

3 Material und Methoden

3.1 Materialiennachweis

3.1.1 Biologisches Material

Rinderaugen wurden von der Fleischzentrum Lausitz GmbH in D-15938 Kasel-Golzig bezogen und unmittelbar nach dem Tod der Tiere in einem lichtdichten Behälter gesammelt. Für die Herstellung von 2D-Kristallen wurden alternativ tiefgekühlte Netzhäute der Firma W. L. Lawson, Co. (Lincoln, Nebraska, USA) verwendet.

Präparationen von Wildtyp bR-Membranfragmenten (Purpurmembranen) wurden von Frau Wallat, AG Heyn, zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid 37:1 (30 % Lösung)	Biorad
Amylamin	Sigma
C ₅ -Bromacetamido Texas Red [®]	Molecular Probes
p-Chlormercuribenzoat	Fluka
Concanavalin A-Sepharose (ConA-Sepharose)	Pharmacia
5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonylaziridin	Molecular Probes
4,4'-Dithiodipyridin	Sigma
Dithiothreit (DTT)	Merck
Emulphogen (Polyoxyethylen-10-Tridecylether)	Sigma
Glimmer zur Herstellung von Kohleträgerfilmen	Plano
5-Iodacetamidofluorescein	Molecular Probes
N-(Iodacetamidoethyl)-1-naphthylamin-5-sulfonsäure	Molecular Probes
Kupfer-Rhodium Netze für die Elektronenmikroskopie	Graticules
Lauryldimethylaminoxid (LDAO)	Fluka
α-D-Methylmannose	Sigma
n-Octyl-β-D-glucoopyranosid (OG)	Bachem
n-Octyltetraoxyethylen (C ₈ E ₄)	Bachem
Phosphatidylcholin (aus Sojabohnen)	Sigma
Phosphatidylethanolamin (aus Sojabohnen)	Sigma
SDS	Fluka
Sephadex G25f (fine)	Pharmacia
Slide-A-Lyzer [®] Dialysekassetten, 10 kDa Ausschlußgrenze	Pierce
Thermolysin	Sigma

Die übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth und Sigma bezogen. Die verwendeten Substanzen entsprachen mindestens der Reinheitsnorm p.a. („pro analysi“).

3.2 Allgemeine präparative Methoden

3.2.1 Isolation von ROS-Membranen aus Rinderaugen

Die Gewinnung von ROS-Membranen erfolgte nach der Methode von Papermaster und Dreyer (1974) mit Modifikationen nach McDowell und Kühn (1977) aus Augen von frisch

geschlachteten Rindern. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis unter schwachem Rotlicht (Osram Dunkelkammerlampen, 680 nm) durchgeführt.

Pro Präparation wurden 100-130 Netzhäute isoliert und in 45 % (w/v) Saccharose in ROS-Puffer (70 mM Natriumphosphat pH 7,4, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT) homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch ein Nylontuch (125 mesh) filtriert und verbleibende Zelltrümmer 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert (SS34 Rotor, 4 °C). Der Überstand wurde 1:1 mit ROS-Puffer verdünnt und die ROS-Membranen sedimentiert (SS34 Rotor, 10 min, 10000 rpm, 4 °C). Anschließend wurden die Membranen in ROS-Puffer mit 26,36 % (w/v) Saccharose aufgenommen und über einen stufenförmigen Saccharosedichtegradienten gereinigt (39,02 % / 34,23 % / 28,75 % (w/v) Saccharose in ROS-Puffer, SW28 Rotor, 45 min, 23000 rpm, 4 °C). Nach der Zentrifugation wurden die ROS-Membranen von der Grenzschicht zwischen der 34,23 %igen und der 28,75 %igen (w/v) Saccharoselösung abgenommen, 3:1 mit ROS-Puffer verdünnt und bei 20000 rpm, SS34 Rotor, 20-30 min, 4 °C sedimentiert. Abschließend wurden die ROS-Membranen bei einer Konzentration von 3-5 mg/ml Rhodopsin in ROS-Puffer aufgenommen und bei -80 °C unter Argon gelagert.

3.2.2 Reinigung von Rhodopsin mittels Concanavalin A-Affinitätschromatographie

Die Reinigung von Rhodopsin erfolgte mittels Concanavalin A-Affinitätschromatographie nach De Grip (1982). Das Verfahren beruht auf der reversiblen Bindung der N-terminalen Kohlenhydratseitenketten des Rezeptors an das Lectin Concanavalin A (ConA), wobei bevorzugt α -D-Mannopyranosylreste und etwas schwächer α -D-Glucopyranosylreste gebunden werden. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde Rhodopsin für unterschiedliche Verwendungszwecke in verschiedenen Detergenzien bzw. Puffersystemen gereinigt. Für die Fluoreszenzmessungen wurde bevorzugt n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG) verwendet.

ROS-Membranen (ca. 50 mg Rhodopsin) wurden sedimentiert (SS34 Rotor, 20000 rpm, 20-30 min, 4 °C). Anschließend wurden die Membranen bei einer Rhodopsinkonzentration von 1 mg/ml in ConA-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,0, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 3 mM CaCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) in Gegenwart von 100 mM OG aufgenommen und 1 h unter Rühren bei 4 °C solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (SA300 Rotor, 25000 rpm, 1 h, 4 °C). Der Überstand wurde auf eine Säule mit Concanavalin A-Sepharose (Pharmacia) aufgetragen und die Säule mit ConA-Puffer, 30 mM OG gewaschen, bis im Eluat keine Proteinbestandteile an Hand der Absorption bei $\lambda = 280$ nm mehr nachgewiesen werden konnten. Die Elution des gereinigten Rhodopsins erfolgte mit ConA-Puffer, 30 mM OG und 0,2 M α -D-Methylmannose in Fraktionen à 4-5 ml. Die Flußgeschwindigkeit während der gesamten Reinigung betrug 2-3 ml/min. Bis zur weiteren Verwendung wurde das gereinigte Rhodopsin bei -80 °C unter Argon gelagert.

Für Kristallisationsexperimente wurde Rhodopsin nach Krebs et al. (1998) in Puffer S (50 mM Natriumacetat pH 6,0, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 1 mM EDTA, 2 mM DTT), 1% (w/v) LDAO solubilisiert und wie oben beschrieben auf einer ConA-Säule mit Puffer S und 0,1 % (w/v) LDAO gereinigt. Die Elution erfolgte mit Puffer S in Gegenwart von 0,1 % (w/v) LDAO und 0,2 M α -D-Methylmannose.

3.2.3 Spektralphotometrische Messungen

Absorptionsspektren wurden mit einem Zweistrahlphotometer (Shimadzu UV-2102PC) aufgenommen. Das Photometer war mit einem Integrationskugeleinsatz ausgerüstet, der die Detektion eines großen Anteils des Streulichts ermöglicht. Dies erlaubte die Aufnahme von Absorptionsspektren auch von stark streuenden Proben wie z.B. Suspensionen von ROS-Membranen oder 2D-Kristallen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte in der Regel mit einer spektralen Bandbreite von 2 nm, die durch die Breite des Austrittsspalts am Monochromator

gegeben ist, einem Aufnahmeintervall von 0,5 nm und bei mittlerer Scan-Geschwindigkeit über einen Wellenlängenbereich von 200-750 nm.

3.2.4 Bestimmung der Pigmentkonzentration

Die Rhodopsinkonzentration wurde nach Shichi et al. (1969) bestimmt. Im Falle von ROS-Membranen wurden Aliquots mit ca. 100-250 µg Rhodopsin in 1 ml Volumen in Gegenwart von 1% Emulphogen solubilisiert (1 h, Schüttler, RT), unlösliche Bestandteile abzentrifugiert und ein Spektrum im Dunkelzustand aufgenommen. Anschließend wurde die Probe 2 min mit gelbem Licht (150 W Halogenkaltlichtlampe Schott KL1500 ausgestattet mit einem Glasfaserlichtleiter, Kantenfilter OG 515) belichtet und ein Spektrum der gebleichten Probe aufgenommen. Die Rhodopsinkonzentration wurde aus der Absorptionsdifferenz des Retinalpeaks bei $\lambda = 498$ nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 40600 \text{ m}^{-1}\text{M}^{-1}$ berechnet (Lin und Sakmar, 1996). Die Bestimmung der Rhodopsinkonzentration in Detergenzlösungen erfolgte durch Bleichen der Probe in der jeweiligen Lösung.

3.2.5 Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteinzusammensetzung der Proben wurde mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgellelektrophorese nach Laemmli (1970) unter Verwendung eines Flachgelsystems (Hofer SE600 bzw. Hofer SE400, 180 x 160 x 1,5 mm) analysiert. Die Trenngele mit 12 % bzw. 17 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37:1) in 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS und Sammelgele mit 5 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid in 125 mM Tris-HCl pH 6,5, 0,1 % (w/v) SDS wurden durch Zugabe von APS (100 bzw. 50 µl 10 % w/v) und TEMED (15 bzw. 7,5 µl) polymerisiert. Als Laufpuffer wurde 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS verwendet. Der Lauf erfolgte in der Regel über Nacht bei einem konstanten Strom von 10 mA.

Zur Analyse der Proteinzusammensetzung wurden ca. 20 µg Protein unter reduzierenden Bedingungen in Probenpuffer mit 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % (w/v) Glycerin, 3 % (w/v) SDS, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau und 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol aufgenommen und 1 h bei RT solubilisiert. Die Analyse der enzymatischen Spaltprodukte bzw. der Bindung von cysteinreaktiven Fluoreszenzmarkern erfolgte dagegen in Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol. Nach dem Lauf wurden die Gele in 0,25 % (w/v) Coomassie G250, 45 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure mindestens 1 h gefärbt und anschließend in 45 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

3.2.6 Isolation nativer ROS-Lipide

Native Lipide wurden aus ROS-Membranen nach der Methode von Wiegand und Anderson (1982) extrahiert. ROS-Membranen (10 mg Rhodopsin pro Ansatz) wurden sedimentiert (SA300 Rotor, 25000 rpm, 30 min, 4 °C) und zweimal in Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 5 ml Chloroform:Methanol:Wasser (1:2:0,8) aufgenommen, die Suspension kräftig gemischt und 5 min in ein Ultraschallbad gehalten. Anschließend wurden je 1 ml Chloroform und Wasser zugegeben und nochmals gut gemischt. Nach Zentrifugation (SS34 Rotor, 6000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde die Chloroformphase abgenommen und die Extraktion mit 2 ml Chloroform wiederholt. Die Chloroformextrakte wurden vereinigt und die Lipide unter einem Argonstrom getrocknet. Nach Bestimmung des Trockengewichts wurden die Lipide in Chloroform:Methanol (19:1) aufgenommen und unter Argon bei -20 °C gelagert. Der Gehalt an Phospholipiden wurde nach der Methode von Bartlett (1958) bestimmt.

3.3 2D-Kristallisation von Rhodopsin

2D-Kristalle von Rhodopsin wurden mit einigen Modifikationen nach Schertler et al. (1993) bzw. Krebs et al. (1998) hergestellt. 20-30 mg Rhodopsin wurden wie unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben gereinigt. Anschließend wurde durch Zugabe von Puffer D (20 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 3 mM NaN₃, 0,5 % (w/v) LDAO) eine Rhodopsinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt. Je 1 ml dieser Lösung wurden in eine Dialysekassette (Slide-A-Lyzer[®], Pierce, 10 kDa Ausschlußgrenze) gefüllt und 11 Tage bei 18 °C gegen Puffer D ohne LDAO dialysiert. Als Oxidationsschutzmittel wurden dem Dialysepuffer zusätzlich DTT und/oder Mercaptoethanol in Konzentrationen von 1-4 mM zugegeben. Der Puffer wurde einmal täglich gewechselt. Die hier beschriebene Dialysemethode stellt lediglich die Ausgangsbasis für zahlreiche Modifikationen im Rahmen der einzelnen Experimente dar, die im experimentellen Teil der Arbeit ausführlich diskutiert werden.

Zur Rekonstitution von Rhodopsin in Gegenwart zusätzlicher Lipide (z.B. native Lipide der ROS-Membran bzw. Cholesterin) wurde die benötigte Menge an Lipiden in Chloroform aufgenommen und in einem Reagenzglas unter einem schwachen Argonstrom getrocknet, in 1 ml Diethylether aufgenommen und erneut unter Argon getrocknet. Anschließend wurden die Lipide in 300 µl Puffer D aufgenommen und 1-2 h geschüttelt, bis eine homogene Suspension entstand. Danach wurde 1 mg Rhodopsin in Puffer D zugegeben und mit Puffer D auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml Rhodopsin aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und wie oben beschrieben dialysiert.

3.4 Charakterisierung der 2D-Kristalle mittels Elektronenmikroskopie

Die Zusammensetzung der kristallinen Präparationen wurde mittels elektronenmikroskopischer Übersichtsaufnahmen bei niedriger Vergrößerung begutachtet. Anhand dieser Bilder wurde das Verhältnis zwischen Vesikeln, tubulären Kristallen und Membranfragmenten gegenüber sonstigen Proteinaggregaten beurteilt. Übersichtsbilder wurden mit einem Philips CM12 oder Philips 420 Elektronenmikroskop in der Gruppe von Dr. Schertler (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) oder in Zusammenarbeit mit Dr. Böttcher (Institut für Organische Chemie, Freie Universität Berlin, Kooperation über den SFB 312) aufgenommen.

Zur Charakterisierung der Gitterqualität bzw. der Gittereigenschaften wurden einzelne 2D-Kristalle in vitrifiziertem Eis mit hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie abgebildet und analysiert. Die Aufnahmen wurden am MRC Cambridge unter Verwendung eines 200 kV Hitachi Feldemissionsmikroskops aufgenommen, das mit einer GATAN-Kryostation ausgestattet war. Anschließend wurden die Negative mittels optischer Diffraktion und computergestützter Bildverarbeitung nach Krebs et al. (1998) analysiert.

3.4.1 Elektronenmikroskopische Übersichtsbilder

Als Objektträger für die Aufnahmen wurden Kupfer-Rhodium Netze (Graticules, 400 mesh) verwendet, auf die nach der "floating-film"-Methode ein Kohlefilm von ca. 80-100 Å Dicke aufgebracht wurde. Die Netze wurden auf Filterpapier in einer flachen Schale mit Wasser bedeckt. Der Kohlefilm wurde zunächst auf die Oberfläche eines frisch gespaltenen Glimmerplättchens aufgedampft. Beim Eintauchen des Glimmers in Wasser wurde der Kohlefilm abgelöst und auf der Wasseroberfläche schwimmend über die Netze gebracht. Durch Absenken des Wasserpegels wurde der Film auf die Netze aufgelegt und die Netze anschließend getrocknet. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Netze durch eine Glimmentladung im Vakuum in Gegenwart von 50 µl Amylamin positiviert. Danach wurden 5 µl Probe auf das Netz aufgetragen und die überschüssige Flüssigkeit nach 30 s mit

Filterpapier abgesaugt. Zur Kontrastierung der Probe wurde anschließend ein Tropfen einer 1 % (w/v) Uranylacetatlösung aufgetragen und nach 10 s die überschüssige Lösung wiederum entfernt ("negative staining").

Die Mikroskope (Philips CM12 bzw. Philips 420) wurden mit einer Betriebsspannung von 120 kV, einem 50 μm Kondensator und einer 50 μm Objektapertur betrieben. Übersichtsbilder wurden bei ca. 4000x Vergrößerung im defokussierten Diffraktionsmodus unter Verwendung von Kodak SO-163 Filmmaterial aufgenommen. Die Negative wurden 12 min in Kodak D19 Entwickler entwickelt, kurz gewässert, 30 min fixiert, nochmals ca. 30 min gewässert und anschließend getrocknet.

3.4.2 Kryoelektronenmikroskopie

Für kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden die Kupfer-Rhodium Netze mit Kohleträgerfilm wie im vorherigen Abschnitt beschrieben vorbereitet. 3,5 μl Probe wurden bei 4 °C auf die Netze aufgetragen und die überschüssige Flüssigkeit nach 2 min durch Aufpressen eines Filterpapiers entfernt. Unmittelbar darauf wurden die Proben durch Einschließen der Trägernetze in flüssiges Ethan eingefroren (Henderson et al., 1990). Die Abkühlung der Probe erfolgt dabei so schnell, daß die Wassermoleküle kein für Eis typisches Kristallgitter ausbilden können. Man spricht daher auch von amorphem bzw. vitrifiziertem Eis. Die Proben wurden anschließend in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

Der Transfer der Netze in das Mikroskop erfolgte unter Verwendung einer GATAN-Kryostation. Im Mikroskop (200 kV Hitachi Feldemissionsmikroskop) wurden die Proben auf -180 °C gekühlt. Die Aufnahmen wurden mit einem 20 μm Kondensator unter "low-dose"-Bedingungen (10-15 Elektronen/ \AA^2) und unter Verwendung eines Spot-Scan Verfahrens (Bullough und Henderson, 1987) aufgenommen. Bei diesem Verfahren, das speziell für strahlungsempfindliche biologische Proben entwickelt wurde, wird die abzubildende Fläche mit dem Elektronenstrahl in mehreren Schritten abgetastet und somit nicht über den gesamten Zeitraum der Aufnahme exponiert. Dadurch werden vor allem Effekte durch die Aufladung der Probe und die Drift des Objekts während der Belichtung reduziert. Fokussierung und Astigmatismuskontrolle erfolgten mit abgelenktem Elektronenstrahl bei 200000x Vergrößerung ca. 2-5 μm neben der abzubildenden Stelle anhand der Körnung des Kohleträgerfilms. Anschließend wurden die Objekte bei einer 60000x Vergrößerung und einem Unterfokus von 7000 \AA abgebildet. Als Filmmaterial wurden Kodak SO-163 Filme eingesetzt. Die Filme wurden 12 min in Kodak D19 Entwickler bei 20 °C entwickelt, kurz gewässert, 30 min fixiert, nochmals 30 min gewässert und anschließend getrocknet.

3.4.3 Bildverarbeitung

Die Negative der hochauflösenden kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mittels optischer Diffraction auf kristalline Bereiche hin untersucht. Bei dieser Technik wird Laserlicht (He-Ne-Laser, $\lambda = 632,8 \text{ nm}$) an dem Negativ gebeugt. Der optische Aufbau entspricht dem Fraunhofer Diffraktions-Arrangement. Aus der Intensität des Laserdiffraktogramms können Rückschlüsse auf die Größe und Qualität der kristallinen Bereiche gezogen werden. Darüber hinaus ermöglicht die optische Diffraction die Kontrolle der Defokussierung und des Astigmatismus. Da im Elektronenmikroskop nicht alle Raumfrequenzen gleichermaßen gut übertragen werden, verursacht die Abbildung der Granulation des Kohleträgerfilms ein gleichmäßiges Spektrum von Raumfrequenzen mit Ausnahme derjenigen Frequenzbereiche, in denen die Kontrast-Transfer-Funktion einen Nulldurchgang durchläuft. In der Fourier-Transformation bzw. im Laserdiffraktogramm des Negativs drückt sich dies in einer typischen Reihe von Ringen mit einer Amplitude von Null aus, den sogenannten Thon-Ringen (Thon, 1966). Reflexe im Bereich der Nulldurchgänge erscheinen entsprechend schwächer

bzw. fehlen ganz. Der Astigmatismus wiederum verursacht eine elliptische Verzerrung der Thon-Ringe.

Für die Bildverarbeitung wurden nur Bereiche ausgewählt, in deren Laserdiffraktogramm Reflexe mit 15-10 Å Auflösung deutlich zu erkennen waren. Entsprechende Areale mit einer Größe von 42 x 42 mm wurden mit einem Zeiss SCAI Densitometer mit einer Schrittgröße von 7 µm (6000 x 6000 Pixel) bei einer Integrationszeit von 2 ms gescannt. Die digitalisierten Bilder wurden anschließend mit den MRC Bildverarbeitungsprogrammen bearbeitet (Amos et al., 1982; Henderson et al., 1990; Crowther et al., 1996; Krebs et al., 1998).

Zunächst wurde die Fourier-Transformation des gescannten Areals mit dem Programm XIMDISP berechnet und die Gitterparameter bestimmt. Anschließend wurden durchschnittlich 50 Reflexe indiziert, die deutlich über dem Hintergrundrauschen lagen. Die Liste dieser Reflexe wurde zur Fourier-Filterung des Rohbilds verwendet. Dazu wurde die Fourier-Transformation des Rohbilds maskiert, indem alle Bereiche einschließlich des (0,0) Reflexes der Transformierten auf den Wert Null gesetzt wurden mit Ausnahme eines Bereichs von 16 Pixel um die reziproken Gitterpunkte der indizierten Reflexe (Programm MASKTRAN). Die Rücktransformation nach Maskierung ergab dann ein gefiltertes Bild, worin ein großer Teil des Rauschens sowie der nicht-periodischen Information reduziert wurde (Henderson et al., 1986).

Anschließend wurden Verzerrungen des Gitters, die z.B. durch Wechselwirkung der Kristalle mit dem Kohlefilm des Objektträgers verursacht werden, mittels einer dreistufigen "unbending"-Routine korrigiert (Henderson et al., 1986; Krebs et al., 1998). Dieses Verfahren basiert auf der Berechnung der Kreuzkorrelationsfunktion zwischen dem gefilterten Bild und einem schrittweise verbesserten Referenzbereich. Im ersten Durchgang wurde ein Referenzbereich von 300 x 300 Pixel aus dem gefilterten Bild herausgegriffen (Programm BOXIMAGE), Fourier-transformiert (Programm FFTRANS) und durch Einbetten in ein entsprechend großes Feld mit dem Grauwert Null auf die Größe des Originalbilds ausgedehnt. Anschließend wurde die Fourier-Transformation des Referenzbereichs mit der Konjugiert-Komplexen der Fourier-Transformation des gesamten gefilterten Bildes multipliziert (Programm TWOFIELD). Die Rücktransformation des Produkts ergab schließlich die Kreuzkorrelationsfunktion. Anschaulich ausgedrückt entsteht die Kreuzkorrelationsfunktion durch eine kontinuierliche Verschiebung des Referenzbereichs gegenüber dem gefilterten Bild, wobei jeweils die Korrelation zwischen beiden berechnet wird. Dementsprechend zeigt die Kreuzkorrelationsfunktion Maxima an den Stellen, an denen eine hohe Ähnlichkeit zwischen dem Referenzbereich und dem gefilterten Bild vorliegt.

Die Positionen dieser Maxima wurden mit dem Programm QUADSEARCH ermittelt und ein Satz korrespondierender Verschiebungsvektoren berechnet (Programm AUTOCORREL), die wiederum ein Maß für die Abweichung eines Bildpunktes von seiner Position in einem perfekten Gitter darstellen. Im letzten Schritt wird das gefilterte Bild um die analysierten Verzerrungen korrigiert (Programm CCUNBEND). In der nächsten Runde des "unbending"-Verfahrens wurde ein Referenzbereich mit besserem Signal-Rausch-Verhältnis aus dem zuvor entzerrten Bild verwendet, in der dritten "unbending"-Runde wurde schließlich der kristalline Bereich des Bildes sorgfältig markiert und zur Berechnung der Kreuzkorrelationsfunktion herangezogen.

Aus der Fourier-Transformation des korrigierten Bildes wurden die Amplituden und Phasen mit dem Programm MMBOXA extrahiert, das eine sinc-Funktion ($\sin[x]/x$) an die Peaks der Fourier-Transformation anpaßt. Das Programm MMBOXA wurde ferner dazu benutzt, mittlere Peakintensitäten eines kleinen Ausschnitts um die theoretischen Peakpositionen der einzelnen Reflexe zu berechnen. Gleichzeitig normiert das Programm die mittleren Intensitäten auf den Untergrund, dem per Definition ein Wert von 7 zugeordnet wird. Ein nützliches Hilfsmittel stellt die Berechnung der mittleren Intensitäten in Zonen verschiedener Auflösung dar (hier 200-9 Å, 9-5 Å bzw. 5-3,5 Å). Die mittleren Intensitäten geben Auskunft

über die Signifikanz der Strukturinformation in dem entsprechenden Bereich. Eine signifikante Information liegt dann vor, wenn die mittleren Intensitäten eines Bereichs ein vom Untergrundwert abweichendes deutliches Maximum aufweisen (Krebs et al., 1998). Dieses Verfahren ermöglicht einerseits die Beurteilung der "unbending"-Schritte und andererseits den Vergleich der Gitterqualität unterschiedlicher Bilder.

Der nächste Schritt der Bildverarbeitung bestand in der Korrektur des Astigmatismus und den Effekten der Kontrast-Transfer-Funktion. Der Astigmatismus verursacht eine elliptische Verzerrung der Nulldurchgänge der Kontrast-Transfer-Funktion (Thon-Ringe). Dementsprechend kann der Astigmatismus durch zwei Defokuswerte entlang der elliptischen Achsen, dem Winkel zwischen den elliptischen Achsen und einem Winkel zwischen der x-Achse des gescannten Bildes und einer der elliptischen Achsen charakterisiert werden. Für die akkurate Bestimmung der Amplituden und Phasen müssen die Amplitudenmodulation und die Phasenverschiebung der Kontrast-Transfer-Funktion sorgfältig korrigiert werden. Die Korrektur erfolgte mit Hilfe der Programme ORIGTILD, CTFSEARCH und CTFAPPLY gegen einen Datensatz der vorliegenden Rhodopsinstruktur von Krebs et al. (1998). Anschließend wurde die Raumgruppe einzelner Kristalle mit dem Programm ALLSPACE bestimmt.

Amplituden, die aus der Bildverarbeitung elektronenmikroskopischer Aufnahmen extrahiert werden, sind mit zunehmender Auflösung meist deutlich schwächer im Vergleich zu Amplituden, die aus der Elektronendiffraktion an denselben Kristallen erhalten werden. Dies führt zu einem Informationsverlust mit steigender Auflösung, obwohl die Phasen nach wie vor mit hoher Genauigkeit bestimmt werden können. Diese Beobachtung kann einerseits durch Fehlordnungen im Kristall und andererseits durch spezielle Effekte der mikroskopischen Aufnahmetechnik (Drift der Probe, Wechselwirkungen der Kristalle mit dem Kohleträgerfilm) sowie durch Strahlenschäden erklärt werden (Henderson et al., 1986; Henderson, 1992; Schertler et al., 1993; Unger und Schertler, 1995; Krebs et al., 1998). Zur Kompensation des Informationsverlustes können die Amplituden der Bildverarbeitung allerdings auf die Diffraktionsamplituden einer Referenzstruktur skaliert werden, wie bereits für Halorhodopsin (Havelka et al., 1993; Havelka et al., 1995) und Rhodopsin (Schertler et al., 1993; Unger und Schertler, 1995; Unger et al., 1997; Krebs et al., 1998) gezeigt werden konnte. Das Programm SCALIMAMP3D berechnet hierzu mittlere Amplituden in verschiedenen Auflösungszonen und skaliert diese auf die entsprechenden mittleren Referenzamplituden, hier die mittleren Amplituden der Elektronendiffraktion von Bacteriorhodopsin (Krebs et al., 1998).

Die Berechnung und Darstellung der Elektronendichteverteilung erfolgte schließlich durch Fourier-Synthese mit Hilfe des kristallographischen Softwarepakets CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Nach Fourier-Transformation (Programm FFT) wurde die Verteilung der Elektronendichte zur übersichtlicheren Darstellung über die Grenzen der Einheitszelle hinaus erweitert (Programm EXTEND) und ein Konturplot der 2D-Projektion erstellt (Programm NPO).

3.4.4 Elektronendiffraktion

Elektronendiffraktogramme von 2D-Kristallen verschiedener Proben wurden in vitrifiziertem Eis mit einem Philips CM12 Elektronenmikroskop mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV unter Verwendung eines 20 μm Kondensors aufgenommen. Die gestreuten Elektronen wurden auf einen polykristallinen Phosphorschirm abgebildet und die Sekundäremission des Lichts über eine Glasfaseroptik mit einer gekühlten CCD-Kamera detektiert (Faruqi et al., 1999). Die Kameralänge betrug 950 mm, die Belichtungszeit 7 s. Die Präparation der Trägernetze sowie die Einbettung der Proben in vitrifiziertem Eis wurde wie in Abschnitt 3.4.2

beschrieben durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden unter flüssigem Stickstoff mit Hilfe einer GATAN-Kryostation durchgeführt.

3.4.5 Referenzphasen aus der Elektronenmikroskopie

Die Phasen zur Auswertung der Röntgendaten wurden von Dr. Schertler (MRC Cambridge) zur Verfügung gestellt. Sie wurden aus einem Referenzdatensatz mit einer Auflösung von 6 Å extrahiert, der durch Summation der Strukturinformation von vier kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen von im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Rhodopsinkristallen erzeugt wurde. Die Amplituden und Phasen der einzelnen Bilder wurden nach Analyse des Phasenursprungs mit dem Programm AVRAMPHS gemittelt und die Amplituden anschließend mit dem Programm SCALIMAMP3D auf die mittleren Amplituden der Elektronendiffraktion von bR-Kristallen skaliert (Krebs et al., 1998). Auf Grund der Symmetrieeigenschaften des Kristallgitters (Raumgruppe $p2_12_1$) können die Phasen hier nur einen Wert von 0 oder 180 annehmen.

3.5 Lokalisation von Schweratommarkern mittels Röntgendiffraktion

3.5.1 Seitenkettenspezifische Schweratommarkierung in 2D-Kristallen

Die Markierung der cytoplasmatischen Cysteinreste C140 und C316 mit p-Chlormercuribenzoat (PCMB) erfolgte nach Boyer (1954). 5 mg PCMB wurden in 1 ml Puffer A (1 mM Natriumphosphat pH 7,0, 20 mM NaCl) aufgenommen und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Im Überstand wurde die PCMB-Konzentration spektralphotometrisch unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten $\epsilon(232 \text{ nm}) = 16900 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Krebs et al., 1993) bestimmt. 2D-Kristalle (ca. 1-1,5 mg Rhodopsin) wurden dreimal in Puffer A gewaschen, in 1 ml Puffer A bei einer Rhodopsinkonzentration von ca. 15 μM resuspendiert und DTT im Verhältnis zu Rhodopsin von 1:1 (mol/mol) zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PCMB im 10-fachen Überschuss zu Rhodopsin (mol/mol) gestartet und spektralphotometrisch an Hand der Absorptionszunahme bei $\lambda = 250 \text{ nm}$ verfolgt. Nach 5-6 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktion abgebrochen und überschüssiges PCMB durch dreimaliges Waschen in Puffer A entfernt. Die Stöchiometrie des gebundenen Mercuribenzoats (MB) wurde anschließend aus der Absorptionsdifferenz bei ca. $\lambda = 235\text{-}240 \text{ nm}$ nach

$$\text{(Gl. 3.1)} \quad c(\text{MB})/c(\text{Rho}) = \frac{\epsilon(\text{Rho}, 500\text{nm}) \cdot \Delta A(\text{MB}, 236\text{nm})}{A(\text{Rho}, 500\text{nm}) \cdot \Delta \epsilon(\text{MB}, 236\text{nm})}$$

mit $\Delta \epsilon(\text{MB}, 236 \text{ nm}) = 20600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Krebs et al., 1993) und $\epsilon(\text{Rho}, 500 \text{ nm}) = 40600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Lin und Sakmar, 1996) bestimmt.

3.5.2 Herstellung multilamellarer Filme von 2D-Kristallen

Zur Herstellung multilamellarer Filme von bR-Membranfragmenten wurden ca. 1 mg bR in ca. 20 μl 1 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 in mehreren Schritten auf die Trägerfolie des Probenhalters aufgetragen und bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 86 % (eingestellt mit gesättigter KCl-Lösung) und Raumtemperatur getrocknet. Unter diesen Bedingungen bilden sich zuverlässig und reproduzierbar gut geordnete Filme (Krebs et al., 1993; Behrens et al., 1998a).

Im Fall von Rhodopsin wurden ca. 1 mg einer kristallinen Probe dreimal in 1 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 und 0-20 mM NaCl gewaschen und anschließend in einem möglichst geringen Volumen Puffer (ca. 15-30 μl) aufgenommen. Diese Suspension wurde in mehreren

Schritten à 4-7 μl auf Trespaphanfolie aufgetragen und langsam bei konstanter Luftfeuchtigkeit nahe 100 % und konstanter Raumtemperatur über einen Zeitraum von mehreren Tagen getrocknet. Auf Grund der hohen Variabilität der Rhodopsinproben mußten die Bedingungen für jede Präparation individuell angepaßt werden und der Verlauf des Trocknens sorgfältig kontrolliert werden. Die besten Ergebnisse wurden in der Regel bei einer Auftragung in 1 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 in Gegenwart von 20 mM NaCl erhalten.

3.5.3 Aufbau des Röntgenexperiments

Die Röntgendiffraktionsexperimente wurden mit einem Drehanodengenerator der Firma Marconi (Modell Elliot GX 21) durchgeführt. Mit einer Beschleunigungsspannung von 35 kV und einem Anodenstrom von 55 mA liefert der Generator mit einer rotierenden Kupferanode die charakteristische Röntgenstrahlung der Cu- K_{α} Linie von $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$. Strahlungsanteile anderer Energien (z.B. Cu- K_{β} Strahlung) wurden mit einem Nickelfilter absorbiert. Die verbleibende Röntgenstrahlung der Cu- K_{α} Linie wurde mit einem 200 μm Kollimator parallelisiert. Der Aufbau des Diffraktionsexperiments ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Durch den Kollimator gelangt die Strahlung auf die Probe, die auf einem Probenhalter in der Probenkammer senkrecht zum Strahl justiert wurde. Die Probenkammer konnte in der Ebene senkrecht zum Strahl frei bewegt werden. Zwischen Probenkammer und Detektor wurde eine Heliumkammer, deren Ein- und Austrittsfenster aus Mylarfolie bestanden, montiert, um die Streuung des Primärstrahls in Luft zu verringern. In der Heliumkammer befand sich ein Beamstop aus Blei, der die intensive Primärstrahlung blockiert. In der Heliumkammer befand sich ein Beamstop aus Blei, der die intensive Primärstrahlung blockiert.

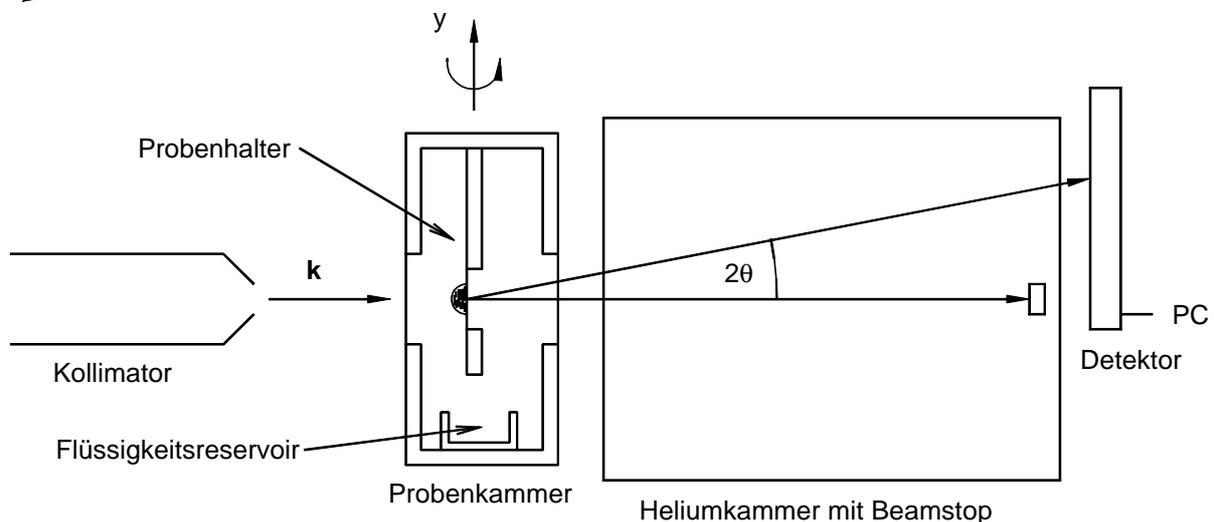


Abbildung 3.1: Schematischer Versuchsaufbau des Diffraktionsexperiments. Die Röntgenstrahlung trifft hinter dem Kollimator auf die Probe, die in der Probenkammer senkrecht zum Strahl justiert ist. Die Abbildung zeigt die Standardprobenkammer, in der die Probe offen auf dem Probenhalter aufgebracht ist. Die Luftfeuchtigkeit im Inneren der Kammer wurde mit Hilfe eines Reservoirs für Wasser bzw. salzhaltige wäßrige Lösungen eingestellt. Zur Messung der lamellaren Stapelreflexe kann der Probenhalter um die y-Achse gedreht werden. Der Beamstop in der Heliumkammer blockt den Primärstrahl ab. Die an der Probe gestreute Strahlung gelangt durch die Heliumkammer auf den Detektor, der ebenfalls senkrecht zum Strahl positioniert ist. Die Probe besteht aus einem multilamellaren Film aus 2D-Kristallen, die innerhalb der Filmebene beliebig gegeneinander verdreht sind. Daher entspricht das detektierte Diffraktionsmuster Debye-Scherrer Ringen, von denen der Detektor einen radialen Ausschnitt aufzeichnet.

Als Detektor wurde ein linear ortsempfindlicher Detektor vom Typ OED 50 M (Braun) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine ortsempfindliche Ionisationskammer, die mit einem Gemisch aus 90 % Argon und 10 % Methan gespült wird. Zum Nachweis der Röntgenquanten dient ein Platindraht mit einem Durchmesser von 20 μm , an dem eine Hochspannung von ca. 3-3,6 kV anliegt. Treten Röntgenquanten durch das Berylliumfenster des Detektors, werden in der Zählkammer Gasmoleküle ionisiert und freie Elektronen wandern zum Anodendraht. Sie werden dabei durch das anliegende elektrische Feld beschleunigt und verursachen die Ionisation weiterer Gasmoleküle. Auf diese Weise wird die primäre Ionisation verstärkt (Avalanche-Prozeß bzw. Gasverstärkung). Die Elektronen erzeugen schließlich auf dem Anodendraht und den zwei dahinter liegenden dreieckigen Kathoden einen elektrischen Impuls, wobei aus den Ladungsverhältnissen der beiden Kathodenhälften auf den Ort des Primäreignisses zurück geschlossen werden kann. Detektoren dieser Bauart werden auch als „Backgammon-Detektoren“ bezeichnet. Die Ortsauflösung des Detektors lag unterhalb von 80 μm . Der Abstand zwischen Probe und Detektor lag zwischen 18-21 cm. Bei den hier durchgeführten Messungen an lamellaren Stapeln von 2D-Kristallen wird am Detektor ein radialer Schnitt durch die Debye-Scherrer Ringe aufgezeichnet, die dadurch entstehen, daß die Reflexe einzelner Kristalle zu Kreisbögen verschmiert sind. Um den Einfluß der Mosaikverteilung der Membrannormalen um die Trägernormale („mosaic spread“) zu minimieren, wurde das Eintrittsfenster des Detektors zusätzlich mit einer Blende parallel zum Zählrohr maskiert.

Das Detektorsystem sowie die Datenaufnahme wurden über einen PC gesteuert, so daß die Qualität der Spektren unmittelbar während der Messung kontrolliert werden konnten. Das Meßprogramm (Asa Version 2.4, Braun) ermöglichte ferner die Steuerung und Begrenzung des Energiefensters, um störende niedrig- bzw. höherenergetische Strahlungsanteile des Detektorsignals elektronisch zu filtern.

Multilamellare Filme aus 2D-Kristallen wurden auf einer Trägerfolie hergestellt (vgl. Abschnitt 3.5.2), die über die Bohrung des Probenhalters gespannt wurde. Der Probenhalter wurde anschließend in die Probenkammer eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Probenkammern verwendet. Die Hauptspezifikation der Standardkammer lag darin, daß sich die Probe auf dem Probenhalter offen in der Probenkammer mit einem Volumen von ca. 200 cm^3 befand und die Luftfeuchtigkeit im Inneren mit Hilfe eines Reservoirs für Wasser bzw. Salzlösungen reguliert werden konnte. Ein weiterer Vorteil dieser Kammer lag darin, daß sich die Probe auf der Außenseite des Halters befand und somit durch Drehung um die y-Achse (vgl. Abbildung 3.1) die Messung der lamellaren Stapelreflexe möglich war.

Bei der zweiten Probenkammer handelte es sich um ein Kryostatsystem, das für Messungen bei Temperaturen $< -70\text{ }^\circ\text{C}$ entwickelt wurde (Behrens, 1996; Pöhlmann, 1999). Hierbei wird der Probenfilm im Inneren der Bohrung des Probenhalters zwischen zwei Lagen von Trespaphanfolie abgeschlossen. Obwohl im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit keine Tieftemperaturmessungen durchgeführt wurden, erwies sich für die Rhodopsinmessungen das kleine Volumen des Probenraums als Vorteil, da die Filme aus Rhodopsinkristallen sehr empfindlich auf Schwankungen der Luftfeuchtigkeit reagierten. Selbst der kurze Transfer des Probenhalters in die Standardprobenkammer und die anschließende Reäquilibration der Luftfeuchtigkeit im Innenraum der Kammer konnten bei den Rhodopsinmessungen schon drastische Effekte auf die Probenqualität ausüben. Daher wurden die meisten Messungen mit der Kryostatkammer durchgeführt. Mit diesem System konnten allerdings keine lamellaren Stapelreflexe gemessen werden.

3.5.4 Durchführung der Diffraktionsexperimente

24 h vor Beginn der Messung wurde die Gasversorgung der Heliumkammer und des Detektorsystems gestartet. Anschließend wurde der Probenhalter in die Meßkammer überführt. Die Standardprobenkammer ermöglichte hierbei die Äquilibration des offenliegenden Probenfilms an die gegebene Luftfeuchtigkeit des Probenraums. Bei Verwendung der Kryostatkammer wurde der Probenfilm in der Bohrung des Probenhalters mit Trespaphanfolie verschlossen. Durch Verschieben der Probenkammer in der Ebene senkrecht zur Strahlrichtung konnte die Probe systematisch untersucht werden. Nach dem Auffinden einer geeigneten Stelle wurde die Datenaufnahme gestartet. Zur Minimierung systematischer Fehler durch z.B. Strom- und Spannungsschwankungen des Generators oder Effekte durch Instabilität der Probenfilme wurden die Spektren nach einer Stunde automatisch abgespeichert. Als Meßzeit wurde ein Minimum von 20 h angestrebt, um eine ausreichende Zählstatistik zu erzielen. In allen Schritten der Versuchsdurchführung wurden MB-markierte bzw. nicht markierte Proben möglichst identisch behandelt. Die Kriterien für den Abbruch einer Messung waren das Auftreten von Strahlenschäden sowie deutlich sichtbare Veränderungen im Meßuntergrund, die auf eine Veränderung des Probenfilms hinwiesen. Zur Eichung und Kontrolle der Apparatur wurden in regelmäßigen Abständen Referenzspektren von Purpormembranen (Wildtyp bR) aufgenommen.

3.5.5 Datenanalyse

Die Einzelspektren à 1 h Meßzeit wurden sorgfältig nach Abweichungen in Bezug auf die Lage der Reflexe und Veränderung des Streuuntergrunds bzw. nach sonstigen systematischen Abweichungen untersucht und gegebenenfalls verworfen. Die verbleibenden Einzelspektren wurden summiert. Der Streuuntergrund wurde als Polynom 8. Grades modelliert und abgezogen (Krebs et al., 1993; Behrens et al., 1998a). Die Reflexe der Rhodopsinspektren wurden nach einem orthorhombischen Gitter mit $p22_12_1$ -Symmetrie indiziert. Gittertyp und Symmetrie wurden mittels elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Proben verifiziert (vgl. Abschnitt 3.4). Die Gitterkonstanten wurden anhand der ausgeprägten Reflexe im vorderen Bereich der Spektren ermittelt. Die Streuintensitäten der Reflexe wurden als Summe von Gauß-Funktionen angepaßt und mit einem geometrischen Lorentz-Faktor

$$(Gl. 3.2) \quad \text{Lorentzfaktor}(h, k) = \sqrt{\frac{b^2}{a^2} * h^2 + k^2}$$

für das zweidimensionale orthorhombische $p22_12_1$ -Gitter korrigiert. Diese Korrektur trägt der Tatsache Rechnung, daß auf Grund des rechteckigen Eintrittsfensters des Lineardetektors bei größer werdenden Streuwinkeln lediglich ein immer kleiner werdender Ausschnitt der Debye-Scherrer Ringe registriert werden kann. Anschließend wurden die Spektren auf die Gesamtintensität normiert. Mit den daraus resultierenden Strukturfaktoramplituden und den Phasen aus der Elektronenmikroskopie wurde die Elektronendichteverteilung des Rhodopsins bzw. unter Verwendung des kristallographischen Softwarepakets CCP4 berechnet (vgl. Abschnitt 3.4.3). Analog dazu wurde die Fourier-Differenzdichte aus den Differenzen der Strukturfaktoramplituden zwischen markiertem und nativem Protein berechnet.

Auf Grund der Symmetrieeigenschaften der $p22_12_1$ -Kristalle entspricht die 2D-Projektion der Elektronendichte hier einer sogenannten zentrischen Zone. Daraus folgt, daß die Vektoren der Strukturfaktoren des nativen Proteins, des markierten Proteins und der Schweratommarker kollinear sind und die korrespondierenden Phasen entweder den Wert 0 oder π besitzen. Wenn die Anzahl der eingeführten Schweratome klein ist, können deshalb die Strukturfaktoramplituden der Schweratome bereits mit großer Genauigkeit aus der Differenz der Strukturfaktoramplituden des markierten Proteins und des nativen Proteins bestimmt werden (Blundell und

Johnson, 1976). Zur Überprüfung der experimentell bestimmten Schweratompositionen wurde ein sogenanntes Refinement durchgeführt. Hierbei wurden die Differenzen zwischen den experimentell bestimmten Strukturfaktoramplituden der Schweratommarker und einem Modelldatensatz nach der Methode der kleinsten quadratischen Abweichungen minimiert. Für das Refinement wurde das Programm Shelx76 verwendet.

Zur Auswertung der Referenzspektren von Wildtyp bR wurden die Reflexe nach dem hexagonalen Gitter p3 induziert und die zugeordneten Intensitäten mit dem geometrischen Lorentz-Faktor

$$\text{(Gl. 3.3) Lorentzfaktor}(h, k) = \sqrt{h^2 + hk + k^2}$$

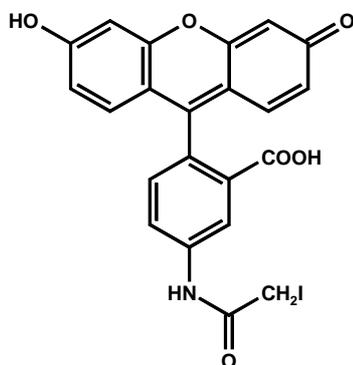
korrigiert. Die Phasen wurden von Henderson et al. (1986) übernommen und die Elektronendichteverteilung mit dem Programm HEXMO berechnet (Behrens et al., 1998a).

3.6 Seitenkettenspezifische Markierung mit Fluoreszenzmarkern

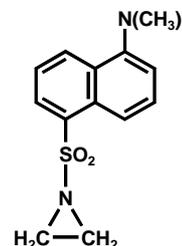
3.6.1 Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzmarker

Zur Untersuchung der Dynamik der cytoplasmatischen Loopbereiche von Rhodopsin wurden die nativen Cysteinreste C140 und C316 mit verschiedenen sulfhydrylspezifischen Fluoreszenzmarkern gekoppelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier unterschiedliche Fluorophore verwendet, deren Strukturformeln und spektrale Eigenschaften in Abbildung 3.2 bzw. Tabelle 3.1 zusammengestellt sind.

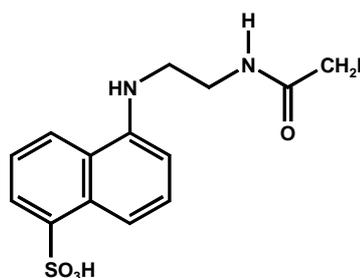
(1) 5-Iodacetamidofluorescein (IAF)



(2) 5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonylaziridin (DNZ)



(3) N-(Iodacetamidoethyl)-1-naphthylamin-5-sulfonsäure (IAEDANS)



(4) C5-Bromacetamido Texas Red® (TR)

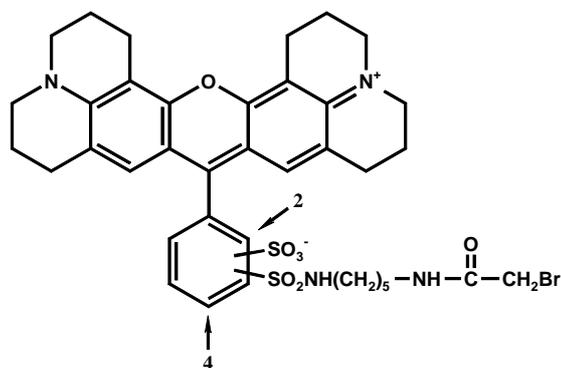


Abbildung 3.2: Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten sulfhydrylspezifischen Fluoreszenzmarker.

Marker	Abkürzung	$\lambda_{\max}(\text{abs}) / \text{nm}$	$\lambda_{\max}(\text{em}) / \text{nm}$	$\epsilon / \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
5-Iodacetamidofluorescein	IAF (AF)	492	515	75000
5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonylaziridin	DNZ	340	543	4100
N-(Iodacetamidoethyl)-1-naphthylamin-5-sulfonsäure	IAEDANS (AEDANS)	336	490	5700
C ₅ -Bromacetamido Texas Red [®]	TR	583	603	113000

Tabelle 3.1: Spektrale Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzmarker. Die Angaben der Absorptionsmaxima $\lambda_{\max}(\text{abs})$, Emissionsmaxima $\lambda_{\max}(\text{em})$ und Extinktionskoeffizienten ϵ stammen vom Hersteller Molecular Probes, Inc. (Oregon, USA). Die in Klammern angegebenen Abkürzungen kennzeichnen speziell die Fluorophore IAF bzw. IAEDANS nach Kopplung an eine SH-Gruppe.

3.6.2 Blockierung von C316 mit 4,4'-Dithiodipyridin

ROS-Membranen wurden vor der Reaktion mit 4,4'-Dithiodipyridin (DTP) dreimal in 10 mM HEPES-Puffer pH 6,9 gewaschen (Zentrifugation bei 20000 rpm, SS34-Rotor, 20-30 min, 4 °C) und in 10 mM HEPES, pH 6,9 bei einer Rhodopsinkonzentration von 15-20 μM aufgenommen. DTP (3-5 mg) wurde in 30 μl DMF gelöst. Anschließend wurde durch Zugabe von 10 mM HEPES, pH 6,9 eine DTP-Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mM DTP hergestellt. Beide Lösungen wurden auf Eis gekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM DTP gestartet. Die Sulfhydrylgruppe von Cystein reagiert mit DTP unter Abspaltung von 4-Thiopyridin (Abbildung 3.3). Das Absorptionsmaximum von DTP liegt bei $\lambda = 247 \text{ nm}$, das von 4-Thiopyridin dagegen bei $\lambda = 324 \text{ nm}$ (Grassetti und Murray, 1967). Daher wurde der Verlauf der Reaktion an Hand der Freisetzung von 4-Thiopyridin spektroskopisch bei $\lambda = 324 \text{ nm}$ gegen eine Referenzküvette mit 1 mM DTP in 10 mM HEPES pH 6,9 verfolgt. Der Extinktionskoeffizient von 4-Thiopyridin bei dieser Wellenlänge beträgt $19000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Cai et al., 1997). Im gesamten Verlauf der Reaktion durfte die Temperatur der Probe 5 °C nicht überschreiten, um die mögliche Reaktion von C140 mit DTP zu unterbinden. Nach Umsetzung von 1-1,1 Cysteinresten pro Rhodopsin wurde die Reaktion durch Zugabe von Cystein (Endkonzentration 10 mM) gestoppt und die ROS-Membranen dreimal in 10 mM HEPES, pH 6,9 gewaschen (Zentrifugation bei 20000 rpm, SS34-Rotor, 20-30 min, 4 °C).

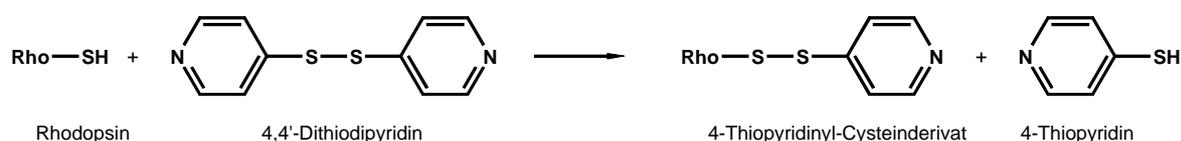


Abbildung 3.3: Reaktion von Cysteinseitenketten mit 4,4'-Dithiodipyridin nach Grassetti und Murray (1967).

Rhodopsin in OG-Mizellen wurde vor der Reaktion mit DTP durch Ausschlußchromatographie über eine Sephadex-G25f-Säule (Säulenvolumen ca. 10 ml pro mg Rhodopsin) in 10 mM HEPES, pH 6,9, 30 mM OG gereinigt, um Salze bzw. Reste von α -D-Methylmannose zu entfernen. Die Blockierung der Position C316 erfolgte analog zu den ROS-Membranen bei einem Überschuß von 4:1 DTP/Rhodopsin in 10 mM HEPES, pH 6,9, 30 mM OG. Überschüssiges Reagenz bzw. 4-Thiopyridin wurden wiederum chromatographisch über eine

Sephadex-G25f-Säule in dem entsprechenden Puffer, in dem die nachfolgende Markierung der Position C140 mit Fluoreszenzmarkern durchgeführt wurde (in der Regel 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 30 mM OG), entfernt.

3.6.3 Seitenkettenspezifische Markierung der Cysteinreste C140 und C316

Die Fluoreszenzmarker (ca. 1 mg/25 ml) wurden in 50 µl DMF (IAF, IAEDANS, DNZ) bzw. DMSO (TR) gelöst. Anschließend wurden durch Zugabe von 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5 Stammlösungen mit einer Fluorophorkonzentration von 25 mM hergestellt. Die Markierung von Rhodopsin in ROS-Membranen erfolgte in der Regel in 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl und in OG-Mizellen in 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl und 30 mM OG bei einer Rhodopsinkonzentration von 20-25 µM. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Markers gestartet. Das molare Verhältnis zwischen Marker und Rhodopsin sowie die Reaktionszeit bzw. Reaktionstemperatur variierten je nach Marker und gewünschter Markierungsposition. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen der einzelnen Markierungsreaktionen werden im experimentellen Teil der Arbeit ausführlich erläutert (siehe Abschnitt 5.3.2). Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 50-100 mM Cystein oder Glutathion gestoppt.

Der überschüssige Marker wurde in ROS-Membranen durch mehrmaliges Waschen in 10 mM MES pH 6,0, 150 mM NaCl entfernt (Zentrifugation bei 20000 rpm, SS34 Rotor, 30 min, 4 °C), bis im Überstand spektroskopisch kein freier Marker mehr nachgewiesen werden konnte. Die OG-Mizellen wurden nach Markierung chromatographisch über eine Sephadex-G25f-Säule in 10 mM MES pH 6,0, 150 mM NaCl und 30 mM OG gereinigt (Säulenvolumen ca. 10-12 ml pro mg Rhodopsin). Lediglich die Entfernung von ungebundenem TR erforderte auf Grund des hydrophoben Charakters des Markers eine Reinigung über ConA-Sepharose (Säulenvolumen ca. 1 ml pro mg Rhodopsin). Die Säule wurde mit 10 mM MES pH 6,0, 150 mM NaCl und 30 mM OG gewaschen, bis im Eluat kein freies TR mehr nachweisbar war.

Die Bindungsstöchiometrie wurde aus der Absorptionsdifferenz zwischen markiertem und nicht markiertem Rhodopsin nach

$$(Gl. 3.4) \quad c(M)/c(Rho) = \frac{\varepsilon(Rho, 500nm) \cdot \Delta A(M)}{A(Rho, 500nm) \cdot \Delta \varepsilon(M)}$$

bestimmt, wobei $\Delta A(M)$ für die Absorptionsdifferenz des Markers am jeweiligen Absorptionsmaximum und $\Delta \varepsilon(M)$ für den entsprechenden Extinktionskoeffizienten stehen. Im Falle des Fluoresceins wurde die Bindungsstöchiometrie auf Grund der pH-abhängigen Absorption dieses Fluorophors alternativ durch Titration nach

$$(Gl. 3.5) \quad c(AF)/c(Rho) = \frac{\varepsilon(Rho, 500nm) \cdot \Delta A(AF, 495 nm)}{A(Rho, 500nm) \cdot \Delta \varepsilon(AF)}$$

mit

$$\Delta A(AF, 495 nm) = A_{495 nm}(pH 9) - A_{495 nm}(pH 5)$$

bestimmt (Alexiev, 1994). Die kovalente Bindung der Fluorophore an Rhodopsin wurde gelelektrophoretisch nachgewiesen (vgl. Abschnitt 3.1.5).

3.6.4 Limitierte Proteolyse mit Thermolysin

Zur Kontrolle der Bindungsposition wurde das markierte Rhodopsin proteolytisch mit Thermolysin gespalten (Poer, 1982). ROS-Membranen mit je 100 μg Rhodopsin wurden zum Entsalzen zweimal in 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 gewaschen und in 100 μl (10 mM) Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 aufgenommen. Nach Zugabe von 5 μl (100 mM) CaCl_2 und 4 μl (1 mg/ml) Thermolysin in 10 mM Tris-HCl pH 7,4 wurden die Proben 4 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 22 μl (100 mM) EDTA-Lösung gestoppt und die Membranen abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 13000 rpm, 10 min). Die Proben wurden in einem Volumen von 50 μl einer Lösung mit 40 mM EDTA und 8 % (w/v) SDS und 50 μl Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % (w/v) Glycerin, 3 % (w/v) SDS, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Die Proteolyse von Rhodopsin in OG-Mizellen erfolgte ebenfalls bei einem Rhodopsin/Thermolysin-Verhältnis von 25:1 (w/w) in Gegenwart von 5 mM CaCl_2 , jedoch wurde hier auf die vorhergehende Entfernung der Salze verzichtet. Zum Abbruch der enzymatischen Spaltung wurden EDTA (Endkonzentration 10 mM) und 30-50 μl Probenpuffer zugeben.

Die Trennung der Peptidfragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese unter Verwendung eines Trenngels mit 17 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (vgl. Abschnitt 3.1.5). Nach dem Lauf wurden die markierten Peptidfragmente auf einem UV-Leuchtschirm dokumentiert (Polaroidfilm 667, UV-Filter 15 orange) und die Gele anschließend mit Coomassie G250 gefärbt.

3.6.5 Reduktion der Schiff-Base mit Natriumborhydrid

Für Fluoreszenzanisotropiemessungen unter Ausschluß von Energietransfer wurde die Schiff-Base des Rhodopsins nach Bownds und Wald (1965) mit Natriumborhydrid (NaBH_4) reduziert. Rhodopsin ist im Dunkeln inert gegenüber NaBH_4 , die Absorption von Licht führt dagegen zur Bildung von N-Retinylopin, wobei der Chromophor kovalent an K296 gebunden bleibt. Die Reduktion der Schiff-Base verursacht hierbei eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Chromophors von $\lambda = 498 \text{ nm}$ nach $\lambda = 333 \text{ nm}$. Zur Durchführung der Reaktion wurden die Proben (150 μg Rhodopsin in einem Volumen von 150 μl Lösung) durch Zugabe von 50 mM Natriumhydrogencarbonatlösung (pH 10) auf einen pH-Wert von 8,5-9,0 eingestellt und auf Eis 2,8 mg NaBH_4 zugegeben. Die Belichtung der Proben mit gelbem Licht (Kaltlichtlampe Schott KL1500, Kantenfilter OG 515) ermöglichte die Reduktion. Nach 10 min wurde das überschüssige Reagenz durch Zentrifugation (ROS-Membranen) oder durch Ausschlußchromatographie über Sephadex G25f (OG-Mizellen) entfernt (vgl. Abschnitt 3.6.3). Der Nachweis der Reduktion der Schiff-Base erfolgte mit Hilfe von Absorptionsspektren an Hand der Verschiebung der Chromophorbande.

3.7 Untersuchung der Dynamik der cytoplasmatischen Loopbereiche von Rhodopsin mit zeitaufgelöster Fluoreszenzanisotropie

Die Messungen der zeitaufgelösten Fluoreszenz und Fluoreszenzanisotropie wurden mit einer Apparatur durchgeführt, die speziell für die Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung an Synchrotronstrahlungsquellen entwickelt wurde (Gläsel, 2000). Die Vorteile der Verwendung einer Synchrotronanlage als Anregungslichtquelle liegen hierbei in der nahezu uneingeschränkten Durchstimbarkeit der Anregungswellenlänge und der hohen Wiederholrate der Anregungspulse. Die Experimente wurden an den Speicherringen der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung mbH (BESSY I) und des Hamburger Synchrotronstrahlungslabors (HASYLAB) im "single bunch"-Betrieb durchgeführt. Die mittleren Halbwertsbreiten der Anregungspulse lagen bei 600-900 ps am BESSY I

und 200 ps am HASYLAB. Aus der Wiederholrate von 5 MHz in beiden Synchrotronanlagen resultiert ein zeitlicher Abstand der Pulse von 200 ns. Dies garantiert eine ausreichende Akkumulation von Zählereignissen innerhalb einer angemessenen Meßdauer, die einerseits durch die Stabilität der Proben (Photolyse des Rhodopsins bzw. Lebensdauer der zu untersuchten Photointermediate) und andererseits durch den Injektionszyklus des Speicherringes begrenzt ist. Der Zeitraum zwischen den Injektionen betrug durchschnittlich 3 Stunden am BESSY I bzw. 9 Stunden am HASYLAB.

Da die Elektronen im Speicherring bei der Ablenkung durch die Undulatoren Strahlungsenergie abgeben, kommt es zu einem kontinuierlichen Intensitätsverlust. Daher müssen in regelmäßigen Abständen Elektronenbündel in den Speicherring injiziert werden. Dies stellt einen wesentlichen Nachteil für die Anwendung der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung dar. Die Intensitätsänderungen der Synchrotronstrahlung sind zusätzlich von Änderungen der Anregungspulsform und einer zeitlichen Verschiebung der Anregungspulse begleitet. Da die gemessene Fluoreszenzintensität mathematisch eine Faltung des Anregungspulses mit der tatsächlichen Fluoreszenz darstellt, beeinflussen Veränderungen des Pulsprofils die Meßergebnisse. Die Fluoreszenzanisotropie wird von polaritätsabhängigen Intensitätskomponenten bestimmt. Veränderungen des Pulsprofils sowie Intensitätsschwankungen führen daher zu Fehlern bei der Messung der zeitaufgelösten Anisotropie. Die verwendete Meßapparatur wurde speziell dazu konzipiert, diese negativen Einflüsse der Anregung mit Synchrotronstrahlung zu korrigieren (Gläsel, 2000).

3.7.1 Das Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung

Die Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung beruht auf der Anregung einer fluoreszierenden Probe mit kurzen Lichtpulsen. Von den im Anschluß emittierten Photonen wird hierbei von der Meßapparatur willkürlich nur ein Photon detektiert. Durch Korrelation mit dem Anregungspuls wird parallel der zeitliche Abstand zwischen der Anregung und der Detektion gemessen. Wird dieser statistische Prozeß genügend oft wiederholt, erhält man eine Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Emission eines Photons zu einer bestimmten Zeitdifferenz nach der Anregung (zur Übersicht siehe O'Connor und Phillips, 1984).

Die Anzahl der Zählereignisse pro Zeitdifferenz wird bei der Messung mit einem Vielkanalanalysator aufgezeichnet. Der Photodetektor, der die Fluoreszenz der Probe registriert, gibt dabei durchschnittlich p_i Spannungsimpulse an die Folgeelektronik weiter. Der Index i steht für das i -te Zeitintervall, das mit Hilfe des Vielkanalanalysators erfaßt wird. Die Wahrscheinlichkeit $P_m(i)$, daß zwischen dem nullten und i -ten Zeitintervall m Spannungsimpulse erzeugt werden, kann mit einer Poisson-Verteilung beschrieben werden:

$$(Gl. 3.6) \quad P_m(i) = \frac{(p_i)^m \cdot e^{-p_i}}{m!}.$$

Demnach beträgt die Wahrscheinlichkeit, keinen Puls zu registrieren

$$(Gl. 3.7) \quad P_0(i) = e^{-p_i},$$

genau einen Puls zu registrieren

$$(Gl. 3.8) \quad P_1(i) = p_i e^{-p_i}$$

und mehr als einen Puls zu detektieren

$$(Gl. 3.9) \quad P_{m>1}(i) = 1 - P_0(i) - P_1(i) = 1 - (1 + p_i) e^{-p_i}.$$

Das Meßprinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung beruht technisch auf der Auslösung einer Spannungsrampe durch den Anregungspuls (Start-Signal) und deren Abbruch durch das erste am Detektor registrierte Photon (Stop-Signal). Die Höhe dieses Spannungssignals ist somit proportional zu der Zeitdifferenz zwischen Anregung und Emission. Die nachfolgenden Photonen, die im Zuge desselben Anregungspulses emittiert werden, werden nicht mehr berücksichtigt, da die Elektronik eine Totzeit durchläuft, in der das erste Photon verarbeitet wird. Das ist eine Grundvoraussetzung des Meßprinzips, da die Detektion mehrerer Photonen pro Anregungspuls die Statistik verfälschen würde.

Die zentrale Frage ist hierbei, unter welchen Bedingungen die registrierte Statistik die tatsächliche zeitliche Verteilung der emittierten Photonen wiedergibt. Erfolgt die Detektion eines Photons pro Zeitkanal selten ($p_i \ll 1$), gilt näherungsweise

$$(Gl. 3.10) \quad P_1(i) = p_i \quad \text{bzw.} \quad P_{m>1}(i) = p_i^2 \ll p_i.$$

Bei N_{ex} Anregungspulsen pro Messung werden $N_c(i)$ Zählereignisse zwischen dem nullten und i -ten Kanal registriert, wobei gilt:

$$(Gl. 3.11) \quad N_c(i) = N_{ex} \{P_1(i) + P_{m>1}(i)\}.$$

Die Forderung, höchstens ein Photon pro Anregungspuls zu detektieren, wird somit durch das Verhältnis N_c/N_{ex} bestimmt. Einen vernachlässigbaren statistischen Fehler erhält man bei einem hinreichend kleinem Verhältnis von N_c/N_{ex} unterhalb von 0,05 (Yguerabide, 1972).

3.7.2 Aufbau der Meßapparatur

Der Aufbau der Apparatur, die zur Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie eingesetzt wurde, ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt. Abbildung 3.5 gibt einen Überblick über die elektronischen Komponenten der Anlage. Das Anregungslicht der Synchrotronquelle wurde über einen Umlenkspiegel in die Apparatur geleitet. Die Monochromatoren der Strahlrohre (2m-Seya am BESSY I bzw. Visuv X2 am HASYLAB) wurden auf die nullte Ordnung eingestellt. Die Wellenlänge des Anregungslichts wurde mit einem in die Anlage integrierten Monochromator (Jobin Yvon H10 UV) selektiert. Der Monochromator verfügte über eine spektrale Bandbreite von 200-800 nm. Die Spaltbreite betrug 0,5-1 mm. Das Streulicht des Monochromators (maximal 5 % im höherenergetischen Spektralbereich) wurde in Abhängigkeit von der verwendeten Wellenlänge mit unterschiedlichen Interferenz- bzw. Bandenfiltern reduziert (Schott IF580, IF548, IF484, bzw. BF380).

Hinter dem Eingangsmonochromator wurde ein Teil des einfallenden Lichts mit Hilfe einer Quarzplatte in den Referenzstrahlengang reflektiert. Das übrige Anregungslicht wurde im Fluoreszenzstrahlengang mit einem UV-Glan-Taylor Polarisationsprisma (Spindler & Hoyer) senkrecht zur Tischebene polarisiert und mit einer Linse auf die Probe fokussiert. Die Halterung der Probenküvette wurde über einen eigenen Wasserkreislauf mit einem Umwälzthermostat temperiert. Das Fluoreszenzlicht der Probe wurde über einen Folienpolarisator (Spindler & Hoyer), der als Analysator diente, auf den Hauptdetektor gelenkt. Der Hauptdetektor bestand aus einer kompakten Mikrokanalplatte (Microchannel Plate Photomultiplier Tube MCP-PMT, Hamamatsu R3809U), dessen Kühlgehäuse mit einem integrierten Peltier-Element (Products for Research Inc., Refrigerated Chamber TE104RF) und einem zusätzlichen Wasserkreislauf gekühlt wurde. Zur Unterdrückung von Streuteilen des Anregungslichts im Fluoreszenzstrahlengang wurden hinter dem Analysator Kantenfilter (Schott KV380, GG455, OG475, OG515 bzw. RG610) eingesetzt. Die Wahl des Filters hing von der Emissionswellenlänge der untersuchten Fluoreszenzmarker ab. Die Kantenfilter zeichneten sich gegenüber dem Einsatz eines zweiten Monochromators durch einen höheren Transmissionsgrad und somit einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis aus.

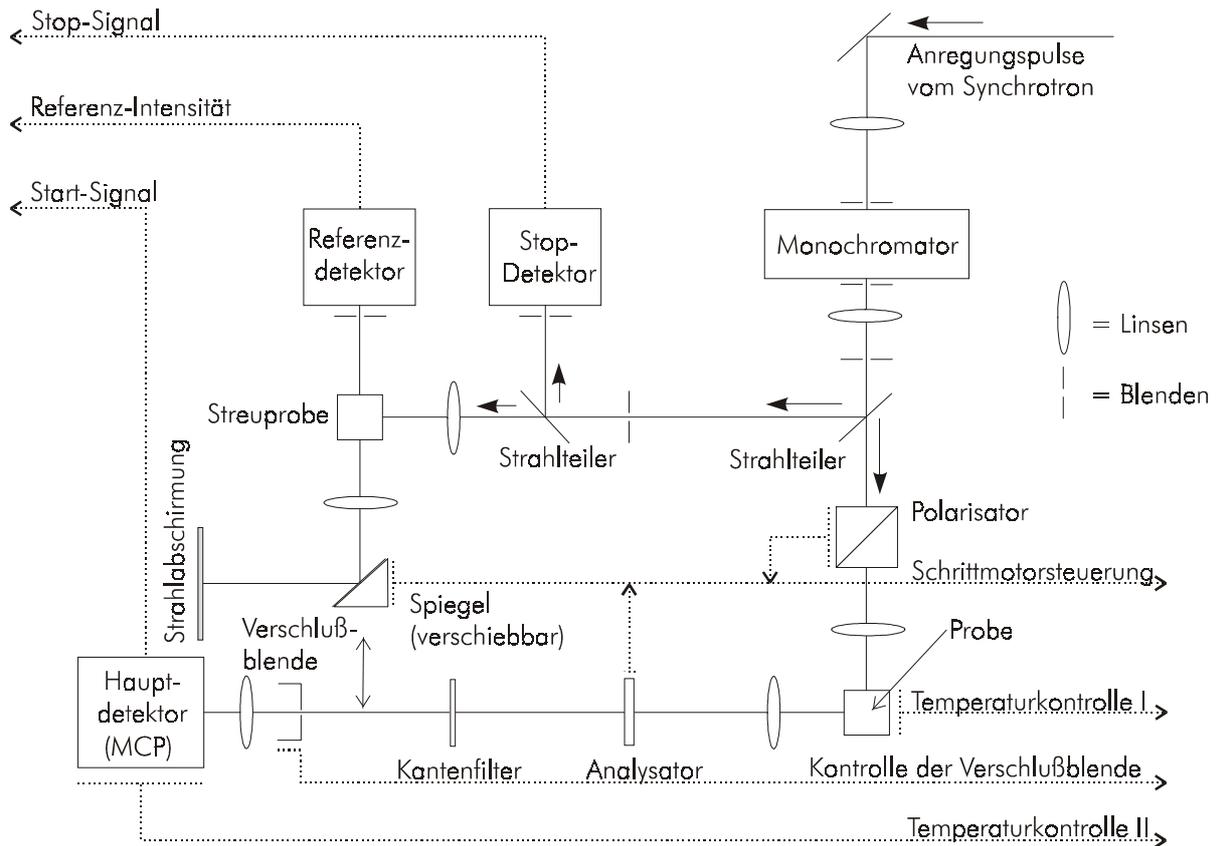


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Meßapparatur zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung nach Gläsel (2000). Hinter dem Eingangsmonochromator wird der Strahlengang geteilt. Ein Teil des Anregungslichts wird linear polarisiert und trifft auf die Probe. Das Fluoreszenzlicht der Probe gelangt durch den Analysator auf den Hauptdetektor. Im Referenzstrahlengang befindet sich eine Streuprobe, wobei deren Streulicht zur Normierung der Lichtintensität und mit Hilfe eines verschiebbaren Spiegels zur Messung des Anregungsprofils verwendet wird. Weiterhin wird das Stop-Signal im Referenzstrahlengang erzeugt. Die gepunkteten Linien kennzeichnen die Steuerungs- und Signalverbindungen. Die nach außen weisenden Pfeile deuten die weiteren Wege der Signalverarbeitung an (vgl. Abbildung 3.5).

Das Ausgangssignal des Hauptdetektors wurde über einen Vorverstärker (EG&G Ortec 9306) an ein schnelles Modul (EG&G Ortec pico-TimingTM Discriminator 9307) weitergeleitet, das die zeitliche Diskriminierung der Signale durchführte. Dabei wurden die in der Amplitude fluktuierenden Eingangssignale in einen Ausgangspuls mit definierter Form und Spannungshöhe umgewandelt. Anschließend wurde das Signal über eine Verzögerungsleitung (EG&G Ortec DB 463) an den Starteingang des Zeit-Amplituden-Konverters (TAC, EG&G Ortec 566) geleitet, der die zeitliche Differenz zwischen diesem Startsignal und dem Signal des Stop-Detektors im Referenzstrahlengang (siehe unten) in ein Spannungssignal übersetzte. Nach Digitalisierung mit Hilfe eines Analog-Digital-Konverters (ADC, Canberra 8715) wurden die Signale von einem Vielkanalanalysator (MCA, Canberra Accuspec B) aufgezeichnet, der als Einschubkarte für den Meßrechner ausgelegt war. Die Bandbreite des Vielkanalanalysators betrug 8192 Kanäle bei 31 Bit pro Kanal.

Im Referenzstrahlengang wurde ein Teil des Referenzlichts mit einer weiteren Quarzplatte auf den Stop-Detektor (Hamamatsu R5600P-01) gelenkt. Das Signal dieses Detektors wurde über einen Vorverstärker (EG&G Ortec 9306) und einen Diskriminator (Oxford Instruments Inc., CFD TC 453) verarbeitet und bildete das Stop-Signal an dem TAC. Diese Konfiguration, bei

der der Anregungspuls das Stop-Signal bildet, wird auch als invertierter Betriebsmodus bezeichnet. Der Stop-Detektor wurde anstelle der Paketmarkierung der Speicherringe ("bunchclock") verwendet, um die beobachtete zeitliche Verschiebung der Anregungspulse zu kompensieren, die bis zu 150 ps betrug.

Das verbleibende Referenzlicht fiel auf eine Streuprobe (Ludox, DuPont Co.). Das Streulicht der Referenzprobe wurde mit einem Referenzdetektor (Hamamatsu R2949) registriert und über einen "Gate and Delay"-Generator (EG&G Ortec 416A) an die nachgeschaltete Zählkarte (Meilhaus ME-15) weitergeleitet. Dieser Teil der Apparatur diente zur Normierung der Lichtintensität. Ein Teil des Streulichts wurde zusätzlich über einen verschiebbaren Spiegel auf den Hauptdetektor geleitet. Eine Abdeckung auf der Rückseite des Spiegels blockierte während der Detektion des Referenzlichts am Hauptdetektor den Fluoreszenzstrahlengang. Auf diese Weise konnte über den Referenzstrahlengang das Anregungsprofil des Systems $L(t)$ gemessen werden, das auch als "impulse response function" (IRF) bezeichnet wird.

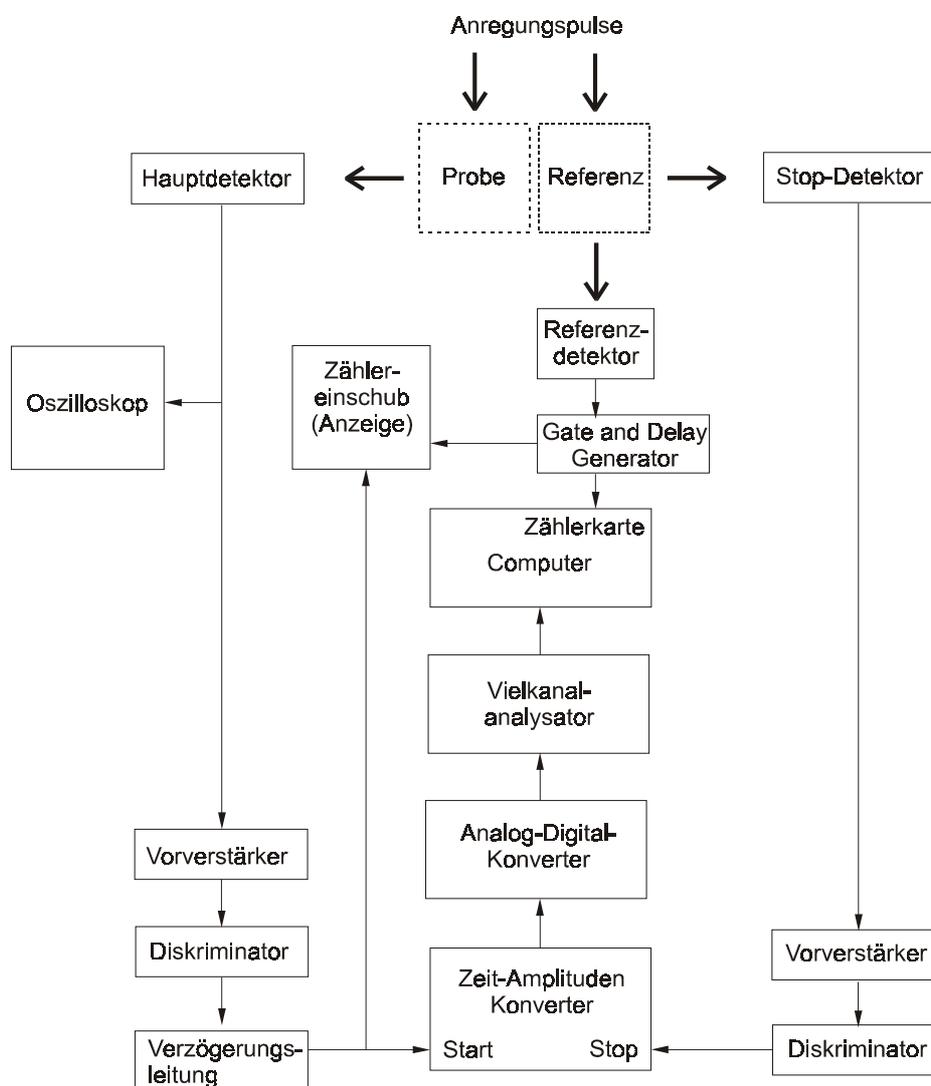


Abbildung 3.5: Vereinfachtes Blockschaltbild der Meßelektronik nach Gläsel (2000). Die Apparatur wurde im invertierten Modus betrieben: Ein von der Probe emittiertes Photon erzeugt hierbei das Start-Signal, der Anregungspuls über den Referenzstrahlengang das Stop-Signal (vgl. Abbildung 3.4). Während der Messung konnten die aktuellen Zählraten und die Form des Anregungspulses mit einem Oszilloskop und einem Zählereinschub ständig kontrolliert werden.

Die Verschiebung des Spiegels zwischen Referenz- und Fluoreszenzstrahlengang sowie die Drehung der Polarisatoren wurden mit Schrittmotoren automatisiert, die über ein externes Modul (Conrad SMC 800) von dem Meßrechner aus gesteuert wurden. Während der Messung konnten die aktuellen Zählraten des Haupt- und Referenzdetektors über einen Zählereinschub (Tennelec/Nucleus Inc., Dual Counter/Timer TC512) kontrolliert werden.

Die Spezifikationen der einzelnen elektronischen und optischen Komponenten sowie die Regelung der Spannungsversorgung der Detektoren werden bei Gläsel (2000) ausführlich diskutiert. Die maximale Zeitauflösung der Meßelektronik lag bei 5 ps/Kanal. Die Messungen wurden typischerweise mit einer Auflösung von 20-25 ps/Kanal bei einer Gesamtbreite von 1024 Kanälen durchgeführt. Dies entspricht einem Meßbereich von ca. 0-20 ns. Die spektrale Empfindlichkeit der Apparatur ermöglichte Messungen in einem Wellenlängenbereich zwischen 290-800 nm.

3.7.3 Durchführung der Messungen

Ein einzelner Meßzyklus bestand aus der Aufnahme der Fluoreszenzintensitäten $I_{\parallel}(t)$, $I_{\perp}(t)$ und des Anregungsprofils $L(t)$, wobei $I_{\parallel}(t)$ und $I_{\perp}(t)$ den Intensitäten bei einer parallelen bzw. senkrechten Stellung des Analysators in Bezug auf die vertikale Stellung des Eingangspolarisators entsprechen. Die Meßdauer pro Zyklus betrug ca. 3 min. Die Summation mehrerer Zyklen ergab dann die akkumulierte Zeitspur der Fluoreszenzdepolarisation bzw. Fluoreszenzanisotropie $r(t)$. Die Zählraten lagen typischerweise im Bereich von 10^3 - 10^4 cps (counts per second). Die Anzahl der Meßzyklen hing von der Konzentration der Fluorophore und deren Quantenausbeute bzw. Emissionskoeffizienten ab. In der Regel wurden 10^5 - 10^6 Zählereignisse im Maximum der Fluoreszenzdepolarisationskurve registriert, um eine ausreichende Statistik zu gewährleisten, was einer Meßzeit von durchschnittlich 30-45 min entsprach.

Eine Voraussetzung für eine korrekte Datenauswertung war die Bestimmung des G-Faktors. Dieser Faktor entspricht dem Verhältnis der Empfindlichkeiten der Apparatur für parallel bzw. senkrecht polarisiertes Licht und geht nach

$$(Gl. 3.12) \quad r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - G \cdot I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2G \cdot I_{\perp}(t)}$$

in die Bestimmung der Fluoreszenzanisotropie ein. Der G-Faktor wurde bei einer horizontalen Stellung des Eingangspolarisators aus dem Verhältnis von $I_{\parallel}(t)$ und $I_{\perp}(t)$ bestimmt, das bei dieser Konfiguration theoretisch einen Wert von 1 haben sollte. Der Wert des G-Faktors lag typischerweise im Bereich von $1,00$ - $1,05 \pm 0,003$.

Die Messungen an ROS-Membranen wurden in 10 mM MES-Puffer pH 6, 150 mM NaCl bei 15 °C durchgeführt. Die Standardbedingungen für die Messungen von Rhodopsin in OG-Mizellen waren 10 mM MES-Puffer pH 6, 150 mM NaCl und 30 mM OG bei ebenfalls 15 °C, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten. Die Konzentration der markierten Proben betrug 0,5-4 μ M in Abhängigkeit von der Markierungsstöchiometrie und der Quantenausbeute der verschiedenen Fluoreszenzmarker. Zur Messung der Fluoreszenzdepolarisation von Rhodopsinproben im MII-Intermediat wurden die Proben 2 min bei 5 °C mit einer Kaltlichtlampe (Schott KL1500, Kantenfilter OG515) gebleicht und unmittelbar darauf die Messung gestartet. Zum direkten Vergleich hierzu wurden Referenzmessungen im Grundzustand bei 5 °C durchgeführt.

3.7.4 Datenauswertung

Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität bzw. der Fluoreszenzanisotropie wurden mit zwei unterschiedlichen Algorithmen analysiert. Ein Verfahren basierte auf der Levenberg-Marquardt-Methode (Johnson, 1994) und ermöglichte eine Anpassung von maximal fünf Exponentialtermen. Das zweite Programm beruhte auf einer Evolutionsstrategie (Rosenhagen, 1994) und bot die Möglichkeit der Anpassung mit drei Exponentialtermen. Zusätzlich konnten hier die Anfangs- und/oder Endanisotropie festgehalten werden. Die Anpassung der Meßdaten erfolgte als iterative Faltung einer Modellfunktion (der Summe von Exponentialtermen) mit dem Anregungsprofil $L(t)$. Die Variation der zu bestimmenden Parameter der Modellfunktion wurde nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt, bei der die Qualität der Anpassung durch Minimierung des Parameters

$$(Gl. 3.13) \quad \chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_{fit}(t_k)]^2$$

verbessert wird (Johnson, 1994). Hierbei wird über n Datenpunkte summiert, die der Anzahl der Meßkanäle des Vielkanalanalysators entsprechen. $N(t_k)$ und $N_{fit}(t_k)$ stehen für die Anzahl der registrierten Zählereignisse bzw. den berechneten Wert im k -ten Kanal. Für die Poisson-Statistik der Zählereignisse ist die Standardabweichung σ_k durch die Quadratwurzel der Anzahl der Ereignisse $\sqrt{N(t_k)}$ gegeben, so daß gilt:

$$(Gl. 3.14) \quad \chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_{fit}(t_k)]^2}{N(t_k)} .$$

Da gewöhnlich die Abhängigkeit von der Anzahl der Datenpunkte nicht erwünscht ist, wird statt dessen die reduzierte Größe

$$(Gl. 3.15) \quad \chi_R^2 = \frac{\chi^2}{n - p - 1}$$

verwendet. Der Nenner beschreibt hier die Anzahl der Freiheitsgrade, die sich aus n Datenpunkten und p freien Anpassungsparametern zusammensetzen. Als weiteres Kriterium für die Güte der Anpassung wurden die gewichteten Residuen verwendet, die wie folgt definiert sind:

$$(Gl. 3.16) \quad R(t_k)_{gew.} = \frac{N(t_k) - N_{fit}(t_k)}{\sqrt{N(t_k)}} .$$

Die gewichteten Residuen zeigen eine gleichförmige Verteilung, wenn die Abweichungen lediglich von zufälligen Fehlern und nicht von systematischen Meßfehlern verursacht werden.