

## 5 Messungen der zeitaufgelösten Fluoreszenz

Im folgenden Kapitel werden mit Hilfe der Messungen der zeitaufgelösten Fluoreszenz und der daraus berechneten mittleren Fluoreszenzlebensdauern die an den gelabelten Proben beobachteten Energietransferprozesse untersucht.

Der erste Abschnitt 5.1 gibt einen Überblick über das prinzipielle Fluoreszenzverhalten und dessen Unterteilung in Probenkategorien. Im Kapitel 5.2 wird der intramolekulare Energie-Heterotransfer betrachtet. Es handelt sich hierbei um den Transfer von Anregungsenergie innerhalb eines Donator-Akzeptor-Paares ohne Wechselwirkung mit anderen Donatoren oder Akzeptoren. Es werden minimale und maximale Abstände zwischen den Übergangsdipolmomenten der Paare berechnet. In diesem Kapitel werden ausschließlich Messungen an Mizellen-Proben untersucht.

In dem darauf folgenden Kapitel 5.3 wird ein Modell zur Beschreibung des Energietransfers in zweidimensionalen Systemen angewendet, um Aussagen über die Membranproben treffen zu können. Die Betrachtungen werden hier auf Proben mit geringer Markierungsstöchiometrie beschränkt, um Donator-Donator-Wechselwirkungen (Homotransfer) auszuschließen<sup>45</sup>. Es wird ein Modellparameter, der Abstand der geringsten Nähe zwischen Donator und Akzeptor, für vier verschiedene Membranfragmente bestimmt. Der abschließende Abschnitt 5.4 beinhaltet die zusammengefaßten Ergebnisse und einen Vergleich mit den Resultaten anderer Autoren.

### 5.1 Das Fluoreszenzverhalten

Das zeitaufgelöste Fluoreszenzverhalten  $I(t)$  eines Fluorophors wird durch die Summe aller Prozesse bestimmt, die seinen elektronischen Anregungszustand deaktivieren. Für einen Emittenten, der keinen intermolekularen Wechselwirkungen unterliegt, gibt das Jablonski-Schema die möglichen Relaxationsprozesse anschaulich wieder [Jablonski, 1935]. Die Deaktivierungsraten addieren sich in diesem Fall zu einer zeitunabhängigen Gesamtrate und die Besetzung des Anregungszustandes klingt exponentiell ab. Ein komplexerer Funktionsverlauf von  $I(t)$  wird im allgemeinen beobachtet, wenn zusätzliche Wechselwirkungen mit äußeren Partnern auftreten.

Die in dieser Arbeit untersuchten Emissionen der gebundenen Fluoreszenzmarker wiesen zu einem großen Anteil multiexponentielle Intensitätsverläufe auf. Die Modellierung und Entfaltung der Meßkurven erfolgte mit einer Summe von ein bis vier Exponentialfunktionen. Den einzelnen Komponenten der Exponentialterme wurde dabei keine physikalische Bedeutung zugeordnet. Als physikalisch relevanter Parameter wurde die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\langle\tau_D\rangle$  bei der analytischen Beschreibung verwendet (Gleichung(2.9)). Um ein Verständnis für das unterschiedliche Fluoreszenzverhalten zu entwickeln, war es notwendig, die Proben in Gruppen zu unterteilen.

---

<sup>45</sup> Der Homotransfer wird in Kapitel 2.4.3 untersucht.

Das Kriterium der Unterteilung war der neben der spontanen Emission dominierende Deaktivierungsprozeß des elektronischen Anregungszustandes des Fluorophors. Aufgrund der in dieser Arbeit untersuchten Probenkonstellation, ein kovalent gebundener Fluoreszenzmarker in örtlicher Nähe zu einem breitbandig absorbierenden Proteinchromophor, bestand der stärkste Einfluß in dem als strahlungsloser Energietransfer (RET) bezeichneten Prozeß (Kapitel 2.4). Die Unterteilung wurde folglich nach den verschiedenen Arten des Energietransfers vorgenommen.

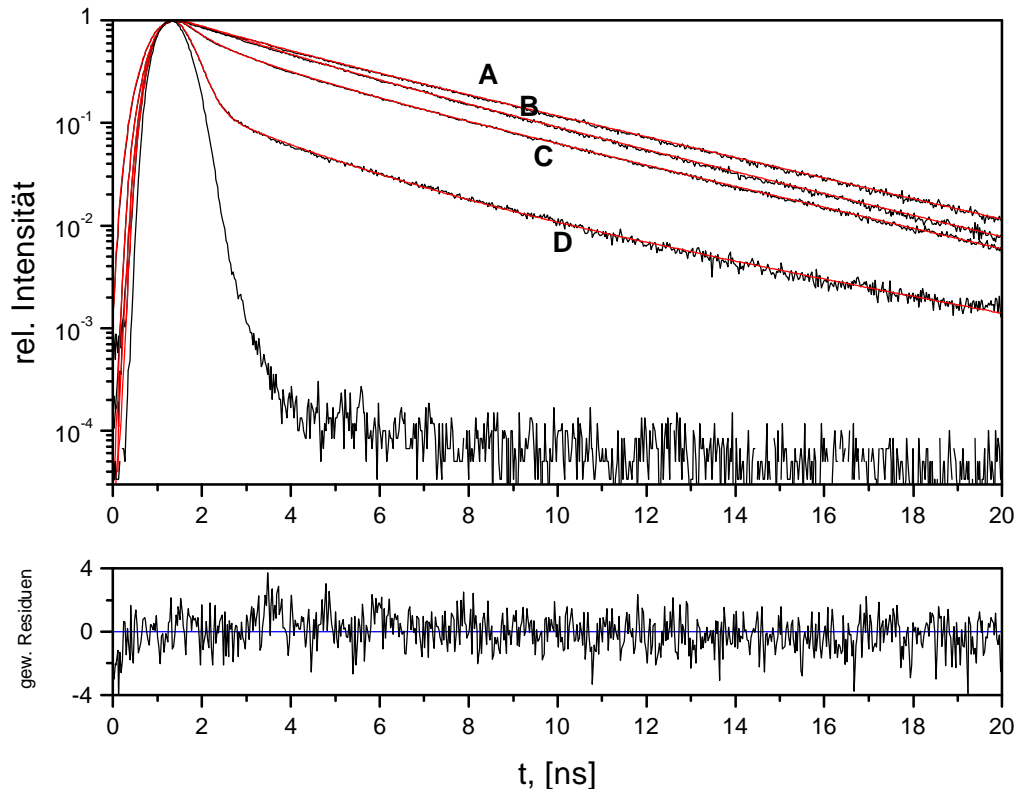
Die in Tabelle 5-1 aufgeführten Proben geben die für den in der linken Spalte angegebenen Transferprozeß notwendige äußere Form an. Es ist prinzipiell nicht möglich, das Verhalten aller Proben mit nur einem Energietransfermodell zu beschreiben. Vielmehr muß jede Probengruppe mit einer separaten Beschreibung der Verhältnisse zwischen den Energie-Donatoren und Akzeptoren behandelt werden.

Prozeß	Proben
intramolekularer Energie-Heterotransfer	Mizellen
intramolekularer Energie-Homotransfer	doppelt gelabelte Mizellen ohne Retinal beziehungsweise mit reduzierter Schiffcher Base
zweidimensionaler Energie-Heterotransfer	Membranfragmente mit niedriger Markierungsstöchiometrie
zweidimensionaler Energie-Homotransfer	Membranfragmente ohne Retinal beziehungsweise mit reduzierter Schiffcher Base
zweidimensionaler Hetero- und Homotransfer	Membranfragmente

**Tabelle 5-1** Zuordnung der verwendeten Proben zu dem jeweils möglichen Energietransferprozeß. Heterotransfer bezeichnet den Energieaustausch zwischen unterschiedlichen Chromophoren (Donator-Akzeptor-Systeme) und Homotransfer den Austausch zwischen gleichartigen Chromophoren (Donator-Donator-Systeme)

Als Beispiel für die Notwendigkeit der Unterteilung ist in Abbildung 5-1 das Fluoreszenzabklingverhalten  $I(t)$  der Fluorescein (IAF) markierten Bacteriorhodopsin-Mutante V130C dargestellt. Alle vier Kurven basieren auf der Emission des gleichen Labels an der gleichen Bindungsposition. Die beobachteten Differenzen beruhen auf dem unterschiedlich starken Einfluß des Energietransfers: Bei Probe A ist der Energietransfer ausgeschlossen, keine spektrale Überlagerung existiert. Probe B unterliegt in einem geringen Maße dem zweidimensionalen Homotransfer zwischen Fluoreszenzmarkern benachbarter Opsine. In der Probe C tritt intramolekularer Heterotransfer zwischen dem Fluoreszenzmarker (Donator) und dem Retinal (Akzeptor) auf. In D überlagern sich Homo- und Heterotransfer in einem zweidimensionalen System. Das beobachtete nichtexponentielle Verhalten wurde jedoch nicht ausschließlich durch den Energietransfer verursacht. Für die Anpassung der Kurve A, bei welcher RET ausgeschlossen war, wurden zwei Exponentialterme benötigt.

Chen und Scott [Chen und Scott, 1985] geben für das an Hühnerei Ovalbumin gebundene IAF ebenfalls ein biexponentielles Fluoreszenzabklingen an. Die Ursache liegt vermutlich in unterschiedlichen lokalen Umgebungswchselwirkungen. In den folgenden beiden Abschnitten werden zwei der in Tabelle 5-1 aufgeführten Kategorien beschrieben.



**Abbildung 5-1** Zeitaufgelöstes Fluoreszenzabklingen der Bacteriorhodopsin-Mutante V130C-AF unter Standardbedingungen, A: gebleichte Mizellen,  $\langle\tau\rangle = 3,70$  ns B: gebleichte Purpurmembranen, 11 % gelabelt,  $\langle\tau\rangle = 3,27$  ns C: Mizellen,  $\langle\tau\rangle = 1,65$  ns; D: Purpurmembranen, 11 % gelabelt,  $\langle\tau\rangle = 0,28$  ns; Die in der unteren Abbildung befindlichen gewichteten Residuen beziehen sich auf die Anpassung der Kurve D.

## 5.2 Intramolekularer Energie-Heterotransfer

Die Untersuchung der Energietransferprozesse zwischen den Fluoreszenzmarkern und dem Proteinchromophor bietet die Möglichkeit der intramolekularen Abstandsbestimmung zwischen den wechselwirkenden Chromophoren. Die auf die hier untersuchten Probentypen allgemein angewandte Theorie [Förster, 1948] gibt eine Relation zwischen den Abständen  $R$  der Donator/Akzeptor-Paare, der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente  $\kappa^2$ , und der Energietransferrate  $k_T$  an (Kapitel 2.4, Gleichung (2.43)). In einem ersten Schritt wird durch die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer des Donators mit und ohne Akzeptor<sup>46</sup> die Transfereffizienz  $E$  berechnet (Gleichung (2.49)).

<sup>46</sup> Das bedeutet nicht zwingend die präparative Entfernung des Akzeptor, sondern die Aufhebung seiner Funktion als solcher.

Die Fluoreszenz des Akzeptors kann dabei vernachlässigt werden [Alfano et al., 1976; Govindjee et al., 1978; Kandori et al., 1995]. In einem zweiten Schritt wird ein Bereich des Försterradius  $R_0$  ermittelt.

Bei gegebenen Randparametern (Gleichung (2.47)) werden die minimalen und maximalen Werte von  $R_0$  durch den Orientierungsparameter  $\kappa^2$ , beziehungsweise dessen mittleres Quadrat  $\langle \kappa^2 \rangle$  bei Betrachtung eines Ensembles von D/A-Paaren, bestimmt.

Die Anisotropiemessungen ermöglichen einen beschränkten Zugang zu  $\langle \kappa^2 \rangle$ , dessen Größe zwischen 0 und 4 variieren kann. Die Möglichkeit dieses Parameters, gegen Null zu streben, hat dabei einen entscheidenden Einfluß auf die Berechnung des Försterradius  $R_0$ . Obwohl eine exakte Berechnung von  $\langle \kappa^2 \rangle$  nach Gleichung (2.50) in dem hier angewandten experimentellen Rahmen nicht möglich ist, lassen sich Beschränkungen für die möglichen Werte von  $\langle \kappa^2 \rangle$  angeben. Voraussetzungen sind die Annahme des dynamischen Grenzfalls bei der Bildung der Mittelwerte und die Axialsymmetrie der Verteilung der Emissionsübergangsdipolmomente bezüglich der Bindungsstelle<sup>47</sup>.

In den Tabelle 5-2 und Tabelle 5-3 sind Parameter verschiedener Bacteriorhodopsin- und Rhodopsin-Proben aufgeführt, die wie folgt ermittelt wurden:

Die oberen und unteren Grenzen für das mittlere Quadrat des Orientierungsparameters  $\langle \kappa^2 \rangle$  können durch die Bestimmung der Depolarisationsfaktoren des Donators  $\langle d_D \rangle$  des Akzeptors  $\langle d_A \rangle$  berechnet werden (Gleichung (2.51) und (2.52)). Die Bestimmung von  $\langle d_D \rangle$  muß an Proben ohne Energietransfer erfolgen. Die dazu notwendigen Modifikationen (Bleichen, Reduzierung der Schiffschens Base) führen mitunter zu Veränderungen in der Umgebung der Fluorophore. Um Artefakte auszuschließen, war deshalb eine andere Vorgehensweise notwendig. Die Proben wurden alle im Grundzustand verglichen. Die Depolarisation in diesem Zustand mit Energietransfer wird durch die Gesamttransferdepolarisation  $\langle d_T \rangle$  beschrieben (Gleichung (2.54)). Da das Retinal keine Bewegung im Proteingerüst ausführt [Kouyama et al., 1981], wird  $\langle d_A \rangle = 1$  gesetzt. Der Vergleich des Anisotropieverlaufs von Proben mit und ohne Energietransfer (Kapitel 4.3) zeigte einen vernachlässigbaren Einfluß des Transfers, so daß in Näherung gilt:  $\langle d_T \rangle \approx \langle d_D \rangle$ .

Die zur Berechnung des Försterradius  $R_0$  zusätzlich notwendigen Größen wie u.a. Überlagerungsintegrale und Quantenausbeuten (Gleichung (2.47)) sind im Kapitel 4.1 enthalten. Die Werte für die Rhodopsin-Proben wurden in Analogie zu den obigen Annahmen beim Bacteriorhodopsin ermittelt. Die Werte gelten wiederum auf der Grundlage der Voraussetzungen bezüglich der Depolarisationsfaktoren  $\langle d_A \rangle$  und  $\langle d_T \rangle$ . Die starre Orientierung des Akzeptors gegenüber dem Abstandsvektor hat eine große Variation in  $\langle \kappa^2 \rangle$  zur Folge (Tabelle 5-2 und Tabelle 5-3).

---

<sup>47</sup> Kapitel 2.4.1

Probe	$\langle d_D \rangle$	$\langle \kappa^2 \rangle_{\min}$	$\langle \kappa^2 \rangle_{\max}$	$R_0 / \text{Å}$	E	R / Å
bRS35C-AF	0,47	0,10	3,16	36-64	0,58	34-61
bRA160C-AF	0,58	0,08	3,36	35-69	0,59	33-65
bRV130C-AF	0,74	0,05	3,63	31-63	0,55	30-61

**Tabelle 5-2** Vergleich dreier Bindungspositionen an Bacteriorhodopsin hinsichtlich ihrer Energietransferparameter unter Standardbedingungen (siehe Text). Die Größen bedeuten im einzelnen:  $\langle \kappa^2 \rangle_{\min}$ ,  $\langle \kappa^2 \rangle_{\max}$  die limitierenden mittleren Quadrate der Orientierungsparameter,  $\langle d_D \rangle$  die Depolarisation des Donators,  $R_0$  der Försterradius, E die Transfereffizienz und R der Abstand zwischen Donator und Akzeptor.

Der daraus resultierende große Bereich für den Abstand zwischen Donator und Akzeptor läßt sich nur durch eine genauere Kenntnis der Orientierung des Emissionsübergangsdipolmomentes des gebundenen Fluorophors gegenüber dem Abstandsvektor einschränken. Diese Information ist aber in den Anisotropiemessungen nicht enthalten.

Der Fakt, daß es sich bei diesen Meßreihen um den selben Fluoreszenzmarker (Fluorescein) an allen Bindungspositionen handelt, wird durch vergleichbare Försterradien  $R_0$  widerspiegelt. Die verschiedenen Bindungsstellen zeigen vergleichbare Transfereffizienzen. Mit Ausnahme der Mutante K245C liegen die Transfereffizienzen E zwischen 0,34 und 0,39, ein Hinweis auf die zentrale Lage des Retinals und die Dominanz der Labeleigenbewegung.

Probe	$\langle d_D \rangle$	$\langle \kappa^2 \rangle_{\min}$	$\langle \kappa^2 \rangle_{\max}$	$R_0 / \text{Å}$	E	R / Å
OGC140-AF	0,62	0,071	3,43	32,5-62,0	0,37	35,5-67,8
OGC316-AF	0,61	0,073	3,42	32,6-62,0	0,39	35,1-66,8
OGK245C-AF	0,71	0,052	3,59	30,8-62,5	0,16	40,6-82,4
OGV63C-AF	0,61	0,073	3,42	32,6-62,0	0,38	35,4-67,3
OGQ64C-AF	0,61	0,073	3,42	32,6-62,0	0,38	35,4-67,3
OGL68C-AF	0,68	0,058	3,53	31,4-62,3	0,36	34,6-68,6
OGR69C-AF	0,65	0,065	3,48	32,0-62,1	0,34	35,7-69,4
OGL72C-AF	0,69	0,056	3,55	31,2-62,4	0,34	34,8-69,7

**Tabelle 5-3** Vergleich verschiedener Bindungspositionen an Rhodopsin hinsichtlich ihrer Energietransferparameter. Die Tabelle zeigt die Parameter von mit Fluorescein markierten Mizellenproben. Die diesen Parametern zugrunde liegenden Messungen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Bedeutungen der tabellierten Größen sind in Tabelle 5-2 sowie im Text enthalten.

Wie in Tabelle 5-3 aufgeführt, liegen die Depolarisationsfaktoren  $\langle d_D \rangle$  der OG-Mizellen gleichfalls in einem engen Bereich zwischen 0,61 und 0,71. Dies deutet den starken Einfluß der Detergenzien auf die Bewegungsbeschränkung der Label-Loop-Konstrukte an. Da die Struktur des Bacteriorhodopsins<sup>48</sup> weitgehend bekannt ist, bot sich die Möglichkeit einer weiteren Einschränkung der Extremwerte für das mittlere Quadrat des Orientierungsparameters  $\langle \kappa^2 \rangle$  an.

<sup>48</sup> siehe Kapitel 1.3.1

Die Bestimmung des Abstandes von der Mitte des Retinals ( $C_{10}$ -Kohlenstoff) zur Bindungsposition ( $C_{\alpha}$ -Kohlenstoff) aus vorhandenen Strukturdaten plus maximalem Bindungsabstand sowie Labelgröße ergeben einen größten Abstand, aus dem sich wiederum der Orientierungsparameter bestimmen läßt.

Die folgende Tabelle 5-4 zeigt im mittleren Teil Abstände, die aus den Strukturmodellen verschiedener Autoren berechnet wurden. In der vorletzten Spalte ist eine Abschätzung der maximalen Entfernung des Fluorophors zum Retinal angegeben, bestehend aus einem Mittelwert der Strukturdaten ( $C_{10} - C_{\alpha}$ ), plus einem maximalen Abstand vom  $C_{\alpha}$ -Kohlenstoff zum Fluorophor ( $8 \text{ \AA}$ , für die längste Verbindung des IAEDANS) und einer angenommen maximalen Fluorophorlänge ( $+9 \text{ \AA}$ ). Ebenfalls in der Tabelle enthalten ist  $R_{\Delta}$ , ein Wert, der die Schnittmenge aus der vorletzten Spalte (größter Wert) und den eigenen Meßdaten aus der Tabelle 5-2 (kleinster Wert) angibt.

	Brookhaven-Strukturdatenbank, Abstände in $\text{\AA}$				Mittlerer Retinal- Label- Abst.	Ret-Label-Abst. $\Delta$
	1C3W <sup>1</sup>	1BM1 <sup>2</sup>	1BRR <sup>3</sup>	1QHJ <sup>4</sup>	$R_{\text{struk}} / \text{\AA}$	$R_{\Delta} / \text{\AA}$
$C_{10}(\text{Ret}) - C_{\alpha}(\text{S35})$	31,33	31,91	31,95	31,38	(32+8) +9	34-49
$C_{10}(\text{Ret}) - C_{\alpha}(\text{A160})$		23,86	23,40	23,52	(24+8) +9	33-41
$C_{10}(\text{Ret}) - C_{\alpha}(\text{V130})$	22,28	22,90	22,73	22,68	(23+8) +9	30-40

**Tabelle 5-4** Abstandsbestimmung mittels Strukturmodell: In der ersten Zeile sind die Bezeichnungen der Referenzdateien der Datenbank angegeben. Die entsprechenden Veröffentlichungen sind: <sup>1</sup>[Lücke et al., 1999], <sup>2</sup>[Sato et al., 1999], <sup>3</sup>[Essen et al., 1998], <sup>4</sup>[Belrhali et al., 1999].  $R_{\text{struk}}$  gibt den maximalen Abstand des Fluorophors an. Diese Entfernung setzt sich aus dem Mittelwert der Strukturdaten plus einem maximalen Abstand vom  $C_{\alpha}$ -Atom zum Fluoreszenzmarker ( $8 \text{ \AA}$ ) sowie einem zusätzlichen Term für die maximale Größe des Fluoreszenzmarkers ( $9 \text{ \AA}$ ) zusammen.  $R_{\Delta}$  entsteht durch die Bildung einer Schnittmenge aus den empirischen Daten der Tabelle 5-2 (kleinster möglicher Abstand) und  $R_{\text{struk}}$  (größter möglicher Abstand).

Mit Hilfe von  $R_{\Delta}$  läßt sich ein sinnvoll eingegrenzter Bereich für die Orientierungsparameter ermitteln. Die untere Grenze  $\langle \kappa^2 \rangle_{\text{min}}$  ist durch die Meßwerte (Tabelle 5-2 und Tabelle 5-3) gegeben. Die obere Grenze  $\langle \kappa^2 \rangle_{\text{max}}$  wird durch den aus den Strukturdaten berechneten maximalen Abstand von  $49 \text{ \AA}$  (Tabelle 5-4) bestimmt. Setzt man diesen Abstand in die Gleichungen (2.50) und (2.47) ein, so ergibt sich ein oberer Grenzwert von  $\langle \kappa^2 \rangle_{\text{max}} = 0,70$ .

Auf der Grundlage der strukturellen Ähnlichkeit von Bacteriorhodopsin und Rhodopsin wird die obere Grenze des mittleren Orientierungsparameters auf die markierten Rhodopsin-Mizellen übertragen.

Die untere Grenze wird ebenso wie beim Bacteriorhodopsin aus Gleichung (2.51) bestimmt. Unter Verwendung dieser Grenzwerte kann der Bereich für den Försterradius, der zur Unterscheidung in diesem Zusammenhang mit  $R_{0\Delta}$  bezeichnet wird, eingeschränkt werden.

Probe	$R_{0\Delta} / \text{\AA}$	E	$R_{\Delta} / \text{\AA}$
OGC316-AF	32,6-47,6	0,39	35,1-51,2
OGC316-AEDANS	29,4-43,1	0,19	37,4-54,9
OGC316-DNZ	25,6-39,1	0,32	29,0-44,3
OGC316-Cm	31,2-41,4	0,25	37,5-49,7
OGC140-AF	32,5-47,6	0,37	35,5-52,0
OGC140-AEDANS	28,0-43,4	0,21	34,9-54,1
OGV63C-AF	32,6-47,6	0,38	35,4-51,6
OGQ64C-AF	32,6-47,6	0,38	35,4-51,6
OGL68C-AF	31,4-47,6	0,36	34,6-52,4
OGR69C-AF	32,0-47,6	0,34	35,7-53,2
OGL72C-AF	31,2-47,6	0,34	34,8-53,2
OGK245C-AF	30,8-47,6	0,16	40,6-62,8

**Tabelle 5-5** Reduzierter Wertebereich für den Försterradius  $R_{0\Delta}$ , reduzierter Abstandsbereich  $R_{\Delta}$  sowie Energietransfereffizienz E verschiedener Rhodopsin-Mizellen.

**Tabelle 5-5** zeigt eine Übersicht der so bestimmten Parameter unterschiedlicher Rhodopsin-Proben. Aus den Ergebnissen läßt sich wiederum ein resultierender Abstandsbereich für die jeweilige Position ermitteln, der als Schnittmenge die verschiedenen Label beinhaltet:  $R_{\Delta}(\text{C316}) = 37,5-51,2 \text{ \AA}$  und  $R_{\Delta}(\text{C140}) = 35,3-52,0 \text{ \AA}$ . Der punktmutierte zytoplasmatische I/II-Loop mit den Positionen 63, 64, 68, 69, und 72 reiht sich in diese Wertebereiche ein. Das Ergebnis für die Mutante K245C ist dagegen auffallend groß.

### 5.3 Energietransfer in zweidimensionalen Systemen

Die Voraussetzung für die im Kapitel 2.4.2 beschriebene Theorie des Energietransfers in zweidimensionalen Systemen war die zufällige Verteilung der Donatoren und Akzeptoren. Das Bacteriorhodopsin bildet jedoch in den Purpurchmembranen Trimere und ist somit nicht kontinuierlich verteilt. Das Modell wurde trotzdem verwendet, da die hohe Proteindichte in den Membranen, mit einem Protein-Lipid-Verhältnis von 1:9 [Glaeser et al., 1985], die Annahme einer Kontinuität näherungsweise erfüllte. Weiterhin stellten die Fluoreszenzmarker als Donatoren und die Retinale als Akzeptoren durch ihre geometrische Anordnung in der Membran kein System in der gleichen Ebene dar. Die Beschreibung eines solchen Zweischichtsystems erfolgt aber uneingeschränkt nach der Theorie für die Donator-Akzeptor-Verteilung in nur einer Ebene [Wolber und Hudson, 1979], so daß keine Erweiterung des Formalismus notwendig war. In Kapitel 5.2 wurden die Försterradien und Energietransfereffizienzen der Donator-Akzeptor-Systeme in Mizellenform diskutiert. In Anlehnung an das dortige Ergebnis, daß der effektive D/A-Abstand mit dem Försterradius vergleichbar war, wurden die Rechnungen für die Membransysteme auf drei vorgegebene Abstandsverhältnisse beschränkt.

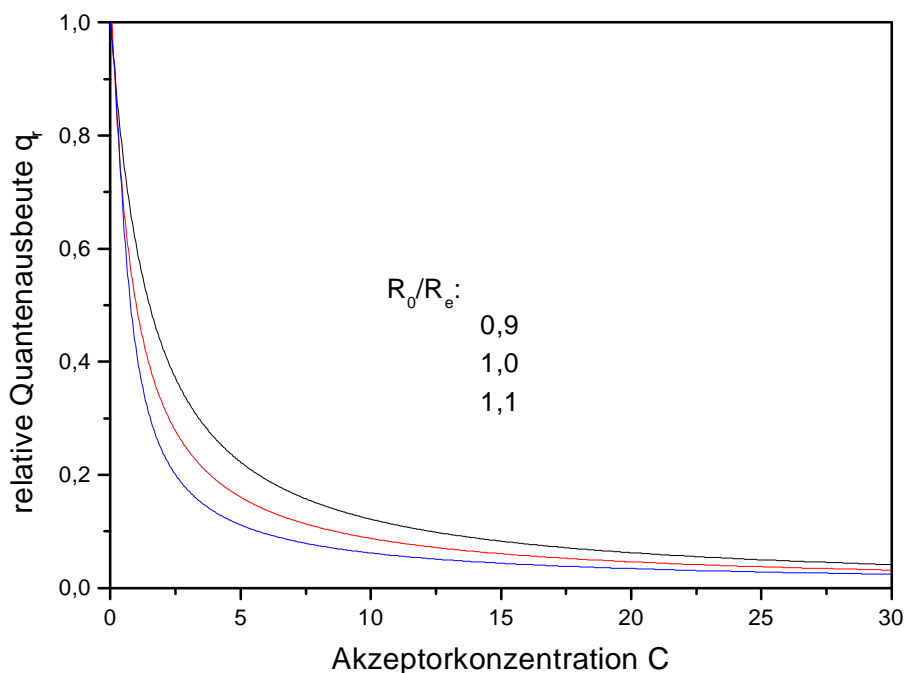
Für das Verhältnis zwischen Försterradius  $R_0$  und dem Abstand der kleinsten Annäherung  $R_e$  wurden die Werte  $R_0/R_e = (0,9; 1,0; 1,1)$  gewählt. Die Werte basieren auf den Ergebnissen des intramolekularen Heterotransfers (Kapitel 5.2), bei denen die Verhältnisse zwischen dem Försterradius  $R_0$  und dem Abstand  $R$  in diesem Bereich lagen.

Mit dieser Vorgabe wurde die unvollständige Gamma-Funktion  $\gamma = (2/3, y)$  (Gleichung (2.55) und (2.58)) parametrisiert und für das in den Messungen verwendete Zeitfenster von 0-20 ns numerisch berechnet. Dazu wurden drei unvollständigen Gamma-Funktionen  $\gamma(2/3, y)$  mit der Sigmoidal-Funktion

$$u(t) = k_1 - e^{-k_2(t-k_3)} \quad (5.1)$$

angepaßt<sup>49</sup>.

Unter Verwendung der Näherung  $u(t)$  (5.1) für die unvollständige Gamma-Funktion wurden dann für die ausgewählten Abstandsverhältnisse  $R_0/R_e$  die relativen Quantenausbeuten  $q_r$  als Funktion der Akzeptorkonzentration berechnet (Gleichung (2.58), Abbildung 5-2).



**Abbildung 5-2** Theoretische relative Quantenausbeute (Verhältnis der Quantenausbeuten der Donatoren mit und ohne Akzeptoren) als Funktion der modifizierten Akzeptorkonzentration in der Ebene, für drei Verhältnisse des Försterradius  $R_0$  zum Abstand der geringsten Näherung  $R_e$

<sup>49</sup> Die Koeffizienten  $k_1$ ,  $k_2$  und  $k_3$  sind im Anlage III aufgeführt.



Probe	$q_r$	[AF]/[P]	$R_0/R_e$					
			0,9		1,0		1,1	
			C	$R_e/\text{\AA}$	C	$R_e/\text{\AA}$	C	$R_e/\text{\AA}$
A160C-AF	$0,11 \pm 0,01$	0,06	5,08	32,6	7,76	33,0	11,12	33,3
V130C-AF	$0,13 \pm 0,01$	0,11	4,17	32,3	6,40	32,8	9,29	33,2
ROSC140-AF	$0,45 \pm 0,05$	0,13	0,90	30,9	1,20	31,1	1,82	31,8
ROSC140-AF	$0,54 \pm 0,06$	0,08	0,69	29,7	0,85	29,9	1,29	30,7
ROSC316-AF	$0,40 \pm 0,04$	0,19	1,05	31,4	1,46	31,7	2,22	32,3

**Tabelle 5-6** Abstände der geringsten Näherung zwischen Donatoren und Akzeptoren ( $R_e$ ). Es sind zwei Purpormembranproben und zwei ROS-Membranfragmente aufgeführt, deren Markierungsstöchiometrie (zweite Spalte) gering war, um die intermolekulare Wechselwirkung unter den Donatoren zu unterbinden. Die Meßgröße ist die relative Quantenausbeute  $q_r$ . C wurde aus dem Zusammenhang bestimmt, der in Abbildung 5-2 dargestellt ist. Der größte Fehler entsteht in C bei den kleinsten Quantenausbeuten, nach Fehlerfortpflanzung überträgt sich diese Abweichung auf  $R_e$  mit  $\pm 0,5 \text{\AA}$ .

Die relative Quantenausbeute  $q_r$  wurde aus den experimentell bestimmten mittleren Fluoreszenzlebensdauern mittels  $q_r = \langle \tau_{DA} \rangle / \langle \tau_D \rangle$  berechnet. Aus der Abbildung 5-2 ließen sich die modifizierten Konzentrationen C aus den Funktionen  $q_r(C; [R_0/R_e])$  entnehmen. Durch Umstellung der Gleichung (2.56) läßt sich der Abstand der kleinsten Annäherung  $R_e$  als Funktion von C ausdrücken:

$$R_e = \sqrt{\frac{(\pi R_d^2)}{\pi + (N/C)(R_0/R_e)^2}} \quad (5.2)$$

Die tatsächliche Akzeptorkonzentration, in Gleichung (5.2) durch N Akzeptoren auf einer Fläche von  $\pi R_d^2$  ausgedrückt, ist für das Bacteriorhodopsin bekannt: In der Einheitszelle mit der Seitenlänge von  $62,4 \text{\AA}$  befinden sich drei Proteine [Henderson et al., 1990]. Für das Rhodopsin wurde ein Abstand von  $25 \text{\AA}$  zwischen den äußeren Proteingrenzen in nativen Membranfragmenten von Albert et al. [Albert et al., 1997] angegeben.

Für die drei angenommenen Verhältnisse  $R_0/R_e$  ließen sich somit die Abstände  $R_e$  berechnen (Tabelle 5-6). Diese berechneten Werte für den Abstand der geringsten Annäherung zwischen Retinal und den an der Oberfläche gebundenen Fluorophor von  $R_e = 30 - 33 \text{\AA}$  stellen bei einem Vergleich mit den Werten aus Abschnitt 5.2 eine sinnvolle Lösung dar. Die Lösungsmenge ist jedoch durch die vorausgegangen Annahmen über die Verhältnisse  $R_0/R_e$  eingeschränkt. Die Lösungen unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Proben nur gering (Tabelle 5-6).

## 5.4 Ergebnisse

Die Fluoreszenzemissionen der Proben wiesen bis auf wenige Ausnahmen ein nichtmono-exponentielles Abklingverhalten auf. Die Ursache ist möglicherweise eine statistische Verteilung von Lebensdauern, die häufig bei Proteinfluoreszenzen beobachtet wird [Alcala et al., 1987; Lee et al., 1994]. Bei den Proben mit Energietransfer (RET) kann auch eine Verteilung der Abstände zwischen dem Fluoreszenzmarker (Donator) und dem Retinal (Akzeptor) zu dem beobachteten Verhalten führen [Cantor und Pechukas, 1971; Haas et al., 1975; Haas und Steinberg, 1984; Amir und Haas, 1987; Beechem und Haas, 1989]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit des Energie-Quenchings der gebundenen Fluorophore durch angrenzende Seitenketten oder in der Lösung befindliche Ionen [Wahl, 1975b; Clegg et al., 1992].

Das große Interesse an intramolekularen Abständen zwischen Aminosäurepositionen in Proteinstrukturen führte zu zahlreichen Anwendungen der Methode des strahlungslosen Energietransfers, wie die große Zahl von Veröffentlichungen belegt. Eine aktuelle Übersicht findet sich in [Wu und Brand, 1994], oder den in älteren Arbeiten von Steinberg und Stryer [Steinberg, 1971; Stryer, 1978]. Es zeigte sich jedoch, der Theorie folgend, daß wesentliche Beschränkungen bei der Untersuchung makroskopischer Ensemble der Donator-Akzeptor-Paare existieren [Dale und Eisinger, 1976; Dale et al., 1979; Cheung, 1991]. Vor allem die fehlenden Informationen über die relativen Orientierungen von Donator und Akzeptor schränken die Anwendbarkeit der Methode ein.

Die durchgeführten Experimente zum intramolekularen Energietransfer an Bacteriorhodopsin- und Rhodopsin-Mizellen führten deshalb zu Aussagen über Bereiche von möglichen Abständen und nicht zu diskreten Abstandswerten. Die minimalen und maximalen Abstände zwischen dem ortsspezifisch gebundenen Fluoreszenzmarker und dem Retinal wurden durch die Grenzwerte des Orientierungsparameters bestimmt. Für die Bacteriorhodopsin-Mutanten wurden folgende maximale Abstandsbereiche zwischen Retinal-Chromophor ( $C_{10}$  – Kohlenstoff) und dem an die angegebene Position gekoppelten Fluoreszenzmarker bestimmt: S35C: 34-49 Å, A160C: 33-41Å, V130C: 30-40 Å. Ein Vergleich experimenteller Daten findet sich unter anderem bei Marque et al. [Marque et al., 1986] mit 37 Å für den Abstand vom Retinal zu einem an den C-Terminus gekoppelten Fluorophor. Tabelle 5-7 zeigt für das Rhodopsin einen Vergleich der ermittelten Abständen zwischen dem  $C_{10}$ -Kohlenstoff des Retinals und dem  $C_{\alpha}$ -Kohlenstoff des jeweiligen Cysteins, und den Voraussagen nach einem theoretischen Strukturmodell von Pogozheva [Pogozheva et al., 1997]. Einige Positionen der flexiblen interhelikalen Bereiche sind in dem Modell nicht enthalten. Die vergleichbaren Positionen weisen eine sehr gute Übereinstimmung auf. Die Mutante K245C besitzt größere Abstände zum Retinal in Bezug auf die anderen Aminosäuren. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der in Abbildung 1-4 dargestellten Sekundärstruktur des Rhodopsins. Die hier ermittelten Abstandswerte sind insgesamt kleiner als die Wu und Stryer angegebenen Entfernungen zwischen dem Retinal und verschiedenen extrinsischen Fluorophoren [Wu und Stryer, 1972]. Eine mögliche Ursache sind die unterschiedlichen präparativen Bedingungen, denn die Proben wurden bei den Autoren in einer Digitonin-Lösung untersucht.

Position	Abstände zum Retinal in Å	
	Theoretisches Modell	Minimal-, Maximalwerte*
C140	34,6	26,3-43,0
V63C	27,9	26,4-42,6
Q64C	30,6	26,4-42,6
L72C	26,7	25,8-44,2
C316		28,5-32,2
R69C		26,7-44,2
L68C		25,6-43,4
K245C		31,6-53,8

**Tabelle 5-7** Vergleich der ermittelten Abstandsbereiche zwischen dem C<sub>10</sub>-Kohlenstoff des Retinals und dem C<sub>α</sub>-Kohlenstoff des jeweiligen Cysteins, mit den theoretischen Angaben von Pogozheva [Pogozheva et al., 1997]. \*die Labelgröße ist hier nicht mehr enthalten

Der Orientierungsparameter, der zur Bestimmung der Abstandsgrenzen verwendet wurde, läßt sich auch durch die Betrachtung der Wahrscheinlichkeitsverteilungsfunktion auf einen engeren Bereich eingrenzen [Hillel und Wu, 1976; Stryer, 1978]. In Abhängigkeit vom Verhältnis der Endanisotropie zur Anfangsanisotropie  $r_{\infty}/r_0$  und somit in Abhängigkeit vom Ordnungsparameter läßt sich ein Bereich für  $\langle \kappa^2 \rangle$  angeben, in dem der Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von 80 % zu finden ist. Die in dieser Arbeit verwendete Beschränkung von  $\langle \kappa^2 \rangle$  durch die Zuhilfenahme der Strukturdaten von Bacteriorhodopsin bot engere Grenzen, so daß von der Methode der Wahrscheinlichkeitsverteilung kein Gebrauch gemacht wurde.

Für die Experimente an den Membranproben zum zweidimensionalen Energietransfer wurde ein Modell verwendet, bei welchem Akzeptoren und Donatoren einen minimalen Abstand ( $R_e$ ) voneinander haben, unterhalb dessen keine weitere Annäherung stattfinden kann [Wolber und Hudson, 1979]. Es wurden drei Verhältnisse  $R_0/R_e$  (0,9; 1,0 ;1,1), in Anlehnung an die Ergebnisse bei der Untersuchung des intramolekularen Heterotransfers an Mizellen, ausgewählt. Die berechneten Entfernungen der geringsten Annäherung von Akzeptoren und Donatoren ( $R_e$ ) betragen 30 bis 33 Å .

Die Abstandswerte gelten unter der Einschränkung, daß die Modellvoraussetzungen einer kontinuierlichen Verteilung der Wechselwirkungspartner bei den untersuchten Proben nur in Näherung gegeben waren. Ein Vergleich mit den Entfernungen der Mizellenproben zeigt eine sehr gute Übereinstimmung, wodurch die Annahmen bestätigt werden. Rehorek et al. untersuchten den Energietransfer zwischen dem Retinal des Bacteriorhodopsins und dem Fluorophor DPH eingebettet in Vesikelsystemen unter Verwendung des gleichen theoretischen Formalismus nach Wolber und Hudson [Rehorek et al., 1983; Wolber und Hudson, 1979]. Die Autoren fanden einen Abstand der geringsten Annäherung von  $18 \pm 5$  Å. Dieser Wert beschreibt den Umfang des Proteins in der Membranebene. Der hier gefundene Wert von ca. 30 Å stellt im Gegensatz dazu die Entfernung zur Membranoberfläche plus der Entfernung der Bindungsstelle von der Oberfläche sowie dem Abstand des Labels von der Bindungsstelle dar.

Die unterschiedliche Größe von Rhodopsin und Bacteriorhodopsin, die unterschiedliche Abstände der geringsten Annäherung zur Folge hat, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die gefundenen Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proteinen.