

6 Gleichlichtfluoreszenz

Im folgenden Kapitel werden die Messungen der Gleichlichtabsorptions- und Emissionsspektren dargestellt und diskutiert. Im Abschnitt 6.1 erfolgt ein Überblick über die spektralen Eigenschaften der Fluoreszenzmarker und Proteine. Die Spektren bieten zum einen eine Kontrolle über die Probenreinheit, da eventuell vorhandene Dimere oder Photoprodukte zusätzliche Banden im Spektrum verursachen würden, zum anderen stellen sie eine Referenz für die Spektren der in den Anisotropieexperimenten verwendeten markierten Proteinproben dar. Im weiteren werden die Absorptionsspektren von Bacteriorhodopsin und Rhodopsin in unterschiedlichen Zuständen mit den Emissionsspektren der gebundenen Fluorophore AF und TR verglichen. Der Überlagerungsbereich dieser Spektren ist für den resonanten Energietransfer (RET) von Bedeutung (Kapitel 2.4).

Im letzten Teil des Kapitels 6.1 wird die Abhängigkeit der Fluoreszenzmaxima von der Polarität des Lösungsmittels untersucht. Es wird eine Gegenüberstellung zwischen freien und an die Proteine gebundenen Fluorophoren vorgenommen, um deren Position gemessen an der Polarität der Umgebung festzustellen.

Das zweite Unterkapitel 6.2 beschreibt die Experimente zum diffusionskontrollierten Fluoreszenzquenching. Diese Experimente erlauben Aussagen über die Zugänglichkeit der gebundenen Fluorophore. Es werden bimolekulare Quenchingkonstanten verschiedener Fluorophore an unterschiedlichen Bindungspositionen verglichen. Das gesamte Kapitel 6 wird mit einer Zusammenfassung der Ergebnisse in Abschnitt 6.3 abgeschlossen.

6.1 Gleichlichtspektren und Umgebungspolarität

Alle Gleichlichtspektren wurden mit denen in Kapitel 3.2 beschriebenen Apparaturen unter den Standardmeßbedingungen aufgenommen. Abbildung 6-1 zeigt die Absorptions- und Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzmarker über einem Spektralbereich von 250 - 700 nm. In dieser Abbildung beziehen sich jeweils beide Kurven auf die gleiche Ordinate, die in einer relativen Skalierung dargestellt ist. Alle Fluorophore wurden für diese Untersuchungen kovalent an freies Cystein gekoppelt, um spektrale Bindungseigenschaften in die Messungen mit einzubeziehen. Die in den oberen beiden Bildern gezeigten Proben C-AF und C-TR besaßen einen geringen Stokes Shift, der zu einer starken Überlagerung der Spektren führte. Einen Gegensatz dazu stellte die Probe C-DNZ dar, bei der keine Überlagerung auftrat. Die Stärke der Überlagerung wird durch das Überlagerungsintegral ausgedrückt (Gleichung (2.45)) dessen jeweiliger Wert in Tabelle 4-2 angegeben ist.

Das Auftreten der dargestellten Überlagerung der Spektren führt im besonderen zu zwei Effekten: oberhalb einer kritischen Molekülkonzentration kommt es zum einen zu einer Reabsorption emittierter Photonen innerhalb des Lösungsvolumens und zum anderen tritt bei hinreichend kurzer Distanz mindestens zweier Wechselwirkungspartner strahlungsloser Energie-Homotransfer auf. Letzterer Effekt ist wie im Kapitel 4.3.2 erwähnt für die markierten Proteinproben von Bedeutung, die in der Form von Membranfragmenten untersucht wurden.

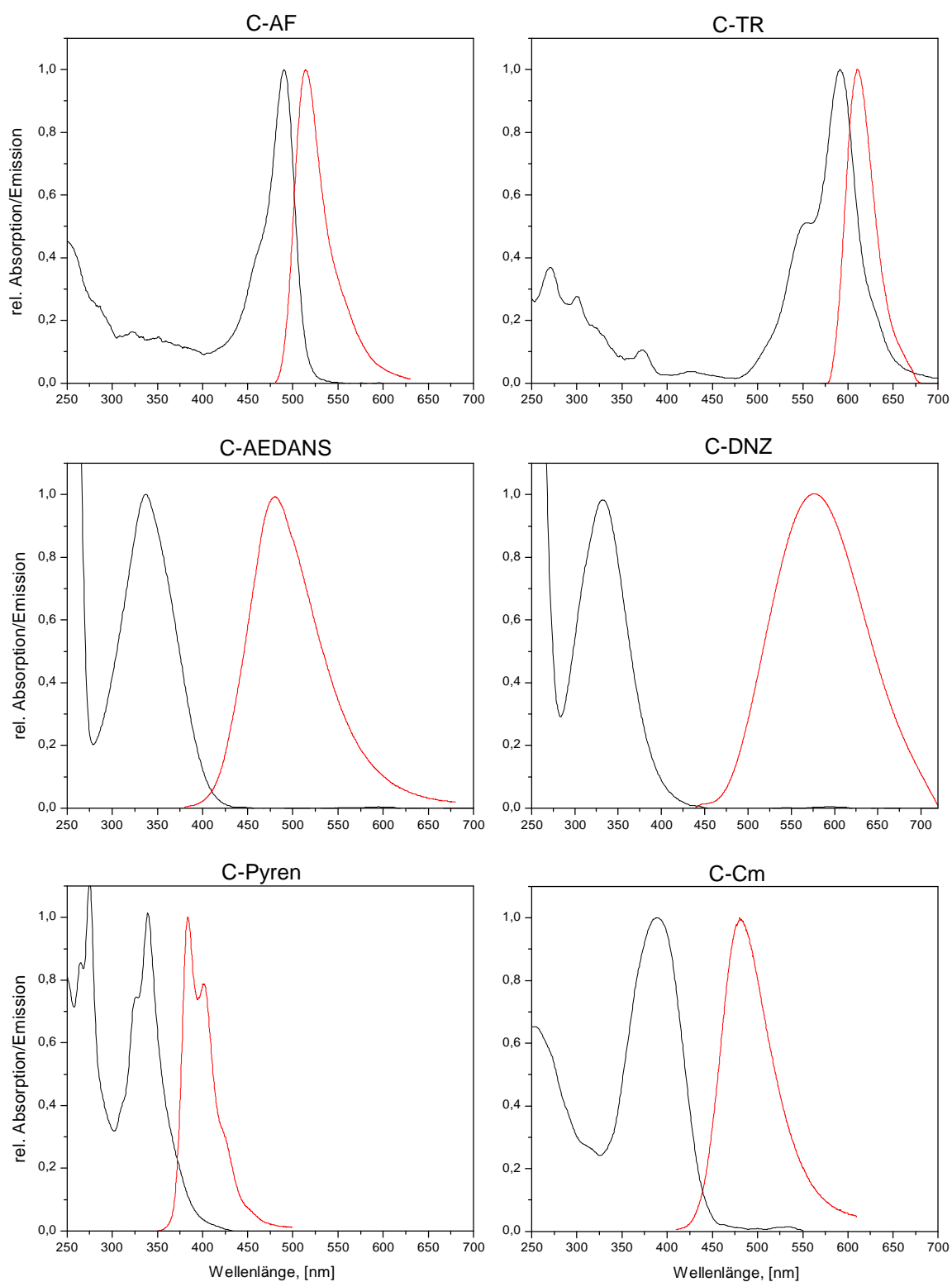


Abbildung 6-1 Absorptions- und Emissionsspektren der an freies Cystein gebundenen Fluoreszenzmarker. Die Fluoreszenzspektren sind bezüglich der spektralen Abhängigkeit der Apparatur korrigiert. Die Messungen wurden bei einem Salzgehalt von 150 mM KCl, 10 mM Tris pH 7 und einer Temperatur von 15 °C durchgeführt.

Neben der spektralen Überlagerung der Emission mit der eigenen Absorption eines Fluorophors ist auch die Überlagerung der Spektren zwischen zwei verschiedenen Chromophoren möglich. Im besonderen besteht die Frage, wie stark sich die Absorption der Proteine mit der jeweiligen Emission der gebundenen Fluoreszenzmarker überdeckt. Abbildung 6-2 zeigt vier verschiedene Absorptionsspektren gemeinsam mit den Emissionen der gebundenen Label Fluorescein und Texas Red.

Die unterlegten Flächen stellen folgende Spektren dar: die Absorptionen des Bacteriorhodopsin im Grundzustand und gebleichten Zustand sowie die des Rhodopsins im Grundzustand und im MII-Intermediat. Aus den rechten beiden Teilbildern läßt sich entnehmen, daß der Energietransfer in den erwähnten Proteinzuständen stark reduziert beziehungsweise völlig unterbunden ist. Dieser spektrale Befund findet sein Äquivalent in den zeitaufgelösten Messungen durch eine entsprechende Erhöhung der Fluoreszenzlebensdauer. Durch eine Gegenüberstellung von Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2 lassen sich in gleicher Weise die RET-Verhältnisse für die restlichen Fluorophore finden.

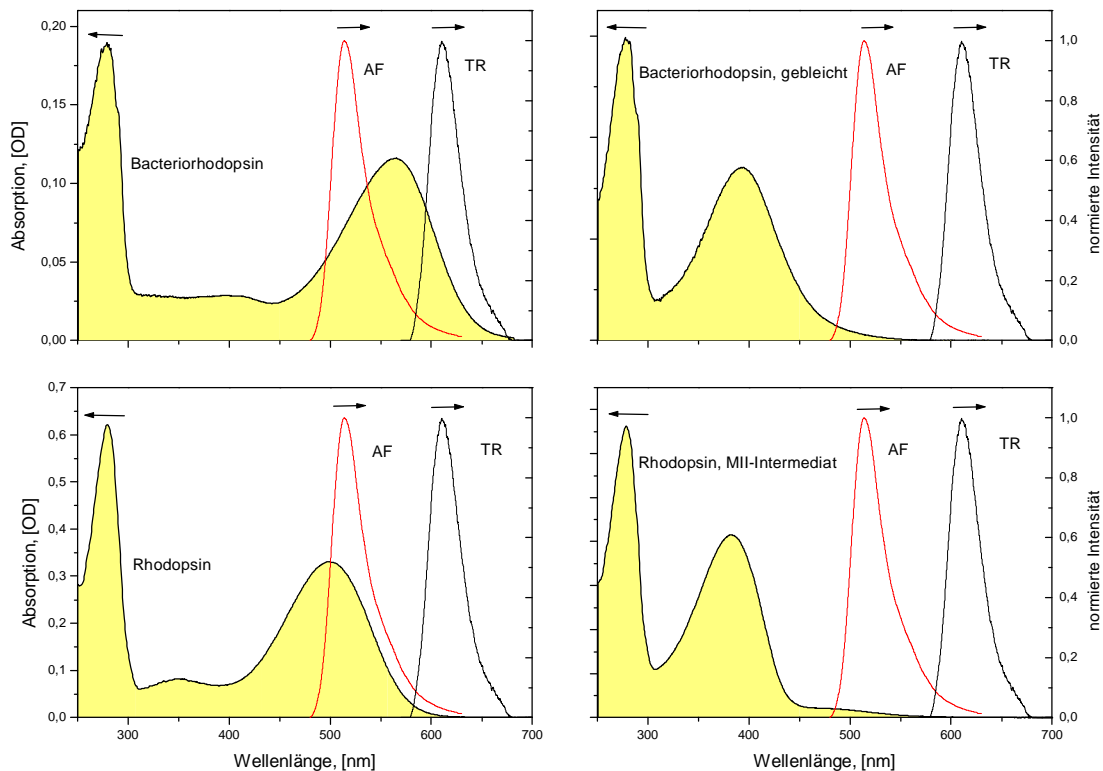


Abbildung 6-2 Dargestellt sind die Absorptionsspektren von Bacteriorhodopsin im Grundzustand (links oben) und im gebleichten Zustand (rechts oben) sowie die von Rhodopsin im Grundzustand (links unten) und im Intermediat MII (rechts unten). In den gleichen Fenstern sind exemplarisch die spektralen Emissionsbanden von gebundenem Fluorescein und Texas Red abgebildet, um die Überlagerungsbereiche zu veranschaulichen.

Die präparative Vorgehensweise zur Verhinderung des Energietransfers bestand beim Bacteriorhodopsin in der Reduzierung der Schiffischen Base des Retinals (Kapitel 3.3). Mit dieser Veränderung der Retinalbindung geht eine spektrale Verschiebung der Retinalabsorptionsbande einher.

Die Abbildung 6-3 enthält zwei Absorptionsspektren von Bacteriorhodopsin-Proben, die unter den dargestellten Verhältnissen bei den Experimenten zur zeitaufgelösten Anisotropie verwendet wurden. Das Absorptionsmaximum des an die Mutante V130C gebundenen Fluoresceins liegt bei 495 nm und ist in beiden Spektren zu erkennen.

Das Bacteriorhodopsin weist im Grundzustand die typische Retinalbande bei 570 nm auf, während nach der Reduzierung der Schiffischen Base ein strukturiertes Spektrum bei 380 nm erscheint. Durch die verursachte spektrale Verschiebung der Absorption wird der Energietransfer zum Retinal bei den Fluorophoren AF, TR, DNZ und Cm unterbunden. Der Vorteil von Proben mit reduzierter Schiffischer Base gegenüber Proben mit gebleichtem Chromophor (Retinaloxim) besteht darin, daß sich in ersteren der Chromophor noch kovalent gebunden in der Bindungstasche befindet.

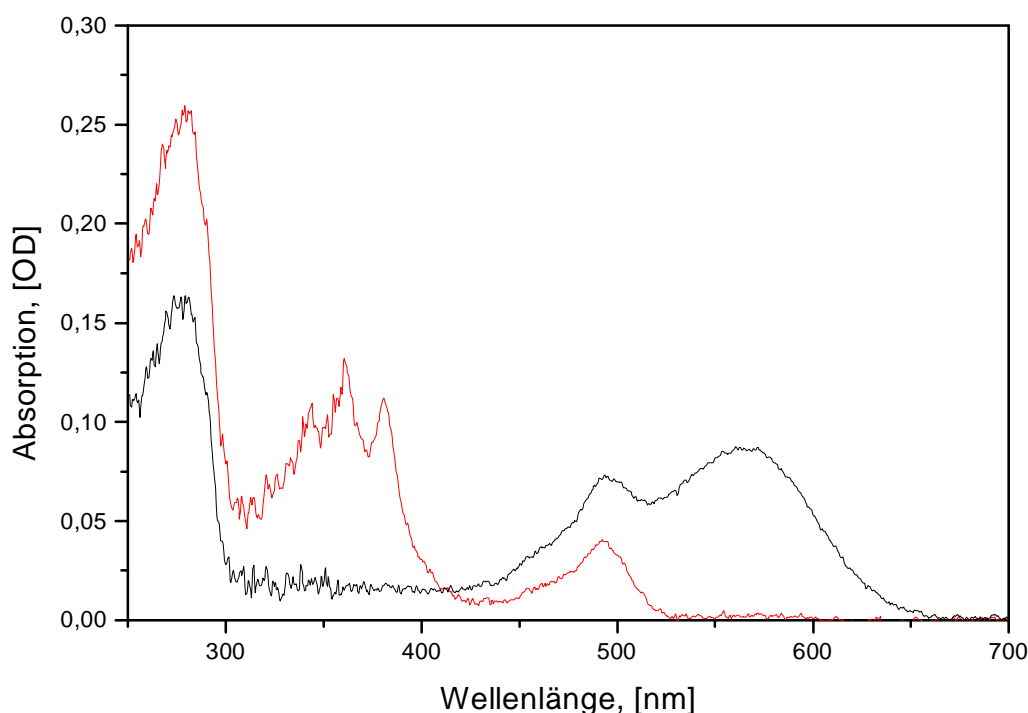


Abbildung 6-3 Absorptionsspektren der mit Fluorescein markierten Bacteriorhodopsin-Mutante V130C vor und nach der Reduzierung der Schiffischen Base des Retinals. Es ist eine starke spektrale Verschiebung der Retinalbande von 570 nm nach 380 nm durch die Reduzierung zu beobachten. Die Bande bei 495 nm entspricht dem Absorptionsmaximum des Fluoresceins.

Die konkreten spektralen Lagen der Emissionsmaxima der extrinsischer Fluoreszenzlabel hängen nicht nur von den elektronischen Fluorophoreigenschaften ab. Es tritt mitunter eine Wechselwirkung mit den die Fluorophore umgebenden Lösungsmittelmolekülen auf. Dieser als Polaritätsabhängigkeit bezeichnete Effekt wurde an den Markern Fluorescein und Texas Red untersucht. Die Abhängigkeiten wurden für die an freies Cystein gebundenen Label durch die Änderung des Mischungsverhältnisses von den unterschiedlich polaren Stoffen Methanol und Wasser gemessen (Abbildung 6-4).

Es wurde vorausgesetzt, daß eine Additivität der die polaren Eigenschaften beschreibenden Dielektrizitätskonstanten bei den Mischungen vorlag [Fernandez und Fromherz, 1977]. In der Abbildung 6-4 sind die λ_{\max} -Werte der Fluoreszenzemissionen von C-AF und C-TR über der Dielektrizitätskonstante aufgetragen.

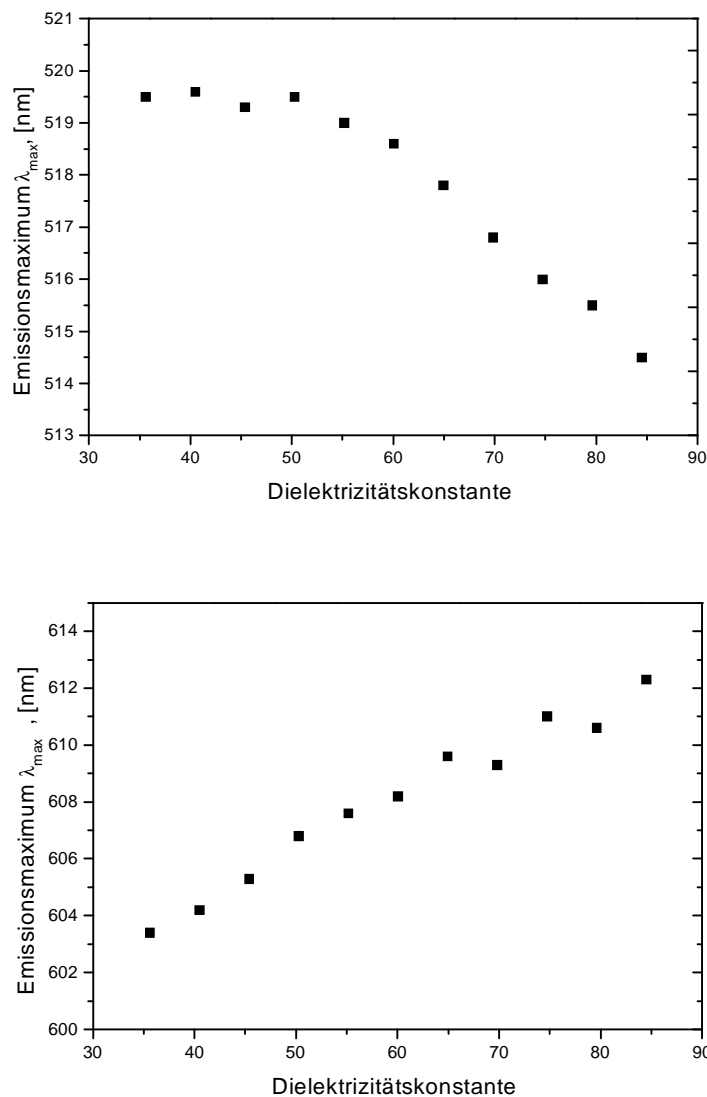


Abbildung 6-4 Abhängigkeit der spektralen Emissionsmaxima von der Polarität der Lösung. Im oberen Bild ist die hypsochrome Abhängigkeit von an freiem Cystein gebundenen Fluorescein (C-AF) dargestellt. Das untere Bild zeigt die bathochrome Verschiebung der Emissionsmaxima von an freiem Cystein gebundenen Texas Red (C-TR). Die Polarität der Lösung wurde durch sukzessives Mischen von Methanol und Wasser variiert [Handbook of Chemistry and Physics, 1986].

Man erkennt eine bathochrome Verschiebung unter Erhöhung der Dielektrizität beim C-TR, während dieser Effekt beim C-AF hypsochrom ist. Diese Grafiken dienen als Eichkurven zur Bestimmung der Polarisierbarkeit der Labelumgebung an der Proteinbindungsstelle. Dazu wurden die Fluoreszenzspektren der in Tabelle 6-1 enthaltenen Proteinproben unter den gleichen Meßbedingungen aufgenommen und deren Maxima auf der Wellenlängenskala bestimmt.

Probe	-AF		-TR	
	$\lambda_{\max} / \text{nm}$	ϵ_{AF}	$\lambda_{\max} / \text{nm}$	ϵ_{TR}
bRV130C-	516,2	72	612,6	87
bRA160C-	516,0	75	612,9	89
ROS-C316-	516,5 (516,6)	71 (70)		
ROS-C140-	516,3 (516,4)	72 (73)		
OG-C316-	518,2 (518,1)	59 (60)	611,5 (611,2)	83 (81)
OG-C140-	518,1 (518,3)	60 (58)	611,3 (611,3)	82 (82)

Tabelle 6-1 Maxima der Fluoreszenzemissionen und die aus den Eichkurven zugeordneten Dielektrizitätskonstanten gelabelter Proteinproben. Die Genauigkeit der Wellenlängenwerte beträgt $\pm 0,3$ nm. Der Fehler für die Dielektrizitätskonstante ϵ wurde unter Annahme dieser Abweichung aus den Eichkurven mit ± 2 entnommen. Als bR-Proben wurden ausschließlich Purpormembranen verwendet. Die Rhodopsin-Proben wurden im dark- und im MII-Zustand (Werte in Klammern) gemessen. Die Spektren wurden bei 20 °C, in 150 mM KCl beziehungsweise 150 mM NaCl (Rho), 10 mM Tris pH 7 aufgenommen. Der OG-Gehalt der Rho-Mizellen betrug 30 mM.

Die tabellierten Dielektrizitätskonstanten zeigen insgesamt hohe Werte in bezug auf die Skala der Abbildung 6-4, was auf ein wäßriges Umgebungsmilieu der gebundenen Label hinweist⁵⁰. Dieser Umstand ist unabhängig von der Labelposition und ebenso unabhängig von der Membranseite, da sich die Position V130C auf der extrazellulären und die A160C auf der zytoplasmatischen Seite der Purpormembranen befinden.

Die Fluorophore an den Rhodopsin-Mizellen weisen in Relation zu den ROS-Membranfragmenten auf eine unpolare Umgebung hin. Im Vergleich der beiden verwendeten Marker untereinander finden sich größere Dielektrizitätskonstanten beim TR gegenüber dem AF. Diese Beobachtung kann mit den unterschiedlichen Bindungsabständen der Fluorophore begründet werden. Das AF hat einen kürzeren Abstand zur Bindungsposition als das TR (Tabelle 3-2). Die TR-Werte zeigen jedoch eine höhere Polarität als die von Wasser, was auf einen systematischen Fehler hindeutet.

Neben dem Rhodopsin-Grundzustand (dark) wurden auch die spektralen Fluoreszenzmaxima der Label im MII-Intermediatzustand bestimmt. Die entsprechenden Werte sind in der Tabelle 6-1 in Klammern dargestellt. Die Proben im MII-Intermediatzustand wiesen innerhalb der Fehlergrenzen keine Änderungen der Emissionswellenlängen auf. Die polaren Eigenschaften in der Umgebung der beiden Label änderten sich somit nicht signifikant beim Übergang in den photoaktiven Proteinzustand.

⁵⁰ Die Dielektrizitätskonstante von Wasser beträgt bei 20 °C $\epsilon = 80,4$ [Handbook of Chemistry and Physics, 1986].

6.2 Diffusionskontrolliertes Fluoreszenzquenching, Zugänglichkeit der gebundenen Fluorophore

Die Methode des Fluoreszenzquenching⁵¹ findet durch einen simplen experimentellen Aufbau, verbunden mit einer Vielzahl an erreichbaren Informationen in verschiedensten biochemischen und biophysikalischen Fragestellungen, ihre Anwendung. In dieser Arbeit wird sie als zusätzliches Experiment angewandt, dessen Resultat in Verbindung mit den anderen Methoden das Verständnis für das mikroskopische Probenverhalten erweitert. Zusätzlich fungieren diese Messungen als Kontrollexperimente für die Zugänglichkeit der gebundenen Fluoreszenzmarker am Protein. Die hier durchgeführten Betrachtungen beschränken sich auf den diffusionskontrollierten Prozeß, der auch als dynamisches Quenching bezeichnet wird.

Das Experiment besteht in seiner einfachsten Form in der Bestimmung der Fluoreszenzintensität I einer Probe unter Variation der Quencherkonzentration $[Q]$. Auf die in die Probenlösung eingebrachten Quencher-moleküle wird durch Stoßwechselwirkung mit den angeregten Fluoreszenzmarkern Energie übertragen. Es sinken die Fluoreszenzlebensdauer und die Intensität der Emission bei sukzessiver Erhöhung der Quencherkonzentration. Der funktionelle Verlauf des Verhältnisses I_0/I über $[Q]$, der Stern-Volmer-Plot (2.66), gibt unter anderem Aufschluß über Wechselwirkungsarten, Aspekte der Konformation, Diffusionsprozesse, effektive Wechselwirkungsradien oder Mehrkomponentensysteme [Gratton et al., 1984; Lakowicz, 1999].

Als Quencher wurden Γ -Ionen gewählt, deren Quenchingeffizienz nahe eins ist [Lakowicz, 1999]. Dieser Quencher besitzt einerseits ein geringes Eigenvolumen und ist andererseits als dynamischer Quencher bekannt [Lehrer und Leavis, 1978; Eftink und Ghiron, 1981; Raymond und Knutson, 1988; Visser et al., 1985]. Die Γ -Ionen dringen nicht in das Proteingerüst ein, der Quenchingprozeß bleibt auf die Fluorophore an der Oberfläche beschränkt [Lehrer, 1971]. Da es sich hierbei um einen Ladungsträger handelt, haben mögliche Coulombwechselwirkungen einen zusätzlichen Einfluß auf die Quenchingraten.

Es wurden die im Kapitel 3.4 beschriebenen IAF-, TR- und Cm-Label als Fluoreszenzmarker verwendet. Die Messung des an ein freies Cystein gekoppelten Fluorescein-Labels bei unterschiedlichen Temperaturen bestätigte eine lineare Abhängigkeit der einfachen Stern-Volmer-Gleichung (2.66).

Das Temperaturverhalten deutet darauf hin, daß es sich um dynamisches Quenching handelt (Abbildung 6-5). Die schnellere Diffusion der Quencher-moleküle bei höheren Temperaturen führt beim dynamischen Quenching zu einer größeren Kontaktrate mit den angeregten Fluorophoren. Bei einer Reduzierung der Quenchingrate durch Temperaturerhöhung, müßte dynamisches Quenching ausgeschlossen werden.

⁵¹ Der Begriff des Quenching bezieht sich hier auf die Relaxation eines Anregungszustandes durch Wechselwirkung mit in der Probenlösung befindlichen Molekülen.

Die Temperaturabhängigkeit der Quenchingrate ist aber kein eindeutiger Beweis für den Charakter des Prozesses. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit temperaturbegünstigter Komplexbildung (statisches Quenching).

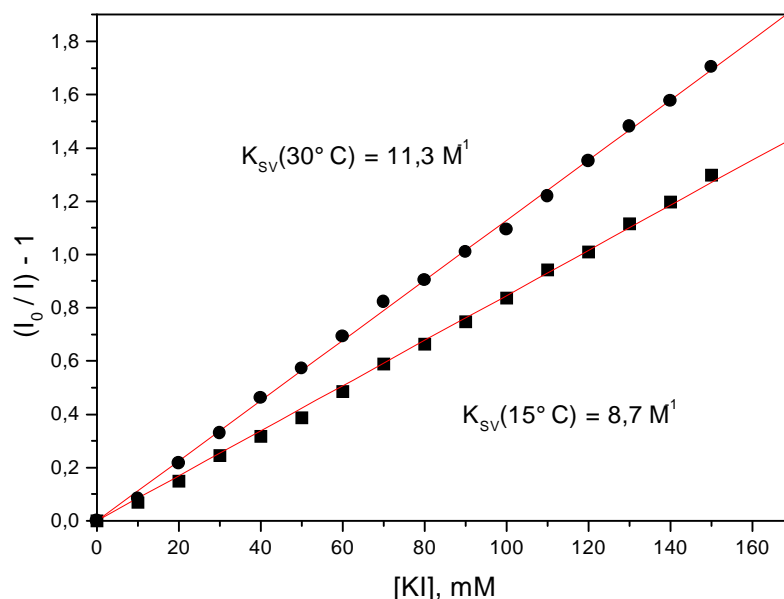


Abbildung 6-5 Stern-Volmer-Plot von an freiem Cystein gebundenen Fluorescein (C-AF) bei zwei verschiedenen Temperaturen. Die Messungen wurden im Gleichlicht bei konstanter Ionenkonzentration in der Lösung durchgeführt. Der stärkere Anstieg bei der höheren Temperatur zeigt, daß es sich um einen dynamischen Quenchingprozeß handelt.

Um eine innerhalb der experimentellen Fehler exakte Linearität zu erreichen, mußte die Ionenkonzentration in der Lösung konstant gehalten werden [Schwehm und Stites, 1998]. Dazu wurden zwei Lösungen mit gleicher Ionenstärke angesetzt. Eine Lösung enthielt die Fluorophore und das nicht quenchende Salz KCl, die andere wurde bei gleicher Fluorophorkonzentration mit KI versehen. Bei der Titration beider Lösungen blieb somit die Gesamtionenstärke konstant, während sich die Quencherkonzentration schrittweise erhöhte. Dieses Verfahren wurde bei allen nachfolgenden Messungen angewandt. Die Experimente wurden, falls nicht anders ausgewiesen, bei 20 °C, einer Pufferkonzentration von 10 mM Tris pH 7 sowie einem Gesamtsalzgehalt von 150 mM durchgeführt. Der Lösung wurden 0,1 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zugegeben, um die Bildung von I_3^- zu unterbinden. Die Zahl der Meßwerte betrug sieben bis fünfzehn⁵². Die in den Tabellen angegebenen Fehlergrößen resultieren aus der Addition des relativen Fehlers der Lebensdauermessung mit dem relativen Fehler aus dem Linearitätsfit der Stern-Volmer-Abhängigkeit.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im folgenden nur die bimolekularen Quenchingkonstanten k_q diskutiert (2.66). In Tabelle 6-2 sind die Ergebnisse für die drei an freies Cystein gebundene Fluorophore zusammengefaßt. Die drei Konstanten sind von der selben Größenordnung, ein Hinweis darauf, daß der Quenchingprozeß für diese Moleküle den selben Charakter trägt.

⁵² Der äquidistante Konzentrationsunterschied von KI betrug 10mM.

Proben	$k_q / 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
C-AF	$2,4 \pm 0,1$
C-TR	$3,1 \pm 0,2$
C-Cm	$2,3 \pm 0,2$

Tabelle 6-2 Bimolekulare Quenchingkonstanten der an freien Cysteinen gebundenen Fluoreszenzmarker Fluorescein, Texas Red und Coumarin.

Es wurden im weiteren Messungen an Purpurmembranen mit unterschiedlichen Markierungsstöchiometrien vorgenommen, um den Einfluß der Markierungsdichte festzustellen (Tabelle 6-3). Die Proben mit niedriger Stöchiometrie wiesen eine geringfügig höhere Quenchingrate als das freie C-AF auf. Dies war unabhängig von der Retinalbindung (dunkel adaptiert / gebleicht) und scheinbar ebenso unabhängig von der Bindungsposition. Die Membranfragmente, bei denen an fast jedes dritte Protein ein Label gebunden wurde, zeigten eine weitere Erhöhung von k_q . Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu einer erwarteten Beschränkung der Zugänglichkeit des Quenchers aufgrund sterischer Faktoren [Schmitz und Schnur, 1972].

Probe	Markierungsstöchiometrie	$k_q / 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	
		Gebleicht	Dunkel adaptiert
A160C-AF	0,05	$3,1 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,4$
V130C-AF	0,11	$2,9 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,2$
A160C-AF	0,31	$5,8 \pm 0,2$	
V130C-AF	0,30	$3,7 \pm 0,2$	

Tabelle 6-3 Bimolekulare Quenchingkonstanten der Purpurmembranen, mittels Hydroxylamin gebleicht oder im dunkel adaptierten Zustand. Die in der zweiten Spalte angegebene Stöchiometrie bezieht sich auf das molare Label-Protein-Verhältnis

Die Tabelle 6-4 enthält die Ergebnisse dreier bR-Mizellenproben. Hier wurden die Label TR und Cm verwendet. Der TR-Label zeigte eine Verringerung der Quenchingrate, die aber ebenso wie bei den Purpurmembranproben nahe dem Wert des an freies Cystein gebundenen Labels in Lösung lag.

Proben	$K_q / 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
A160C-TR	$2,5(\pm 0,1)$
A160C-Cm	$12,2(\pm 0,9)$
V130C-Cm	$15,4(\pm 1,1)$

Tabelle 6-4 Bimolekulare Quenchingkonstanten k_q von Bacteriorhodopsin-Mizellen mit den Fluoreszenzmarkern Texas Red (TR) und Coumarin (Cm). Die Proben befanden sich in 0,1 % CHAPS-Lösung.

Das Coumarin wies am Bacteriorhodopsin eine erheblich größere Quenchingrate als bei dem C-Cm auf. Dieses Verhalten ähnelt den mit Fluorescein markierten Proteinproben. Da diese beiden Labeltypen im Gegensatz zum TR protonierbar sind wird das Quenchingverhalten offenbar von dieser Eigenschaft beeinflusst.

Die Tabelle 6-5 zeigt die Meßergebnisse verschiedener Rhodopsin-Proben in Mizellenform (OG) und als Membranfragmente (ROS). In der Abbildung 6-6 ist ein Stern-Volmer-Plot der in der Tabelle aufgeführten Probe OGC140-TR dargestellt. In der Tabelle 6-5 und der Abbildung 6-6 wird speziell das Quenchingverhalten zwischen dem Grundzustand und dem MII-Intermediat des Rhodopsins verglichen.

Proben	$k_q / 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	
	Grundzustand	MII - Intermediat
OGC316-TR	$2,6 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,5$
OGC140-TR	$1,7 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1$
OGC316-AF	$5,7 \pm 0,7$	$1,5 \pm 0,2$
OGC140-AF	$6,2 \pm 0,8$	$2,0 \pm 0,2$
ROSC316-AF	$5,6 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,4$
ROSC140-AF	$5,9 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,4$

Tabelle 6-5 Vergleich der bimolekulare Quenchingkonstanten k_q der Rhodopsin-Proben im dark/MII-Übergang. Der OG-Gehalt betrug bei den Mizellen 30 mM. In allen Proben befindet sich 10mM MES, pH 6. Die Proben wurden eine Minute lang auf Eis gebleicht.

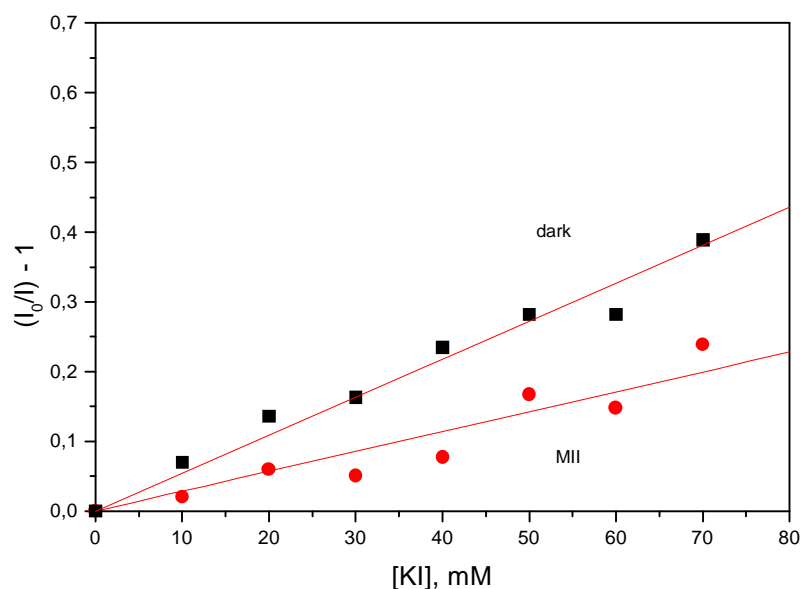


Abbildung 6-6 Stern-Volmer-Plot der Rhodopsin-Probe OGC140-TR im Grundzustand (Quadrate) und im Intermediat MII (Kreise). Die entsprechenden Konstanten sind in der Tabelle 6-5 aufgeführt.

Bei den Experimenten wurde während der Aufnahme eines Meßpunktes im Grundzustand durch die apparative Konstellation 9-11 % der Probe gebleicht. Die Angaben zu den AF-Proben in Tabelle 6-5 stellen Mittelwerte aus mindestens zwei verschiedenen Meßreihen dar. Die mit Fluorescein markierten Rhodopsin-Proben wiesen im Grundzustand des Proteins vergleichbare bimolekulare Quenchingkonstanten k_q auf, wohingegen die Werte im MII-Intermediat voneinander abwichen. Weiterhin ist eine reproduzierbare Tendenz zu kleineren k_q beim Übergang in das Intermediat MII aus der Tabelle 6-5 ersichtlich.

Bei den Proben OGC316-TR und ROSC140-AF ist dieser Effekt gering und fällt unter die Nachweisgrenze. Der direkte Vergleich der markierten Proteine Rhodopsin und Bacteriorhodopsin (Tabelle 6-3, Tabelle 6-4 und Tabelle 6-5) zeigt, daß die bimolekularen Quenchingkonstanten von vergleichbarer Größe sind. Das bedeutet, daß die Quenchingraten vom Fluoreszenzmarker dominiert werden und daß die von dem Quenchingprozeß erfaßbaren Wechselwirkungen an den unterschiedlichen Proteinoberflächen ähnlich sind.

6.3 Ergebnisse

Die Gleichlichtmessungen der Absorptions- und Emissionsspektren zeigten, daß es bei den Fluorophoren, mit Ausnahme des Dansyl-Labels (DNZ) zu einer spektralen Überlagerung der Absorption mit der Emission kam. Durch diese Überschneidung der Absorptions- und Emissionsbanden war ein strahlungsloser Energietransfer unter den gleichartigen Fluorophoren (Homotransfer) möglich. In gleicher Weise zeigten die Emissionsbanden der Fluorophore spektrale Überlagerungen mit den Proteinabsorptionen, was den Prozeß des strahlungslosen Hetero-Energietransfers ermöglichte. Eine Unterbindung des Energietransfers erfolgte durch Veränderungen der Retinalbindung an das Proteingerüst und den damit verbundenen spektralen Verschiebungen der Absorptionsmaxima. Die Veränderungen waren im einzelnen beim Bacteriorhodopsin die Reduzierung der Schiffschens Base [Peters et al., 1976] oder das Bleichen mittels Hydroxylamin und beim Rhodopsin die Photoaktivierung.

Im weiteren wurden die spektralen Lagen der Emissionsmaxima von C-AF und C-TR in Abhängigkeit von der Polarität der Lösung untersucht. Das C-AF zeigte eine hypsochrome und das C-TR eine bathochrome Verschiebung mit steigender Dielektrizitätskonstante der Lösung. Diese Abhängigkeiten wurden zur Bestimmung der Dielektrizitätskonstanten an den unterschiedlichen Bindungspositionen verwendet, um Aufschluß über die Polarisierbarkeit der Labelumgebung im gebundenen Zustand zu erhalten. Das Resultat dieser Experiment war, daß unabhängig vom Protein und von der Bindungsposition ein wäßriges Umgebungsmilieu der Fluoreszenzmarker beobachtet wurde.

Es konnten außerdem keine Veränderungen der polaren Eigenschaften beim Übergang vom Grundzustand in das Intermediat MII des Rhodopsins festgestellt werden. Borochov-Neori und Montal [Borochov-Neori und Montal, 1983a] fanden für vier verschiedene an die zytoplasmatische Seite gekoppelte Fluoreszenzmarker ebenfalls keine Änderung der spektralen Eigenschaften. Dunham und Farrens [Dunham und Farrens, 1998] geben eine hydrophobe Verschiebung des von ihnen verwendeten an der Position V250C gebundenen Biman-Labels (mBB⁵³) an. Dies ist jedoch die einzige von den Autoren gefundene Verschiebung unter insgesamt fünf markierten Mutanten (K248C, E249C, V250C, T251C, R252C).

⁵³ Monobromobimane

Die von den Autoren angegebenen unterschiedlichen Fehlerbereiche bei der Bestimmung der spektralen Maxima von 0,0 nm bis 2,7 nm sowie das Ausbleiben der Verschiebung bei den anderen Positionen bleiben ungeklärt. Durch Quenching-Experimente mit einfach negativ geladenen Iod-Ionen konnte die Zugänglichkeit der ortsspezifisch gekoppelten Fluoreszenzmarker zum Lösungsvolumen bestätigt werden. Es wurde eine die klassische Stern-Volmer-Gleichung (Gleichung (2.66) bestätigende lineare Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses I_0/I von der Quencherkonzentration beobachtet. Die Linearität weist auf die Eindeutigkeit der Wechselwirkung unter Beteiligung von nur einer Klasse von Fluorophoren hin. Dies ist vor allem in Bezug auf das protonierbare Fluoresceinderivat von Bedeutung. Der apparente pK-Wert (pK_{app}) liegt bei der verwendeten Salzkonzentration für C-AF bei $pK_{app} = 6,2$ [Alexiev, 1995]. Obwohl somit bei pH 7 in der Lösung verschiedene Protonierungsformen des C-AF nebeneinander existierten, zeigte sich bis zu einer Konzentration von $[KI] = 150$ mM keine Abweichung von der Linearität. Ein Unterschied in den Quenchingraten der Spezies wurde nicht detektiert.

Die Temperaturabhängigkeit der Quenchingraten von an freiem Cystein gebunden Fluorescein (C-AF) deutet auf einen dynamischen Quenchingprozeß hin. Würden statisches und dynamisches Quenching parallel auftreten, käme es zu einer nichtlinearen Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses von der Quencherkonzentration [Eftink, 1991]. Die gemessene Linearität der Stern-Volmer-Grafik bestätigt demnach die Existenz nur eines Prozesses. Dynamisches Quenching wurde für Iod-Ionen an Tryptophyl [Lehrer, 1971], dem Zellindikator LQZ⁵⁴ [Jayaraman et al., 1999] sowie Pyren in Mizellsystemen [Guan und Tung, 1998] nachgewiesen. Carrero und Voss geben für ein gebundenes Fluoresceinderivat ebenfalls diffusionskontrolliertes Quenching durch Iod-Ionen an [Carrero und Voss, 1996], so daß für das hier verwendete Fluoresceinderivat IAF auf den gleichen Charakter geschlossen wurde.

Die bimolekulare Quenchingkonstante für C-AF betrug $k_q = 2,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Johnson und Yguerabide [Johnson und Yguerabide, 1985] fanden exakt den selben Wert für den freien Fluorophor in Lösung, Eftink et al. [Eftink et al., 1987] geben einen Wert von $k_q = 1,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ an. Bigelow und Inesi fanden für ein Maleimid-Derivate einen Wert von $k_q = 2,13 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [Bigelow und Inesi, 1991].

Durch die sterische Einschränkung der Zugänglichkeit kann k_q beim Koppeln des Labels an ein Makromolekül sinken [Schmitz und Schnur, 1972; Shoup et al., 1981; Johnson und Yguerabide, 1985]. Die Reduzierung von k_q ist von der Größe des Makromoleküls abhängig. Unter der Annahme der vollständigen Zugänglichkeit der Iod-Ionen zum Label ergibt sich für das Molekulargewicht von Bacteriorhodopsin ein theoretisches Verhältnis der entsprechenden Quenchingkonstanten von $k_q(\text{bR-TR})/k_q(\text{TR}) = 0,53$ und für Rhodopsin $k_q(\text{Rho-TR})/k_q(\text{TR}) = 0,51$. Die hier experimentell bestimmten Verhältnisse sind ausschließlich größer⁵⁵. Somit wird die Annahme der vollständigen Exposition des Labels bestätigt, da eine Verringerung der zugänglichen Labeloberfläche das theoretische Verhältnis verkleinern würde.

⁵⁴ Luminarosin

⁵⁵ Beim Rhodopsin wird hier Bezug auf die Werte im Grundzustand genommen.

Die Schlußfolgerung einer fehlenden Beschränkung wird zusätzlich durch die Tatsachen unterstützt, daß die Verschiedenheit der Bindungsstellen auf den unterschiedlichen Membranseiten sowie das Bleichen des Bacteriorhodopsins mit Hydroxylamin keinen Einfluß auf die bimolekulare Quenchingrate haben.

Die höheren Quenchingraten im gebundenen Zustand des Fluoresceins und des Coumarins ebenso wie das verstärkte Quenching bei größeren Markierungsstöchiometrien widersprechen den Vorstellungen einer maximalen Zugänglichkeit des Quenchers bei freien Fluorophoren. Es ist jedoch zu beachten, daß es sich um ein geladenes Quenchemolekül handelt. Attraktive elektrostatische Wechselwirkungen können die Ursache für ein verstärktes Quenching an der Proteinoberfläche sein [Ando und Asai, 1980(a); Ando et al., 1980(b); Miyata und Asai, 1981; Lehrer, 1971].

Der Vergleich zwischen dem Grundzustand und dem Intermediat MII des Rhodopsins führte zu der Beobachtung von kleineren Quenchingraten im Intermediatzustand MII. Dieser Effekt wurde an den Positionen C140 und C316 mit den Markern Fluorescein und Texas Red in verschiedenen Präparationen reproduziert. Borochoy-Neori und Montal [Borochoy-Neori und Montal, 1983a] verwendeten für ihre Quenching-Experimente am Rhodopsin den positiv geladenen Quencher⁵⁶ BP⁺. Für zwei von den vier an die zytoplasmatische Seite gekoppelten Fluoreszenzmarkern geben die Autoren die gleiche Tendenz von verkleinerten Quenchingraten in MII an. Die restlichen zwei zeigen in ihren Experimenten keine Änderungen der Zugänglichkeit. Die Quenching-Experimente mit I⁻ von Dunham und Farrens [Dunham und Farrens, 1998] zeigen dagegen eine größere bimolekulare Quenchingkonstante der markierten Mutante V250C im MII-Zustand. Die erhöhte Zugänglichkeit steht jedoch im Gegensatz zu der von den Autoren gleichzeitig detektierten Verstärkung der Hydrophobizität (siehe oben).

⁵⁶ N-benzylpicolinium

