

## 7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Meßapparatur zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung für den Einsatz an Synchrotronstrahlungsquellen entwickelt und zum Einsatz gebracht. Der optische Aufbau wurde in eine lichtundurchlässige transportable Systembox integriert. Durch einfache Justage an den Lichtaustritt der Synchrotronspeicherringe von BESSY I oder HASYLAB war die Apparatur somit funktionsbereit. Das Meßprinzip beruhte auf der periodischen Akkumulation von kurzen Meßzyklen, innerhalb derer die polarisationsabhängigen Intensitätskomponenten der Probenfluoreszenz sowie die mittels Streuprobe detektierte Systemantwort  $L(t)$  gemessen wurden. Die Halbwertsbreiten der Systemantwort lagen bei einer Wiederholrate von 5 MHz zwischen 200 und 900 ps. Die entwickelte Steuerungssoftware erlaubte einen automatisierten Meßablauf mit einer frei wählbaren Anzahl von Meßzyklen. Die Verwendung des Synchrotronlichtes ermöglichte die Nutzung eines kontinuierlich durchstimmbaren Spektralbereichs von 290 bis 800 nm.

Mit dem neuen Meßaufbau wurden Experimente zur zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie von an den Membranproteinen Bacteriorhodopsin und Rinderrhodopsin gebundenen Fluoreszenzmarkern (Labeln) durchgeführt. Die sulfhydrylreaktiven Fluoreszenzmarker wurden ortsspezifisch an verschiedene Positionen innerhalb der die Transmembranhelices verbindenden Schleifenkonformationen gebunden, um die Dynamik und die sterische Beschränkung dieser flexiblen Bereiche zu studieren. Es wurden insgesamt elf Positionen in mizellaren und membranalen Systemen untersucht.

Die empirische Anpassung der gemessenen zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropiekurven erfolgte mit einer Summe von ein bis drei Exponentialfunktionen. Mit Ausnahme des Dansylaziridins (DNZ) besaßen alle verwendeten Fluorophore eine Kurzzeitkomponente im Anisotropieverlauf auf der Pikosekundenzeitskala. Dieser Anteil an der Gesamtdepolarisation wurde der schnellen Eigenrotationsdiffusion der Fluorophore zugeordnet. Das Anisotropieverhalten des DNZ wies neben einer Endanisotropie ( $r_\infty$ ) nur eine Zeitkomponente im Nanosekundenbereich auf. Das Texas Red (TR) und das IAEDANS zeigten dagegen nur die Pikosekundenkomponente und eine Endanisotropie. Dieses Verhalten wurde durch eine unterschiedlich starke Kopplung der Fluoreszenzmarker an die Polypeptidketten verursacht. Die Bewegung des TR beziehungsweise IAEDANS erfolgte nahezu frei, während das DNZ eine starke Kopplung aufwies. Die Fluorophore Coumarin (Cm) und Fluorescein (IAF) wiesen beide Komponenten auf. Die Grundlage für die physikalische Beschreibung des nichtmonoexponentiellen Anisotropieverlaufs war die Annahme einer erweiterten Bewegungsgeometrie. Das Modell des Bewegungsablaufs bestand aus einer Rotation des Labels um eine Symmetrieachse, die von der Eigendiffusion der Symmetrieachse überlagert wird. Zur Berechnung der Diffusionskonstanten und Ordnungsparameter wurde eine Näherungslösung der zugeordneten Rotationsdiffusionsgleichung verwendet. Das Ergebnis war eine schnelle Rotationsdiffusion um die Symmetrieachse mit Diffusionskonstanten von  $10^9 \text{s}^{-1}$  sowie eine langsamere Schwankungsbewegung der Symmetrieachse mit Werten von  $10^7 \text{s}^{-1}$ .

Letztere unterlag einer starken sterischen Bewegungseinschränkung. Neben dem Vergleich der markierten Proben unter den Standardmeßbedingungen wurden zusätzlich äußere Parameter wie Viskosität, Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke variiert. Die Erhöhung der Viskosität hatte erwartungsgemäß eine Verlangsamung der Rotationsdiffusion zur Folge. Die Fluorophore waren folglich auch im gebundenen Zustand dem viskosen Lösungsvolumen zugänglich.

Die Temperaturreihen führten zur Beobachtung einer Veränderung des Ordnungsparameters. Es wurde ein Übergang von einer konstanten Ordnung zu einer Verringerung des Ordnungsgrades bei steigender Temperatur beobachtet. Die Übergangstemperatur lag zwischen 20 und 25 °C. Eine Ausnahme bildeten die ROS-Membranfragmente. Hier führte eine Temperaturerhöhung zur Steigerung der Ordnung an der Membranoberfläche. Die Ionenstärke und der pH-Wert hatten ebenfalls einen Einfluß auf das Anisotropieverhalten der Label-Loop-Konstrukte. Der Einfluß der Ionenstärke trat im Nanosekundenzeitbereich auf, ein experimenteller Hinweis auf die Veränderung der Dynamik der Proteinoberflächen. Die Erhöhung des pH-Wertes war mit einer Verringerung des Ordnungsparameters der Label-Loop-Konstrukte verbunden.

Als Experiment zur Sensitivität der Methode gegenüber sterischen Beschränkungen wurde der C-Terminus des Bacteriorhodopsins durch limitierte Proteolyse mit Papain entfernt. Die Proben wurden dann auf der zytoplasmatischen (A160C) sowie auf der extrazellulären Seite (V130C) mit Fluorophoren markiert. Das Resultat war eine starke Erhöhung der Bewegungsfreiheit der Label-Loop-Konstrukte bei den zytoplasmatischen Markierungen, während die auf der extrazellulären Seite markierte Probe keine Veränderungen zeigte. Dieses Experiment unterstreicht die Anwendbarkeit der Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie beim Studium lokaler Effekte auf molekularer Ebene.

Neben der Rotationsdiffusion trat bei einer Reihe von markierten Proteinproben zusätzlich strahlungsloser Energietransfer auf. Der strahlungslose Transfer der Energie vom Fluoreszenzmarker (Donator) zum Retinal-Chromophor (Akzeptor), hier als Heterotransfer bezeichnet, führte zu keinen signifikanten Veränderungen des Anisotropieverlaufs. Der Energie-Homotransfer der Donatoren untereinander führte dagegen zu einer verstärkten Depolarisation. Für den Fall des intramolekularen Homotransfers doppelt markierter Rhodopsin-Mizellen konnten maximal und minimal mögliche Abstände der Fluorophore zwischen den Bindungsstellen C140 und C316 berechnet werden. Die Verwendung des Fluoreszenzmarkers Fluorescein führte zu Werten von 24 - 28 Å, beim Texas Red ergab sich Bereich von 26 - 39 Å. Die Entfernungen beinhalten auch die Abstände der Fluoreszenzmarker zur Bindungsposition. Der eigentliche Abstand der Positionen C140 und C316 ist entsprechend kleiner als die angegebenen Bereiche.

Die mittleren Fluoreszenzlebensdauern wurden im Fall des intramolekularen Heterotransfers bei den Rhodopsin-Mizellen zur Berechnung von minimalen und maximalen Entfernungen zwischen den extrinsischen Fluoreszenzmarkern und dem intrinsischen Retinal-Chromophor verwendet.

Die Positionen der Cystein-Punktmutationen V63C, Q64C, L72C, L68C und R69C sowie das Wildtyp-Cystein C140 umfaßten Entfernungen zwischen 25,6 und 44,2 Å. Das Cystein C316 wurde auf einen Bereich von 28,5 - 32,2 Å eingeschränkt. Die größte Entfernung besaß K245C, deren Wert zwischen 31,6 und 53,8 Å lag. Für vier Membranproben mit niedriger Markierungsstöchiometrie wurden unter Anwendung eines Energietransfermodells für zweidimensionale Systeme Abstände der geringsten Annäherung zwischen Donator und Akzeptor berechnet. Der berechnete Wertebereich von 30-33 Å reiht sich gut in die Angaben aus den intramolekularen Experimenten ein.

Als Ergänzung zu den zeitaufgelösten Messungen wurden Fluoreszenzgleichlichtexperimente durchgeführt. Die Abhängigkeit der spektralen Position der Emissionsmaxima der Fluorophore IAF und TR von der Polarisierbarkeit ihrer Umgebung wurde dazu verwendet, die polaren Eigenschaften ihres Umfeldes im gebundenen Zustand zu untersuchen. Die Dielektrizitätskonstanten wiesen mit einem Bereich zwischen 60 bis 89 an allen Bindungsstellen auf ein wäßriges Milieu hin. Diese Eigenschaft änderte sich beim Übergang vom Grundzustand in das photoaktive MII-Intermediat des Rhodopsins nicht. Das diffusionskontrollierte Fluoreszenzquenching mit I<sup>-</sup>-Ionen führte zur Bestätigung der Zugänglichkeit aller Bindungspositionen.

Ein wesentliches Resultat dieser Arbeit war der direkte Nachweis von Konformationsänderungen an der zytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins mit Hilfe der Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie. Die Experimente zum Anisotropieverhalten im Grundzustand und im aktiven Intermediatzustand MII führten zu der Beobachtung einer Erhöhung des Ordnungsparameters durch die Photoaktivierung. Dieser Effekt an den Positionen C316 und C140 wurde als eine Erhöhung der sterischen Bewegungsbeschränkung der Label-Loop-Konstrukte im aktiven MII-Zustand interpretiert.

Der Vergleich der bimolekularen Quenchingkonstanten zwischen dem Rhodopsin-Grundzustand und dem Zustand MII zeigte eine Einschränkung der Zugänglichkeit der Fluorophore nach der Lichtaktivierung des Proteins. Die Quenching-Experimente bestätigen somit zusätzlich zu den Anisotropieexperimenten eine veränderte zytoplasmatische Oberfläche des Rhodopsins im aktiven Zustand.