

1 Einleitung

Diese Dissertation beschäftigt sich mit dem anisotropen Emissionsverhalten von an der Oberfläche von Membranproteinen gebundenen Fluoreszenzmarkern. Schwerpunkt ist die Entwicklung einer neuen Meßapparatur zum Einsatz an Synchrotronstrahlungsquellen. Es soll ein Verständnis für das Bewegungsverhalten der Fluoreszenzmarker unter der Beteiligung flexibler Polypeptidketten der Proteine Bacteriorhodopsin und Rinderrhodopsin entwickelt werden. Die als zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie bezeichnete Methode soll es ermöglichen, in direkter Weise lichtinduzierte Änderungen der Struktur und Dynamik der Proteine zu detektieren.

1.1 Einführung in den Themenkomplex

Die in einer biologischen Membran befindlichen Proteine verfügen über Funktionen, die für das Zelleigenleben und die interzellulären Wechselwirkungen von entscheidender Bedeutung sind. Proteine sind insbesondere für die selektive Permeabilität der Zellmembran verantwortlich. Sie bilden ein System selektiver Poren, das in vielschichtiger Weise Ionen transportieren, Energie konvertieren und Informationen übertragen kann. Für Wahrnehmungs- und Signaltransduktionsprozesse ist die Gruppe der Rezeptorproteine verantwortlich. Eine in Eukaryoten weit verbreitete Form ist die der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Hierbei handelt es sich um Membranproteine, deren Aktivierung zu einer Interaktion mit den Guanylnucleotid-bindenden Proteinen (G-Proteinen) führt. Das vom Rezeptor registrierte Eingangssignal wird dabei auf das gebundene heterotrimere G-Protein übertragen. Die anschließende Reaktionskaskade des aktivierten G-Proteins führt zur Bildung sekundärer Botenstoffe, die für die Weiterleitung des Signals verantwortlich sind. Die für die Signaltransduktion wichtigen funktionalen Eigenschaften der Rezeptorproteine werden durch ihre dreidimensionale Struktur bestimmt. Im allgemeinen handelt es sich um integrale Membranproteine, welche die gesamte Membranschicht durchspannen und deshalb als Transmembranproteine bezeichnet werden. Das reguläre Gerüst im transmembranalen Bereich wird aus Helix- oder Faltblattkonformationen gebildet. Es stellt den eigentlichen Proteinkörper dar und ist ein gemeinsames Strukturmotiv vieler Rezeptoren. Die verbleibenden nichtrepetitiven Polypeptidsegmente verbinden die Hauptstrukturelemente als Schleifenkonformationen¹ an den Proteinoberflächen.

Rose et al. unterscheiden zwischen β -Schleifen (auch Winkel oder Haarnadelschleifen) mit häufig 4 Aminosäureresten und Ω -Schleifen, benannt nach ihrer dem griechischen Buchstaben Ω ähnlichen Form, aus 6-16 Aminosäureresten [Rose et al., 1985; Leszcynski und Rose, 1986]. Die Ω -Schleifen sind kompakte globuläre Einheiten deren Seitenketten die inneren Hohlräume der Konformation auffüllen. Neben diesen Strukturen existieren auch ungeordnete Regionen wie die N- beziehungsweise C-Termini der Polypeptidketten.

¹ Aus dem Englischen adaptiert in der Literatur häufig als „Loops“ bezeichnet.

Da sich die Schleifen und Termini an der Oberfläche der Rezeptoren befinden, stellen sie den Schlüssel der Signalübertragung zu den G-Proteinen dar. Die zentrale Frage ist, durch welche Veränderungen der Rezeptoroberfläche dem G-Protein die Bindungsbereitschaft signalisiert wird.

Die Aktivierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren erfolgt entweder durch Bindung eines spezifischen Signalmoleküls oder durch Absorption von Licht. Die durch Licht aktivierbaren Proteine werden Photorezeptoren genannt. Ein Mitglied dieser Proteinfamilie ist das Rhodopsin. Es kommt in den vertebralen Stäbchenzellen der Netzhaut vor und gilt als Prototyp G-Protein gekoppelter Rezeptoren [Khorana, 1992; Hargrave und McDowell; 1992, Nathans, 1992; Sakmar 1998]. Die Stäbchenzellen und die gleichfalls in der Netzhaut befindlichen Zapfenzellen sind für die Wahrnehmung und Weiterleitung von Lichtreizen beim Sehvorgang verantwortlich². Beide Zelltypen besitzen den gleichen Mechanismus der Signalverarbeitung [Stryer, 1988]. Während die Zapfen physiologisch das Farbsehen koordinieren, registrieren die Stäbchen die Helligkeitsunterschiede der optischen Abbildung auf der Netzhaut.

In der Netzhaut des Menschen gibt es etwa drei Millionen Zapfen und hundert Millionen Stäbchen. Sie bilden Synapsen mit bipolaren Zellen aus, die wiederum mit anderen Nervenzellen der Netzhaut in Verbindung stehen. Die Signale der Photorezeptoren werden nach der Weiterleitung durch die Retina über Fasern des Sehnervs auf das Gehirn übertragen. Das Rhodopsin beginnt diese Signalkette des primären Sehprozesses mit einer durch die Absorption eines Photons ausgelösten Isomerisierung seines im Proteingerüst kovalent gebundenen Retinal-Chromophors. Diese initiale Isomerisierung verursacht eine Konformationsänderung in der Proteinstruktur, die auf unbekanntem Wege zur transienten Bindung des visuellen G-Proteins Transducin in dem als MII-Intermediat bezeichneten aktivierten Zustand des Rhodopsins führt.

Das allgemeine Problem bei der Erforschung der Rezeptorproteine ist die Bestimmung ihrer Struktur beziehungsweise der Strukturänderung nach ihrer Aktivierung, denn keiner der Rezeptoren hat sich bisher kristallisieren lassen. Aus diesem Grund stehen bislang keine hochaufgelösten experimentellen Daten der Röntgendiffraktion zur Tertiärstruktur von Rhodopsin zur Verfügung.

Eine alternative Aufklärung bietet das Studium strukturell und funktional ähnlicher Proteine. Das in den Zellmembranen des Bakteriums *Halobacterium salinarium* vorkommende Bacteriorhodopsin besitzt eine solche Ähnlichkeit [Ovchinnikov, 1982]. Seine dreidimensionale Struktur ist bis auf die interhelikalen Bereiche mit einer Auflösung von $1,55 \cdot 10^{-10}$ m bekannt [Luecke et al., 1999a]. Aufgrund seiner hohen bio- und photochemischen Stabilität ist das Bacteriorhodopsin ein häufig studiertes Objekt und trägt Modellcharakter für eine große Zahl von membranständigen Proteinen [Stoeckenius und Bogomolni, 1982; Khorana, 1988; Lanyi, 1993]. Das Proteingerüst besteht wie beim Rhodopsin aus sieben α -Helices. Es setzt sich ebenfalls aus einem Apoprotein und einem kovalent gebundenen Retinal-Chromophor zusammen, ist jedoch kein Photorezeptor.

² Für die Aufklärung des Sehvorgangs auf biochemischer Ebene bekam George Wald 1967 den Nobelpreis für Medizin [Wald, 1968]

Das Bacteriorhodopsin transportiert nach Lichtanregung während eines geschlossenen Photozyklus ausschließlich ein Proton durch die Zellmembran und stellt somit ein photosynthetisches System dar [Oesterhelt und Stoeckenius, 1973].

In dieser Arbeit wird die Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie verwendet, um die an den Proteinoberflächen befindlichen Schleifenkonformationen zu untersuchen. Die Fluoreszenzanisotropie stellt eine parallele Methode zur Kernspinresonanzspektroskopie³ dar und zeichnet sich durch direkt interpretierbare Meßergebnisse aus. Sie bietet Strukturinformationen in den interhelikalen Bereichen, die den Standardstrukturmethoden wie Röntgendiffraktion oder der Elektronenmikroskopie aufgrund der hohen Flexibilität und den damit verbundenen hohen Temperaturfaktoren nur begrenzt zugänglich sind.

Für die Anisotropieexperimente werden extrinsische Fluoreszenzmarker verwendet, die ortsspezifisch an verschiedene Positionen der Oberfläche gebunden werden. Durch eine linear polarisierte Anregung der Fluorophore mit kurzen Lichtimpulsen wird eine Photo-selektion erzeugt, deren Abklingen zeitaufgelöst gemessen wird. Die Methode liefert direkt Informationen über die Dynamik der Fluorophor-Schleifen-Konstrukte und bietet außerdem Aufschluß über deren sterische Einschränkungen durch angrenzende Schleifen und terminale Peptidketten. Durch den Vergleich der Fluoreszenzanisotropiekurven unterschiedlicher Proteinzustände können unmittelbar Konformationsänderungen an der Proteinoberfläche beobachtet werden.

1.2 Anforderungen an Experiment und Methodik

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Messung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzintensitäten wird als zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung bezeichnet. Diese Technik zeichnet sich durch einen großen dynamischen Bereich von bis zu vier Größenordnungen und durch ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber den Methoden der Phasenfluorometrie oder den Streakkameras aus [Lakowicz, 1999].

Der Umstand, daß nur geringe Anregungsintensitäten notwendig sind, birgt im besonderen die Möglichkeit, das photoinstabile Rhodopsin in seinem Grundzustand untersuchen zu können. Die Anwendung der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung zur Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie bedingt jedoch folgende Anforderungen:

- eine spektral durchstimmbare gepulste Lichtquelle
- hohe Impulswiederholraten
- geringe Halbwertsbreiten der Anregungsimpulse
- Stabilität in Form, Intensität und Zeitpunkt der Anregungsimpulse

³ Die Kernspinresonanzspektroskopie bietet ebenso Zugang zu Ordnungsparametern und Rotationskorrelationszeiten [Lipari und Szabo, 1980, 1981, 1982a, 1982b]

Die Variation der Anregungswellenlänge ist notwendig, da sich die Lagen der Absorptionsmaxima der verschiedenen Fluoreszenzmarker im sichtbaren Spektralbereich stark unterscheiden. Das Licht einer Synchrotronanlage bietet sich hier aufgrund seiner fast uneingeschränkten Durchstimmbareit als Strahlungsquelle an [Munro und Schwentner 1983]. Aus statistischen Gründen ist außerdem eine ausreichend hohe Wiederholrate der Anregungsimpulse erforderlich. Im Einzelpaketbetrieb der Synchrotronanlagen BESSY I und HASYLAB beträgt die Impulsrate 5 MHz.

Somit besteht die Möglichkeit einer ausreichenden Akkumulation von Ereignissen innerhalb einer moderaten Meßdauer. Die maximal mögliche Dauer einer einzelnen Messung wird durch den Injektionszyklus des Synchrotronspeicherrings begrenzt. Da Elektronen durch Stöße mit Restgasionen oder durch Elektron-Elektron-Wechselwirkungen aus den umlaufenden Elektronenpaketen verloren gehen, erfolgt in periodischen Abständen eine Neueinspeisung von Elektronenbündeln in die Speicherringe. Die mittlere Dauer zwischen den Injektionen beträgt bei dem Berliner Synchrotron BESSY I ca. 3 Stunden und bei dem Hamburger HASYLAB ca. 9 Stunden.

Die Halbwertsbreiten der Lichtimpulse liegen im Subnanosekundenbereich. Diese Halbwertsbreiten der Anregungsimpulse stellen die wesentlichen Beschränkungen in der Zeitauflösung der Messung dar. Moderne Lasersysteme bieten zwar Halbwertsbreiten bis zu einigen Femtosekunden, erfordern jedoch im Hinblick auf die variablen Emissionswellenlängen einen erheblichen technischen und finanziellen Aufwand.

Ein wesentlicher Nachteil des Synchrotrons als Anregungsquelle wird durch die in Punkt vier obiger Aufzählung enthaltenen Faktoren bedingt. Während des Meßverlaufs kommt es zu Intensitätsverlusten, zu einer Änderung der Impulsform sowie zur zeitlichen Verschiebung des Eintreffens des Anregungsimpulses in der Meßapparatur. Der negative Einfluß dieser Veränderungen auf das Meßergebnis kommt wie folgt zustande⁴:

Bei einem nicht δ -förmigen Anregungsimpuls besteht das gemessene Fluoreszenzverhalten aus einer Faltung des Anregungsimpulses mit der Zeitfunktion der Probenfluoreszenz. Die Fluoreszenzanisotropie ist weiterhin als Differenz von polaritätsabhängigen Intensitätskomponenten definiert, die im Experiment nacheinander gemessen werden. Jegliche Veränderungen des Impulsprofils während der Meßdauer bewirken folglich Artefakte im zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzanisotropie. Bei der Konzeption der Meßapparatur müssen diese Einflüsse berücksichtigt werden.

Neben den physikalisch-technischen Aspekten sind auch an die Proteinproben bestimmte Bedingungen geknüpft. Um Informationen über die Dynamik und die sterische Beschränkung der Fluoreszenzmarker-Schleifen-Konstrukte gewinnen zu können, muß das Depolarisationsverhalten von deren Rotationsdiffusion dominiert werden. Daher muß der Einfluß zusätzlich depolarisierender Prozesse aufgeklärt oder durch präparative Maßnahmen ausgeschlossen werden. Bei diesen Prozessen handelt es sich um Deaktivierungskanäle des elektronischen Anregungszustandes des Fluorophors, die neben der spontanen Emission auftreten.

⁴ Nähere Erläuterungen befinden sich im Kapitel 3.

Weiterhin ist ein gewisser Grad an starrer Kopplung zwischen Fluorophor und Polypeptidschleife notwendig. Ohne diese Kopplung wird die Depolarisation im Kurzzeitbereich ausschließlich durch die Fluorophoreigenbewegung verursacht. Eine Aussage über die Dynamik der die Bindungsstelle enthaltenden Schleifenkonformation des Proteins ist in diesem Fall nicht möglich. Bei den experimentellen Ergebnissen der verwendeten Proteinmutanten sind außerdem mögliche Unterschiede zu den nativen Systemen zu beachten. Dies gilt insbesondere, da Art und Reihenfolge der Aminosäuren in der Polypeptidkette der interhelikalen Schleife für deren Struktur von Bedeutung sind.

1.3 Allgemeine Darstellung der untersuchten Proteine

1.3.1 Struktur und Funktion des Bacteriorhodopsins

In dem als Purpurmembran (PM) bezeichneten Bereich der Zellmembran des *Halobacterium salinarium* ist das Transmembranprotein Bacteriorhodopsin (bR) in einem zweidimensionalen hexagonalen Gitter angeordnet.

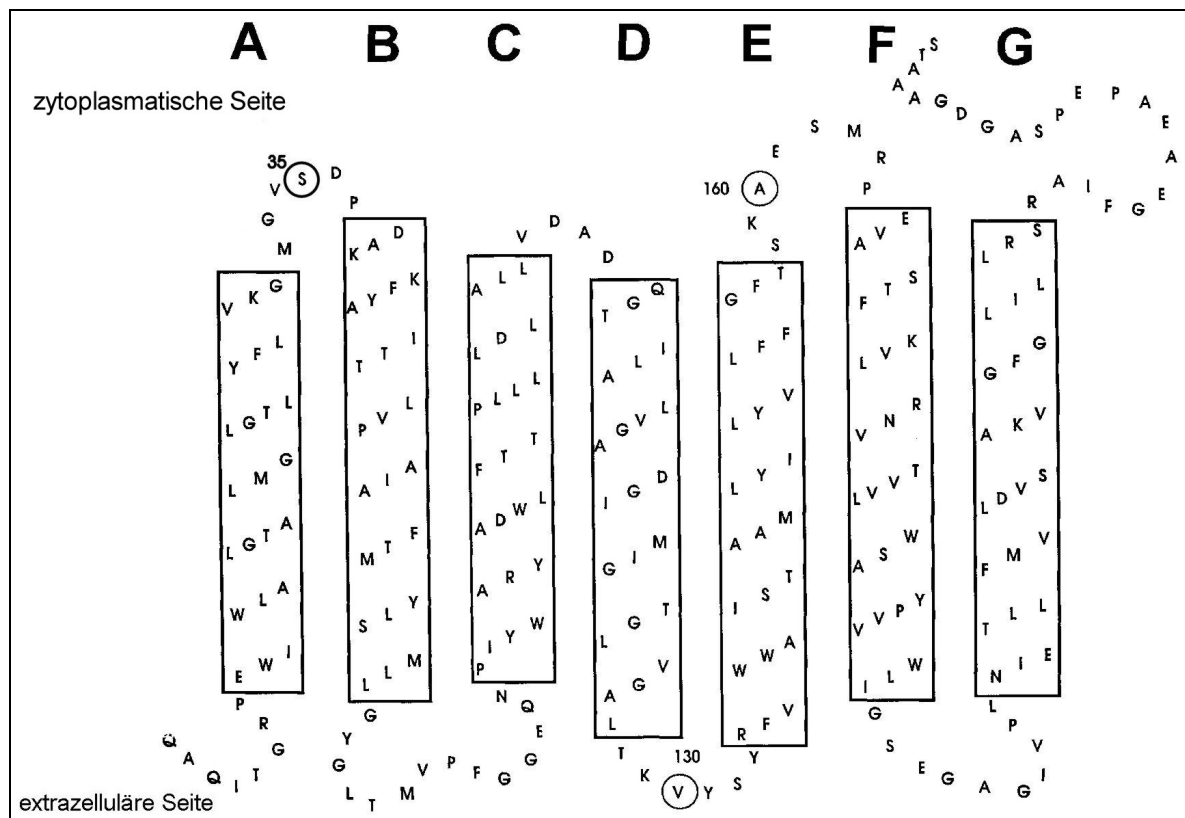


Abbildung 1-1 Sekundärstrukturmodell des nativen Bacteriorhodopsins. Die Helices durch Rahmen gekennzeichnet und durch große Buchstaben unterschieden. Die numerierten Kreismarkierungen zeigen die Aminosäuren, welche gegen Cystein ausgetauscht wurden (nicht abgebildet). Die Markierungen geben damit die Bindungspositionen der Fluoreszenzmarker an.

In der Einheitszelle mit einer Gitterkonstanten von $62,4 \text{ \AA}$ [Henderson et al., 1990] bilden die Proteine dichtgepackte Trimere. Das Protein-Lipid-Verhältnis beträgt in der Purpurmembran 1:9 [Glaeser et al., 1985]. Abbildung 1-1 zeigt die Sekundärstruktur des Proteins. Die rechteckig eingerahmten Bereiche stellen die die Zellmembran durchsetzenden α -helikalen Bereiche dar. Diese Bereiche sind durch unterschiedlich lange flexible Peptidketten, die im folgenden als Loops⁵ bezeichnet werden, verbunden. Die numerierten Kreismarkierungen kennzeichnen die Aminosäurereste, die bei den Mutanten durch Cysteinreste ersetzt waren.

Bei der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur erreichten Messungen der Elektronenbeugung eine Auflösung von 3 \AA [Henderson et al., 1990; Grigorieff et al., 1996; Kimura et al., 1997]. Neuere Experimente mit kubischen Lipidphasen führten unter Anwendung von Röntgenbeugung zu einer verbesserten Auflösung von bis zu $1,55 \text{ \AA}$ [Lücke et al., 1998, 1999; Belrhali et al., 1999; Landau und Rosenbusch, 1996]. Sato et al. stellten außerdem eine Struktur vor, die auf Röntgendiffraktion an Kristallen aus Vesikeln beruhte [Sato et al., 1999]. Mit Hilfe der neu entwickelten Atomkraftmikroskopie (AFM)⁶ konnten zusätzlich detailgetreue Abbildungen der Purpurmembranoberfläche gewonnen werden [Müller et al., 1995, 1999; Möller et al., 1999].

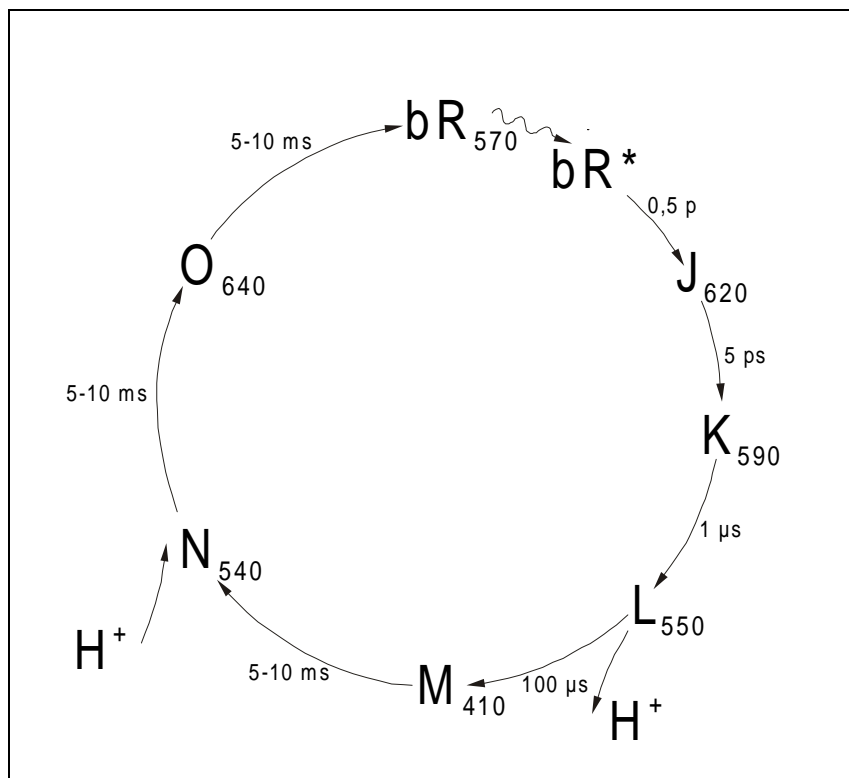


Abbildung 1-2 Schema des Bacteriorhodopsin-Photozyklus. Die Indizierungen des Grundzustandes und der Intermediate J – O geben die spektralen Absorptionsmaxima in nm an. Die Beschriftung der Übergänge zeigt die zugehörigen Zeitskalen.

⁵ In Anlehnung an die englisch sprachige Literatur.

⁶ atomic force microscopy

Neben den Positionen der Aminosäuren im Proteingerüst war auch die Lage des intrinsischen Retinyliden-Chromophors⁷ Ziel der Untersuchungen. Dieser Chromophor des 26,5 kDa schweren und 248 Aminosäuren umfassenden Proteins [Khorana et al., 1979; Ovchinnikov et al., 1979] wird von den sieben transmembranalen α -helikalen Bereichen umschlossen [Kometani et al., 1987]. Er ist kovalent durch eine protonierte Schiffsbasis (SB) an die ϵ -Aminogruppe von Lysin-216 gebunden. Neutronenstreuexperimente an deuterierten Retinalen sowie Messungen des Lineardichroismus gaben Auskunft über die Orientierung des Chromophors im Zentrum des Proteins [Heyn et al., 1988; Hauß et al., 1990].

Es wurde eine Neigung der Polyenkette gegenüber der Membrannormalen von 70° festgestellt [Heyn et al., 1977; Lin und Mathies, 1989]. Auf der Nanosekundenzeitskala ist das Retinal in der Bindungstasche unbeweglich [Kouyama et al., 1981]. Es existieren unterschiedliche Konformationen des Chromophors. Im dunkeladaptierten Zustand besteht ein Gleichgewicht zwischen 66 % 13-*cis*, 15-*syn* und 34 % all-*trans*, 15-*anti* Isomeren [Scherrer et al., 1989]. Unter Lichteinwirkung verschiebt sich dieses Gemisch zu 100 % all-*trans*, 15-*anti*. Der 13-*cis*, 15-*syn*-Zustand besitzt ein Absorptionsmaximum bei 550 nm, der all-*trans*, 15-*anti*-Zustand eines bei 568 nm.

Obwohl sich die Isomere spektroskopisch unterscheiden lassen, ändert sich die relative Lage des elektronischen Übergangsdipolmomentes bei der Konformationsänderung nicht [Borucki, 1998].

Die spektrale Lage der maximalen Absorption wird durch die protonierte Schiffsbasis und durch nahe Proteinkonstituenten geprägt. Abbildung 1-3 zeigt die Strukturen der Isomere sowie die Bindung via protonierter oder reduzierter Schiffsbasis. Das Retinaloxim entsteht durch Reaktion des gebundenen Retinals mit Hydroxylamin⁸. Das ungebundene Molekül absorbiert bei 380 nm. Im gebundenen Zustand befindet sich das stark rotverschobene Absorptionsmaximum der all-*trans*-Form bei 568 nm und das der 13-*cis*-Form bei 550 nm. Diese Differenz der Absorptionsmaxima zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand wird als „opsin shift“ bezeichnet [Balogh-Nair et al., 1981]. Die Reduzierung der Schiffsbasis (Abbildung 1-3) führt ebenfalls zu einem Absorptionsmaximum bei 380 nm [Peters et al., 1976]. In der Form einer freien Schiffsbasis kommt es zwar zu einer Rotverschiebung in den Bereich zwischen 440 bis 465 nm [Lugtenburg et al., 1986; Ottolenghi, 1980], dies entspricht aber nicht dem Absorptionsmaximum in der Proteinumgebung. Zur Erklärung der weiteren Rotverschiebung wurden zwei auf zusätzlichen Coulombwechselwirkungen beruhende Modelle vorgeschlagen [Nakanishi et al., 1980; Lugtenburg et al., 1986].

Seinen hohen Bekanntheitsgrad verdankt Bacteriorhodopsin seinem Wirkmechanismus als Protonenpumpe [Oesterhelt und Stoebenius, 1973]. Durch Lichtanregung des all-*trans*-Retinal-Zustandes wird ein Photozyklus initiiert, in dessen Verlauf ein Proton vom Zellinneren zum Zelläußeren transportiert wird, wobei die Protonenabgabe vor der Protonenaufnahme erfolgt [Lozier et al., 1975; Grzesiek und Dencher, 1986].

⁷ Im weiteren wie gebräuchlich als Retinal bezeichnet.

⁸ Eine Anzahl von Bacteriorhodopsin-Proben wurden im „gebleichten Zustand“ untersucht, der durch diese Reaktion erzeugt wurde.

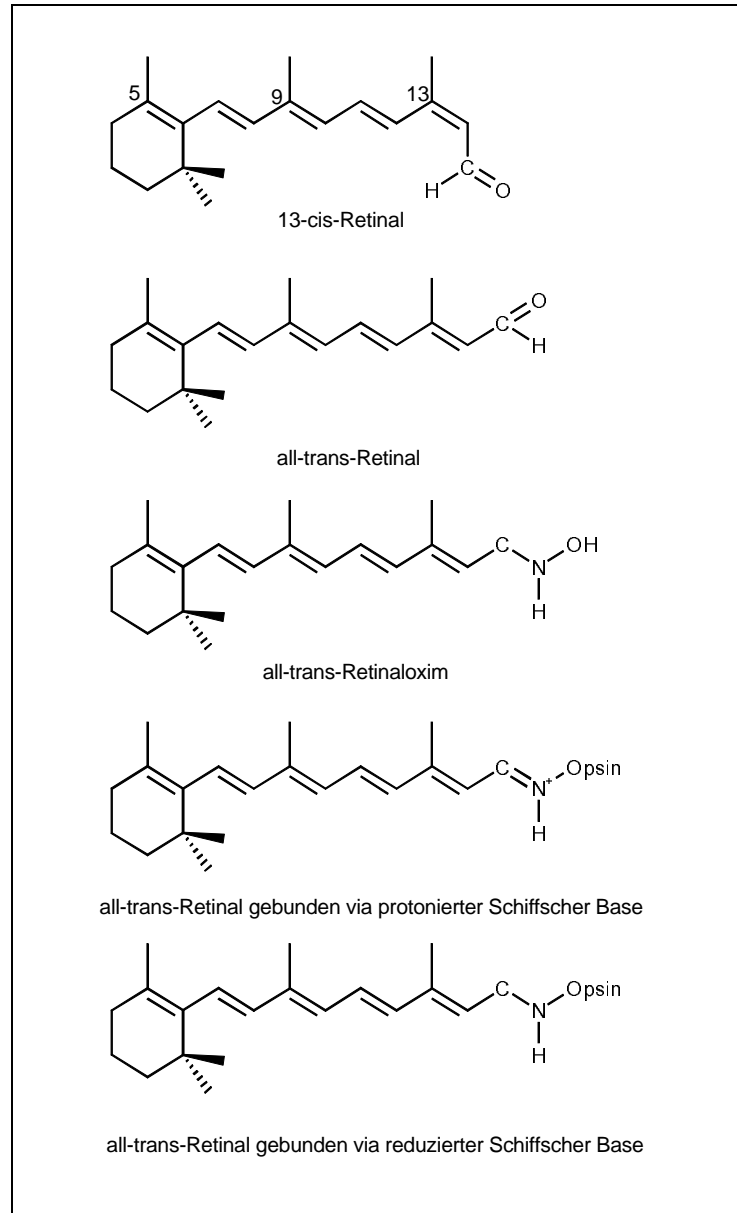


Abbildung 1-3 Struktur des Retinals: Die obersten drei Strukturen stellen Isomere im ungebundenen Zustand dar. Die unteren beiden Strukturen zeigen das gebundene all-trans-Isomer mit zwei spektral unterscheidbaren Bindungstypen. Die Reduktion der Schiffischen Base verursacht eine starke Blauverschiebung des Absorptionsmaximums (siehe Text).

Die Reaktionskaskade beginnt mit einer Photoisomerisierung des Retinals in die 13-*cis*, 15-*anti* Konformation. Mit Hilfe der daraufhin folgenden Änderungen in den Absorptionseigenschaften wurde ein zeitlicher Verlauf von Zwischenzuständen bestimmt, der letztendlich wieder zur Rückkehr in den bR-Grundzustand führt [Mathies et al., 1991; Lanyi und Váró, 1995]. Die Übergänge zwischen den Intermediatzuständen, die einzeln wiederum elektronische Grundzustände darstellen, verlaufen auf verschiedenen Zeitskalen. In Abbildung 1-2 ist eine Übersicht des Photozyklus dargestellt.

Die Zwischenzustände werden sukzessive mit den Buchstaben J bis O gekennzeichnet. Der Aufbau des M-Zustandes ist mit der Deprotonierung der Schiffischen Base gekoppelt. Zeitgleich erfolgt die Abgabe eines Protons auf der extrazellulären Seite. Während des Übergangs von M nach N erfolgt die Reprotonierung der Schiffischen Base von der zytoplasmatischen Seite der Membran. Es wird davon ausgegangen, daß die Protonenaufnahme sowie die Reisoomerisierung während der Intermediate N und O vollzogen wird.

Elektronenspinresonanz-Experimente (ESR) mit ortsspezifisch gebundenen Spin-Markern (SDSL, site-directed spin-labeling) von Steinhoff et al. und Mollaaghababa et al. zeigten in Verbindung mit dem M-Intermediat Veränderungen im zytoplasmatischen CD-Loop (Positionen 101 und 103), wogegen die Spin-Marker im AB-Loop (Position 35), im DE-Loop (Position 130) sowie im EF-Loop (Position 160) keine Signaländerungen aufwiesen [Steinhoff et al., 1994; Mollaaghababa et al., 2000].

Die gleichen Experimente wurden von Rink et al. in einem erweiterten Rahmen durchgeführt [Rink et al., 2000]. Die Autoren untersuchten die Positionen 100-107 (CD-Loop) sowie 154-171 (EF-Loop) und fanden eine geringe Bewegung der Helix C in Verbindung mit einer Verkippung der Helix F. Der EF-Loop erfuhr dadurch eine geringe Neuausrichtung. Das Kippen des zytoplasmatischen Endes der Helix F wurde auch von Subramaniam et al. im M-Intermediat einer D96G-Mutante mittels Elektronenbeugung beobachtet [Subramaniam et al., (1993)]. Die Autoren fanden außerdem Konformationsänderungen der Helices C, B und G im O-Intermediat einer L93A-Mutante [Subramaniam et al., 1997]. Luecke et al. konnten die Struktur des Proteingerüsts im M-Intermediat an der den Zustand konservierenden Mutante D96N mit einer Auflösung von 2 Å bestimmen [Luecke et al., 1999]. Dabei wurden veränderte Positionen der Seitenketten in der Umgebung des Retinals, Verschiebungen im Wasserstoffnetzwerk und erhöhte Temperaturfaktoren im EF-Loop sowie im C-Terminus gegenüber dem Grundzustand der Mutante festgestellt.

1.3.2 Struktur und Funktion des Rinderrhodopsins

Das Rinderrhodopsin⁹ ist ebenfalls ein Retinal-Protein mit sieben die Zellmembran durchspannenden α -helikalen Bereichen (Abbildung 1-4). Als G-Protein gekoppelter Rezeptor ist seine Struktur auf der zytoplasmatischen Oberfläche für die Bindung des visuellen G-Proteins Transducin von zentraler Bedeutung [Sakmar, 1998]. Die strukturelle Ähnlichkeit zum Bacteriorhodopsin ermöglicht dabei weitreichende Analogieschlüsse bei der Aufklärung des Rhodopsins [Ovchinnikov, 1982]. Das Retinal des 38 kDa schweren Proteins liegt im Grundzustand als 11-*cis* Form, mit einem Maximum der Absorptionsbande bei 500 nm vor. Die kovalente Bindung des Chromophors an das Apoprotein¹⁰ erfolgt via protonierter Schiffischer Base [Oseroff und Callander, 1974] an den Lysinrest in der Position 296 [Hargrave et al., 1983]. Für den Ladungsausgleich sorgt die deprotonierte Seitenkette der Glutaminsäure 113 [Sakmar et al., 1989].

⁹ folgend als Rhodopsin (Rho) bezeichnet

¹⁰ bezeichnet das Protein ohne Retinal

Die durch Lichtabsorption ausgelöste Zustandskaskade, bei der der Chromophor in den *all-trans*-Zustand isomerisiert, bildet keinen geschlossenen Zyklus, sondern endet mit der Abspaltung des *all-trans* Retinals vom Protein. Abbildung 1-5 zeigt das klassische Modell der Zustandsumwandlungen bei niedrigen Temperaturen. Unter nahezu physiologischen Bedingungen wird zwischen Lumi- und Batho-Intermediat noch ein weiterer Zustand, das sogenannte „blue-shifted intermediate“ (BSI), unterschieden [Sakmar, 1998; Hofmann et al., 1995; Kliger und Lewis, 1995]. Bis zum Batho-Zustand erfolgen nur geringfügige Änderungen in der Nähe des Retinals.

Während des Zerfalls von MI wird jedoch die an der starken Wellenlängenverschiebung erkennliche Deprotonierung der Schiffischen Base vollzogen. Das frei werdende Proton wird während der MII-Bildung von Glu-113 aufgenommen [Jäger et al., 1994]. Der Übergang von MI nach MII ist pH-abhängig [Radding und Wald, 1956; Matthews et al., 1963] und wird außerdem von der Phosphorylierung beeinflusst [Gibson et al., 1999].

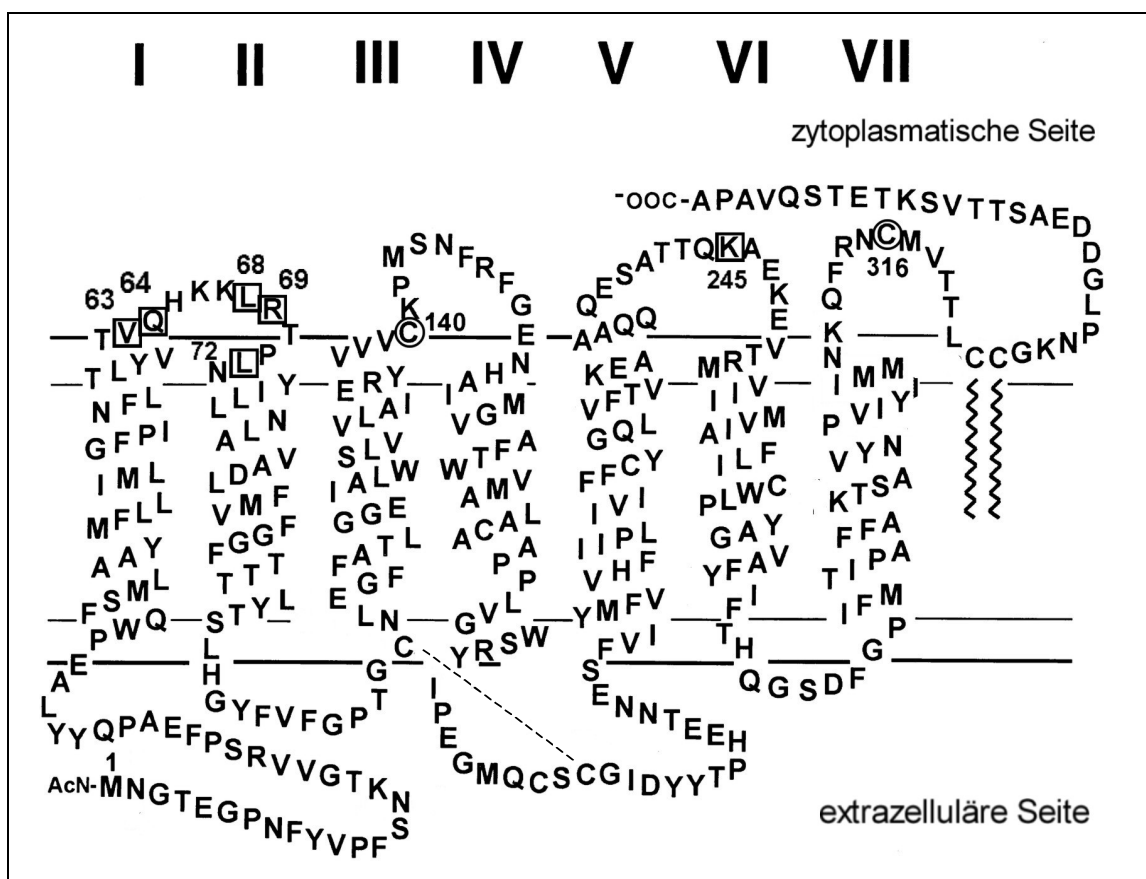


Abbildung 1-4 Sekundärstruktur des Rinderrhodopsins. Die Helices sind durch römische Zahlen unterschieden. Die numerierten kreisförmigen Markierungen kennzeichnen zwei der nativen Cysteinreste. Die numerierten quadratischen Markierungen beschreiben die Positionen der Aminosäurereste, die bei den Mutanten durch Cysteine ersetzt wurden. Die Doppellinien an den Enden der Helices stellen den Membran-Wasser-Grenzbereich dar. Durch die Palmitoylierungen nach Helix VII kommt es zur Ausbildung einer vierten Schleifenkonformation an der zyttoplasmatischen Oberfläche. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Disulfidbrücke [Karnik et al., 1988; Hwa et al., 1999] zwischen Cys-110 und Cys-187.

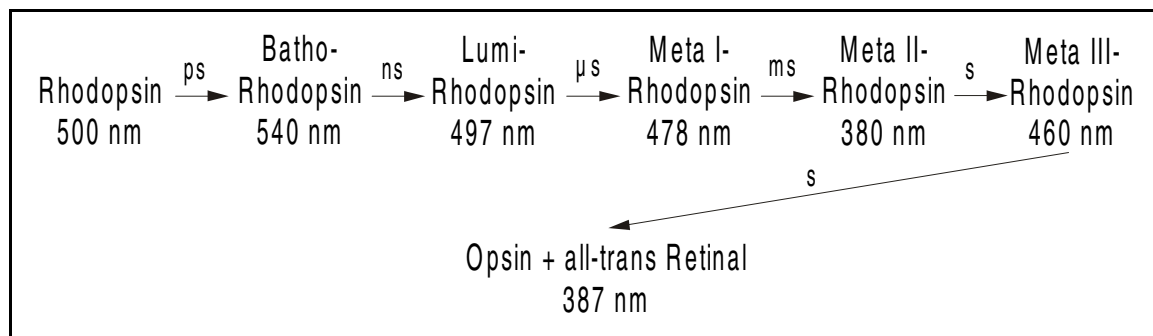


Abbildung 1-5 Vereinfachtes Schema der photolytischen Spaltung des Rhodopsins. Unter den Intermediatsbezeichnungen sind die zugehörigen Absorptionsmaxima angegeben. Die Zeitskalen der Zustandswechsel sind an den Übergangspfeilen zu erkennen.

Der spektroskopisch definierte Intermediatzustand MII [Emeis et al., 1982; Kibelbek et al., 1991] wurde nach einem Modell von Arnis und Hoffmann [Arnis und Hofmann, 1993; Dickopf et al., 1998] in Unterzustände aufgespalten, die sich jedoch spektroskopisch nicht unterscheiden lassen. Arnis und Hoffmann wiesen dabei eine den Zyklus begleitende Protonenaufnahme nach.

Dem MII-Intermediat kommt eine starke funktionale Bedeutung zu, denn es ist die aktive Form des Rezeptors und ermöglicht die Bindung des heterotrimeren G-Proteins Transducin an die zytoplasmatische Oberfläche. Im Grundzustand ist diese Bindungsreaktion nicht möglich. Dagegen konnte nachgewiesen werden, daß Peptidanaloga der zytoplasmatischen Loops die Aktivierung von Transducin ermöglichen [König et al., 1989]. Die photoinduzierte Isomerisierung des Retinals muß also eine Veränderung der zytoplasmatischen Loop-Strukturen zur Folge haben. Es wurden deshalb umfangreiche Experimente unter Verwendung von Proteinmutanten mit nur einem reaktiven Cystein an der zytoplasmatischen Oberfläche durchgeführt.

Mit Hilfe von Elektronenspin-Resonanz-Experimenten (ESR) mit sulfhydrylspezifischen Spin-Markern und durch Reaktivitätstest mit verschiedenen Reagenzien wurde die Zugänglichkeit, die Seitenkettenbeweglichkeit und die Reaktivität der Cysteine in den einzelnen Positionen untersucht. An den Mutanten wurde außerdem die Fähigkeit zur Aktivierung von Transducin überprüft. Um den Einfluß der Photoaktivierung festzustellen, wurden die experimentellen Ergebnisse im Grundzustand mit dem MII-Intermediat verglichen.

Die Positionen 55-75 zwischen Helix I und Helix II wurden von Altenbach et al. und Klein-Seetharaman et al. analysiert [Altenbach et al., 1999b; Klein-Seetharaman et al., 1999a]. Die Experimente zeigten, daß sich die Sequenz 64-71 in wäßriger Phase befand, während die Positionen 56-63 der Helix I und die Positionen 72-75 der Helix II zugeordnet wurden. Die Photoaktivierung verursachte in dieser Region eine geringe Veränderung im Bereich der Helix II.

Die Peptidsequenz zwischen Helix III und Helix VI wurde in den Positionen 136-155 von Farahbakhsh et al. und Ridge et al. untersucht und eine Beteiligung an der Transducin-Kopplung nachgewiesen [Farahbakhsh et al., 1993, 1995; Ridge et al., 1995]. Der interhelikale Bereich der Sequenz in wäßriger Phase wurde hier mit 138-152 angegeben.

Ein wesentliches Resultat der Studien war die photoinduzierte Relativbewegung der Helix III gegenüber dem Proteingerüst, die scheinbar mit einer gleichartigen Bewegung der Helix VI verbunden war [Farrens et al., 1996; Dunham und Farrens, 1999]. Yu und Oprian geben außerdem für vier verschiedene Cystein-Mutanten Disulfidbrückenbildungen an: 140/222, 140/225, 136/222 sowie 136/225 [Yu und Oprian, 1999].

Im interhelikalen V/VI-Loop konnte durch den Austausch verschiedener Aminosäuren ebenfalls eine Beteiligung einzelner Aminosäurenreste sowohl an der Wechselwirkung mit dem G-Protein Transducin als auch mit Rhodopsinkinase beobachtet werden [König et al., 1989; Franke et al., 1990, 1992; Shi et al., 1995].

Im besonderen nahmen Altenbach et al. und Yang et al. in der Peptidsequenz 225-256 einen sukzessiven Austausch der Aminosäuren durch Cysteine vor [Altenbach et al., 1996; Yang et al., 1996a]. Ihre Experimente zeigten zwei Peptidbereiche, die sich in wässriger Phase befanden: 227-231 sowie 250-254. Die Autoren stellten außerdem eine α -helikale Konformation in der mutierten interhelikalen Peptidkette fest.

Der vierte Peptidbereich an der zytoplasmatischen Oberfläche besteht aus der Verbindung von Helix VII und den Palmitoylierungsstellen C322 und C323 sowie aus dem daran anschließenden Rest des C-Terminus. Die Experimente von Altenbach et al. zeigten bei den Positionen 306-314 eine α -helikale Konformation sowie durch die Photoaktivierung verursachte Veränderungen an den Stellen 306, 313 und 316 [Altenbach et al., 1999a]. Die ESR-Experimente an den nativen Cysteinen C316 und C140 von Resek et al. zeigten ebenfalls Verschiebungen nach Lichteinwirkung [Resek et al., 1993]. Yang et al. untersuchten H65C/C316-Mutanten und fanden für den Abstand der an die beiden Cysteinreste gebundenen Spin-Marker im Grundzustand $10 \pm 3 \text{ \AA}$ sowie eine größere Entfernung von $15 \pm 4 \text{ \AA}$ im Intermediat MII [Yang et al., 1996b]. Cai et al. konnten außerdem einen Einfluß der Peptidkette 306-321 auf den Aktivierungsprozeß nachweisen [Cai et al., 1999]. Die Positionen 325-340 nach den Palmitoylierungsstellen sind nach Langen et al. ungeordnet und flexibel [Langen et al., 1999]. Cai et al. fanden zusätzlich Disulfidbrücken in Doppelmutanten zwischen der C-terminalen Position 338 und den im V/VI-Loop befindlichen Positionen 242 und 245 [Cai et al., 1997]. Die Rate der Brückenbildung verringerte sich nach der Photoaktivierung, was auf einen vergrößerten Abstand der Positionen schließen ließ.

Yeagle et al. rekonstruierten die gesamte zytoplasmatische Oberfläche mit synthetischen Peptidanaloga und untersuchten diese mit Zirkulardichroismus (CD)¹¹- und Kernspinresonanztechniken (NMR)¹² [Yeagle et al., 1995a, 1995b, 1996, 1997a, 1997b]. Die Experimente führten zu folgenden Resultaten:

Die freien Polypeptidketten sind auch ohne die angrenzenden Helices strukturiert, was die Bedeutung der Primärstruktur auf die Konformation belegt. Die ersten beiden Loops zwischen Helix I und II sowie zwischen III und IV bilden einander ähnliche β -Kehren (β -turns). Die Polypeptidkette zwischen Helix V und VI besitzt einen helikalen Bereich.

¹¹ circular dichroism

¹² nuclear magnetic resonance

Der vierte an die Helix VII anschließende Loop besteht aus einer anfänglich helikalen Struktur und setzt sich nach den Palmitoylierungsstellen in einer antiparallelen β -Faltblattkonformation fort, die durch eine β -Schleife verbunden ist.

Das aktuelle Bild der Strukturen und Wechselwirkung an der zytoplasmatischen Oberfläche muß im Detail bestätigt und vervollständigt werden. Insbesondere ist die Tertiärstruktur des Rhodopsins bislang nicht geklärt, nicht zuletzt aufgrund der schwer zu realisierenden Kristallisation von Membranproteinen. Es stehen in diesem Zusammenhang nur Daten mit niedriger Auflösung aus Experimenten an 2D-Kristallen zur Verfügung [Schertler et al., 1993; Unger et al., 1997; Krebs et al., 1998]. Baldwin et al. schlugen nach einer Analogiestudie, bei der die Transmembranregionen unter den G-Protein gekoppelten Rezeptoren verglichen wurden, ein allgemeines Strukturmodell dieses Bereiches für die Rezeptorfamilie vor [Baldwin et al., 1993, 1997].

Neben den experimentellen Daten wurden außerdem von Pogozheva et al. und Filizola et al. theoretische Strukturmodelle entwickelt [Pogozheva et al., 1997; Filizola et al., 1999].

