

ZEITAUFGELÖSTE FLUORESCENZSPEKTROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNGEN AN DER CYTOPLASMATISCHEN
OBERFLÄCHE VON RHODOPSIN

im Fachbereich Physik
der Freien Universität Berlin eingereichte Dissertation

TAI-YANG KIM

Berlin, Juni 2012

Erstgutachterin: Prof. Dr. Ulrike Alexiev
Zweitgutachter: Prof. Dr. Holger Dau
Tag der Disputation: 10. Juli 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Motivation	9
1.2	Zielsetzung und Lösungsansatz	11
1.2.1	Aufbau einer 2D-TCSPC-Apparatur zur Detektion von Proteinkonformationsänderungen	11
1.2.2	Dynamik an der cytoplasmatischen Oberfläche von Bakteriorhodopsin	12
1.2.3	Dynamik an der cytoplasmatischen Oberfläche von Rhodopsin und die Interaktion mit Signalproteinen	12
2	Grundlagen	15
2.1	Rhodopsin - das Sehpigment im Auge	15
2.1.1	Organisation von Rhodopsinmembranen	16
2.1.2	Struktur des Rhodopsins	16
2.1.3	Funktionszyklus des Rhodopsins	20
2.1.4	Funktionszyklus des G-Proteins und Signalweiterleitung	22
2.1.5	Deaktivierung der Signalkaskade	24
2.2	Bakteriorhodopsin	24
2.2.1	Struktur des Bakteriorhodopsin	24
2.2.2	Funktionszyklus des Bakteriorhodopsin	26
2.3	Dynamik von Proteinen	27
2.4	Fluoreszenzlöschung	29
2.4.1	Energieübertragungsmechanismen	30
3	Material und Methoden	33
3.1	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	33
3.1.1	Messprinzip der Einzelphotonenzählungsspektroskopie	33
3.2	Transiente Flash - Absorptionsspektroskopie	35
3.2.1	Meßaufbau	35
3.2.2	Meßbedingungen	36
3.3	Einzelmolekülexperimente	36
3.3.1	Messprinzip der Einzelmolekülexperimente	36
3.3.2	Aufbau	37
3.4	Zirkulardichroismusexperimente	38
3.5	Fluoreszenzreportergruppen	40
3.6	Präparation der biologischen Proben	42
3.6.1	Bakteriorhodopsinpräparation	42
3.6.2	Rhodopsinpräparation	42
3.6.3	Opsinpräparation / Präparation von phosphoryliertem Rhodopsin	43
3.6.4	Transducinpeptide	44
3.6.5	Arrestinpräparation	44
3.7	Auswertung der Experimente	44
3.7.1	Analyse zeitaufgelöster Fluoreszenzdaten	44
3.7.2	Analyse der Einzelmolekülexperimente	55
4	Resultate & Diskussion Teil I: Aufbau einer zeitaufgelösten Fluoreszenz "Pump-Probe" Apparatur	57
4.1	Beschreibung der 2D-TCSPC Apparatur	58

4.2	Testmessung mit Bakteriorhodopsin	60
4.3	Diskussion	64
5	Resultate & Diskussion Teil II: Die Dynamik von Helix 8 an der cytoplasmatischen Seite von Rhodopsin bei Rezeptoraktivierung	67
5.1	pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften von Fluorescein	68
5.1.1	Freies Fluorescein	68
5.1.2	Rhodopsin-Fluorescein-Komplex	72
5.2	Fluorescein-Fluoreszenzzerfallszeiten τ_i als Indikator für Helix 8 - Umgebungsänderungen	75
5.2.1	Apoprotein Opsin	76
5.2.2	Rhodopsin Diskmembranen	78
5.2.3	Solubilisiertes Rhodopsin in β -DM Mizellen	84
5.2.4	Zusammenfassende Analyse der Fluoreszenzlebensdauer-messungen als Indikator für Helix 8 Umgebungsänderungen	86
5.3	Die Dynamik der Helix 8 von Rhodopsin	90
5.3.1	Helix 8 - Dynamik unter physiologischen Puffer-Bedingungen	91
5.3.2	Opsin-AF in nativer Membran	93
5.3.3	Anisotropie der Opsin-Mizellen	95
5.3.4	Anisotropie der Rhodopsin Membranen bei 0°C	97
5.3.5	Anisotropie der Rhodopsin Membranen bei 37°C	101
5.3.6	Analyse der Helix 8 Dynamik mittels Ordnungsparameter $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ und der Verteilungsfunktion $f(\Theta)$	104
5.4	Diskussion	107
6	Resultate & Diskussion Teil III: Rhodopsinaktivierung & Interaktion mit Transducin	109
6.1	Opsin + pG τ α – LY Fluoreszenzmessungen	115
6.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenzzerfallsänderungen während der Bindung des pG τ α – LY an das lichtaktivierte Rhodopsin	117
6.2.1	Zeitaufgelöste Messung der Bindung von pG τ α – LY	117
6.3	Einfluss des pG τ α -Peptides auf die Helix 8 Dynamik	123
6.4	Verfolgung der Bindung von G τ α -Peptiden an der Oberfläche von Diskmembranen	126
6.5	Diskussion	130
7	Resultate & Diskussion Teil IV: Rhodopsin-deaktivierung & Interaktion mit Arrestin	133
7.1	Anisotropie von Helix 8	133
7.2	Diskussion	137
8	Zusammenfassung	139
	Publikationsliste	143
	Abkürzungsverzeichnis	145
	Literaturverzeichnis	147
	Selbstständigkeitserklärung	161
	Danksagung	163

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an der cytoplasmatischen Oberfläche des lichtsensitiven Sehpigments Rhodopsin durchgeführt. Diese Rezeptoroberfläche spielt eine entscheidende Rolle bei der Rezeptoraktivität, da sich dort nach Aktivierung der Lichtantenne - dem Liganden Retinal - die Rezeptorkonformationen manifestieren, die zur Bindung des G-Proteins Transducin und des Inhibitorproteins Arrestin führen.

Ziel der Arbeit war es, die Dynamik und die Änderungen der Umgebungsparameter an der cytoplasmatischen Oberfläche in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern zu bestimmen. Dazu wurden Fluoreszenzanisotropieexperimente mit einem an der amphiphatischen Helix 8 an Position Cys316 gebundenen Fluorescein durchgeführt. Über eine Analyse der Fluoreszenzanisotropiekurven mit Hilfe der Ordnungsparameter $\langle P_2 \rangle$ und $\langle P_4 \rangle$ konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem Bewegungsmodell von Helix 8, dem Rezeptorzustand, welcher unter anderem von pH und Temperatur abhängig ist, und der Proteinumgebung ermittelt werden.

Im Zuge der Arbeit wurde eine zeitkorrelierte Einzelphotonenzählungs (TCSPC)-Apparatur zur Detektion zeitaufgelöster Fluoreszenz- und Dynamikänderungen zu einer multidimensionalen TCSPC-Apparatur für Fluoreszenz *Pump-Probe* Messungen ausgebaut. Damit können nun zeitaufgelöste Fluoreszenz- und Dynamikänderungen in Abhängigkeit der Proteinfunktion detektiert werden. Die Proteinreaktion wird durch einen Farbstofflaser angeregt. Auf der Zeitachse der Proteinreaktion werden dann sequenziell Pikosekunden-zeitaufgelöste Fluoreszenzzerfallskurven aufgenommen, die es erlauben, die Veränderung der Nanosekunden-Oberflächendynamik zu verfolgen. Zum automatisierten Austausch der Probe wurde eine Flußzelle in den Aufbau integriert. Mit dieser Apparatur wurde die Kinetik der Bindung des G-Proteins Transducin an den Sehrezeptor Rhodopsin mit Hilfe eines in der Arbeitsgruppe neuentwickelten, fluoreszenzbasierten Helix-Faltungs-Sensors untersucht, welches dem C-terminalen Ende der katalytischen α -Untereinheit des Transducins entspricht. Dieses C-terminale Ende der α -Untereinheit gehört zu den drei Bindungsankern des Transducins und bindet spezifisch an den aktivierten Rezeptor. Es konnte damit gezeigt werden, daß die Kinetik der Bindung des Peptides an das lichtaktivierte Rhodopsin zweistufig ist. Der erste Schritt - die Vorbindung - findet in Membranumgebung vor der Ausbildung des aktiven Meta-II Intermediats von Rhodopsin statt. Der zweite Schritt - die Helixbildung des Sensors durch die Änderung der Konformation an der cytoplasmatischen Oberfläche - findet nach der Ausbildung von Meta-II statt.

Ebenfalls wurde ein Mikroskopaufbau zur Messung der internen Totalreflektionsfluoreszenz (TIRF) in der Arbeitsgruppe etabliert, mit dessen Hilfe die Diffusion von einzelnen lichtaktivierten Rhodopsinmolekülen in nativen Diskmembranfragmenten untersucht wurde. Es konnte damit ein heterogenes Diffusionsverhalten der lichtaktivierten Rhodopsinmoleküle in nativen Membranen nachgewiesen werden. Ein Teil der Moleküle ist wahrscheinlich in Oligomeren organisiert und diffundiert langsam über die Diskmembran. Der andere Teil der Moleküle bewegt sich in kleineren Einheiten mit einer höheren Diffusionsrate über die Diskmembran. Zusätzlich ist eine Einschränkung der Diffusion auf Bereiche zu erkennen, welche der Größe der gemessenen Diskmembranfragmente entsprechen.

Abstract

The cytoplasmic surface of the G-Protein coupled receptor rhodopsin plays a crucial role in the process of vision. The activation of rhodopsin is triggered by a photon, which is absorbed by the ligand, the retinal. The accompanying conformational changes of the protein are reflected on the protein surface. They lead to binding of the G-Protein transducin - which starts the visual cascade - and also of the protein arrestin - which terminates the visual cascade.

The aim of this work was to analyse the changes of rhodopsins cytoplasmic surface in dependence of several parameters such as pH, temperature and activation state. Therefore we performed fluorescence anisotropy measurements on the fluorescent dye fluorescein covalently bound to the amphiphatic helix 8 at position Cys316 of rhodopsin. The examination of the time-resolved fluorescence decay curves via order parameters $\langle P_2 \rangle$ and $\langle P_4 \rangle$ showed a direct correlation between the pH and temperature-dependent receptor state and the distribution model of helix 8, which itself depends on the protein environment.

In this work, a time correlated single photon counting (TCSPC)-apparatus was extended to a multi dimensional pump-probe setup to measure time-resolved fluorescence and dynamic changes along the reaction coordinate of protein function. A dye laser triggers the protein function (pump) and a laser with picosecond pulses excites the fluorescent dye (probe). The fluorescence decay curves are recorded sequentially along the reaction coordinate of the protein. The decay curves allow the analysis of the protein nanosecond surface dynamics. With this setup we measured the binding kinetics of transducin to light activated rhodopsin with a newly developed, fluorescence based helix folding sensor. This sensor has an amino acid sequence similar to the native C-terminus of the transducin α -subunit, which is one of the three transducin anchors, and can specifically bind to light activated rhodopsin (metarhodopsin-II). We could show for the first time, that binding occurs via a two-step mechanism in native membranes. The prebinding is the first step. In comparison with time correlated absorption measurements prebinding is faster than the formation of the active metarhodopsin-II state. The second step is called final binding and is characterized by formation of an α -helical structure. This structural change is induced due to conformational changes at the cytoplasmic surface of the light activated rhodopsin and is much slower than formation of metarhodopsin-II.

Measurements of the diffusion of individual light activated rhodopsin molecules in native membrane fragments on a TIRF-microscope are also presented in this work. We were able to identify a heterogeneous diffusion behaviour of slow and fast diffusing rhodopsin molecules in the membrane. The slowly diffusing fraction was assigned to oligomeres of rhodopsin organized in patches and the fast diffusing molecules to smaller units (possibly mono- or dimers) of rhodopsin. The diffusion is restricted to an area, which is comparable to the size of the disk-membrane patches used in these experiments.

Einleitung

1.1 Motivation

Proteine sind biologische Makromoleküle, die aus kovalent verbundenen Einzelbausteinen, den Aminosäuren, bestehen. Proteine gehören zu den elementaren Bestandteilen von biologischen Zellen und sind sowohl am Aufbau dieser als auch an ihrer Funktion beteiligt. Zu den Funktionen gehören u.a. die Replikation von Desoxyribonukleinsäure, die Synthese von Proteinen, Energieumwandlung und Speicherung, Vermittlung des Ionentransports durch Lipidmembranen (Ionenkanäle), die Erkennung von Signalen außerhalb der Zelle und die Weiterleitung der Information in das Innere der Zelle (Membranrezeptoren), und die Durchführung katalytischer Reaktionen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit der molekularen Dynamik des Proteins Rhodopsin, welches zur größten Gruppe von Membranrezeptoren, den G-Protein gekoppelten Rezeptoren¹ gehört. Diese integralen Membranrezeptoren können die unterschiedlichsten Signale wie Photonen, Ionen, Hormone, Pheromone oder Neurotransmitter erkennen, das Signal über die Membran weiterleiten und damit eine zelluläre Reaktion auslösen. Viele GPCRs sind direkt oder indirekt mit verschiedenen Krankheiten verbunden. Das Sehpigment im Auge, der GPCR Rhodopsin, ist z.B. durch Mutationen in der Aminosäuresequenz des Rezeptors an der Augenkrankheit Retinitis pigmentosa beteiligt, einer Netzhautdegeneration bei der die Photorezeptoren zerstört werden. β -Adrenorezeptoren leiten u. a. die Signale des „Stresshormons“ Adrenalin und des Neurotransmitters Noradrenalins weiter. Damit sind diese Rezeptoren an Krankheiten wie Bluthochdruck und Herzinfarkt beteiligt. Aufgrund der zellulären Reaktionen, die sie auslösen, spielen die GPCRs eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Medikamenten, deren Wirkstoffe direkt oder indirekt die Funktion von GPCRs beeinflussen. Ungefähr 40% aller auf dem Markt erhältlichen Medikamente wirken auf GPCRs. Ein bekanntes Beispiel sind die Beta-Blocker, die eine antagonistische (blockierende) Wirkung auf die Funktion von β -Adrenorezeptoren haben und damit den Blutdruck sowie die Ruheherzfrequenz senken. Jedoch haben viele dieser Medikamente unerklärliche oder unerwünschte Nebeneffekte. Gleichzeitig werden immer neue Verbindungen zwischen Krankheiten, wie z.B. verschiedenen Krebsarten oder Alzheimer, und GPCRs entdeckt. Um Nebeneffekte zu reduzieren oder neue Wirkstoffe zu entwickeln, ist ein mechanistisches molekulares Verständnis über die Interaktion des Rezeptors mit dem Liganden, die Signalweiterleitung durch die Membran und die Kopplung an die verschiedenen intrazellulären Signaltransduktionsketten unerlässlich.

Interaktion und Funktionsweise des Rezeptors werden durch die räumliche Anordnung und die dynamischen Eigenschaften der beteiligten Proteine und die Änderung der dynamischen Eigenschaften während der Funktion bestimmt. Die Änderungen der dynamischen Eigenschaften des Rezeptors sind oft mit Konformationsänderungen des Proteins verbunden [Pieper et al., 2008]. Neuere Erkenntnisse über die Wirkungsweise von GPCRs deuten darauf hin, dass spezifische Konformationen des Rezeptors für die Kopplung an bestimmte intrazelluläre Signaltransduktionswege verantwortlich sind [Rajagopal et al., 2010]. Daher ist es von großem Interesse, die dynamischen Eigenschaften der beteiligten Proteine zu verstehen.

Die molekulare Dynamik von Proteinen erstreckt sich über große Zeitbereiche, von Femtosekunden wie bei der Chromophorisomerisierung (licht-induzierte Isomerisierung des Liganden Retinal)

¹ GPCR

in Bakteriorhodopsin [Herbst et al., 2002] bis hin zu Minuten, Stunden oder Tagen, wenn die Reorganisation von gesamten Proteinbereichen bzw. die Auflösung der Quartärstruktur involviert ist.

Die Kinetik der Dynamik- und Konformationsänderungen des Proteins ist abhängig von dem jeweils betrachteten Strukturelement des Proteins. Die Geschwindigkeit der Konformationsänderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen ist durch die Diffusion der Proteinsegmente limitiert und erfolgt im Bereich von Nanosekunden bis Millisekunden [Bieri et al., 1999, Alexiev et al., 2003, Schröder et al., 2005]. Um Konformationsänderungen experimentell zu ermitteln, ist es von Vorteil, die Tertiärstruktur des Proteins zu kennen. Dazu wird das Protein kristallisiert und mittels Röntgenstrukturanalyse vermessen und analysiert. Da GPCRs membranständig sind, ist ihre Kristallisation sehr schwierig. Es existierten daher lange Zeit nur Kristallstrukturen von Rhodopsin. Kristallstrukturen [Palczewski et al., 2000], welche aus Röntgenbeugungsexperimenten [Luecke et al., 2001, Oka et al., 1999, Sass et al., 2000] gewonnen wurden, sind zeitlich gemittelte Strukturen. Die Dynamik flexibler Proteinstrukturen kann daher nicht quantitativ bestimmt werden. Dafür gibt es eine Reihe von anderen Messmethoden, wie die zeitaufgelöste EPR [Farrens et al., 1996, Klare et al., 2004, Radzwill et al., 2001], verschiedene NMR-Methoden [Brown et al., 2002, Cai et al., 1999, Crocker et al., 2006, Klein-Seetharaman et al., 1999], Fluoreszenzspektroskopie [Alexiev et al., 2003, Dunham und Farrens, 1999, Imamoto et al., 2000, Pöhlmann et al., 2004, Schröder et al., 2005], und weitere Methoden [Ernst et al., 2000, Itoh et al., 2001], welche größtenteils Messungen von Proteinmutanten beinhalten. Dazu gehören die Methoden des ortsspezifischen Fluoreszenz-Labelings [Alexiev et al., 2003], der ortsspezifischen Spinlabel-Markierung [Farrens et al., 1996], und der ortsspezifischen NMR-Label-Markierung [Klein-Seetharaman et al., 1999].

Zeitaufgelöste Fluoreszenzdepolarisationsexperimente sind eine geeignete Methode unter physiologischen Bedingungen Diffusionsdynamiken und Konformationsänderungen von Peptiden und Proteinsegmenten, insbesondere von Oberflächen-Schleifensegmenten² [Alexiev et al., 2003, Schröder et al., 2005] auf einer Zeitskala von Pico- bis Nanosekunden zu untersuchen. Zusätzlich können weitere Erkenntnisse, z.B. über kurzreichweitige Konformationsänderungen, mit Fluoreszenzlöschung über photoinduzierten Elektrontransfer gewonnen werden.

Auch Änderungen von Umgebungsparametern können sich unmittelbar auf die Fluoreszenzlebensdauer und -intensität der fluoreszierenden Reporter-moleküle auswirken [Kim et al., 2009, Mansoor et al., 2002, Pöhlmann et al., 2004, Yang et al., 2003].

Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Membranproteine sind die membranständige Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (bR) aus dem halophilen Bakterium *Halobacterium salinarium* und das Sehpigment in den Stäbchenzellen der Netzhaut des Auges, das Rhodopsin. Beide Proteine teilen das Strukturmotiv aus sieben transmembranen Helizes und enthalten den kovalent gebundenen Liganden Retinal. Die Funktion beider Proteine wird durch die Absorption eines Photons durch den gebundenen Chromophors Retinal initiiert. bR ist als lichtaktive Protonenpumpe für den Aufbau eines Protonenkonzentrationsgradienten mit einem resultierenden elektrischen Potential über der Membran verantwortlich, welcher direkt von der ATP-Synthetase zur Gewinnung von ATP genutzt werden kann. Das Sehpigment Rhodopsin gehört zu den GPCRs. Dieses befindet sich in den disk-artigen Organellen (Disks) im Außensegment der Stäbchenzellen in der Netzhaut des Auges. Als erstes Glied in der visuellen Signalkaskade wandelt das Rhodopsin Licht in ein chemisches Signal um, welches dann als elektrischer Impuls weiter in das Gehirn übertragen wird. Durch Isomerisierung des Retinals wird eine Konformationsänderung ausgelöst, welche das Rhodopsin in das aktive Intermediat Metarhodopsin-II (Meta-II) überführt und auf der cytoplasmatischen Seite des Proteins eine Bindung des G-Proteins Transducin und dadurch eine Weiterleitung des Signals ermöglicht. Die Inaktivierung des Rhodopsins erfolgt durch Rhodopsinkinase, welche

² engl. *Loop*

den C-Terminus des aktiven Rhodopsins phosphoryliert. Dadurch kann mit hoher Affinität das Inhibitorprotein Arrestin gebunden werden, welches die Signalkaskade blockiert.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Aufbau zur Messung von zeitaufgelösten Fluoreszenz- und Anisotropiezerfällen vorgestellt. Es werden Experimente zu zeitaufgelösten Konformationsänderungen an der cytoplasmatischen Oberfläche von Bakteriorhodopsin und visuellem Rhodopsin, welche Dynamikänderungen in den Proteinen während des Aktivierungsprozesses widerspiegeln, sowie zu zeitaufgelösten Bindungsexperimenten vom G-Protein Transducin und dem Inhibitorprotein Arrestin gezeigt.

1.2 Zielsetzung und Lösungsansatz

1.2.1 Aufbau einer 2D-TCSPC³-Apparatur zur Detektion von Proteinkonformationsänderungen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu realisieren, die es erlaubt, die Dynamik von Proteinsegmenten im Nanosekundenbereich und die Kinetik ihrer Änderung während der Proteinfunktion zu detektieren. Mit Hilfe dieser Methode sollten die dynamischen Änderungen von Oberflächenschleifensegmenten des GPCRs Rhodopsin bei der Aktivierung des Rezeptors untersucht werden und Aufschlüsse über die Kopplung von dynamischen Proteinoberflächenzuständen und Reaktionsintermediaten des Rezeptors geben.

Zu den in der Biophysik verwendeten spektroskopischen Methoden gehört u.a. die Fluoreszenzspektroskopie. Tryptophan, eine Aminosäure, wird oft als proteinintrinsischer Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Fluoreszierende Proteine, wie das Green Fluorescent Protein, können als Fusionsprotein genetisch an das zu untersuchende Protein gekoppelt werden, um Informationen auf zellulärer Ebene zu erhalten.

Für die Untersuchung der molekularen Eigenschaften eines Proteins wird dieses meist molekularbiologisch überexprimiert, isoliert und gereinigt. Dabei können gezielt einzelne Aminosäuren in der Sequenz ausgetauscht werden. Die Aminosäure Cystein besitzt eine reaktive Thiolgruppe und erlaubt damit die gezielte chemische Kopplung von reaktiven Fluoreszenzfarbstoffen an eine gewünschte Stelle im Protein. Die spektralen und zeitaufgelösten Fluoreszenzeigenschaften der Fluoreszenzreportergruppe (Fluoreszenzmarker) als auch deren Fluoreszenzintensität reagieren auf Veränderungen in der unmittelbaren Proteinumgebung des Fluorophores. Die Fluoreszenzanisotropie einer kovalent gebundenen Reportergruppe kann sich ändern, wenn sich die Dynamik des Segmentes ändert, an dem der Farbstoff gebunden ist. Sterische Einschränkungen des Markers können ebenfalls detektiert werden. Änderungen von Fluoreszenzparametern wie Verschiebungen der Wellenlängen des Emissionsmaximums, der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzlebensdauer können Informationen über statische und dynamische Fluoreszenzlöschung, sowie über die Änderung in der Polarität der Umgebung geben.

Diese Informationen können einfach in stabilen Intermediatzuständen eines Proteins ermittelt werden. Sollen jedoch Reaktionszwischenintermediate bzw. ein kurzlebiger Zustand des Proteins speziell über die zeitaufgelöste Fluoreszenz der Reportergruppe charakterisiert werden, dann muss entweder mit Hilfe einer Proteinmutante oder niedriger Temperatur der Intermediatzustand eingefangen, d.h. seine Lebensdauer verlängert werden. Bei diesen beiden Methoden kann jedoch die zeitliche Änderung einer Proteinkonformation, die über die Fluoreszenz der Reportergruppe detektiert wird, nicht erfasst werden. Um dies zu ermöglichen, muss die zeitaufgelöste Fluoreszenz (Fluoreszenzlebensdauer) über der Zeitachse der Proteinreaktion aufgelöst gemessen werden.

³ Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung - *Time Correlated Single Photon Counting*

Das bedeutet, die Fluoreszenzemission wird simultan über zwei ganz verschiedene Zeitachsen gemessen – über die Zeitachse des Fluoreszenzzerfalls des Fluorophors im Nanosekundenbereich und über die Zeitachse der Proteinreaktion im Millisekunden- bis Stundenbereich.

Die Aufgabe bestand deshalb zunächst darin, eine bestehende zeitaufgelöste Fluoreszenzapparatur zur Messung von Fluoreszenzlebensdauer/Fluoreszenzanisotropie so zu erweitern, dass diese während einer Proteinreaktion – also in zwei „Zeitdimensionen“ (2D) – gemessen werden können. Die Messapparatur soll speziell für die Messung von lichtaktivierbaren Proteinen angepasst werden und diese automatisiert durchführen. Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählungsapparaturen sind für die Erweiterung gut geeignet. Als Einzelphotonenmessmethode besitzt sie ein geringes Rauschen und eine hohe zeitliche Auflösung auf der Zeitachse des Fluoreszenzzerfalls des Fluorophors. Auch muß die Zuordnung der Einzelmessungen, welche sich zu Fluoreszenzzerfällen addieren, bei diesen repetitiven Messungen auf der Zeitachse der Proteinfunktion geeignet realisiert werden.

Um den Anforderungen gerecht zu werden, sollte das Funktionsprinzip des neuen 2D-TCSPC-Meßaufbaus für Fluoreszenz-*Pump-Probe*-Messungen folgendermaßen aussehen: Eine Messung wird mit der Lichtaktivierung des Proteins gestartet (*Pump*-Puls). Anschließend werden zeitaufgelöste Fluoreszenzzerfälle sequenziell über die Photoreaktion des Proteins aufgenommen, wobei die Zeitauflösung auf der Achse der Photoreaktion bis in den Submillisekundenbereich gewählt werden kann. Der *Probe*-Puls ist der Picosekundenanregungspuls für die Fluoreszenz. Für eine bessere Statistik können die Messungen wiederholt und ihre Ergebnisse aufintegriert werden. Proben, welche keinen geschlossenen Photozyklus besitzen, werden vor Beginn jeder Einzelmessung automatisch ausgetauscht.

1.2.2 Dynamik an der cytoplasmatischen Oberfläche von Bakteriorhodopsin

Um die neu aufgebaute 2D-zeitaufgelöste Fluoreszenz-Messapparatur zu testen, werden zunächst Messungen an bR durchgeführt, da die Funktion der Protonenpumpe mit einem geschlossenen Photozyklus einher geht, wobei der Ligand Retinal kovalent gebunden bleibt. Dies erlaubt eine repetitive Anregung der Proteinfunktion ohne Probenaustausch. Die cytoplasmatische Proteinoberfläche von bR ist der Ort der Protonenaufnahme und es ist bekannt, dass dort während dieses Prozesses große Konformationsänderungen stattfinden. Es wurde deshalb eine bR-Mutante verwendet, an die die Fluoreszenzreportergruppe selektiv an die erste cytoplasmatische (AB-) Schleife gebunden ist.

1.2.3 Dynamik an der cytoplasmatischen Oberfläche von Rhodopsin und die Interaktion mit Signalproteinen

Konformationsänderungen an der cytoplasmatischen Oberfläche von Rhodopsin

Bei der Lichtaktivierung von Rhodopsin geht dieses in das aktiven Meta-II Intermediat über. Dieser Übergang wird von Konformationsänderungen, welche sich vor allem an der cytoplasmatischen Oberfläche widerspiegeln, begleitet. Die lichtinduzierten Bewegungen einzelner Transmembranhelizes ändern die Schleifendynamik des Rezeptors an der Oberfläche des Proteins. Ebenso zeigt die amphipathische Helix 8, die parallel zur Membran liegt, signifikante Änderungen in ihrer Dynamik. Diese sollen während der Aktivierung des Rhodopsins erfasst und ausgewertet werden.

Interaktion von Rhodopsin mit Transducin

Im lichtaktivierten Zustand Meta-II bindet das G-Protein Transducin, welches im gebundenen Zustand durch den Rezeptor aktiviert wird und dann die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade

in Gang setzt. Für die Bindung an das lichtaktivierte Rhodopsin besitzt Transducin drei Anker: zwei Membrananker und einen Peptidanker für das lichtaktivierte Rhodopsin, welcher aus dem C-terminalen Ende der $G_T\alpha$ -Untereinheit gebildet wird und auch als Peptid ($pG_T\alpha$) das aktive Intermediat Meta-II stabilisiert. In ungebundener Form ist das $pG_T\alpha$ sehr flexibel, bei Bindung mit dem lichtaktivierten Rhodopsin bekommt es eine helikale Sekundärstruktur [Koenig et al., 2002]. Experimente über die Bindungskinetik des $pG_T\alpha$ an das lichtaktivierte Rhodopsin werden hier vorgestellt.

Interaktion von Rhodopsin mit Arrestin

Arrestin bindet sehr spezifisch an lichtaktiviertes, phosphoryliertes Rhodopsin. In der Arbeit wird speziell der Einfluss der Interaktion zwischen Arrestin und Rhodopsin auf die Dynamik der Helix 8 von Rhodopsin untersucht.

Laterale Diffusion von Rhodopsin in nativen Diskmembranen und ihre Interaktion mit Transducinmolekülen auf Einzelmolekülebene

Unter physiologischen Bedingungen liegt Rhodopsin in hoher Konzentration in Diskmembranen vor. Die Membrangeometrie und die Anordnung der Rhodopsinmoleküle in der Diskmembran ist von entscheidender Bedeutung für die visuelle Transduktionskaskade. Wie die Proteine in der Membran angeordnet sind, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Diffundieren die Proteine einzeln in der Membran frei herum oder formen sie sich zu Oligomeren in einem zweidimensionalen quasikristallinen Gitter? Die Diffusion von fluoreszenzmarkierten $G_T\alpha$ -Peptiden soll mittels Interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) und Einzelmolekülverfolgung (SPT) Informationen über die Rhodopsindiffusion in der Diskmembran auf Einzelmolekülebene geben.

Grundlagen

2.1 Rhodopsin - das Sehpigment im Auge

Das Bild von der Umgebung wird vom Auge auf dem Augenhintergrund abgebildet, auf dem die Netzhaut (Retina) aufgespannt ist. Die Retina beinhaltet lichtempfindliche Zellen, welche aus zwei verschiedenen Zelltypen besteht: Stäbchen und Zapfen. Drei verschiedene Zapfentypen sind für das Farbsehen verantwortlich und unterscheiden sich in den Absorptionsspektren der lichtempfindlichen Proteine.

Die Stäbchen sind sehr viel lichtsensitiver - sie können einzelne Photonen detektieren - können aber dafür keine Farben unterscheiden. Ein einzelnes lichtsensitives Protein muß daher in der Lage sein, die Stäbchenzelle zu einer Reizweiterleitung zu bewegen. Eine wesentliche Voraussetzung ist, daß das Protein ein möglichst geringes Dunkelrauschen besitzt und das Signal des Proteins entsprechend verstärkt werden muß, um eine Hyperpolarisation der Membran zu erreichen. Damit Photonen nicht auf der Retina verloren gehen, sind in den Stäbchenzellen in der Außenregion je nach Spezies bis zu 2000 Disks übereinander gestapelt, welche dicht gepackt mit Rhodopsin, dem lichtempfindlichen GPCR, sind (Abb. 1).

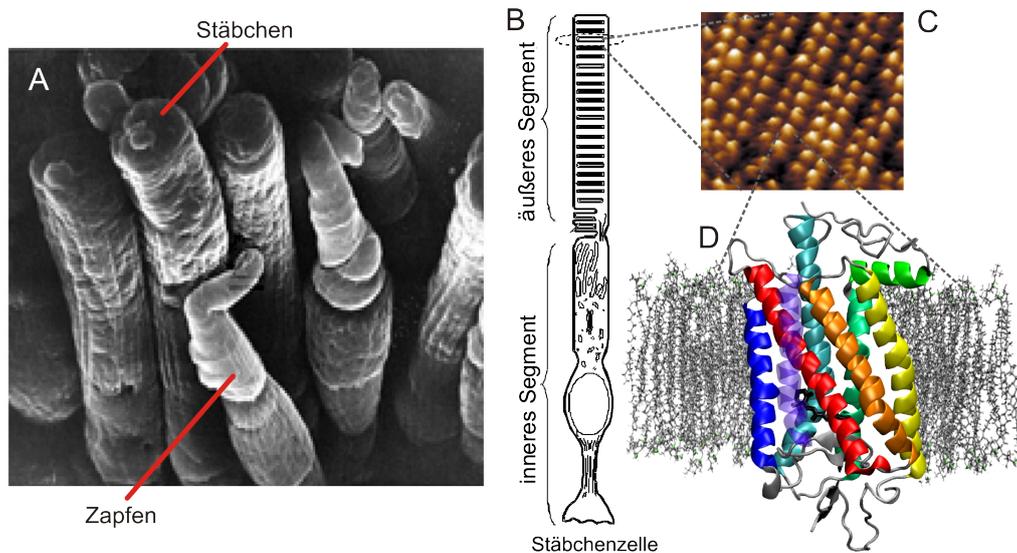


Abbildung 1: Stäbchenzelle im Auge: (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme (aus Lewis et al. [1969]) und (B) schematische Darstellung einer Stäbchenzelle eingeteilt in inneres und äußeres Segment. Im äußeren Segment (ROS - *Rod outer segment*) sind die lichtempfindlichen Rhodopsine in den gestapelten Diskmembranen integriert. (C) Übersichtsbild einer AFM-Topographiemessung, welche den parakristallinen Zusammenschluss von Rhodopsin Dimeren in der natürlichen Membran zeigt. Das Bild ist aus Fotiadis et al. [2003] entnommen. (D) Tertiärstruktur von nicht lichtaktivierten Rhodopsin (PDB: *1u19*). Die Transmembranhelizes (TM) sind folgendermaßen geordnet: TM1 (gelb), TM2 (orange), TM3 (rot), TM4 (lila transparent), TM5 (blau), TM6 (türkis), TM7 (hellgrün), H8 (grün). Das Retinal (schwarz) ist im Inneren des Proteins an TM7 (Lys296) gebunden.

Der im Rhodopsin gebundene Photoschalter (kovalent gebundenes Vitamin A Aldehyd in 11-cis Konformation) gehört mit einer Quantenausbeute von 0.65 [Kim et al., 2001] zu den effizientesten Schaltern, die es gibt.

Wird ein Rhodopsin von einem Photon aktiviert, so setzt sich eine Signalkaskade in Gang (Abb. 2). In dieser Signalkaskade wird in zwei Stufen eine Vervielfältigung und damit eine maximale Verstärkung um den Faktor 10^6 erreicht (Abb. 2), durch welche schlagartig alle Ionenkanäle in der Nähe des aktivierten Rhodopsins in der Plasmamembran des äußeren Segmentes schließen. Dadurch ändert sich lokal das Membranpotential. Die darauffolgende Hyperpolarisation der Membran wird elektrisch über die Synapse an das Gehirn weitergeleitet. Damit ein aktiviertes Rhodopsin nicht in der gesamten Zelle die Ionenkanäle schließt, ist die Diffusion der Proteine der Signalkaskade durch die Disks eingeschränkt. Innerhalb der Reichweite eines aktivierten Rhodopsins von etwa 50 Disks löst die Stäbchenzelle keinen weiteren Sehipuls aus [Müller und Kaupp, 1998].



Abbildung 2: Schematische Enzymkaskade: ein Rhodopsin (R) wird durch ein Photon lichtaktiviert (R*) und aktiviert bis zu 3000 Transducine (T*), welche jeweils eine Phosphodiesterase (PDE*) aktivieren. PDE* hydrolysiert bis zu 2000 zyklische Guanodinmonophosphate (cGMP). Diese schließen Ionenkanäle im äußeren Segment der Zelle, welche hyperpolarisiert.

2.1.1 Organisation von Rhodopsinmembranen

Im äußeren Segment der Stäbchenzellen sind die Disks gestapelt. Diese Disks sind geschlossene Organellen, in welchen nahezu ausschließlich Rhodopsin mit einer Dichte von ca. $30000 \mu\text{m}^{-2}$ vorkommt. Die Membran der Disks besteht zum einen aus Rhodopsin und zum anderen aus Lipiden, welche sich aus $41.6 \pm 2.6\%$ Phosphatidylethanolamin, $13.7 \pm 2.1\%$ Phosphatidylserin, $2.5 \pm 0.8\%$ Phosphatidylinositol und $45.3 \pm 3.2\%$ Phosphatidylcholin bei einem Cholesterin/Phospholipidverhältnis von 0.11 zusammensetzen [Boesze-Battaglia und Schimmel, 1997]. Die Lipide sind asymmetrisch über die beiden Membranen der Lipiddoppelmembran der Disks verteilt [Hessel et al., 2001]. Eine Disk aus Kuhaugen hat einen Durchmesser von $1.5 \mu\text{m}$ und besitzt damit etwa 50000 Rhodopsinproteine pro Diskseite [Liebman et al., 1987].

Wie das Rhodopsin in der Membran organisiert ist, ist ein Gegenstand aktueller Forschung. Während Messungen in früheren Jahren darauf hindeuteten, daß das Rhodopsin frei in der Membran der Disks diffundiert [Poo und Cone, 1974], zeigen aktuellere Rasterkraftmikroskop⁴ Messungen die Anordnung des Rhodopsins in einem parakristallinen Gitter [Fotiadis et al., 2003] (Abb. 1C).

2.1.2 Struktur des Rhodopsins

Das Rhodopsin ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit einer Größe von 38 kDa. Es gehört zur Superfamilie der Sieben-Transmembranhelikalen-Rezeptoren, welche größtenteils für die

⁴ Atomic Force Microscopy - AFM

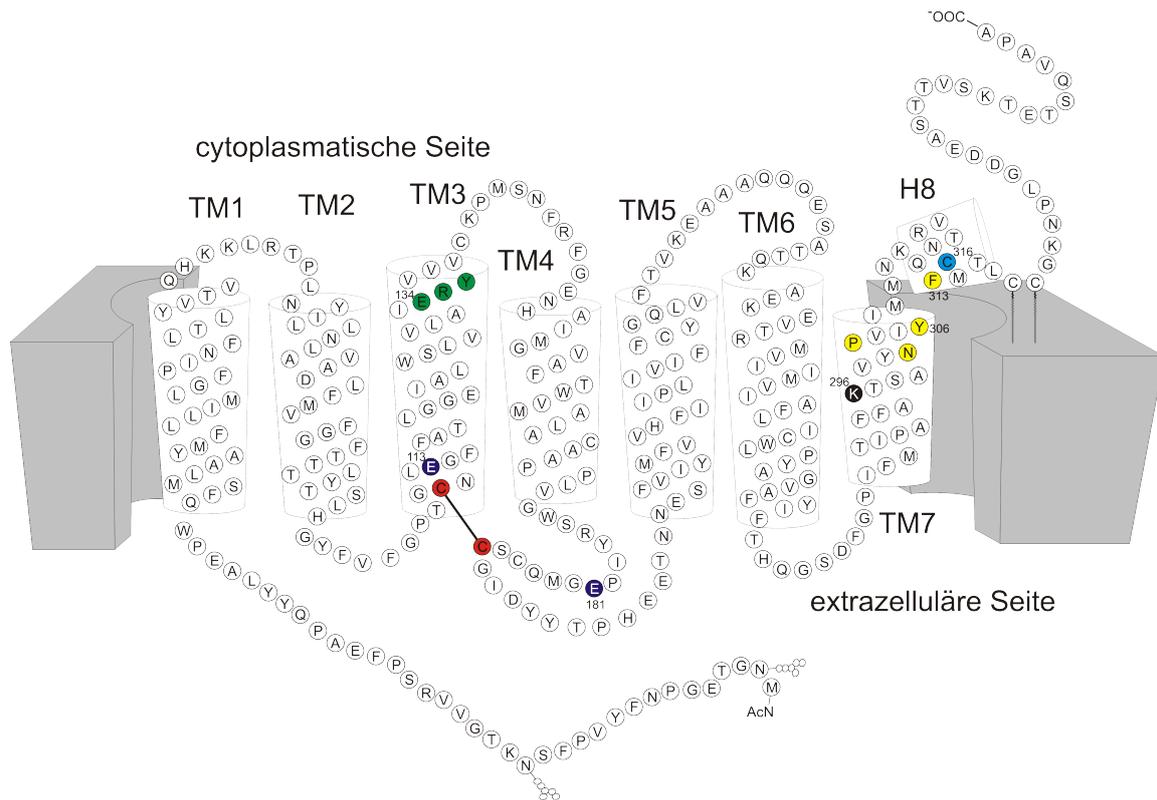


Abbildung 3: Sekundärstrukturmodell von Rhodopsin auf Grundlage ihrer Kristallstruktur [Palczewski et al., 2000]. Wichtige Strukturelemente sind farbig markiert. Grün: D(E)RY-Motiv, Gelb: NPxxY_{5,6}-Motiv, Schwarz: Retinalbindungsstelle, Lila: Komplexes Gegenion, Rot: Disulfidbrücke, Blau: Cysteinbindungsstelle für Fluoreszenzmarker an H8.

Wahrnehmung der Umgebung von Zellen zuständig sind. G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind membranständige Rezeptoren, welche Moleküle (Liganden) erkennen und durch die Bindung des Liganden aktiviert werden. Im Falle des Rhodopsins ist der Ligand im Ausgangszustand bereits kovalent am Rezeptor gebunden und hält ihn in der inaktiven Konformation. Daher wird dieser Ligand *inverser Agonist* genannt. Die Aktivierung des Rhodopsins geschieht durch die Absorption eines Photons durch den Liganden Retinal. Das Rhodopsin aus Rinderaugen ist das erste Protein aus der Gruppe der GPCRs von Vertebraten, dessen dreidimensionale Struktur (Tertiärstruktur) mittels Röntgenstrukturanalyse im Jahre 2000 gelöst wurde [Palczewski et al., 2000]. Von Rhodopsin existieren inzwischen mehrere Kristallstrukturen, sowohl im Grund- als auch im aktiven Zustand (u.a. Scheerer et al. [2008], Topiol und Sabio [2009], Choe et al. [2011]). Der Proteinteil des Rhodopsins wird Opsin genannt und besteht aus sieben transmembranen Helizes und einer achten Helix, welche an der cytoplasmatischen Seite auf der Oberfläche der Membran liegt. Sie sind miteinander durch flexible Aminosäureketten, den Schleifen, verbunden.

Wichtige Strukturelemente in Rhodopsin

Für die Stabilität und korrekte Faltung des Rezeptors ist die Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren Cys110 und Cys187 essentiell [Karnik und Khorana, 1990].

Das Retinal ist kovalent über eine protonierte Schiffsche Base [Oseroff und Callender, 1974] am Lys296 des Opsins an der Helix 7 gebunden (Abb. 3). Im nicht-aktivierten Zustand (Dunkelzustand) liegt das Retinal in der 11-cis-Konformation vor. Die protonierte Schiffsche Base (PSB) wird durch

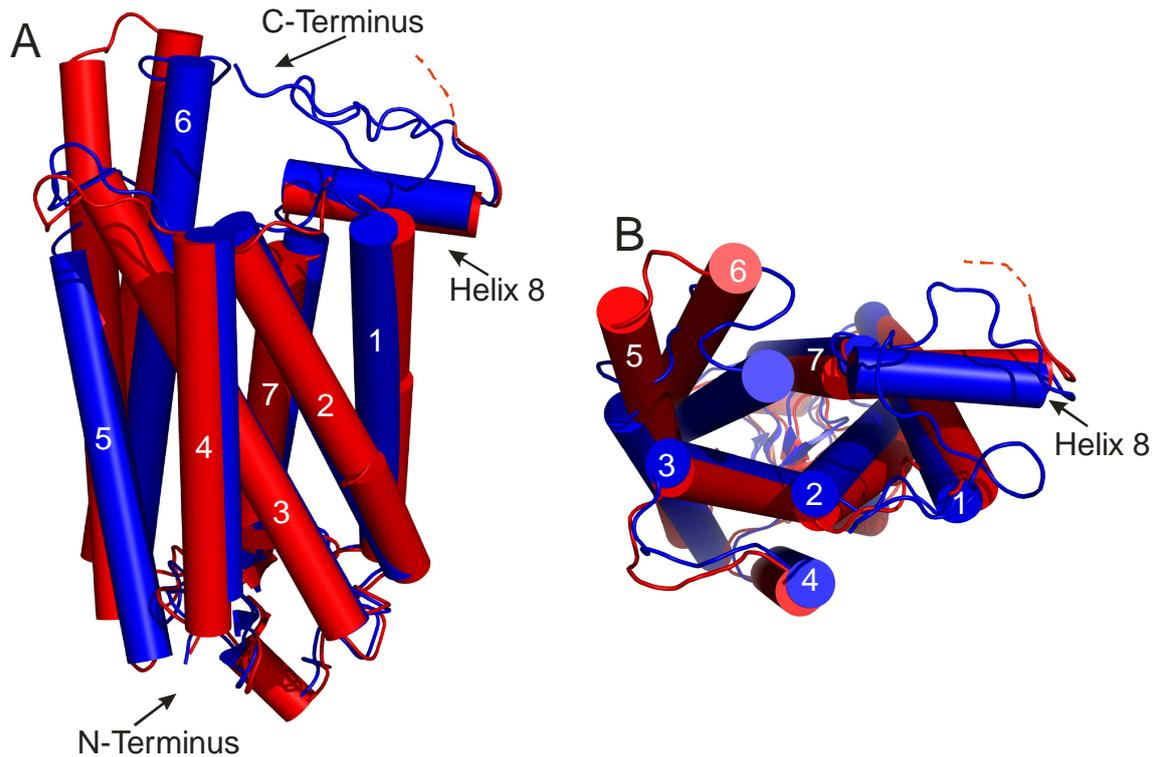


Abbildung 4: Überlagerte Tertiärstrukturen von Rhodopsin (blau PDB *1u19*) und der aktiven Meta-II Struktur (rot PDB *3PXO*). Die gestrichelte rote Linie deutet den in der aktiven Meta-II Struktur nicht aufgelösten C-Terminus an.

ein komplexes Gegenion - bestehend aus Glu113 von Helix 3 und Glu181 von der extrazellulären Schleife 2 - stabilisiert. Es wird angenommen, daß Glu181 während der Proteinreaktion nach Lichtanregung in den inaktiven Vorläuferintermediaten die Funktion des Gegenions übernimmt [Lüdeke et al., 2005]. Bei der Aktivierung von Rhodopsin werden komplexe Protonierungsschritte durchgeführt, an dessen Ende die PSB deprotoniert und Glu113 protoniert vorliegt.

Das konservierte D(E)RY-Motiv (Abb. 3 in grün) ist an der cytoplasmatischen Seite der Helix 3 (im Rhodopsin: Glu134, Arg135, Tyr136) lokalisiert. Es ist Teil eines weiteren Wasserstoffbrückennetzwerks (H3-H6 Netzwerk) von Rhodopsin, in dem Glu247 und Thr251 von Helix 6 beteiligt sind. Dieses Netzwerk wird auch *ionic lock* genannt. Es stabilisiert die Rhodopsinkonfiguration im Ausgangszustand. Das Glu134 wird nach Aufnahme eines Protons von der cytoplasmatischen Seite protoniert [Arnis et al., 1994]. Neueren Studien zufolge ist es von der Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht bzw. der Detergenzumgebung abhängig, ob Rhodopsin die Protonierung des Glu134 benötigt, um in das aktive Meta-II-Intermediat wechseln zu können [Mahalingam et al., 2008]. Für die Bindung des Peptidankers von Transducin wird aber die durch die Protonierung ausgelöste Konformationsänderung benötigt. Wie diese aussieht, kann anhand der kristallisierten, aktiven Meta-II Struktur nachvollzogen werden [Choe et al., 2011]. In dieser ist die Salzbrücke zwischen Glu134 und Arg135 aufgebrochen. Ebenso ist mit der Trennung der Verbindung zwischen Arg135 und Glu247 die Verbindung der Helizes 3 und 6 getrennt. Helix 6 kippt um 6 – 7Å nach außen und stabilisiert seine neue Lage mit der Neuknüpfung von Wasserstoffbrücken mit Helix 5, welche in der aktiven Struktur am cytoplasmatischen Ende um 2 – 3Å zur Helix 6 kippt und nahezu parallel zu ihr liegt. Sie ist außerdem verlängert ist und ragt in die cytoplasmatische Seite

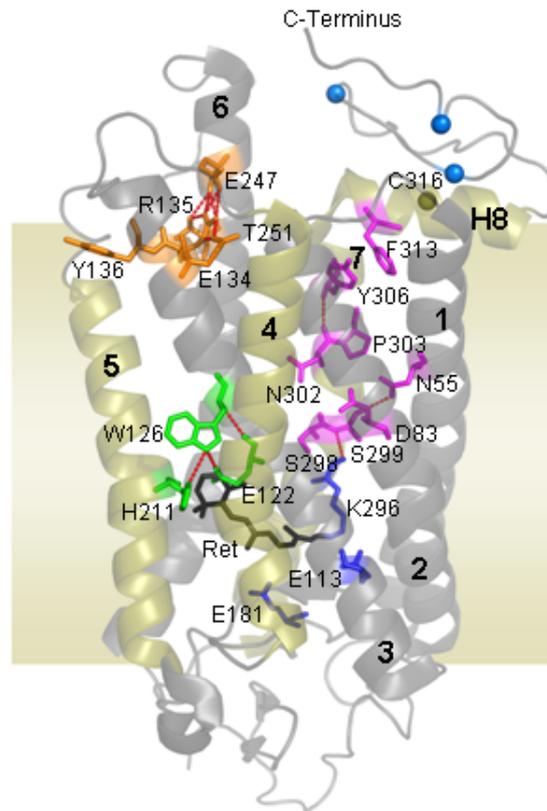


Abbildung 5: Das TM3-TM6 Netzwerk (orange) ist mit dem D(E)RY-Motiv verknüpft und das H1-H2-H7 Netzwerk (Magenta) mit dem NPxxY_{5,6}F-Motiv. Das H3-H5 Motiv (grün) interagiert mit dem β -Ionon Ring des Retinals (schwarz). In blau ist das Lys296, an welchem das Retinal über eine protonierte Schiffische Base verbunden ist. Die beiden anderen blauen Aminosäuren bilden das dazugehörige komplexe Gegenion (Glu113 und Glu 181).

hinein und bildet mit Helix 6 ein Helixpaar. Arg135 wird von Tyr223 (Helix 5) stabilisiert und bildet eine Interaktion mit dem G_T α -C-Terminus von Transducin aus [Scheerer et al., 2008] (Abb. 4).

Das konservierte NPxxY(x)_{5,6}F-Motiv (Abb. 3 (gelb), Abb. 5 (magenta)) befindet sich an der cytosolischen Seite von Helix 7 und geht in Helix 8 über. Das Motiv ist sowohl an der Meta-II Bildung als auch an der Bildung der Bindungstasche für das Transducin beteiligt. Beim Y(x)_{5,6}F-Teilmotiv ist nur im Dunkelnzustand von Rhodopsin zwischen den Aromaten des Tyr306 und Phe313 eine hydrophobe Interaktion zu beobachten, welche Helix 7 und 8 stabilisiert. Bei Mutagenesestudien wurde gezeigt, daß der Peptidanker von Transducin keine Bindungsaffinität zu Rhodopsinmutanten ohne die aromatischen Aminosäuren besitzt, wobei die Bildung von Meta-II bei Nichtvorhandensein der Aromaten erleichtert ist [Fritze et al., 2003]. Das NP - Teilmotiv gehört zu dem Wasserstoffbrückennetzwerk TM1-TM2-TM7, an welchem unter anderem die in GPCRs hochkonservierte Aminosäure Asp83 beteiligt ist [Nagata et al., 1998, Lehmann et al., 2007] und mit dem Wasserstoffbrückennetzwerk der Schiffischen Base in Kontakt steht.

In der Nähe des β -Ionon Rings des Retinals besteht ein weiteres Wasserstoffbrückennetzwerk H3-H5 (Glu122, Trp126, His211). Nach der Isomerisierung des Retinals verändert sich die Lage des Retinals und der β -Ionon Ring zerstört dabei die Verbindung zwischen Helix 3 und 5, was für die Bildung von Meta-II wichtig ist [Vogel et al., 2005].

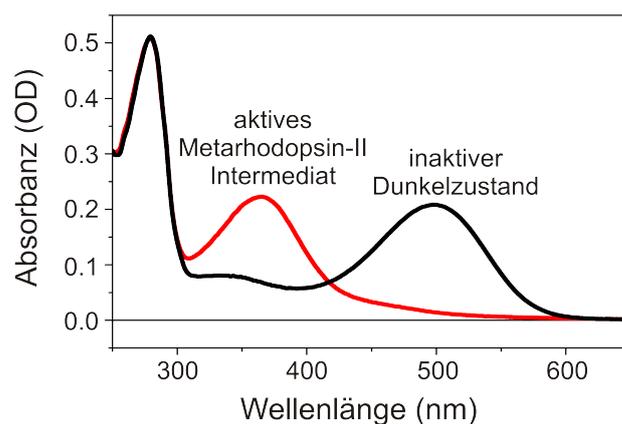


Abbildung 6: Absorptionsspektren von Rhodopsin in Membranfragmenten im inaktiven Dunkelzustand (schwarz) und im lichtaktivierten Meta-II Intermediat (rot). Das Absorptionsmaximum des über eine protonierte Schiff'sche Base gebundenen Retinals liegt beim Dunkelzustand bei 498 nm. Der Extinktionskoeffizient ist $\epsilon = 40600 \text{ (mol}\cdot\text{cm)}^{-1}$ und die molare Masse des Apoproteins liegt bei etwa 38 kDa [Daemen et al., 1972]. Nach Lichtaktivierung verschiebt sich das Absorptionsmaximum durch die Deprotonierung der PSB nach 380 nm.

Die amphiphilische Helix 8 spielt beim Aktivierungsprozess ebenfalls eine wichtige Rolle. Fourier-Transformations-IR-Spektroskopie (FTIR) Messungen des Rezeptors deuten darauf hin, daß sie im aktiven Meta-II-Intermediat sich teilweise entfaltet [Lehmann et al., 2007]. In Fluoreszenzdepolarisationsmessungen wurde gezeigt, daß sich die sterische Einschränkung von Fluoreszenzmarkern, welche am Cys316 angebracht wurden, im Meta-II-Intermediat erhöht [Mielke et al., 2002, Alexiev et al., 2003]. Die Kristallstruktur des Opsins mit synthetischem $G_T\alpha$ -Peptid zeigt, daß Helix 8 gegenüber der Struktur im Dunkelzustand die gleiche Länge und nahezu die gleiche Position besitzt, aber als Teil des $NP_{xx}Y_{5,6}F$ -Motivs mit dem $D(E)RY$ -Motiv und dem gebundenen $G_T\alpha$ -Peptid in einem ausgedehnten Wasserstoffbrückennetzwerk verbunden ist [Scheerer et al., 2008].

2.1.3 Funktionszyklus des Rhodopsins

Das Retinal hat im Dunkelzustand sein Absorptionsmaximum bei 498 nm. Die Photoreaktion des Rhodopsins wird mit Anregung des Retinals durch Absorption eines Photons gestartet. Das Retinal isomerisiert dabei von 11-cis in die all-trans Konformation. Das Protein durchläuft während der Photoreaktion mehrere Absorptionsänderungen, welche verschiedenen Rhodopsinintermediaten entsprechen, bis es im aktiven Intermediat Meta-II die Signalkaskade über Transducinaktivierung in Gang setzt (Abb. 7).

Bei Anregung des Rhodopsins bei tiefen Temperaturen lassen sich einige Intermediate (Bathorhodopsin, Lumirhodopsin, Metarhodopsin I und II) einfangen, die Intermediate Photorhodopsin und das blauverschobene Rhodopsinintermediat⁵ dagegen nicht [Lewis und Klier, 1992].

Das erste Intermediat, das Photorhodopsin, ist ein Zwischenprodukt (200 ps [Schoenlein et al., 1991]), welches auf dem Weg zum Bathorhodopsin gebildet wird. Es zeichnet sich dadurch aus, daß bei Lichtanregung das Retinal in den angeregten Zustand übergeht, welcher in etwa 50 fs zerfällt. Es durchläuft Konformationsänderungen, wobei beim Photorhodopsinintermediat die C11-C12 Bindung bereits isomerisiert, das Retinal an sich aber noch nicht relaxiert ist [Kukura et al., 2005].

⁵ Blue-shifted Intermediat (BSI)

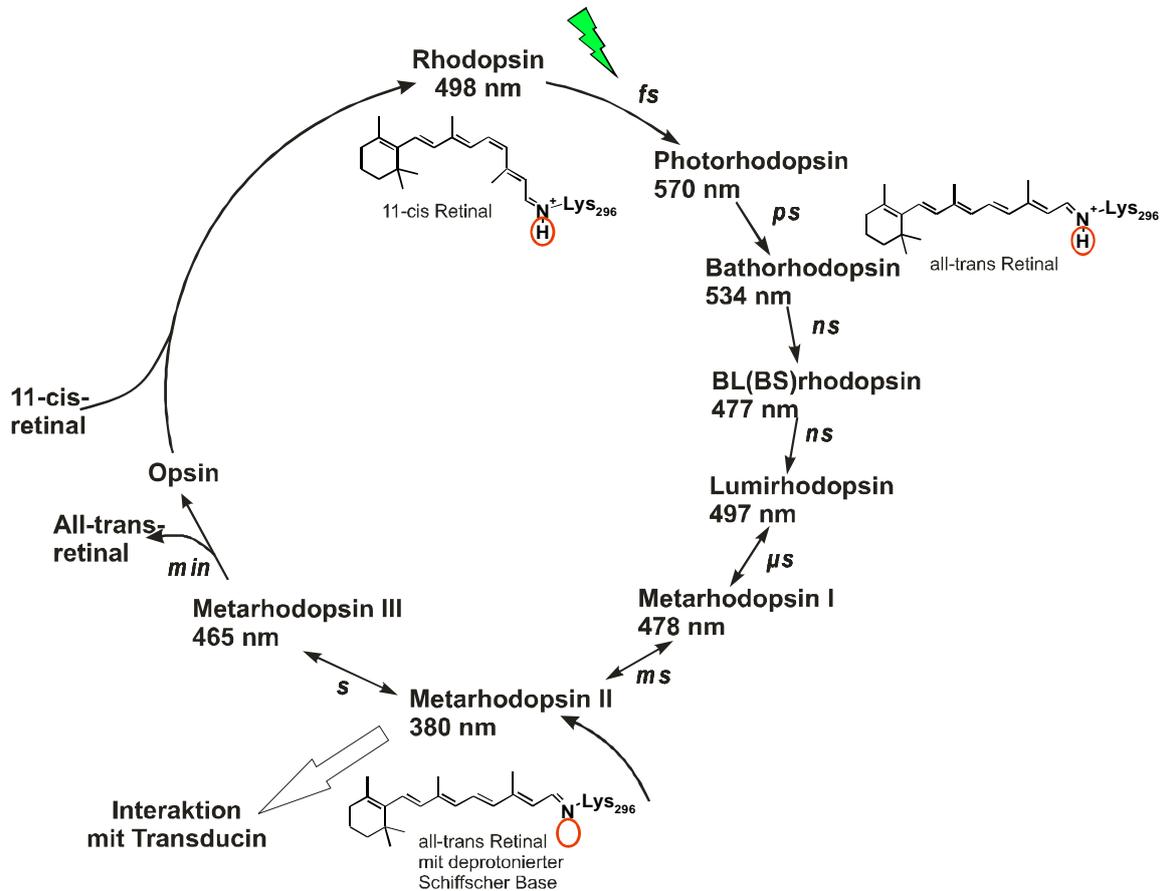


Abbildung 7: Photozyklus von Rhodopsin. Dieser besteht aus spektral unterscheidbaren Intermediaten, deren Absorptionsmaxima λ_{max} unter den jeweiligen Intermediaten dargestellt sind. Bei Lichtanregung isomerisiert das Retinal von 11-cis nach all-trans und über mehrere Vorläuferintermediate geht Rhodopsin in das aktive Meta-II Intermediat über, welches dann mit dem G-Protein interagiert. In diesem Intermediat wird die Schiff'sche Base der Bindungsstelle des Retinals deprotoniert und das Retinal trennt sich vom Opsinrest, welcher anschließend wieder mit 11-cis Retinal regeneriert wird.

Die Relaxation des Retinals in die all-trans Form ist etwa nach einer Picosekunde abgeschlossen und endet im Bathorhodopsinintermediat. Das BSI und das Lumiintermediat zeichnen sich durch weitere Änderungen des Rhodopsins im Bereich des Retinals [Jäger et al., 1997] und insbesondere der Interaktion der 9-Methyl Gruppe [Ganter et al., 1989], der 13-Methyl Gruppe [Ganter et al., 1990] und des β -Ionon-Rings des Retinals mit dem Opsin aus, welche strukturelle Änderungen der Transmembranhelices induzieren (Abb. 4). Beim Übergang von Lumi nach Meta-I verschwindet die Interaktion der 9-Methyl Gruppe mit der Proteinumgebung [Shichida et al., 1991].

Zwischen dem inaktiven Meta-I und dem aktiven Meta-II Intermediat herrscht ein Gleichgewicht, welches unter anderem von Temperatur und pH-Wert abhängig ist. Diese Eigenschaft ist wichtig für experimentelle Untersuchungen am Rhodopsin. Bei niedrigen Temperaturen und hohem pH ist das Gleichgewicht nahezu vollständig beim Meta-I Intermediat. Das ändert sich bei Zugabe vom G-Protein. Das Gleichgewicht verschiebt sich dadurch zum aktiven Intermediat. Dieses durch das G-Protein zusätzlich induzierte Meta-II wird *Extra Meta-II* genannt. Der Übergang vom inaktiven Intermediat Meta-I zum aktiven Intermediat Meta-II ist spektroskopisch gut nachzuvollziehen. Das Maximum der Absorptionswellenlänge schiebt sich um etwa 100 nm zu 380 nm. Diese Verschiebung wird durch die Deprotonierung der Schiff'schen Base ausgelöst, das

Retinal selbst absorbiert im ungebundenen Zustand bei 360 nm. Das Proton wird vom Glu113, welches im Ausgangszustand mit dem Glu181 zusammen als komplexes Gegenion die Schiff'sche Base stabilisiert, aufgenommen.

Durch Hydrolyse zerfällt das Rhodopsin aus dem Meta-I/Meta-II Gleichgewichtszustand in Opsin und all-trans Retinal. Dieses kann durch zwei verschiedene Arten geschehen. Die meisten Rhodopsine zerfallen unter sauren oder neutralen pH-Bedingungen direkt durch Hydrolyse in die beiden Endprodukte Opsin und all-trans Retinal. Bei basischem pH-Werten wird der andere Weg bevorzugt, welcher das Rhodopsin über das Meta-III-Intermediat ($\lambda_{\text{MetaIII}} = 470 \text{ nm}$) führt. Dieses zerfällt im Zeitraum von Minuten ebenfalls zu Opsin und all-trans Retinal. Weitere Studien ergaben, daß Meta-III direkt aus dem inaktiven Meta-I-Intermediat gebildet wird und mit diesem im Gleichgewicht steht [Vogel et al., 2003, 2004, Bartl und Vogel, 2007].

Durch die Trennung von Retinal und Opsin hat das Rhodopsin keinen geschlossenen Photozyklus. Das Rhodopsin wird durch Regeneration von Opsin und 11-cis Retinal wieder in den Ausgangszustand überführt.

Die initiale Weiterleitung des Signals des enzymatisch aktiven Rhodopsin (Meta-II) erfolgt über ein Guanosintriphosphat (GTP) - bindendes Protein (G-Protein), welches im Falle des Rhodopsins das *Transducin* ist. Dieses aktiviert die Phosphodiesterase (PDE), welches dann das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) spaltet. Diese Enzymkaskade führt zur anschließenden Hyperpolarisierung der Membran und zur elektrischen Weiterleitung des Signals ans Gehirn. Diese Enzymkaskade verstärkt das Signal eines aktivierten Rhodopsin in zwei der drei Schritte: Ein aktives Rhodopsin kann etwa 3000 Transducine aktivieren und eine aktive PDE kann ca. 2000 cGMPs spalten (Abb. 2). Durch diese Enzymkaskade ist die Stäbchenzelle in der Lage, mit einem einzigen aktivierten Rhodopsinprotein einen Sehipuls im Gehirn zu erzeugen.

2.1.4 Funktionszyklus des G-Proteins und Signalweiterleitung

Das G-Protein Transducin ist ein Heterotrimer und besteht aus drei Untereinheiten, der $G_T\alpha$, $G_T\beta$ und $G_T\gamma$ -Untereinheit (Abb. 8). In der katalytischen $G_T\alpha$ Untereinheit ist Guanosindiphosphat (GDP) gebunden, die beiden anderen Untereinheiten existieren unter physiologischen Bedingungen nur als Einheit ($G_T\beta\gamma$).

Das Transducin besitzt drei Ankerstellen: die γ -Untereinheit ist farnesyliert und carboxymethyliert [Fukada et al., 1990], die α -Untereinheit heterogen acyliert [Bigay et al., 1994, Neubert et al., 1992, Kokame et al., 1992]. Die α -Untereinheit besitzt zusätzlich einen Peptidanker, welcher an das aktivierte Rhodopsin bindet. Dieser Peptidanker ändert seine Sekundärstruktur von ungeordnet nach α -helikal bei Bindung an das aktivierte Rhodopsin [Koenig et al., 2002]. Nach Bindung an das aktive Rhodopsin wird ein Austausch von GDP mit GTP initiiert. Der Komplex zerfällt anschließend in $G_T\alpha - \text{GTP}$ ($G_T\alpha^*$) und $G_T\beta\gamma$. Das aktive Rhodopsin ist danach frei, um weitere Transducine zu binden und zu spalten. Das $G_T\alpha^*$ aktiviert anschließend das nächste Glied in der Anregungskaskade, die membranständige PDE. Diese besitzt eine inhibitorische Einheit, welche durch jeweils ein $G_T\alpha^*$ gebunden wird. Daraufhin wird die PDE aktiv und hydrolysiert mit einer Wechselzahl von bis zu 2000 pro Sekunde cGMP. Das cGMP hält Kationenkanäle in der Stäbchenzelle offen, bei sinkender Konzentration von cGMP schließen sich diese und die Konzentration von Na^+ und K^+ Ionen nimmt ab. Dadurch wird die Membraninnenseite an dieser Stelle negativer und hyperpolarisiert. Die Hyperpolarisation wird dann passiv vom äußeren Segment zum synaptischen Ende der Zelle weitergeleitet, von wo sie aus weiter als elektrisches Signal ins Gehirn geleitet wird (Abb. 2 auf Seite 16).

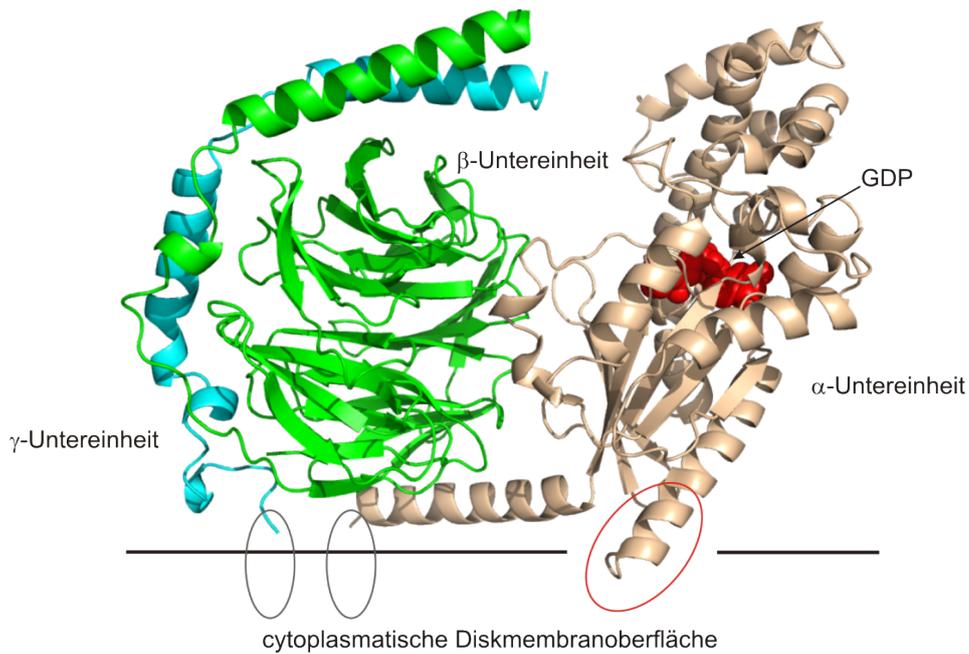


Abbildung 8: Transducin. Die α -Untereinheit ist in beige mit GDP in rot, die β -Untereinheit ist in türkis. Die γ -Untereinheit ist grün. Die Membranankerstellen sind als graue Ovale dargestellt (PDB: *1got*). Der Peptidanker der α -Untereinheit ist in der Bindungskonformation (als α -Helix rot umrandet) dargestellt (PDB: *3dqb*).

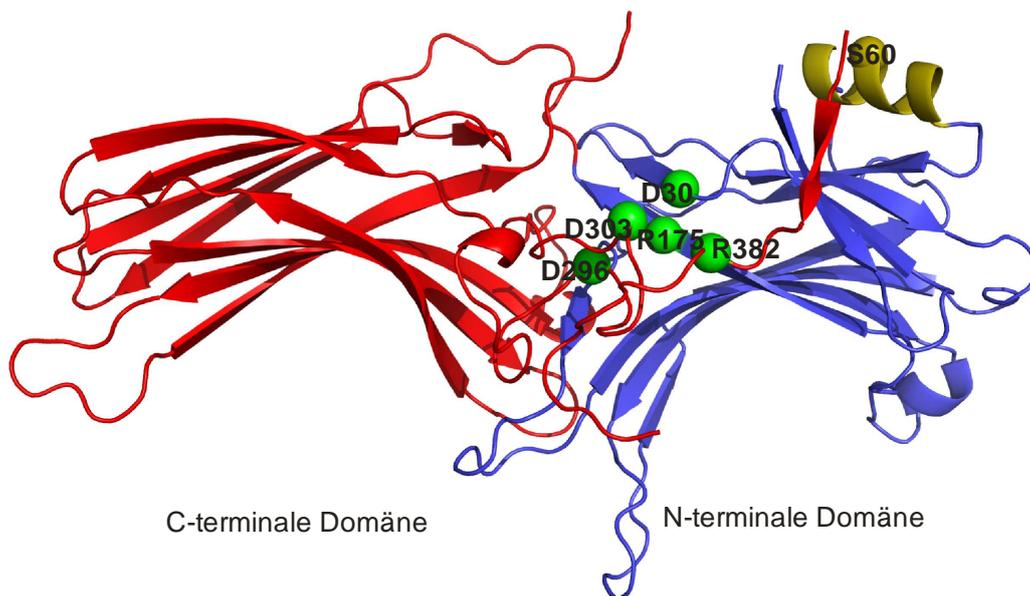


Abbildung 9: Tertiärstruktur von Arrestin (*ICF1*): Erkennbar sind die kuppelförmigen Strukturen (blau und rot) in der gestreckten (und ungebundenen) Form von Arrestin, welche durch β -Faltblätter geformt werden und durch hydrophobe Interaktionen stabilisiert werden. Als grüne Punkte erkennbar ist der polare Kern.

2.1.5 Deaktivierung der Signalkaskade

Nach der Signalweiterleitung muß lichtaktiviertes Rhodopsin inaktiviert werden, damit die Enzymkaskade stoppen und sich regenerieren kann. Die Inaktivierung des lichtaktivierten Rhodopsins wird über zwei Schritte vollzogen. An das lichtaktivierte Rhodopsin bindet in Konkurrenz zum Transducin die *Rhodopsinkinase* (RK) und phosphoryliert Threonine und Serine am C-Terminus des Rhodopsin, von denen neun identifiziert wurden [Pfister et al., 1983, Kühn und Wilden, 1982]. Die erste Phosphorylierung durch die RK geschieht im Zeitraum von etwa 100 ms nachdem das Rhodopsin in das aktive Meta-II Intermediat übergegangen ist. Die Bindungsaffinität des Transducins wird dadurch ein wenig gesenkt. Bei Phosphorylierung von mindestens drei Serinen oder Threoninen kann ein anderes Protein, das *Arrestin*, mit sehr hoher Affinität an das phosphorylierte Rhodopsin binden und verhindert damit effektiv eine weitere Aktivierung von Transducinen [Kühn et al., 1984, Mendez et al., 2000]. Aktuell werden für Arrestin zwei Sensoren postuliert, welche zum einen die Phosphorylierung des C-Terminus von Rhodopsin und zum anderen die Konformation der cytoplasmatischen Oberfläche erkennen sollen. Der Phosphatsensor ist mit den Aminosäuren Arg175 und Asp296 bereits identifiziert worden [Gurevich und Benovic, 1995, Granzin et al., 1998, Hirsch et al., 1999] und Teil des eines wichtigen Motivs, dem polaren Kerns⁶ (Asp30, Arg175, Asp296, Asp303, Arg382 [Vishnivetskiy et al., 1999]) von Arrestin (Abb. 9). Der Konformationssensor wurde aber bisher nicht eindeutig identifiziert. Die jeweilige Bindung eines der beiden Sensoren führt zu einer Bindung mit niedriger Affinität zu aktivierten, phosphorylierten Rhodopsin [Gurevich und Benovic, 1993]. Sind aber beide Sensoren an der Bindung beteiligt, ist die Bindungsaffinität größer als die Summe beider Teilaffinitäten, was auf einen komplexen Erkennungsmechanismus hinweist.

2.2 Bakteriorhodopsin

Bakteriorhodopsin (bR) findet man in der Plasmamembran des salzliebenden Bakteriums *Halobacterium Salinarum*. Das Protein hat eine Größe von 24 kDa und ist von intensiv violetter Farbe. Aufgrund dieser Farbe werden die Membranbereiche, in denen es konzentriert und in kristalliner Form vorkommt, auch Purpurmembran genannt. Bakteriorhodopsin ist eine Protonenpumpe, die Protonen nach Lichtaktivierung von der cytoplasmatischen zur extrazellulären Seite pumpt. Durch den entstehenden Protonengradienten wird u.a. Energie für die Synthetisierung von ATP, welches der universelle Energielieferant von Zellen ist, bereitgestellt.

2.2.1 Struktur des Bakteriorhodopsin

bR ist ein Protein mit sieben transmembranen Helizes und einem kovalent gebundenen Retinal. Es gehört zu den membranständigen Rezeptoren, ist aber im Gegensatz zu Rhodopsin kein GPCR. Es wurde 1971 entdeckt [Oesterhelt und Stoeckenius, 1971]. Aufgrund ihrer kristallinen Anordnung wurde die elektronische Struktur 1975 mittels Elektronenmikroskopie gelöst [Henderson und Unwin, 1975], aus welcher das Strukturmodell ermittelt wurde. Die Aminosäuresequenz wurde 1979 bestimmt [Khorana et al., 1979]. Die erste Kristallstruktur wurde 1998 von [Pebay-Peyroula et al., 1997] ermittelt.

Das Retinal ist am Lys216 des bR über eine protonierte Schiff'sche Base (PSB) gebunden und liegt als Chromophor im Inneren des Proteins zwischen den Helizes. Das Absorptionsmaximum des freien Retinals bei 380 nm ist durch die Bindung rotverschoben und liegt bei ca. 570 nm.

⁶ polar core

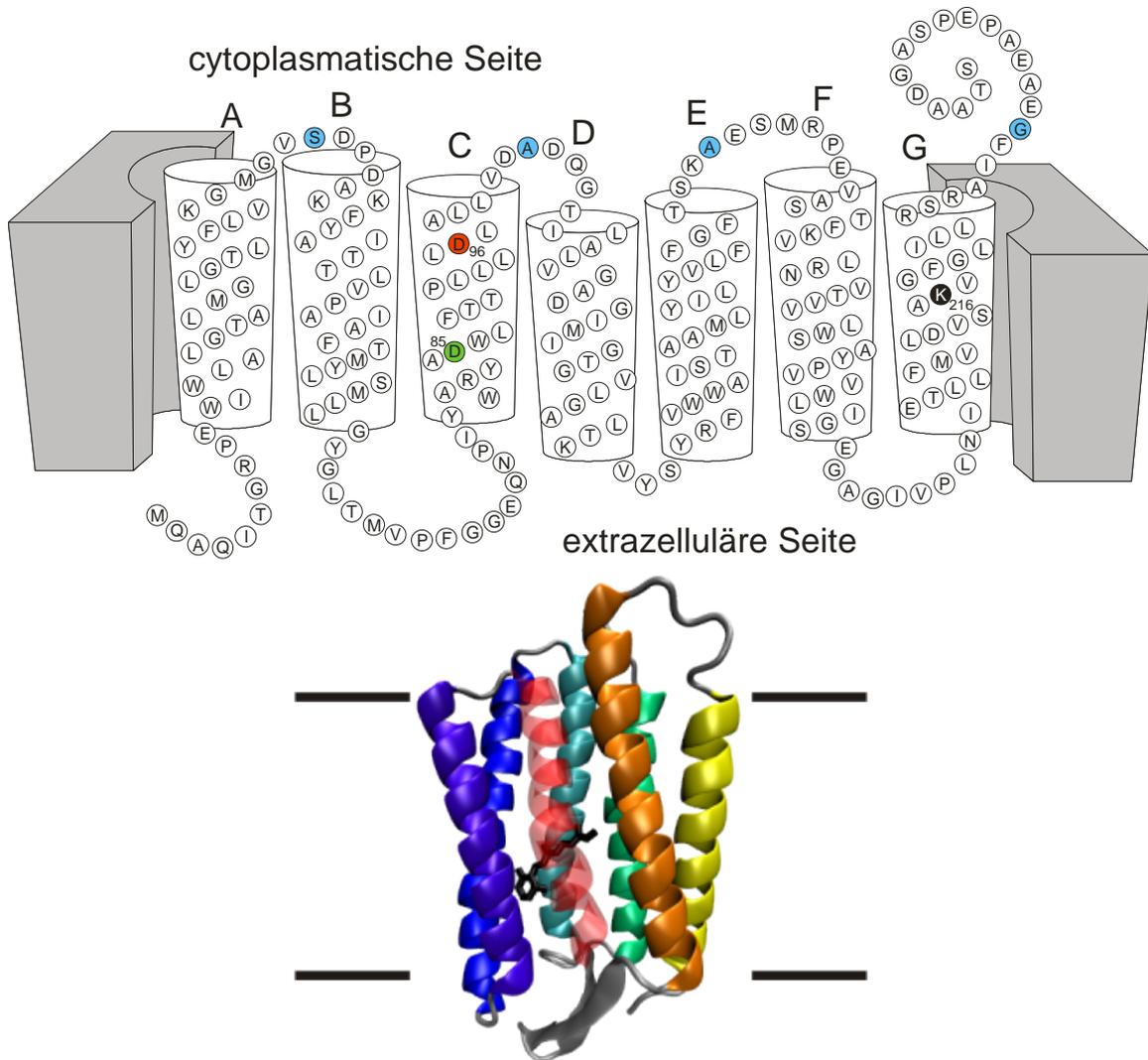


Abbildung 10: Sekundärstruktur und Tertiärstruktur von bR. **Oben:** Schwarz: Retinalbindungsstelle, Grün: interner Protonenakzeptor, Rot: interner Protonendonator, Blau: bR-Mutanten für die Messung von Schleifendynamiken, in diesen Mutanten sind die jeweiligen Aminosäuren durch Cystein ersetzt worden. **Unten:** Tertiärstruktur von bR (PDB: *1iw6*). Die Transmembranhelizes A-G sind folgendermaßen geordnet: A (gelb), B (orange), C (rot transparent), D (lila), E (blau), F (türkis), G (hellgrün). Das Retinal (schwarz) ist im Inneren des Proteins an TM7 (Lys216) gebunden.

2.2.2 Funktionszyklus des Bakteriorhodopsin

Bakteriorhodopsin besitzt einen vollständigen Photozyklus (Abb. 11), welcher bei Raumtemperatur nach etwa 10 ms abgeschlossen ist. Während eines Zyklus wird ein Proton von der cytoplasmatischen Seite zur extrazellulären Seite gepumpt. Dieser Pumpmechanismus ist kein einfacher Transport eines einzelnen Protons durch das Protein, vielmehr wird dieser während des Photozyklus über mehrere Zwischenschritte vollzogen.

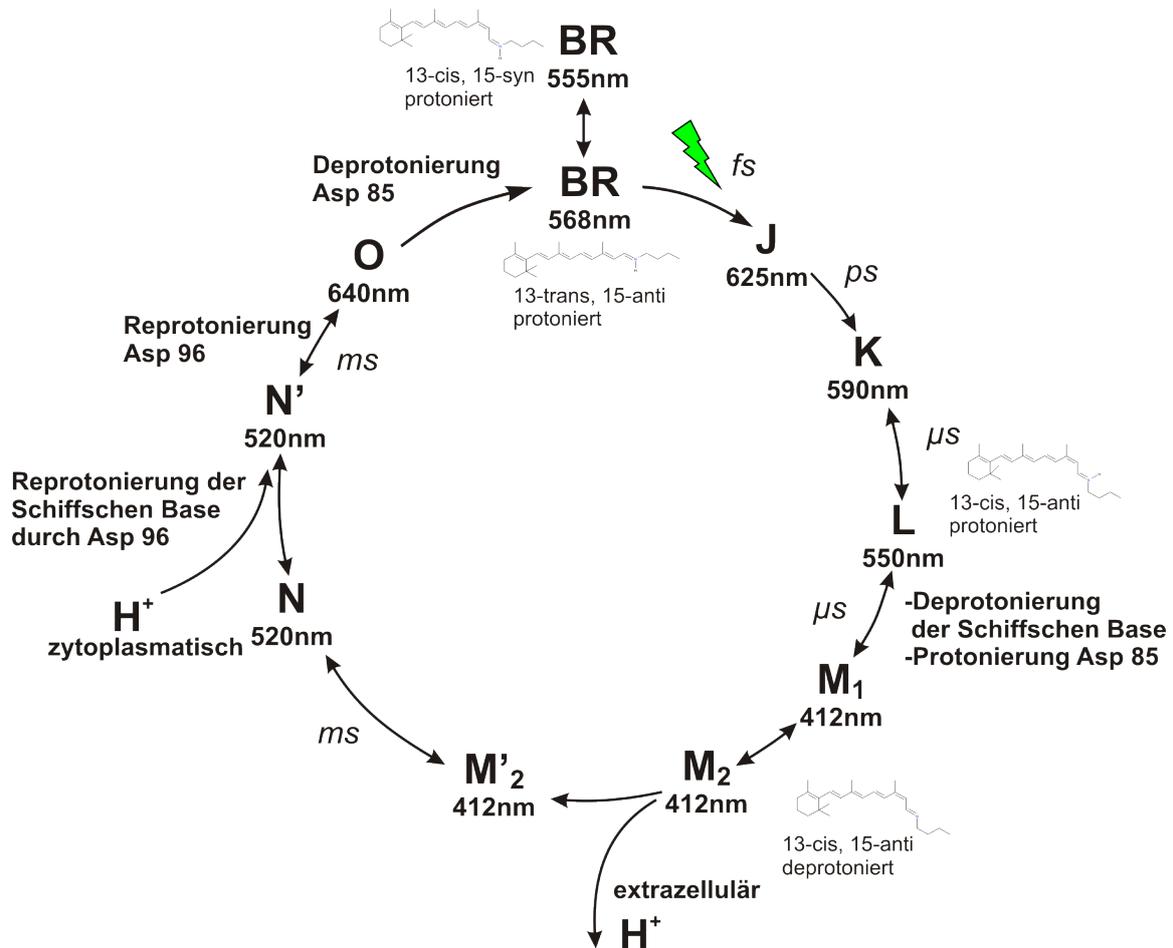


Abbildung 11: Photozyklus von bR. Dieser besteht aus spektral unterscheidbaren Intermediaten, dessen λ_{max} unter den jeweiligen Intermediaten dargestellt sind. Bei Lichtanregung isomerisiert das Retinal nach 13-cis und geht über einige Vorläuferintermediate mit der Deprotonierung der Schiffsbasis in das aktive M-Intermediat über. Dieses besteht aus spektral nicht zu unterscheidenden Unterzuständen. Ein Proton wird an die extrazelluläre Seite abgegeben und im N-Intermediat von der cytoplasmatischen Seite wieder aufgenommen. Von N→O isomerisiert das Retinal wieder zurück und bR geht wieder in den Grundzustand zurück.

Als erstes wird ein Proton an die extrazelluläre Seite abgegeben. Dieses stammt von der PSB und wird zunächst an das Asp85, dem Gegenion zur PSB und dem Protonenakzeptor, transferiert und dann an die extrazelluläre Seite weitergeleitet. Im zweiten Schritt wird der interne Protonendonator Asp96 mit Hilfe von Bewegungen der Helizes F und G von der cytoplasmatischen Seite protoniert,

welcher dann die Schiff'sche Base reprotoniert. Im Ausgangszustand liegt das bR heterogen mit Retinalen in der all-trans Form und der 13-cis, 15-syn Form im Verhältnis 34:66 vor. Bei Lichtanregung isomerisieren nur die Retinale von der all-trans zur 13-cis, 15-anti Konformation. Im anschließenden Photozyklus geht das bR über mehrere spektroskopisch unterscheidbare Intermediatzustände (λ_{max} der einzelnen Intermediate sind in Abb. 11 dargestellt) K und L in den angeregten Zustand M, in der das Proton der Schiff'sche Base zum Asp85 transferiert wird und dann deprotoniert vorliegt [Gerwert et al., 1990]. Das M-Intermediat besteht aus zwei bis drei, spektroskopisch nicht unterscheidbaren Unterzuständen, in welcher die Zugänglichkeit der Schiff'schen Base sich ändert. Die Protonenabgabe aus der Nähe von Glu194 und Glu204 an die extrazelluläre Seite findet bei einem $\text{pH} > 5.8$ nach einer Millisekunde statt [Zimányi et al., 1992]. Bei niedrigerem pH passiert dies erst im Schritt $\text{O} \rightarrow \text{BR}$. Mit Reprotonierung der Schiff'schen Base durch den internen Protonendonator Asp96 kehrt bR [Otto et al., 1989, Gerwert et al., 1989] über die Intermediate N (Reprotonierung der Asp96 durch ein Proton von der cytoplasmatischen Seite [Gerwert et al., 1990]) und O wieder zurück in den Ausgangszustand. Die Reisoomerisierung des Retinals findet im Schritt $\text{O} \rightarrow \text{BR}$ statt.

2.3 Dynamik von Proteinen

Ein Protein besteht aus Aminosäuren, welche linear miteinander verbunden sind. Die Sequenz der Aminosäuren wird Primärstruktur genannt. Die lokale Anordnung der Aminosäuren nennt man Sekundärstruktur. Eine Aminosäurekette kann ungeordnet vorliegen, sie kann auch geordnete Strukturen wie eine helikale Struktur (z.B. α -Helix) oder Faltblattstruktur (z.B. β -Faltblatt) ausbilden. Die Stabilisierung dieser Strukturen wird durch Wasserstoffbrückenbindungen realisiert. Die Tertiärstruktur zeigt die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente, sie entspricht der Kristallstruktur von Proteinen. Sie wird sowohl durch Wasserstoffbrücken stabilisiert als auch durch Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinen, Ionenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen. Die Quartärstruktur stellt die räumliche Anordnung mehrerer unabhängiger Aminosäuresequenzen dar. Diese können Untereinheiten sein, welche erst bei Zusammenschluss ein funktionales Protein ergeben.

Proteine können unter bestimmten Bedingungen ihre Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur verändern. Diese liegen meist in der Funktion der Proteine begründet. Membranproteine können wie z.B. bR Protonen pumpen, indem sie an der extrazellulären Seite ein Proton abgeben und anschließend ein Proton von der intrazellulären Seite aufnehmen. Viele GPCRs nehmen einen Liganden von der extrazellulären Seite auf, welcher eine Änderung der Tertiärstruktur auslöst und auf der intrazellulären Seite die Bindungsaffinität des G-Proteins signifikant erhöht.

Daher ist es von Interesse, die stattfindenden Veränderungen nachzuvollziehen und zu verstehen. Aus Kristallstrukturen von Röntgenbeugungsexperimenten läßt sich eine Struktur mit einer Auflösung im Ångstrombereich darstellen, aber nur in einem starren Zustand und von unflexiblen Bereichen im Protein. Als weitere Stukturbestimmungsmethode wird die **Kernspinresonanzspektroskopie** eingesetzt. Diese kann im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse über longitudinale- oder Spin-Gitter-Relaxation (T1) und transversale- oder Spin-Spin-Relaxation (T2) zeitaufgelöste Aussagen für die Proteine machen, wobei die Proteingröße bei diesem Verfahren im Vergleich zur Röntgenstrukturanalyse ein Problem darstellt [Cemazar und Craik, 2006]. Eine Kristallisation der Proteine ist nicht notwendig, für die Messungen werden deuterierte Lösungsmittel eingesetzt.

Für **Elektronenspinresonanzmessungen** in Proteinen benötigt man paramagnetische (mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen) Moleküle als Marker, welche sich zum Messen eignen. Diese können ortsspezifisch in Proteinen an die Thiolgruppe eines Cysteins angebracht werden. Experimentell nutzt man den *Zeeman Effekt* aus, welcher in paramagnetischen Molekülen bei Anlegen eines Magnetfeldes die Entartung der Energieniveaus der Elektronen aufhebt. Mit Absorption

eines elektromagnetischen Wechselfeldes werden die Energiedifferenzen dieser Energieniveaus gemessen, wobei man mit variablen Magnetfeldstärken bei festem Wechselfeld arbeitet.

Die Wechselwirkung von Atomkern und ungepaartem Elektron spaltet die Energieniveaus in Hyperfeinstrukturen auf, welche gemessen werden können. Aus ihr können Parameter wie sterische Einschränkung und Beweglichkeit der Spin-Marker qualitativ aus der Form der Niederfeldkomponente der Hyperfeinaufspaltung erhoben werden (Abb. 12B). Um quantitative Parameter zu erhalten, müssen die EPR-Marker mit passenden Umgebungsparametern am Computer simuliert und mit den experimentellen Daten verglichen werden. Die Parameter zur Beweglichkeit des Spinmarkers sind der Ordnungsparameter S und die Rotationskorrelationszeit τ . Der Ordnungsparameter kann Werte zwischen 0 (mobil) und 1 (immobil) annehmen. In Abb. 12B sind die dafür charakteristischen Banden markiert mit α und β zu sehen. Mittels verschiedener Techniken wie DEER (*Double Electron Electron Resonance*) oder MQC (*Multiple Quantum Coherence*) ist es auch möglich, Abstände von zwei EPR-Markern zu bestimmen. Dabei können Abstände bis zu 8 nm aufgelöst werden [Schiemann und Prisner, 2007]. Auch sind zeitaufgelöste EPR-Messungen mit einer Zeitauflösung von zu 100 μ s möglich [Volkov et al., 2009, Alexander et al., 2008, Knierim et al., 2007]. Eine detaillierte Übersicht ist im Review von Klare und Steinhoff [2009] zu finden.

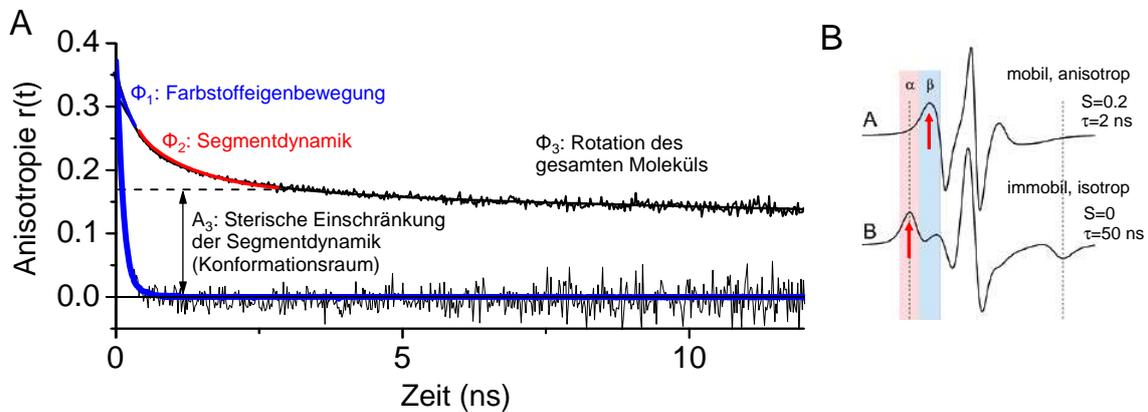


Abbildung 12: Vergleich der Messungen der Anisotropie von Fluoreszenzdepolarisationsmessungen (A) und aus EPR-Messungen (B). **A:** Die blaue Kurve ist aus einer Messung von freiem Farbstoff. Sie zeigt einen einfach-exponentiellen Anisotropiezerfall, dessen Zeit die Rotationskorrelationszeit des Farbstoffes ist. Die dreifarbige Kurve ist von einer Messung eines kovalent gebundenen Farbstoffes an einem Protein und wird mit drei Exponentialfunktionen gefittet. Die drei Zeiten entsprechen der Farbstoffbewegung, der Proteinsegmentdynamik und der Rotation des gesamten Moleküls. Der Offset entspricht den Konformationsraum. **B:** Zwei EPR-Kurven zeigen oben einen mobilen EPR-Marker mit einer schnellen Rotationskorrelationszeit und unten einen immobil, isotropen Marker [Kusnetzow et al., 2006].

Die **Fluoreszenzspektroskopie** in Proteinen wird an endogenen, in die Aminosäuresequenz eingebauten (z.B. Tryptophan), und exogenen, am Protein gebundenen (z.B. über Cystein gebundenen), Fluorophoren durchgeführt. Sie werden optisch angeregt, anschließend wird ihre Fluoreszenz detektiert.

Es gibt zwei konkurrierende Messmethoden, Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen: Messungen im Zeitbereich und im Frequenzbereich. Bei Messungen im Frequenzbereich wird der Fluoreszenzmarker mit einem amplitudenmodulierten Laserstrahl bestrahlt und der Phasenversatz und die Amplitude der Fluoreszenz detektiert und daraus die Lebensdauer bestimmt. Bei Messungen im

Zeitbereich wird die Probe mit einem Laserpuls angeregt und dann Fluoreszenzintensität und -lebensdauer detektiert.

Fluoreszenzmarker können auf Veränderungen in ihrer Umgebung mit Änderungen in Fluoreszenzintensität und -lebensdauer reagieren. Ebenso ist es möglich, die Eigenbewegung (Rotationsbewegungen) der Reportergruppe via zeitaufgelöster Anisotropiemessungen direkt aus den gemessenen Daten zu bestimmen. Abb. 12A zeigt exemplarisch zwei zeitaufgelöste Anisotropiekurven, welche zum einen die Kurve von einem Fluoreszenzmarker alleine in Lösung zeigt (blau). Diese Anisotropiekurve kann mit einer Zeitkonstante direkt gefittet werden, welche proportional zum Volumen ist. Die andere Kurve zeigt den Anisotropiezerfall eines an ein Protein gebundenen Fluorophors. Ihre drei Hauptzerfallskomponenten werden durch die Eigenbewegung des Fluorophors, des Segments und der Rotationsdiffusion des Gesamtmoleküls bestimmt.

2.4 Fluoreszenzlöschung⁷

Die Fluoreszenz von Fluorophoren kann sich in Abhängigkeit der Umgebung ändern. Meist kommt es zur Löschung von Fluoreszenz, wobei hier zwei Fälle unterschieden werden. Beim ersten Fall verringert sich nur die statische Fluoreszenzintensität und wird *Statisches Quenching* (Statische Fluoreszenzlöschung) genannt. Beim zweiten Fall, dem *Dynamischen Quenching* (Dynamische Fluoreszenzlöschung), verändert sich zudem die mittlere Fluoreszenzlebensdauer $\bar{\tau}$ als auch τ^* (Gleichungen 3.10 und 3.12). Die Löschung der Fluoreszenz geht mit der Übertragung der absorbierten Energie in einen nicht-fluoreszierenden Prozess überein. Im folgenden werden die Quenchingmechanismen und dazugehörigen physikalischen Prozesse näher beschrieben.

Statisches Quenching

Beim statischen Quenching bilden Farbstoff und Quencher einen Komplex. Dieser relaxiert bei Anregung strahlungslos wieder zurück in den Grundzustand. Die Anzahl der Komplexe nimmt mit steigender Konzentration von Quencher-molekülen zu, die Löschungseffizienz ist durch die Komplexierungsrate K_S bestimmt. Die *Stern-Vollmer-Gleichungen* 2.1 und 2.2 beschreiben die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität F oder der Fluoreszenzzerfallszeit τ eines Farbstoffes in Abhängigkeit der Quencherkonzentration mit

$$\frac{F_0}{F([Q])} = 1 + K_S [Q] \quad (2.1)$$

und

$$\frac{\tau_0}{\tau([Q])} = 1 + K_D [Q] \quad (2.2)$$

$F([Q])$ ist die gemessene Fluoreszenzintensität bei der Konzentration $[Q]$ und F_0 die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes ohne Quencher. Für die dynamische Quenchingkonstante gilt $K_D = k_q \tau_0 [Q]$ mit k_q als bimolekularer Quenchingkonstante und τ_0 als Fluoreszenzlebensdauer in Abwesenheit von Quencher-molekülen.

Beim statischen Quenching sind Änderungen der Fluoreszenzlebensdauer τ nicht zu erwarten, da die Fluoreszenzmoleküle im Komplex nicht fluoreszieren und somit keine Rolle für die Messung spielen (Abb. 13A). Die unkomplexierten Fluoreszenzmoleküle besitzen dagegen keinerlei Interaktion mit den Quencher-molekülen, daher sollte sich τ konzentrationsabhängig nicht ändern. Bei

⁷ Quenching

zunehmender Temperatur ist durch geringere Komplexbildung eine geringere Quencheffizienz zu erwarten.

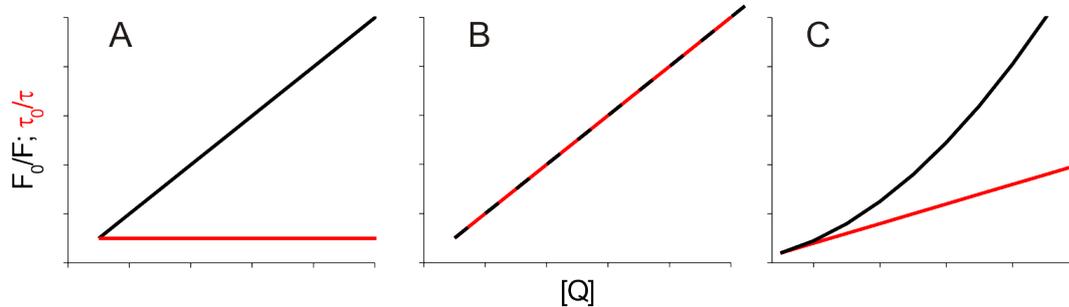


Abbildung 13: Stern Vollmer Graphen für A) statisches Quenching, B) dynamisches Quenching, C) einer Kombination aus statischen und dynamischen Quenching

Dynamisches Quenching

Die Fluoreszenz kann auch dynamisch durch einen Quencher gelöscht werden. Angeregte Fluorophore kommen diffusionsbedingt mit den Quencher-molekülen in Kontakt und werden strahlungslos deaktiviert. Die Löschung ist ebenso wie beim statischen Quenching von der Konzentration des Quenchers abhängig, hier wird aber nicht nur die Fluoreszenzintensität F verringert, sondern auch die mittleren Fluoreszenzlebensdauer $\bar{\tau}$ und τ^* . Die Elektronen im angeregten Zustand erhalten durch den dynamischen Quencher einen zusätzlichen Deaktivierungskanal, dadurch wird der angeregte Zustand schneller abgebaut. Bei steigender Temperatur erhält man eine erhöhte Quencheffizienz (Abb. 13B).

In manchen Fällen ist die Löschung der Fluoreszenz eine Mischung aus statischen und dynamischen Quenching (Abb. 13C). Für die Berechnung der Komplexbildungsrate K_S nutzt man die modifizierte Stern-Vollmer-Gleichung.

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[Q])(1 + K_S[Q]) \quad (2.3)$$

Für die Berechnung von K_D nutzt man weiterhin Gleichung 2.1, da das statische Quenching keinen Einfluss auf die Lebensdauer besitzt.

2.4.1 Energieübertragungsmechanismen

Nach Absorption von Licht geht der Fluorophor in einen angeregten Zustand über, dabei wird ein Elektron aus dem Grundzustand in einen Zustand mit höherer Energie übertragen. Bei Interaktion mit dem Quencher-molekül kehrt der Fluorophor in den Grundzustand zurück, ohne ein Photon emittiert zu haben. Diese überschüssige Energie wird vom Quencher aufgenommen. Im folgenden wird auf diese lang- und kurzreichweitigen Energieübertragungsmechanismen eingegangen.

Langreichweitige Energieübertragung:

Dieser Energietransfer kann durch langreichweitige Dipol-Dipol-Wechselwirkungen vermittelt werden (Förster Resonanz Energie Transfer - FRET). Für den Energietransfer mittels FRET benötigt man Donor und Akzeptor mit spektralen Überlapp. Die Fluoreszenzbande des Donors muß einen Überlapp mit der Absorptionsbande des Akzeptors haben. Der Energietransfer geschieht nicht durch Erzeugung von Photonen, sondern durch langreichweitige Dipol-Dipol Interaktionen von Donor und Akzeptor. Während beim Elektronentransfer ein Kontakt zwischen Donor und Akzeptor notwendig ist, können bei FRET typischerweise Abstände bis zu 10 nm detektiert werden. Die Energietransferrate k_F ist stark abhängig vom Abstand des Donor/Akzeptor Pärchens und fällt mit der sechsten Potenz ab:

$$k_F(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (2.4)$$

R_0 ist der materialabhängige Försterradius (Abstand, bei dem die Übertragungseffizienz 50% ist), r der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, τ_D die Fluoreszenzlebensdauer.

Typische R_0 liegen bei 2 – 6 nm. Durch die starke Abstandsabhängigkeit hat sich FRET als Messinstrument für diese Abstände etabliert. Es ist möglich, diese auch zeitabhängig zu messen. Durch seine Reichweite ist FRET gut geeignet, inter- und intramolekulare Abstände und Abstandsänderungen von und in Proteinen zu detektieren.

Kurzreichweitige Energieübertragung:

Es ist auch möglich, daß Energietransfer bei molekularem Kontakt von Fluorophor und Quencher vonstatten geht. Dieser wird über die Elektronen von Fluorophor und Quencher vermittelt. Die kurzreichweitige Energieübertragung kann durch verschiedene Mechanismen vermittelt werden, dazu zählen unter anderem der Dexter-Mechanismus oder der photoinduzierte Elektronenaustausch. Bei beiden ist van-der-Waals Kontakt Voraussetzung für die Energieübertragung. Die Energietransferrate (oder Quenchingrate) k_E von Fluorophor und Quencher ist proportional zum Abfall der Elektronendichte ihrer Elektronenhüllen. Diese Beziehung läßt sich folgendermaßen formulieren:

$$k_E(r) = A \cdot \exp(-\beta(r - r_c)) \quad (2.5)$$

r ist der Abstand der Zentren von Quencher und Fluorophor, r_c ihre geringstmögliche Distanz. $A \approx 10^{13} \text{ s}^{-1}$ und $\beta \approx 1 \text{ \AA}^{-1}$ sind die typische Parameter für Quencher-Fluorophorinteraktionen. Das Verhältnis aus Interaktions- und Zerfallsrate des angeregten Zustandes gibt die Quenchingeffizienz an. In der Regel ist schon bei einem Abstand von einigen Ångstrom kein Quenching mehr zu beobachten.

Der **Dexter-Energietransfer** beruht auf dem Austausch von Elektronen. Vom Fluorophor (D^*) wird das angeregte Elektron auf das Quenchemolekül (Q) übertragen, welches dann im Austausch ein Elektron aus seinem Grundzustand in den Grundzustand des Fluorophors (D) zurückgibt. Der Quencher ist im angeregten Zustand (Q') und relaxiert - meist strahlungslos - in den Grundzustand zurück. Dieser Austausch kann sowohl in zwei getrennten Schritten als auch konzertiert, d.h. in einem Übergangszustand, stattfinden.



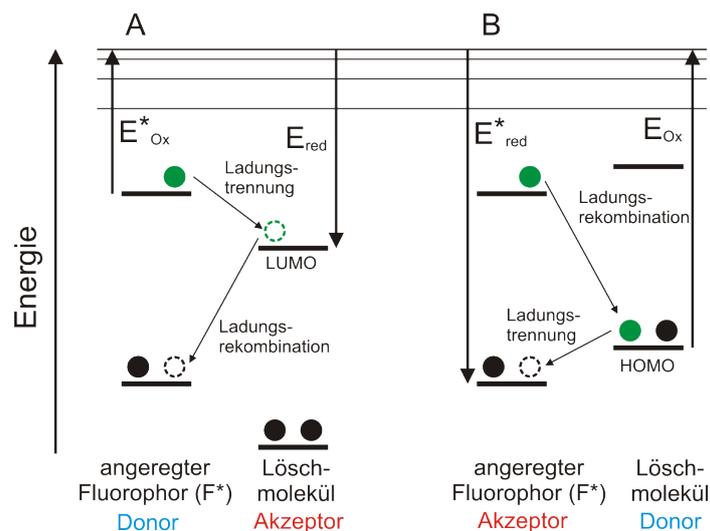


Abbildung 14: Darstellung des PET Transfermechanismus mit angeregtem Farbstoff F^* . **A:** Der angeregte Farbstoff fungiert als Elektronendonator. **B:** Der angeregte Farbstoff fungiert als Elektronenakzeptor (nach Brunner [2002]).

Für den Transfer ist es wichtig, wie die räumliche Anordnung der beteiligten Elektronenorbitale ist (K), ebenso muß ein spektraler Überlapp (J) vorhanden sein, damit der Austausch funktioniert.

Eine weitere Voraussetzung für den Elektronenaustausch ist der Gesamtspin der Tauschpartner, welcher sich nicht ändern darf [Dexter, 1953]. Es ist daher möglich, daß nicht nur Elektronen in Singulettzuständen getauscht werden, sondern auch in Triplettzuständen. Das nennt man Triplett-Triplett Energietransfer⁸.

Der Akzeptor hat nach dem Austausch ein Elektron im angeregten Triplettzustand, während der Donor durch den Elektronentausch strahlungslos in den Grundzustand übergegangen ist. Voraussetzungen für den TTET ist ein Donor mit hoher *intersystem crossing* Umwandlungsrate, um nach Anregung eine große Anzahl von Elektronen im Triplettzustand zu haben. Außerdem muß der Donor eine höhere Triplettenergie besitzen als der Akzeptor.

Der Triplettzerfall wird nicht über die Detektion der Phosphoreszenz gemessen, sondern über die transiente Absorptionsänderungen der Triplettabsorptionsbanden [Bieri et al., 1999]. Die Lebensdauer der Triplettzustände liegt um Größenordnungen höher als die Fluoreszenz im Bereich von 100 ns bis zu mehreren μ s. Protein- und Peptidfaltungsdynamiken, wie z.B. die Helixfaltung [Thompson et al., 1997], spielen sich in diesem Zeitbereich ab.

Der **Photoinduzierte Elektrontransfer Mechanismus** (PET) ist eine Redox-Reaktion (Elektronenaustauschreaktion) und findet nach Bildung eines Komplexes von Donor und Akzeptor (Exciplex) statt. Dabei ist eines der beteiligten Moleküle (hier der Fluorophor) durch Absorption eines Photons im angeregten Zustand. Die Redox-Potentiale von (angeregten) Fluorophor (F^*) und Fluoreszenzlöcher bestimmen, ob sie als Donor oder Akzeptor im Komplex agieren. Gilt $|E_{Ox}^*(F^*)| < |E_{red}(Lösch)|$ (Abb. 14 A), so fungiert F^* als Elektronendonator. Das Elektron im angeregten Zustand des Fluorophors geht in das niedrigste unbesetzte Orbital (LUMO) des Löschers über (Ladungstrennung) und von dort aus in den Grundzustand des Fluorophors zurück (Ladungsrekombination). Gilt dagegen $|E_{red}^*(F^*)| > |E_{Ox}(Lösch)|$ (Abb. 14 B), so fungiert F^* als Elektronenakzeptor. Ein Elektron aus dem höchsten von Elektronen besetzte Orbital (HOMO) des Fluoreszenzlöschers geht in den Grundzustand des F^* über, welcher dann sein angeregtes Elektron zurück auf den Löcher überträgt.

⁸ Triplet-Triplet Energy Transfer - TTET

Material und Methoden

3.1 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Proteinen werden mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenmessungen durchgeführt.

Für TCSPC-Messungen wird eine gepulste Strahlungsquelle benötigt. In dieser Arbeit wird ein von einem Festkörperlaser *Millenia V* gepumpter Titan Saphir Laser (TiSa) *Tsunami* (beide von *Spectra Physics*) genutzt, welcher auf Pulslängen von Picosekundenlänge (1 – 2 ps) konfiguriert ist. Der TiSa zeichnet sich durch eine große Fluoreszenzbande aus, welche mit Frequenzverdopplung, -verdreifachung und optisch parametrischen Oszillator (OPO) den Spektralbereich zwischen 250 – 1100 nm abdecken kann und sich damit für die Messung von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gut eignet. Selektiv können einzelne Wellenlängen gewählt werden. Die Repetitionsrate des Lasers wird mittels Pulspicker von 82 MHz auf ca. 4 MHz heruntergetaktet, um überlappende Fluoreszenzzerfälle für die in dieser Arbeit genutzten Fluorophore zu vermeiden, diese besitzen eine maximale Fluoreszenzlebensdauer von 10 ns (Tabelle 1).

Für die TCSPC-Experimente werden geringe Fluoreszenzintensitäten benötigt, da traditionell mit der TCSPC-Technik pro Puls nur das erste Photon, welches den Detektor trifft, erfasst wird. Die Anregungsintensität und die Fluoreszenzmarkerkonzentration (einstelliger Mikromolarbereich) wird so eingestellt, daß der Detektor etwa alle 200 Anregungspulse ein Photon detektiert. Wenn mehr als ein Photon den Detektor in einer Pulsperiode trifft, werden ab dem zweiten alle weiteren von der Meßelektronik ignoriert und das entstehende Zerfallshistogramm verzerrt. Die entstehende Fluoreszenzkurve gibt dann scheinbar eine verkürzte Abklingzeit an.

Die TCSPC-Messungen wurden mit einer in einem PC eingebauten PCI-Karte SPC-830 (Becker und Hickl GmbH) durchgeführt, welche im Rahmen dieser Arbeit in den bestehenden Meßaufbau integriert wurde. Auf dieser Meßkarte sind bis auf den Vorverstärker die elektronischen Komponenten, deren Eigenschaften im nächsten Abschnitt näher erläutert werden, für die Aufnahme der Signale integriert.

3.1.1 Messprinzip der Einzelphotonenzählungsspektroskopie

Messungen von Fluoreszenzzerfällen mittels TCSPC werden aus vielen Einzelmessungen zusammengesetzt. Jede Einzelmessung wird mit dem Anregungspuls vom Laser gestartet. Dieser wird an einem Strahlteiler geteilt. Ein Teil wird von einer Diode detektiert und der andere von der Probe mit dem Fluoreszenzfarbstoff absorbiert. Der Farbstoff emittiert Photonen, welche auf einen weiteren Detektor treffen. Die Zeitdifferenz der beiden Ankünfte wird anschließend in ein Intensitäts-Zeit-Histogramm eingetragen bzw. aufaddiert. Die Repetitionsrate des Lasers muß so eingestellt sein, daß die Fluoreszenzzerfälle sich nicht überlappen.

In Abb. 15 ist ein detailliertes Schema eines TCSPC-Aufbaus. Ein Teil des Laserstrahles (1) geht durch einen kontinuierlichen Neutraldichtefilter (F) und triggert die Diode. Der andere Teil geht zur Probe (2). Je nach Polarisationssebene des Anregungsstrahls wird dieser mit dem Fresnelrhombus (FR) gedreht, anschließend wird der Strahl über einem doppeltes Neutraldichtefilterrad (DF) abgeschwächt. Ein Glan-Taylor Polarisator steht im Strahlengang, um Photonen mit falscher Polarisationssebene zu filtern. Bei Anregung von lichtempfindlichen Proben wird der Strahl zusätzlich mit

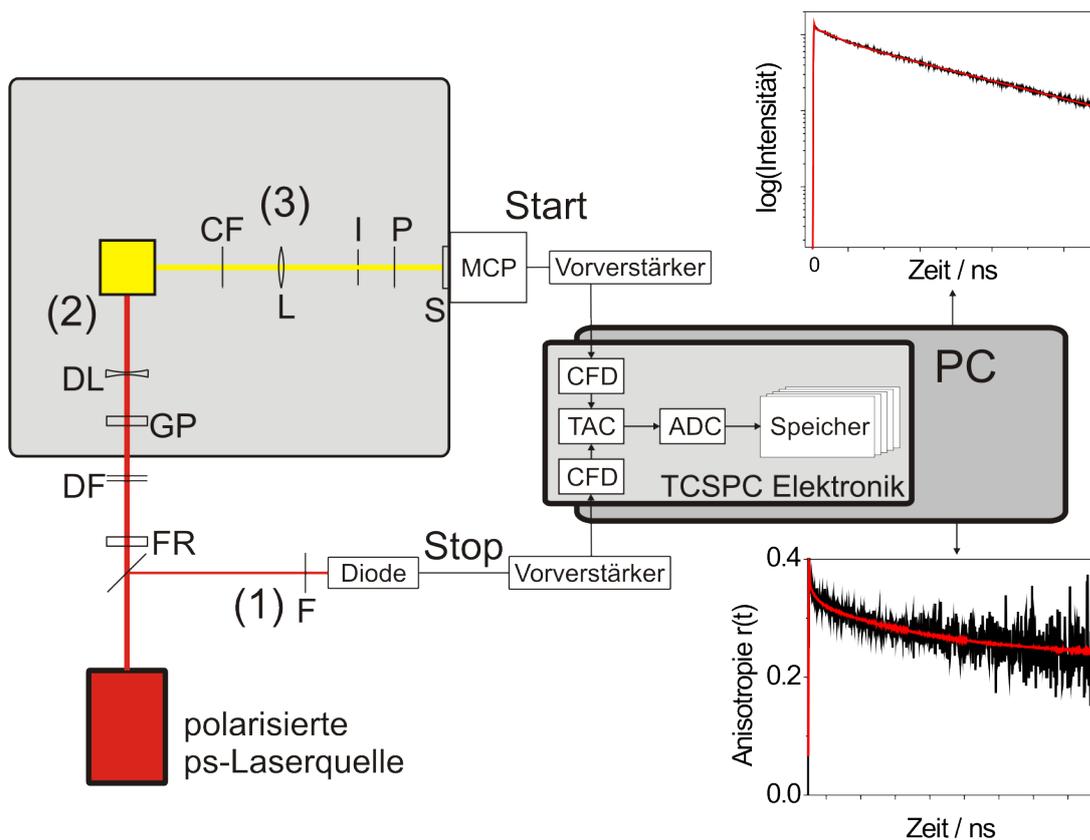


Abbildung 15: Schematischer Aufbau eines TCSPC-Setups. Der Laserpuls wird in zwei Einzelpulse geteilt, wobei ein Teil die Diode triggert (1) und der andere (2) die Probe anregt. Über den Fluoreszenzstrahlengang (3) wird die Fluoreszenz detektiert, durch die Meßelektronik registriert und anschließend in Fluoreszenzzerfalls- und Anisotropiezerfallshistogramme eingeordnet. Abkürzungen: Fresnelrhombus (FR), doppeltes Neutraldichtfilterrad (DF), Glan-Taylor Polarisator (GP), konkave Aufweitungslinse (DL), Kantenfilter (CF), Linse (L), Irisblende (I), Folienpolarisator (P), mechanischer Verschluss (S), *Multi Channel Plate* (MCP), Zeit-Amplituden Konverter (TAC), *Constant Fraction Discriminator* (CFD), Analog-Digital Wandler (ADC)

einer konkaven Linse (DL) aufgeweitet. Die Fluoreszenz der Probe (3) wird über einen Kantenfilter (CF) vom Streulicht abgetrennt und dann mit einer Linse parallelisiert. Der Folienpolarisator (P) polarisiert das Emissionslicht für Lebensdauer- und Anisotropiemessungen. Ein mechanischer Verschluss (S) verhindert, daß das *Multi Channel Plate* (MCP) außerhalb der Messungen dem Licht ausgesetzt wird.

Ein detektierter Puls ist nicht δ -förmig, sondern besitzt eine endliche zeitliche Breite. Außerdem kann die Intensität der Pulse unterschiedlich hoch sein. Für die Messungen ist es jedoch wichtig, daß trotz der zeitlichen Verteilung der Pulse die Start- und Stopzeiten mit höchstmöglicher Genauigkeit definiert werden können. Bei TCSPC-Messungen wird dafür der *Constant Fraction Discriminator* (CFD) benutzt. Dieser teilt den Puls in zwei Einzelpulse mit unterschiedlicher Amplitude und invertiert einen. Der andere wird zeitlich verzögert und anschließend werden beide Teilpulse addiert. Der resultierende Puls hat einen Nulldurchgang, welcher als Zeitpunkt an den Zeit-Amplituden Konverter (*Time to amplitude converter* - TAC) gegeben wird. Der CFD kann damit bei gleicher Pulsform unabhängig von verschiedenen Pulsamplituden einen definierten

Zeitpunkt bestimmen. Der Startpuls startet den TAC, in dem ein Kondensator geladen wird, der Stoppuls stoppt den Ladevorgang. Die ausgelesene Spannung ist proportional zu einer Zeit Δt zwischen dem Anregungs- und Emissionsphoton und wird vom Analog-Digital Wandler (ADC) einer Kanalnummer mit dem Zeitintervall $t_{ADC} + \Delta t_{ADC}$ zugeordnet. Nach Aufsummierung der Einzelmessungen erhält man ein Histogramm, welches dem Fluoreszenzzerfall der gemessenen Probe entspricht.

Da nur etwa jeder 200ste Anregungspuls zu einer detektierten Emission führt, würden in dieser Konfiguration die restlichen Anregungspulse zu einer Ladung des TAC ohne Stoppuls führen. Der TAC muß jedes mal entladen werden, was Zeit in Anspruch nimmt. Daher werden TCSPC-Setups im *inversen Modus* betrieben: Ein detektiertes Fluoreszenzphoton startet die Messung und wird von dem Anregungspuls gestoppt. Dazu muß nur der Anregungspuls zeitlich verzögert werden.

3.2 Transiente Flash - Absorptionsspektroskopie

Das Messprinzip der transienten Flash-Absorptionsspektroskopie erlaubt es, zeitaufgelöst Extinktionsänderungen $\Delta A(t)$ bei einer Wellenlänge λ_{Mess} zu detektieren, welche durch einen Laserpuls induziert wurden. Dadurch ist es möglich, von lichtaktivierbaren Proben zeitaufgelöst die Entstehung und den Zerfall von Intermediaten mit verschiedenen Extinktionsmaxima zu bestimmen. Darüber hinaus können auch zeitaufgelöste Extinktionsänderungen von pH-Indikatoren und damit Protonenkonzentrationsänderungen gemessen werden. Das transmittierte Licht wird von einem *Photomultiplier* (PM) gemessen, die Ausgangsspannung vom PM $U(t)$ kann als Differenz zur PM-Spannung vor Meßbeginn U_0 direkt in eine Extinktionsänderung ΔA umgerechnet werden: $\Delta A(t) = \log(U_0/U(t))$. Da der Detektor bei Spannungen um Null am empfindlichsten ist, wird dieser Nullpunkt mithilfe einer Offsetspannung U_{off} verschoben. Man erhält dadurch $U'(t) = U(t) + U_{off}$ und $U'_0 = U_0 + U_{off}$. Für die Extinktionsänderung erhält man:

$$\Delta A(t) = -\log\left(1 + \frac{U'(t) - U'_0}{U_0}\right) \quad (3.1)$$

3.2.1 Meßaufbau

Die Flashmessungen wurden an einer selbstgebauten Flashapparatur durchgeführt [Engel, 1989]. Ein Excimerlaser (EMG50 - Lambda Physics) pumpt bei 308 nm mit 10 ns langen Pulsen mit jeweils einer Energie von 70 – 90 mJ einen Farbstofflaser, welcher mit Coumarin 307 in Methanol befüllt ist. Dessen Laserpulse werden direkt aus dem offenen Resonator in die Probenkammer und die in einer Küvette befindliche Probe eingekoppelt. Diese Laserpulse besitzen bei $\lambda_{fl} = 493$ nm eine Energie von 12 – 14 mJ. Diese Wellenlänge eignet sich gut für Rhodopsinmessungen, da sie im Bereich des Absorptionsmaximum von Rhodopsin ($\lambda_{Rho} = 498$ nm) liegt. Ein Teil des Laserpulses wird für die Bestimmung der Laserintensität (12bit A/D Wandler) auf eine Diode geleitet, welche außerdem als Starttrigger für den Meßcomputer dient.

Mittels Monochromator wird von einer kontinuierlichen Lichtquelle (100 W Halogenlampe) die gewünschte Meßwellenlänge λ_{Mess} eingestellt. Die Probenküvette steht so im Meßstrahlengang, daß der Anregungslaserpuls senkrecht auf die Küvette fällt. Mit den Linsen wird der Meßstrahl auf die Küvette und anschließend auf den Photomultiplier fokussiert. Der Polarisator ist auf den Magischen Winkel (54.7°) eingestellt, damit keine Anisotropieeffekte detektiert werden. Das transmittierte Licht geht zunächst durch einen weiteren Monochromator, um Streulicht vom Laser und eine eventuelle Probenlumineszenz zu filtern, und wird dann vom Photomultiplier detektiert (Abb. 16).

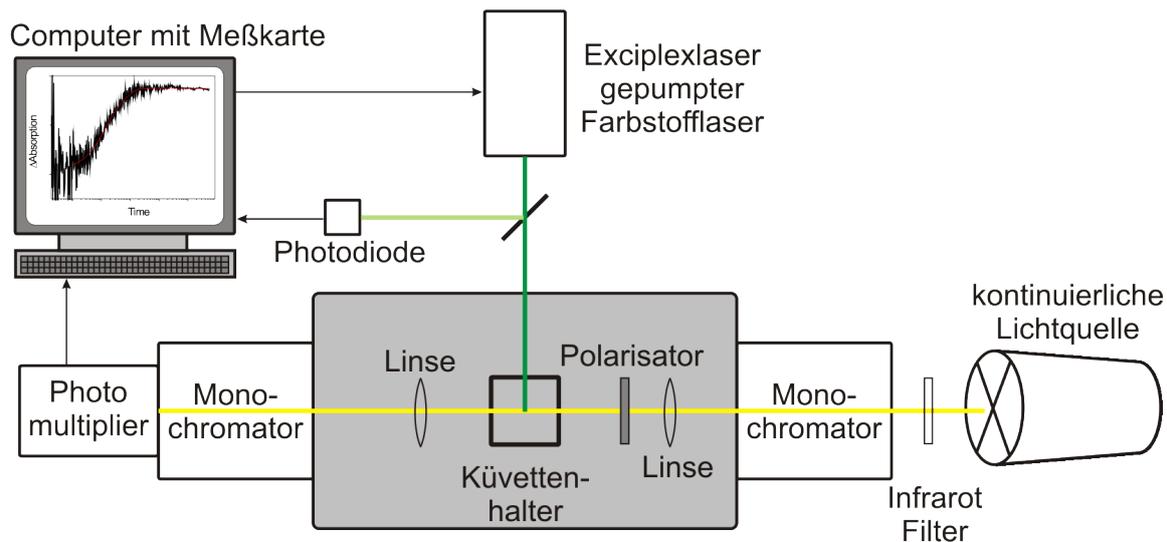


Abbildung 16: Schematischer Aufbau der Apparatur zur Messung transienter Absorptionsänderungen. Der gepulste Laser aktiviert die Photoreaktion des Proteins. In dieser werden transiente Absorptionsänderungen bei einer Wellenlänge detektiert.

Die Ausgangsspannung wird vorverstärkt und anschließend über ein variables RC-Glied gefiltert. Das Signal wird von einem 8bit A/D-Wandler mit zwei Kanälen und einer Abtastfrequenz von 20 MHz und 64 KByte Speicher gesampelt, seine beide Kanäle sind mit unterschiedlichen Zeitkonstanten ($0.1 \mu\text{s} - 4000 \mu\text{s}$) ausgestattet. Die beiden daraus entstehenden Kurven werden jeweils logarithmisch auf der Zeitachse zusammengefasst und dann zu einem Datensatz verbunden.

3.2.2 Meßbedingungen

Bei Messungen mit bR wird pro Einzelblitz bei ca. 20-30% der Proteine der Photozyklus ausgelöst. In der Regel werden etwa 20-50 Einzelmessungen für eine Absorptionswellenlänge aufgenommen und gemittelt, um ein gutes Signal-zu Rauschverhältnis (SNR^9) zu erhalten.

Bei Messungen mit Rhodopsin wird bei ca. 30% des Proteins die Photoreaktion ausgelöst. Weil Rhodopsin keinen Photozyklus besitzt, muß für jede Einzelmessung eine neue, im inaktiven Dunkelzustand befindliche, Rhodopsinprobe verwendet werden. Für die Messung des aktiven Meta-II Intermediats wird die Absorptionsänderung bei 380 nm gemessen.

3.3 Einzelmolekülexperimente

3.3.1 Messprinzip der Einzelmolekülexperimente

Bei Molekülen mit heterogenen Verhalten erhält man aus Ensemblemessungen eine Mischung des Fluoreszenzverhaltens unterschiedlicher Spezies. Um individuelle Moleküle beobachten zu können, werden Einzelmolekülweitfeldexperimente durchgeführt.

In der Weitfeldmikroskopie wird die Probe auf dem Objektträger gleichmäßig ausgeleuchtet und auf einer Fokusebene im Probenvolumen die einzelnen Bildpunkte parallel von einer CCD-Kamera aufgenommen. Nach Abbe können in der Lichtmikroskopie nur Objekte auseinandergehalten

⁹ Signal to Noise Ratio

werden, welche mindestens einen Abstand von $\frac{\lambda}{2 \cdot NA}$ (λ : Wellenlänge des Lichtes, NA: Numerische Apertur des Objektivs) besitzen. Die Konzentration der fluoreszierenden Moleküle wird daher so gering gehalten, daß vorausgesetzt werden kann, daß einzelne detektierte Objekte zu einzelnen Molekülen gehören. Aufgrund dessen kann man die Position dieser Moleküle mittels verschiedener Methoden (z.B. Center of Mass, 2D-Gaußfit) mit einer höheren Genauigkeit bestimmen.

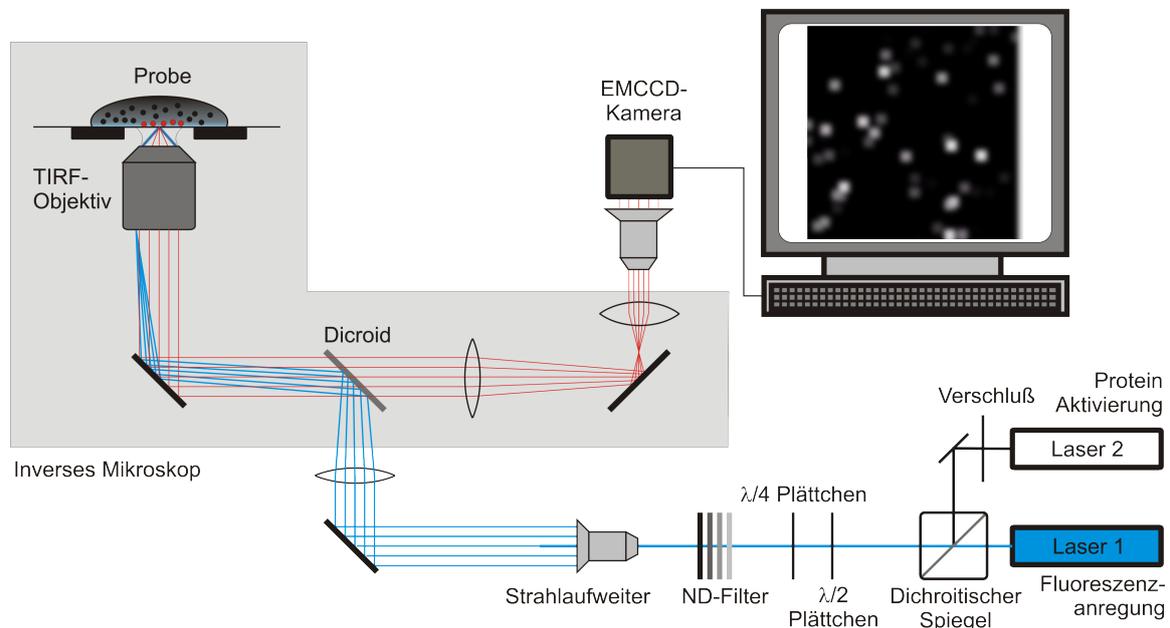


Abbildung 17: Schematischer Aufbau des TIRFM-Weitfeld Setups. Der linear polarisierte Laserstrahl wird durch das $\lambda/2$ - und $\lambda/4$ -Plättchen zirkular polarisiert, aufgeweitet und in ein inverses Mikroskop (IX-71 Olympus) eingekoppelt. Dieser wird aussermittig auf die hintere Brennebene des TIRF-Objektivs fokussiert und wird an der Probengrenzfläche totalreflektiert. Das Fluoreszenzlicht wird von einer EMCCD-Kamera (Hamamatsu ImagEM C9100-13) aufgenommen.

Durchlichtexperimente haben den Nachteil, daß Streulicht von anderen Molekülen außerhalb der Fokusebene das SNR verschlechtert. Um die SNR zu verbessern, kann man die Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* - TIRFM) verwenden. Bei dieser Methode wird das Anregungslicht an der Grenzfläche von Objekträger und Probe totalreflektiert. Bei Totalreflektion entsteht ein elektrisches Feld, welches über die Grenzfläche hinaus in die Probe eindringt. Dieses evaneszente Feld klingt exponentiell ab, hat eine Eindringtiefe von wenigen hundert Nanometern und regt nur Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb dieses Bereiches an. TIRF-Mikroskopie ist daher gut geeignet, Proben an der Oberfläche des Objekträgers ohne störende Streulichteinstrahlung aus anderen Bereichen der Probe, welche das SNR verschlechtern, zu beobachten.

3.3.2 Aufbau

Die Messungen wurden an einem inversen Mikroskop von Olympus (IX-71) und 60-fachem TIRFM Objektiv (NA=1.45) durchgeführt (Abb. 17). Die Fluoreszenz der kovalent an Proteinen gebundenen Farbstoffe wurde mit Diodenlaser passender Emissionswellenlängen für die Farbstoffe angeregt. Ein Diodenlaser ($\lambda_{max} = 473 \text{ nm}$) wurde zur Anregung der Photoreaktion von Rhodopsin während

der Messung genutzt. Die Anregung wurde mit einem steuerbaren mechanischen Verschluss (Öffnungszeit ca. 1 ms) kontrolliert. Mit einer EMCCD-Kamera (Hamamatsu ImagEM C9100-13) wurden Bildsequenzen mit einer Frequenz von ca. 31 – 200 Hz aufgenommen.

Der Laserstrahl wird zunächst zirkular polarisiert, dazu wird die Polarisationssebene des linear polarisierten Strahls mit dem $\lambda/2$ -Plättchen um 45° gedreht, welcher anschließend im $\lambda/4$ -Plättchen zirkular polarisiert wird. Anschließend wird der Strahl mittels Neutraldichtefilter abgeschwächt und in einem 10-fach Strahlaufweiter¹⁰ aufgeweitet. Eine Linse fokussiert den Strahl anschließend in hintere Brennebene des TIRF-Objektivs. Für Messungen im TIRF-Modus wird dieser an den Rand der Austrittspupille fokussiert, damit das Licht, das die Frontlinse verläßt, von der Probe totalreflektiert wird. Objektiv und Probenglas werden mit einer Brücke aus Immersionsöl verbunden, um Brechungsindexwechsel zu vermeiden.

Das TIRF-Objektiv sammelt das zurückkommende Licht, der Dichroismspiegel und ein Kantenfilter lassen nur das Fluoreszenzlicht durch, welches dann im Strahlengang des Mikroskops zur CCD-Kamera geleitet wird. Die Bilder werden von der CCD-Kamera aufgenommen und als Rohdaten für Analysen gespeichert.

3.4 Zirkulardichroismusexperimente

Um die Sekundärstrukturänderungen des C-terminalen Endes der α -Untereinheit von Transducin von ungeordnet zu α -helikal zu detektieren, wurden Zirkulardichroismusexperimente durchgeführt. Wie NMR-Messungen [Koenig et al., 2002] und die Kristallstruktur des gebundenen C-terminalen Endes der α -Untereinheit von Transducin [Scheerer et al., 2008] zeigen, ändert dieses bei Bindung mit dem lichtaktivierten Rhodopsin seine Konformation von ungeordnet nach α -helikal. Inwiefern diese Konformationsänderungen von den Umgebungsparametern abhängig ist, soll mit diesen Experimenten herausgefunden werden.

Aus Messungen des Zirkulardichroismus¹¹ kann man von Proteinen und Peptiden Sekundärstrukturelemente bestimmen. Dabei wird die Chiralität der Aminosäuren ausgenutzt. Diese Eigenschaft von Molekülen sagt aus, daß das Molekül und sein Spiegelbild nicht deckungsgleich sind. Diese Molekülpaare werden auch Enantiomerenpaare genannt. Sie zeichnen sich durch eine unterschiedliche optische Aktivität aus und absorbieren rechts (A_r) und links (A_l) zirkular polarisiertes Licht mit unterschiedlich hoher Amplitude. Es gilt also $A_r - A_l \neq 0$. Die Absorption wird nur bei bestehenden Extinktionsbanden beobachtet, dabei sind Extinktionsunterschiede etwa um den Faktor 10^3 kleiner als die der Absorptionsbande. Der Unterschied der Extinktion wird als Elliptizität Θ_λ ausgedrückt und ist wie folgt definiert:

$$\Theta_\lambda = 2.303(A_l(\lambda) - A_r(\lambda))180/4\pi \quad (3.2)$$

Für Messungen bei Proteinen und Peptiden kann mittels CD die Sekundärstruktur ermittelt werden. Entscheidend sind die Peptidbindungen im Peptidrückgrat, welche die Sekundärstruktur prägen. Aus der Masse m und der Anzahl der Peptidbindungen erhält man die MRW¹²: $MRW = \frac{m}{N-1}$ (N : Anzahl der Aminosäuren). Mit dieser kann die molare Elliptizität $[\Theta]_{\text{molar},\lambda}$ berechnet

¹⁰ Beam Expander

¹¹ circular dichroism - CD

¹² mean residue weight

werden, welche noch die Konzentration des Proteins c in $\frac{g}{ml}$ und die optische Weglänge d in cm berücksichtigt:

$$[\Theta]_{\text{molar},\lambda} = \frac{MRW \cdot \Theta}{10 \cdot d \cdot c} \quad (3.3)$$

Bei bekannter molaren Konzentration m gilt:

$$[\Theta]_{\text{molar},\lambda} = \frac{100 \cdot \Theta_{\lambda}}{m \cdot d} \quad (3.4)$$

Zur Bestimmung von Sekundärstrukturelementen werden CD-Spektren im fernen UV von 160 – 250 nm gemessen. Die C=O (Carbonyl-Gruppe) der Amidbindung im Peptidrückgrat ändert sich wesentlich bei Ausbildung verschiedener Sekundärstrukturen, welche man im CD-Spektrum messen und analysieren kann.

Die CD-Spektren müssen mit Modellpeptiden, welche bestimmte Sekundärstrukturen ausbilden, kalibriert werden. Anschließend können die gemessenen CD-Spektren analysiert werden. Dabei werden die relativen Anteile von α -Helix, β -Faltblatt, *Turn* und ungeordneten Peptidanteilen quantifiziert.

Im nahen UV von 250 – 300 nm können die CD-Signale von Aromaten, welche in den drei Aminosäuren Trp, Tyr und Phe vorkommen, detektiert werden. Die CD-Spektren variieren bei unterschiedlichen Umgebungsparametern.

Bei den Messungen muß darauf geachtet werden, daß die Lösung der Probe eine möglichst geringe Absorption im zu messenden Wellenlängenbereich besitzt. Im fernen UV steigt die Absorption von H_2O stark an. Um den Effekt der Wasserabsorption möglichst gering zu halten, sollte die optische Weglänge durch die Probe möglichst kurz sein und mit möglichst hoher Probenkonzentration gemessen werden.

Für die CD-Messungen an einem Peptid, welches die Aminosäuresequenz einer hochaffinen Variante (HAA) des C-terminalen Endes der α -Untereinheit des Transducins besitzt, wurden 300 μg des lyophilisierten Peptides in 500 μl 50 mM NaPP Puffers pH 6 gelöst. Die Konzentration der Lösung bei Annahme eines molaren Gewichts von 1200 g/l des Peptides ist 500 μM . Die Messungen wurden bei 20°C durchgeführt. Die Messungen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von n-Dodecyl β -D-maltoside (DM) und Natriumdodecylsulfat (SDS) durchgeführt.

Das CD-Spektrometer ist von der Fa Jasco, Modell J-500A. Die Küvetten, in der die Messungen durchgeführt wurden, sind von der Firma Hellma und haben eine Dicke von 0.2 mm mit einem Probenvolumen von 150 μl oder eine Dicke von 1 mm mit einem Probenvolumen von 350 μl .

3.5 Fluoreszenzreportergruppen

Die in dieser Arbeit eingesetzten Reportergruppen (Abb. 18) sind fluoreszierende Moleküle, welche sich zusammen mit einer reaktiven Gruppe spezifisch an ein Protein binden können. Diese spezifische Gruppe ist entweder eine Iodoacetamid- oder eine Maleimidgruppe und kann an einem Cystein binden. Cysteine besitzen als einzige Aminosäure eine Thiolgruppe, welches mit der reaktiven Gruppe des Farbstoffes eine Verbindung eingeht. Die Cysteine werden, wenn sie nicht schon nativ an der gewünschten Position im Protein vorhanden sind, durch Mutagenese in diese eingefügt. Andere Cysteine, welche die Reportergruppen ebenfalls binden können, müssen vor der Bindungsreaktion molekularbiologisch entfernt werden, damit nur das gewünschte Cystein markiert wird, da ansonsten Meßartefakte bei Messungen der Fluoreszenzlebensdauer und der zeitaufgelösten Anisotropie auftreten können. In der Regel geschieht dies durch Mutagenese. Bei unterschiedlicher Bindungskinetik der Cysteine kann auch durch geeignete Labelingprotokolle eine spezifische Markierung einzelner Cysteine im Protein durchgeführt werden. Bei den bR-Messungen wurden spezielle Cysteinmutanten erstellt, welche einen Farbstoff an jeweils einen bestimmten Schleife binden. Beim Rhodopsin wird das gut zugängliche Cystein an Position Cys316 für die Messungen der Helix 8 Dynamik genutzt.

Ortsspezifische Markierung der Proteine

Die ortsspezifische Markierung wird für jede jedes Protein nach individuellen Protokollen durchgeführt, wobei die folgenden Schritte universell sind: Die Cysteine werden mit Dithiothreitol (DTT) reduziert, damit diese mit den Linker reagieren können. Anschließend läßt man Probe und Farbstoff zusammen reagieren, wobei die Labelingstöchiometrie unter anderem von der Reaktionszeit, der Temperatur, dem Überschuss an Farbstoff und der Zugänglichkeit des Cysteins abhängig ist.

Die Labelingstöchiometrie wird wie folgt ausgerechnet:

$$\frac{c_{\text{label}}}{c_{\text{Probe}}} = \left(\frac{\Delta A(\lambda_{\text{label}})}{\varepsilon(\lambda_{\text{label}})} \right) \left(\frac{\varepsilon(\lambda_{\text{Probe}})}{A(\lambda_{\text{Probe}})} \right) \quad (3.5)$$

c_{label} und c_{Probe} sind die molaren Konzentrationen des gebundenen Labels und des Proteins. $\Delta A(\lambda_{\text{label}})$ ist der Extinktionsunterschied bei der Wellenlänge der maximalen Absorption des Labels λ_{label} vom Label und dem Protein. $\varepsilon(\lambda_{\text{label}})$ ist der dazugehörige Extinktionskoeffizient. $A(\lambda_{\text{Probe}})$ ist die Extinktion vom Protein bei der Wellenlänge λ_{label} mit dem dazugehörigen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda_{\text{Probe}})$.

Proteindynamik

Proteindynamiken können mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzdepolarisationsexperimente gewonnen werden. Dazu müssen die Eigenschaften des Fluoreszenzmarkers bekannt sein. So kann z.B. ein hydrophober Marker eine ganz andere Dynamik zeigen als ein hydrophiler. Ebenso spielt der *linker*, mit dem der Farbstoff kovalent über eine reaktive Gruppe (z.B. Maleimid) am Protein bindet, eine Rolle. Für Messungen der Anisotropie sollte dieser relativ kurz und rigide sein, damit der Farbstoff die Dynamik des Proteinsegmentes nachvollziehen kann.

Die Eigenschaften der in dieser Arbeit eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

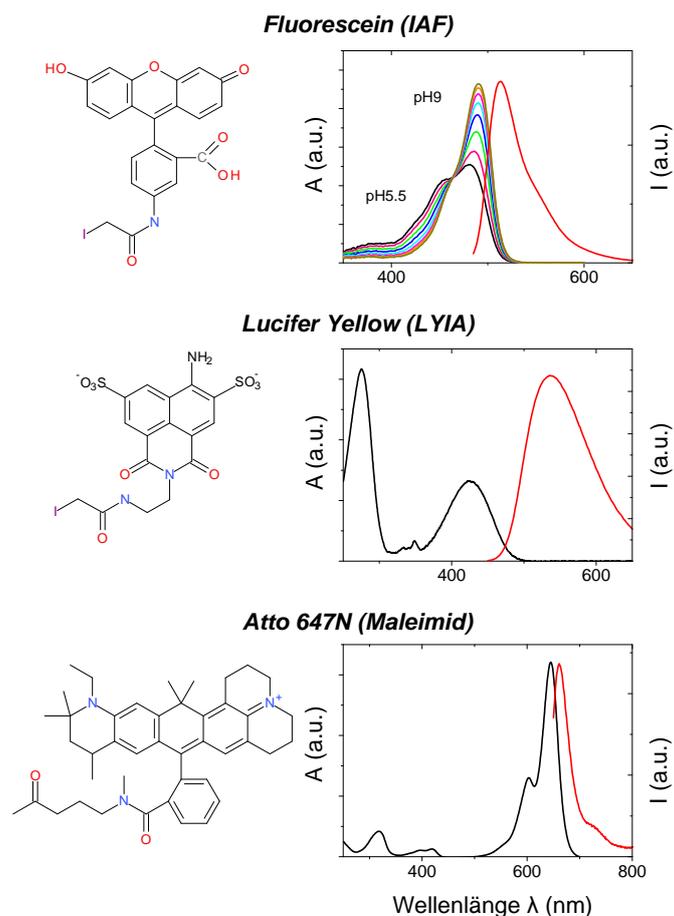


Abbildung 18: Übersicht der in dieser Arbeit eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe. Absorptions-, Emissionsspektren und Strukturformeln der in dieser Arbeit eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe 5-Iodoacetamidofluorescein (5-IAF), Lucifer Yellow Iodoacetamid (LY) und Atto647N (dargestellt ist das Atto647N-Carboxylat aus [Eggeling et al., 2009]). Die Absorptions- und Emissionsspektren sind in schwarz, bzw. rot dargestellt. Fluorescein besitzt eine pH-abhängige Absorption.

Farbstoff	<i>Absorptionseigenschaften</i>	<i>Fluoreszenzeigenschaften</i>		<i>chemische Eigenschaften</i>
	Extinktionskoeffizient ϵ $\lambda_{\text{Abs.max}}$	$\lambda_{\text{Em.max}}$	τ/ns	
Lucifer Yellow IA	$11000 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$ 430 nm	535 nm	ca. 6-9	Polar, negativ geladen
5-IAF	$77000 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$ 500 nm (pH 9.0)	514 nm	ca. 4	Absorption & Ladungszustand pH-abhängig,
Atto-647N Maleimid	$150000 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$ 644 nm	669 nm	3.4	Kationisch / nach Bindung einfach positiv geladen

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht der Eigenschaften der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe.

3.6 Präparation der biologischen Proben

3.6.1 Bakteriorhodopsinpräparation

Aus den halophilen Bakterien *Halobacterium salinarum* werden die Bakteriorhodopsinproteine gewonnen. Die für die Messungen verwendete Bakteriorhodopsinmutation bR-S35C sitzt an ersten flexiblen Schleifenelement auf der cytoplasmatischen Seite (AB Schleife) des Bakteriorhodopsins.

Die Präparation der Bakterien, die Expression der Mutanten und die Markierung der Proben mit den Fluoreszenzfarbstoff 5-(iodoacetamido)-fluorescein (IAF, Molecular Probes) wurde durchgeführt wie in [Alexiev et al., 1995, Krebs et al., 1993] beschrieben.

Die Labelingstöchiometrie der bR-Moleküle wurde bei den Fluoreszenzmessungen auf etwa 10% eingestellt, um Homoenergietransfer zu vermeiden. Die Proteine ordnen sich im hexagonalen Gitter mit einer Gitterkonstanten von $c = 62 \text{ \AA}$ an [Unwin und Henderson, 1975]. Der Försterradius eines Fluorescein-Fluorescein Paares liegt bei 44 \AA . Die Effizienz der Energieübertragung ist laut Förster:

$$E(r) = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \quad (3.6)$$

Wird angenommen, daß der Orientierungsfaktor wie in freien Lösungen $\kappa = \frac{2}{3}$ beträgt, dann liegt die Energieübertragung durch den Förstertransfer bei 11% für $c = 62 \text{ \AA}$. Tendenziell wird dieser Wert eher darunter liegen, daher werden die Werte als maximal mögliche Energieübertragungseffizienz angesehen. Innerhalb des Radius c befinden sich 12 bR-Proteine. Im Abstand von $1.5c$ (93 \AA) liegt der Energietransfer bei $< 1\%$ und es befinden sich 27 bR-Moleküle innerhalb des Radius. Die Labelingstöchiometrie ist für ein fluoreszenzmarkiertes Protein innerhalb des Radius c 8% und innerhalb von $1.5c$ 4%. Da die Werte für die Übertragungseffizienz als Oberwerte angesehen werden können, ist eine Labelingstöchiometrie von 10% akzeptabel (Abb. 19).

3.6.2 Rhodopsinpräparation

Das Rhodopsin wurde aus Retinae präpariert (J. A. Lawson Corp., USA), welche aus Rinderaugen extrahiert wurden. Diese Retinae wurden nach der Vorschrift aus McDowell und Kühn [1977] präpariert. Um die Diskmembranen aus den Außensegmenten¹³ aufzureinigen, wurden sie über einen Sukrose-Stufengradienten abzentrifugiert und anschließend mehrere Male gewaschen. Abschließend wurden sie über einen kontinuierlichen Sukrosegradienten weiter aufgereinigt. Die Proben wurden entweder analog zu den Protokollen sofort nach der Präparation verbraucht oder bei -80°C eingefroren.

Die Präparationen wurden von Ingrid Wallat, Maria Alachmad und Stefan Ott durchgeführt.

Das Labeling des Rhodopsins wurde an der Helix 8 - an der Position C316 - mit IAF und Atto647 (Atto-Tec GmbH) durchgeführt [Alexiev et al., 2003]. Um zu verifizieren, daß nur das Cystein an Position 316 gelabelt wurde, wurde mit Thermolysin das Rhodopsin proteolytisch gespalten und via Gelelektrophorese getrennt [Möller und Alexiev, 2009].

Da noch nicht abschließend geklärt ist, wie die Anordnung der Rhodopsinmoleküle in der Diskmembran ist, wurde für die Berechnung des möglichen Homoenergietransfers die dichtest-mögliche Packung angenommen: ein parakristallines Gitter aus Rhodopsindimeren [Fotiadis et al., 2003]. Der Abstand der Aminosäuren Cys316 eines solchen Dimeres wurde aus der Kristallstruktur (PDB: 1N3M) berechnet und liegt bei etwa 56 \AA [Liang et al., 2003]. Die Energieübertragungseffizienz liegt nach Gleichung 3.6 bei 19%. Innerhalb des Radius befinden sich sechs Cys316, welche

¹³ bovine rod outer segments

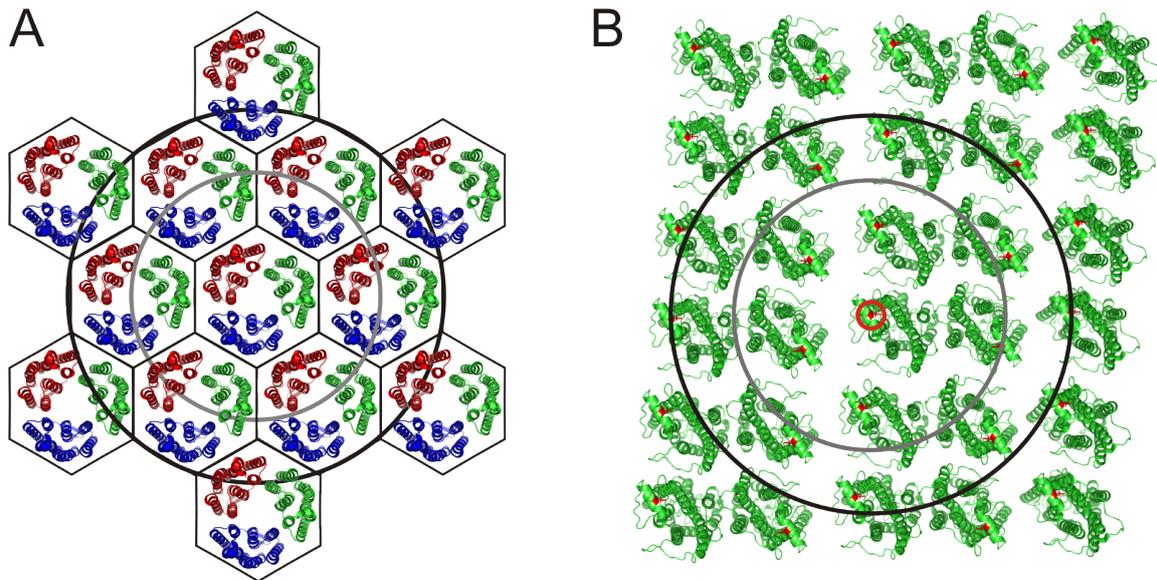


Abbildung 19: Darstellungen von bR und Rhodopsinanordnungen zur Abschätzung des möglichen Homoenergietransfers zwischen markierten Fluoreszenzmolekülen. **A:** Darstellung der Anordnung von bR in Purpurmembranen (PDB: 1C3W). Sie ordnen sich in Trimeren zu einem hexagonalen Gitter. Im Abstand einer Gitterkonstanten c (grau) vom Zentrum befinden sich 12 bR-Proteine, im Abstand von $1.5c$ (schwarz) 27 bR-Proteine. **B:** Darstellung einer möglichen parakristallinen Rhodopsinanordnung nach einem Modell von Filipek [2005] (PDB: 1N3M). Die Labelingposition Cys316 ist rot markiert. Innerhalb eines Radius von 56 \AA (grau) befinden sich sechs Cys316 und innerhalb eines Radius von 84 \AA (schwarz) 14 Cys316.

als Bindestellen für den Fluoreszenzmarker dienen können (Abb. 19 grau). Für den Radius von 84 \AA , welcher der Breite der Dimerreihen entspricht, liegt die Energieübertragungseffizienz bei 2% und es befinden sich 14 Rhodopsinmoleküle darin. Wenn innerhalb dieser Radien nur ein Molekül markiert werden soll, dann liegen die entsprechenden Stöchiometrien bei 17% bzw. 7%. Da diese Annahmen aufgrund eines Modells angestellt wurden, ist deren Aussagekraft beschränkt, würde aber auf den Extremfall größter Packungsdichte der Rhodopsinmoleküle gelten. Bei den Messungen wurde die Labelingstöchiometrie bei etwa 20% eingestellt.

Für Messungen von Rhodopsin in β -DM Mizellen muß das präparierte Rhodopsin in Diskmembranen über eine Sepharosesäule mit speziellen Antikörpern (1D4 [Molday und MacKenzie, 1983]) gereinigt werden. Diese binden das C-Terminale des Rhodopsins [MacKenzie et al., 1984] und werden anschließend mit dem gewünschten Puffer gewaschen. Um die Proteine von der Säule zu lösen, werden Peptide mit höherer Bindungsaffinität zum 1D4 hinzugegeben und das gereinigte solubilisierte Rhodopsin eluiert. Das genaue Protokoll ist in Möller und Alexiev [2009] beschrieben.

3.6.3 Opsinpräparation / Präparation von phosphoryliertem Rhodopsin

Die Phosphorylierung des präparierten Rhodopsin in Diskmembranen wurde nach dem Protokoll von Wilden und Kühn [1982] von Frau Dr. Kristina Kirchberg durchgeführt. Die Herstellung des Apoproteins Opsin wurde ebenfalls nach dem Protokoll von Wilden und Kühn [1982] ohne die Zugabe von ATP und MgCl_2 und ohne Regeneration mit 11-cis Retinal von Stefan Ott und Dr. Kristina Kirchberg durchgeführt.

3.6.4 Transducinpeptide

Die Varianten des hochaffinen Peptidanalogs (VLEDLKSCGLF [Martin et al., 1996]) des C-terminalen Endes der Transducin α -Untereinheit VLEDLKCVGLF für die Einzelmolekülexperimente und WVLEDLKCVGLF als Helixfaltungssensor für die 2D-Experimente wurde von der Firma Biosynthan synthetisiert.

Für die Einzelmolekülexperimente wurden die Peptide mit dem Farbstoff Atto-647N-maleimid (Atto-Tec, Deutschland) fluoreszenzmarkiert. Für die Helixexperimente wurden die Peptide mit Lucifer Yellow Iodoacetamid (Molecular Probes) an der Thiolgruppe des Cysteins fluoreszenzmarkiert.

3.6.5 Arrestinpräparation

Wildtyp Arrestin und die Arrestinmutanten wurden in Hefezellen (F11 α) exprimiert. Das lösliche Arrestin wurde mittels Affinitätschromatographie (N-terminaler Strep-tag II) über eine Säule gereinigt. Das komplette Präparationsprotokoll ist in Skegro et al. [2007] beschrieben. Das Arrestin wurde im Rahmen einer Kooperation mit AG Büldt vom FZ Jülich von Frau Dr. Ramona Schlesinger und Dr. Kristina Kirchberg präpariert und von Frau Dr. Kristina Kirchberg fluoreszenzmarkiert.

3.7 Auswertung der Experimente

3.7.1 Analyse zeitaufgelöster Fluoreszenzdaten

Das detektierte zeitaufgelöste Fluoreszenzsignal $S(t)$ ist mit der Gerätefunktion $L(t)$ gefaltet, welche für die Analyse des Fluoreszenzsignal $I(t)$ entfaltet werden muß. Im Idealfall ist diese δ -förmig. Im Experiment besitzt sie eine endliche Ausdehnung, $L(t)$ besitzt beim genutzten Aufbau im besten Fall eine Halbwertsbreite von ca. 35 ps. Der Laserpuls besitzt eine Länge von 1 – 2 ps, die Meßelektronik verbreitert das Signal zeitlich.

$$S(t) = \int L(t')I(t-t')dt' \quad (3.7)$$

Zum Signal $S(t)$ muß zusätzlich die Gerätefunktion $L(t)$ bestimmt werden, damit aus $I(t)$ die Lebensdauer τ_i bestimmt werden können. Die Fluoreszenzzerfälle werden folgendermaßen gefittet:

$$I(t) = \sum_{i=1}^N A_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (3.8)$$

A_i sind die absoluten Amplituden der einzelnen Lebensdauerkomponenten τ_i und proportional zum Anteil der jeweiligen Spezies. i ist die Anzahl der Zerfallskomponenten, die gefittet werden. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Daten werden die relativen Amplituden α_i berechnet (I_0 ist die Anfangsintensität):

$$I(t) = I_0 \cdot \sum_{i=1}^N \alpha_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (3.9)$$

Die mittlere relative Lebensdauer τ^* wird folgendermaßen berechnet:

$$\tau^* = \sum_i \alpha_i \cdot \tau_i \quad (3.10)$$

Aus den Amplituden α_i und den dazugehörigen Fluoreszenzlebensdauer τ_i können die fraktionalen Amplituden f_i berechnet werden:

$$f_i = \frac{\alpha_i \cdot \tau_i}{\sum \alpha_i \cdot \tau_i} \quad (3.11)$$

Die fraktionalen Amplituden f_i sind im Gegensatz zu den relativen Amplituden α_i proportional zur Fläche, welche die Fluoreszenzzerfallskurven überspannen. Ihre mittlere fraktionale Lebensdauer $\bar{\tau}$ wird folgendermaßen berechnet:

$$\bar{\tau} = \sum_i f_i \cdot \tau_i \quad (3.12)$$

Die Fluoreszenzkurven parallel $I_{||}(t)$ und senkrecht $I_{\perp}(t)$ werden zunächst aus den entsprechenden Signalen $S_{||}(t)$ und $S_{\perp}(t)$ entfaltet. Daraus wird die zeitabhängige Anisotropie $r(t)$ berechnet:

$$r(t) = \frac{I_{||}(t) - G \cdot I_{\perp}(t)}{I_{||}(t) + G \cdot 2 \cdot I_{\perp}(t)} \quad (3.13)$$

Mit dem G-Faktor korrigiert man polarisationsabhängige Intensitätsunterschiede des eingesetzten Detektors. Der zeitliche Zerfall der Anisotropie ist ebenso wie die Fluoreszenzlebensdauer (Formel 3.9) exponentiell und wird folgendermaßen berechnet:

$$r(t) = r_0 \cdot \sum_{i=0}^N \beta_i \cdot e^{-t/\phi_i} \quad (3.14)$$

Hierbei sind i die Anzahl der Anisotropiezerfallskomponenten, β_i die dazugehörige relative Amplitude und ϕ_i die dazugehörige Rotationskorrelationszeit. Wenn die Anisotropie aufgrund sterischer Einschränkung des Fluoreszenzmarkers im Beobachtungszeitfenster nicht gegen Null geht, wird für die Berechnung von r_{∞} eine unendlich große Rotationskorrelationszeit ϕ_{∞} gewählt. Die dazugehörige Amplitude β_{∞} ist proportional zu r_{∞} .

χ^2 -Analyse

Die in dieser Arbeit gemessenen Fluoreszenz- und Anisotropiezerfälle werden mit der Software Global Unlimited V2.2 (Laboratory for Fluorescence Dynamics, University of California, Irvine) entfaltet und analysiert. Dieses fittet die Meßdaten mit einer Funktion an, dessen Parameter mit der Levenberg-Marquardt-Methode gefunden werden. Die Güte des Fits wird durch das χ^2 ermittelt:

$$\chi^2 = \sum_{i=0}^{N-1} (y_i - y(x_i | a_0 \dots a_{M-1}))^2 \quad (3.15)$$

N ist die Nummer der Datenpunkte, M die Anzahl der Parameter, y_i ein gemessener Datenpunkt, $y(x_i)$ der dazugehörige Fitpunkt und a_i ein Parameter.

Normalerweise wird nur das reduzierte χ^2 angegeben, welches noch die Anzahl der Datenpunkte und die Anzahl der variablen Parameter in Betracht zieht:

$$\chi_{\text{red}}^2 = \frac{\chi^2}{N - M - 1}$$

Auswerteprozedur

Nach der Messung der polarisierten zeitaufgelösten Fluoreszenzzerfälle werden die Daten mit dem Programm Globals analysiert. Aus der Analyse erhält man die Zerfallszeiten der Fluoreszenz und die der zeitaufgelösten Anisotropie. Die Güte der Fits wird über das χ^2 und die Residuen bestimmt (Abb. 22 links).

Die Fluoreszenzzerfälle lassen sich mit einer Summe von Exponentialfunktionen unterschiedlicher Amplitude fitten. Fluorescein frei in Lösung läßt sich mit einem einzelnen Zerfall fitten. Wenn es gebunden am Protein ist, wird der Fluoreszenzzerfall aufgrund von dynamischer Fluoreszenzlösung mit der Proteinumgebung multiexponentiell.

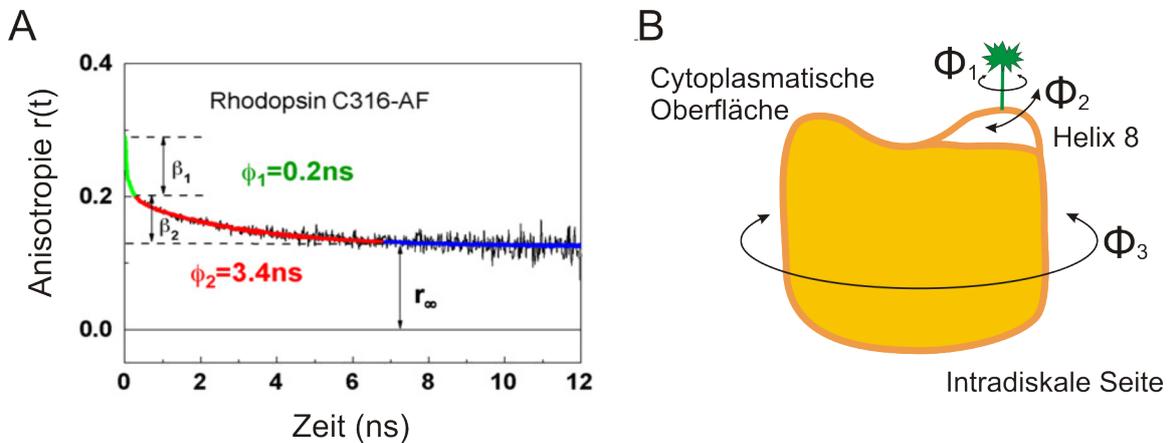


Abbildung 20: **A:** Zuordnung der drei Anisotropiezerfallskomponenten (Gleichung 3.13) für an C316 fluoreszenzmarkiertes Rhodopsin [Alexiev et al., 2003]. ϕ_1 und ϕ_2 entsprechen der Dynamik des Farbstoffes, bzw. der Helix 8. Ihre Amplituden werden mit β_1 und β_2 gekennzeichnet. r_∞ bzw. β_3 entspricht der sterischen Einschränkung des Farbstoffes durch die Proteinoberfläche. **B:** Zuordnung der einzelnen Rotationskorrelationszeiten ϕ_i aus zeitaufgelösten Anisotropiemessungen von fluoreszenzmarkiertem Rhodopsin (Schematisch in gelb dargestellt). Der Fluoreszenzmarker (grün) ist kovalent am Cys316 in der Helix 8 gebunden.

Die Anisotropien lassen sich mit drei Komponenten mit Gleichung 3.13 fitten. Diese drei Rotationskorrelationszeiten lassen sich verschiedenen Hauptkomponenten, die zur Depolarisation führen können, zuordnen (Abb. 20A, B) [Alexiev et al., 2003, Schröder et al., 2005]:

1. Die schnelle Zerfallskomponente der Anisotropie mit der Rotationskorrelationszeit $\phi_1 \approx 0.2$ ns entspricht der Bewegung des Farbstoffes.
2. Die mittlere Zerfallskomponente der Anisotropie mit der Rotationskorrelationszeit ϕ_2 im einstelligen Nanosekundenbereich entspricht der Bewegung des flexiblen Proteinsegments, an dem der Farbstoff gebunden ist.
3. Die langsamste Zerfallszeit ϕ_3 entspricht der Rotationskorrelationszeit des Gesamtmoleküls. Bei Rhodopsin in Mizellen beträgt sie etwa 50 ns. Bei Rhodopsin in Membranen ist ϕ_3 um mehrere Größenordnungen (ms-Zeitbereich für Rotationsdiffusion eines Membranfragmentes) größer als die Fluoreszenzlebensdauer der eingesetzten Fluorophore (1 – 6 ns) und wird bei der Analyse durch eine hinreichend große Rotationskorrelationszeit ersetzt, welche im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer unendlich groß ist. Dadurch erhält man eine quasi zeitunabhängige Endanisotropie r_∞ , die die sterische Einschränkung der Bewegung des flexiblen Proteinsegments und der Rotationsdiffusion des Farbstoffes um seine eigene Achse beschreibt.

Beim Fitten der Anisotropie $r(t)$ dieser Messungen wurden die beiden schnellen Komponenten ϕ_1 und ϕ_2 immer variabel gehalten. Die Komponente für die Rotation des gesamten Moleküls ϕ_3 ist abhängig davon, ob die Proteine in Membranen eingebettet oder als Monomere in Mizellen solubilisiert sind. Rhodopsin-Mizellen haben eine Größe, welche mit 50-100 ns Rotationskorrelationszeit mit der Fluoreszenzlebensdauer der Marker gerade noch gefittet werden kann. Die Rotationskorrelationszeit der Proteine in den Membranfragmenten liegt im ms-Zeitbereich und damit um viele Größenordnungen außerhalb der Fluoreszenzlebensdauer der Fluoreszenzfarbstoffe. Daher wird in diesem Fall $\phi_3 = \infty$ gesetzt. Der Wert für r_∞ , welcher den Anisotropiewert am Ende der Messkala darstellt ist auch ein Maß für die sterische Einschränkung des Fluoreszenzlabels an der Proteinoberfläche, welcher mit steigenden Werten ebenso steigt.

Um die Güte der einzelnen Parameter zu bestimmen, wird eine eindimensionale erweiterte Fehleranalyse (*exhaustive error analysis*) durchgeführt, bei der der untersuchte Parameter um sein Optimum variiert wird. Dieser wird dann festgesetzt. Mit den restlichen Parametern wird dann eine χ^2 -Minimierung durchgeführt und die χ^2 Werte als Funktion des Parameters aufgetragen (Abb. 22 rechts). Die Konfidenzintervallgrenzen werden als Schnittpunkte mit dem entsprechenden Konfidenzintervallniveau festgelegt.

Analyse der Konfidenzintervalle (Exhaustive Error Analysis)

Um die Güte der durch das χ^2 -fitten erzeugten einzelnen Parameter zu erhalten, wird eine Analyse der Konfidenzintervalle durchgeführt. Dies wird im folgenden für jeweils einen Parameter durchgeführt [Press et al., 2007].

Zunächst wird die Meßkurve mit dem Fitmodell angepasst und das χ^2 minimiert. Anschließend wird in einem Intervall um den Idealwert des zu analysierenden Parameters α_i eine Anzahl von Werten genommen, welche in der in der folgenden χ^2 Analyse konstant gehalten werden. Die Analysesoftware setzt dazu standardmäßig ein Intervall von $\pm 20\%$ des Idealwerts des Parameters und zehn äquidistante Werte ein. Die χ^2 Werte werden dann über α_i aufgetragen.

Um eine Vergleichbarkeit der Konfidenzintervalle von verschiedenen Datensätzen zu gewährleisten, müssen die jeweiligen minimalen χ^2_{\min} -Werte und die Anzahl der Datenpunkte im Datensatz berücksichtigt werden. Es werden dabei die Intervallgrenzen gesetzt, in welcher der Parameter α_i mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit p vorkommt. Aus historischen Gründen werden

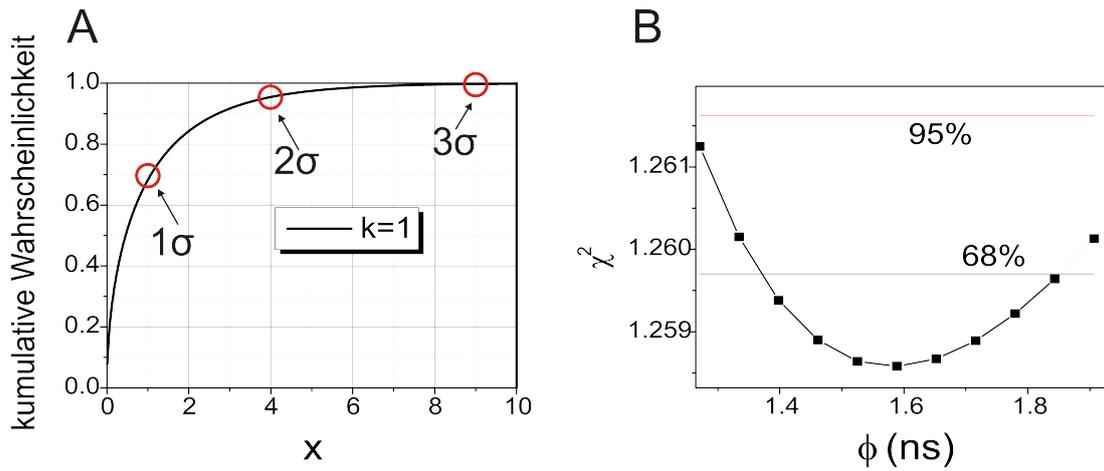


Abbildung 21: Erweiterte Fehleranalyse der χ^2 -Fits. **A:** Die Kumulative χ^2 -Verteilungsfunktion $F(x, k)$ mit einem Freiheitsgrad ($k = 1$). σ entspricht der Standardabweichung, die Konfidenzlevel können für die individuellen Experimente nach Formel 3.16 berechnet werden. **B:** Beispiel einer Konfidenzintervallanalyse mit den Konfidenzleveln σ und 2σ .

wie in der Gausschen Normalverteilung die Wahrscheinlichkeiten der Standardabweichungen σ ($p = 68.27\%$ (1σ), $p = 95.45\%$ (2σ) und $p = 99.73\%$ (3σ)) angewendet. Aus der kumulativen χ^2 -Verteilungsfunktion ($F(x, k) = P(\frac{k}{2}, \frac{x}{2})$, P ist die regularisierte unvollständige Gammafunktion) mit einem Freiheitsgrad ($k = 1$) kann für die entsprechenden Wahrscheinlichkeiten der entsprechende $\Delta\chi^2(p)$ Wert ermittelt werden (Abb. 21A). Sie sind (mit $\Delta\chi^2 = x$) wie folgt: $\Delta\chi^2(\sigma) = 1.00$, $\Delta\chi^2(2\sigma) = 4.00$, $\Delta\chi^2(3\sigma) = 9.00$. Die entsprechenden Konfidenzlevel werden wie folgt berechnet:

$$\chi^2_{\text{Konfidenzlevel}}(p, x) = \chi^2_{\text{min}} + \frac{\Delta\chi^2(p, x)}{N} \quad (3.16)$$

Der Schnittpunkt des Konfidenzlevels mit der χ^2 Kurve bestimmt die Intervallgrenze.

Erweiterte Fehleranalyse (exhaustive error analysis)

Übersicht über eine Einzelauswertung Fluoreszenzlebensdauer

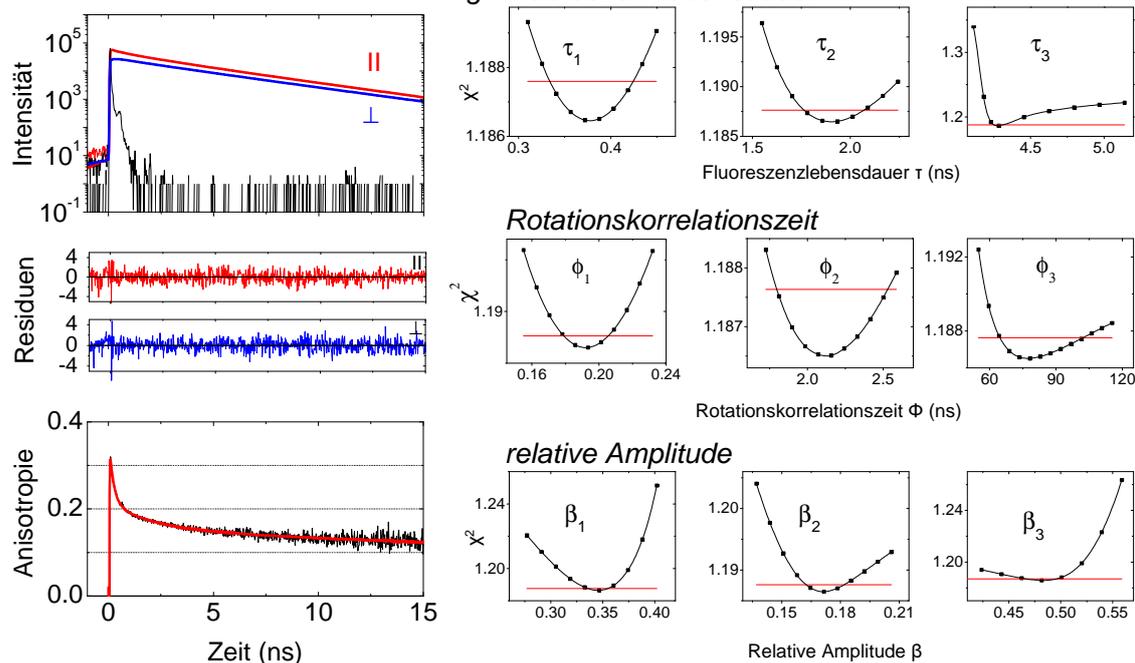


Abbildung 22: Beispiel einer Auswertung von Anisotropiedaten. Links eine Zusammenstellung einer Auswertung einer einzelnen Anisotropiemessung. Im oberen Graphen ist in schwarz die IRF und die Fits der Fluoreszenzintensität Parallel (rot) und Senkrecht (blau) als Funktion der Zeit zu sehen. In der Mitte sind die jeweiligen Residuen aufgetragen. Im unteren Graphen ist die resultierende Anisotropie mit Fit (rot) aufgetragen. Rechts: Erweiterte Fehleranalyse der Auswertung. Aus dieser erhält man die jeweiligen Konfidenzintervalle für die einzelnen Parameter. Die rote Linie zeigt das Konfidenzniveau von 1σ (64.8%).

cone in a cone - Analyse

Das *cone in a cone* Modell [Schröder et al., 2005] ist eine Erweiterung des *wobbling in a cone* Modell [Kinosita et al., 1977], bei welcher man annimmt, daß ein Übergangsdipolmoment, welches mit einem Ende an einer Kegelspitze befestigt ist, sich frei in diesem bewegen kann. Aus diesem Modell kann der Kegelöffnungswinkel bestimmt werden. Im *cone in a cone* Modell wird angenommen, daß sich der eine Kegel seinerseits in einem weiteren Kegel mit bestimmten Kegelöffnungswinkel bewegt. Diese Erweiterung ist nötig, um neben dem Konformationsraum des Fluoreszenzmarkers auch den des flexiblen Segments in Betracht zu ziehen. Wenn beide Bewegungen entkoppelt voneinander sind, kann die Anisotropie folgendermaßen gefittet werden:

$$r(t) = r_0[(1 - B_1)e^{-t/\phi_1} + B_1][(1 - B_2)e^{-t/\phi_2} + B_2]e^{-t/\phi_G} \quad (3.17)$$

r_0 ist die Anfangsanisotropie, ϕ_i die einzelnen Rotationskorrelationszeiten, wobei ϕ_G die Rotationskorrelationszeit des gesamten Proteins ist, B_i ist das Maß der Einschränkung der Bewegung. B_i ist mit dem Halbkegelöffnungswinkel θ_i folgendermaßen verknüpft:

$$B_i = \left[\frac{1}{2}(1 + \cos(\theta_i))\cos(\theta_i) \right]^2 \quad (3.18)$$

Für θ_i erhält man als eine Lösung:

$$\theta_i = \arccos\left[\frac{1}{2}(-1 + \sqrt{1 + 8\sqrt{B_i}})\right] \quad (3.19)$$

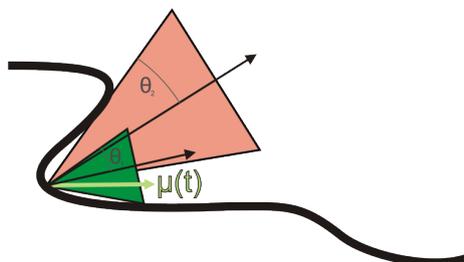


Abbildung 23: Darstellung des *cone in a cone* Modells. $\mu(t)$ ist das Übergangsdipolmoment des Farbstoffes, θ_1 und θ_2 sind die Halbkugelöffnungswinkel des Farbstoffes, bzw. des flexiblen Elements.

Analyse der Ordnungsparameter

Ordnungsparameter sind meßbare physikalische Größen, welche den Zustand des Gesamtsystems beschreiben. In der Regel quantifizieren sie den Grad der Orientierung eines Ensembles in Abhängigkeit eines Phasenübergangs. Während man aus der phänomenologischen Analyse der Anisotropie $r(t) = r_0 \sum_i \alpha_i \cdot e^{t/\phi_i}$ die Rotationskorrelationszeiten erhält, kann man aus der *cone-in-a-cone* Analyse die Öffnungswinkel der sterisch eingeschränkten Bewegung von Fluorophor und Proteinsegment erhalten. Bei der *cone-in-a-cone* Analyse wird angenommen, daß die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des fluoreszierenden Sensors innerhalb des Bewegungskegels gleich ist. Dagegen kann aus der Analyse der Ordnungsparameter die Aufenthaltswahrscheinlichkeitsfunktion $f(\Theta)$ des fluoreszierenden Sensors extrahiert werden.

Es ist möglich, aus Fluoreszenzanisotropiedaten die Ordnungsparameter 2. und 4. Ordnung, $\langle P_2 \rangle$ und $\langle P_4 \rangle$, zu extrahieren. Die Ordnungsparameter sind Teil von Gleichgewichtsverteilungsfunktionen $f(\Theta)$, aus denen das dahinterliegende mathematisch-physikalische Bewegungsmodell ermittelt werden kann.

Für die Auswertung der zeitaufgelösten Anisotropiedaten wird angenommen, daß der fluoreszierende Sensor ein zylindrisches Objekt ist. Es ist Voraussetzung, daß die Zerfallskurven eine Endanisotropie r_∞ besitzen für die gilt: $r_\infty \neq 0$. Dies bedeutet im Experiment, daß Rotationskorrelationszeit ϕ_3 im Vergleich zur Fluoreszenzzerfallszeit des Fluorophors sehr viel größer sein muß. Für die Anisotropiedaten in Membranen ist dies der Fall, für Rhodopsin-AF in Mizellen gilt dagegen $\phi_3 \approx 100$ ns. Diese Anisotropiekurven wurden daher mit $\phi_3 = 1$ s simuliert, um eine für den Fit geeignete Kurve zu erhalten.

Der Ordnungsparameter $\langle P_2 \rangle$ ist mit der relativen Amplitude β_3 (sterische Einschränkung) von ϕ_3 folgendermaßen verknüpft: $\beta_3 = \langle P_2 \rangle^2$ [Heyn, 1979].

Die Ordnungsparameter $\langle P_2 \rangle$ und $\langle P_4 \rangle$

Die Analyse der zeitaufgelösten Anisotropiedaten (mit drei Zerfallskomponenten) mittels Ordnungsparameter $\langle P_2 \rangle$ und $\langle P_4 \rangle$ nach van der Meer et al. [1984] ist eine modellunabhängige Analyse. Im Gegensatz zur *cone in a cone* Analyse wird keine Annahme über das Verhalten des

zylinderförmigen Fluoreszenzsensor gemacht. Dieser Fluoreszenzsensor ist im Falle dieser Arbeit ein System bestehend aus Fluorophor und der Helix 8 von Rhodopsin und besitzt zwei Diffusionsmodi, welche zum einen die Wackelbewegung (D_{\perp}) und die Rotationsdiffusion (D_{\parallel}) um die Symmetrieachse beschreiben. Dies kann auch bei Rhodopsin als Näherung genutzt werden, da die Bewegungen von Fluorophor und Helix 8 gekoppelt sind.

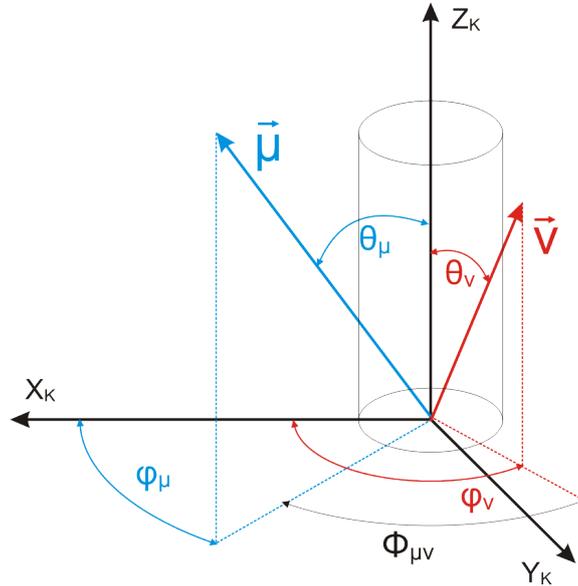


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Dipolmomente der Absorption $\vec{\mu}$ (blau) und der Emission $\vec{\nu}$ (rot) im Koordinatensystem des Sensors.

Der Sensor ist ein in einem orthogonalem Koordinatensystem (X_K, Y_K, Z_K) fixiertes zylindrisches Molekül (körperfestes Koordinatensystem), dessen eines Ende im Ursprung verankert ist und dessen Symmetrieachse mit Z_K übereinstimmt. Die Übergangsdipolmomente der Absorption $\vec{\mu}$ und der Emission $\vec{\nu}$ sind absolut in diesem Koordinatensystem. Das Laborsystem (X_L, Y_L, Z_L) ist durch die Achse Z_L bestimmt, welche entlang der Membrannormalen zeigt. Die Transformation zwischen beiden Systemen geschieht durch die Eulerschen Winkel Φ, Θ und Ψ . Dabei ist Θ der polare Winkel zwischen Z_K - und Z_L -Achse. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Fluorophors wird durch die Verteilungsfunktion $f(\Phi, \Theta, \Psi)$ bestimmt. Durch die Annahme, daß die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Sensors axialsymmetrisch um Z_L ist, bleibt nur Θ erhalten.

Die zeitaufgelöste Anisotropie $r(t)$ eines Ensembles von Fluorophoren kann nach Lipari und Szabo [1980] mit dem Legendrepolynom 2. Ordnung folgendermaßen dargestellt werden:

$$r(t) = \frac{2}{5} \langle P_2(\mu(0) \cdot \nu(t)) \rangle \quad (3.20)$$

$\mu(0)$ ist der Vektor der Absorption zum Anregungszeitpunkt und $\nu(t)$ der Vektor der Emission zur Zeit t mit der Länge des Einheitsvektors. Die Abhängigkeit der Winkel von der Anisotropie stellt sich laut Zannoni [1981] folgendermaßen dar:

$$r(t) = \frac{2}{5} P_2(\cos\Theta_{\mu}) \cdot P_2(\cos\Theta_{\nu}) \cdot G_0(t) + \quad (3.21)$$

$$\frac{3}{10} \sin 2\Theta_{\mu} \cdot \sin 2\Theta_{\nu} \cdot \cos \Phi_{\mu\nu} \cdot G_1(t) + \quad (3.22)$$

$$\frac{3}{10} \sin^2 \Theta_{\mu} \cdot \sin^2 \Theta_{\nu} \cdot \cos 2\Phi_{\mu\nu} \cdot G_2(t) \quad (3.23)$$

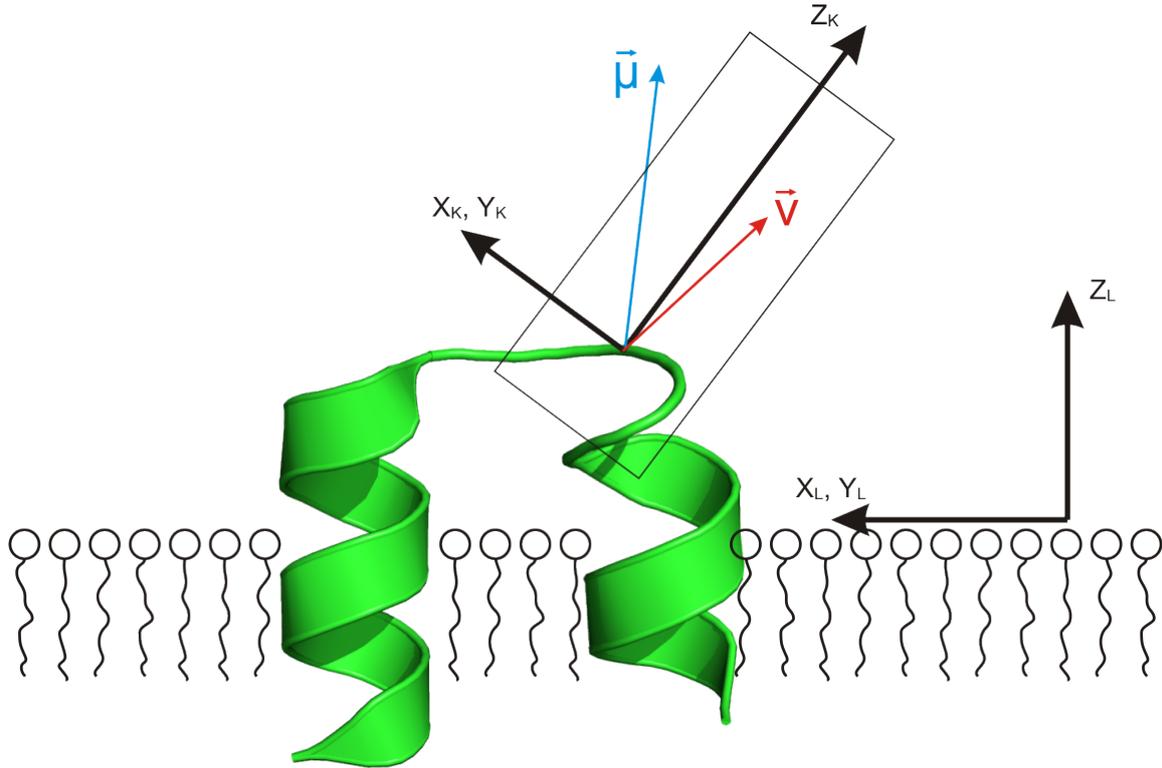


Abbildung 25: Schematische Darstellung des fluoreszierenden Sensors und den dazugehörigen Koordinatensystemen für die Analyse der $\langle P_2 \rangle$, $\langle P_4 \rangle$ Parameter nach van der Meer et al. [1984]. Der Übersicht halber liegen die X- und Y-Achsen in einer Ebene. Der Sensor besteht aus Fluorophor und dem beweglichen Schleifensegment. Die Übergangsdipolmomente der Absorption $\vec{\mu}$ und der Emission $\vec{\nu}$ sind fest im körperfesten Koordinatensystem. Im Laborsystem ist Z_L parallel zur Membrannormalen.

mit $\Phi_{\mu\nu} = \varphi_{\mu} - \varphi_{\nu}$ (Abb. 24). Θ_{μ} ist der Eulerwinkel für das Absorptionsdipolmoment und Θ_{ν} ist der Eulerwinkel für das Emissionsdipolmoment. G_n sind Korrelationsfunktionen, welche für die drei exponentiellen Anisotropiezerfälle durch Anwendung der Wignerschen Rotationsmatrizen als Summe von drei Korrelationsfunktionen geschrieben werden können [Zannoni, 1981, Zannoni et al., 1983]:

$$G_n(t) = G_{0n}(t) + 2G_{1n}(t) + 2G_{2n}(t) \quad (3.24)$$

mit

$$G_{mn}(t) = \langle\langle D_{mn}^2(\Phi(0), \Theta(0), \Psi(0))^* D_{mn}^2(\Phi(t), \Theta(t), \Psi(t))^* \rangle\rangle \quad (3.25)$$

Die Eulerwinkel beschreiben die Rotation des Laborsystems zum Zeitpunkt Null in das körperfeste System zum Zeitpunkt t .

Wird für alle n und m das Kurzzeitverhalten $G_{mn}(t) = G_{mn}(0) + t \cdot \dot{G}_{mn}(0)$ durch das Langzeitverhalten $G_{mn}(t) = \langle P_2 \rangle^2 \delta_{m0} \delta_{n0}$ ersetzt, so erhält man [van der Meer et al., 1984]:

$$r(t) = \frac{2}{5} P_2(\cos\Theta_\mu) P_2(\cos\Theta_\nu) [\langle P_2 \rangle^2 + \beta_{00} e^{-\alpha_{00}t} + 2 \sum_{m=1}^2 \beta_{m0} e^{-\alpha_{m0}t}] + \quad (3.26)$$

$$\frac{3}{10} \sin 2\Theta_\mu \sin 2\Theta_\nu \cos \Phi_{\mu\nu} [\beta_{01} e^{-\alpha_{01}t} + 2 \sum_{m=1}^2 \beta_{m1} e^{-\alpha_{m1}t}] + \quad (3.27)$$

$$\frac{3}{10} \sin^2 \Theta_\mu \sin^2 \Theta_\nu \cos 2\Phi_{\mu\nu} [\beta_{02} e^{-\alpha_{02}t} + 2 \sum_{m=1}^2 \beta_{m2} e^{-\alpha_{m2}t}] \quad (3.28)$$

Der Fit der zeitaufgelösten Anisotropien wurde mittels globaler numerischer Minimierungsalgorithmen (*Wolfram Mathematica*) durchgeführt. In dieser Arbeit werden speziell die Ordnungsparameter $\langle P_2 \rangle$ und $\langle P_4 \rangle$ betrachtet.

Die Verteilungsfunktion $f(\Theta)$:

$f(\Theta)$ kann als Reihe von Legendre Polynomen P_l dargestellt werden, wobei aufgrund der Symmetrie entlang der Membranoberfläche nur die Terme mit geraden Koeffizienten eine Rolle spielen.

$$f(\Theta) = \sum_{l \text{ gerade}} \frac{1}{2} (2l+1) \langle P_l \rangle P_l(\cos\Theta) \quad (3.29)$$

$\langle P_l \rangle$ sind dabei die Ordnungsparameter, welche folgendermaßen ausgerechnet werden können:

$$\langle P_l \rangle = \int_0^\pi \sin\Theta \cdot P_l(\cos\Theta) \cdot f(\Theta) d\Theta \quad (3.30)$$

Aus den experimentellen zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropiedaten kann neben $\langle P_2 \rangle$ noch der Ordnungsparameter vierter Ordnung $\langle P_4 \rangle$ ermittelt werden. Unter der Annahme der Maximum-Entropie-Methode erhält man

$$\int_0^\pi \sin\Theta \cdot P_2(\cos\Theta) \cdot f(\Theta) d\Theta = \langle P_2 \rangle \quad (3.31)$$

$$\int_0^\pi \sin\Theta \cdot P_4(\cos\Theta) \cdot f(\Theta) d\Theta = \langle P_4 \rangle \quad (3.32)$$

und der Lösung mittels Lagrangemultiplikatoren:

$$\int_0^\pi \sin\Theta \cdot (\ln(f(\Theta) - \lambda_2 P_2(\cos\Theta) - \lambda_4 P_4(\cos\Theta)) \cdot \delta f(\Theta) d\Theta = 0 \quad (3.33)$$

Daraus erhält man die Gleichgewichtsverteilungsfunktion $f(\Theta)$:

$$f(\Theta) = N^{-1} \cdot \exp[\lambda_2 P_2(\cos\Theta) + \lambda_4 P_4(\cos\Theta)] \quad (3.34)$$

N^{-1} ist hierbei der Normierungsterm und λ_i die Lagrange-Multiplikatoren, P_2 und P_4 sind die Legendrepolynome zweiter und vierter Ordnung.

Über den Ordnungsparameter $\langle P_4 \rangle$ in Abhängigkeit von $\langle P_2 \rangle$ kann die Aufenthaltswahrscheinlichkeitsfunktion $f(\Theta)$ des gebundenen fluoreszierenden Sensors ermittelt werden. Die theoretischen Unter- und Obergrenzen für $\langle P_4 \rangle$ in Abhängigkeit von $\langle P_2 \rangle$ sind die folgenden (Abb. 26):

$$\langle P_4 \rangle_{\min} = \frac{1}{18}(35 \langle P_2 \rangle^2 - 10 \langle P_2 \rangle - 7) \quad (3.35)$$

$$\langle P_4 \rangle_{\max} = \frac{1}{12}(5 \langle P_2 \rangle + 7) \quad (3.36)$$

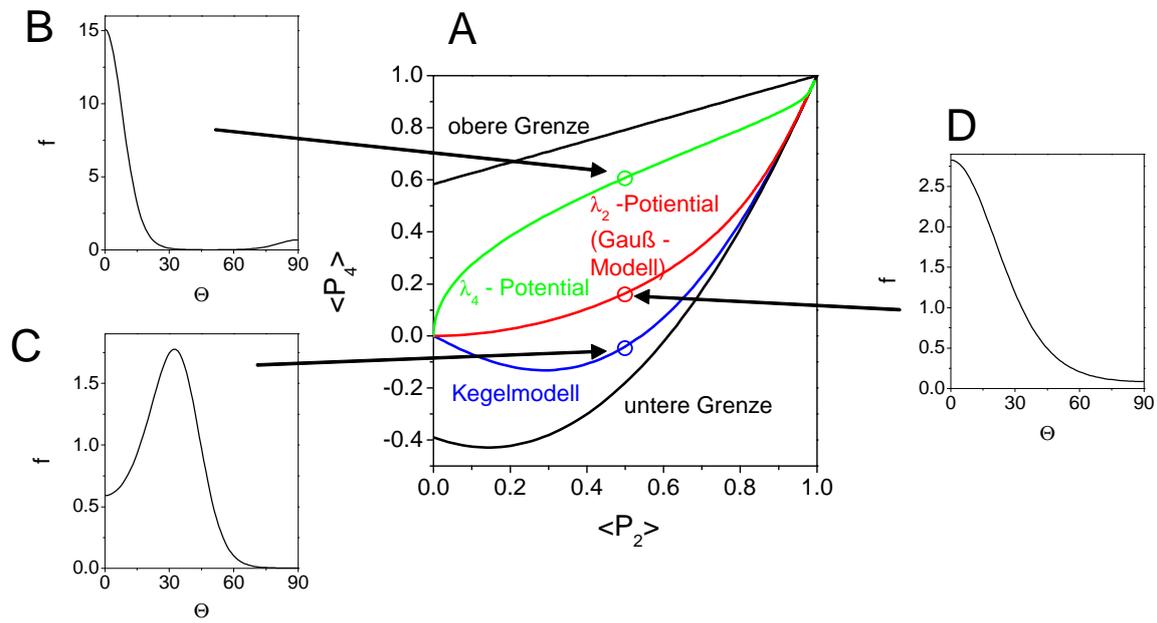


Abbildung 26: Darstellung verschiedener Modelle und ausgewählte Verteilungsfunktionen $f(\Theta)$. **A:** $\langle P_2 \rangle$, $\langle P_4 \rangle$ -Paare für das Kegel-, Gauß- Modell und das λ_4 -Potential. Die Grenzen geben die möglichen Wertebereich für die $\langle P_2 \rangle$, $\langle P_4 \rangle$ -Paare vor. **B:** $f(\Theta)$ bei $\langle P_2 \rangle = 0.5$ für das λ_4 -Potential. **C:** $f(\Theta)$ bei $\langle P_2 \rangle = 0.5$ für das Kegelmodell. **D:** $f(\Theta)$ bei $\langle P_2 \rangle = 0.5$ für das Gaußmodell.

Je nach Form der Verteilungsfunktion $f(\Theta)$ besitzt diese bestimmte lokale Maxima, welche bei $\Theta = 0^\circ$, $\Theta = 90^\circ$ oder bei $\cos^2 \Theta = -\lambda/2\beta$ liegen (Abb. 26B, C, D), wobei gilt $\lambda = \frac{3}{2}\lambda_2 - \frac{30}{8}\lambda_4$ und $\beta = \frac{35}{8}\lambda_4$. Es gilt:

$$\Theta_{\max} = 0^\circ \text{ für } \lambda > -2\beta \quad (3.37)$$

$$\Theta_{\max} = 90^\circ \text{ für } \lambda < 0 \quad (3.38)$$

$$\Theta_{\max} = \arccos \sqrt{(-\lambda/2\beta)} \quad (3.39)$$

Gelten 3.37 und 3.38, so existieren auch beide Maxima bei 0° und 90° (Abb. 26B). Die Form der unterschiedlichen Verteilungsfunktionen werden detailliert in [Pottel et al., 1986] beschrieben.

Die $\langle P_2 \rangle$, $\langle P_4 \rangle$ - Kurve des *Kegelmodells* wird mit den folgenden Beziehungen dargestellt (Abb. 26 blau):

$$\langle P_2 \rangle = \frac{1}{2} \cos \Theta_c (1 + \cos \Theta_c) \quad (3.40)$$

$$\langle P_4 \rangle = \frac{1}{8} \cos \Theta_c (1 + \cos \Theta_c) (7 \cos^2 \Theta_c - 3) \quad (3.41)$$

Das Maximum der Gleichgewichtsverteilungsfunktion wird nach Gleichung 3.39 berechnet, dieser Winkel ist etwas kleiner als der Kegelwinkel Θ_c . Für den Sensor bedeutet dies, daß dieser vorzugsweise eine Dreh-Bewegung innerhalb des Kegelwinkels ausübt.

Für das *Gaussmodell* (oder Maier-Saupe Modell) wird in der Gleichgewichtsverteilungsfunktion (Formel 3.34) $\lambda_4 = 0$ gesetzt, welche dann in Gleichung 3.31 und 3.32 eingesetzt wird (Abb. 26 rot). Das Maximum der Gleichgewichtsverteilungsfunktion ist bei 0° (Gleichung 3.37).

Beim λ_4 -*Potential* gilt für die Gleichgewichtsverteilungsfunktion (Formel 3.34) $\lambda_2 = 0$ (Abb. 26 grün). Es existieren für $f(\Theta)$ zwei Maxima bei 0° und 90° (Abb. 26B).

3.7.2 Analyse der Einzelmolekülexperimente

Die aufgenommenen Bildsequenzen wurden mit Hilfe eines *Matlab*-Programms (PhD Hiroshi Ujii, KU Leuven, Belgien) für die Analyse aufbereitet. Das Programm entauscht die einzelnen Bilder und findet die fluoreszierenden Moleküle in diesen. Die genauen Koordinaten der Moleküle werden mit 2D-Gaußfits mit Subpixelgenauigkeit gefittet. Positiv- und Negativfalsche Findungen können per Hand korrigiert werden. Anschließend werden die Einzelpunkte zu Zeittrajektorien zusammengefasst.

Die Analyse der Trajektorien wurde mit Hilfe einer im Rahmen dieser Arbeit selbstgeschriebenen Matlab Routine und in Origin 8 (OriginLab Corporation) durchgeführt. Die Analyse von einzelnen Trajektorien werden mittels des MSD¹⁴ $\langle r^2 \rangle$ als eine Funktion der Zeit analysiert. Die Zeitintervalle zwischen zwei Bildern in einer Zeitserie ist Δt . Für die Auswertung des MSD wurden auch Zeitserien analysiert mit verschiedenen $t_{lag} = n\Delta t$, mit $n \in \mathbb{N}$, um eine Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten mit steigenden t_{lag} zu ermitteln. Die MSD einer Trajektorie wird als "average over all pairs" wie folgt berechnet. [Saxton, 1997]

$$\langle r^2(t_{lag}) \rangle = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} \left[(x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2 \right] \quad (3.42)$$

N ist die Anzahl aller Bilder der Trajektorie. Für jedes n läuft die Funktion über alle möglichen Zeitintervalle der Länge $n\Delta t$. Für normale Diffusion in zwei Dimensionen ist der Diffusionskoeffizient D wie folgt gegeben

$$\langle r^2(t_{lag}) \rangle = 4D \cdot t_{lag} \quad (3.43)$$

Die Diffusionsgleichung (2. Ficksches Gesetz) für konstante Diffusionskoeffizienten D lautet:

$$\frac{dc}{dt} = D \frac{d^2c}{dr^2} \quad (3.44)$$

14 mittleres Verschiebungsquadrat - mean square displacement

Um eine zweidimensionale Diffusion zu beschreiben, benutzt man eine Wahrscheinlichkeitsfunktion $p(r, t_{lag}) = \frac{c(r)dr}{N_0}$ mit N_0 (Anzahl der Partikel) [Chandrasekhar, 1943], welche eine Lösung der Differenzialgleichung 3.44 ist. Mit dieser berechnet man die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Partikel von einem Ursprung ausgehend in einen Kreisring der Breite dr und dem Radius - der Schrittweite r - springt:

$$p(r, t_{lag})dr = \frac{1}{4\pi D t_{lag}} \cdot \exp\left(-\frac{r^2}{4D t_{lag}}\right) 2\pi r dr \quad (3.45)$$

In der Auswertung wird die Breite dr mit dem Intervall $[r, r + \Delta r]$ angenähert [Anderson et al., 1992, Kues et al., 2001].

Durch Integration der Formel 3.45 erhält man die kumulative Wahrscheinlichkeitsfunktion

$$P(r, t_{lag}) = \int_0^r p(r, t_{lag})dr = 1 - \exp\left(-\frac{r^2}{4D \cdot t_{lag}}\right) \quad (3.46)$$

in welcher man die Wahrscheinlichkeit, ein Partikel innerhalb eines Radius r vom Ursprung aus vorzufinden, bestimmt [Vrljic et al., 2002].

In einer solchen Darstellungsweise kann man die verschiedenen Unterpopulationen der Diffusion mit einer Summe von Exponentialfunktionen mit relativen Amplituden fitten [Schütz et al., 1997]. Hier für zwei Subpopulationen:

$$P(r^2, t_{lag}) = 1 - \left(A \cdot \exp\left(-\frac{r^2}{4D_1 \cdot t_{lag}}\right) + (1 - A) \cdot \exp\left(-\frac{r^2}{4D_2 \cdot t_{lag}}\right) \right) \quad (3.47)$$

und die verallgemeinerte Form mit n Subpopulationen (mit $\sum_i A_i = 1$):

$$P(r^2, t_{lag}) = 1 - \left(\sum_{i=1}^n A_i \cdot \exp\left(-\frac{r^2}{4D_i \cdot t_{lag}}\right) \right) \quad (3.48)$$

Für die Schrittweitenverteilung ergibt sich analog für n Subpopulationen [Kues et al., 2001]:

$$p(r, t_{lag})\Delta r = \left(\sum_{i=1}^n \frac{A_i}{4\pi D_i \cdot t_{lag}} \cdot \exp\left(-\frac{r^2}{4D_i \cdot t_{lag}}\right) 2\pi r \right) \Delta r \quad (3.49)$$

Die Analyse der Schrittweite r^2 in Abhängigkeit von t_{lag} gibt Aufschluß über die Art der Diffusion. Ist die Abhängigkeit linear, so liegt normale Diffusion vor. Erreicht r^2 aber einen Grenzwert so spricht man von eingeschränkter Diffusion (*confined diffusion*). Dieses Verhalten würde z.B. bei einer Diffusion eines Partikels innerhalb eines abgeschlossenen Bereiches vorliegen. Bei eingeschränkter Diffusion kann dieser Bereich, bzw. die Einschränkungslänge L folgendermaßen berechnet werden [Kusumi et al., 1993]:

$$r^2(t_{lag}) = \frac{L^2}{3} \left(1 - \exp\left[-\frac{12 \cdot D_0 \cdot t_{lag}}{L^2}\right] \right) \quad (3.50)$$

Resultate & Diskussion Teil I: Aufbau einer zeitaufgelösten Fluoreszenz “Pump-Probe” Apparatur

Mit Hilfe einer 2-dimensional zeitkorrelierten Einzelphotonenzählungs (2D-TCSPC-) Apparatur können auf zwei verschiedenen auch sehr weit auseinanderliegenden Zeitskalen die Fluoreszenzphotonen detektiert werden. In unserem Fall handelt es sich um den Pico-/Nanosekunden-Fluoreszenzlebensdauerbereich und den Nanosekunden- bis Sekundenbereich der Proteinfunktion.

Der eine Zeitbereich wird durch den “Pump”- Puls bestimmt, der im Nanosekundenbereich die Proteinfunktion triggert. Dies ist hier der Photozyklus von Bakteriorhodopsin bzw. die Photoreaktion des Sehpigments Rhodopsin. Entlang der Reaktionskoordinate des Proteins wird dann mit einem Picosekunden-Puls (“Probe”-Puls) die zeitaufgelöste Fluoreszenz einer proteingebundenen Reportergruppe abgefragt. Die Zeitskala des Fluoreszenzzerfalls der Reportergruppe (Picosekunden bis Nanosekundenbereich) ist der andere Zeitbereich, der mit der 2D-TCSPC-Apparatur erfasst werden kann.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich den bestehenden “normalen” eindimensionalen TCSPC-Aufbau, welcher die Fluoreszenzzerfallskurven mißt, zu einer 2D-TCSPC-Apparatur erweitert. Somit können jetzt auch Fluoreszenzzerfälle von Reportergruppen an lichtenregbaren Proteinen in Abhängigkeit des Photozyklus/der Photoreaktion gemessen werden. Das von mir realisierte Meßverfahren kann Informationen über zeitaufgelöste Fluoreszenzdaten und Anisotropien in Nicht-Gleichgewichtszuständen mit Submillisekundenzeitauflösung erfassen.

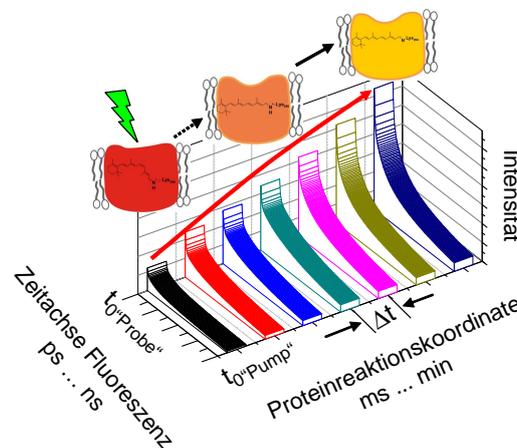


Abbildung 27: Schematische Darstellung von 2D-TCSPC-Messungen. Die einzelnen, Picosekunden zeitaufgelösten, Fluoreszenzzerfallskurven (farbig dargestellt) werden in aufeinanderfolgenden Zeitintervallen Δt entlang der Proteinreaktionskoordinate gemessen, welche sich in Abhängigkeit des transienten Proteinzustandes ändern. Diese wird zum Zeitpunkt t_0 “Pump” gestartet. t_0 “Probe” ist die Startzeit der Fluoreszenzzerfallskurven.

4.1 Beschreibung der 2D-TCSPC Apparatur

Der bestehende TCSPC-Aufbau [Alexiev et al., 2003] enthält einen von einem frequenzverdoppelten Neodym-Yttrium-Vanadate (Nd : YVO₄)-Laser gepumpten Titan:Saphir-Laser. In diesem wird ein gepulster Laserstrahl erzeugt, welcher über einen Bereich von ca. 700 – 1000 nm eingestellt werden kann und das Maximum der Laserintensität bei ca. 800 nm besitzt. Über separate Frequenzverdoppler (SHG¹⁵) und -verdreifacher (THG¹⁶) werden Frequenzbereiche von 350 – 500 nm und 230 – 330 nm eingestellt. Mit dem Optisch-Parametrischen-Oszillator (OPO) wird in der Lücke zwischen frequenzverdoppeltem Laserlicht und der Fundamentalen der Bereich von 525 – 665 nm abgedeckt. Es ist damit möglich, nahezu lückenlos einen Frequenzbereich von 250 – 1100 nm zu adressieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzmarker besitzen Fluoreszenzlebensdauern von 4 – 6 ns. Da die Repetitionsrate der Pulse bei 80 MHz liegt, würden zwischen den Einzelmessungen 12.5 ns liegen und die Messungen würden mit den vorhergehenden überlappen. Daher wird die Repetitionsrate mittels Pulspicker auf 4 MHz heruntergetaktet. Die integrierte Laserleistung liegt bei ca. 100 µW - 24 mW bei 4 MHz, die Halbwertsbreite der Pulse liegt bei 2 ps. Der linear polarisierte Laserstrahl ist entweder horizontal oder vertikal polarisiert und wird gegebenenfalls im Fresnelrhombus um 90° gedreht.

Wie aus Abb. 28 ersichtlich ist, wird der Laserstrahl über einen Neutraldichte (ND)-Filter geteilt, dabei wird ein Bruchteil der Intensität ausgekoppelt und von einer schnellen Photodiode mit Nanosekunden Zeitauflösung (DET210, Thorlabs) detektiert. Das Signal der Photodiode wird mit einem 1.6 GHz Vorverstärker (HFAC-26, B&H GmbH) [Vorverstärker] verstärkt und anschließend invertiert. Die Intensität des Signals wird mittels kontinuierlichen Neutraldichtefilters [F] vor der Photodiode so eingestellt, daß das verstärkte elektrische Signal eine Spitzenintensität von 0.5 V besitzt. Anschließend wird dieses Signal direkt zur in die TCSPC-Meßkarte (SPC-830, B&H GmbH) geleitet und dient für die TCSPC-Messungen als Stoppsignal. Diese im PC eingebaute PCI-Meßkarte beinhaltet *Constant Fraction Discriminators* (CFDs), *Time-to-Amplitude Konverter* (TAC), Analog/Digitalwandler (ADC) und den *Multichannel Analyser* (MCA). Der Speicher ist ebenfalls auf der Karte integriert, ebenso kommt die Stromversorgung der Vorverstärker von dieser Meßkarte.

Der andere Teil des Laserpulses wird durch ein Filterrad mit zwei Neutraldichtefiltern hintereinander geleitet. Diese können so eingestellt werden, daß die durch den Laserstrahl angeregte Fluoreszenz der Probe nicht zu klein ist und auch nicht zu hoch, damit noch im Einzelphotonenmodus gemessen werden kann und auch die hohe Lichtintensität das *Multi Channel Plate* [MCP] nicht zerstören kann. Vor der Probe wird das Licht noch durch einen *Glan-Thompson Polarisor* [GP] geleitet. Für lichtempfindliche Proben befindet sich eine Zerstreulinse vor der Probe im Probenanregungsstrahlengang.

Die Probe befindet sich in einem temperierbaren Küvettenhalter. Das Licht vom Pumplaser wird über eine Glasfaser zur Probe geleitet. Am Probenhalter existieren Anschlüsse, mit welchen trockene Luft an die Küvettenfenster geblasen wird, um bei Messungen unter 15°C Kondensation von Luftfeuchtigkeit an den Fenstern zu vermeiden.

Das Licht der Probe aus der Küvette geht durch einen Kantenfilter [CF], welcher das Fluoreszenzlicht passieren läßt, aber gestreutes Licht absorbiert. Die Linse [L] parallelisiert das Fluoreszenzlicht, welches dann noch eine variable Irisblende [I] und einen Folienpolarisator [P] passiert. Der MCP (R3809U, Hamamatsu) detektiert einfallende Photonen und konvertiert sie in ein elektrisches Impuls. Da der MCP bei hohen Lichtintensitäten zerstört werden kann, wird dieser durch einen mechanischen Shutter (LS6T2K, Uniblitz) außerhalb der Messungen geschützt. Der MCP wird über ein Peltierelement in einem Kühlgehäuse gekühlt, um die Dunkelzählrate so gering wie möglich zu halten. Sie liegt bei diesem Modell bei ca. zehn Impulsen pro Sekunde. Die Arbeitsspannung

¹⁵ *second harmonic generation*

¹⁶ *third harmonic generation*

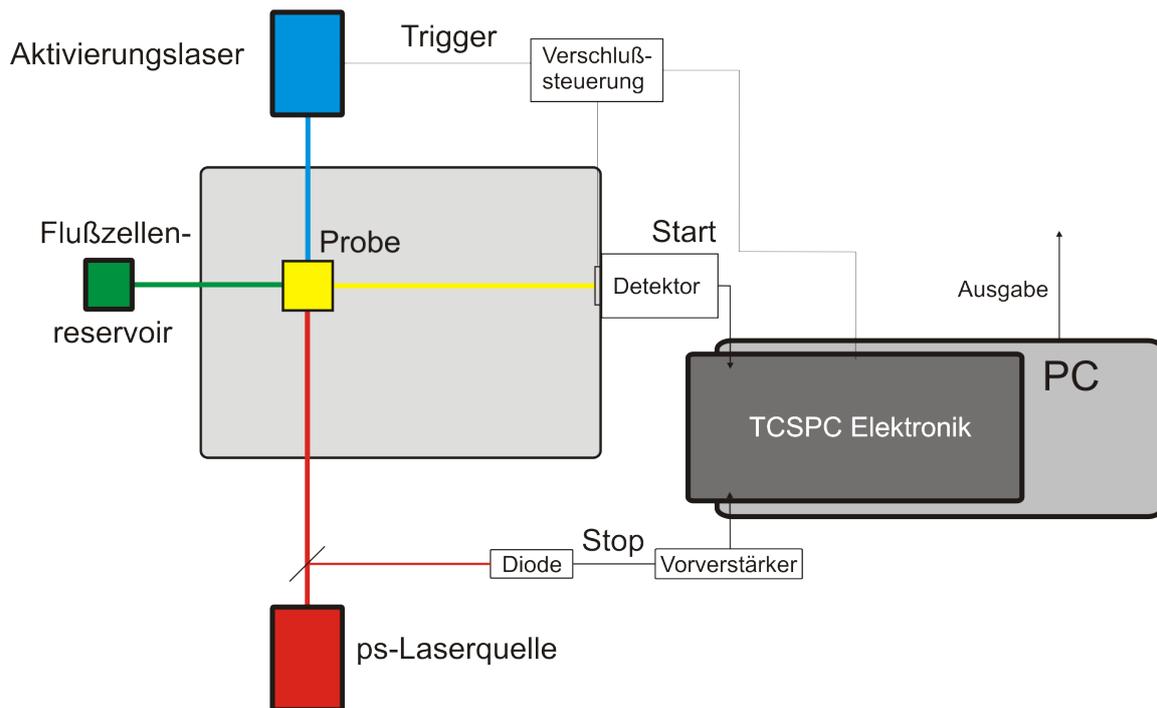


Abbildung 28: Aufbau der 2D-Apparatur: Die eindimensionale TCSPC-Apparatur (Abb. 15) wird um einen Pump Laser (4) erweitert, welcher mit einem Lichtpuls die Probe lichtaktiviert und die Messung mit der Meßkarte synchronisiert (5). Die Flußzelle (grün) wird aus dem Flußzellenreservoir (6) gespeist. F steht für kontinuierlicher ND-Filter, FR der Fresnelrhombus, DF Doppeltes Neutraldichtefilterrad, GP Glan Thompson Polarisator, DL Aufweitungslinse, CF Kantenfilter, L Sammellinse, I Irisblende, P Folienpolarisator und Sh Verschluß.

liegt bei 2.84 kV. Die Impulse vom MCP werden von einem 1.6 GHz Vorverstärker (HFAC-26, B&H GmbH) vorverstärkt und auf die TCSPC-Karte geleitet. Das Signal vom MCP wird in der Karte als Startsignal interpretiert. Das hat den Vorteil, daß die Karte eine Einzelmessung nur startet, wenn wirklich ein Photon durch den MCP registriert wurde. Das Verhältnis der Stop-/Startpulse sollte etwa bei 100:1 bis 200:1 liegen, um die Apparatur im Einzelphotonenmodus zu betreiben [Lakowicz, 2006, Alexiev et al., 2003].

Die Auflösung des ADC kann variabel bis 4096 Kanäle auf der Zeitachse der Fluoreszenz eingestellt werden. Für die Messungen wurde sie auf 1024 Kanäle eingestellt, damit die Meßkurven mit der Global Unlimited V2.2 Software analysiert werden können. Um die Gerätefunktion (*Instrumental response function* - IRF) aufnehmen zu können, wird anstelle der Probe eine stark streuende Lösung benutzt. Im sichtbaren Wellenlängenbereich benutzt man dafür verdünnte Milch. Im UV Bereich dagegen verwendet man eine kolloidale Dispersion sehr kleiner Siliciumdioxid-Partikel (LUDOX), da die in der Milch vorhandenen Proteine Tryptophan enthalten, welche im UV Bereich fluoreszieren. Die Halbwertsbreite der IRF liegt bei 35 ps bei einer Kanalbreite von 20 ps.

Der Pump Laser aktiviert den Photozyklus oder die Photoreaktion. Dafür wird ein Excimer-Laser (EMG 50, Lambda Physik) gepumpter Farbstofflaser genutzt. Die Pulsdauer des Excimers liegt bei 10 ns und die Energie eines einzelnen Pulses bei 308 nm bei 80 – 100 mJ. Die Laserpulse aus dem Farbstofflaser mit dem Farbstoff Coumarin 307 in Methanol haben eine Energie von 14 – 16 mJ bei 493 nm. Diese werden durch eine Lichtleitfaser zur Probe geleitet. Bei den hohen Energien der Pulse ist die Einkopplung der Pulse in die Faser (HCG-M0940T mit 10 m Länge von LaserComponents, maximale Peakpower 1 GW/cm²) kritisch. Da der Strahl stark divergent ist,

muß er gebündelt werden, dabei ist darauf zu achten, daß der Fokussierpunkt vor dem Eintritt in das GlasfasermEDIUM liegt, da die entstehenden Energiedichten in der Faser diese zerstören können. Weiterhin kann nicht mit Steckern mit normalen SMA (*Sub-Miniature-A*) Anschluß gearbeitet werden, da die Faser in diese Stecker geklebt wird. Wenn der Laserstrahl nicht direkt in die Faser geht, sondern die Klebung trifft, vaporisiert dieser und setzt sich auf die Faseroberfläche ab und macht sie unbrauchbar. In diesem Aufbau wird eine freistehende Faser verwendet, welcher die äußeren Isolierschichten entfernt wurden und an der Oberfläche poliert wurde. Die Energie des Laserpulses am Faserende beträgt etwa 3 – 5 mJ, mit welchen die Probe aktiviert wird. Für die Triggerung der Meßkarte wird ein elektrisches Signal vom Excimerlaser an die Karte geleitet, welche von 15V auf 5V transformiert wird. Das Signal kommt mit etwa 800 ns Verzögerung nach dem Laserpuls von der Stromversorgung des Excimerlasers und triggert zusätzlich die Verschlusssteuerung. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit für das Setup entworfen, um den Verschluss (*Shutter*) zu steuern. Diese Verschlusssteuerung wird genutzt, um ein +5 V TTL-Signal (Transistor-Transistor-Logik) an die Treiber des *Shutter* zu senden, um diesen zu öffnen. Die Öffnungszeit kann innerhalb von 100 s frei mit einer Auflösung $\frac{1}{10}$ s eingestellt werden. Für andere Messungen kann auch ein Dauer-TTL Signal gegeben werden, damit der Shutter offen bleibt. Es existiert ebenfalls die Möglichkeit einen zweiten Verschluss gleichzeitig zu steuern, um z.B. den *Probe*-Laser ausserhalb der Meßzeit zu blocken, um eine eventuelle Anregung der Probe zu minimieren.

Um die einzelnen Fluoreszenzzerfallskurven aus den 2D-Messungen mit ausreichenden Konfidenzintervallen fitten zu können, ist es vonnöten, die Probe wiederholt zu messen und die detektierten Ergebnisse der einzelnen Meßzyklen aufzusummieren. Da Bakteriorhodopsin einen vollständigen Photozyklus besitzt, kann man ein und dieselbe Probe auch für mehrere aufeinanderfolgende Photozyklen benutzen. Daher wird für Messungen mit Bakteriorhodopsin eine 3 mm x 3 mm Fluoreszenzquarzküvette (Hellma) mit drei 5 mm hohen Fenstern benutzt. Das Probenvolumen im sichtbaren Bereich beträgt 45 µl. Rinderaugenrhodopsin kann aufgrund dessen, daß es nach Lichtanregung nicht mehr von alleine in den Ausgangszustand zurückkehrt, nur einmal lichtaktiviert werden. Daher muß für die 2D Messungen auch für jede Einzelmessung die Probe ausgetauscht werden. Um die Messung zu optimieren, wird eine Quarzdurchflußküvette mit drei Fenstern eingesetzt, so daß durch das eine Fenster die Probe mit den *Pumppuls* angeregt werden kann und die zwei anderen Fenster in rechtwinkliger Geometrie zur Anregung und Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors genutzt werden können. Die Probe wird aus einem Vorratsgefäß über eine Peristaltikpumpe zur Küvette gepumpt. Um vorzeitige Lichtanregung der Probe zu vermeiden, ist das Gefäß in einer dunklen Box aufbewahrt und mit lichtundurchlässigen Schläuchen mit der Küvette verbunden. Die Pumpgeschwindigkeit der angeregten Probe muß an den Beobachtungszeitraum über der Proteinfunktionskoordinate angepasst sein. Deshalb wird die Pumpeinheit über eine weitere Steuereinheit geschaltet, welche sich ebenso variabel einstellen läßt wie die Verschlusssteuerung.

4.2 Testmessung mit Bakteriorhodopsin

Um den 2D-TCSPC-Aufbau zu testen, habe ich Bakteriorhodopsin als Probe verwendet. Der Photozyklus von Bakteriorhodopsin ist innerhalb von ungefähr einer Sekunde durchlaufen. Die Zeitkonstante der Reaktion, die von den Intermediaten N und O zurück zum Grundzustand führt, liegt im Bereich von 10 ms bis 200 ms bei 10°C. Mit einer Abtastzeit von 2 ms auf der Proteinreaktionskoordinate kann die Änderung der zeitaufgelösten Fluoreszenzzerfälle einer kovalent an das bR gebundenen Reportergruppe in der zweiten Hälfte des Photozyklus ($M \rightarrow N/O \rightarrow bR$) detektiert werden. Ein Vorteil von bR ist, dass der Photozyklus repetitiv anregbar ist und somit das Signal über viele Zyklen aufsummiert werden kann. Bei einer mittleren Fluoreszenzintensität von 30000

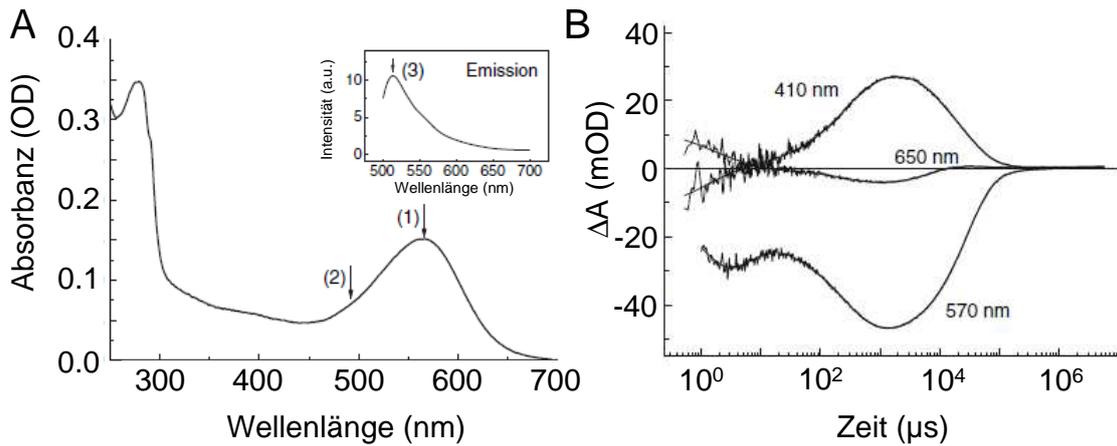


Abbildung 29: A: Absorptions- und Emissionsspektren der fluoresceinmarkierten Bakteriorhodopsin Mutante S35C (S35C-AF). Der Farbstoff ist an Position 35 im AB-Schleife über ein Cystein an das Bakteriorhodopsin gebunden. (1) markiert den Absorptionspeak des Retinals von bR, (2) den Absorptionspeak des gebundenen Fluoresceins und (3) das Emissionsmaximum des Fluoresceins. B: Die zeitabhängigen Absorptionsänderungen über den Photozyklus von S35C-AF wurden bei 410, 570 und 650 nm aufgenommen. Meßbedingungen: 10 μ M S35C-AF, 150 mM KCl, 10 mM Tris pH 7 bei 10°C.

counts/s am Detektor erwarten wir 60 *counts* pro Pumpereignis (Anregung des Photozyklus) in einem Zeitintervall von 2 ms auf der Proteinreaktionskoordinate. Um etwa 1000 bis 2000 *Peakcounts* in der Fluoreszenzzerfallskurve zu erhalten, sind bei einem Verhältnis von 1:30 zwischen *Peakcounts* und *Gesamtcounts* des Fluoreszenzzerfallssignals von Fluorescein, welches an bR kovalent gebunden ist, ungefähr 500 bis 1000 repetitive Anregungen des Photozyklus notwendig.

Für die Testmessung wurde die bR Mutante S35C verwendet. An das Cystein in Position 35 wurde der Fluoreszenzfarbstoff Iodoacetamidofluorescein (IAF) mit einer Labelstöchiometrie von 10% kovalent gebunden. Diese Labelingstöchiometrie ist niedrig genug, um Homoenergietransfer an der Oberfläche der bR Membranfragmente zu vermeiden, aber hoch genug, um ein ausreichendes Fluoreszenzsignal zu erreichen. Abbildung 29A zeigt die Absorptions- und Emissionsspektren der bR-Mutante S35C-AF. Ein Überblick über die Photozykluskinetik von bR-S35C-AF ist in Abb. 29B dargestellt. Der Photozyklus von S35C-AF wurde mittels transientser Absorptionsspektroskopie bei 17 verschiedenen Wellenlängen zwischen 390 und 670 nm gemessen. In Abb. 29B sind drei charakteristische Wellenlängen aufgetragen. Diese entsprechen folgenden Intermediaten im Photozyklus des Bakteriorhodopsins: 410 nm - Anstieg und Zerfall des M-Intermediates; 570 nm - Zerfall und Rückkehr des Ausgangszustandes (bR-Zustand); 650 nm - Zerfall des K-Intermediates, Bildung und Zerfall des O-Intermediates. Mit einem globalen Fit der 17 verschiedenen Zeitspuren können acht Zeitkonstanten ermittelt werden. Für den ersten Teil des Photozyklus (Aufbau des M-Intermediates) wurden folgende Zeitkonstanten bestimmt: 1.1 μ s, 5.4 μ s, 79 μ s und 306 μ s. Der zweite Teil des Photozyklus (M \rightarrow N/O \rightarrow bR) wurde mit folgenden Zeitkonstanten beschrieben: 1.7 ms, 6.3 ms, 29 ms und 212 ms, wobei der Zerfall des M-Intermediates in einem separaten biexponentiellen Fit mit den Zeitkonstanten von 5 ms und 30 ms angepasst wurde.

Vor Beginn der Fluoreszenz-Pump-Probe Messungen an bR S35C-AF wurde zunächst der Fluoreszenzzerfall des Fluoresceins im bR-Zustand vor Lichtanregung gemessen. Abbildung 30A zeigt den Fluoreszenzzerfall von S35C-AF und die entsprechende Fitkurve. Der Fluoreszenzzerfall wurde mit drei Exponentialfunktionen gefittet (Gleichung 3.9). Die Zeitkonstanten der Fluoreszenzzerfälle

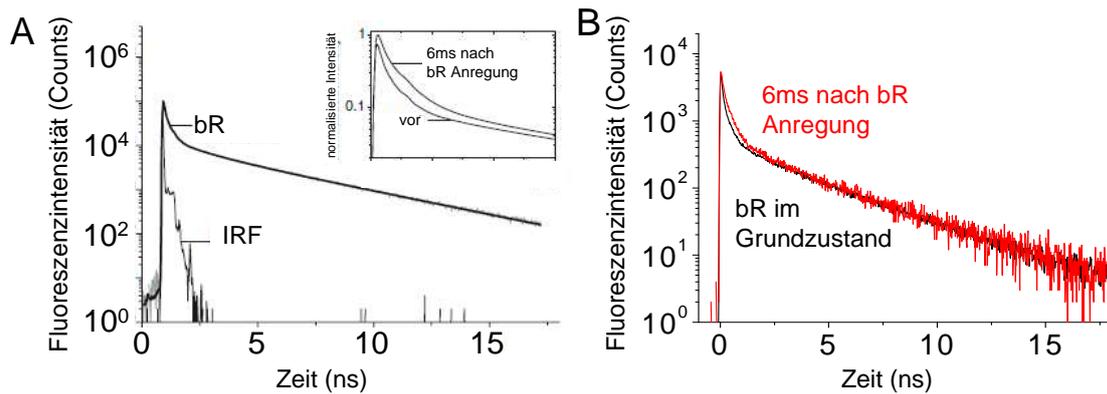


Abbildung 30: A: Fluoreszenzzerfall der Bakteriorhodopsin S35C-AF Mutante im Ausgangszustand mit Gerätefunktion. Inset: Normalisierte Kurven von bR vor und 6 ms nach Lichtaktivierung. B: Rohdaten des Fluoreszenzzerfalls 6ms nach Lichtanregung (rot) im Vergleich zu der Fluoreszenzzerfallskurve im Ausgangszustand (schwarz). Meßbedingungen: 10 μ M S35C-AF, 150 mM KCl, 10 mM Tris pH 7 bei 10°C, λ_{ex} = 461 nm, Emission wurde über OG515 aufgenommen.

liegen bei 0.16 ns, 1.1 ns und 4.0 ns und passen zu früheren Messungen von S35C-AF [Alexiev et al., 2003].

In der 2D-TCSPC-Messung wurde die Probe bR S35C-AF mit 1000 *Pump*zyklen angeregt. Abbildung 30B zeigt den Vergleich der Rohdaten zwischen den Fluoreszenzzerfällen vom bR Zustand und während des Photozyklus (6 ms nach Lichtaktivierung). Betrachten wir die Peakcounts der Zerfallskurve 6 ms nach Lichtaktivierung von bR, dann haben wir einen Wert von etwa 1500 Ereignissen bei einer Gesamtsumme von etwa 41000 Ereignissen im Meßbereich von 0-20 ns. Diese Werte entsprechen unserer Überschlagsrechnung und wir haben ca. 40 *Counts* pro *Pump*ereignis am Detektor im betrachteten Zeitintervall von 2 ms.

Zur weiteren Auswertung wurden die Fluoreszenzintensitätsänderungen des bR gebundenen Fluoresceins als Funktion der Proteinreaktionskoordinate in einem Konturplot mit den Absorptionsänderungen im Photozyklus (Abb. 31B, D) verglichen. Der Konturplot von Abbildung 31B zeigt die Differenz der zweidimensionalen Fluoreszenzlebensdauermessungen des Fluoreszenzlabels an der Oberfläche über den Photozyklus des Bakteriorhodopsin zu der Fluoreszenzlebensdauerermessung des Bakteriorhodopsins im Ausgangszustand, um die Änderungen während des Photozyklus herauszuheben. Der höchste Anstieg in der Fluoreszenz ist im Bereich von 0.1 – 0.2 ns nach Anregung des Fluoreszenzlabels (mit einem + markiert) zu sehen, welches der schnellsten Fluoreszenzlebensdauerkomponente entspricht.

In den Abbildungen 31A und C sind zeitabhängige Fluoreszenzintensitätsänderungen über der jeweiligen Zeitachse, zum einen des Photozyklus (Abb. 31A) und zum anderen des Fluoreszenzzerfalls (Abb. 31C), aufgetragen. Diese zeitabhängigen Intensitätsänderungen sind die Linienprofile der eingezeichneten horizontalen und vertikalen Schnitte in Abbildung 31B.

Zum Vergleich ist in Abbildung 31D der Konturplot der Photozyklus - Absorptionsänderungen über einen Wellenlängenbereich von 380 – 670 nm aufgetragen. Das “+” kennzeichnet hier den Absorptionsanstieg des M-Intermediates bei 410 nm und das “-” den Abfall in Absorption des Ausgangszustandes bei 570 nm. Es ist ersichtlich, daß die erhöhte Fluoreszenzintensität den Marker während der Lebensdauer des M-Intermediates auftritt. In Abbildung 31E werden der Zerfall des M-Intermediats mit dem Zerfall der Fluoreszenz der schnellen Fluoreszenzlebensdauerkomponente von 0.16 ns direkt miteinander verglichen (horizontale Schnitte durch die beiden Konturplots).

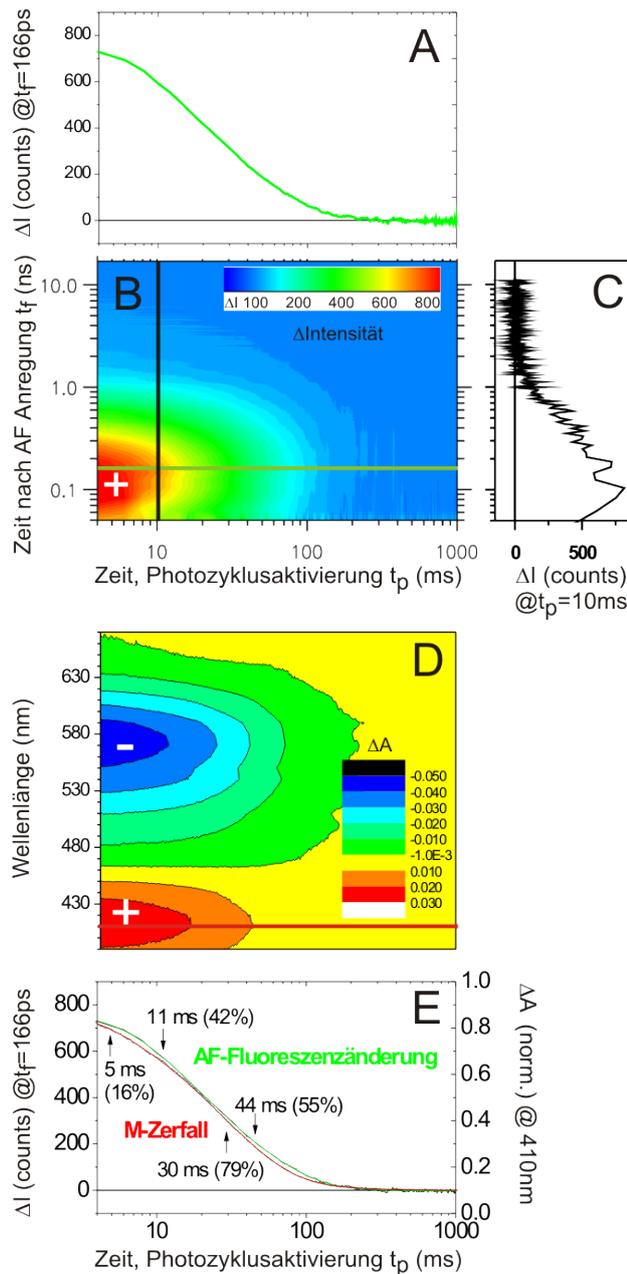


Abbildung 31: Übersicht über 2D-Fluoreszenzmessung (oberes Dreierpanel) und den Absorptionsmessungen (unteres Zweierpanel) im bR-S35C-AF Photozyklus. **A:** Fluoreszenzänderung des am Rhodopsin gebundenen Fluorescein. **B:** Konturplot der Differenz der Fluoreszenzzerfälle des Fluoresceins über den Photozyklus mit den Fluoreszenzzerfall im Ausgangszustand des S35C-AF. **C:** Die Differenz des Fluoreszenzzerfalls von Fluorescein 10 ms nach Lichtaktivierung (vertikales Linienprofil aus B) mit dem des Fluoreszenzzerfalls mit bR im Grundzustand ist aufgetragen. **D:** Konturplot der Verläufe der Absorptionsänderungen bei 19 Wellenlängen über den Photozyklus der S35C-AF Mutante als Konturplot. "+" und "-" Kennzeichen die Bereiche mit den größten Absorptionsänderungen. **E:** Vergleich der Kinetiken in der zweiten Hälfte des Photozyklus. Das M-Intermediat bei 410 nm (Linienprofil aus A, rot) und der Verlauf der schnellen 166 ps (Linienprofil aus B, grün) Fluoreszenzkomponente des Fluoresceins sind mit den korrespondierenden Zeiten und Amplituden aufgetragen. Meßbedingungen: 10 μ M S35C-AF, 150 mM KCl, 10 mM Tris pH 7 bei 10°C, 2 ms Zeitaufösung auf der Achse des Photozyklus mit 500 Zeitfenstern und 1000 Wiederholungsmessungen. Die Fluoreszenzanregung wurde bei $\lambda_{ex} = 461$ nm, die Fluoreszenzemission durch einen OG515 Kantenfilter aufgenommen.

Diese beiden Zerfälle werden biexponentiell gefittet und ergeben für den M-Zerfall Zeitkonstanten von 5 ms und 30 ms, sowie für den Zerfall der schnellen Fluoreszenzlebensdauerkomponente von 11 ms und 44 ms. Die 5 ms Zerfallskomponente in der Absorption bei 410 nm passt relativ gut zur 6.3 ms Komponente aus dem globalen Fit des Photozyklus aus Abbildung 29B. Diese Zeitkonstante beschreibt hauptsächlich den Übergang von M \rightarrow N/O, wobei das O-Intermediat bei höheren Temperaturen und niedrigeren pH bevorzugt gebildet wird [Scherrer und Stoeckenius, 1985] und bei 10°C zu 10-30% gebildet wird. Unter unseren Meßbedingungen von 10°C und pH 7 haben wir deshalb eine relativ niedrige Amplitude, die bei 16% liegt. Vergleicht man die mittleren Lebensdauer des M-Zerfalls mit der Kinetik der Fluoreszenzintensitätsänderung, so erhält man Zeitkonstanten von 25 ns für den Zerfall des M-Intermediats und 29 ns für den Zerfall der AF-Fluoreszenz (Abb. 31A und E). Es scheint, daß der beobachtete Fluoreszenzanstieg mit dem Zerfall des M-Intermediates ebenfalls wieder zur Fluoreszenzintensität des Ausgangszustandes zurückkehrt (Abb. 31B).

4.3 Diskussion

In diesem Kapitel wurde die erfolgreiche Integration einer neuen multidimensionalen TCSPC-Meßkarte mit einem durchstimmbaren Lasersystem mit hoher Wiederholfrequenz und einem gepulstem Laser mit hohen Pulsenergien zu einer neuen 2D-TCSPC-Apparatur gezeigt. Die Implementierung einer Durchflußzelle bei der mit einer elektronischen Steuerung die Verweildauer der Proben im Meßkompartiment geregelt werden kann, komplementieren den Aufbau. Es wurde gezeigt, daß diese Apparatur in der Lage ist, Echtzeitdynamiken eines Fluoreszenzmarkers und damit auch Änderungen in der Umgebung des Markers während des Photozyklus in Nicht-Gleichgewichtszuständen zu detektieren. Diese Apparatur ist ebenfalls in der Lage, zeitaufgelöste Anisotropiezerfälle auf der Zeitachse der Proteinfunktion zu erfassen.

Bei dem Test an bR wurde der Fokus auf Änderungen des zeitaufgelösten Fluoreszenzzerfalls an der cytoplasmatischen Oberfläche während des Photozyklus der bR-S35C Mutante gelegt. Mit transienten *Flash*-induzierten Absorptionsmessungen wurde gezeigt, daß die bR-S35C Mutante eine Kinetik zeigt, welche dem Wildtyp bR sehr ähnelt [Scherrer et al., 1994]. Die Messungen zeigen die Änderungen der Absorption des Chromophors des Proteins. Für die Detektion der Oberflächenänderungen des Proteins werden Fluoreszenzänderungen eines spezifisch daran gebundenen Fluoreszenzmarkers gemessen. Mit der Bindung des Fluoreszenzmarkers an das Protein wird das Fluoreszenzzerfallsverhalten des Markers durch Fluoreszenzlöschung multiexponentiell. Fluoreszenzlöschung kann vielfältige Ursachen haben. Da in diesem System die Emissionsbande des Fluoresceins mit der Absorptionsbande des Retinals überlappt (Abb. 29A) muß ebenfalls ein möglicher Förster-Energietransfer in Betracht gezogen werden. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen (unpubliziert - U. Alexiev) an fluoresceinmarkierten bR mit reduzierter Schiffischer Base (rR-bR) zeigten, daß die relativen Amplituden der Fluoreszenzlebensdauerkomponenten $\tau_1 = 0.1$ ns (α_1) und $\tau_3 = 4$ ns (α_3) eine Abhängigkeit vom Energietransfer zeigen. α_1 steigt von 20% ohne Energietransfer im rR-bR zu etwa 70% im bR-Grundzustand. Durch das im M-Intermediat verschobene Retinalabsorptionsmaximum ($\lambda_{\text{max},M} = 412$ nm) ist kein Energietransfer vom Fluorophor zum Retinal und eine Verringerung von α_1 zu erwarten. Die Analyse der hier gemessenen Daten zeigt, daß aber im M-Intermediat nicht nur ein absoluter Anstieg der Gesamtfluoreszenz zu beobachten ist, sondern auch α_1 ansteigt (Abb. 30A Inset, 31D). Zusätzlich muß berücksichtigt werden, daß nur ca. 10-15% der bR - Moleküle angeregt werden und in den Photozyklus gehen. Dies bedeutet, daß das Fluoreszenzzerfallssignal eine Überlagerung des Fluoreszenzzerfallssignals des bR - Grundzustandes und des jeweiligen Zeitbereiches im Photozyklus ist. Dieser Trend bestätigt die Messungen mit rR-bR, der Effekt ist jedoch geringer, wahrscheinlich aus den genannten Gründen. Das ist ein klarer Hinweis darauf, daß neben dem Energietransfer die Änderung der Umgebung einen

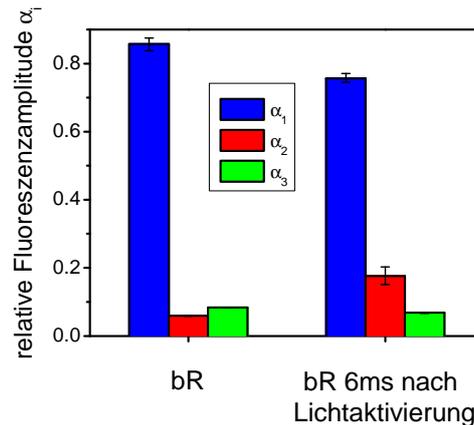


Abbildung 32: Analyse der relativen Fluoreszenzamplituden von bR im Grundzustand und 6 ms nach Lichtaktivierung. Für bR im Grundzustand sind $\tau_1 = 0.11$ ns, $\tau_2 = 0.41$ ns und $\tau_3 = 3.51$ ns. 6 ms nach Lichtaktivierung sind $\tau_1 = 0.15$ ns, $\tau_2 = 0.52$ ns und $\tau_3 = 3.55$ ns. Meßbedingungen: 10 μ M S35C-AF, 150 mM KCl, 10 mM Tris pH 7 bei 10°C. Die Fluoreszenzanregung wurde bei $\lambda_{ex} = 461$ nm, die Fluoreszenzemission durch einen OG515 Kantenfilter aufgenommen.

großen Einfluß auf α_1 besitzt. Betrachtet man die Analyse der relativen Amplituden (Abb. 32), dann erkennt man, daß im M-Intermediat nicht nur α_1 , sondern gerade α_2 ($\tau_2 = 1$ ns) stark ansteigt. Da diese Zerfallskomponente nicht mit dem Energietransfer in Zusammenhang gebracht wurde, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, daß Umgebungsänderungen im M-Intermediat den stärksten Einfluß auf die Änderung der Fluoreszenz haben.

Ebenfalls zeigt der direkte Vergleich der Kinetiken des M-Zerfalls und der Fluoreszenzänderung bei 166 ps über der Zeitachse des Photozyklus Differenzen zwischen der mittleren Zerfallskonstante, die für den Zerfall des M-Intermediates 25 ms und für die Fluoreszenzänderung 29 ms beträgt (Abb. 31E). Gleiches gilt auch für die beiden individuellen Zerfallszeiten, die darüberhinaus auch deutlich unterschiedliche Amplituden aufweisen (Abb. 31E). Dies ist ein nochmaliger Hinweis darauf, daß der Energietransfer nur zum Teil die Fluoreszenzänderungen beeinflusst. Darüberhinaus zeigt der Vergleich mit EPR-Messungen an Spinmarkern in gleicher Position ein ähnliches kinetisches Verhalten für den Zerfall des M-Intermediates und die Änderung des EPR-Signals [Mollaaghababa et al., 2000], d.h. die EPR-Signaländerung besitzt eine langsamere Kinetik als der Zerfall des M-Intermediates. Die in diesen Messungen festgestellten Änderungen von Umgebung bzw. Proteinstruktur scheinen ebenfalls während des M-Intermediates aufzutreten, aber sind mit dem M \rightarrow N Übergang assoziiert. Im M \rightarrow N/O wird die Schiff'sche Base vom Asp96 reprotoniert, welche sich im cytoplasmischen Teil des Proteins befindet. Mit dem M \rightarrow N Übergang ist das Herauskippen des cytoplasmatischen Endes der Helix F assoziiert. Dabei ändert sich ebenfalls die Konformation der EF-Schleife und Helix G dreht sich in Richtung des Protonenkanals [Subramaniam und Henderson, 2000, Vonck, 2000, Radzwill et al., 2001]. Da sich der Fluoreszenzmarker an der AB-Schleife in direkter Nachbarschaft von Helix G befindet, ist er in einer guten Position, diese konzertierten Bewegungen zu detektieren.

Zusammenfassend kann am Beispiel des Retinalproteins bR erfolgreich gezeigt werden, dass die Kinetik von photozyklusinduzierten Umgebungs- bzw. Strukturänderungen an der cytoplasmatischen Proteinoberfläche über die Änderung der Eigenschaften des Fluoreszenzmarkers mittels 2D-TCSPC-Messungen detektiert werden können.

Resultate & Diskussion Teil II: Die Dynamik von Helix 8 an der cytoplasmatischen Seite von Rhodopsin bei Rezeptoraktivierung

Helix 8 spielt eine wichtige strukturelle Rolle sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Deaktivierung des Sehpigments Rhodopsin. Rhodopsin besteht aus sieben Transmembranhelizes, welche über flexible Segmente, den Schleifen, miteinander verbunden sind. Die vierte cytoplasmatische Schleife ist amphipatisch und besitzt eine α -helikale Sekundärstruktur, welche erst seit der Lösung der Kristallstruktur des Rhodopsins bekannt ist und parallel zur Membranoberfläche der cytoplasmatischen Oberfläche liegt [Palczewski et al., 2000]. Die Untersuchung ihrer Funktion, insbesondere ihrer Bindung zu Transducin, wurde meist mit Mutagenesestudien und Aktivitätsassays durchgeführt [Marin et al., 2000, Ernst et al., 2000]. Dagegen sind die Flexibilität und Dynamik dieser amphipatischen Helix unter physiologischen Bedingungen nicht ausreichend untersucht worden. Das sind aber wichtige Faktoren für die Bindung des G-Protein Transducin und auch neben der Phosphorylierung des C-Terminus von Rhodopsin - für die Bindung des Arrestins. Fluoreszenzanisotropiemessungen sind ein geeignetes Mittel, um diese Fragestellung zu adressieren. Aus der Analyse von polarisierten zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen können zwei unabhängige Parametersätze - die Fluoreszenzlebensdauer und die Anisotropie - gewonnen werden. Aus der Analyse der Fluoreszenz kann im wesentlichen auf Umgebungsparameter geschlossen werden, die Anisotropie kann Informationen über die Dynamik und Flexibilität der Helix liefern [Alexiev et al., 2003]. Im folgenden werden zunächst die zeitaufgelösten Fluoreszenzparameter analysiert und im anschließenden Unterkapitel die Anisotropieparameter.

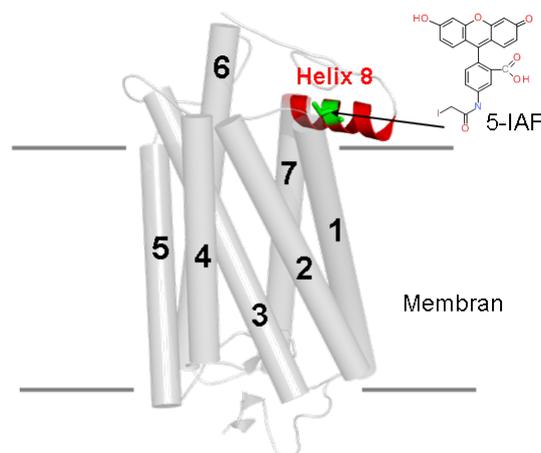


Abbildung 33: Darstellung eines Tertiärstrukturmodells von Rhodopsin im Dunkelzustand (PDB: 1U19) in einer Membran. Die amphipatische Helix 8 ist rot hervorgehoben. Der Fluorophor 5-IAF (als Strukturformel dargestellt) ist am Cys316 (grün) kovalent gebunden.

Für die Messungen an Helix 8 wurde das in dieser Helix liegende Cys316 fluoreszenzmarkiert. Es ist eines von zwei frei zugänglichen Cysteinresten von Rhodopsin. Unter geeigneten Präparationsbedingungen [Alexiev et al., 2003] kann exklusiv am Cys316 der Fluoreszenzfarbstoff gebunden werden (Abb. 33). Die Labelingstöchiometrie ist bei Fluoreszenzmessungen in Rhodopsindiskmembranen von entscheidender Bedeutung, da die Proteine auf der Membranoberfläche sehr dicht gepackt sind. Um Homoenergie transfer auszuschließen, wurde eine Labelingstöchiometrie von etwa 10-20% verwendet wie sie in Kapitel 3.6.2 berechnet wurde.

Für die Messungen in dieser Untersuchung wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein benutzt. Dieser besitzt auch pH-abhängige spektroskopische Eigenschaften (Abb. 35). Neben der Fluoreszenz können somit über die pH-abhängigen Absorptionseigenschaften Protonen- und Potentialänderungen lokal über transiente Absorptionsmessungen detektiert werden. Der Vorteil der Nutzung dieses Farbstoffes liegt nun darin, daß ein und dieselbe Probe mit verschiedenen Meßmethoden analysiert werden kann und damit eine bessere Vergleichbarkeit der Meßergebnisse gegeben ist. Die pH-Abhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften und ihr Einfluß auf die Fluoreszenz und Anisotropie werden im folgenden zunächst charakterisiert.

5.1 pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften von Fluorescein

5.1.1 Freies Fluorescein

Fluorescein besitzt im pH-Bereich von pH 1 bis pH 10 drei Protonierungs- / Deprotonierungsübergänge [Zanker und Peter, 1958] (Abb. 34). Im sauren Bereich unter pH 2 liegt das Fluorescein als Kation vor und besitzt phosphoreszierende Eigenschaften [Lewis et al., 1941]. Dagegen sind der neutrale und die anionischen Zustände fluoreszent. Die unterschiedlichen Ladungszustände des Fluoresceins unterscheiden sich in ihren Absorptionseigenschaften (Abb. 34).

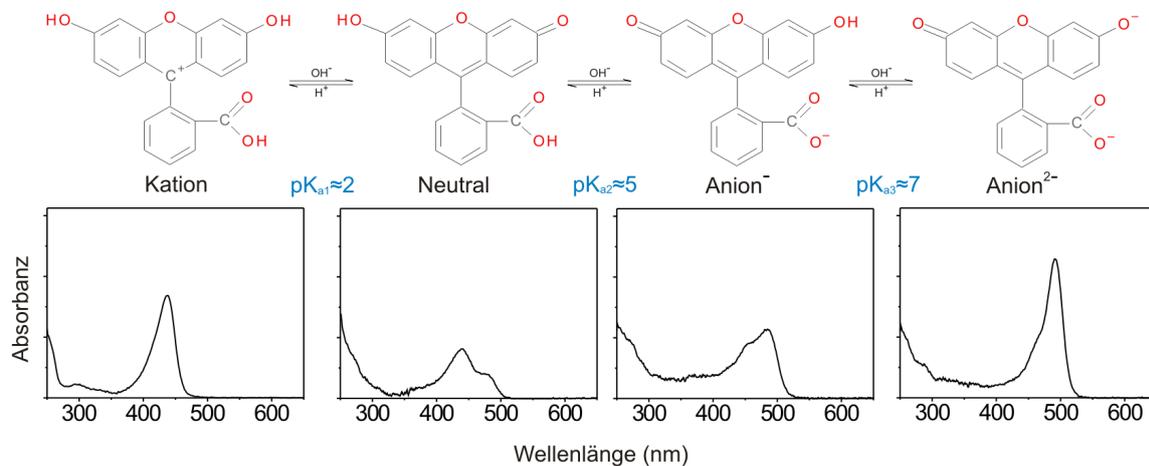


Abbildung 34: Struktur von Fluorescein in verschiedenen Protonierungszuständen (obere Reihe) mit ihren ungefähren pK_a-Werten. In der unteren Reihe sind die korrespondierenden Absorptionsspektren (von links nach rechts) bei ca. pH 1, pH 3.7, pH 6.0 und pH 8.5 dargestellt. Messbedingungen: 2 µM IAF, 50 mM Puffer, 150 mM NaCl, 20°C. pH 1 wurde mittels HCl ohne Puffer titriert.

Die Absorptionsspektren besitzen zwei leicht pH-abhängige Maxima bei etwa $\lambda_{\text{max}1} \approx 440$ nm und $\lambda_{\text{max}2} \approx 490$ nm, dessen Amplituden sich stark mit dem pH ändern. Im Säuren ist die Amplitude von $\lambda_{\text{max}1}$ dominierend, beim Übergang zum Alkalischen steigt die Amplitude des langwelligeren Maximums $\lambda_{\text{max}2}$ (Abb. 35A). Das Absorptionsmaximum der kationischen Form liegt bei $\lambda_K = 438$ nm, das der neutralen Form bei $\lambda_N = 440$ nm. Die monoanionische Form besitzt ihr Absorptionsmaximum bei $\lambda_A = 485$ nm und die dianionische bei $\lambda_{2A} = 491$ nm.

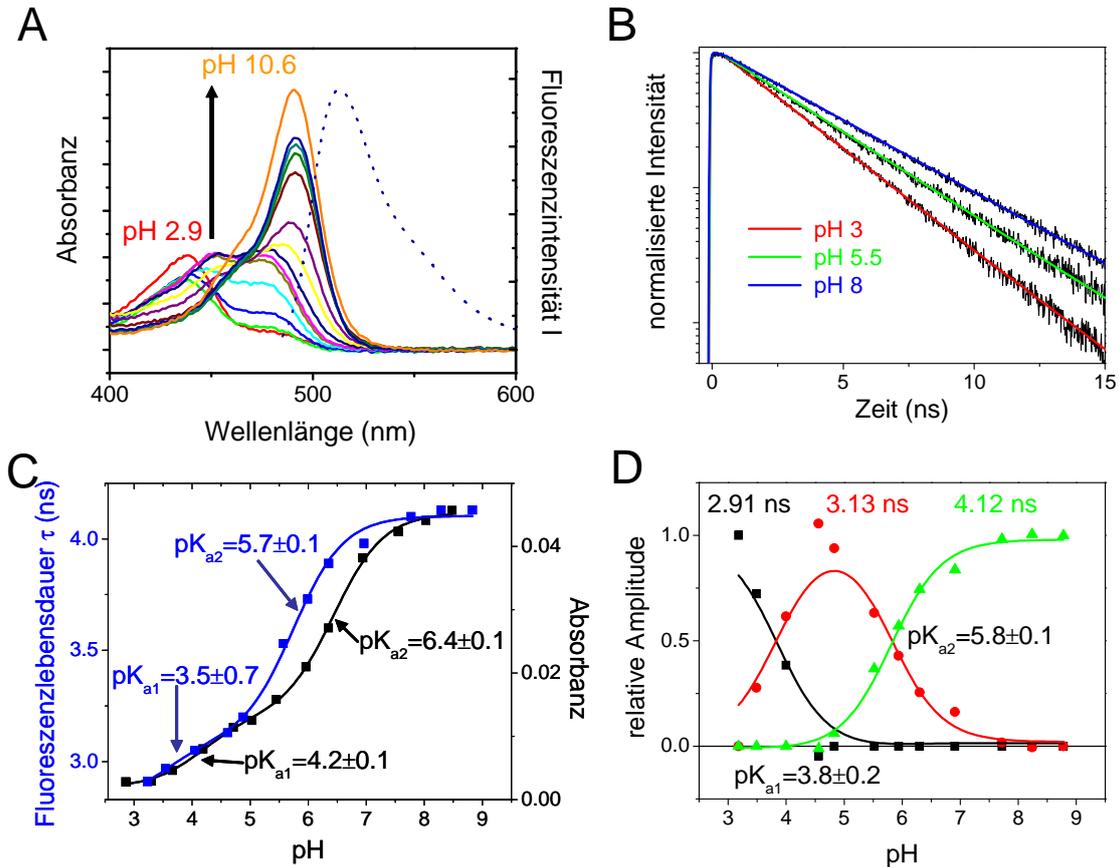


Abbildung 35: Spektrale Eigenschaften des Fluoresceins: **A:** Die pH-Abhängigkeit der Absorptionsspektren (durchgezogene Linien) im Bereich von pH 2.9 bis pH 10.6 und das Fluoreszenzemissionspektrum bei pH 8.5 (gepunktete Linie) bei 20°C sind dargestellt (50 mM Puffer, 150 mM NaCl). **B:** Vergleich der Fluoreszenzzerfallskurven von IAF bei verschiedenen pH-Werten. **C:** Die pH-Abhängigkeit des Fluoreszenzlebensdauer τ (blau) und der Absorption bei 491 nm (schwarz) von IAF sind dargestellt. **D:** Alternative Analyse der Fluoreszenzlebensdauer mit τ_N (schwarz), τ_A (rot) und τ_{2A} (grün) von IAF. Alle Messungen wurden mit 2 μ M IAF, 50 mM MES-Bis-Tris-Propan und 150 mM NaCl bei 20°C durchgeführt. Bei den Fluoreszenzmessungen war $\lambda_{\text{ex}} = 484$ nm, Emission wurde über OG515 aufgenommen.

Fluorescein wurde als Fluorescein-Dinatriumsalz ($F - Na_2$) und als Iodoacetylfluorescein (IAF) in 50 mM Puffer und 150 mM NaCl bei 20°C charakterisiert. Dazu wurden pH-Reihen der Absorption und der Fluoreszenzlebensdauer gemessen. Die pH-abhängigen Absorptionsspektren sind in Abb. 35A (durchgezogene Linien) dargestellt, ebenso wie ein charakteristisches Fluoreszenzemissionsspektrum (gestrichelte Linie). Zur Messung der Fluoreszenzlebensdauer wurden

Ladungszustand des Fluoresceins	Extinktionskoeffizient @ $\lambda = 484 \text{ nm}$ ($[\text{Mol}\cdot\text{cm}]^{-1}$)
Kation	860
Neutral	12000
Anion	39000
Dianion	66000

Tabelle 2: Extinktionskoeffizienten bei unterschiedlichen Ladungszuständen von Fluorescein, bei Annahme von $\epsilon_{2A}(494 \text{ nm}) = 77000[\text{M}\cdot\text{cm}]^{-1}$ ¹⁷

die Proben bei $\lambda_{\text{Ex}} = 484 \text{ nm}$ angeregt, da die neutrale, die monoanionische und dianionische Form bei dieser Wellenlänge eine signifikante Absorption besitzen. Die Extinktionskoeffizienten $\epsilon(484 \text{ nm})$ der einzelnen Fluoresceinzustände sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Zur Bestimmung der Protonierungsübergänge im pH-Bereich von 3 bis 9 des Fluoresceins wurde die Änderung der Absorption bei $\lambda_{\text{max}2}$ (genauer: bei $\lambda_{2A} = 491 \text{ nm}$) ermittelt. Dieser pH-Bereich überspannt den Bereich des neutralen Fluoresceins bis zum zweiwertigen Anion, deren Absorptionsanteile $A(\lambda_{\text{max}2}) > 0$ und daher für die Bestimmung der Protonierungsübergänge geeignet sind (Abb. 35A). Diese wurden mittels Henderson-Hasselbalch-Funktion gefittet. Man erhält zwei Protonierungsgleichgewichte $\text{pK}_{a1A\text{bs}} = 4.2 \pm 0.1$ und $\text{pK}_{a2A\text{bs}} = 6.4 \pm 0.1$ (Abb. 35A schwarze Kurve). Aus der Analyse der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer τ der zeitaufgelösten Fluoreszenzdauermessungen erhält man ebenfalls zwei Protonierungsgleichgewichtskonstanten mit $\text{pK}_{a1F1} = 3.5 \pm 0.7$ und $\text{pK}_{a2F1} = 5.7 \pm 0.1$ (Abb. 35A blau). Dabei ist die Fluoreszenzlebensdauer für das neutrale Fluorescein $\tau_{\text{N}} = 2.9 \pm 0.1 \text{ ns}$, für das Fluoresceinmonoanion $\tau_{\text{A}} = 3.2 \pm 0.1$ und für das Fluoresceindianion $\tau_{\text{DA}} = 4.1 \pm 0.1$. Zusätzlich wurde ein globaler Fit über den gesamten gemessenen pH-Bereich mit den τ_{N} , τ_{A} und τ_{DA} , welche die Fluoreszenzlebensdauer der einzelnen geladenen Zustände repräsentieren, folgendermaßen durchgeführt: $\tau^*(\text{pH}) = \sum_i \alpha_i(\text{pH}) \cdot \tau_i$ mit $\sum \alpha_i = 1$. Für die Fits wurde τ_i variabel gehalten. Der globale Fit ergibt für die Fluoreszenzlebensdauerzeiten der geladenen Zustände: $\tau_{\text{N}} = 2.91 \text{ ns}$, $\tau_{\text{A}} = 3.13 \text{ ns}$ und $\tau_{2A} = 4.12 \text{ ns}$ (Abb. 35D). Die Analyse der relativen Amplituden der einzelnen $\alpha_i(\text{pH})$ gibt Informationen über den Anteil des Farbstoffes im jeweiligen Ladungszustand über den pH. Der globale Henderson-Hasselbalch-Fit zeigt zwei Protonierungsgleichgewichte mit $\text{pK}_{aA\text{mp}1} = 3.8 \pm 0.2$ und $\text{pK}_{aA\text{mp}2} = 5.8 \pm 0.1$. τ_{N} ist bei pH 3 bei etwa 100% und erreicht bei etwa pH 5.5 0%. τ_{A} besitzt ihr Maximum bei etwa pH 4.8 und fällt bis etwa pH 7.5 auf 0% ab. τ_{DA} steigt von pH 5 bis pH 7.5 auf 100% an (Abb. 35D). Die pK_{a1} - und pK_{a2} -Werte aus den Fluoreszenzlebensdauer-Messungen sind gegenüber den pK-Werten bei der Absorption signifikant zu niedrigeren pK-Werten verschoben. Diese Verschiebung wird durch den angeregten Zustand des Fluoresceins ausgelöst und kann mit Hilfe des Förster-Zyklus quantitativ überschlagen werden [Förster, 1950]:

$$\text{pK}_a^* = \text{pK}_a - 20.8 \cdot \Delta\bar{\nu}_{0-0} \quad (5.1)$$

pK_a^* ist der Übergang im angeregten Zustand, $\Delta\bar{\nu}_{0-0}$ die Differenz der Wellenzahlen zwischen den Absorptionsmaxima der einzelnen Protonierungszustände. Die Absorptionsmaxima liegen bei $\lambda_{\text{A}} = 481 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{DA}} = 492 \text{ nm}$, daraus erhält man eine Verschiebung um etwa eine pH-Einheit. Das passt relativ gut zu der experimentell ermittelten Differenz von 0.7 pH-Einheiten.

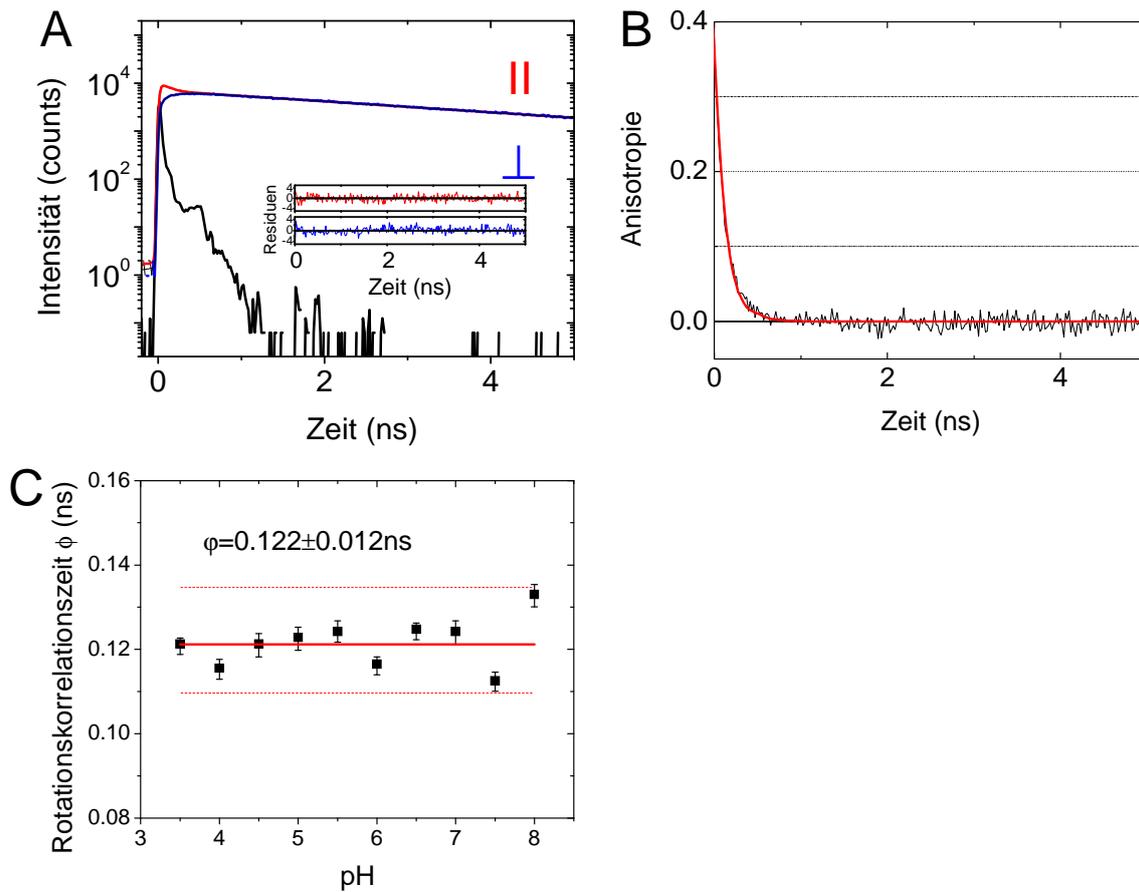


Abbildung 36: pH-Abhängigkeit der IAF Fluoreszenzanisotropie. **A:** Die gemessenen zeitaufgelösten Fluoreszenzzerfallskurven $I_{\parallel}(t)$ und $I_{\perp}(t)$ und ihre Fits (rot: parallel, blau: senkrecht) sind im oberen Graph dargestellt ($\tau = 3.97$ ns, $\chi^2 = 1.08$). Ihre dazugehörigen Residuen sind in den unteren Graphen gezeigt. **B:** Die Anisotropiekurve $r(t)$ wird aus $I_{\parallel}(t)$ und $I_{\perp}(t)$ berechnet. Die Rotationskorrelationszeit beträgt $\phi = 106$ ns. **C:** pH-Abhängigkeit der Rotationskorrelationszeit ϕ von freiem Fluorescein in Lösung. Meßbedingungen: $\lambda_{ex} = 484$ nm, Fluoreszenzaufnahme über OG515 Kantenfilter. Messung von B und C wurden in Tris pH 8.8 und bei 37°C durchgeführt.

Die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer des Fluoresceins kann auch zur Detektion von lokalen pH-Änderungen genutzt werden, wie z.B. zur Detektion von pH-Profilen innerhalb einer Zelle [Lin et al., 2003].

Desweiteren wurden Fluoreszenzanisotropiemessungen im Bereich von pH 3 - 9 durchgeführt. Bei einer typischen Messung wird die zeitaufgelöste Fluoreszenz parallel (I_{\parallel}) und senkrecht (I_{\perp}) zum vertikal polarisierten Anregungsstrahl detektiert (Abb. 36A) und daraus die Anisotropie (Abb. 36B, Formel 3.13) berechnet. Die Analyse der Fluoreszenzanisotropiemessungen für das Fluorescein-Natriumsalz zeigen, daß die Anisotropie $r(t)$ monoexponentiell zerfällt (Abb. 36B exemplarisch für alle Messungen der pH-Reihe). Die Rotationskorrelationszeit ϕ des freien Farbstoffes ist konstant über den gemessenen pH-Bereich und ist bei $T=20^{\circ}\text{C}$ $\phi = 0.122 \pm 0.012$ ns (Abb. 36C). Dies bedeutet, daß die Protonenkonzentration keinen intrinsischen Einfluß auf die Eigenbewegung des Labels besitzt und dieser daher für die Anisotropiemessungen von fluoresceinmarkierten Proteinen generell geeignet ist.

5.1.2 Rhodopsin-Fluorescein-Komplex

Nachdem das Verhalten von freiem Fluorescein bei verschiedenen pH-Werten charakterisiert wurde, kann nun überprüft werden, wie sich der Einfluß der Proteinumgebung auf die Fluoreszenzeigenschaften des Fluoresceins auswirkt. Als Protein wird das Apoprotein Opsin (Rhodopsin ohne Retinal) genutzt, an welches das Fluorescein kovalent gebunden ist. Opsin wurde für diese Messungen aus der nativen Diskmembran isoliert, in dem Detergenz β -DM gereinigt und als Protein-Detergenz Mizelle verwendet. Das Detergenz β -DM hüllt den membranständigen Teil des Proteins ein und stabilisiert damit seine räumliche Struktur. Da bekannt ist, daß Opsin in Detergenz nicht lange stabil ist, wurde es nach der Präparation in Aliquots eingefroren und bei der Messung sofort aufgebraucht [McKibbin et al., 2007].

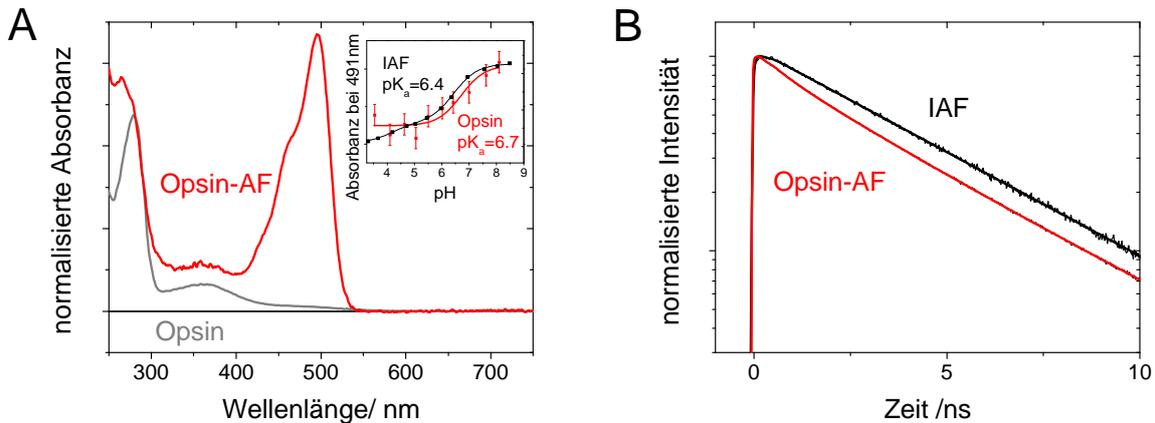


Abbildung 37: Spektroskopische Eigenschaften von Opsin-C316-AF. **A:** Absorptionsspektren von solubilierten Opsin und Opsin-AF in PBS-Puffer pH 7.2. Deutlich ist die Fluoresceinabsorptionsbande bei 500 nm zu erkennen. **Inset:** pH-Abhängigkeit der Opsin-AF Absorption bei 491 nm im Vergleich zu der von IAF frei in Lösung. **B:** Vergleich der Fluoreszenzzerfallskurven von freiem IAF (schwarz) und Opsin-AF (rot). $\lambda_{ex} = 484$ nm, Fluoreszenzaufnahme über OG515 Kantenfilter. Bedingungen: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 20°C,

Die Absorptionsspektren von Opsin (Abb. 37A) zeigen eine Absorptionsbande bei 280 nm, die durch im Apoprotein enthaltenen Tryptophane (Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280} = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und Tyrosine ($\epsilon_{280} = 1200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) erzeugt wird. Das Opsin-AF besitzt zusätzlich eine Absorptionsbande bei etwa 490 nm. Da das Opsin kein über eine protonierte Schiff'sche Base gebundenes *11-cis*-Retinal enthält, kommt die Absorption im Bereich von 500 nm nur vom Farbstoff zustande.

Zur Bestimmung der Protonierungszustände des Farbstoffes wurde die Fluoresceinabsorption bei 491 nm vom Opsin-AF über den gesamten gemessenen pH-Bereich von pH 3.5 - 8.5 bestimmt (Abb. 37A Inset). Aufgrund der geringen Probenkonzentration sind die Meßwerte stark verrauscht, daher konnte mittels Henderson-Hasselbalch-Funktion das Protonierungsgleichgewicht zwischen dem monoanionischen und dianionischen Zustand des Fluoresceins ermittelt werden ($pK_a = 6.7 \pm 0.3$). Dieser ist im Vergleich zum freien IAF zu etwas höheren pH-Werten verschoben. Die Verschiebung kann durch das cytoplasmatische Oberflächenpotential des Opsins, an deren Seite das Fluorescein gebunden ist, erklärt werden [Möller und Alexiev, 2009]. An der cytoplasmatischen Oberfläche hat das Rhodopsin ein negatives Potential, welches zu einer Verschiebung des pK -Wertes zu höheren pH-Werten führt. Zusätzlich ist die Peakwellenlänge des Fluorescein-Dianions

im gebundenen Zustand mit $\lambda_{\text{max,Ops-AF}}(\text{pH } 8.5) = 499 \text{ nm}$ gegenüber dem freien Fluorescein-Dianion mit $\lambda_{\text{max,IAF}}(\text{pH } 8.5) = 491 \text{ nm}$ zu längeren Wellenlängen verschoben. Das deutet darauf hin, daß die Dielektrizitätskonstante zu niedrigeren Werten verschoben ist [Alexiev et al., 1994, Alexiev, 1994].

Der Vergleich der Fluoreszenzzerfallskurven von IAF frei in Lösung und Opsin-AF zeigt einen schnelleren Zerfall der Fluoreszenz beim Opsin-AF. Die Analyse des Fluoreszenzzerfalls zeigt, daß IAF monoexponentiell gefittet werden kann. Der Fluoreszenzzerfall des Opsin-AF muß mit einer Modellfunktion, die aus einer Summe von drei Exponentialfunktionen besteht, angepasst werden. Die langsame Fluoreszenzzerfallszeit $\tau_3 \approx 4.3 \text{ ns}$ entspricht dabei dem Fluoreszenzzerfall des freien IAF, die beiden schnellen ($\tau_1 = 0.39 \pm 0.02 \text{ ns}$, $\tau_2 = 2.00 \pm 0.05 \text{ ns}$) werden durch Fluoreszenzlöschung aufgrund einer Interaktion mit der Proteinmatrix hervorgerufen (Stoßquenching).

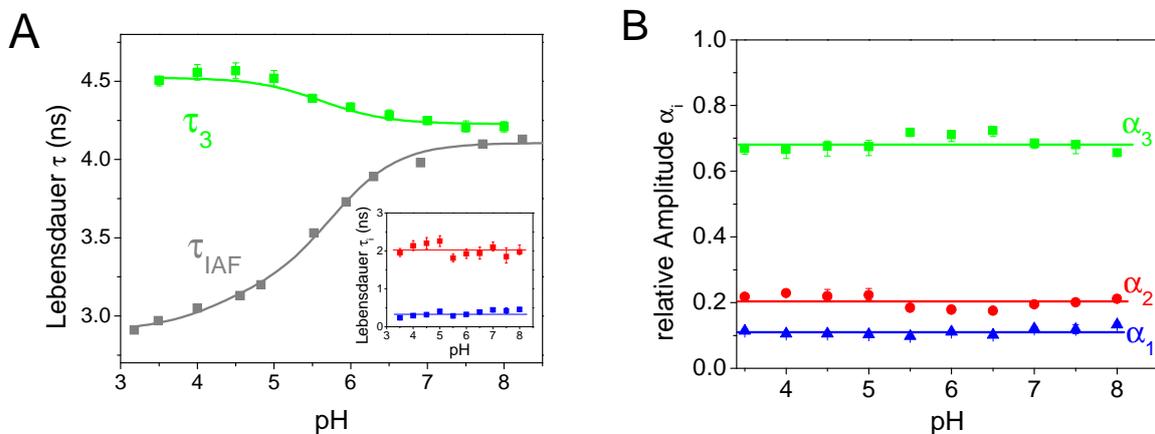


Abbildung 38: Übersicht über die Fluoreszenzlebensdauer und -amplituden des an Opsin gebundenen Fluorescein in Mizellen. **A:** Die Fluoreszenzlebensdauer τ_3 von Opsin-AF (grün) wird mit der von freien IAF (grau) verglichen. Im Inset sind die pH-Abhängigkeiten von τ_1 und τ_2 dargestellt. **B:** Die relativen Amplituden α_i der Fluoreszenzlebensdauer zeigen keine pH-Abhängigkeit. Bedingungen: $1 \mu\text{M}$ Opsin-C316-AF, 50 mM Puffer (Citrat-Puffer (pH 3.5-4.5), MES (pH 5-7), Tris (pH 7.5-8)), 150 mM NaCl und 0.05% β -DM. $\lambda_{\text{ex}} = 484 \text{ nm}$, Fluoreszenzaufnahme über OG515 Kantenfilter.

Die Analyse der pH-Abhängigkeiten der Fluoreszenzlebensdauer τ_i zeigt keine signifikante pH-Abhängigkeit der beiden schnellen Zerfallskomponenten τ_1 und τ_2 , während die Fluoreszenzlebensdauer τ_3 eine pH-Abhängigkeit mit einem Protonierungsgleichgewicht zwischen Mono- und Dianion von $\text{pK}_a = 5.6 \pm 0.1$ besitzt. Der neutrale und der monoanionische Zustand besitzen die gleiche Fluoreszenzlebensdauer von $\tau_N = \tau_A = 4.55 \pm 0.05 \text{ ns}$. Der Vergleich der Fluoreszenzlebensdauer τ_{IAF} mit τ_3 vom gebundenen Fluorescein zeigt ein unterschiedliches Verhalten zwischen den Protonierungszuständen: τ_{IAF} steigt von $\tau_{\text{IAF,N}} = 2.9 \text{ ns}$ bis zum dianionischen Zustand $\tau_{\text{IAF,DA}} = 4.1 \text{ ns}$ an (Abb. 38A grau), während beim gebundenen Fluorescein die Fluoreszenzlebensdauer zum alkalischen hin mit $\tau_{\text{DA}} = 4.20 \pm 0.03 \text{ ns}$ kleiner wird.

Die relativen Amplituden α_i zeigen keine signifikante pH-Abhängigkeit und liegen bei $\alpha_1 = 0.11$, $\alpha_2 = 0.20$ und $\alpha_3 = 0.69$. Die Amplituden der beiden schnellen Komponenten besitzen nur ca. 30% der Gesamtamplitude.

	Neutral (pH 3.5)	Monoanion (pH 6)	Dianion (pH 8.5)
τ^*	3.5[$\pm_{0.15}^{0.11}$] ns	3.6[$\pm_{0.2}^{0.2}$] ns	3.2[$\pm_{0.10}^{0.12}$] ns
$\bar{\tau}$	4.2[$\pm_{0.2}^{0.2}$] ns	4.1[$\pm_{0.3}^{0.3}$] ns	3.9[$\pm_{0.2}^{0.2}$] ns

Tabelle 3: Übersicht der nach relativen Amplituden gewichteten Fluoreszenzlebensdauer τ^* und nach fraktionalem Amplituden gewichteten Fluoreszenzlebensdauer $\bar{\tau}$ (Formel 3.11) von Opsin-AF in β -DM Mizellen. Bedingungen: 1 μ M Opsin-C316-AF, 50 mM Puffer (Citrat-Puffer (pH 3.5-4.5), MES (pH 5-7), Tris (pH 7.5-8)), 150 mM NaCl und 0.05% β -DM. Fehler wurden über Konfidenzintervallanalyse bestimmt.

Die mittleren Lebensdauer wurden mit ihren relativen und fraktionalem Amplituden gewichtet und sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Betrachtet man die spektroskopischen Eigenschaften des Fluorescein nach Bindung mit dem Protein, so fällt im Vergleich zum freien IAF auf, daß die ausgeprägte pH-abhängige Änderung der Fluoreszenzlebensdauer vom freien IAF beim am Protein gebundenen Fluorescein stark gedämpft ist. Es treten auch Fluoreszenzlöschungprozesse auf. Letztere drücken sich durch einen multiexponentiellen Fluoreszenzzerfall aus. Dabei liegt die langsame Zerfallskomponente τ_3 im Bereich der Fluoreszenzlebensdauer des freien IAF bei etwa 4 ns. Die beiden schnellen Zerfallskomponenten sind demzufolge auf eine Interaktion mit der Proteinumgebung des Fluoresceins zurückzuführen. Diese sind pH-unabhängig im Bereich von pH 3.5-8, wie ihre Amplituden und Zerfallszeiten zeigen. Die Fluoreszenzzerfallszeit τ_3 ist mit ca. 70% die dominierende Zerfallskomponente und ist außerdem pH-abhängig. τ_3 zeigt aber eine pH-Abhängigkeit, welche der des freien Fluoresceins entgegengesetzt ist und dessen Amplitude der "Lebensdauertitrationskurve" um etwa einen Faktor drei reduziert ist. Der Vergleich mit der pH-Abhängigkeit der Fluoresceinabsorption (Abb. 37 Inset) mit einer Gleichgewichtskonstante von $pK_a = 6.7$ von Opsin-AF zeigt einen deutlich ins saure verschobenen pK -Wert der Fluoreszenz ($pK_a = 5.6$) und damit des angeregten Zustandes.

Es konnte hier am Beispiel von Opsin-AF gezeigt werden, daß die bekannte pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von Fluorescein, gebunden an der Oberfläche eines Proteins, von den Eigenschaften der umgebenden Proteinmatrix stärker beeinflusst ist als vom pH-Wert des Puffers, d.h. der Protonenkonzentration in der Lösung. Änderungen der Proteinumgebung können sich somit in der Fluoreszenzlebensdauer von gebundenen Fluorescein widerspiegeln.

5.2 Fluorescein-Fluoreszenzzerfallszeiten τ_i als Indikator für Helix 8 - Umgebungsänderungen

Es ist bekannt, daß die Meta-II Bildung nach Lichtaktivierung des Rezeptors von den physikochemischen Parametern Temperatur und pH-Wert der wässrigen Umgebung abhängig ist. Dabei spielt die Membranumgebung eine ebenso wichtige Rolle. So wurde bereits in *Matthews et al. [1963]* gezeigt, daß in nativer Membranumgebung bei niedrigen Temperaturen und hohem pH-Wert die Meta-II Bildung nahezu vollständig unterdrückt werden kann. Dagegen wird auch bei niedrigen Temperaturen in β -DM solubilisierten Rhodopsin pH-unabhängig Meta-II gebildet.

Zur Detektion von Meta-II von fluoreszenzmarkierten Rhodopsinmolekülen wurde die De-protonierung der Schiffschens Base am Lys296 als Indikator genutzt, dabei verschiebt sich die Absorptionsbande des Retinals von 500 nm nach 380 nm (Kapitel 2.1.3) (Abb. 6). Die Absorptionsmessungen wurden mit transienten Flash-Absorptionsmessungen durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Endamplituden (Absorptionsänderung) der Messungen ermittelt und aufgetragen, mit der Annahme, daß die maximale Absorptionsänderung 100% Meta-II entspricht (Abb. 39). Sie zeigen bei 0°C ein Gleichgewicht zwischen Meta-I und -II von $pK_a(0^\circ C) = 6.6 \pm 0.1$. Dabei wird die nahezu vollständige Aktivierung im sauren pH-Bereich im alkalischen nahezu vollständig unterdrückt. Bei physiologischer Temperatur (37°C) wird über den gesamten pH-Bereich Meta-II nach Lichtaktivierung gebildet, wobei sich der relative Anteil der aktiven Konformation mit $pK_a(37^\circ C) = 7.9 \pm 0.1$ auf ca. 60% zurückgeht. In β -DM Mizellen dagegen kann auch unter diesen Bedingungen fast vollständig Meta-II gebildet werden (Abb. 39).

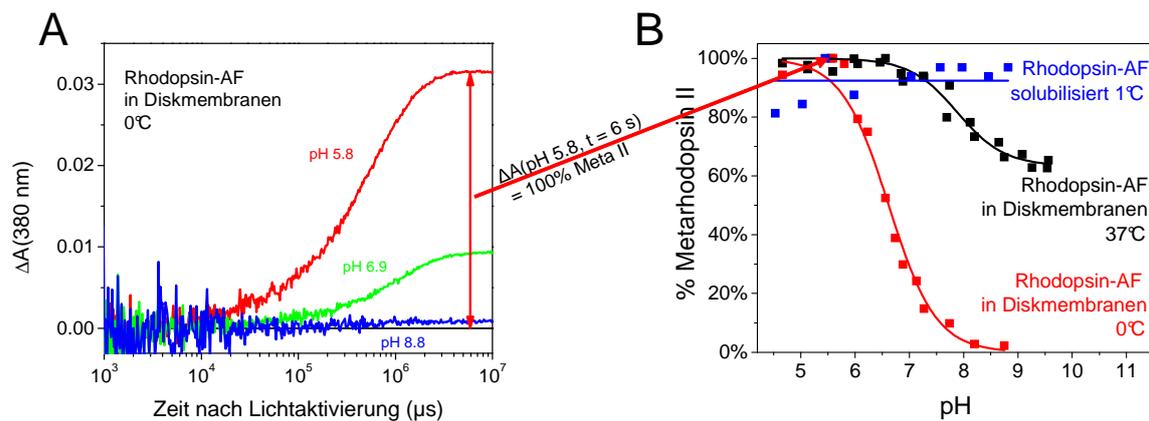


Abbildung 39: Meta-II Bildung unter verschiedenen Bedingungen. **A:** Der zeitliche Verlauf der Bildung von Meta-II (Absorptionsänderung bei 380 nm) zeigt die Abhängigkeit vom pH. **B:** Die Endamplituden der Kinetiken wurden normiert und der relative Anteil des aktiven Meta-II Intermediates für fluoreszenzmarkiertes Rhodopsin in Membranen (0°C: rot, 37°C: schwarz) und von fluoreszenzmarkierten solubilisierten Rhodopsin in DM-Mizellen (blau, 0.05% β -DM) bei 1°C nach Lichtaktivierung aufgetragen. Bedingungen: 10 μ M Rhodopsin-AF, 50 mM MES-Bis-Tris-Propan, 150 mM NaCl

Ebenfalls kann auch Opsin in nativen Membranen eine Konformation ausbilden, welche das G-Protein Transducin binden und auch aktivieren kann. Diese aktive Konformation bildet Opsin aber nur bei sehr saurem pH aus und fällt mit einem Übergang von $pK_a = 3.8$ auf Null [Vogel und Siebert, 2001, Vogel et al., 2007].

Im vorhergehenden Kapitel 5.1.2 wurde am Beispiel des Opsin-AF Komplexes in β -DM Mizellen gezeigt, daß die zeitaufgelösten Fluoreszenzeigenschaften von gebundenen Fluorescein direkt vom Protein beeinflusst werden. Im folgenden wird die Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauerparameter von an Helix 8 gebundenen Fluorescein bei verschiedenen Temperaturen, Intermediatzuständen und Lipidzusammensetzungen untersucht. Es soll herausgefunden werden, ob es eine Korrelation zwischen zeitaufgelösten Fluoreszenzeigenschaften von Fluorescein und der aktiven Proteinkonformation gibt. Die pH-abhängigen Messungen wurden außer für Opsin-AF in Mizellen auch für Opsin-AF in nativen Diskmembranen ($T=20^\circ\text{C}$), solubilisierten Rhodopsin in β -DM Mizellen ($T=15^\circ\text{C}$) und Rhodopsin in nativen Diskmembranen ($T=0^\circ\text{C}$ & $T=37^\circ\text{C}$) durchgeführt.

5.2.1 Apoprotein Opsin

Analog zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften von gebundenen Fluorescein des solubilisierten Apoproteins Opsin-AF (in β -DM Mizellen) wurde Opsin-AF in nativen Membranen untersucht. Der Chromophor Retinal wurde chemisch (Kaptiel 3.6.3) aus dem in den Diskmembranen enthaltenen Rhodopsin entfernt.

Fluorescein gebunden an Opsin in Membranen zeigt ebenfalls pH-abhängige Verschiebungen der Absorptionsbanden wie das freie Fluorescein. Der Übergang vom Monoanion zum Dianion ist zu noch höheren pH-Werten verschoben als in Opsin-AF Mizellen und liegt bei $\text{pK}_a = 7.2 \pm 0.1$ (Abb. 40 Inset). Die Peakwellenlänge des Fluorescein-Dianions ist im gebundenen Zustand mit $\lambda_{\text{max,Ops-AF}}(\text{pH } 8.6) = 499 \text{ nm}$ gegenüber dem freien Fluorescein-Dianion mit $\lambda_{\text{max,IAF}}(\text{pH } 8.5) = 491 \text{ nm}$ zu längeren Wellenlängen verschoben und stimmt mit der Peakwellenlänge von Opsin-AF in Mizellen überein.

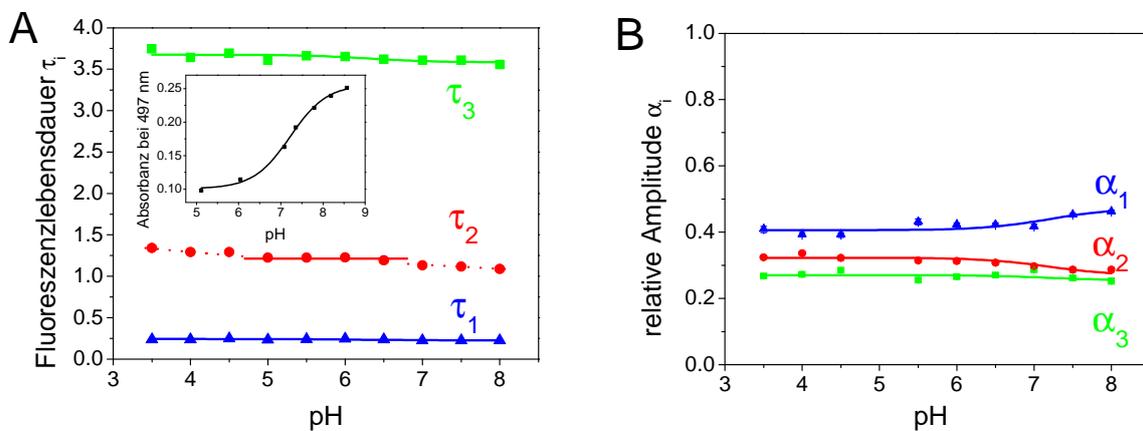


Abbildung 40: Übersicht über die Fluoreszenzlebensdauerparameter des Opsin-AF Komplexes in nativen Membranen. **A:** pH-Abhängigkeit der drei Fluoreszenzzerfallszeiten τ_i des Opsin-AF. Inset: Absorptionsabhängigkeit von Opsin-AF in Membranen. **B:** pH-Abhängigkeit der zu A gehörigen fraktionellen Fluoreszenzamplituden. Bedingungen: 50 mM Puffer (Citrat-Puffer (pH 3.5-4.5), MES (pH 5-7), Tris (pH 7.5-8)), 150 mM NaCl, 20°C . $\lambda_{\text{ex}} = 484 \text{ nm}$, Fluoreszenzaufnahme über OG515 Kantenfilter.

Wie in den Opsin-AF Mizellen müssen die zeitaufgelösten Fluoreszenzzerfälle der pH-Reihe des an das Apoprotein Opsin in Diskmembranen gebundenen Fluorescein mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen angepasst werden (Abb. 40A). Es treten hier auch zwei kurze

	Neutral (pH 3.5)	Monoanion (pH 6)	Dianion (pH 8)
τ^*	$1.5[\pm_{0.02}^{0.015}]$ ns	$1.4[\pm_{0.04}^{0.03}]$ ns	$1.3[\pm_{0.014}^{0.03}]$ ns
$\bar{\tau}$	$2.8[\pm_{0.18}^{0.19}]$ ns	$2.7[\pm_{0.18}^{0.17}]$ ns	$2.7[\pm_{0.16}^{0.2}]$ ns

Tabelle 4: Übersicht der nach relativen Amplituden gewichteten Fluoreszenzlebensdauer τ^* und nach fraktionalem Amplituden gewichteten Fluoreszenzlebensdauer $\bar{\tau}$ (Formel 3.11) von Opsin-AF in β -DM in nativen Diskmembranen. Bedingungen: 50 mM Puffer (Citrat-Puffer (pH 3.5-4.5), MES (pH 5-7), Tris (pH 7.5-8)), 150 mM NaCl.

Zerfallszeiten mit $\tau_1 \approx 0.2$ ns und $\tau_2 \approx 1.2$ ns auf, wobei die Zerfallszeit τ_1 keine und τ_2 nur eine geringe pH-Abhängigkeit zeigen. τ_3 ist die Fluoreszenzlebensdauer und liegt im Bereich der Fluoreszenzlebensdauer des freien Farbstoffes IAF. Sie spiegelt aber nicht den Ladungszustand des Farbstoffes wieder, da sie über den gesamten pH-Bereich mit $\tau_N = \tau_A = \tau_{DA} = 3.6 \pm 0.1$ nahezu konstant und kürzer als die Fluoreszenzlebensdauer des freien Fluorescein-Dianions ($\tau_{DA} = 4.1 \pm 0.1$ ns) ist. τ_2 zeigt eine schwache pH-Abhängigkeit, im sauren ist $\tau_2(\text{pH } 3.5) = 1.3$ ns, fällt auf $\tau_2(\text{pH } 5-6.5) = 1.2$ ns und im alkalischen auf $\tau_2(\text{pH } 8) = 1.1$ ns. τ_2 und $\tau_1 = 0.2$ ns sind jeweils schneller als die entsprechende Zerfallskomponente von Opsin-AF in Mizellen.

Die relativen Amplituden α_i der Fluoreszenzlebensdauerkomponenten zeigen eine schwache pH-Abhängigkeit im alkalischen Bereich, wobei der Anteil der schnellen Komponente prozentual ansteigt, während die der anderen fallen. Die globale Anpassung mit einer Henderson-Hasselbalch-Funktion ergibt die Gleichgewichtskonstante von $\text{pK}_a = 7.2 \pm 0.4$.

Der Vergleich der relativen Amplituden der Mizellen- und Membranexperimente zeigt, daß in Mizellen α_3 mit etwa 70% die dominierende Komponente darstellt, während sie in Membranen nur um etwa 25% liegt. Die relative Amplitude α_2 liegt um etwa 20%, in Mizellen um 30%. Die relative Amplitude α_1 liegt bei mindestens 40% in Mizellen und ist damit die dominierende Zerfallskomponente, in Membranen liegt sie im Mittel bei 12%.

Die kovalente Kopplung des Fluoresceins an die Oberfläche des Apoproteins in Membranen verschiebt ebenfalls wie bei den Mizellenmessungen die apparenten pK_a -Werte der Übergänge zwischen den verschiedenen Ladungszuständen zu höheren pH-Werten aufgrund der negativen Oberflächenladung des Opsins und der negativen Ladung der Lipide [Möller und Alexiev, 2009].

Auch in Membranen führt die kovalente Kopplung des Fluoresceins an der Oberfläche des Apoproteins zu einem multiexponentiellen Fluoreszenzzerfallsverhalten. Die langsame Zerfallskomponente τ_3 mit 3.6 ns ist konstant über den gesamten pH-Bereich. Die beiden schnellen Zerfallskomponenten verschieben sich gegenüber den Werten, die für Opsin-AF in Mizellen bestimmt wurden; von $\tau_{1\text{Miz}} = 0.4$ ns (12%) auf $\tau_{1\text{Mem}} = 0.2$ ns (40%) für die schnellste Zerfallskomponente und von $\tau_{2\text{Miz}} = 2.0$ ns (30%) auf $\tau_{2\text{Mem}} = 1.3$ ns (20%) für die mittlere Zerfallskomponente. Das bedeutet, daß nicht nur die Interaktion mit der Protein-, sondern auch mit der Membranumgebung einen Einfluß auf die beiden schnellen Fluoreszenzzerfallskomponenten besitzt. Sie zeigt eine leichte pH-abhängigkeit im alkalischen Bereich (pH 6-8), wie die Zerfallskomponenten und ihre relativen Amplituden zeigen. Die dominierende Zerfallskomponente ist im Falle von Opsin in Membranen die schnellste Zerfallskomponente τ_1 mit etwa 40% relativer Amplitude.

Dies läßt darauf schließen, daß die Membranumgebung einen spezifischen Quenchingeffekt ausübt, der sich in der Amplitude der schnellsten Zerfallskomponente τ_1 bemerkbar macht. Darüber hinaus sind die Fluoreszenzlebensdauer τ_3 als auch die mittlere Lebensdauer τ^* bzw. $\bar{\tau}$ nicht mehr pH-abhängig. Die relative Amplitude α_1 ist abhängig von der Membranumgebung, τ_2 zeigt eine Abhängigkeit von der Proteinumgebung.

5.2.2 Rhodopsin Diskmembranen

Um herauszufinden, ob es eine Korrelation zwischen den zeitaufgelösten Fluoreszenzeigenschaften von Fluorescein und der aktiven Proteinkonformation gibt, werden die Fluoresceinmarkierten Rhodopsin-Membranen vergleichend im inaktiven Dunkelzustand und im lichtaktivierten Meta-II Zustand untersucht.

An Rhodopsin gebundenes Fluorescein zeigt wie freies Fluorescein ebenfalls eine pH-abhängige Verschiebung der Absorptionsbanden [Möller und Alexiev, 2009]. Der Übergang vom Monoanion zum Dianion ist im Dunkelzustand ähnlich wie bei Opsin-Membranen bei $pK_a = 7.1 \pm 0.1$. Die Peakwellenlänge des Dianions im gebundenen Zustand mit $\lambda_{max} = 499$ nm ist gegenüber dem freien Fluorescein mit $\lambda_{max} = 491$ nm zu längeren Wellenlängen verschoben. Die Verschiebung wird durch die Dielektrizitätskonstante der Umgebung hervorgerufen [Alexiev, 1994]. Eine Erhöhung resultiert in einer Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen. Die Rotverschiebung wird bei Bindung des Fluoresceins an das Rhodopsin durch die unpolare Proteinumgebung hervorgerufen.

Da die pH-Abhängigkeit des aktiven Meta-II Intermediats temperaturabhängig ist [Mahalingam et al., 2008], werden in diesem Abschnitt bei Temperaturen von 0°C und 37°C die zeitaufgelösten Fluoreszenzeigenschaften vom gebundenen Fluorescein untersucht. Bei 0°C ist der Übergang von Meta-I nach Meta-II mit einer Protonierung der Glu134 an der cytoplasmatischen Oberfläche gekoppelt. Bei 37°C existiert bei alkalischem pH ein pH-unabhängiges Gleichgewicht zwischen Meta-I, inaktiven Meta-II (Meta-II_a) und der aktiven Rezeptorkonformation Meta-II_b (mit deprotonierter Glu134) [Mahalingam et al., 2008].

Die gemessenen Fluoreszenzzerfälle des Rhodopsin-AF in nativen Diskmembranen bei 0°C und 37°C werden mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen gefittet (Formel 3.9). Die langsame Zeit τ_3 ist dabei die Fluoreszenzzerfallszeit des freien Fluorescein. Die beiden kurzen Zerfallszeiten τ_1 und τ_2 werden durch Fluoreszenzlöschungsprozesse durch die Protein- und Membranumgebung hervorgerufen (Kapitel 5.2.1).

Anisotropie von Helix 8 bei 0°C

Beim inaktiven Rhodopsin ist die Zerfallszeit $\tau_1 = 0.2$ ns (44-53%) pH-unabhängig, τ_2 zeigt eine leichte pH-Abhängigkeit und fällt von $\tau_2(\text{pH } 5) = 1.3$ ns auf $\tau_2(\text{pH } 9) = 1.0$ ns und zeigt damit eine ähnliche Abhängigkeit wie die entsprechende Zerfallskomponente in Opsin-Membranen. Die Fluoreszenzlebensdauer τ_3 ($\tau_A = \tau_{DA} = 3.5 \pm 0.1$ ns) liegt im gleichen Bereich wie die von Opsin-Membranen und zeigt ebenfalls keine signifikante pH-Abhängigkeit.

Eine relevante pH-Abhängigkeit kann jedoch für die Amplituden α_3 und α_1 detektiert werden. Die Amplitude α_3 sinkt und die Amplitude α_1 steigt um etwa 10%. Der pK_a -Wert des Übergangs wurde mit $pK_a = 6.8 \pm 0.1$ bestimmt.

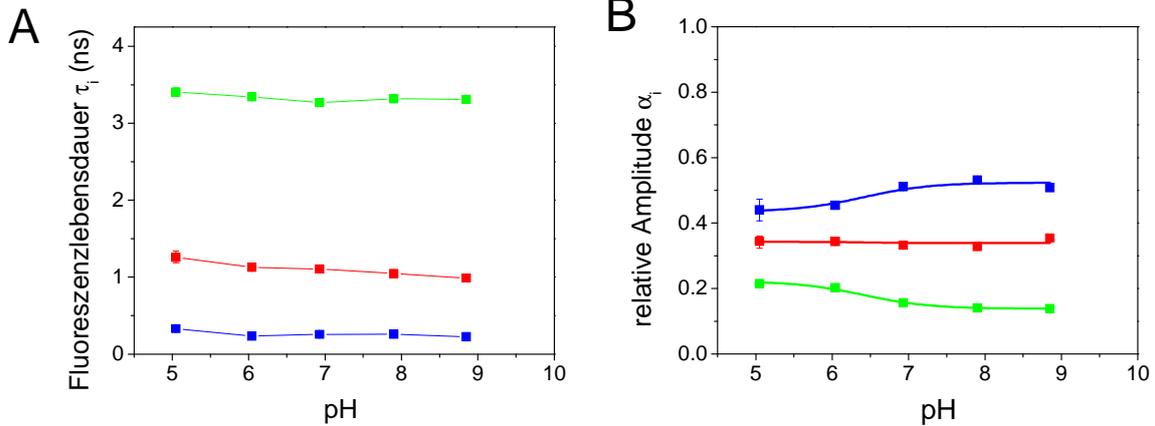
Wie in Opsin-Membranen ist die dominierende Zerfallskomponente die schnellste (τ_1) mit 44-53% relativer Amplitude. Die relative Amplitude der langsamen Zerfallskomponente τ_3 sinkt von 22% bei saurem pH, was vergleichbar ist mit der entsprechenden Amplitude bei Opsin-Membranen, auf 14% bei alkalischem pH ab.

Nach Lichtanregung zeigt die Zerfallszeit $\tau_1 = 0.2$ ns (40-50% relative Amplitude) keine pH-Abhängigkeit, während wie im Falle des inaktiven Rhodopsins die mittlere Zerfallszeit und $\tau_2 = 1.2$ ns eine leichte pH-Abhängigkeit besitzt. Im Gegensatz zum inaktiven Rhodopsin zeigt τ_3 eine signifikante pH-Abhängigkeit. Sie fällt von $\tau_3(\text{pH } 5) = 4.0$ ns auf $\tau_3(\text{pH } 9) = 3.6$ ns mit einem Übergang von $pK = 6.5 \pm 0.1$.

Eine signifikante pH-Abhängigkeit zeigen nur die relativen Amplituden α_1 und α_2 der Zerfallskomponenten. α_1 fällt dabei von 50% auf 40% und α_2 steigt von 23% auf 30%. Der pK -Wert des Übergangs konnte mit $pK = 5.3 \pm 0.2$ bestimmt werden.

Rhodopsin-AF in Membranen, 0°C

Rhodopsin im Dunkelzustand



Rhodopsin nach Lichtanregung

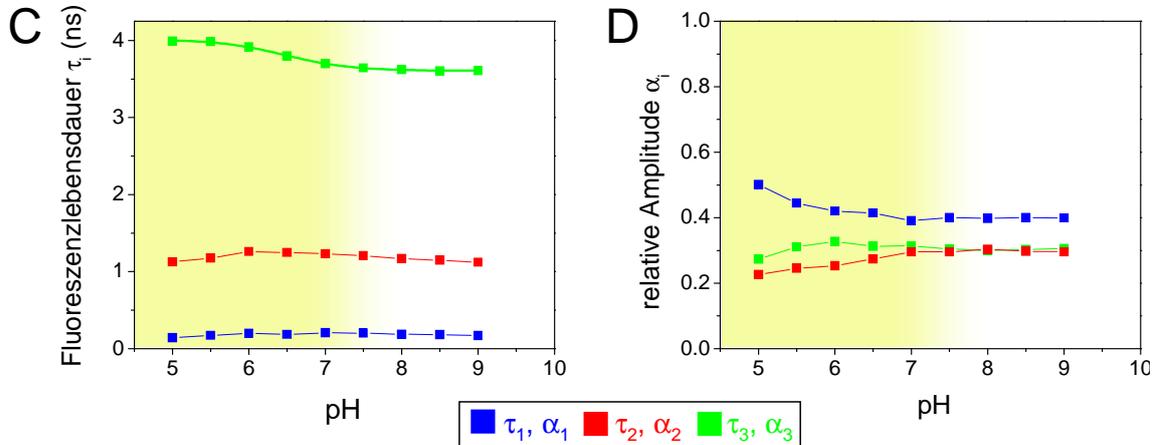


Abbildung 41: Übersicht der Ergebnisse der Fits aller Fluoreszenzlebensdauermessungen von Rhodopsin-C316-AF in nativen Diskmembranen bei 0°C. Analyse der Fluoreszenzlebensdauer (**A,C**) und der dazugehörigen relativen Amplituden (**B,D**) von Rhodopsin im Dunkelzustand und im Meta-II Intermediat. Der pH-Bereich des aktiven Zustands von Rhodopsin ist gelb hinterlegt. Bedingungen: 10 μ M Rhodopsin-AF, 50 mM MES-Bis-Tris-Propan, 150 mM NaCl, 0°C. λ_{ex} = 484 nm, Fluoreszenzaufnahme über OG515 Kantenfilter.

Wie im Dunkelzustand ist die dominierende Zerfallskomponente die schnellste (τ_1) mit 40-50%. Im Gegensatz dazu fällt die relative Amplitude dieser Komponente mit steigendem pH. Die Amplitude α_3 der langsamen Zerfallskomponente τ_3 ist relativ pH-unabhängig bei 30%.

Im Vergleich der pH-Abhängigkeiten zwischen inaktivem Dunkelzustand und lichtaktiviertem Meta-II Intermediat bei 0°C ergibt sich folgendes Bild:

1. Weder in Opsin-Membranen noch im Dunkelzustand von Rhodopsin-Membranen ist die Fluoreszenzlebensdauer von Fluorescein (τ_3) pH-abhängig.
2. Die Membranumgebung übt einen spezifischen Quencheffekt aus, welcher sich im Dunkelzustand in der relativen Amplitude α_1 ausdrückt.
3. Im lichtaktivierten Meta-II Intermediat zeigt die Fluoresceinlebensdauer τ_3 eine pH-Abhängigkeit mit $pK = 6.5 \pm 0.1$, bei der sie sich von 4.0 ns im saurem auf 3.6 ns bei alkalischem pH

ändert. Das Gleichgewicht von τ_3 korreliert dabei mit der Ausbildung des aktivem Meta-II mit $pK_a = 6.6 \pm 0.1$ (Abb.39). Die Fluoreszenzlebensdauer τ_3 des gebundenen Fluoresceins scheint daher unter diesen Bedingungen ein Indikator für die jeweilige Proteinkonformation darzustellen.

Anisotropie von Helix 8 bei 37°C

Bei 37°C sind im Dunkelzustand des Rhodopsin-AF in Membranen die Zerfallszeiten $\tau_1 = 0.2$ ns, $\tau_2 = 1.1$ ns und $\tau_3 = 3.3$ ns im Rahmen des Fehlers im Vergleich zu den Messungen bei 0°C pH-unabhängig. Die Fluoreszenzlebensdauer τ_3 spiegelt, wie auch in Opsin-Membranen, mit $\tau_A = \tau_{DA} = 3.3$ ns nicht den Ladungszustand des Fluoresceins wieder.

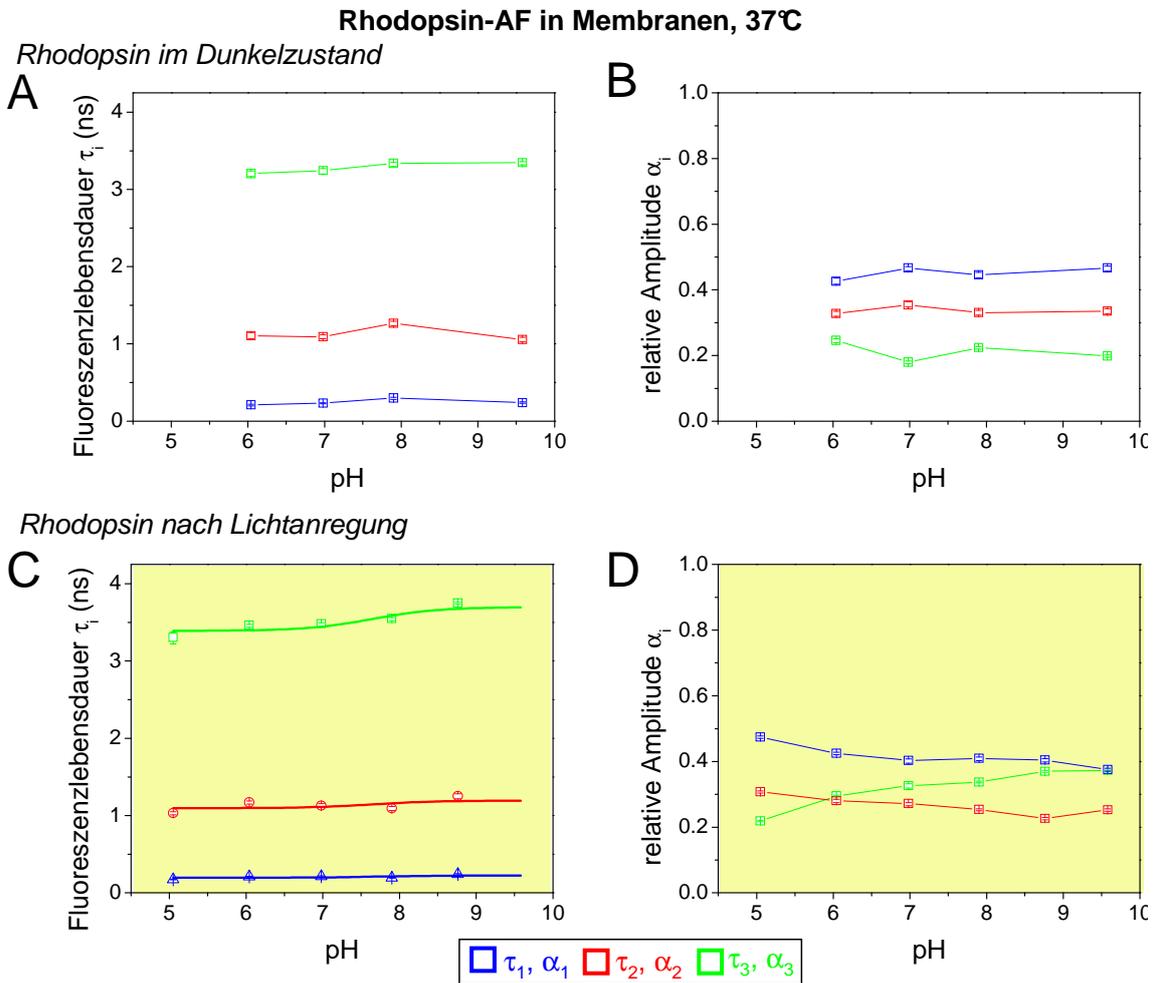


Abbildung 42: Übersicht der Ergebnisse der Fits aller Fluoreszenzlebensdauer-messungen von Rhodopsin-C316-AF in nativen Diskmembranen bei 37°C. Analyse der Fluoreszenzlebensdauer (A,C) und der dazugehörigen relativen Amplituden (B,D) von Rhodopsin im Dunkelzustand und im Meta-II Intermediat. Der pH-Bereich des aktiven Zustands von Rhodopsin ist gelb hinterlegt. Bedingungen: 10 μ M Rhodopsin-AF, 50 mM MES-Bis-Tris-Propan, 150 mM NaCl, 37°C. $\lambda_{ex} = 484$ nm, Fluoreszenzaufnahme über OG515 Kantenfilter.

Wie in Opsin-Membranen ist die schnelle Zerfallskomponente τ_1 die dominierende Komponente mit etwa 45% relativer Amplitude. Die langsame Fluoreszenzzerfallskomponente τ_3 ist ebenfalls vergleichbar zu Opsin-Membranen mit etwa 22%.

Nach Lichtaktivierung sind die beiden schnellen Zerfallszeiten unverändert bei $\tau_1 = 0.2$ ns (37-47%) und $\tau_2 = 1.1$ ns (23-31%). Die Fluoreszenzzerfallszeit τ_3 zeigt eine leichte pH-Abhängigkeit und einen Anstieg von $\tau_3(\text{pH } 5) = 3.3 \pm 0.1$ auf $\tau_3(\text{pH } 9.5) = 3.7 \pm 0.1$. Der pK-Wert des Übergangs liegt bei $\text{pK} = 7.6 \pm 0.4$. Die dazugehörige relative Amplitude α_3 steigt mit einer Gleichgewichtskonstante von $\text{pK} = 6.0 \pm 0.2$.

Im Gegensatz zum Dunkelzustand ist die dominierende Zerfallskomponente bei alkalischem pH die langsame Komponente τ_3 mit 37% Amplitude.

Im Vergleich der pH-Abhängigkeiten zwischen inaktivem Dunkelzustand und lichtaktivierten Meta-II Intermediat bei 37°C ergibt sich folgendes Bild:

1. Weder in Opsin-Membranen noch im Dunkelzustand von Rhodopsin-Membranen ist die Fluoreszenzlebensdauer von Fluorescein (τ_3) pH-abhängig.
2. Die Membranumgebung übt einen spezifischen Quenchingeffekt aus, der sich in der dominierenden relativen Amplitude α_1 der schnellsten Zerfallskomponente τ_1 bemerkbar macht. Die Fluoreszenzlebensdauer τ_3 zeigt keine Abhängigkeit vom pH.
3. Das ändert sich nach Lichtaktivierung des Rezeptors. Die Fluoreszenzlebensdauer τ_3 zeigt eine leichte pH-Abhängigkeit mit $\text{pK} = 7.6 \pm 0.4$ und einer Änderung der Lebensdauer von $\tau_3(\text{pH } 5) = 3.3 \pm 0.1$ auf $\tau_3(\text{pH } 9.5) = 3.7 \pm 0.1$. Die dazugehörige relative Amplitude α_3 steigt zum alkalischen mit einem Gleichgewicht bei $\text{pK} = 6.0 \pm 0.2$ an.

0°C	Dunkelzustand		Lichtaktiviert	
	Monoanion (pH 5)	Dianion (pH 9)	Monoanion (pH 5)	Dianion (pH 9)
τ^*	$1.3[\pm_{0.12}^{0.12}]$ ns	$0.9[\pm_{0.03}^{0.03}]$ ns	$1.4[\pm_{0.03}^{0.02}]$ ns	$1.5[\pm_{0.02}^{0.02}]$ ns
$\bar{\tau}$	$2.4[\pm_{0.2}^{0.2}]$ ns	$2.0[\pm_{0.15}^{0.16}]$ ns	$3.3[\pm_{0.18}^{0.17}]$ ns	$2.9[\pm_{0.17}^{0.17}]$ ns

37°C	Dunkelzustand		Lichtaktiviert	
	Monoanion (pH 6)	Dianion (pH 9)	Monoanion (pH 5)	Dianion (pH 9)
τ^*	$1.2[\pm_{0.1}^{0.1}]$ ns	$1.1[\pm_{0.1}^{0.1}]$ ns	$1.1[\pm_{0.1}^{0.1}]$ ns	$1.8[\pm_{0.1}^{0.1}]$ ns
$\bar{\tau}$	$2.4[\pm_{0.17}^{0.17}]$ ns	$2.3[\pm_{0.16}^{0.17}]$ ns	$2.4[\pm_{0.19}^{0.2}]$ ns	$3.1[\pm_{0.17}^{0.17}]$ ns

Tabelle 5: Übersicht der nach relativen Amplituden gewichteten Fluoreszenzlebensdauer τ^* und nach fraktionalen Amplituden gewichteten Fluoreszenzlebensdauer $\bar{\tau}$ (Formel 3.11) von Rhodopsin-AF in nativen Diskmembranen. Fehler wurden mittels Konfidenzintervallanalyse berechnet. Bedingungen: 50 mM Puffer (Citrat-Puffer (pH 3.5-4.5), MES (pH 5-7), Tris (pH 7.5-8)), 150 mM NaCl.

Vergleich der Temperaturabhängigkeit bei verschiedenem pH-Werten

Die Fluoreszenzzerfallszeiten τ_3 liegen im Dunkelzustand von Rhodopsin pH- und temperaturunabhängig bei $\tau_3 = 3.3 \pm 0.1$ ns im inaktiven Zustand. Nach Lichtaktivierung verhält sich τ_3 unterschiedlich bei 0°C und 37°C. Im sauren pH-Bereich liegt τ_3 mit ca. 4 ns signifikant höher als bei 37°C mit ca. 3.3 ns, obwohl der Rezeptor in beiden Fällen im aktiven Meta-II-Intermediat

vorliegt. Bei hohen pH-Werten (ab pH 8) konvergieren $\tau_3(0^\circ\text{C})$ mit einer Gleichgewichtskonstante von $pK = 6.5 \pm 0.1$ und $\tau_3(37^\circ\text{C})$ mit $pK = 7.6 \pm 0.4$ zu 3.6 ns. Die Temperaturabhängigkeit für lichtaktiviertes Rhodopsin-AF in nativen Membranen bei pH 5.5 und pH 7.5 über einen Temperaturbereich von $0^\circ\text{C} - 37^\circ\text{C}$ zeigt eine starke Abhängigkeit der Fluoreszenzzerfallszeit τ_3 im sauren, dagegen nur eine leichte und umgekehrte Temperaturabhängigkeit im alkalischen Bereich (Abb. 44). Die Gleichgewichtskonstanten stimmen innerhalb ihres Fehlers mit den aus den Absorptionmessungen gewonnenen Meta-I/II Gleichgewichtskonstanten überein (Kap. 5.2, Abb. 39).

Die amplitudengewichteten durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauer τ^* zeigen für 37°C einen ähnlichen Trend wie die Fluoreszenzzerfallszeit τ_3 . Bei 0°C fällt im Dunkelnzustand τ^* ins alkalische ab, während nach Lichtaktivierung τ^* von pH 5 bis pH 7 ansteigt und anschließend im Trend wie τ_3 fällt (Abb. 43).

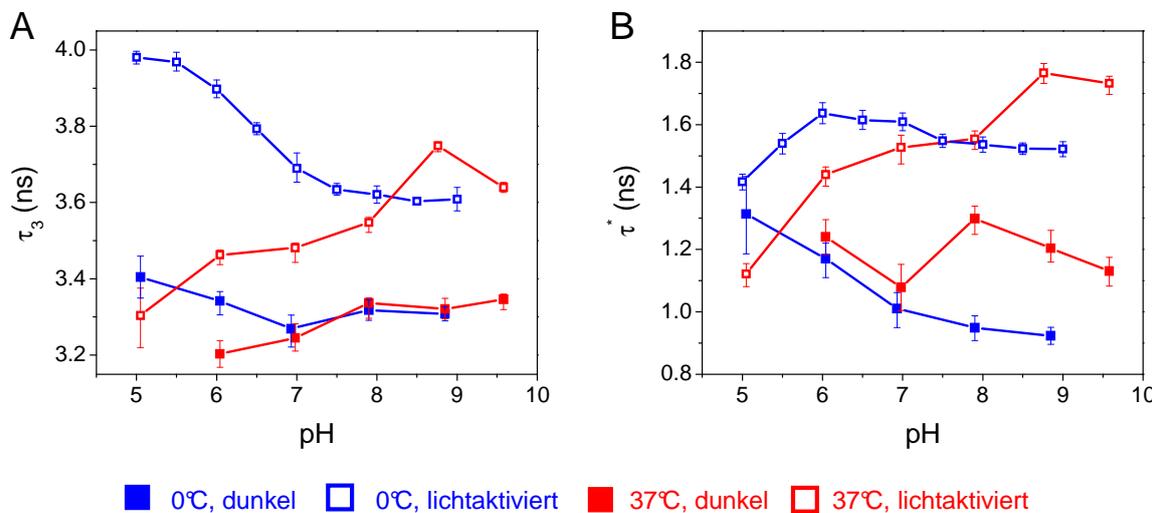


Abbildung 43: Übersicht der Fluoreszenzlebensdauer τ_3 (A) und der relativen amplitudengewichteten Fluoreszenzzerfallszeiten τ^* (relative Amplituden) (B) von Rhodopsin-AF in nativen Membranen. Bedingungen: 10 μM Rhodopsin-C316-AF in nativen Membranen, 50 mM MES-Bis-Tris-Propan, 150 mM NaCl. $\lambda_{\text{ex}} = 484 \text{ nm}$, Fluoreszenzaufnahme über OG515 Kantenfilter.

Die Analyse der Fluoreszenzlebensdauer τ_3 bei pH 5.5 und pH 7.5 von lichtaktivierten Rhodopsin in nativen Membranen mittels Arrheniusplot zeigt, daß bei beiden pH-Werten sich die Steigungen stark unterscheiden. Hier wurde auf der Ordinatenachse τ_3 aufgetragen, wie sich die Fluoreszenzlebensdauer des Fluoresceins in Abhängigkeit von der Temperatur ändert.

Aus dem Plot ist ersichtlich, daß die Fluoreszenzlebensdauer τ_3 nach Lichtanregung von Rhodopsin von pH und Temperatur abhängig ist (Abb. 44). Bei pH 7.5 nimmt die Ausbildung von Meta-II von 95% bei 37°C auf 10% bei 0°C ab. Der steigende Anteil von Meta-I bei niedrigen Temperaturen manifestiert sich in einer Temperaturabhängigkeit von τ_3 (Abb. 44), die der bei pH 5.5 entgegengesetzt ist. Bei pH 5.5, bei dem es Temperaturunabhängig zur Ausbildung von Meta-II kommt, sieht man eine deutliche Temperaturabhängigkeit von τ_3 mit einer kürzeren Fluoreszenzlebensdauer bei hoher Temperatur

Die Unabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer τ_3 vom pH der fluoresceinmarkierten Opsin- und inaktiven Rhodopsin-Membranen und die Übereinstimmung der pK-Werte für die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer nach der Lichtaktivierung von Rhodopsin mit den pK-Werten

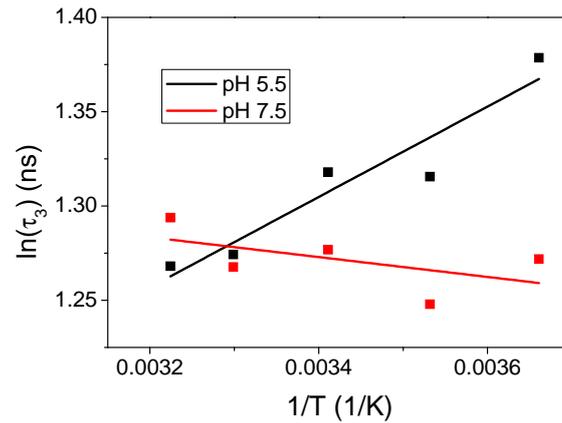


Abbildung 44: Die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer τ_3 von Rhodopsin-AF in nativen Membranen bei pH 5.5 und pH 7.5 im lichtaktivierten Metarhodopsin-II-Intermediat ist als Arrheniusplot aufgetragen. Bedingungen: 50 mM MES-Bis-Tris-Propan, 150 mM NaCl.

für die Bildung von Meta-II deutet darauf hin, daß die Fluoreszenzlebensdauer von gebundenem Fluorescein und ihre jeweiligen Amplituden durch eine für die aktive Proteinkonformation spezifische Umgebungsänderung beeinflusst werden.

5.2.3 Solubiliertes Rhodopsin in β -DM Mizellen

In vielen Studien wird mit solubilierten Rhodopsin gearbeitet, insbesondere werden Rhodopsinmutanten in Zellen exprimiert, welche eine andere Membranzusammensetzung als die nativen Diskmembranen besitzen. Da sich das Verhalten des Rhodopsin in Mizellenumgebung von der von Rhodopsin in nativen Diskmembranen unterscheidet, wurden zum Vergleich zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen an Rhodopsin durchgeführt, die Fluoreszenzanalyse wird nun im folgenden vorgestellt.

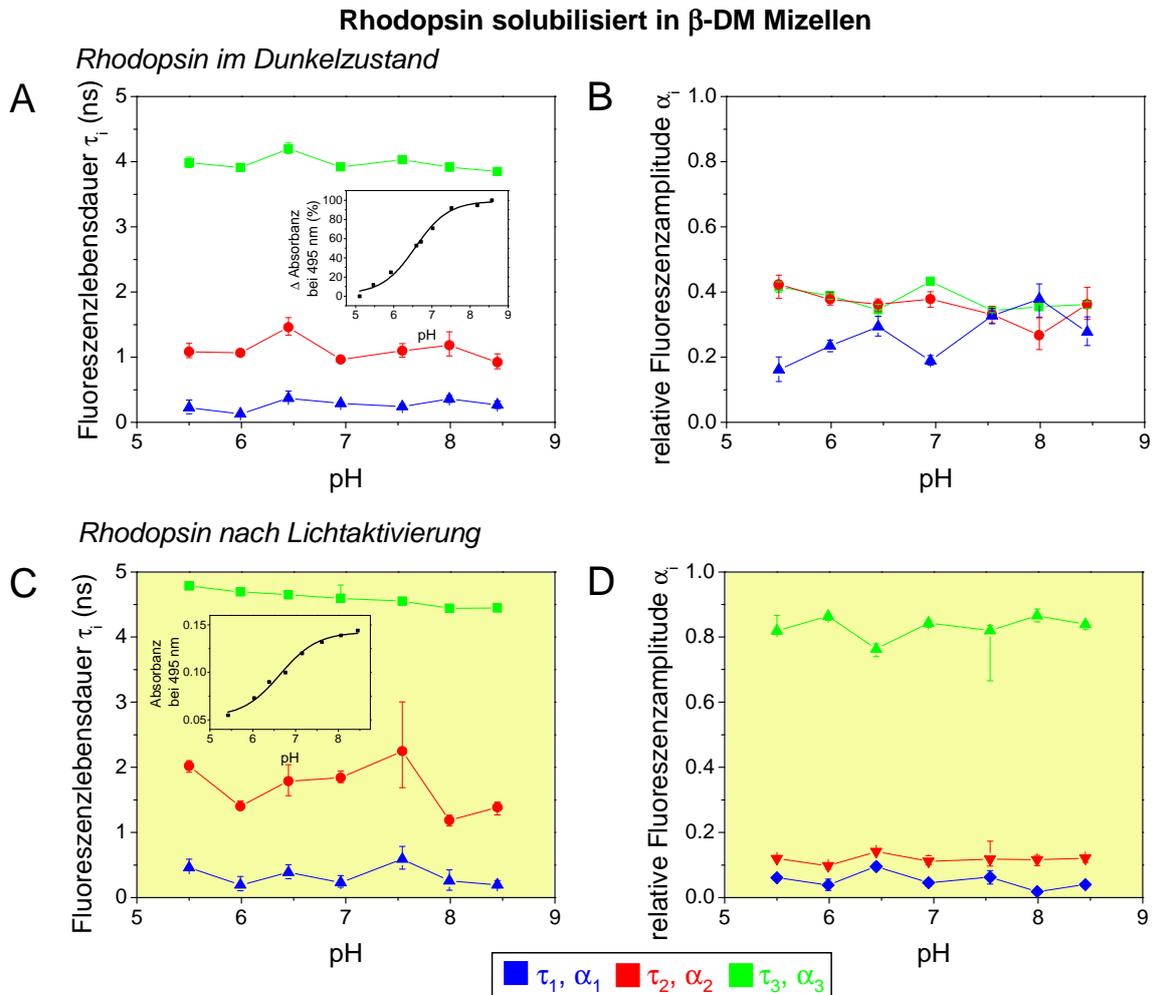


Abbildung 45: Übersicht der Ergebnisse der Fits aller Fluoreszenzlebensdauer-messungen von solubilierten Rhodopsin in β -DM Mizellen. **A,B:** Die pH-Abhängigkeit der gefitteten Fluoreszenzlebensdauer τ_i und ihre dazugehörigen Amplituden von Rhodopsin im Dunkelzustand. **C,D:** Analog dazu die Fluoreszenzlebensdauer τ_i und ihre dazugehörigen relativen Amplituden α_i aus den Messungen des Rhodopsins im Meta-II Intermediat. Der pH-Bereich des aktiven Zustands von Rhodopsin ist gelb hinterlegt. Die Insets zeigen die Absorptionsänderungen der Fluoresceinbande. Bedingungen: 50 mM Puffer (MES (pH 5.5-7), Tris (pH 7.5-8.5)), 150 mM NaCl, 15°C, $\lambda_{ex} = 465$ nm, Fluoreszenzaufnahme über OG515 Kantenfilter.

Aus vergleichenden transienten Absorptionsmessungen ist zu erkennen, daß das Gleichgewicht Meta-I/Meta-II bei Rhodopsin in DM-Mizellen komplett nach Meta-II verschoben ist. Zusätzlich

15°C	Dunkelzustand		Lichtaktiviert	
	Monoanion (pH5.5)	Dianion (pH 8.5)	Monoanion (pH5.5)	Dianion (pH 8.5)
τ^*	$2.1[\pm_{0.2}^{0.2}]$ ns	$1.8[\pm_{0.18}^{0.17}]$ ns	$4.2[\pm_{0.3}^{0.11}]$ ns	$3.9[\pm_{0.09}^{0.12}]$ ns
$\bar{\tau}$	$3.3[\pm_{0.3}^{0.2}]$ ns	$3.2[\pm_{0.2}^{0.2}]$ ns	$4.6[\pm_{0.3}^{0.3}]$ ns	$4.3[\pm_{0.2}^{0.2}]$ ns

Tabelle 6: Übersicht der nach relativen Amplituden gewichteten Fluoreszenzlebensdauer τ^* und nach fraktionierten Amplituden gewichteten Fluoreszenzlebensdauer $\bar{\tau}$ (Formel 3.11) von solubilisierten Rhodopsin-AF in DM-Mizellen. Bedingungen: 50 mM Puffer (Citrat-Puffer (pH 3.5-4.5), MES (pH 5-7), Tris (pH 7.5-8)), 150 mM NaCl, 15°C, $\lambda_{ex} = 465$ nm, Fluoreszenzaufnahme über OG515 Kantenfilter.

ist die Kinetik der Meta-II Bildung viel schneller ist als in nativen Diskmembranen (eigene Messungen).

Um herauszufinden, wie der Einfluß der Mizellenumgebung sich auf die zeitaufgelösten Fluoreszenzeigenschaften von Fluorescein an der cytoplasmatischen Oberfläche von Rhodopsin niederschlägt, wurden die Fluoresceinmarkierten Rhodopsin-Mizellen vergleichend im Dunkelzustand und im lichtaktivierten Meta-II Intermediat untersucht.

Fluorescein gebunden an Rhodopsin in Mizellen zeigt ebenfalls die pH-abhängigen Verschiebungen der Absorptionsbanden wie das freie Fluorescein [Möller und Alexiev, 2009]. Der Übergang vom Monoanion zum Dianion ist im Dunkelzustand mit $pK_a = 6.6 \pm 0.1$ ähnlich zu dem von Opsin-Mizellen. Die Peakwellenlänge des Dianions im gebundenen Zustand ist mit $\lambda_{max} = 500$ nm gegenüber dem freien Fluorescein mit $\lambda_{max} = 491$ nm zu längeren Wellenlängen verschoben.

Die Fluoreszenzlebensdauerzerfälle des solubilisierten Rhodopsin-AF in β -DM Mizellen werden mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen nach Formel 3.9 gefittet. Im Dunkelzustand sind die Zerfallskomponenten alle konstant über den gemessenen pH-Bereich ($\tau_1 \approx 0.2$ ns, $\tau_2 \approx 1.1$ ns). Wie bei den Rhodopsin-Membranen spiegelt die Fluoreszenzlebensdauer mit $\tau_{3,M} = \tau_{3,DA} \approx 3.9$ ns nicht den Ladungszustand des Farbstoffes wieder und ist konstant über den gesamten gemessenen pH-Bereich. Die relativen Amplituden α_i der beiden Quenching-Zerfallskomponenten τ_1 und τ_2 zeigen eine leichte, gegenläufige pH-Abhängigkeit, wobei Amplitude der schnellen Zerfallskomponente α_1 von 0.16 im sauren auf 0.38 bei alkalischen pH-Werten ansteigt, wie auch in Rhodopsin-Membranen bereits beobachtet wurde. Die relative Fluoreszenzamplitude α_3 ist relativ konstant bei $\alpha_3 = 0.38$.

Im lichtaktivierten Meta-II Intermediat sind die Fluoreszenzzerfallskomponenten $\tau_1 \approx 0.3$ ns und $\tau_2 \approx 1.5$ ns konstant über den gesamten pH-Bereich. Die Fluoreszenzlebensdauer τ_3 zeigt eine pH-Abhängigkeit und fällt von τ_3 (pH 5.5) = 4.8 ns auf τ_3 (pH 8.5) = 4.4 ns. Verglichen mit der Fluoreszenzlebensdauer im Dunkelzustand ist im lichtaktivierten Rhodopsin die Fluoreszenzlebensdauer τ_3 des Fluoresceins über den gesamten pH-Bereich länger. Mit der Henderson-Hasselbalch-Funktion erhält man ein Protonierungsgleichgewicht von $pK_a = 6.8 \pm 0.3$.

Die relativen Amplituden liegen bei $\alpha_1 = 0.05$, $\alpha_2 = 0.12$ und $\alpha_3 = 0.83$, sie besitzen keine pH-Abhängigkeit über den gesamten pH-Bereich. Im Vergleich zum Dunkelzustand ist im lichtaktivierten Intermediat die Fluoreszenzzerfallsamplitude τ_3 die dominierende Komponente.

Schlussfolgerung

In Membranen ist die Ausbildung der aktiven Proteinkonformation durch einen Anstieg der Fluoreszenzlebensdauer des gebundenen Fluoresceins und einem teilweisen Anstieg der entsprechenden Amplitude verbunden. In Mizellen ist dies ebenso der Fall. Hier ist jedoch zusätzlich ein signifikanter Anstieg der relativen Amplitudenn α_3 der Fluoreszenzlebensdauerkomponente von etwa 30% auf 83% zu verzeichnen, der in nativer Membrenumgebung unterdrückt wird. Dieser Anstieg ist demzufolge spezifisch für die aktiven Proteinkonformation in Mizellenumgebung. Da-

durch ist das Mizellensystem besonders geeignet, um aus zeitaufgelösten Fluoreszenzeigenschaften des gebundenen Fluoresceins Informationen über den Aktivierungszustand des Rhodopsins zu erhalten.

5.2.4 Zusammenfassende Analyse der Fluoreszenzlebensdauer-messungen als Indikator für Helix 8 Umgebungsänderungen

Die Bindung des Fluoreszenzmarkers Fluorescein an das Protein verändert sein Fluoreszenzverhalten. Zum einen wird der einfachexponentielle Fluoreszenzzerfall multiexponentiell. Dieses Verhalten wird durch Fluoreszenzlöschungsprozesse ausgelöst, welche durch die Interaktion mit der Protein- und Lipidumgebung, aber auch durch Energietransfer zum Retinal im Dunkelzustand von Rhodopsin zustande kommen. Zum anderen ändern sich die Fluoreszenzzerfallszeiten τ_3 , welche durch die Umgebung beeinflusst werden. Neben der Fluoreszenzzerfallszeit τ_3 wurden noch die Zerfallszeiten τ_1 und τ_2 ermittelt. Sie zeigen in allen Messungen keine signifikante pH-Abhängigkeit. Während die schnelle Zerfallszeit τ_1 bei allen Messungen bei 100-200 ps liegt, ist die Zerfallszeit τ_2 bei den Messungen von solubilisiertem Rhodopsin im Dunkelzustand und für den Rezeptor in allen Zuständen in nativen Membranen zwischen 1-1.3 ns. Bei Opsin in Mizellen und solubiliertem Rhodopsin nach Lichtaktivierung ist $\tau_2 \approx 2$ ns signifikant höher. Vergleichbare Messungen an fluoresceinmarkierten Bakteriorhodopsin ohne Retinal zeigen nur eine Beeinflussung von τ_1 und τ_3 durch Energietransfer [Alexiev et al., 2003]. Das bedeutet, daß der Fluoreszenzlöschungsprozess, welcher durch τ_2 charakterisiert ist, direkt durch die Proteinumgebung beeinflusst wird. In β -DM Mizellen ist der laterale Druck durch die Mizelle schwächer als in Membranumgebung (siehe auch Kapitel 6.5). Auch wurde gezeigt, daß in Mizellenumgebung die Aktivierungsenergie geringer ausfällt [Corley et al., 2011]. Der in Mizellenumgebung fehlende laterale Druck scheint die Stabilität des Dunkelzustands negativ zu beeinflussen, ebenso wie die Stabilität des inaktiven Meta-I Intermediats. Die Fluoreszenzlebensdauerdaten deuten auch darauf hin, daß in Membranumgebung die Änderungen an der cytoplasmatischen Oberfläche von Rhodopsin schwächer auszufallen als in Mizellenumgebung.

Für den Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften des Fluoresceins wurde seine mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ^* für seine beiden Anionenzustände in Abbildung 46 aufgetragen. Für den monoanionischen Zustand wurden die Messungen bei pH 5 und für den dianionischen Zustand der alkalische Endpunkt der Messungen herausgesucht. Als Referenz wurde die pH-Abhängigkeit von IAF gemessen, welche sich mit einer Fluoreszenzzerfallszeit anpassen läßt. Die anderen Messungen wurden über drei Zerfallszeiten mit ihren relativen Amplituden gewichtet gemittelt.

Es ist zu erkennen, daß die lichtaktivierten Proben eine größere mittlere Fluoreszenzlebensdauer besitzen als ihre Pendanten im Dunkelzustand. In Membranen besitzt das Fluorescein die kürzesten mittleren Lebensdauern, was auf ein hohes Gewicht der kurzen Zerfallszeiten und damit auf eine starke Fluoreszenzlöschung durch die Membranumgebung hinweist, welche in einer Mizellenumgebung nicht gegeben ist. Deren mittlere Fluoreszenzzerfallszeiten liegen bei Rhodopsin im Dunkelzustand bei 2 ns, was auf signifikante Fluoreszenzlöschung hinweist, wohingegen das lichtaktivierte Rhodopsin in Mizellen mittlere Fluoreszenzlebensdauer im Bereich des freien IAF besitzt, was auf minimales Quenching hindeutet. Mit einer relativen Amplitude von $\alpha_3 = 0.83$ (Kap. 5.2.3) ist dies auch der Fall.

Da das Fluoreszenzspektrum des Fluorescein ($\lambda_{\text{max}} = 515$ nm) signifikant mit der Absorptionsbande des Retinals im Dunkelzustand von Rhodopsin ($\lambda_{\text{max}} = 498$ nm) überlappt, wird qualitativ überprüft, ob der Unterschied der Fluoreszenzlöschung von Dunkel- und Meta-II-Zustand durch Energietransfer vom Fluorescein zum Retinal hervorgerufen wird. Dazu wird das Apoprotein Opsin herangezogen, welches kein Retinal besitzt. In nativen Diskmembranen kann dieses un-

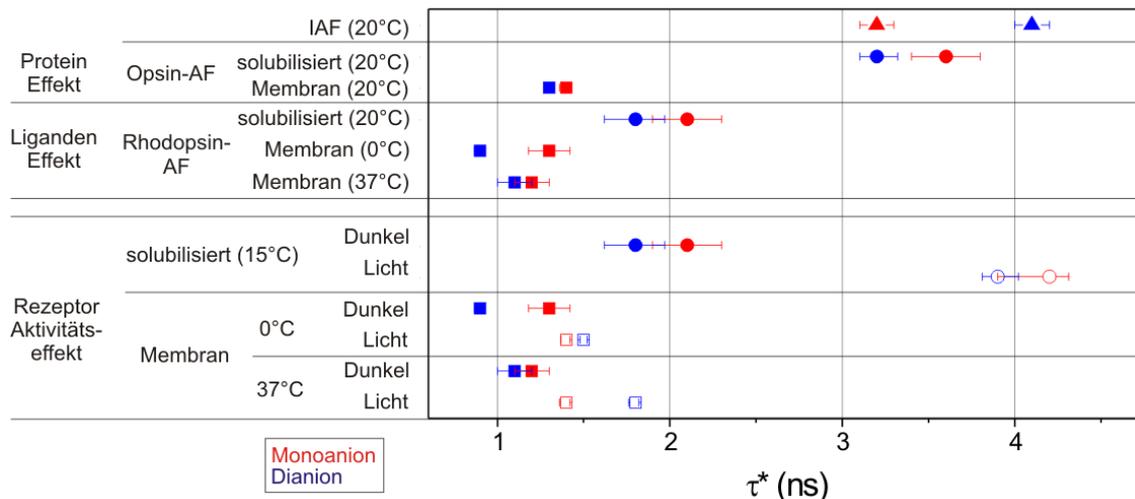


Abbildung 46: Übersicht der nach relativen Amplituden gewichteten Lebensdauer τ^* der Rhodopsin-AF und Opsin-AF pH-Reihen. Die Punkte geben den Mittelwert der gewichteten mittleren Lebensdauer der Fluoreszenzzerfälle von Fluorescein im monoanionischen, bzw. dianionischen Zustand mit ihren Fehler an.

ter sauren pH-Bedingungen die aktive Konformation annehmen [Vogel und Siebert, 2001]. Im pH-Bereich des Mono-, bzw. Dianions sind damit weniger als 10% in der aktiven Konformation.

Im Vergleich zwischen Opsin in Membranen und solubilisierten Opsin ist klar zu erkennen, daß die Membranumgebung den entscheidenden Effekt für eine kürzere τ^* darstellt, d.h. der Hauptquenchingeffekt beruht auf der Membranumgebung. Der Unterschied zwischen Opsin-Membranen und Rhodopsin in Membranen deutet auf einen kleinen Quenchingeffekt durch Energietransfer zum Retinal hin, der jedoch im Vergleich zum Membranquenchingeffekt vernachlässigbar ist.

In Mizellen ist der Quenchingeffekt durch Energietransfer durch das Retinal ($\tau^* \approx 3.5$ ns gegenüber $\tau^* \approx 2$ ns) deutlich zu erkennen. Ein Effekt, der durch die Kopplung des Fluoresceins an das Protein hervorgerufen wird, ist die Invertierung der mittleren Lebensdauer vom Dianion und Monoanion. Bei freiem Fluorescein hat das Dianion die kürzere Lebensdauer. Am Protein gebunden, ist τ^* des Monoanions immer die kürzere. Eine Ausnahme besteht bei lichtaktivierten Rhodopsinmembranen.

Es ist bekannt, daß die Funktion des Rezeptors von der Membranzusammensetzung geprägt ist. Insbesondere wurde die Abhängigkeit der Formation des aktiven Meta-II-Intermediats untersucht [Applebury et al., 1974, Litman et al., 1981]. In β -DM Mizellen ist die Kinetik der Meta-II Bildung sehr viel schneller als in nativen Membranen, welche pH- und temperaturunabhängig ist, während für Rhodopsin in nativen Diskmembranen die Bildung von Meta-II eine sehr starke Abhängigkeit von pH und Temperatur besitzt. Die hohe Elastizität der Mizellenumgebung [König et al., 1989] und auch die Ladung der Lipidkopfgruppen [Litman et al., 1981] sind wichtige Faktoren für die Meta-II Bildung. Trotz der Unterschiede sind Messungen in β -DM Mizellen weitverbreitet, da zum einen das Detergenz den Rezeptor nicht denaturiert und seine Funktion erhalten bleibt [DeGrip und Bovee-Geurts, 1979]. Zum anderen werden die meisten Proben mit Rhodopsinmutanten in diesem Detergenz solubilisiert.

Es ist aus CD- und stationären Fluoreszenzmessungen bekannt, daß die α -helikale Sekundärstruktur der amphiphilen Helix 8 sich auf der Oberfläche der nativen, geladenen Diskmembran ausbildet [Krishna et al., 2002], in β -DM Mizellen dagegen deuten die Ergebnisse darauf hin, daß möglicherweise keine Bindung des C-terminalen Endes von Rhodopsin auf der Oberfläche

der Mizelle und damit zumindest keine vollständige Bildung einer helikalen Struktur stattfindet. Kristallstrukturen von "aktiven" Opsin, mit und ohne $G_T\alpha$ -Peptid und von Meta-II zeigen einen helikalen C-Terminus von Rhodopsin [Park et al., 2008, Scheerer et al., 2008, Choe et al., 2011], welcher allerdings durch die Kristallisationsbedingungen induziert sein könnte. FTIR-Messungen von Rhodopsin unter physiologischen Bedingungen zeigen eine partielle Entfaltung der Sekundärstruktur von Helix 8 in Meta-II [Lehmann et al., 2007]. Der Vergleich der mittleren Fluoreszenzlebensdauer zeigt ein Fluoreszenzlösungsverhalten, mit welchem man zwischen aktiven und inaktiven Intermediaten unterscheiden kann. Aus den Fluoreszenzzerfallszeiten τ_3 kann innerhalb einer pH-Reihe auch der Übergang vom inaktiven zum aktiven Intermediat nachvollzogen werden. Das Verhalten von τ_3 könnte durch die Protonierung des Protonenschalters Glu134 im Rhodopsin hervorgerufen werden. Es wurde gezeigt, daß sich im lichtaktivierten Meta-II Intermediat die Oberflächenladung an der cytoplasmatischen Oberfläche ändert [Möller und Alexiev, 2009]. Durch die Nähe des Glu134 zur cytoplasmatischen Oberfläche kann seine Protonierung eine Änderung der Oberflächenladung hervorrufen [Möller und Alexiev, 2009], welche durch den Fluoreszenzmarker detektiert wird. In Mizellenumgebung wurde eine verlängerte Fluoreszenzlebensdauer τ_3 vor allem des Monoanions gegenüber der Fluoreszenzlebensdauer von freiem Fluorescein detektiert, welche im aktiven Zustand noch weiter ansteigt (Abb. 47). Dieses Verhalten könnte durch zwei verschiedene Effekte hervorgerufen werden:

1. Ein signifikanter Anstieg der Fluorescein-Fluoreszenzlebensdauer wurde bei erhöhter Konzentration (ab ca. 20 μM) festgestellt, welcher durch Homoenergietransfer erklärt wird [Elmgren, 1980]. In den hier vorgestellten Experimenten wurde mit einer maximalen Konzentration von 5 μM gearbeitet. Eine Erhöhung der Homoenergietransferrate bei niedriger Konzentration könnte aber durch eine eventuelle Dimerbildung von Rhodopsin im aktiven Zustand hervorgerufen werden. Der mittlere Abstand a zwischen freien Fluoresceinen in Lösung bei $c = 20 \mu\text{M}$ liegt bei $a < 4 \text{ \AA}$. Der Abstand der Farbstoffe im Rhodopsindimer ist von der Orientierung der Rhodopsinmoleküle zueinander abhängig. Diese ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt aber neue Ergebnisse, welche zeigen, daß eine wahrscheinliche Dimerisierung über Helix 8-Kontakte stattfindet [Knepp et al., 2012]. In dieser Konfiguration wäre der Abstand zwischen zwei gebundenen Fluoresceinen klein genug, damit Homoenergietransfer stattfinden kann.
2. Die Fluorescein-Fluoreszenzlebensdauer wird auch durch die Polarität der Umgebung moduliert. In Magde et al. [2002] wurden die Fluoreszenzzerfallszeiten von Fluorescein in Abhängigkeit des Lösungsmittels mit geringer werdender Polarität - deren Dielektrizitätskonstanten ebenfalls in gleicher Reihenfolge fallen (von H_2O ($\epsilon_r \approx 80$) bis zu Octanol ($\epsilon_r \approx 10$) [Ritzoulis et al., 2000]) - ermittelt. Dabei wurde festgestellt, daß Fluorescein in H_2O kurze Fluoreszenzzerfallszeiten τ besitzt und mit steigender Unpolarität des Lösungsmittels τ ansteigt. Das Absorptionsmaximum λ_{max} von Fluorescein wird durch die Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums moduliert. Bei pH 7.5 liegt $\lambda_{\text{max}}(\text{Dunkel}) = 495 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max}}(\text{Lichtaktiviert}) = 497 \text{ nm}$. Beim freien IAF (bei pH 9) entsprechen diese Werte Dielektrizitätskonstanten von $\epsilon_r(\text{Dunkel}) = 55$, bzw. $\epsilon_r(\text{Licht}) = 34$ [Alexiev, 1994]. Da das Fluorescein teilweise in einer Protein-/Membranumgebung eingebettet ist, kann nur qualitativ auf eine Verringerung der Dielektrizitätskonstante durch die lichtinduzierten Konformationsänderungen an der cytoplasmatischen Oberfläche geschlossen werden. Diese könnte beispielsweise durch eine stärkere Abschirmung des Fluoresceins gegen das Solvenz durch die Protein-/Membranumgebung induziert werden.

Wenn pH-abhängige Änderungen der Fluoreszenzzeit τ_3 existieren, sind sie gegenüber den Absorptionsänderungen von Fluorescein zu niedrigen pH-Werten verschoben, da sie im angeregten Zustand veränderte Protonierungseigenschaften besitzen (Förster-Zyklus [Förster, 1950]). Eine

pH-abhängige Änderung der Absorption des gebundenen Fluoresceins wurde in allen Rezeptorzuständen beobachtet. Dagegen erfährt die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzzerfallszeit meist eine stark gedämpfte Änderung. Der Grundzustand des Fluoresceins scheint daher auf andere Umgebungsparameter, wie z.B. die Protonenkonzentration der umgebenden Lösung, sensibel zu reagieren als der angeregte Zustand. Dieser scheint eher durch die Polarität des umgebenden Mediums, welche auch seine Fluoreszenzlebensdauer moduliert, am meisten beeinflusst zu werden.

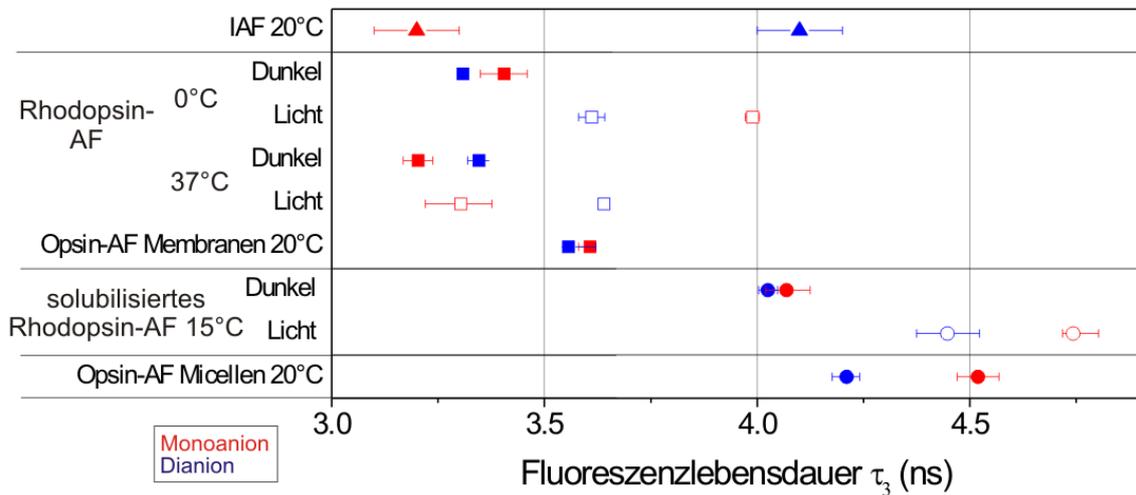


Abbildung 47: Übersicht der Fluoreszenzlebensdauer τ_3 der Rhodopsin-AF und Opsin-AF pH-Reihen. Die Punkte geben den Mittelwert der gewichteten mittleren Lebensdauer der Fluoreszenzzerfälle von Fluorescein im monoanionischen, bzw. dianionischen Zustand mit ihren Fehler an.

5.3 Die Dynamik der Helix 8 von Rhodopsin

Die Aktivierung des Rhodopsins - ausgehend von der lichtinduzierten Isomerisierung des Retinals - ist begleitet von langreichweitigen Konformationsänderungen innerhalb des Rezeptors. Dabei kommt es im Besonderen zu Änderungen an der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins. Dadurch kann das G-Protein Transducin - welches die Signalkaskade aktiviert - an dieser Oberfläche des Proteins binden. Bestandteil der cytoplasmatischen Oberfläche ist die amphipatische Helix 8. Untersuchungen der Kristallstruktur zeigen, daß Helix 8 im Grundzustand von Rhodopsin über sein Phe313 eine Verbindung zum Tyr306 des konservierten NPxxY Motivs besitzt [Palczewski et al., 2000] (siehe Kap. 2.1.2, Abb. 5). Die Aromaten beider Aminosäuren interagieren via $\pi - \pi$ Wechselwirkung und stabilisieren Helix 8 (Abb. 48A). In der lichtaktivierten Meta-II Form ist die Interaktion beider Aminosäuren durch die Drehung von Tyr306 zerstört [Hofmann et al., 2009, Choe et al., 2011] (Abb. 48B). Diese Aminosäure gilt als wichtiges Element bei der Interaktion zwischen dem aktivierten Rezeptor und dem G-Protein [Prioleau et al., 2002, Fritze et al., 2003].

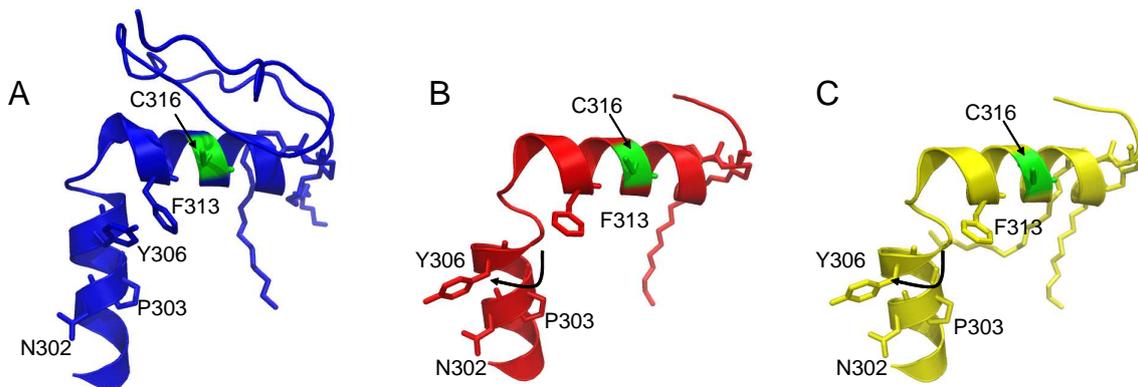


Abbildung 48: Änderung der Kristallstruktur vor und nach Lichtaktivierung. Es sind der obere Teil der TM Helix 7 und Helix 8 dargestellt. Die Seitenketten der Aminosäuren des konservierten NPxxY(x)F-Motivs und des Cys316 (grün), an welchen der Farbstoff kovalent gebunden ist, sind dargestellt. **A:** Die aromatischen Ringe von Tyr306 und Phe313 sind in räumlicher Nähe. (PDB: 1U19) **B:** Durch die Drehung von TM Helix 7 im Meta-II Intermediat wird die Interaktion zwischen Tyr306 und Phe313 aufgebrochen (PDB: 3PXO). **C:** Die aktive Opsin-Struktur zeigt ebenfalls die Drehung von TM Helix 7 (PDB: 3DQB).

Das NPxxY Motiv ist mittels eines ausgedehnten Wasserstoffbrückennetzwerks über Asp83 mit dem interhelikalen H^+ -Netzwerk [Zaitseva et al., 2010] und mit der Retinalbindungstasche verbunden. Die Analyse der Kristallstrukturen in den verschiedenen Intermediatzuständen erlaubte es, Informationen über die räumliche Struktur und die Konformationsänderungen des Rhodopsins zu erhalten. Kristallstrukturen können jedoch nur bedingt Informationen über die Dynamik des Proteins und insbesondere der cytoplasmatischen Oberfläche und ihrer Veränderung in Abhängigkeit von der Photoreaktion enthalten. Diese Informationen sind aber essentiell für das Verständnis der Bindung des aktiven Rezeptors mit dem G-Protein Transducin. Die Dynamik von Proteinsegmenten kann experimentell u.a. mittels EPR- oder Fluoreszenzanisotropieexperimenten ermittelt werden [Altenbach et al., 2008, Alexiev et al., 2003]. Im folgenden werden Fluoreszenzanisotropieexperimente vorgestellt, welche die Dynamik der Helix 8 unter verschiedenen Umgebungsbedingungen quantifiziert. Die Dynamik an der cytoplasmatischen Oberfläche von Rhodopsin wurde - über die zeitaufgelöste Anisotropie von Fluorescein, welches an Cys316 (an Helix 8) gebundenen ist - gemessen und analysiert. Die Ergebnisse werden im folgenden vorgestellt.

5.3.1 Helix 8 - Dynamik unter physiologischen Puffer-Bedingungen

Der Vergleich der zeitaufgelösten Anisotropiekurven des Fluorescein am Cys316 von Rhodopsin in den verschiedenen Rezeptorzuständen soll zunächst zeigen, ob sich die Änderung des Aktivierungszustandes des Rezeptors in der Dynamik von Helix 8 niederschlägt. Dazu wurde als erstes unter physiologischen pH-Bedingungen die Helix 8-Dynamik von Rhodopsin im Dunkelizustand, nach Lichtaktivierung und vom Apoprotein Opsin (ohne Ligand) verglichen. Die Labelingstöchiometrie für das an Rhodopsin in nativen Diskmembranen gebundene Fluorescein lag bei den Messungen bei 20%, um Homoenergietransfer zu vermeiden (Kap. 3.6.2).

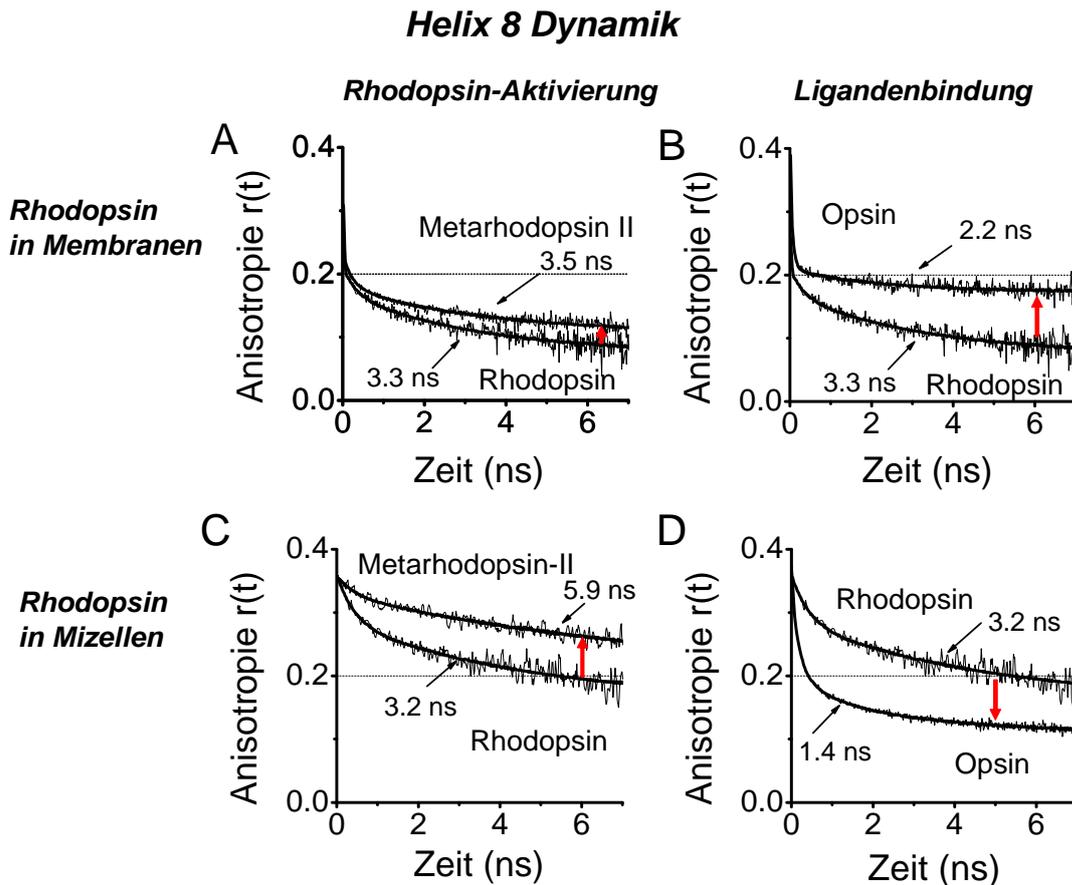


Abbildung 49: Gegenüberstellung von Anisotropien der an C316-AF markierten Proteine. Die in den einzelnen Diagrammen eingetragenen Rotationskorrelationszeiten beziehen sich auf die jeweiligen Dynamiken der Helix 8. Die obere Reihe zeigt Anisotropien der Proteine in nativen Diskmembranen und die untere in β -DM Mizellen. In der ersten Spalte (A, C) werden die Anisotropien vor und nach Lichtaktivierung verglichen. In der zweiten Spalte (B, D) wird das ligandenfreie Opsin mit Rhodopsin verglichen. Die roten Pfeile zeigen die Änderungen der Anisotropie nach Lichtaktivierung (A, C), bzw. den Unterschied zum Rhodopsin Grundzustand (B, D). Alle Messungen wurden mit 50 mM Puffer pH 7.5, 150 mM NaCl und bei 20°C, bzw. 37°C (Rhodopsin in Membranen Dunkelizustand und Lichtaktiviert) durchgeführt.

Die experimentell ermittelten Anisotropiezerfallskurven $r(t)$ und die dazugehörigen Parameter wurden wie in Kap. 3.7.1 dargestellt ausgewertet und die drei ermittelten Anisotropiezerfallskomponenten wie folgt zugeordnet [Alexiev et al., 2003, Schröder et al., 2005]:

1. Die schnelle Zerfallskomponente der Anisotropie mit der Rotationskorrelationszeit $\phi_1 \approx 0.2$ ns entspricht der Eigenbewegung des Farbstoffes.
2. Die mittlere Zerfallskomponente der Anisotropie mit der Rotationskorrelationszeit ϕ_2 im einstelligen Nanosekundenbereich entspricht der Bewegung des flexiblen Proteinsegments, an dem der Farbstoff gebunden ist.
3. Die langsamste Zerfallszeit ϕ_3 entspricht der Rotationskorrelationszeit des Gesamtmoleküls. Bei Rhodopsin in Mizellen beträgt sie etwa 50 ns. Bei Rhodopsin in Membranen ist ϕ_3 um mehrere Größenordnungen (ms-Zeitbereich für Rotationsdiffusion eines Membranfragmentes) größer als die Fluoreszenzlebensdauer der eingesetzten Fluorophore (1 – 6 ns) und wird bei der Analyse durch eine hinreichend große Rotationskorrelationszeit ersetzt, welche im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer unendlich groß ist. Dadurch erhält man eine quasi zeitunabhängige Endanisotropie r_∞ , die die sterische Einschränkung der Bewegung des flexiblen Proteinsegments und der Rotationsdiffusion des Farbstoffes um seine eigene Achse beschreibt.

		r_0	ϕ_1 (ns)	β_1	ϕ_2 (ns)	β_2	ϕ_3 (ns)	β_3
native Membranen	Rhodopsin	0.26	0.26	0.19	3.3	0.44	∞	0.37
	Meta-II	0.23	0.21	0.19	3.5	0.32	∞	0.49
	Opsin	0.28	0.06	0.22	2.2	0.12	∞	0.66
β -DM Mizellen	Rhodopsin	0.35	0.33	0.18	3.2	0.25	60	0.57
	Meta-II	0.33	0.32	0.12	5.9	0.20	78	0.68
	Opsin	0.33	0.16	0.37	1.4	0.19	49	0.44

Tabelle 7: Übersicht über die Fitparameter der in Abb. 49 gezeigten Anisotropiezerfallskurven. ϕ_i sind die Rotationskorrelationszeiten und β_i die zugehörigen relative Amplituden mit $\sum_i \beta_i = 1$. Die absoluten Amplituden r_i berechnen sich mit $r_i = r_0 \cdot \beta_i$. Das χ^2 liegt bei den Messungen bei 1.06-1.18.

Die Dynamik von Helix 8 unterscheidet sich in allen Rezeptorzuständen, wie an den Rotationskorrelationszeiten ϕ_2 (Abb. 49, Tab. 7) zu erkennen ist. Dabei wird die Dynamik von Helix 8 unabhängig von der Proteinumgebung (native Membranen/Mizellen) nach Lichtaktivierung langsamer, während sie beim Apoprotein (Opsin) schneller wird. Zusätzlich zeigt sich eine Änderung der Endanisotropie r_∞ , bzw. der relativen Amplitude β_3 der langsamsten Rotationskorrelationszeit ϕ_3 , welche eine Änderung der sterischen Einschränkung des Farbstoffes und/oder der Helix zeigt. Der Vergleich des Dunkelzustandes mit dem lichtaktivierten Zustand zeigt einen Anstieg von β_3 in beiden Proteinumgebungen (native Membranen, Mizelle). Es zeigt sich auch, daß das β_3 von Opsin in nativen Membranen größer und in Mizellen kleiner ist als im Dunkelzustand des Rhodopsins. Zusammenfassend deuten die Messungen darauf hin, daß unter physiologischen pH-Bedingungen ein Anstieg der Endanisotropie unabhängig von der Membranumgebung bei der Aktivierung von Rhodopsin stattfindet. Das ist an der höheren sterischen Einschränkung der Helix 8 nach Lichtaktivierung des Rezeptors zu erkennen. Ebenso erhöht sich die Rotationskorrelationszeit ϕ_2 der Helix 8 nach Lichtaktivierung des Rezeptors, was auf eine verlangsamte Dynamik im aktiven Zustand hindeutet. Diese beiden Eigenschaften der Helix 8 scheinen eine wichtige Rolle bei der Bindung des G-Proteins nach Lichtaktivierung des Rezeptors zu besitzen, da das lichtaktivierte Rhodopsin unabhängig von der Proteinumgebung (native Membranen, Mizelle) das G-Protein Transducin binden und aktivieren kann.

Opsin besitzt bei pH 7.5 und 20°C keine aktive Konformation [Vogel und Siebert, 2001, Vogel et al., 2007]. Die Anisotropiezerfallskurven zeigen, daß die Rotationskorrelationszeit ϕ_2 schneller als die im Dunkelzustand und das Verhalten der Endanisotropien r_∞ von der Proteinumgebung (native Membranen, Mizelle) abhängig ist.

Um zu verstehen, welche Rolle die beobachteten Helix 8 Dynamikänderungen bei der Rezeptoraktivierung spielen, wird im folgenden systematisch die Dynamikänderung von Helix 8 bei Rhodopsin im Dunkelzustand und nach Lichtaktivierung bei verschiedenen Temperaturen, pH-Werten und unterschiedlichen Umgebungen (native Membran, β -DM Mizelle) untersucht, da diese Parameter nach Lichtaktivierung entscheidend das Gleichgewicht zwischen dem aktiven und inaktiven Rezeptorzustand beeinflussen, wie in Abb. 39 dargestellt ist.

5.3.2 Opsin-AF in nativer Membran

Es ist bekannt, daß Opsin in nativen Diskmembranen bei saurem pH ($< \text{pH } 4$) eine aktive Konformation einnimmt [Vogel und Siebert, 2001, Vogel et al., 2007]. Deshalb wurden die Fluoreszenzanisotropiekurven von Opsin-C316-AF als Funktion des pH-Wertes im Bereich zwischen pH 3 und pH 8 gemessen.

In Abb. 50A sind diese Anisotropiekurven dargestellt. Die farbigen Kurven stellen die entsprechenden Fits nach Gleichung 3.14 mit drei Zerfallskomponenten dar, wobei $\phi_3 = \infty$ gesetzt ist. Als Vergleich ist die Anisotropiekurve des freien IAF dargestellt, welche monoexponentiell zerfällt.

Die Parameter der Fits sind in Abb. 50B und C zu dargestellt. In Abb. 50B, C und D ist mit gelb im Hintergrund der pH-Bereich für die Ausbildung der aktiven Konformation des Opsins angedeutet, welche mit der inaktiven Konformation ein Gleichgewicht bei $\text{pK} = 3.8$ besitzt [Vogel et al., 2007].

Abb. 50B zeigt die pH-Abhängigkeit der Rotationsdiffusion des gebundenen Farbstoffes (ϕ_1) und der Helix 8 (ϕ_2). ϕ_1 zeigt keine pH-Abhängigkeit. Die Rotationskorrelationszeit ϕ_2 von Helix 8 dagegen zeigt eine pH-Abhängigkeit. Diese kann mit der Henderson-Hasselbalch Funktion gefittet werden und zeigt eine biphasische pH-Abhängigkeit mit $\text{pK}_{a1} = 4.1 \pm 0.8$ und $\text{pK}_{a2} = 6.4 \pm 0.3$. Die relativen Amplituden β_i wurden global mit der Henderson-Hasselbalch-Funktion mit einem Übergang von $\text{pK}_a = 6.3 \pm 0.1$ gefittet (Abb. 50C). Die relativen Amplituden β_1 und β_2 sind im alkalischen doppelt so groß wie im sauren pH-Bereich und steigen von 9% bei pH 4 auf 21% bei pH 8 (β_1), bzw. von 6% bei pH 4 auf 12% bei pH 8 (β_2). Die relativen Amplituden β_i können über den r_0 Wert aus dem Fit in die absoluten Amplituden r_i umgerechnet werden: $\beta_i = \frac{r_i}{r_0}$. Die Endanisotropie r_∞ , welche ein Wert für die sterische Einschränkung der Bewegung durch die Proteinoberfläche ist, nimmt mit steigendem pH-Wert ab. Dies ist in Abb. 50A gut zu erkennen. Die Auswertung der relativen Amplituden der Rotationsdiffusion über das Kegelmodell mit dem *cone-in-a-cone* Ansatz [Schröder et al., 2005] für Farbstoff und Segmentmobilität werden in Abb. 50D gezeigt. Der Helix 8 Öffnungswinkel zeigt einen Anstieg von 13.5° auf 19° mit einem Übergang von $\text{pK}_a = 6.5 \pm 0.1$. Der Farbstoffhalbkegelöffnungswinkel wird mit steigenden pH zunächst mit einem Übergang von $\text{pK}_{a1} = 4.3 \pm 0.4$ kleiner und steigt dann mit einem Übergang von $\text{pK}_{a2} = 5.7 \pm 0.2$ von 10° auf 22° an.

In Bezug auf eine Korrelation von Helix 8 Dynamikänderung und Ausbildung der aktiven Rezeptorkonformation von Opsin bei hoher Protonenkonzentration läßt sich aus den Daten schließen, daß sich die Rotationskorrelationszeit von Helix 8 im relevanten pH-Bereich von $\phi_2 \approx 0.5$ ns bei pH 5 auf $\phi_2 \approx 1$ ns bei pH 3.5 ändert. Zusätzlich nimmt die sterische Einschränkung durch die umgebenden Komponenten der Proteinoberfläche zu, wie durch den Anstieg der sterischen Einschränkung des Farbstoffes zu sehen ist. Dies bedeutet, daß sich nicht nur die Dynamik von Helix 8, sondern auch weitere Elemente der cytoplasmatischen Rezeptoroberfläche in einer pH-abhängigen Konformationsänderung mit einem Übergang von $\text{pK}_a \approx 4$ ändern. Diese

pH-abhängige Konformationsänderung von Helix 8 und Oberfläche korreliert mit dem Übergang von einer inaktiven zu einer aktiven Opsinkonformation mit einem $pK = 3.8$ [Vogel et al., 2007]. Zusätzlich tritt eine pH-abhängige Konformationsänderung im pH-Bereich von ca. pH 6 auf, die nicht mit der Ausbildung der aktiven Konformation korreliert ist, aber eine intrinsische Eigenschaft des Sieben-Helix-Proteins darzustellen scheint. Sowohl die Rotationskorrelationszeit als auch die sterische Einschränkung von Helix 8 und die Farbstoffbeweglichkeit durch die Proteinumgebung zeigen eine Zustandsänderung mit einem Übergang im Bereich von $pK \approx 6 - 6.5$.

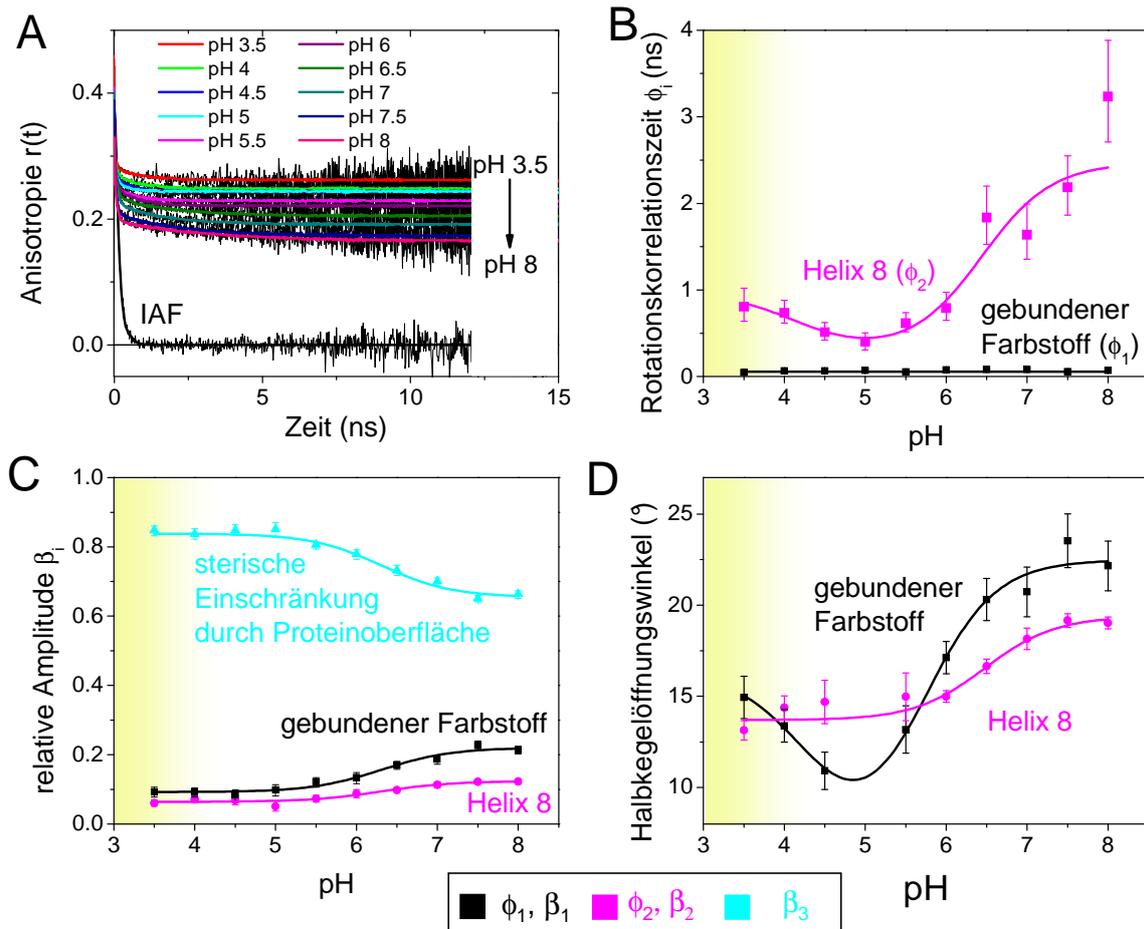


Abbildung 50: Übersicht über die Anisotropien von Opsin-C316-AF in nativen Membranen als Funktion vom pH. **A:** Anisotropiekurven von Opsin-AF in Membranen bei verschiedenen pH-Werten. In schwarz ist zum Vergleich die Anisotropie von freiem IAF dargestellt. **B:** pH-Abhängigkeiten der Rotationskorrelationszeiten ϕ_i . **C:** pH-Abhängigkeit der relativen Amplituden β_i . r_∞ korreliert mit β_3 via $\beta_3 = \frac{r_\infty}{r_0}$. **D:** pH-Abhängigkeit der Halbkegelöffnungswinkel aus dem *cone-in-a-cone* Modell. Fehler wurden mittels *exhaustive error analysis* ermittelt. Messungen wurden in 50 mM Puffer (Citrat-Puffer (pH 3.5 – 4.5), MES (pH 5 – 7), Tris (pH 7.5 – 8)) und 150 mM NaCl bei 20°C durchgeführt. $\lambda_{ex} = 484$ nm, OG515 Kantenfilter im Fluoreszenzstrahlengang. Der pH-Bereich des aktiven Zustands von Rhodopsin ist gelb hinterlegt.

5.3.3 Anisotropie der Opsin-Mizellen

Die Anisotropiezerfallskurven von Opsin-C316-AF verhalten sich in Abhängigkeit von der Proteinumgebung - native Membranen oder Mizellen - im Vergleich zum jeweiligen Dunkelzustand von Rhodopsin bei pH 7.5 unterschiedlich (Abb 49B und D) und zeigen ein diametral entgegengesetztes Verhalten bezüglich der sterischen Einschränkung der Bewegung des Farbstoffs, bzw. von Helix 8. Während in nativen Membranen die Endanisotropie von Opsin-C316-AF bei pH 7.5 und 20°C höher liegt als im Dunkelzustand, ist sie in Mizellenumgebung niedriger (Abb. 49). Die Analyse der Diffusionsdynamik zeigt auch ein unterschiedliches Verhalten der relativen Amplituden β_i der Anisotropiezerfallskurven (siehe Tabelle 7). Die Diffusionsdynamik von Opsin-C316-AF in Abhängigkeit vom pH im Bereich von pH 3.5 - pH 8 wurde daher in Mizellenumgebung zum Vergleich gemessen.

In Abb. 51A sind diese Anisotropiekurven dargestellt. Die farbigen Kurven sind die entsprechenden Fits nach Modellgleichung 3.14 mit drei Anisotropiezerfallskomponenten. Als Vergleich ist die Anisotropiekurve des freien Fluorescein dargestellt, welche monoexponentiell zerfällt.

Die einzelnen Parameter der Fits sind in Abb. 50B und C zu sehen. Die Analyse der Rotationsdiffusion des gebundenen Farbstoffes und der Helix 8 über das Kegelmodell wird in Abb. 50D dargestellt.

Die Übersicht der Opsin-AF Anisotropien in Abbildung 51A zeigen im gesamten gemessenen pH-Bereich von pH 3.5 - pH 8 eine sterische Einschränkung durch die Proteinoberfläche, welche mit steigendem pH fällt (Abb. 50A). Dies ist in Analogie zu den Experimenten mit Opsin in Membranen. Die relativen Amplituden β_i lassen sich global mit einer Henderson-Hasselbalch-Funktion mit $pK_a = 5.7 \pm 0.1$ fitten. Die relativen Amplituden β_1 (18% auf 36%) und β_2 (10% auf 20%) verdoppeln sich jeweils, während β_3 von 72% auf 44% fällt.

Die Halbkegelöffnungswinkel für die Bewegung von Farbstoff und Helix 8 wurden mit dem *cone-in-a-cone* Modell für den pH-Bereich von pH 3.5 bis pH 8 berechnet (Abb. 50D). Diese zeigen einen pH-abhängigen Anstieg der Öffnungswinkel von 20° auf 32° für den Fluoreszenzmarker und einen pH-abhängigen Anstieg von 15° auf 28° für Helix 8. Die pH-Abhängigkeiten wurden mittels Henderson-Hasselbalch Funktion gefittet. Die Änderung des Halbkegelöffnungswinkels des Fluoreszenzmarkers wurde mit einem $pK_a = 5.7 \pm 0.2$ und für die Änderung des Halbkegelöffnungswinkels von Helix 8 mit einem $pK_a = 5.4 \pm 0.1$ ermittelt. Damit wird auch in Opsin-Mizellen der pH-abhängige Konformationsübergang bei ca. pH 6, der nicht mit der aktiven Rezeptorkonformation assoziiert ist, wiedergefunden.

Die Rotationskorrelationszeit ϕ_1 (gebundener Farbstoff) ist konstant über den gesamten pH-Bereich bei $\phi_1 = 0.15$ ns. Die Rotationskorrelationszeiten ϕ_2 (Helix 8) und ϕ_3 (Mizelle) zeigen eine pH-Abhängigkeit, welche global mit einer einfachen Henderson-Hasselbalch-Funktion ($n=1$) gefittet werden kann und einen $pK_a = 4.2$ besitzt (Abb. 51B). Die Rotationskorrelationszeit ϕ_2 nimmt mit zunehmenden saurem pH ab und fällt von $\phi_2 = 1.6$ ns bei pH 5 auf $\phi_2 = 0.7$ ns bei pH 3.5. Die Rotationskorrelationszeit ϕ_3 steigt von $\phi_3 = 50$ ns bei pH 5 auf $\phi_3 = 140$ ns bei pH 3.5 an. ϕ_3 spiegelt die Rotationsdiffusion der Opsinmizelle wieder. Über die Perringleichung kann man Rotationskorrelationszeit und Volumen V der Mizelle (d.h. die Größe der Mizelle) in Beziehung setzen: $\phi_3 = \frac{V\eta}{kT}$ (η : Viskosität, k : Boltzmann-Konstante und T : Temperatur). Unter der Voraussetzung, daß die Mizelle als kugelförmiger Rotator angesehen wird, kann aus dem Volumen der Durchmesser der Mizelle berechnet werden. Der Durchmesser der Opsin-DM-Mizelle wird damit zu $d = 10.3$ nm bei pH 3.5 und zu $d = 7.3$ nm für \geq pH 5 bestimmt. Die Werte für \geq pH 5 stimmen mit den bestimmten Rhodopsin-Mizellen Durchmessern in 0.05% DM für Rhodopsin-Monomere überein [Dutta et al., 2010]. Der Durchmesser von $d = 10.3$ nm bei pH 3.5 deutet auf eine Dimerisierung von Opsin in der DM-Mizelle hin. Der Durchmesser einer "leeren" DM-Mizelle (0.1% DM) beträgt 3.1 nm. Addiert man den Durchmesser eines Opsin-Dimers dazu, der mit einem maximalen Durchmesser parallel zur Membranoberfläche bei jeder möglichen Dimerkonformation

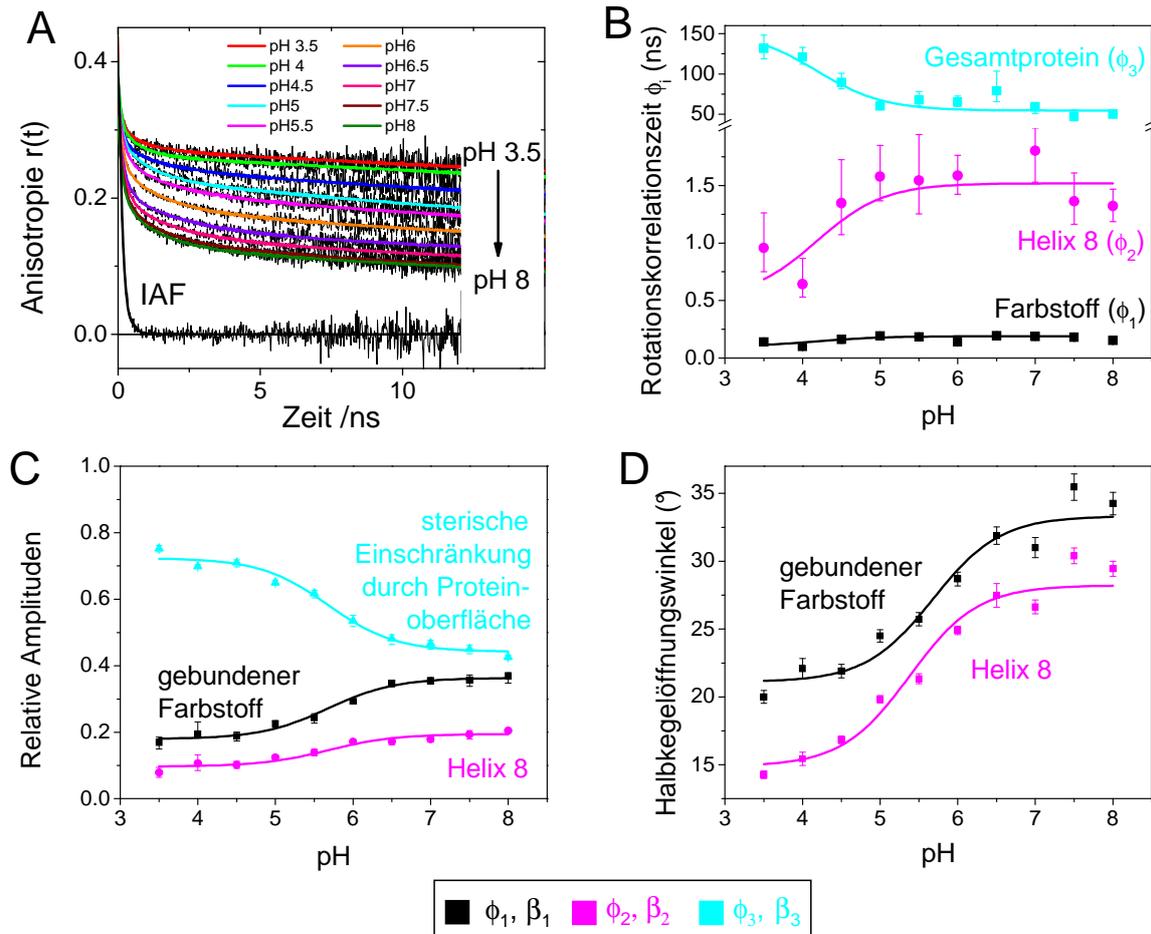


Abbildung 51: Übersicht über die Anisotropien von Opsin-C316-AF in Mizellen: **A:** Anisotropiekurven von Opsin-AF bei verschiedenen pH-Werten. In schwarz ist zum Vergleich die Anisotropie von freier IAF dargestellt. **B:** pH-Abhängigkeiten der Rotationskorrelationszeiten ϕ_i . **C:** Relative Amplituden β_i der ϕ_i . **D:** pH-Abhängigkeit der Halbkegelöffnungswinkel aus dem *cone-in-a-cone* Modell. Fehler wurden mittels *exhaustive error analysis* ermittelt. Probe: 5 μ M Opsin-C316-AF, $\lambda_{ex} = 486$ nm, Kantenfilter GG515. Messungen wurden in 50 mM Puffer (Citrat-Puffer (pH 3.5 – 4.5), MES (pH 5 – 7), Tris (pH 7.5 – 8)), 0.05% DM und 150 mM NaCl bei 20°C durchgeführt.

(PDB: 1N3M) zu 7 – 7.5 nm aus der Kristallstruktur bestimmt wurde, dann kann der aus den Anisotropiemessungen bestimmte Durchmesser auf die Bildung von Opsindimeren bei saurem pH hinweisen. Eine Dimerisierung von Rhodopsin wurde unter verschiedenen Bedingungen gezeigt [Fotiadis et al., 2003].

In einer wahrscheinlichen Dimerkonfiguration stehen beide Rezeptoren in den Dimeren derart zueinander, daß sie über Helix 8 und TM1 miteinander in Kontakt stehen [Knepp et al., 2012]. Da die pH-abhängige Änderung der Rotationskorrelationszeit ϕ_2 der Helix 8 mit dem Anstieg der Mizellengröße korreliert, kann geschlossen werden, daß die Änderung der Rotationskorrelationszeit von Helix 8 eher mit der Dimerisierung von Opsin als mit der Ausbildung einer sauren aktiven Rezeptorkonformation verbunden ist. Die beobachtete Änderung der Rotationskorrelationszeit von Helix 8 in Opsin-Membranen bei pH 4 mit einer verlangsamten Dynamik im aktiven Rezeptorzustand steht im Gegensatz zu den Beobachtungen in Opsin-Mizellen, in denen die Rotationskorrelationszeit von Helix 8 im sauren pH-Bereich schneller wird.

5.3.4 Anisotropie der Rhodopsin Membranen bei 0°C

In den beiden vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, daß die Dynamik von Helix 8 und der cytoplasmatischen Oberfläche stark durch die Umgebung (Membran oder Detergenz) geprägt wird. Darüberhinaus konnte eine spezifische Signatur von Helix 8 in der aktiven Konformation beschrieben werden. Diese beinhaltet eine Verlangsamung der Rotationskorrelationszeit der Helix 8 und der sterischen Einschränkung durch die Proteinumgebung. In dem vorliegenden Kapitel werden Anisotropieexperimente von Rhodopsin-C316-AF in nativen Diskmembranfragmenten bei tiefen Temperaturen vorgestellt. In diesem Temperaturbereich existiert ein einfaches Gleichgewicht zwischen dem inaktiven Vorläuferintermediat Meta-I und dem aktiven Intermediat Meta-II. Nach Lichtaktivierung des Rhodopsins wird dabei pH-abhängig Meta-I oder Meta-II gebildet. Im sauren pH-Bereich wird vollständig Meta-II gebildet, im alkalischen pH-Bereich nur Meta-I. Das Gleichgewicht hat bei 0°C einen pK_a von 6.6 ± 0.1 (Abb. 39).

Die Anisotropie von Rhodopsin-C316-AF wurde im Dunkelzustand und nach Lichtaktivierung in einem Bereich von pH 5.5 - pH 9 gemessen. Die Analyse wurde anhand der Modellgleichung 3.14 mit drei Anisotropiezerfallskomponenten durchgeführt. Die einzelnen Parameter der Fits sind in Abb. 52 dargestellt.

Analyse der Anisotropiezerfallskurven im inaktiven Dunkelzustand

Abbildung 52A und C zeigen die aus den Fits erhaltenen Rotationskorrelationszeiten ϕ_i und die dazugehörigen Amplituden β_i der jeweiligen Anisotropiezerfallskomponente. Die Analyse der Rotationsdiffusion des gebundenen Farbstoffes und der Helix 8 über das Kegelmodell wird in Abbildung 52E dargestellt.

Im Grundzustand von Rhodopsin zeigt die Dynamik des Farbstoffes (ϕ_1) keine signifikante Abhängigkeit vom pH-Wert (Abb. 52A) und liegt bei 0.1 ns, die dazugehörige relative Amplitude β_1 liegt bei konstant 7% über den gemessenen pH-Bereich (Abb. 52C).

Die Dynamik von Helix 8 (ϕ_2) zeigt eine pH-Abhängigkeit. Die Rotationskorrelationszeit ϕ_2 fällt von 3.1 ns im sauren pH-Bereich auf 2.4 ns im alkalischen pH-Bereich. Der Übergang wurde mittels Henderson-Hasselbalch Funktion mit einem $pK_a = 6.4 \pm 0.3$ gefittet (Abb. 52A). Die Amplitude β_2 steigt von 4% im sauren pH-Bereich auf 48%, die relative Amplitude β_3 (sterische Einschränkung) nimmt gleichermaßen von 89% auf 45% ab (Abb. 52C). Der Übergang wurde mittels Henderson-Hasselbalch Funktion mit einem $pK_a = 5.7 \pm 0.2$ gefittet.

Die *cone-in-a-cone* Analyse des Dunkelzustands von Rhodopsin zeigt, daß innerhalb des Fehlers pH-unabhängig der Farbstoff-Halbkegelöffnungswinkel bei 16° liegt, der Halbkegelöffnungswinkel der Helix 8 Komponente steigt von 7° auf 42° an und besitzt einen Übergang bei $pK_a = 5.9 \pm 0.1$ (Abb. 52E).

In Alexiev et al. [2003] wurde die relative Mobilität β'_2 der Helix 8 analysiert. Für eine Vergleichbarkeit der Daten wurde β'_2 auch für die in dieser Arbeit ermittelten Anisotropiedaten nach $\beta'_2 = \frac{\beta_2}{\beta_2 + \beta_3}$ berechnet. Der Übergang der relativen β'_2 -Werte im Dunkelzustand von Rhodopsin liegt bei $pK_a = 6.0 \pm 0.3$ mit einen Hill-Koeffizienten von $n = 1.7$ und stimmt damit sehr gut mit den publizierten Daten ($pK_a = 6.2$, $n = 1.9$) überein [Alexiev et al., 2003].

Rhodopsin-AF in Membranen, 0°C

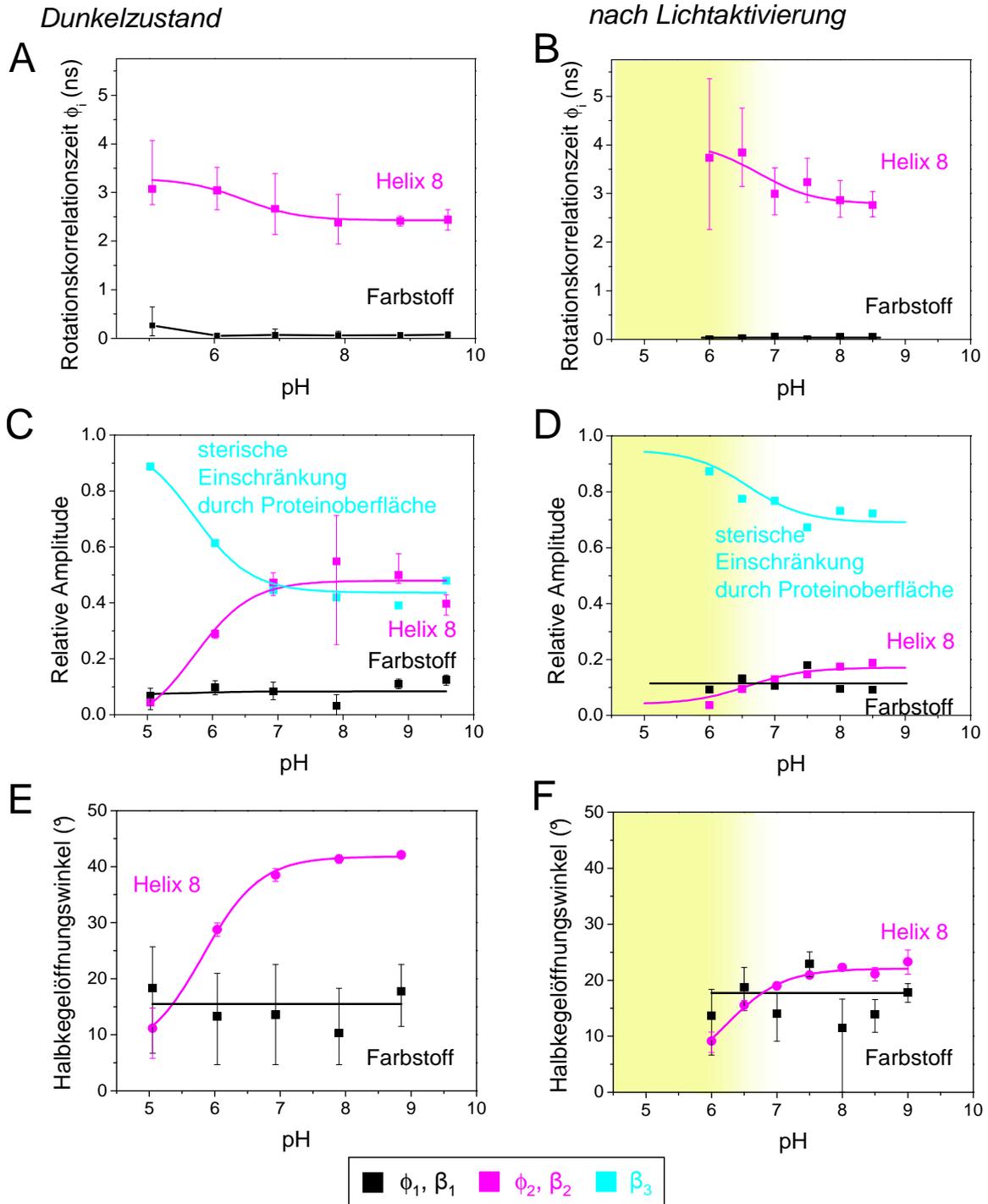


Abbildung 52: pH-Abhängigkeit der Anisotropie von Rhodopsin-C316-AF in Membranen im Grundzustand (linke Spalte) und im angeregten Meta-II Intermediats (rechte Spalte) bei 0°C. Die Rotationskorrelationszeiten ϕ_i sind auf der ersten Zeile, die relativen Amplituden β_i in der Mitte ($\phi_3 = \infty$) und die Halbkegelöffnungswinkel in der unteren Zeile dargestellt. Der pH-Bereich des aktiven Zustands von Rhodopsin ist gelb hinterlegt. Bedingungen: 50 mM MES-Bis-Tris-Propan, 150 mM NaCl

Analyse der Anisotropiezerfallskurven im lichtaktivierten Zustand

Abbildung 52B und D zeigen die aus den Fits ermittelten Rotationskorrelationszeiten und dazugehörigen Amplituden der jeweiligen Anisotropiezerfallskomponente im lichtaktivierten Zustand bei 0°C. Die Analyse der Rotationsdiffusion des gebundenen Farbstoffes und der Helix 8 über das Kegelmodell wird in Abb. 52F dargestellt.

Nach Lichtaktivierung zeigen die Anisotropiezerfallskurven für Proben < pH 6 nach initialen Zerfall einen zwischenzeitlichen Anstieg in der Anisotropie (Abb. 53), welche auch *associated anisotropy decay* genannt wird [Lakowicz, 2006]. Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt bei sehr niedrigen pH-Werten. Bei pH 6 ist er nur noch schwach zu sehen. Der Anstieg der Anisotropie kann dadurch erklärt werden, daß zwei verschiedene Spezies von Proben mit unterschiedlichen Anisotropieverhalten und unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauer existieren. Eine Spezies besitzt einen schnellen Anisotropie- und Fluoreszenzzerfall, die andere einen langsamen Anisotropie- und Fluoreszenzzerfall. In der Anisotropiekurve dominiert im Zeitbereich direkt nach Fluoreszenzanregung der Anisotropiezerfall der ersten Spezies. Durch ihren schnellen Fluoreszenzzerfall wird für spätere Zeiten der Anisotropiezerfall der anderen Spezies dominant. Eine Ursache für die Aufspaltung in zwei Spezies könnte eine Reprotonierung der Schiffsbasis aufgrund der hohen Protonenkonzentration bei niedrigen pH-Werten sein. Für die weitere Auswertung wurden diese Kurven nicht genutzt.

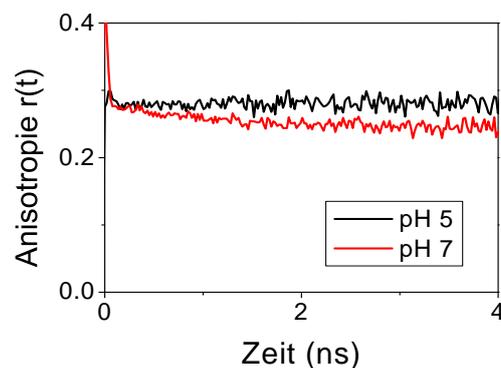


Abbildung 53: Beispiel einer Anisotropiekurve mit *associated anisotropy decay*. Nach initialen Anisotropiezerfall steigt die Anisotropie wieder an und zerfällt langsam wieder (schwarze Kurve bei pH 5). Zum Vergleich ist eine Anisotropiezerfallskurve bei pH 7 dargestellt (rot), die das Verhalten nicht zeigt. Meßbedingungen: Lichtaktiviertes Rho-C316AF in nativen Membranen, 50 mM MES-Bis-Tris-Propan, 150 mM NaCl, 0°C.

Die Analyse der Anisotropiezerfallskurven im Bereich von pH 6 bis pH 9 zeigt ein eindeutiges pH-abhängiges Verhalten nach Lichtanregung. Dabei ist zu beachten, daß unterhalb von pH 6.5 der aktive Meta-II Zustand überwiegt und oberhalb von pH 6.5 der inaktive Vorläuferzustand Meta-I. Die gelbe Unterlegung in den Abbildungen 52B und D zeigt den pH-Bereich der Ausbildung des aktiven Rezeptorzustandes bei 0°C an. Die in Abb. 52B dargestellten Rotationskorrelationszeiten von Farbstoff und Helix 8 zeigen ein pH-abhängiges Verhalten für Helix 8 und ein pH-unabhängiges Verhalten für die Farbstoffkomponente. Die Rotationskorrelationszeit ϕ_2 (Helix 8) fällt von 3.8 ns (pH 6) auf 3.0 ns (pH 8.5). Der pH-abhängige Konformationsübergang wurde mittels Henderson-Hasselbalch Funktion gefittet und liegt bei $pK_a = 6.7 \pm 0.7$ (Abb. 52B). Die in Abbildung 52D gezeigten relativen Amplituden der Rotationszerfallskomponenten zeigen ein deutliches pH-abhängiges Verhalten für die sterische Einschränkung durch die Proteinoberfläche (β_3) und für

die Helix 8-Komponente (β_2). Die relative Amplitude β_1 liegt innerhalb des Fehlers konstant bei etwa 12%. Die Amplitude β_2 steigt von 5% auf 17%. Die Amplitude β_3 fällt von 87% auf 68% ab. Der Übergang wurde für β_2 (Helix 8) und β_3 (sterische Einschränkung durch Proteinumgebung) global mittels Henderson-Hasselbalch Funktion gefittet und liegt bei $pK_a = 6.6 \pm 0.7$.

Im Einklang mit der Analyse der relativen Amplituden zeigt die Auswertung mit Hilfe des *cone-in-a-cone* Ansatzes der lichtaktivierten Proben keine signifikante pH-Abhängigkeit für den Halbkegelöffnungswinkel des Farbstoffes ($\sim 18^\circ$). Der Halbkegelöffnungswinkel der Helix steigt von (extrapolierten) 3° auf 23° mit einem $pK_a = 6.2 \pm 0.2$ an (Abb. 52F) und stimmt damit sehr gut mit dem Übergang aus der pH-Abhängigkeit der relativen Amplituden überein.

Schlußfolgerung

Bei 0°C ist der lichtinduzierte Übergang von Meta-I nach Meta-II sehr stark vom pH abhängig. Im Dunkelzustand (inaktiver Zustand des Rezeptors) von Rhodopsin sind die Übergänge der pH-abhängigen Dynamikänderungen von Helix 8 im Bereich von pH 6 ($pK_a = 5.9 - 6.0$). In Alexiev et al. [2003] wurde im Dunkelzustand eine starke Erhöhung der Mobilität, d.h. Vergrößerung des Konformationsraums von Helix 8, detektiert, welche als *alkaline unlock* von Helix 8 bezeichnet wurde. Der pK-Wert dieses *alkaline unlock* von $pK = 6.2$ (bei 15°C , Alexiev et al. [2003]) stimmt gut mit dem berechneten pK-Wert aus den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen von $pK_a = 6.0 \pm 0.3$ (relative Mobilität β_2') überein, sie besitzen auch nahezu den gleichen Hill-Koeffizienten ($n = 1.6 - 1.7$), was auf eine Kooperativität beim Übergang hinweist. In Alexiev et al. [2003] wurde die Hypothese aufgestellt, dass der *alkaline unlock* von Helix 8 eine funktionelle Bedeutung für Ausbildung des aktiven Meta-II Intermediats hat, da der pK-Wert des *alkaline unlock* im Bereich des pK-Wertes des Meta-I/Meta-II-Gleichgewichts liegt.

Für die hier betrachteten Rhodopsin Proben liegt das Meta-I/Meta-II-Gleichgewicht bei 0°C bei $pK_a = 6.6 \pm 0.1$. Dieser Wert liegt leicht höher als z.B. der extrapolierte Wert für 0°C ($pK = 6.1$) aus publizierten Daten [Mahalingam et al., 2008]. Dies deutet auf eine biologische Variabilität in den Proben hin, was jedoch nicht verwundert, da die ROS-Membranen aus Rinderaugen vom Schlachthof isoliert worden sind und nicht von standardisierten Labortieren stammen.

Vergleicht man die hier in dieser Arbeit erhobenen Werte für den Konformationsübergang bei pH 6 (relative Mobilität und *cone-in-a-cone* Modell) mit dem pK-Wert des Meta-I/Meta-II Gleichgewichtes ($pK = 6.6$), dann liegt der Konformationsübergang im inaktiven Dunkelzustand leicht unter dem pK-Wert des Meta-I/Meta-II Gleichgewichtes.

Nach Lichtanregung erhalten wir pH-abhängig Meta-I (oberhalb von pH 6.6), bzw. Meta-II (unterhalb von pH 6.6). Die beobachteten Konformationsänderungen von Helix 8 (Rotationskorrelationszeit ϕ_2 , relative Amplitude β_2) und die pH-abhängige Änderung der sterischen Einschränkung durch die Proteinoberfläche korrelieren in ihrer pH-Abhängigkeit ($pK_a \sim 6.2 - 6.7$) mit der Ausbildung des aktiven Meta-II Zustandes. D.h. in Meta-II ist die Rotationskorrelationszeit von Helix 8 mit $\phi_2 = 3.8$ ns im Vergleich zu $\phi_2 = 3.0$ ns im inaktiven Dunkelzustand langsamer. Mit dieser vom aktiven Rezeptorzustand abhängigen Dynamikänderung von Helix 8 ist ein Anstieg der sterischen Einschränkung durch die Proteinoberfläche von ca. 30% korreliert. Diese Dynamiksignatur von Helix 8 im aktivierten Rezeptorzustand bei 0°C stimmt mit der schon beobachteten Signatur von Helix 8 unter physiologischen Bedingungen bei Raumtemperatur (siehe Abb. 49) qualitativ überein.

5.3.5 Anisotropie der Rhodopsin Membranen bei 37°C

In einer weiteren Experimentreihe wurde die Dynamik von Helix 8 bei physiologischer Temperatur von 37°C im pH-Bereich von pH 5.5 – 9 gemessen. Bei dieser Temperatur wird aktives Meta-II nach Lichtaktivierung bei allen untersuchten pH-Werten gebildet. Jedoch hängt die Konzentration des gebildeten Meta-II vom pH-Wert ab. Der Anteil von Meta-II fällt von 100% im sauren pH-Bereich auf ca. 60% (Abb. 39A) im alkalischen Bereich. Dieser pH-abhängige Übergang hat einen $pK_a = 7.9 \pm 0.1$. Daraus ist zu schließen [Mahalingam et al., 2008], daß auch bei 37°C pH-abhängig auf unterschiedlichen Wegen Meta-II gebildet wird.

Die Anisotropie von Rhodopsin-C316-AF wurde im Dunkelizustand und nach Lichtaktivierung in einem pH-Bereich von pH 5.5 - pH 9 gemessen. Die Analyse wurde anhand der Modellgleichung 3.14 mit drei Anisotropiezerfallskomponenten durchgeführt. Die einzelnen Parameter der Fits sind in Abb. 54 zu sehen.

Analyse der Anisotropiezerfallskurven im inaktiven Dunkelizustand

Abbildung 54A und C zeigen die pH-abhängigen Rotationskorrelationszeiten von Helix 8 und Fluorophor und die dazugehörigen relativen Amplituden. Man sieht deutlich, daß für die Rotationskorrelationszeiten ϕ_1 keine pH-Abhängigkeit besteht. Die Korrelationszeit von Helix 8 liegt bei $\phi_2 = 2.6 \pm 0.5$ ns. Die Rotationskorrelationszeit des Farbstoffes mit $\phi_1 = 0.13 \pm 0.09$ ns entspricht der Rotationskorrelationszeit des freien Farbstoffes. Der Konformationsraum des Farbstoffes, d.h. die Amplitude der entsprechenden Zerfallskomponente, zeigt eine leichte pH-Abhängigkeit mit höheren Werten bei alkalischem pH. Die Amplitude β_2 (Helix 8) zeigt jedoch eine deutliche pH-Abhängigkeit mit einem $pK_a = 6.4 \pm 0.1$. Die relativen Amplituden steigen von 20% bei pH 6 auf 40% bei pH 9 an, d.h. der Konformationsraum für die Bewegung von Helix 8 wird größer. Im gleichen Maße, wie die Mobilität von Helix 8 größer wird, nimmt die sterische Einschränkung durch die Proteinoberfläche ab. Mit Hilfe des *cone-in-a-cone* Modells konnte die pH-abhängige Änderung im Konformationsraum von Helix 8 und vom gebundenen Farbstoff quantifiziert werden. Dabei gibt es interessanterweise einen Unterschied in der pH-Abhängigkeit von Helix 8 und vom gebundenen Farbstoff. Während der Halbkegelöffnungswinkel von Helix 8 mit einem $pK_a = 6.6 \pm 0.1$ von 24° auf 41° ansteigt, verändert sich der Halbkegelöffnungswinkel des gebundenen Farbstoffes mit einem $pK_a = 8.1 \pm 0.1$ von 19 auf 34° (Abb. 54E).

Analyse der Anisotropiezerfallskurven im lichtaktivierten Zustand

Abbildung 54B und D zeigen die aus den Fit erhaltenen Rotationskorrelationszeiten und dazugehörigen Amplituden der jeweiligen Anisotropiezerfallskomponente nach Lichtaktivierung. Die Analyse der Rotationsdiffusion des gebundenen Farbstoffes und der Helix 8 über das Kegelmodell wird in Abbildung 54F dargestellt. Der gelbe Hintergrund in 54B und D deutet an, daß Meta-II im gesamten gemessenen pH-Bereich gebildet wird.

Die Analyse der Anisotropiezerfallskurven im Bereich von pH 5.5 bis pH 9 zeigt, daß für die Rotationskorrelationszeiten des Farbstoffes (ϕ_1) und der Helix 8 (ϕ_2) keine pH-Abhängigkeit besteht (Abb. 54B). Die Korrelationszeit von Helix 8 liegt bei $\phi_2 = 3.2 \pm 0.3$ ns. Die Rotationskorrelationszeit des Farbstoffes mit $\phi_1 = 0.13 \pm 0.07$ ns entspricht wiederum der Rotationskorrelationszeit des freien Farbstoffes.

Rhodopsin-AF in Membranen, 37°C

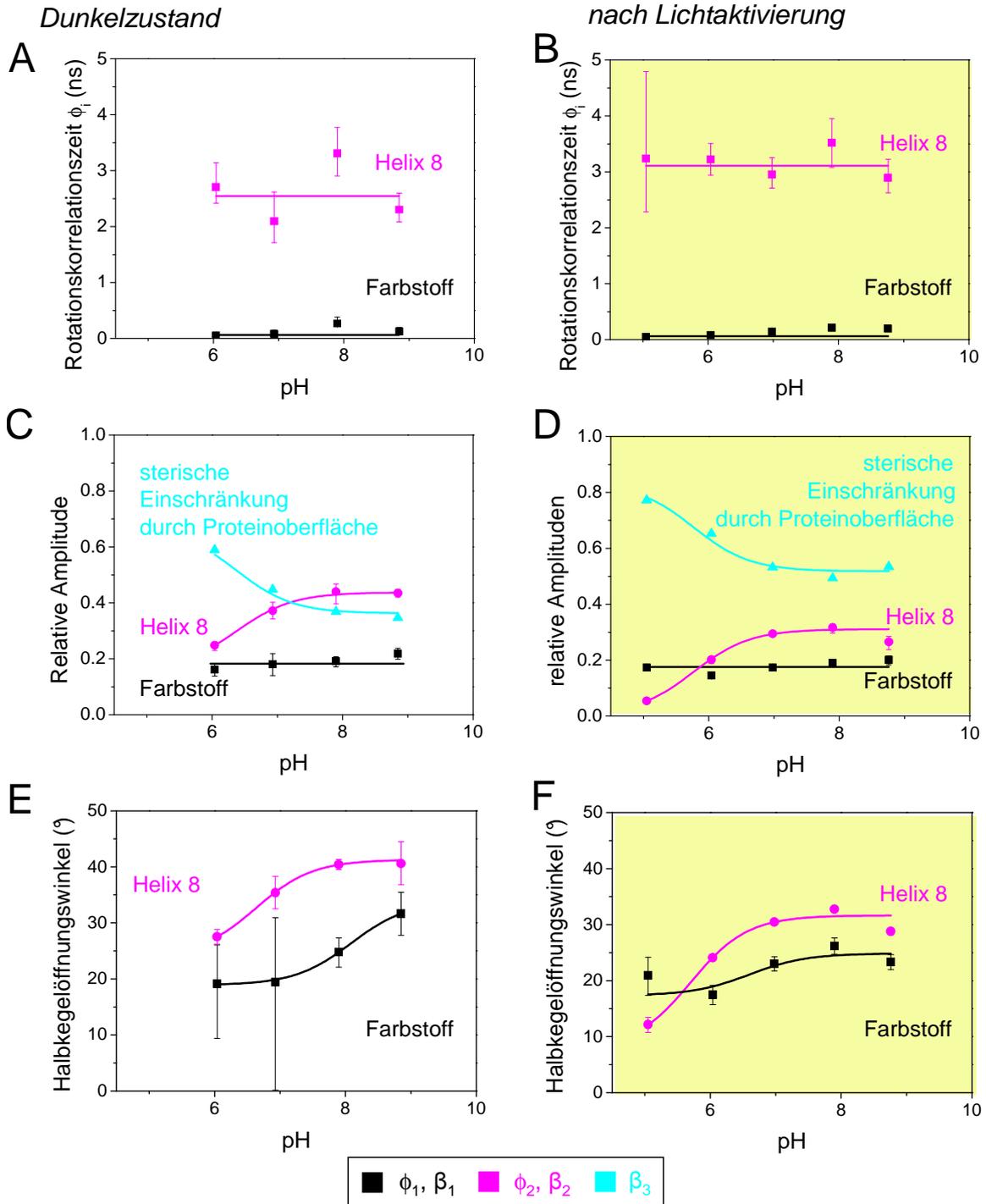


Abbildung 54: pH-Abhängigkeit der Anisotropie von Rhodopsin-C316-AF in Membranen im Grundzustand (linke Spalte) und im angeregten Meta-II Intermediats (rechte Spalte) bei 37°C. Die Rotationskorrelationszeiten ϕ_i sind in der ersten Zeile, die relativen Amplituden A_i in der Mitte ($\phi_3 = \infty$) und die Halbkegelöffnungswinkel in der unteren Zeile dargestellt. Der pH-Bereich des aktiven Zustands von Rhodopsin ist gelb hinterlegt. Bedingungen: 50 mM MES-Bis-Tris-Propan, 150 mM NaCl

Die in Abbildung 54D dargestellten relativen Amplituden der Rotationszerfallskomponenten zeigen ein deutliches pH-abhängiges Verhalten für die sterische Einschränkung durch die Proteinoberfläche (β_3) und für die Helix 8-Komponente (β_2). Die relative Amplitude β_1 liegt innerhalb des Fehlers konstant bei etwa 17%. Die Amplitude β_2 steigt von 5% auf 31% an. Die sterische Einschränkung durch die Proteinoberfläche (β_3) fällt von 78% auf 52% ab. Der Übergang wurde für β_2 (Helix 8) und β_3 (sterische Einschränkung durch Proteinumgebung) global mittels der Henderson-Hasselbalch Funktion gefittet und liegt bei einem $pK_a = 5.8 \pm 0.1$ (Abb. 54D). Mit Hilfe des *cone-in-a-cone* Modells konnte diese pH-Abhängigkeit von Helix 8 und gebundenen Farbstoff quantifiziert werden. Der Halbkegelöffnungswinkel von Helix 8 steigt mit einem $pK_a = 5.7 \pm 0.3$ von 8° auf 32° an. Der Halbkegelöffnungswinkel des gebundenen Farbstoffes verändert sich mit einem $pK_a = 6.6 \pm 0.8$ leicht von 17° auf 24° (Abb. 54F).

Schlußfolgerung

Trotzdem bei 37°C über den gesamten gemessenen pH-Bereich von pH 5 bis pH 9 Meta-II gebildet wird, zeigen die Anisotropiemessungen von Helix 8 distinkte pH-abhängige Konformationsänderungen. Diese können mit den unterschiedlichen Reaktionsgleichgewichten zwischen Meta-I/Meta-II bei alkalischem und saurem pH zu tun haben. Während bei saurem pH direkt die protonierte Meta-II Spezies (aktive Rezeptorkonformation: deprotonierte Schiffische Base, protoniertes Glu134 an der cytoplasmatischen Oberfläche) gebildet wird, existiert bei alkalischem pH ein pH-unabhängiges Gleichgewicht zwischen Meta-I, inaktiven Meta-II (Meta-II_a) und der aktiven Rezeptorkonformation Meta-II_b (deprotonierte Schiffische Base, deprotonierte Glu134) [Mahalingam et al., 2008].

In Übereinstimmung mit der Tatsache, daß bei 37°C Meta-II über den gesamten pH-Bereich gebildet wird, findet ein pH-unabhängiger Anstieg der Rotationskorrelationszeit von Helix 8 von $\phi_2 = 2.6 \pm 0.5$ im Dunkelzustand zu $\phi_2 = 3.2 \pm 0.3$ im aktiven Meta-II Zustand statt. Dies ist wiederum eine Bestätigung der Signatur von Helix 8 im aktiven Rezeptorzustand, die durch Verlangsamung der Helix 8 Dynamik gegenüber den jeweiligen Dunkelzustand gekennzeichnet ist.

Eine Korrelation zum pK-Wert des Meta-I/Meta-II Gleichgewichts bei alkalischen pH-Werten ($pK_a = 7.9 \pm 0.1$) konnte im inaktiven Dunkelzustand des Rezeptors für den Konformationsraum des gebundenen Farbstoffes festgestellt werden. Die Vergrößerung des Bewegungskegels des Farbstoffes mit einem $pK_a = 8.1 \pm 0.1$ deutet auf eine Veränderung der Proteinumgebungskonformation mit diesem pK-Wert hin. Diese Konformationsänderung kann mit der Ausbildung des pH-unabhängigen Meta-I/Meta-II Gleichgewichtes bei alkalischen pH-Werten zusammenhängen.

Im lichtaktivierten Meta-II Zustand dominiert eine Konformationsänderung im pH-Bereich von etwa pH 6, d.h. in der Nähe vom pK-Wert des einfachen Meta-I/Meta-II Gleichgewichtes, welches bei 0°C untersucht wurde. Die Helix 8 Dynamik scheint im Bezug auf Konformationsraum und sterischer Einschränkung durch die Proteinumgebung direkt mit der Deprotonierung der Schiffischen Base und der Protonierung der Glu134 an der cytoplasmatischen Oberfläche korreliert zu sein.

5.3.6 Analyse der Helix 8 Dynamik mittels Ordnungsparameter $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ und der Verteilungsfunktion $f(\Theta)$

Die phänomenologische Analyse der Anisotropiezerfallszeiten ϕ_i gibt Auskunft über Fluorophor-, Segment- und Proteindynamik und der sterischen Einschränkung. Diese kann als Halbkegelöffnungswinkel quantifiziert werden, wenn man die Analyse mittels Kegelmodell durchführt. Es können jedoch unter bestimmten Annahmen die Ordnungsparameter zweiter ($\langle P_2 \rangle$) und vierter ($\langle P_4 \rangle$) Ordnung aus den Anisotropiezerfallsdaten extrahiert werden. Während beim Kegelmodell die Verteilungsfunktion $f(\Theta)$ vorgegeben ist, kann aus den Ordnungsparametern die Verteilungsfunktion $f(\Theta)$ des fluoreszierenden Sensors ermittelt werden.

In dieser Analyse wurden Fluorescein und Helix 8 (Helix 8 - Fluorescein) zusammen als ein zylindrisches Objekt approximiert und die Ordnungsparameter $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ bestimmt (fluoreszierender Sensor). Da ihre Bewegungen gekoppelt sind, kann diese Approximation angenommen werden. Der Ordnungsparameter $\langle P_2 \rangle$ ist bei zeitaufgelösten Anisotropiemessungen direkt mit der Endanisotropie r_∞ bzw. der relativen Amplitude β_3 verknüpft: $\langle P_2 \rangle^2 = \beta_3$. Der Ordnungsparameter $\langle P_4 \rangle$ ist bei zeitaufgelösten Anisotropiemessungen ein Maß für die Mobilität des Sensors.

Der Vergleich der Graphen von Kegelmodell und Gaußmodell zeigt, daß für alle $\langle P_2 \rangle$ gilt (Abb. 26, 55): $\langle P_4 \rangle_{\text{Gauß}} \geq \langle P_4 \rangle_{\text{Kegel}}$. Dies bedeutet, daß der fluoreszierende Sensor eine höhere Mobilität besitzt, wenn dieser der Verteilungsfunktion $f(\Theta)$ des Gaußmodells folgt (Abb. 26). Für die Interpretation der Helix 8 - Fluorescein Daten in Membranumgebung bedeutet es, daß die Umgebung um die Helix beim Kegelmodell starrer als beim Gaußmodell ist, welche eher für eine flexiblere (weichere) Umgebung steht. Bei der Analyse wird von einer Rotationssymmetrie um die Achse, welche den Halbkegelöffnungswinkel aufspannt, und einer Isotropie des umgebenden Mediums um das zu analysierende Molekül ausgegangen. Helix 8 - Fluorescein ist in Kontakt mit der Membran- und Proteinoberfläche und ist jeweils an beiden Enden durch Protein und Membrananker stabilisiert. Dadurch ist der fluoreszierende Sensor größtenteils auf eine Bewegung entlang der Membran- und Proteinoberfläche eingeschränkt, welche eine zweidimensionale quasi-isotrope Umgebung für den Sensor darstellt.

Die $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ -Analyse der Rhodopsin-AF Messungen soll Aufschluß darüber geben, ob sich die Ordnungsparameter nach einem typischen Modell im Dunkelzustand von Rhodopsin verhalten und ob nach Lichtaktivierung sich die Ordnungsparameter von inaktiven Meta-I und aktiven Meta-II unterscheiden lassen können.

In Abbildung 55A und B sind Wertepaare der Ordnungsparameter zweiter und vierter Ordnung ($\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$) gegeneinander aufgetragen. Die Unter- und Obergrenzen sind mit den durchgezogenen Graphen gekennzeichnet. Die $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ -Wertepaare, welche dem Kegelmodell entsprechen, sind mit einer gestrichelten Linie dargestellt. Die $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ -Wertepaare, welche dem Gaußmodell entsprechen, sind mit einer gepunkteten Linie dargestellt.

In Abbildung 55A sind die $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ -Wertepaare der analysierten Anisotropiemessungen der pH-Reihen von Rhodopsin-C316-AF im Dunkelzustand bei 0°C (Quadrate) und 37°C (Dreiecke) aufgetragen. Die Proben, die nach Lichtaktivierung in den aktiven Meta-II Zustand übergehen, sind in rot (37°C) und orange (0°C) eingefärbt. Die Proben, die nach Lichtaktivierung im inaktiven Meta-I Zustand bleiben, sind blau eingefärbt. Es ist gut zu erkennen, daß die Wertepaare $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ für die Anisotropieexperimente bei 37°C im inaktiven Dunkelzustand auf der Kurve des Kegelmodells liegen. Die Wertepaare für $\text{pH} > 7.5$ bei 0°C sind ebenfalls dem Kegelmodell zuzuordnen. Die analysierten $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ -Wertepaare der Experimente des Dunkelzustands bei 0°C und pH -Werten < 7.5 zeigen dagegen ein anderes Verhalten. Bei $\text{pH} 5$ und $\text{pH} 6$ sind sie eher dem Gaußmodell zuzuordnen, während bei $\text{pH} 7$ das $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ -Wertepaar zwischen Gauß- und Kegelmodell liegt. Die Beobachtung, daß die Wertepaare bei 0°C im sauren pH -Bereich mit dem Gaußmodell und mit steigenden pH mit dem Kegelmodell übereinstimmen, deutet auf eine

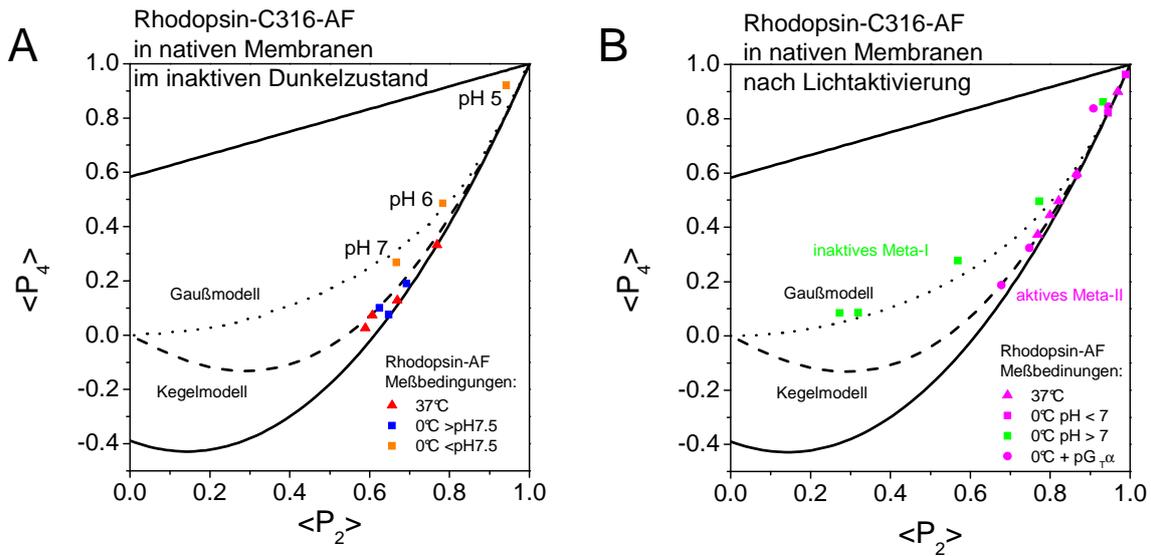


Abbildung 55: Darstellung der Ordnungsparameter $\langle P_2 \rangle$ und $\langle P_4 \rangle$ von Rhodopsin-AF in nativen Membranen. Die durchgezogenen Linien stellen die untere und obere Grenze dar. **A:** Rhodopsin-AF im inaktiven Dunkelzustand bei 0°C und 37°C wird pH-abhängig dargestellt. **B:** Rhodopsin-AF nach Lichtaktivierung für 0°C (pH-abhängig, mit pG_Tα und farnesylierten Membrananker) und 37°C.

pH-abhängige Veränderung der Umgebung um den fluoreszierenden Sensors Helix 8 - Fluorescein hin. Diese Abhängigkeit korreliert mit dem pK-Wert des *alkaline unlock* von $pK_a = 6.0 \pm 0.3$, welcher sich auf der alkalischen Seite des Gleichgewichts durch eine erhöhte relative Mobilität der Helix 8 auszeichnet und den Übergang zum aktiven Meta-II nach Lichtaktivierung verhindern soll [Alexiev et al., 2003].

In Abbildung 55B sind die $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ -Wertepaare der analysierten Anisotropiemessungen der pH-Reihen von Rhodopsin-C316-AF nach Lichtaktivierung bei 0°C ohne und mit pG_Tα – LY-Peptid und bei 37°C aufgetragen. Die Experimente mit dem pG_Tα – LY-Peptid werden in Kapitel 6 vorgestellt. Da aber das pG_Tα – LY-Peptid das Meta-I/Meta-II Gleichgewicht bei niedrigen Temperaturen nach Lichtenregung soweit verschiebt, daß auch bei pH 9.5 ausreichend viel aktives Meta-II gebildet wird (siehe Abb. 66, Kap. 6), werden die $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ -Wertepaare hier mit vorgestellt. In Mangenta sind die Wertepaare der Experimente eingefärbt, unter deren Bedingungen nach Lichtaktivierung die Proben in den aktive Meta-II Zustand übergehen. Bei 0°C und pH > 7 ohne pG_Tα – LY-Peptid wird nach Lichtenregung nur inaktives Meta-I gebildet. Die analysierten $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ -Wertepaare dieser Experimente sind grün eingefärbt.

Es ist sehr deutlich eine Aufspaltung der Wertepaare zu erkennen (Abb. 55B). Bei den Proben, in denen Rhodopsin nach Lichtaktivierung in das aktive Meta-II Intermediat übergeht, liegen die $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ -Wertepaare auf der Kurve des Kegelmodells. Dagegen liegen die Wertepaare für die lichtaktivierten Rhodopsin-Proben im inaktiven Meta-I Intermediat (0°C, pH > 7), auf der Kurve des Gaußmodells, was auf eine flexiblere Umgebung dieses Intermediatzustands hindeutet. Die Proben mit pG_Tα – LY-Peptid gehen nach Lichtaktivierung über den gesamten gemessenen pH-Bereich in das aktive Meta-II Intermediat über und liegen auf der Kurve des Kegelmodells. Das Peptid bindet zentral an der cytoplasmatischen Oberfläche von Rhodopsin und besitzt keinen Kontakt zur Membrenumgebung (Abb. 57, Kap. 6). Es kann daher geschlossen werden, daß die Änderung der Flexibilität der Umgebung um den fluoreszierenden Sensor größtenteils auf eine Änderung der Proteinflexibilität zurückzuführen ist.

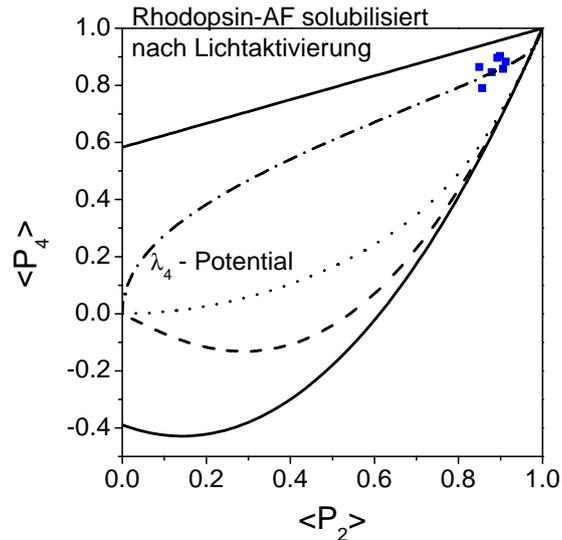


Abbildung 56: Darstellung der Ordnungsparameterwerte $\langle P_2 \rangle$, $\langle P_4 \rangle$ von Rhodopsin-AF in β -DM Mizellen.

Nach Lichtaktivierung geht Rhodopsin in DM-Mizellen auch bei 0°C und alkalischem pH im Gegensatz zu Rhodopsin in nativen Membranen vollständig in den aktiven Meta-II Zustand über (Abb. 39). Mit der Ordnungsparameteranalyse soll analysiert werden, welchem Modell die $\langle P_2 \rangle$, $\langle P_4 \rangle$ -Wertepaare folgen und ob eine Aussage bezüglich der Flexibilität um den fluoreszierenden Sensor getroffen kann. In Abbildung 56 sind die $\langle P_2 \rangle$, $\langle P_4 \rangle$ -Wertepaare der analysierten Anisotropiemessungen der pH-Reihen von Rhodopsin-C316-AF in β -DM Mizellen nach Lichtaktivierung (blau) aufgetragen.

Die $\langle P_2 \rangle$, $\langle P_4 \rangle$ -Analyse des solubilisierten, lichtaktivierten Rhodopsin-AF zeigt wie auch schon die Analyse der Fluoreszenz- und Anisotropieparameter (Kap. 5.2.3, 5.2.4) ein gänzlich anderes Verhalten der Ordnungsparameter als die der Proben in nativen Membranen. Die Wertepaare liegen sehr nahe der oberen $\langle P_2 \rangle$, $\langle P_4 \rangle$ -Grenze auf der Kurve des λ_4 -Potentials und besitzen damit viel höhere $\langle P_4 \rangle$ -Werte als in nativen Membranen.

Die Verteilungsfunktion $f(\Theta)$ des λ_4 -Potentials besitzt zwei Maxima, bei $\Theta_1 = 0^\circ$ und $\Theta_2 = 90^\circ$ [Pottel et al., 1986], was auf zwei Subpopulationen von Konformationen von Helix 8 - Fluorescein schließen läßt. Das deutet auf eine höhere Flexibilität der Umgebung um Helix 8 - Fluorescein hin. Diese könnte durch den geringeren lateralen Druck der Mizellenumgebung hervorgerufen sein, welcher sich negativ auf die Proteinstabilität auswirken könnte. Dafür spricht auch eine Beschleunigung der Kinetik der Aktivierung von Rhodopsin in Mizellen gegenüber der in nativen Membranen (Abb. 39). Außerdem ist das Meta-I/Meta-II Gleichgewicht der nach Lichtaktivierung gegenüber dem Rhodopsin in nativen Membranen sehr stark ins alkalische und zu tiefen Temperaturen verschoben. Einen Einfluß auf Helix 8 könnte die Geometrie der Mizellen ausüben. Das C-terminale Ende der Helix ist durch ihren Membrananker fixiert und könnte durch die Form der Mizelle eine Krümmung der Helix hervorrufen. In Ameloot et al. [1984] wurden Experimente mit einem fluoreszierenden Membransensor DPH¹⁸ in Vesikeln vorgestellt, deren $\langle P_2 \rangle$, $\langle P_4 \rangle$ -Wertepaare ebenfalls auf der Kurve des λ_4 -Potentials liegen.

Die Geometrie und der fehlende laterale Druck in Mizellenumgebung beeinflussen die Flexibilität des Rezeptors und modulieren die Eigenschaften des Rezeptors. Dies kann auch durch die Analyse der Ordnungsparameter gut nachvollzogen werden.

18 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene

5.4 Diskussion

Die Charakterisierung der Dynamik der Helix 8 als Funktion des Zustandes der Ligandenbindungstasche (mit gebundenen 11-cis- (Dunkelzustand), all-trans- (Meta-II) und ohne Retinal (Opsin-Zustand)), des Zustandes des C-Terminus (Phosphorylierung) und des pH-Wertes wurde mit Hilfe von zeitaufgelösten TCSPC-Experimenten durchgeführt.

Die hier in dieser Arbeit vorgestellten Fluoreszenzzerfallsmessungen zeigen eine Übereinstimmung der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzzerfallszeit τ_3 wie auch der Dynamik von Helix 8 im lichtangeregten Meta-II Intermediat mit dem Meta-I/-II Gleichgewicht aus den Absorptionmessungen. Der in Alexiev et al. [2003] im Dunkelzustand beschriebene *alkaline unlock* wurde in den hier präsentierten Experimenten bestätigt. Es konnte darüberhinaus jeoch gezeigt werden, daß der pK-Wert des *alkaline unlock* mit $pK \approx 6$ nicht exakt mit dem pK-Wert des Meta-I/Meta-II Gleichgewichts ($pK = 6.6$) übereinstimmt. Das bedeutet, es existiert ein pH-abhängiger Übergang im Dunkelzustand, dessen Eigenschaften durch eine andere Gruppe oder Gruppen (wegen des kooperativen Effekts) bestimmt werden, als im Meta-II Zustand. Alternativ kann sich aber auch der pK-Wert dieser Gruppe(n) beim Übergang nach Meta-II zu einem $pK \approx 6$ verschieben.

Nach Lichtaktivierung des Rezeptors steigt die sterische Einschränkung und die Rotationskorrelationszeit von Helix 8 bei Rhodopsin in Membranen und Mizellen an. Damit kann diese aktive Signatur von Helix 8 für alle untersuchten Bedingungen bestätigt werden. Das trifft auch auf die langsamere Dynamik, d.h. die größere Rotationskorrelationszeit ϕ_2 von Helix 8 in Meta-II zu, die unabhängig von pH, Temperatur und Proteinumgebung gefunden wurde. Über eine $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ -Ordnungsparameteranalyse des fluoreszierenden Sensors (Fluorescein-Helix 8-Konstrukt) konnte diese klare Zuordnung von Dynamikparameter zu Rezeptorzuständen qualitativ untermauert werden. Die Analysen zeigen deutlich eine Zuordnung der Dynamik des fluoreszierenden Sensors zu unterschiedlichen Bewegungspotentialen. Im aktiven Meta-II Zustand in nativen Membranen bewegt sich der fluoreszierende Sensor im Konformationsraum des Kegelpotentials. Im inaktiven Vorläuferintermediat Meta-I bewegt sich der fluoreszierende Sensor dagegen innerhalb des Gaußpotentials, was auf eine weichere, flexiblere Membran-/Proteinumgebung schließen läßt.

Im Einklang mit dem *alkaline unlock* von Helix 8 im Dunkelzustand ändert sich das Potential durch das sich die Bewegung des fluoreszierenden Sensors im Dunkelzustand beschreiben läßt - vom Gaußmodell bei saurem pH zum Kegelmodell bei niedrigen Temperaturen und alkalischem pH. Diese pH-Abhängigkeit ist bei 37°C nicht mehr vorhanden.

Daraus läßt sich eindeutig schließen, daß zwei fundamental verschiedene Bewegungseigenschaften von Helix 8 bei tiefer und bei physiologischer Temperatur vorliegen, die somit mit den beiden verschiedenen kinetischen Modellen für den Übergang zum aktiven Meta-II-Intermediat korreliert sind. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß die Oberflächendynamik in Mizellen nicht der in Rhodopsinmembranen bei 37°C entspricht, sondern im Falle von Helix 8 einem völlig anderen Bewegungsmodell - dem λ_4 -Potential folgt, welches ein bistabiles Verhalten zeigt.

Es konnte damit gezeigt werden, daß Helix 8 äußerst sensitiv auf ihre Umgebung reagiert und damit in Membranen als Reporter für Rezeptorzustände geeignet ist. Das Schalten zwischen verschiedenen Bewegungsmodellen in der Aktivierungskaskade (Kegel-/Gaußmodell im Dunkelzustand, Gaußmodell in Meta-I und Kegelmodell in Meta-II) deutet auf eine funktionelle Relevanz der Bewegungszustände hin. Eine flexiblere Umgebung in Meta-I kann die Konformationsänderungen, die den Übergang zu Meta-II begleiten, erleichtern. Der Unterschied der Helix 8-Bewegungsmodelle in Membranen und Mizellen im aktiven Meta-II und die daraus zu schließenden unterschiedlichen Konformationen von Helix 8 können u.a. einen Einfluß auf die Bindung und Aktivierung von Signalproteinen haben. Es ist beispielsweise bekannt, daß das regulatorische Protein Arrestin an Rhodopsin-Mizellen nicht bindet. Diese Bindung wird jedoch

nach Zugabe von negativ geladenen Lipiden ermöglicht [Sommer et al., 2006], die wahrscheinlich durch elektrostatische Interaktionen die Bindungsaffinität erhöhen.

In Bezug auf das Apoprotein Opsin wurde gezeigt, daß in Membranen mit einem pK_a von 4.1 eine Konformation von Helix 8 ausgebildet wurde, die in ihrer Signatur einer "aktiven Oberfläche" entspricht. Die Korrelation von Helix 8 Dynamik mit den verschiedenen Rezeptorzuständen läßt darauf schließen, daß es eine enge Kopplung zwischen Ligandenbindungstasche und Helix 8 Dynamik gibt. Diese langreichweitige Interaktion wird durch ein H-Brückennetzwerk über das konservierte NPxxYF-Motiv von Helix 8 zu Asp83 in der Nähe des Retinals vermittelt [Lehmann et al., 2007].

Resultate & Diskussion Teil III: Rhodopsinaktivierung & Interaktion mit Transducin

Für die Erkennung des aktiven Meta-II Intermediats von Rhodopsin gibt es verschiedene biophysikalische Assays. Über die Absorption kann die spektrale Verschiebung des Retinals von 500 nm im Grundzustand nach 380 nm im angeregten Meta-II Intermediats erfasst werden [Wald et al., 1950]. FTIR¹⁹ ist ebenfalls ein Mittel zum Erkennen des aktiven Meta-II Intermediats. Der Grundzustand und das angeregte Meta-II Intermediat besitzen zwei unterschiedliche FTIR Signaturen, welche gut zu unterscheiden sind [Vogel et al., 2003].

Über die Bindung des G-Proteins Transducin, dessen Bindungsaffinität zum lichtaktivierten Meta-II Intermediat sehr viel höher ist als zum Dunkelzustand von Rhodopsin, kann ebenfalls das aktive Intermediat, bzw. die Transducin-bindende Konformation, detektiert werden. Durch die Bindung der beiden Moleküle nimmt die Gesamtmasse, bzw. das Gesamtvolumen zu. Das wird bei Lichtstreuversuchen (Rayleighstreuung) ausgenutzt oder durch die Änderung des Brechungsindex bei Bindung des Transducin an auf einem Wellenleiter immobilisierten Rhodopsins [Alves et al., 2005]. Bei niedrigen Temperaturen und hohem pH ist das Gleichgewicht stark auf die Seite des inaktiven Meta-I verschoben. Bei der Bindung von Transducin wird das aktive Intermediat Meta-II stabilisiert und das Gleichgewicht Meta-I/Meta-II zum aktiven Meta-II verschoben. Das durch das Transducin stabilisierte Rhodopsin im angeregten Meta-II-Zustand wird Extra-Meta-II genannt [Emeis und Hofmann, 1981]. Beim Extra-Meta-II Assay wird über die Detektion des Extra-Meta-II-Anteils die Bindung von Transducin detektiert.

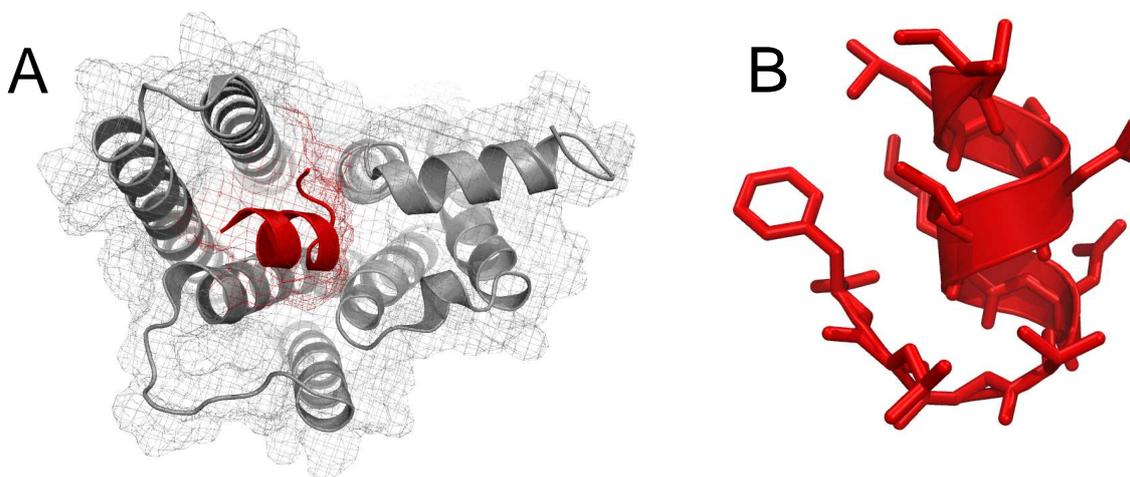


Abbildung 57: Struktur des C-terminalen Peptids von der Transducin α -Untereinheit in der hochaffinen Version (ILENLKDVGLF) im gebundenen Zustand. **A:** Lage des gebundenen Peptids an der Oberfläche von Rhodopsin im aktiven Meta-II Intermediat. **B:** Darstellung mit Aminosäureseitenketten. (PDB: 3PQR).

¹⁹ Fouriertransformierte Infrarot Spektroskopie

Die Bindung des G-Proteins an das lichtaktivierte Rhodopsin wird über den C-Terminus der $G_T\alpha$ -Untereinheit des Transducins vermittelt. Es existieren Peptidanaloga dieses C-Terminus', welche mit einer anderen Affinität als der native C-Terminus des $G_T\alpha$ an das lichtaktivierte Rhodopsin binden. Im folgenden wird nun eine Variante des Peptidanalogs vorgestellt, mit welcher mittels Fluoreszenz der Bindungszustand und auch die Kinetik der Bindung an das lichtaktivierte Rhodopsin detektiert werden kann.

Design und Charakterisierung des Helixfaltungssensors

Für die Untersuchungen des lichtaktivierten Rhodopsins wird der Umstand ausgenutzt, daß das Transducin Ankerstellen für die Bindung an das aktive Rhodopsin besitzt. Eine spezifische Ankerstelle für das Rhodopsin im aktiven Meta-II Intermediat ist der Peptidanker am C-terminalen Ende der α -Untereinheit des Transducins (siehe Abb. 8 auf Seite 23 in Kap. 2.1.4).

Dieser ist alleine in der Lage, dem Rhodopsin die Bindung des vollständigen Transducins vorzutauschen [Hamm et al., 1988] und damit das Gleichgewicht zwischen Meta-I und Meta-II zum aktiven Intermediat Meta-II zu verschieben.

Es existieren Kristallstrukturen von Transducin, in welcher aber die Peptidankerstelle aufgrund ihrer ungeordneten Struktur nicht aufgelöst ist [Lambright et al., 1996]. Aus NMR [Koenig et al., 2002] und kristallographischen Messungen [Scheerer et al., 2008] mit Peptidanker-Analoga ist bekannt, daß diese aber nach Bindung an das lichtaktivierte Rhodopsin helikal vorliegen (Abb. 57).

Wir haben einen Fluoreszenzsensor entwickelt, der über photoinduzierten Energietransfer zwischen einem organischen Fluorophor und einem Tryptophan den helikalen Zustand des C-terminalen Ankers anzeigt. Der in der Messung verwendete Faltungssensor ist eine Variante eines Peptidanker-Analogs, welches ein Tryptophan und einen kovalent gebundenen Farbstoff LY ($^{339}\text{WVLEDLK}(\text{C} - \text{LY})\text{VGLF}^{350}$, im folgenden als $pG_T\alpha - \text{LY}$ bezeichnet) besitzt. Die Änderung vom ungeordneten Peptid im ungebundenen Zustand zur geordneten, helikalen Struktur im gebundenen Zustand sollte mittels Fluoreszenzlöschung zeitaufgelöst nachvollzogen werden. Das Design des Faltungssensors ist derart, daß im ungeordneten Peptidanker die Fluoreszenz von LY durch molekularen Kontakt von Tryptophan und dem Farbstoff gelöscht wird. Bei Ausbildung einer helikalen Struktur vergrößert sich der Abstand der beiden Quenchingpartner und die Fluoreszenz wird wieder hergestellt (Abb. 58). Die Funktionalität des Faltungssensors wird im folgenden mit einem Extra-Meta-II Bindungsassay gezeigt (Abb.59D).

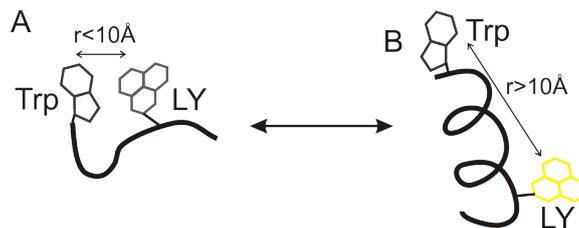


Abbildung 58: Schematische Darstellung des Faltungssensors $pG_T\alpha - \text{LY}$. **A:** Die ungeordnete Sekundärstruktur erlaubt molekularen Kontakt zwischen Fluorophor LY und Quencher Trp: Löschung der LY-Fluoreszenz. **B:** In der α -helikalen Form ist der Abstand zwischen LY und Trp so, daß keine Löschung der Fluoreszenz erfolgt.

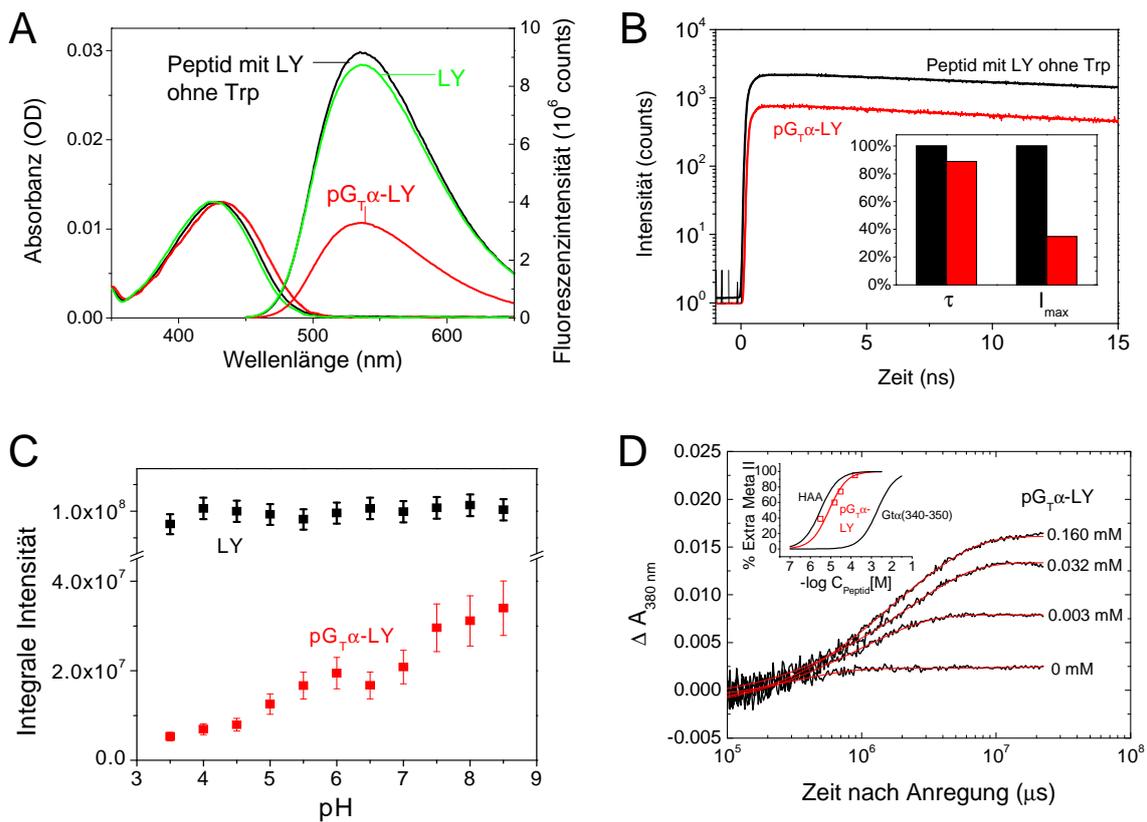


Abbildung 59: **A:** Das pG_Tα-LY (rot) hat im Vergleich zu LY (grün) und einem Nonapeptid ohne Tryptophan (schwarz) bei gleicher Absorption (und Konzentration) eine dreimal niedrigere Fluoreszenzemission. **B:** Fluoreszenzerfallskurven von pG_Tα-LY (rot) und dem Nonapeptid ohne Tryptophan (schwarz) sind einfach exponentiell mit ähnlicher Zerfallszeit. Das Inset zeigt deutlich, daß das Quenching von LY statisch ist. **C:** pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von LYIA und pG_Tα-LY. **D:** pG_Tα-LY Bindungsassay. Die Bildung von Extra-Meta-II in Abhängigkeit des pG_Tα-LY Konzentration ist zeitabhängig dargestellt. Inset: Die Bildung von Extra-Meta-II ist mit dem pG_Tα-LY (rot) etwas schwächer als beim hochaffinen Analogon. Meßbedingungen: **A,B:** MES pH 6, 20°C, **C:** 1 μM LY, ca. 1 μM pG_Tα-LY, 50 mM Puffer (Citrat-Puffer (pH 3.5-4.5), MES (pH 5-7), Tris (pH 7.5-8)), 150 mM NaCl, **D:** 50mM Tris pH 8, 3°C

Spektroskopische Charakterisierung

pG_Tα-LY zeigt in MES-Puffer pH 6 bei 20°C im Vergleich zu LY und einem Peptidanker-Analogon ohne Tryptophan bei gleicher LY Konzentration eine um den Faktor drei geringere Fluoreszenzintensität (Abb.59A). Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen zeigen, daß diese einem einfach exponentiellen Zerfall folgen ($\tau = 6.8$ ns) (Abb.59B), auch hier ist dessen Gesamtintensität etwa ein Drittel der Intensität des Peptides ohne Tryptophan. Die Fluoreszenzlebensdauer unterscheiden sich auch nur leicht voneinander. Dies weist auf einen vorwiegend statischen Quenchingmechanismus hin mit einem geringen Anteil an dynamischen Quenching. Bei dem statischen Quenching bilden LY und Trp einen Grundzustandskomplex, das dynamische Quenching passiert mittels photoinduzierten Elektronentransfer (PET) [Fürstenberg und Vauthey, 2005].

Das Peptid zeigt im Gegensatz zum freien LY eine pH-abhängige Fluoreszenzintensität (Abb.59C). Die Löschungseffizienz nimmt mit fallendem pH zu. Diese kann durch die pH-Abhängigkeit

des PET-induzierten Quenchings erklärt werden [Shosheva et al., 1988]: Die durch die erhöhte Konzentration an Protonen induzierten Wasserstoffbrücken erhöhen die Reichweite der Elektronen für den PET und damit auch die Quenchingeffektivität.

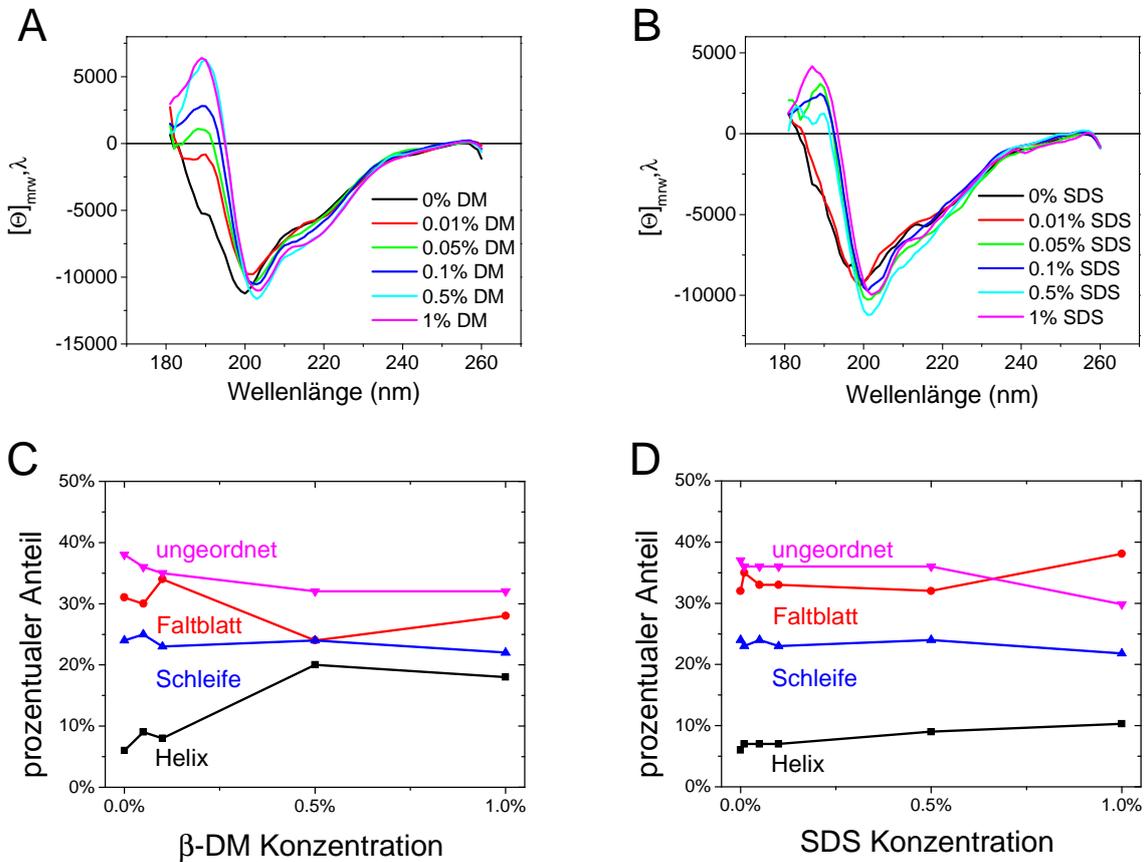


Abbildung 60: Obere Reihe: CD Spektren des $G_T\alpha$ Peptides bei verschiedenen Detergenzkonzentrationen von DM (A) und SDS (B). **Untere Reihe:** Ergebnisse der ausgewerteten CD Messungen in Abhängigkeit von verschiedenen Detergenzkonzentrationen von DM (C) und SDS (D). Bedingungen: 50 mM NaPP pH 6, 20°C

Zur Bestimmung der Aktivität des Faltungssensors wurde der Extra-Meta-II Assay durchgeführt. Das Gleichgewicht zwischen Meta-I und Meta-II wird durch mehrere Parameter bestimmt. Bei niedrigen Temperaturen und hohem pH ist das Gleichgewicht auf der Seite des inaktiven Intermediats Meta-I. Die Zugabe von bestimmten Proteinen und Peptiden stabilisiert das aktive Intermediat Meta-II und verschiebt entsprechend das Gleichgewicht nach Meta-II, welches dann Extra-Meta-II genannt wird [Kirchberg et al., 2011]. Die Messungen von Meta-II wurden mit transientser Absorptionsspektroskopie bei 380 nm durchgeführt. Die Aktivierung von Rhodopsin wurde bei gleichbleibender Konzentration mit unterschiedlich hohen Konzentrationen des $pG_T\alpha - LY$ gemessen. Dabei betrug die Konzentration des Rhodopsins immer 5 μM . Die Endamplitude der Absorption bei 50-fachen Überschuss an $pG_T\alpha - LY$ wurde 100% Extra-Meta-II gleichgesetzt. Entsprechend wurden die Verhältnisse der anderen Peptidkonzentrationen relativ dazu aufgetragen. Die Halbmaximale Konzentration des $pG_T\alpha - LY$ ist etwas höher als beim hochaffinen Peptid, aber sehr viel geringer als beim nativen Peptidanker (Abb.59D).

Charakterisierung der Sekundärstruktur

Um den Einfluß der Umgebung auf die Sekundärstruktur des Peptides zu ermitteln, wurden CD-Messungen mit variierenden Konzentrationen (in Prozent *weight/volume*) an Detergenz in 50 mM NaPP pH 6 und 20°C durchgeführt. Die entstandenen CD Spektren wurden mit dem CDPro Softwarepaket von Narasimha Sreerama ausgewertet (*Department of Biochemistry & Molecular Biology, Colorado State University*), welches drei Programme zur Auswertung der CD Spektren (SELCON3, CDSSTR und CONTIN) enthält. Diese bestimmen die relativen Anteile an α -Helix, β – Faltblatt, Schleifen- und ungeordneten Sekundärstrukturen aus. Das Anpassen der Kurven wird mit Hilfe von Kalibrierungsspektren durchgeführt, welche im Wellenlängenbereich zwischen 185 – 240 nm liegen. Die drei Programme zeigen recht unterschiedliche Ergebnisse, daher wurde nur das Ergebnis mit dem besten Fit für die Analyse berücksichtigt (CDSSTR). Abbildung 60 zeigt in der oberen Reihe die einzelnen CD-Spektren und in der unteren die Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente in Abhängigkeit von der Detergenzkonzentration.

Abbildungen 60A und B zeigen CD-Spektren, welche zwischen 181 – 260 nm mit unterschiedlichen Detergenzkonzentrationen aufgenommen wurden. Die vom CD-Spektrometer detektierte Elliptizität Θ_λ wird in Milligrad aufgezeichnet. Für die Analyse wird sie nach Gleichung 3.4 in die molare Elliptizität bezogen auf die Anzahl der Peptidbindungen $[\Theta]_{\text{molar},\lambda} = 100 \cdot \Theta_\lambda / (m \cdot d)$ umgerechnet (m : molare Konzentration des Peptids, d : Pfadlänge durch die Meßküvette in cm). Die Abbildungen 60C und D zeigen die relativen Anteile der aus den Analysen ermittelten Sekundärstrukturelemente. Dabei wurden die Anteile von rechts- und linksgängiger Helix, bzw. parallelen und antiparallelen Faltblattstrukturen zusammenaddiert.

Die CD-Spektren unterscheiden sich signifikant im Bereich von 181 – 200 nm (Abb. 60A und B). Dabei steigt jeweils mit steigender Detergenzkonzentration ein positiver Peak bei 190 nm an, welcher mit α -helikaler Struktur assoziiert ist. Dagegen sind die negativen Peaks bei 210 nm und 225 nm, die ebenfalls die α -helikalen Struktur charakterisieren, nur schwach ausgeprägt.

Die Auswertung der β -DM-Konzentrationsreihe zeigt, daß bei 0% β -DM ein hoher Anteil von ungeordneter Struktur von ca. 40% vorliegt, welcher bei steigender β -DM-Konzentration auf 33% fällt. Der Anteil von Faltblatt- und Schleifenstruktur bleibt relativ konstant über den gemessenen Bereich. Dagegen ist gut zu erkennen, daß der Helixanteil signifikant mit steigender DM-Konzentration von etwa 5% bei 0% Detergenz auf 20% bei 0.5% Detergenz ansteigt.

Die Auswertung der SDS-Konzentrationsreihe zeigt ein ähnliches Verhalten wie bei der β -DM-Reihe. Dabei fällt aber der Anstieg des Helixanteil mit steigendem Detergenzkonzentration geringer aus (7% Helix bei 0% SDS, 10% Helix bei 1% SDS).

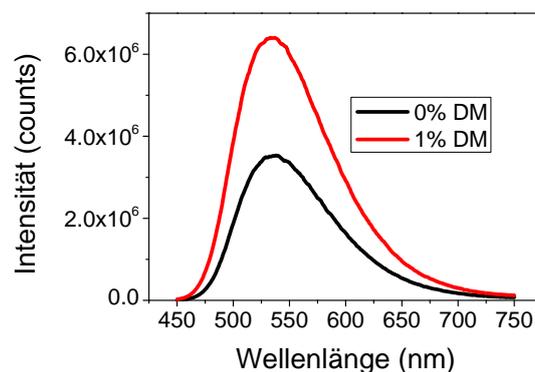


Abbildung 61: Fluoreszenzemissionsspektren von pG_T α – LY in 10 mM MES pH 6 bei 0% DM (schwarz) und 1% DM (rot) bei 20°C. Der Farbstoff wurde bei 430 nm angeregt.

Die Veränderung der Sekundärstrukturanteile zugunsten des Anteils an α -helikaler Struktur konnte auch indirekt mittels der *steady state* Fluoreszenz nachvollzogen werden. In Abb. 61 sind die Fluoreszenzspektren des $pG_{T\alpha} - LY$ -Peptides ohne Detergenz und mit 1% DM aufgetragen. Es ist eindeutig eine erhöhte Fluoreszenz bei der Probe in Korrelation mit dem Anstieg des α -helikalen Anteils bei 1% β -DM zu sehen. Dies wird auf die Ausbildung einer helikalen Sekundärstruktur an der Grenzfläche der Mizellen zurückgeführt.

Die Sequenz des Peptides wurde mittels der Hopp&Woods Skala [Hopp und Woods, 1981] nach der Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren aufgeschlüsselt (Abb. 62B). In beiden Peptiden alternieren Bereiche mit hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren. In der Kristallstruktur des Rhodopsins im Meta-II Intermediat mit gebundenen hochaffinen $G_{T\alpha}$ -Analogon (PDB: 3PQR) ist zu erkennen, daß dieses in der α -helikalen Form eine amphipatische Anordnung seiner Aminosäuren besitzt. Die hydrophoben Reste sind dem Rezeptor zugewandt, während die hydrophilen in die wässrige Lösung zeigen. Das Detergenz β -DM besitzt seine kritische Mizellenkonzentration bei ca. 0.006%, die kritische Mizellenkonzentration von SDS dagegen liegt bei ca. 0.2%. Die Peptide besitzen bei den Experimenten mit β -DM-Mizellen verglichen mit denen mit SDS-Mizellen einen höheren α -helikalen Anteil bei gleicher relativer Detergenzkonzentration. Detergenzien sind amphipatische Moleküle, wobei die hydrophoben Teile der Detergenzmoleküle sich im Inneren der Mizelle zusammenlagern. Das Peptid lagert sich an die Mizelle an, dann werden die hydrophoben Aminosäuren des Peptids von dem apolaren Teil des Detergenz umschlossen und es wird die Bildung einer α -helikalen Struktur induziert.

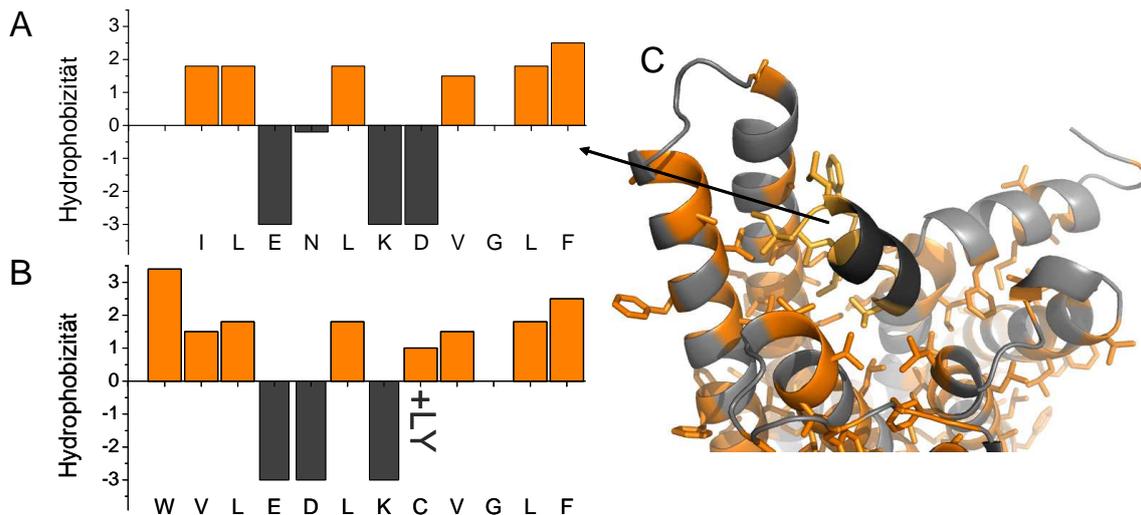


Abbildung 62: Übersicht der Hydrophobizitäten der Aminosäuren des hochaffinen $G_{T\alpha}$ -Analogons (A), aus der aktiven Kristallstruktur (PDB: 3PQR) und des Peptides $pG_{T\alpha} - LY$ (B), das in dieser Arbeit genutzt wurde. In orange sind alle hydrophoben und in grau alle hydrophilen Aminosäuren des Peptides dargestellt. LY ist ebenfalls hydrophil. Die Amplitude stellt ein Maß der Hydrophobizität dar. C: Lage des hochaffinen $G_{T\alpha}$ -Analogons an der Oberfläche des aktiven Rhodopsins (Meta-II).

6.1 Opsin + pG_Tα – LY Fluoreszenzmessungen

Die Bindungsexperimente mit dem pG_Tα – LY wurden am Fluoromax-3 (Horiba Scientific) durchgeführt. Dazu wurde Opsin mit dem pG_Tα – LY Peptid im Verhältnis 5 μM Opsin : 1 μM pG_Tα – LY eingesetzt und die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz des LY gemessen.

In den Messungen wurde bei 430 nm das LY angeregt und ein Fluoreszenzspektrum zwischen 475 nm und 650 nm aufgenommen. Da nur die Gesamtfluoreszenzintensität für die Fragestellung von Interesse ist, werden alle Fluoreszenzcounts über den gemessenen Wellenlängenbereich integriert und über den pH aufgetragen. Der Farbstoff selbst besitzt keine pH-Abhängigkeit (Abb. 59C).

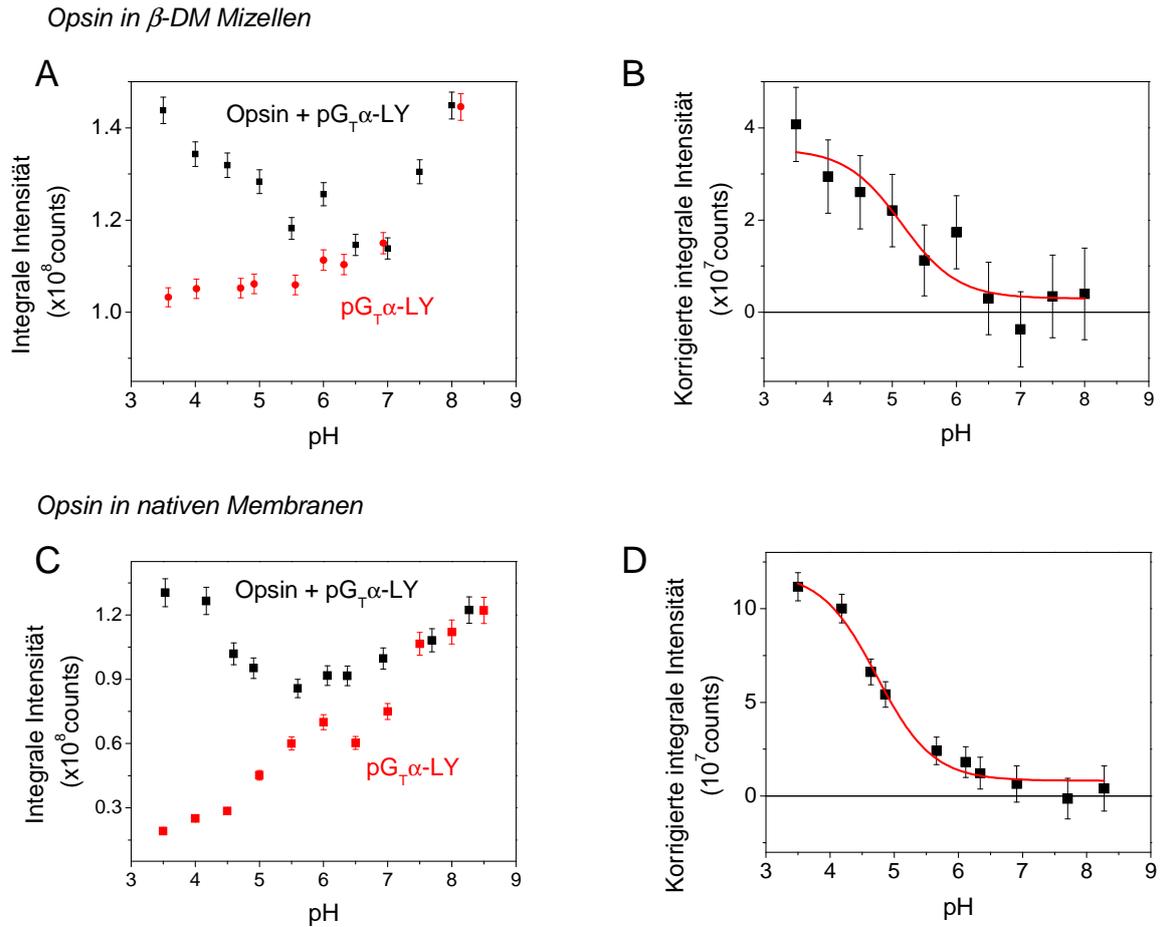


Abbildung 63: Links: Integrale Fluoreszenzintensitäten von LY gebunden am pG_Tα mit und ohne Opsin in Abhängigkeit vom pH. Rechts: Korrigierte Fluoreszenzintensitätsspektren. Der Fluoreszenzuntergrund des Peptids wurde vom Opsin + Peptidspektrum abgezogen. Die Änderung der integralen Fluoreszenz wurde mit einem Übergang von $pK_a = 5.1 \pm 0.3$ für die Mizellen (0.05% DM) und $pK_a = 4.7 \pm 0.1$ in nativen Membranen gefittet. Bedingungen: 50 mM Puffer, 150 mM NaCl, 20°C, 5 μM Rhodopsin, 1 μM pG_Tα – LY.

Als Kontrollmessung wurde das pG_Tα – LY Peptid zuerst in 0.05% β-DM in 50 mM Puffer und 150 mM NaCl gemessen. In Anwesenheit von Detergenz (Abb. 63A, rot) steigt die Fluoreszenz des am Peptid gebundenen LY zwischen pH 3.5 und 7 konstant an, bis pH 9 ist dieser Anstieg noch

stärker. Ohne Detergenz (Abb. 63C, rot) steigt die Fluoreszenz nahezu linear mit zunehmenden pH an.

Bei Zugabe des pG_Tα – LY Peptides zum Opsin kommt es zum Abfall in der Fluoreszenz von pH 3.5 bis 6.5 (Mizellen) und pH 3.5 bis 5.5 (Membranen). Im alkalischen steigt die Fluoreszenz wieder an. Für die Analyse wurde der Untergrund (rote Datenpunkte aus den Referenzmessungen) subtrahiert. Da die Fluoreszenzspektren der Protein- und Peptidmessungen bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt wurden, wurden die Zwischenwerte der Peptidmessungen interpoliert (*B-Spline*) und dann abgezogen. Die resultierenden Werte sind für Opsin in Mizellen in Abb. 63B und für Opsin in Membranen in Abb. 63D dargestellt. Die Fluoreszenzintensität ist in beiden Fällen bei pH 3.5 am höchsten und fällt dann zu höheren pH-Werten ab. Der Übergang, gefittet mit der Henderson Hasselbalch Funktion, liegt für Opsin in Mizellen dabei bei pK_a = 5.1 ± 0.3, für Opsin in Membranen bei pK_a = 4.7 ± 0.1.

Die Messungen zeigen (Abb. 63 auf der vorherigen Seite C, D), daß pH-abhängig ein Anstieg der Fluoreszenz von pG_Tα – LY in Anwesenheit von Opsin stattfindet. Wie zuvor in den CD-Messungen gezeigt, geht ein Anstieg der Fluoreszenz mit der Ausbildung einer α-helikalen Struktur einher. Die klare pH-Abhängigkeit in Anwesenheit von Opsinmembranen läßt sich mit der Bindung des pG_Tα – LY und der Ausbildung der α-helikalen Struktur bei saurem pH (pH 3.5) erklären. Dies ist im Einklang mit der Ausbildung einer aktiven Konformation von Opsin bei saurem pH [Vogel und Siebert, 2001], an die das pG_Tα – LY bindet.

Wir konnten hier zum erstenmal mit dieser Methode zeigen, daß auch in Opsin-Mizellen eine aktive Konformation ausgebildet wird, an die das pG_Tα-Peptid binden kann. Opsin ist in Mizellen sehr instabil [Cohen et al., 1993], und es gibt daher bis jetzt keine Studien, die Informationen über eine eventuelle aktive Konformation des Apoproteins in Mizellen zeigt.

Da Fluoreszenzmessungen sehr schnell durchgeführt werden können, ist in unserem Fall der Nachweis einer aktiven Konformation über die Bindung des pG_Tα – LY Peptides gelungen.

6.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzzerfallsänderungen während der Bindung des pG_Tα – LY an das lichtaktivierte Rhodopsin

6.2.1 Zeitaufgelöste Messung der Bindung von pG_Tα – LY

Zur Kinetik der Bindung des Proteinankers von Transducin (G_Tα-C-Terminus) an das lichtaktivierte Rhodopsin gibt es Informationen, welche über kinetische Lichtstreuexperimente gewonnen wurden [Kahlert und Hofmann, 1991]. Jedoch fehlen Informationen über die Kinetik der Faltung in eine α-helikale Struktur und wie dieser Prozess mit der Ausbildung der aktiven Rhodopsinkonformation korreliert ist. Über die Änderung der zeitaufgelösten Fluoreszenzparameter des hier vorgestellten Helixfaltungssensors pG_Tα – LY soll die zeitliche Änderung der Sekundärstruktur nachvollzogen werden. Dafür wird die im Zuge dieser Arbeit aufgebaute 2D-TCSPC-Apparatur eingesetzt. Diese nimmt Fluoreszenzzerfallskurven über die Proteinreaktion des Rhodopsins auf.

Messungen des Helixfaltungssensors pG_Tα – LY wurden mit Rhodopsin in nativen Membranen, sowie in β-DM solubilisierten Mizellen durchgeführt. Als Referenz wurden zunächst Fluoreszenzzerfallskurven von pG_Tα – LY zusammen mit nicht lichtaktivierten und anschließend mit lichtaktivierten Rhodopsin gemessen.

Rhodopsin in nativen Membranen

Alle Messungen in nativen Membranen wurden bei 10°C und bei pH 6 (10 mM MES, 150 mM NaCl) durchgeführt.

In den Referenzmessungen wurden die zeitaufgelösten Fluoreszenzzerfallskurven des pG_Tα – LY Peptids mit Rhodopsin im Dunkelzustand und nach Lichtaktivierung an der TCSPC-Apparatur aufgenommen (Abb. 64A). Es ist zu gut zu erkennen, daß die integrale Fluoreszenz des Helixfaltungssensors pG_Tα – LY nach Lichtaktivierung des Rhodopsins um den Faktor drei ansteigt. In den Fluoreszenzexperimenten mit dem Referenzpeptid (Abb. 59A schwarz) ist zu erkennen, daß das Peptid ohne Quencher eine etwa dreimal so hohe integrale Fluoreszenz besitzt. Dies bedeutet, daß die Fluoreszenz nahezu komplett wiederhergestellt ist und das Peptid durch die Bindung an das Rhodopsin im aktiven Meta-II in eine α-helikale Sekundärstruktur übergegangen ist. Zusätzlich existiert bei der Bindung zum Fluoreszenzzerfall des Farbstoffes ($\tau_2 = 7$ ns) auch eine zweite, schnelle Fluoreszenzzerfallskomponente mit $\tau_1 = 20$ ps.

Die 2D-Fluoreszenzzerfallsmessungen wurden am neuen 2D-TCSPC-Aufbau durchgeführt. Dazu wurde die Probe bestehend aus Rhodopsin im Dunkelzustand und dem pG_Tα – LY Peptid durch eine Durchflußküvette gepumpt und periodisch mit einem ca. 4 mJ starken Laserpuls bei 493 nm und mit 10 ns Dauer (Exciplex gepumpter Farbstofflaser) lichtaktiviert. Vom Netzteil des Exciplexlasers kommt ein Triggerpuls, welcher eine einzelne 2D-Meßreihe in der TCSPC-Elektronik startet. 700 Fluoreszenzzerfallskurven wurden sequenziell in Abhängigkeit der Proteinanregung mit einer Zeitauflösung von 10 ms aufgenommen (Abb. 64B-D). Es wurden 720 einzelne 2D-Meßreihen aufgenommen und die Zeiten auf der Proteinfunktion entsprechend aufaddiert, um eine bessere Zähl-Statistik zu erhalten.

Die Analyse der Fluoreszenzzerfallskurven über die Photoreaktion (Abb. 64B-G) wurde mit globaler Fluoreszenzzerfallsanalyse durchgeführt. Aus den globalen Fluoreszenzfits, welche mit $\tau_1 = 20$ ps und $\tau_2 = 7$ ns gefittet wurden, wurde der Verlauf der beiden Amplituden über die Photoreaktion aufgetragen und exponentiell gefittet. Die Zeitkonstanten betragen $\tau_{PR}(\alpha_1) < 4$ ms und $\tau_{PR}(\alpha_2) = (196 \pm 12)$ ms auf der Zeitachse der Proteinfunktion (PR). Die unter gleichen Bedingungen gemessene transiente Absorptionsänderung des Rhodopsins bei 380 nm wird mit zwei Exponentialfunktionen gefittet ($\tau_{380nm-1} = 4 \pm 2$ ms und $\tau_{380nm-2} = 66 \pm 3$ ms).

Die Analyse der 2D-Messungen zeigt, daß die Amplituden der beiden Fluoreszenzzerfallskurven mit unterschiedlichen Zeitkonstanten nach Lichtaktivierung von Rhodopsin ansteigen. Dies weist auf darauf hin, daß die Bindung des $pG_{T\alpha} - LY$ in zwei Schritten erfolgt. Die relative Amplitude der 20 ps-Lebensdauerkomponente α_1 , welche bei der Messung von Rhodopsin im Ausgangszustand nicht existiert, steigt mit einer Zeitkonstanten $\tau_{PR}(\alpha_1) < 4$ ms an. Bisher wird angenommen, daß Transducin erst nach der Ausbildung des aktiven Meta-II Intermediats mit Rhodopsin interagiert [Kühn et al., 1981]. Die schnelle Lebensdauerkomponente konnte nicht einem bestimmten molekularen Prozess zugeordnet werden. Es ist anzunehmen, daß eine intramolekulare Dynamik des $pG_{T\alpha} - LY$, ausgelöst durch die Interaktion mit dem lichtaktivierten Rezeptor, diesen Fluoreszenzzerfall induziert. Der zeitliche Anstieg dieser Komponente ist schneller als die Bildung des aktiven Meta-II Intermediats mit $\tau_{380nm-2} = 66 \pm 3$ ms, was darauf hindeutet, daß ein Vorkomplex bestehend aus $pG_{T\alpha} - LY$ und Rhodopsin bereits in einem früheren, inaktiven Intermediat zustandekommt. Die relative Amplitude α_2 der langsamen Fluoreszenzzerfallskomponente bestimmt maßgeblich die Gesamtfluoreszenzintensität. Mit der Bindung an das lichtaktivierte Rhodopsin ändert sich die Struktur des C-terminalen Endes von Transducins von ungeordnet zu helikal. Durch das Design des $pG_{T\alpha} - LY$ -Sensors bricht der Komplex zwischen LY und Tryptophan auf, welcher die Fluoreszenz löscht und die Fluoreszenzintensität steigt an. Die Kinetik der relativen Amplitude $\tau_{PR}(\alpha_2)$ spiegelt daher die Änderung der Sekundärstruktur bei finaler Bindung des $pG_{T\alpha} - LY$ an das lichtaktivierte Rhodopsin wieder. Diese ist langsamer als die Bildung des aktiven Meta-II Intermediats.

Die relative Amplitude α_1 der schnellen Fluoreszenzlebensdauerkomponente τ_1 ist mit einer Zeitkonstanten $\tau_{PR}(\alpha_1) < 4$ ms schneller als die Bildung des aktiven Meta-II. Daher muß diese mit einem Übergang zu einem anderen Vorläuferintermediat verknüpft sein. Die transienten Absorptionmessungen bei 380 nm zeigen eine zusätzliche schnelle Zeitkonstante $\tau_{380nm-1} = 4 \pm 2$ ms, welche dem Übergang von Lumi \rightarrow MetaI₃₈₀ zugeordnet ist. Die Interaktion mit einem anderen Meta-I Intermediat, dem Meta-Ib mit einem Absorptionsmaximum von 470 nm, scheint aber wahrscheinlicher [Tachibanaki et al., 1997, 1998, Morizumi et al., 2003, 2005]. In diesem Intermediat bindet das Transducin mit seinem Transducinpeptidanker bereits an das Rhodopsin, aber es findet noch kein Nukleotidaustausch von GDP zu GTP im Transducin statt. Die anschließende Deprotonierung der Schiffischen Base im Meta-II Zustand würde die Änderung der cytoplasmatischen Oberfläche induzieren, welche wiederum die verzögerten Sekundärstrukturänderungen am C-terminalen Ende von Transducin und den Fluoreszenzanstieg des $pG_{T\alpha} - LY$ auslöst.

Es konnte gezeigt werden, daß während der Lebensdauer von Meta-II Konformationsänderungen an der cytoplasmatischen Oberfläche stattfinden [Kim et al., 2009], deren Kinetik kann bestimmend für die Bindung, d.h. Ausbildung der α -helikalen Struktur des $G_{T\alpha}$ C-Terminus sein.

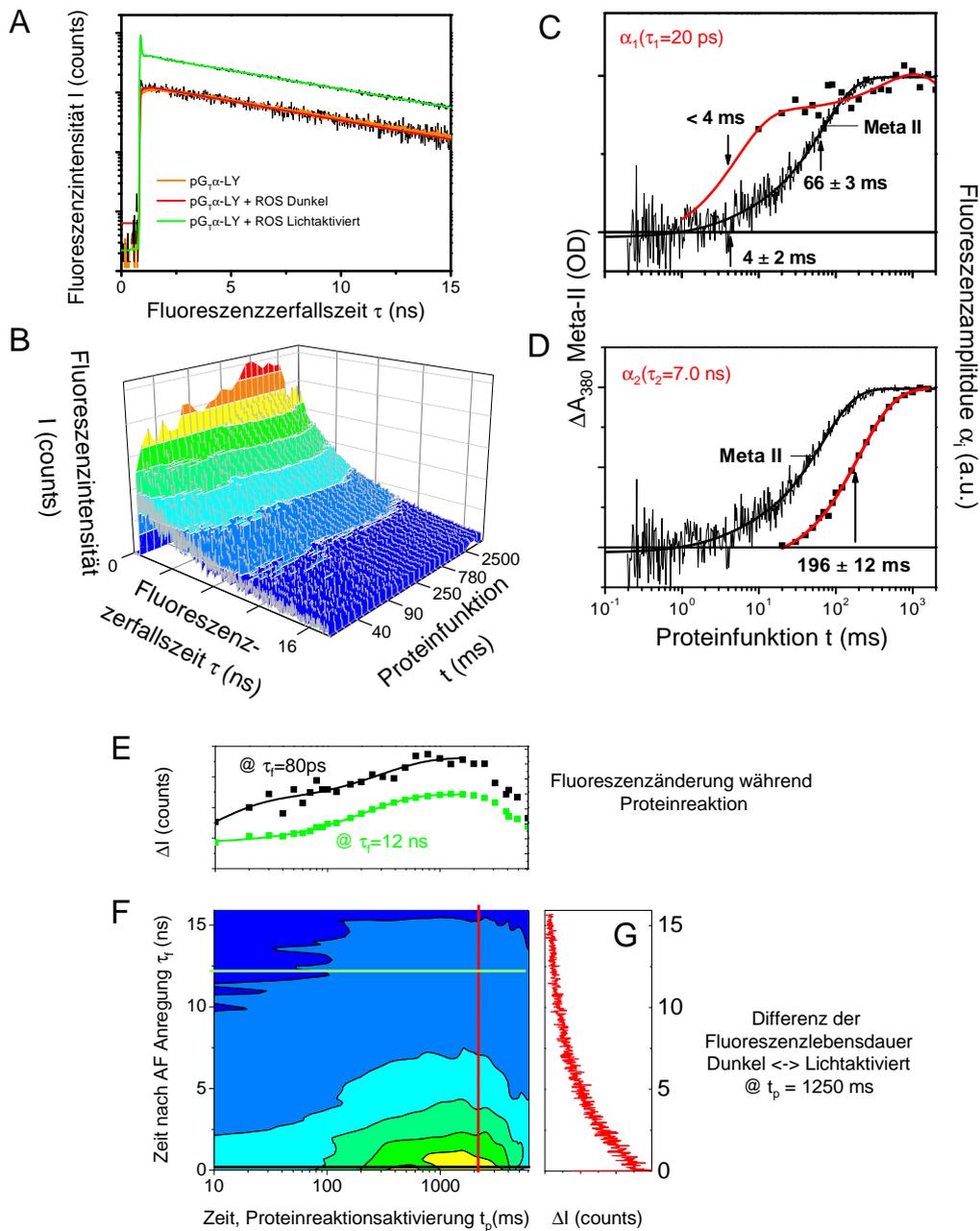


Abbildung 64: Analyse der Rhodopsin - pG_T α - LY 2D Messungen in Membranen. **A:** *Steady state* Fluoreszenzzerfallskurven des pG_T α - LY alleine und mit Rhodopsin in beiden Zuständen. **B:** Fluoreszenzzerfallskurven in Abhängigkeit der Proteinfunktion. **C:** Amplitudenabhängigkeit der schnellen Zerfallszeit α_1 im Vergleich zum Meta-II Anstieg aus Absorptionsmessungen. **D:** Amplitudenabhängigkeit der Fluoreszenzzerfallszeit α_2 im Vergleich zum Meta-II Anstieg aus Absorptionsmessungen. **E:** Fluoreszenzänderung während der Proteinreaktion bei 80 ps und 12 ns nach Fluoreszenzeinregung. **F:** Konturplot der Differenz zwischen Fluoreszenzzerfall des Dunkelzustands mit den zeitabhängigen Fluoreszenzzerfällen nach Lichtaktivierung des Rezeptors. **G:** Differenz der Fluoreszenzlebensdauerzerfallskurve von dunklen und lichtaktivierten Rezeptor 1.25 s nach Lichtanregung. Bedingungen: 10 mM MES pH 6, 150 mM NaCl, 10°C, $\Delta t_{PR} = 10$ ms, $\lambda_{ex} = 430$ nm, Emission wurde durch GG495 detektiert.

Die Messungen wurden bei 15°C und bei pH 7 (50 mM MES, 130 mM NaCl) mit 1 μ M solubilisierten Rhodopsin und 5 μ M pG τ α – LY durchgeführt.

In den Referenzmessungen wurden die zeitaufgelösten Fluoreszenzzerfallskurven des pG τ α – LY Peptids mit Rhodopsin im Dunkelzustand und nach Lichtaktivierung an der TCSPC-Apparatur aufgenommen (Abb. 65A). Es ist zu gut zu erkennen, daß die integrale Fluoreszenz des Helixfaltungssensors pG τ α – LY nach Lichtaktivierung des Rhodopsins um den Faktor zwei ansteigt. In den Fluoreszenzexperimenten mit dem Referenzpeptid (Abb. 59A schwarz) ist zu erkennen, daß das Peptid ohne Quencher eine etwa dreimal so hohe integrale Fluoreszenz besitzt. Die integrale Fluoreszenzintensität ist geringer als bei den Experimenten in Membranen. Dies bedeutet, daß die Bindung an das Rhodopsin im aktiven Meta-II oder die Umwandlung in eine α -helikale Sekundärstruktur nicht so effizient funktioniert wie bei Rhodopsin in Membranen. Zusätzlich existiert bei der Bindung zum Fluoreszenzzerfall des Farbstoffes ($\tau_2 = 7.6$ ns) auch eine zweite, schnelle Fluoreszenzzerfallskomponente mit $\tau_1 = 20$ ps, welche im Vergleich zu den Experimenten in Membranen eine geringere Amplitude besitzt (Abb. 64A).

Die 2D-Fluoreszenzzerfallsmessungen wurden am neuen 2D-TCSPC-Aufbau durchgeführt (Abb. 65B). Dazu wurde die Probe bestehend aus Rhodopsin im Dunkelzustand und dem pG τ α – LY Peptid durch eine Durchflußküvette gepumpt und periodisch mit einem ca. 4 mJ starken Laserpuls bei 493 nm und mit 10 ns Dauer (Exciplex gepumpter Farbstofflaser) lichtaktiviert. Vom Netzteil des Exciplexlasers kommt ein Triggerpuls, welcher eine einzelne 2D-Meßreihe in der TCSPC-Elektronik startet. 800 Fluoreszenzzerfallskurven wurden sequenziell in Abhängigkeit der Proteinanregung mit einer Zeitauflösung von 1 ms aufgenommen (Abb. 65B-D). Es wurden 800 einzelne 2D-Meßreihen aufgenommen und den Zeiten auf der Proteinfunktion entsprechend aufaddiert, um eine bessere Zähl-Statistik zu erhalten.

Die Analyse der Fluoreszenzzerfallskurven über die Photoreaktion wurden mit globaler Fluoreszenzzerfallsanalyse durchgeführt. Aus den globalen Fluoreszenzfits, welche mit $\tau_1 = 20$ ps und $\tau_2 = 7.6$ ns gefittet wurden, wurde der Verlauf der beiden Amplituden über die Photoreaktion aufgetragen und für die Fluoreszenzzerfallskomponente exponentiell gefittet. Die Zeitkonstante τ_{PF} beträgt $\tau_{PF}(\alpha_2) = (27 \pm 1)$ ms auf der Zeitachse der Proteinfunktion. Die Komponente α_1 ist im Bereich der Messung konstant (Abb. 65C, D).

Die unter gleichen Bedingungen gemessene transiente Absorptionsänderung bei 380 nm (Abb. 65C, D) wird mit zwei Exponentialfunktionen gefittet ($\tau_{380nm-1} = 0.14 \pm 0.04$ ms und $\tau_{380nm-2} = 1.3 \pm 1$ ms). Die langsame Anstiegszeit $\tau_{380nm-2}$ ist dem Übergang Meta-I₄₈₀ \rightarrow Meta-II zugeordnet, während $\tau_{380nm-1}$ dem Übergang Meta-I₃₈₀ \rightarrow Meta-II entspricht [Szundi et al., 1998].

Wie auch bei den Messungen mit Rhodopsin Membranen besitzt die Fluoreszenzzerfallskurve des pG τ α – LY nach Lichtaktivierung des Rezeptors zwei Zerfallskomponenten, einer schnellen Zerfallskomponente $\tau_1 = 20$ ps und der Fluoreszenzzerfallskomponente $\tau_2 = 7.6$ ns (Abb. 65A, F).

Zur Analyse der Fluoreszenzlebensdauer als Funktion der Rezeptoraktivierung wurde das zweidimensionale Verteilungshistogramm in Abb. 65B global angepasst, dabei sind die Fluoreszenzzerfallszeitkonstanten global festgelegt, während die Amplituden unabhängig bleiben.

Für die Zeitauflösung auf der Achse der Proteinaktivierung ist folgendes zu beachten. Der Meßstartpunkt auf Achse der Proteinfunktion liegt bei 3 ms, trotz der eingestellten Zeitauflösung von 1 ms, da das MCP mit einem mechanischen Shutter (Uniblitz LS6) vor dem Laserblitz (zum Starten der Proteinfunktion) geschützt wird. Dieser benötigt 1.2 ms um vollständig zu öffnen, daher sind die absoluten Fluoreszenzamplituden der Zerfallskurven für die ersten beiden Meßpunkte verfälscht und wurden für die Analyse verworfen.

Wie in Abb. 65C zu sehen ist, bleiben die Amplituden der 20 ps-Komponente α_1 konstant über die gemessenen Zeitbereich der Photoreaktion. Da τ_1 im Dunkelzustand von Rhodopsin nicht existiert, wird davon ausgegangen, daß die Amplitude mit einer Zeitkonstanten von $\tau_{PR}(\alpha_1) <$

3 ms ansteigt. Die Amplitude der langsamen Zerfallskomponente steigt mit $\tau_{PR}(\alpha_2) = (27 \pm 1)$ ms an. Der Vergleich mit dem Anstieg von Meta-II über die Absorptionsmessung zeigt, daß $\tau_{PR}(\alpha_2)$ um eine Größenordnung langsamer ansteigt als die Bildung von Meta-II. Über $\tau_{PR}(\alpha_1)$ kann mangels Zeitauflösung kein Vergleich zur Bildung von Meta-II gemacht werden. Da die Zeitkonstanten für die Änderung von α_1 und α_2 sich mit $\tau_{PR}(\alpha_1) < 3$ ms und $\tau_{PR}(\alpha_2) = (27 \pm 1)$ ms unterscheiden, ist auch in Rhodopsin-Mizellen ein zweistufiger Bindungsprozess des pG τ α Peptides vorhanden. Die Bildung des Vorbindungskomplexes ist schneller als 3 ms und liegt damit innerhalb der Bildungskinetik von Meta-II, kann aber auch schneller sein. Die Helixstruktur des pG τ α bildet sich mit einer Zeitkonstanten von $\tau_{PR}(\alpha_2) = (27 \pm 1)$ ms und ist damit langsamer als die Meta-II Bildung, stimmt aber gut mit der Protonenaufnahme aus der Lösung mit ca. 25 ms überein [Arnis und Hofmann, 1993].

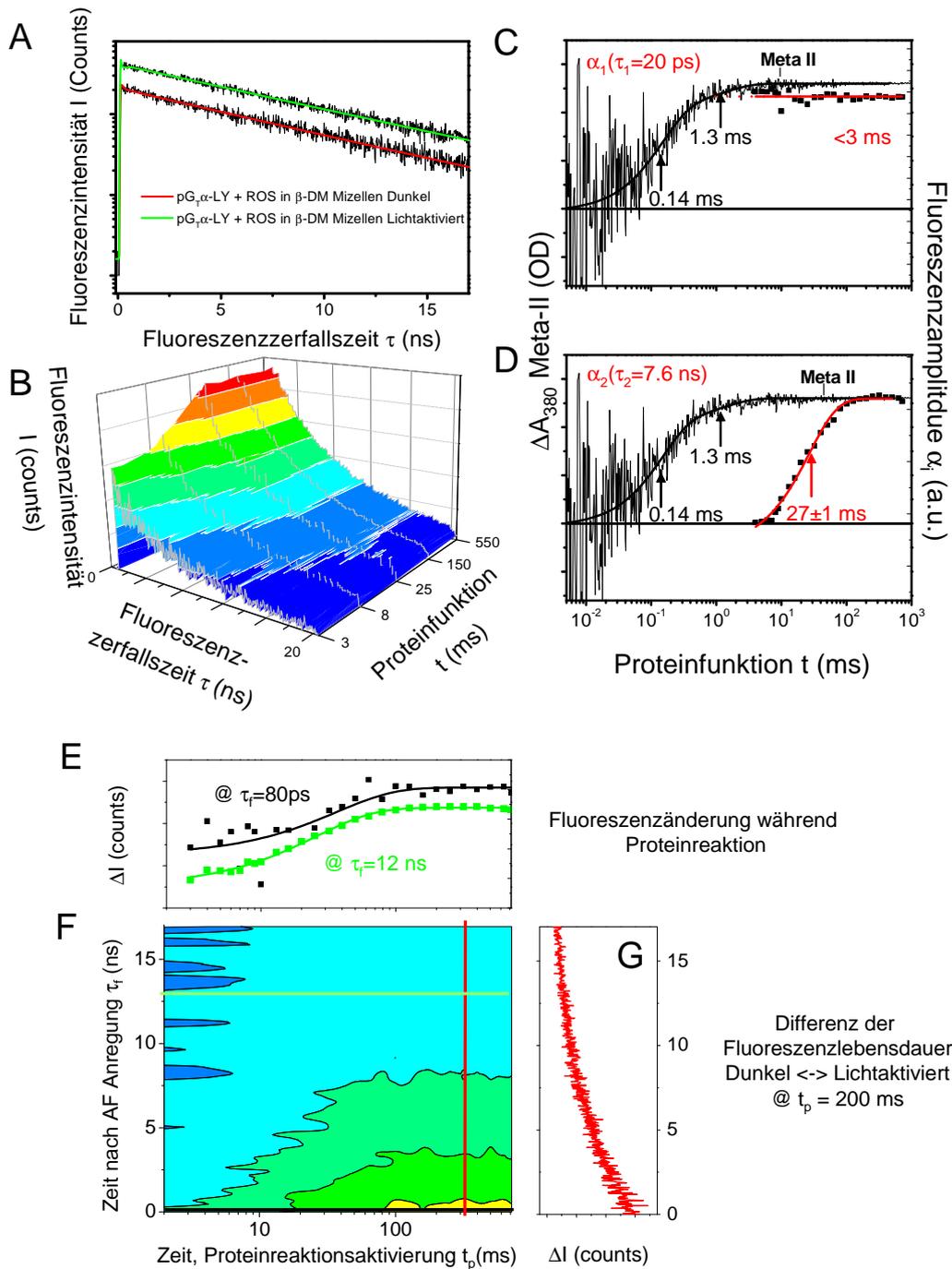


Abbildung 65: Analyse der Rhodopsin - pG_Tα - LY 2D Messungen in β-DM Mizellen. **A:** *Steady state* Fluoreszenzzerfallskurven des pG_Tα - LY vor und nach Lichtanregung von Rhodopsin. **B:** Fluoreszenzzerfallskurven in Abhängigkeit der Proteinfunktion. **C:** Amplitudenabhängigkeit der schnellen Zerfallszeit α_1 im Vergleich zum Meta-II Anstieg aus Absorptionsmessungen. **D:** Amplitudenabhängigkeit der Fluoreszenzzerfallszeit α_2 im Vergleich zum Meta-II Anstieg aus Absorptionsmessungen. **E:** Fluoreszenzänderung während der Proteinreaktion bei 80 ps und 12 ns nach Fluoresceinanzregung. **F:** Konturplot der Differenz zwischen Fluoreszenzzerfall des Dunkelzustands mit den zeitabhängigen Fluoreszenzzerfällen nach Lichtaktivierung des Rezeptors. **G:** Differenz der Fluoreszenzlebensdauerzerfallskurve von dunklen und lichtaktivierten Rezeptor 0.2 s nach Lichtanregung. Bedingungen: 5 μM Rhodopsin, 1 μM G_Tα - LY, 50 mM MES pH 7, 130 mM NaCl, 15°C, $\Delta t_{PR} = 1$ ms, $\lambda_{ex} = 430$ nm, Emission wurde durch GG495 detektiert.

6.3 Einfluss des pG_Tα-Peptides auf die Helix 8 Dynamik

In den vorhergehenden Kapiteln 6.1 und 6.2 wurde gezeigt, daß der Helixfaltungssensor pG_Tα – LY durch seine Fluoreszenzeigenschaften Auskunft über die Bindung zur aktiven Konformation von Rhodopsin und die Kinetik der Ausbildung der aktiven Sekundärstruktur des Peptidankers von Transducin liefern kann.

Wie sich die Interaktion des pG_Tα-Peptides mit dem lichtaktivierten Rhodopsin auf das MetaI/MetaII Gleichgewicht, die Dynamik der Helix 8 und auf die Fluoreszenzparameter des an Cys316 gebundenen Fluoresceins auswirkt, wird im folgenden untersucht.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen der Helix 8 Dynamik von Rhodopsin in Membranen wurden mit dem hochaffinen Analogon des C-terminalen Endes der G_Tα-Untereinheit, dem pG_Tα-Peptid, durchgeführt. Da zwischen Transducin und Rhodopsin im Dunkelzustand keine Interaktion stattfindet, werden im folgenden nur die Messungen mit lichtaktivierten Proben analysiert.

pG_Tα-Peptid

Der Einfluß des pG_Tα-Peptids auf das Meta-I/Meta-II Gleichgewicht wurde mittels absorptionspektroskopischer Experimente ermittelt. Dazu wurde der Extra-Meta-II Assay angewendet. Bei hohem pH und niedriger Temperatur wird nur wenig Meta-II gebildet, durch das pG_Tα-Peptid wird zusätzliches (Extra-) Meta-II gebildet, welches ebenso wie das "normale" Meta-II auch über die Absorption bei 380 nm detektiert werden kann [Emeis und Hofmann, 1981]. Abbildung 66 zeigt die Verschiebung des Meta-I/Meta-II Gleichgewichtes zu alkalischen pH-Werten von pK_a = 6.6 ± 0.1 auf pK_a = 9.4 ± 0.4.

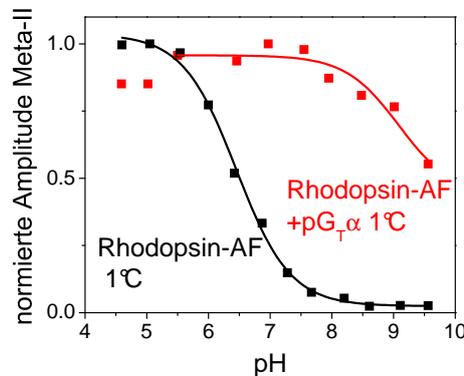


Abbildung 66: Vergleich der pH-Abhängigkeiten des aktiven Meta-II Intermediats ohne (schwarz) und mit (rot) pG_Tα-Peptid, ermittelt durch zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie bei 380 nm. Bedingungen: 10 μM Rhodopsin-AF, 50 mM MES-Bis-Tris-Propan, 150 mM NaCl.

Die zeitaufgelöste Anisotropien des Fluorescein gebunden am Cys316 an Helix 8 von Rhodopsin in Membranen wurden mit G_Tα Peptid im Überschuss gemessen ($c_{\text{Rh}_o} = 5 \mu\text{M}$, $c_{\text{G}_T\alpha} = 100 \mu\text{M}$). Diese wurden als pH-Reihe mit 50 mM MES-Bis-Tris-Propan als Puffer im Bereich von pH 5.5-9.5 mit 150 mM NaCl, um eine Vergleichbarkeit mit den Daten von Mahalingam et al. [2008] zu gewährleisten, und bei 0°C nach Lichtaktivierung des Proteins durchgeführt. Das Peptid wurde im 10-fachen Überschuss (100 μM) dazugegeben. Die Analyse wurde anhand der Modellgleichung 3.14

mit drei Anisotropiezerfallskomponenten durchgeführt. Die einzelnen Parameter der Fits sind in Abb. 67 zu sehen. In der oberen Reihe sind die gefitteten Fluoreszenzlebensdauerparameter, in der mittleren Reihe die Anisotropieparameter und unten die Halbkegelöffnungswinkel von Farbstoff und Helix 8 pH-abhängig aufgetragen.

Abb. 67A zeigt die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauerkomponenten. $\tau_1 = 0.25$ ns und $\tau_2 = 1.2$ ns sind über den gesamten gemessenen pH-Bereich konstant. Die Zerfallszeit τ_3 , welche der Lebensdauer des freien Fluoresceins entspricht, fällt von 3.7 ns mit einem Übergang von $pK_a = 8.6 \pm 0.4$ auf 3.4 ns ab.

Die relativen Amplituden α_i der Fluoreszenzkomponenten wurden global mit einer Henderson Hasselbalch Funktion gefittet (Abb. 67B). Der Übergang liegt bei $pK_a = 9.4 \pm 0.4$. α_3 fällt von 27% auf 23% ab, α_2 steigt von 32% auf 36% an und α_1 ist konstant über den gesamten pH-Bereich bei 41%.

Die Analyse der Anisotropie zeigt, daß die Rotationskorrelationszeit ϕ_1 des Farbstoffes konstant über den gesamten pH-Bereich bei $\phi_1 = 0.2$ ns liegt. Die Rotationskorrelationszeit der Helix 8 ϕ_2 steigt von 0.6 ns auf 3.6 ns mit einem Übergang von $pK_a = 7.0 \pm 0.4$ an (Abb. 67C). Aufgrund der langsamen Rotationsdiffusionszeit der Membranfragmente im ms-Bereich ist keine entsprechende Depolarisation im Meßfenster der zeitaufgelösten Fluoreszenz des Fluoresceins zu beobachten, so daß virtuell die Anisotropie auf einen Endwert r_∞ ($\sim \beta_3$) fällt. Die relativen Amplituden β_i sind in Abb. 67D gezeigt, sie wurden global mit der Henderson-Hasselbalch-Funktion gefittet, der Übergang liegt bei $pK_a = 8.4 \pm 0.1$. Die Halbkegelöffnungswinkel aus der *cone-in-a-cone* Analyse werden in Abb. 67E dargestellt. Sie zeigen, daß bei den Messungen des Rhodopsins mit dem Peptidanker $G_T\alpha$ innerhalb des Fehlers keine Änderung des Halbkegelöffnungswinkels des Farbstoffes stattfindet. Dagegen vergrößert sich der Halbkegelöffnungswinkel der Helix 8 mit einem Übergang von $pK_a = 8.5 \pm 0.1$ von 16° auf 40° .

Schlußfolgerung

Der Vergleich mit lichtakivierten Rhodopsin-AF in Membranen bei 0°C zeigt eine signifikante Verschiebung des Übergangs der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer τ_3 von Fluorescein mit $pK_a = 6.5 \pm 0.1$ bei 0°C ohne $pG_T\alpha$ zu $pK_a = 8.6 \pm 0.4$ mit dem Peptid. Vergleichende Messungen der Meta-II Kinetik über transiente Absorptionsspektroskopie zeigen einen Übergang von $pK_a = 9.1 \pm 0.3$ bei 0°C in Anwesenheit von $pG_T\alpha$ (Abb. 66). Diese Messungen erhärten den Zusammenhang zwischen der Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer τ_3 und dem aktiven Meta-II Intermediat, welche durch die Konformationsänderungen des Meta-II Intermediats hervorgerufen werden könnten. Ebenso zeigt die Verschiebung des Meta-I/Meta-II Gleichgewichtes die Meta-II-stabilisierenden Eigenschaften des $G_T\alpha$ -Peptides.

Während die weiteren Fluoreszenzeigenschaften durch das $G_T\alpha$ -Peptid nicht signifikant beeinflusst werden, zeigen sich Unterschiede in den Anisotropieparametern. Die Rotationskorrelationszeit ϕ_2 besitzt im sauren pH-Bereich von pH 5 - pH 6 eine sehr schnelle Dynamik, deren Ursprung unklar ist. Die pK_a -Werte der pH-Abhängigkeit der relativen Amplituden β_i verschieben sich signifikant gegenüber den Anisotropien ohne Peptid, ebenso wie das Meta-I/Meta-II Gleichgewicht der korrespondierenden Absorptionmessungen, zu alkalischen pH-Werten.

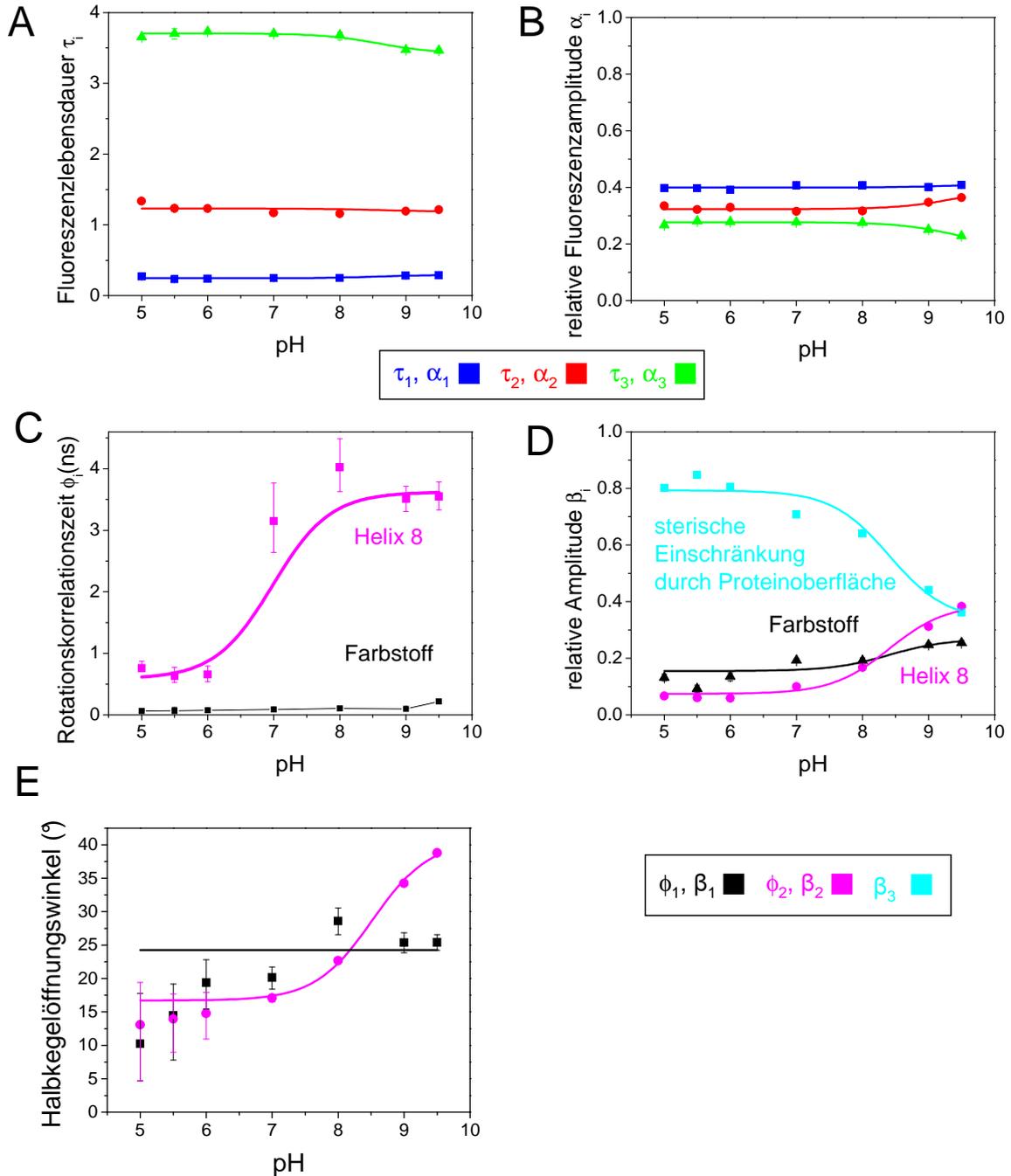


Abbildung 67: Analyse der Fluoreszenzanisotropiemessungen von Rhodopsin-AF und pG_Tα – LY in nativen Membranen. In der oberen Reihe sind die Fluoreszenzzerfallsanalysen von **A** der Fluoreszenzlebensdauern und **B** ihrer relativen Amplituden dargestellt. In der mittleren Reihe sind die Analysen der zeitaufgelösten Anisotropiemessungen **C** der Rotationskorrelationszeiten und **D** ihrer relativen Amplituden dargestellt. **E:** Darstellung der Halbkegelöffnungswinkel von Farbstoff und Helix. Bedingungen: 10 mM Rhodopsin-AF in Membranen, 100 μM pG_Tα – LY, 50 mM MES-Bis-Tris-Propan, 150 mM NaCl, $\lambda_{ex} = 485$ nm, Fluoreszenz wurde durch einen Kantenfilter OG515 aufgenommen.

6.4 Verfolgung der Bindung von $G_T\alpha$ -Peptiden an der Oberfläche von Diskmembranen

Aus der individuellen Verfolgung von einzelnen Molekülen können Informationen über Diffusion und Interaktion mit anderen Molekülen gewonnen werden. Bei den hier vorgestellten Messungen wird die Diffusion und Bindung des hochaffinen $G_T\alpha$ -Analog - welcher als Peptidanker an die Bindungstasche des lichtaktivierten Rhodopsins bindet - über die Membranfragmente von Rhodopsin untersucht. Von speziellen Interesse ist dabei ihre Interaktion in Abhängigkeit des Intermediatzustandes des Rhodopsins. Aus den Experimenten wurden die Trajektorien der fluoreszenzmarkierten $pG_T\alpha$ -Peptide vor- und nach Lichtaktivierung des Rhodopsins aufgenommen und analysiert. Da $pG_T\alpha$ in Meta-II hochaffin bindet, zeigt die Diffusion des $G_T\alpha$ Peptides die Diffusion der Rhodopsine im aktiven Meta-II Zustand an.

Da das evaneszente Feld des Anregungsstrahles beim TIRFM nur einige hundert Nanometer in die Probenlösung eindringt, mußten für die Messungen mit Membranfragmenten diese auf die Oberfläche des Deckglases lokalisiert sein. Dazu wurden sie auf das Deckglas in ihrer Pufferlösung pipettiert, in der sie dann durch die Schwerkraft auf die Oberfläche des Deckglases absanken. Die Rhodopsinmembranen bilden dabei gut definierte Schichtstrukturen aus [Fitter et al., 1998]. In den Messungen sind die Membranfragmente nicht sichtbar, sondern nur die fluoreszenzmarkierten Moleküle. Bei höheren Konzentrationen des Peptids können Bereiche ausgemacht werden, an denen sich die Peptide sammeln und dessen Umriss zu der Größe von Membranfragmenten passt (Abb. 68A).

Die Experimente wurden mit dem Farbstoff Atto647N, dem hochaffinen Analogon des C-terminalen Endes der $G_T\alpha$ -Untereinheit, $pG_T\alpha$ – Atto647N, und Rhodopsin-Diskmembranfragmenten durchgeführt.

Als Kontrollexperiment wurde die Interaktion von Farbstoff und von fluoreszenzmarkierten Peptid mit der Glasoberfläche verfolgt, um eventuelle Artefakte ausschließen zu können. In beiden Fällen waren die Interaktionen homogen über die gesamte Oberfläche verteilt, wobei die Moleküle nur für kurze Zeit auftauchen und keine Bewegung entlang der Glasoberfläche stattfand (Abb. 68D).

Die Experimente mit den ROS-Membranfragmenten wurden unter schwachem Rotlicht durchgeführt, um eine vorzeitige Anregung der Rhodopsin-Proteine auszuschließen. Der Farbstoff wurde mit einem Helium-Neon-Laser (HeNe) bei $\lambda_{Ex} = 632$ nm angeregt. Bei dieser Wellenlänge wird das Retinal im Rhodopsin nicht angeregt, welches zur Aktivierung des Rhodopsins führen würde. Zur Lichtaktivierung des Rhodopsins während des TIRF-Experiments wurde das Laserlicht eines zweiten Diodenlasers mit $\lambda_{Rho} = 532$ nm in den Strahlengang des TIRF-Aufbaus eingekoppelt. Die Anregung dauerte ca. 2 – 3 ms.

Für die Experimente, in denen die Diffusion von $pG_T\alpha$ – Atto647N über die Lichtaktivierung von Rhodopsin verfolgt werden sollte, mußte mit einer sehr geringen Konzentration an markierten Molekülen gemessen werden, da für das Auffinden der einzelnen fluoreszierenden Moleküle diese einen gewissen Abstand haben müssen, um als einzelne Moleküle identifiziert werden zu können. Die Auflösung ist dabei von der Numerischen Apertur N_A und der Wellenlänge des verwendeten Lichts λ abhängig: $d = \lambda / (2 \cdot N_A)$. In den Experimenten wurden mit der CCD-Kamera Bilder mit einer Wiederholfrequenz von etwa 1 – 200 Hz gemessen.

Analyse der Trajektorien

Die Interaktion der fluoreszenzmarkierten Peptide mit nativen Diskmembranfragmenten zeigt eine Änderung als Folge der Lichtaktivierung von Rhodopsin. Exemplarisch ist in Abb. 68B eine Bildfolge zu sehen, in der Rhodopsin während der Messung lichtaktiviert wird. Das erste Bild zeigt

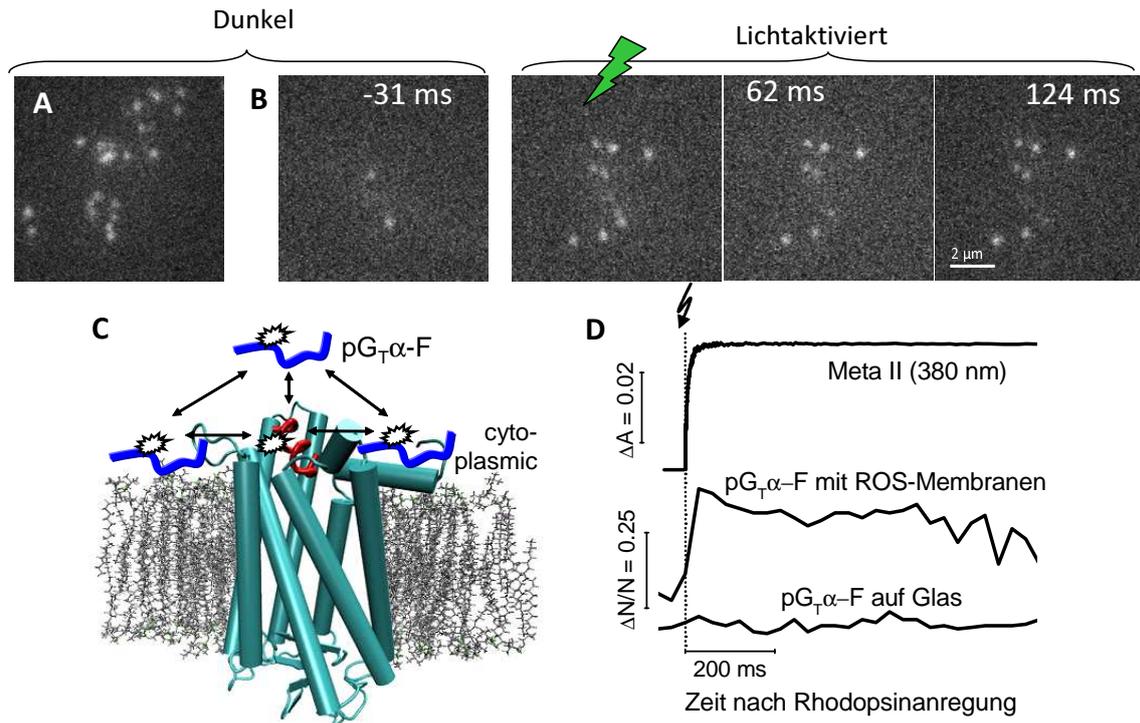


Abbildung 68: Interaktion von fluoreszenzmarkierten $G_T\alpha$ -Peptiden. **A:** Stelle mit hoher Peptidkonzentration **B:** Gleiche Stelle kurz vor Lichtaktivierung des Rhodopsins, die darauffolgenden Bilder sind die folgenden Aufnahmen bei Lichtaktivierung und danach. **C:** Schematische Darstellung des Peptids, welches nur in der Rhodopsinbindungstasche α -helikal wird. **D:** Vergleich der Anzahl der detektierten Peptide zum Vergleich mit den Anstieg von Meta-II und einem Vergleich ohne Rhodopsin.

eine Stelle direkt vor der Anregung mit dem grünen Anregungslichtblitz, die drei darauffolgenden zeigen die Veränderung der Interaktion von $pG_T\alpha - Atto647N$ direkt nach der Anregung, sowie nach 62 und 124 ms. Es ist ein Anstieg in der Anzahl der $pG_T\alpha - Atto647N$ -Moleküle auf der Diskmembran nach Lichtanregung zu sehen, wobei der höchste Anstieg direkt nach der Lichtanregung zu sehen ist. Die Anstiegszeit ist vergleichbar mit der Anstiegszeit des aktiven Meta-II-Intermediats von Rhodopsin nach Lichtanregung (Abb. 68D). Diese Tatsache steht im Widerspruch zu Messungen mit "Mass tagged" C-terminalen Peptiden aus Lichtstreuexperimenten [Herrmann et al., 2004], welche eine Bindungskonstante im Sekundenbereich zeigt. Dagegen zeigen andere Studien schnellere Bindungskonstanten von Transducin von 40 ms [Bennett et al., 1982].

Das $G_T\alpha$ -Peptidanalogen besitzt eine sehr viel höhere Bindungsaffinität zum aktiven Rhodopsin als zum inaktiven [Kisselev et al., 1999, Herrmann et al., 2004]. Aufgrund der - im Holotransducin vorhandenen - aber hier fehlenden Membrananker sollten bei diesen Experimenten nur kurze Interaktionen mit Rhodopsin im Grundzustand vorliegen. Peptide, welche nur ein Bild (≤ 31 ms) sichtbar sind und keiner Trajektorie angehören, werden als nicht mit Rhodopsin interagierende Peptide interpretiert. Dies besitzen einen Anteil von ca. 75% (Abb. 69A). Von den restlichen Partikeln sind 80% nahezu immobil. Nach Lichtaktivierung fällt der Anteil der kurz-interagierenden Moleküle auf ca. 40% (Abb. 69D). Das deutet darauf hin, daß durch die Lichtaktivierung die Bindungsaffinität der Membran-, bzw. Proteinoberfläche signifikant erhöht ist. Durch die Lichtaktivierung entsteht die Proteinankerstelle an der cytoplasmatischen Oberfläche von Rhodopsin, an die das $pG_T\alpha - Atto647N$ -Molekül spezifisch binden kann (Abb. 68C).

Rhodopsin im Dunkelzustand

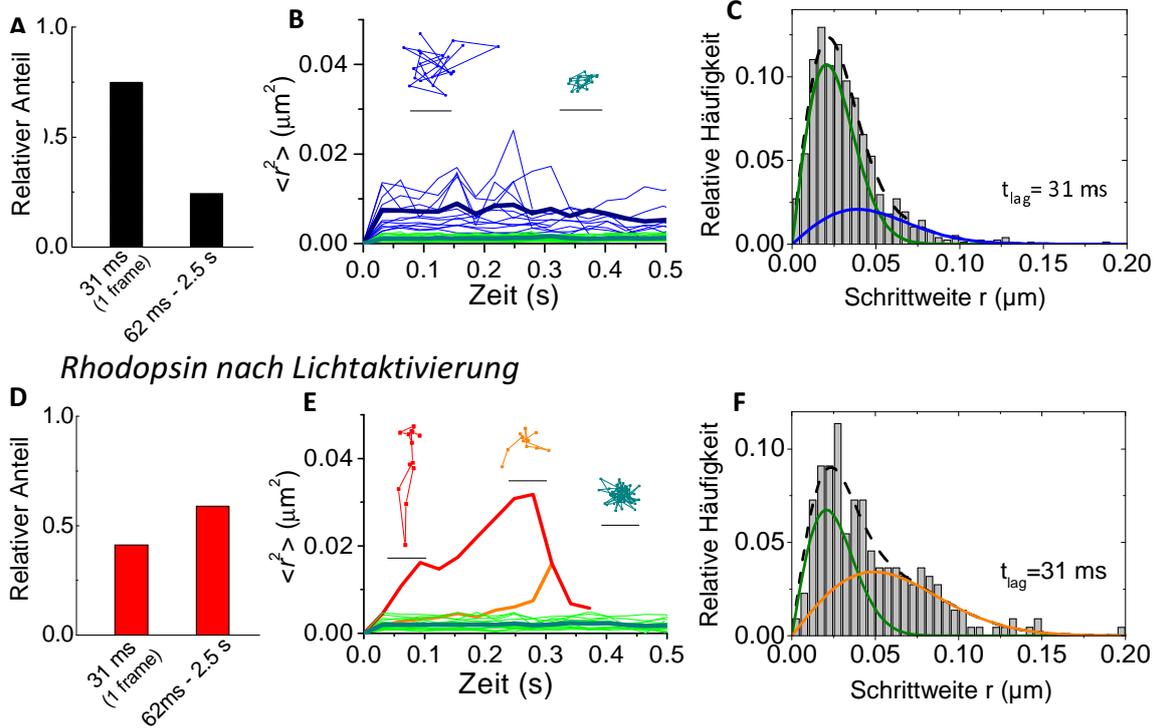


Abbildung 69: Auswertung der Trajektorien der fluoreszierenden pG_Tα-Moleküle, welche mit Rhodopsin nicht lichtaktiviert (oben) und lichtaktiviert (unten) interagieren. In der ersten Spalte die relative Anzahl Trajektorien mit der Länge Null im Verhältnis zu längeren Trajektorien. In der zweiten Spalte die MSDs von individuellen Trajektorien. In der dritten Spalte die Schrittweitenverteilungen für $t_{\text{lag}} = 31 \text{ ms}$. Sie zeigen eine inhomogene Verteilung mit zwei Subpopulationen.

Aus den Trajektorien der fluoreszenzmarkierten Peptide kann die Diffusion der Peptide berechnet werden. Das mittlere Verschiebungsquadrat (*Mean square displacement* - MSD) für individuelle Trajektorien der fluoreszenzmarkierten Peptide vor und nach Lichtanregung des Rhodopsins sind in Abb. 69B, E eingezeichnet. Abb. 69B (vor Lichtanregung) zeigt, daß sich die MSD-Kurven in zwei Populationen aufteilen, welche mit blau und grün farbkodiert sind. Die grünen Kurven zeigen MSDs einer immobilen Population und die blauen einer mobileren. Zwei Trajektorien sind exemplarisch im Diagramm eingezeichnet. Nach Lichtanregung sind zusätzlich zu den MSDs von immobilen Partikeln auch welche mit hoher Mobilität erkennbar. Diese zeigen aber keine freie Diffusion, sondern eine gerichtete (Abb. 69E, rot) bzw. eine eingeschränkte (orange).

Für die quantitative Untersuchung der Trajektorien wurde die Analyse der Schrittweitenverteilung aller Trajektorien nach Formel 3.47 durchgeführt. Diese läßt sich mit zwei Subpopulationen gut fitten, eine mit kleiner Schrittweite (Subpopulation 1) und eine mit großer Schrittweite (Subpopulation 2). Im inaktiven Dunkelzustand, für $\Delta t = 31 \text{ ms}$ hat Subpopulation 1 (Abb. 69C grün) eine mittlere Schrittweite von $r_1^2 = 0.0009 \pm 0.0001 \mu\text{m}^2$ und die Subpopulation 2 (blau) eine von $r_2^2 = 0.003 \pm 0.001 \mu\text{m}^2$. Nach Lichtaktivierung kann die Schrittweitenverteilung mit zwei Subpopulationen gefittet werden, mit ebenfalls einer Subpopulation mit kleiner und einer mit großer Schrittweite. Subpopulation 1 hat eine mittlere Schrittweite von $r_1^2 = 0.001 \pm 0.0001 \mu\text{m}^2$ und Subpopulation 2 eine mittlere Schrittweite von $r_2^2 = 0.005 \pm 0.001 \mu\text{m}^2$. Der Anteil der Subpopulation 1 fällt von etwa 80% auf etwa 50% nach Lichtaktivierung ab. Die Auswertung der

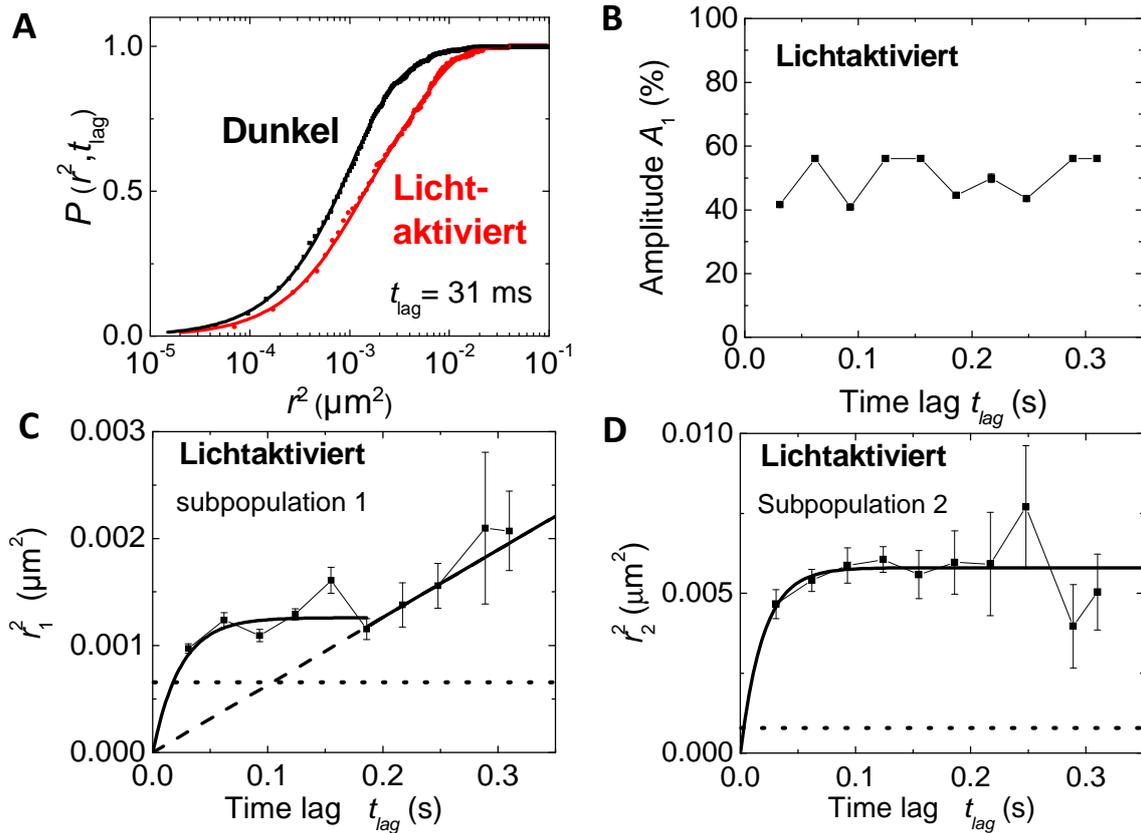


Abbildung 70: **A:** Kumulative Wahrscheinlichkeitsfunktionen der Schrittlängen von pG_Tα vor (schwarz) und nach (rot) Lichtanregung von Rhodopsin. **B:** zeigt die Abhängigkeit der Amplitude der beiden Subpopulationen **C,D:** $\langle r^2 \rangle$ in Abhängigkeit der verschiedenen Zeitabstände.

kumulativen Wahrscheinlichkeitsfunktion ergibt mittlere Schrittlängen, welche innerhalb des Fehlers der Analyse der Schrittlängenverteilung gleichen (schwarz; $r_1^2 = 0.0009 \mu\text{m}^2$, $r_2^2 = 0.0037 \mu\text{m}^2$ mit $A_1 = 0.81$) und Lichtaktiviert (rot; $r_1^2 = 0.001 \mu\text{m}^2$, $r_2^2 = 0.0047 \mu\text{m}^2$ mit $A_1 = 0.42$).

Die Analyse der Trajektorien mit Vielfachen von Δt kann Aufschluß über Diffusion über größere Zeitskalen geben. Die Analyse der Messungen des fluoreszenzmarkierten G_Tα Peptids zeigt, daß die Amplitude der langsamen Subpopulation bei ca. 50% liegt (Abb 70). Subpopulation 1 zeigt für kleinere Δt eine eingeschränkte Diffusion mit einer Einschränkungslänge²⁰ $L_1 = 61 \pm 2 \text{ nm}$ und $D_0 = 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$, welche dann bei größeren $\Delta t > 200 \text{ ms}$ zu einer normalen Diffusion mit $0.002 \mu\text{m}^2/\text{s}$ wechselt. Subpopulation 2 besitzt eine *confinement length* von $L_2 = 130 \pm 2 \text{ nm}$ bei $D_0 = 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Da das pG_Tα-Peptid hochaffin nach Lichtanregung an den aktivierten Rezeptor bindet, ist das Peptid ein Affinitätsmarker für das aktive Meta-II. Die Analyse der Trajektorien nach Lichtaktivierung zeigt demzufolge das Diffusionsverhalten der lichtaktivierten Rhodopsinmoleküle. Dies bedeutet, daß nach Lichtaktivierung in Rhodopsinmembranen ein heterogenes Diffusionsverhalten der aktiven Rezeptormoleküle vorliegt, mit zwei verschiedenen Subpopulationen und unterschiedlichen Diffusionskonstanten sowie *confinement lengths*. Die eine Population besitzt wie bei den Experimenten mit Rhodopsin im Grundzustand einen sehr kleinen Diffusionskoeffizienten, welche

20 confinement length

sich nahe der Detektionsgenauigkeit des Systems befindet. Diese wurde mit simulierten Bildern von Dr. Sebastian Haase mit gleichen Parametern für Anzahl der Photonen pro Partikel, Rauschen und Größe der Partikel quantifiziert und beträgt für diese Messungen $r_{\text{immobile}} = 0.0002 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Für größere Zeitskalen ändert sich ihre Diffusion von eingeschränkt zu frei. Das kann möglicherweise so interpretiert werden, daß ein großer, zusammenhängender Bereich von Rhodopsinen sich wie eine Eisscholle über die Diskmembran diffundiert. Die andere Gruppe mit höherer Mobilität deutet auf Rezeptoren hin, welche sich als kleinere Einheiten (Mono- oder Dimere) in ungeordneten Bereichen der Diskmembran bewegen.

6.5 Diskussion

pG_Tα-Fluoreszenzsensor

Die Funktion des Sensors beruht auf der Veränderung der Sekundärstruktur des C-terminalen Ankers der α-Untereinheit von Transducin (G_Tα) bei der Bindung an die aktive cytoplasmatische Oberfläche von Rhodopsin. Diese Sekundärstrukturänderung findet auch in synthetischen Peptiden statt, die eine ähnliche Aminosäuresequenz wie der native C-terminale G_Tα-Anker besitzen.

Im Falle der Bindung zum lichtaktivierten Rhodopsin wird die Sekundärstruktur des C-terminalen G_Tα-Peptids α-helikale [Koenig et al., 2002, Scheerer et al., 2008, Choe et al., 2011]. Mit Hilfe von Fluoreszenzlöschung kann durch einen strategisch angebrachten Fluorophor und einem Tryptophan in der Sequenz zwischen der ungefalteten und der α-helikalen Struktur unterschieden werden. In der α-helikalen Form erhöht sich die Fluoreszenzintensität.

Da es sich beim C-terminalen G_Tα-Anker um eine amphiphatische Aminosäuresequenz handelt, konnte auch in Gegenwart von Detergenz Mizellen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Wir nutzten diese Messung als Referenzmessung um zu zeigen, daß eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität in der Tat mit einem Anstieg der α-helikalen Struktur verbunden ist, wie über CD-Messungen gezeigt wurde.

Der pG_Tα – LY-Faltungssensor wurde als erstes verwendet, um die Ausbildung der aktiven Konformation in Opsin bei saurem pH zu testen. In Opsinmembranen als auch in Opsinmizellen steigt die Fluoreszenzintensität des pG_Tα – LY zu sauren pH-Werten an. Damit konnte gezeigt werden, daß pG_Tα – LY pH-anhängig an Opsin bindet. Die Ausbildung der aktiven Opsinstruktur, die die Bindung ermöglicht, erfolgt mit einem $pK_a = 4.7 \pm 0.1$ in Opsin-Membranen und mit einem $pK_a = 5.1 \pm 0.3$ in Opsin-Mizellen. Diese pK-Werte liegen in dem pH-Bereich, in dem über FTIR-Messungen die pH-abhängige Ausbildung aktiver Struktur von Opsin mit einem $pK_a = 4.1$ gezeigt wurde [Vogel und Siebert, 2001]. Gleichzeitig stimmen diese pK-Werte auch mit der pH-abhängigen Ausbildung der aktiven Helix 8-Struktur in Opsin-Membranen überein (Kap. 5.3.2). Der Nachweis einer aktiven Bindungsstruktur in Opsin-Mizellen ist insofern interessant, da Opsin-Mizellen eine reduzierte Stabilität zeigen und bis jetzt davon ausgegangen wurde, dass keine Bindung und Aktivierung des Transducins stattfindet [Cohen et al., 1993]. Eine Erklärung könnte der Einsatz des hochaffinen pG_Tα – LY-Peptides liefern, welches eine aktive Konformation an der cytoplasmatischen Oberfläche von Opsin induzieren könnte. Ein solches wurde auch für die kristallographische Bestimmung der Tertiärstruktur von Transducin-bindenden Opsin genutzt [Scheerer et al., 2008], welches gelöst unter den genutzten Puffer- und Temperaturbedingungen (pH 6, 4°C) keine aktive Struktur ausbilden dürfte.

Weiterhin wurde der Einfluss der Bindung des C-terminalen Transducin-Peptides auf die Dynamik von Helix 8 untersucht. Der an Helix 8 gekoppelte Fluorophor zeigt charakteristische pH-abhängige Änderungen in Fluoreszenzzerfall und Anisotropie. Mit Hilfe von pH-abhängigen Extra-Meta-II Messungen bei 0°C und alkalischen pH, mit und ohne pG_Tα, konnte gezeigt werden,

daß der pK fuer das Meta-I/-II Gleichgewicht sich von 6.6 in Abwesenheit nach 9.4 in Gegenwart des pG_Tα verschiebt.

Die Fluoreszenzlebensdauer des an Helix gebundenen Fluorescein reagiert sehr sensitiv auf die Ausbildung von Meta-II (Kap. 5.2). Eine pH-abhängige Verlangsamung der Fluoreszenzlebensdauer τ_3 bei alkalischem pH in Gegenwart von pG_Tα mit $pK_a = 8.6 \pm 0.4$ korreliert mit dem pK-Wert des Meta-I/-II Gleichgewichts.

Die Bindung des pG_Tα beeinflusst auch die zeitaufgelösten Anisotropiedaten. Sowohl die Amplituden der Anisotropiezerfallskomponenten als auch der Halbkegelöffnungswinkel von Helix 8 zeigen eine pH-Abhängigkeit mit einem $pK_a \approx 9$, die der des Meta-I/-II Gleichgewichts entspricht. Die Übereinstimmung des pK-Wertes des Meta-I/-II Gleichgewichts mit der pH-Abhängigkeit der Anisotropieamplituden ist auch in Rhodopsin-Membranen ohne Gegenwart des pG_Tα-Peptids zu beobachten. Bei niedrigen Temperaturen scheint die Änderung des Halbkegelöffnungswinkels mit dem Gleichgewicht Meta-I/-II aus den Absorptionmessungen gekoppelt zu sein. Es wurde gezeigt, daß bei niedrigen Temperaturen im Gegensatz zu Experimenten bei 37°C die Protonierung der Glu134 mit der Deprotonierung der Schiffsbasis des Retinals gekoppelt ist [Mahalingam et al., 2008]. In Bezug auf die Daten würde das bedeuten, daß die Protonierung der Glu134 bei niedrigen Temperaturen mit der Beweglichkeit der Helix 8 gekoppelt ist.

Kinetik der Helix-Faltung bei der Bindung an lichtaktiviertes Rhodopsin (2D-Fluoreszenzlebensdauer-messungen)

Mit Hilfe des Faltungssensors pG_Tα – LY wurde die Kinetik der Helix-Faltung bei der Bindung an lichtaktiviertes Rhodopsin untersucht. Es wurden sowohl die Bindung an Rhodopsinmembranen als auch an Rhodopsinmizellen untersucht.

Die Fluoreszenzlebensdauer-messungen mit den LY-markierten G_Tα-Peptiden zeigen nur bei Bindung an das lichtaktivierte Rhodopsin einen biexponentiellen Fluoreszenzerfall: eine sehr schnelle Komponente mit $\tau_1 = 20$ ps und die Fluoreszenzkomponente mit $\tau_2 \approx 7$ ns. Die 2D-Messungen zeigen die Entwicklung der Amplituden beider Zerfallszeiten. Diese steigen mit unterschiedlichen Zeitkonstanten an. Der Anstieg der 20 ps-Komponente, die nicht die Faltung der Helix widerspiegelt, ist sowohl bei Rhodopsinmizellen als auch bei Rhodopsinmembranen schneller als der Anstieg der 7 ns-Komponente, welche die Umwandlung des Peptidankers in eine helikale Struktur widerspiegelt. Die Zeitkonstanten für die Helixbildung des Peptides liegen bei 27 ms (Mizellen) bzw. 196 ms (native Diskmembranen) und sind damit jeweils langsamer als die Ausbildung des aktiven Meta-II Zustandes. Der Vorgang der Helixbildung an sich liegt im Bereich von Mikrosekunden [Kubelka et al., 2004, Eaton et al., 2000]. Daher muß der ratenlimitierende Schritt in den Konformationsänderungen, die das Protein nach Deprotonierung der Schiffsbasis ausführt, liegen.

Die Helixbildung des C-terminalen Endes der katalytischen Transducin α-Untereinheit ist eng mit der Aktivierung von Transducin verknüpft [Dratz et al., 1993]. Währenddessen in Rhodopsin-Mizellen die Helixbildung auf einer ähnlichen Zeitskala wie die Protonenaufnahme aus der Lösung stattfindet, ist dies bei Rhodopsin-Membranen nicht der Fall [Arnis und Hofmann, 1993]. Damit geht die Protonenaufnahme nicht mit der Aktivierung von Transducin, bzw. zumindest nicht mit der Ausbildung der helikalen Struktur des C-terminalen Ankers der α-Untereinheit einher. Die Ergebnisse zeigen weiterhin eindeutig, daß es einen Vorbindungszustand gibt, der durch eine Änderung in der cytoplasmatischen Rhodopsinoberfläche ausgelöst werden muss, da die 20 ps-Komponente sowohl in Rhodopsin-Membranen als auch -Mizellen auftritt.

Organisation der Rhodopsinmoleküle in der Diskmembran und ihre Auswirkungen auf die Signalkaskade

Rhodopsinmoleküle sind mit einer sehr hohen Dichte in der Diskmembran gepackt. Es ist noch nicht geklärt, ob die Moleküle frei oder in Mono- oder Dimeren in der Membran diffundieren oder ob sie eine parakristalline Anordnung ausbilden, wie sie in einer AFM-Studie ermittelt wurde [Fotiadis et al., 2003]. Die Organisation der Rhodopsinmoleküle in Form von Oligomeren in der nativen Diskmembran würde enorme Auswirkungen für den initialen Sehprozess haben [Park et al., 2004, Park und Palczewski, 2005]. Die Packungsorganisation und die Diffusionseigenschaften der am initialen Sehprozess teilnehmenden Moleküle haben einen starken Einfluß auf den zeitlichen Verlauf in der Signalkaskade. Simulationen von zufälligen Begegnungen von lichtaktivierten Rhodopsin und dem G-Protein Transducin zeigen eine Abhängigkeit von der Rhodopsinorganisation in der Membran und der Diffusion von Transducin an der Membranoberfläche. Für eine schnelle Signalantwort müssen die Transducine auch bei hoher Rhodopsinpackungsdichte schnell auf der Oberfläche diffundieren [Dell'Orco und Schmidt, 2008].

In den hier gezeigten Einzelmolekülverfolgungsexperimenten wurden die Trajektorien des $pG_T\alpha$ – Atto647N-Peptids gemessen. Da das $pG_T\alpha$ -Peptid eine hohe Bindungsaffinität zu Rhodopsin im lichtaktivierten Meta-II Intermediat besitzt, konnte damit die Diffusion der Rhodopsinmoleküle in der nativen Diskmembran im lichtaktivierten Zustand bestimmt werden. Da Transducin und auch das $pG_T\alpha$ -Peptid keine Bindungsaffinität zum Rhodopsin im Dunkelzustand besitzt [Herrmann et al., 2004], kann klar zwischen Diffusion im Dunkel- und Meta-II Intermediat unterschieden werden. Nach Lichtaktivierung von Rhodopsin in nativen Diskmembranen zeigen die gebundenen $pG_T\alpha$ -Peptide ein eingeschränktes- und heterogenes Diffusionsverhalten, welches auf Inhomogenitäten in der Diskmembran und einen losen Zusammenschluß von mehreren Rhodopsinmolekülen in der Membran hinweist. Die Daten deuten damit auf ein Diffusionsverhalten hin, das sich 1. nach Lichtanregung ändert, 2. heterogen und 3. langsamer ist als in früheren Studien gezeigt [Poo und Cone, 1974] und auch nicht mit einer parakristallinen Anordnung der Moleküle im lichtaktivierten Rhodopsinzustand vereinbar ist.

Resultate & Diskussion Teil IV: Rhodopsindeaktivierung & Interaktion mit Arrestin

Das aktive Rhodopsin im Meta-II Intermediat setzt mit der Bindung des Transducins eine Signalkaskade in Gang. Um diese zu unterbrechen, muß das Rhodopsin deaktiviert werden. Dazu wird zunächst der C-Terminus des Rhodopsin von der Rhodopsinkinase phosphoryliert. Dadurch kann das Arrestin mit hoher Affinität binden und die Signalkaskade blockieren.

Da sich der C-Terminus des Rhodopsin direkt an Helix 8 anschließt, ist zu erwarten, daß neben der Phosphorylierung auch die Bindung des Arrestins einen Einfluß auf die Dynamik der Helix besitzt. Neben dem Arrestin-Wildtyp ist auch die R175E-Mutation von Interesse, da diese mit hoher Affinität an lichtaktiviertes Rhodopsin unabhängig vom Phosphorylierungsgrad des Rhodopsins binden kann [Gray-Keller et al., 1997].

7.1 Anisotropie von Helix 8

Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen wurden an Fluorescein durchgeführt, welches an Helix 8 (Cys316) kovalent gebunden ist. Das Rhodopsin wurde im unphosphorylierten, im phosphorylierten, im inaktiven Dunkelzustand, im Meta-II-Zustand, mit und ohne Arrestin (Wildtyp und Arr-R175E Mutante), in Micellen und nativen Membranen gemessen. Die Messungen wurden in 50 mM KPP pH 7.5, 150 mM NaCl und 20°C durchgeführt. Die hier eingesetzten Arrestin-Proben wurden von Dr. Kristina Kirchberg aufgereinigt und fluoreszenzmarkiert.

Abbildung 71 zeigt den Vergleich der Anisotropiekurven von fluoresceinmarkiertem Rhodopsin im phosphorylierten inaktiven Grundzustand und nach Lichtaktivierung in Meta-II, mit (Abb. 71C) und ohne Arrestin (Abb. 71A, B). Als Kontrolle sind die Anisotropiekurven von unphosphoryliertem Rhodopsin in Abb. 71D gezeigt.

Deutlich ist im Vergleich zum unphosphorylierten Rhodopsin zu sehen, daß der Anstieg der sterischen Einschränkung von Helix 8, d.h. der Anstieg von r_∞ beim Übergang nach Meta-II, im phosphorylierten Zustand weniger stark ausgeprägt ist.

Die Analyse der Fluoreszenzzerfallskurven wurde mittels Modellgleichung 3.9 mit drei Fluoreszenzzerfallskomponenten und die der Anisotropiezerfallskurven anhand der Modellgleichung 3.14 mit drei Anisotropiezerfallskomponenten in einem globalen Fit durchgeführt (Kap. 3.7.1). Die einzelnen Parameter der Fits sind in Abb. 72 dargestellt. Die schraffierten Balken sind jeweils die gefitteten Parameter der Proteine im inaktiven Dunkelzustand, die anderen stellen die Parameter nach Lichtaktivierung der Rezeptoren dar. Die Fehlerbalken wurden mittels *exhaustive error analysis* mit einem Konfidenzlevel von 68% berechnet.

Die Fluoreszenzanalyse wurde mit einer Summe von drei Zerfallsdauern τ_i und ihren relativen Amplituden α_i durchgeführt. Die längste Zerfallsdauer τ_1 entspricht dem Fluoreszenzzerfall des Farbstoffes, die beiden schnellen Zerfallsdauern werden durch Fluoreszenzlösungsprozesse hervorgerufen.

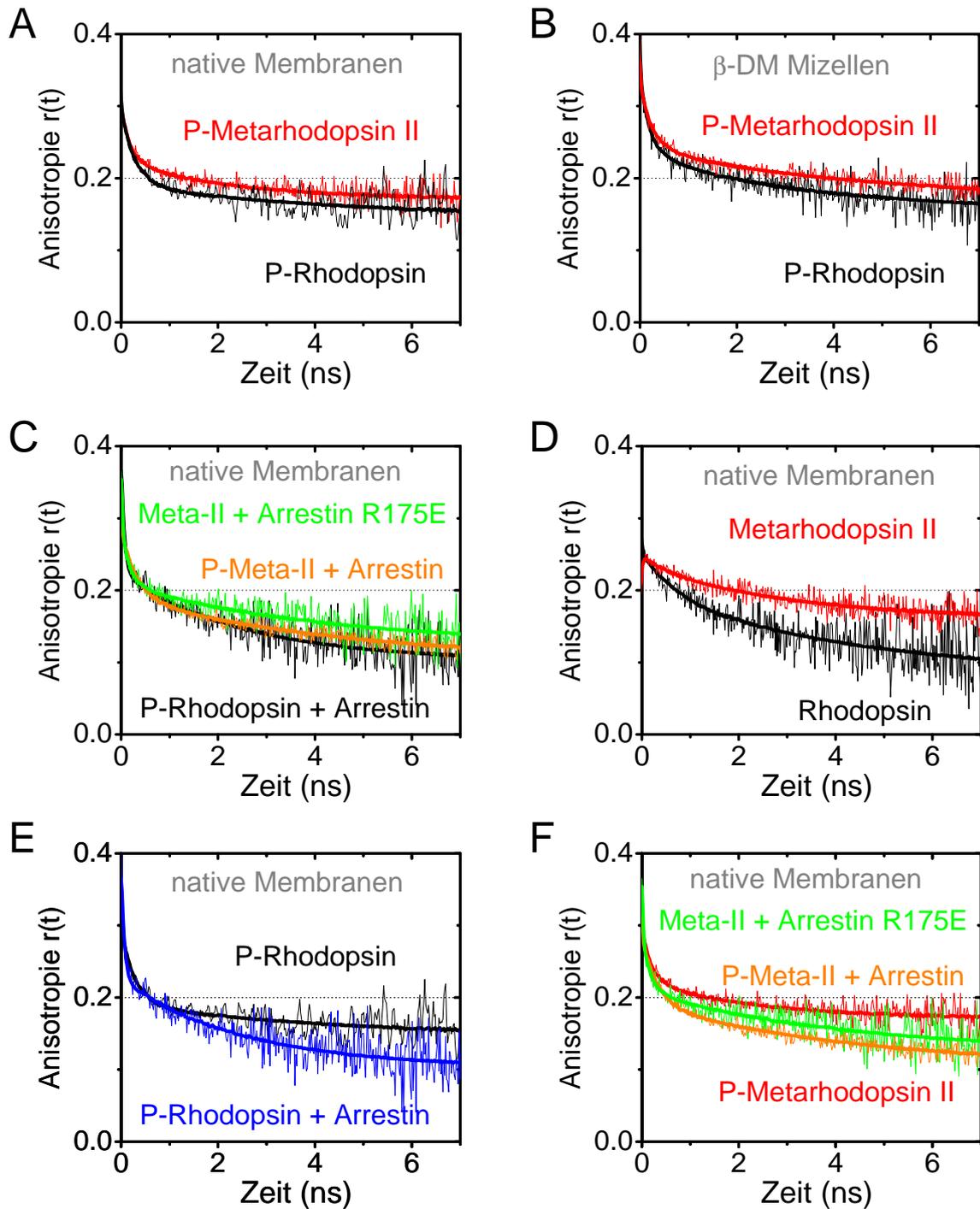


Abbildung 71: Anisotropieplots von Rhodopsin im Grundzustand (schwarz) und im angeregten Zustand (rot). **A:** Anisotropie von phosphorylierten Rhodopsin in nativen Membranen. **B:** Anisotropie von phosphoryliertem Rhodopsin in β -DM Mizellen. **C:** Anisotropie von phosphoryliertem Rhodopsin in nativen Membranen mit Wildtyp Arrestin und unphosphoryliertem Rhodopsin mit Arrestin-R175E. **D:** Anisotropie von nativem, unphosphoryliertem Rhodopsin. **E:** Anisotropie von phosphoryliertem Rhodopsin im inaktiven Dunkelzustand ohne und mit wt-Arrestin **F:** Anisotropie von lichtaktiviertem, phosphoryliertem Rhodopsin ohne und mit Arrestin und lichtaktiviertem Rhodopsin mit Arrestin-R175E. Bedingungen: 50 mM KPP pH 7.5, 150 mM NaCl und 20°C.

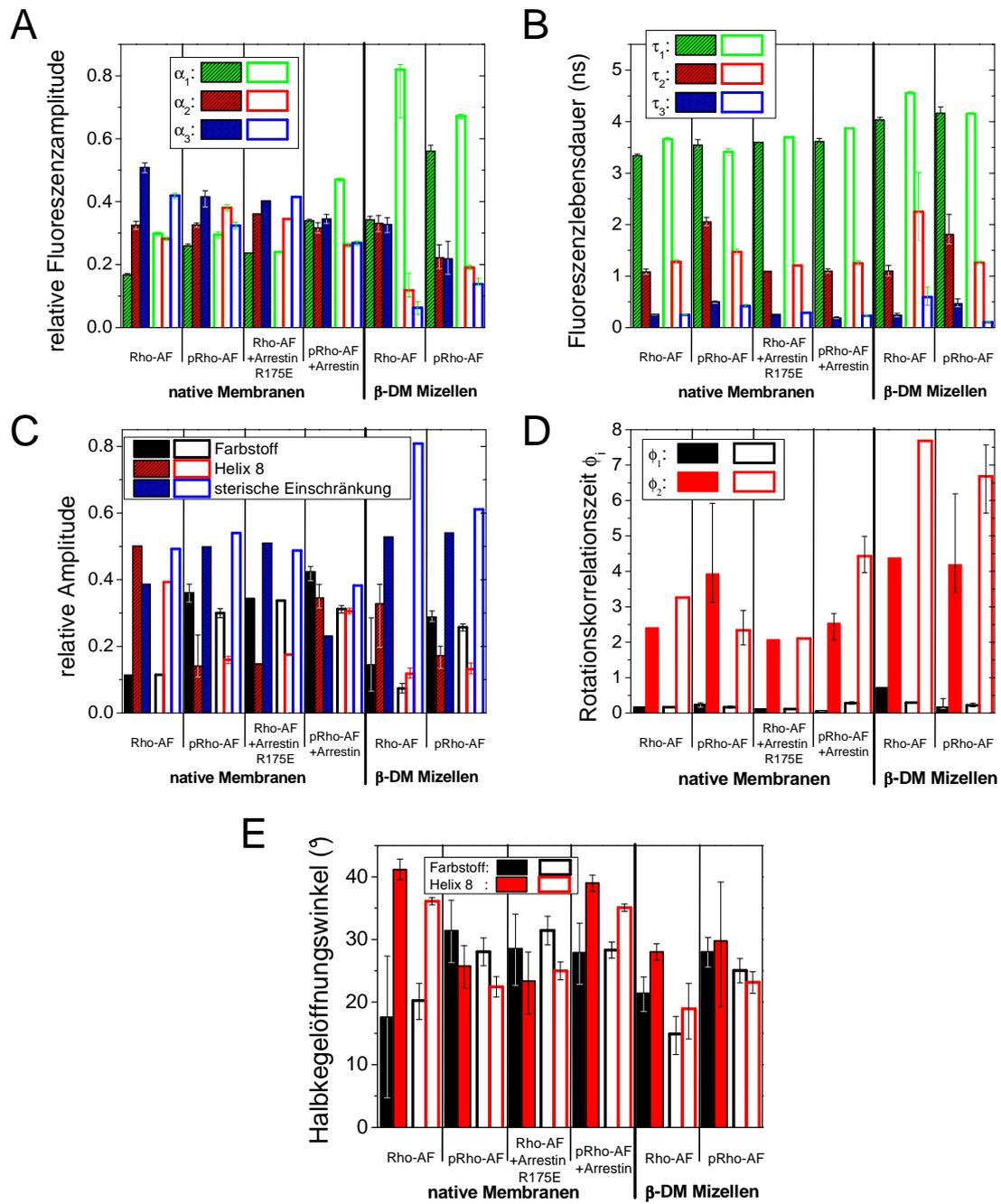


Abbildung 72: Darstellung der Fluoreszenz- und Anisotropieparameter für pROS, pROS solubilisiert, pROS mit Arrestin und ROS mit und ohne Arrestin R175E jeweils Cys316-AF markiert. Jeder Block besteht aus einer Messung im inaktiven Dunkelzustand (gefüllte Säulen) des Proteins und nach Lichtaktivierung (offene Säulen). Die Messungen wurden bei 50 mM KPP pH 7.5 und 150 mM NaCl und 20°C durchgeführt.

Analyse der Fluoreszenzlebensdauerparameter

Zuerst werden die Fluoreszenzerfallskomponenten vergleichend betrachtet und sind in Abb. 72A, B dargestellt.

Die Auswertung der relativen Fluoreszenzamplituden α_i (Abb. 72A) zeigt für das phosphorylierte Rhodopsin in nativen Membranen ($pRho_{Mem}$) mit 26% gegenüber dem unphosphorylierten (Rho_{Mem}) mit 16% einen größeren Anteil der relativen Amplitude des Fluoreszenzzerfalls α_3 im Dunkelzustand. Das gilt ebenfalls für die relative Amplitude α_3 des Rhodopsins-C316-AF in Mizellen, welche im Dunkelzustand unphosphoryliert (Rho_{Mic}) 34% und phosphoryliert ($pRho_{Mic}$) 56% der Gesamtamplitude besitzt. Ein Anstieg der relativen Amplitude des Fluoreszenzzerfalls α_3 im lichtaktivierten Zustand ist bei allen Messungen zu beobachten, was auf eine Änderung in den Oberflächeneigenschaften von Rhodopsin (apolarere Oberfläche) hindeutet. Durch die Zugabe von Arrestin zum phosphorylierten Rhodopsin im Dunkelzustand ($pRho_{Mem+Arr}$) ändern sich die Fluoreszenzamplituden (und damit die Fluoreszenzlöschung) des an der Helix 8 gebundenen Fluoresceins, was auf eine Änderung der Proteinumgebung und auf eine Interaktion von Arrestin und dem $pRho_{Mem}$ hindeutet. Nach Lichtaktivierung steigt α_3 beim $pRho_{Mem+Arr}$ auf 47%, wogegen beim Rho_{Mem} und $pRho_{Mem}$ α_3 auf 30% steigt. Die Messungen der unphosphorylierten Probe Rho_{Mem} mit der voraktivierten Mutante Arr R175E zeigt, daß diese im inaktiven Dunkelzustand und nach Lichtaktivierung keine signifikante Änderung der relativen Amplituden und der Fluoreszenzerfallskomponenten besitzt. Während die relativen Amplituden α_i denen der phosphorylierten Proben $pRho_{Mem}$ im Dunkelzustand gleichen, sind die τ_i mit den unphosphorylierten Proben Rho_{Mem} vergleichbar.

Die Fluoreszenzlebensdauer τ_3 weist auf eine veränderte Umgebung des Fluoreszenzmarkers und eine durch das Arrestin induzierte Veränderung der Helix 8 hin. Dieser Prozeß ist im Mizellensystem bei Lichtaktivierung stärker ausgeprägt als bei den nativen Membranen, in Einklang mit den in Kap. 5.2 vorgestellten Ergebnissen.

Die Auswertung der Fluoreszenzlebensdauerparameter zeigt für Rho_{Mem} und Rho_{Mic} eine Erhöhung der Fluoreszenzlebensdauer τ_3 nach Lichtaktivierung. Für $pRho_{Mem}$ und $pRho_{Mic}$ bleibt τ_3 im Rahmen des Fehlers gleich, wobei in Mizellenumgebung die Fluoreszenzlebensdauer langsamer ist als in Membranumgebung. Bei Bindung mit Arrestin steigt τ_3 ebenfalls an. Die Zerfallsdauer τ_2 ist im Dunkelzustand der phosphorylierten Proben signifikant länger als in den unphosphorylierten Proben.

Analyse der Anisotropieparameter

Die Anisotropieanalyse wurde mit drei Rotationskorrelationszeiten ϕ_i und ihren relativen Amplituden β_i durchgeführt (Kap. 3.7.1). Die Rotationskorrelationszeiten werden wie folgt zugeordnet: ϕ_1 wird durch die Rotationsdiffusion des gebundenen Farbstoffes hervorgerufen, ϕ_2 durch die Bewegung der Segmentbewegung (hier Helix 8 von Rhodopsin) und ϕ_3 entspricht der Rotationsdiffusion des Gesamtproteins. Die relative Amplitude β_3 entspricht der sterischen Einschränkung durch die Proteinoberfläche. Abbildungen 72C und D zeigen die entsprechenden Fitparameter.

Bei den unphosphorylierten Proben im Dunkelzustand zeigen die relativen Anisotropieamplituden β_i in Mizellen und Membranen ein ähnliches Verhalten zwischen Dunkelzustand und nach Lichtaktivierung. Die sterische Einschränkung durch die Proteinumgebung nimmt zu, während die relative Amplitude von Helix 8 gleichermaßen abnimmt. Die relativen Anisotropieamplituden β_i der phosphorylierten Proben ohne Arrestin in Mizellen und Membranen $pRho_{Mem}$ und $pRho_{Mic}$ und der unphosphorylierten Probe mit der voraktivierten Arrestin R175E Mutante zeigen nach Lichtaktivierung nur eine geringfügige Veränderung und einen kleinen Anstieg der sterischen Einschränkung durch die Proteinoberfläche. Die sterische Einschränkung durch die Proteinumgebung β_3 von $pRho_{Mem+Arr}$ ist im Dunkel- und im lichtaktivierten Zustand, verglichen mit den anderen Proben, am niedrigsten.

Die Rotationskorrelationszeit der Farbstoffeigenbewegung ϕ_1 liegt bei allen Messungen bei etwa 0.2 ns. Die Rotationskorrelationszeit von Helix 8 (ϕ_2) wird bei allen Proben, bis auf pRho_{Mem}, nach Lichtaktivierung größer. Die Rotationskorrelationszeiten liegen für die Membranproben zwischen 2 und 4 ns, für die Mizellenproben zwischen 4 und 8 ns.

Die Rotationskorrelationszeit ϕ_2 der Helix 8 im Dunkelizustand von pRho_{Mem} ist größer als beim unphosphorylierten Rho_{Mem}. Die Anisotropieparameter des Dunkelizustands von pRho_{Mem} verändern sich bei Zugabe von Arrestin. Durch die Phosphorylierung interagiert das Arrestin mit dem Rhodopsin im Dunkelizustand, die sterische Einschränkung durch die Proteinoberfläche wird kleiner. Nach Lichtaktivierung steigt ϕ_2 in pRho_{Mem} + Arr von $\phi_2 = 2.8$ ns auf $\phi_2 = 4.2$ ns an. Die sterische Einschränkung β_3 wird im lichtaktivierten Zustand in der phosphorylierten Probe durch Zugabe von Arrestin kleiner. Es ist zu beachten, daß Helix 8 bei der Bindung direkt mit dem Arrestin interagiert. Durch das an Helix 8 gebundene Fluorescein wird eine Aktivierung von Arrestin verhindert [Kirchberg et al., 2011]. Somit beschreibt die Anisotropiekurve in Meta-II + Arrestin einen Vorbindungszustand, der der Aktivierung des Arrestins vorausgeht. Da Arrestin R175E aufgrund ihrer Mutation voraktiviert ist, kann mit Hilfe dieser Arrestinmutation das lichtaktivierte Rhodopsin komplett binden. Damit kann die Dynamik von Helix 8 im gebundenen Zustand bestimmt werden (Abb. 71C, F, 72).

Die *cone-in-a-cone* Auswertung der unphosphorylierten Proben zeigt, daß die Halbkegelöffnungswinkel des Farbstoffes vor und nach Lichtaktivierung im Rahmen des Fehlers unverändert sind (Abb. 72E). Der Halbkegelöffnungswinkel der Helix wird dagegen nach Lichtaktivierung kleiner im Einklang mit Ergebnissen aus den Kapiteln 5.3.4 und 5.3.5. Die phosphorylierten Proben zeigen keine signifikante Änderung der Halbkegelöffnungswinkel bei Lichtaktivierung und auch keine in Abhängigkeit von der Membran-/Mizellenumgebung. Bei Zugabe von Arrestin zu pRho_{Mem} zeigt sich jedoch deutlich, daß der Halbkegelöffnungswinkel gegenüber den Proben ohne Arrestin stark vergrößert ist, sowohl vor als auch nach Lichtanregung. Der Halbkegelöffnungswinkel von Helix 8 der unphosphorylierten Probe mit der voraktivierten Arrestin R175E Mutante ist im Vergleich zu pRho_{Mem} + Arr sehr viel kleiner.

7.2 Diskussion

Beim Übergang vom Dunkelizustand des Rhodopsins zum aktiven Meta-II Intermediat verändern sich typischerweise zwei Anisotropiesignaturen des an der Helix 8 kovalent gebundenen Fluorescein, wie im Kapitel 5.3 herausgearbeitet wurde. Die Rotationskorrelationszeit ϕ_2 wird nach Lichtaktivierung größer, ebenso die sterische Einschränkung durch die Proteinoberfläche.

Bei Lichtaktivierung von phosphoryliertem Rhodopsin kann man nur geringe Änderungen der Helix 8 Rotationsdiffusionszeit ϕ_2 beobachten. Die sonst im Meta-II Intermediat beobachteten größeren Diffusionszeiten sind nicht zu erkennen und die erhöhte sterische Einschränkung ist im phosphorylierten Meta-II Intermediat marginal. Das weist darauf hin, daß die Phosphorylierung des C-Terminus' die Interaktion mit Helix 8 verändert. Dies ist in Einklang mit Ergebnissen, die zeigen, daß die Transducinankerstelle des Rhodopsins in Meta-II durch die Phosphorylierung des Rhodopsins verändert ist und damit eine Reduktion der Bindung mit Transducin einher geht [Gibson et al., 2000, Hamer et al., 2003].

Ein Vergleich der Rotationskorrelationszeiten zeigt, daß Helix 8 nach Phosphorylierung und Bindung von Arrestin in einem Vorbindungszustand sowohl einen größeren Konformationsraum, als auch eine längere Rotationskorrelationszeit besitzt. Dies kann folgendermaßen interpretiert werden: Zuerst bindet das Arrestin mit Hilfe von elektrostatischer Interaktion an der cytoplasmatischen Oberfläche von Rhodopsin. Damit Arrestin in seine aktive Konformation übergehen kann, muß eine Salzbrücke zwischen Arg175 und Asp296 durch die Phosphate, welche sich am C-Terminus des Rhodopsins befinden, aufgebrochen werden. Damit der phosphorylierte C-Terminus sich in das

Arrestin hineinbewegen kann, wird der Konformationsraum von Helix 8 größer, um eine größere Flexibilität zu gewährleisten. Im aktivierten Arrestinzustand, der hier über die voraktivierte Arrestinmutante R175E gemessen wurde, hat Helix 8 mit der Rotationskorrelationszeit von $\tau_2 = 2.1$ ns eine schnellere Dynamik und einen geringeren Konformationsraum als im Verbindungszustand, im Einklang mit einer festen Bindung von Arrestin.

Die Ergebnisse aus den FTIR-Experimenten von Lehmann et al. [2007] deuten darauf hin, daß im aktiven Meta-II Intermediat die Helix 8 von der Umgebung durch den C-Terminus des Rhodopsins abgeschirmt und von diesen durch H-Brücken gegenüber dem Grundzustand immobilisiert wird. Die Deaktivierung von Rhodopsin wird durch die Phosphorylierung der Serine oder Threonine im C-Terminus durch die Kinase eingeleitet. Dabei verringert sich die Bindungsaffinität zum Transducin. Anschließend kann das Arrestin spezifisch binden und eine weitere Aktivierung durch Transducin verhindern [Gurevich und Benovic, 1995, Kühn und Wilden, 1982, Mendez et al., 2000]. Die Phosphorylierung des C-Terminus besitzt daher zwei Funktionen: 1. Sie läßt die hochaffine Bindung mit dem Arrestin zu. 2. Sie stört die Interaktion mit der Helix 8. Die Veränderung der Helix 8 Dynamik durch die Phosphorylierung des C-Terminus könnte dem Arrestin in der initialen Bindungsphase die Bindungsbereitschaft signalisieren.

Die relativen Fluoreszenzamplituden geben Aufschluß über die Löschung der Fluoreszenz. Die relative Amplitude des Fluoreszenzzerfalls α_3 ist das Maß für die integrale Fluoreszenzintensität. Bei allen Proben nimmt die Fluoreszenzlöschung mit Lichtaktivierung des Rezeptors ab (siehe Kapitel 5). Die phosphorylierten Membranproben zeigen eine stärkere Fluoreszenzlöschung als die Mizellenproben, was auf einen stärkeren Einfluß der Proteinmatrix und der Membran hinweist. Interessanterweise zeigt pRho_{Mem}+ Arrestin nach Lichtaktivierung eine stärkere Abnahme der Fluoreszenzlöschung als die ohne Arrestin, was auf größere Konformationsänderungen hindeutet. Damit scheint das C-terminale Ende von Rhodopsin mit Helix 8 bei der Bindung von Arrestin eine entscheidende Rolle zu spielen, wie auch Bindungsexperimente zeigen [Kirchberg et al., 2011].

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Oberflächendynamik des lichtsensitiven Sehpigments Rhodopsin unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Dabei wurde die Dynamik der Proteinsegmente mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie analysiert. Insbesondere die cytoplasmatische Rezeptoroberfläche spielt eine entscheidende Rolle bei der Rezeptoraktivität, da sich dort die Lichtaktivierung des Liganden Retinals in einer aktiven Rezeptorkonformation manifestiert, die zur Bindung des G-Proteins Transducin führt. Diese Bindung ist für die Weiterleitung des Sehpulses an das Gehirn erforderlich. Die Kinetik der Bindung von Transducin wurde ebenfalls charakterisiert. Auch die Änderungen an der cytoplasmatischen Oberfläche, die zum Stoppen der Signalweiterleitung durch die Bindung des Inhibitorproteins Arrestin führen, wurden in dieser Arbeit untersucht.

Für die Fluoreszenzexperimente wurde der Rezeptor spezifisch auf der cytoplasmatischen Proteinoberfläche an der amphiphatischen Helix 8 in Position Cys316 mit einem Fluorophor markiert. Weiterhin wurde die Bindung des G-Proteins Transducin an den Rezeptor mit Hilfe eines Peptides untersucht, welches dem C-terminalen Ende der katalytischen α -Untereinheit des Transducins entspricht. Dieses C-terminale Ende der α -Untereinheit gehört zu den drei Bindungsankern des Transducins und bindet spezifisch an den aktivierten Rezeptor. Bei der Bindung bildet dieses eine α -helikale Struktur aus. Das C-terminale Peptid hat die gleiche Eigenschaft. Die Kinetik der Bindung an das aktivierte Rhodopsin wurde deshalb über die Faltung des Peptides in die helikale Struktur verfolgt. Dazu wurde ein fluoreszenzbasierter Helix-Faltungs-Sensor entwickelt.

Da es nicht möglich war, mit üblichen zeitkorrelierten Einzelphotonenzählungen (TCSPC)-Apparaturen die zeitliche Änderung von zeitaufgelösten Fluoreszenz- und Dynamikänderungen von fluoreszenzmarkierten Proteinsegmenten während der Proteinreaktion zu untersuchen, wurde im Zuge dieser Arbeit eine multidimensionale TCSPC-Apparatur für Fluoreszenz *Pump-Probe* Messungen aufgebaut. Die Anregung der Proteinreaktion geschieht dabei mittels eines Farbstofflasers, dessen Laserpulse durch eine Faser zur Probe geleitet werden. Die Fluoreszenz wird mit Pikosekunden-Pulsen angeregt. Auf der Zeitachse der Proteinaktivierung werden dann Pikosekunden-zeitaufgelöste Fluoreszenzzerfallskurven aufgenommen, die es erlauben, die Veränderung der Nanosekunden-Oberflächendynamik zu verfolgen. Zum automatisierten Austausch der Probe wurde eine Flußzelle in den Aufbau integriert. Zur Validierung des neuen multidimensionalen TCSPC-Aufbaus wurden Testexperimente mit einer fluoresceinmarkierten Bakteriorhodopsinmutante bR-S35C-AF durchgeführt. Diese Mutante ist im Schleifenbereich zwischen Transmembranhelix 1 und 2 fluoreszenzmarkiert. Das Experiment zeigt Änderungen der zeitaufgelösten Fluoreszenzparameter in Abhängigkeit vom Photozyklus und damit eine erfolgreiche Implementierung der Fluoreszenz *Pump-Probe* Messungen mit Hilfe von multidimensionaler TCSPC.

Die Dynamik der Helix 8 von Rhodopsin wurde zuerst mit konventionellen TCSPC-Experimenten untersucht. Dazu wurden zeitaufgelöste Fluoreszenz-, bzw. Anisotropiemessungen in unterschiedlichen Rezeptorzuständen als Funktion von pH und Temperatur durchgeführt. Zu den unterschiedlichen Rezeptorzuständen gehören der inaktive Dunkelzustand, das inaktive Intermediat Meta-I, der aktive Zustand Meta-II, das Apoprotein Opsin, Rhodopsin in der Gegenwart des Transducin-Peptides $pG_T\alpha$, Rhodopsin mit phosphoryliertem C-Terminus und phosphoryliertes Rhodopsin in der Gegenwart von Arrestin. Weiterhin wurde der Einfluss der Lipidumgebung

durch vergleichende Messungen in nativen Membranen und in Rhodopsin-Detergenz-Mizellen untersucht. Die pH- und Temperaturabhängigkeit der Dynamik der cytoplasmatischen Rezeptoroberfläche wurde mit der pH- und Temperaturabhängigkeit des Meta-I/-II Gleichgewichts aus Absorptionmessungen verglichen. Da sich die Reaktionskinetik für den Übergang in das aktive Meta-II-Intermediat bei niedrigen Temperaturen von dem bei physiologischer Temperatur unterscheidet, wurden insbesondere die Fluoreszenzmessungen bei 0°C und 37°C durchgeführt.

Da der verwendete Fluorophor Fluorescein gleichzeitig ein pH-Indikator ist, ist sein Absorptionsverhalten im Bereich von pH 5 bis pH 9 durch die pH-abhängige Absorptionsbande bei ca. 490nm geprägt. Die Fluoreszenzparameter sind stark durch die Polarität der Umgebung beeinflusst und können im Kontext der einzelnen pH-Reihen mit der aktiven Oberflächenkonformation korreliert werden. Der monoexponentielle pH-abhängige Fluoreszenzzerfall von Fluorescein wird multiexponentiell nach der Kopplung an die Rezeptoroberfläche. Zwei schnelle Fluoreszenzzerfallszeiten deuten auf Quenchingprozesse hin, die hauptsächlich durch die Membrenumgebung beeinflusst sind. Die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer in freiem Fluorescein wird an der Proteinoberfläche durch Polaritätseffekte unterdrückt. Speziell im lichtaktivierten Meta-II-Zustand machen sich die Polaritätseffekte durch eine längere Fluoreszenzlebensdauer bemerkbar. Daraus lässt sich eine Korrelation zwischen den Fluoreszenzlebensdauern bzw. der mittleren Lebensdauer und dem Meta-II-Zustand ableiten. Bei 0°C korreliert die pH-Abhängigkeit der mittleren Lebensdauer mit der pH-Abhängigkeit des Meta-I/Meta-II Gleichgewichts. Bei 37°C zeigt sich, dass die pH-Abhängigkeit der Ausbildung einer Meta-II-Spezies, die unabhängig von der Protonierung von Glu134 gebildet wird, ebenfalls mit einer Veränderung der Oberflächeneigenschaften des Rezeptors verbunden ist. Bei solubilisiertem Rhodopsin in Detergenz-Mizellen ist keine pH-Abhängigkeit zu verzeichnen, jedoch steigt die mittlere Lebensdauer auf 4.6 ns im Meta-II-Zustand an. Dieser Anstieg ist signifikant gegenüber dem Wert im inaktiven Dunkelzustand mit 3.3 ns. Diese Eigenschaften des gebundenen Fluoresceins können z.B. ausgenutzt werden, um die Ausbildung einer aktiven Rezeptoroberfläche in Rhodopsinmutanten zu testen, die hauptsächlich in Mizellen untersucht werden.

Mit Hilfe der Fluoreszenzanisotropieparameter konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen der Ausbildung von Meta-II und der aktiven Oberflächenkonformation abgeleitet werden. Insbesondere eine Verlangsamung der Helix 8-Dynamik und die Erhöhung der sterischen Einschränkung durch die Proteinoberfläche sind charakteristische Signaturen im aktiven Meta-II-Intermediat.

Über eine Analyse der Fluoreszenzanisotropiekurven mit Hilfe der Ordnungsparameter $\langle P_2 \rangle$ und $\langle P_4 \rangle$ konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem Bewegungsmodell von Helix 8 und dem Rezeptorzustand ermittelt werden. Im aktiven Meta-II-Zustand in nativen Membranen bewegt sich der fluoreszierende Sensor im Konformationsraum des Kegelpotentials. Im inaktiven Vorläuferintermediat Meta-I bewegt sich der fluoreszierende Sensor dagegen innerhalb des Gaußpotentials, was auf eine weichere, flexiblere Membran-/Proteinumgebung schließen lässt. Bei tiefen Temperaturen im inaktiven Dunkelzustand ändert sich das Bewegungspotential im Einklang mit dem *alkaline unlock* von Helix 8 vom Gaußmodell bei saurem pH zum Kegelmodell bei alkalischem pH. Bei physiologischer Temperatur bewegt sich Helix 8 im inaktiven Dunkelzustand im Kegelmodell. Daraus lässt sich eindeutig schließen, daß zwei fundamental verschiedene Bewegungsmoden von Helix 8 vorliegen, die mit der Temperaturabhängigkeit des Übergangs zum aktiven Meta-II-Intermediat korreliert sind. Interessanterweise folgt die Dynamik von Helix 8 in Mizellen einem völlig anderen Bewegungsmodell - dem λ_4 -Potential. Die Verteilungsfunktion dieses Potentials ist durch zwei Maxima gekennzeichnet und deutet damit auf eine heterogene Dynamik mit zwei Subpopulationen von Helix 8-Konformationen hin. Eine heterogene Dynamik von Helix 8 in Rhodopsin-Mizellen kann u.a. der Grund sein, dass Arrestin nicht an Rhodopsin- β -DM-Mizellen bindet.

In der Arbeit wurden ebenfalls zeitaufgelöste Anisotropiemessungen an phosphoryliertem Rhodopsin, mit und ohne Arrestin, durchgeführt. Der Fluoreszenzmarker an Helix 8 der phosphorylierten Proben besitzt stark unterschiedliche Fluoreszenz- und Anisotropieeigenschaften im Vergleich zu den unphosphorylierten Proben. Während bei den unphosphorylierten Proben nach Lichtaktivierung eine Erhöhung der sterischen Einschränkung der Helix 8 aufgrund der Interaktion mit dem C-Terminus des Rhodopsins zu beobachten ist, ist bei phosphoryliertem Rhodopsin weder in Mizellen noch in nativen Membranen ein Unterschied zu beobachten. Das deutet darauf hin, daß die zuvor beobachtete Interaktion aufgrund der phosphorylierten Aminosäuren im C-Terminus verändert ist. Die Bindung von Arrestin zum phosphorylierten Rhodopsin ist ein mehrstufiger Prozess, der aus einem Vorbindungskomplex, der Arrestin-Aktivierung und der daraus folgenden hochaffinen Bindung des Arrestins besteht. Um die Dynamik in diesen Bindungsschritten zu untersuchen, wurde zuerst die Anisotropie von phosphoryliertem Rhodopsin in Gegenwart von Wildtyp Arrestin gemessen. Es konnte gezeigt werden, daß der erste Schritt der Arrestinbindung durch eine verlangsamte Dynamik und einen vergrößerten Konformationsraum der Helix 8 von Rhodopsin charakterisiert ist, aber durch den gekoppelten Farbstoff die Aktivierung des Arrestins und damit die hochaffine Bindung verhindert wird [Kirchberg et al., 2011]. Die voraktivierte Arrestin-R175E-Mutante kann dagegen trotz des an Cys316 gebundenen Fluoresceins an aktiviertes Rhodopsin binden [Kirchberg et al., 2011]. Die Dynamik von Helix 8 wird in diesem Zustand schnell und auch der Konformationsraum ist verglichen mit dem Vorbindungszustand kleiner. Es konnte somit eine aktive Rolle der Helix 8 bei der Bindung des Arrestins nachgewiesen werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt in dieser Arbeit war die Untersuchung der Interaktion von Rhodopsin mit dem G-Protein Transducin, bzw. dem C-terminalen Anker der α -Untereinheit. Das C-terminale Transducinpeptid besitzt im ungebundenen Zustand eine ungeordnete Struktur; nach Bindung an das lichtaktivierte Rhodopsin wird seine Sekundärstruktur α -helikal. Um diese Helixbildung während der Bindung an das lichtaktivierte Rhodopsin zu untersuchen, wurde ein fluoreszenzbasierter Helix-Faltungssensor entwickelt. Der hier eingeführte Helixfaltungssensor pG α – LY besitzt eine Aminosäuresequenz, welche einem hochaffinen C-terminalen Transducin Peptid ähnelt. Die wichtigen Modifikationen beinhalten ein Tryptophan und ein Cystein, welches mit *Lucifer Yellow* fluoreszenzmarkiert ist. Dieser Faltungssensor wurde spektroskopisch charakterisiert und seine Bindungsaffinität mit Hilfe des Extra-Meta-II-Assays bestimmt. Die Kinetik der Bindung des C-terminalen Transducinpeptides an das lichtaktivierte Rhodopsin wurde über die Helixfaltung mit Hilfe des Helixfaltungssensors pG α – LY durch Fluoreszenz-*Pump-Probe*-Messungen bestimmt. Die Messungen wurden sowohl an Rhodopsin in Mizellen und in Rhodopsinmembranen durchgeführt. Die Analyse der zeitaufgelösten Fluoreszenz zeigte in Mizellen und Membranen, daß zusätzlich zum Fluoreszenzzerfall des *Lucifer Yellows* mit $\tau_2 \approx 7$ ns eine schnelle Zerfallskomponente von $\tau_1 = 20$ ps existiert. Wir interpretieren diese schnelle Zerfallskomponente als Charakteristikum für eine initiale Interaktion zwischen Rhodopsin und Transducin, die dem aktiven Bindungszustand vorausgeht. Daraus ergibt sich das Modell eines zweistufigen Bindungsprozesses des Transducinankers an das lichtaktivierte Rhodopsin: 1. Nach Lichtaktivierung, in einem inaktiven Vorläuferintermediat, wird ein Vorkomplex zwischen Rhodopsin und dem C-terminalen Peptid der G α -Untereinheit gebildet, welcher durch die schnelle Fluoreszenzzerfallskomponente charakterisiert ist. 2. Die durch die Deprotonierung der Schiffschenschen Base an Lys296 induzierte Konformationsänderung der cytoplasmatischen Oberfläche erzeugt in einem Unter-Intermediatzustand von Meta-II die Bindungstasche für den Proteinanker Transducin, deren Umgebung dann die Helixfaltung des Peptids induziert.

Weiterhin wurde das C-terminale Transducin-Peptid genutzt (pG α – Atto647N), um mit Hilfe von TIRF-Mikroskopie die Diffusion von lichtaktivierten Rhodopsinmolekülen in nativen Diskmembranfragmenten zu untersuchen. Diese zeigen ein heterogenes Diffusionsverhalten. Ein Teil der Moleküle besitzt eine sehr kleine Diffusionskonstante nahe der Detektionsgenauigkeit

des Systems. Diese ändert sich zu größeren Zeitskalen von eingeschränkt zu freier Diffusion. Dies weist darauf hin, daß ein Teil der Moleküle sich in Oligomeren organisiert und langsam über die Diskmembran diffundieren. Der andere Teil der Moleküle besitzt eine höhere Mobilität mit eingeschränkter Diffusion. Daraus schließen wir, daß sich dieser Teil der Rezeptoren in kleineren Einheiten (Mono- oder Dimere) in ungeordneteren Bereichen der Diskmembran bewegen kann. Damit zeigen unsere Ergebnisse im Gegensatz zu früheren Veröffentlichungen, dass keine freie Diffusion von lichtaktivierten Rhodopsinen existiert, sondern ein heterogenes Verhalten vorherrscht, welches mit einer Diffusion in Mikrodomänen einhergeht und auf eine semigeordnete Packung der Rhodopsine in den Diskmembranen hinweist, die nach Lichtanregung teilweise aufgelöst wird.

Es konnte somit in dieser Arbeit erfolgreich

1. die dynamischen Oberflächenkonformationen von Rhodopsin charakterisiert werden,
2. eine Korrelation mit Rezeptorzuständen hergestellt werden,
3. die physikalischen Bewegungsmodelle von Helix 8 in den einzelnen Rezeptorzuständen identifiziert werden,
4. die helikale Faltung des C-terminalen Transducin-Peptids bei seiner Bindung auf der Zeitachse der Rezeptoraktivierung mit Hilfe von Fluoreszenz-*Pump-Probe*-Messungen verfolgt werden und
5. die laterale Diffusion von aktiviertem Rhodopsin in Einzelmolekül-TIRF-Mikroskopiemessungen verfolgt werden.

Publikationsliste

Aus dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

Picosecond multidimensional fluorescence spectroscopy: a tool to measure real-time protein dynamics during function.

Kim TY, Winkler K, Alexiev U

Photochem Photobiol. 2007 Mar-Apr ; 83(2): 378-84

Dissection of environmental changes at the cytoplasmic surface of light-activated Bakteriorhodopsin and visual rhodopsin: sequence of spectrally silent steps.

Kim TY, Möller M, Winkler K, Kirchberg K, Alexiev U

Photochem Photobiol. 2009 Mar-Apr ; 85(2): 570-7

Monitoring the interaction of a single G-protein key binding site with rhodopsin disk membranes upon light activation.

Kim TY, Uji-i H, Möller M, Muls B, Hofkens J, Alexiev U

Biochemistry. 2009 May 12; 48(18): 3801-3

Functional interaction structures of the photochromic retinal protein rhodopsin.

Kirchberg K, Kim TY, Haase S, Alexiev U

Photochem Photobiol Sci. 2010 Feb ; 9(2): 226-33

Characterization of membrane protein non-native states. 2. The SDS-unfolded states of rhodopsin.

Dutta A, Kim TY, Möller M, Wu J, Alexiev U, Klein-Seetharaman J

Biochemistry. 2010 Aug 3; 49(30): 6329-40

Activation and molecular recognition of the GPCR rhodopsin - Insights from time-resolved fluorescence depolarisation and single molecule experiments.

Kim TY, Schlieter T, Haase S, Alexiev U

Eur J Cell Biol, 2011, 91, 300 - 310

Conformational dynamics of helix 8 in the GPCR rhodopsin controls arrestin activation in the desensitization process.

Kirchberg K, Kim TY, Möller M, Skegrod D, Dasara Raju G, Granzin J, Büldt G, Schlesinger R, Alexiev U

Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Nov 15; 108(46): 18690-5

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic Force Microscopy - Rasterkraftmikroskopie
ATP	Adenosintriphosphat
bR	Bakteriorhodopsin
BSI	Blue-shifted Intermediate
CD	circular dichroism - Zirkulardichroismus
DM	n-Dodecyl β -D-maltoside
EPR	electron paramagnetic resonance - Elektronenspinresonanz
GPCR	G-Protein coupled Receptor - G-Protein gekoppelter Rezeptor
H8	Helix 8
IA	Iodoaccedamid
IAF	Iodoaccedamidofluorescein
LY	lucifer yellow Farbstoff
MRW	mean residue weight - mittleres Gewicht einer Aminosäure (Dalton)
MSD	mean square displacement - mittleres Verschiebungsquadrat
NA	Numerische Apertur
NMR	nuclear magnetic resonance - Kernspinresonanz
PBS	phosphate buffered saline - Phosphatgepufferte Salzlösung
PSB	protonierte Schiffsche Base
ROS	Rod outer segments
SDS	Natriumdodecylsulfat - sodium dodecyl sulfate
SNR	Signal to Noise Ratio
SPT	Single Particle Tracking - Einzelmolekülverfolgung
TCSPC	time correlated single photon counting - Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung
TIRFM	Total Internal Reflection Microscopy - Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie

Literaturverzeichnis

- Alexander N., Bortolus M., Al-Mestarihi A., Mchaourab H., und Meiler J. *De novo high-resolution protein structure determination from sparse spin-labeling EPR data*. *Structure*, 16(2):181–195, Feb 2008. doi: 10.1016/j.str.2007.11.015. (Zitiert auf Seite 28.)
- Alexiev U. *Protonenbewegung und Oberflächenpotentialänderungen während des Photozyklus der membranständigen Protonenpumpe Bacteriorhodopsin*. Doktorarbeit, Freie Universität Berlin, 1994. (Zitiert auf den Seiten 73, 78, and 88.)
- Alexiev U., Marti T., Heyn M. P., Khorana H. G., und Scherrer P. *Covalently bound pH-indicator dyes at selected extracellular or cytoplasmic sites in bacteriorhodopsin. 2. Rotational orientation of helices D and E and kinetic correlation between M formation and proton release in bacteriorhodopsin micelles*. *Biochemistry*, 33(46):13693–13699, Nov 1994. (Zitiert auf Seite 73.)
- Alexiev U., Mollaaghababa R., Scherrer P., Khorana H. G., und Heyn M. P. *Rapid long-range proton diffusion along the surface of the purple membrane and delayed proton transfer into the bulk*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(2):372–376, Jan 1995. (Zitiert auf Seite 42.)
- Alexiev U., Rimke I., und Pöhlmann T. *Elucidation of the nature of the conformational changes of the EF-interhelical loop in bacteriorhodopsin and of the helix VIII on the cytoplasmic surface of bovine rhodopsin: a time-resolved fluorescence depolarization study*. *J Mol Biol*, 328(3):705–719, May 2003. (Zitiert auf den Seiten 10, 20, 42, 46, 47, 58, 59, 62, 67, 68, 86, 90, 91, 97, 100, 105, and 107.)
- Altenbach C., Kusnetzow A. K., Ernst O. P., Hofmann K. P., und Hubbell W. L. *High-resolution distance mapping in rhodopsin reveals the pattern of helix movement due to activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(21):7439–7444, May 2008. doi: 10.1073/pnas.0802515105. (Zitiert auf Seite 90.)
- Alves I. D., Salgado G. F., Salamon Z., Brown M. F., Tollin G., und Hruby V. J. *Phosphatidylethanolamine enhances rhodopsin photoactivation and transducin binding in a solid supported lipid bilayer as determined using plasmon-waveguide resonance spectroscopy*. *Biophys J*, 88(1):198–210, Jan 2005. doi: 10.1529/biophysj.104.046722. (Zitiert auf Seite 109.)
- Ameloot M., Hendrickx H., Herreman W., Pottel H., Van Cauwelaert F., und van der Meer W. *Effect of orientational order on the decay of the fluorescence anisotropy in membrane suspensions. Experimental verification on unilamellar vesicles and lipid/alpha-lactalbumin complexes*. *Biophys J*, 46(4):525–539, Oct 1984. doi: 10.1016/S0006-3495(84)84050-3. (Zitiert auf Seite 106.)
- Anderson C. M., Georgiou G. N., Morrison I. E., Stevenson G. V., und Cherry R. J. *Tracking of cell surface receptors by fluorescence digital imaging microscopy using a charge-coupled device camera. Low-density lipoprotein and influenza virus receptor mobility at 4 degrees C*. *J Cell Sci*, 101 (Pt 2): 415–425, Feb 1992. (Zitiert auf Seite 56.)
- Applebury M. L., Zuckerman D. M., Lamola A. A., und Jovin T. M. *Rhodopsin. Purification and recombination with phospholipids assayed by the metarhodopsin I leads to metarhodopsin II transition*. *Biochemistry*, 13(17):3448–3458, Aug 1974. (Zitiert auf Seite 87.)
- Arniss S. und Hofmann K. P. *Two different forms of metarhodopsin II: Schiff base deprotonation precedes proton uptake and signaling state*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(16):7849–7853, Aug 1993. (Zitiert auf den Seiten 121 and 131.)

- Arnis S., Fahmy K., Hofmann K. P., und Sakmar T. P. *A conserved carboxylic acid group mediates light-dependent proton uptake and signaling by rhodopsin.* J Biol Chem, 269(39):23879–23881, Sep 1994. (Zitiert auf Seite 18.)
- Bartl F. J. und Vogel R. *Structural and functional properties of metarhodopsin III: recent spectroscopic studies on deactivation pathways of rhodopsin.* Phys Chem Chem Phys, 9(14):1648–1658, Apr 2007. doi: 10.1039/b616365c. (Zitiert auf Seite 22.)
- Bennett N., Michel-Villaz M., und Kühn H. *Light-induced interaction between rhodopsin and the GTP-binding protein. Metarhodopsin II is the major photoproduct involved.* Eur J Biochem, 127(1): 97–103, Sep 1982. (Zitiert auf Seite 127.)
- Bieri O., Wirz J., Hellrung B., Schutkowski M., Drewello M., und Kiefhaber T. *The speed limit for protein folding measured by triplet-triplet energy transfer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 96(17):9597–9601, Aug 1999. (Zitiert auf den Seiten 10 and 32.)
- Bigay J., Faurobert E., Franco M., und Chabre M. *Roles of lipid modifications of transducin subunits in their GDP-dependent association and membrane binding.* Biochemistry, 33(47):14081–14090, Nov 1994. (Zitiert auf Seite 22.)
- Boesze-Battaglia K. und Schimmel R. *Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets.* J Exp Biol, 200(Pt 23):2927–2936, Dec 1997. (Zitiert auf Seite 16.)
- Brown L. S., Needleman R., und Lanyi J. K. *Conformational change of the E-F interhelical loop in the M photointermediate of bacteriorhodopsin.* J Mol Biol, 317(3):471–478, Mar 2002. doi: 10.1006/jmbi.2002.5428. (Zitiert auf Seite 10.)
- Brunner M. *Spektroskopische Eigenschaften kovalent an Glas gebundener Fluoreszenzfarbstoffe und farbstoffmarkierter Peptide.* Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2002. (Zitiert auf Seite 32.)
- Cai K., Klein-Seetharaman J., Hwa J., Hubbell W. L., und Khorana H. G. *Structure and function in rhodopsin: effects of disulfide cross-links in the cytoplasmic face of rhodopsin on transducin activation and phosphorylation by rhodopsin kinase.* Biochemistry, 38(39):12893–12898, Sep 1999. (Zitiert auf Seite 10.)
- Cemazar M. und Craik D. J. *NMR and Structural Genomics in the Pharmaceutical Sciences.* In Webb G. A., editor, *Modern Magnetic Resonance*, pages 1429–1434. Springer Netherlands, 2006. ISBN 978-1-4020-3910-2. (Zitiert auf Seite 27.)
- Chandrasekhar S. *Stochastic Problems in Physics and Astronomy.* Reviews of Modern Physics, 15(1): 1+, January 1943. doi: <http://dx.doi.org/10.1103/RevModPhys.15.1>. (Zitiert auf Seite 56.)
- Choe H. W., Kim Y. J., Park J. H., Morizumi T., Pai E. F., Krauß N., Hofmann K. P., Scheerer P., und Ernst O. P. *Crystal structure of metarhodopsin II.* Nature, 471(7340):651–655, Mar 2011. doi: 10.1038/nature09789. (Zitiert auf den Seiten 17, 18, 88, 90, and 130.)
- Cohen G. B., Yang T., Robinson P. R., und Oprian D. D. *Constitutive activation of opsin: influence of charge at position 134 and size at position 296.* Biochemistry, 32(23):6111–6115, Jun 1993. (Zitiert auf den Seiten 116 and 130.)
- Corley S. C., Sprangers P., und Albert A. D. *The bilayer enhances rhodopsin kinetic stability in bovine rod outer segment disk membranes.* Biophys J, 100(12):2946–2954, Jun 2011. doi: 10.1016/j.bpj.2011.05.015. (Zitiert auf Seite 86.)

- Crocker E., Eilers M., Ahuja S., Hornak V., Hirshfeld A., Sheves M., und Smith S. O. *Location of Trp265 in metarhodopsin II: implications for the activation mechanism of the visual receptor rhodopsin*. J Mol Biol, 357(1):163–172, Mar 2006. doi: 10.1016/j.jmb.2005.12.046. (Zitiert auf Seite 10.)
- Daemen F., Grip W. D., und Jansen P. *Biochemical aspects of the visual process XX. The molecular weight of rhodopsin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure, 271(2):419 – 428, 1972. ISSN 0005-2795. doi: 10.1016/0005-2795(72)90217-6. (Zitiert auf Seite 20.)
- DeGrip W. und Bovee-Geurts P. *Synthesis and properties of alkylglucosides with mild detergent action: Improved synthesis and purification of β -1-octyl-, -nonyl-, and -decyl-glucose. Synthesis of β -1-undecylglucose and β -1-dodecylmaltose*. Chemistry and Physics of Lipids, 23:321–335, 1979. doi: 10.1016/0009-3084(79)90010-0. (Zitiert auf Seite 87.)
- Dell'Orco D. und Schmidt H. *Mesosopic Monte Carlo simulations of stochastic encounters between photoactivated rhodopsin and transducin in disc membranes*. J Phys Chem B, 112(14):4419–4426, Apr 2008. doi: 10.1021/jp709963f. (Zitiert auf Seite 132.)
- Dexter D. L. *A Theory of Sensitized Luminescence in Solids*. The Journal of Chemical Physics, 21(5): 836–850, 1953. doi: 10.1063/1.1699044. (Zitiert auf Seite 32.)
- Dratz E. A., Furstenau J. E., Lambert C. G., Thireault D. L., Rarick H., Schepers T., Pakhlevaniants S., und Hamm H. E. *NMR structure of a receptor-bound G-protein peptide*. Nature, 363(6426): 276–281, May 1993. doi: 10.1038/363276a0. (Zitiert auf Seite 131.)
- Dunham T. D. und Farrens D. L. *Conformational changes in rhodopsin. Movement of helix f detected by site-specific chemical labeling and fluorescence spectroscopy*. J Biol Chem, 274(3):1683–1690, Jan 1999. (Zitiert auf Seite 10.)
- Dutta A., Kim T. Y., Moeller M., Wu J., Alexiev U., und Klein-Seetharaman J. *Characterization of membrane protein non-native states. 2. The SDS-unfolded states of rhodopsin*. Biochemistry, 49(30): 6329–6340, Aug 2010. doi: 10.1021/bi100339x. (Zitiert auf Seite 95.)
- Eaton W. A., Muñoz V., Hagen S. J., Jas G. S., Lapidus L. J., Henry E. R., und Hofrichter J. *Fast kinetics and mechanisms in protein folding*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 29:327–359, 2000. doi: 10.1146/annurev.biophys.29.1.327. (Zitiert auf Seite 131.)
- Eggeling C., Ringemann C., Medda R., Schwarzmann G., Sandhoff K., Polyakova S., Belov V. N., Hein B., von Middendorff C., Schönle A., und Hell S. W. *Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell*. Nature, 457(7233):1159–1162, Feb 2009. doi: 10.1038/nature07596. (Zitiert auf Seite 41.)
- Elmgren H. *The fluorescence lifetime of free and conjugated fluorescein in various environments*. Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition, 18(12):815–822, 1980. ISSN 1543-0472. doi: 10.1002/pol.1980.130181212. (Zitiert auf Seite 88.)
- Emeis D. und Hofmann K. P. *Shift in the relation between flash-induced metarhodopsin I and metarhodopsin II within the first 10 membranes*. FEBS Lett, 136(2):201–207, Dec 1981. (Zitiert auf den Seiten 109 and 123.)
- Engel F. *Zeitaufgelöste optische Spektroskopie an Bacteriorhodopsin*. Master's thesis, Freie Universität Berlin, 1989. (Zitiert auf Seite 35.)
- Ernst O. P., Meyer C. K., Marin E. P., Henklein P., Fu W. Y., Sakmar T. P., und Hofmann K. P. *Mutation of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin affects binding of transducin and peptides derived from the carboxyl-terminal sequences of transducin alpha and gamma subunits*. J Biol Chem, 275(3): 1937–1943, Jan 2000. (Zitiert auf den Seiten 10 and 67.)

- Farrens D. L., Altenbach C., Yang K., Hubbell W. L., und Khorana H. G. *Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin*. *Science*, 274(5288):768–770, Nov 1996. (Zitiert auf Seite 10.)
- Filipek S. *Organization of rhodopsin molecules in native membranes of rod cells—an old theoretical model compared to new experimental data*. *J Mol Model*, 11(4-5):385–391, Sep 2005. doi: 10.1007/s00894-005-0268-3. (Zitiert auf Seite 43.)
- Fitter J., Ernst O. P., Hauss T., Lechner R. E., Hofmann K. P., und Dencher N. A. *Molecular motions and hydration of purple membranes and disk membranes studied by neutron scattering*. *Eur Biophys J*, 27(6):638–645, 1998. (Zitiert auf Seite 126.)
- Förster T. *Elektrolytische Dissoziation angeregter Moleküle*. *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie*, 54(1):42–46, 1950. ISSN 0005-9021. doi: 10.1002/bbpc.19500540111. (Zitiert auf den Seiten 70 and 88.)
- Fotiadis D., Liang Y., Filipek S., Saperstein D. A., Engel A., und Palczewski K. *Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes*. *Nature*, 421(6919):127–128, Jan 2003. doi: 10.1038/421127a. (Zitiert auf den Seiten 15, 16, 42, 96, and 132.)
- Fritze O., Filipek S., Kuksa V., Palczewski K., Hofmann K. P., und Ernst O. P. *Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(5):2290–2295, Mar 2003. doi: 10.1073/pnas.0435715100. (Zitiert auf den Seiten 19 and 90.)
- Fukada Y., Takao T., Ohguro H., Yoshizawa T., Akino T., und Shimonishi Y. *Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding*. *Nature*, 346(6285):658–660, Aug 1990. doi: 10.1038/346658a0. (Zitiert auf Seite 22.)
- Fürstenberg A. und Vauthey E. *Excited-state dynamics of the fluorescent probe Lucifer Yellow in liquid solutions and in heterogeneous media*. *Photochem Photobiol Sci*, 4(3):260–267, Mar 2005. doi: 10.1039/b418188c. (Zitiert auf Seite 111.)
- Ganter U. M., Schmid E. D., Perez-Sala D., Rando R. R., und Siebert F. *Removal of the 9-methyl group of retinal inhibits signal transduction in the visual process. A Fourier transform infrared and biochemical investigation*. *Biochemistry*, 28(14):5954–5962, Jul 1989. (Zitiert auf Seite 21.)
- Ganter U. M., Gärtner W., und Siebert F. *The influence of the 13-methyl group of the retinal on the photoreaction of rhodopsin revealed by FTIR difference spectroscopy*. *European Biophysics Journal*, 18(5):295–299, Jun 1990. doi: 10.1007/BF00188042. (Zitiert auf Seite 21.)
- Gerwert K., Hess B., Soppa J., und Oesterhelt D. *Role of aspartate-96 in proton translocation by bacteriorhodopsin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(13):4943–4947, Jul 1989. (Zitiert auf Seite 27.)
- Gerwert K., Souvignier G., und Hess B. *Simultaneous monitoring of light-induced changes in protein side-group protonation, chromophore isomerization, and backbone motion of bacteriorhodopsin by time-resolved Fourier-transform infrared spectroscopy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(24):9774–9778, Dec 1990. (Zitiert auf Seite 27.)
- Gibson S. K., Parkes J. H., und Liebman P. A. *Phosphorylation modulates the affinity of light-activated rhodopsin for G protein and arrestin*. *Biochemistry*, 39(19):5738–5749, May 2000. (Zitiert auf Seite 137.)
- Granzin J., Wilden U., Choe H. W., Labahn J., Krafft B., und Büldt G. *X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments*. *Nature*, 391(6670):918–921, Feb 1998. doi: 10.1038/36147. (Zitiert auf Seite 24.)

- Gray-Keller M. P., Detwiler P. B., Benovic J. L., und Gurevich V. V. *Arrestin with a single amino acid substitution quenches light-activated rhodopsin in a phosphorylation-independent fashion*. *Biochemistry*, 36(23):7058–7063, Jun 1997. doi: 10.1021/bi963110k. (Zitiert auf Seite 133.)
- Gurevich V. V. und Benovic J. L. *Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin*. *J Biol Chem*, 268(16): 11628–11638, Jun 1993. (Zitiert auf Seite 24.)
- Gurevich V. V. und Benovic J. L. *Visual arrestin binding to rhodopsin. Diverse functional roles of positively charged residues within the phosphorylation-recognition region of arrestin*. *J Biol Chem*, 270 (11):6010–6016, Mar 1995. (Zitiert auf den Seiten 24 and 138.)
- Hamer R. D., Nicholas S. C., Tranchina D., Liebman P. A., und Lamb T. D. *Multiple steps of phosphorylation of activated rhodopsin can account for the reproducibility of vertebrate rod single-photon responses*. *J Gen Physiol*, 122(4):419–444, Oct 2003. doi: 10.1085/jgp.200308832. (Zitiert auf Seite 137.)
- Hamm H. E., Deretic D., Arendt A., Hargrave P. A., Koenig B., und Hofmann K. P. *Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit*. *Science*, 241(4867): 832–835, Aug 1988. (Zitiert auf Seite 110.)
- Henderson R. und Unwin P. N. *Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy*. *Nature*, 257(5521):28–32, Sep 1975. (Zitiert auf Seite 24.)
- Herbst J., Heyne K., und Diller R. *Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization*. *Science*, 297(5582):822–825, Aug 2002. doi: 10.1126/science.1072144. (Zitiert auf Seite 10.)
- Herrmann R., Heck M., Henklein P., Henklein P., Kleuss C., Hofmann K. P., und Ernst O. P. *Sequence of interactions in receptor-G protein coupling*. *J Biol Chem*, 279(23):24283–24290, Jun 2004. doi: 10.1074/jbc.M311166200. (Zitiert auf den Seiten 127 and 132.)
- Hessel E., Müller P., Herrmann A., und Hofmann K. P. *Light-induced reorganization of phospholipids in rod disc membranes*. *J Biol Chem*, 276(4):2538–2543, Jan 2001. doi: 10.1074/jbc.M009061200. (Zitiert auf Seite 16.)
- Heyn M. P. *Determination of lipid order parameters and rotational correlation times from fluorescence depolarization experiments*. *FEBS Lett*, 108(2):359–364, Dec 1979. (Zitiert auf Seite 50.)
- Hirsch J. A., Schubert C., Gurevich V. V., und Sigler P. B. *The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation*. *Cell*, 97(2):257–269, Apr 1999. (Zitiert auf Seite 24.)
- Hofmann K. P., Scheerer P., Hildebrand P. W., Choe H. W., Park J. H., Heck M., und Ernst O. P. *A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model*. *Trends Biochem Sci*, 34(11):540–552, Nov 2009. doi: 10.1016/j.tibs.2009.07.005. (Zitiert auf Seite 90.)
- Hopp T. P. und Woods K. R. *Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(6):3824–3828, Jun 1981. (Zitiert auf Seite 114.)
- Imamoto Y., Kataoka M., Tokunaga F., und Palczewski K. *Light-induced conformational changes of rhodopsin probed by fluorescent alexa594 immobilized on the cytoplasmic surface*. *Biochemistry*, 39(49): 15225–15233, Dec 2000. (Zitiert auf Seite 10.)
- Itoh Y., Cai K., und Khorana H. G. *Mapping of contact sites in complex formation between light-activated rhodopsin and transducin by covalent crosslinking: use of a chemically preactivated reagent*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(9):4883–4887, Apr 2001. doi: 10.1073/pnas.051632998. (Zitiert auf Seite 10.)

- Jäger S., Lewis J. W., Zvyaga T. A., Szundi I., Sakmar T. P., und Kliger D. S. *Chromophore structural changes in rhodopsin from nanoseconds to microseconds following pigment photolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(16):8557–8562, Aug 1997. (Zitiert auf Seite 21.)
- Kahlert M. und Hofmann K. P. *Reaction rate and collisional efficiency of the rhodopsin-transducin system in intact retinal rods*. Biophys J, 59(2):375–386, Feb 1991. doi: 10.1016/S0006-3495(91)82231-7. (Zitiert auf Seite 117.)
- Karnik S. S. und Khorana H. G. *Assembly of functional rhodopsin requires a disulfide bond between cysteine residues 110 and 187*. J Biol Chem, 265(29):17520–17524, Oct 1990. (Zitiert auf Seite 17.)
- Khorana H. G., Gerber G. E., Herlihy W. C., Gray C. P., Anderegg R. J., Nihei K., und Biemann K. *Amino acid sequence of bacteriorhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 76(10):5046–5050, Oct 1979. (Zitiert auf Seite 24.)
- Kim J. E., Tauber M. J., und Mathies R. A. *Wavelength dependent cis-trans isomerization in vision*. Biochemistry, 40(46):13774–13778, Nov 2001. (Zitiert auf Seite 16.)
- Kim T. Y., Moeller M., Winkler K., Kirchberg K., und Alexiev U. *Dissection of environmental changes at the cytoplasmic surface of light-activated bacteriorhodopsin and visual rhodopsin: sequence of spectrally silent steps*. Photochem Photobiol, 85(2):570–577, Mar-Apr 2009. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00525.x. (Zitiert auf den Seiten 10 and 118.)
- Kinosita K., Kawato S., und Ikegami A. *A theory of fluorescence polarization decay in membranes*. Biophys J, 20(3):289–305, Dec 1977. doi: 10.1016/S0006-3495(77)85550-1. (Zitiert auf Seite 49.)
- Kirchberg K., Kim T. Y., Möller M., Skegrod D., Dasara Raju G., Granzin J., Büldt G., Schlesinger R., und Alexiev U. *Conformational dynamics of helix 8 in the GPCR rhodopsin controls arrestin activation in the desensitization process*. Proc Natl Acad Sci U S A, 108(46):18690–18695, Nov 2011. doi: 10.1073/pnas.1015461108. (Zitiert auf den Seiten 112, 137, 138, and 141.)
- Kisselev O. G., Meyer C. K., Heck M., Ernst O. P., und Hofmann K. P. *Signal transfer from rhodopsin to the G-protein: evidence for a two-site sequential fit mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(9):4898–4903, Apr 1999. (Zitiert auf Seite 127.)
- Klare J. P. und Steinhoff H. J. *Spin labeling EPR*. Photosynth Res, Aug 2009. doi: 10.1007/s11120-009-9490-7. (Zitiert auf Seite 28.)
- Klare J. P., Bordignon E., Engelhard M., und Steinhoff H. J. *Sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin: light activated helix F movement*. Photochem Photobiol Sci, 3(6):543–547, Jun 2004. doi: 10.1039/b402656j. (Zitiert auf Seite 10.)
- Klein-Seetharaman J., Getmanova E. V., Loewen M. C., Reeves P. J., und Khorana H. G. *NMR spectroscopy in studies of light-induced structural changes in mammalian rhodopsin: applicability of solution (19)F NMR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(24):13744–13749, Nov 1999. (Zitiert auf Seite 10.)
- Knepp A. M., Periolo X., Marrink S. J., Sakmar T. P., und Huber T. *Rhodopsin forms a dimer with cytoplasmic helix 8 contacts in native membranes*. Biochemistry, 51(9):1819–1821, Mar 2012. doi: 10.1021/bi3001598. (Zitiert auf den Seiten 88 and 96.)
- Knierim B., Hofmann K. P., Ernst O. P., und Hubbell W. L. *Sequence of late molecular events in the activation of rhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(51):20290–20295, Dec 2007. doi: 10.1073/pnas.0710393104. (Zitiert auf Seite 28.)

- Koenig B. W., Kontaxis G., Mitchell D. C., Louis J. M., Litman B. J., und Bax A. *Structure and orientation of a G protein fragment in the receptor bound state from residual dipolar couplings*. J Mol Biol, 322(2):441–461, Sep 2002. (Zitiert auf den Seiten 13, 22, 38, 110, and 130.)
- Kokame K., Fukada Y., Yoshizawa T., Takao T., und Shimonishi Y. *Lipid modification at the N terminus of photoreceptor G-protein alpha-subunit*. Nature, 359(6397):749–752, Oct 1992. doi: 10.1038/359749a0. (Zitiert auf Seite 22.)
- König B., Welte W., und Hofmann K. P. *Photoactivation of rhodopsin and interaction with transducin in detergent micelles. Effect of 'doping' with steroid molecules*. FEBS Lett, 257(1):163–166, Oct 1989. (Zitiert auf Seite 87.)
- Krebs M. P., Mollaaghababa R., und Khorana H. G. *Gene replacement in Halobacterium halobium and expression of bacteriorhodopsin mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 90(5):1987–1991, Mar 1993. (Zitiert auf Seite 42.)
- Krishna A. G., Menon S. T., Terry T. J., und Sakmar T. P. *Evidence that helix 8 of rhodopsin acts as a membrane-dependent conformational switch*. Biochemistry, 41(26):8298–8309, Jul 2002. (Zitiert auf Seite 87.)
- Kubelka J., Hofrichter J., und Eaton W. A. *The protein folding 'speed limit'*. Curr Opin Struct Biol, 14(1):76–88, Feb 2004. doi: 10.1016/j.sbi.2004.01.013. (Zitiert auf Seite 131.)
- Kues T., Dickmanns A., Lührmann R., Peters R., und Kubitscheck U. *High intranuclear mobility and dynamic clustering of the splicing factor U1 snRNP observed by single particle tracking*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98:12021–12026, Oct 2001. (Zitiert auf Seite 56.)
- Kühn H. und Wilden U. *Assay of phosphorylation of rhodopsin in vitro and in vivo*. Methods Enzymol, 81:489–496, 1982. (Zitiert auf den Seiten 24 and 138.)
- Kühn H., Bennett N., Michel-Villaz M., und Chabre M. *Interactions between photoexcited rhodopsin and GTP-binding protein: kinetic and stoichiometric analyses from light-scattering changes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 78(11):6873–6877, Nov 1981. (Zitiert auf Seite 118.)
- Kühn H., Hall S. W., und Wilden U. *Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin*. FEBS Lett, 176(2):473–478, Oct 1984. (Zitiert auf Seite 24.)
- Kukura P., McCamant D. W., Yoon S., Wandschneider D. B., und Mathies R. A. *Structural observation of the primary isomerization in vision with femtosecond-stimulated Raman*. Science, 310(5750):1006–1009, Nov 2005. doi: 10.1126/science.1118379. (Zitiert auf Seite 20.)
- Kusnetzow A., Altenbach C., und Hubbell W. *Conformational states and dynamics of rhodopsin in micelles and bilayers*. Biochemistry, 45(17):5538–50, 2006. doi: 16634635. (Zitiert auf Seite 28.)
- Kusumi A., Sako Y., und Yamamoto M. *Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells*. Biophys J, 65(5):2021–2040, Nov 1993. doi: 10.1016/S0006-3495(93)81253-0. (Zitiert auf Seite 56.)
- Lakowicz J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 2006. ISBN 0387312781. (Zitiert auf den Seiten 59 and 99.)
- Lambright D. G., Sonddek J., Böhm A., Skiba N. P., Hamm H. E., und Sigler P. B. *The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein*. Nature, 379(6563):311–319, Jan 1996. doi: 10.1038/379311a0. (Zitiert auf Seite 110.)

- Lehmann N., Alexiev U., und Fahmy K. *Linkage between the intramembrane H-bond network around aspartic acid 83 and the cytosolic environment of helix 8 in photoactivated rhodopsin*. *J Mol Biol*, 366 (4):1129–1141, Mar 2007. doi: 10.1016/j.jmb.2006.11.098. (Zitiert auf den Seiten 19, 20, 88, 108, and 138.)
- Lewis E. R., Zeevi Y. Y., und S W. F. *Scanning electron microscopy of vertebrate visual receptors*. *Brain Res*, 15(2):559–562, Oct 1969. (Zitiert auf Seite 15.)
- Lewis G. N., Lipkin D., und T M. T. *Reversible Photochemical Processes in Rigid Media. A Study of the Phosphorescent State*. *J. Am. Chem. Soc*, 63:3005–3018, 1941. doi: 10.1021/ja01856a043. (Zitiert auf Seite 68.)
- Lewis J. W. und Kliger D. S. *Photointermediates of visual pigments*. *J Bioenerg Biomembr*, 24(2): 201–210, Apr 1992. (Zitiert auf Seite 20.)
- Liang Y., Fotiadis D., Filipek S., Saperstein D. A., Palczewski K., und Engel A. *Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes*. *J Biol Chem*, 278(24):21655–21662, Jun 2003. doi: 10.1074/jbc.M302536200. (Zitiert auf Seite 42.)
- Liebman P. A., Parker K. R., und Dratz E. A. *The molecular mechanism of visual excitation and its relation to the structure and composition of the rod outer segment*. *Annu Rev Physiol*, 49:765–791, 1987. doi: 10.1146/annurev.ph.49.030187.004001. (Zitiert auf Seite 16.)
- Lin H. J., Herman P., und Lakowicz J. R. *Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells*. *Cytometry A*, 52(2):77–89, Apr 2003. doi: 10.1002/cyto.a.10028. (Zitiert auf Seite 71.)
- Lipari G. und Szabo A. *Effect of librational motion on fluorescence depolarization and nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules and membranes*. *Biophys J*, 30(3):489–506, Jun 1980. doi: 10.1016/S0006-3495(80)85109-5. (Zitiert auf Seite 51.)
- Litman B. J., Kalisky O., und Ottolenghi M. *Rhodopsin-phospholipid interactions: dependence of rate of the meta I to meta II transition on the level of associated disk phospholipid*. *Biochemistry*, 20(3):631–634, Feb 1981. (Zitiert auf Seite 87.)
- Lüdeke S., Beck M., Yan E. C., Sakmar T. P., Siebert F., und Vogel R. *The role of Glu181 in the photoactivation of rhodopsin*. *J Mol Biol*, 353(2):345–356, Oct 2005. doi: 10.1016/j.jmb.2005.08.039. (Zitiert auf Seite 18.)
- Luecke H., Schobert B., Lanyi J. K., Spudich E. N., und Spudich J. L. *Crystal structure of sensory rhodopsin II at 2.4 angstroms: insights into color tuning and transducer interaction*. *Science*, 293(5534): 1499–1503, Aug 2001. doi: 10.1126/science.1062977. (Zitiert auf Seite 10.)
- MacKenzie D., Arendt A., Hargrave P., McDowell J. H., und Molday R. S. *Localization of binding sites for carboxyl terminal specific anti-rhodopsin monoclonal antibodies using synthetic peptides*. *Biochemistry*, 23(26):6544–6549, Dec 1984. (Zitiert auf Seite 43.)
- Magde D., Wong R., und Seybold P. G. *Fluorescence Quantum Yields and Their Relation to Lifetimes of Rhodamine 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields*. *Photochemistry and Photobiology*, 75(4):327–334, 2002. ISSN 1751-1097. doi: 10.1562/0031-8655(2002)0750327FQYATR2.0.CO2. (Zitiert auf Seite 88.)
- Mahalingam M., Martínez-Mayorga K., Brown M. F., und Vogel R. *Two protonation switches control rhodopsin activation in membranes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(46):17795–17800, Nov 2008. doi: 10.1073/pnas.0804541105. (Zitiert auf den Seiten 18, 78, 100, 101, 103, 123, and 131.)

- Mansoor S. E., McHaourab H. S., und Farrens D. L. *Mapping proximity within proteins using fluorescence spectroscopy. A study of T4 lysozyme showing that tryptophan residues quench bimane fluorescence.* *Biochemistry*, 41(8):2475–2484, Feb 2002. (Zitiert auf Seite 10.)
- Marin E. P., Krishna A. G., Zvyaga T. A., Isele J., Siebert F., und Sakmar T. P. *The amino terminus of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin modulates rhodopsin-transducin interaction.* *J Biol Chem*, 275(3):1930–1936, Jan 2000. (Zitiert auf Seite 67.)
- Martin E. L., Rens-Domiano S., Schatz P. J., und Hamm H. E. *Potent peptide analogues of a G protein receptor-binding region obtained with a combinatorial library.* *J Biol Chem*, 271(1):361–366, Jan 1996. (Zitiert auf Seite 44.)
- Matthews R. G., Hubbard R., Brown P. K., und Wald G. *Tautomeric Forms Of Metarhodopsin.* *J Gen Physiol*, 47:215–240, Nov 1963. (Zitiert auf Seite 75.)
- McDowell J. H. und Kühn H. *Light-induced phosphorylation of rhodopsin in cattle photoreceptor membranes: substrate activation and inactivation.* *Biochemistry*, 16(18):4054–4060, Sep 1977. (Zitiert auf Seite 42.)
- McKibbin C., Toye A. M., Reeves P. J., Khorana H. G., Edwards P. C., Villa C., und Booth P. J. *Opsin stability and folding: the role of Cys185 and abnormal disulfide bond formation in the intradiscal domain.* *J Mol Biol*, 374(5):1309–1318, Dec 2007. doi: 10.1016/j.jmb.2007.10.013. (Zitiert auf Seite 72.)
- Mendez A., Burns M. E., Roca A., Lem J., Wu L. W., Simon M. I., Baylor D. A., und Chen J. *Rapid and reproducible deactivation of rhodopsin requires multiple phosphorylation sites.* *Neuron*, 28(1): 153–164, Oct 2000. (Zitiert auf den Seiten 24 and 138.)
- Mielke T., Alexiev U., Gläsel M., Otto H., und Heyn M. P. *Light-induced changes in the structure and accessibility of the cytoplasmic loops of rhodopsin in the activated MII state.* *Biochemistry*, 41(25): 7875–7884, Jun 2002. (Zitiert auf Seite 20.)
- Molday R. S. und MacKenzie D. *Monoclonal antibodies to rhodopsin: characterization, cross-reactivity, and application as structural probes.* *Biochemistry*, 22(3):653–660, Feb 1983. (Zitiert auf Seite 43.)
- Mollaaghababa R., Steinhoff H. J., Hubbell W. L., und Khorana H. G. *Time-resolved site-directed spin-labeling studies of bacteriorhodopsin: loop-specific conformational changes in M.* *Biochemistry*, 39(5):1120–1127, Feb 2000. (Zitiert auf Seite 65.)
- Möller M. und Alexiev U. *Surface charge changes upon formation of the signaling state in visual rhodopsin.* *Photochem Photobiol*, 85(2):501–508, Mar-Apr 2009. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00528.x. (Zitiert auf den Seiten 42, 43, 72, 77, 78, 85, and 88.)
- Morizumi T., Imai H., und Shichida Y. *Two-step mechanism of interaction of rhodopsin intermediates with the C-terminal region of the transducin alpha-subunit.* *J Biochem*, 134(2):259–267, Aug 2003. (Zitiert auf Seite 118.)
- Morizumi T., Imai H., und Shichida Y. *Direct observation of the complex formation of GDP-bound transducin with the rhodopsin intermediate having a visible absorption maximum in rod outer segment membranes.* *Biochemistry*, 44(29):9936–9943, Jul 2005. doi: 10.1021/bi0504512. (Zitiert auf Seite 118.)
- Müller F. und Kaupp U. B. *[Signal transduction in photoreceptor cells].* *Naturwissenschaften*, 85(2): 49–61, Feb 1998. (Zitiert auf Seite 16.)

- Nagata T., Terakita A., Kandori H., Shichida Y., und Maeda A. *The hydrogen-bonding network of water molecules and the peptide backbone in the region connecting Asp83, Gly120, and Glu113 in bovine rhodopsin.* *Biochemistry*, 37(49):17216–17222, Dec 1998. doi: 10.1021/bi9810149. (Zitiert auf Seite 19.)
- Neubert T. A., Johnson R. S., Hurley J. B., und Walsh K. A. *The rod transducin alpha subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated.* *J Biol Chem*, 267(26):18274–18277, Sep 1992. (Zitiert auf Seite 22.)
- Oesterhelt D. und Stoeckenius W. *Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium.* *Nat New Biol*, 233(39):149–152, Sep 1971. (Zitiert auf Seite 24.)
- Oka T., Kamikubo H., Tokunaga F., Lanyi J. K., Needleman R., und Kataoka M. *Conformational change of helix G in the bacteriorhodopsin photocycle: investigation with heavy atom labeling and x-ray diffraction.* *Biophys J*, 76(2):1018–1023, Feb 1999. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77266-8. (Zitiert auf Seite 10.)
- Oseroff A. R. und Callender R. H. *Resonance Raman spectroscopy of rhodopsin in retinal disk membranes.* *Biochemistry*, 13(20):4243–4248, Sep 1974. (Zitiert auf Seite 17.)
- Otto H., Marti T., Holz M., Mogi T., Lindau M., Khorana H. G., und Heyn M. P. *Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(23):9228–9232, Dec 1989. (Zitiert auf Seite 27.)
- Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le Trong I., Teller D. C., Okada T., Stenkamp R. E., Yamamoto M., und Miyano M. *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor.* *Science*, 289(5480):739–745, Aug 2000. (Zitiert auf den Seiten 10, 17, 67, and 90.)
- Park J. H., Scheerer P., Hofmann K. P., Choe H. W., und Ernst O. P. *Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin.* *Nature*, 454:183–187, Jul 2008. (Zitiert auf Seite 88.)
- Park P. S. und Palczewski K. *Diversifying the repertoire of G protein-coupled receptors through oligomerization.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(25):8793–8794, Jun 2005. doi: 10.1073/pnas.0504016102. (Zitiert auf Seite 132.)
- Park P. S., Filipek S., Wells J. W., und Palczewski K. *Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future.* *Biochemistry*, 43(50):15643–15656, Dec 2004. doi: 10.1021/bi047907k. (Zitiert auf Seite 132.)
- Pebay-Peyroula E., Rummel G., Rosenbusch J. P., und Landau E. M. *X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases.* *Science*, 277(5332):1676–1681, Sep 1997. (Zitiert auf Seite 24.)
- Pfister C., Kühn H., und Chabre M. *Interaction between photoexcited rhodopsin and peripheral enzymes in frog retinal rods. Influence on the postmetarhodopsin II decay and phosphorylation rate of rhodopsin.* *Eur J Biochem*, 136(3):489–499, Nov 1983. (Zitiert auf Seite 24.)
- Pieper J., Buchsteiner A., Dencher N. A., Lechner R. E., und Hauss T. *Transient protein softening during the working cycle of a molecular machine.* *Phys Rev Lett*, 100(22):228103–228103, Jun 2008. (Zitiert auf Seite 9.)
- Pöhlmann T., Böckmann R. A., Grubmüller H., Uchanska-Ziegler B., Ziegler A., und Alexiev U. *Differential peptide dynamics is linked to major histocompatibility complex polymorphism.* *J Biol Chem*, 279(27):28197–28201, Jul 2004. doi: 10.1074/jbc.C400128200. (Zitiert auf Seite 10.)

- Poo M. und Cone R. A. *Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane*. *Nature*, 247(441): 438–441, Feb 1974. (Zitiert auf den Seiten 16 and 132.)
- Pottel H., Herreman W., van der Meer B., und Ameloot M. *On the significance of the fourth-rank orientational order parameter of fluorophores in membranes*. *Chemical Physics*, 102(1-2):37 – 44, 1986. ISSN 0301-0104. doi: 10.1016/0301-0104(86)85115-1. (Zitiert auf den Seiten 55 and 106.)
- Press W. H., Teukolsky S. A., Vetterling W. T., und Flannery B. P. *Numerical Recipes 3rd Edition: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, 3 edition, September 2007. ISBN 0521880688. (Zitiert auf Seite 47.)
- Prioleau C., Visiers I., Ebersole B. J., Weinstein H., und Sealfon S. C. *Conserved helix 7 tyrosine acts as a multistate conformational switch in the 5HT_{2C} receptor. Identification of a novel locked-on phenotype and double revertant mutations*. *J Biol Chem*, 277(39):36577–36584, Sep 2002. doi: 10.1074/jbc.M206223200. (Zitiert auf Seite 90.)
- Radzwill N., Gerwert K., und Steinhoff H. J. *Time-resolved detection of transient movement of helices F and G in doubly spin-labeled bacteriorhodopsin*. *Biophys J*, 80(6):2856–2866, Jun 2001. doi: 10.1016/S0006-3495(01)76252-2. (Zitiert auf den Seiten 10 and 65.)
- Rajagopal S., Rajagopal K., und Lefkowitz R. J. *Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors*. *Nat Rev Drug Discov*, 9(5):373–386, May 2010. doi: 10.1038/nrd3024. (Zitiert auf Seite 9.)
- Ritzoulis G., Missopolinou D., Doulami S., und Panayiotou C. *Relative Permittivities, Densities, Refractive Indices and Ultrasound Velocities of the Binary Systems of γ -Butyrolactone with Methanol, Ethanol, 1-Butanol, and 1-Octanol*. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 45(4):636–641, 2000. doi: 10.1021/je990226l. (Zitiert auf Seite 88.)
- Sass H. J., Büldt G., Gessenich R., Hehn D., Neff D., Schlesinger R., Berendzen J., und Ormos P. *Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin*. *Nature*, 406 (6796):649–653, Aug 2000. doi: 10.1038/35020607. (Zitiert auf Seite 10.)
- Saxton M. J. *Single-particle tracking: the distribution of diffusion coefficients*. *Biophys J*, 72(4):1744–1753, Apr 1997. (Zitiert auf Seite 55.)
- Scheerer P., Park J. H., Hildebrand P. W., Kim Y. J., Krauss N., Choe H. W., Hofmann K. P., und Ernst O. P. *Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation*. *Nature*, 455(7212): 497–502, Sep 2008. doi: 10.1038/nature07330. (Zitiert auf den Seiten 17, 19, 20, 38, 88, 110, and 130.)
- Scherrer P. und Stoeckenius W. *Effects of tyrosine-26 and tyrosine-64 nitration on the photoreactions of bacteriorhodopsin*. *Biochemistry*, 24(26):7733–7740, Dec 1985. (Zitiert auf Seite 64.)
- Scherrer P., Alexiev U., Marti T., Khorana H. G., und Heyn M. P. *Covalently bound pH-indicator dyes at selected extracellular or cytoplasmic sites in bacteriorhodopsin. 1. Proton migration along the surface of bacteriorhodopsin micelles and its delayed transfer from surface to bulk*. *Biochemistry*, 33(46): 13684–13692, Nov 1994. (Zitiert auf Seite 64.)
- Schiemann O. und Prisner T. F. *Long-range distance determinations in biomacromolecules by EPR spectroscopy*. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 40(01):1–53, 2007. doi: 10.1017/S003358350700460X. (Zitiert auf Seite 28.)
- Schoenlein R. W., Peteanu L. A., Mathies R. A., und Shank C. V. *The first step in vision: femtosecond isomerization of rhodopsin*. *Science*, 254(5030):412–415, Oct 1991. (Zitiert auf Seite 20.)

- Schröder G. F., Alexiev U., und Grubmüller H. *Simulation of fluorescence anisotropy experiments: probing protein dynamics*. *Biophys J*, 89(6):3757–3770, Dec 2005. doi: 10.1529/biophysj.105.069500. (Zitiert auf den Seiten 10, 47, 49, 91, and 93.)
- Schütz G. J., Schindler H., und Schmidt T. *Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion*. *Biophys J*, 73(2):1073–1080, Aug 1997. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78139-6. (Zitiert auf Seite 56.)
- Shichida Y., Kandori H., Okada T., Yoshizawa T., Nakashima N., und Yoshihara K. *Differences in the photobleaching process between 7-cis- and 11-cis-rhodopsins: a unique interaction change between the chromophore and the protein during the lumi-meta I transition*. *Biochemistry*, 30(24):5918–5926, Jun 1991. (Zitiert auf Seite 21.)
- Shosheva A. C., Christova P. K., und Atanasov B. P. *pH-dependence of photo-induced electron transfer in zinc-substituted sperm whale myoglobin*. *Biochim Biophys Acta*, 957(2):202–206, Nov 1988. (Zitiert auf Seite 112.)
- Skegrod D., Pulvermüller A., Krafft B., Granzin J., Hofmann K. P., Büldt G., und Schlesinger R. *N-terminal and C-terminal domains of arrestin both contribute in binding to rhodopsin*. *Photochem Photobiol*, 83(2):385–392, Mar-Apr 2007. doi: 10.1562/2006-08-25-RA-1014. (Zitiert auf Seite 44.)
- Sommer M. E., Smith W. C., und Farrens D. L. *Dynamics of arrestin-rhodopsin interactions: acidic phospholipids enable binding of arrestin to purified rhodopsin in detergent*. *J Biol Chem*, 281(14):9407–9417, Apr 2006. doi: 10.1074/jbc.M510037200. (Zitiert auf Seite 108.)
- Subramaniam S. und Henderson R. *Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin*. *Nature*, 406(6796):653–657, Aug 2000. doi: 10.1038/35020614. (Zitiert auf Seite 65.)
- Szundi I., Mah T. L., Lewis J. W., Jäger S., Ernst O. P., Hofmann K. P., und Kliger D. S. *Proton transfer reactions linked to rhodopsin activation*. *Biochemistry*, 37(40):14237–14244, Oct 1998. doi: 10.1021/bi981249k. (Zitiert auf Seite 120.)
- Tachibanaki S., Imai H., Mizukami T., Okada T., Imamoto Y., Matsuda T., Fukada Y., Terakita A., und Shichida Y. *Presence of two rhodopsin intermediates responsible for transducin activation*. *Biochemistry*, 36(46):14173–14180, Nov 1997. doi: 10.1021/bi970932o. (Zitiert auf Seite 118.)
- Tachibanaki S., Imai H., Terakita A., und Shichida Y. *Identification of a new intermediate state that binds but not activates transducin in the bleaching process of bovine rhodopsin*. *FEBS Lett*, 425(1):126–130, Mar 1998. (Zitiert auf Seite 118.)
- Thompson P. A., Eaton W. A., und Hofrichter J. *Laser temperature jump study of the helix \rightleftharpoons coil kinetics of an alanine peptide interpreted with a 'kinetic zipper' model*. *Biochemistry*, 36(30):9200–9210, Jul 1997. doi: 10.1021/bi9704764. (Zitiert auf Seite 32.)
- Topiol S. und Sabio M. *X-ray structure breakthroughs in the GPCR transmembrane region*. *Biochem Pharmacol*, 78(1):11–20, Jul 2009. doi: 10.1016/j.bcp.2009.02.012. (Zitiert auf Seite 17.)
- Unwin P. N. und Henderson R. *Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens*. *J Mol Biol*, 94(3):425–440, May 1975. (Zitiert auf Seite 42.)
- van der Meer W., Pottel H., Herreman W., Ameloot M., Hendrickx H., und Schröder H. *Effect of orientational order on the decay of the fluorescence anisotropy in membrane suspensions. A new approximate solution of the rotational diffusion equation*. *Biophys J*, 46(4):515–523, Oct 1984. doi: 10.1016/S0006-3495(84)84049-7. (Zitiert auf den Seiten 50, 52, and 53.)

- Vishnivetskiy S. A., Paz C. L., Schubert C., Hirsch J. A., Sigler P. B., und Gurevich V. V. *How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin?* J Biol Chem, 274(17):11451–11454, Apr 1999. (Zitiert auf Seite 24.)
- Vogel R. und Siebert F. *Conformations of the active and inactive states of opsin.* J Biol Chem, 276(42): 38487–38493, Oct 2001. doi: 10.1074/jbc.M105423200. (Zitiert auf den Seiten 75, 87, 93, 116, and 130.)
- Vogel R., Siebert F., Mathias G., Tavan P., Fan G., und Sheves M. *Deactivation of rhodopsin in the transition from the signaling state meta II to meta III involves a thermal isomerization of the retinal chromophore C[double bond]D.* Biochemistry, 42(33):9863–9874, Aug 2003. doi: 10.1021/bi034684+. (Zitiert auf den Seiten 22 and 109.)
- Vogel R., Siebert F., Zhang X. Y., Fan G., und Sheves M. *Formation of Meta III during the decay of activated rhodopsin proceeds via Meta I and not via Meta II.* Biochemistry, 43(29):9457–9466, Jul 2004. doi: 10.1021/bi049337u. (Zitiert auf Seite 22.)
- Vogel R., Siebert F., Lüdeke S., Hirshfeld A., und Sheves M. *Agonists and partial agonists of rhodopsin: retinals with ring modifications.* Biochemistry, 44(35):11684–11699, Sep 2005. doi: 10.1021/bi0508587. (Zitiert auf Seite 19.)
- Vogel R., Sakmar T. P., Sheves M., und Siebert F. *Coupling of protonation switches during rhodopsin activation.* Photochem Photobiol, 83(2):286–292, Mar-Apr 2007. doi: 10.1562/2006-06-19-IR-937. (Zitiert auf den Seiten 75, 93, and 94.)
- Volkov A., Dockter C., Bund T., Paulsen H., und Jeschke G. *Pulsed EPR determination of water accessibility to spin-labeled amino acid residues in LHCIIb.* Biophys J, 96(3):1124–1141, Feb 2009. doi: 10.1016/j.bpj.2008.09.047. (Zitiert auf Seite 28.)
- Vonck J. *Structure of the bacteriorhodopsin mutant F219L N intermediate revealed by electron crystallography.* EMBO J, 19(10):2152–2160, May 2000. doi: 10.1093/emboj/19.10.2152. (Zitiert auf Seite 65.)
- Vrljic M., Nishimura S., Brasselet S., Moerner W., und McConnell H. *Translational diffusion of individual class II MHC membrane proteins in cells.* Biophys. J., 83:2681–2692, Nov 2002. (Zitiert auf Seite 56.)
- Wald G., Durell J., und St George C. C. *The light reaction in the bleaching of rhodopsin.* Science, 111 (2877):179–181, Feb 1950. (Zitiert auf Seite 109.)
- Wilden U. und Kühn H. *Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: number of phosphorylation sites.* Biochemistry, 21(12):3014–3022, Jun 1982. (Zitiert auf Seite 43.)
- Yang H., Luo G., Karnchanaphanurach P., Louie T. M., Rech I., Cova S., Xun L., und Xie X. S. *Protein conformational dynamics probed by single-molecule electron transfer.* Science, 302(5643):262–266, Oct 2003. doi: 10.1126/science.1086911. (Zitiert auf Seite 10.)
- Zaitseva E., Brown M. F., und Vogel R. *Sequential rearrangement of interhelical networks upon rhodopsin activation in membranes: the Meta II(a) conformational substate.* J Am Chem Soc, 132(13):4815–4821, Apr 2010. doi: 10.1021/ja910317a. (Zitiert auf Seite 90.)
- Zanker V. und Peter W. *Die prototropen Formen des Fluoresceins.* Chemische Berichte, 91:572–580, 1958. doi: 10.1002/cber.19580910316. (Zitiert auf Seite 68.)
- Zannoni C. *A theory of fluorescence depolarization in membranes.* Molecular Physics, 42(6):1303–1320, 1981. doi: 10.1080/00268978100100981. (Zitiert auf den Seiten 51 and 52.)

Zannoni C., Arcioni A., und Cavatorta P. *Fluorescence depolarization in liquid crystals and membrane bilayers*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 32(3-4):179 – 250, 1983. ISSN 0009-3084. doi: 10.1016/0009-3084(83)90037-3. (Zitiert auf Seite 52.)

Zimányi L., Váró G., Chang M., Ni B., Needleman R., und Lanyi J. K. *Pathways of proton release in the bacteriorhodopsin photocycle*. *Biochemistry*, 31(36):8535–8543, Sep 1992. (Zitiert auf Seite 27.)

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, Tai-Yang Kim, daß ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„ZEITAUFGELÖSTE FLUORESZENZSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DER
CYTOPLASMATISCHEN OBERFLÄCHE VON RHODOPSIN“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei denjenigen Personen bedanken, die mich während der Anfertigung der Arbeit unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Professor Dr. Ulrike Alexiev bedanken, für die Unterstützung, die wertvollen Ratschläge und die schier unendliche Geduld.

Auch möchte ich mich bei Professor Dr. Holger Dau für die Bereitschaft, sich als Zweitgutachter zur Verfügung zu stellen, bedanken.

Ich möchte auch sehr meinen Kollegen - Ingrid Wallat, Dr. Martina Möller, Dr. Kristina Kircheng und Stefan Ott - danken, die die biochemischen Präparationen der hier präsentierten und gemessenen Proben durchgeführt haben.

Ebenfalls möchte ich Alexander Boreham, Oliver Karge, Emilia Miloiu, Dr. Martina Möller, Boris Repen, Ingrid Wallat und Dr. Kathrin Winkler danken, die nicht nur fachlich, sondern auch persönlich die Zeit während meiner Doktorarbeit bereichert haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen aufopferungsvollen Eltern, ohne die das Studium und damit auch die Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären und meiner Schwester für ihre moralische Unterstützung.

Meiner Freundin Kristina möchte ich für Ihre Geduld danken und den Rückhalt, den sie mir gegeben hat, und Armin dafür, daß er mein Leben bereichert hat.