

# **Untersuchungen zur Struktur und Dynamik der cytoplasmatischen Loopbereiche des G-Protein gekoppelten Rezeptors Rhodopsin**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
vorgelegt am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der  
Freien Universität Berlin

von

Thorsten Mielke

Berlin 2000

Erstgutachter:	Prof. Dr. Maarten P. Heyn
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Ferdinand Hucho
Datum der Disputation:	24.08.2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Maarten P. Heyn im Institut für Experimentalphysik am Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin angefertigt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die G-Protein gekoppelte Signalübertragung	1
1.2 Der primäre Sehprozeß – ein Modellsystem für die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion	2
1.3 Aufbau und Funktion der Photorezeptoren	4
1.3.1 Die Photointermediate von Rhodopsin	5
1.3.2 Lipidzusammensetzung der ROS-Membran	6
1.3.3 Die Struktur von Rhodopsin	7
1.3.4 Die Lichtaktivierung von Rhodopsin	9
1.3.5 Struktur und lichtinduzierte Veränderungen der cytoplasmatischen Oberfläche	11
1.3.6 Die Wechselwirkungen zwischen R* und Transducin	12
1.3.7 Wechselwirkungen zwischen Rhodopsin und anderen Proteinen der visuellen Signaltransduktion	13
1.4 Zielsetzung	14
<b>2 Grundlagen</b>	<b>16</b>
2.1 Grundlagen der Strukturuntersuchung von Proteinen mit Hilfe von Diffraktionsmethoden	16
2.1.1 Einführung	16
2.1.2 Die Streuung von Wellen an Materie	16
2.1.3 Die Streuung am Kristallgitter	18
2.1.4 Fourier-Differenzverfahren	21
2.2 Theoretische Grundlagen der Fluoreszenzanisotropiemessungen	23
2.2.1 Einführung	23
2.2.2 Die Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie	24
2.2.3 Der strahlungslose Energietransfer	29
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>31</b>
3.1 Materialinnachweis	31
3.1.1 Biologisches Material	31
3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	31
3.2 Allgemeine präparative Methoden	31
3.2.1 Isolation von ROS-Membranen aus Rinderaugen	31
3.2.2 Reinigung von Rhodopsin mittels Concanavalin A-Affinitätschromatographie	32
3.2.3 Spektralphotometrische Messungen	32
3.2.4 Bestimmung der Pigmentkonzentration	33
3.2.5 Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese	33
3.2.6 Isolation nativer ROS-Lipide	33
3.3 2D-Kristallisation von Rhodopsin	34
3.4 Charakterisierung der 2D-Kristalle mittels Elektronenmikroskopie	34
3.4.1 Elektronenmikroskopische Übersichtsbilder	34
3.4.2 Kryoelektronenmikroskopie	35
3.4.3 Bildverarbeitung	35
3.4.4 Elektronendiffraktion	37

3.4.5 Referenzphasen aus der Elektronenmikroskopie	38
3.5 Lokalisation von Schweratommarkern mittels Röntgendiffraktion	38
3.5.1 Seitenkettenspezifische Schweratommarkierung in 2D-Kristallen	38
3.5.2 Herstellung multilamellarer Filme von 2D-Kristallen	38
3.5.3 Aufbau des Röntgenexperiments	39
3.5.4 Durchführung der Diffraktionsexperimente	41
3.5.5 Datenanalyse	41
3.6 Seitenkettenspezifische Markierung mit Fluoreszenzmarkern	42
3.6.1 Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzmarker	42
3.6.2 Blockierung von C316 mit 4,4'-Dithiodipyridin	43
3.6.3 Seitenkettenspezifische Markierung der Cysteinreste C140 und C316	44
3.6.4 Limitierte Proteolyse mit Thermolysin	45
3.6.5 Reduktion der Schiff-Base mit Natriumborhydrid	45
3.7 Untersuchung der Dynamik der cytoplasmatischen Loopbereiche von Rhodopsin mit zeitaufgelöster Fluoreszenzanisotropie	45
3.7.1 Das Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung	46
3.7.2 Aufbau der Meßapparatur	47
3.7.3 Durchführung der Messungen	50
3.7.4 Datenauswertung	51
<b>4 Lokalisierung von Aminosäureseitenketten mittels Röntgendiffraktion</b>	<b>52</b>
4.1 Einführung	52
4.2 Zielsetzung und experimentelle Strategie	52
4.3 Kristallisationsexperimente und elektronenmikroskopische Charakterisierung der Proben	54
4.3.1 Reinigung von Rhodopsin für die Kristallisation	54
4.3.2 Kristallisationsexperimente	55
4.3.3 PCMB-Markierung von 2D-Kristallen	59
4.3.4 Elektronendiffraktion	60
4.3.5 Charakterisierung der kristallinen Proben mittels hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie	61
4.4 Durchführung und Ergebnis der Röntgendiffraktionsmessungen	67
4.4.1 Referenzmessungen an 2D-Kristallen von Bacteriorhodopsin	67
4.4.2 Herstellung multilamellarer Filme von Rhodopsinkristallen	69
4.4.3 Röntgenmessungen an Rhodopsinkristallen	70
4.5 Diskussion	80
4.5.1 2D-Kristallisation von Rhodopsin	80
4.5.2 Schweratommarkierung der 2D-Kristalle	83
4.5.3 Elektronenmikroskopische Charakterisierung der 2D-Kristalle	83
4.5.4 Herstellung multilamellarer Filme von Rhodopsinkristallen	84
4.5.5 Datenanalyse	85
4.5.6 Die Position der Schweratommarker	86
4.5.7 Zusammenfassung und Ausblick	89
<b>5 Die Dynamik der cytoplasmatischen Loopbereiche</b>	<b>91</b>
5.1 Einführung	91
5.2 Zielsetzung und experimentelle Strategie	91
5.3 Seitenkettenspezifische Markierung der Cysteinreste C140 und C316	92

5.3.1 Präparation und Reinigung von Rhodopsin	92
5.3.2 Markierung von C140 und C316 mit thiolreaktiven Fluoreszenzmarkern	92
5.4 Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Fluorophore	95
5.4.1 Absorptions- und Emissionseigenschaften	95
5.4.2 Fluoreszenzanisotropiemessungen an freien Fluorophoren	98
5.5 Meßparameter der Anisotropiemessungen an Rhodopsin	100
5.6 Einfluß des Energietransfers auf die Fluoreszenzanisotropie	103
5.6.1 Die Fluoreszenzanisotropie ohne Energietransfer	104
5.6.2 Heteroenergietransfer	106
5.6.3 Homoenergietransfer	107
5.7 Einfluß von Viskosität und Temperatur auf die Fluoreszenzanisotropie	108
5.8 Lichtinduzierte Änderungen der Fluoreszenzanisotropie	111
5.9 Diskussion	115
5.9.1 Seitenkettenspezifische Markierung der Position C140 und C316	115
5.9.2 Der Zerfall der Anisotropie nach Kopplung der Fluorophore an Rhodopsin	115
5.9.3 Der Einfluß von Energietransferprozessen	118
5.9.4 Die Lichtaktivierung des Rhodopsins	119
5.9.5 Zusammenfassung und Ausblick	121
<b>6 Zusammenfassung/Abstract</b>	<b>123</b>

<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>127</b>
-------------------------------	------------

**Anhang:**

Abkürzungsverzeichnis  
Danksagung  
Lebenslauf