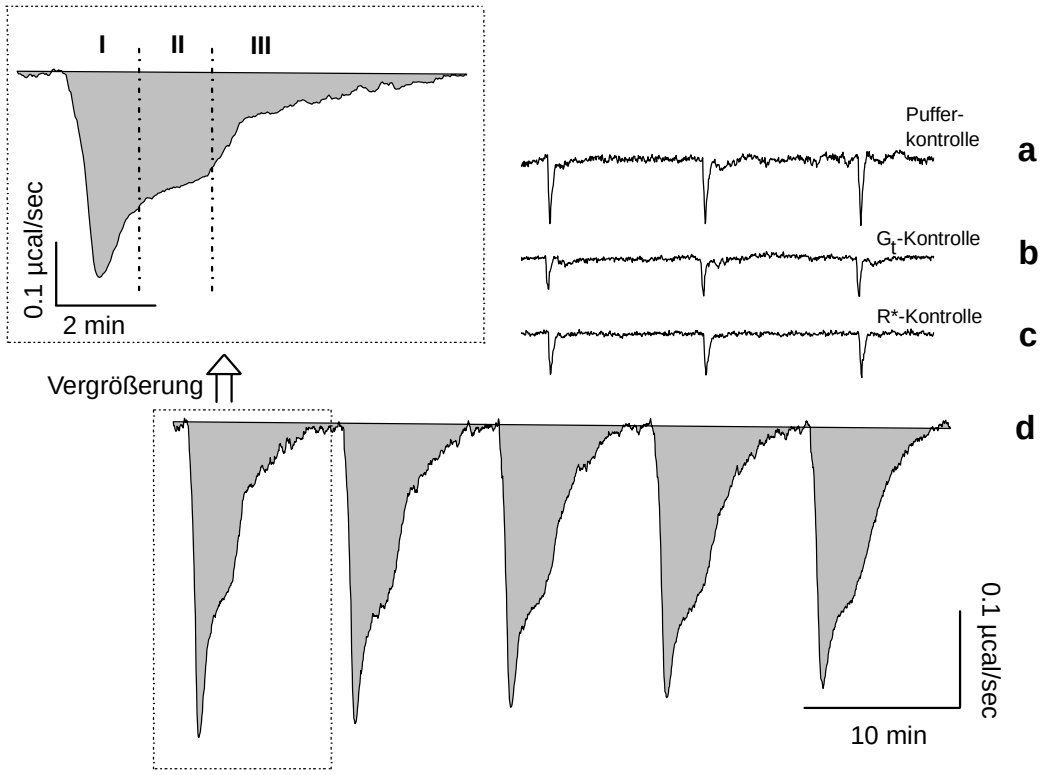


Abbildung 8
Darstellung einer Messung des G-Protein-Zyklus und der zugehörigen Kontrollen

Pro Injektion wurden jeweils 5 µl einer 0.8 mM GTP-Lösung (angesetzt in BTP-Puffer, pH 7.5) zugespritzt, entsprechend einer Konzentration von 3 µM GTP in der Meßzelle.
Die Spuren a - c zeigen Kontrollexperimente:

a. Titration von GTP zu BTP-Puffer zeigt keine Reaktion. Man beobachtet eine sehr geringe Wärme, hervorgerufen durch Mischung und Verdünnung der Reaktanden.
b. Zugabe von GTP zu 1 µM Transducin zeigt keine Reaktion
c. Gibt man GTP zu belichtetem Rhodopsin (1 µM) in Abwesenheit von Transducin, ist ebenfalls keine Reaktion zu erkennen.

*Spur d zeigt die Titration von GTP zum R*G-Komplex (1µM R* und 1 µM G_t). Der Verlauf der Wärmeabgabe ist sehr komplex und nicht durch eine einzige Reaktion zu beschreiben. Wie in der Vergrößerung der ersten Injektion von Spur d zu erkennen ist, lassen sich verschiedene Phasen der Reaktion unterscheiden. Sie sind durch gestrichelte Linien markiert und mit I, II und III bezeichnet.*
Die Messungen wurden bei 10 °C durchgeführt.

Der zeitliche Verlauf der freiwerdenden Wärme bei Zugabe von GTP zum R*G-Komplex läßt mehrere Phasen erkennen. Dies zeigt eine Vergrößerung der ersten Injektion der Meßkurve (d). Durch die gestrichelten Linien ist die Fläche in drei Bereiche unterteilt. Phase I zeigt eine schnelle Reaktion, die sich in einem exothermen Peak widerspiegelt. Ihr folgt eine Phase (II) mit geringerer, nahezu konstanter Wärmeproduktion, die sich durch ein Plateau beschreiben läßt.

Die mit III bezeichnete Phase zeigt das Ende der Reaktion, repräsentiert durch die Rückkehr des Wärmesignals zum Ausgangsniveau. Eine Zuordnung der einzelnen Phasen zu bestimmten Teilreaktionen des G-Protein-Zyklus wird in Kapitel 4 vorgenommen.

3.2 Enthalpieänderung des G-Protein-Zyklus

Nach Messungen von Schleicher und Hofmann (1985) [70] wird bei der GTP-induzierten Dissoziation des R*G-Komplexes ein Proton frei. Ein weiteres Proton wird im nächsten Schritt des Zyklus, der Hydrolyse von GTP zu GDP abgegeben. Bei der Bildung des R*G-Komplexes hingegen wird ein H^+ aus der wäßrigen Lösung aufgenommen (Schleicher und Hofmann, 1985) [70]. In der Bilanz wird beim Durchlaufen des ganzen Zyklus ein Proton abgegeben. Da die Protonierung des Puffer sich auf die gemessene Wärme auswirkt (siehe Kapitel 2.4), muß in einem Experiment, bei dem der ganze G-Protein-Zyklus durchlaufen wird, die Bilanz der Protonen berücksichtigt werden.

Mißt man den G-Protein-Zyklus in Phosphat- und BTP-Puffer, so werden sich die ermittelten Enthalpieänderungen um einen Betrag unterscheiden, welcher der Differenz der Protonierungswärmen der Puffer entspricht. Abbildung 9 A zeigt die Messung des G-Protein-Zyklus in Phosphatpuffer (a) und in BTP-Puffer (b). Pro Injektion wurde GTP entsprechend einer Endkonzentration von 3 µM zum R*G-Komplex titriert. Die Transducinkonzentration betrug 1 µM, Rhodopsin lag im Überschuß vor (10 µM). In Abbildung 9 A sind nur die ersten drei von insgesamt 10 Injektionen abgebildet. Die Messung in Phosphatpuffer weist eine geringere Wärmeabgabe pro Zeiteinheit auf, als das gleiche Experiment durchgeführt in BTP-Puffer. Bezüglich des zeitlichen Verlaufs der freiwerdenden Wärme, zeigen die Messungen in der ersten Phase des Signals eine sehr gute Übereinstimmung. In beiden Fällen ist eine schnelle exotherme Reaktion zu erkennen, deren Dauer nicht von der Verwendung verschiedener Puffer beeinflußt wird. Die zweite Phase der Wärmeabgabe zeichnet sich bei dem Experiment in Phosphatpuffer sehr viel deutlicher ab, als bei der Messung in BTP-Puffer. Während die Regelleistung in Kurve (a) annähernd konstant ist, beobachtet man bei Spur (b) eine sehr kurze Phase von linearer Verringerung der Wärmeabgabe bevor die dritte Phase einsetzt. In BTP-Puffer ist die dritte Phase gekennzeichnet durch einen geringen endothermen Anteil, der in Phosphatpuffer nicht erkennbar ist. Die Gesamtdauer der Reaktion ist in beiden Messungen gleich.

In Abbildung 9 B ist die Enthalpieänderung, die durch die einzelnen Injektionen hervorgerufen wird (die normierte Fläche unter der Meßkurve) für die gesamte in Abbildung 9 A dargestellte Messung in kcal pro Mol GTP angegeben. Die durch Rechtecke markierten Werte entsprechen den Injektionen in Phosphatpuffer, während die Dreiecke die Titration in BTP-Puffer wiedergeben. Aus dem Schaubild geht hervor, daß die Flächen der einzelnen Injektionen für die jeweiligen Puffer konstant sind. Dies ist in Übereinstimmung damit, daß mit jeder Injektion der Zyklus

neu ausgelöst wird. In Phosphatpuffer liegen die gemessenen Werte für die beobachtete Enthalpieänderung bei - 6.9 ± 0.4 kcal/Mol, in BTP-Puffer bei - 15.2 ± 0.7 kcal/Mol.

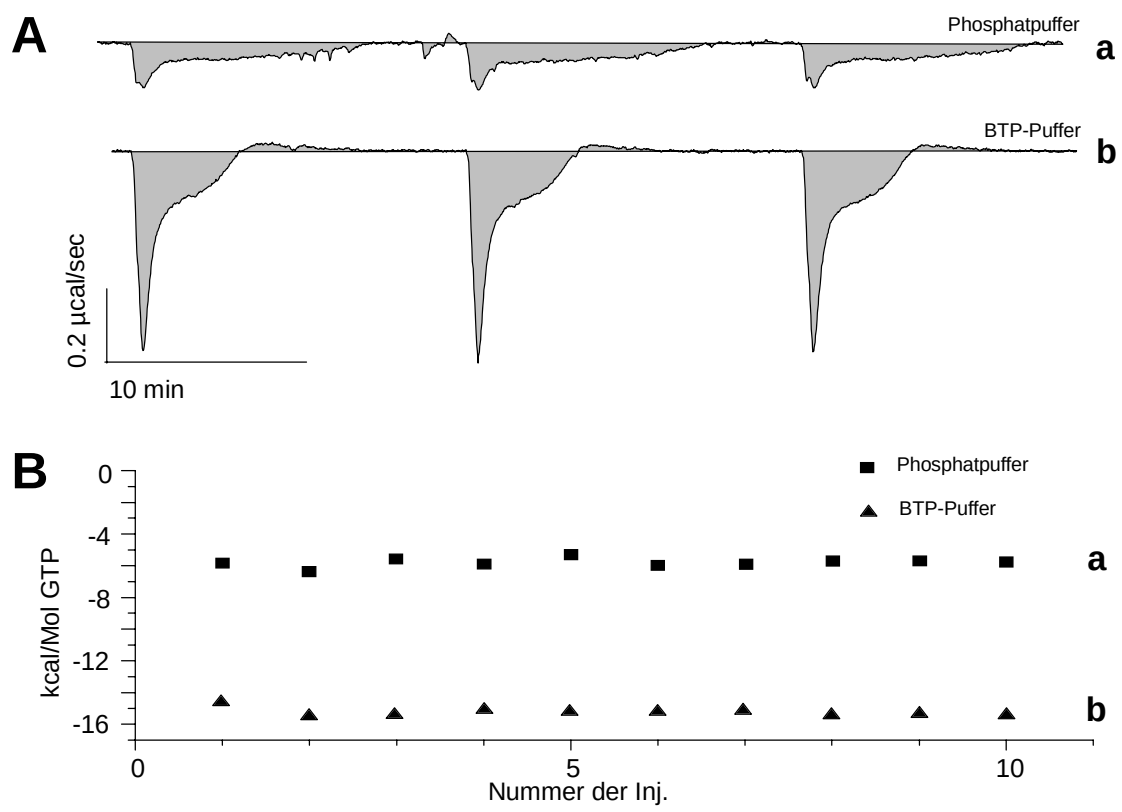


Abbildung 9
Messung des G-Protein-Zyklus in verschiedenen Puffern

A Titration einer GTP-Lösung (3 µM GTP pro Injektion) zu 1µM Transducin und 10 µM Rhodopsin durchgeführt bei 10 °C in Phosphatpuffer (a) und in BTP-Puffer (b). Die abgegebene Wärme ist im phosphatgepufferten System geringer als in BTP-Puffer. Die Gesamtdauer der Injektionen ist gleich, jedoch ist der zeitliche Verlauf des Wärmesignals unterschiedlich. Kurve a zeigt eine ausgeprägte Phase von nahezu konstanter Wärmeabgabe, Kurve b zeigt einen endothermen Anteil in der Schlußphase des Signals.

B Berechnung der Enthalpieänderung durch Integration der Fläche unter dem Wärmesignal einer Injektion in Phosphatpuffer (a) und in BTP-Puffer (b). Die gemessene Änderung der Gesamtenthalpie ist in Phosphatpuffer geringer. Die durch die einzelnen Injektionen hervorgerufene Wärme ist jeweils für einen Puffer konstant.

Für die korrekte Berechnung der Enthalpieänderungen unter Berücksichtigung der Protonenbilanz gilt:

$$\Delta H_{obs} = k \cdot \Delta H_p + \Delta H_{ges} \qquad (3.1)$$

Dabei ist ΔH_{obs} die beobachtete Enthalpieänderung ohne Berücksichtigung der Pufferprotonierung (wie sie in Abbildung 9 B dargestellt ist), ΔH_p steht für die Wärme bei Aufnahme von Protonen durch den Puffer, wobei k die Menge der beteiligten Protonen in Mol angibt. ΔH_{ges} ist die

gesamte Enthalpieänderung des Zyklus, korrigiert um die Enthalpieänderung durch Pufferprotonierung.

Trägt man in einem Schaubild die beobachtete Enthalpieänderung ΔH_{obs} gegen ΔH_p auf, so läßt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden die Menge der abgegebenen Protonen in Mol und aus dem y-Achsenabschnitt die Enthalpieänderung ΔH_{ges} entnehmen (Abbildung 10). Hierbei ist der Wert für Phosphatpuffer als Rechteck, der für BTP-Puffer als Dreieck eingezeichnet. Die berechnete Regressionsgerade hat eine Steigung von k = 0.95. Das bedeutet, daß im Laufe eines Zyklus 0.95 Mol Protonen an die Umgebung (den Puffer) abgegeben werden. Die auf der y-Achse abgelesene Enthalpieänderung für den gesamten Zyklus beträgt - 4.9 kcal/Mol GTP.

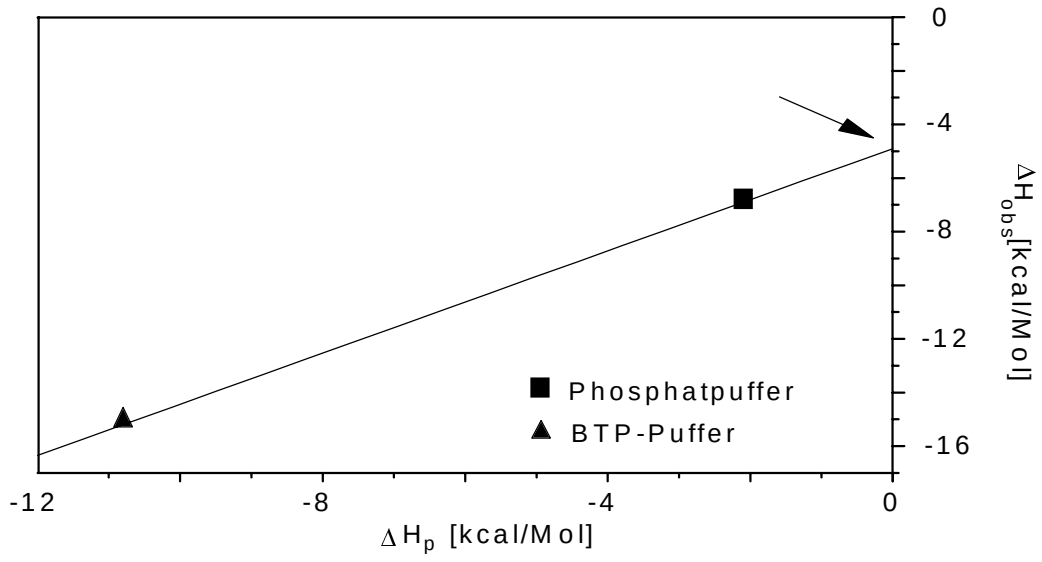


Abbildung 10
Enthalpieänderung unter Berücksichtigung der Pufferprotonierung

Bei Auftragung der beobachteten Enthalpieänderung ΔHobs gegen die Protonierungswärme des Puffers ΔHp, läßt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden die Menge an abgegebenen Protonen in Mol ermitteln. Aus dem y-Achsenabschnitt liest man die protonenkorrigierte Enthalpieänderung der Reaktion ab.

Die folgende Tabelle (Tab. 5) stellt die gemessenen und korrigierten Werte zusammen. Bei der Korrektur der gemessenen Werte wurde angenommen, daß ein Mol Protonen pro Zyklus frei wird. Die Werte für die Enthalpieänderung ohne Korrektur der Pufferprotonierung wurden als Mittelwert aus mehreren Messungen errechnet. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung. Für die korrigierte Gesamtenthalpieänderung wurde der wahrscheinlichste Fehler berechnet.

Betrachtete Reaktion	ΔH_{obs} in kcal/Mol GTP	ΔH_P in kcal/Mol H^+	ΔH_{ges} in kcal/Mol GTP
R*G +GTP *in BTP-Puffer*	- 15.2 ± 0.7 n = 12	-10.8 ± 0.5 n = 6	- 4.4 ± 0.9
R*G + GTP *in Phosphatpuffer*	- 6.9 ± 0.4 n = 9	- 2.1 ± 0.5 n = 3	- 4.8 ± 0.6
aus der graphischen Auftragung ermittelter Wert für ΔH_{ges}:			- 4.9 kcal/Mol

Tabelle 5

Zusammenstellung der gemessenen und um die Wärme der Pufferprotonierung korrigierten Werte für die Enthalpieänderung des G-Protein-Zyklus

Die Werte für ΔHobs und ΔHp ergeben sich als Mittelwerte und Standardabweichung aus n Messungen zu je 10 Injektionen. Für ΔHges ist der wahrscheinlichste Fehler angegeben.

Diese Ergebnisse geben den Wert der Enthalpieänderung bei Durchlaufen des ganzen Zyklus an. Die Messungen in den verschiedenen Puffern sind nach Korrektur um die Protonierungswärme in sehr guter Übereinstimmung. Gemittelt über die gemessenen Werte in den beiden Puffern ergibt sich für die Enthalpieänderung durch GTP-Hydrolyse

- 4.6 ± 0.8 kcal/Mol

Der angegebene Fehler ergibt sich als wahrscheinlichster Fehler aus den Werten der Tabelle.

3.3 Vergleich mit der GTPase des Ras-Proteins

Um einen Vergleichswert für die Wärme durch GTP-Hydrolyse außerhalb der visuellen Kaskade zu bekommen, wurden kalorimetrische Messungen zur GTPase des Ras-Proteins durchgeführt. Dieses läßt sich wieTransducin durch Zugabe von GTP in seinen aktiven Zustand bringen. Die intrinsische GTPase Reaktion ist jedoch sehr langsam und muß durch ein GAP-Protein (GTPase activating protein) beschleunigt werden. Des weiteren ist ein Austauschfaktor nötig, der den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP am Ras-Protein beschleunigt. Auch bei der GTPase des Ras-Proteins wird ein Zyklus von Reaktionen betrachtet, bei dem das System nach Verbrauch des zugegebenen GTP wieder in seinen Ausgangszustand zurückkehrt.
Die hier verwendeten Proben wurden von Christian Herrmann aus der Arbeitsgruppe von A. Wittinghofer am Max-Planck-Institut in Dortmund präpariert. Bei dem verwendeten Austauschfaktor handelt es sich um Cdc25, dessen katalytische Domäne, AS 976-1260 (siehe hierzu Jacquet et al., 1995 [38]), im Experiment eingesetzt wurde. Bei GAP wurde ebenfalls die

katalytische Domäne, die AS 714-1047 (Gideon et al., 1992 [23]) verwendet. Die Konzentrationen von Austauschfaktor und GAP wurden so gewählt, daß die Zeitdauer der Reaktionen in dem Bereich liegt, der für Messungen im visuellen System typisch ist. Die Experimente wurden in Puffer T (20 mM Tris, pH 7.5 und 5 mM $MgCl_2$) bei 20 °C durchgeführt.

In Abbildung 11 ist die Messung der Hydrolyse des Ras-gebundenen GTP (Spur b) im Vergleich zur Hydrolyse des Transducin-gebundenen GTP dargestellt (Spur a). Verschiedene Konzentrationen von GTP wurden zu einer Probe aus 2.8 µM Ras_{GDP}, 3 µM GAP und 2.8 µM Cdc25 gegeben. Der Verlauf des Wärmesignals im Ras-System zeigt nicht die Komplexität, wie die Messungen zur visuellen Kaskade. Einzelne Phasen sind nicht zu unterscheiden. Auch durch die Variation der zugegebenen GTP-Menge wird die Form des Wärmesignals nicht beeinflußt. Die Verbreiterung des Signals mit zunehmender Zeit ist auf die Anhäufung von GDP nach mehreren Injektionen zurückzuführen, die den Ablauf des Zyklus verlangsamt (Herrmann, 1997 [29]). Dies hat jedoch keinen Einfluß auf die Fläche unter der Meßkurve und damit auf die abgegebene Wärme. Die Kontrollmessung, eine Zugabe von GTP zu Cdc25 und GAP, zeigt keine Reaktion. Eine genauere Untersuchung der Teilreaktionen bei der GTPase des Ras-Proteins ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erfolgt.

Trägt man die gemessene Wärme bei der GTP-Hydrolyse des Ras-Proteins gegen die zutitrierte Konzentration von GTP auf (Inset in Abbildung 11), so ergibt sich, wie bei der Betrachtung der GTP-Hydrolyse von Transducin, eine lineare Funktion, die durch den Ursprung geht. Daraus folgt, daß in beiden Systemen die abgegebene Wärme nur durch GTP-induzierte Reaktionen erzeugt wird.

In einem Zyklus, der GTP verbraucht, müssen sich die aufgenommenen und abgegebenen Protonen der Teilreaktionen dahingehend ausgleichen, daß in der Bilanz ein Proton übrig bleibt, welches bei der Hydrolyse des GTP frei wird. Dies gilt auch für die GTPase des Ras-Proteins.

Die Meßergebnisse für die Enthalpieänderungen durch Hydrolyse von GTP durch Transducin und Ras-Protein sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die Werte für ΔH_{obs} und ΔH_p ergeben sich jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aus n Messungen zu je 10 Injektionen bei 20 °C. Als Fehler für ΔH_{ges} wurde der wahrscheinlichste Fehler angenommen.

Die gute Übereinstimmung der Enthalpieänderungen in den beiden Systemen kann als Beweis dafür betrachtet werden, daß bei Durchlaufen des Zyklus der Unterschied zwischen dem Ausgangs- und Endzustand des jeweiligen Systems nur darin besteht, daß GTP verbraucht wurde.

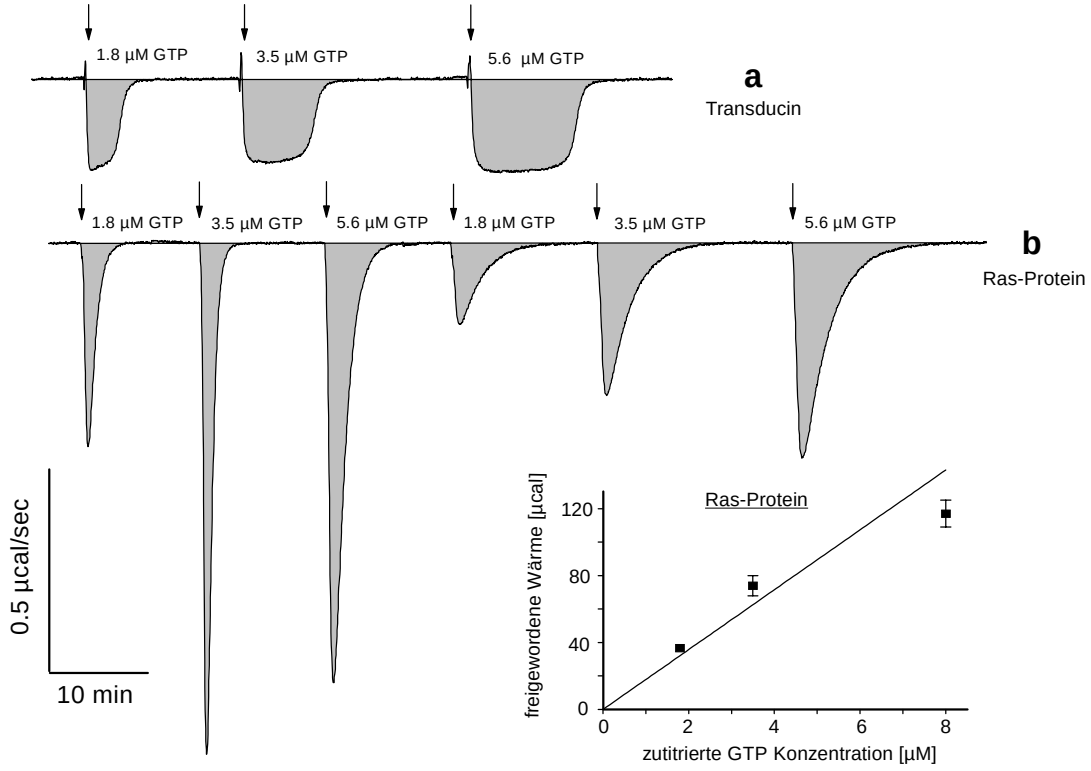


Abbildung 11
Vergleich der GTPase von Transducin und Ras-Protein

a. Die obere Spur zeigt eine Messung im visuellen System. Dabei wurden zu 1µM Rhodopsin und 1 µM Transducin 1.8 µM GTP, 3.5 µM GTP und 5.6 µM GTP gegeben. Mit zunehmender GTP-Konzentration zeichnet sich die 'Plateauphase' der Wärmeabgabe deutlicher ab.

b. Die untere Spur zeigt die Messung der GTPase des Ras-Proteins. In der Meßzelle wurden 2.8 µM RasGDP, 3 µM GAP und 2.8 µM Cdc25 in Tris-Puffer vorgegeben. Die zu titrierte GTP-Konzentration betrug 1.8 µM (Inj. 1 und 4), 3.5 µM (Inj. 2 und 5) und 5.6 µM (Inj. 3 und 6). Die längere Reaktionsdauer bei der wiederholten Injektion ist bedingt durch die Anhäufung von GDP in der Probenzelle. Eine Veränderung des Verlaufs der Wärmeabgabe durch die Variation der GTP-Konzentration ist nicht zu erkennen. Auch die Unterscheidung verschiedener Phasen der Reaktion ist nicht möglich.
Die Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt. In dem kleinen Schaubild ist die abgegebene Wärme in Abhängigkeit von der zutitrierten GTP-Konzentration aufgetragen. Die Ursprungsgerade zeigt, daß die Wärme nur durch GTP-induzierte Reaktionen hervorgerufen wird.

Betrachtete Reaktion	ΔH_{obs} in kcal /Mol GTP	ΔH_p in kcal/Mol H^+	ΔH_{ges} in kcal/Mol GTP
GTPase *des G-Protein-Zyklus*	- 15.1 ± 0.5 n = 3	-10.5 ± 0.5 n = 2	-4.6 ± 0.7
GTPase *des Ras-Proteins*	- 14.7 ± 2.8 n = 3	-10.2 ± 0.8 n =2	-4.5 ± 2.9

Tabelle 6

Vergleich von DH der GTPase von Transducin und Ras-Protein bei 20 °C

3.4 Variation der GTP-Konzentration

In einem ersten Schritt zur Untersuchung und Interpretation der einzelnen Phasen des Zyklus wurde die zum R*G-Komplex titrierte GTP-Menge variiert. Betrachtet man den G-Protein-Zyklus aus Sicht der Enzymkinetik (Enzym: Transducin, Substrat: GTP, Rhodopsin ist der 'essential activator'), so entspricht dies einer Variation des Substrates. Die Zugabe steigender GTP-Mengen bei gleichbleibender Konzentration von Transducin bewirkt eine Verlängerung der Gesamtreaktionszeit, da der Zyklus häufiger durchlaufen werden muß, um das zugegebene GTP zu hydrolysieren.

Die Variation des Substrates wurde zunächst mittels Titrationskalorimetrie untersucht, um den Einfluß auf die Enthalpieänderung festzustellen. Im Anschluß wurde das gleiche Experiment zur Kontrolle im Fluoreszenzspektrometer durchgeführt.

a. Kalorimetermessungen

Abbildung 12 A zeigt den Einfluß verschiedener GTP-Konzentrationen auf das Wärmesignal. Zu 1 µM Transducin und 10 µM Rhodopsin wurden 4 verschiedene Injektionen von GTP gegeben (GTP-Endkonzentration in der Meßzelle: 3.5 µM, 2.5 µM, 1 µM und 8.5 µM). Die Fläche unter dem Signal nimmt mit steigender GTP-Konzentration zu. Die einzelnen Phasen des Wärmesignals bilden sich in Abhängigkeit des G_t-GTP-Verhältnisses unterschiedlich ab. Im Falle des 'single turns', wenn G_t und GTP in gleicher Konzentration vorliegen, wird bereits bei einem Umlauf des Zyklus die gesamte GTP-Menge hydrolysiert. Die Unterscheidung verschiedener Teilschritte des Signals ist nicht möglich. Im 'multi turn', wenn GTP gegenüber Transducin im Überschuß vorliegt, treten die einzelnen Phasen deutlicher hervor. Insbesondere die zweite Phase ist umso ausgeprägter, je öfter das System den Zyklus durchlaufen muß. Sie wird dem 'Steady-State'-Zustand des Zyklus zugeordnet. Während der Steady-State-Phase halten sich Bildung und Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes die Waage (hier entspricht das aktive G-Protein, $G_{\alpha GTP}$ dem Enzym-Substrat-Komplex). Der Steady-State-Zustand ist nur für eine begrenzte Zeit stabil. Die Wärme, die während dieser Phase frei wird, entspricht der Summe der Wärmen aller Reaktionen, die zu dem betrachteten Zeitpunkt ablaufen.

In der ersten Phase des Wärmesignals einer Injektion beobachtet man einen exothermen Peak, welcher der Dissoziation des R*G-Komplexes zugeordnet wird. Diese Teilreaktion wird in einem späteren Kapitel genauer besprochen. Hier soll nur angemerkt werden, daß das Fehlen dieses Peaks bei der 4. Injektion von Abb. 12 A mit dem zeitlichen Zerfall des aktiven Rhodopsins zusammenhängt.

In Abb. 12 B ist die freigewordene Wärme gegen die pro Injektion hinzutitrierte Konzentration von GTP aufgetragen. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der eingespritzten GTP-Menge und der freigewordenen Wärme. Die berechnete Regressionsgerade geht durch

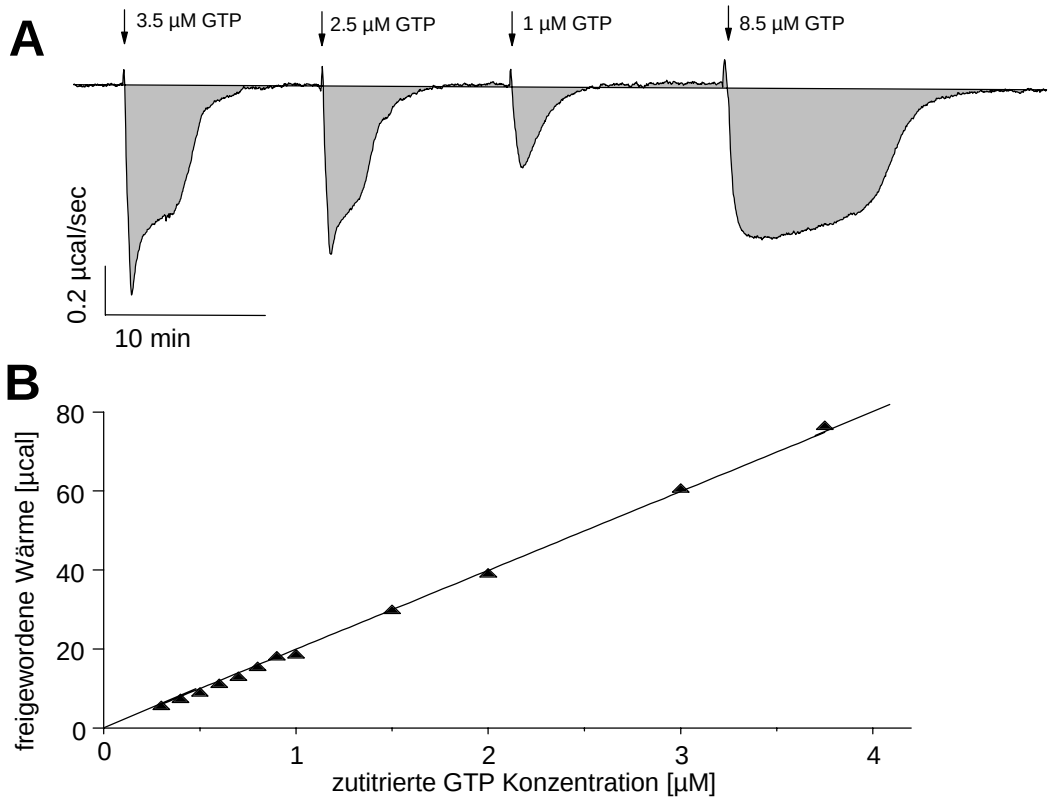


Abbildung 12

Variation der GTP-Konzentration

*A Titration verschiedener Volumina einer 1 mM GTP-Lösung zum R*G-Komplex (1 µM G_t, 10 µM Rhodopsin in WM): 3.5 µM GTP (Endkonzentration), 2.5 µM, 1 µM und 8.5 µM. Sowohl die Fläche unter der Meßkurve, als auch der Verlauf des Wärmesignals verändern sich mit der zugegebenen GTP-Menge. Mit zunehmender Konzentration wird mehr Wärme abgegeben und die zweite Phase der Injektion tritt deutlicher hervor. Die Messungen wurden bei 10 °C in BTP-Puffer (pH 7.5) durchgeführt.*

*B Das Schaubild zeigt die Abhängigkeit der freigewordenen Wärme bei Zugabe von GTP zum R*G-Komplex von der pro Injektion hinzutitrierten Konzentration. Es ist ein linearer Zusammenhang zu erkennen, der sich durch eine Ursprungsgerade beschreiben läßt.*

den Ursprung, was darauf hindeutet, daß die Wärmeproduktion sich ausschließlich auf Reaktionen zurückführen läßt, die durch GTP induziert werden.

b. Fluoreszenzmessungen

Durch die Änderung der intrinsischen Fluoreszenzintensität des Transducins beim Übergang in den aktiven Zustand erlaubt die Fluoreszenzmessung, den aktiven Zustand von G_t zeitabhängig zu beobachten. In vergleichenden Messungen von Kalorimetrie und Fluoreszenzspektroskopie wird die Kenntnis der Dauer des aktiven Zustandes des G-Proteins ausgenutzt, um die kalorimetrischen Daten zu interpretieren. Hierzu werden identische Proben verwendet.

Durch Zugabe von GTPγS im Überschuß werden zum Schluß der Messung sämtliche G-Proteine irreversibel aktiviert, was zu einer maximalen Fluoreszenzintesität führt. Die angegebenen Werte der relativen Fluoreszenzänderung beziehen sich auf diesen Wert.

Abbildung 13 zeigt die Messung der Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit von unterschiedlichen zutitrierten GTP-Mengen. Zu 1 µM Transducin und 1 µM lichtaktiviertem Rhodopsin wurden nacheinander 3.5 µM GTP, 1 µM GTP, 0.6 µM GTP und 3.5 µM GTPγS zugegeben. Die Zeitpunkte der Nukleotidzugabe sind jeweils durch Pfeile markiert.

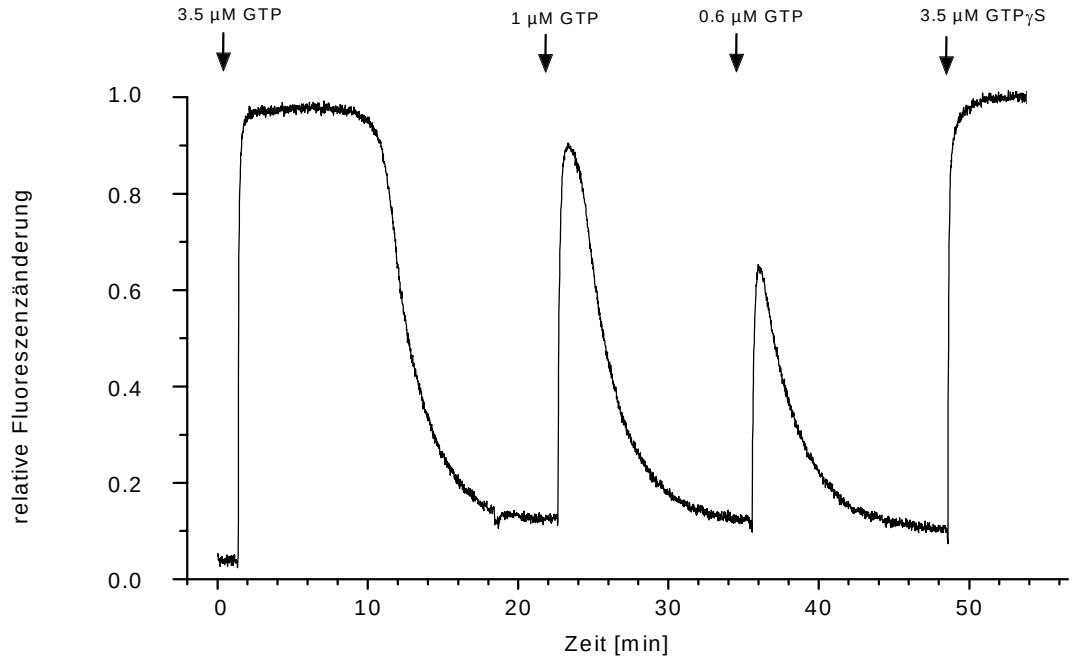


Abbildung 13
Messung der Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit der GTP-Konzentration

Zu 1 µM Rhodopsin und 1 µM G_t wurden 3.5 µM GTP, 1 µM GTP , 0.6 µM GTP und 3.5 µM GTPγS gegeben. Der steile Anstieg der Fluoreszenzintensität entspricht der Aktivierung von Transducin, die anschließende Phase konstanter Fluoreszenzintensität dem aktiven Zustand des G-Proteins. Die Dauer dieser Phase ist abhängig von dem Verhältnis von G_t zu GTP in der Probe. Das Abklingen des Fluoreszenzsignals ist der Deaktivierung von Transducin durch die Hydrolyse des GTP zu GDP zuzuordnen. Durch die Überlagerung der Aktivierung mit der einsetzenden Hydrolyse wird bei einem G_t zu GTP Verhältnis von 1:1 oder einem Überschuß an Transducin das maximale Aktivierungsniveau nicht erreicht. Durch Zugabe von GTPγS zur Fluoreszenzprobe werden alle Transducinmoleküle in den aktiven Zustand versetzt und man erhält die maximal mögliche Fluoreszenzintensität der Probe. Das Experiment wurde bei 10 °C in BTP-Puffer durchgeführt.

Nach Zugabe von GTP zum R*G-Komplex, erfolgt ein steiler Anstieg der Fluoreszenzintensität, welcher der Aktivierung von Transducin entspricht. Es schließt sich eine Phase konstanter Fluoreszenzintensität an, deren Dauer von der GTP-Konzentration abhängt und die den aktiven Zu-

stand von G_t widerspiegelt. Das Abklingen des Fluoreszenzsignals stellt die Deaktivierung von Transducin durch Hydrolyse des zugegebenen GTP zu GDP dar.
Verschiedene Konzentrationen von GTP zeigen unterschiedliche Signalverläufe. Liegt GTP gegenüber Transducin im Überschuß vor (1. Injektion), so ist die Plateauphase sehr ausgeprägt. Dies entspricht dem mehrfachen Durchlaufen des G-Protein-Zyklus (multi turn), bis das gesamte vorliegende GTP hydrolysiert ist. Unter Single-Turn-Bedingungen (2. Injektion) wird das maximale Aktivierungsniveau nicht erreicht. Dies liegt daran, daß die einsetzende Hydrolyse die Aktivierung überlagert. Ist in der Probe weniger GTP als Transducin vorhanden (3. Injektion), so bleibt ein Teil des G-Proteins inaktiv und die Amplitude des Signals erreicht nicht das Niveau der vollständigen Aktivierung. Durch Zugabe des nicht hydrolysierbaren GTPγS wird Transducin in seinem aktiven Zustand blockiert und das Fluoreszenzniveau bleibt konstant.
Die Beobachtungen der Fluoreszenzmessung stehen im Einklang mit der Betrachtung des Wärmesignals in Abhängigkeit von der GTP-Konzentration. Ein Überschuß von GTP führt zum mehrfachen Durchlaufen des Zyklus, was sich bei beiden Meßsignalen in einer Verlängerung der Plateauphase (des Steady-State-Zustandes) niederschlägt. Die Fluoreszenzmessungen sind damit ein weiterer Beweis der Zuordnung der Plateauphase des Wärmesignals zum Steady-State-Zustand des G-Protein-Zyklus.

Anhäufung von GDP
Aus der Literatur (Kahlert et al., 1990 [40]; Bruckert et al., 1992 [10]) ist bekannt, daß Transducin im GDP-bindenden Zustand, der Übergangszustand des R*G-Komplexes mit gebundenem GDP (R^*G_{GDP}) und der nukleotidfreie R^*G_{empty}-Komplex jeweils in einem GDP-abhängigen Gleichgewicht zu einander stehen:

$$R^* + G_{GDP} \leftrightarrow R^*G_{GDP} \leftrightarrow R^*G_{empty} + GDP \qquad (3.2)$$

In Anwesenheit hoher GDP-Konzentrationen verschiebt sich das Gleichgewicht zur Seite des dissoziierten Komplexes. Bei der Untersuchung der GTP-Abhängigkeit des G-Protein-Zyklus, muß daher auch die Auswirkung von GDP betrachtet werden, das sich im Laufe der Messung anhäuft. Um zu untersuchen, ob die zunehmende GDP-Konzentration das Wärmesignal oder das Fluoreszenzsignal einer GTP-Injektion beeinflußt, wurde neben dem R*G-Komplex 20 µM GDP in der Probe vorgelegt. (Diese Messungen sind nicht abgebildet.)
Sowohl in der Fluoreszenzmessung als auch im Wärmesignal ist kein Unterschied gegenüber einer Messung ohne GDP-Vorgabe zu erkennen. Der Einfluß von GDP auf die Komplexbildung muß folglich im Rahmen der verwendeten GTP- bzw. GDP-Konzentrationen in diesen Messungen nicht berücksichtigt werden.

3.4.1 Doppelinjektionsprotokoll

Aus Messungen der Enthalpie- und Fluoreszenzänderung des G-Protein-Zyklus in Abhängigkeit der GTP-Konzentration wurde die zweite Phase des Wärmesignals einer Injektion dem Steady-State-Zustand des Zyklus zugeordnet. Um weitere Informationen über den Momentanzustand des Zyklus zu bekommen, wurde während des Durchlaufens der Hydrolyse eine weitere GTP-Injektion zugegeben. Durch die zusätzliche GTP-Menge wird der Zustand des Systems zum Zeitpunkt des Einspritzens geprüft, indem die möglichen Teilreaktionen ausgelöst werden.

Zusätzliche GTP-Injektion in der Steady-State-Phase des Wärmesignals

Gibt man die zweite GTP-Injektion während der Steady-State-Phase des Wärmesignals zur Probe, so wird dadurch die zu hydrolysierende GTP-Menge in der Meßzelle erhöht. Dies hat keinen Einfluß auf die Komplexbildung oder -dissoziation, da nahezu alle Transducinmoleküle aktiviert sind und das System sich im Steady-State-Zustand befindet. Aufgrund der erhöhten GTP-Konzentration in der Probe muß der Zyklus jedoch häufiger durchlaufen werden. Die Gesamtdauer der Wärmeabgabe verlängert sich dadurch um einen Faktor, welcher der zusätzlichen GTP-Menge proportional ist. Eine Messung, die nach dem beschriebenen Protokoll durchgeführt wurde, ist in Abbildung 14 gezeigt.

Die obere Spur der Abbildung zeigt eine Injektion, bei der 3.5 µM GTP zu dem vorgegebenen Komplex aus 1 µM Transducin und 1 µM Rhodopsin titriert wurden. Die untere Spur zeigt die unmittelbar darauf folgende GTP-Injektion, bei der während der zweiten Phase des Wärmesignals noch einmal 3.5 µM GTP zugegeben wurden. Diese zusätzliche Injektion ruft einen sehr kleinen Peak hervor und bewirkt eine geringfügig höhere Wärmeabgabe in der darauffolgenden Plateauphase. Dieser kleine Peak ist auf den Einspritzartefakt zurückzuführen, der sich zur Wärmeproduktion der ersten Injektion addiert. Die Veränderung des Steady-State-Niveaus erklärt sich aus der erhöhten GTP-Konzentration. Das momentane Wärmesignal gibt an, wieviel Wärme pro Sekunde zu dem betrachteten Zeitpunkt frei wird. Da die Gesamt-Reaktionsrate (‘Overall’-Rate) des Zyklus durch die zusätzliche Injektion von GTP nur wenig beeinflußt wird, so wird eine höhere Wärmeabgabe dadurch erreicht, daß mehr Moleküle an dieser Wärme beteiligt sind. Damit gibt die Lage des Plateaus an, wieviele Moleküle sich im Steady-State-Zustand befinden. Bei zusätzlicher GTP-Zugabe muß folglich ein ‘exothermeres’ Niveau erreicht werden.

Wertet man die Fläche unter dem Signal der Doppelinjektion aus, so ergibt sich für die zweifache GTP-Menge die doppelte Wärmemenge. Dies entspricht der in Abbildung 12 B gezeigten linearen Abhängigkeit von abgegebener Wärme zu eingespritzter GTP-Konzentration.

Führt man das gleiche Experiment in der Fluoreszenzspektroskopie durch, so ist die Plateauphase des Signals, die dem aktiven Zustand des G-Proteins entspricht, im gleichen Maße verlängert, wie die GTP-Menge erhöht wurde. Auch hier ist aufgrund der GTP-Zugabe während des Steady-State-Zustandes kein Einfluß auf die Aktivierung oder Deaktivierung von Transducin zu erkennen.

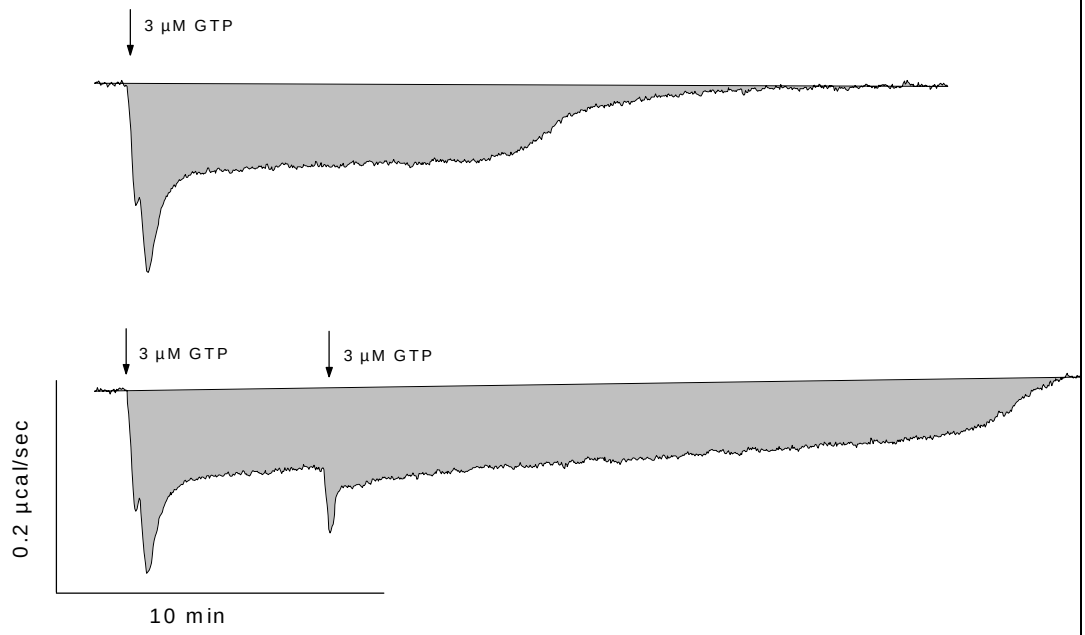


Abbildung 14
Vergleich von einmaliger und doppelter GTP-Zugabe

*Die obere Kurve zeigt den typischen Verlauf des Wärmesignals bei Titration von GTP zum R*G-Komplex, während in der unteren Spur eine Doppelinjektion abgebildet ist. Hierbei wurde in der zweiten Phase des Wärmesignals eine weitere Injektion derselben Konzentration zugesetzt (3.5 µM GTP). In der Meßzelle wurde belichtetes Rhodopsin (10 µM) und Transducin (1 µM) vorgegeben. Die dargestellten Injektionen sind unmittelbar aufeinanderfolgende Titrationen zu derselben Probe. Bei der Doppelinjektion beobachtet man außerdem kleinen Peak (Einspritzartefakt) eine Absenkung des Niveaus und eine verlängerte Dauer der Wärmeabgabe. Die Fläche unter der Doppelkurve entspricht dem Doppelten der Fläche einer Einzelinjektion.*
Die Messungen wurden bei 10 °C in BTP-Puffer (pH 7.5) durchgeführt.

Zusätzliche GTP-Injektion in der Schlußphase des Wärmesignals

Um den momentanen Zustand des G-Protein-Zyklus in der dritten Phase des Wärmesignals zu überprüfen, wurde in einem weiteren Experiment die zweite GTP-Injektion während des Abklingens des Wärmesignals zugegeben. In dieser Phase ist ein Teil des G-Proteins bereits wieder in den inaktiven G_{GDP}-Zustand zurückgekehrt und hat mit belichtetem Rhodopsin den R*G-Komplex gebildet. Durch die erneute Zugabe von GTP kann der komplexgebundene Anteil von Transducin aktiviert und so der Zyklus wieder in den Steady-State-Zustand versetzt werden. Zum Zeitpunkt der zweiten Injektion liegt nur ein Teil des G_t in komplexgebundener Form vor. Daher muß die Komplexdissoziation, die dem exothermen Peak des Wärmesignals zugeordnet ist (siehe hierzu Kapitel 4.2) im Wärmesignal der zweiten Injektion eine kleinere Wärme bewirken, als bei der ersten Injektion. Das Steady-State-Niveau der zweiten Injektion entspricht dem der ersten Injektion. In Abbildung 15 ist das beschriebene Experiment als Wärmesignal im Vergleich zu einem Fluoreszenzsignal dargestellt.

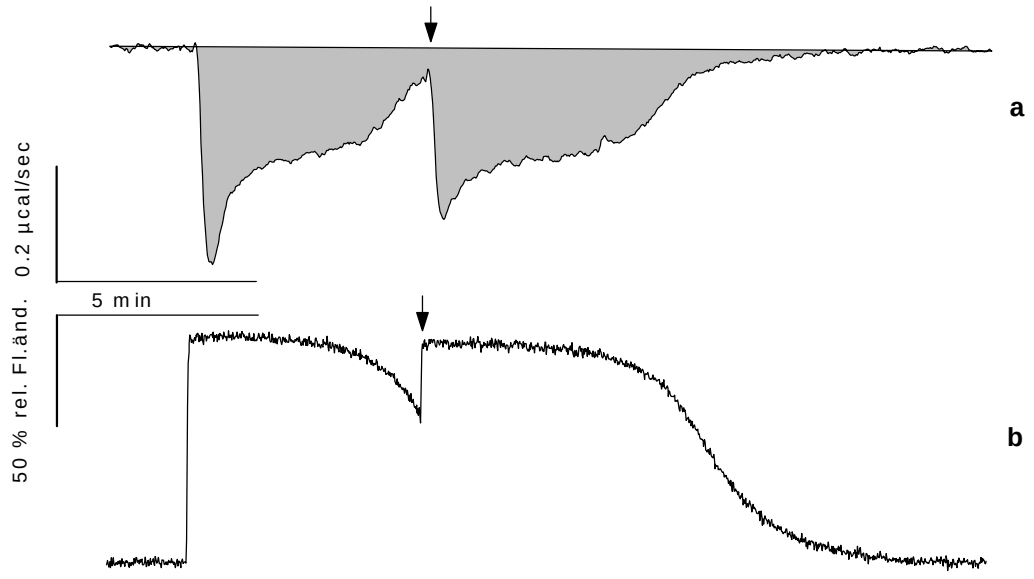


Abbildung 15
Vergleich von Wärmesignal und Fluoreszenzsignal einer Doppelinjektion von GTP

Das Wärmesignal und das Fluoreszenzsignal wurden unter exakt gleichen Bedingungen an identischen Proben aufgenommen. Pro Injektion wurde je 3.5 µM GTP zu einer Probe aus 10 µM Rhodopsin und 1µM Transducin gegeben. Beide Messungen wurden bei 10 °C in BTP-Puffer (pH 7.5) durchgeführt.
a. Die obere Spur zeigt das Wärmesignal eines Experimentes, bei dem in der Schlußphase der Reaktion eine zusätzliche GTP-Injektion gegeben wurde (der Zeitpunkt der Zugabe ist durch einen Pfeil markiert). Der exotherme Peak des Signals ist bei der zweiten Injektion kleiner als bei der ersten. Das Niveau der Steady-State-Phase ist gleich.
b. Die untere Spur zeigt das gleiche Experiment, das zum Vergleich in der Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt wurde. Die erneute GTP-Zugabe in der abfallenden Phase des Signals bewirkt die Rückkehr des Systems in den Steady-State-Zustand.
Betrachtet man die zeitliche Dauer der Reaktionen, so ist in beiden Messungen der zweite Teil des Signals, nach der wiederholten Zugabe von GTP etwas länger, entsprechend dem Anteil von GTP aus der ersten Zugabe, der zum Zeitpunkt der Wiederholung noch nicht aufgearbeitet ist. Die Gesamtdauer der Signale ist in beiden Messungen gleich.

Spur a zeigt das Doppelinjektionsprotokoll für eine Messung des Titrationskalorimeters, in Spur b ist das beschriebene Protokoll in einer Fluoreszenzmessung angewendet worden. In beiden Messungen wurden Aliquots derselben Probe aus 10 µM Rhodopsin in WM und 1 µM G_t vorgelegt, die Messungen wurden gleichzeitig durchgeführt. Zugegeben wurden Injektionen, die einer Endkonzentration von 3.5 µM GTP entsprechen. Die Kalorimetermessung zeigt bei der zweiten Injektion einen kleineren exothermen Peak, entsprechend einer niedrigeren Komplexkonzentration als zum Zeitpunkt der ersten Injektion. Die Plateauphase verläuft bei beiden Injektionen auf dem gleichen Niveau. Hierbei ist die Dauer des Wärmesignals der zweiten Injektion in dem Maße verlängert, wie noch GTP zum Zeitpunkt der Zugabe der zweiten Injektion vorhanden ist. Wie auch bei dem vorangehenden Experiment, wird durch die zusätzliche GTP-Injektion die pro Mol GTP freiwerdende Wärme nicht beeinflußt.

Durch Vergleich des Wärmesignals mit der Fluoreszenzmessung erhält man Aufschluß darüber, welcher Prozentsatz von Transducin zu dem betrachteten Zeitpunkt noch aktiv ist. Wie bereits erläutert, entspricht das Signal der Fluoreszenzänderung der Menge an aktivem G-Protein. Das Plateau des Fluoreszenzsignals entspricht der vollständigen Aktivierung des vorhandenen Transducins. Zum Zeitpunkt der zweiten Injektion ist bereits ein Teil des G-Proteins inaktiv, erkennbar an dem Abfall des Signals. Durch die zweite GTP-Injektion wird erneut der ganze G-Protein-Vorrat in den aktiven Zustand versetzt. Dies ist an dem Plateau erkennbar. Die Bedeutung der Fluoreszenzmessung für den Vergleich zum Wärmesignal liegt darin, daß aus der Fluoreszenzmessung der Anteil an aktivem G_t zum Zeitpunkt der Zugabe der zweiten Injektion bestimmt werden kann.
Bei der betrachteten Messung sind zum Zeitpunkt der zweiten Injektion 60 % des G-Proteins noch im aktiven Zustand. 40 % des Transducins sind bereits in den inaktiven Zustand übergegangen. Der geringere Anteil an Transducin erklärt den gegenüber der ersten Injektion kleineren exothermen Peak der zweiten Injektion des Wärmesignals.
Eine Unterteilung der freigewordenen Wärme des Gesamtzyklus auf einzelne Teilreaktionen ist hierdurch jedoch nicht möglich, da mehrere Reaktionen überlagert sind. Durch den Vergleich zur Fluoreszenz gelingt es nicht, eine Phase des Zyklus isoliert zu betrachten.

3.5 Variation der G-Protein-Konzentration

In dem vorangehenden Kapitel wurde die Änderung des Verhältnisses von Transducin zu GTP durch Variation der GTP-Konzentration untersucht (Variation des Substrates). Hier soll nun der Einfluß der Veränderung der Transducin-Konzentration auf die Enthalpieänderung des G-Protein-Zyklus bei konstanter GTP-Konzentration betrachtet werden (Variation des Enzyms).
Abbildung 16 zeigt drei Messungen mit verschiedenen G_t--Konzentrationen. Zu einer Vorgabe von jeweils 1 µM belichtetem Rhodopsin und unterschiedlichen Konzentrationen von Transducin wurden Injektionen zu je 3 µM GTP gegeben. Die oberste Spur (a) wurde mit einem G_t zu GTP Verhältnis von 2:3 aufgenommen (2 µM G_t, 3 µM GTP), in Spur (b) betrug das Verhältnis 1:3 und in Spur (c) 1:6. Der Fall höchster Transducinkonzentration unterscheidet sich im Verlauf des Wärmesignals deutlich von den anderen Messungen. Im Gegensatz zu niedrigeren Konzentrationen ist hier eine Einteilung in verschiedene Phasen der Reaktion nicht möglich. Ferner ist die Gesamtdauer der Reaktion bei Vorgabe von 2 µM Transducin kürzer als bei den Messungen mit geringeren G_t-Konzentrationen. Mit zunehmendem GTP-Überschuß bildet sich die Plateauphase der Injektionen deutlicher aus. Dies ist konsistent mit der Zuordnung dieser Phase zum Steady-State-Zustand des Zyklus. Je weniger G-Protein vorhanden ist, desto öfter muß der Zyklus durchlaufen werden um die vorhandene GTP-Menge zu GDP zu hydrolysieren.

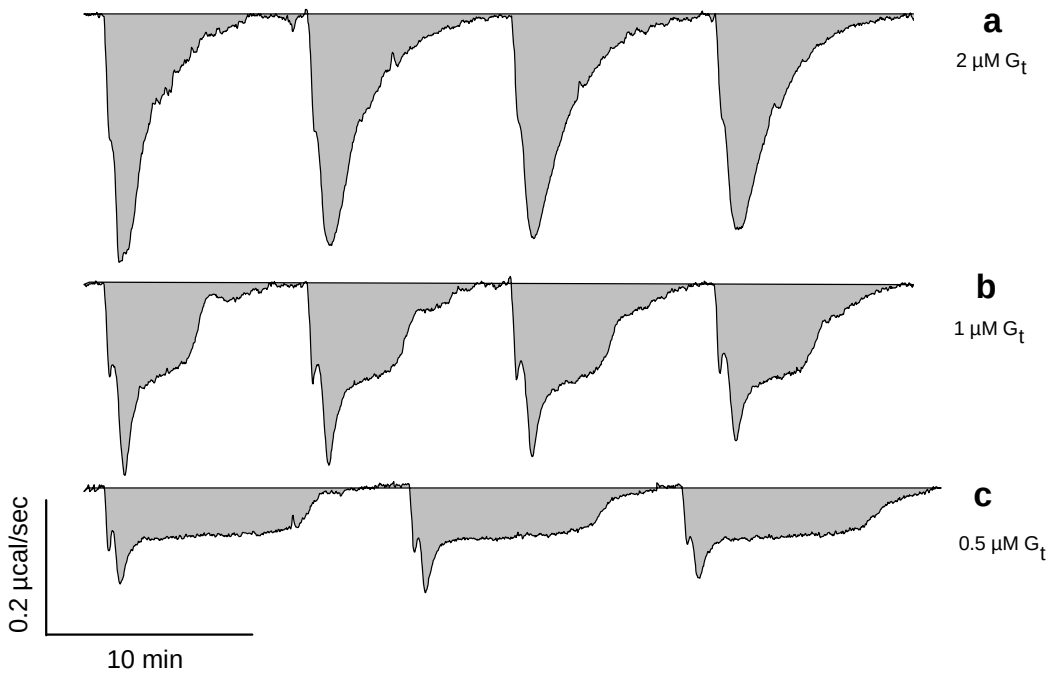


Abbildung 16
Variation der Transducinkonzentration

Zu einer Probe aus 1 µM R und Transducin wurde GTP entsprechend einer Endkonzentration von 3 µM pro Injektion zugegeben. Die Gt-Konzentration wurde variiert: 2 µM (a), 1 µM (b) und 0.5 µM (c). Mit zunehmendem GTP-Überschuß bildet sich die Plateaupha se, die dem Steady-State-Zustand des Zyklus zugeordnet wird, deutlicher ab. Ferner ist eine Abhängigkeit des ersten Peaks des Wärmesignals von der Gt-Konzentration erkennbar; bei höheren Konzentrationen ist diese erste Phase stärker exotherm. (Die kleine Spitze, die auf der Flanke dieses Peaks sitzt ist dem Artefakt durch Einspritzen zuzuordnen.) Auch das Niveau der Steady-State-Phase verändert sich bei Variation der Transducinkonzentration, die Wärmeabgabe pro Zeiteinheit sinkt während dieser Phase mit abnehmender Gt-Konzentration.*
Die Messungen wurden bei 10 °C in BTP-Puffer (pH 7.5) durchgeführt.

Das Niveau der Plateauphase ist abhängig von der Transducinkonzentration. Wie bereits erläutert, gibt die Lage der Plateauphase an, wieviele G_t-Moleküle sich im Steady-State-Zustand befinden. Diese Menge ist bei einem Überschuß an GTP limitiert durch die Menge an vorhandenem G_t. Folglich ist die Wärmeabgabe pro Zeiteinheit während des Steady-State-Zustandes bei niedrigerer Transducinkonzentration geringer.

Weiterhin ist zu beobachten, daß die erste Phase des Wärmesignals, der exotherme Peak, auch von der Konzentration des G-Proteins abhängt. Mit abnehmender Konzentration wird der Peak kleiner. Die einzelnen Flächen des Wärmesignals der verschiedenen Meßkurven sind gleich groß. Dies zeigt, daß die Wärmeproduktion des betrachteten Zyklus von der Transducinkonzentration unabhängig ist und ist somit ein weiterer Beweis dafür, daß die gemessene Wärme nur von der zugegebenen GTP-Menge abhängt.

3.6 Temperaturabhängigkeit der Enthalpieänderung des G-Protein-Zyklus

Um festzustellen, ob die Wärmeproduktion des G-Protein-Zyklus einer Temperaturabhängigkeit unterliegt, wurde die Zugabe von GTP zum R*G-Komplex bei verschiedenen Arbeitstemperaturen des Kalorimeters gemessen. Hierbei wurden GTP-Injektionen von je 3 µM zu 1 µM R* und 1 µM Transducin gegeben. Die Messungen wurden bei 4 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C und 25 °C durchgeführt. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse für die Messungen bei 4 °C, 15 °C und 25 °C dargestellt. Messungen bei höheren Temperaturen konnten aufgrund der abnehmenden Stabilität der Proteine nicht durchgeführt werden.

Betrachtet man die Form der einzelnen Signale, so ist eine deutliche Veränderung des zeitlichen Verlaufs der Wärmeabgabe in Abhängigkeit von der Temperatur zu erkennen. Mit zunehmender Temperatur verkürzt sich die Gesamtdauer der Wärmeabgabe des Zyklus, und die einzelnen Phasen treten weniger stark hervor. Für die Messung bei 4 °C ist der erste exotherme Peak sehr deutlich ausgebildet. Ihm folgt eine ca. 15 minütige Phase geringer, konstanter Wärmeabgabe. Mit steigender Temperatur ist der exotherme Peak weniger ausgeprägt und die zweite Phase der Injektion verkürzt. Jedoch verlaufen die Injektionen bei höheren Temperaturen auf einem stärker exothermen Niveau. Die von der Meßkurve eingeschlossene Fläche und damit die insgesamt freiwerdende Wärme bleibt dabei unverändert. Dies zeigt, daß die Enthalpieänderung der GTP-Hydrolyse nicht temperaturabhängig ist.

Die kürzere Gesamtdauer des Zyklus bei höheren Temperaturen ist bedingt durch eine temperaturabhängige Veränderung der Reaktionsraten. Dies erlaubt eine Verknüpfung des Wärmesignals mit der Kinetik der Reaktion. Das Niveau größerer Wärmeabgabe, auf dem die Hydrolysereaktion bei höheren Temperaturen abläuft, kann als Maß für die ‘Overall’-Reaktionsrate angesehen werden. Je höher die momentane Wärmeabgabe, desto schneller läuft die Reaktion ab, d.h. desto höher ist die Reaktionsrate.

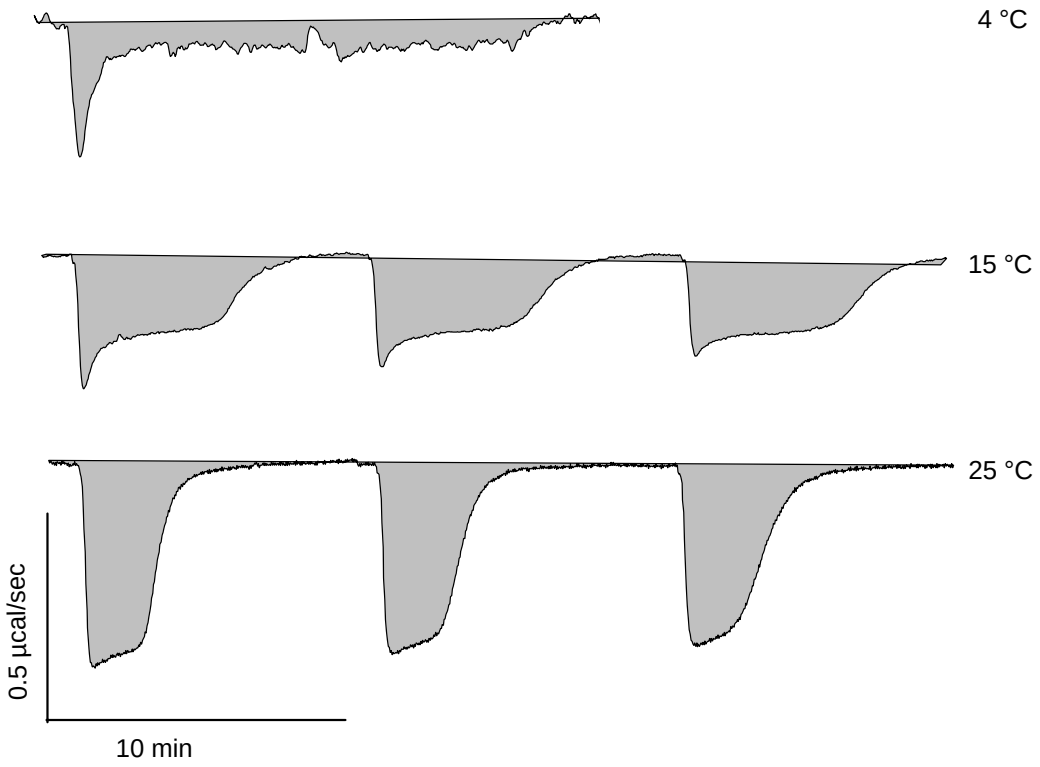


Abbildung 17
Untersuchung der Temperaturabhängigkeit des G-Protein-Zyklus

Injektionen zu je 3 µM GTP wurden zu 1µM R und 1 µM Transducin titriert. Hierbei wurden verschiedene Messungen in BTP-Puffer bei pH 7.5 in Abhängigkeit von der Arbeitstemperatur des Kalorimeters durchgeführt (4 °C, 15 °C und 25 °C). Während die freiwerdende Wärme unabhängig von der Temperatur ist, zeigen sich im Verlauf und der Dauer des Wärmesignals deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Messungen. Die erste Phase des Signals, der exotherme Peak ist für niedrigere Temperaturen deutlicher ausgeprägter. Die zweite Phase und auch die Dauer der Gesamtreaktion wird mit steigender Temperatur kürzer, jedoch verläuft die Reaktion auf einem Niveau höherer Wärmeabgabe.*

4. Teilreaktionen im G-Protein-Zyklus

Zerlegt man den G-Protein-Zyklus in einzelne Schritte so muß für die Enthalpieänderungen ΔH_i der Teilreaktionen gelten

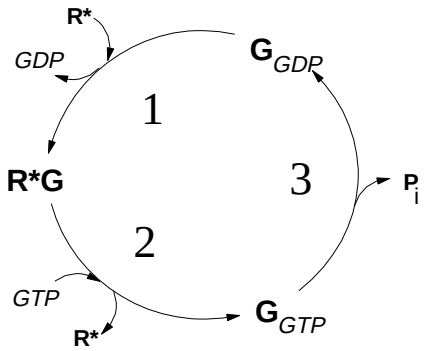
$$\Delta H_{ges} = \sum_i \Delta H_i \tag{4.1}$$

Die für die Teilschritte ermittelten Werte müssen sich aufaddieren zu dem Wert der Enthalpieänderung, der beim Durchlaufen des gesamten Zyklus gemessen wird.
Im folgenden wird der GTPase-Zyklus des Transducins vereinfacht in drei Schritte aufgeteilt:

1 Bildung des R*G-Komplexes

2 Dissoziation des Komplexes

3 Hydrolysereaktion von G_{GTP} zu G_{GDP}



Bei dieser Unterteilung des G-Protein-Zyklus werden zunächst Reaktionen wie z. B. die Bindung von GTP an Transducin oder die Dissoziation bzw. Assoziation der G_α- und $G_{\beta\gamma}$-Untereinheiten nicht einzeln berücksichtigt. Die Enthalpieänderungen für die drei Teilschritte sind als Summe aus weiteren Einzelreaktionen zu betrachten. Diese Einzelreaktionen und deren Beitrag zur Enthalpieänderung werden im Kapitel Diskussion näher besprochen.
In Kapitel 3 wurde die Enthalpieänderung betrachtet, die durch den Ablauf des ganzen G-Protein-Zyklus hervorgerufen wird. Da gezeigt wurde, daß die gemessene Wärme nur von der Konzentration des zutitrierten GTP abhängig ist, liegt zunächst die Vorstellung nahe, daß die resultierende Wärme allein der Hydrolyse von G_{GTP} zu G_{GDP} zuzuschreiben ist. Die Enthalpieänderungen durch Bildung und Dissoziation des R*G-Komplexes müßten sich folglich aufheben. Bei genauerer Betrachtung ist dies jedoch nicht die einzig mögliche Erklärung. Die Wärmeabgabe, die bei Durchlaufen des ganzen Zyklus gemessen wurde, erlaubt keine Aussage über die Enthalpieänderungen der Teilschritte. Es muß berücksichtigt werden, daß ein Teil der Energie des GTP zunächst in Arbeit umgewandelt werden kann, um beispielsweise eine Konformationsänderung an einem Protein durchzuführen. Dieser Beitrag wird im Laufe des Zyklus wieder frei (wenn die Konformationsänderung rückgängig gemacht wird), so daß die Enthalpieänderung des gesamten Zyklus davon unbeeinflußt bleibt. Jedoch kann ein Protein, das während des

Zyklus verschiedene Zustände durchläuft, in Abhängigkeit von seinem Zustand unterschiedliche innere Energien aufweisen.
In den nachfolgenden Unterkapiteln werden Experimente beschrieben, in denen die Teilschritte des G-Protein-Zyklus betrachtet werden. Das Ziel hierbei ist, aufzuklären, welchen Beitrag Komplexbildung, Komplexdissoziation und GTP-Hydrolyse an der Gesamtenthalpieänderung haben.

4.1 Komplexbildung

4.1.1 Titration von Rhodopsin zu G-Protein

Um die Enthalpieänderung bei der Bildung des R*G-Komplexes direkt zu messen wurde Transducin in Abwesenheit von Nukleotiden zu belichtetem Rhodopsin titriert. Hierbei handelt es sich nicht wie bisher beschrieben um einen zyklischen Prozeß, sondern um eine Bindungsreaktion. Das charakteristische Wärmesignal einer Bindungsisotherme im Titrationskalorimeter zeigt für die ersten Injektionen größere Signale, entsprechend der Wärme durch Bindung. Im weiteren Verlauf nimmt die Fläche der Injektionen ab, bis schließlich kein Unterschied mehr zum Einspritzartefakt zu erkennen ist, da alle Bindungsstellen besetzt sind. Aus der Messung der Bindungsisothermen läßt sich sowohl die Bindungskonstante als auch die Enthalpieänderung der Reaktion bestimmen.
Damit bei der Messung einer Bindungsisothermen Wärmesignale erzeugt werden, die sich deutlich vom Einspritzartefakt unterscheiden, müssen ausreichend hohe Konzentrationen der Reaktionspartner gewählt werden. Bedingt durch die hohe Verdünnung der zutitrierten Komponente in der verhältnismäßig großen Meßzelle (1.4 ml) ist es sinnvoll, das Protein, welches in höherer Konzentration vorliegt, zuzutitrieren. Da Rhodopsin gegenüber Transducin einfacher aufkonzentriert werden kann, sollte folglich Transducin vorgelegt und Rhodopsin zutitriert werden.
Gibt man belichtetes Rhodopsin in die Titrationsspritze, ist jedoch aufgrund der Sedimentation der Membranen nicht gewährleistet, daß immer die gleiche Menge an Rhodopsin zugespritzt wird. Ferner ist der Einspritzartefakt bei großen Konzentrationsunterschieden sehr groß (siehe Kapitel 2.4). Ein weiteres Problem bei der Titration von Rhodopsin ergibt sich durch den Zerfall von aktivem Rhodopsin. R* ist nur im Beisein von Transducin durch Bildung des R*G-Komplexes stabil. Die Genauigkeit der Messung ist hierdurch beeinträchtigt, da mit zunehmender Dauer immer mehr Rhodopsin bereits zerfallen ist. Auch die Anwesenheit von GDP in der Probe kann zur Verfälschung des Meßwertes beitragen, da die Komplexbildung durch hohe GDP-Konzentrationen beeinträchtigt wird (siehe hierzu Kahlert et al., 1990 [40]; Bruckert et al., 1992 [10]).
Trotz der aufgeführten Schwierigkeiten wurde die Titration von Rhodopsin zu Transducin mit den höchstmöglichen zur Verfügung stehenden Konzentrationen der Proteine durchgeführt (200 µM

Rhodopsin in der Spritze, 4 µM Transducin in der Zelle). Dies entspricht einer Endkonzentration von 0.7 µM Rhodopsin pro Injektion, so daß nach 6 Injektionen die Reaktion gesättigt ist. Die Messung und die zugehörige Kontrolle in Abwesenheit von Transducin sind in Abbildung 18 dargestellt.

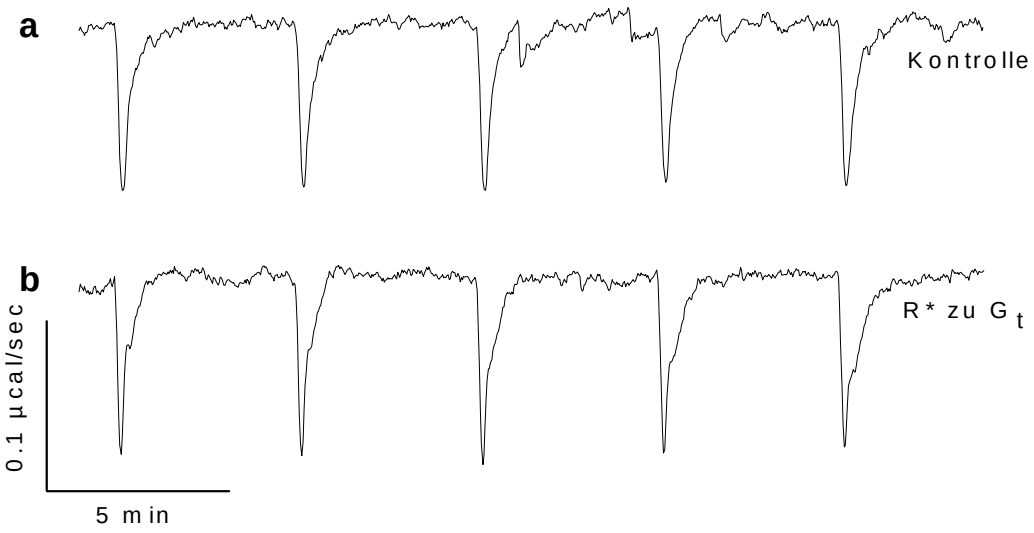


Abbildung 18

Titration von R zu Transducin zur Bestimmung der Enthalpieänderung bei Komplexbildung*

Spur a zeigt das Kontrollexperiment, die Titration einer 200 µM Lösung von belichtetem Rhodopsin in WM zu BTP-Puffer. Spur b zeigt eine Messung, bei der 4 µM Transducin in der Meßzelle vorgelegt wurden. Die Endkonzentration von R betrug in beiden Messungen 0.7 µM pro Injektion. Das Wärmesignal der Bindungsmessung unterscheidet sich nicht von der Kontrolle.*
Die Experimente wurden bei 10 °C in BTP-Puffer (pH 7.5) durchgeführt.

Als erste Näherung für die Enthalpieänderung der Komplexbildung kann eine Abschätzung aus der Fläche des Wärmesignals vorgenommen werden. Um eine Reaktion von dem Einspritzartefakt deutlich trennen zu können, sollte sie eine Wärme hervorrufen, die einer Fläche größer als 5 µcal entspricht. Je größer der Artefakt ist, umso schwieriger sind sehr kleine Reaktionswärmen zu isolieren. Bei den durchgeführten Titrationsexperimenten betrug die maximal durch das zutitrierte Rhodopsin bewirkte Konzentrationsänderung Δc in der Zelle 0.7 µM. Aus diesen Werten und dem Zellvolumen (1.4 ml) läßt sich der größtmögliche Wert für die Enthalpie der Komplexbildung abschätzen. Die Fläche unter dem Signal, das durch die Reaktion hervorgerufen wird entspricht einer Wärme, die kleiner als 5 µcal ist (-5 µcal < Q < 5 µcal).
Damit ergibt sich für die Abschätzung der Bildungsenthalpie ΔH_B aus

$$\Delta H_B = \frac{Q}{V \cdot \Delta c} \tag{4.2}$$

ein Intervall von -5 kcal/Mol < ΔH_B < 5 kcal/Mol.

Diese Abschätzung der Enthalpieänderung der Komplexbildung ist recht unbefriedigend.
Eine Erklärungsmöglichkeit für das Ausbleiben einer erkennbaren Reaktion könnte die zu geringe Rhodopsinkonzentration aufgrund des Zerfalls von R* sein. Dadurch wäre die Konzentration des gebildeten Komplexes zu niedrig um eine meßbare Enthalpieänderung zu erzeugen.

4.1.2 Variation der Rhodopsinkonzentration

Da eine isolierte Betrachtung der Komplexbildungsreaktion offensichtlich nicht möglich ist, muß die Information über die Wärme dieses Schrittes aus dem Ablauf des gesamten Zyklus gewonnen werden. Um Aufschluß darüber zu bekommen, wie sich die Schritte, an denen Rhodopsin beteiligt ist auf den Gesamtverlauf des Wärmesignals auswirken, wurden Experimente mit verschiedenen Rhodopsinkonzentrationen durchgeführt.

a. Variation der Konzentration der Gewaschenen Membranen (WM)

Gibt man verschiedene Konzentrationen von Rhodopsin vor, so hat das einen Einfluß auf die Reihenfolge der Reaktionen im Zyklus. Liegt Rhodopsin gegenüber Transducin im Überschuß vor (10 µM Rhodopsin, 1 µM Transducin), so sind sämtliche vorhandenen G_t-Moleküle als Komplex gebunden und das System muß erst die Hydrolysereaktion durchlaufen, bevor wieder G_t-Moleküle zur Komplexbindung zur Verfügung stehen. Im Falle von G_t-Überschuß hingegen (0.1 µM Rhodopsin, 1 µM Transducin) kann höchstens die der Rhodopsinkonzentration entsprechende Menge als Komplex vorliegen. Erst wenn durch GTP-Zugabe die Komplexdissoziation erfolgt ist, kann mit dem dissoziierten R* ein neuer Komplex gebildet werden. Geht man davon aus, daß die Hydrolyse den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Zyklus darstellt (eine Begründung für diese Annahme wird später (Kap. 4.2.1) gegeben), so sind im Falle eines R*-Überschusses die Komplexdissoziation und die -bildung zeitlich durch den Hydrolyseschritt getrennt. Liegt dagegen G_t im Überschuß vor, laufen die beiden Prozesse unmittelbar hintereinander ab und sind im Verlauf des Wärmesignals nicht zu trennen.
Diese unterschiedlichen Versuchsbedingungen sollten sich insbesondere auf den Anfangsverlauf des Wärmesignals einer Injektion auswirken.

Einfluß der Konzentrationsänderung der WM auf das Wärmesignal

Abbildung 19 zeigt Messungen des gesamten G-Protein-Zyklus bei drei verschiedenen Konzentrationen von gewaschenen Membranen und gleichbleibenden Mengen an Transducin (1 µM) und GTP (3 µM pro Injektion).

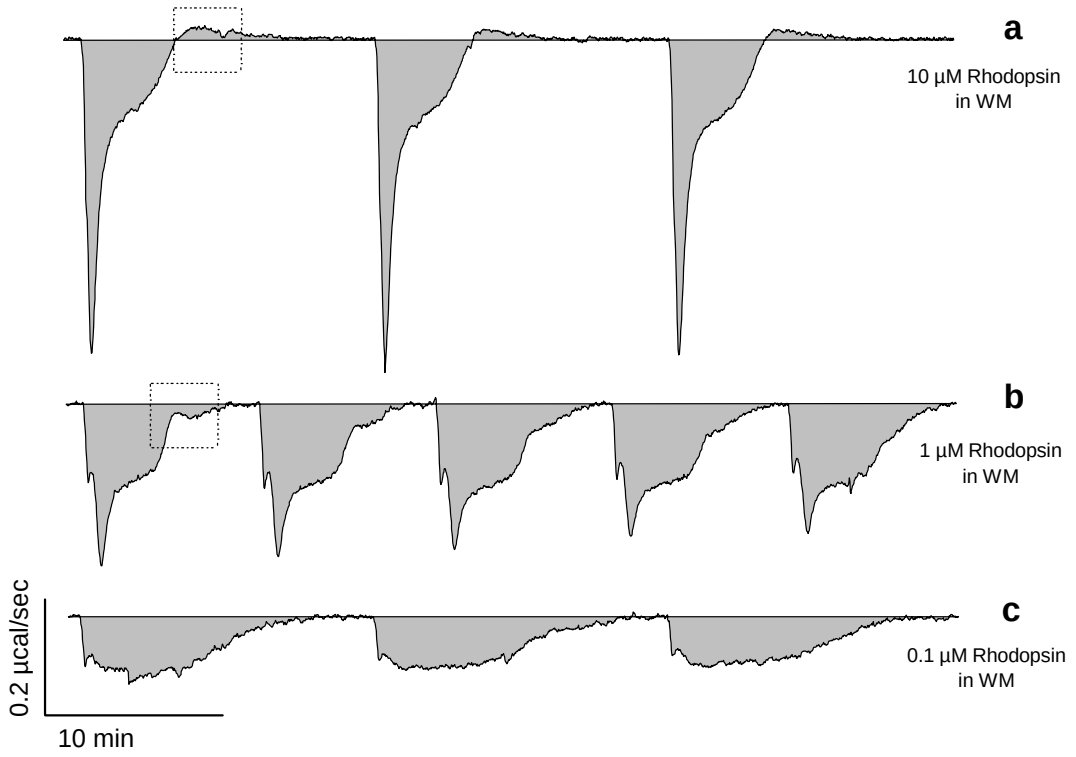


Abbildung 19
Variation der Konzentration von Rhodopsin in WM

Je 3 µM GTP wurden pro Injektion zu 1 µM Transducin und verschiedenen Konzentrationen von Rhodopsin in gewaschenen Membranen titriert (10 µM Rhodopsin in WM in Spur a, 1 µM in Spur b und 0.1 µM in Spur c). Die erste Phase der Injektion ist sehr stark von der Rhodopsinkonzentration abhängig. Bei der Messung mit 10 µM Rhodopsin ist ein ausgeprägter exothermer Peak zu beobachten, der mit geringerer Konzentration abnimmt und bei Vorgabe von 0.1 µM Rhodopsin gar nicht zu erkennen ist. (Der kleine exotherme Peak unmittelbar nach dem Einspritzen in Spur c und die kleine Spitze auf der jeweils ersten Flanke bei Messung b sind dem Einspritzartefakt zuzuordnen.) Ferner ist in Abhängigkeit von der Rhodopsinkonzentration in der letzten Phase einer Injektion ein endothermer Anteil an der Enthalpieänderung zu erkennen (markiert durch ein gestrichelt gezeichnetes Quadrat). Die dargestellten Messungen wurden bei 10 °C in BTP-Puffer durchgeführt.

Sehr auffällig ist die starke Abhängigkeit der ersten Phase der Injektion von der vorgelegten WM-Konzentration. Bei der Messung mit 10 µM Rhodopsin in WM (a) ist die erste Phase sehr deutlich ausgeprägt. Gibt man hingegen nur 0.1 µM WM (c) vor, so bildet sich diese Phase gar nicht ab. Die zweite Phase des Wärmesignals erscheint bei geringer Rhodopsin-Konzentration verlängert. In der dritten Phase ist in Spur a und b ein Anteil einer endothermen Reaktion zu sehen (markiert durch ein gestrichelt gezeichnetes Quadrat), der in Spur c nicht erkennbar ist. Die starke Abhängigkeit der ersten Phase von der Rhodopsinkonzentration zeigt, daß sich hier ein Vorgang abbildet, der direkt von Rhodopsin abhängt. Da bei Vorgabe von 10 µM Rhodopsin die Probe vor der Reaktion als R*G-Komplex vorliegt, ist die erste Reaktion, die durch GTP ausgelöst wird die Dissoziation des Komplexes. Folglich würde sich die Dissoziation in der ersten Phase des Wärmesignals abbilden. Entsprechend ist die Rückbildung des Komplexes, nach

vollendeter Hydrolyse des zugegebenen GTP, als endothermer Anteil in der dritten Phase des Signals zu erkennen. Komplexbildung und -dissoziation sind im Fall geringer WM-Konzentrationen überlagert und daher bei der Messung mit nur 0.1 µM WM nicht getrennt im Wärmesignal zu erkennen.

Abbildung 19 zeigt nur die ersten 50 min der Messungen. Betrachtet man die Meßkurve, die mit 10 µM Rhodopsin aufgenommen wurde in ihrer gesamten Dauer von 3 Stunden, so stellt man fest, daß sich die zeitliche Verteilung der Wärmeabgabe von der ersten zur letzten (10ten) Injektion verändert. In Abbildung 20 sind die 1., die 7. und die 10. Injektion der genannten Messung übereinander abgebildet.

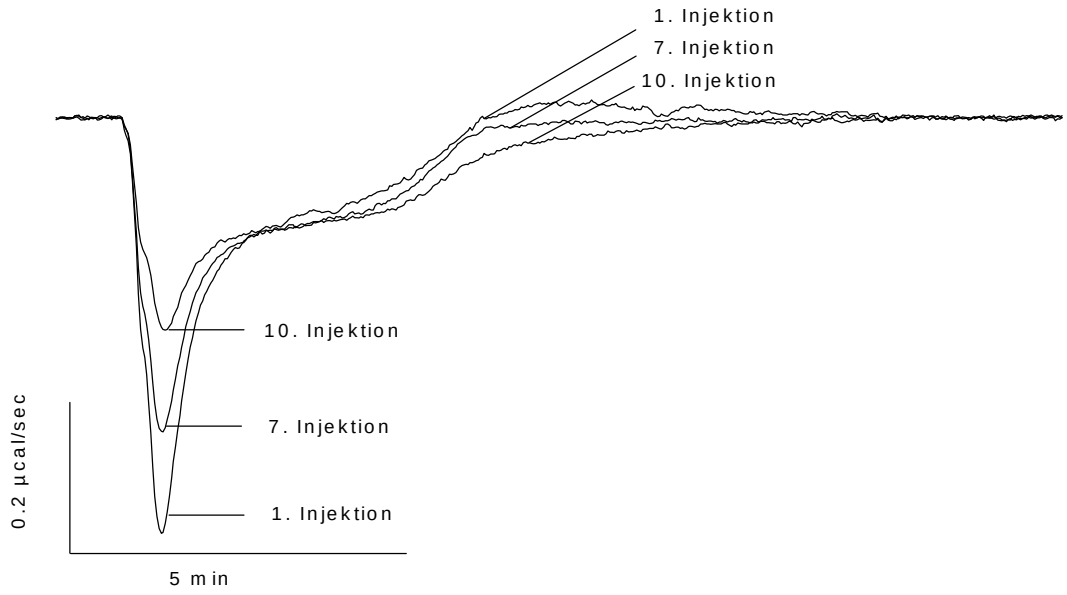


Abbildung 20
Veränderung des Wärmesignals des G-Protein-Zylus durch den Zerfall des aktiven Rhodopsins
Gezeigt sind drei Injektionen der gleichen Messung von jeweils 3 µM GTP zu 10 µM Rhodopsin in gewaschenen Membranen in Anwesenheit von 1 µM Transducin. Die Messung wurde in BTP-Puffer bei 10 °C durchgeführt. Dargestellt sind die 1. Injektion (ca. 15 min nach Einfüllen der Probe) (a), die 7. Injektion (nach ca. 2 Stunden) (b) und die 10. Injektion (nach etwa drei Stunden) (c). Die größte initiale Wärmeproduktion wird bei der ersten Injektion hervorgerufen. Der exotherme Charakter dieser Teilreaktion nimmt bei weiteren Injektionen ab. Die Schlußphase späterer Injektionen verläuft hingegen auf einem stärker exothermen Niveau, der endotherme Anteil, der in den ersten Injektionen auffällt verschwindet mit zunehmender Zeit.

Der exotherme Peak ist bei der ersten Injektion sehr viel stärker ausgeprägt, als bei der zehnten, wohingegen zu einem späteren Zeitpunkt die Schlußphase der Injektion unter größerer Wärmeabgabe verläuft. Diese zeitliche Veränderung des Signals ist bedingt durch den Zerfall des belichteten Rhodopsins im Laufe der Messung. Die starke Abhängigkeit dieser Phasen des Signals von der vorgelegten Rhodopsinkonzentration ist im Einklang mit der Zuordnung zu Reaktionen, an denen Rhodopsin unmittelbar beteiligt ist. Da vor der Titration von GTP das System

als R*G-Komplex vorliegt, kann man annehmen, daß die erste nach dem Einspritzen ablaufende Reaktion die Dissoziation des vorliegenden Komplexes ist. Somit läßt sich der erste exotherme Peak der Injektion der Dissoziation von R* und G_t zuordnen. Die endotherme Schlußphase kann als Abbild der Bildung des Komplexes nach vollendeter Hydrolyse des Systems interpretiert werden. Beide Prozesse sind mit größerer R*-Konzentration stärker ausgeprägt. Dies läßt eine erste Vermutung über die Enthalpieänderungen der Teilreaktionen zu: die Dissoziation des Komplexes entspricht einer Wärmeabgabe, während die Enthalpieänderung bei der Bildung des Komplexes endotherm ist.

Einfluß der Konzentrationsänderung der WM auf das Fluoreszenzsignal

Durch die Verwendung von Rhodopsin in gewaschenen Diskmembranen, geht die Variation der R*-Konzentration einher mit einer gleichzeitigen Variation der Menge an Membranen. Um den Einfluß unterschiedlicher Membranmengen auf die Kinetik des G-Protein-Zyklus zu untersuchen, wurden Fluoreszenzsignale mit unterschiedlichen Konzentrationen an WM aufgenommen. Dies ist in Abbildung 21 gezeigt. Zu 1 µM Transducin und 10 µM WM (Spur a), bzw. 1 µM WM (Spur b) oder 0.1 µM WM (Spur c) wurden unterschiedliche GTP-Mengen injiziert (1. Inj. 3.5 µM GTP, 2. Inj. 1 µM GTP, 3. Inj. 0.6 µM GTP). Das Niveau maximaler Fluoreszenzänderung wurde durch Zugabe von GTPγS im Überschuß (3.5 µM GTPγS) erreicht.

Die abgebildeten Daten zeigen, daß mit abnehmender Konzentration von WM die Dauer der Gesamtreaktion zunimmt. Die Abhängigkeit der Aktivierung von Transducin von der Membrankonzentration (Schleicher et al., 1987 [71]) ist für die aufgenommenen Meßkurven im Inset von Abbildung 21 gezeigt. Hierbei ist die Fluoreszenzänderung bei Zugabe von GTPγS (aus den Meßkurven a - c) vergrößert dargestellt. Je niedriger die Membrankonzentration, desto langsamer ist die Aktivierung von Transducin. Dies macht sich in der Steigung des Fluoreszenzsignals bemerkbar. Bei der Messung mit 0.1 µM WM, wird das Niveau der maximalen G-Protein-Aktivität später erreicht, als bei höheren WM-Konzentrationen. Die verlangsamte Aktivierung führt dazu, daß mit sehr wenig Membranen das Niveau der vollständigen Aktivierung gar nicht erreicht wird, da die Deaktivierung gleichzeitig abläuft.

Bei der Variation der WM-Konzentration wird sowohl die Konzentration von aktivem Rhodopsin, als auch die Membrankonzentration verändert. Die Veränderung der Aktivierungskinetik von Transducin ist auf die Änderung der Membrankonzentration zurückzuführen und nicht auf eine geringere Menge an aktivem Rhodopsin. Um dies zu zeigen, wurde eine Messung durchgeführt, bei der WM eingesetzt wurden, die zuvor bei Raumtemperatur und Tageslicht für eine Stunde ohne die stabilisierende Zugabe von G_t stehen gelassen wurden. Der Zerfall des belichteten Rhodopsins senkt die ursprüngliche R*-Konzentration (10 µM) erheblich (auf ca. 0.5 µM), die Membrankonzentration bleibt jedoch unverändert. Mißt man diese Probe im Vergleich zu einer Probe identischer Zusammensetzung, die 10 µM Rhodopsin in 10 µM Membranen enthält, so zeigt die Fluoreszenzmessung keinen Unterschied in der Kinetik. Das gleiche Experiment durchgeführt als kalorimetrische Messung läßt auch in den Wärmesignalen keinen Unterschied

erkennen. Damit kann die verlangsamte G-Protein-Aktivierung der niedrigen Membrankonzentration zugeschrieben werden. Eine Variation der Rhodopsinkonzentration durch Änderung der Menge an WM beinhaltet folglich zwei Effekte, die im Wärmesignal des Titrationskalorimeters nicht unterschieden werden können.

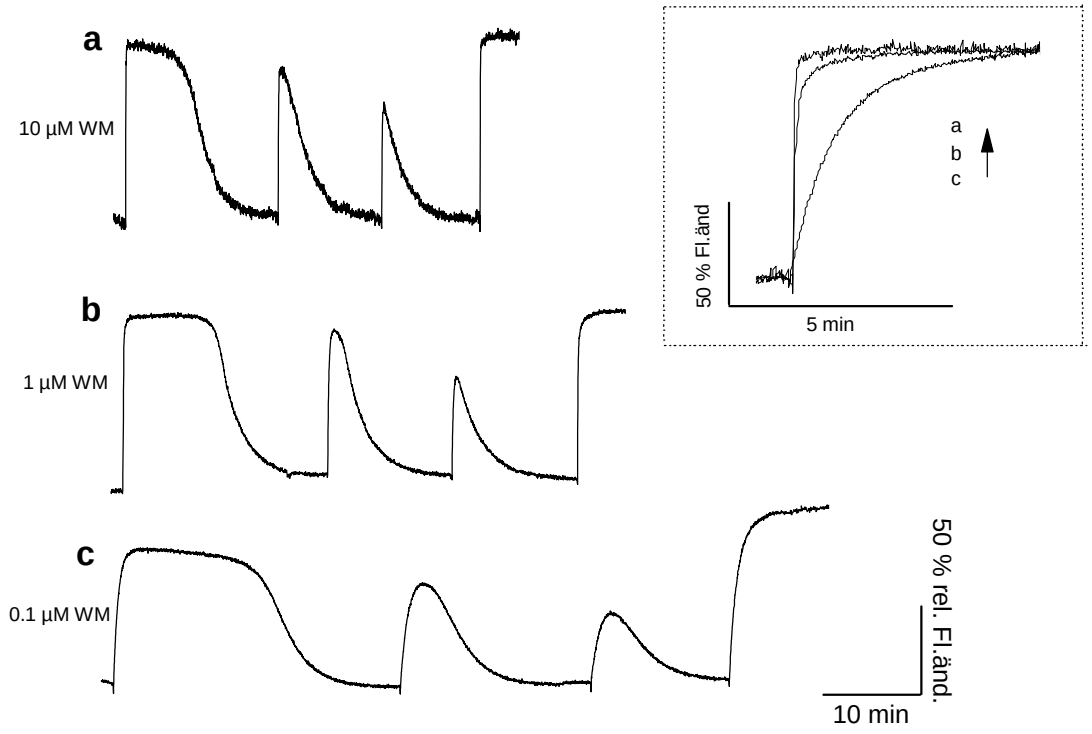


Abbildung 21
Einfluß der Variation der WM-Konzentration auf das Fluoreszenzsignal

Die abgebildeten Spuren wurden unter Vorgabe von 1 µM Transducin und 10 µM WM (a), 1 µM WM (b) und 0.1 µM WM (c) aufgenommen. Die jeweils zugegebenen Injektionen entsprechen einer Endkonzentration von 3.5 µM GTP, 1 µM GTP und 0.6 µM GTP. Um die maximale Fluoreszenzänderung zu erhalten, wurde zum Ende der Messung jeweils 3.5 µM GTPγS zugegeben. Mit abnehmender WM-Konzentration verlängert sich die Dauer der Gesamtreaktion. Bei der Vorgabe von 0.1 µM Rhodopsin wird das Niveau maximaler Fluoreszenzänderung nicht erreicht. In dem Inset der Abbildung ist die Abhängigkeit der Transducinaktivierung von der Membrankonzentration bei Zugabe von GTPγS vergößert dargestellt. Die Messungen wurden bei 10 °C in BTP-Puffer (pH 7.5) durchgeführt.

b. Messungen mit Opsin

Um auszuschließen, daß die Anwesenheit verschiedener Membrankonzentrationen einen Einfluß auf die kalorimetrische Messung ausübt, muß die Konzentration von R* unabhängig variiert werden. Naheliegend ist hierbei, Rhodopsin in Detergens zu solubilisieren. Dies ist jedoch aufgrund der kurzen Lebensdauer von Rhodopsin in solubilisiertem Zustand (ca. 10 min) nicht möglich, da das Titrationskalorimeter nach Einfüllen der Probe in die Zelle eine Equilibrierungszeit von ca. 15 min benötigt.

Um die geforderten Bedingungen hoher Membrankonzentration bei gleichzeitig wenig R* zu gewährleisten, wurde eine Opsinprobe verwendet, die einen geringen Anteil an Rhodopsin enthält. Hierzu wurde bei der Präparation von Opsin aus Stäbchenaußensegmenten die Belichtung so durchgeführt, daß nur ca. 95 % des ursprünglich vorhandenen Rhodopsins zu Opsin zerfallen und die übrigen 5 % als aktivierbares Rhodopsin erhalten bleiben.

Eine Messung mit der so hergestellten Probe ist in Abbildung 22 a gezeigt. In der Meßzelle wurden 1µM Transducin, 9.5 µM Opsin und 0.5 µM Rhodopsin eingesetzt. Die zugegebenen GTP-Injektionen entsprechen einer Endkonzentration von 3.5 µM. Im Wärmesignal dieses Experiments, sind ansatzweise einzelne Phasen zu erkennen (exothermer Peak und Plateauphase). In Spur b ist eine Messung dargestellt, die bei Verwendung von 10 µM WM unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt wurde. Gezeigt sind die zweite und dritte Injektion der Messung sowie die nach drei Stunden zutitrierte, letzte Injektion. Bei den ersten Titrationen ist der exotherme Peak des Wärmesignals sehr ausgeprägt, wohingegen bei der letzten Injektion nur eine Andeutung dieser Phase zu erkennen ist. Der Vergleich von Spur a und b zeigt, daß die Messung mit Opsin und nur geringem Anteil an R* (a), in Bezug auf den Verlauf des Wärmesignals, den späteren Injektionen der WM-Messung (b) sehr ähnlich ist. Dies beweist, daß die Abnahme des exothermen Peaks in Messungen mit Rhodopsin in gewaschenen Membranen dem Zerfall von Rhodopsin entspricht.

Die pro Injektion freigewordene Gesamtwärme hat bei Verwendung der Opsinprobe den gleichen Wert wie bei Messungen mit gewaschenen Membranen. Die Kontrollmessung mit Opsinmembranen, die keinen Anteil an Rhodopsin enthalten, zeigt bei Zugabe von GTP keine Reaktion.

Eine weitere Möglichkeit eine Probe mit geringem Rhodopsin und hohem Membrananteil zu erhalten besteht darin, sehr schwach zu belichten und dadurch nur wenig Rhodopsin zu bleichen. Dazu wurden Messungen durchgeführt, bei denen Rhodopsin vor dem Einfüllen in die Meßzelle gar nicht belichtet wurde. Bedingt durch die Konstruktion des Kalorimeters ist es jedoch nicht möglich völlige Dunkelheit zu gewährleisten. Die automatische Positionierung der Titrationsspritze ist durch rote Leuchtdioden geregelt, die ständig in Betrieb sind. Das Licht dieser Dioden, das beim Einfüllen auf die Probe fällt, reicht aus, um einen geringen Teil des Rhodopsins zu bleichen. Das Meßergebnis entspricht dem des vorangehend beschriebenen Experiments, dessen Probe neben einem großen Anteil an Opsin einen geringen Prozentsatz an

Rhodopsin enthält. Damit ist gezeigt, daß durch die Opsinpräparation der Anteil an unbelichtetem Rhodopsin nicht beeinträchtigt wird.

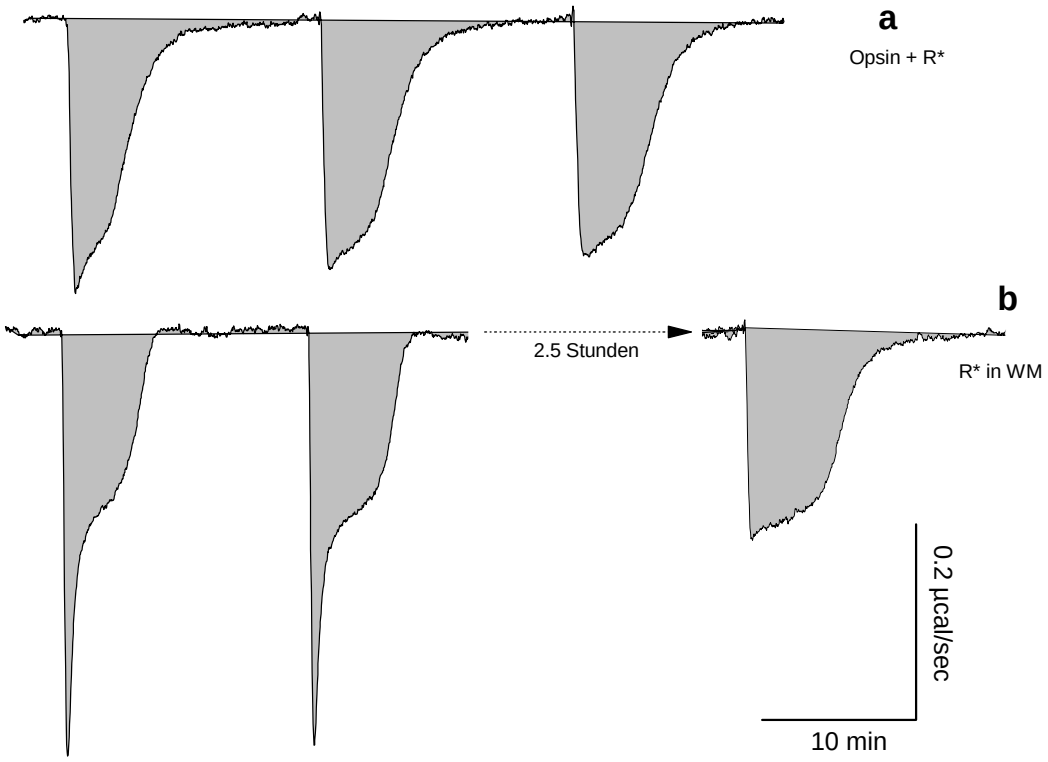


Abbildung 22

Einfluß des Zerfalls von belichtetem Rhodopsin auf den exothermen Peak des Wärmesignals

a Dargestellt ist eine Messung des G-Protein-Zyklus, bei der GTP zu Transducin und Opsin mit geringem Rhodopsinanteil titriert wurde. Bei der Präparation von Opsin aus Stäbchenaußensegmenten wurde so verfahren, daß ein geringer Anteil des Rhodopsins erhalten blieb. Man erhält eine Probe mit hohem Membrananteil und geringer Rhodopsinkonzentration. (Probenzusammensetzung: ca. 5 % R und 95 % Opsin bei einer Membrankonzentration von 10 µM, 1 µM Transducin; pro Injektion wurden 3.5 µM GTP zugegeben. Meßbedingungen: BTP-Puffer pH 7.5, 10 °C)*

b. Zu einer Probe aus 10 µM Rhodopsin in gewaschenen Membranen und 1 µM Transducin wurden je 3.5 µM GTP gegeben (Meßbedingungen siehe a). Dargestellt sind die zweite und dritte GTP-Injektion sowie die letzte Zugabe von GTP.

Die Messung mit geringem Rhodopsin- und hohem Opsinanteil (a) zeigt ein ähnliches Verhalten wie Messung (b) in einer der späteren Injektionen. Das Verschwinden des exothermen Peaks des Wärmesignals läßt sich damit zurückführen auf den Zerfall von R im Laufe der Zeit.*

4.1.3 Variation der $G_{\beta\gamma}$-Konzentration

In den bisherigen Untersuchungen des G-Protein-Zyklus wurden zwei verschiedene Wege gewählt, die Menge an gebildetem R*G-Komplex zu variieren. Zum einen wurde in verschiedenen Experimenten die Konzentration von Rhodopsin variiert (Kapitel 4.1.2), zum anderen wurde die Komplexbildung durch unterschiedliche Mengen an Transducin gesteuert (Kapitel 3.5). Hierbei ist zu berücksichtigen, daß durch die Vorgabe verschiedener Transducin-Konzentrationen sowohl die Menge an gebildetem Komplex, als auch die Menge an aktivierbarem G_α verändert wird.

Eine weitere Möglichkeit, die Komplexbildung zu beeinflussen, ohne jedoch die Menge an aktivierbarem Transducin zu verändern, besteht darin, die Konzentration der $G_{\beta\gamma}$-Untereinheit zu variieren. Da R* nur an das Holo-Protein Transducin bindet, kann durch Variation der $G_{\beta\gamma}$-Konzentration, bei konstanter G_α– und R*-Konzentration, das Ausmaß der R*G-Komplexbildung bestimmt werden. Liegt G_α gegenüber $G_{\beta\gamma}$ im Überschuß vor, so bedeutet dies, daß die Konzentration des gebildeten Komplexes durch die Konzentration von $G_{\beta\gamma}$ limitiert ist.

Die Messungen, die unter Variation der $G_{\beta\gamma}$–Konzentration durchgeführt wurden, sind in Abbildung 23 dargestellt. Die vorgegebene Rhodopsinmenge (10 µM Rhodopsin in WM) und die G_α–Konzentration (1 µM) blieben hierbei konstant. Um die zusätzliche Schwierigkeit der Überlagerung von Pufferprotonierungsreaktionen zu vermeiden, wurden die Messungen in Phosphatpuffer durchgeführt, der eine geringere Protonierungswärme als BTP-Puffer aufweist. Spur b zeigt eine Messung mit einem Verhältnis von G_α zu $G_{\beta\gamma}$ von 1:1. Hierbei sind die einzelnen Phasen der Wärmeabgabe am deutlichsten zu unterscheiden. Messungen a und c zeigen trotz unterschiedlichen Konzentrationen von $G_{\beta\gamma}$ (3 µM $G_{\beta\gamma}$ in Spur a und 0.5 µM $G_{\beta\gamma}$ in Spur c) einen sehr ähnlichen Verlauf des Wärmesignals. Die zweite und dritte Phase der Signale lassen sich nicht gegeneinander abgrenzen. Betrachtet man den exothermen Peak der beiden Messungen, so ist im Falle der höheren Konzentration an $G_{\beta\gamma}$ die Fläche dieses Peaks kleiner als bei der Probe mit 0.5 µM $G_{\beta\gamma}$. Eine Erklärung dieser Beobachtung konnte bisher nicht gefunden werden. Möglicherweise ist dieses Verhalten dadurch zu begründen, daß eine von der Konzentration der $G_{\beta\gamma}$-Untereinheit abhängige Reaktion mit endothermen Charakter der Komplexdissoziation überlagert ist.

Ein Unterschuß von $G_{\beta\gamma}$ hat bei den verwendeten Konzentrationen nur dann eine Auswirkung auf die Aktivierung der G_α-Untereinheit, wenn das Konzentrationsverhältnis von $G_{\beta\gamma}$ zu G_α kleiner als 1:10 wird (Spur d) (siehe hierzu auch Phillips und Cerione, 1988 [67]). Bei einem sehr geringen Anteil der $G_{\beta\gamma}$-Untereinheit ist der Durchlauf des Zyklus verlangsamt. Dies ist sowohl aus der verlängerten Gesamtdauer als auch aus der Betrachtung des exothermen Peaks zu erkennen. Diese Beobachtung ist jedoch nicht allein der geringen Konzentration der $G_{\beta\gamma}$-Untereinheit zuzuschreiben. Da lichtaktiviertes Rhodopsin nur durch Bindung an das Holo-Protein Transducin stabilisiert werden kann, ist bei der gegebenen $G_{\beta\gamma}$-Konzentration von 0.1 µM nur 0.1 µM R*

gebunden. Ferner zerfällt R* im Laufe einer Messung. Bei den gezeigten Injektionen in Spur d handelt es sich um einen Ausschnitt der Messung, ca. 40 min nach Start des Experiments. Vermutlich ist bereits soviel R* zerfallen, daß der Ablauf des Zyklus hiervon beeinflußt ist. Diese Messung kann daher nicht ausgewertet werden.

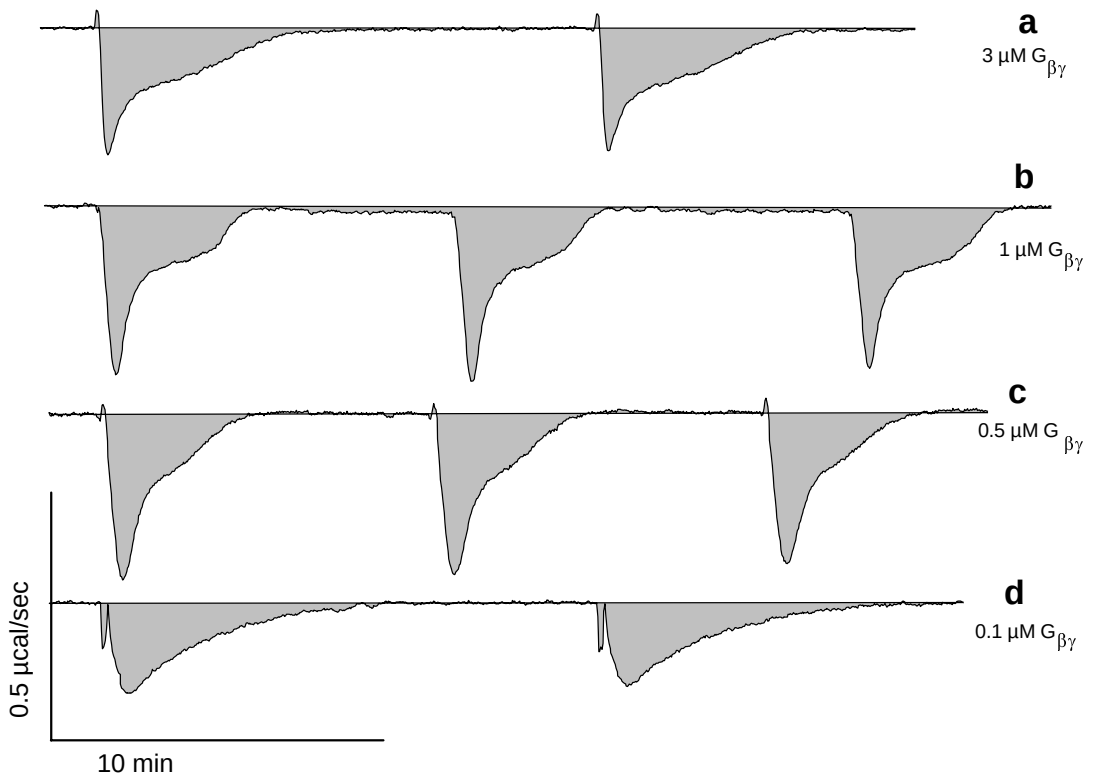


Abbildung 23
Variation der Konzentration der $\beta\gamma$-Untereinheit des Transducins

In der Meßzelle des Kalorimeters wurde eine Probe aus 10 µM Rhodopsin in WM, 1 µM G_{α} und 3 µM $G_{\beta\gamma}$ (a), 1 µM $G_{\beta\gamma}$ (b), 0.5 µM $G_{\beta\gamma}$ (c) bzw. 0.1 µM $G_{\beta\gamma}$ (d) vorgegeben. Pro Injektion wurden jeweils 3.5 µM GTP zutitriert. Die Messungen wurden bei 10 °C in Phosphatpuffer durchgeführt.
Bei einem Verhältnis von G_{α} zu $G_{\beta\gamma}$ von 1:1 (b) sind die einzelnen Phasen des Wärmesignals am deutlichsten ausgebildet, während sowohl die Messung mit 3 µM $G_{\beta\gamma}$ (a) als auch mit 0.5 µM $G_{\beta\gamma}$ (c) eine Unterscheidung von zweiter und dritter Phase nicht zulassen. Der Verlauf des Signals ist bei diesen beiden Messungen sehr ähnlich, insbesondere ist der exotherme Peak in der ersten Phase des Wärmesignals kleiner als bei einem Konzentrationsverhältnis von G_{α} zu $G_{\beta\gamma}$ von 1:1. (Der kleine Peak unmittelbar nach der GTP-Zugabe in Spur a ist durch den Einspritzartefakt zu erklären.) Erläuterungen zu Spur d siehe Text.

Wie Abbildung 23 zeigt, ist es auch durch die Variation des Verhältnisses von G_{α}- zu $G_{\beta\gamma}$-Untereinheit nicht möglich, die Teilreaktionen des Zyklus soweit zu trennen, daß die Enthalpieänderungen der einzelnen Schritte isoliert werden könnten. Statt dessen stellt sich die Frage, wieso das Wärmesignal des G-Protein-Zyklus bei einem Überschuß an $G_{\beta\gamma}$ gegenüber G_{α} einen

kleineren exothermen Peak und eine schlechtere Unterscheidung der einzelnen Phasen aufweist, als im Fall des 1:1 Verhältnisses.

4.2 Komplexdissoziation

In diesem Kapitel werden weitere Möglichkeiten untersucht, das Wärmesignal des G-Protein-Zyklus, das durch Titration von GTP zum R*G-Komplex hervorgerufen wird, in Teilschritte zu unterteilen, um so partielle Enthalpieänderungen messen zu können. Die hier beschriebenen Verfahren dienen insbesondere dazu, die Enthalpieänderung bei der Dissoziation des R*G-Komplexes zu ermitteln.

4.2.1 Betrachtung des exothermen Peaks des Wärmesignals

In vorangehenden Kapiteln wurde der erste exotherme Peak des Wärmesignals der Dissoziation des R*G-Komplexes zugeordnet. Da aus der Variation der Rhodopsinkonzentration keine Aussage über die Größe der Enthalpieänderung gemacht werden konnte, werden in diesem Kapitel Überlegungen vorgestellt, die eine Abschätzung des gesuchten Wertes erlauben. Dazu wird das Wärmesignal bei mehrfachem Durchlaufen des Zyklus in seinen einzelnen Phasen betrachtet. In der gegebenen Darstellung des Wärmesignals als Leistung pro Zeiteinheit, kann eine geschwindigkeitsbestimmende Reaktion nur durch ein Plateau oder eine Gerade gegeben sein, niemals durch eine Spitze. Betrachtet man beispielsweise Abbildung 12, so bildet sich offensichtlich die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion des Zyklus in der zweite Phase des Wärmesignals einer Injektion ab. Diese Phase wird durch die Hydrolyse von GTP zu GDP geprägt. Bei dem ersten exothermen Peak des Wärmesignals muß es sich folglich um eine oder mehrere Reaktionen handeln, die vor der Hydrolyse ablaufen. In Frage kommen hierfür die Bildung und die Dissoziation des R*G-Komplexes. Gibt man in der Probenzelle einen Überschuß von Rhodopsin im Verhältnis zu Transducin (10 : 1) vor, so kann man davon ausgehen, daß sämtliche G-Proteine in Form des Komplexes gebunden sind. Die Komplexbildungsreaktion kann erst stattfinden, nachdem einige G-Proteine die Hydrolyse durchlaufen haben. In diesem Fall ist die erste Phase, der exotherme Peak einer Injektion, ausschließlich der Dissoziation des Komplexes zuzuordnen.
In Abbildung 24 ist dargestellt, wie nach dieser Interpretation die Wärme der Komplexdissoziation (schraffiert eingezeichnet) auf die Gesamtfläche des G-Protein-Zyklus verteilt ist.

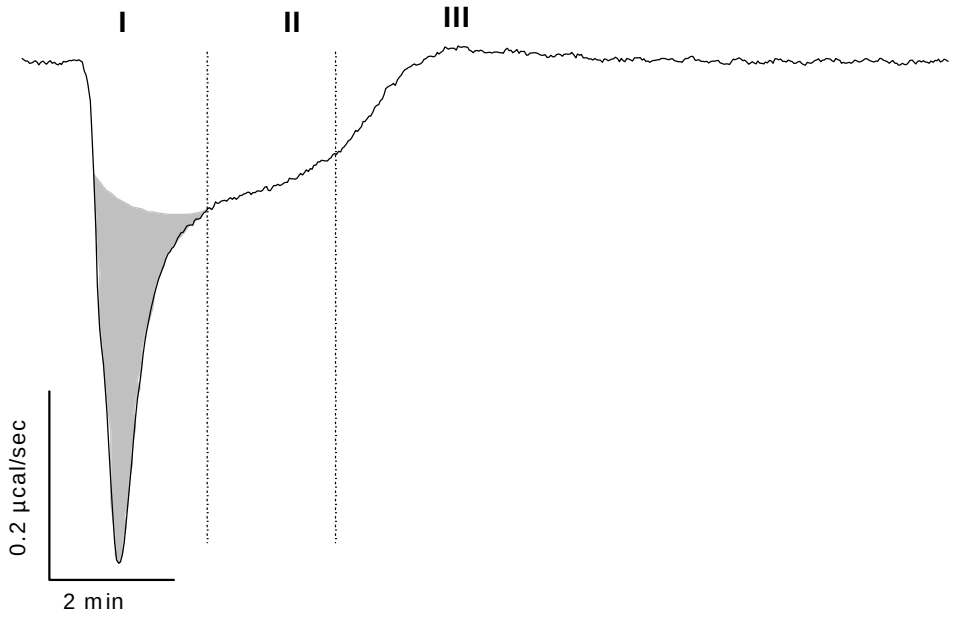


Abbildung 24
Auswertung der ersten Phase des Wärmesignals des G-Protein-Zyklus

*Die abgebildete Injektion entstammt einer Titration von 3.5 µM GTP zu 10 µM Rhodopsin und 1 µM Transducin, durchgeführt bei 10 °C in BTP-Puffer. Die schraffiert eingezeichnete Fläche entspricht der Wärme bei Dissoziation des R*G-Komplexes.*

Für diese Art der Auswertung muß man jeweils eine der ersten Injektionen einer Messung zugrunde legen, da nach längerer Zeit der Zerfall des Rhodopsins zu einem kleineren exothermen Peak führt (siehe Abb. 20). Es ist zu berücksichtigen, daß der Dissoziation des Komplexes die einsetzende Hydrolysereaktion überlagert ist. Hierdurch ergibt sich die Form der betrachteten Fläche. Die Festlegung der Fläche, die der Wärme durch Komplexdissoziation entspricht, ist stark fehlerbehaftet. Jedoch ergibt sich aus mehreren Messungen, bei denen die Fläche der ersten Phase auf diese Weise bestimmt wird, ein Mittelwert, der die Größenordnung der erwarteten Wärme festlegt. Auf diese Weise wurden Messungen in BTP- und Phosphatpuffer ausgewertet.

Tabelle 7 gibt jeweils die Mittelwerte der Flächenberechnungen, sowie den um die Wärme der Pufferprotonierung bereinigten Wert an. Hierbei wurden Titrationen von je 3.5 µM GTP zu 1 µM Transducin und 10 µM Rhodopsin ausgewertet. Die Korrektur der Protonierungswärme, geht davon aus, daß pro Mol dissoziiertem Komplex auch genau ein Mol Protonen frei wird. Der Parameter n gibt die Anzahl der ausgewerteten Messungen an.

Betrachtete Reaktion	Größe der schraffierten Fläche in µcal	ΔH_{obs} in kcal/Mol G_t	ΔH_p in kcal/Mol H+	ΔH_{ges} in kcal/Mol G
R*G → R* + G* *in BTP-Puffer*	- 16 ± 4 n =3	-11.9 ± 3.0	- 10.8 ± 0.5 n = 6	-1.1 ± 3.0
R*G → R* + G* *in Phosphatpuffer*	- 4 ± 2 n =2	-3.0 ± 1.5	- 2.1 ± 0.5 n = 3	- 0.9 ± 1.6

Tabelle 7

Auswertung des exothermen Peaks in BTP- und Phosphatpuffer

Diese Ergebnisse sind durch die abgeschätzte Einzeichnung der Fläche sehr ungenau. Sie erlauben eine Aussage darüber, daß die Enthalpieänderung durch Komplexbildung im Bereich von wenigen kcal pro Mol G-Protein liegt, und daß es sich um eine exotherme Reaktion handelt. Ferner muß berücksichtigt werden, daß nicht zwangsläufig bei der Dissoziation von 1 Mol R*G-Komplex auch genau 1 Mol Protonen freiwerden. Die Bedingungen die diesem von Schleicher und Hofmann (1985) [70] gemessenen Ergebnis zugrunde liegen, entsprechen nicht den Bedingungen im Titrationskalorimeter. Möglicherweise werden hierbei weniger Protonen frei. Damit handelt es sich bei dem abgeschätzten Wert für die durch Komplexdissoziation freiwerdende Wärme um eine untere Grenze.

4.2.2 Messungen mit GTPγS

Verwendet man für die Titrationen statt GTP dessen nicht hydrolysierbares Analogon, GTPγS, so findet keine Hydrolysereaktion im Zyklus statt. Transducin wird aktiviert, und im aktiven Zustand blockiert, so daß der Kreis dadurch unterbrochen wird. Die Wärme, die bei diesem Experiment gemessen wird ist damit für hohe R*-Konzentrationen der Dissoziation des Komplexes zuzuordnen, für niedrige R*-Konzentrationen entspricht sie der Summe aus Komplexbildung und -dissoziation.

Im Unterschied zu den bisherigen Messungen wird das System durch GTPγS in einen irreversiblen Zustand getrieben. Es ist nur solange eine Reaktion zu erwarten, bis sich alle vorhandenen Transducinmoleküle im aktiven Zustand befinden. Wählt man Konzentrationsverhältnisse von 1 µM Transducin und 3.5 µM Nukleotid pro Injektion, so ist die vollständige Aktivierung bereits durch die erste Injektion eingetreten, jede weitere Zugabe von GTPγS ruft nur noch einen Einspritzartefakt hervor.

Im Allgemeinen ist das Titrationsvolumen der ersten Injektion sehr viel stärker fehlerbehaftet als das der folgenden. Da durch das Einsetzen der Titrationsspritze in die Halterung die lange Nadel leicht gebogen wird, kann eine kleine Menge der Titrationslösung austreten. Dies hat zu Folge,

daß bei der ersten Injektion durch Hinunterdrücken des Stempels ein geringeres Volumen zutitriert wird als angenommen. Die Fläche, die der Wärme der ersten Injektion entspricht ist damit kleiner als die der folgenden Injektionen. Liegt GTPγS gegenüber G_t im Überschuß vor, so spielt dieser Fehler keine Rolle, da bereits ein Teil des GTPγS ausreicht, um das vorhandene Transducin zu aktivieren.

Gibt man in der Meßzelle eine Probe vor, bei der Rhodopsin gegenüber Transducin im Überschuß vorliegt so sind alle vorhandenen G-Proteine als Komplex gebunden. Bei Zugabe von GTPγS läuft die Dissoziation des Komplexes als einzige Reaktion ab, so daß die hierdurch bewirkte Enthalpieänderung dem Dissoziationsschritt entspricht. Diese Messung ist in Abbildung 25 a dargestellt. Unter den gegebenen Bedingungen zeigt nur die erste Injektion eine Reaktion, da bereits durch einmalige GTPγS-Zugabe das gesamte Transducin aktiviert wird. Wertet man die Fläche dieser Injektion aus, so ist zu berücksichtigen, daß bei der Dissoziation des Komplexes ein Proton an den Puffer abgegeben wird. Für die Dissoziation von R* und G_t ergibt sich unter Berücksichtigung der Protonierungswärme die Enthalpieänderung

$$\Delta H_{diss} = -4.4 \text{ kcal/Mol}$$

Wählt man für das Experiment Bedingungen, bei denen Transducin gegenüber dem belichteten Rhodopsin im Überschuß vorliegt (2 µM Transducin, 0.1 µM Rhodopsin), so zeigt die Titration mit GTPγS nicht nur die Wärme der Dissoziation des Komplexes, sondern auch die Enthalpieänderung, die durch Bildung des Komplexes hervorgerufen wird. Da Rhodopsin im Unterschuß vorliegt, kann zunächst nur ein Teil des G-Proteins als Komplex gebunden werden. Nachdem GTPγS zugegeben wurde und dadurch der komplexgebundene Anteil von G_t in den aktiven Zustand versetzt wurde, kann das freigewordene R* einen weiteren Teil des Transducins aktivieren. Dieser Vorgang wiederholt sich solange, bis die vollständige Aktivierung erreicht ist. Die Wärme, die unter diesen Konzentrationsverhältnissen gemessen wird, muß als Summe von Komplexbildung ΔH_b und Komplexdissoziation ΔH_{diss} betrachtet werden. Dieses Experiment ist in Abbildung 25 b dargestellt.

Die GTPγS-Konzentration wurde bei Spur b zu 4.6 µM pro Injektion gewählt, dadurch tritt hier ein endothermer Artefakt durch Verdünnung auf (siehe hierzu auch Kapitel Vorversuche). Da bei der Bildung des R*G-Komplexes ein Proton aus der wäßrigen Lösung aufgenommen wird, hingegen bei der Dissoziation ein H^+ frei wird, müssen in der Bilanz keine Protonierungsreaktionen berücksichtigt werden. Damit ergibt sich für die Summe der Enthalpieänderungen der beiden Reaktionen

$$\Delta H_{diss} + \Delta H_b = -2.4 \text{ kcal/Mol}$$

Unter Berücksichtigung des bekannten Wertes für ΔH_{diss} ergibt sich für die Enthalpieänderung durch Komplexbildung

$$\Delta H_b = +2.0 \text{ kcal/Mol}$$

Die errechneten Werte bestätigen die bisherige Interpretation des Wärmesignals des G-Protein-Zyklus: die Enthalpieänderung der Komplexdissoziation ist exotherm und die der Komplexbil-

dung endotherm. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die angegebenen Werte stark fehlerbehaftet sind, da die Berechnung sich nur auf die beiden gezeigten Messungen stützt.

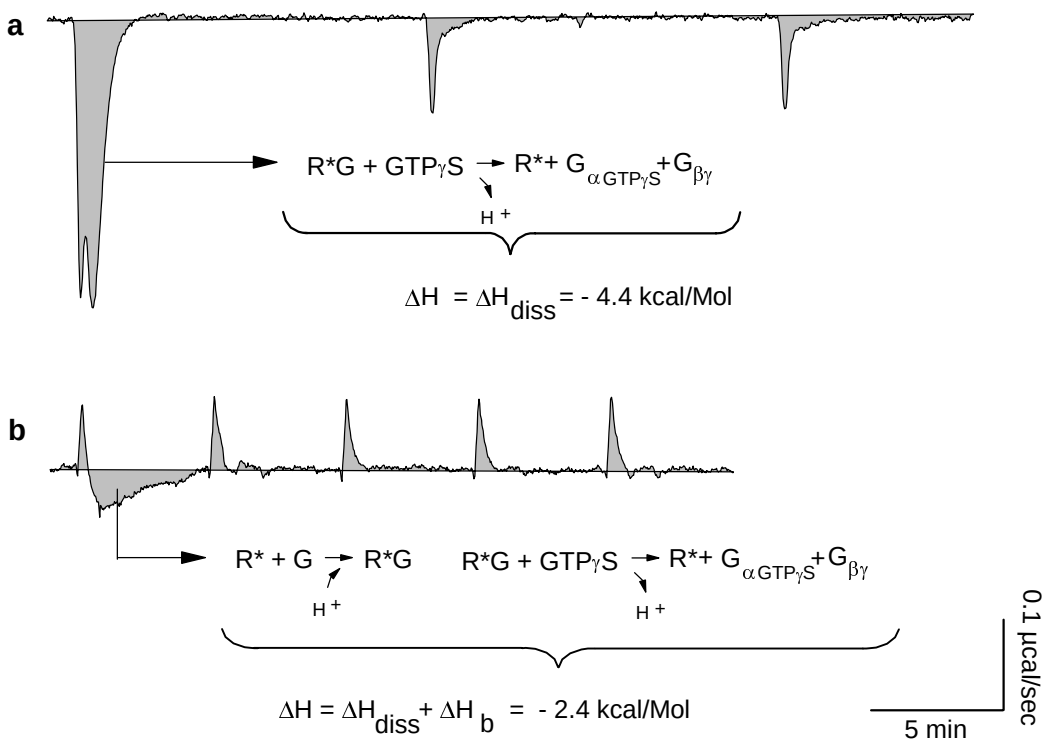


Abbildung 25
*Messung der Dissoziationswärme des R*G-Komplexes bei Titration von GTPγS*

a. Zu 10 µM Rhodopsin und 1 µM Transducin wurden pro Injektion je 3.5 µM GTPγS zugegeben. Die Messung wurde in BTP-Puffer bei 10 °C durchgeführt. Da Transducin durch Zugabe von nichthydrolysierbarem GTPγS im aktiven Zustand blockiert wird, zeigt nur die erste Injektion zeigt eine Reaktion. Der Zyklus wird hierdurch unterbrochen. Unter den gegebenen Bedingungen liegt Transducin vollständig im aktiven Zustand vor und die gemessene Wärme entspricht der Enthalpieänderung durch Komplexdissoziation (ΔHdiss). Der scheinbare Doppelpeak der ersten Injektion ist darauf zurückzuführen, daß der Einspritzartefakt (erster Peak) dem eigentlichen Signal überlagert ist.

b. Gibt man Transducin gegenüber Rhodopsin im Überschuß vor (2 µM G_t, 0.1 µM Rhodopsin) so wird bei Zugabe von GTPγS (4.6 µM pro Injektion) sowohl die Dissoziation als auch die Bildung des Komplexes induziert (Meßbedingungen: BTP-Puffer, 10 °C). Das vorhandene Rhodopsin reicht nicht aus, um 2 µM Transducin auf einmal zu aktivieren. Dadurch ist die Enthalpieänderung durch Komplexbildung (ΔHb) derjenigen durch Dissoziation überlagert.

4.2.3 Einfluß des MI-MII-Gleichgewichtes auf das Wärmesignal

Bei der Betrachtung der Teilreaktionen des G-Protein-Zyklus müssen auch die Wärmetönungen mit einbezogen werden, die durch Übergang des Rhodopsins in verschiedene Intermediate hervorgerufen werden.

Das MI-MII-Gleichgewicht

Für belichtetes Rhodopsin, wie es in der Probenzelle vorliegt, gibt es zwei mögliche Zustände, Metarhodopsin I (MI) und Metarhodopsin II (MII), die in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen (pH und Temperatur) im Gleichgewicht zueinander stehen (Parkes und Liebman, 1984 [66]). Bei alkalischem pH-Wert und niedriger Temperatur liegt das Gleichgewicht auf der Seite von MII. Durch die Bindung an Transducin wird Rhodopsin in die MII-Konformation gezwungen, da MI nicht an G_t bindet (Emeis und Hofmann, 1981 [17]; Hofmann, 1986 [31], 1993 [32]). Nach der Dissoziation des R*G-Komplexes, stellt sich das freigewordene R* (MII) wieder in dem ursprünglichen Gleichgewicht zu MI ein. Die Verschiebung des MI-MII-Gleichgewichtes ist damit der Bildung und der Dissoziation des Komplexes überlagert. In Abbildung 26 sind die beschriebenen Teilreaktionen zur Verdeutlichung in einem Schema dargestellt.

Auswirkungen des MI-MII-Gleichgewichtes auf das Wärmesignal (theoretische Vorhersage)

Aus der Literatur ist bekannt, daß der Übergang von MI zu MII eine endotherme Reaktion darstellt. Cooper und Converse (1976) [13] errechneten aus kalorimetrischen Daten eine Enthalpieänderung von + 10 kcal/Mol für diesen Schritt. Die Berechnungen von Parkes und Liebman (1984) [66] ergaben für die gleiche Reaktion + 18.8 kcal/Mol. Bei Messung der Komplexbildung und -dissoziation im Titrationskalorimeter sollte im Wärmesignal ein Anteil dieser Wärme (entsprechend den Umgebungsbedingungen) auftreten. Hierbei ist in der dritten Phase des Wärmesignals (die der Komplexbildung zugeordnet ist) ein endothermer Anteil zu erwarten, da bei Komplexbildung das MI-MII-Gleichgewicht zu MII hin verschoben wird. In der ersten Phase des Signals (Komplexdissoziation) sollte sich die Einstellung des Gleichgewichtes exotherm abbilden, da ein Teil des dissoziierten MII wieder in die MI-Konformation übergehen wird. Durch Messung des Zyklus bei verschiedenen pH-Werten sollte es möglich sein, auf die Enthalpieänderung der Gleichgewichtsverschiebung zu schließen.

Durch Änderung der Temperatur (wie bereits in Kapitel 3.6 beschrieben) können keine Rückschlüsse auf den Übergang von der MI- in die MII-Konformation gezogen werden. Dies liegt daran, daß Reaktionsraten temperaturabhängig sind, und somit der Verlauf des Wärmesignals durch die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Temperaturen geprägt ist.

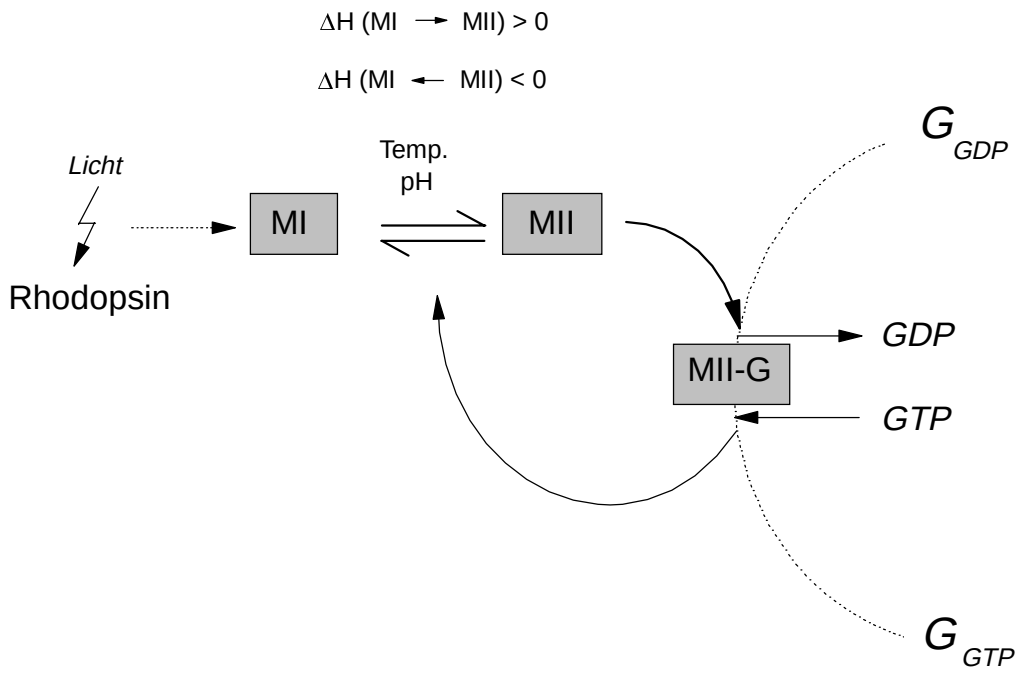


Abbildung 26
Schema des Rhodopsinkreislaufs

Belichtetes Rhodopsin (R) befindet sich in einem Gleichgewicht von Metarhodopsin I (MI) zu Metarhodopsin II (MII). Dieses Gleichgewicht ist abhängig von Temperatur und pH- Wert des umgebenden Mediums. Durch Bindung an Transducin wird das Gleichgewicht auf die Seite von MII verschoben, da nur die MII-Konformation Gt bindet. Nach der GTP-induzierten Komplexdissoziation wird sich das freigewordene Rhodopsin entsprechend den gegebenen Bedingungen wieder in einem Gleichgewicht zu MI einstellen. Diese Verschiebung des MII-MII-Gleichgewichtes sollte sich bei Messung der Enthalpieänderung von Komplexbildung und Dissoziation bemerkbar machen.*

Die pH-Werte der Puffer wurden jeweils bei Raumtemperatur eingestellt, sie verändern sich temperaturabhängig. In Tabelle 8 sind die eingestellten und tatsächlichen pH-Werte der verwendeten Puffer aufgelistet. Die Werte bei 10 °C ergeben sich durch Berechnung aus den Temperaturabhängigkeiten der Puffer (Holtzhauer, 1995) [35].

Aus Parkes und Liebman (1984) [66] folgt, daß bei einem pH-Wert von 7.9 und 10 °C ungefähr 20 % des Rhodopsins in der MII-Konformation und 80 % als MI-Rhodopsin vorliegen. Startet man nun den G-Protein-Zyklus in einem Zustand, bei dem Transducin vollständig als Komplex gebunden ist (Überschuß von Rhodopsin), so kehrt ein Anteil von ca. 80 % des gebundenen Rhodopsins nach der Dissoziation von R* und G_t in den MI-Zustand zurück. Hierbei sollte sich der Übergang als exotherme Reaktion abbilden.

Betrachteter Puffer	pH-Wert bei Raumtemperatur (24 °C)	pH-Wert bei 10 °C
BTP-Puffer	7.5	7.9
BTP-Puffer	6.0	6.3
Phosphatpuffer	7.5	7.6
Phosphatpuffer	6.0	6.1

Tabelle 8

Temperaturabhängigkeit der verwendeten Puffer

Bei einem pH-Wert von 6.3 liegen bei 10 °C ca. 70 % des Rhodopsins als MII vor. Bei der Komplexdissoziation werden höchstens 30 % des gebundenen R* in die Meta-I- Form übergehen.

Da bei Verwendung von Puffer mit einem pH-Wert von 7.9 das MI-MII-Gleichgewicht stärker verschoben wird als bei pH 6.3, sind für diese Messung ein größerer exothermer Peak (Komplexdissoziation + Gleichgewichtsverschiebung von MII nach MI) und ein größerer endothermer Anteil in der dritten Phase des Signals (Komplexbildung + endotherme Reaktion von MI zu MII) zu erwarten. Aus dem Unterschied der Messungen bei pH 7.9 und pH 6.3 sollte sich die Wärme des Übergangs zwischen MI und MII errechnen lassen.

Die Gesamtwärme, die bei Injektion von GTP zum Komplex abgegeben wird, darf durch die verschiedenen pH-Werte nicht beeinflußt werden. Die Wärme, die bei der Dissoziation von R* und G_t durch Verschiebung zur MI-Form frei wird, muß bei der Bildung des R*G-Komplexes wieder aufgewendet werden, um Rhodopsin von der MI- in die MII-Konformation zu überführen. Die Unterschiede im Wärmesignal bei verschiedenen pH-Werten sollten sich daher in der ersten Phase und der letzten Phase des Signals zeigen.

Auswirkungen des MI-MII-Gleichgewichtes auf das Wärmesignal (experimenteller Befund)

In Abbildung 27 ist die Messung des G-Protein-Zyklus bei 10 °C in BTP-Puffer bei pH 6.3 bzw. 7.9 dargestellt.

Die Gesamtdauer der Wärmeabgabe, sowie die insgesamt freigewordene Wärme sind durch die Verwendung von Puffern mit verschiedenem pH-Wert nicht beeinflußt. In der dritten Phase des Wärmesignals beobachtet man in Spur a einen deutlicheren endothermen Anteil (grau unterlegt) als in Spur b. Dies ist in Übereinstimmung mit der Vorhersage. Betrachtet man die erste Phase des Signals, so ist der exotherme Peak für die Messung bei pH 7.9 (Spur a), umgekehrt als erwartet, weniger stark ausgeprägt als bei pH 6.3 (Spur b, grau unterlegt). Die gleichen Beobachtungen wurden auch bei Messungen des G-Protein-Zyklus in Phosphatpuffer mit pH 7.6 bzw. 6.1 gemacht.

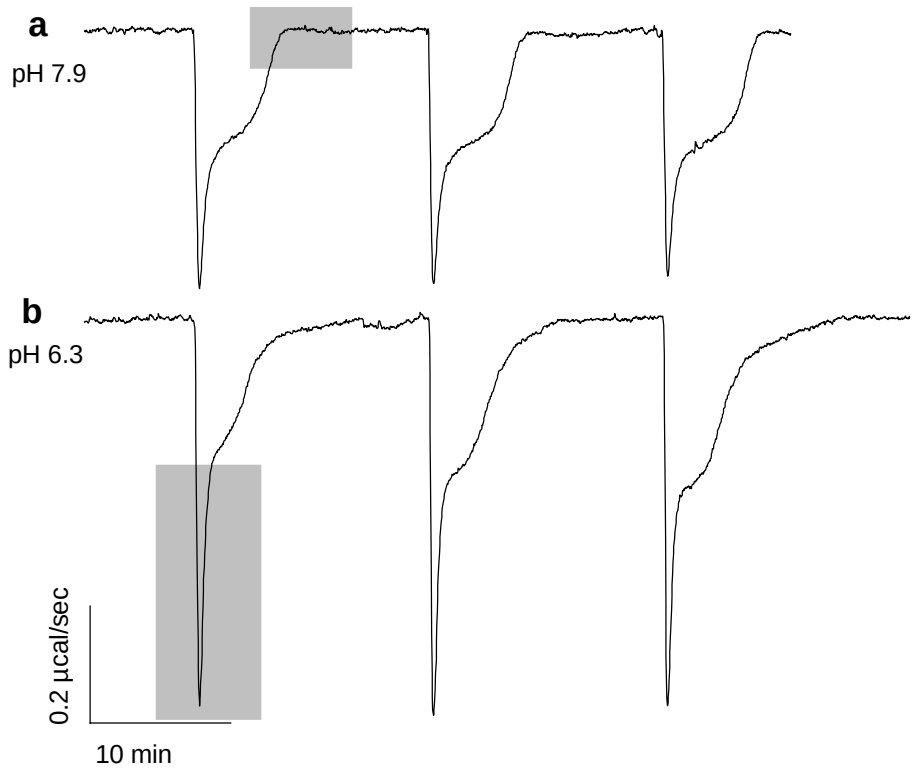


Abbildung 27
pH-Abhängigkeit des Wärmesignals des G-Protein-Zyklus

Zu 1 µM Transducin und 10 µM Rhodopsin wurden bei 10 °C jeweils 3.5 µM GTP titriert. Messung a wurde bei einem pH-Wert von 7.9 durchgeführt, Messung b bei pH 6.3. Spur a zeigt gegenüber Spur b einen weniger ausgeprägten exothermen Peak, jedoch einen größeren endothermen Anteil (grau unterlegt) in der dritten Phase der Wärmeabgabe. Die Unterschiede im Verlauf des Wärmesignals lassen sich für die Beobachtungen zur Komplexbildung (dritte Phase) durch eine Verschiebung des pH-abhängigen Gleichgewichtes von MI zu MII erklären.

Eine Erklärung für dieses Verhalten konnte nicht gefunden werden. Möglicherweise ist der erwarteten exothermen Reaktion im Falle von alkalischem pH-Wert eine weitere, endotherme Reaktion überlagert. Diese Vermutung ergab sich bereits durch die Messungen mit verschiedenen Verhältnissen von Untereinheiten in Abhängigkeit von der $G_{\beta\gamma}$-Konzentration.

Die Enthalpieänderung bei Verschiebung des MI-MII-Gleichgewichtes konnte durch die Messung des G-Protein-Zyklus in Puffern verschiedenen pH-Wertes nicht bestimmt werden. Der Widerspruch zwischen dem vorhergesagten Verlauf des Wärmesignals für die erste Phase und dem Meßergebnis zeigt, daß die Frage nach der Wärme des MI-MII-Übergangs noch genauer untersucht werden muß. Hierzu müssen auch Methoden herangezogen werden, die es erlauben die Verschiebung des MI-MII-Gleichgewichtes spektroskopisch unter den gleichen Bedingungen wie im Kalorimeter zu beobachten.

4.3 Die Hydrolysereaktion von G_{GTP} zu G_{GDP}

Die Hydrolysereaktion des an die α-Untereinheit von Transducin gebundenen GTP zu GDP läßt sich nicht unabhängig vom G-Protein-Zyklus messen. Der einzige Zugang für diesen Teilschritt des G-Protein-Zyklus ist die Berechnung aus der Gesamtwärme des Zyklus und den bereits ermittelten Werten für die Enthalpieänderungen durch Komplexbildung und -dissoziation. Damit ergibt sich für den gesuchten Wert ΔH_{hyd}

$$\Delta H_{hyd} = \Delta H_{ges} - \Delta H_{diss} - \Delta H_b$$

$$\mathbf{\Delta H_{hyd} = - 2.2\ kcal/Mol}$$

Vergleicht man den errechneten Wert für ΔH_{hyd} mit der Enthalpieänderung, die für den gesamten G-Protein-Zyklus ermittelt wurde, so stellt man fest, daß die Eingangs von Kapitel 4 erwähnte Vermutung, die Enthalpieänderung von Komplexbildung und Dissoziation würden sich aufheben, nicht zutrifft. Aus der Feststellung, daß die Enthalpieänderung des gesamten G-Protein-Zyklus nur von der zugegebenen GTP-Menge bestimmt wird, darf nicht gefolgert werden, daß in der Bilanz des Zyklus nur die Hydrolyse des an Transducin gebundenen GTP Wärme abgibt. Die Messungen dieses Kapitels zeigen, daß Transducin in seiner GTP-bindenden Konformation eine höhere innere Energie aufweist, als im GDP-bindenden Zustand. Hieraus erklärt sich die Differenz zwischen der Gesamtenthalpieänderung für den G-Protein-Zyklus und der Wärme, die bei Hydrolyse von Transducin-gebundenem GTP frei wird.

5. Kalorimetrische Untersuchung von weiteren Teilreaktionen der visuellen Kaskade

In der visuellen Signaltransduktion wird ein Reiz über eine Kaskade aus Rezeptor, Transmitter und Effektor verarbeitet. In Kapitel 3 und 4 sind Messungen und Beobachtungen dargestellt, die sich mit der Aufklärung der Enthalpieverhältnisse des Transmitter Transducin und seiner Wechselwirkungen mit dem Rezeptor Rhodopsin befassen. Weitere, über diese Arbeit hinausgehende kalorimetrischen Untersuchungen, müssen die Aufklärung der Enthalpieänderungen für alle Komponenten der visuellen Kaskade zum Ziel haben. Erste Schritte hierzu sind in diesem Kapitel beschrieben. Untersucht wurde eine Teilreaktion der Deaktivierung des Rezeptors, die Bindung von Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin. Ferner wurde die Aktivierung des Effektors betrachtet, indem der Einfluß von Phosphodiesterase auf die Wärmeabgabe des G-Protein-Zyklus gemessen wurde.

5.1 Bindung von Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin

Das Ziel der Messungen mit Arrestin und phosphoryliertem Rhodopsin (P-Rhodopsin) war die Bestimmung der Enthalpieänderung bei der P-Rhodopsin-Arrestin-Komplexbildung. Hierbei wurde P-Rhodopsin in der Meßzelle des Kalorimeters vorgegeben und Arrestin zutitriert. Im Unterschied zu den meisten bisherigen Untersuchungen handelt es sich dabei um die Messung einer Bindungsisotherme und nicht um einen zyklischen Prozeß.
Die Konzentration von P-Rhodopsin in der Meßzelle betrug 1 µM, Arrestin wurde in Schritten von je 0.6 µM zutitriert (es wurde die höchstmögliche zur Verfügung stehende Arrestinkonzentration gewählt). In Abbildung 28 sind die Bindungsmessung (Spur c) und die zugehörigen Kontrollen (Spur a, b) dargestellt. Zur Kontrolle wurden je 0.6 µM Arrestin zum einen in Puffer gegeben (a), zum anderen zu unphosphoryliertem Rhodopsin in gewaschenen Membranen, an das keine Bindung stattfinden kann. Arrestin kann nur an phosphoryliertes Rhodopsin binden (Schleicher et al., 1989 [72], Palczewski et al. 1991 [63]). Die Abbildung zeigt keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Kontrollen und der Bindungsmessung. Die Auswertung der Flächen ergibt für die drei Messungen im Rahmen der Genauigkeit gleiche Werte.

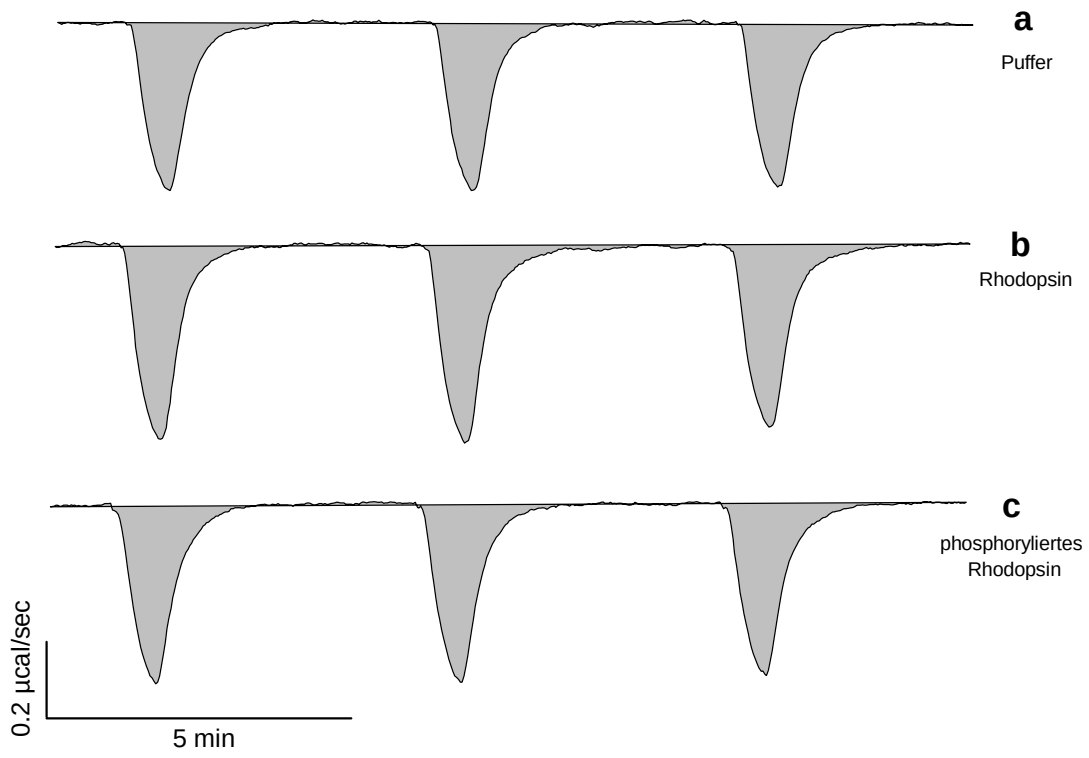


Abbildung 28
Messung der Bindungsreaktion von Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin

Pro Injektion wurden jeweils 0.6 µM Arrestin zutitriert. Spur a und b zeigen Kontrollmessungen. In Spur a wurde Arrestin zu Puffer gegeben, in Spur b enthielt die vorgegebene Probe 1 µM Rhodopsin, an das keine Bindung erfolgen darf. Beide Reaktionen zeigen nur die Wärme, die durch Verdünnung oder Mischung hervorgerufen wird. In Spur c wurde 1 µM phosphoryliertes Rhodopsin vorgegeben. Das Wärmesignal unterscheidet sich nicht von den Kontrollmessungen. Das erwartete Verhalten für den Fall einer Bindung ist nicht zu erkennen. Die Messungen wurden bei 10 °C in einem Puffer aus 10 mM BTP (pH 7.5) und 50 mM NaCl durchgeführt.

Das erwartete Wärmesignal für den Fall der Bindung ist nicht zu beobachten. Die Enthalpieänderung bei Bindung von Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin ist offensichtlich zu gering um bei den gegebenen Konzentrationen der Proteine detektiert zu werden.

Eine sehr grobe obere Abschätzung für die Wärmeproduktion durch Arrestinbindung läßt sich aus theoretischen Überlegungen geben. Um bei dem gegebenen, recht großen Artefakt eine Reaktion deutlich erkennen zu können, müßte die dadurch bewirkte Flächenänderung größer als 5 µcal sein. Für eine kleinere Fläche ergibt sich daraus, nach Normierung auf Zellvolumen und Konzentration, eine Enthalpieänderung, die dem Betrag nach kleiner als 6 kcal/Mol sein muß (zur Erklärung der Abschätzung siehe Kapitel 4.1.1).

Diese Abschätzung ist sehr unbefriedigend und muß durch Messungen bei höheren Arrestinkonzentrationen genauer eingegrenzt werden. Hierzu muß eine Möglichkeit gefunden werden Arrestin weiter aufzukonzentrieren.

5.2 Der G-Protein-Zyklus im Beisein von Phosphodiesterase

Die freie $G_{\alpha GTP}$-Untereinheit des Transducins aktiviert in der Stäbchenzelle die cGMP-Phosphodiesterase, indem G_α an eine der beiden γ-Untereinheiten der PDE bindet und diese von der $\alpha\beta$-Einheit abtrennt. Sind beide γ-Einheiten jeweils an G_α gebunden, so ist die PDE vollständig aktiviert.

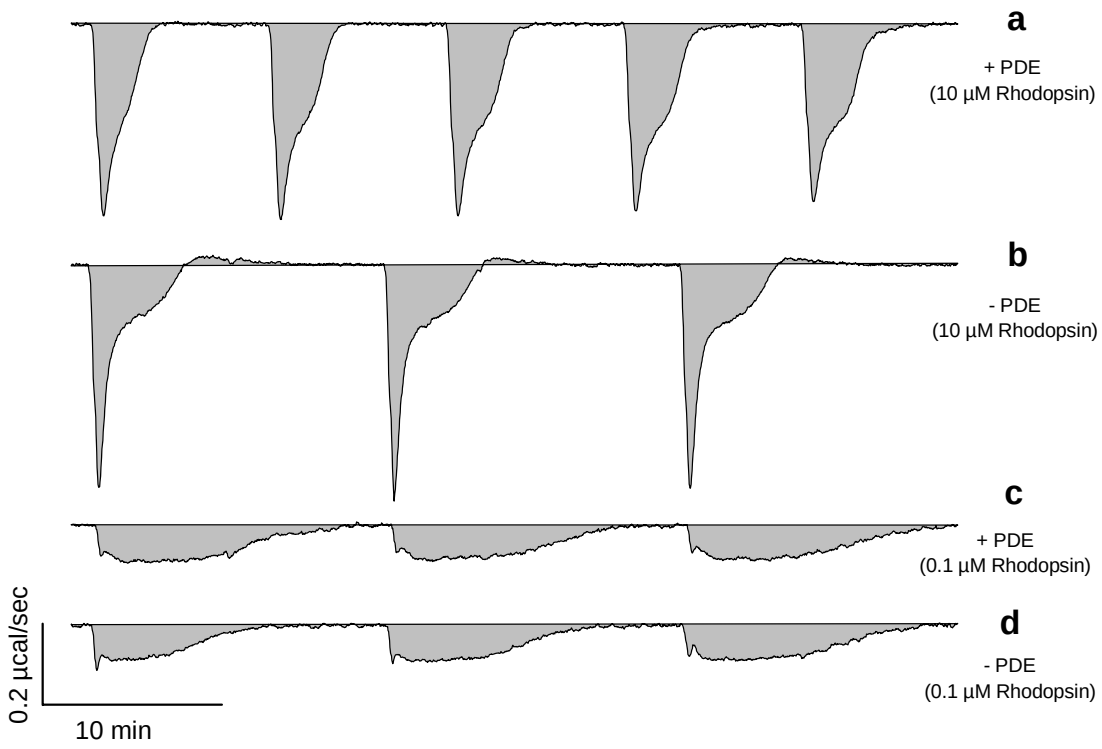


Abbildung 29
Messung des G-Protein-Zyklus in Anwesenheit von Phosphodiesterase

Je 3 µM GTP wurden pro Injektion zu 1 µM Transducin und 10 µM Rhodopsin in WM (Spur a und b) bzw. 0.1 µM Rhodopsin in WM (Spur c und d) titriert. Bei den Messungen a und c wurden zusätzlich 0.3 µM PDE vorgegeben. Die Experimente wurden in BTP-Puffer bei pH 7.5 und 10 °C durchgeführt.
In den Wärmesignalen, die mit 0.1 µM WM aufgenommen wurden, bewirkt die Vorgabe von PDE keine Veränderung der freiwerdenden Wärme. Betrachtet man hingegen die Messungen mit 10 µM WM, so ist im Beisein von PDE (a) ist die Gesamtdauer des Wärmesignals verkürzt. Ferner ist der exotherme Peak, seiner maximalen Amplitude kleiner, als bei Messung des Zyklus ohne PDE-Vorgabe (b). Die zweite Phase der Wärmeabgabe ist in Spur a weniger deutlich ausgeprägt als in Spur b. Desgleichen ist kein auffälliger endothermer Anteil in der Schlußphase des Signals mit PDE-Vorgabe zu erkennen.

Der Einfluß der Phosphodiesterase auf den G-Protein-Zyklus wurde untersucht, indem PDE neben dem R*G-Komplex in der Meßzelle des Kalorimeters vorgegeben wurde und der Ablauf des gesamten G-Protein-Zyklus durch Zugabe von GTP induziert wurde. Die Experimente wur-

den in Abhängigkeit der Membrankonzentration durchgeführt, da Angleson und Wensel (1994) [1] eine GTPase beschleunigende Wirkung der PDE nur in Anwesenheit hoher Membrankonzentrationen angeben. Abbildung 29 zeigt Messungen mit 10 µM und 0.1 µM Membranen im Beisein von 0.3 µM PDE (Spur a, c) im Vergleich zu Messungen mit unterschiedlichen Membrankonzentrationen, die ohne PDE-Vorgabe durchgeführt wurden (Spur b, d).

Die Wärmesignale der Messungen mit 0.1 µM Rhodopsin in WM zeigen keinen Unterschied bezüglich der Vorgabe von Phosphodiesterase. Sowohl die Gesamtdauer der Reaktion, als auch der Verlauf des Signals ist in beiden Spuren gleich. Die Messungen mit hohen Rhodopsinkonzentrationen (Spuren a und b) zeigen hingegen deutliche Unterschiede des Signalverlaufs. Die einzelnen Phasen des Wärmesignals sind weniger ausgeprägt und die Gesamtdauer der Wärmeabgabe ist in Anwesenheit von Phosphodiesterase deutlich kürzer. Dies bestätigt die GTPase beschleunigende Wirkung der PDE in Anwesenheit hoher Membrankonzentrationen. Der exotherme Peak in der ersten Phase ist bei Vorgabe von PDE kleiner Fläche. Des weiteren ist das Niveau der nur ansatzweise erkennbaren zweiten Phase in dieser Messung exothermer als bei der in Spur b dargestellten Messung. In der Schlußphase des Wärmesignals zeigt sich der Unterschied zwischen den beiden Experimenten (a und b) darin, daß in Abwesenheit von PDE die endothermen Anteile des G-Protein-Zyklus stärker hervorgehoben sind.

Betrachtet man die Flächen unter den beiden Meßkurven, so ist die abgegebene Wärme in beiden Fällen gleich. Dies bedeutet, daß die Enthalpieänderung des G-Protein-Zyklus durch die Bindung von PDE an Transducin nicht beeinflußt wird, und die Wärme nur durch den Verbrauch des zutitrierten GTP bestimmt wird.

Die Messungen bestätigen die Beobachtungen von Angleson und Wensel (1994), daß die PDE nur in Anwesenheit hoher Membrankonzentrationen eine GTPase beschleunigende Wirkung ausübt. Um die Einzelheiten des durch cGMP-Phosphodiesterase veränderten Wärmesignals besser zu verstehen, sind weitere Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von PDE nötig.

6. Diskussion

Die Thermodynamik beschreibt makroskopische Größen eines Systems und kann daher eine Vorhersage über Prozesse machen, ohne daß deren mikroskopischer Ablauf im Einzelnen bekannt ist. Dies ist für biologische Systeme von besonderer Bedeutung, da sie aufgrund zahlreicher physikalischer und chemischer Wechselwirkungen sehr komplex und in ihrem molekularen Zusammenwirken äußerst schwierig zu beschreiben sind.

Die wichtigsten makroskopischen Größen zur Beschreibung eines Systems sind die Energie und die Entropie bzw. deren Veränderung bei Übergang des Systems in einen anderen Zustand. Bei einer kalorimetrischen Bestimmung von Energieänderungen, wird die Wärmeänderung einer Reaktion gemessen, die der Änderung der Enthalpie ΔH entspricht (siehe Kapitel 1.4 Thermodynamische Grundlagen).

In den beschriebenen titrationskalorimetrischen Experimenten wurden die Enthalpieänderungen der Teilschritte des G-Protein-Zyklus gemessen. Allein die Kenntnis von ΔH der einzelnen Reaktionen, erlaubt es jedoch nicht, Aussagen über den Ablauf des betrachteten Prozesses zu machen. Um eine Reaktion thermodynamisch im einzelnen beschreiben zu können muß die **Aktivierungsenergie E_a**, die **Änderung der freien Enthalpie ΔG**, die **Änderung der Entropie ΔS** und die **Enthalpieänderung ΔH** unter den gegebenen äußeren Bedingungen bekannt sein.

Die Aktivierungsenergie

Die Aktivierungsenergie gibt den Betrag der Energie an, die zugeführt werden muß um eine Reaktion ablaufen zu lassen. Die Aktivierungsenergie läßt sich mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung (6.1) aus der Reaktionskonstanten *k* berechnen.

$$k = A e^{-E_a/RT} \qquad \textit{(Arrhenius-Gleichung)} \qquad (6.1)$$

Der Faktor A ist der sogenannte präexponentielle Faktor (eine ausführliche Erklärung gibt Kamp, 1988). Für das hier betrachtete System, den G-Protein-Zyklus, sind die Aktivierungsenergien einiger Teilschritte (Bildung und Dissoziation des R*G-Komplexes) bereits von Kahlert und Hofmann (1991) [41] bestimmt worden.

Die Änderung der freien Enthalpie (ΔG)

ΔG ist ein Maß für die Energie einer Reaktion, die maximal als Arbeit genutzt werden kann und gibt Auskunft darüber, in welche Richtung eine Reaktion abläuft ($\Delta G < 0$ exergonische Reaktion, $\Delta G > 0$ endergonische Reaktion). Hierbei ist zu beachten, daß endergonische Reaktionen scheinbar freiwillig ablaufen können, indem sie durch eine gekoppelte exergonische Reaktion getrieben werden.

In der Literatur finden sich keine Angaben über ΔG für die Teilschritte des G-Protein-Zyklus. Eine Möglichkeit, die Änderung der freien Enthalpie zu berechnen ergibt sich, wenn die Gleichgewichtskonstante K einer Reaktion bekannt ist. Es gilt:

$$\Delta G = -RT\ln K + RT\ln\frac{[C]^c[D]^d\ldots}{[A]^a[B]^b\ldots} \qquad (6.2)$$

Hierbei beschreibt der erste Term der Gleichung die Änderung der freien Enthalpie unter Standardbedingungen (ΔG^0), der zweite Term berücksichtigt die eingesetzten Konzentrationen der Reaktionspartner (Erläuterungen der Variablen siehe Kapitel 1.4. Thermodynamische Grundlagen).

Die Änderung der Entropie (ΔS)

Der Entropie hängt zusammen mit der Anzahl der Möglichkeiten, die Gesamtenergie des Systems auf dessen Teilchen zu verteilen und mit den möglichen Freiheitsgraden der Moleküle. Durch Erhöhung der Teilchenzahl können Freiheitsgrade gewonnen werden, was zu einer Entropiezunahme führt.

Auch für die Änderung der Entropie bei Ablauf des G-Protein-Zyklus sind bisher keine Werte vorgeschlagen worden.

Berechnung der Standardenthalpieänderung (ΔH^0)

Die Enthalpieänderung einer Reaktion unter Standardbedingungen läßt sich neben der kalorimetrischen Bestimmung auch mit Hilfe der van´t Hoff-Gleichung (Gleichung 6.3) aus der Lage des Gleichgewichtes in Abhängigkeit von der Temperatur errechnen.

$$\frac{d\ln K}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \qquad \textit{(van´t Hoff-Gleichung)} \qquad (6.3)$$

Die so berechneten Werte für die Enthalpieänderung weichen häufig von den experimentell ermittelten ab. Diese Abweichung hat verschiedene Ursachen (Fisher und Singh, 1995 [19]; Naghibi et al., 1995 [60]; Liu und Sturtevant, 1995 [52]). Unter anderem muß man bei einem Vergleich von gemessener und berechneter Enthalpieänderung berücksichtigen, daß die kalorimetrisch gemessene Wärme die Summe aller Reaktionswärmen in der Probe wiedergibt, während die Berechnung einen isolierten Schritt zugrunde legt.

6.1 Der gesamte G-Protein-Zyklus

In dieser Arbeit wurde bei der Untersuchung des G-Protein-Zyklus der visuellen Kaskade ein rekonstituiertes System aus isolierten Membranen zugrunde gelegt, welches den Rezeptor Rhodopsin in seiner nativen Umgebung und gereinigtes Transducin enthält. Hierduch können die

Konzentrationen der Komponenten einzeln variiert und so Teilreaktionen hervorgehoben werden.

Messung der Enthalpieänderung durch GTP-Hydrolyse des G-Protein-Zyklus

Mit Hilfe des Titrationskalorimeters wurde die Enthalpieänderung für den gesamten G-Protein-Zyklus zu - 4.6 ± 0.8 kcal/Mol GTP bestimmt. Dieser Wert wurde nach Zugabe von GTP zum R*G-Komplex durch Integration der Fläche unter dem Wärmesignal ermittelt. Die Größe der Fläche, und damit die freiwerdende Wärme, ist nur abhängig von der hydrolysierten GTP-Menge und nicht von Veränderungen der Rhodopsin- oder Transducinkonzentration. Mit jeder neuen Zugabe von GTP zu derselben Probe, kann wieder die gleiche Wärmeabgabe induziert werden. Dies zeigt, daß nach Durchlaufen des Zyklus das System wieder in den Ausgangszustand zurückkehrt.

Die Genauigkeit des angegebenen Wertes für die Enthalpieänderung beruht auf der Zuverlässigkeit der Konzentrationsangabe für die GTP-Lösung. Die käuflichen GTP-Präparate enthalten einen Anteil an Verunreinigungen (z. B. GDP, GMP, Na) der je nach Hersteller zwischen 5 % und 20 % schwankt. In spektroskopischen Messungen der GTP-Konzentration läßt sich nur die Gesamtkonzentration von GTP, GDP und GMP bestimmen. Eine Unterscheidung der einzelnen Nukleotide ist durch Absorptionsspektroskopie nicht möglich. Um diesen Fehler zu minimieren, wurde für die Messungen der vorliegenden Arbeit GTP verwendet, das über eine Q-Sepharose-Säule aufgereinigt wurde. Die Reinigung wurde von der Arbeitsgruppe von A. Wittinghofer (Max-Planck-Institut, Dortmund) durchgeführt.

Vergleichende Messung der GTP-Hydrolyse des Ras-Proteins

Um einen Vergleichswert zur GTPase des Transducins zu erhalten, wurden die GTPase des Ras-Proteins unter den gleichen Bedingungen im Titrationskalorimeter gemessen. Der ermittelte Wert für die Enthalpieänderung beträgt -4.5 ± 2.9 kcal/Mol. Der große Fehler beruht darauf, daß nur drei Messungen durchgeführt wurden und die Flächen der einzelnen Injektionen stark schwankten. Vergleicht man die für Ras-Protein und Transducin ermittelten ΔH-Werte so erhält man eine recht gute Übereinstimmung.

Vergleich der Enthalpieänderungen durch GTP- und ATP-Hydrolyse

Da neben GTP in biologischen Systemen vorwiegend ATP als Zwischenspeicher für chemisch gebundene Energie dient, und sich die beiden Nukleotide bezüglich der energiereichen Phosphatbindungen nicht unterscheiden, kann auch ein Vergleich mit der Hydrolyse von ATP herangezogen werden.

Die Hydrolyse von ATP ist bereits häufig und unter verschiedenen Bedingungen untersucht worden, beispielsweise von Millar et al. (1987) [58] an der S1 Untereinheit von Myosin.

Einige der für die Hydrolyse ermittelten Werte aus der Literatur sind in Tabelle 9 zusammengestellt:

	ΔH in kcal/Mol	Meßbedingungen	Literaturquelle
ATP → ADP + P_i	- 4.0	4 °C, pH 8.0	Kodama, 1985
	- 4.9	25 °C, pH 8.0	Gajewski et al., 1986
	- 4.5	5 °C, pH 7.0	Millar et al., 1987

Tabelle 9

Enthalpieänderung ΔH durch Hydrolyse von ATP zu ADP

Die aufgelisteten Werte sind dem gemessenen Wert für die Hydrolyse von GTP zu GDP sehr ähnlich.

Temperaturabhängigkeit der Enthalpieänderung der GTP-Hydrolyse

Im Rahmen der Genauigkeit der Messungen konnte für die Enthalpieänderung des G-Protein-Zyklus keine Temperaturabhängigkeit gefunden werden. Bei gleichbleibender Wärmeabgabe, verändert sich jedoch der zeitliche Verlauf des Wärmesignals mit steigender Temperatur (siehe Abb. 16). Die Gesamtdauer der Reaktion ist verkürzt und das Niveau der Hydrolyse stärker exotherm. Das veränderte Niveau entspricht einem erhöhten GTP-Umsatz aufgrund der schnellere Hydrolyserate bei höheren Temperaturen.

Quantitative Aussagen über die Kinetik der betrachteten Reaktionen sind aus den Messungen des Titrationskalorimeters nicht zu entnehmen, da die zeitliche Auflösung des Gerätes nicht ausreicht. Betrachtungen zur Kinetik des G-Protein-Zyklus finden sich in der Literatur beispielsweise bei Kahlert und Hofmann (1991) [41]oder bei Ting und Ho (1991) [74].

Bei der Auswertung der Messungen bezüglich ihrer Enthalpieänderung wurde die unterschiedliche Bindung von Magnesium an GTP und GDP aufgrund der erwarteten, sehr geringen Enthalpieänderung nicht berücksichtigt (genauere Ausführungen finden sich bei Gajewski et al., 1986 [22]). Auch die Enthalpieänderung durch Zerfall von MII-Rhodopsin bei langen Messungen wurde vernachlässigt. Dieser Effekt müßte sich darin bemerkbar machen, daß sich mit zunehmender Dauer der Messung die Fläche unter dem Wärmesignal ändert. Da dies im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht zu beobachten ist, kann die Wärme des Zerfalls von R* vernachlässigt werden.

6.1.1 Berücksichtigung der Protonierungswärme des Puffers

Im Kalorimeter wird die Gesamtheit aller Wärmeeffekte einer Reaktion gemessen, hierzu gehören auch Wärmetönungen, die durch die Protonierung des Puffers hervorgerufen werden (ΔH_p). Bei der Betrachtung von Reaktionen, die unter Aufnahme oder Abgabe von Protonen verlaufen, muß daher die gemessene Enthalpieänderung entsprechend korrigiert werden.
In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen des G-Protein-Zyklus in zwei verschiedenen Puffern durchgeführt, deren Protonierungswärmen sehr unterschiedlich sind. Die Enthalpieänderung durch Protonierung wurde jeweils getrennt ermittelt und von der Gesamtwärme subtrahiert. Ferner ergibt sich aus der graphischen Auftragung der beobachteten Enthalpieänderungen gegen die Protonierungswärmen der Puffer durch Extrapolation auf $\Delta H_p = 0$ der gesuchte Wert für die protonenbereinigte Wärmeänderung.
Durch die Verwendung eines Puffers mit großer Protonierungswärme (z. B. BTP-Puffer mit $\Delta H_p = -10.8$ kcal/Mol) wird das Wärmesignal für Reaktionen, an denen Protonen beteiligt sind verstärkt. Diese Teilreaktionen lassen sich gegenüber Reaktionen ohne Protoneneinfluß hervorheben. Für die visuelle Kaskade wird die Verstärkung durch Protonierung besonders deutlich in der ersten Phase des Wärmesignals, dem exothermen Peak. Dieser ist in Messungen in BTP-Puffer wesentlich deutlicher ausgeprägt, als bei Verwendung von Phosphatpuffer (siehe hierzu Abb. 9 A).

6.2 Teilreaktionen

Zur Bestimmung der Enthalpieänderungen der einzelnen Schritte des G-Protein-Zyklus wurde eine Gliederung in drei Teilreaktionen vorgenommen. Es wurde unterschieden zwischen der Bildung des R*G-Komplexes, der Komplexdissoziation und der Hydrolyse von G_{GTP} zu G_{GDP}. Hierbei handelt es sich um eine vereinfachte Einteilung, bei der einige Reaktionen zusammengefaßt wurden. Das Ziel dabei war, zunächst die Gesamtenthalpie des Zyklus in möglichst wenig Schritte aufzuteilen, um die relevanten Teilreaktionen herauszufinden.
Wie in Kapitel 3 und 4 gezeigt, sind die drei betrachteten Teilschritte nicht direkt durch kalorimetrische Messungen zugänglich. Durch gezielte Variation der Konzentrationen der beteiligten Komponenten, muß der Verlauf des Wärmesignals so beeinflußt werden, daß aus der Messung des gesamten Zyklus Rückschlüsse auf die einzelnen Phasen möglich werden.
In diesem Zusammenhang ist das Verhältnis der Konzentrationen von Rhodopsin zu Transducin von Bedeutung. Liegt R* in deutlichem Überschuß vor (10 µM R*, 1 µM G_t), so ist G_t vollständig als Komplex gebunden. Bei Zugabe von GTP wird die Dissoziation des Komplexes induziert. Bevor der Komplex wieder gebildet werden kann, müssen die aktivierten G-Protein-Moleküle den Zyklus durchlaufen um das gebundene GTP zu hydrolysieren und in den inaktiven Zustand zurückzukehren. Unter diesen Bedingungen entspricht der erste exotherme Peak des Wärmesi-

gnals ausschließlich der Dissoziation des R*G-Komplexes. Bei einem 1:1-Verhältnis von Rhodopsin- zu Transducinkonzentration sind nur maximal 50 % des G_t als Komplex gebunden. Unmittelbar nach der GTP-induzierten Trennung des Komplexes, kann das freigewordene R* erneut Transducin aktivieren. Dadurch laufen Komplexbildung und -dissoziation bereits in der ersten Phase des Wärmesignals gleichzeitig ab. Bei Messung mit einem Überschuß an R* ist der erste exotherme Peak des Wärmesignals deutlich größer, als bei einem Konzentrationsverhältnis von R* zu G_t von 1:1 (siehe Abb. 28). Dies ist ein Beweis dafür, daß im Zyklus ein endothermer Schritt enthalten ist.
Die Messungen des G-Protein-Zyklus wurden stets unter Vorgabe von Rhodopsin und Transducin bei Titration von GTP durchgeführt. Die Vorgabe von GTP in der Meßzelle bei Zugabe eines der beiden anderen Reaktionspartner ist nicht sinnvoll, da lichtaktiviertes Rhodopsin ohne die stabilisierende Bindung an G_t binnen weniger Minuten zerfällt.

Durch Variation der Konzentrationen der Reaktionspartner ist es gelungen, die verschiedenen Phasen des Wärmesignals mit den Teilschritten des Zyklus in Verbindung zu bringen. In dem exothermen Peak unmittelbar nach einer Injektion bildet sich die Dissoziation des R*G-Komplexes ab. Die je nach GTP-Konzentration mehr oder weniger ausgeprägte Plateauphase spiegelt den Steady-State-Zustand des Systems wider. Die letzte Phase des Wärmesignals, die endothermen Charakter zeigt, wird der Rückbildung des Komplexes nach erfolgter Hydrolyse zugeordnet.
Bei der Betrachtung der zweiten Phase des Wärmesignals fällt auf, daß bei Messungen, die unter gleichen Bedingungen, mit unterschiedlichen Probenchargen durchgeführt wurden, leicht unterschiedliche Neigungen des Plateaus auftreten. Eine Erklärung für dieses Verhalten konnte bisher nicht gefunden werden. Zunächst wurde angenommen, daß dieser Effekt auf den Zerfall von aktivem Rhodopsin zurückzuführen ist. Dies konnte jedoch nach einer systematischen Untersuchung der freiwerdenden Wärme von aufeinanderfolgenden Injektionen ausgeschlossen werden. Der Zerfall von R* sollte sich in einer kontinuierlichen Abnahme der Flächen unter dem Wärmesignal äußern, gemessen wurden aber gleich große Flächen.

6.2.1 Komplexbildung

Die Auswertung der Kalorimetermessungen ergibt für die als Komplexbildung bezeichnete Phase eine endotherme Enthalpieänderung von + 2.0 kcal/Mol. Der endotherme Charakter der Reaktion kann als bewiesen betrachtet werden. Da die Dissoziation des R*G-Komplexes mit Hilfe von GTPγS als exotherme Reaktion erkannt wurde, die Variation der Rhodopsinkonzentration jedoch einen eindeutigen Hinweis auf eine endotherme Reaktion des Zyklus in Abhängigkeit von der Rhodopsinkonzentration liefert, muß es sich bei der Komplexbildung um eine endotherme Reaktion handeln. Der Betrag der Wärmeänderung ist stark fehlerbehaftet, da nur aus wenigen der durchgeführten Messungen quantitativ auf die Wärme dieser Reaktion geschlossen werden

konnte. Ferner wirken sich Rauschen und geringe Schwankungen des Wärmesignals auf kleinere Enthalpieänderungen stärker aus.
Bei der Unterteilung des G-Protein-Zyklus in die genannten drei Teilschritte ist zu berücksichtigen, daß die Teilschritte selbst aus mehreren Reaktionen zusammengesetzt sein können. So wird im Moment der Komplexbildung die Bindung von GDP an die α-Untereinheit des Transducins gelöst und mit Rhodopsin der R*G-Komplex gebildet. Diese beiden Reaktionen lassen sich mit den zur Verfügung stehenden Untersuchungs- und Präparationsmethoden nicht weiter auftrennen, so daß nur ein gemeinsamer Wert für die Enthalpieänderung angegeben werden kann.
Ein weiteres Problem ergibt sich durch das pH- und temperaturabhängige Gleichgewicht von Meta-I- und Meta-II-Konformation des Rhodopsins. Bei alkalischem pH-Wert und niedrigen Temperaturen liegt das Gleichgewicht auf der Seite von MI. Durch Bindung an Transducin wird das Gleichgewicht zu MII verschoben, da nur diese Form G_t binden kann. Nach Cooper und Converse (1976) [13] ist der Übergang von MI zu MII mit einer endothermen Enthalpieänderung verbunden. Diese Wäme addiert sich bei Komplexbildung anteilig, je nach den gewählten Meßbedingungen, zu den beiden oben beschriebenen Reaktionen, so daß die als Komplexbildung bezeichnete Teilreaktion sich in drei einzelne Reaktionen aufteilt.
Durch Variation des pH-Wertes bei konstanter Temperatur verschiebt sich das MI-MII-Gleichgewicht (siehe Parkes und Liebman, 1984) [66]und sollte so den Zugang zur Messung der vorhergesagten endothermen Wärme für diesen Schritt ermöglichen. Die hierzu durchgeführten Experimente zeigen bei einem pH-Wert von 7.9 einen deutlicheren endothermen Verlauf des Wärmesignals als für einen niedrigeren pH-Wert (siehe hierzu Abb. 27). Dies ist in Übereinstimmung mit der Vorhersage, daß in diesem Fall für die Komplexbildung eine endotherme Reaktion überlagert sein sollte. Eine quantitative Bestimmung dieser Wärme ist jedoch nicht möglich, da es unter den gegebenen technischen Bedingungen keine Möglichkeit gibt den Übergang von MI nach MII separat im Kalorimeter zu betrachten.

6.2.2 Komplexdissoziation

Für die Enthalpieänderung durch Komplexdissoziation wurde ein exothermer Wert bestimmt: ΔH_{diss} = - 4.4 kcal/Mol. Der exotherme Charakter der Reaktion wird bewiesen durch Messungen mit GTPγS, die unter Vorgabe von Rhodopsin im Überschuß durchgeführt wurden. Aufgrund nur weniger hinsichtlich dieser Reaktion quantitativ auswertbarer Messungen, ist die ermittelte Wärmeänderung stark fehlerbehaftet.

Auch hier ist bei der Bestimmung der Enthalpieänderung zu berücksichtigen, daß die als Komplexdissoziation bezeichnete Phase aus mehreren Einzelreaktionen besteht. Bei Zugabe von GTP zum R*G-Komplex erfolgt zunächst die Bindung von GTP an G_t. Durch die Aktivierung von

Transducin dissoziiert der Komplex und G_t trennt sich in α- und $\beta\gamma$-Untereinheit auf. Diese Reaktionen konnten in der kalorimetrischen Messung nicht unterschieden werden. Ferner wirkt sich auch das Gleichgewicht zwischen MI- und MII-Konformation von Rhodopsin auf die Bestimmung der Enthalpieänderung bei Komplexdissoziation aus. Das bei der Dissoziation freigewordene Rhodopsin wird sich entsprechend den gegebenen Bedingungen in einem Gleichgewichtszustand zu MI einstellen. Hierbei sollte anteilig die Wärme des MII-MI-Übergangs frei werden. Messungen bei verschiedenem pH-Wert zeigen jedoch nicht das erwartete Verhalten. Statt dem vorhergesagten stärker exothermen Peak bei größerem MI-Anteil, findet sich ein exothermer Peak mit kleinerer Fläche. Eine Erklärung dieser Beobachtung konnte bisher nicht gefunden werden. Es liegt die Vermutung nahe, daß es sich um eine überlagerte endotherme Reaktion handelt, die jedoch noch nicht näher charakterisiert werden kann.

Durch Messung des G-Protein-Zyklus mit verschiedenen Konzentrationen von $G_{\beta\gamma}$ bei konstant gehaltener Konzentration von G_α, wurde der Einfluß der Transducin-untereinheiten auf den Verlauf der Wärmeabgabe untersucht. Es zeigt sich, daß bei einem Überschuß von $G_{\beta\gamma}$ gegenüber G_α ($[G_{\beta\gamma}] : [G_\alpha] = 3:1$) der erste exotherme Peak des Wärmesignals kleiner ist, als bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:1. Dies widerspricht der ursprünglichen Vorstellung, daß ein Überschuß an $G_{\beta\gamma}$ die Komplexdissoziation nicht beeinflußen sollte. Zur Erklärung dieses Verhaltens muß man annehmen, daß eine weitere, endotherme, von der Konzentration der $\beta\gamma$-Untereinheit abhängige Reaktion der Dissoziation des R*G-Komplexes überlagert ist. Eine genauere Untersuchung steht noch aus. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zu dem widersprüchlichen Verhalten des exothermen Peaks der Messungen bei verschiedenem pH-Wert.

6.2.3 Die Hydrolysereaktion von G_{GTP} zu G_{GDP}

Die Enthalpieänderung der Hydrolysereaktion von Transducin-gebundenem GTP zu G_{GDP} wurde als Differenz aus der Gesamtwärme des Zyklus und den für Komplexdissoziation und -bildung ermittelten Werten zu -2.2 kcal/Mol bestimmt. Obwohl die Wärme des Zyklus nur aus dem Verbrauch von GTP resultiert, muß, wie bereits ausgeführt, der Teilschritt der Hydrolyse in seiner Enthalpieänderung nicht der Bilanz des ganzen Zyklus entsprechen. Die Messungen beweisen dies, da für die Teireaktionen der Komplexbildung ein Wert ermittelt wurde, dessen Betrag kleiner ist als derjenige der exothermen Enthalpieänderungen der Komplexdissoziation. Dies bedeutet, daß Transducin in seiner GTP-bindenden Konformation eine höhere innere Energie aufweist als im GDP-gebundenen Zustand.

Da die Enthalpieänderung der Hydrolyse nicht direkt zugänglich ist, sondern mit Hilfe der fehlerbehafteten Werte für die Bildung und die Dissoziation errechnet wurde, muß für den Betrag der Wärmeänderung eine große Ungenauigkeit angenommen werden.

V*ergleich mit der Literatur*

Frühere Arbeiten zur Thermodynamik des G-Protein-Zyklus (Chabre und Vuong, 1992 [12]) befaßten sich mit zeitaufgelöster Kalorimetrie an ganzen Außensegmenten der Sehstäbchen (ROS). Das Hauptziel war die Bestimmung der Reaktionszeiten. Die Messungen an ROS erschweren jedoch die gezielte Untersuchung von Teilreaktionen, da eine Überlagerung mit anderen Reaktionen unvermeidbar ist.

Für die Enthalpieänderung durch Dissoziation des R*G-Komplexes geben Chabre und Vuong (1992) [12] -3 kcal/Mol an, für die Hydrolyse des GTP zu GDP -4 kcal/Mol. Diese Werte weichen von den in dieser Arbeit gemessenen ab, stimmen jedoch darin überein, daß beide Schritte exotherm sind. Während das Filmkalorimeter von Chabre und Vuong eine gute Zeitauflösung besitzt und damit kinetische Untersuchungen ermöglicht, ist das MCS-Titrationskalorimeter aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit für eine genaue Messung besser geeignet. Die Enthalpieänderungen der vorliegenden Arbeit erscheinen daher gegenüber den vorgeschlagenen exakter zu sein.

6.2.4 Bindung von Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin

Im Unterschied zu den Untersuchungen zum G-Protein-Zyklus handelt es sich bei den Messungen mit Arrestin nicht um einen Kreisprozeß, sondern um die Messung einer Bindungsisotherme. Das Ziel dieser Messungen war, die Enthalpieänderung der Bindung von Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin zu ermitteln und Informationen über die Bindungskonstante der Reaktion zu erhalten. Jedoch waren die bisher eingesetzten Arrestinkonzentrationen zu gering, um die Bindungswärme zu zeigen (siehe Abb. 28). Es sollte jedoch möglich sein, Arrestin weiter aufzukonzentrieren um durch höhere Proteinkonzentrationen eine größere Wärmeänderung hervorzurufen.

6.2.5 Einfluß von PDE auf den G-Protein-Zyklus

Die bisher durchgeführten Messungen zur Untersuchung des Einflußes der Phosphodiesterase auf die Wärmeabgabe des G-Protein-Zyklus können nur als Anfang einer genaueren Analyse betrachtet werden.

Die Enthalpieänderung des gesamten Zyklus bleibt durch die Vorgabe von PDE in der Meßzelle unverändert. Jedoch ändert sich in Anwesenheit hoher Membrankonzentrationen der Verlauf des Wärmesignals (siehe Abb. 29). Die Gesamtdauer der Reaktion ist durch die Phosphodiesterase deutlich verkürzt. Dies hängt mit der Wirkung der PDE als beschleunigender Faktor der GTPase zusammen (Angleson und Wensel, 1994 [1]).
Genauere Untersuchungen durch Variation der Konzentrationen der beteiligten Komponenten sind bisher nicht durchgeführt worden, so daß noch keine Aussage über den genauen Einfluß der Phosphodiesterase auf die Teilschritte des G-Protein-Zyklus gemacht werden kann.

6.3 Grenzen der Anwendbarkeit des Titrationskalorimeters

Im Verlauf der Arbeit mit dem MCS-Titrationskalorimeters der Firma MicroCal, zeigte sich, daß die Anwendbarkeit des Gerätes für die Messung von Enthalpieänderungen in der visuellen Kaskade gewissen Einschränkungen unterliegt. Dies ist sowohl durch die Bauweise als auch durch die Handhabung des Gerätes bedingt.
Die Meßzelle des Kalorimeters hat ein recht großes Volumen von ca. 1.4 ml. Hierbei ist zu beachten, daß aufgrund der langen Zugangsröhren das Probenvolumen, welches zum korrekten, blasenfreien Befüllen der Zelle notwendig ist ca. 2 ml beträgt. Die große Meßzelle erlaubt einerseits eine sehr große Genauigkeit und die Detektion kleinster Wärmen, bedingt jedoch andererseits hohe Konzentrationen der zu untersuchenden Proteine und Enzyme. Diese Anforderungen sind insbesondere bei der Arbeit an biologischen Systemen oft nur schwer oder gar nicht zu erfüllen. Bei Messungen mit zu geringen Konzentrationen, liegt die Wärme der Reaktion im Bereich des Artefaktes, der durch das Einspritzen entsteht und kann so nicht aufgelöst werden. Einige der Reaktionen in der visuellen Kaskade können aus diesem Grund hier nicht untersucht werden.
Ein weiteres Problem ergibt sich bei sehr langsamen Reaktionen mit geringer Wärmetönung pro Zeiteinheit. Die Fläche, die der Gesamtwärme entspricht, verteilt sich auf eine lange Zeit. Es ist dadurch schwierig, die exakte Fläche unter dem Wärmesignal zu bestimmen, da das Rauschen bei kleineren Signalen eine größere Rolle spielt. Nähert sich die Reaktion ihrem Ende sehr langsam, so ist es schwierig, den genauen Endzeitpunkt für die Integration festzulegen, da Signal und Basislinie sehr dicht beieinander verlaufen. Hierdurch können große Schwankungen bei der Integration von verschiedenen Injektionen einer Messung auftreten.
Aufgrund der großen Temperaturempfindlichkeit des Gerätes ist beim Einfüllen der Probe darauf zu achten, daß die Probentemperatur um ca. 3-5 K unter der eingestellten Arbeitstemperatur des Kalorimeters liegt. Überschreitet man diesen Temperaturbereich, so wird die Zeit, die das Gerät zum Equilibrieren benötigt sehr lang (bis zu mehreren Stunden). Bei einer Arbeitstemperatur von 10 °C ist es günstig die Proben auf Eis zu handhaben. Die dadurch erreichte Probentemperatur erlaubt ein schnelles Equilibrieren (10 min). Soll die Messung bei Temperaturen

knapp unterhalb Raumtemperatur erfolgen, so werden die Proben am besten in einem entsprechend temperierten Wasserbad vorbereitet. Die Equilibrierungszeit läßt sich jedoch in keinem Fall unter 10 min verkürzen. Dadurch ist die Messung von Proben, deren Aktivität bzw. Lebensdauer im Bereich von wenigen Minuten liegt nicht möglich. Für die Untersuchung der visuellen Kaskade bedeutet das, daß belichtetes Rhodopsin nur in Gegenwart von Transducin, in Form des R*G-Komplexes sinnvoll eingesetzt werden kann. Die Messung mit solubilisiertem Rhodopsin ist nicht möglich.

Durch die vollständig computergesteuerte Bedienung des Gerätes ergibt sich ein zusätzliches Problem: die Dauer einer Injektion kann für die momentan laufende Injektion nicht geändert werden. Stellt man fest, daß die Reaktion, die auf die Titration folgt, länger dauert als die ursprüngliche Zeitvorgabe, so läßt sich das für diese Injektion nicht mehr ändern. Nur die Dauer der noch nicht begonnenen Injektion läßt sich verändern. Dies kann in einigen Fällen dazu führen, daß das erhaltene Wärmesignal keine sinnvolle Informtion enthält, da zwei Injektionen überlagert sind.

Die Integration der Flächen unter dem Wärmesignal wird automatisch vom Steuerprogramm durchgeführt. Hierbei können die Integrationsgrenzen und der Verlauf der Baseline manuell korrigiert werden. Häufig tritt eine Drift der Baseline auf, die bei Auswertung der Messung manuell korrigiert werden muß. Hierdurch können Fehler auftreten.

Das zeitliche Auflösungsvermögen des Titrationskalorimeters läßt keine direkten Aussagen über die Kinetik einer Reaktion zu. Laut Angaben des Herstellers liegt die Zeit zwischen erfolgter Reaktion und Antwort der Regelelektronik bei ca. 10 sec. Da in einem biologischen System die meisten Reaktionen sehr viel schneller ablaufen, ist deren zeitliche Auflösung im Kalorimeter nicht möglich.

6.4 Ausblick

Um die ermittelten Enthalpieänderungen des G-Protein-Zyklus in einen thermodynamischen Zusammenhang zu stellen, ist es wünschenswert, mit anderen Untersuchungsmethoden Aussagen über die Änderung der freien Enthalpie zu gewinnen. Dies ließe die Berechnung der Entropieänderung zu und damit die vollständige thermodynamische Beschreibung des Reaktionsablaufs und der treibenden Kräfte im G-Protein-Zyklus.

Für den weiteren Einsatz des Titrationskalorimeters zur Messung von Enthalpieänderungen in der visuellen Kaskade ist ein Umbau des Gerätes geplant. In der Konzeption des MCS-ITC ist die Messung einer durch Photonen gestarteten Reaktion nicht vorgesehen. Besonders bei der Untersuchung von Reaktionen an denen Rhodopsin beteiligt ist, schränkt dies die experimentellen Möglichkeiten stark ein. Der Einbau von Lichtleitern durch die institutseigene Werkstatt ist daher für die Zukunft vorgesehen. Hierbei sind viele Schwierigkeiten zu erwarten. Unter anderem muß die Wärme, die durch das Einstrahlen von Licht entsteht vom Meßwert abgezogen

werden und gleichzeitig eine gute Durchmischung der Probe gewährleisten sein. Zusätzlich erschwert wird die Belichtung der Probe dadurch, daß die Innenseite der Zelle nicht verspiegelt sondern schwarz ist. Ferner wird die Empfindlichkeit des Gerätes durch den Umbau herabgesetzt.

Um die Aufklärung der Enthalpieänderungen für die ganze visuelle Kaskade zu erhalten, müssen auch die Aktivierung und Deaktivierung von Rhodopsin, sowie die Weiterleitung des Signals über die Phosphodiesterase untersucht werden. Einen ersten Schritt hierzu stellen die in Kapitel 6 vorgestellten Messungen an Arrestin und PDE dar, die in weiteren Experimenten noch verfeinert werden müssen. Im Zusammenhang mit der Phosphodiesterase bietet sich die Untersuchung der cGMP-Hydrolyse an. Auch hierbei handelt es sich, wie beim G-Protein-Zyklus um eine zyklische Reaktion, die nach Hydrolyse des cGMP wieder den Ausgangszustand erreicht.

Auch außerhalb der visuellen Kaskade, z. B. im System des Ras-Proteins stellen sich noch zahlreiche Fragen. Die in Kapitel 3.3 aufgeführten Messungen stellen lediglich einen Anfang der Betrachtung dar. Zu untersuchen wäre hier beispielsweise parallel zur GTPase des Transducins der Einfluß von Konzentrationsvariationen des Wärmesignals.

ANHANG

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BTP	Bis-Tris-Propan
DTT	1, 4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure
G_t	Transducin
G_α, $G_{\alpha GTP}$, $G_{\alpha GDP}$	α-Untereinheit des Transducins, die Zusatzbezeichnung GTP bezeichnet die aktive Form, GDP die inaktive
$G_{\beta\gamma}$	meint die $\beta\gamma$-Untereinheit des Transducin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPγS	Guanosin-5'-(γ-thio)triphosphat
G, G^0	freie Enthalpie, freie Enthalpie unter Standardbedingungen
ΔG, ΔG^0	Änderung der freien Enthalpie, Änderung der freien Enthalpie unter Stand.bed.
H, H^0	Enthalpie, Enthalpie unter Standardbedingungen
ΔH, ΔH^0	Änderung der Enthalpie, Änderung der Enthalpie unter Standardbedingungen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
k	Boltzmann-Konstante
K	Gleichgewichtskonstante
MI	Meta-Rhodopsin I
MII	Meta-Rhodopsin II
n	Stoffmenge
p	Druck
PDE	Phosphodiesterase
PIPES	1, 4-Piperazin-bis-ethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
q	Wärmemenge pro Mol
Q	Wärmemenge
R	Gaskonstante
R*	durch Licht aktiviertes Rhodopsin
R*G	Komplex, den das aktivierte Rhodopsin mit Transducin bildet
ROS	Rod Outer Segments, Außensegmente der Sehstäbchen
S	Entropie
T	Temperatur
U	Innere Energie
V	Volumen
W	Arbeit
WM	Washed Membranes, gewaschene Diskmembranen, die Rhodopsin enthalten

Liste der verwendeten Chemikalien

Nukleotide :

GTP	Guanosin-5'-triphosphat Trinatriumsalz Monohydrat	(FLUKA)
	(Reinheit laut Hersteller: ~ 97 %)	
	[das für die Messungen verwendete GTP wurde von der Arbeitsgruppe von A. Wittinghofer (MPI, Dortmund) über eine Q-Sepharose-Säule aufgereinigt]	
GTPγS	Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat) Tetralithiumsalz	
	(Reinheit laut Hersteller: > 85 % [HPLC])	(CALBIOCHEM)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat Dilithiumsalz	(BOEHRINGER)
	(Reinheit laut Hersteller: 80 %)	
ATP	Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz	(SERVA)
	(Reinheit laut Hersteller: > 97 %)	

Pufferchemikalien:

BTP	1, 3-Bis[tris-(hydroxymethyl)-methylamino]propan	(FLUKA)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure	(FLUKA)
K_2HPO_4	di-Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei	(MERCK)
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat	(MERCK)
Na_2HPO_4	di-Natriumhydrogenphosphat	(FLUKA)
PIPES	Piperazin-1, 4 -bis(2-ethansulfonsäure)	(MERCK)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	(MERCK)

sonstige Chemikalien:

Aprotinin		(BOEHRINGER)
Benzamindin	Benzamidinhydrochlorid	(FLUKA)
BSA	Bovine Albumin, fettsäurefrei	(SIGMA)
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol	(FLUKA)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Na_4-Salz • 1.5 H_2O	(SERVA)
Harnstoff		(FLUKA)
Leupeptin	Nr. L 2884	(SIGMA)
$Mg(Az)_2$	Magnesiumacetat-Tetrahydrat	(MERCK)
$MgCl_2$		(FLUKA)
NaCl		(FLUKA)
NH_2OH	Hydroxylaminhydrochlorid	(FLUKA)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid	(FLUKA)
Saccharose	Saccharose zur Dichtegradientenzentrifugation	(MERCK)

Verwendete Pufferlösungen

(sämtliche pH-Werte wurden bei Raumtemperatur gemessen)

Meßpuffer

BTP-Puffer	*pH 7.5*	20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT
BTP-Puffer	*pH 6.0*	20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT
Phosphatpuffer	*pH 7.5*	41 mM K_2HPO_4, 10 mM KH_2PO_4, 80 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT
Phosphatpuffer	*pH 6.0*	6 mM K_2HPO_4, 50 mM KH_2PO_4, 100 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT
Puffer T	*pH 7.5*	20 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$

Puffer zur Präparation

Puffer I	*pH 7.5*	20 mM BTP, 120 mM KCl, 0.2 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 5 µM Leupeptin, 0,1µM Aprotinin
Puffer II	*pH 7.5*	5 mM Tris-HCl, 0.2 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT
Puffer A	*pH 7.0*	10 mM Na_2HPO_4, 10 mM NH_2OH
Puffer B	*pH 6.5*	10 mM Na_2HPO_4, 2 % BSA, fettsäurefrei
Puffer C	*pH 6.5*	10 mM Na_2HPO_4
Puffer D	*pH 7.5*	20 mM BTP, 130 mM NaCl
Puffer E	*pH 7.5*	20 mM BTP, 130 mM NaCl, 10 % Saccharose
Extraktions-puffer	*pH 7.0*	5 mM PIPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
Puffer F	*pH 7.5*	10 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM Benzamidin, 20 µg/ml Leupeptin
Puffer G	*pH 7.5*	20 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT
Puffer H	*pH 7.2*	10 mM PIPES, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT
Puffer P	*pH 7.0*	40 mM K_2HPO_4, 26 mM KH_2PO_4, 1 mM $Mg(Az)_2$, 0.1 mM EDTA-Na_4, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 µM Aprotinin, 5 µM Leupeptin
Urea-Puffer	*pH 6.5*	10 mM Na_2HPO_4, 5 M Harnstoff

Literatur

1 Angleson, J. K. and Wensel, T. G.
Enhancement of rod outer segment GTPase accelerating protein activity by the inhibitory subunit of cGMP phosphodiesterase
J. Biol. Chem. 269, 16290-16296
1994

2 Arnis, S. and Hofmann, K. P.
Two different forms of metarhodopsin II: Schiff base deprotonation precedes proton uptake and signaling state
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7849-7853
1993

3 Baehr, W., Devlin, M. and Applebury, M. L.
Isolation and characterization of cGMP phosphodiesterase from bovine rod outer segments
J. Biol. Chem. 254, 11669-11677
1979

4 Bennett, N. and Dupont, Y.
The G-Protein of retinal rod outer segments (transducin) - mechanism of interaction with rhodopsin and nucleotides
J. Biol. Chem. 260, 4156-4168
1985

5 Bernstein, P. S., Law, W. C. and Rando, R. R.
Isomerisation of all-trans retinoids to 11-cis retinoids in *vivo*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1849-1853
1987

6 Beschiaschvilli, G. and Seelig, J.
Peptide binding to lipid bilayers. Nonclassical hydrophobic effect and membrane-Iinduced pK shifts
Biochemistry 31, 10044-10053
1992

7 Blume, A., Tuchtenhagen, J.
Thermodynamics of ion binding to phosphatidic acid bilayers. Titration calorimetry of the heat of dissociation of DMPA
Biochemistry 31, 4636-4642
1992

8 Bourne, H. R., Sanders, D. A. and McCormick, F.
The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions
Nature 348, 125-132
1990

9 Bourne, H. R., Sanders, D. A. and McCormick, F.
The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism
Nature 349, 117-127
1991

10 Bruckert, F., Chabre, M. and Vuong, T. M.
Kinetic analysis of the activation of transducin by photoexcited rhodopsin - influence of the lateral diffusion of transducin and competition of guanosine diphosphate and guanosine triphosphate for the nucleotide site.
Biophys. J. 63, 616-629
1992

11 Campbell-Burk, S. L. and Carpenter, J. W.
Refolding and purification of ras proteins
Methods in Enzymol. 255, 3-13
1995

12 Chabre, M. and Vuong, T. M.
Kinetics and energetics of the rhodopsin-transducin-cGMP phosphodiesterase cascade of visual transduction
Biochim. Biophys. Acta 1101, 260-263
1992

13 Cooper, A. and Converse, C. A.
Energetics of the primary processes in visual excitation: Photocalorimetry of rhodopsin in rod outer segment membranes
B*iochemistry 15*, 2970-2978
1976

14 Cooper, A.
Energy uptake in the first step of the visual excitation
Nature 282, 531-533
1979

15 Cooper, A.
Rhodopsin photoenergetics: Lumirhodopsin and the complete energy profile
FEBS Letters 123, 324-326
1981

16 Denhardt, D. T.
Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling
Biochem. J. 318, 729-747
1996

17 Emeis, D. and Hofmann, K. P.
Shift in the relation between flash-induced metarhodopsin I and metarhodopsin II within the first 10 % rhodopsin bleaching in bovine disk membranes
FEBS Lett. 136, 201-207
1981

18 Faurobert, E., Otto-Bruc, A., Chardin, P. and Chabre M.
Tryprophan W207 in transducin Ta is the fluorescence sensor of the G protein activation switch and is involved in the effector binding
EMBO 12, 4191-4198
1993

19 Fisher, H. F. and Singh, N.
Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions
Methods in Enzymology 259, 194-221
1995

20 Fowles, C., Akhtar, M. and Cohen, P.
nterplay of phosphorylation and dephosphorylation in vision: Protein phosphatase of bovine rod outer segments
Biochemistry 28, 9385-9391
1989

21 Fung, B. K. K.

Characterization of transducin from bovine rod outer segments
J. Biol. Chem. 285, 10495-10502
1983

22 Gajewski, E., Steckler, D. K., Goldberg, R. N.
Thermodynamics of the hydrolysis of adenosine 5'-triphosphate to adenosine 5'-diphosphate *J. Biol. Chem. 261*, 12733- 12737
1986

23 Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, J. E. and Wittinghofer A.
Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity
Mol. Cell Biol. 12, 2050-2056
1992

24 Gilman, A. G.
G-proteins: Transducers of receptor-generated signals
Ann. Rev. Biochem. 56, 615-649
1987

25 Gudermann, T., Kalkbrenner, F., Schultz, G
Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction
Ann. Rev. Pharmacol. Toxikol. 36, 429-59
1996

26 Heck, M. and Hofmann, K. P.
G-protein-effector coupling: A real-time light-scattering assay for transducin-phosphodiesterase interaction
Biochemistry 32, 8220-8227
1993

27 Hemminger, W. und Höhne, G.
Grundlagen der Kalorimetrie
1980 Berlin Akademie Verlag

28 Herrmann, C. and Nassar, N. Ras and its effectors
Prog. Biophys. molec. Biol. 66, 1-41
1997

29 Herrmann, C.
persönliche Mitteilung
1997

30 Higashijima, T., Ferguson, K. M., Sternweis, P. C., Ross, E. M., Smigel, M. D., Gilman, A. G.
The effect of activating ligands on the intrinsic fluorescence of guanine nucleotide-binding regulatory proteins
J. Biol. Chem. 262, 752-756
1987

31 Hofmann, K. P. Photoproducts of rhodopsin in the disk membrane
Photobiochem. Photobiophys. 13, 309-338
1986

32 Hofmann, K. P. Rhodopsin/G-protein interaction Dickey, B. and Birnbaumer, L., eds GTPases in biology - handbook of experimental pharmacology
1993 *Springer*

33 Hofmann, K.-P., Pulvermüller, A., Buczylko, J., Van Hooser, P. and Palczewski, K.

The role of arrestin and retinoids in the regeneration pathway of rhodopsin
J. Biol. Chem. 267, 15701-15706
1992

34 Hofmann, K.-P. und Heck, M.
Lee, A. G *Biomembranes* IIa 1996 Greenwich,
USA JAI Press Inc.

35 Holtzhauer, M.
Biochemische Labormethoden 1995 2. Auflage
Springer Verlag

36 Howarth, J. C., Millar, N. C. and Gutfreund, H.
A stopped-flow calorimeter for biochemical applications
Biochem. J. 248, 677-682
1987

37 Hurley, J. B. and Stryer, L.
Purification and characterization of the g regulatory subunit of the cyclic GMP phosphodiestera-se from retinal rod outer segments
J. Biol. Chem. 257, 11094-11099
1982

38 Jacquet, E., Baouz, S. and Parmeggiani, A.
Characterization of mammalian C-CDC25^{Mm} exchange factor and kinetic properties of the ex-change reaction intermediate p21·C-CDC25^{Mm}
Biochemistry 34, 12347-12354
1995

39 Jones, G. J., Crouch, R. K., Wiggert, B., Cornwall, M. C. and Chader, G. J.
Retinoid requirements for recovery of sensitivity after visual pigment bleaching in isolated photo-receptors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9606-9610
1989

40 Kahlert, M., König, B. and Hofmann, K.-P.
Displacement of rhodopsin by GDP from three-loop interaction with transducin depends critically on the diphosphate β-position
J. Biol. Chem. 265, 18928-18932
1990

41 Kahlert, M. and Hofmann, K. P.
Reaction rate and collisional efficiency of the rhodopsin-transducin system in intact retinal rods
Biophys. J. 59, 375-386
1991

42 Kamp, H.
Kap. 10.3 Aktivierungsenergie Physikalische Chemie 1988
Springer-Verlag Berlin

43 Khan, S. M. A., Bolen, W., Hargrave, P. A., Santoro, M. M. and McDowell, J. H.
Differential scanning calorimetry of bovine rhodopsin in rod-outer-segment disk membranes
Europ. J. Biochem. 200, 53-59
1991

44 Koch, K.-W.
Calcium as modulator of phototransduction in vertebrate photoreceptor cells
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 125, 149-192

1994

45 Kodama, T.
Thermodynamic analysis of muscle ATPase mechanism
Physiol. Rev. 65, 467-551
1985

46 Kohl, B. and Hofmann, K. P.
Temperature dependence of G-protein activation in photoreceptor membranes - transient extra metarhodopsin II on bovine disc membranes
Biophys. J. 52, 271-277
1987

47 Ladbury, J. E., Lemmon, M. A., Zhou, M., Green, J., Botfield, M. C. and Schlessinger, J.
Measurement of the binding of tyrosyl phosphopeptides to SH2 domains: A reappraisal
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3199-3203
1995

48 Ladbury, J. E., Hensmann, M., Panayotou, G. and Campbell, I. D.
Alternative modes of tyrosyl phosphopeptide binding to a Src Family SH2 domain: Implications for regulation of tyrosine kinase activity
Biochemistry 35, 11062-11069
1996

49 Langerman,N. and Biltonen, R.L.
Microcalorimeters for biological chemistry: Applications, instrumentation and experimental design
Methods in Enzymology 61, 261-286
1979

50 Lin, S. W., Sakmar, T. P., Franke, R. R., Khorana, H. G. and Mathies, R. A.
Resonance Raman microprobe spectroscopy of rhodopsin mutants: effect of substitutions in the third transmembrane helix
Biochemistry 31, 5105-5111
1992

51 Livingstone, J. R.
Antibody characterization by isothermal titration calorimetry
Nature 348, 491-492
1996

52 Liu, Y. and Sturtevant, J. M.
Significant discrepancies between van´t Hoff and calorimetric enthalpies. II.
Protein Science 4, 2559-2561
1995

53 Marr, K. and Peters, K. S.
Photoacoustic calorimetric study of the conversion of rhodopsin and isorhodopsin to lumirhodopsin
Biochemistry 30, 1254-1258
1991

54 Matthews, H. R., Hubbard, R., Brown, P. K. and Wald, G.
Tautomeric forms of metarhodopsin
J. Gen. Physiol. 47, 215-240
1963

55 McDowell, J. H., Khan, S. M. A., Bolen, D. W., Santoro, M. M. and Hargrave, P. A.

Structural stability of rhodopsin and opsin studied by differential scanning calorimetry
Hargrave, Hofmann, Kaupp *Signal Transduction in Photoreceptor Cells* 1990
Springer-Verlag Berlin Heidelberg

56 McKinnon, I. R., Fall, L., Parody-Morreale, A. and Gill, S. J.
A twin titration microcalorimeter for the study of biochemical reactions
Analyt. Biochem. 139, 134-139
1984

57 Miljanich, G. P., Brown, M. F., Mabrey-Gaud, S., Dratz, E. A., Sturtevant, J. M.
Thermotropic behaviour of retinal rod membranes and dispersions of extracted phospholipids *J. Membrane Biol. 85*, 79-86
1985

58 Millar, N. C., Howarth, J. V. and Gutfreund, H.
A transient kinetic study of enthalpy changes during the reaction of myosin subfragment 1 with ATP
Biochem. J. 248, 683-690
1987

59 Morin, P. E. and Freire, E.
Direct calorimetric analysis of the enzymatic activity of yeast cytochrome c oxidase *Biochemistry 30*, 8494-8500
1991

60 Naghibi, H., Tamura, A. and Sturtevant, J. M.
Significant discrepancies between van´t Hoff and calorimetric enthalpies
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5597-5599
1995

61 Nathans, J.
Determinants of visual pigment absorbance: identification of retinylidene Schiff´s base counterion in bovine rhodopsin
Biochemistry 29, 9746-9752
1990

62 Palczewski, K., McDowell, J. H., Jakes, S., Ingebritsen, T. S. and Hargrave, P. A.
Regulation of rhodopsin dephosphorylation by arrestin
J. Biol. Chem. 264, 15770-15773
1989

63 Palczewski, K., Pulvermüller, A., Buczylko, J., Gutmann, C. and Hofmann, K. P.
Binding of inositol phosphates to arrestin
FEBS Lett. 295, 195-199
1991

64 Palczewski, K., Pulvermüller, A.,Buczylko, J. and Hofmann, K. P.
Phosphorylated rhodopsin and heparin induce similar conformational changes in arrestin
J. Biol. Chem. 266, 18649-18654
1991a

65 Palczewski, K., Rispoli, G. and Detwiler, P. B.
The influence of arrestin (48 K protein) and rhodopsin kinase on visual transduction
Neuron 8, 117-126
1992

66 Parkes, J. H. and Liebman, P. A.
Temperature and pH dependence of the metarhodopsin I - metarhodopsin II kinetics and equili-

bria in bovine rod disk membrane suspensions
Biochemistry 23, 5054-5061
1984

67 Phillips, W. J. and Cerione, R. A.
The intrinsic fluorescence of the a subunit of transducin
J. Biol. Chem. 263, 15498-15505
1988

68 Rosing, J. and Slater, E. C.
The value of ΔG^0 for the hydrolysis of ATP
Biochim. Biophys. Acta 267, 275-290
1972

69 Sakmar, T. P., Franke, R. R. and Khorana, H. G.
Glutamic acid 113 serves as the retinylidene schiff base counterion in bovine rhodopsin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8309-8313
1989

70 Schleicher, A. and Hofmann, K. P.
Proton uptake byblight induced interaction between rhodopsin and G-protein
Z. Naturforschung 40c, 400-405
1985

71 Schleicher, A., Franke, R., Hofmann, K.-P., Finkelmann, H., Welte. W.
Deoxylysolecithin and a new biphenyl detergent as solubilizing agents for bovine rhodopsin.
Functional test by formation of metharhodopsin II and binding of G-protein
Biochemistry 26, 5908-5916
1987

72 Schleicher, A., Kühn, H. and Hofmann, K. P.
Kinetics, binding constant and activation energy of the 48 kDa protein-rhodopsin complex by extra-metarhodopsin II
Biochemistry 28, 1770-1775
1989

73 Shnyrov, V. L., Berman, A. L.
Calorimetric study of thermal denaturation of vertebrate visual pigments
Biomed. Biochim. Acta 47, 355-362
1988

74 Ting, T. D. and Ho, Y.-K.
Molecular mechanism of GTP hydrolysis by bovine transducin: pre-steady-state kinetic analyses
*Biochemistry 30*1985, 8996-9007
1991

75 Vuong, T. M. and Chabre M.
Subsecond deactivation of transducin by endogenous GTP hydrolysis
Nature 346, 71-74
1990

76 Vuong, T. M. and Chabre, M.
Deactivation kinetics of the transduction cascade of vision
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9813-9817
1991

77 Wald, G. and Brown, P. K.
Human rhodopsin

Science 127, 222-226
1958

78 Wald, G. and Brown, P. K.
The molecular basis of visual excitation
Nature (London) 219, 800-807
1968

79 Wessling-Resnick, M. and Johnson, G. L.
Kinetic and hydrodynamic properties of transducin: Comparison of physical and structural parameters for GTP-binding regulatory proteins
Biochemistry 26, 4316-4323
1987

80 Wilden, U., Hall, S. W. and Kühn, H.
Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds to the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1174-1178
1986

81 Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. and Lin, L.-N.
Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter
Anal. Biochem. 179, 131-137
1989

82 Wadsö, I.
Design and testing of a micro reaction calorimeter
Acta Chem. Scand. 22, 927-937
1968

83 Yoshizawa, T. and Shichida, Y.
Low-temperature spectrophotometry of intermediates of rhodopsin
Methods in Enzymol. 81, 333-354
1982

84 Zhukovsky, E. A. and Oprian, D. D.
Effect of carboxylic acid side chains on the absorption maximum of visual pigments *Science 246*, 928-930
1989

Vielen Dank!

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. K.-P. Hofmann sehr herzlich danken. Er gab mir die Gelegenheit und die nötige Zeit, mich in die Biophysik einzuarbeiten und schlug das Thema der Kalorimetrie vor. In zahlreichen Diskussionen half er bei der Konzeption der Experimente und der Interpretation der Ergebnisse. Sein Interesse und seine Bemühungen trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. A. Herrmann danke ich für die Betreuung der Arbeit und die Bewältigung organisatorischer Probleme.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dr. Martin Heck. Er hat sehr viel Zeit und Mühe für meine Fragen und Probleme aufgebracht und war jederzeit bereit meinem Gedankengang zu folgen und mir zu helfen. Seine Überlegungen und Ideen haben grundlegend zum Erfolg der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. A. Blume möchte ich mich dafür bedanken, daß er mir die Möglichkeit gab, die Durchführung kalorimetrischer Messungen an biologischen Systemen in seinem Labor zu erlernen. Auch im weiteren Verlauf der Arbeit war er gerne bereit bei der Interpretation meiner Ergebnisse zu helfen.

Frau Dr. Sophia Schlosser und Herrn Dr. Stefan Jäger möchte ich für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Thematik der visuellen Kaskade danken. Frau Dr. Schlosser gab wertvolle Hilfestellung beim Erlernen der Präparationen und bei der biochemischen Interpretation der physikalischen Meßergebnisse.

Für das gute Arbeitsklima möchte ich mich bei *allen* Mitarbeitern des Institutes bedanken. Ohne die zahlreichen Gespräche und die konstruktive Zusammenarbeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Frau Dipl.-Biochem. Astrid Meyboom, Frau Dipl.-Chem. Kristina Sachs und Herrn Dipl.-Biochem. Christoph Seibert danken, die stets unmittelbar an Erfolgen und Mißerfolgen meiner Messungen Anteil hatten.

Ohne zahlreiche Präparationen der verschiedenen Proteine, die von Frau Jana Engelmann, Frau I. Semjonow und Frau C. Koch durchgeführt wurden, hätte ich die vorliegende Arbeit nicht in diesem Zeitrahmen erstellen können. Ich möchte ihnen für ihre Hilfe sehr herzlich danken.

Bei technischen Problemen konnte ich stets auf schnelle Hilfe von Herrn Dr. Siegurd Magnus, Herrn Andreas von Garnier und Herrn Thomas Penczok zählen. Ihnen ist es zu verdanken, daß alle technisch bedingten Ausfallzeiten nur von kurzer Dauer waren.
Bei Frau R. Raddatz und Frau M. Neumann möchte ich mich für die schnelle und unbürokratische Lösung von organisatorischen Problemen bedanken. Frau Raddatz hatte ungeachtet ihrer eigenen Arbeit stets Zeit, sich um mein Anliegen zu kümmern. Frau Neumann erfüllte umgehend jeden Literaturwunsch und half, wo immer es nötig war.

Für die Überarbeitung des Manuskripts danke ich Herrn Dr. Martin Heck, Frau Dipl.-Biochem. Astrid Meyboom und meinem Mann Ralf. Sie haben sehr viel Zeit aufgewendet um mir bei der Darstellung meiner Ergebnisse zu helfen.

Herrn Dr. Christian Herrmann möchte ich stellvertretend für die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Wittinghofer am Max-Planck-Institut in Dortmund danken für die zur Verfügung gestellten Proteine (Ras, Gap und Cdc 25) und das aufgereinigte GTP.

Meinem Mann Ralf und meinen Eltern und Schwiegereltern danke ich für die liebevolle Unterstützung und das Verständnis, das sie mir entgegengebracht haben.

Lebenslauf

Vorname, Name	Gabriele Tellgmann, geb. Weiss	
Geburtsdatum	31.07.1969	
Geburtsort	Hermannstadt (Rumänien)	
Eltern	Karlheinz Weiss	(Dipl.-Ing. Elektronik)
	Monika Weiss, geb. Unterer	(Dipl.-Chemikerin)
Familienstand	verheiratet	
Staatsangehörigkeit	deutsch	

Schule

1975-1977 Grundschule, Hermannstadt
1977-1979 Anne-Frank-Schule, Freiburg
1979-1988 Rotteck-Gymnasium, Freiburg
Mai 1988 Abitur

Hochschule

1988-1994 Studium der Physik an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
Diplomarbeit am Kristallographischen Institut der Universität
unter Betreuung von Prof. Dr. V. Krämer
Thema: Untersuchungen zur Kristallzüchtung von Wismutoxidhalogeniden
Abschluß: Diplom (März 1994)

1989-1993 Studium der Mathematik und Physik - Lehramt an Gymnasien
an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
Abschluß: 1. Staatsexamen (November 1993)

seit 01.01.1995 Promotion am Institut für medizinische Physik und Biophysik der Charité,
Humboldt-Universität zu Berlin
Betreuung durch Prof. Dr. K.-P. Hofmann
Thema der Doktorarbeit:
Messung von Reaktionsenthalpien von Teilreaktionen der visuellen
Kaskade

Erklärung

Ich erkläre, daß ich diese Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und daß alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht worden sind.