

4 Messungen der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie

Den Hauptbestandteil dieser Arbeit bildeten die Untersuchungen zum zeitlichen Verhalten der Fluoreszenzanisotropie ortsspezifisch gebundener Fluorophore. Es wurden verschiedene Fluoreszenzmarker mit unterschiedlichen präparativen und spektroskopischen Eigenschaften verwendet, um das bisher weitestgehend unbekanntes Spektrum an Wechselwirkungen zwischen Protein, Fluorophor und Bindungsposition unter der Variation verschiedener Parameter studieren zu können.

In diesem Kapitel 4 werden die Meßergebnisse unter verschiedenen Gesichtspunkten dargestellt. Zuerst werden die Ergebnisse der ungebundenen Label im Abschnitt 4.1 beschrieben, um einen Vergleich hinsichtlich der Größenordnung der Rotationskorrelationszeiten bei freier Bewegung zu geben. Die darauf folgenden Betrachtungen in Kapitel 4.2 über gebundene Fluorophore beschränken sich im ersten Teil auf Proben, bei denen der strahlungslose Energietransfer vom angeregten Fluoreszenzmarker zum Retinal-Chromophor unterbunden war. Bei diesen Proben sind keine zusätzlichen Annahmen notwendig, um die Ergebnisse im Rahmen der Depolarisation durch Rotationsdiffusion empirisch zu diskutieren. In dem darauffolgenden Kapitel 4.3 wird ein Vergleich der Messungen zwischen Proben mit und ohne Energietransfer gegeben. Im Abschnitt 4.4 werden in der Anisotropiefunktion $r(t)$ enthaltene Parameter diskutiert, die von speziellen Verteilungsmodellen unabhängig sind und somit einen allgemeingültigen Charakter besitzen. Unter der Annahme einer erweiterten Bewegungsgeometrie werden experimentelle Daten in Abschnitt 4.4.2 mit einer theoretischen Anisotropiefunktion angepaßt.

Eine Darstellung des Anisotropieverhaltens unter der Variation verschiedener äußerer Parameter erfolgt in Kapitel 4.5. Im Anschluß daran erfolgt in Kapitel 4.6 eine direkte Gegenüberstellung der Anisotropiemessungen im Grundzustand und im Intermediat MII des Rhodopsins. Der gesamte Komplex wird mit einer Zusammenfassung der Ergebnisse in Kapitel 4.7 abgeschlossen.

4.1 Ungebundene Fluorophore

Die Messungen an freien Fluorophoren dienen in erster Linie ihrer jeweiligen Charakterisierung, da die Größe der Fluorophore einen Einfluß auf den zeitlichen Verlauf der Anisotropie hat. Zur Bestimmung der einzelnen Fluorophorvolumina wurden Viskositätsreihen durchgeführt. Die Geschwindigkeit der Diffusion eines Körpers in einer Lösung ist von deren Viskosität abhängig. Man erwartet daher bei diesen Experimenten eine Verlangsamung der Bewegung bei einer Erhöhung der Viskosität. Das vereinfachte Modell eines sphärischen isotropen Rotors führt dabei direkt zu einem linearen Zusammenhang zwischen der Viskosität und der Rotationskorrelationszeit (Gleichungen (2.21) und (2.22)) der durch die Messungen im wesentlichen bestätigt wurde.

Es wurden Glycerin-Wassergemische verwendet, bei denen oberhalb einer Glycerinkonzentration von 40 % eine Abweichung von dem linearen Verhalten zu beobachten war.

Die Diskrepanzen beruhten auf der zeitlichen Auflösung zusätzlicher Rotationsmodi bei den extrem viskosen Lösungen [Barkley et al., 1981]. Dieses Verhalten traf auf alle verwendeten Labeltypen zu. Die beobachteten Abweichungen von der idealisierten Form sind aufgrund der geringen Labelgröße unter den Standardmeßbedingungen vernachlässigbar. Die Bestimmung der effektiven Volumina V_{eff} erfolgte aus dem linearen Anteil der Abhängigkeiten. In der Tabelle 4-1 sind die Anfangsanisotropie r_0 , die Fluoreszenzlebensdauer τ und die Rotationskorrelationszeit ϕ_{rot} unter Standardbedingungen angegeben.

| | IAF | TR | Cm | IAEDANS | DNZ | Pyr |
|--|-------|-------|-------|-----------------------------|----------------|-----------------|
| $V_{\text{eff}} \pm 0,1$ / 10^{-22}cm^3 | 7,7 | 11,0 | 10,0 | 5,8 | 3,1 | 3,4 |
| $\tau \pm 0,05$ / ns | 4,01 | 4,15 | 1,81 | 2,50 ¹ (14,1) | 2,65 (17,9) | 50 ¹ |
| $\phi_{\text{rot}} \pm 0,02$ / ns | 0,19 | 0,30 | 0,26 | 0,18 | 0,10 | 0,16 |
| $R_0 \pm 0,004$ | 0,376 | 0,385 | 0,378 | 0,220 | 0,305 | 0,250 |

Tabelle 4-1 Parameter ungebundener Label: V_{eff} , das aus den Viskositätsreihen bestimmte effektive Rotationsvolumen, τ , die Fluoreszenzlebensdauer, ϕ_{rot} , die Rotationskorrelationszeit der Fluoreszenzanisotropieanpassung mit einem Exponentialterm, r_0 , die Anfangsanisotropie in 95 % Glycerin bei -1°C . ¹Mittelwert aus zwei Komponenten. Die Werte in den Klammern wurden an gebundenen Fluorophoren gemessen.

Für das in dieser Arbeit als Fluoreszenzstandard verwendete Fluorescein geben Kumke et al. eine Lebensdauer von $\tau = 4,01 \pm 0,05$ ns an [Kumke et al., 1995]. Die Fluoreszenzlebensdauer von IAEDANS wurde als Mittelwert über zwei Abklingzeiten bestimmt³⁵, während die anderen Fluoreszenzen monoexponentiellen Charakter aufwiesen. Die Lebensdauern von IAEDANS und DNZ verlängerten sich im gebundenen Zustand. Die Fluoreszenzeigenschaften dieser Fluorophore werden stark von der jeweiligen Umgebung beeinflusst [Hudson und Weber, 1973]. Chen und Scott [Chen und Scott, 1985] geben für diese beiden Fluorophore, gebunden an Hühnerei Ovalbumine, biexponentielle Verläufe mit mittleren Lebensdauern von 21,2 ns und 18,2 ns an. Für das an eine Kinase gebundene IAEDANS geben Haran et al. biexponentielle Fluoreszenzverläufe mit Mittelwerten von 11,0 – 27,7 ns an [Haran et al., 1992].

³⁵ Eftink et al. [Eftink et al., 1987] geben als Ursache eine Reaktion mit Wasser an.

Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer von Pyren³⁶ variierte zwischen verschiedenen Messungen. Dieser Fluorophor wird von Sauerstoff gequencht, reagiert auf die Umgebungspolarität und neigt zur Excimerbildung [Molecular Probes, 1996; Hiratsuka, 1997]. Die Anisotropieanpassungen zur Bestimmung von ϕ_{rot} wurden mit festgehaltenem r_0 vorgenommen, da die Rotationskorrelationszeiten extrem empfindlich auf Schwankungen dieses Wertes reagierten.

Der jeweilige r_0 -Wert wurde bei einem Gehalt von 95 % Glycerin und einer Temperatur von $T = -1$ °C bestimmt. Unter diesen Bedingungen waren die Bewegungen so stark verlangsamt, daß eine Messung des r_0 -Wertes mit hoher Genauigkeit möglich war. Hamman et al. geben für an Cystein gebundenes IAF und IAEDANS in 90 % Glycerin bei 0 °C Werte von $r_0 = 0,375$ beziehungsweise $r_0 = 0,282$ an [Hamman et al., 1996a]. Hanson et al. geben für ein Dansylchloridderivat (vergleichbar mit DNZ) $r_0 = 0,300$ an [Hanson et al., 1981]. Die Abweichungen vom theoretischen Wert 0,4 können im wesentlichen unterschiedlichen Orientierungen der Übergangsdipolmomente von Absorption und Emission zugeordnet werden.

| | IAF | TR | Cm | IAEDANS | DNZ | Pyr |
|---|------|------|------|---------|------|------|
| $\phi_D \pm 0,05$ | 0,30 | 0,52 | 0,21 | 0,42 | 0,18 | 0,20 |
| $J_{\text{bR}} / 10^{-14} \text{cm}^3 \text{M}^{-1}$ | 33,0 | 19,7 | 13,3 | 8,2 | 36,6 | 4,8 |
| $J_{\text{Rho}} / 10^{-14} \text{cm}^3 \text{M}^{-1}$ | 24,1 | 0,6 | 14,7 | 8,9 | 12,9 | 2,7 |
| $J_{\text{eigen}} / 10^{-14} \text{cm}^3 \text{M}^{-1}$ | 7,3 | 7,9 | 3,7 | 0,1 | 0,0 | 0,6 |

Tabelle 4-2 Relative Quantenausbeute ϕ_D und spektrale Überlagerungsintegrale J , die für die Energietransfermessungen verwendeten gebundenen Fluorophore. Die Integrale J_{bR} und J_{Rho} beziehen sich auf die Überlagerungen der jeweiligen Labelmission mit der Mizellenabsorption des Bacteriorhodopsin und des Rhodopsin. Das Integral J_{eigen} bezieht sich auf den spektralen Überlagerungsbereich der Fluorophorabsorption mit der eigenen Fluorophoremission. Der relative Fehler bei der Bestimmung der Überlagerungsintegrale betrug 5 %. Die Quantenausbeuten ϕ_D sind Mittelwerte aus bR und Rho-Mizellen.

Die Tabelle 4-2 zeigt die relativen Quantenausbeuten der gebundenen Label, die jeweiligen spektralen Überlagerungsintegrale der Labelfluoreszenz mit der Retinal-Absorptionsbande des Bacteriorhodopsins (J_{bR}) beziehungsweise des Rhodopsins (J_{Rho}) im Grundzustand. Für die numerische Berechnung der Überlagerungsintegrale nach Gleichung (2.45) wurden die korrigierten Emissionsspektren der Fluorophore verwendet. Zur Bestimmung der Quantenausbeuten wurden die Integrale unter den Emissionsspektren der Proben ohne Energietransfer mit den spektralen Flächen eines Fluorescein-Standards gleicher optischer Dichte verglichen. In 0,1 M NaOH beträgt die absolute Quantenausbeute des Fluoresceins 0,95 [Brannon und Magde et al., 1978].

³⁶ Aufgrund der langen Lebensdauer überlagerte sich bei diesem Fluorophor die Fluoreszenz aufeinanderfolgender Anregungsimpulse (Abstand 200 ns). Bei den Anisotropieexperimenten wurde das Pyren deshalb nicht verwendet. Der Fluorophor wurde nur in einem Experiment zur Untersuchung der örtlichen Nähe (Excimerbildung) der Rhodopsin Cysteine C316 und C140 benutzt, welches jedoch negativ ausfiel.

4.2 Proben kovalent gebundener Fluorophore ohne Energietransfer

Da die Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ als Meßgröße eine Überlagerung aller möglichen depolarisierenden Prozesse darstellt, mußten die Proben in Hinblick auf ihr 'inneres' Depolarisationsverhalten unterschieden werden. Vor allem der Transfer von Anregungsenergie machte eine solche Differenzierung der Proben, beziehungsweise eine Klassifizierung notwendig.

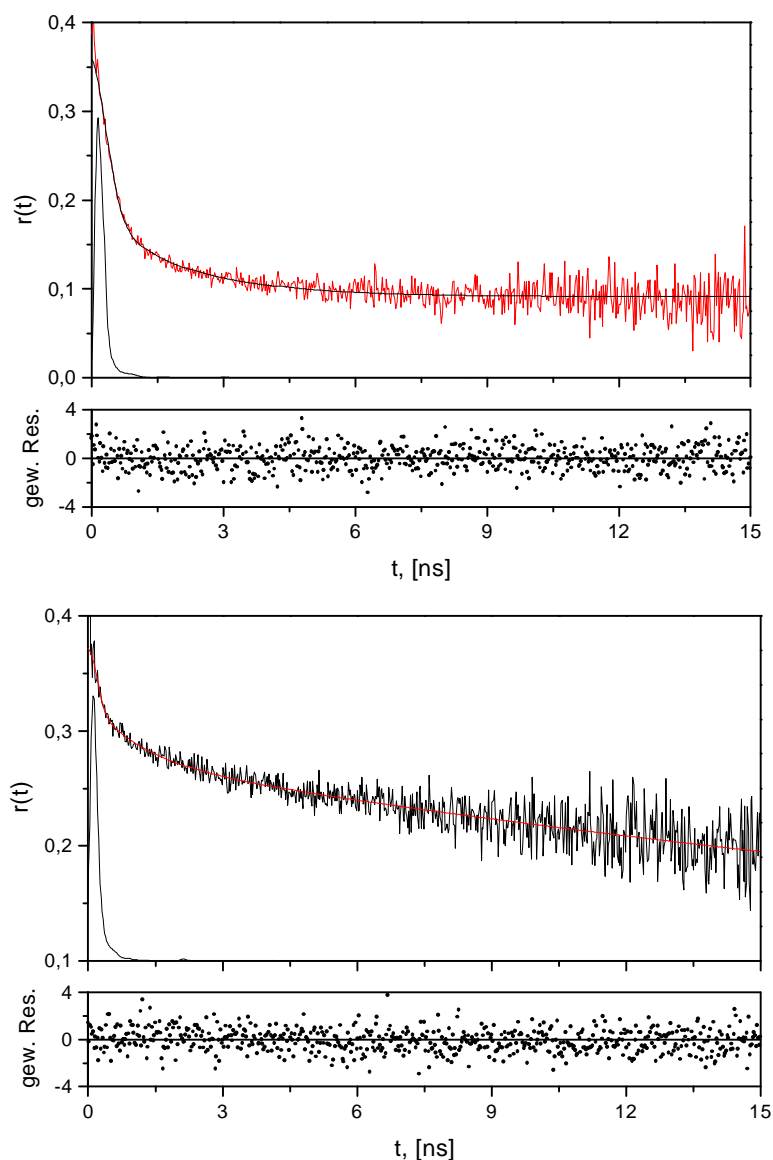


Abbildung 4-1 Anisotropieverlauf des gebleichten Membranfragmentes ROSC140-AF (obere Grafik) sowie der gebleichten Rhodopsin-Mutante OGR69C-AF (untere Grafik) unter Standardmeßbedingungen. Gebleicht bedeutet hier, daß das Retinal aus dem Protein herausgelöst ist. Unter den Kurven ist die Systemantwort $L(t)$ der Messung im linearen Maßstab abgebildet. Unter den Grafiken sind die der Anpassung zugeordneten gewichteten Residuen dargestellt.

Im folgenden Kapitel 4.2 werden die Resultate der zeitaufgelösten Anisotropiemessungen gebundener Fluorophore ohne Energietransfer dargestellt. Die Analyse kann in diesem Fall vollständig auf den Bewegungsprozeß und seine sterischen Beschränkungen reduziert werden. Die Anpassung dieser Meßkurven wurde wie im Kapitel 2.3.1 beschrieben mit einer Summe von Exponentialfunktionen, bei gleichzeitiger Entfaltung mit der Anregungsfunktion $L(t)$, vorgenommen. Als Ergebnis erhielt man eine Anzahl von Amplituden β_i und Rotationskorrelationszeiten ϕ_i . Der größte Teil der Messungen wurde mit den Fluoreszenzlabeln Fluorescein (IAF) und Texas Red (TR) vorgenommen. Die anderen Fluorophore wurden im allgemeinen verwendet, um zusätzlichen Aufschluß über den Eigenanteil der gebundenen Label am Anisotropieverhalten zu erhalten. Typische Meßkurven der Proben ohne Energietransfer sind in der folgenden

Abbildung 4-1 dargestellt. Die unter Standardbedingungen gemessenen Rhodopsin-Proben wurde vor der Messung 1,5 Minuten mit gelben Licht (Kantenfilter OG 485) gebleicht. Die dadurch verursachte Verschiebung des Chromophorabsorptionsmaximums führte zu einer Unterbindung des Energietransfers. Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer dieser Proben betragen 3,73 ns und 3,89 ns, vergleichbar mit der Lebensdauer des ungebundenen Labels. Die Anisotropiekurven des gesamten Probenspektrums besaßen mit wenigen Ausnahmen die selben charakteristischen nicht monoexponentiellen Verläufe.

| A | $\Sigma(\text{amin})$ | r_0 | β_1 | β_2 | β_3 | ϕ_1 / ns | ϕ_2 / ns | ϕ_3 / ns | χ_R^2 |
|-------------------------|-----------------------|-------|-----------|-----------|------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------|
| bRV130C-AF ¹ | 6 | 0,35 | 0,05 | 0,06 | 0,24 | 0,34 | 3,1 | 39 | 1,01 |
| bRA160C-AF ¹ | 8 | 0,37 | 0,12 | 0,10 | 0,15 | 0,18 | 1,8 | 30 | 1,19 |
| bRS35C-AF ¹ | 6 | 0,38 | 0,10 | 0,08 | 0,20 | 0,19 | 1,9 | 33 | 1,14 |
| OGC316-AF ² | 11 | 0,35 | 0,07 | 0,07 | 0,21 | 0,14 | 2,6 | 46 | 1,04 |
| OGR69C-AF ² | 9 | 0,36 | 0,05 | 0,04 | 0,27 | 0,13 | 1,5 | 45 | 1,09 |
| B | $\Sigma(\text{amin})$ | r_0 | β_1 | β_2 | r_∞ | ϕ_1 / ns | ϕ_2 / ns | | |
| bRV130C-AF ¹ | 6 | 0,34 | 0,12 | 0,07 | 0,15 | 0,39 | 4,7 | | 1,20 |
| bRA160C-AF ¹ | 8 | 0,37 | 0,16 | 0,06 | 0,15 | 0,24 | 4,2 | | 1,08 |
| bRS35C-AF ³ | 6 | 0,37 | 0,18 | 0,07 | 0,12 | 0,28 | 3,0 | | 1,00 |
| ROSC316-AF ² | 11 | 0,37 | 0,15 | 0,08 | 0,14 | 0,18 | 2,7 | | 1,21 |

¹mit Hydroxylamin gebleicht, ²im MII-Intermediat ³reduzierte Schiff'sche Base

Tabelle 4-3 Parameter der Anisotropieanpassungen. Messungen des Fluoresceinderivates an Bacteriorhodopsin- und Rhodopsin-Mizellen (A) sowie an Purpirmembranen und ROS-Membranfragmenten (B). Es bedeuten r_0 die Anfangsanisotropie, β_i die Amplitude des i -ten Exponentialterms, r_∞ die Endanisotropie und ϕ_i die Rotationskorrelationszeit des i -ten Exponentialterms. In der ersten Spalte ist die Zahl der Aminosäurereste $\Sigma(\text{amin})$ des zugehörigen Loops angegeben.

Die Anisotropiekurven unterschieden sich hinsichtlich des Langzeitcharakters zwischen Mizellen und Membranfragmenten. Während die Mizellenrotation auf der beobachteten Zeitskala noch detektierbar war, führte die um zwei Zehnerpotenzen langsamere Diffusion der Membranfragmente zu einem konstanten von Null verschiedenen Anisotropiewert (Abbildung 4-1).

Die empirische Anpassung erfolgte bei den Mizellen mit zwei bis drei Exponentialfunktionen und bei den Membranfragmenten mit ein bis zwei Exponentialfunktionen und einer Endanisotropie. Tabelle 4-3 enthält Fitparameter mit dem Fluoresceinderivat IAF gelabelter Proben unter Standardmeßbedingungen.

Die Rubrik A in Tabelle 4-3 enthält Bacteriorhodopsin- und Rhodopsin-Mizellen, die Rubrik B, Purpurchromophore und ein ROS-Membranfragment. Die Fitparameter zeigen, daß es eine Übereinstimmung des prinzipiellen Anisotropieverlaufs zwischen den Proben unabhängig vom Protein und von der Bindungsposition gibt. Die Proben weisen zwei zeitlich getrennte Komponenten des Anisotropieverlaufs auf, eine auf der Pikosekunden- und eine weitere auf der Nanosekunden-Zeitskala. Bei den Mizellen ließ sich zusätzlich eine Langzeitkomponente messen, die aufgrund ihrer Größenordnung der Gesamtrotation zugeordnet wurde. Die Berechnung des Volumens von OG-Mizellen erfolgte mit Hilfe der Rotationskorrelationszeit nach den Gleichungen (2.21) und (2.22). Vorausgesetzt wurde eine Zylinderform, die sich aus dem zylindrischen Protein mit einem Radius von 15 Å und einem Detergenzzylindermantel zusammensetzte. Mit einem C-C-Bindungsabstand von 1,5 Å [Stryer, 1990] und einem Durchmesser der Kopfgruppe von 3 Å ergab sich eine Detergenzlänge (OG) von 15 Å die zum Proteinradius addiert wurde. Unter der Annahme einer Höhe von 40 Å und einem Gesamtradius von 30 Å berechnete sich eine Rotationskorrelationszeit von 31 ns. Die Formeln (2.21) und (2.22) gelten jedoch nur für kugelförmige Rotoren. Die Differenz zu den gemessenen Werten läßt sich auf die Asymmetrie zurückführen.

Die aus Tabelle 4-3 ersichtliche Streuung der Anfangsanisotropie r_0 wurde in späteren Untersuchungen durch das Festhalten dieses Parameters unterdrückt. Hier wird die meßtechnische Grenze bezüglich des Auflösungsvermögens extrem schneller Prozesse deutlich. Die Untersuchung einer großen Menge von Datensätzen zeigte, daß sowohl die meßtechnischen Fehler als auch die durch die Fits entstandenen Abweichungen konsequent vernachlässigbar gegenüber den präparativen Einflüssen waren. Das Problem dieser 'biologischen Streuung' konnte zum Teil durch Mittelung über mehrere Präparationen reduziert werden. Bei den hier betrachteten Proben ohne Energietransfer wurde vorausgesetzt, daß der Vorgang des Bleichens oder die Reduzierung der Schiffchen Base die wesentliche Struktur der Proteinproben unverändert ließ.

Unter dieser Prämisse ließen sich folgende reproduzierbare qualitative Aussagen finden:

- 1.) Die Größenordnung der kürzesten Komponente ϕ_1 ist vergleichbar mit der Rotationskorrelationszeit des ungebundenen Labels in Lösung (Tabelle 4-1).
- 2.) Die zweite Zeitkomponente birgt keinen reproduzierbaren Zusammenhang mit der Loopgröße, $\Sigma(\text{amin})$ in Tabelle 4-3, so daß in dieser Hinsicht keine einfache Zuordnung der Rotationskorrelationszeit erfolgen kann.
- 3.) Die Mizellenrotationskorrelationszeit ϕ_3 ist mit dem effektiven Volumen der Proteinproben korreliert und liegt in der erwarteten Größenordnung.
- 4.) Bei den Mizellen dominiert die Gesamtrotation die Depolarisation, die Summe aus β_1 und β_2 ist kleiner als bei den Membranfragmenten.
- 5.) Vergleichbare Endanisotropien an unterschiedlichen Bindungsstellen deuten darauf hin, daß dieser Parameter durch die Größe des Fluoresceins bestimmt wird.

Die Tabelle 4-4 zeigt zum Vergleich weitere markierte Proben. Die Anfangsanisotropie r_0 ist bei diesen Anpassungen im Vergleich mit den Werten aus Tabelle 4-3 zum Teil reduziert. Im Gegensatz zum Fluorescein scheint die kovalente Kopplung des Texas Red eine Veränderung der Lagen der Übergangsdipolmomente zu verursachen. Die Rhodopsin-Proben OGC316-TR, OGC316-DNZ und ROOSC140-AEDANS wiesen nur zwei Fit-Terme auf. Die kleinere Rotationskorrelationszeit der mit DNZ markierten Mizellen lag im Nanosekundenbereich und wurde deshalb in Tabelle 4-4 ϕ_2 zugeordnet.

| Mizellen | r_0 | β_1 | β_2 | β_3 | ϕ_1 / ns | ϕ_2 / ns | ϕ_3 / ns | χ_R^2 |
|---|-------|-----------|-----------|------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------|
| A | | | | | | | | |
| bRS35C-TRm ^{1,2} | 0,31 | 0,07 | 0,04 | 0,20 | 0,17 | 2,0 | 41 | 1,01 |
| OGC316-TRm ¹ | 0,26 | 0,08 | 0,04 | 0,14 | 0,15 | 1,9 | 31 | 1,16 |
| OGC316-TR | 0,29 | 0,05 | | 0,24 | 0,43 | | 36 | 1,22 |
| OGC316-DNZ ³ | 0,30 | | 0,05 | 0,25 | | 1,4 | 50 | 1,00 |
| B | r_0 | β_1 | β_2 | r_∞ | ϕ_1 / ns | ϕ_2 / ns | | χ_R^2 |
| ROOSC140-Cm ³ | 0,35 | 0,10 | 0,06 | 0,19 | 0,58 | 6,2 | | 1,15 |
| ROOSC140-AEDANS ³ | 0,21 | 0,12 | | 0,09 | 0,51 | | | 1,09 |
| ¹ TR-Maleimide-Derivat, ² reduzierte Schiffsbasis, ³ gebleicht | | | | | | | | |

Tabelle 4-4 Parameter der Anisotropieanpassungen. Messungen der mit unterschiedlichen Fluorophoren markierten Proteine Bacteriorhodopsin und Rhodopsin. A: Mizellen; B: Membranfragmente. Es bedeuten r_0 die Anfangsanisotropie, β_i die Amplitude des i -ten Exponentialterms, r_∞ die Endanisotropie und ϕ_i die Rotationskorrelationszeit des i -ten Exponentialterms.

Ebenso wie bei den Fluorescein-Mizellen dominierte die dritte Amplitude das Depolarisationsverhalten, während die ersten beiden Amplituden der schnelleren Bewegungsmodi einen geringeren Anteil an der Gesamtbewegung besaßen. Die bei den Maleimid-Proben bestimmte zweite Rotationskorrelationszeit lag in der gleichen Größenordnung wie die der mit Fluorescein markierten Proben.

4.3 Proben gebundener Fluorophore unter Einfluß des Energietransfers

Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzanisotropie ist grundsätzlich das Resultat einer Überlagerung aller beteiligten depolarisierenden Prozesse. Es war deshalb notwendig, die verschiedenen Einflüsse zu charakterisieren und deren Größenordnung zu bestimmen. Die Hauptprobenmenge dieser Arbeit stellten solche Proben dar, bei denen strahlungsloser Energietransfer (RET) auftrat. Da die Proteinabsorptionen einen durchgängigen Bereich von der Proteinbande bei 280 nm bis hin zu den Ausläufern der Retinalabsorptionen oberhalb von 600 nm umfaßte, kam es zu einer spektralen Überdeckung mit den Emissionen der Fluoreszenzmarker. Zusätzlich existierte bei den meisten Fluorophoren eine spektrale Überlagerung der eigenen Absorption und Emission, wodurch bei hinreichend nahen Abständen die Möglichkeit des Homotransfers gegeben war.

Der Energietransfer ist bei den Mizellen intramolekularer Natur, bei den Membranfragmenten handelt es sich dagegen um eine komplexe Energiemigration in einem zweidimensionalen System. Die Wirkung des RET auf die zeitliche Charakteristik der Fluoreszenzanisotropie hängt von den Verhältnissen zwischen Fluoreszenzlebensdauer, den Diffusionskonstanten sowie der Energietransferrate ab.

4.3.1 Energie-Heterotransfer

Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3 zeigen Anisotropiekurven der markierten Bacteriorhodopsin-Mutanten bRA160C-AF beziehungsweise bRS35C-AF im Grundzustand (mit RET) und unter Reduzierung der Schiffischen Base des Retinals (ohne RET). Die Messungen wurden an Mizellen sowie an Purpurchmembranen durchgeführt. Die Anisotropiekurven sind hier auf einer normierten logarithmischen Skala dargestellt.

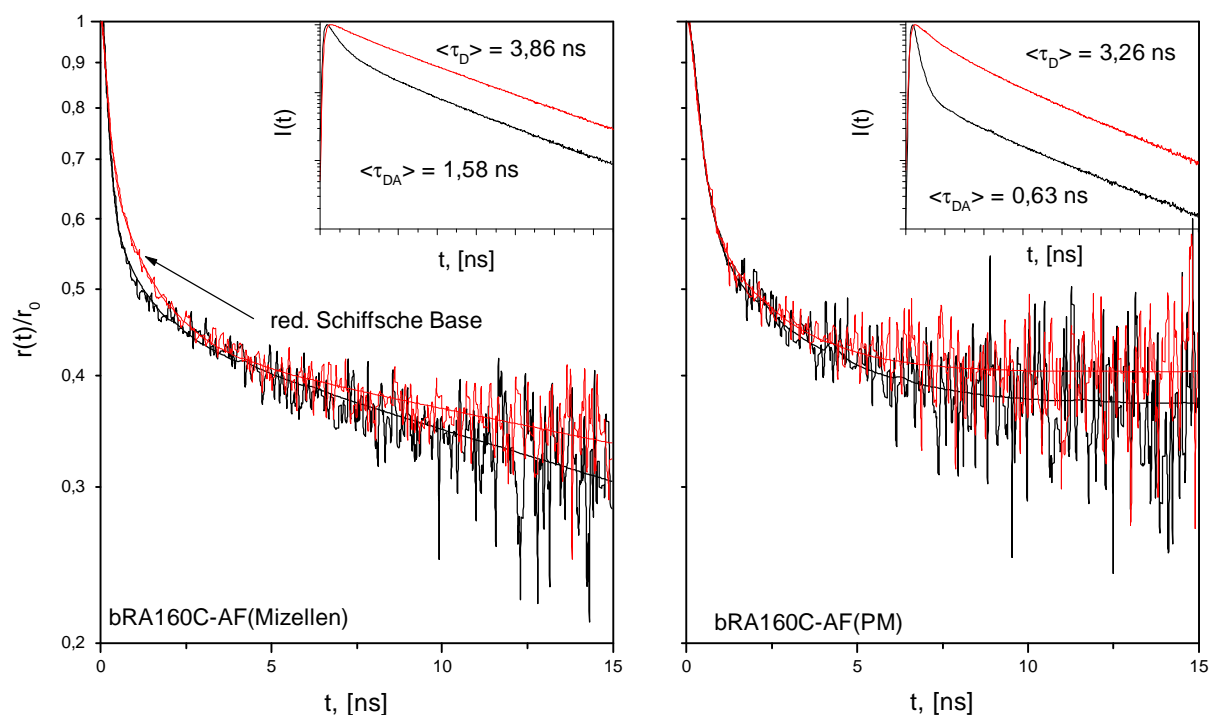


Abbildung 4-2 Vergleich der normierten Anisotropiekurven der markierten Bacteriorhodopsin-Mutante A160C-AF im Grundzustand und mit reduzierter Schiffischer Base (gepunktete Linien). Im linken Fenster sind die Anisotropien der Mizellen und im rechten die der Purpurchmembranen dargestellt. Zusätzlich sind die Verläufe der Fluoreszenzintensitäten in den oberen Fenstern verkleinert abgebildet.

Diese Darstellungsform vereinfacht die Vergleichbarkeit durch einen gemeinsamen Anfangswert und verstärkt gleichzeitig sichtbare Abweichungen im Mittel- und Langzeitbereich durch die logarithmische Auftragung. Im oberen Teil der Abbildungen ist in verkleinerter Form der zugehörige Intensitätsverlauf der Fluoreszenz $I(t)$ über der Zeit dargestellt.

In diesen Fenstern stellt die obere Kurve das Verhalten ohne und die untere Kurve den Verlauf mit RET dar. Es ist deutlich das unterschiedliche Abklingen der Intensität $I(t)$ zwischen den Probenotypen erkennbar. Die Membranfragmente weisen bei gleicher Bindungsposition einen scheinbar stärkeren Energietransfer auf als die Mizellen. Aufgrund der Energiemigration zwischen den Fluorophoren an der Membranoberfläche weicht der Verlauf von $I(t)$ vom monoexponentiellen Charakter ab. In den Abbildungen 4-2 und 4-3 sind geringe Unterschiede in den Anisotropieverläufen der Mizellen zu erkennen. Die Differenzen zwischen den Kurven mit und ohne Energietransfer unterscheiden sich dabei zwischen den beiden Proben bRA160C-AF und bRS35C-AF.

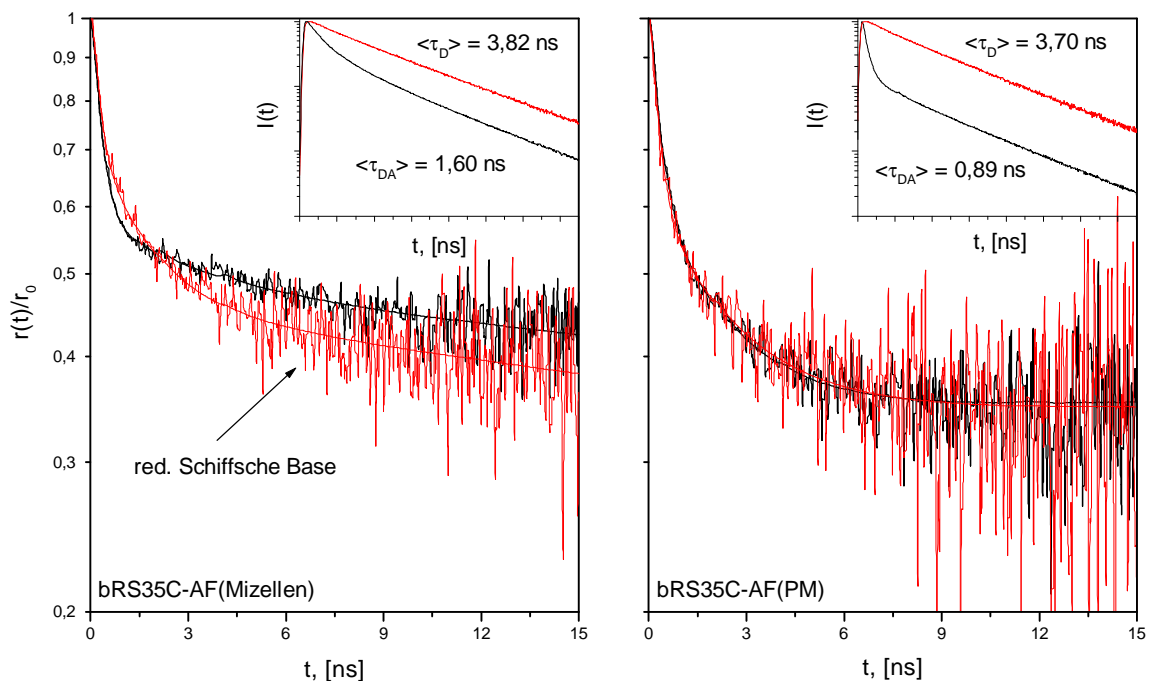


Abbildung 4-3 Normierte Anisotropiekurven der markierten Bacteriorhodopsin-Mutante S35C-AF im Grundzustand und mit reduzierter Schiffischer Base (gepunktete Linien). Im linken Fenster sind die Anisotropien der Mizellen und im rechten die der Purpormembranen dargestellt. In den oberen Fenstern sind zusätzlich die Verläufe der Fluoreszenzintensitäten verkleinert abgebildet.

Die Purpormembranen zeigen dagegen keine signifikante Veränderungen. Da in beiden Systemen der Energietransfer auf die selbe Art unterbunden wurde kann angenommen werden, daß der Einfluß des Energie-Heterotransfers vernachlässigbar ist.

Die Veränderungen der Mizellen wurden vermutlich durch den präparativen Vorgang der Reduzierung der Schiffischen Base des Retinals verursacht. Als Konsequenz dieser Beobachtung wurden die Proben bei den Experimenten zur Variation äußerer Parameter (Kapitel 4.5) nicht mehr hinsichtlich mit und ohne RET unterschieden.

4.3.2 Energie-Homotransfer

Der als resonanter Energie-Homotransfer bezeichnete Prozeß gleichartiger Fluorophore tritt unter der Voraussetzung auf, daß ein hinreichend geringer Stokes Shift des elektronischen Überganges vorhanden ist. Unter dieser Bedingung kommt es zu einer spektralen Überlagerung der Absorptionsbanden mit den eigenen Emissionsbanden. Die Effizienz des Energie-Homotransfers ist neben der Stärke der spektralen Überlagerung, ebenso wie der Energie-Heterotransfer, vom Abstand und der Orientierung der wechselwirkenden Übergangsdipolmomente abhängig. Der Homotransfer kann im besonderen durch Anregung im langwelligen Bereich der Absorptionsbande verhindert werden [Weber und Shinitzky, 1970]. Die Fluoreszenzemission des durch die Photoselektion orientiert angeregten Fluorophors wird auch beim Homotransfer durch die Energieübertragung zu einem willkürlich orientierten Nachbarn depolarisiert. Um so mehr Möglichkeiten der Wechselwirkungen durch nächste Nachbarn bestehen, um so stärker ist die Gesamtdepolarisation. Der Prozeß des Energietransportes ist aber im Gegensatz zum Heterotransfer reversibel. Im folgenden Kapitel wurde der Einfluß des Homotransfers auf den Verlauf der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie in intramolekularen und zweidimensionalen Systemen untersucht. Bei den intramolekularen Systemen, wurden auf der Grundlage einer theoretischen Modellierung der Anisotropiefunktion $r(t)$ (Kapitel 2.4.3) Abstandverhältnisse zwischen den wechselwirkenden Übergangsdipolmomenten bestimmt.

intramolekularer Homotransfer

Da natives Rhodopsin über zwei reaktive Cysteine verfügt (Kapitel 3.4), bestand die Möglichkeit, den intramolekularen Homotransfer ohne den zusätzlichen Aufwand von Punktmutationen zu beobachten. Die Reaktionsbedingungen wurden darauf ausgerichtet, daß die auf der zytoplasmatischen Seite zugänglichen Cysteinreste C140 und C316 gleichermaßen, im Verhältnis 1:1 markiert wurden. Um den Homotransfer als isolierten Prozeß zu untersuchen, wurden mit Ausnahme der mit Texas Red (TR) markierten Rhodopsin-Proben nur gebleichte Proben oder Proben mit reduzierter Schiffscher Base (rR) untersucht. Dadurch wurde der Retinal-Chromophor in seiner Akzeptorfunktion ausgeschlossen. Die TR-Proben fungierten als Nachweis dafür, daß es sich bei dem beobachteten Phänomen um kein präparatives Artefakt handelte. In Abbildung 4-4 sind zwei Paare von Rhodopsin-Mizellen unter den Standardmeßbedingungen dargestellt: OGC316-AF(rR), OGC316-AF/C140-AF(rR), OGC316-TR, OGC316-TR/C140-TR.

Die Anisotropiefunktion $r(t)$ wurde bei den einfach gelabelten Proben durch die Diffusion des Label-Loop-Konstruktes und bei den zweifach gelabelten Proben durch eine Überlagerung dieser Bewegung mit dem Homotransfer bestimmt³⁷. Die Abbildung 4-4 zeigt eine verstärkte Depolarisation der Proben mit Energie-Homotransfer gegenüber denen mit fehlender Wechselwirkung zwischen den beiden Fluorophoren.

³⁷ Die Probe OGC316-TR zeigt wie bereits im Kapitel 4 angegeben nur zwei zeitlich getrennte Komponenten.

Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer unterschied sich zwischen den Proben innerhalb der Fehlergrenzen nicht. Die Homotransfer zwischen zwei identischen Fluorophoren sollte auch nicht zu einer Abnahme der Lebensdauer führen [Runnels und Scarlata, 1995].

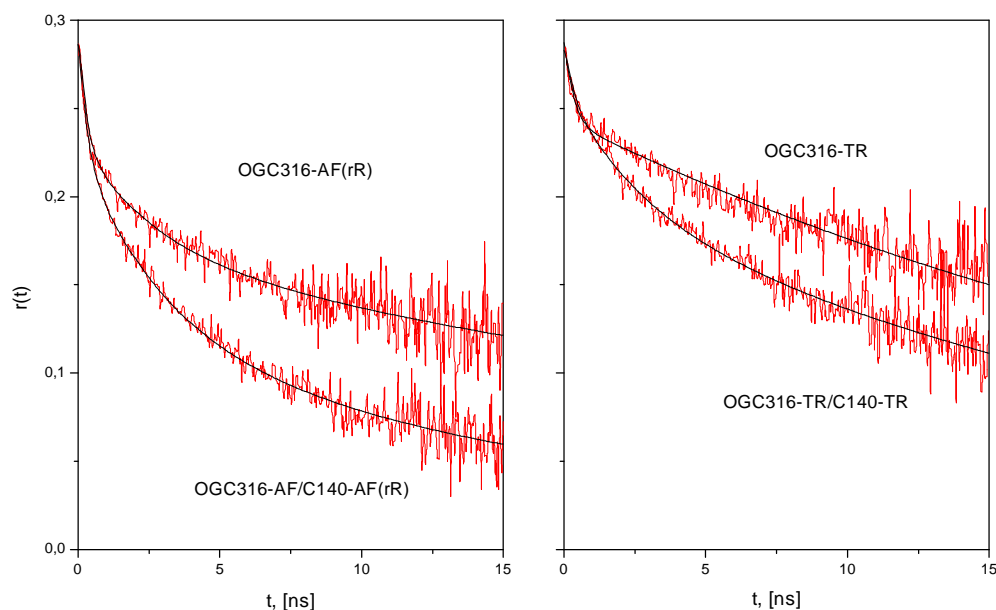


Abbildung 4-4 Effekt des intramolekularen Homotransfers an Rhodopsin-Mizellen. Die oberen Kurven zeigen die Anisotropieverläufe der mit Fluorescein (IAF) und Texas Red (TR) an der Position C316 markierten Rhodopsine. Die Depolarisation verstärkt sich bei gleichzeitiger Markierung der Positionen C316 und C140.

Die Anpassung der Anisotropieverläufe $r(t)$ der doppelt markierten Proben erfolgte wie im Kapitel 2.4.3 (Gleichung (2.63)) beschrieben nach einem Formalismus, der von Karolin et al. [Karolin et al., 1998] vorgeschlagen wurde. Unter der Anwendung dieses Modells wurden Abstandsverhältnisse R_0/R zwischen den wechselwirkenden Übergangsdipolmomenten ermittelt. Die folgende Tabelle 4-5 gibt die Resultate der Anpassungen wieder. Von den mit Fluorescein markierten OG-Mizellen wurden zwei verschiedene Präparationen gemessen. Der Vergleich der Parameter der beiden Anpassungen gibt den experimentellen Fehlerbereich wieder. Die mathematischen Fehler der Kurvenanpassung waren demgegenüber vernachlässigbar. Obwohl sich die Bindungspositionen auf der selben Seite des Proteins befinden, ist der Winkel zwischen den Symmetrieachsen (δ_{HT}) der Label-Loop-Konstrukte ungleich Null. Die Bewegungskegel sind nicht parallel orientiert, wodurch eine Unterscheidung der Bindungsstellen möglich wird.

| | p_{12}^0 | p_{12}^∞ | $k_{HT} / 10^9 \text{ s}^{-1}$ | δ_{HT} | R_0/R | $\langle \kappa^2 \rangle$ | $R / \text{\AA}$ |
|---------------------------------|------------|-----------------|--------------------------------|---------------|---------|----------------------------|------------------|
| OGC316/C140-AF(rR) ₁ | 0,72 | 0,28 | $3,1 \pm 0,1$ | 36° | 1,51 | 0,46-2,48 | 24-32 |
| OGC316/C140-AF(rR) ₂ | 0,43 | 0,38 | $6,8 \pm 0,2$ | 28° | 1,72 | 0,55-2,85 | 22-28 |
| OGC316/C140-TR | 0,13 | -0,06 | $1,7 \pm 0,2$ | 59° | 1,37 | 0,22-2,57 | 26-39 |

Tabelle 4-5 Anpassungsparameter nach Gleichung (2.63) für den Anisotropieverlauf unter Beteiligung des intramolekularen Homotransfers. Es bedeuten p_{12}^0 und p_{12}^∞ die normierten Anfangsbeziehungsweise Endanisotropiebeiträge des indirekt angeregten Partners, k_{HT} die Transferrate, δ_{HT} der Winkel zwischen den Symmetrieachsen der Bewegungskegel der Übergangsdipolmomente der beiden Wechselwirkungspartner und R_0/R das Verhältnis zwischen Försterradius und dem Abstand der Fluorophore. Die ersten beiden Zeilen stellen Proben unterschiedlicher Präparationen dar.

Die Abstandsverhältnisse R_0/R wurden durch die Anwendung der Methode von Karolin et al. bestimmt. Um die Abstände zwischen den Positionen C316 und C140 berechnen zu können, mußte zuvor das mittlere Quadrat des Orientierungsparameters ermittelt werden. Unter der Annahme, daß die Öffnungskegel, innerhalb derer sich die Label-Loop-Konstrukte bewegen, senkrecht zum Verbindungsvektor der Bindungspositionen stehen, wurden minimale und maximale Werte für $\langle \kappa^2 \rangle$ berechnet. Die daraus resultierenden Abstandsbereiche sind in der letzten Spalte der Tabelle 4-5 aufgeführt. Die Unterschiede in den Anpassungsparametern der ersten beiden Zeilen in Tabelle 4-5 machen die präparativen Einflüsse deutlich. Trotz dieser Schwankungen sind die gefundenen minimalen und maximalen Abstände von vergleichbarer Größe.

Die größere Werte des TR-Labels werden vermutlich durch den längeren Bindungsabstand (14 Å) gegenüber dem IAF (5 Å) bedingt. Einen Anhaltspunkt, ob die Ergebnisse in einem sinnvollen Wertebereich liegen, bietet der Vergleich mit den Dimensionen der Proteinoberfläche. Das Protein hat als Projektion seiner atomaren Dichte auf die Ebene annähernd die Form einer Ellipse, mit einer langen Achse von 34 Å und einer kurzen Achse von 29 Å [Krebs et al., 1998]. Die bestimmten Abstände zwischen C140 und C316 von 22 – 32 Å (IAF) beziehungsweise 26 – 39 Å (TR) (Tabelle 4-5) sind von vergleichbarer Größe und stellen somit ein sinnvolles Ergebnis dar.

Zweidimensionale Systeme

Die für die Wirksamkeit des Homotransfers an den Membranoberflächen notwendig geringe intermolekulare Entfernung der Donatoren war durch die hohe Flächendichte der Proteine in den Membranen gegeben. Beim Bacteriorhodopsin besitzt die 2D-Einheitszelle, die Proteine als Trimere enthaltend, eine Kantenlänge von 62,4 Å [Henderson et al., 1990]. Für die Untersuchung des Homotransfers wurden die Bacteriorhodopsin-Mutanten V130C und A160C mit steigendem Fluoreszenzmarker-Proteinverhältnis gelabelt und die entsprechende Anisotropie zeitabhängig gemessen. Als Fluoreszenzmarker wurde das Fluoresceinderivat IAF verwendet.

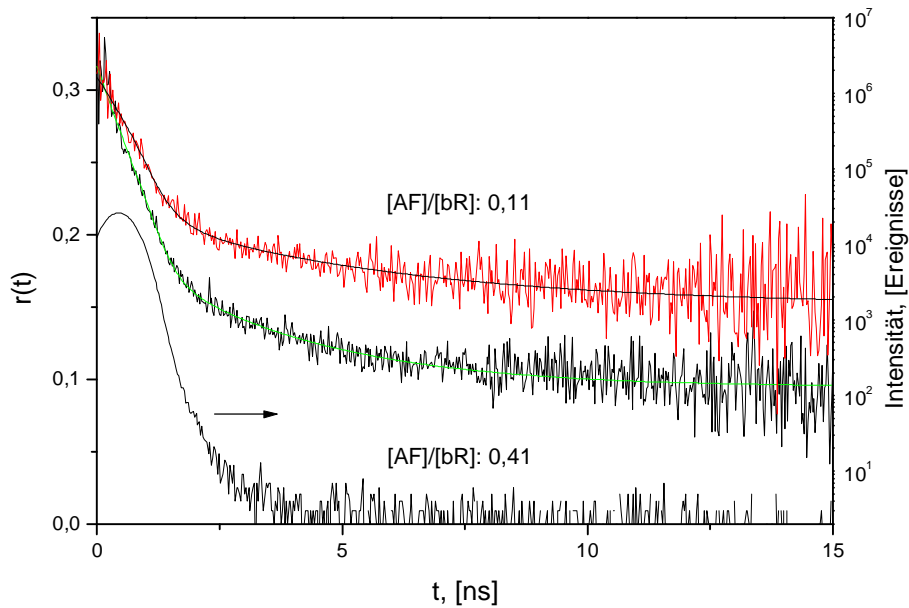


Abbildung 4-5 Vergleich der Anisotropien der markierten Bacteriorhodopsin-Mutante V130C-AF (Purpurmembranen) mit unterschiedlichen Markierungsstöchiometrien. Die Proben wurden im gebleichten Zustand gemessen, um den Hetero-Energietransfer zu unterbinden. Unter den Kurven ist das Anregungsprofil $L(t)$ dargestellt

Abbildung 4-5 zeigt einen Vergleich zweier Purpurmembranproben mit unterschiedlicher Markierungsstöchiometrie. Es handelt sich hierbei um die Probe bOV130C-AF mit den Verhältnissen $[AF]/[bR] = 0,11$ und $[AF]/[bR] = 0,41$. Die dargestellten Messungen erfolgten unter den Standardmeßbedingung, wobei sich die Proben im gebleichten Zustand (bO) befanden.

Die rechte Ordinate der Grafik bezieht sich auf das Anregungsprofil $L(t)$, der am Berliner Synchrotron BESSY I durchgeführten Messungen. Die Probe mit dem höheren Stöchiometrieverhältnis weist eine stärkere Depolarisation auf, vergleichbar mit den Resultaten der Rhodopsin-Proben beim intramolekularen Homotransfer. In Abbildung 4-6 ist die Abhängigkeit des Ordnungsparameters S_2 und der mittleren Fluoreszenzlebensdauer $\langle \tau \rangle$ von der Labelstöchiometrie $[AF]/[Protein]$ aufgezeigt. Für die Bacteriorhodopsin-Mutante V130C wurden acht und für die Mutante A160C drei verschiedene Stöchiometrieverhältnisse gemessen. Letztere lag ausschließlich im gebleichten Zustand vor, während die V130C in gebleichter Form und mit reduzierter Schiffischer Base untersucht wurde, was zu einer stärkeren Streuung der Fitparameter führte. Die Messungen wurden an beiden Synchrotronanlagen und während unterschiedlicher Meßperioden durchgeführt. Abbildung 4-6 zeigt für den Ordnungsparameter wie auch für die mittlere Fluoreszenzlebensdauer eine abfallende Tendenz mit steigender Stöchiometrie. Diese Abhängigkeit wurde an beiden Bacteriorhodopsin-Mutanten festgestellt. Desto größer die Zahl der möglichen Transferpartner, desto stärker wurde auch die Depolarisation.

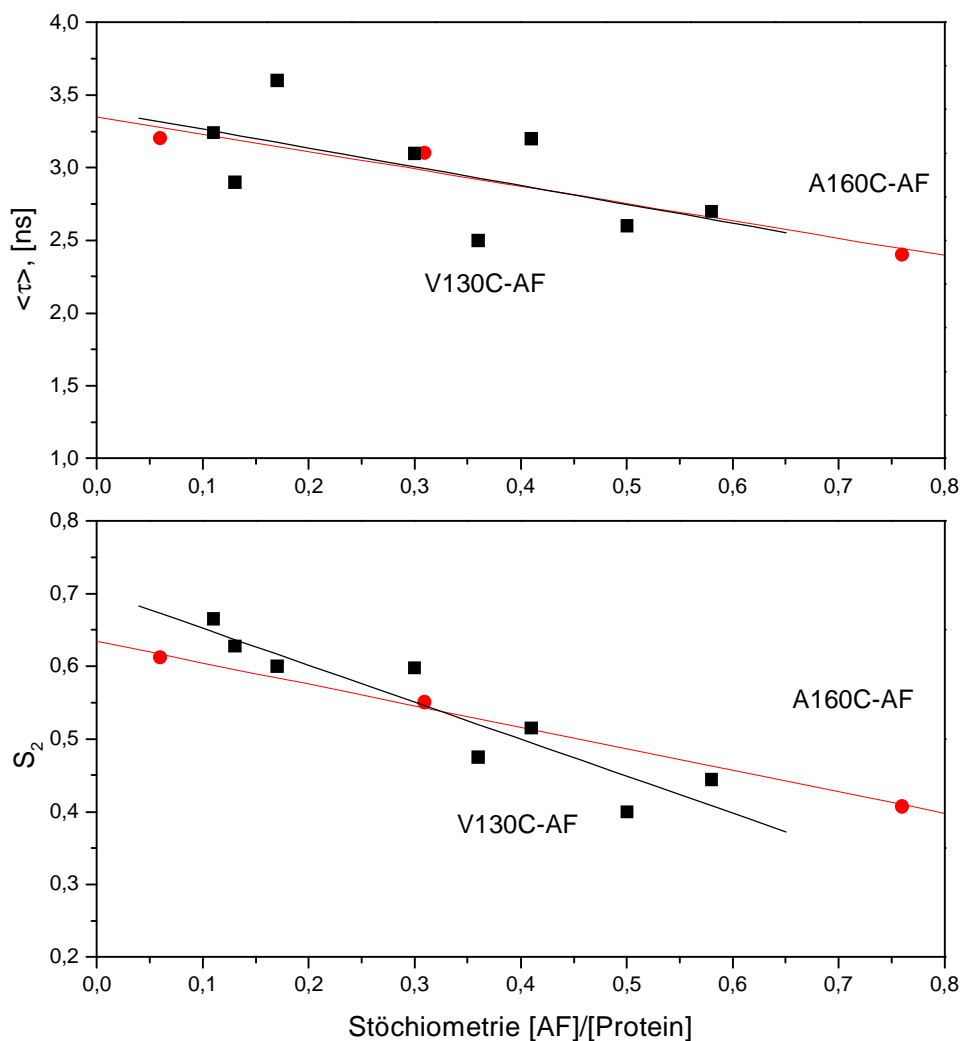


Abbildung 4-6 Darstellung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer und des Ordnungsparameters der einfachen Bewegungsgeometrie als Funktion der Markierungsstöchiometrie. Acht Werte stammen von der Bacteriorhodopsin-Mutante V130C-AF (Quadrate) und drei von A160C-AF (Kreise). Die V130C-AF wurde in gebleichtem Zustand und mit reduzierter Schiffischer Base gemessen, die A160C-AF nur in letzterer Form.

Im Gegensatz zum intramolekularen Homotransfer, zwischen zwei gleichartigen Partner, wo kein Einfluß auf die mittlere Lebensdauer beobachtet wurde, kam es durch die Energiemigration an der Membranoberfläche zu einer Lebensdauerverkürzung. Der Transfer der Energie unterliegt vermutlich auf längeren Wegen (über mehrere Partner) Verlusten, die als zusätzliche Komponenten in das Gesamtemissionsverhalten eingehen.

4.4 Modellunabhängige Analyse der Meßdaten

Während die Anpassung der Meßkurven mit einer Summe von Exponentialfunktionen vorerst der Entfaltung von $L(t)$ und dem empirischen Vergleich dienen, sollen im folgenden Parameter verglichen werden, denen eine physikalische Bedeutung zukommt. Die Zuordnung dieser Parameter zur Bewegung der Label-Loop-Konstrukte (LLK) hängt jedoch von deren angenommenen geometrischen Verhältnissen ab. Es werden zwei unterschiedliche, im Kapitel 2.3 beschriebene, Bewegungsgeometrien zur Interpretation verwendet. Im Kapitel 4.4.1 wird die einfache Bewegungsgeometrie zugrunde gelegt, bei der ausschließlich die Bewegung der Übergangsdipolmomente um eine starre Symmetrieachse die Depolarisation verursacht. In dem folgenden Abschnitt 4.4.2 wird eine Erweiterung vorgenommen, bei der zwischen einer schnellen Rotation der Übergangsdipolmomente um die Symmetrieachse und einer langsameren Schwankungsbewegung der Symmetrieachse selbst unterschieden wird. Diese Konstellation bildet die Grundlage der in dem Kapitel 4.4.2 verwendeten Näherungslösung der Diffusionsgleichung nach van der Meer et al. [van der Meer et al., 1984].

4.4.1 Die einfache Bewegungsgeometrie

Die Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie ermöglicht den einfachen geometrischen Verhältnissen in Abbildung 2-1 folgend die direkte Bestimmung zweier wichtiger Parameter. Aus dem Kurzzeitverhalten von $r(t)$ läßt sich in Näherung zum einen eine mittlere Diffusionskonstante \bar{D}_M bestimmen und aus dem Verhältnis von Anfangs- und Endanisotropie zum anderen der Ordnungsparameter zweiten Grades S_2 (Gleichungen (2.24), (2.29), (2.30)). Mit diesen Größen lassen sich erste Aussagen über das Bewegungsverhalten unter der Variation äußerer oder präparativer Parameter treffen. Die Parameter der mit Fluorescein gelabelten Bacteriorhodopsin-Proben sind in Tabelle 4-6 enthalten. Die Messungen wurden entweder unter vorheriger Reduzierung der Schiffschenschen Base des Retinals oder nach vorangegangenem Bleichen der Proben mittels Hydroxylamin vorgenommen. Um den Einfluß des Homotransfers bei den Purpurmembranen zu minimieren, wurden die Markierungsstöchiometrien unter 10 % gehalten. Es sind gemittelte Werte angegeben, wobei die Zahl der Einzelmessungen zwischen zwei und acht betrug.

| | Mizellen | | Purpurmembranen | |
|------------|----------|----------------------------------|-----------------|----------------------------------|
| | S_2 | $\bar{D}_M / 10^9 \text{s}^{-1}$ | S_2 | $\bar{D}_M / 10^9 \text{s}^{-1}$ |
| bRS35C-AF | 0,66 | 0,30 | 0,57 | 0,42 |
| bRV130C-AF | 0,81 | 0,22 | 0,53 | 0,38 |
| bRA160C-AF | 0,70 | 0,28 | 0,44 | 0,56 |

Tabelle 4-6 Vergleich der Ordnungsparameter und Diffusionskonstanten dreier mit Fluorescein markierter Bacteriorhodopsin-Mutanten. Der Fehler des Ordnungsparameters betrug $\Delta S_2 = \pm 0,02$, bestimmt mittels Standardabweichung der Mittelwertbildung aus acht Messungen der Mutante bRA160C-AF. Der maximale Fehler der Diffusionskonstante betrug $\Delta D_M = \pm 0,16 \cdot 10^9 \text{s}^{-1}$.

Die Mizellen zeigen durch die größeren Ordnungsparameter eine stärkere Einschränkung der Depolarisationsbewegung als die Purpurmembranproben. Obwohl die Unterschiede zwischen den Ordnungsparametern außerhalb der Fehlergrenzen liegen, wird die Abhängigkeit der Mizellenwerte von der Bindungsstelle bei den Membranfragmenten nicht reproduziert. Die Diffusion an der Mizellenoberfläche erfährt durch die Wechselwirkung mit den Detergenzien eine Verlangsamung im Vergleich zu der schnelleren Bewegung an den Purpurmembranoberflächen. Die Aussage der Diffusionskonstanten bleibt jedoch aufgrund der oben angegebenen Fehlergrenzen beschränkt.

Insbesondere läßt sich der Vergleich der Diffusionskonstanten zur Unterscheidung der Bindungsstellen nicht heranziehen. Zur Positionierung der Fluoreszenzmarker an der Proteinoberfläche des Rhodopsins wurden neben den nativen Cysteinresten auch Rhodopsin-Mutanten der Arbeitsgruppe Khorana verwendet. Bei den Proben waren die reaktiven natürlichen Cysteine C316 und C140 durch nichtreaktive Serine ausgetauscht [Klein- Seetharaman et al., 1999a]. Diese Positionen waren somit für die Kopplungsreaktion blockiert. Durch Punktmutationen wurden ausgewählte Aminosäuren gegen kopplungsfähige Cysteine ausgetauscht. Diese Mutanten waren von besonderem Interesse, da ein direkter Vergleich der Anisotropiekurven untereinander aufgrund des identischen präparativen Werdegangs, möglich wurde.

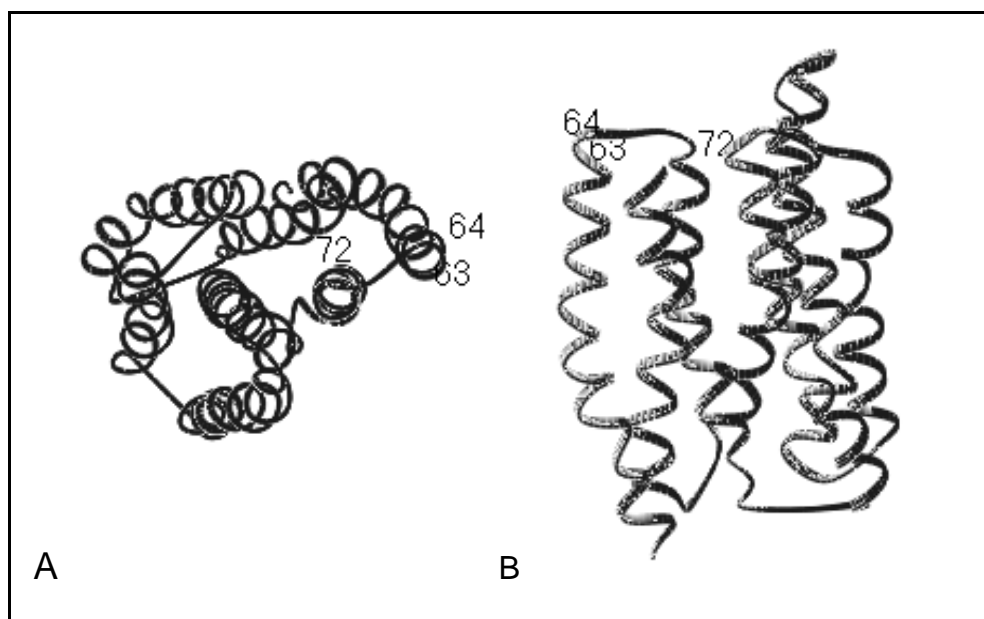


Abbildung 4-7 Dreidimensionale Struktur des Rhodopsins nach einem Modell von Pogozeva et al. [Pogozeva et al., 1997]. In dem Modell sind für den interessierenden Bereich zwischen Helix I und Helix II die Positionen V63, Q64 und L72 angegeben. Die linke Darstellung (A) zeigt eine Projektion auf die Membranebene und die rechte (B) eine transmembranale Ansicht, bei der sich die zytoplasmatische Seite oben befindet.

Es wurden fünf Proben untersucht, bei denen sich die Punktmutationen im I/II-Loop befanden. Die Abbildung 4-7 zeigt zwei Ansichten einer theoretischen Proteinstruktur des Rhodopsins [Pogozeva et al., 1997] mit drei in dem Modell enthaltenen, durch ihre Sequenznummern gekennzeichneten Aminosäureresten an den Enden der Helices I und II.

Das eigentliche interhelikale Segment ist in dem Modell der Autoren nicht enthalten, sondern nur in seiner näherungsweise Lage dargestellt. Die Tabelle 4-7 enthält die Ordnungsparameter und Diffusionskonstanten der untersuchten Mutanten. Die Werte beziehen sich auf den gebleichten Zustand der als Mizellen gemessenen Proben.

| Rhodopsin-Mutanten* | S_2 | $\bar{D}_M / 10^9 \text{ s}^{-1}$ |
|---------------------|-------|-----------------------------------|
| OG-L72C-AF | 0,86 | 0,18 |
| OG-R69C-AF | 0,84 | 0,23 |
| OG-L68C-AF | 0,83 | 0,18 |
| OG-Q64C-AF | 0,81 | 0,23 |
| OG-V63C-AF | 0,80 | 0,22 |

* gebleichte Proben, 15 °C, pH 6, 30 mM OG, 150 mM NaCl

Tabelle 4-7 Ordnungsparameter und Diffusionskonstanten gebleichter Rhodopsin-Mutanten des I/II-Loops. Die maximalen Fehler betragen $\Delta S_2 = \pm 0,02$ und $\Delta D_M = \pm 0,07 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$.

Die Diffusionskonstanten streuen innerhalb der Meßreihe und zeigen keine signifikante Abhängigkeit von der Position. Die Ordnungsparameter zeigen dagegen einen Zusammenhang, welcher sich in Verbindung mit den Vorstellungen über die dreidimensionale Struktur in Abbildung 4-7 interpretieren läßt. Die in Bezug auf die Projektion (Teilbild A in Abbildung 4-7) äußeren Positionen V63C und Q64C weisen offensichtlich eine höhere Bewegungsfreiheit auf, während die mehr im Zentrum gelegene Bindungsstelle L72C den Ordnungsparameter erhöht.

Die Analyse der Bewegungsbeschränkung läßt sich also nicht allgemein auf unterschiedliche Loop-Bereiche reduzieren, sondern muß auch hinsichtlich der relativen Lage zur Gesamtstruktur ausgeweitet werden.

4.4.2 Die erweiterte Bewegungsgeometrie

Weiteren Aufschluß über den Bewegungsablauf des Label-Loop-Konstruktes (LLK) soll im folgenden die Anwendung einer Näherungslösung der Diffusionsgleichung nach van der Meer et al. [van der Meer et al., 1984] liefern. Die von den Autoren entwickelte Lösung bietet die Möglichkeit nichtexponentielle Kurvenverläufe anzupassen. Es sind keine weiteren Annahmen bezüglich der Gleichgewichtsverteilungsfunktion $f(\theta)$ notwendig, da die Approximation eine Anpassung der Ordnungsparameter zweiten und vierten Grades ($\langle P_2 \rangle$, $\langle P_4 \rangle$) verwendet. Die direkte Bestimmung dieser Parameter aus den Messungen liefert einen außergewöhnlichen Zugang zu der Verteilungsfunktion $f(\theta)$, da sie in den ersten beiden nichttrivialen Termen eines Reihenansatzes in Legendre-Polynomen die Koeffizienten darstellen (2.40). Der Formalismus ist im Kapitel 2.3.2 beschrieben. Zur Anwendung kommt der allgemeine Ausdruck für $r(t)$ (2.39), wobei die geometrischen Annahmen in einem erweiterten Sinn verstanden werden sollen. Die Abbildung 2-2 wird dahingehend erweitert, daß die gezeigte Symmetrieachse ξ nicht auf den Label beschränkt bleibt, sondern auf das gesamte LLK bezogen wird.

Die Winkel, die die Lagen der Übergangsdipolmomente zu dieser Hauptachse wiedergeben, können sich deshalb bei ein und dem selben Label zwischen verschiedenen LLK's ändern. Um die sieben freien Parameter zu reduzieren, soll weiterhin für die Azimutaldifferenz dieser Winkel gelten $\Phi_{\mu\nu} = 0$. Weil die Drehbewegung des Makromoleküls in dem verwendeten Formalismus nicht enthalten ist, wurde die Anisotropiekurve $r(t)$ auf die Mizellenrotation normiert.

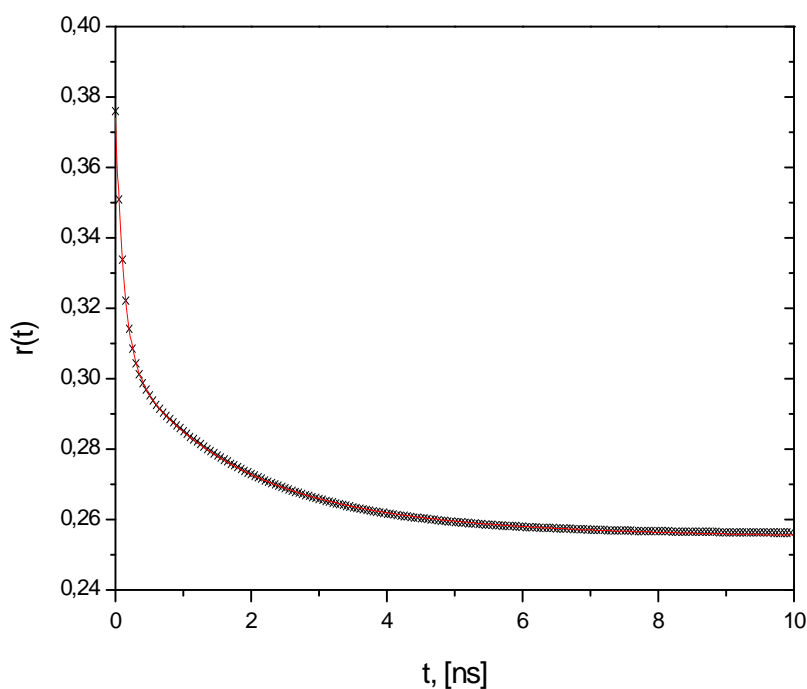


Abbildung 4-8 Empirischer Anisotropiefit (Linie) und dessen Anpassung mit dem erweiterten Bewegungsmodell (Gleichung (2.39), (Kreuze)) des anisotropen Fluoreszenzverhaltens der gebleichten Rhodopsin-Mutante OGV63C-AF. Die Fitkurve wurde zuvor durch die Mizellenrotation dividiert, so daß eine von Null verschiedene Endanisotropie auftritt.

Zur Veranschaulichung der Anwendbarkeit der verwendeten Näherungslösung (2.39) ist als Beispiel die Fitfunktion des Anisotropieverlaufs der Rhodopsin-Mutante OG-V63C-AF im gebleichten Zustand dargestellt (Abbildung 4-8). Vorausgegangen ist die Entfaltung der eigentlichen Meßdaten und die Approximation mit einer Summe von Exponentialfunktionen, wodurch die Kurve vollständig glatt erscheint.

Die Anpassung mit dem erweiterten Bewegungsmodell ist durch Kreuze symbolisiert. Die zugehörigen Daten sind in der unten aufgeführten Tabelle 4-8 enthalten.

Zur Überprüfung, ob bei einem bekannten System die physikalischen Parameter mit dem van der Meer-Modell reproduziert werden können, wurde der Anisotropieverlauf eines ungebundenen Fluorophors angepaßt. Die Entfaltung der gemessenen Anisotropie ergab ein exponentielles Abklingen des Anfangswertes $\beta_1 = 0.377$ mit einer Rotationskorrelationszeit von $\phi_1 = 0.190$ ns. Damit die theoretische Funktion $r(t)$ (Gleichung (2.39)) auf diesen Fit angewendet werden konnte, mußten vier Parameter festgehalten werden: $D_{II} = 0 \text{ s}^{-1}$, $\langle P_4 \rangle = 0$, $\theta_\mu = 0^\circ$, $\theta_\nu = 0^\circ$.

Die freie Variation bezog sich ausschließlich auf die Rotationsdiffusion der Symmetrieachse, dargestellt durch D_{\perp} , sowie den Ordnungsparameter $\langle P_2 \rangle$. Eine Übereinstimmung der Meßkurve mit dem theoretischen Verlauf fand sich für die Werte $D_{\perp} = 0,88 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ und $\langle P_2 \rangle = 0,012$. Die Umrechnung der Diffusionskonstante liefert einen Wert von $\phi_1^* = 0,189 \text{ ns}$, was die Dynamik sehr gut reproduziert. Der theoretische Wert von $\langle P_2 \rangle$ für ein vollständig isotropes Ensemble ist Null. Die Abweichung des ermittelten Wertes von $\langle P_2 \rangle = 0,012$ liegt daher im Prozentbereich.

Nach dieser Bestätigung der Anwendbarkeit der Näherungslösung werden im folgenden ausgewählte Proben auf ihr Verhalten innerhalb dieser Bewegungsgeometrie untersucht. Die Tabelle 4-8 zeigt die berechneten Parameter der gebleichten Rhodopsin-Mutanten.

| Rhodopsin-Mutanten* | $\theta_{\chi} / ^{\circ}$ $\pm 1,3^{\circ}$ | $\theta_{\mu} / ^{\circ}$ $\pm 1,1^{\circ}$ | $\theta_{\nu} / ^{\circ}$ $\pm 1,1^{\circ}$ | $\langle P_2 \rangle$ $\pm 0,03$ | $\langle P_4 \rangle$ $\pm 0,05$ | $D_{\parallel} / 10^9 \text{ s}^{-1}$ $\pm 0,7 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ | $D_{\perp} / 10^9 \text{ s}^{-1}$ $\pm 0,5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ |
|---------------------|---|--|--|-------------------------------------|-------------------------------------|--|--|
| OGL72C-AF | 15,8° | 8,5 | 20,1 | 0,95 | 0,84 | 7,7 | 0,009 |
| OGR69C-AF | 17,1° | 9,2 | 20,5 | 0,94 | 0,83 | 9,2 | 0,012 |
| OGL68C-AF | 20,2° | 7,9 | 21,6 | 0,91 | 0,78 | 7,2 | 0,014 |
| OGQ64C-AF | 21,0° | 9,4 | 20,2 | 0,90 | 0,73 | 10,6 | 0,024 |
| OGV63C-AF | 19,8° | 9,3 | 21,5 | 0,91 | 0,78 | 8,0 | 0,016 |

* gebleichte Proben, 15 °C, pH 6, 30 mM OG, 150 mM NaCl

Tabelle 4-8 Parameter der erweiterten Bewegungsgeometrie für die Anpassungen der Anisotropien der Rhodopsin-Mutanten. Es bedeuten: θ_{μ} und θ_{ν} die Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der Absorption und Emission mit der Symmetrieachse, $\langle P_2 \rangle$ und $\langle P_4 \rangle$ die Ordnungsparameter zweiten und vierten Grades, D_{\parallel} und D_{\perp} die Diffusionskonstanten der Rotation der Übergangsdipolmomente um die Symmetrieachse beziehungsweise deren Eigenbewegung. Der Winkel θ_c bezeichnet den Halbkegelöffnungswinkel nach dem Kegelmodell. Die Fehler sind durch Mehrfachmessungen bestimmte statistische Fehler. Die direkten Fehler der Anpassungen sind bei allen Parameter kleiner als die angegebenen.

In der Zuordnung der Diffusionskonstanten ergibt sich eine schnelle Rotation um die Symmetrieachse des LLK (D_{\parallel}) sowie eine langsame Diffusion der Symmetrieachse (D_{\perp}). Die in Tabelle 4-1 angegebene Rotationskorrelationszeit des freien Labels liegt in ihrer Größenordnung zwischen den reziproken Diffusionskonstanten aus Tabelle 4-8, wodurch D_{\parallel} und D_{\perp} in ihrer Zuordnung zu den Bewegungskomponenten sinnvoll erscheinen. Es läßt sich weiterhin für die Position 72 eine in Relation zu den anderen Bindungsstellen verlangsamte Bewegung der Symmetrieachse erkennen. Die Position 64 weist in beiden Diffusionskonstanten höhere Werte auf und zeigt die geringste Bewegungsbeschränkung. Die Differenz zwischen θ_{μ} und θ_{ν} ergibt im Mittel einen Wert von 11,9°. Einen vergleichbarer Wert findet sich nach Gleichung (2.25) für den Winkel δ , welcher in der vereinfachten Bewegungsgeometrie ebenfalls den Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten wiedergibt. Die Stellung der Übergangsdipolmomente gegenüber der Symmetrieachse bleibt innerhalb des Loops erhalten.

Signifikante Unterschiede treten dagegen in den Ordnungsparametern auf. Die weiter innen liegende Position 72 zeigt eine höhere sterische Beschränkung, ein Effekt der bereits im Ordnungsparameter der vereinfachten Geometrie Ausdruck fand. Es ist zu beachten, daß die Absolutwerte der Ordnungsparameter aus Tabelle 4-8 größer sind als diejenigen aus der Tabelle 4-7. Im Gegensatz zu den vorherigen Bedingungen bezieht sich hier die stärkere Bewegungseinschränkung auf die Symmetrieachse des LLK.

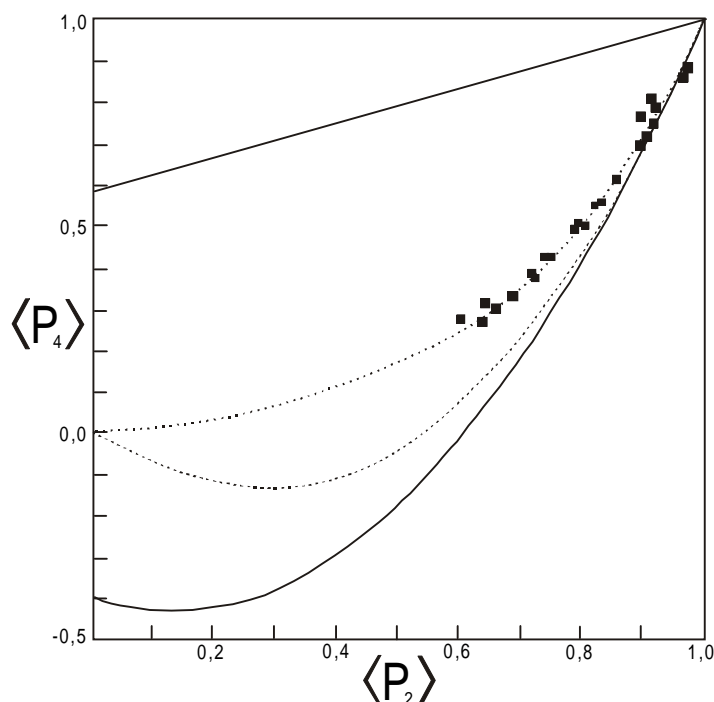


Abbildung 4-9 Wertebereich der Ordnungsparameter. Die durchgehenden Linien geben die obere Grenze ($\langle P_4 \rangle = (7 + 5 \langle P_2 \rangle)/12$) und die untere Grenze [$\langle P_4 \rangle = (35 \langle P_2 \rangle^2 - 10 \langle P_2 \rangle - 7)/18$] der Wertepaare an [Kooyma et al., 1981]. Die gepunkteten Linien geben die Wertepaare im Kegelmodell (untere Kurve) sowie im Gaußmodell (obere Kurve) an (siehe Text). Die Quadrate stellen die Ordnungsparameterpaare aus den durchgeführten Anpassungen dar.

In der ersten Spalte der Tabelle 4-8 sind die Halbkegelöffnungswinkel θ_c der Symmetrieachse gesondert angegeben. Ihre Berechnung beruhte auf der zusätzlichen Annahme des Kegelmodells. Die Ordnungsparameter sind in diesem Fall Funktionen von θ_c (Gleichungen (2.41), (2.42)). Die Werte entstammen separat durchgeführter Anpassungen, bei denen θ_c als direkter Fitparameter verwendet wurde. In anschaulicher Weise ist eine Vergrößerung der Öffnungswinkel zu den äußeren Bindungsstellen zu beobachten. Die empirisch gefundenen Wertepaare $\langle P_2 \rangle, \langle P_4 \rangle$ stellen Meßpunkte in der $\langle P_2 \rangle/\langle P_4 \rangle$ -Fläche dar. Die Abbildung 4-9 zeigt einerseits die theoretischen Grenzen der Lösungsmengen und andererseits die Abhängigkeiten, die aus dem Kegel- beziehungsweise Gaußmodell folgen. Die stationäre Verteilungsfunktion $f(\theta)$ der Orientierungen der Übergangsdipolmomente ist im Kegelmodell durch $f(\theta) = \text{const.}$ für $0^\circ \leq \theta \leq \theta_c$ sowie $f(\theta) = 0$ für alle anderen Winkel gegeben.

Der Winkel θ_c beschreibt in diesem Modell den Halbkegelöffnungswinkel (siehe Kapitel 2.3.1). Das Gaußmodell läßt sich durch den Zusammenhang $f(\theta) \sim \exp(q^2 \cos^2 \theta / 2)$ beschreiben. Der Parameter q bestimmt dabei die Breite der Verteilung [Kinosita et al., 1982]. Die Abbildung 4-9 zeigt eine solche Gegenüberstellung. Es wurden Temperaturreihen der gebleichten Rhodopsin-Proben ROS140C-AF, ROS316C-AF, OG316C-AF sowie die Rhodopsin-Mutanten verwendet.

Aus Abbildung 4-9 sind zwei wesentliche Ergebnisse ersichtlich: Zum einen liegen die erhaltenen Ordnungsparameter alle innerhalb des möglichen Wertebereichs, stellen somit sinnvolle Lösungen dar und zum anderen stimmen die Wertepaare mit denen eines Gaußmodells überein. Die Annahme der erweiterten Bewegungsgeometrie findet hierdurch eine weitere Bestätigung.

4.5 Das Anisotropieverhalten unter der Variation äußerer Parameter

Als Konsequenz aus dem experimentellen Ergebnis, daß der Energie-Heterotransfer keinen signifikanten Einfluß auf den Verlauf der Anisotropiefunktion $r(t)$ hat (Kapitel 4.3.1), werden die unterschiedlichen Probenotypen in dieser Hinsicht im folgenden nicht mehr unterschieden. Die in diesem Kapitel 4.5 aufgeführten Untersuchungen sind nach der Art der Parameter geordnet, die in den jeweiligen Meßreihen variiert wurden, um die Einflüsse auf das Depolarisationsverhalten zu studieren. Dabei handelt es sich im einzelnen um die Änderung der Viskosität, der Temperatur, des pH-Wertes und der Ionenstärke. Weiterhin wurden Bacteriorhodopsin-Mutanten untersucht, bei denen die C-terminale Peptidsequenz entfernt wurde. Hierdurch sollte die Sensitivität der Fluoreszenzmarker gegenüber Änderungen ihrer sterischen Bewegungsbeschränkung getestet werden. Das Ende dieses Kapitels bildet ein Abschnitt über drei einzelne mit dem Fluorophor Texas Red markierte Proben, deren Kurven auf einen assoziierten Anisotropieverlauf hindeuteten.

Viskosität

Ein einfacher Test, ob das Depolarisationsverhalten tatsächlich auf eine Rotationsdiffusionsbewegung zurückzuführen ist, ergibt sich durch die Änderung der Viskosität in der Probenlösung. Die Erhöhung der Viskosität sollte eine Verlangsamung der Rotationsdiffusion zur Folge haben.

Die folgende Abbildung 4-10 zeigt Einzelmessungen zweier Rhodopsin-Proben in unterschiedlich viskosen Medien. Die Messungen in Glycerin-Wassergemischen wurden an den ROS-Membranfragmenten C316-AF im MII-Zustand vorgenommen. Die Endanisotropie blieb bei diesem Experiment erhalten, während sich im mittleren Zeitbereich die erwartete Änderung einstellte. Bei den in der rechten Grafik der Abbildung 4-10 gezeigten OGC316-AF-Mizellen mit reduzierter Schiffischer Base dominierte die leichte Verlangsamung der Mizellenrotation die Kurven.

Bei dieser Meßreihe wurde D_2O verwendet, um eventuelle Wechselwirkungen der Glycerin- oder Saccharosemoleküle mit der Proteinoberfläche auszuschließen. Die relative Änderung war insgesamt klein, da der Faktor zwischen den Viskositäten beim Übergang von Wasser zum D_2O nur 1,22 betrug [Handbook of Chemistry and Physics, 1986]³⁸.

Die Grafiken zeigen, daß sich Tendenzen der Verlangsamung der Rotationsdiffusion des Label-Loop-Konstruktes bei höheren Viskositäten reproduzierbar beobachten lassen. Die zwischen der linken und der rechten Grafik in Abbildung 4-10 voneinander abweichenden Anfangsanisotropien sind darauf zurückzuführen, daß die Daten an den beiden unterschiedlichen Synchrotronanlagen aufgenommen wurden (Kapitel 3.1).

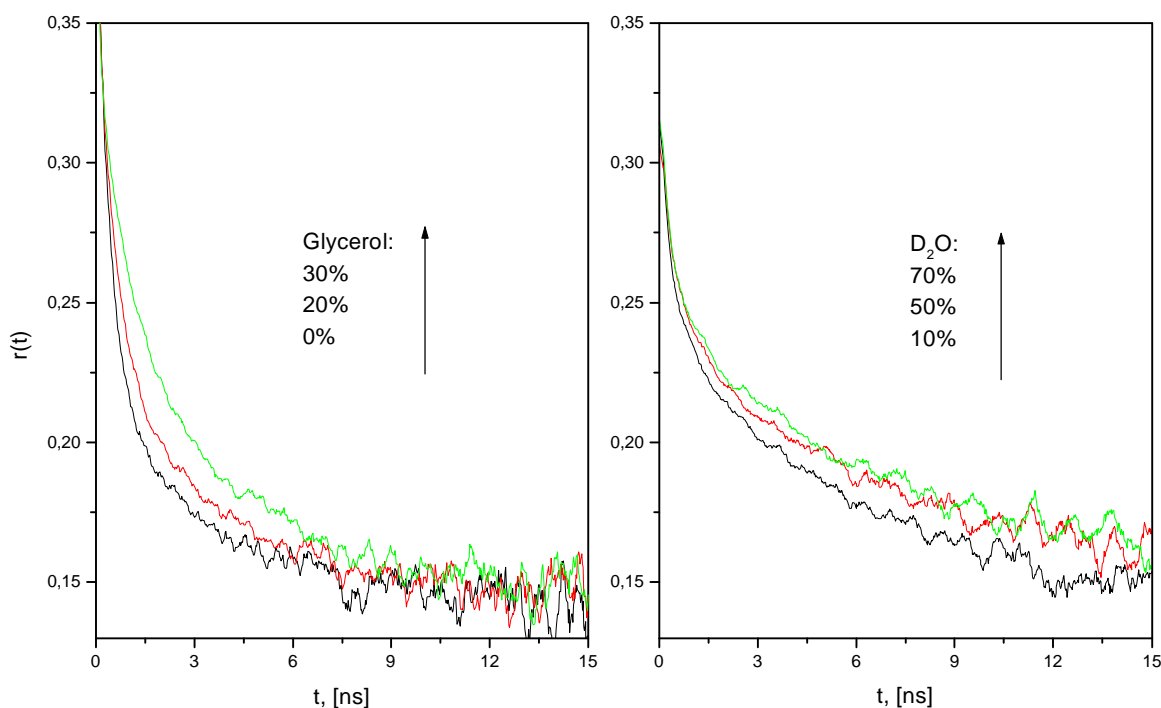


Abbildung 4-10 Viskositätsreihen der ROS-Membranfragmente C316-AF im MII -Zustand (links) sowie der Rhodopsin-Mizellen OGC316-AF mit reduzierter Schiffischer Base (rechts). Dargestellt sind die über jeweils 5 Datenpunkte geglätteten Meßkurven der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie.

Abbildung 4-11 enthält eine weitere Viskositätsreihe. Die markierte Bacteriorhodopsin-Mutante mit reduzierter Schiffischer Base, bRS35C-AF(rR), wurde in einer Saccharosereihe mit dem freien Fluoresceinderivat IAF verglichen. Im linken Teil der Darstellung sind die Meßkurven mit den zugehörigen Fitkurven der Probe S35C-AF(rR) bei 0 %, 25 % und 50 % Saccharosegehalt abgebildet. Im rechten Bild sind die Fitkurven der S35C-AF(rR) gleichzeitig mit den Fitkurven des ungebundenen Fluorescein-Labels bei jeweils gleicher Saccharosekonzentration dargestellt. Es ist eine schnellere Depolarisation des ungebundenen Fluorophors gegenüber dem gebundenen, bei gleich viskoser Lösung zu erkennen.

³⁸ Im Vergleich dazu ändert sich die Viskosität bei 30% (v/v) Glyceringehalt um einen Faktor 3 und bei 50 % (v/v) Saccharosegehalt um einen Faktor 70 gegenüber der wässrigen Ausgangslösung.

In der Tabelle 4-9 sind die Anisotropieparameter der empirischen Anpassung der in Abbildung 4-11 dargestellten Bacteriorhodopsin-Mutante aufgeführt.

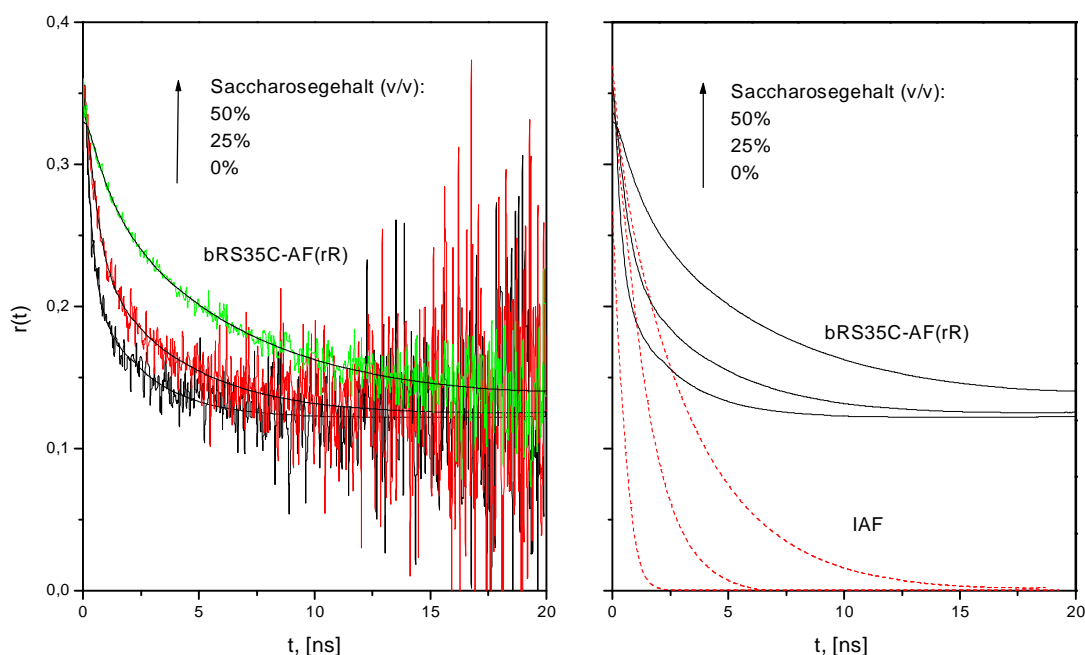


Abbildung 4-11 Saccharose Reihe: Anisotropiemess- und Fitkurven der Bacteriorhodopsin-Mutante S35C-AF (Purpormembranen) mit reduzierter Schiffscher Base (linke Grafik). Fitkurven der bR-Mutante im Vergleich mit den Fitkurven des ungebundenen Fluoresceinderivates IAF bei gleichen Saccharosekonzentrationen (rechte Grafik).

| Saccharose-gehalt | β_1 | β_2 | r_∞ | ϕ_1 | ϕ_2 | χ_R^2 |
|-------------------|-----------|-----------|------------|----------|----------|------------|
| 0 % | 0,156 | 0,093 | 0,112 | 0,22 | 2,3 | 1,04 |
| 25 % | 0,114 | 0,108 | 0,114 | 0,45 | 3,8 | 1,09 |
| 50 % | 0,053 | 0,148 | 0,131 | 0,98 | 6,3 | 1,01 |

Tabelle 4-9 Fitparameter der Bacteriorhodopsin-Mutante S35C-AF(rR) bei unterschiedlichem Saccharosegehalt. Die β_i bezeichnen die Amplituden und ϕ_i die Rotationskorrelationszeiten der Exponentialterme, r_∞ bezeichnet die Endanisotropie. Die Parameter gehören zu den Kurven in Abbildung 4-11.

Die Rotationskorrelationszeiten ϕ_1 und ϕ_2 deuten eine Verlangsamung mit steigender Viskosität an. Diese Parameter besitzen jedoch keinen direkten Zusammenhang mit der Diffusion [Kinosita et al., 1977; Lipari und Szabo, 1980]. Wie in Kapitel 2.3 beschrieben kann jedoch aus dem Kurzzeitverhalten der komplexen Anisotropieverläufe eine Diffusionskonstante in Näherung berechnet werden. Im Gegensatz zu den empirischen Parametern in Tabelle 4-9 stellt die Diffusionskonstante eine tatsächliche physikalische Größe dar. In Anlehnung an Abbildung 4-11 wurden das ungebundene IAF und das markierte ROS-Membranfragment C316-AF in sieben unterschiedlich viskosen Lösungen gemessen.

Abbildung 4-12 zeigt die Änderung der reziproken Diffusionskonstante $1/D$ in Abhängigkeit vom Verhältnis von Viskosität und Temperatur (η/T) bei sukzessiver Erhöhung des Glyzeringehaltes [Handbook of Chemistry and Physics, 1986] für den gebundenen (Kreise) und den ungebundenen Fluorophor (Quadrate).

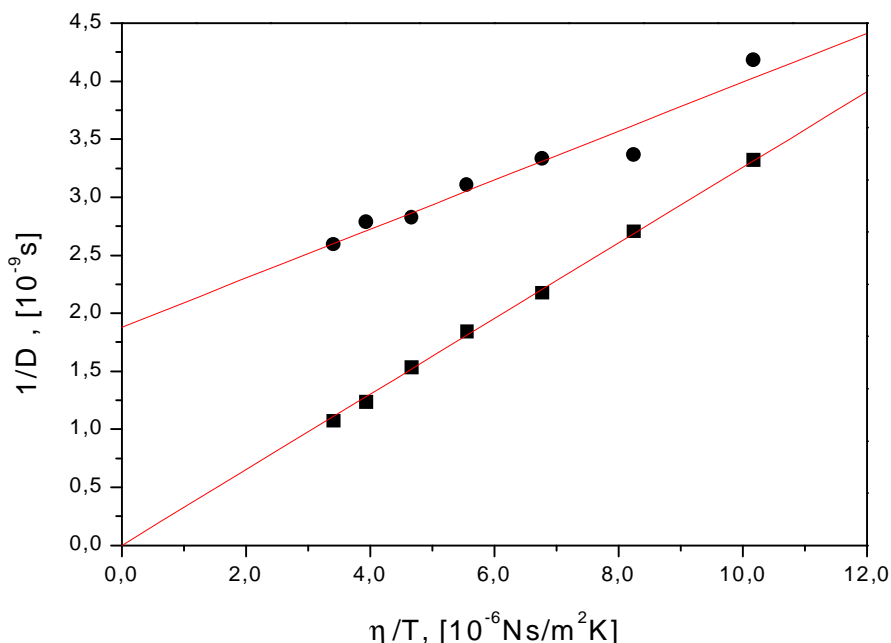


Abbildung 4-12 Viskositätsabhängigkeit der reziproken Diffusionskonstante. Es ist die reziproke Diffusionskonstante als Funktion des Verhältnisses aus Viskosität und Temperatur dargestellt. Dieses Verhältnis wurde durch den Saccharosegehalt in der Probenlösung variiert. Die Quadrate geben die Werte von ungebundenem IAF an, die Kreise die Werte der Rhodopsin-Probe RO3C316-AF im MII-Intermediat.

Die Diffusionskonstante wurde für den freien Fluorophor nach Gleichung (2.21) bestimmt und für gebundenen nach (2.24) aus dem anfänglichen Abfall der gemessenen Fluoreszenzanisotropie $r(t)$. Der freie Label bestätigt die Linearität (2.22), deren Extrapolation exakt durch den Koordinatenursprung führt. Die Bewegungsänderung des Label-Loop-Konstruktes weist ebenfalls auf einen linearen Zusammenhang hin, ist jedoch vertikal verschoben. Die Auftragung der Funktion $1/D = f(\eta/T)$ bietet die Möglichkeit der Bestimmung desjenigen Volumens, daß der Änderung von η/T zugänglich ist. Eine Interpretation der Gleichung (2.22) in Anwendung auf Abbildung 4-12 würde anschaulich zu einem zusätzlichen Term als Schnittpunkt mit der Ordinate führen. Dieser läßt sich als der Anteil der anfänglichen Depolarisation (Gleichungen (2.23) und (2.24)) interpretieren, der nicht von der Änderung der Viskosität beeinflusst wird. Es kann sich hierbei um einen Volumen oder einen Bewegungsmodus handeln. Der Effekt wurde in weiteren Viskositätsreihen mit den Rhodopsin-Proben OGC316-AF(rR), OGC316-TR(rR), OGC316-TR, RO3C316-AF(gbl) und RO3C140-AF(gbl) gemessen, um aus den Anstiegen der Funktion $(1/D) = f(\eta/T)$ die Volumina zu bestimmen.

Um die Fehler zu minimieren, beschränkt sich die Angabe des Volumenwertes in Tabelle 4-10 auf die Position und den Labeltyp. Es wurde nicht zwischen Mizellen und Membranfragmenten unterschieden. Durch einen Vergleich mit den Rotationsvolumina der ungebundenen Label aus Tabelle 4-1 findet man, daß hauptsächlich das Labeleigenvolumen die schnelle Depolarisation der Proteinproben verursacht.

| Position/Label | $V_{\text{eff}} / 10^{-22} \text{ cm}^3$ | |
|-----------------|--|----------------|
| | -AF | -TR |
| Rhodopsin C316- | $6,5 \pm 1,5$ | $12,3 \pm 1,6$ |
| Rhodopsin C140- | $8,9 \pm 1,4$ | |

Tabelle 4-10 Die aus den Viskositätsreihen ermittelten Volumina unterschiedlicher Rhodopsin-Proben (siehe Text). Die Volumina wurden aus den Anstiegen der Abhängigkeiten $1/D = f(\eta/T)$ nach Gleichung (2.22 bestimmt).

Temperatur

Die Betrachtungen im vorherigen Abschnitt beruhen auf der Änderung der Viskosität bei konstanter Temperatur. Das Verhältnis η/T läßt sich ebenso durch die Temperatur variieren, wobei sich gleichzeitig der Wert der Viskosität ändert. Existieren innerhalb des untersuchten Temperaturbereichs Phasenübergänge oder latente thermische Freiheitsgrade, so ist eine Abweichung von der Proportionalität zu erwarten. Eine Möglichkeit solche thermischen Freiheitsgrade zu erfassen besteht in der Untersuchung der relativen Amplituden der gefitteten Exponentialterme, die durch $f_i = \beta_i/r_0$ gegeben sind. Bei Mizellen wird der Wert von f_3 durch β_3 bestimmt, bei den Membranfragmenten durch r_∞ . Dieser Wert stellt also in diesem Sinne keinen relativen Depolarisationsanteil dar, sondern gibt die Bewegungsbeschränkung des Label-Loop-Konstruktes wieder.

| T / °C | bRS35C-AF(rR) | | | ROSC140-AF | | |
|--------|---------------|-------|-------|------------|-------|-------|
| | f_1 | f_2 | f_3 | f_1 | f_2 | f_3 |
| 5 | 0,37 | 0,23 | 0,40 | 0,49 | 0,33 | 0,18 |
| 10 | 0,38 | 0,22 | 0,40 | 0,50 | 0,31 | 0,19 |
| 15 | 0,36 | 0,24 | 0,40 | 0,49 | 0,28 | 0,23 |
| 20 | 0,40 | 0,21 | 0,39 | 0,47 | 0,30 | 0,23 |
| 25 | 0,40 | 0,21 | 0,39 | 0,52 | 0,23 | 0,25 |
| 30 | 0,41 | 0,22 | 0,37 | 0,49 | 0,25 | 0,26 |
| 35 | 0,45 | 0,20 | 0,35 | | | |
| 40 | 0,46 | 0,21 | 0,33 | | | |

Tabelle 4-11 Fraktionale Amplituden ($f_i = \beta_i/r_0$) der Bacteriorhodopsin-Mizellen bRS35C-AF mit reduzierter Schiffcher Base sowie der ROS-Membranfragmente C140-AF in Abhängigkeit von der Temperatur.

In Tabelle 4-11 sind die relativen Amplituden zweier Anisotropieanpassungen für einen Temperaturbereich von 5 - 40 °C aufgeführt. Es handelt sich hierbei um die Bacteriorhodopsin-Mutante S35C-AF(rR), mit reduzierter Schiffscher Base in Mizellenform, und um das ROS-Membranfragment C140-AF. Bei beiden Proben wurde eine Temperaturabhängigkeit der relativen Amplituden festgestellt. Der Austausch zwischen den Amplituden erfolgte immer unter Beteiligung von f_3 . Während jedoch die bR-Probe oberhalb von 20 °C eine Lockerung der Bewegungsbeschränkung erfuhr, stieg diese kontinuierlich mit Temperaturerhöhung bei den ROS-Membranfragmenten. Der Austausch mit f_3 erfolgte bei Bacteriorhodopsin im wesentlichen durch f_1 und bei Rhodopsin durch f_2 . Die Werte dieser Parameter sind dabei sehr ähnlich, was auf die Dominanz der Labeleigenbewegung hindeutet.

Ein Austausch zwischen f_1 und f_2 bei konstanter Summe ($f_1 + f_2$), der auf latente Freiheitsgrade schließen lassen würde [Nishimoto et al., 1998], wurde nicht beobachtet. Die Beteiligung von f_3 zeigt dagegen die temperaturabhängige sterische Wechselwirkung des Label-Loop-Konstruktes (LLK) mit seiner Umgebung. Die weitere Analyse erfolgt deshalb durch die Darstellung des Ordnungsparameters S_2 ³⁹ in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Abbildung 4-13 zeigt den Temperaturverlauf von S_2 bei verschiedener Purpurmembranproben. Die Darstellung enthält außerdem die S_2 -Werte der in der Tabelle 4-11 aufgeführten Mizellenprobe S35C-AF(rR). Das Vorhandensein eines kritischen Temperaturbereichs von 20 – 25 °C wird besonders in der rechten Grafik der Abbildung 4-13 deutlich. Der Effekt war von Probenart sowie Bindungsposition unabhängig und reproduzierte sich sowohl auf der zytoplasmatischen als auch auf der extrazellulären Seite der Membran. Er war ebenso unabhängig von dem Typ des Fluoreszenzmarkers. Diese Tatsache ließ die allgemeine Schlußfolgerung zu, daß es sich um eine Eigenschaft des Proteins in Verbindung mit seiner Lipidumgebung handelte. Die naheliegende Interpretation war die eines Phasenübergangs der Lipide in dem untersuchten Temperaturbereich.

Abbildung 4-14 zeigt die Temperaturabhängigkeit des Ordnungsparameters der Rhodopsin-Proben OGC316-TR, OGC316-AF(rR), ROSC316-Cm sowie der in obiger Tabelle 4-11 aufgeführten ROSC140-AF. Die beiden OG-Mizellen zeigen das gleiche Bild wie die Bacteriorhodopsin-Mutanten. Der Ordnungsparameter bleibt konstant unterhalb und fällt ab oberhalb einer kritischen Temperatur. Ein anderes Verhalten zeigen jedoch die beiden Membranfragmente: eine Erhöhung der Bewegungsbeschränkung mit steigender Temperatur. Um Aufschluß über letzteren Effekt zu erhalten, wurde die Näherungslösung für $r(t)$ der erweiterten Bewegungsgeometrie nach Gleichung (2.39) auf die temperaturabhängigen Kurven der Probe ROSC140-AF angewendet (Kapitel 2.3.2). Durch die Aufspaltung der Bewegungskomponenten lassen sich die jeweiligen Abhängigkeiten von äußeren Einflüssen separieren.

³⁹ Gemeint ist hier der Ordnungsparameter der einfachen Bewegungsgeometrie, siehe Kapitel 2.3.1, Gleichung.(2.30).

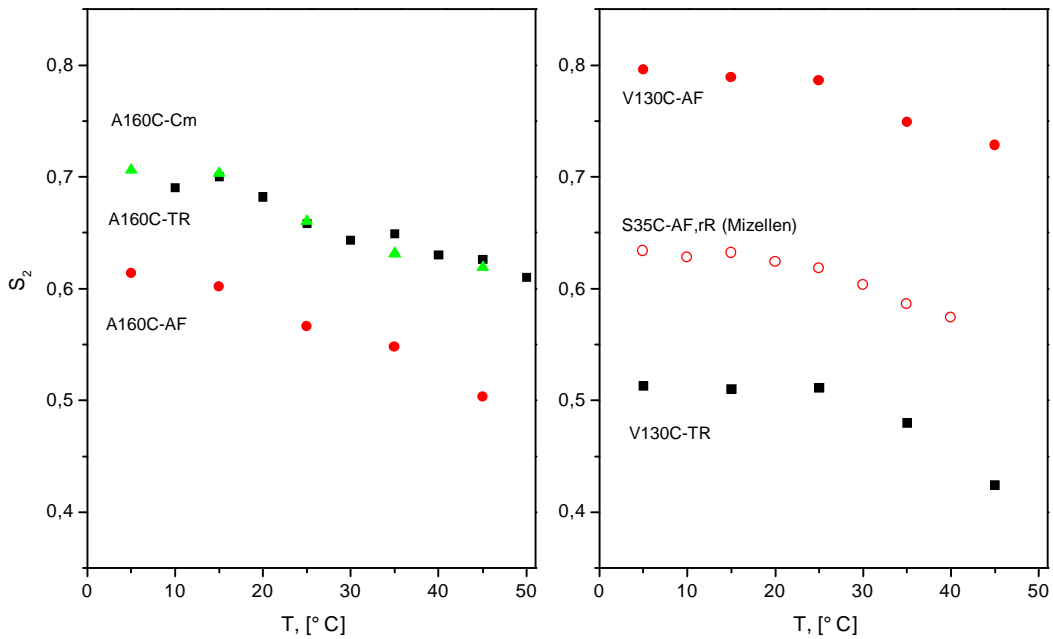


Abbildung 4-13 Ordnungsparameter der einfachen Bewegungsgeometrie unterschiedlicher Bacteriorhodopsin-Proben in Abhängigkeit von der Temperatur. Außer der Mutante S35C-AF(rR), die in Mizellenform gemessen wurde, lagen die Proben als Purpurmembranen vor.

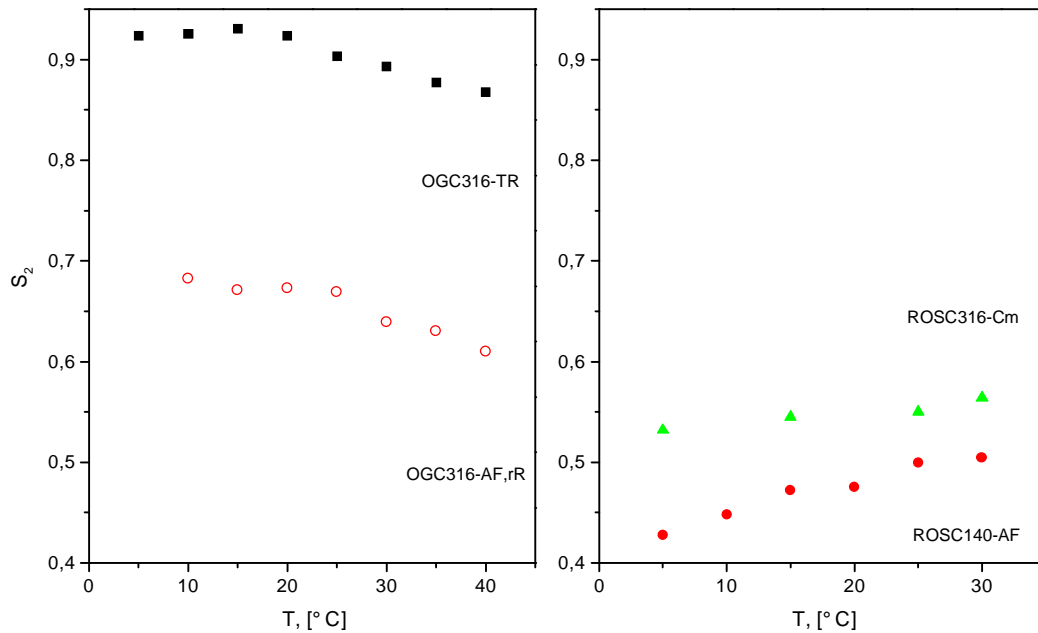


Abbildung 4-14 Ordnungsparameter der einfachen Bewegungsgeometrie unterschiedlicher Rhodopsin-Proben in Abhängigkeit von der Temperatur. Im linken Bild sind Parameter von Mizellen und im rechten von Membranfragmenten dargestellt.

Die Abbildung 4-15 gibt die Fitresultate der Temperaturreihe der Probe ROS140C-AF in den Parametern der erweiterten Bewegungsgeometrie wieder.

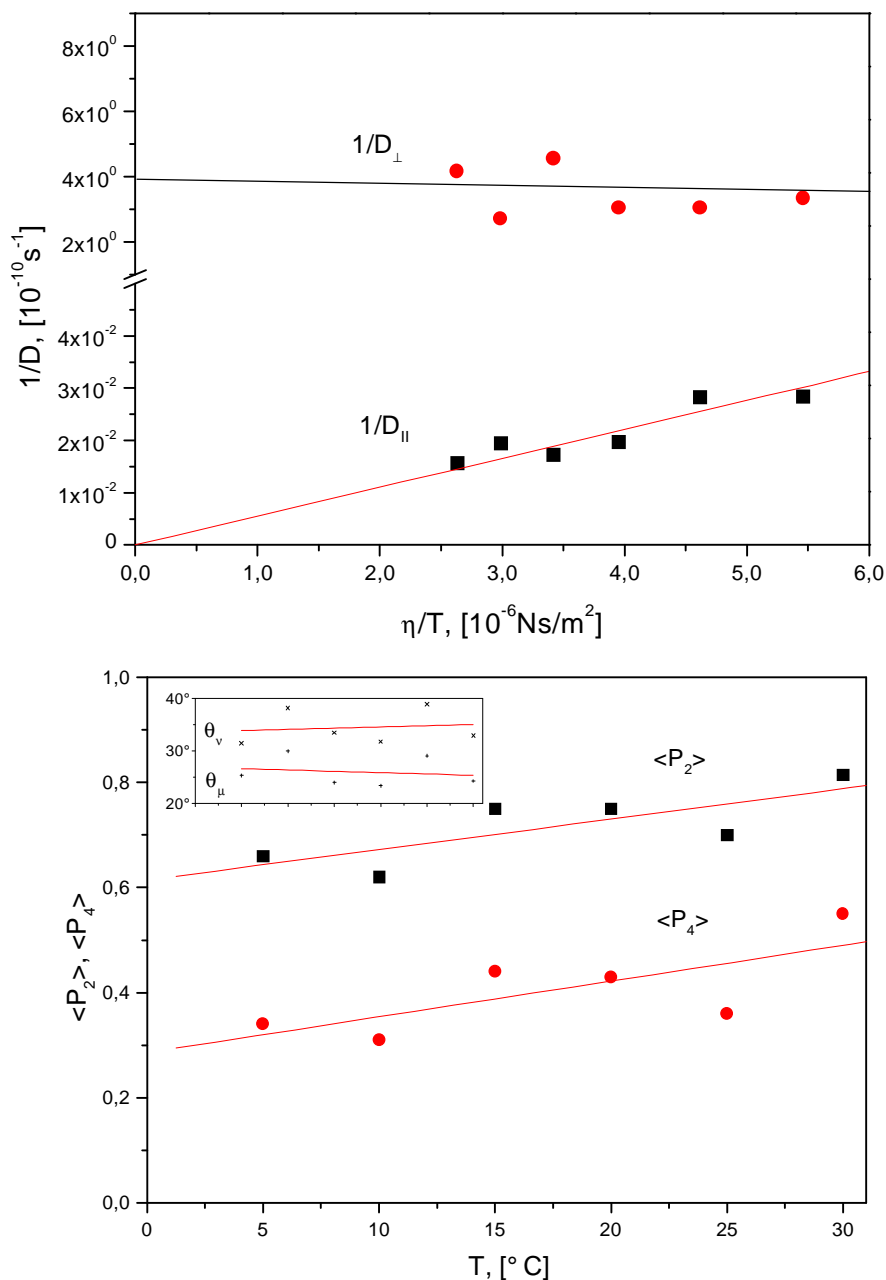


Abbildung 4-15 Parameter der erweiterten Bewegungsgeometrie, berechnet für die Temperaturreihe der ROS-Membranfragmente C140-AF. Oberes Bild: die Diffusionskonstante der Rotationsbewegung um die Symmetrieachse des Label-Loop-Konstruktes (D_{\parallel}) und die der Bewegung der Symmetrieachse (D_{\perp}) als Funktion von η/T . Unteres Bild: Ordnungsparameter zweiten und vierten Grades als Funktion der Temperatur.

Die Ordnungsparameter und die Winkel der Übergangsdipolmomente zur Symmetrieachse (verkleinert abgebildet) sind in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt, während die reziproken Diffusionskonstanten wiederum über dem Verhältnis aus Viskosität und Temperatur abgetragen sind.

Die Ordnungsparameter zweiten und vierten Grades $\langle P_2 \rangle$ und $\langle P_4 \rangle$ zeigen, wie auch in der einfachen Bewegungsgeometrie durch den zugehörigen Ordnungsparameter zweiten Grades in Abbildung 4-14 veranschaulicht, eine stärkere Bewegungseinschränkung bei höheren Temperaturen. Die Lagen der Übergangsdipolmomente, die durch θ_μ und θ_ν ausgedrückt werden, blieben in Relation zur Symmetrieachse über dem Temperaturbereich konstant. Das bedeutet, daß der prinzipielle Aufbau des Label-Loop-Konstruktes erhalten bleibt. Die Änderung der Dynamik weist dagegen eine Differenzierung auf:

Die schnelle Rotationsbewegung D_{\parallel} reagiert auf die Viskositätsänderung im Lösungsvolumen aufgrund der Temperaturerhöhung. Im Grenzfall, wenn das Verhältnis von Viskosität und Temperatur gegen Null geht, führt die lineare Anpassung der Fitwerte der reziproken Diffusionskonstante $1/D_{\parallel}$ durch den Koordinatenursprung. Ein Verhalten, das in Anlehnung an das Modell eines ungehinderten isotropen Rotors interpretiert werden kann. Die langsamere Bewegung D_{\perp} der Symmetrieachse des Label-Loop-Konstruktes bleibt im Gegensatz dazu innerhalb der Streuung der Datenpunkte konstant.

pH-Abhängigkeit

Das Fluorescein ist ein protonierbarer Fluoreszenzmarker (Tabelle 3-2) [Molecular Probes, 1996]. Die Absorptions- und Emissionsspektren sind vom pH-Wert der Lösung und vom pK-Wert des Moleküls abhängig. Der pK-Wert hängt wiederum davon ab, ob das Fluorescein frei oder gebunden ist und in welcher ionischen Umgebung es sich befindet. Der apparente pK des an freies Cystein gebundenen Fluoresceins beträgt bei einer Salzkonzentration von 150 mM $pK_{app} = 6,2$. Der Wert steigt nach der Bindung an das Bacteriorhodopsin auf $pK_{app} = 7,1 - 7,3$ [Alexiev, 1995].

Es wurden die mit Fluorescein markierten Bacteriorhodopsin-Mutanten A160C-AF und V130C-AF in Mizellenform und als Purpurmembranen bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Um Aggregationen zu vermeiden, wurden pH-Werte oberhalb von pH 6 verwendet. Abgesehen von den veränderten pH-Werten, wurden die Messungen unter den Standardmeßbedingungen durchgeführt. In Abbildung 4-16 ist die zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie der Purpurmembranen bei den pH-Werten 7 und 10 dargestellt. Bei hohem pH-Wert ist ein Absinken der Kurven im Langzeitbereich zu erkennen. In Tabelle 4-12 sind die Ordnungsparameter der einfachen Bewegungsgeometrie S_2 in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgelistet. Die Reduzierung des Ordnungsparameters mit steigendem pH-Wert ließ sich bei allen vier Proben reproduzieren.

Es kann nicht unterschieden werden, ob der Effekt auf den Eigenschaften des Labels beruht, oder ob protonierbare Gruppen an der Proteinoberfläche für die Reduzierung des Ordnungsparameters verantwortlich sind. Unabhängig davon läßt sich die erhöhte Bewegungsfreiheit des Label-Loop-Konstruktes als Folge einer Coulombabstoßung verstehen. Das Bacteriorhodopsin hat eine negative Oberflächenladungsdichte [Alexiev, 1994b, 1995] und die Protonierungsform des Fluoresceins wird von der einfach negativen zur zweifach negativen Form verschoben. Im Gegensatz zum weiter unten beschriebenen Salzeffekt wird hier die Nettoladung des ganzen Label-Loop-Konstruktes geändert.

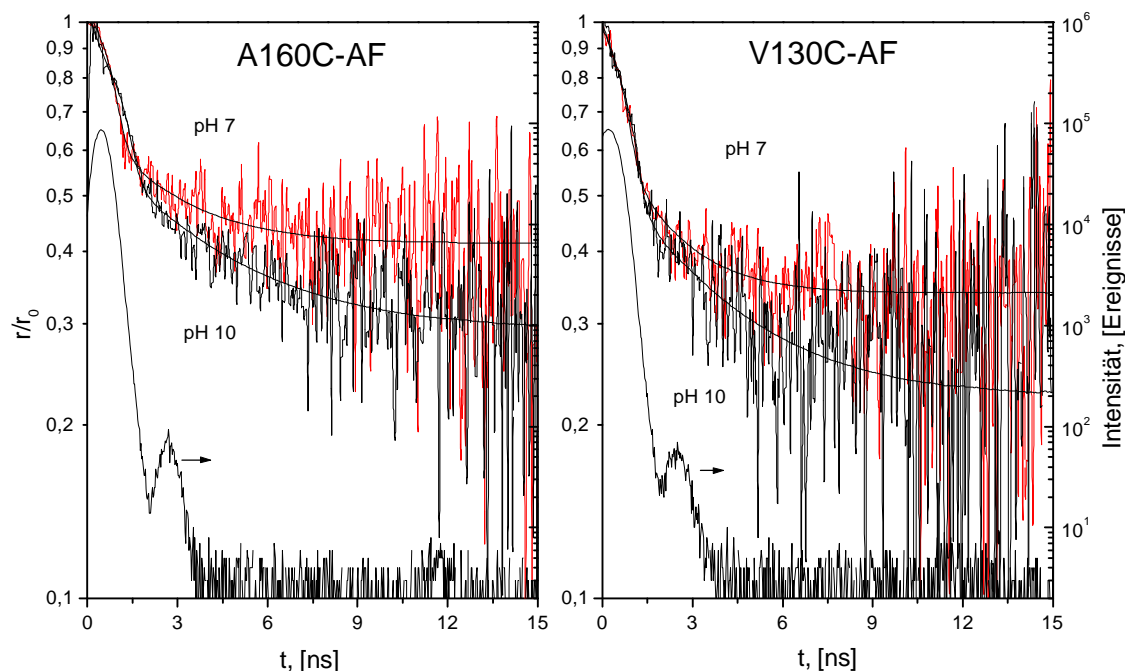


Abbildung 4-16 pH-Abhängigkeit der Bacteriorhodopsin-Proben A160C-AF und V130C-AF (Purpurmembranen) bei Werten von pH 7 und pH 10. Es sind die normierten Anisotropieverläufe als Meß- und Fitkurven auf einer logarithmischen Achse dargestellt.

| pH-Wert | S_2 | | | |
|---------|----------|----------|-----------------|----------|
| | Mizellen | | Purpurmembranen | |
| | A160C-AF | V130C-AF | A160C-AF | V130C-AF |
| 6 | 0,85 | 0,72 | | |
| 7 | 0,83 | 0,69 | 0,58 | 0,50 |
| 7,5 | 0,79 | 0,69 | | |
| 8 | 0,75 | 0,68 | | |
| 10 | | | 0,52 | 0,42 |

Tabelle 4-12 pH-Abhängigkeit des Ordnungsparameters der einfachen Bewegungsgeometrie. In der Tabelle sind Werte der mit Fluorescein markierten Bacteriorhodopsin-Mutanten A160C und V130C als Mizellen sowie als Purpurmembranen angegeben.

Ionenstärke

Ein einfacher Test zur Beobachtung der Ionenstärke auf das Depolarisationsverhalten wurde an zwei Membranproben mit und ohne 150 mM Salzgehalt vorgenommen. Die Probenkonstellation sollte dabei möglichst unterschiedlich sein, so daß die Bacteriorhodopsin-Mutante A160C-AF mit dem Fluoresceinderivat IAF und die Rhodopsin-Probe ROSC140-TR(rR) mit dem TR-Fluorophor markiert wurden. Als Puffer wurden entsprechend den Standardbedingungen 10 mM Tris mit einem eingestellten pH-Wert von 7 beim Bacteriorhodopsin sowie 10 mM MES mit einem pH-Wert von 6 beim Rhodopsin verwendet.

Die Abbildung 4-17 stellt die in unterschiedlichen Meßperioden aufgenommenen normierten Anisotropiekurven der Probenpaare in einer logarithmischen Skalierung dar. Die rechten Ordinaten beziehen sich auf die ebenfalls abgebildeten Anregungsprofile $L(t)$ der jeweiligen Messungen. Es wurde eine Differenz der Kurvenverläufe im mittleren Zeitbereich festgestellt. Die Proben ohne den Salzgehalt wiesen geringere Amplituden der zweiten Zeitkomponente auf.

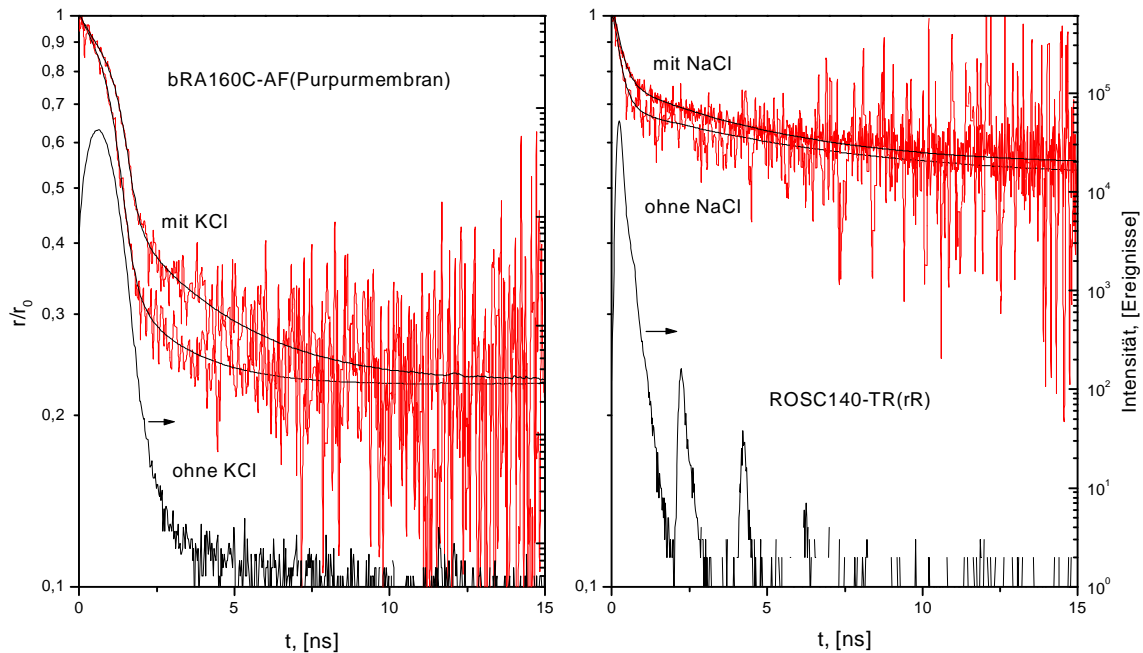


Abbildung 4-17 Salzeffekt an Membranproben. An der logarithmischen Ordinate ist der normierte zeitliche Anisotropieverlauf der Bacteriorhodopsin-Probe bRA160C-AF und der Rhodopsin-Probe ROSC140-TR mit und ohne 150 mM KCl beziehungsweise NaCl dargestellt. Unter den Meß- und Fitkurven sind die Anregungsprofile $L(t)$ abgebildet. Die Messung mit Bacteriorhodopsin wurde am BESSY und die mit der Rhodopsin-Probe am HASYLAB durchgeführt.

Die Ionenstärke der Lösung hat eine Bedeutung auf die Kompensation beziehungsweise die Sättigung der Oberflächenladungen der Membranproteine. Fehlen die Gegenionen aus dem Lösungsvolumen im Grenzbereich Membran/Wasser, so vergrößert sich die Reichweite der effektiven Oberflächenladungsdichte. Beim Bacteriorhodopsin ist die Oberflächenladungsdichte negativ [Alexiev, 1995]. Eine größere Entfernung des Labels von der Oberfläche durch Coulombwechselwirkungen hätte aber eine verringerte Endanisotropie zur Folge, was nicht beobachtet wurde. Das Absinken der Anisotropiefunktion im mittleren Zeitbereich deutet eher auf einen Loop-Effekt hin. Beim TR-Label ist die mechanische Kopplung zum Loop durch den langen Bindungsabstand (Tabelle 3-2) sehr gering und oder überhaupt nicht vorhanden. Die Veränderung des Anisotropieverlaufs in Abbildung 4-17 ist dementsprechend gering.

Entfernung der C-terminalen Peptidsequenz am Bacteriorhodopsin

Bei drei verschiedenen Purpurmembranproben des Bacteriorhodopsins wurde durch Papainverdau die als C-Terminus bezeichnete Peptidsequenz am Ende der Helix G entfernt (Abbildung 1-1). Die Schnittstelle befand sich zwischen den Positionen 231 und 232 [Fimmel et al., 1989]. Da sich die Peptidsequenz auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet, war eine sterische Wechselwirkung mit auf dieser Seite gebundenen Fluoreszenzmarkern zu erwarten. Für diese Experimente wurde die Mutante A160C mit den Fluorophoren IAF und TR markiert.

Die Position der Punktmutation A160C befindet sich in dem interhelikalen EF-Loop auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran in der Nähe des C-Terminus. Zum Vergleich wurde die Mutante V130C ebenfalls mit IAF markiert. Diese Position befindet sich im Gegensatz zur A160C auf der extrazellulären Seite der Zellmembran. Eine Entfernung der C-terminalen Peptidsequenz sollte auf das Anisotropieverhalten des dort gebundenen Fluorophors keinen Einfluß haben.

Abbildung 4-18 zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzanisotropie der drei genannten Proben, jeweils mit und ohne C-Terminus. Die Proben A160C-AF und A160C-TR weisen eine reduzierte Endanisotropie nach dem Entfernen der Peptidsequenz auf. Die Probe V130C-AF zeigt dagegen keine Veränderung in ihrem zeitlichen Anisotropieverhalten.

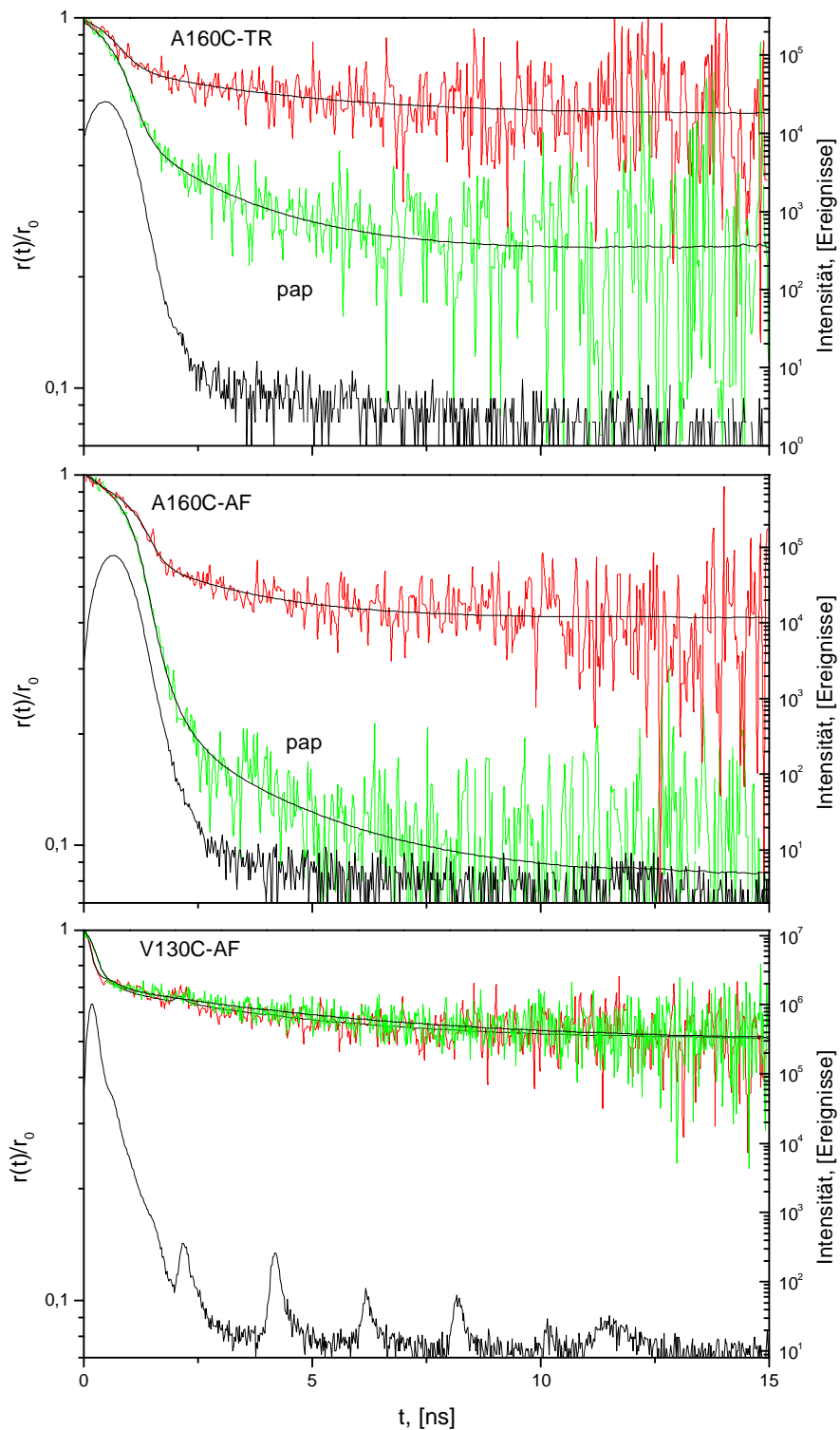


Abbildung 4-18 Effekt der Entfernung der C-terminalen Aminosäuresequenz von Bacteriorhodopsin auf die Anisotropie. Die oberen beiden Bilder zeigen die Purpurmembranproben A160C-AF beziehungsweise -TR. Die Position der A160C befindet sich im EF-Loop, der sich auf der selben Membranseite wie der C-Terminus befindet (zytoplasmatische Seite). Das untere Bild zeigt die markierte Mutante V130C-AF, eine Position im DE-Loop auf der gegenüberliegenden extrazellulären Seite.

Nichtmonoton abfallender Anisotropieverlauf

Die Ursache einer komplexen Anisotropiekurve kann, neben der Vielfalt möglicher Rotationsmodi und Bewegungsbeschränkungen, eine Heterogenität der emittierenden Spezies sein. In einem solchen Fall setzt sich die Anisotropie $r(t)$ aus den gewichteten Anteilen der beteiligten Spezies zusammen [van Paridon et al., 1988; Guest et al., 1991; Peng et al., 1990a,1990b]. Die Wichtungsfaktoren sind durch die Komponenten im Verlauf der Fluoreszenzintensität bestimmt. Für einen mit einer heterogenen Fluoreszenz assoziierten Anisotropieverlauf gilt:

$$r(t) = \sum_i f_i(t) r_i(t) \quad (4.1)$$

Die $f_i(t)$ geben den Anteil der i -ten Komponente an der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t wieder:

$$f_i(t) = \frac{\alpha_i \exp(-t/\tau_i)}{\sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i)} \quad (4.2)$$

Während zum Zeitpunkt $t = 0$ alle Spezies entsprechend ihrer Amplitude zur Anisotropie beitragen, sinken die Anteile der kurzlebigen in Relation zu den langlebigen mit wachsender Zeit. Bei Korrelation einer kurzlebigen Spezies mit einer schnellen Rotationsdiffusion kann es nach einem anfänglichen Abfall zu einem Anstieg der Anisotropie kommen [Lakowicz, 1999]. Ein solches Verhalten wurde bei drei einzelnen mit Texas Red markierten Rhodopsin-Proben beobachtet. Die Proben wiesen ein nichtexponentielles Fluoreszenzabklingen auf, das mit drei Exponentialfunktionen angepaßt wurde. Die zugehörigen Parameter sind in Tabelle 4-13 angegeben. Abbildung 4-19 zeigt die zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie der Probe RO3C316-TR (in der Abbildung 4-19 mit A bezeichnet) sowie einen modellierter Funktionsverlauf nach Gleichung (4.2) (in der Abbildung 4-19 mit B bezeichnet). Das Auftreten dreier Fluoreszenzkomponenten führt zu einer Anzahl von Kombinationsmöglichkeiten mit den Anisotropietermen. Für die modellierte Kurve wurde angenommen, daß die ersten beiden Fluoreszenzkomponenten α_1, τ_1 und α_2, τ_2 einer schnellen, unbeschränkten Rotation zugehören und die dritte Komponente α_3, τ_3 einer langsamen, beschränkten Bewegung. Die Amplituden r_{0i} der einzelnen Anisotropiebeiträge wurden gleichgesetzt. Die folgenden Parameter wurden zur Erzeugung der Kurve B verwendet: $\beta_{1,2} = \beta_3 = 0,15$, $\phi_{1,2} = 0,6$ ns, $\phi_3 = 5$ ns sowie $r_{3\infty} = 0,14$. Die Zuordnung der Fluoreszenzkomponenten zu den Anisotropietermen ist willkürlich und wird nur durch eine scheinbare Übereinstimmung der erzeugten Kurve mit der Meßkurve bestätigt. Eine eindeutige Zuordnung ist nur möglich, wenn die Lebensdauern und das Anisotropieverhalten der unterschiedlichen Spezies bekannt sind oder eine globale Analyse der Daten angewendet wird [Lim et al., 1995; Bialik et al., 1998].

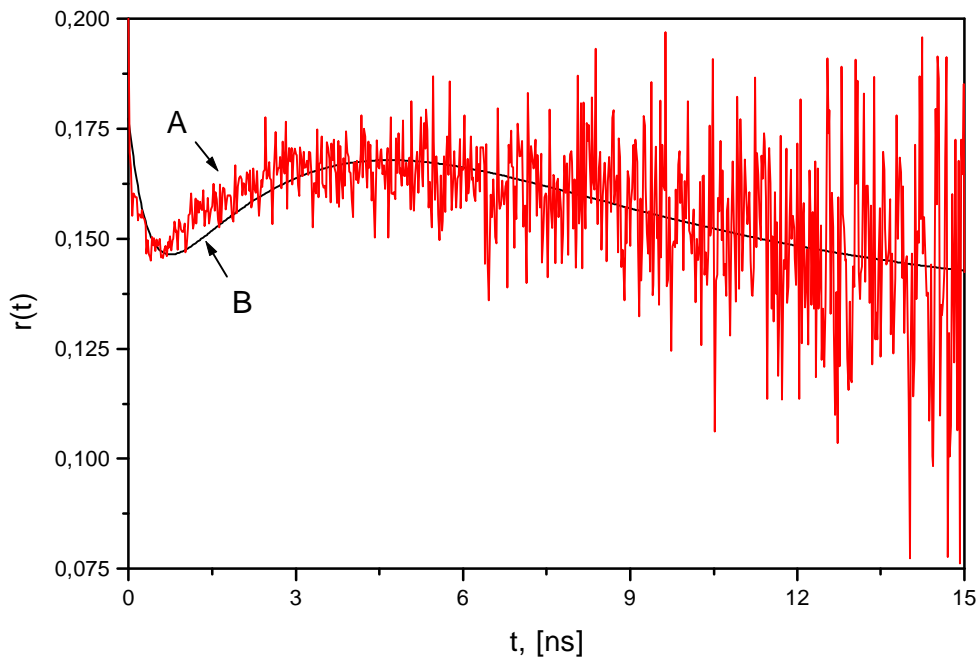


Abbildung 4-19 Zeitlicher Anisotropieverlauf einer einzelnen Rhodopsin-Probe des Typs ROSC316-TR (Meßkurve A). Die Kurve B gibt den modellierten Verlauf eines assoziierten Anisotropieverhaltens wieder. Die verwendeten Größen sind im Text beschrieben.

| | α_1 | α_2 | α_3 | τ_1 | τ_2 | τ_3 | χ^2 |
|------------|------------|------------|------------|----------|----------|----------|----------|
| ROSC140-TR | 0,49 | 0,34 | 0,17 | 0,45 | 1,53 | 3,8 | 1,12 |
| OGC316-TR | 0,30 | 0,25 | 0,45 | 0,48 | 1,90 | 4,2 | 1,20 |
| ROSC316-TR | 0,43 | 0,32 | 0,25 | 0,39 | 1,46 | 3,9 | 1,23 |

Tabelle 4-13 Anpassungsparameter der zeitaufgelösten Fluoreszenz dreier mit Texas Red markierter Rhodopsin-Proben. Die α_i sind die Amplituden und die τ_i die scheinbaren Lebensdauern der jeweiligen Anpassungen mit drei Exponentialfunktionen.

4.6 Der Dark/MII-Übergang des Rhodopsins

Eines der Hauptziele dieser Arbeit bestand im experimentellen Nachweis der durch die Photoaktivierung hervorgerufenen Veränderungen der flexiblen interhelikalen Proteinbereiche des Rhodopsins. Dazu wurde der Anisotropieverlauf des Grundzustandes mit dem des Intermediates MII unterschiedlicher Rhodopsin-Proben verglichen. Um den temporären Intermediatzustand MII möglichst lange aufrecht zu erhalten, wurden die Messungen bei einer Temperatur von 5 °C und pH 6 vorgenommen. Diese pH- und Temperaturwerte führten zu einem Gleichgewichtsverhältnis zwischen MI und MII von 0,06 bei den OGMizellen beziehungsweise 0,11 bei den ROS-Membranfragmenten.

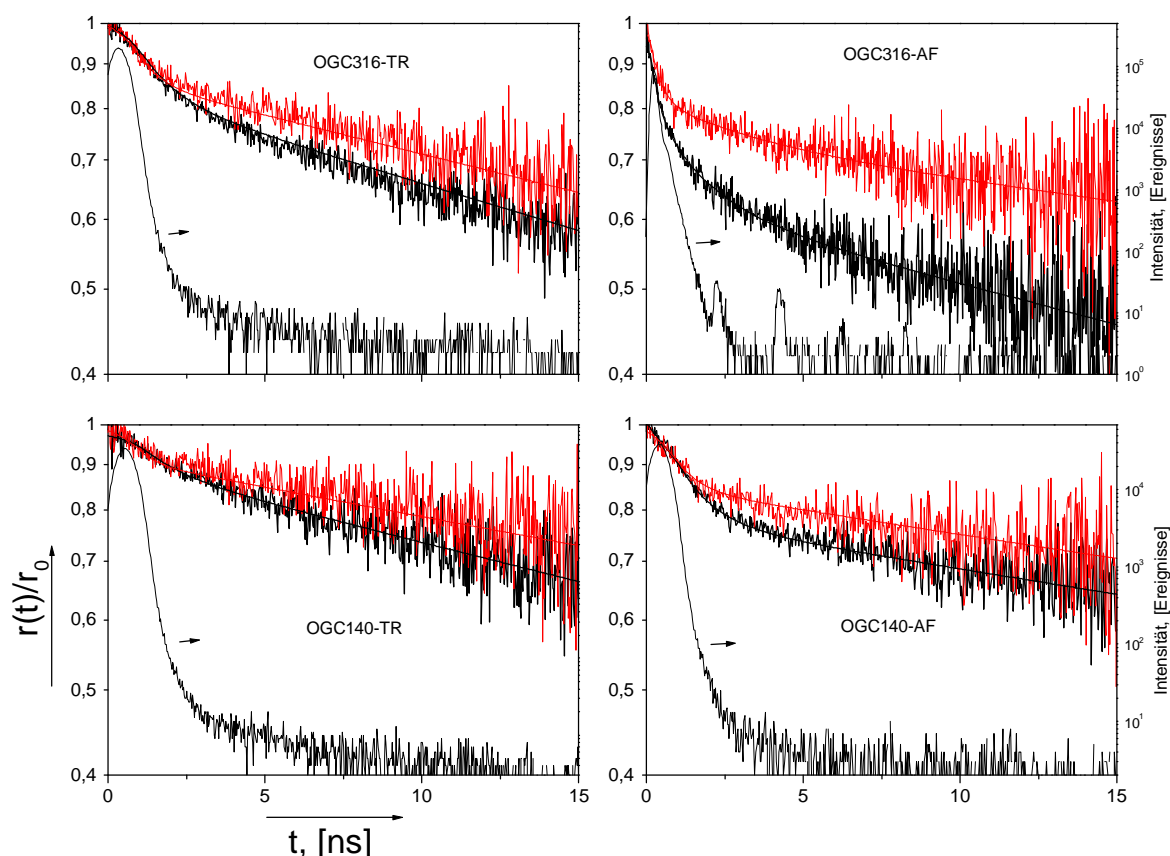


Abbildung 4-20 Normierte zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropien der mit Fluorescein (IAF) und Texas Red (TR) markierten Rhodopsin-Mizellen OGC316 und OGC140. Die oberen Kurven in jedem Teilbild zeigen das anisotrope Verhalten im MII-Intermediat und die unteren Kurven das Verhalten im Grundzustand. Unter den Meß- und Fitkurven sind die Anregungsprofile $L(t)$ dargestellt. Die zugehörigen mittleren Fluoreszenzlebensdauern im Grundzustand des Proteins waren $\langle \tau \text{ (C316-AF)} \rangle = 2,30$ ns, $\langle \tau \text{ (C140-AF)} \rangle = 2,35$ ns, $\langle \tau \text{ (C316-TR)} \rangle = 3,55$ ns, $\langle \tau \text{ (C140-TR)} \rangle = 3,26$ ns und im MII-Intermediat $\langle \tau_{\text{MII}} \text{ (C316-AF)} \rangle = 3,34$ ns, $\langle \tau_{\text{MII}} \text{ (C140-AF)} \rangle = 2,86$ ns, $\langle \tau_{\text{MII}} \text{ (C316-TR)} \rangle = 4,13$ ns sowie $\langle \tau_{\text{MII}} \text{ (C140-TR)} \rangle = 3,97$ ns.

Zur Berechnung der Anteile von MI und MII wurden die sofort nach der Photoaktivierung aufgenommenen Absorptionsspektren ausgewertet [Mielke, 2000]. Für die Extinktionskoeffizienten wurden $\epsilon_{\text{MI}}(478 \text{ nm}) = 44 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ sowie $\epsilon_{\text{MII}}(380 \text{ nm}) = 38 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet [Kibelbek et al., 1991].

Parkes und Liebman entwickelten eine empirische Näherungsformel für die Abhängigkeit des MI/MII-Gleichgewichts von Temperatur und pH-Wert: $\ln(\text{MII}/\text{MI}) = -9464/T - 1,608 \cdot (\text{pH}) + 44,87$ [Parkes und Liebman, 1984; Parkes et al., 1999]. Nach dieser Formel würde der MI-Anteil bei den ROS-Membranen 23 % betragen. Der Unterschied kommt möglicherweise durch die hier verwendete höhere Salzkonzentration von 150 mM KCl zustande, die eine verstärkte MII-Bildung verursacht [Delange et al., 1997]. Unter den angegebenen Bedingungen betrug die Halbwertszeit des MII-Zustandes beim Übergang zu MIII für die OG-Mizellen $t_{1/2} = 90$ min und für die ROS-Membranfragmente $t_{1/2} = 108$ min.

Die Werte wurden anhand der zeitlichen Änderung der MII-Absorptionsbande bei 380 nm bestimmt. Somit blieben 90 % des MII-Intermediats innerhalb einer Meßdauer von 15 Minuten zur Aufnahme einer Anisotropiekurve erhalten. Bei höheren Temperaturen verstärkt sich der Abbau des MII-Zustandes. Farrens und Khorana geben eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 15,9$ min für Rhodopsin-Mutanten in 0,1 % Dodecylmaltosid, bei pH 6 und 20 °C an [Farrens und Khorana, 1995].

Abbildung 4-20 zeigt die Meß- und Fitkurven des Anisotropieverhaltens verschiedener Rhodopsin-Mizellen im Grundzustand und im Intermediat MII. Dazu wurden die Fluoreszenzmarker AF und TR an die nativen Cysteinreste C316 und C140 gebunden und die zeitaufgelösten Anisotropiekurven auf einer normierten logarithmischen Skala $\log[r(t)/r_0]$ verglichen. Die Daten wurden an der Berliner Synchrotronanlage BESSY I aufgenommen. Die dortigen Anregungsimpulsbreiten von bis zu 0,9 ns verursachten durch die fehlende Auflösung im Kurzzeitbereich eine Reduzierung der Anfangsanisotropie r_0 , auf 0,31 für AF und 0,28 für TR⁴⁰. Da dieser Wert Bestandteil des Ordnungsparameters S_2 ist, erscheinen die weiter unten angeführten Tabellenwerte für diese Größe zu hoch. Auf den in diesem Abschnitt geführten Vergleich zwischen den Proteinzuständen hat dies jedoch keinen Einfluß.

Mit Ausnahme der Probe OGC316-AF wiesen die Anisotropien bei der konstanten Temperatur von 5 °C nur zwei Rotationskorrelationszeiten auf. Es stellte sich unabhängig von der Position und vom Labeltyp ein reproduzierbarer Unterschied im Zeitverlauf der Anisotropiefunktion zwischen den Proteinzuständen ein. Die Meßkurven zeigen eine erhöhte Bewegungsbeschränkung des LLK's im MII-Intermediat, verbunden mit einer Verlängerung der Mizellenrotationskorrelationszeit.

Die Tendenz zur Erhöhung der Bewegungsbeschränkung des LLK's ließ sich auch bei Membranfragmenten nachweisen. Abbildung 4-21 zeigt zwei Rhodopsin-Proben in den unterschiedlichen Zuständen. Diese Messungen bestätigen den bei den Mizellen beobachteten Effekt der Veränderung in der Labelumgebung durch eine drastische Erhöhung der Endanisotropie. Die Anisotropiefunktionen zeigen ähnliche Verläufe im Kurzzeitbereich. In Tabelle 4-14 sind die zugehörigen Ordnungsparameter S_2 als Parameter der einfachen Bewegungsgeometrie, und im Falle der Mizellen die Rotationskorrelationszeiten der Gesamtbewegung aufgeführt. Die Ordnungsparameter sind bei den Mizellen nahe eins und unterscheiden sich geringfügig zwischen dem III/IV-Loop (C140) und der Peptidsequenz zwischen Helix VII und den Palmitoylierungen (C316). Eine Differenz findet sich in S_2 zusätzlich zwischen den Fluorophoren IAF und TR sowie zwischen Mizellen und Membranfragmenten. Offensichtlich beeinflußt zum einen die Labelgröße den Ordnungsparameter und zum anderen erhöhen die angrenzenden Detergenzien die Bewegungsbeschränkung bei den Mizellen-Proben. Die mit Texas Red markierten Proben zeigen beim Zustandswechsel im Gegensatz zu denen mit Fluorescein markierten keine Änderung der Ordnungsparameter, sondern nur eine Verlängerung der Gesamtrrotationszeit.

⁴⁰ Am HASYLAB wurden dagegen für die mit Fluorescein markierten Proben Werte von $r_0 = 0,37$ erzielt.

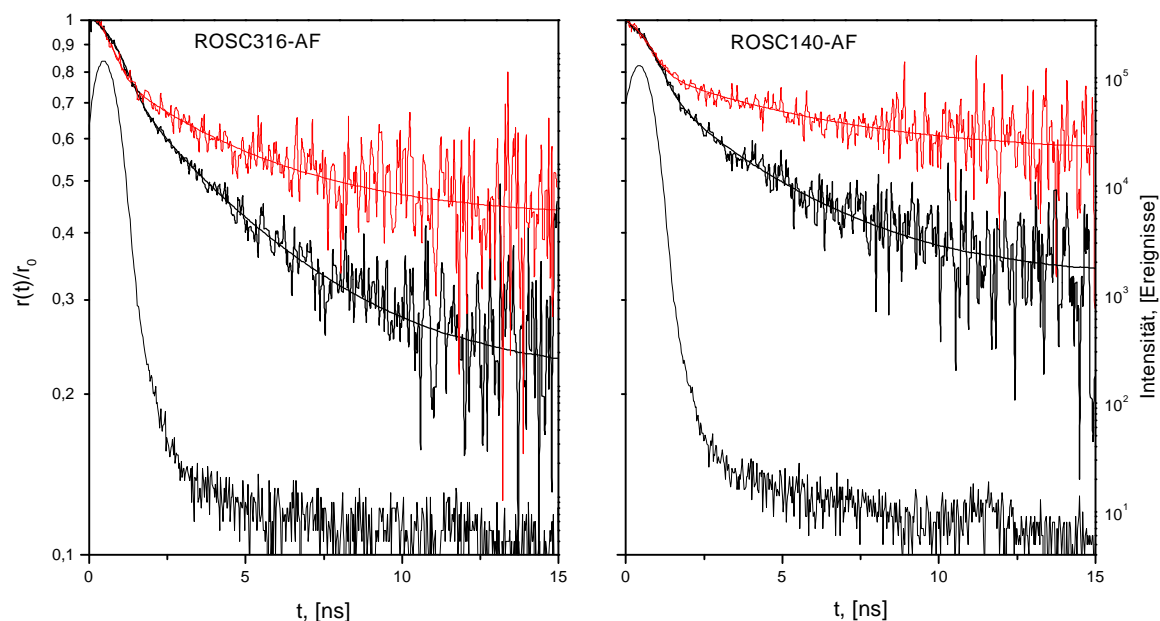


Abbildung 4-21 Normierte zeitaufgelöste Anisotropien der mit Fluorescein (IAF) markierten ROS-Membranfragmente C316-AF und C140-AF. Die oberen Kurven in jedem Teilbild zeigen das anisotrope Verhalten im MII-Intermediat und die unteren Kurven das Verhalten im Grundzustand. Unter den Meß- und Fitkurven sind die Anregungsprofile $L(t)$ dargestellt

| | $\phi_{\text{rot}} / \text{ns}$ | | S_2 | |
|-------------|---------------------------------|-----|-------|------|
| | dark | MII | dark | MII |
| OG C316-TR | 36 | 57 | 0,93 | 0,92 |
| OG C140-TR | 48 | 60 | 0,96 | 0,95 |
| OG C316-AF | 44 | 50 | 0,84 | 0,88 |
| OG C140-AF | 64 | 74 | 0,89 | 0,92 |
| ROS C316-AF | | | 0,43 | 0,61 |
| ROS C140-AF | | | 0,53 | 0,71 |

Tabelle 4-14 Vergleich der Rotationskorrelationszeiten der Gesamtbewegung und des Ordnungsparameters der einfachen Bewegungsgeometrie zwischen Grundzustand und Intermediatzustand MII. Die maximalen Fehler der hier aufgeführten Größen betragen $\Delta\phi_{\text{rot}} = \pm 11 \text{ ns}$, $\Delta S_2 = \pm 0,02$.

Die Anisotropiefunktionen der ROS-Membranfragmente wurden weiterhin mit dem erweiterten Bewegungsmodell angepaßt (Tabelle 4-15). Die Ordnungsparameter zeigen auch hier eine Erhöhung des Ordnungsgrades auf der zytoplasmatischen Seite der Membran beim Übergang aus dem Grundzustand in den aktiven Intermediatzustand MII. Die Diffusionskonstanten weisen ein unterschiedliches Verhalten auf. Die Rotationsdiffusion um die Symmetrieachse (D_{\parallel}) wird schneller, während die Bewegung der Symmetrieachse (D_{\perp}) nahezu unverändert bleibt.

| | $\langle P_2 \rangle \pm 0,03$ | | $\langle P_4 \rangle \pm 0,04$ | | $D_{ } / 10^9 s^{-1}$ $\pm 0,7 * 10^9 s^{-1}$ | | $D_{\perp} / 10^9 s^{-1}$ $\pm 0,5 * 10^7 s^{-1}$ | |
|-------------|--------------------------------|------|--------------------------------|------|---|-----|--|-------|
| | dark | MII | dark | MII | dark | MII | dark | MII |
| ROS C316-AF | 0,50 | 0,72 | 0,18 | 0,23 | 2,3 | 4,3 | 0,028 | 0,027 |
| ROS C140-AF | 0,62 | 0,81 | 0,32 | 0,45 | 2,2 | 3,3 | 0,021 | 0,017 |

Tabelle 4-15 Ordnungsparameter und Diffusionskonstanten der erweiterten Bewegungsgeometrie beim Übergang des Rhodopsins aus dem Grundzustand (dark) in den Intermediatzustand MII. Die Öffnungswinkel der Übergangsdipolmomente gegenüber der Symmetrieachse wurden bei diesen Anpassungen mit folgenden Werten konstant gehalten: $\theta_{\mu} = 9^{\circ}$, $\theta_{\nu} = 30^{\circ}$.

Aufgrund des Energie-Heterotransfers verursachte die Verschiebung des Retinalabsorptionsmaximums bei der Aktivierung des Proteins eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauern der extrinsischen Fluorophore. Da der Heterotransfer, wie im Kapitel 4.3 gezeigt, jedoch nur einen unwesentlichen Einfluß auf den Anisotropieverlauf hatte, wurden die gefundenen Effekte in $r(t)$ (Abbildung 4-20) tatsächlich einer lichtinduzierten Zustandsänderung zugeordnet. Der Einfluß der Depolarisation durch Homotransfer bei den Membranfragmenten braucht nicht berücksichtigt zu werden, da sich an dessen Quantität beim Übergang zwischen den Proteinzuständen nichts ändert.

4.7 Ergebnisse

Im Rahmen der Experimente zur zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie wurden an Bacteriorhodopsin drei und an Rhodopsin acht verschiedene Positionen in den interhelikalen Aminosäuresequenzen der Proteinoberflächen mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Die empirische Anpassung der Anisotropieverläufe $r(t)$ wurde mit einer Summe von ein bis drei Exponentialfunktionen vorgenommen. Die multi-exponentiellen Anpassungen enthielten einen Term mit einer schnellen Rotationskorrelationszeit im Subnanosekundenbereich $\phi_1 = 0,15 - 0,58$ ns, einen zweiten Term mit einer Rotationskorrelationszeit im Nanosekundenbereich $\phi_2 = 1,4 - 6,2$ ns und im Fall der Mizellen einen dritten Term mit der Rotationskorrelationszeit $\phi_3 = 30 - 50$ ns. Bei den Membranen bestand der dritte Term in einer konstanten Endanisotropie (r_{∞}) mit Werten zwischen 0,1 und 0,2. Die von Null verschiedene Endanisotropie weist auf eine verbleibende Ordnung der Übergangsdipolmomente hin. Diese Restordnung kann als eine beschränkte Bewegungsfreiheit der Fluoreszenzmarker interpretiert werden.

Die schnelle Komponente ϕ_1 wird im allgemeinen sowohl bei extrinsischen [Haran et al., 1992; Dong et al., 1997] als auch bei intrinsischen [Döring et al., 1997; Dijkstra et al., 1997; She et al., 1997] Fluorophoren der Eigenbewegung um die Bindungsstelle zugeordnet. Diese Zuordnung wird durch die Ergebnisse der Anisotropiemessungen an ungebundenen Fluorophoren unterstützt, denn die Rotationskorrelationszeiten der ungebundenen Fluorophore waren von gleicher Größenordnung wie die Kurzzeitkomponenten im gebundenen Fall.

Im Vergleich zu den mit NMR- und Anisotropieexperimenten bestimmten Rotationskorrelationszeiten der Tryptophan- und Tyrosinseitenketten von 10 – 70 ps [Palmer et al., 1993; Moncrieffe et al., 2000; Kemple et al., 1994; Ferreira et al., 1994] sind die hier gefundenen Zeiten größer, was mit dem größeren Eigenvolumen der Fluoreszenzmarker erklärt werden kann.

Die durch die Anpassung mit einer Summe von Exponentialfunktionen erhaltenen Amplituden und Korrelationszeiten zeigten beim Fluorescein keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Bindungspositionen. Die Ursache liegt einerseits darin, daß die Parameter voneinander nicht unabhängig sind und andererseits der Fluoreszenzmarker die Rotationsdiffusion dominiert. Zusätzlich besteht die Frage, wie die Beweglichkeit der Loops von ihren speziellen Konformationen abhängt. Die Konformation wird durch Art, Reihenfolge und Anzahl der Aminosäuren sowie durch die angrenzenden Helixstrukturen bestimmt [Baldomero et al., 1997]. Der vorgenommene Austausch ausgewählter Aminosäuren kann demnach zu Veränderungen in der Loop-Struktur führen [Hughson et al., 1991; Handel et al., 1993].

Mit Hilfe der funktionalen Abhängigkeit der Rotationsdiffusion von der Viskosität der Lösung wurden die Hydratationsvolumina der ungebundenen Fluorophore bestimmt. Obwohl die Fluorophore keine ideal kugelförmigen Rotoren darstellen, wiesen die Anisotropieverläufe unter den Standardmeßbedingungen einen monoexponentiellen Charakter auf. Die durch die Asymmetrie der Moleküle verursachte Aufspaltung der Rotationsbewegung [Chuang und Eisenhal, 1972] wurde ausschließlich in extrem viskosen Lösungen beobachtet. Die Schlußfolgerung in bezug auf die gebundenen Fluorophore ist, daß die dort beobachtete zweite Rotationskorrelationszeit nicht auf eine Komponente der Eigenbewegung der Fluorophore zurückzuführen ist. Da sich alle Bindungsstellen in den flexiblen Loop-Bereichen der Proteine befanden, liegt eher die Vermutung nahe, daß deren Beweglichkeit zur Depolarisation beitrug. Vergleichbare Rotationskorrelationszeiten von Protein-Loops werden u. a. von Juszczak et al. [Juszczak et al. 1997], Lim et al. [Lim et al., 1995] und Fa et al. [Fa et al., 1995] angegeben. Marque et al. [Marque et al., 1986] und Govindjee et al. [Govindjee et al., 1984] untersuchten insbesondere die Beweglichkeit des C-Terminus des Bacteriorhodopsins und ermittelten Rotationskorrelationszeiten von 1,8 – 1,1 ns beziehungsweise 4 ns unter vergleichbaren Meßbedingungen. Die Flexibilität des C-Terminus von Bacteriorhodopsin wurde auch mittels ^{13}C NMR von Tuzi et al. bestätigt [Tuzi et al., 1994]. Stivers et al. bestimmten mit NMR-Experimenten für den C-Terminus einer Tautomerase (4-OT)⁴¹ Rotationskorrelationszeiten von 0,7 – 1,4 ns [Stivers et al., 1996]. Bei den Fluoreszenzmarkern TR und IAEDANS fehlte die mittlere Zeitkomponente. Diese Chromophore besitzen langkettige Abstände zwischen ihren Ringsystemen und den Bindungsatomen mit Entfernungen von 14 Å (TR) beziehungsweise 8 Å (IAEDANS). Die Anisotropiemessungen von Haran et al. an IAEDANS, gebunden an 3-Phosphoglycerat Kinase, zeigten ebenfalls nur eine schnelle Rotationskorrelationszeit [Haran et al., 1992]. Die Rotationsdiffusion dieser Fluorophore scheint vom Einfluß der Bindung entkoppelt zu sein.

⁴¹ 4-oxalocrotonate tautomerase

Das anisotrope Fluoreszenzverhalten des Dansylmarkers (DNZ) wies dagegen keine Kurzzeitkomponente auf. Der Marker zeigte bei den Anisotropiemessungen von Schneider et al. an Immunglobulin ebenfalls keine Pikosekundenkomponente [Schneider et al., 1988]. Entweder fiel die schnelle Eigenbewegung unter die Auflösungsgrenze der Meßverfahren oder sie wurde durch die Kopplungsreaktion blockiert.

Eine Abweichung im Anisotropieverhalten gab es im Fall dreier einzelner mit TR markierter Rhodopsin-Proben, bei denen ein Anstieg der Anisotropiekurve beobachtet wurde. Die Ursache des Verhaltens kann die Verbindung einer heterogenen Fluoreszenz mit dem Anisotropieverhalten sein, vermutlich durch die Aggregationen der Proben verursacht. Diese als Lebensdauer assoziierte Fluoreszenzdepolarisation [Lakowicz, 1999] interpretierten Kurven wurden von der Auswertung ausgenommen.

Die zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ setzt sich in komplexer Weise aus allen beteiligten Depolarisationsprozessen zusammen. Zwischen den untersuchten Proben wurde deshalb in Bezug auf mögliche depolarisierende Wechselwirkungen unterschieden. Bei den meisten Proben kam es durch die breitbandige Absorption des Retinals in Verbindung mit den Emissionsspektren der Fluoreszenzmarker zum strahlungslosen Energietransfer (Energie-Heterotransfer) [Förster, 1948]. Durch die Überlagerung der Absorptionsbanden der Fluorophore mit den eigenen Emissionsbanden wurde zusätzlich der Energietransfer unter den Fluorophoren (Homotransfer) möglich. Die Überlagerung von Rotationsdiffusion und Energietransfer führt im allgemeinen zu einem komplexen Zeitverhalten der Fluoreszenzanisotropie [Tanaka und Mataga, 1982; Szabo, 1984; Tanaka, 1998; Fedchenia und Westlund, 1994, 1995; Johansson et al., 1996].

Der direkte Vergleich markierter Mizellen der Bacteriorhodopsin-Mutanten A160C und S35C mit und ohne Energie-Heterotransfer zeigte jedoch nur geringfügige Unterschiede im Anisotropieverhalten. Bei den Purpurmembranen der selben Mutanten lagen die Differenzen unterhalb der Rauschgrenze. Der Energie-Heterotransfer hatte demzufolge keinen signifikanten Einfluß auf die Anisotropiefunktion $r(t)$. Dieses experimentelle Ergebnis stimmt in ausgezeichneter Weise mit den Vorhersagen von Tanaka und Mataga überein [Tanaka und Mataga, 1982]. Die Autoren beschreiben den Einfluß des Energietransfers auf die Fluoreszenzanisotropie eines an ein Makromolekül gebundenen Donators. In dem untersuchten Modellsystem unterliegt der Donator einer internen Diffusionsbewegung und der Akzeptor ist starr an das Makromolekül gekoppelt. Das theoretische Modell sagt einen vernachlässigbaren Einfluß des Energietransfers auf die Anisotropie für eine schnelle Rotationsdiffusion des Donators voraus.

Der Energietransfer zwischen gleichartigen Fluorophoren (Homotransfer) wird mitunter verwendet, um Wechselwirkungen zwischen Proteinuntereinheiten zu untersuchen [Erijman und Weber, 1991, 1993] oder deren relative Entfernungen zu bestimmen [Hamman et al., 1996b].

Um die depolarisierende Wirkung des intramolekularen Homotransfer zu studieren, wurden hier Rhodopsin-Mizellen an den Positionen C140 und C316 im Verhältnis 1:1 markiert. Im Gegensatz zum Heterotransfer wurde bei diesen Proben eine zusätzlich zur Rotationsdiffusion auftretende Depolarisation beobachtet.

Nach einem Modell von Karolin et al. [Karolin et al., 1998] wurden daraufhin minimal und maximal mögliche Entfernungen (R) der an die Cysteine C140 und C316 gebundenen Fluorophore IAF und TR berechnet: $R(\text{C316-AF/C140-AF}) = 22 - 32 \text{ \AA}$ und $R(\text{C316-TR/C140-TR}) = 26 - 39 \text{ \AA}$. Diese Abstände stimmen sehr gut mit dem aus Röntgendiffraktionsexperimenten mit Schweratomlabeln ermittelten Wert von $27 \pm 2 \text{ \AA}$ überein [Mielke, 2000].

Die höheren Werte des TR-Labels gegenüber dem IAF können dessen längeren Bindungsabstand zugeschrieben werden (Tabelle 3-2). Albert et al. [Albert et al., 1997] geben für den Abstand zwischen C140 und S338 (oder S342) einen Wert von $18 \pm 3 \text{ \AA}$ an. Die Positionen S338 und S342 befinden sich wie die C316 im C-Terminus der Polypeptidkette.

Der Einfluß des Homotransfers auf die Fluoreszenzanisotropie wurde weiterhin an zweidimensionalen Systemen, den Membranen, untersucht. Dazu wurde die Kopplungsreaktion der Fluorophore bei den Bacteriorhodopsin-Mutanten V130C und A160C zu unterschiedlichen Zeitpunkten beendet, wodurch verschiedene Markierungsstöchiometrien erzeugt wurden [Alexiev, 1995]. Die zeitaufgelösten Messungen zeigten eine Verstärkung der Depolarisation sowie eine Reduzierung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer mit steigender Markierungsstöchiometrie. Die gleichen Tendenzen finden Blackman et al. [Blackman et al., 1998] bei ihren Homotransferexperimenten mit Eosin-5-maleimide am AE1⁴².

Neben der empirischen Analyse wurden die Anisotropien auch hinsichtlich konkreter physikalischer Parameter, den Ordnungsparametern und den Diffusionskonstanten, ausgewertet. Es wurden dabei zwei Bewegungsgeometrien unterschieden:

- die einfache Geometrie - diffusive Schwankungsbewegung des auf einer Achse mit zylindrischer Symmetrie liegenden Übergangsdipolmomentes der Emission (oder der Absorption) des Fluoreszenzmarkers [Kinosita et al., 1977]
- die erweiterte Geometrie - zusätzliche Rotation der Übergangsdipolmomente um die Symmetrieachse während ihrer Schwankungsbewegung [van der Meer et al., 1984]

Während mit der einfachen Bewegungsgeometrie nur monoexponentielle Anisotropieverläufe angepaßt werden können, lassen sich mit der Erweiterung auch komplexere Meßkurven parametrisieren. Es wurden bei der Auswertung keine zusätzlichen Annahmen über mögliche Modelle der Gleichgewichtsverteilungsfunktion⁴³ der Übergangsdipolmomente gemacht. Die Anwendung der Näherungslösung für $r(t)$ des erweiterten Modells, nach van der Meer et al. auf 23 Meßkurven führte jedoch zur Bestätigung eines Gaußmodells [Kinosita et al., 1982] für die Verteilung der Übergangsdipolmomente im Gleichgewicht [van der Meer et al., 1984]. Die bei den Anpassungen ermittelten Diffusionskonstanten ergaben eine schnelle Rotationsdiffusion der Übergangsdipolmomente um die Symmetrieachse von $D_{\parallel} = 10^9 - 10^{10} \text{ s}^{-1}$ und eine langsamere Eigendiffusion der Symmetrieachse mit Werten von $D_{\perp} = 10^7 \text{ s}^{-1}$.

⁴² Erythrozyten-Anion-Austausch-Protein, Band 3

⁴³ Wie zum Beispiel das Kegelmodell nach Kinosita et al., [Kinosita et al., 1977]

Chen und Cheng fanden unter der Annahme einer Zylindersymmetrie für den Fluorophor DPH, gebunden an Phosphatidylcholin (PC) in Vesikelsystemen, Diffusionskonstanten von $2 - 3 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ für die Schwankungsbewegung der Hauptachse [Chen und Cheng, 1996]. Die Rhodopsin-Mutanten des I/II-Loops wurden unter beiden Bewegungsgeometrien verglichen. Es konnte eine Abhängigkeit der Ordnungsparameter von der Position der Kopplungsstelle innerhalb des I/II-Loops beobachtet werden. Die an der Proteinoberfläche in bezug auf den Randbereich der Dichteprojektion zentraler gelegene Punktmutation L72C war durch eine stärkere Bewegungsbeschränkung charakterisiert als die äußeren Positionen Q64C und V63C.

Weiterhin diffundierte die Symmetrieachse (im Bild der Erweiterung) bei den äußeren Mutanten schneller als bei den inneren. Der Ordnungsparameter zweiten Grades $\langle P_2 \rangle$ der Symmetrieachse des Label-Loop-Konstruktes lag oberhalb von 0,9, was auf einen stark eingeschränkten Bewegungsbereich hindeutet.

Im weiteren wurde das Verhalten der Label-Loop-Konstrukte unter Variation einer Reihe von äußeren Parametern untersucht. Die Änderung der Temperatur zeigte mit Ausnahme der ROS-Membranfragmente ein Schwellenverhalten des Ordnungsparameters. Unterhalb des Grenzbereichs von 20 – 25 °C blieb der Ordnungsparameter temperaturunabhängig, oberhalb dieses Bereichs reduzierte sich der Ordnungsgrad mit steigender Temperatur. Bei den ROS-Membranfragmenten erhöhte sich die Ordnung im Gegensatz zu den anderen Proben kontinuierlich mit steigender Temperatur.

Der Effekt der Temperaturschwelle kann verschiedene Ursachen haben:

1. Bei den meisten biologischen Membranen existiert ein thermotropischer Phasenübergang von der Gel-Phase zur flüssig kristallinen Phase zwischen 10 und 40 °C [Voet und Voet, 1995]. Die Bezeichnung Phase steht hier im Zusammenhang mit der Struktur der Fettsäureketten. Lipiddoppelschichten sind nichtkovalente, kooperative Strukturen. Im geordneten Zustand haben die C-C-Bindungen eine *trans*-Konformation, während bei Temperaturen oberhalb des Phasenübergangs vermehrt Bindungen in der *gauche*-Konformation auftreten [Stryer, 1990]. Diese Phasenteilung läßt sich deshalb auch auf die mizellaren Proben mit den CHAPS und OG-Detergenzien übertragen. Die Phasenübergangstemperatur ist von der Art der Lipide, der Länge ihrer Kohlenwasserstoffketten und dem Wassergehalt abhängig [Cevc und Marsh, 1987]. Heyn et al. zeigten an DMPC⁴⁴-Bacteriorhodopsin-Vesikelsystemen, daß das Protein-Lipid-Verhältnis ebenfalls einen Einfluß auf die Übergangstemperatur hat [Heyn et al., 1981a, 1981b; Rehorek et al., 1985]. Das Fehlen des Übergangs bei den ROS-Membranfragmenten deutet auf einen Phasenwechsel außerhalb des untersuchten Temperaturbereichs von 5 - 40 °C hin. Lamba et al. untersuchten ROS-Membranen mit Infrarotspektroskopie und fanden eine Phasenübergangstemperatur von $< -4 \text{ °C}$, was diese Interpretation unterstützt [Lamba et al., 1994].

2. Die Konformationen von Polypeptidketten weisen ebenfalls Temperaturübergänge auf: Experimente der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie an Leucin-Enkephalin und zweier synthetischer Analoga zeigten Konformationsänderungen mit einer Übergangstemperatur von 15 °C [Harms et al., 1998].

⁴⁴ 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin

Nishimoto et al. beobachteten eine abrupte Erhöhung der Bewegungsfreiheit des Indolrings vom Trp62 in einer Lysozym-Mutante oberhalb von 30 °C [Nishimoto et al., 1998]. Der hier gemessene Temperatureffekt war unabhängig von der Bindungsposition und der Art des Fluoreszenzmarkers. Für verschiedene Polypeptidketten würde man jedoch unterschiedliche Temperaturverhalten erwarten. Die einzigen Gemeinsamkeiten der Proben bestanden in ihrer Bindungsart und in der jeweiligen Proteinumgebung. Eine mögliche Interpretation ist deshalb die Veränderung starrer Konformationen der Proteinoberfläche durch die Zuführung thermischer Energie.

Das Ansteigen des Ordnungsgrades an der Oberfläche der ROS-Membranen bei Erhöhung der Temperatur wird von keiner der beiden Argumentationen unterstützt und bleibt ungeklärt. Es ist nicht auszuschließen, daß es sich hier um einen präparativen Effekt handelt.

Die Messungen an Bacteriorhodopsin-Mizellen und Purpurchromophoren zur pH-Abhängigkeit der Anisotropie führten bei steigenden pH-Werten zu reduzierten Endanisotropien. Ein solches Verhalten wurde auch von Marque et al. [Marque et al., 1986] am markierten C-Terminus beobachtet. Die direkte Ursache dieses Effektes ist unklar, da neben dem protonierbaren Fluoreszenzmarker zusätzlich verschiedene protonierbare Gruppen an der Proteinoberfläche existieren. Die naheliegende Interpretation ist eine abstoßende Coulombwechselwirkung zwischen Proteinoberfläche und Label. Die größere Bewegungsfreiheit kann durch eine größere Entfernung des Fluoreszenzmarkers von der Proteinoberfläche interpretiert werden. Es ist auch eine Veränderung der Loop-Konformation, verbunden mit einer Erweiterung zum Lösungsvolumen nicht auszuschließen.

Die Änderung der Ionenstärke in der Probenlösung führte zu Abweichungen im mittleren Zeitbereich der Anisotropiefunktion $r(t)$. Bei fehlenden Ionen sank die Amplitude der mittleren Zeitkomponente der Anisotropie. Der Effekt ist von besonderem Interesse, da in diesem Zeitbereich der Einfluß der flexiblen Loop-Strukturen erwartet wird. Durch die Zugabe von Ionen in die Lösung werden vor allem die effektiven Oberflächenladungen der Proteinoberflächen abgeschirmt [Alexiev, 1994b]. Es ist deshalb möglich, daß sich die Veränderung auf Coulombwechselwirkungen zwischen den interhelikalen Bereichen an der Proteinoberfläche zurückführen läßt.

Um die Sensitivität des Fluorophors gegenüber seiner Umgebung zu testen, wurde der sich auf der zytoplasmatischen Seite befindliche C-Terminus bei drei Bacteriorhodopsin-Purpurchromophoren enzymatisch abgetrennt. Die an den zytoplasmatischen EF-Loop (A160C) gekoppelten Fluorophore IAF und TR wiesen eine starke Erhöhung der Bewegungsfreiheit nach der Abtrennung auf. Beim Gegenteil mit der extrazellulären Mutation V130C trat keine Änderung des Anisotropieverhaltens ein. Dieses einfache Experiment belegt die Empfindlichkeit der Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie in bezug auf molekulare Veränderungen an den Proteinoberflächen. Ein wesentliches Ziel der Anisotropieexperimente bestand in dem experimentellen Nachweis der Veränderung sterischer und dynamischer Parameter der zytoplasmatischen Loops bei der Photoaktivierung des Rhodopsins. Es konnte eine Verstärkung der sterischen Bewegungsbeschränkung der Label-Loop-Konstrukte der Positionen C140 (III/IV-Loop) sowie C316 (Peptidsequenz zwischen Helix VII und den Palmitoylierungen C322, C323) im aktiven Intermediatzustand MII gegenüber dem Grundzustand gemessen werden.

Photoinduzierte Veränderungen in diesen beiden Positionen wurden auch von Klein-Seetharaman et al. mit ^{19}F -NMR-Spektroskopie gefunden [Klein-Seetharaman et al., 1999b]. Bei den Mizellenproben verursachte die Photoaktivierung des Rhodopsins eine Verlangsamung der Gesamtrotation. Dieser Effekt der Volumenzunahme ist auch mit photoakustischen Methoden untersucht worden, wobei die Volumenänderung zeitlich noch vor dem Intermediatzustand MII beobachtet wurde [Marr und Peters, 1991; Straßburger et al., 1997]. Sie scheint ein direktes Resultat der Isomerisierung des Retinal-Chromophors von der 13-*cis* in die all-*trans*-Konformation zu sein.

Im Bild der erweiterten Bewegungsgeometrie änderte sich die Dynamik der Symmetrieachsen der Label-Loop-Konstrukte jedoch nicht.

