



Doctoral Thesis

Rotationsbewegung und Flexibilität der Calcium, Magnesium abhängigen ATPase des sarkoplasmatischen Reticulums eine dynamische Absorptionsanisotropieuntersuchung an Proteingebundendem Eosin

Author(s):

Bürkli, Arne

Publication Date:

1980

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000238146> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 6766

ROTATIONSBEWEGUNG UND FLEXIBILITAET DER CALCIUM, MAGNESIUM
ABHAENGIGEN ATPase DES SARKOPLASMATISCHEN RETICULUMS:

EINE DYNAMISCHE ABSORPTIONSANISOTROPIEUNTERSUCHUNG AN
PROTEINGEBUNDENEM EOSIN

A B H A N D L U N G

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der

E I D G E N O E S S I S C H E N T E C H N I S C H E N
H O C H S C H U L E Z U E R I C H

vorgelegt von

A R N E B U E R K L I

Dipl. Natw. ETH
geboren am 23. Januar 1949
von Meilen

1980

angenommen auf Antrag von
Prof. G. Semenza (Referent)
PD Dr. R.J. Cherry (Coreferent)



SUMMARY

Sarcoplasmic reticulum membrane vesicles (SR) in which the major protein is the (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -dependent ATPase (Ca^{2+} -ATPase) were isolated from rabbit hind leg muscles. Sulfhydryl residues of SR were labeled in the presence of MgATP with the triplet probe 5'-iodoacetamidoeosin (JA-eosin). At least 80 % of the bound label was attached covalently to the Ca^{2+} -ATPase. The rest was covalently bound to minor proteins or uncovalently bound either to proteins or lipids. The labeling occurred without loss of the ATP splitting activity and without a large reduction of oxalate dependent Ca^{2+} -accumulation. Eosin is a good sensitizer for photooxidative inactivation of the ATP splitting activity and of the Ca^{2+} -transport. Photoinactivation is followed by unselective crosslinking of the membrane proteins and by a mild bleaching of the eosin dye. Photoinactivation of ATPase activity and crosslinking of the proteins could be prevented completely by working under dim red light or by displacing oxygen in the sample with argon (flash photolysis conditions). Inhibition of Ca^{2+} -accumulation was only slightly reduced by the latter procedure and photobleaching of eosin remained unchanged.

Rotational mobility of the JA-eosin labeled Ca^{2+} -ATPase of SR was investigated by observing the decay of dichroism of flash - induced transient absorption changes of the eosin probe. The absorption anisotropy data were fitted to the

monoexponential equation $r(t) = A_1 \cdot e^{-t/\alpha} + A_3$. The value of the $r(t)$ - curve at 20 μ sec after the exciting flash (r_{20}) is found to be small at room temperature compared to other eosin labeled membrane proteins. r_{20} - values increased considerably with decreasing temperature and upon fixation with glutaraldehyde. The Arrhenius plot of r_{20} of labeled SR shows a break around $13 \pm 2^\circ\text{C}$. Similar properties were also found for purified Ca^{2+} - ATPase vesicles which were partially depleted of membrane lipids.

The low value of r_{20} at physiological temperature might in principle be explained by any one of the following three motions: independent motion of the probe in its binding site, segmental motion of the part of the protein which contains eosin, rotation of the whole protein around an axis perpendicular to the plane of the membrane. Steady state fluorescence anisotropy experiments and measurements on glutaraldehyde fixed and lipid depleted samples lead to the conclusion that segmental motion is present and in part is responsible for the low r_{20} - values. It is possible that this internal flexibility of the Ca^{2+} - ATPase has considerable significance for the functional properties of the enzyme.

At times longer than 20 μ sec the anisotropy curve $r(t)$ decays with a time constant (α) which varies from 90 μ sec at 0°C to 40 μ sec at 37°C . This decay is assigned to rotation of the Ca^{2+} ATPase about an axis normal to the plane of the membrane. In 50 % sucrose vesicle rotation makes no contribution to the $r(t)$ - curve. Some evidence for self aggregation of the protein at low temperature may be deduced from temperature dependence of the constant A_1 .

KURZFASSUNG

Die Membranvesikel des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) isolierte man aus den weissen Muskeln von Kaninchenhinterbeinen. Sulfhydrylgruppen des SR's wurden in Gegenwart von MgATP mit der Tripletprobe 5'-iodo-acetamido-Eosin (JA-Eosin) markiert. Mindestens 80 % des vesikelassozierten JA-Eosin's wurde kovalent an die (Ca^{2+}, Mg^{2+}) - abhängige ATPase (Ca^{2+} -ATPase), dem Hauptprotein des SR's gebunden. Der Rest war entweder nicht kovalent protein- beziehungsweise lipidassoziiert, oder wurde kovalent an die Nebenproteine gebunden. Die Markierung erfolgte ohne Verlust der ATP- Spaltungsaktivität und ohne grosse Hemmung der oxalatabhängigen Ca^{2+} - Speicherung. Eosin, ein guter Sensibilisator photooxidativer Reaktionen, induzierte im belichteten, JA-Eosin-markierten SR eine Inaktivierung der ATPase - Aktivität und des Ca^{2+} - Transportes. Zusätzlich führte eine solche Photo- reaktion zur unselektiven Vernetzung der Membranproteine des SR's und zu einem teilweisen Ausbleichen des gebundenen Eosins. Arbeitete man unter diffusem Rotlicht oder ersetzte man den Sauerstoff in der Membransuspension durch das für die Blitzlichtphotolyse notwendige Argongas, so konnte sowohl die Hemmung der ATPase - Aktivität als auch die Proteinvernetzung verhindert werden. Der Ca^{2+} - Transport dagegen ging auch bei Belichtung einer sauerstofffreien Probe fast vollständig verloren, während der Eosinausbleichungsgrad gleich blieb.

Zur Untersuchung der Rotationsbewegung der Ca^{2+} - ATPase verfolgte man mit einer Blitzlichtphotolyseapparatur den Dichroismuszerfall der zeitabhängigen, blitzlichtinduzierten Absorptions-

signale einer Eosinprobe. Die Absorptionsanisotropiekurve $r(t)$ des JA-Eosin-markierten SR's zeigte einen monoexponentiellen Zerfall, entsprechend der Gleichung $r(t) = A_1 e^{-t/a} + A_3$. Die 20 μ sec nach dem anregenden Lichtblitz gemessenen Anisotropiewerte (r_{20}) waren bei physiologischen Temperaturen klein gegenüber den r_{20} -Werten anderer eosinmarkierter Membranproteine. Die r_{20} -Werte stiegen mit abnehmender Temperatur und nach einer Glutaraldehydfixation beachtlich an. Die Arrheniusfunktion $\log r_{20} = f(1/T)$ von JA-Eosin-markiertem SR zeigte eine Diskontinuität bei $13 \pm 2^\circ\text{C}$. Aehnliche Eigenschaften wurden auch für eosinmarkierte, lipidarme, gereinigte Ca^{2+} -ATPase-Vesikel gefunden.

Der bei physiologischen Temperaturen tief liegende r_{20} -Wert kann theoretisch durch jede der drei nachstehenden Bewegungen erklärt werden: Unabhängige Bewegung des Eosinmoleküls in seinem Bindungssitz, segmentelle Bewegung des eosintragenden Proteinteils, Rotation des ganzen Proteins um eine senkrecht zur Membranebene stehende Achse.

Statische Fluoreszenz-anisotropieexperimente und dynamische Absorptionsanisotropiemessungen an lipidarmen oder mit Glutaraldehyd fixierten Proteinproben führten zur Erkenntnis, dass die Ca^{2+} -ATPase segmentelle Bewegungen ausführt, welche teilweise für die tiefen r_{20} -Werte verantwortlich sind. Untersuchungen dieser internen Flexibilität des Ca^{2+} -ATPase-Moleküls könnte in Zukunft eine beachtliche Bedeutung für das Verständnis der Funktionsweise des Enzyms zukommen.

Die Zeitkonstante (α), welche den Anisotropieabfall nach den ersten 20 μ sec beschreibt, variiert zwischen 90 μ sec bei 0°C und 40 μ sec bei 37°C . Dieser Abfall wird der Rotation des

Membranproteins um eine Membrannormale zugeordnet. In einer wie hier verwendeten 50 %-igen Saccharoselösung leisten die Vesikel des SR's keinen Beitrag zum Anisotropiezerfall. Aus der Temperaturabhängigkeit der Konstanten (A_1) können Hinweise auf die Selbstaggregation des Proteins bei tiefen Temperaturen abgeleitet werden.