

4 Lokalisierung von Aminosäureseitenketten mittels Röntgendiffraktion

4.1 Einführung

Die Herstellung geeigneter 3D-Kristalle zur Untersuchung der Struktur integraler Membranproteine ist nach wie vor ein großes Problem. 2D-Kristalle integraler Membranproteine können dagegen häufig leichter erhalten werden und ermöglichen in Kombination mit hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie, Elektronenkristallographie und computergestützter Bildverarbeitung eine Strukturbestimmung bei niedriger Auflösung (z. B. Schertler et al., 1993; Havelka et al., 1995; Krebs et al., 1998; Zhang et al. 1998; Auer et al., 1998), in einigen Fällen sogar bis hin zur atomaren Auflösung (z.B. Grigorieff et al., 1996; Kühlbrandt et al., 1994; Nogales et al., 1998). Daher stellt die 2D-Kristallisation eine wichtige alternative Methode zur Strukturuntersuchung dieser biologisch äußerst bedeutungsvollen Proteine dar.

Unter einem 2D-Kristall versteht man die regelmäßige Anordnung von Molekülen in zwei Raumrichtungen. Wie native biologische Membranen können 2D-Kristalle von integralen Membranproteinen als eine Lipiddoppelschicht mit einem sehr hohen, geordneten Proteingehalt angesehen werden. Daher dominieren bei der Ausbildung der 2D-Kristalle die Wechselwirkungen der hydrophoben Transmembranregion, wobei Lipide die Räume zwischen den Proteinmolekülen besetzen. Die größten Erfolge bei der 2D-Kristallisation konnten bislang mit Rekonstitution der Membranproteine und anschließender Detergensextraktion mittels Dialysetechniken erzielt werden. Das Ziel der Rekonstitutionsexperimente ist dabei die Erzeugung von großen Lipiddoppelschichten mit einem möglichst hohen Proteingehalt. Die Ausbildung geordneter Proteingitter kann dabei spontan erfolgen oder durch Reduktion des Lipid- bzw. Detergensanteils induziert werden.

4.2 Zielsetzung und experimentelle Strategie

Die 2D-Kristallisation von Rhodopsin ermöglichte erstmals die Bestimmung der Struktur der Transmembranregion eines G-Protein gekoppelten Rezeptors bei niedriger Auflösung (Schertler et al., 1993; Unger und Schertler, 1995; Schertler und Hargrave, 1995; Unger et al., 1997, Krebs et al., 1998). Die Struktur der an der Aktivierung des visuellen G-Proteins Transducin beteiligten cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins konnte bislang allerdings noch nicht aufgeklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Position einzelner Aminosäureseitenketten in der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins mittels Röntgendiffraktion an 2D-Kristallen bestimmt werden. Hierzu sollten die nativen cytoplasmatischen Cysteinreste C140 und C316 mit Schweratommarkern derivatisiert und die Position der Marker mit Röntgendiffraktion an multilamellaren Filmen von 2D-Kristallen bestimmt werden. Die experimentelle Strategie wird im folgenden ausführlich erläutert.

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß die cytoplasmatischen Cysteinreste C140 und C316 in Rhodopsin im Dunkeln für verschiedenartige sulfhydrylspezifische Reagenzien zugänglich sind, während die Cysteinreste der extrazellulären Seite bzw. der Membranregion in der Regel erst nach Belichtung oder unter sehr viel aggressiveren Reaktionsbedingungen umgesetzt werden können (De Grip et al., 1975; Chen und Hubbell, 1978; De Grip und Daemen, 1982). Dies eröffnet die Möglichkeit, C140 und C316 selektiv mit sulfhydrylspezifischen Schweratommarkern zu derivatisieren. Ein geeignetes Reagenz hierfür ist p-Chlormercuribenzoat (PCMB), das in der Proteinkristallographie bereits mehrfach zur Darstellung von Schweratomderivaten verwendet wurde (Perutz et al., 1968; Drenth et al., 1968).

In Röntgenbeugungsexperimenten weisen Schweratome wie z.B. Quecksilber gegenüber den in Proteinen überwiegend vorkommenden Atomen - Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff,

Sauerstoff sowie die Schwefelatome der Aminosäuren Cystein und Methionin - eine deutlich höhere Streukraft auf. Bei spezifischer Markierung einer Aminosäure addiert sich der Strukturfaktor des Schweratoms zu dem des Proteins, so daß sich der resultierende Strukturfaktor deutlich von dem des nativen Proteins unterscheidet. Die Strukturfaktoränderungen zwischen markierter und nicht markierter Probe erlauben somit die Bestimmung der Markerposition in der Elementarzelle mittels Fourier-Differenzverfahren (siehe Abschnitt 2.1.4). Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Methode ist, daß sich die Gesamtstruktur des Proteins sowie die Gitterkonstanten durch das Einbringen des Markers nur geringfügig ändern (Isomorphie).

In einem Röntgendiffraktionsexperiment sind prinzipiell nur die Intensitäten der Beugungsreflexe direkt zugänglich. Zur Auswertung der Diffraktionsdaten wird jedoch zusätzlich die Phaseninformation benötigt. Plöhn und Büldt (1986) konnten jedoch zeigen, daß die Atomformfaktoren für Elektronen und Röntgenquanten in guter Näherung übereinstimmen. Die Verwendung der Phasen aus der Elektronenmikroskopie ist daher zur Auswertung von Röntgendiffraktionsexperimenten unter der Voraussetzung zulässig, daß beide Methoden auf den gleichen Gittertyp angewendet werden. Deshalb basierten die Kristallisationsexperimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf den Rekonstitutions- und Dialyseverfahren, die für Strukturuntersuchungen von Rinderrhodopsin mittels Kryoelektronenmikroskopie entwickelt wurden (Schertler et al., 1993; Krebs et al., 1998). Während für elektronenmikroskopische Verfahren einzelne kristalline Membranfragmente als Untersuchungsobjekt völlig ausreichend sind, werden für die hier durchgeführten Röntgendiffraktionsexperimente homogene Präparationen von 2D-Kristallen im mg-Bereich benötigt, die zusätzlich zur Ausbildung von multilamellaren Stapeln geeignet sein müssen.

Das primäre Ziel der Kristallisationsexperimente war daher die Weiterentwicklung der bekannten Rekonstitutions- und Dialyseverfahren, wobei die Anforderungen an das Kristallisationsverfahren wie folgt zusammengefaßt werden können:

- Das Verfahren sollte die Herstellung kristalliner Proben im mg-Bereich ermöglichen.
- Die Proben sollten homogen sein, d.h. der Anteil an nicht kristallinem Material sollte niedrig sein.
- Es sollten Gitter der Raumgruppe $p2_12_1$ erhalten werden, um die Phasen aus der Elektronenmikroskopie verwenden zu können (anderenfalls hätten die Phasen neu bestimmt werden müssen). Die Gitterkonstanten sollten in dem Bereich der von Krebs et al. (1998) beschriebenen 2D-Kristalle liegen.
- Die cytoplasmatischen Aminosäuren C140 bzw. C316 sollten in 2D-Kristallen für den Schweratommarker PCMB zugänglich sein.
- Die kristallinen Proben sollten die Herstellung geordneter multilamellarer Filme ermöglichen.
- Das Kristallisationsverfahren sollte auf Grund des hohen Materialverbrauchs reproduzierbar sein.

Die Eignung der Methode des isomorphen Ersatzes zur Lokalisierung einzelner Aminosäuren in den Loopbereichen eines Membranproteins mittels Röntgendiffraktion an multilamellaren Stapeln von 2D-Kristallen konnte bereits am Beispiel des Bacteriorhodopsins (bR) gezeigt werden (Krebs et al., 1993; Behrens et al., 1998a). Hierbei handelt es sich um die lichtgetriebene Protonenpumpe des *Halobacterium salinarium* (Oesterhelt, 1976). Das Protein verfügt wie Rhodopsin über einen kovalent gebundenen Retinalchromophor und ist mit sieben Transmembranhelices in der Membran verankert, obwohl es weder funktionell noch entwicklungs geschichtlich mit Rhodopsin oder einem anderen G-Protein gekoppelten Rezeptor verwandt ist. Das bR bildet bereits in seiner nativen Membranumgebung, der sogenannten Purpurmembra n, ein zweidimensionales Kristallgitter ($p3$ -Symmetrie, $d = 62,4 \text{ \AA}$). Daher

konnte die Struktur von bR mit Elektronendiffraktionsmethoden und elektronenmikroskopischen Techniken untersucht werden (Henderson und Unwin, 1975; Henderson et al., 1986; Henderson et al., 1990; Grigorieff et al., 1996; Kimura et al., 1997). Erst kürzlich gelang die Herstellung dreidimensionaler bR-Kristalle in verschiedenen Laboratorien, so daß jetzt eine Vielzahl von Strukturdaten bei einer Auflösung im Bereich von 2 Å vorliegt (Pebay-Peyroula et al., 1997; Luecke et al., 1998; Essen et al., 1998).

Die Lage des Retinals sowie die Struktur der interhelikalen Loopbereiche blieben allerdings auf Grund der begrenzten Auflösung lange Zeit unklar. Unter Verwendung der Phasen aus der Elektronenmikroskopie konnten bei niedriger Auflösung wertvolle Strukturdetails mit einer Reihe von Differenzdiffraktionsmethoden gewonnen werden. Mit Hilfe von Schweratomderivaten von Cysteinmutanten wurden beispielsweise die Positionen einzelner Aminosäureseitenketten in den Loopbereichen von bR ermittelt (Krebs et al., 1993; Behrens et al., 1998a). Die Verteilung der Schwefelatome der Aminosäuren Methionin und Cystein in Wildtyp-bR wurde unter Ausnutzung der anormalen Dispersion bei unterschiedlichen Wellenlängen bestimmt (Behrens et al., 1998b). Zusätzlich konnte die Lage des Retinalchromophors in Projektion auf die Membranebene mit Neutronenstreuexperimenten unter Verwendung deuterierter Retinale ermittelt werden (Seiff et al., 1985; Hauss et al., 1990).

Diese Arbeiten belegen eindrucksvoll, daß mit Hilfe von Differenzdiffraktionsmethoden bei niedriger Auflösung wertvolle Strukturinformationen erhalten werden können, die aus der Proteinstruktur alleine bei dieser Auflösung noch nicht zugänglich sind. Mit nativen bR-Kristallen stand somit für die Untersuchungen an Rhodopsinkristallen im Rahmen dieser Arbeit ein Referenzsystem zur Verfügung, mit dem einerseits apparative Fehler minimiert und andererseits die Qualität der Rhodopsinmessungen beurteilt werden konnten.

4.3 Kristallisationsexperimente und elektronenmikroskopische Charakterisierung der Proben

4.3.1 Reinigung von Rhodopsin für die Kristallisation

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Rhodopsin wurden Augen von frisch geschlachteten Rindern oder tiefgekühlte Netzhäute verwendet. Zunächst wurden ROS-Membranen nach einer Standardmethode von Papermaster und Dreyer (1974) mit Modifikationen nach McDowell und Kühn (1977) isoliert und über einen Saccharosedichtegradienten gereinigt. Die Rhodopsinkonzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt. Die Ausbeute lag typischerweise bei ca. 0,7-0,8 mg Rhodopsin pro Netzhaut. Das Absorptionsverhältnis zwischen dem Proteinpeak bei $\lambda = 280$ nm und dem Retinalpeak bei $\lambda = 500$ nm wies für Präparationen aus frischen Rinderaugen einen Wert von 2,1-2,3 auf, das Verhältnis für Präparationen aus tiefgekühlten Retinae der Firma W. L. Lawson (Nebraska, USA) lag zwischen 2,3 und 2,6. Die gelelektrophoretische Analyse ergab eine Proteinzusammensetzung von >90 % Rhodopsin und die typischen Spuren anderer Proteine der visuellen Signalkaskade (Transducin, Phosphodiesterase, Arrestin).

Zur weiteren Reinigung von Rhodopsin wurden die ROS-Membranen nach Krebs et al. (1998) in 1 % LDAO solubilisiert und mittels ConA-Affinitätschromatographie gereinigt. Alle Reinigungsschritte (Säulengröße, Flußgeschwindigkeit, Verweildauer auf der Säule, etc.) wurden weitgehend standardisiert. Nach der Reinigung lag das Absorptionsverhältnis $A_{280\text{ nm}}/A_{500\text{ nm}}$ zwischen 1,65 und 1,8 unabhängig vom Ausgangsmaterial, was einem sehr hohen Reinheitsgrad entspricht (De Grip, 1982). Dementsprechend konnten mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese neben Rhodopsin keine weiteren Proteinbestandteile mehr nachgewiesen werden.

4.3.2 Kristallisationsexperimente

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kristallisationsexperimente basierten auf dem bei Krebs et al. (1998) beschriebenen Verfahren, wobei die Kristallbildung durch Dialyse des solubilisierten Rhodopsins gegen 20 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 3 mM NaN₃ (im folgenden als Standarddialysepuffer bezeichnet) unter Zugabe von 2 mM DTT induziert wird. Nach 11 Tagen Dialyse bei 18 °C wurden hierbei bevorzugt tubuläre 2D-Kristalle und in geringerem Maße kristalline Membranfragmente erhalten, die einen relativ hohen Anteil an Proteinaggregaten aufwiesen (vgl. Abbildung 4.2 B). In Abbildung 4.1 ist ein typisches Absorptionsspektrum einer Suspension von Rhodopsinkristallen dargestellt. Das Spektrum zeigt die charakteristischen Merkmale einer Rhodopsinprobe im Grundzustand. Der Retinalpeak mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 498$ nm belegt, daß der Chromophor des Rhodopsins in der 11-cis-Konfiguration vorliegt.

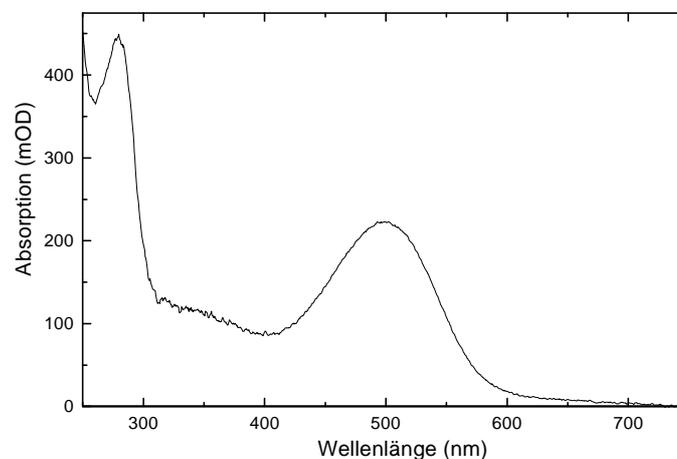


Abbildung 4.1: Absorptionsspektrum einer Suspension von Rhodopsinkristallen, die nach Dialyse gegen Standarddialysepuffer unter Zugabe von 2 mM DTT erhalten wurden. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte in 20 mM HEPES pH 7,0, 150 mM NaCl und 10 mM MgCl₂.

Ausgehend von diesen Standardbedingungen wurden zahlreiche Modifikationen durchgeführt, die hier nicht im Detail dargestellt werden können. Im folgenden wird statt dessen eine Auswahl von Parametern diskutiert, deren Variation zu einer systematischen Verbesserung der Probenqualität führte. Die Beschaffenheit der Proben wurde mit Hilfe von Übersichtsbildern charakterisiert, die nach Negativkontrastierung mit 1 % (w/v) Uranylacetat bei ca. 4000x Vergrößerung aufgenommen wurden. Der gewählte Bildausschnitt entsprach ungefähr der Größe einer Masche der Trägernetze. Ziel der Aufnahmen war es hierbei allerdings nicht, die besten Bereiche einer Probe abzubilden, sondern vielmehr das typische Erscheinungsbild der gesamten Proben zu dokumentieren. Dabei spielte das durchschnittliche Verhältnis von aggregiertem Material zu Membranfragmenten bzw. tubulären Membranstrukturen eine entscheidende Rolle.

Abbildung 4.2 zeigt Ausschnitte einer Auswahl von Übersichtsbildern repräsentativer Proben. Dichtes Material wie z.B. Proteinaggregate ist für den Elektronenstrahl nicht durchlässig und erscheint auf den Aufnahmen als dunkler Fleck. Membranstrukturen sind nach Negativkontrastierung leicht zu erkennen. Tubuläre Strukturen, die prinzipiell als eine doppelte Lage von Membranen aufgefaßt werden können, erscheinen etwas dunkler als einzelne Membran-

fragmente. Die tubulären Kristalle wiesen in der Regel einen Durchmesser von ca. $0,2\ \mu\text{m}$ und eine Länge von bis zu $3\ \mu\text{m}$ auf. Die Größe der Membranfragmente lag im Bereich von ca. $0,2\text{-}0,3\ \mu\text{m}$ Durchmesser, vereinzelt wurden auch größere Membranfragmente gefunden. Dabei ist allerdings unklar, ob es sich bei den Membranfragmenten lediglich um Bruchstücke von tubulären Kristallen handelt.

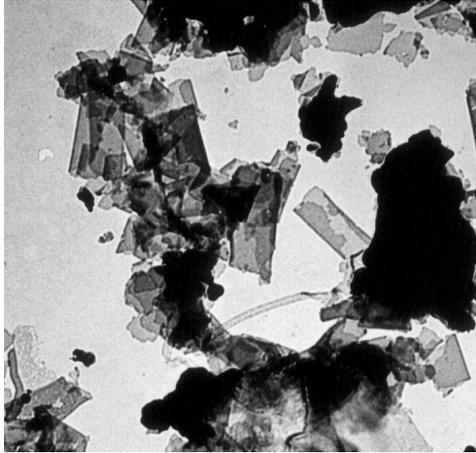
Die Variation der Dialysebedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Dauer der Dialyse führten zu keiner Verbesserung der Präparationen. Die Dialysedauer von 10-11 Tagen stellte bereits ein Optimum in Bezug auf die Ausbildung von Membranstrukturen dar. Mit einer Verkürzung des Dialysezeitraums nahm der Anteil von Membranstrukturen ab, mit längerer Dialyse stieg der Anteil an aggregierten Bestandteilen. Bei tieferen oder höheren pH-Werten des Dialysepuffers wurde eine beschleunigte Aggregation der Proben beobachtet. Eine deutliche Abnahme der Proteinaggregate konnte dagegen durch Erhöhung der Konzentration von Oxidationsschutzmitteln von 1mM DTT über 2mM DTT zu schließlich je 4mM DTT und 4mM Mercaptoethanol erzielt werden (vgl. Abbildung 4.2 A, B und C bzw. Abbildung 4.2 F und G).

Eine weitere Verbesserung brachte der Zusatz von organischen Lösungsmitteln zum Dialysepuffer. In Anwesenheit von $2,5\%$ (v/v) Isopropanol bzw. $2,5\%$ (v/v) (\pm)-2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) kam es zu einer deutlichen Erhöhung des Anteils an Membranstrukturen, wobei wiederum der Anteil an Proteinaggregaten mit steigender Konzentration an DTT und Mercaptoethanol im Dialysepuffer reduziert werden konnte (vgl. Abbildung 4.2 F, G bzw. I). Einen etwas geringeren Effekt hatte die Zugabe von $2,5\%$ (v/v) DMSO (Abbildung 4.2 K) und 5% (v/v) Polyethylenglycol (PEG 400, Daten nicht gezeigt). Bei der Herstellung von 3D-Kristallen integraler Membranproteine wurden bereits mehrfach kleine, in der Regel amphiphile organische Substanzen wie z.B. Heptan-1,2,3-triol erfolgreich eingesetzt, um die Qualität der 3D-Kristalle zu verbessern (Kühlbrandt, 1988). Die Funktion der organischen Moleküle innerhalb des Kristallisationsprozesses ist allerdings unklar. Eine Möglichkeit besteht darin, daß sich die kleinen Moleküle besser als die sperrigen, langkettigen Detergenzmoleküle an die hydrophobe Oberfläche der Membranproteine anpassen können und dadurch Lücken ausfüllen, die sonst zu Unordnungen im Kristall führen würden. Weiterhin wird in der Literatur die Möglichkeit diskutiert, daß die kleinen Moleküle die Deformierbarkeit von Mischmizellen aus organischen Molekülen und Detergenzien erhöhen, wodurch die Bildung des Kristalls erleichtert werden könnte (Garavito et al., 1986).

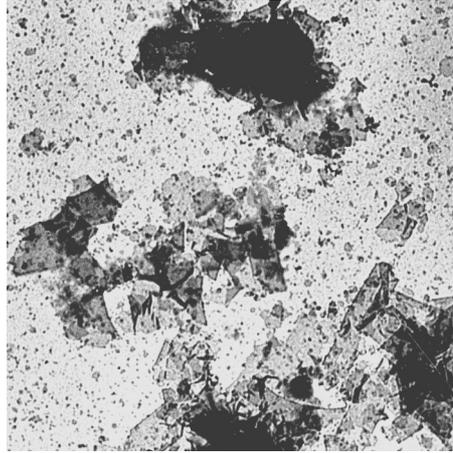
Ein wichtiger Parameter bei der Kristallisation stellt der Grad der Delipidierung während der Proteinreinigung dar. Es stellt sich zusätzlich die Frage, ob möglicherweise spezifische Lipid-Protein-Wechselwirkungen einen Einfluß auf die Kristallisation ausüben. Alle Arbeitsschritte der Isolierung und Reinigung von Rhodopsin wurden unter weitgehend standardisierten Bedingungen durchgeführt. Dennoch führten Präparationen mit unterschiedlichem Ausgangsmaterial unter identischen Kristallisationsbedingungen häufig zu unterschiedlichen Ergebnissen. Dies ist auf die hohe Variabilität des biologischen Ausgangsmaterials zurückzuführen. Die Lipidzusammensetzung der ROS-Membran ist sehr komplex und unterliegt zudem starken natürlichen Schwankungen (siehe Abschnitt 1.3.2).

Albert et al. (1996) postulierten in Rhodopsin eine definierte Bindungsstelle für Cholesterin. Da dies auf einen spezifischen Effekt von Cholesterin auf die Stabilität und/oder Funktion von Rhodopsin hindeutet, wurde der Einfluß von Cholesterin auf die Kristallisation untersucht. Die Zugabe von Cholesterin förderte schon in geringen Mengen ($2:1$ mol/mol Cholesterin/Rhodopsin) die Ausbildung von Membranfragmenten und tubulären Strukturen (vgl. Abbildung 4.2). Weiterhin erhöhte die Gegenwart von Cholesterin die Reproduzierbarkeit der Präparationsergebnisse deutlich.

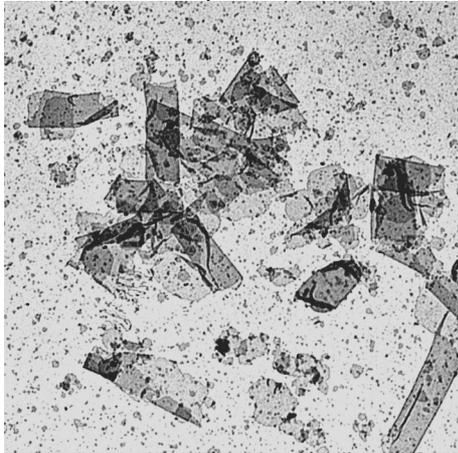
(A) Rhodopsin ohne weitere Lipide, 1 mM DTT



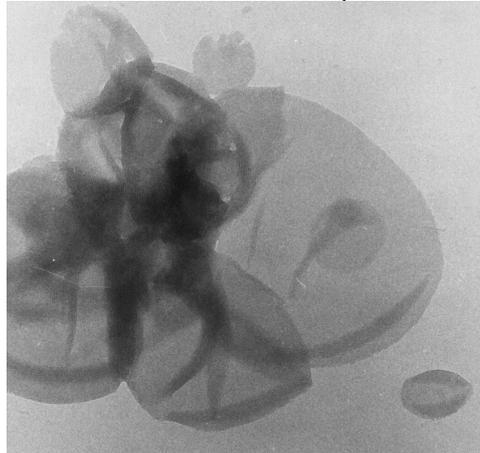
(B) Rhodopsin ohne weitere Lipide, 2 mM DTT



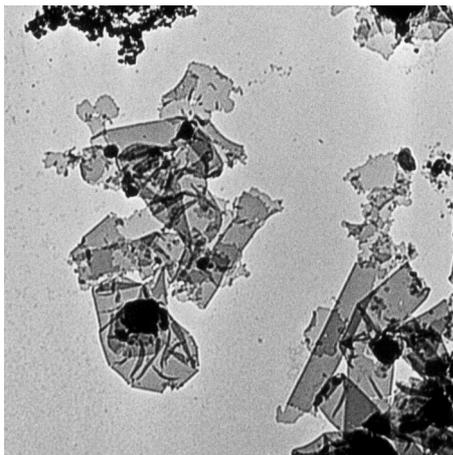
(C) Rhodopsin ohne weitere Lipide, 4 mM DTT und 4 mM Mercaptoethanol



(D) Rhodopsin, 5:1 (mol/mol) ROS-Lipide, 4 mM DTT und 4 mM Mercaptoethanol



(E) Rhodopsin, 2:1 Cholesterin, 2 mM DTT



(F) Rhodopsin, 2:1 Cholesterin, 2,5 % (v/v) Isopropanol, 2 mM DTT

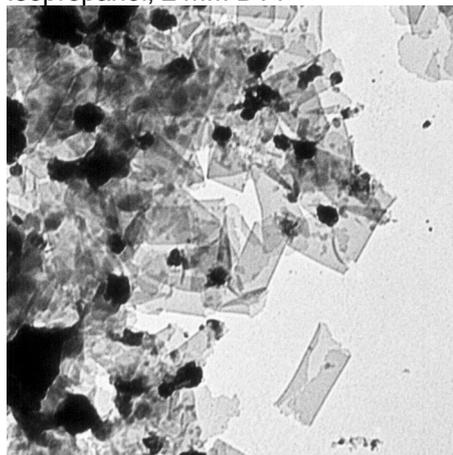
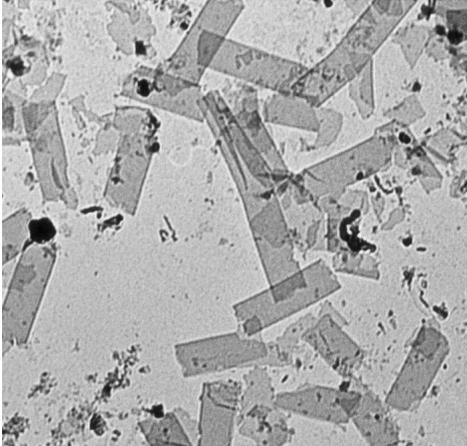
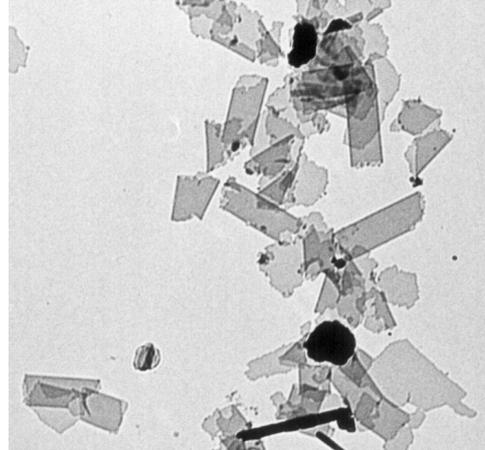


Abbildung 4.2: Elektronenmikroskopische Übersichtsbilder einiger charakteristischer kristalliner Proben. Die Aufnahmen erfolgten nach Negativkontrastierung mit 1 % (w/v) Uranylacetat bei ca. 4000x Vergrößerung. Die Angaben zu den jeweiligen Proben beziehen sich auf die Verwendung zusätzlicher Lipide bzw. Zusätze zum Standarddialysepuffer. Die leichte Variation des Abbildungsmaßstabs ist durch die unterschiedliche fotografische Reproduktion bedingt. Mit Ausnahme der Aufnahme D entspricht 1 cm in der Abbildung einer Länge 0,5 μm . In Aufnahme D entspricht 1 cm einer Länge von ca. 0,2 μm .

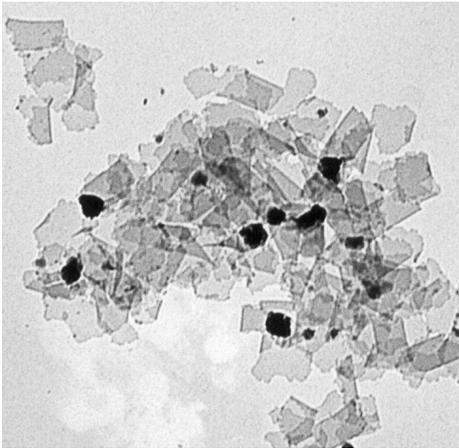
(G) Rhodopsin, 2:1 Cholesterin, 2,5 % (v/v) Isopropanol, 4 mM DTT und 4 mM Mercaptoethanol



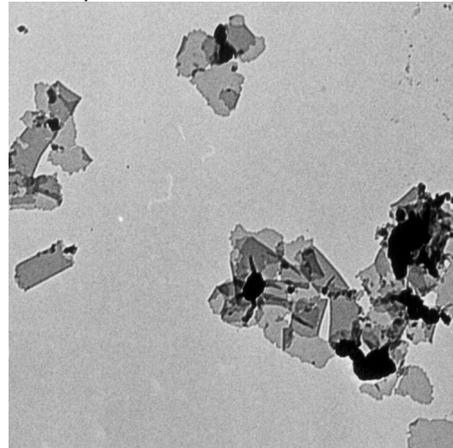
(H) Rhodopsin, PCMB-markiert, 2:1 Cholesterin, 2,5 % (v/v) Isopropanol, 4 mM DTT und 4 mM Mercaptoethanol



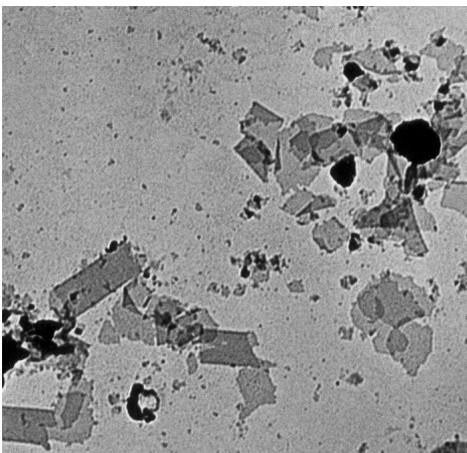
(I) Rhodopsin, 2:1 Cholesterin, 2,5 % (v/v) MPD, 4 mM DTT und 4 mM Mercaptoethanol



(J) Rhodopsin, PCMB-markiert, 2:1 Cholesterin, 2,5 % (v/v) MPD, 4 mM DTT und 4 mM Mercaptoethanol



(K) Rhodopsin, 2:1 Cholesterin, 2,5 % (v/v) DMSO, 4 mM DTT und 4 mM Mercaptoethanol



(L) Rhodopsin, PCMB-markiert, 2:1 Cholesterin, 2,5 % (v/v) DMSO, 4 mM DTT und 4 mM Mercaptoethanol

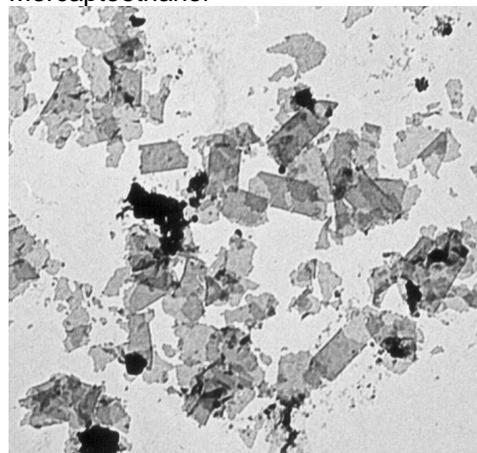


Abbildung 4.2 (Fortsetzung): Elektronenmikroskopische Übersichtsbilder einiger charakteristischer kristalliner Proben

In weiteren Experimenten wurde versucht, auch andere Lipide, die bei der Reinigung möglicherweise entfernt werden könnten, durch Zugabe exogener bzw. endogener Lipide zu ersetzen. Hierzu wurden die nativen Lipide aus ROS-Membranen isoliert. Die Lipidextrakte wiesen einen Anteil von 70-80 % an Phospholipiden in Bezug auf die Trockenmasse der gesamten Lipide auf, was im Bereich der Literaturwerte liegt (Fliesler und Anderson, 1982). Vor der Dialyse wurde das gereinigte Rhodopsin mit Lipiden unterschiedlicher Menge (das molare Verhältnis zwischen den Lipiden und Rhodopsin wurde zwischen 2:1 und 50:1 variiert) und Zusammensetzung rekonstituiert. Neben den nativen Lipiden wurden zusätzlich Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin als exogene Lipide verwendet. Im Verlauf der Dialyse kam es hierbei jedoch bevorzugt zur Ausbildung von Lipid-Protein-Vesikeln. Selbst geringe Mengen nativer Lipide der ROS-Membran (5:1 mol/mol ROS-Lipide:Rhodopsin) verursachten bereits die überwiegende Bildung von Vesikeln (vgl. Abbildung 4.2 D).

Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit früheren Ergebnissen von Schertler et al. (1993) bzw. Unger und Schertler (1995). Dort wurde Rhodopsin in Phosphatidylcholin bei einem Lipid-Protein-Verhältnis von 25:1 (mol/mol) rekonstituiert und wie oben beschrieben dialysiert. Die resultierenden kristallinen Areale befanden sich auf der Oberfläche von Lipid-Protein-Vesikeln und wiesen eine $p22_1$ -Symmetrie auf. Die Qualität dieser zweidimensionalen Rhodopsinkristalle ist jedoch im Vergleich zu den $p22_2$ -Kristallen, die mit der Methode von Krebs et al. (1998) ohne Zusatz von Lipiden erhalten werden, deutlich geringer. Da zudem nicht alle Vesikel kristalline Bereiche enthalten, sind derartige Präparationen wegen des geringen Anteils an kristallinem Material allerdings für Röntgendiffraktionsmessungen nur bedingt geeignet. Zusätzlich stellte sich im Rahmen der hier durchgeführten Experimente heraus, daß mit Proben, die einen hohen Anteil an Vesikeln aufwiesen, keine brauchbaren multilamellaren Filme hergestellt werden konnten (vgl. Abschnitt 4.4.2). Dementsprechend konnten in keinem Experiment, das auf der Rekonstitution von Rhodopsin in Gegenwart von zusätzlichen Lipiden beruhte, brauchbare Röntgendaten erhalten werden.

Der Effekt einzelner Parameter auf die Qualität der 2D-Kristalle ist schwierig zu quantifizieren und theoretisch bislang nur wenig verstanden (Kühlbrandt, 1992; Jap et al., 1992; Schertler, 1999). Die Übersichtsbilder gaben einen Eindruck von der Gesamtbeschaffenheit der Proben insbesondere in Hinblick auf das Auftreten von Membranstrukturen im Verhältnis zu Proteinaggregaten. Die Gitterqualität einzelner 2D-Kristalle wurde in Stichproben mit hochauflösender Elektronenmikroskopie untersucht (siehe Abschnitt 4.3.5). Die Eignung einer kristallinen Präparation für Untersuchungen mit Röntgendiffraktionsmethoden hängt allerdings wesentlich von der Eignung zur Herstellung multilamellarer Filme ab. Die Herstellung dieser Filme erwies sich jedoch als äußerst problematisch (vgl. Abschnitt 4.4.2). Selbst Proben, die unter identischen Kristallisationsbedingungen hergestellt wurden und sich gemäß der elektronenmikroskopischen Übersichtsbilder in ihrem äußeren Erscheinungsbild nur unwesentlich voneinander unterschieden, verhielten sich bei der Herstellung der Filme häufig völlig unterschiedlich. Daher war die Beurteilung der Modifikation einzelner Kristallisationsparameter sehr schwierig und nur durch mehrmalige Wiederholung desselben Experiments möglich.

4.3.3 PCMB-Markierung von 2D-Kristallen

Die Schweratommarkierung von 2D-Kristallen erfolgte nach Boyer (1954) in Gegenwart eines 10-fachen Überschusses an PCMB. Abbildung 4.3 zeigt die typischen Absorptionsspektren einer kristallinen Probe vor bzw. nach der Reaktion mit PCMB. Nach 6 h Reaktionszeit wurde in der Regel eine Markierungsstöchiometrie von 1,6-2,1 Molekülen MB pro Molekül Rhodopsin erzielt. Innerhalb dieser Zeitspanne konnte keine Absorptionsänderung im Bereich des Retinalpeaks bei $\lambda = 500$ nm festgestellt werden. Eine längere

Reaktionszeit führte dagegen häufig zu einer Abnahme der Retinalabsorption, was auf eine beginnende Denaturierung des Proteins hindeutet.

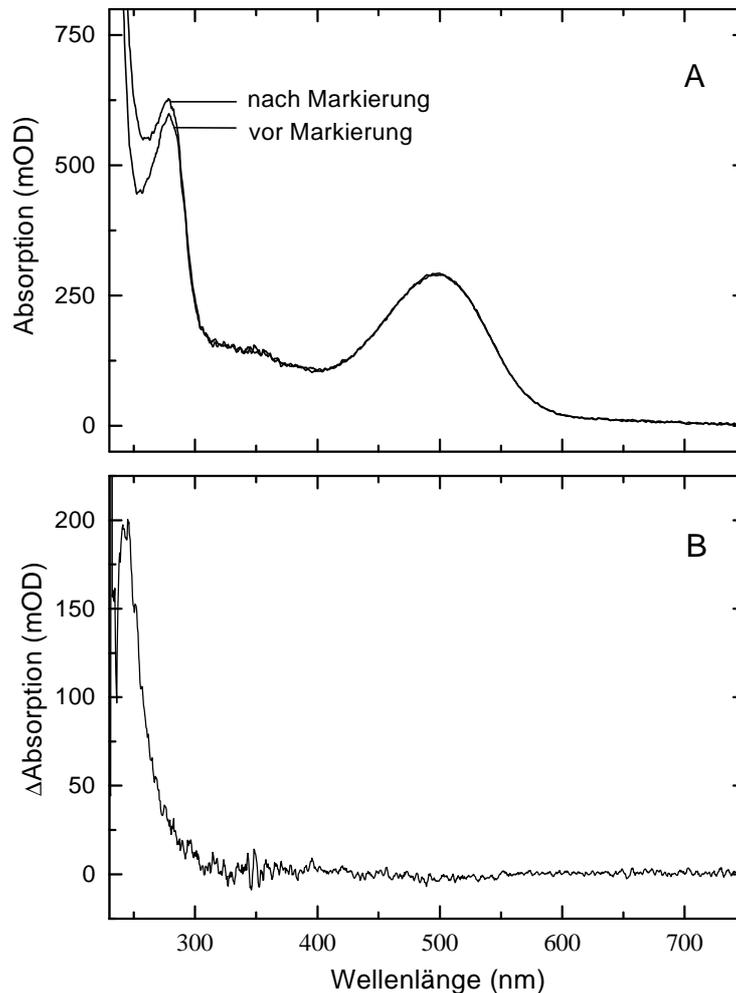


Abbildung 4.3: PCMB-Markierung von Rhodopsinkristallen (Probe K12-2). A: Absorptionsspektren der markierten und nicht markierten Probe. B: Differenzspektrum. Die Absorptionsdifferenz von 196 mOD bei $\lambda = 240$ nm entspricht einer Markierungsstöchiometrie von 1,65 Molekülen MB pro Rhodopsin.

4.3.4 Elektronendiffraktion

Die Qualität der 2D-Kristalle verschiedener Präparationen wurde mittels Elektronendiffraktion überprüft. Elektronendiffraktogramme wurden sowohl von tubulären Kristallen als auch von Membranfragmenten erhalten. Ein typisches Beugungsbild ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Bereits ohne Untergrundkorrektur sind Beugungsreflexe bis zu einer Auflösung von 10 Å deutlich zu erkennen. Die Aufnahme von Elektronendiffraktogrammen erfordert im Vergleich zur computergestützten Bildverarbeitung von kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen größere 2D-Kristalle bzw. deutlich besser geordnete Gitter. Daher belegen selbst Elektronendiffraktogramme mit niedriger Auflösung eine relativ hohe Gitterqualität und können als Kriterium für die Verbesserung einer Kristallisationsmethode herangezogen werden (Krebs et al., 1998). Mit der Aufnahme von Elektronendiffraktogrammen konnte somit gezeigt werden, daß die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Präparationen hochgeordnete 2D-Gitter enthielten. Das Hauptziel der Arbeit lag jedoch auf der Herstellung homogener Präparationen. Die Analyse der Kristalle mittels Elektronendiffraktion an

Einzelkristallen lässt daher nur bedingt Rückschlüsse auf die Eignung der Proben für Röntgendiffraktionsexperimente an multilamellaren Filmen zu.

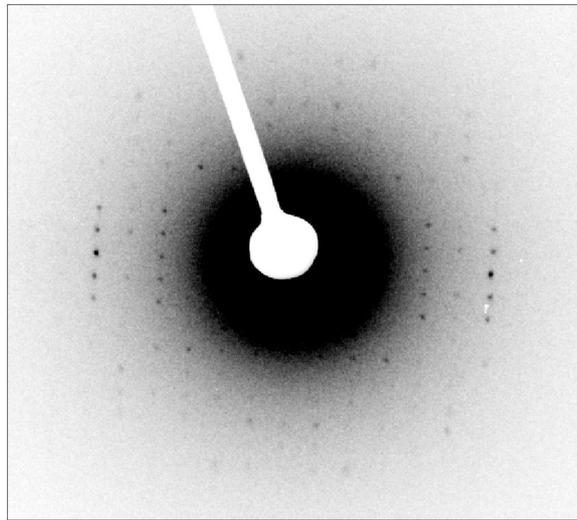


Abbildung 4.4: Elektronendiffraktogramm eines 2D-Kristalls von Rhodopsin. Beugungsreflexe im Auflösungsbereich von 10 Å sind ohne Untergrundkorrektur deutlich zu erkennen. Dialysebedingungen: 2:1 Cholesterin/Rhodopsin, Standarddialysepuffer mit 2 mM DTT und 2 mM Mercaptoethanol.

4.3.5 Charakterisierung der kristallinen Proben mittels hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie

Die Charakterisierung der Gitterqualität mittels “low-dose“-Kryoelektronenmikroskopie und computergestützter Bildverarbeitung erfolgte nach Krebs et al. (1998). Die Negative wurden mit optischer Diffraction analysiert und geeignete Areale digitalisiert. Zur Bestimmung der Gitterparameter wurden durchschnittlich 50 deutlich erkennbare Reflexe in der Fourier-Transformation eines Rohbilds indiziert. Aufnahmen von tubulären Kristallen zeigten häufig zwei überlagerte Gitter mit einem Winkel von ca. 5-15° zwischen den Gitterachsen. In einigen Fällen konnten beide Gitter getrennt indiziert und bearbeitet werden.

Alle untersuchten Gitter wiesen eine orthorhombische Symmetrie auf. Die Gitterkonstanten von Kristallen unterschiedlicher Präparationen variierten zwischen $a = 59,1\text{-}62,4 \text{ \AA}$ und $b = 83,2\text{-}90,7 \text{ \AA}$. Die Mittelwerte nach Analyse von 43 Bildern lagen bei $a = 61,1 \pm 0,9 \text{ \AA}$ bzw. $b = 87 \pm 2,5 \text{ \AA}$ (die Fehlerangaben repräsentieren die Standardabweichung). Das Verhältnis b/a wies mit $1,42 \pm 0,03$ unabhängig von der Art der Präparation einen sehr konstanten Wert auf. Der Winkel zwischen a und b betrug $90 \pm 0,4^\circ$. Diese Werte stimmen mit den von Krebs et al. (1998) beschriebenen Gitterparametern orthorhombischer Rhodopsinkristalle der Raumgruppe $p2_212_1$ gut überein. Die Analyse der Aufnahmen von MB-markierten Proben ergab keine Abweichung der Gitterparameter innerhalb der beobachteten Schwankungen. Somit führte die Schweratomderivatisierung nicht zu einer signifikanten Veränderung des Kristallgitters, was eine Grundvoraussetzung für die Bestimmung der Markerposition mittels Differenzdiffraktionsverfahren darstellt.

Die einzelnen Schritte der Bildverarbeitung werden im folgenden am Beispiel des Bildes 17332 erläutert. Das Bild wurde von einem relativ großen Membranfragment aufgenommen und zeigte die höchste Auflösung von allen untersuchten Bildern. Bei der Probe handelte es sich um eine Präparation, die unter Zugabe von 2:1 (mol/mol) Cholesterin:Rhodopsin und Dialyse gegen Standarddialysepuffer in Gegenwart von je 4 mM DTT und Mercaptoethanol

hergestellt worden war. Die Daten repräsentativer Aufnahmen weiterer Proben sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

An dieser Stelle muß jedoch ausdrücklich betont werden, daß es sich hierbei um Aufnahmen einzelner 2D-Kristalle handelt. Die Daten lassen daher keinen unmittelbaren Rückschluß auf die Gesamtqualität der Präparationen zu. Der Informationsgehalt der kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen hängt neben der Qualität der abgebildeten Kristalle auch ganz entscheidend von der Aufnahmequalität der einzelnen Bilder ab und wird von einer Reihe von Parametern wie z.B. der Dicke der vitrifizierten Eisschicht, dem Probentransfer unter Kryobedingungen in das Mikroskop, Defokussierung, Astigmatismus und Drift während der Aufnahme, etc. bestimmt. Zum Vergleich unterschiedlicher Proben wäre daher jeweils die Aufnahme und Auswertung einer statistisch signifikanten Anzahl von Bildern erforderlich, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

A: Bereich von ∞ -9 Å

7	7	12	10	7	6	8	6	7	8	9	6	8
6	7	9	7	8	9	16	8	7	8	7	7	8
6	9	8	7	10	11	21	9	9	8	7	7	7
7	7	8	8	10	11	14	13	11	9	8	5	7
9	8	15	9	9	16	36	13	11	13	10	8	9
8	10	9	11	20	55	271	39	15	10	8	9	8
13	16	16	22	53	263	1604	177	41	17	14	12	10
8	8	9	11	16	41	205	29	12	10	7	8	7
7	8	8	9	11	14	36	13	9	9	9	8	8
8	7	9	9	10	11	17	9	10	7	7	7	8
9	8	9	8	10	11	23	10	8	8	7	8	8
8	8	8	7	7	11	14	10	9	7	7	8	7
8	7	9	6	7	7	10	9	7	7	9	8	7

B: Bereich von 9-5 Å

8	7	7	8	10	8	7	7	6
7	7	7	8	8	7	7	8	7
9	8	8	8	8	7	7	8	9
7	7	6	9	14	8	7	7	6
7	7	9	16	77	15	7	7	7
7	7	8	9	22	9	7	7	6
7	7	7	8	8	8	8	8	7
7	8	8	8	6	8	7	7	6
7	7	6	7	7	7	7	6	7

C: Bereich von 5-3,5 Å

7	7	7	7	8	7	6	6	7
7	7	7	7	7	6	6	7	7
7	8	7	8	7	7	7	8	7
7	8	7	7	9	8	6	7	8
7	7	7	8	14	9	7	7	7
7	7	7	7	8	8	7	6	7
7	7	7	7	8	8	7	8	7
8	7	7	7	8	7	6	7	7
7	8	7	7	7	6	7	8	7

Abbildung 4.5: Mittlere Peakintensitäten des Bildes 17332 nach Korrektur der Gitterverzerrungen. Die Werte wurden mit dem Programm MMBOXA berechnet und auf einen Untergrundwert von 7 skaliert. Die Intensität im Zentrum der Peaks ist durch Fettdruck hervorgehoben.

Nach Bestimmung der Gitterparameter wurden die Verzerrungen der Gitter mit einer dreistufigen "unbending"-Routine korrigiert und die Amplituden und Phasen aus den korrigierten Bildern extrahiert. Die mittleren Peakintensitäten in den Auflösungsbereichen von ∞ -9 Å, 9-5 Å bzw. 5-3,5 Å wurden mit dem Programm MMBOXA berechnet und auf einen Untergrundwert von 7 normalisiert. Hierzu legt das Programm einen Ausschnitt von wenigen Pixel um die theoretische Lage der einzelnen Reflexe und summiert die Intensitäten in diesem Ausschnitt über alle Reflexe. Die Darstellung der mittleren Intensitäten in Abhängigkeit vom Abstand (in Pixel) zur theoretischen Peakposition ergibt ein Zahlenfeld, in dem ein Wert von 7 dem Untergrundsignal entspricht. Im Zentrum des Zahlenfelds, d.h. an der theoretischen Peakposition, findet man entsprechend die maximale mittlere Intensität; mit zunehmendem Abstand vom Zentrum fällt die Intensität auf den Untergrundwert ab. Enthält ein Auflösungsbereich Informationen über die periodische Struktur eines Objekts, muß die mittlere Intensität aller Reflexe in dem Auflösungsbereich oberhalb des Untergrunds liegen. In der Darstellung der mittleren Intensitäten drückt sich dies in einer signifikanten Häufung von Werten größer 7 um die theoretische Lage des Peaks aus.

Die mittleren Intensitäten des Bildes 17332 nach Korrektur der Gitterverzerrungen sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Im Bereich von ∞ -9 Å wurden die Intensitäten von 95 Reflexen gemittelt und ergaben mit 1604 einen ausgesprochen hohen Wert. In der Zone von 9-5 Å fiel die mittlere Intensität nach Mittelung von 138 Reflexen auf einen Wert von 77. Die mittlere Intensität von 14, berechnet aus 100 Reflexen im Bereich von 5-3,5 Å, macht deutlich, daß das Bild 17332 auch eindeutig Strukturinformation unterhalb von 5 Å enthielt. Im Durchschnitt zeigten die Hälfte aller untersuchten Bilder nachweisbare Reflexe unterhalb von 5 Å Auflösung; die mittleren Intensitäten im Bereich von 5-3,5 Å lagen allerdings in der Regel bei Werten von 8 oder 9. Alle untersuchten Bilder zeigten deutliche Reflexe im Bereich zwischen 9-5 Å Auflösung; die mittleren Peakintensitäten lagen hier im Durchschnitt bei einem Wert von 24 (gemittelt über insgesamt 43 Aufnahmen). Die mittleren Intensitäten der MB-markierten Proben wiesen dabei vergleichbare Werte im Verhältnis zu den nicht markierten Proben auf (vgl. Tabelle 4.1). Somit wurde die Gitterqualität durch die Einführung der Schweratommarker nicht beeinträchtigt.

Die Eignung von Schweratomderivaten für Strukturuntersuchungen von Proteinen mittels elektronenkristallographischen Methoden wurde bereits von Ceska und Henderson (1990) überprüft. Die Analyse von mehr als 20 verschiedenen Schweratommarkern, darunter auch einige Quecksilberverbindungen, ergab jedoch, daß hierbei die durch die Schweratome hervorgerufenen Strukturfaktordifferenzen im Vergleich zu Röntgendiffraktionsexperimenten deutlich niedriger sind. Dies liegt unter anderem daran, daß die Streuamplituden von Elektronen nicht linear mit der Ordnungszahl der streuenden Atome zunimmt (Ceska und Henderson, 1990). Daher wurde nicht versucht, die Position der Schweratommarker mittels hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie zu bestimmen. Dies hätte zudem die Aufnahme und Analyse einer Vielzahl von elektronenmikroskopischen Bildern erfordert, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

Probe	K9-1	K9-2	K9-3	K9-4	K10-MPD	K10-Prop	K10-Prop	K10-DMSO	K10-DMSO
Cholesterin / Protein (mol/mol)	-	-	2:1	2:1	2:1	2:1	2:1	2:1	2:1
Dialyse (1)	2 mM DTT	4 mM DTT 4 mM MeSH (2)	2 mM DTT	4 mM DTT 4 mM MeSH	4 mM DTT 4 mM MeSH 2,5 % (v/v) MPD	4 mM DTT 4 mM MeSH 2,5 % (v/v) Isopropanol	4 mM DTT 4 mM MeSH 2,5 % (v/v) Isopropanol	4 mM DTT 4 mM MeSH 2,5 % (v/v) DMSO	4 mM DTT 4 mM MeSH 2,5 % (v/v) DMSO
Hg / Protein (mol/mol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Negativ-Nr.	18541	93812	17461	17332	24231	24501	26241	25611	26651
a (Å)	59,5	62,1	59,8	61,8	62,1	61,0	61,8	61,6	61,1
b (Å)	84,9	89,8	84,6	88,9	89,8	86,9	87,9	89,9	83,3
Verhältnis b/a	1,43	1,45	1,42	1,44	1,45	1,43	1,42	1,46	1,36
Winkel (°)	89,82	90,05	89,31	90,36	89,84	89,43	89,71	90,01	90,53
Bereich von ∞-3,5 Å	434 244	409 232	487 252	762 333	117 214	236 193	305 254	267 278	324 216
Bereich von ∞-9 Å	136 893 90	136 806 88	151 975 92	220 1604 95	109 237 80	107 492 80	126 565 85	158 523 92	122 629 86
Bereich von 9-5 Å	85 26	85 22	80 30	91 77	69 19	74 21	72 19	81 48	78 19
Bereich von 5-3,5 Å	93 43 9	89 43 7	105 60 7	138 91 14	63 28 9	61 28 9	90 35 9	106 61 9	67 33 8
	61	55	55	100	71	52	79	80	63
	8	8	11	38	12	5	19	16	11

(1) Zugabe zusätzlich zum Standarddialysepuffer (20 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 3 mM NaN₃)

(2) MeSH = Mercaptoethanol

Tabelle 4.1: Vergleich der Analyse kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen verschiedener kristalliner Präparationen. Neben den Gitterparametern sind die mittleren Amplituden, die Anzahl aller Reflexe sowie die Anzahl der Reflexe mit IQ-Werten zwischen 1-4 für verschiedene Auflösungsgebiete aufgeführt. Mittlere Amplituden mit einem Wert größer 7 repräsentieren eine signifikante Strukturinformation oberhalb des Untergrundsignals in dem entsprechenden Bereich. Die PCMB-Markierung der Proben führt innerhalb der üblichen Schwankungen nicht zu Veränderungen der Gitterparameter bzw. zu einer Beeinträchtigung der Gitterqualität.

Nach Beseitigung der Gitterverzerrungen wurden die Effekte der Kontrast-Transfer-Funktion und des Astigmatismus korrigiert. Die Fourier-Komponenten des korrigierten Bildes 17332 sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Die kreisförmigen Linien kennzeichnen die Nulldurchgänge der Kontrast-Transfer-Funktion. Die Intensitäten der Reflexe sind als IQ-Werte nach Henderson et al. (1986) in Form von Quadraten unterschiedlicher Größe dargestellt. Ein IQ-Wert von 7 entspricht dabei der Intensität eines Reflexes, die nach Abzug des Untergrunds gerade so hoch wie das Untergrundsignal selbst ist. Gemäß dieser Konvention nimmt der IQ-Wert mit zunehmender Intensität der Reflexe ab. Reflexe mit einem IQ-Wert zwischen 1 und 4 sind durch Zahlen innerhalb der Quadrate gekennzeichnet. Schwächere Reflexe (IQ = 5-8) werden durch Quadrate mit abnehmender Größe ohne Numerierung symbolisiert. Die Analyse der Kontrast-Transfer-Funktion ergab für das Bild 17332 Defokuswerte von $F_x = 5600 \text{ \AA}$, $F_y = 6890 \text{ \AA}$ und $\phi = 78^\circ$. Die markierten Reflexe (-10,19) bzw. (15,-3) liegen im Bereich einer Auflösung von $3,5 \text{ \AA}$ und bestätigen die hohe Güte des abgebildeten Kristalls.

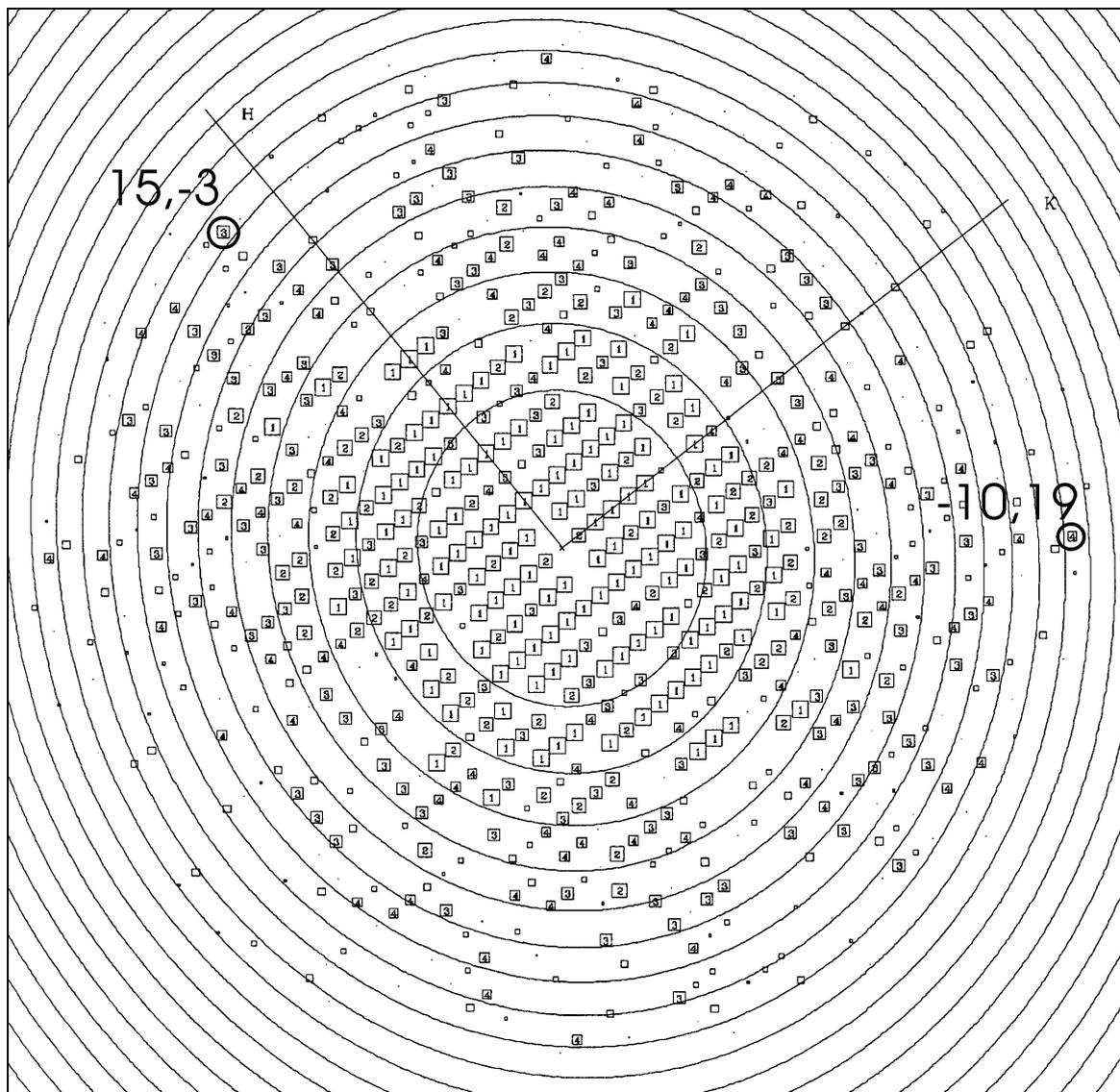


Abbildung 4.6: Fourier-Komponenten des Bildes 17332 nach Korrektur der Gitterverzerrungen und der Effekte der Kontrast-Transfer-Funktion. Die Intensität der Reflexe wird durch Quadrate unterschiedlicher Größe symbolisiert. Zwei Reflexe mit deutlicher Intensität (IQ-Werte von 3 bzw. 4) im Bereich von $3,5 \text{ \AA}$ sind durch die Markierung (Kreise) hervorgehoben.

Anschließend wurde die Raumgruppe des Kristallgitters mit dem Programm ALLSPACE ermittelt. Die niedrigsten Phasenabweichungen wurden jeweils für die Raumgruppe $p22_12_1$ erhalten. Für das Bild 17332 betrug der Wert $38,3^\circ$ unter Berücksichtigung aller Reflexe mit IQ-Werten ≤ 5 im Bereich von ∞ -9 Å (Phasenabweichungen von 90° entsprechen dem statistischen Zufallswert). Die Symmetrie der Raumgruppe $p22_12_1$ führt zu einem Verlust der ungeradzahigen Reflexe entlang der h- und k-Achsen. In Abbildung 4.6 ist dieser Effekt entlang der h-Achse deutlich zu erkennen. Das Auftreten der entsprechenden Reflexe entlang der k-Achse dagegen kann mit der Aufnahme des Kristalls unter einem leichten Kippwinkel erklärt werden. Der Kippwinkel der Aufnahmen wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht eingehender analysiert. Bei anderen Bildern kamen die Symmetriemerkmale sehr viel besser zur Geltung.

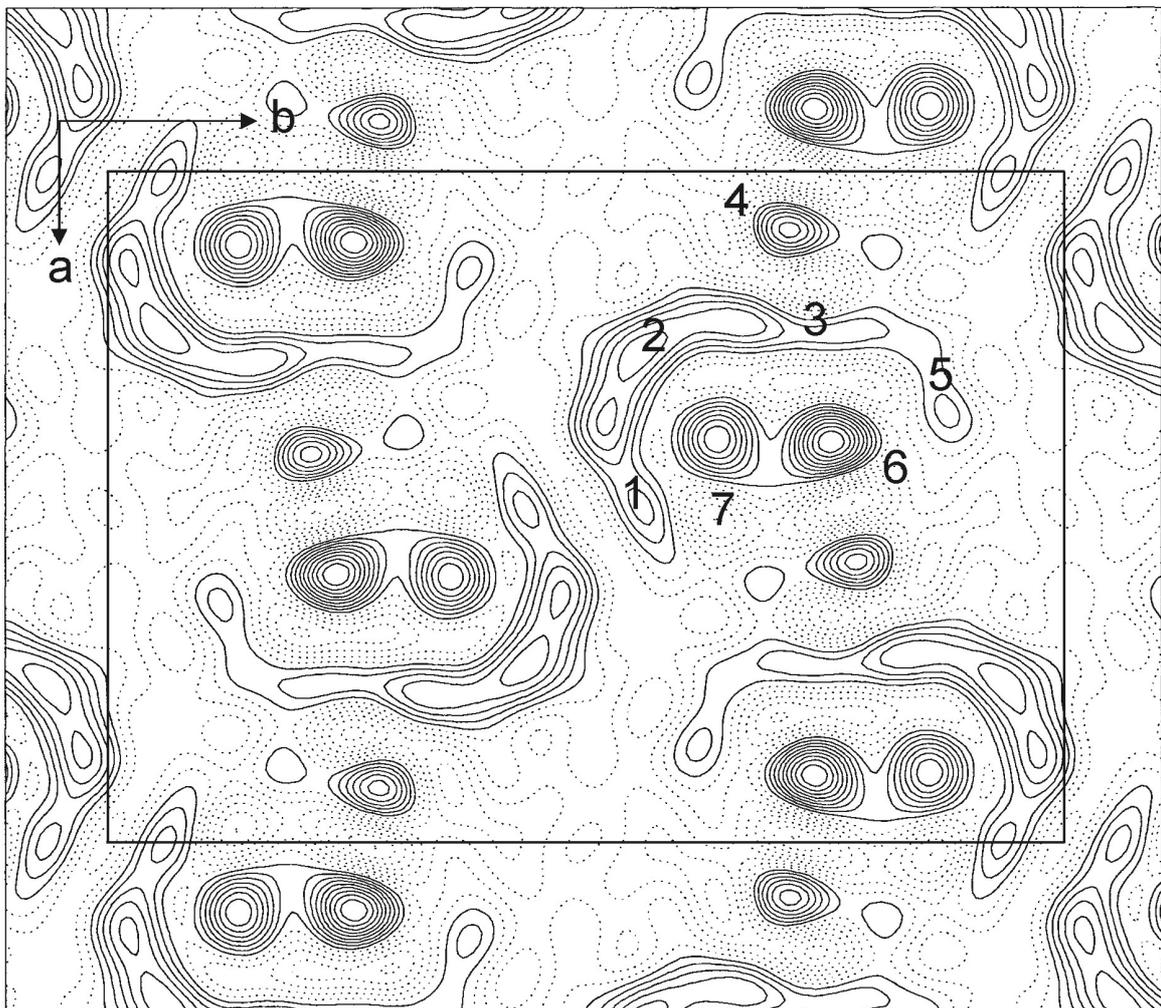


Abbildung 4.7: Elektronendichteverteilung berechnet für das Einzelbild 17332 nach Skalierung der Amplituden. Die Auflösung beträgt 7 Å. Die positiven Höhenlinien sind mit durchgezogenen Linien, die negativen Höhenlinien gepunktet dargestellt. Das Kristallgitter weist eine $p22_12_1$ -Symmetrie auf. In der Einheitszelle (rechteckiger Kasten) befinden sich jeweils vier Rhodopsinmoleküle. In einem der Moleküle sind die Positionen der Transmembranhelices mit Nummern gekennzeichnet. Deutlich zu erkennen sind die drei senkrecht zur Membran stehenden Helices 4,6 und 7.

Zur Kompensation des auflösungsabhängigen Abfalls der Amplituden, der bei der Bildverarbeitung kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen im Vergleich zur Elektronendiffraktion typischerweise beobachtet wird, wurden die Amplituden mit Hilfe des Programms SCALIMAMP3D auf die mittleren Amplituden der Elektronendiffraktion von Bacteriorhodopsin skaliert (Havelka et al., 1995; Unger und Schertler, 1995; Unger et al., 1997; Krebs et al., 1998). Die daraus resultierende Elektronendichteverteilung ist in Abbildung 4.7 für das Bild 17332 bei einer Auflösung von 7 Å dargestellt. Zur besseren Übersicht wurde die Elektronendichte über die Grenzen der Einheitszelle hinaus erweitert. In der Einheitszelle befinden sich vier Rhodopsinmoleküle, die abwechselnd mit der cytoplasmatischen Seite nach oben bzw. unten orientiert sind. Die drei senkrecht zur Membranebene stehenden Helices 4, 6 bzw. 7 sind deutlich zu erkennen. Die übrigen Helices sind stärker geneigt und bilden in der zweidimensionalen Projektion der Elektronendichte ein bogenförmiges Strukturmotiv. Die Symmetrieelemente der Raumgruppe $p2_12_1$ (eine 2-fache Rotationsachse senkrecht zur Membranebene und jeweils eine 2-fache Schraubenachse entlang der Gittervektoren) sind ebenfalls deutlich zu erkennen. Die Tatsache, daß es sich hierbei um die Strukturinformation einer kryoelektronenmikroskopischen Aufnahme eines einzelnen 2D-Kristalls handelt, belegt die hohe Qualität des untersuchten Kristalls.

4.4 Durchführung und Ergebnis der Röntgendiffraktionsmessungen

4.4.1 Referenzmessungen an 2D-Kristallen von Bacteriorhodopsin

Purpormembranen von Wildtyp-bR wurden auf Trespaphanfolie aufgetragen und in einem geschlossenen Behälter bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 86 % getrocknet. Unter diesen Bedingungen ordnen sich die Purpormembranen reproduzierbar zu multilamellaren Filmen (Krebs et al., 1993; Behrens et al., 1998a). Die Röntgenmessungen erfolgten ebenfalls bei 86 % relativer Feuchtigkeit. Die Intensitätsspektren (vor Lorentz-Korrektur) einer typischen bR-Messung vor und nach Untergrundabzug sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Die Messung setzt sich aus 21 Einzelspektren à 1 h zusammen. Die Reflexe wurden nach dem hexagonalen $p3$ -Gitter indiziert und die Intensität als Summe von Gauß-Funktionen angepaßt. Zur Bestimmung der Intensität entarteter Reflexe wurde die Gesamtintensität der Reflexe gemäß der Intensitätsverhältnisse aus der Elektronendiffraktion aufgeteilt (Henderson et al., 1986; Plöhn und Büldt, 1986). Die hexagonale Gitterkonstante wurde durch Auftragung von $\sin\theta$ über $(h^2+k^2+kh)^{1/2}$ mit $62,3 \pm 0,3$ Å bestimmt und lag innerhalb der Fehlergrenze im Bereich der Literaturwerte (Henderson und Unwin, 1975; Henderson et al., 1986; Kimura et al., 1997).

h	k	F	h	k	F	h	k	F
1	0	8,3	2	3	7,6	4	2	7,6
1	1	27,2	2	4	21,5	4	3	26,8
1	2	11,1	2	5	6,7	5	0	17,4
1	3	4,7	2	6	7,2	5	1	3,7
1	4	11,9	3	0	3,4	5	2	16,6
1	5	12,7	3	1	19,1	5	3	4,4
1	6	1,5	3	2	11,2	6	1	5,8
1	7	6,1	3	4	17,0	6	2	5,5
2	0	17,1	3	5	12,2	7	0	7,5
2	1	5,3	4	0	13,2	7	1	4,5
2	2	11,0	4	1	15,8			

Tabelle 4.2: Strukturfaktoramplituden der bR-Referenzmessung

Die Streuintensitäten wurden bis zum (7,1)-Reflex aufgenommen. Dies entspricht einer Auflösung von 7,2 Å. Die Strukturfaktoramplituden nach Lorentz-Korrektur sind in Tabelle 4.2 aufgelistet; die Phasen wurden von Henderson et al. (1986) übernommen. Die resultierende Elektronendichteverteilung ist in Abbildung 4.9 dargestellt. In der Einheitszelle befinden sich drei bR-Moleküle. Die Dichtemaxima repräsentieren jeweils die drei nahezu senkrecht zur Membranebene stehenden Helices 2, 3 und 4. Das bogenförmige Strukturmotiv wird von den übrigen vier Helices gebildet, die zur Membrannormalen stärker geneigt sind. Das Ergebnis entspricht dem typischen Bild von bR innerhalb der Auflösungsgrenze von ca. 7 Å (Krebs et al., 1993; Behrens et al., 1998a).

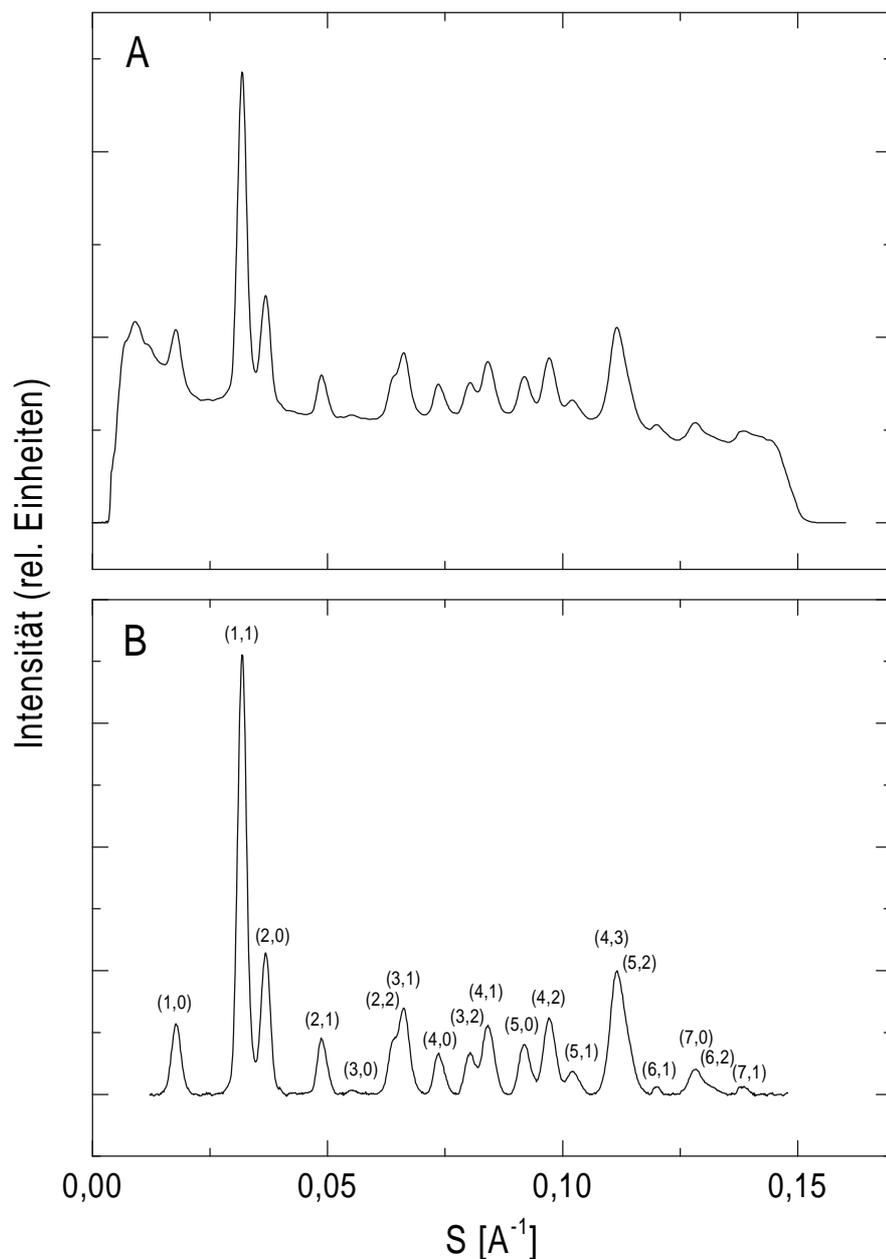


Abbildung 4.8: Intensitätsspektren einer typischen Röntgenmessung an Wildtyp-bR vor Lorentz-Korrektur. (A) Rohdaten. (B) Spektrum nach Untergrundabzug. Die Indizierung der Reflexe erfolgte nach p3-Symmetrie des hexagonalen Gitters.

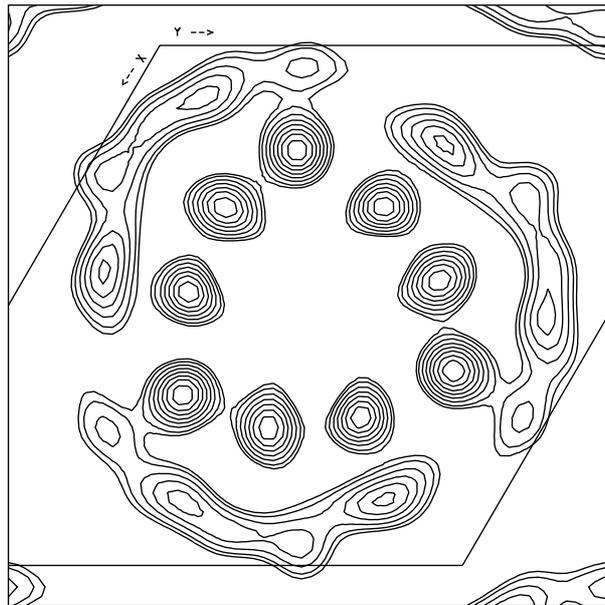


Abbildung 4.9: Elektronendichteverteilung von Wildtyp-bR bei 7,2 Å Auflösung. In der Elementarzelle sind drei bR-Moleküle deutlich zu erkennen. Dargestellt sind die positiven Höhenlinien im Bereich von 38-92 %.

4.4.2 Herstellung multilamellarer Filme von Rhodopsinkristallen

Zur Herstellung geordneter multilamellarer Filme wurden die kristallinen Proben (ca. 1 mg Rhodopsin pro Auftragung) auf die Trespaphanfolie aufgetragen und in einem geschlossenen Behälter bei konstanter Luftfeuchtigkeit langsam getrocknet. Die Anordnung der Rhodopsinkristalle zu multilamellaren Stapeln erfolgte in einem Zeitraum von 3-8 Tagen. Auf Grund der hohen Probenvariabilität mußten die Parameter wie Luftfeuchtigkeit und Salzgehalt der Probe hierbei für jede Präparation individuell optimiert und der Verlauf der Filmbildung sorgfältig kontrolliert werden. Selbst Proben, die unter identischen Kristallisationsbedingungen hergestellt wurden und die laut elektronenmikroskopischer Übersichtsbilder ein nahezu identisches Erscheinungsbild aufwiesen, verhielten sich bei der Herstellung der Filme oft völlig unterschiedlich. Die Ursache hierfür ist unklar. Diese Beobachtungen können einerseits auf die Variabilität des biologischen Ausgangsmaterials und andererseits auf die Inhomogenität der Proben (unterschiedliche Verhältnisse zwischen aggregiertem Material und tubulären Kristallen bzw. kristallinen Membranfragmenten) zurückgeführt werden. Die besten Ergebnisse wurden in der Regel bei Auftragung in Gegenwart von 20 mM NaCl in 1 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 erhalten. PCMB-markierte Proben bzw. nicht markierte Proben wurden bei allen Schritten der Filmherstellung möglichst identisch behandelt.

Die Verwendung anderer Trägerfolien (z.B. Mylarfolie) ergab keine Verbesserung. Ebenfalls erfolglos blieben Versuche, die Stapelung der Proben durch Zerreißen der tubulären Kristalle mit Hilfe einer kurzen Ultraschallbehandlung zu verbessern. Das Tempern der Kristalle durch wiederholtes Aufheizen der Proben auf Temperaturen zwischen 30-35 °C und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur zeigte keine positiven Effekte. Man geht hierbei davon aus, daß das Tempern zur Minimierung von Fehlern in einem Kristallgitter führt.

Im Gegensatz zu Purpormembranen lag die optimale relative Luftfeuchtigkeit bei der Herstellung der Filme von Rhodopsinkristallen nahe 100 %. Bei einer niedrigeren Luftfeuchtigkeit trockneten die Rhodopsinproben irreversibel aus und lösten sich von der Trägerfolie ab. Als äußerst problematisch erwies sich zusätzlich die Empfindlichkeit der Proben auf geringe Schwankungen der Luftfeuchtigkeit. Bereits der Probentransfer in die Meßapparatur

und die anschließende Reäquilibration in der Probenkammer führte zu einer Veränderung der Filmqualität. Dies drückte sich im Verlauf der Messungen in drastischen Schwankungen der Untergrundstreuung bzw. der Ablösung des Probenfilms von der Trägerfolie aus.

Mit zunehmender Inhomogenität verhielten sich die Proben während der Filmbildung völlig unkontrollierbar. Daher wurde versucht, Proteinaggregate mittels Dichtegradientenzentrifugation von dem kristallinen Material abzutrennen. Aus einem kontinuierlichen Saccharosedichtegradient (30-50 % (w/w) in Standarddialysepuffer) konnte eine Bande mit einer Dichte von ca. 1,2 g/ml isoliert werden, die gemäß elektronenmikroskopischer Übersichtsbilder deutlich weniger Proteinaggregate enthielt. Krebs et al. (1998) geben für die Dichte der Rhodopsinkristalle einen Wert von 1,166 g/ml an. Trotz Entfernung der Saccharose durch intensives Waschen führte die Auftragung dieser Proben allerdings zur Bildung von glasartig transparenten Filmen, die leicht von der Trägerfolie absprangen. Dies ist vermutlich auf Wechselwirkungen zwischen der Saccharose und der Proteinoberfläche zurückzuführen. Brauchbare Röntgendaten wurden von keiner dieser Proben erhalten.

Als völlig ungeeignet für die Herstellung multilamellarer Filme erwiesen sich Proben mit einem hohen Anteil an Vesikeln, die bei Rekonstitution von Rhodopsin mit exogenen Lipiden bzw. nativen Lipiden der ROS-Membran bevorzugt gebildet wurden. Dies kann einerseits mit der beobachteten niedrigen Stabilität der Probenfilme und andererseits mit der geringen Größe der kristallinen Areale auf der Vesikeloberfläche erklärt werden.

4.4.3 Röntgenmessungen an Rhodopsinkristallen

Zur Messung der lamellaren Stapelreflexe wurde der Probenfilm waagrecht zum Röntgenstrahl justiert. Bei gut geordneten Proben konnte ein lamellarer Reflex bei $S = 0,0135\text{--}0,015 \text{ \AA}^{-1}$ gefunden werden. In einigen Fällen zeichnete sich zusätzlich eine Schulter bei $S \approx 0,028\text{--}0,03 \text{ \AA}^{-1}$ ab. Diese Werte entsprechen einer Gitterkonstanten zwischen 74-67 Å für die lamellare Stapelung der Kristalle. Die Messung der lamellaren Reflexe wurde allerdings nur in wenigen Fällen durchgeführt, da in der Regel das Kryostatsystem für die Rhodopsinmessungen verwendet wurde. Mit dem Probenhalter dieses Systems war die Messung der lamellaren Streuung nicht möglich (vgl. Abschnitt 3.5.3).

Die Diffraktion am 2D-Gitter wurde unter senkrechter Orientierung der Probe zum Primärstrahl gemessen. Im Vergleich zu den Purpurmembranen wiesen die Messungen der Rhodopsinfilme eine deutlich höhere Untergrundstreuung auf, was auf eine geringere Ordnung der Rhodopsinkristalle hindeutet. Trotz Äquilibration der Proben bei konstanter Luftfeuchtigkeit kam es im Verlauf der Messungen häufig zu drastischen Veränderungen im Untergrund, die vermutlich auf ein fortschreitendes Eintrocknen der Probenfilme zurückzuführen sind. Es gelang daher nur in wenigen Fällen, die Filme über einen Meßzeitraum von mehr als 20 h zu stabilisieren, um eine ausreichende Zählstatistik zu garantieren.

Die besten Diffraktionsdaten wurden von der Probe K12-2 erhalten, die unter Verwendung von 10:1 (mol/mol) Cholesterin:Rhodopsin und Dialyse in Standardpuffer mit 4 mM DTT, 4 mM Mercaptoethanol und 2,5 % (v/v) MPD hergestellt wurde. Die Präparation enthielt überwiegend tubuläre Kristalle von ungewöhnlicher Länge (vgl. Abbildung 4.10). Von der nicht markierten Probe K12-2 konnte ein Datensatz aus 25 Einzelspektren à 1 h aufgenommen werden. Die Summe der Rohdaten sind in Abbildung 4.11 als Funktion des Betrags des Streuvektors $|\mathbf{S}| = S = 2\sin\theta/\lambda$ dargestellt. Bei der Schweratommarkierung mit PCMB wurde eine Markierungsstöchiometrie von 1,65 (mol/mol) MB/Rhodopsin erzielt. Von der markierten Probe konnten ebenfalls 25 Einzelspektren à 1 h gesammelt werden. Zur Untergrundkorrektur wurde ein Polynom 8. Grades modelliert und abgezogen (Behrens, 1996; Behrens et al., 1998a). In den vorliegenden Spektren konnten jedoch die Debye-Scherrer Ringe der Reflexe, die nach

$$(Gl. 4.1) \quad S = \sqrt{\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2}}$$

ähnliche S-Werte aufweisen, nicht vollständig aufgelöst werden (vgl. Abbildung 4.11 bzw. Abbildung 4.12.) Da zur Modellierung des Untergrunds die Intensität zwischen einzelnen Reflexen bzw. Reflexgruppen auf Null gesetzt werden mußte, erschwerte die Überlagerung der Reflexe hierbei die Untergrundkorrektur. Für die Datensätze der markierten bzw. nicht markierten Probe wurden weitgehend identische Stützstellen zur Modellierung des Untergrundverlaufs verwendet. Wegen der ungenügenden Auflösung der einzelnen Debye-Scherrer Ringe muß man jedoch berücksichtigen, daß mit diesem Verfahren die Untergrundstreuung in einigen Bereichen der Spektren überbewertet und somit die Intensität der Reflexe systematisch unterbewertet wird. Eine weitere Fehlerquelle stellt der starke Anstieg der Untergrundstreuung in der Nähe des Beamstops dar. Dort liegen die Reflexe (1,1), (0,2), (1,2) und (2,0), die eine hohe Intensität besitzen. Reflex (2,0) ist außerdem mit dem deutlich schwächeren Reflex (2,1) überlagert. Ein unterschiedlicher Anstieg der Untergrundstreuung führt in diesem Bereich daher zwangsläufig zu fehlerhaften Intensitäten. Andere Methoden der Untergrundkorrektur, die z.B. auf einer gleichzeitigen Anpassung der Peakintensitäten und des Untergrunds beruhen (Hauss et al., 1990), konnten hier wegen der starken Überlagerung der Reflexe nicht verwendet werden.

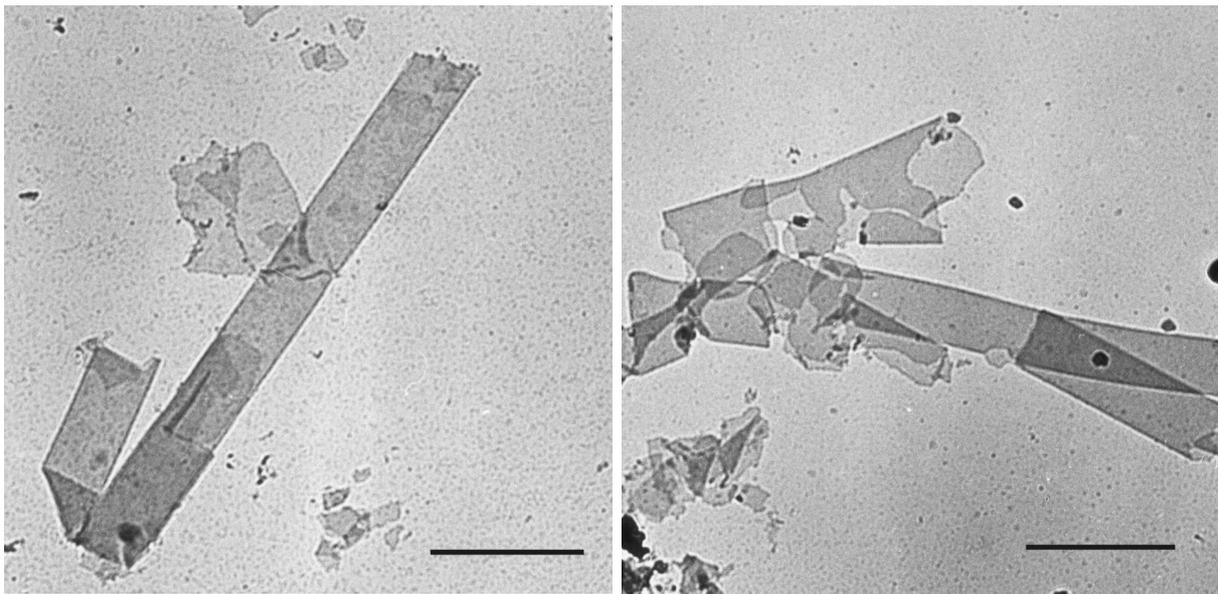


Abbildung 4.10: Tubuläre Rhodopsinkristalle der Probe K12-2 nach Negativkontrastierung. Die Aufnahme erfolgte mit ca. 4000-facher Vergrößerung. Die Größenbalken repräsentieren eine Länge von 0,5 μm .

Die Spektren der markierten und nicht markierten Probe nach Untergrundabzug sind in Abbildung 4.12 gezeigt. Im gesamten Spektrum sind positive und negative Intensitätsdifferenzen zu erkennen, wobei die positiven Differenzen im hinteren Bereich des Spektrums überwiegen. Zur Ermittlung der Gitterkonstanten wurde eine Summe von Gauß-Funktionen an die stark ausgeprägten Reflexe (1,1), (0,2), (1,2), (2,0), (6,0) bzw. (6,1) angepaßt, wobei die Lagen der Gauß-Kurven durch die Gitterkonstanten a bzw. b als freie Variablen definiert wurden.

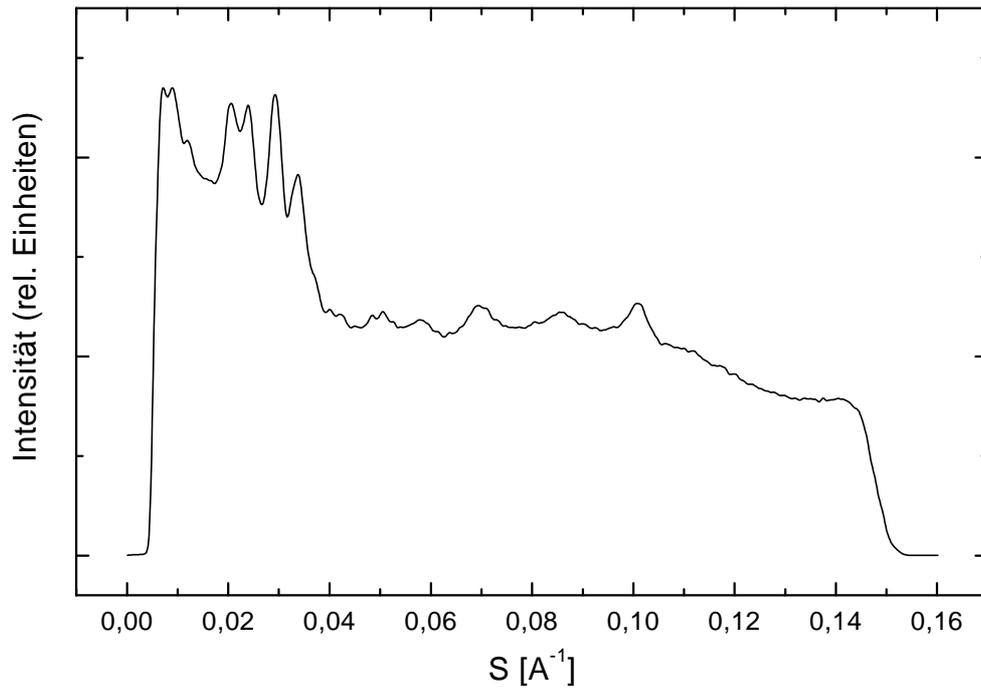


Abbildung 4.11: Intensitätsspektrum der Rhodopsinmessung K12-2 vor Untergrundabzug als Funktion des Streuvektors $|\mathbf{S}| = 2\sin\theta/\lambda$. Das Spektrum setzt sich aus 25 Einzelmessungen à 1 h zusammen.

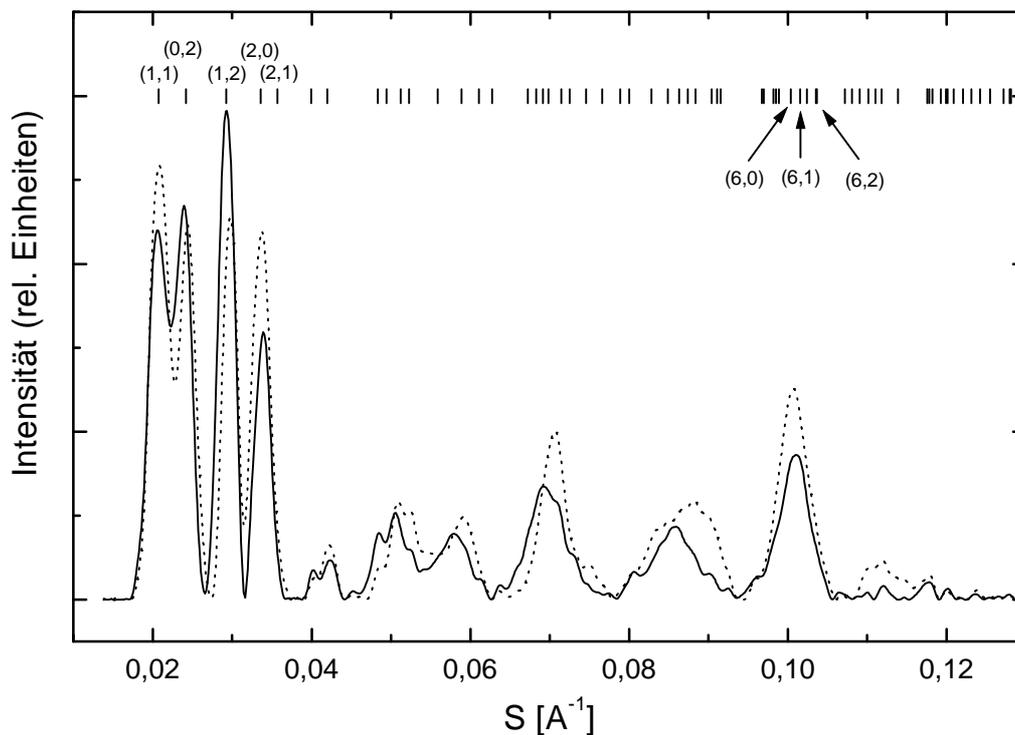


Abbildung 4.12: Intensitätsspektren von Rhodopsin (durchgezogene Linie) und Rhodopsin-MB (gepunktet) nach Untergrundabzug. Die Darstellung zeigt die Daten vor Lorentz-Korrektur. Die senkrechten Linien kennzeichnen die theoretische Lage der Reflexe in dem $p22_12_1$ -Gitter mit den Gitterkonstanten $a = 59,5 \text{ \AA}$ und $b = 82,7 \text{ \AA}$. Die Millerschen Indizes der Reflexe, die zur Bestimmung der Gitterkonstanten verwendet wurden, sind besonders gekennzeichnet. Die theoretischen S -Werte der Reflexe sind Tabelle 4.3 aufgeführt.

h	k	S / Å ⁻¹	h	k	S / Å ⁻¹	h	k	S / Å ⁻¹	h	K	S / Å ⁻¹
1	1	0,0207	3	2	0,0559	4	3	0,0764	0	8*	0,0967
0	2	0,0242	2	4	0,0589	3	5	0,0787	5	4*	0,0970
1	2	0,0295	3	3	0,0621	2	6	0,0800	1	8*	0,0982
2	0	0,0336	1	5	0,0628	4	4	0,0828	3	7*	0,0985
2	1	0,0357	4	0	0,0672	5	1	0,0849	4	6*	0,0989
1	3	0,0400	4	1	0,0683	1	7	0,0863	6	0	0,1008
2	2	0,0414	2	5	0,0692	5	2	0,0874	6	1	0,1016
0	4	0,0484	3	4	0,0699	3	6	0,0884	2	8*	0,1024
2	3	0,0495	4	2	0,0714	4	5	0,0904	5	5*	0,1035
1	4	0,0512	0	6*	0,0726	2	7	0,0911	6	2	0,1037
3	1	0,0518	1	6	0,0745	5	3	0,0915			

Tabelle 4.3: Theoretische S-Werte der in Abbildung 4.12 dargestellten Reflexe. Die Intensität der mit dem Symbol * gekennzeichneten Reflexe konnte nicht mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden. Die Indizierung der Reflexe konnte bis $S = 0,105 \text{ \AA}^{-1}$ durchgeführt werden. Reflexe mit höheren S-Werten sind daher nicht aufgeführt (weitere Erläuterungen siehe Text).

Die resultierenden Werte von $a = 59,5 \pm 1 \text{ \AA}$ bzw. $b = 82,7 \pm 1,5 \text{ \AA}$ lagen im unteren Bereich der Gitterkonstanten, die mittels Elektronenmikroskopie bestimmt wurden (vgl. Abschnitt 4.3.5). Röntgenmessungen an unterschiedlichen Proben, die zwar die Bestimmung der Gitterkonstanten erlaubte, deren Qualität allerdings nicht zur Analyse des gesamten Röntgenspektrums ausreichten, wiesen ebenfalls Gitterkonstanten in dieser Größenordnung auf.

Die Intensitäten der Reflexe wurden durch Anpassung einer Summe von Gauß-Funktionen ermittelt. Auf Grund der Überlagerung von Reflexen mit ähnlichen S-Werten wurden die Peakpositionen gegebenenfalls im Bereich der theoretischen Lage der Reflexe, die mit Hilfe der experimentellen Gitterkonstanten nach (Gl. 4.1) berechnet wurde, festgehalten. Eine geringfügige Abweichung von der theoretischen Peakposition kann auf die experimentellen Fehler bei der Bestimmung des Abstands zwischen Probe und Detektor zurückgeführt werden. Eine weitere Fehlerquelle stellt eine geringe Abweichung des Winkels zwischen Detektor und Primärstrahl von dem Idealwert von 90° dar. Zusätzlich wurden die bekannten Intensitätsverhältnisse der Reflexe aus der Elektronenmikroskopie zur Anpassung der nicht markierten Probe berücksichtigt. Die Anpassung der Daten der MB-markierten Probe erfolgte anschließend unter Verwendung identischer Anpassungsparameter. Die Fehler der resultierenden Intensitäten lagen unter 5 %. An dieser Stelle muß man jedoch anmerken, daß durch die Untergrundkorrektur bereits ein systematischer Fehler eingeführt wird, der bei der mathematischen Anpassung der Meßdaten nicht berücksichtigt wird.

Die Meßdaten der Probe K12-2 ermöglichten die Indizierung der Reflexe bis $S = 0,105 \text{ \AA}^{-1}$. Damit lag die maximale Auflösung des Experiments bei $9,5 \text{ \AA}$. Mit steigender Auflösung wurde die Zuordnung von Reflexen mit relativ niedriger Intensität gegenüber stärker ausgeprägten Reflexen zunehmend schwieriger. Daher konnten im Bereich um $S \cong 0,1 \text{ \AA}^{-1}$ lediglich noch die drei starken Reflexe (6,0), (6,1) und (6,2) mit befriedigender Genauigkeit zugeordnet werden; 7 weitere Reflexe in diesem Bereich wurden in der weiteren Auswertung vernachlässigt (vgl. Tabelle 4.3). Insgesamt konnte die Intensität von 35 Reflexen ermittelt werden. Die Ergebnisse der Anpassung sind in Tabelle 4.4 zusammengestellt.

Die relative Intensitätsänderung nach

$$(Gl. 4.2) \quad \frac{\sum \Delta |I|}{\sum I}$$

vor Lorentz-Korrektur wies mit 28,4 % einen verhältnismäßig hohen Wert auf. In vergleichbaren Diffraktionsexperimenten an 2D-Kristallen von bR-Cysteinmutanten wurde nach Markierung von einer Cysteinseitenkette pro bR-Molekül eine relative Intensitätsänderung von ca. 7-8 % gefunden (Krebs et al., 1993; Behrens et al., 1998a). Neben dem systematischen Fehler der Untergrundkorrektur muß hierbei allerdings auch die Tatsache berücksichtigt werden, daß bei einer Stöchiometrie von 1,65 Molekülen MB pro Rhodopsin und vier Rhodopsinmolekülen pro Einheitszelle ein höherer Schweratomanteil zur Intensitätsdifferenz beiträgt.

In einem unabhängigen Wiederholungsexperiment konnte ein zweiter Datensatz einer MB-markierten Probe als Summe von 23 Einzelspektren à 1 h aufgenommen werden. Die Markierungsstöchiometrie betrug hier 1,7 Moleküle MB pro Rhodopsin. In diesem Experiment wurde eine relative Intensitätsänderung von 32 % erreicht. Der Vergleich der Datensätze untereinander über den Korrelationskoeffizienten (Hoel, 1971; Glaeser et al., 1986)

$$(Gl. 4.3) \quad c = \frac{\sum (\Delta F_1 \Delta F_2) - \frac{\sum \Delta F_1 \sum \Delta F_2}{n}}{\sqrt{\sum (\Delta F_1)^2 - \frac{(\sum \Delta F_1)^2}{n}} \cdot \sqrt{\sum (\Delta F_2)^2 - \frac{(\sum \Delta F_2)^2}{n}}}$$

ergab mit 86,6 % eine hohe Korrelation trotz des relativ niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses und der daraus resultierenden Unsicherheit der Untergrundkorrektur. ΔF_1 bzw. ΔF_2 repräsentieren hierbei die Differenzen der Strukturfaktoramplituden der beiden Datensätze und n die Anzahl der Reflexe.

Die resultierende Elektronendichteverteilung des nativen Rhodopsins ist in Abbildung 4.13 dargestellt. In der Einheitszelle sind die vier Rhodopsinmoleküle deutlich zu erkennen. Der Vergleich mit Abbildung 4.7 zeigt, daß bei der erzielten Auflösung des Röntgenexperiments von 9,5 Å hier die drei senkrecht zur Membran stehenden Helices 4, 6 und 7 nicht als isolierte Strukturmodule aufgelöst werden können. Die Elektronendichte der beiden Helices 6 und 7 überlagert sich stark. Verwendet man zur Berechnung der Elektronendichte allerdings nur diejenigen Reflexe aus dem elektronenmikroskopischen Referenzdatensatz, die an Hand der Röntgenspektren eindeutig zugeordnet werden konnten, erhält man eine Elektronendichteverteilung von vergleichbarer Qualität. Am geringsten ist die Elektronendichte im Bereich der Helices 3 und 5. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen aus der Elektronenmikroskopie und ist vermutlich auf die Neigung der beiden Helices relativ zur Membrannormalen zurückzuführen (Krebs et al., 1998; Baldwin et al., 1997, vgl. auch Abbildung 4.7).

h	k	I_{Rho}	I_{MB}	$F_{\text{Rho, norm}}$	$F_{\text{MB, norm}}$	ΔF_{norm}	$F_{\text{Rho, ska}}$	$F_{\text{MB, ska}}$	ΔF_{ska}
1	1	68,3	77,9	8,93	8,50	-0,42	22,32	21,25	-1,06
0	2	58,1	55,6	8,90	7,76	-1,13	22,24	19,41	-2,84
1	2	73,2	54	11,02	8,44	-2,58	27,55	21,11	-6,45
2	0	35,8	55	8,23	9,10	0,87	20,59	22,76	2,17
2	1	4,7	5,1	3,08	2,86	-0,22	6,15	5,71	-0,44
1	3	2,3	1,6	2,28	1,69	-0,58	4,55	3,39	-1,17
2	2	4,7	6,5	3,31	3,47	0,16	6,62	6,95	0,32
0	4	5,5	2,7	3,87	2,42	-1,45	9,68	6,05	-3,63
2	3	7,8	8,5	4,66	4,34	-0,32	9,32	8,68	-0,64
1	4	6,8	8,6	4,43	4,44	0,01	11,07	11,11	0,03
3	1	3,3	4,8	3,10	3,34	0,23	6,21	6,68	0,47
3	2	7,2	7,9	4,76	4,45	-0,31	6,67	6,23	-0,44
2	4	10,7	14,2	5,96	6,12	0,16	8,34	8,57	0,23
3	3	1,9	2,8	2,58	2,79	0,21	3,61	3,91	0,30
1	5	1,1	0,6	1,97	1,30	-0,67	3,94	2,60	-1,35
4	0	6,1	2	4,81	2,45	-2,35	12,02	6,14	-5,88
4	1	7,6	2,6	5,41	2,82	-2,59	13,52	7,05	-6,47
2	5	8,3	11	5,69	5,84	0,15	10,24	10,51	0,27
3	4	9,3	16,7	6,05	7,23	1,18	15,13	18,08	2,95
4	2	6	7,5	4,91	4,90	-0,01	12,29	12,25	-0,04
1	6	1,3	3,5	2,34	3,42	1,08	6,54	9,57	3,03
4	3	0,5	1,3	1,47	2,11	0,64	4,40	6,33	1,93
3	5	1,1	1,3	2,21	2,14	-0,07	6,63	6,42	-0,20
2	6	2,1	2,4	3,08	2,93	-0,14	7,69	7,33	-0,36
4	4	4,5	7,7	4,58	5,35	0,76	9,16	10,69	1,53
5	1	8	9	6,19	5,85	-0,33	9,28	8,78	-0,50
1	7	4,9	4,4	4,88	4,13	-0,76	4,88	4,13	-0,76
5	2	2,9	8,5	3,78	5,77	1,99	3,78	5,77	1,99
3	6	3	7,1	3,86	5,30	1,44	3,86	5,30	1,44
4	5	2,2	5,6	3,35	4,76	1,42	6,70	9,53	2,83
5	3	0,6	4,1	1,75	4,09	2,34	3,51	8,18	4,67
2	7	0,9	2,1	2,15	2,93	0,78	4,31	5,87	1,56
6	0	15,5	23,4	9,38	10,28	0,90	18,77	20,57	1,80
6	1	12,2	17,2	8,36	8,85	0,49	16,71	17,70	0,98
6	2	6	8,8	5,92	6,39	0,47	11,84	12,79	0,95

Tabelle 4.4: Intensitäten und Strukturfaktoramplituden der MB-markierten bzw. nicht markierten Rhodopsinprobe. I_{Rho} , I_{MB} : Ergebnisse der Anpassung der Intensitäten als Summe von Gauß-Funktionen vor Lorentz-Korrektur; $F_{\text{Rho, norm}}$, $F_{\text{MB, norm}}$, ΔF_{norm} : Strukturfaktoramplituden bzw. Differenzen der Strukturfaktoramplituden nach Normierung der Datensätze auf die Gesamtintensität; $F_{\text{Rho, ska}}$, $F_{\text{MB, ska}}$, ΔF_{ska} : Strukturfaktoramplituden bzw. Differenzen der Strukturfaktoramplituden nach Skalierung auf die Amplituden aus der Bildverarbeitung.

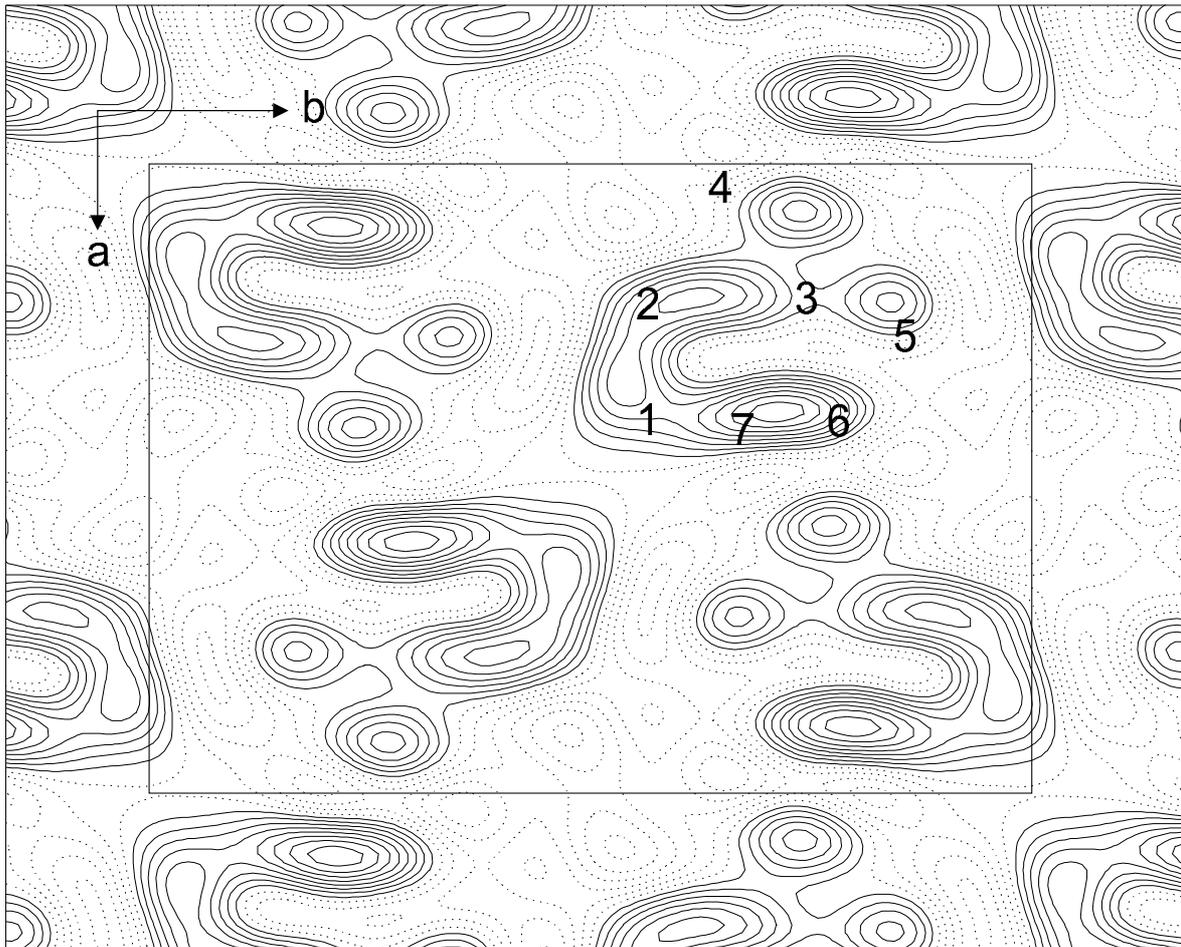


Abbildung 4.13: Elektronendichteverteilung des nativen Rhodopsins berechnet aus den Daten der Röntgendiffraktionsmessungen an multilamellaren Filmen von 2D-Kristallen. Die positiven Höhenlinien sind mit durchgezogenen, die negativen Höhenlinien mit gepunkteten Linien dargestellt. In der Einheitszelle (Rechteck) mit den Gitterparametern $a = 59,5 \text{ \AA}$, $b = 82,7 \text{ \AA}$, $\gamma = 90^\circ$ befinden sich vier Rhodopsinmoleküle. Die Auflösung des Experiments betrug $9,5 \text{ \AA}$. Die Nummern kennzeichnen die Lage der Transmembranhelices im Vergleich zu Abbildung 4.7.

Die Fourier-Differenzdichte nach Normierung der Datensätze auf die Gesamtintensität ist in Abbildung 4.14 dargestellt. Die Differenzdichteverteilung entspricht der Anordnung von vier Rhodopsinmolekülen pro Einheitszelle. Die höchste Differenzdichte (Maximum 1) ist über einen relativ ausgedehnten Bereich verschmiert und ist in der Nähe von Helix 3 bzw. 5 lokalisiert (vgl. Abbildung 4.7 und Abbildung 4.13). Ein weiteres Differenzmaximum (Maximum 2) weist eine etwa 8 % geringere Dichte auf und liegt in der Nähe der Helices 1 und 2. Zusätzlich sind noch weitere Nebenmaxima zu erkennen, deren Dichte um ca. 38 % geringer ist. Die Nebenmaxima liegen in der Nähe der Helix 4 bzw. außerhalb der Elektronendichteverteilung des nativen Rhodopsins. Helix 4 liegt 10 \AA und mehr von den theoretisch erwarteten Positionen der Aminosäure C140 am Ende der Helix 3 bzw. der Aminosäure C316, die zwischen Helix 7 und den C-terminalen Palmitoylierungsstellen lokalisiert ist, entfernt. Die Nebenmaxima können daher unmöglich die Lage der Schweratommarker repräsentieren.

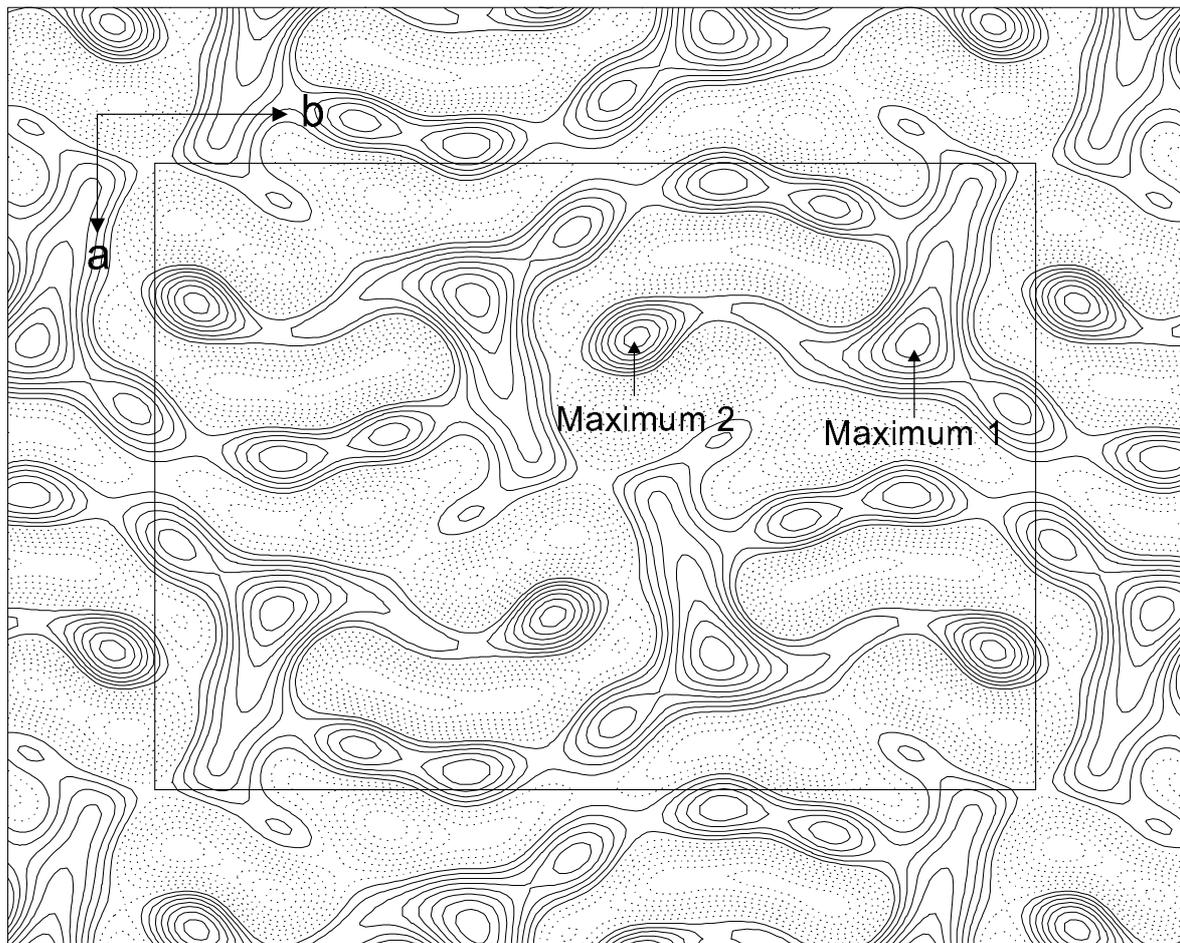


Abbildung 4.14: Differenzdichteverteilung der Rhodopsinprobe K12-2. Der Vergleich mit Abbildung 4.7 bzw. Abbildung 4.13 zeigt, daß die höchsten Differenzdichten in der Nähe der Helix 3 (Maximum 1) bzw. der Helices 1 und 2 (Maximum 2) liegen. Weitere Nebenmaxima sind um ca. 38 % niedriger und liegen im Bereich der Helix 4 bzw. außerhalb der Elektronendichteverteilung des Rhodopsins. Die Höhenlinien sind in äquidistanten Abständen dargestellt (positive Höhenlinien: durchgezogene Linien, negative Höhenlinien: gepunktete Linien). Der Kasten kennzeichnet die Grenzen der Einheitszelle mit den Gitterparametern $a = 59,5 \text{ \AA}$, $b = 82,7 \text{ \AA}$, $\gamma = 90^\circ$.

Eine Analyse der Abstandsbeziehungen der Differenzdaten mit Hilfe der sogenannten Patterson-Funktion war nicht möglich. Hierbei wird durch Fourier-Transformation mit den Quadraten der Strukturfaktoramplituden $F(h,k,l)^2$ eine Verteilung der Abstandsvektoren zwischen einzelnen Atomen in der Einheitszelle berechnet, wobei die Abstandsvektoren vom Ursprung der Einheitszelle ausgehend dargestellt werden. Ein Peak in der Darstellung der Patterson-Funktion repräsentiert somit den Abstand zwischen zwei Atomen, wobei die Intensität des Peaks proportional zu der Anzahl der Elektronen der jeweiligen Atome gewichtet ist (Blundell und Johnson, 1976). Die Abstände von Schweratomen sollten sich daher in der Patterson-Darstellung deutlich hervorheben. Bei der erzielten Auflösung des Experiments von $9,5 \text{ \AA}$ konnten in der Patterson-Darstellung allerdings keine getrennten Peaks aufgelöst werden. Zum Vergleich wurden Patterson-Darstellungen von Modelldaten berechnet, wobei ein oder zwei Quecksilberatome an verschiedenen Orten in der Einheitszelle positioniert wurden. Auch hier zeigte sich, daß eine Auflösung der Peaks der

korrespondierenden Abstandsvektoren erst bei einer Auflösung besser als 5 Å erreicht werden konnte.

Der Vergleich der Strukturfaktoramplituden der Röntgendiffraktion und der Bildverarbeitung elektronenmikroskopischer Aufnahmen ergab für Rhodopsin niedrigere Intensitätsverhältnisse als die entsprechenden Werte für Bacteriorhodopsin. Eine mögliche Ursache hierfür stellt die schlechtere Stapelung der tubulären Rhodopsinkristalle im Vergleich zu den bR-Kristallen der Purpurmembran dar, was zu einer erhöhten Untergrundstreuung bzw. einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis führt. Daher wurden die Strukturfaktoramplituden der nicht markierten Rhodopsinmessung auf die Amplituden der Referenzdaten aus der Elektronenmikroskopie skaliert. Anschließend wurden die Datensätze der MB-markierten Probe mit denselben Skalierungsfaktoren multipliziert. Die Strukturfaktoramplituden vor bzw. nach Skalierung sowie die daraus resultierenden Differenzen sind in Tabelle 4.4 zusammengestellt. Abbildung 4.15 zeigt die resultierende Fourier-Differenzdichte nach Skalierung.

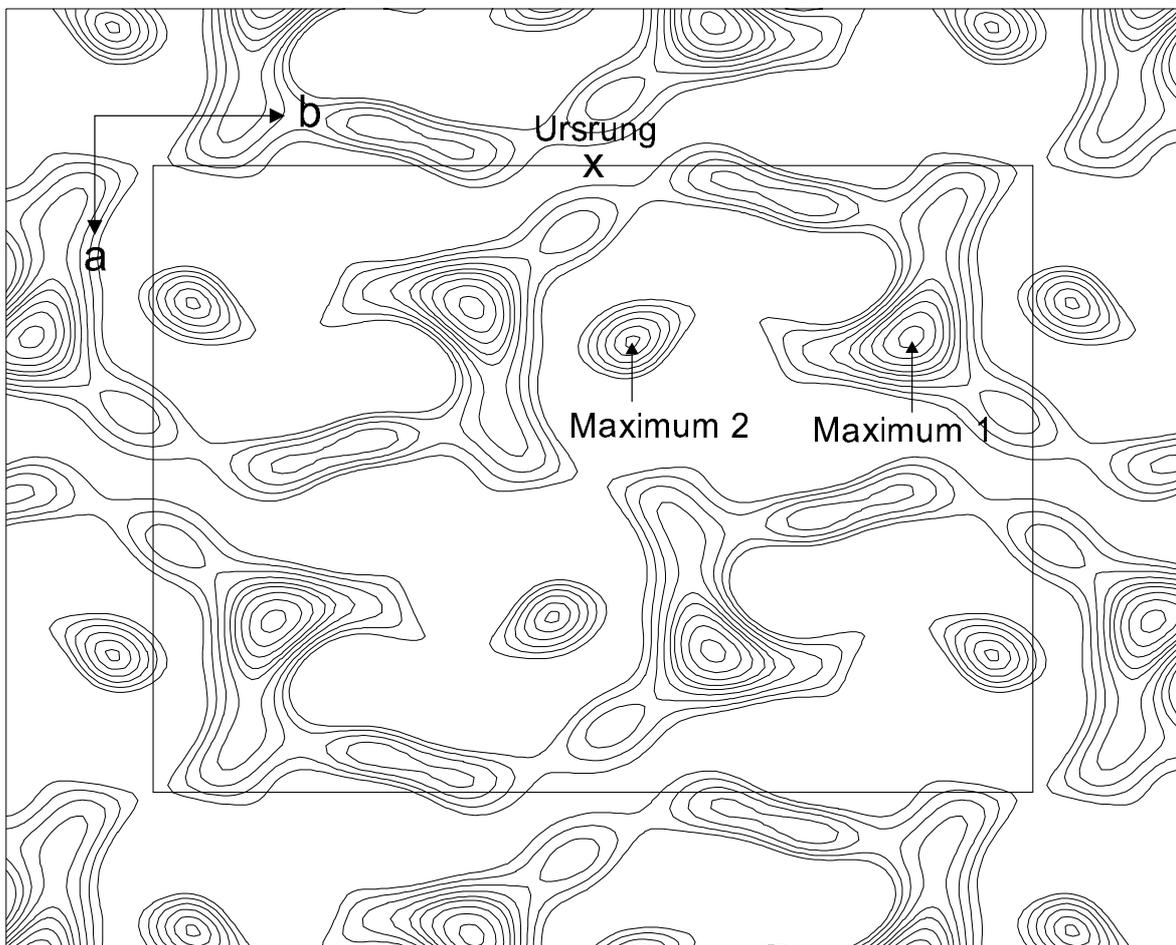


Abbildung 4.15: Differenzdichteverteilung der Rhodopsinprobe K12-2 nach Skalierung. Dargestellt sind die positiven Höhenlinien in äquidistanten Abständen zwischen 0 und 95 %. Die Position der beiden Hauptmaxima (Maximum 1 und 2) und der Nebenmaxima wird durch die Skalierung nicht beeinflusst. Das Kreuz kennzeichnet den Koordinatenursprung der Einheitszelle (weitere Erläuterungen siehe Text).

Das Hauptmaximum der Differenzdichte (Maximum 1) in der Nähe der Helix 3 hebt sich nach Skalierung deutlicher von den Nebenmaxima ab. Das Maximum 2 nahe den Helices 1 und 2 weist nach wie vor eine ca. 30 % höhere Dichte als die übrigen Nebenmaxima auf. Die Skalierung der Amplituden führt nicht zu einer Verschiebung der Position der Haupt- bzw. Nebenmaxima. Die Tatsache, daß ferner im Zuge der Skalierung keine zusätzlichen Dichtemaxima erzeugt werden, ist ein wichtiger Beleg für die Anwendbarkeit der Skalierung. Eine willkürliche Skalierung selbst einzelner Reflexe führte dagegen stets zum Auftreten weiterer Maxima oder zu teils drastischen Verschiebungen der vorhandenen Maxima.

Die relativen Koordinaten der Markerpositionen in der Differenzdichteverteilung lassen sich mit hoher Genauigkeit in Bezug zum Ursprung der Einheitszelle bestimmen und sind in Tabelle 4.5 für beide unabhängigen Messungen zusammengefaßt. Der Koordinatenursprung der Einheitszelle ist in Abbildung 4.15 durch ein Kreuz gekennzeichnet (die Darstellung der Elektronendichteverteilung mit einer relativen Verschiebung entlang der Gitterachse b in allen gezeigten Abbildungen wurde gewählt, um den Vergleich der Daten mit der Darstellung der Elektronendichte von Krebs et al. (1998) in Abbildung 1.6 zu erleichtern).

Die Position der Schweratommarker wurde durch ein Refinement der experimentell ermittelten Strukturfaktoramplituden der Marker (ΔF -Werte) gegen einen Modelldatensatz überprüft. Der Modelldatensatz bestand aus zwei Quecksilberatomen, die an verschiedenen Orten in der Einheitszelle positioniert wurden. Anschließend wurden die Differenzen zwischen den modellierten und experimentellen Strukturfaktoramplituden unter Variation der Lage der Schweratome minimiert. Wurden die aus den Fourier-Differenzmessungen bestimmten Koordinaten der Schweratome als Startposition verwendet, kam es im Zuge des Refinements nur zu einer geringen Verschiebung der Schweratompositionen. Ein Refinement mit willkürlichen Koordinaten als Startwert führte dagegen zu Endwerten, die sowohl weit von den Startpositionen als auch von den Positionen der experimentell beobachteten Differenzmaxima entfernt lagen, und zu völlig unrealistischen Besetzungsverhältnissen, wobei die Besetzung einer Position gegen Null ging. Mit dem Refinement konnte somit gezeigt werden, daß die gefundenen Differenzmaxima in Einklang stehen mit einer Verteilung von Quecksilberatomen an den entsprechenden Positionen.

	Zuordnung	relative Koordinaten	Messung 1	Messung 2
Maximum 1	C140	x/a	0,280 (0,294)	0,269 (0,255)
		y/b	0,363 (0,369)	0,363 (0,373)
Maximum 2	C316	x/a	0,291 (0,271)	0,299 (0,309)
		y/b	0,044 (0,049)	0,048 (0,019)

Tabelle 4.5: Relative Koordinaten x/a bzw. y/a der Markerpositionen ermittelt aus zwei unabhängigen Messungen. Die in den Klammern angegebenen Werte repräsentieren jeweils die relativen Koordinaten, die aus dem Refinement erhalten wurden. Die Werte für x bzw. y entsprechen den Abständen der Maxima vom Koordinatenursprung entlang der Gitterachsen a bzw. b in Å.

Die getroffene Zuordnung der Differenzdichtemaxima zu den markierten Aminosäuren C140 bzw. C316 kann durch die Überlagerung der Differenzdichte mit der 2D-Projektion der Elektronendichte des nicht markierten Rhodopsins veranschaulicht werden (Abbildung 4.16). Die Elektronendichte des nativen Rhodopsins wurde unter Verwendung der Referenzdaten aus der Elektronenmikroskopie mit einer Auflösung von 7 Å berechnet (Abschnitt 3.4.5). In einem der vier Rhodopsinmoleküle ist wiederum die Lage der Transmembranhelices gekennzeichnet. Die Position der gefundenen Dichtemaxima in Relation zu der Orientierung und Neigung der Transmembranhelices wird in Abschnitt 4.5.6 ausführlich diskutiert.

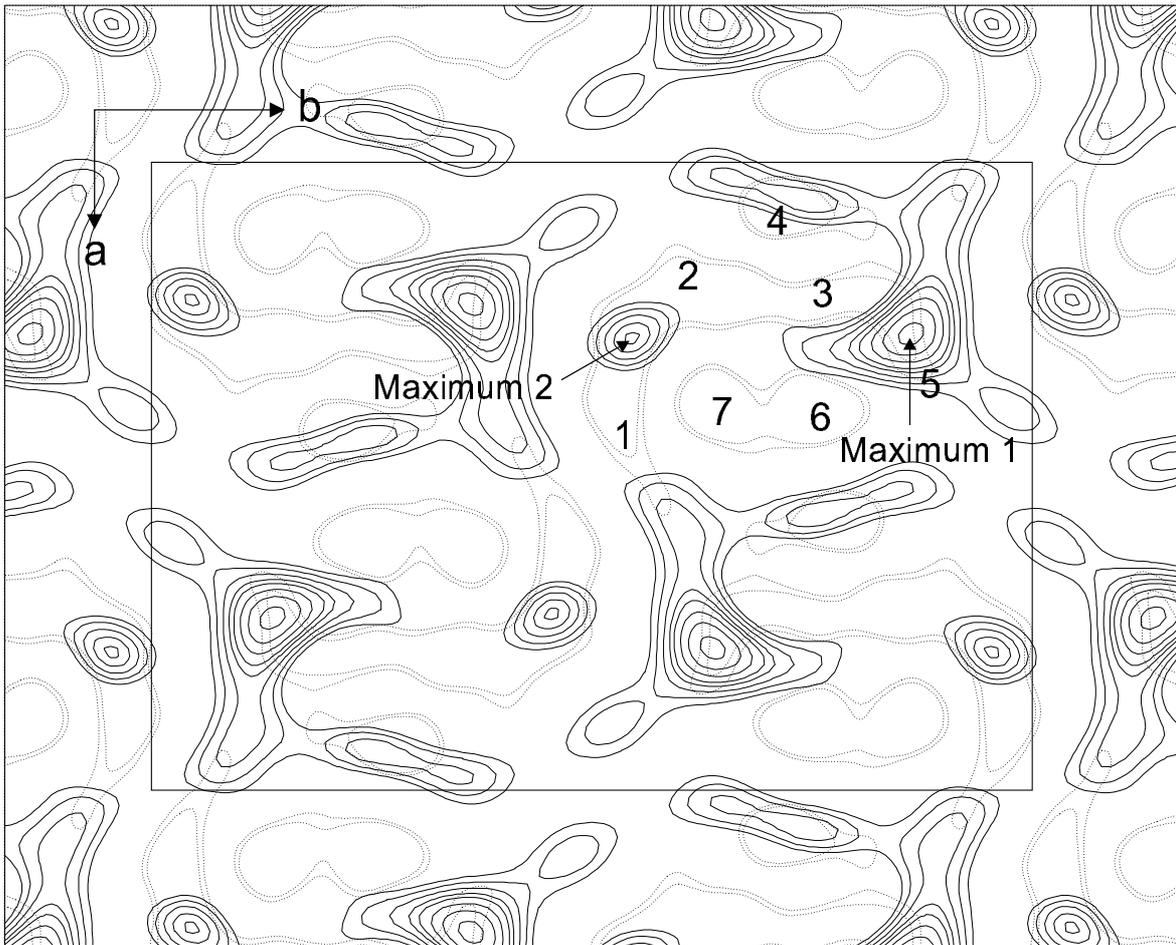


Abbildung 4.16: Überlagerung der Differenzdichte (durchgezogene Linien, Höhenlinien in äquidistanten Abständen von 0-95 %) mit der Proteinstruktur des nativen Rhodopsins (gepunktete Linien, zur besseren Übersichtlichkeit sind nur die ersten beiden Höhenlinien dargestellt). Die Elektronendichte des nicht markierten Proteins wurde mit einer Auflösung von 7 Å unter Verwendung der Referenzdaten aus der Elektronenmikroskopie berechnet. Die höchsten Differenzdichten liegen in der Nähe der Helix 3 bzw. der Helices 1 und 2. Schwächere Nebenmaxima liegen neben Helix 4 bzw. außerhalb der Elektronendichteverteilung des Rhodopsins und kommen als Positionen der Schweratommarker nicht in Frage.

4.5 Diskussion

4.5.1 2D-Kristallisation von Rhodopsin

Zur Durchführung von Röntgendiffraktionsexperimenten an multilamellaren Stapeln von 2D-Kristallen werden homogene Präparationen im mg-Bereich benötigt. Die Herstellung kristalliner Proben, die diese Voraussetzungen erfüllten, erfolgte durch Optimierung der von Krebs et al. (1998) beschriebenen Dialysetechnik. Das Verfahren basiert auf der Solubilisierung von Rinderrhodopsin in LDAO und anschließender Reduktion der Detergenkonzentration durch Dialyse, wobei bereits ohne weitere Lipidzugabe tubuläre Kristalle und in geringerem Maße kristalline Membranfragmente neben einem relativ hohen Anteil ungeordneter Proteinaggregate erhalten werden. Die Modifikationen der Dialysebedingungen wie die

Erhöhung der Konzentration an Oxidationsschutzmitteln und der Zusatz von organischen Lösungsmitteln führten zu einer Verbesserung der Probenqualität durch eine deutliche Verminderung der Proteinaggregate gegenüber den kristallinen Membranstrukturen. Die Rekonstitution von Rhodopsin in Gegenwart selbst von geringen Mengen an Cholesterin (2:1 mol/mol Cholesterin/Rhodopsin) unterstützte zusätzlich die Ausbildung kristalliner Strukturen im Verhältnis zu den Proteinaggregaten und erhöhte vor allem die Reproduzierbarkeit der Kristallisationsexperimente. Die Manipulation anderer Dialyseparameter wie z.B. pH-Wert, Temperatur und Dauer der Dialyse führten dagegen in der Regel zu einer stärkeren Proteinaggregation.

Die Kristallisation von Membranproteinen ist ein komplexer Prozeß und bislang theoretisch nur wenig verstanden (Kühlbrandt, 1992; Schertler, 1999). Daher ist der Einfluß der einzelnen Parameter schwierig zu beurteilen. Prinzipiell beruht die Ausbildung zweidimensionaler Proteinkristalle auf der Reorientierung eines Membranproteins in seiner nativen bzw. künstlichen Umgebung zu geordneten Strukturen. Im Rahmen von Rekonstitutionsexperimenten werden Membranproteine dabei zunächst unter Verwendung geeigneter Detergenzien aus der nativen Lipidumgebung herausgelöst und anschließend in eine künstliche Lipiddoppelschicht inkorporiert. Eine große Rolle spielen dabei die komplexen Wechselwirkungen der Proteine mit den Lipiden der nativen bzw. künstlichen Membranumgebung sowie den Detergenzmolekülen, wie allein das Beispiel unterschiedlicher Photorezeptormembranen deutlich macht: Corless et al. (1982) gelang erstmals die zweidimensionale Kristallisation von Rhodopsin aus Froschaugen durch Extraktion von Lipiden der ROS-Membran unter Verwendung von Tween-Detergenzien. Die Optimierung des Verfahrens ermöglichte schließlich die Strukturbestimmung von Rhodopsin aus Froschaugen bei niedriger Auflösung (Schertler und Hargrave, 1995; Unger et al., 1997). Mit Rhodopsin aus Rinderaugen konnten dagegen unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen keine stabilen 2D-Kristalle erhalten werden (Dratz et al., 1985). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit an der Verwendung des Detergens LDAO in Anlehnung an die Arbeiten von Krebs et al. (1998) zur Kristallisation des Rinderrhodopsins festgehalten (Kristallisationsexperimente, in denen unter sonst identischen Dialysebedingungen lediglich LDAO durch OG oder β -DM ausgetauscht wurde, führten zu keinem positiven Ergebnis. Diese Experimente zeigten, daß die Verwendung anderer Detergenzien die Entwicklung eines völlig neuen Dialysesystems erfordert hätte).

Bei der Solubilisierung, Reinigung und Rekonstitution von Membranproteinen zur Herstellung von 2D-Kristallen stellt das Lipid-Protein-Verhältnis einen kritischen Parameter dar. Sowohl eine unzureichende Delipidierung als auch eine übermäßige Entfernung nativer Lipide können den Kristallisationsprozeß negativ beeinflussen. Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß möglicherweise auch spezifische Lipid-Protein-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle bei der Kristallisation spielen können. Daher wurde die Reinigung von Rhodopsin aufbauend auf der Methode von Krebs et al. (1998) unter möglichst standardisierten Bedingungen durchgeführt. Dennoch wiesen kristalline Präparationen, die unter identischen Bedingungen hergestellt wurden, häufig erhebliche Schwankungen in Bezug auf die Zusammensetzung zwischen kristallinem und aggregiertem Material auf. Eine Erklärung hierfür stellt die hohe Variabilität des biologischen Ausgangsmaterials dar. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Lipidzusammensetzung der ROS-Membran von Parametern wie der Ernährung und der durchschnittlichen Lichtintensität abhängt (Fliesler und Anderson, 1982; Lamba et al., 1994). Diese Variabilität erfordert daher einerseits einen enormen Aufwand für eine Analyse der Lipidzusammensetzung im Ausgangsmaterials bzw. nach der Proteinreinigung und erschwert andererseits die Beurteilung der Modifikation einzelner Kristallisationsparameter. Die Heterogenität der N-terminalen Oligosaccharidseitenketten sowie ein kleiner Anteil phosphorylierter Rhodopsinmoleküle stellen weitere Variablen im Ausgangsmaterial dar (Hargrave und McDowell, 1992).

Untersuchungen des Fluoreszenzenergie transfers zwischen Tryptophanseitenketten des Rhodopsins und ungesättigten Cholesterinderivaten in ROS-Membranen deutet auf eine definierte Bindestelle von Cholesterin in der Membranregion des Proteins hin, wobei allerdings die Bedeutung dieser spezifischen Bindung für die Struktur und/oder Funktion des Rhodopsins völlig ungeklärt ist (Albert et al., 1996). Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente führte die Verwendung selbst geringer Mengen Cholesterin, wie bereits oben erwähnt, zu einer deutlichen Verbesserung der Kristallisationsergebnisse. Eine Erklärung hierfür ist möglicherweise der Einfluß der spezifischen Bindung von Cholesterin auf die Stabilität des Rhodopsins, weshalb die Entfernung von Cholesterin im Zuge der Proteinreinigung zu einer verstärkten Aggregation führen könnte. In weiteren Experimenten wurde der Einfluß nativer Lipide der ROS-Membran sowie verschiedener exogener Lipide auf die Kristallisation untersucht. Die Rekonstitution von Rhodopsin in Gegenwart von nativen ROS-Lipiden und/oder exogenen Lipiden selbst bei niedrigen Lipid-Protein-Verhältnissen (z.B. 5:1 mol/mol) führten jedoch bevorzugt zur Ausbildung von Lipid-Protein-Vesikeln. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Schertler et al. (1993) bzw. Unger und Schertler (1995). Auch hier führte die Rekonstitution von Rinderrhodopsin mit Phosphatidylcholin bei einem Lipid-Protein-Verhältnis von 25:1 (mol/mol) zur Bildung von Vesikeln, auf deren Oberfläche sich vereinzelt kristalline Areale mit $p222_1$ -Symmetrie von relativ niedriger Qualität befanden. Derartige Präparationen sind allerdings für Röntgendiffraktionsexperimente an multilamellaren Filmen von 2D-Kristallen unbrauchbar, da der Anteil des kristallinen Materials zu gering ist.

Mit Ausnahme des Cholesterins führten die Rekonstitutionsexperimente mit Lipiden somit nicht zu einer Verbesserung der Probenqualität. In weiteren Experimenten muß der mögliche Einfluß spezifischer Lipide der nativen Membranumgebung näher untersucht werden. Die Frage hierbei ist, ob auf Grund des hohen Anteils der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der ROS-Membran (Daemen, 1973; Fliesler und Anderson, 1982) neben Cholesterin möglicherweise weitere spezifische Wechselwirkungen zwischen einzelnen nativen Lipiden und Rhodopsin bestehen. Die Untersuchung dieser Fragestellung erfordert allerdings den selektiven Nachweis der Lipid-Protein-Wechselwirkung, die Isolierung der entsprechenden Lipide sowie eine große Anzahl von Rekonstitutionsexperimenten bei unterschiedlichen stöchiometrischen Verhältnissen. Im Hinblick auf die Röntgendiffraktionsexperimente muß dabei zusätzlich die Eignung einer Probe zur Herstellung multilamellarer Filme von 2D-Kristallen berücksichtigt werden. Die Herstellung dieser Filme erwies sich allerdings als äußerst schwierig (vgl. Abschnitt 4.4.2). Da nur in wenigen Fällen stabile multilamellare Filme erhalten werden konnten, war die Charakterisierung der Proben mittels Röntgendiffraktion allein nahezu unmöglich. Eine Untersuchung des Einflusses bestimmter Lipide auf die Kristallisation erfordert daher zusätzlich eine Charakterisierung der Proben mittels hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie.

Kürzlich wurde in der Literatur erstmals die Herstellung dreidimensionaler Rhodopsinkristalle beschrieben (Okada et al., 2000). Das Verfahren beruht auf der Kristallisation von Rhodopsin nach der sogenannten "hanging-drop"-Methode in Gegenwart von Zinkacetat, Heptan-1,2,3-triol (HPTO) und Nonyl- β -D-glucopyranosid (NG). In dem HPTO/NG-Mischsystem erhöht selbst eine geringe Konzentration von HPTO (0,55-0,75 %) entscheidend die Stabilität und Qualität der 3D-Kristalle. Die Autoren vermuten, daß sich HPTO hierbei in die Detergenshülle um die Transmembranregion des Rhodopsins einlagert. Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente führte vor allem die Verwendung von 2,5 % (v/v) Isopropanol bzw. MPD zu einer Verbesserung der 2D-Kristalle von Rhodopsin. Vermutlich üben die kleineren Alkohole einen ähnlichen Effekt auf die Kristallisation aus, wie das HPTO. Die Natur dieses Effekts ist allerdings unklar. Möglicherweise füllen die kleinen organischen Moleküle Lücken zwischen der hydrophoben Oberfläche der Membranproteine und den sperrigeren Detergenmolekülen (Kühlbrandt, 1988). In der Literatur wird weiterhin ein Einfluß organischer, in der

Regel amphiphiler Substanzen wie MPD oder HPTO auf die Deformierbarkeit der Protein-Detergens-Mischmizellen diskutiert, wodurch der Einbau des Membranproteins in den Kristall erleichtert werden könnte (Kühlbrandt, 1988; Garavito et al., 1986).

4.5.2 Schweratommarkierung der 2D-Kristalle

Die Reaktivität der Cysteinreste in Rhodopsin wurde in früheren Arbeiten bereits ausgiebig charakterisiert. Im Dunkelzustand sind unter milden Reaktionsbedingungen lediglich zwei Cysteine für milde sulfhydrylspezifische Reagenzien zugänglich; die Umsetzung weiterer Cysteinreste erfolgt erst nach Belichtung oder unter sehr viel aggressiveren Reaktionsbedingungen. Auf der Basis der Reaktivität gegenüber hydrophoben bzw. hydrophilen Reagenzien und der Analyse von Restriktionsfragmenten des markierten Rhodopsins ist allgemein akzeptiert, daß es sich bei den reaktiven Cysteinresten um die cytoplasmatischen Aminosäuren C140 bzw. C316 handelt (De Grip und Daemen, 1982).

Der Verlauf der Reaktion von PCMB mit Rhodopsin in nativen ROS-Membranen ist aus der Literatur wohl bekannt und führt ohne Denaturierung des Proteins zur Umsetzung von zwei Cysteinresten (De Grip et al., 1975; De Grip und Daemen, 1982). Robertson et al. (1974) kamen unter Verwendung radioaktiv markierter PCMB-Derivate zu einem übereinstimmenden Ergebnis. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Schweratommarkierung der 2D-Kristalle von Rhodopsin führte zu einem Einbau von 1,6-2,1 Molekülen MB pro Rhodopsin ohne Verlust der Absorption bei $\lambda = 498$ nm in Einklang mit der vorliegenden Literatur. Der Nachweis der Markerposition ist auf Grund der Absorptionsmaxima von PCMB bzw. gebundenem MB im UV-Bereich nahe der Proteinbande und der Labilität der Komplexverbindung zwischen dem Schwefel- bzw. Quecksilberatom gegenüber oxidativen Einflüssen mittels Proteinrestriktion und gelelektrophoretischer Analyse der resultierenden Fragmente nicht möglich. Die charakteristische Umsetzung von zwei Cysteinresten mit PCMB im Dunkeln verläuft jedoch analog zur Reaktion mit sulfhydrylspezifischen Farbstoffen, deren Bindestellen auf Grund ihrer Fluoreszenzeigenschaften mittels Restriktionsanalysen eindeutig nachweisbar sind (De Grip und Daemen, 1982; siehe auch Abschnitt 5.3.2). Dies läßt den Schluß zu, daß die Umsetzung der 2D-Kristalle mit PCMB ebenfalls selektiv an den Positionen C140 und C316 erfolgte.

4.5.3 Elektronenmikroskopische Charakterisierung der 2D-Kristalle

Die Reduktion der Anteile an Proteinaggregaten durch Optimierung einzelner Präparationsparameter konnte mit Hilfe elektronenmikroskopischer Übersichtsaufnahmen dokumentiert werden. Die Analyse der Gitterparameter sowie der Qualität der 2D-Kristalle erfolgte mittels hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie. (Präparationen mit einem hohen Vesikelanteil wurden bei diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt, da sie für die Herstellung multilamellarer Filme unbrauchbar waren.) Alle untersuchten Präparationen enthielten sowohl tubuläre Kristalle unterschiedlicher Länge als auch Membranfragmente, wobei die tubulären Kristalle in der Regel häufiger auftraten. Unterschiede zwischen beiden Kristallformen in Bezug auf die Gittereigenschaften bzw. -qualität konnten nicht festgestellt werden. Alle untersuchten 2D-Kristalle zeigten deutliche Reflexe bis zu einer Auflösung von 5 Å. Darüber hinaus konnten durchschnittlich bei jeder zweiten Aufnahme unabhängig von der Art der Präparation sogar Reflexe bis zu einer Auflösung von 3,5 Å nachgewiesen werden. Diese Werte belegen eindrucksvoll die hohe Güte der hergestellten 2D-Kristalle. Ein weiterer Beleg für die Qualität der 2D-Kristalle stellt die Aufnahme von Elektronendiffraktogrammen dar. Dies erfordert im Vergleich zur Analyse kryoelektronenmikroskopischer Bilder nochmals besser geordnete Kristalle bzw. größere kristalline Areale. Krebs et al. (1998) konnten erstmals Elektronendiffraktogramme von Rhodopsinkristallen mit $p22_12_1$ -Symmetrie erhalten.

Der überwiegende Teil der dort untersuchten 2D-Kristalle zeigte Reflexe im Bereich bis 8 Å Auflösung, einige wenige sogar bis 3,5 Å Auflösung. Die geringe Zahl hochauflösender Diffraktogramme verhinderte bislang die Strukturbestimmung mittels Elektronendiffraktion, dennoch können Elektronendiffraktogramme selbst bei niedriger Auflösung als Beleg für eine gute Qualität kristalliner Proben angesehen werden (Krebs et al., 1998).

Die Gitterkonstanten der untersuchten 2D-Kristalle variierten im Bereich von $a = 59,1\text{-}62,4$ Å bzw. $b = 83,2\text{-}90,7$ Å, wobei das Verhältnis von b/a mit $1,42 \pm 0,03$ wiederum einen sehr konstanten Wert aufwies. Die niedrigste Phasenabweichung wurde für die Raumgruppe $p22_12_1$ erhalten. Die Gitterparameter entsprachen somit den Werten der von Krebs et al. (1998) beschriebenen orthorhombischen 2D-Kristalle von Rinderrhodopsin. Ein weiteres wichtiges Ergebnis der elektronenmikroskopischen Untersuchungen war die Beobachtung, daß die Schweratommarkierung der 2D-Kristalle weder zu einer signifikanten Veränderung der Gitterparameter noch zu einer Beeinträchtigung der Gitterqualität innerhalb der üblichen Schwankungen führte. Dies ist eine entscheidende Voraussetzung für die Anwendung von Fourier-Differenzmethoden und die Verwendung der elektronenmikroskopischen Phasen zur Auswertung der Röntgendiffraktionsdaten.

4.5.4 Herstellung multilamellarer Filme von Rhodopsinkristallen

Die Eignung der kristallinen Proben zur Herstellung geordneter multilamellarer Filme ist eine Voraussetzung für die Durchführung von Röntgendiffraktionsexperimenten. Ein wichtiger Parameter ist hierbei die Homogenität des Probenmaterials. Von Proben mit einem hohen Anteil an Proteinaggregaten konnten keine brauchbaren Filme erhalten werden. Die Entfernung der Proteinaggregate mittels Dichtegradientenzentrifugation brachte allerdings keine Verbesserung. Es gelang zwar, den Anteil der Proteinaggregate zu reduzieren, die Auftragung der Proben führte jedoch lediglich zur Ausbildung von glasartig transparenten Filmen, die für die Röntgenexperimente völlig unbrauchbar waren. Ebenfalls unbrauchbar waren Proben, die hauptsächlich Lipid-Protein-Vesikel enthielten. Die meisten Rhodopsinproben enthielten tubuläre 2D-Kristalle und in geringerem Maße kristalline Membranfragmente. Das Verhältnis der beiden Kristallformen untereinander hatte keinen nachweisbaren Einfluß auf die Filmbildung, obwohl man sich leicht vorstellen kann, daß sich flächige Membranfragmente wie z.B. die nativen bR-Kristalle der Purpurmembranen besser zu geordneten Stapeln anordnen können, als die relativ langen und dünnen tubulären Kristalle.

Die Optimierung der Parameter der Filmbildung wie z.B. Temperatur, Feuchtigkeit oder Salzkonzentration erwies sich als äußerst problematisch. Proben, die laut elektronenmikroskopischer Übersichtsbilder ein ähnliches Erscheinungsbild aufwiesen, verhielten sich bei der Filmbildung zum Teil völlig unterschiedlich. Daher mußten die Bedingungen der Filmbildung für jede Probe individuell ermittelt werden. Das Trocknen von nativen bR-Kristallen führt zur Ausbildung stabiler Filme, die bei einer konstanten Luftfeuchtigkeit über einen Zeitraum von mehreren Wochen stabil bleiben (Hauss et al., 1990; Krebs et al., 1993; Behrens et al., 1998a). In Experimenten mit Rhodopsinkristallen konnte dagegen kein vergleichbar stabiler Gleichgewichtszustand erreicht werden. Die Filme der Rhodopsinproben wurden kontinuierlich flacher und lösten sich schließlich von der Trägerfolie ab. Selbst bei einer Luftfeuchtigkeit nahe 100 % konnten die Filme nur in wenigen Fällen über einen Zeitraum von mehr als 20 h stabilisiert werden, der die Datenaufnahme mit ausreichender Zählstatistik ermöglichte. Die Ursache hierfür ist unklar und muß weiter untersucht werden, um die Reproduzierbarkeit der Experimente zu erhöhen. Die Filme der Rhodopsinkristalle reagierten weiterhin extrem empfindlich auf Schwankungen der Luftfeuchtigkeit. Die hohe Variabilität der kristallinen Präparationen sowie die geringe Stabilität der Probenfilme macht daher einen qualitativen Vergleich unterschiedlicher Proben an Hand der Röntgendaten nahezu unmöglich.

4.5.5 Datenanalyse

Die Röntgendiffraktionsdaten der Rhodopsinkristalle weisen im Vergleich zu den nativen bR-Kristallen ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis auf. Die Analyse der Rhodopsinkristalle mit hochauflösender Elektronenmikroskopie ergab, daß die einzelnen 2D-Kristalle von Rhodopsin eine deutlich bessere Gitterqualität aufwiesen, als die Röntgendaten erkennen lassen. Daher ist die Qualität der Probenfilme als Ursache für das relativ niedrige Signal-Rausch-Verhältnis der Röntgendaten anzusehen. Es ist dabei nicht auszuschließen, daß das Eintrocknen der Probenfilme die Zerstörung des Kristallgitters verursacht. Ein weiterer Aspekt ist die Überlagerung der Debye-Scherrer Ringe von Reflexen mit ähnlichen S-Werten, die sich bei den gegebenen Gitterkonstanten und der $p22_12_1$ -Symmetrie der Rhodopsinkristalle stärker auswirkt als bei den hexagonalen bR-Kristallen.

Beide Faktoren erschwerten die Untergrundkorrektur und die Anpassung der Reflexintensitäten. Die Modellierung der Untergrundstreuung als Polynom 8. Grades führt dabei zur Einführung eines systematischen Fehlers. Andere Methoden der Untergrundkorrektur, die z.B. auf einer gleichzeitigen Anpassung der Peakintensitäten und des Untergrunds beruhen (Haus et al., 1990), konnten hier wegen der starken Überlagerung der Reflexe jedoch nicht verwendet werden. Die hierzu notwendige Indizierung der Reflexe konnte erst nach Untergrundkorrektur durchgeführt werden. Sowohl bei der Untergrundkorrektur als auch bei der Anpassung der Reflexe wurden die markierte bzw. nicht markierte Probe identisch behandelt. Insgesamt konnte unter Berücksichtigung der Intensitätsverhältnisse aus der Elektronenmikroskopie und der theoretischen Lage der Reflexe die Intensität von 35 Reflexen zugeordnet werden. Die Auflösung des Experiments lag damit bei 9,5 Å. Die Korrelation von 86,6 % zwischen zwei unabhängigen Datensätzen belegt, daß die Daten trotz des niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses und der starken Überlagerung der Reflexe mit ausreichender Zuverlässigkeit ausgewertet werden können. Beide Datensätze zeigen in der Differenzdichteverteilung zwei Hauptmaxima und mehrere um etwa 30 % schwächere Nebenmaxima an nahezu identischen Positionen.

Auf Grund der niedrigen Auflösung des Experiments konnten die Abstandsbeziehungen zwischen den gefundenen Markerpositionen nicht mit Hilfe der Patterson-Funktion analysiert werden. Mit Hilfe des durchgeführten Refinements konnte jedoch gezeigt werden, daß die gefundenen Maxima der Differenzdichte die Lage von Quecksilberatomen an den entsprechenden Positionen in der Einheitszelle realistisch widerspiegelt. Auf Grund der $p22_12_1$ -Symmetrie der Rhodopsinkristalle können die Phasen hier lediglich den Wert 0 oder π besitzen. Die Strukturfaktoren des nativen und markierten Proteins sind dementsprechend kollinear. Daraus folgt, daß sich nach Einführung eines Schweratoms die Phasen nicht oder nur um 180° ändern können. Eine solche Phasenumkehr ist theoretisch vor allem dann möglich, falls die Strukturfaktoren des nativen und markierten Proteins sehr klein sind (Blundell und Johnson, 1976). Anderenfalls führt die Phasenumkehr zu sehr großen Differenzen der Strukturfaktoramplituden, die hier jedoch nicht beobachtet wurden. Die Variation der Phasen wurde daher bei dem Refinement nicht berücksichtigt. Ein weitergehendes Refinement, das auch unter Variation der Phasen die Differenzen zwischen den experimentellen Strukturfaktoren des markierten Proteins und einem Modelldatensatz, der durch Addition eines Schweratommarkers zu den Strukturfaktoren des nativen Proteins generiert wird, war nicht möglich. Hierfür müßte erst ein Programm entwickelt werden, das speziell an das hier vorliegende zweidimensionale Problem angepaßt ist.

Vergleicht man das Verhältnis der normierten Strukturfaktoramplituden der Röntgenmessungen zu den Strukturfaktoramplituden der elektronenmikroskopischen Bildverarbeitung ($F_{(h,k)}^{\text{Röntgen}}/F_{(h,k)}^{\text{EM}}$), so findet man für bR im Durchschnitt ein Wert von ca. 1, für Rhodopsin dagegen einen Wert von 0,25. Eine mögliche Ursache hierfür ist das deutlich niedrigere Signal-Rausch-Verhältnis der Rhodopsindaten auf Grund der schlechteren

Stapelung der Rhodopsinkristalle. Daher wurden die Strukturfaktoramplituden der Röntgenmessungen auf die Strukturfaktoramplituden der Elektronenmikroskopie skaliert. Die Hauptmaxima heben sich nach der Skalierung deutlicher von den Nebenmaxima ab, wobei sich die Positionen der Maxima nicht ändern. In der Bildverarbeitung elektronenmikroskopischer Aufnahmen sind ähnliche Skalierungsverfahren wohl etabliert (Henderson, 1992; Havelka et al., 1995; Schertler et al., 1993; Unger et al., 1997; Krebs et al., 1998). Hierbei wird der durch die Aufnahmetechnik verursachte systematische Abfall der Amplituden korrigiert, wobei die Skalierung auf die Amplituden der Elektronendiffraktion von bR erfolgt.

4.5.6 Die Position der Schweratommarker

Die Loopbereiche besitzen im Vergleich zu den α -helikalen Bereichen der Transmembranregion eine geringere Streukraft. In 2D-Kristallen, deren Aufbau und Zusammenhalt wesentlich von den Wechselwirkungen der Transmembranregion bestimmt wird, können die Loopbereiche zusätzlich eine hohe Flexibilität bzw. Mobilität aufweisen. Dies könnte bei Strukturuntersuchungen mittels Diffraktionsmethoden zu einem Ensemble von Struktur-faktoren führen, von denen bestenfalls ein Mittelwert bestimmt werden könnte, oder die Strukturbestimmung sogar gänzlich unmöglich machen. Die Wahrscheinlichkeit, die Position einer bestimmten Aminosäure mittels Differenzdiffraktionsmethoden zu bestimmen, ist daher um so größer, je geringer die Mobilität der entsprechenden Aminosäure ist. Der Nachweis von zwei diskreten Differenzmaxima nach Schweratommarkierung der Cysteinreste C140 und C316 ist daher ein Beleg dafür, daß die entsprechenden Bereiche auf der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins zumindest in 2D-Kristallen in einem hohen Maß geordnet vorliegen. Dies war insbesondere für die Position der Aminosäure C140 zu erwarten, die nach den bisherigen Kenntnissen über die Struktur des Rhodopsins am Ende der Helix 3 lokalisiert ist (siehe unten). Die hohe Übereinstimmung der Markerpositionen aus zwei unabhängigen Messungen belegt die Stärke der Fourier-Differenzmethode: Trotz eines niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses und einer insgesamt niedrigen Auflösung des Experiments (9,5 Å) konnten zwei Differenzmaxima gefunden werden, die im Bereich der erwarteten Positionen der cytoplasmatischen Cysteinreste C140 bzw. C316 liegen.

Abbildung 4.17 zeigt einen Ausschnitt der Differenzdichteverteilung im Vergleich zu der Proteinstruktur, die mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Referenzdaten berechnet wurde (Abschnitt 3.4.5), und zu der Modellstruktur der Transmembranregion nach Baldwin et al. (1997). Das cytoplasmatische Ende der stark geneigten Helix 3 liegt über der ebenfalls stark geneigten Helix 5. ESR-Untersuchungen legen den Schluß nahe, daß Helix 3 auf Höhe der Aminosäure V138 die Grenzschicht zwischen der Transmembranregion und der wäßrigen Umgebung durchstößt (Farahbakhsh et al., 1995, vgl. Abbildung 1.5). Nach verschiedenen Modellrechnungen auf der Basis der vorliegenden elektronenmikroskopischen Strukturdaten befindet sich die Aminosäure C140 am cytoplasmatischen Ende der Helix 3. Weiterhin ist die Seitenkette von C140 in Richtung des cytoplasmatischen Endes der Helix 5 orientiert und befindet sich somit auf der von der Helix 4 abgewandten Seite der Helix 3 (Baldwin et al., 1997; Pogozeva et al., 1997; Herzyk und Hubbard, 1998).

Das ausgeprägteste Differenzdichtemaximum (Maximum 1), das in den hier durchgeführten Röntgendiffraktionsexperimenten erhalten wurde, ist eindeutig zwischen den cytoplasmatischen Enden der Helices 3 und 5 lokalisiert (Abbildung 4.17). Der maximale Abstand zwischen dem α -Kohlenstoffatom und dem Quecksilberatom des Cystein-MB-Derivats beträgt 4,1 Å (Behrens, 1996). Legt man einen Kreis mit diesem Radius um die Position des Maximums 1, so liegt den Modelldaten zur Folge das α -Kohlenstoffatom von C140 in diesem Kreis. Die Position des Differenzmaximums liegt daher in einem realistischen Abstand zu der theoretischen Position von C140.

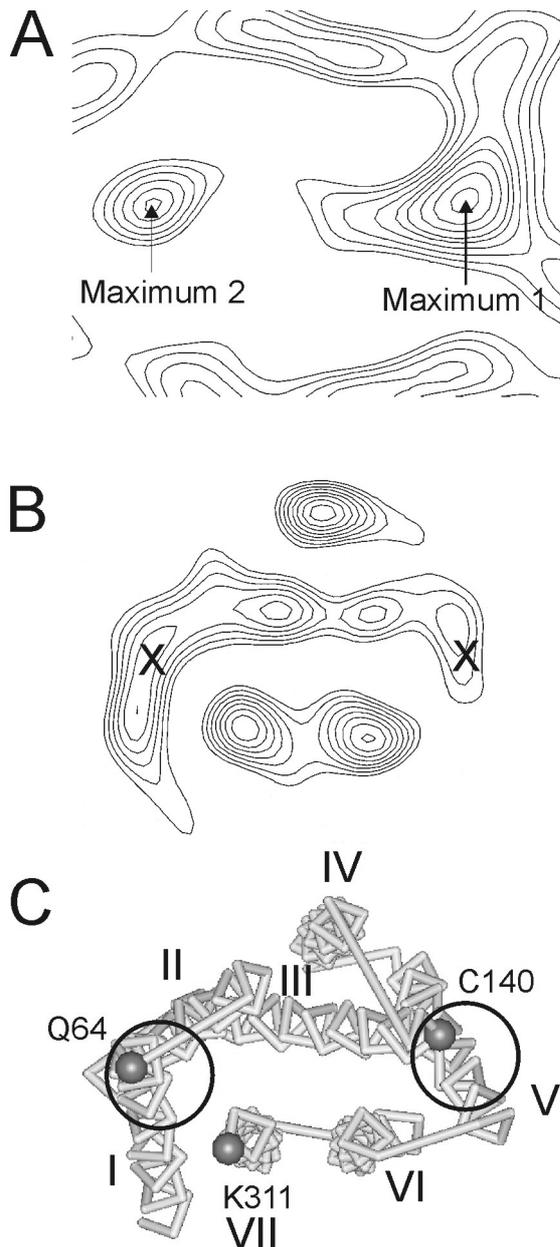


Abbildung 4.17: Ausschnitt der Differenzdichteverteilung bei 9,5 Å Auflösung (A) im Vergleich zu dem korrespondierenden Ausschnitt der Elektronendichte von Rhodopsin mit Blickrichtung auf die cytoplasmatische Seite des Rezeptors (B). Die Proteinstruktur wurde mit einer Auflösung von 7 Å unter Verwendung der Referenzdaten aus der Elektronenmikroskopie berechnet. Die Kreuze kennzeichnen die Lage der beiden Differenzmaxima (rechts: Maximum 1, links: Maximum 2). (C) Modellstruktur der Transmembranregion von Rhodopsin nach Baldwin et al. (1997). Das Modell zeigt die Position der α -Kohlenstoffatome. Die Kreise kennzeichnen den maximalen Abstand von 4,1 Å zwischen dem α -Kohlenstoffatom und dem Quecksilberatom in dem Cystein-MB-Derivat um die Position des Maximums 1 (rechts) bzw. des Maximums 2 (links). C140 befindet sich am cytoplasmatischen Ende der Helix 3 oberhalb von Helix 5 und liegt klar im Bereich des Maximums 1. C316 befindet sich zwischen Helix 7 und den C-terminalen Palmitoylierungsstellen außerhalb der Transmembranregion. Die Position von C316 ist daher in der Modellstruktur nicht zugänglich. Die letzten Aminosäuren der Helices 1 bzw. 7, die in der Modellrechnung noch berücksichtigt werden, sind Q64 bzw. K311. Q64 liegt im Umkreis von 4,1 Å um die Lage des Maximums 2. Folgt man dem Verlauf von Helix 1, so ist die Lage dieses Dichtemaximums ebenfalls konsistent mit der beobachteten Disulfidbrücke zwischen H65C und C316 (Yang et al., 1996a).

Die gefundene Markerposition ist weiterhin in guter Übereinstimmung mit anderen experimentellen Daten. Sie ist beispielsweise konsistent mit der Beobachtung von Farrens et al. (1996), wonach der Abstand von Spinmarkern an V139C in Helix 3 und K248C bzw. T251C in Helix 6 ca. 10-12 Å beträgt. Yu und Oprian (1999) konnten unter geeigneten experimentellen Bedingungen die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen C140 und dem nativen Cysteinrest C222 bzw. dem rekombinanten Cysteinrest Q225C in Helix 5 nachweisen. C222 ist jedoch deutlich tiefer in der Membranregion lokalisiert als C140 und unter milden Reaktionsbedingungen für sulfhydrylspezifische Reagenzien nicht zugänglich; die Umsetzung von C222 mit PCMB ist daher auszuschließen (De Grip und Daemen, 1982; Baldwin et al., 1997). Die Modellkoordinaten der α -Kohlenstoffatome von C222 und Q225 liegen ebenfalls in dem Umkreis von 4,1 Å um das Maximum 1 (die Positionen von C222 bzw. Q225 sind aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abbildung 4.17 nicht dargestellt). Demzufolge ist die

Position des Maximums 1 neben der theoretischen Position von C140 auch konsistent mit den beschriebenen Interaktionen von C140 mit den Aminosäuren C222 bzw. Q225C der Helix 5 und den Abstandsbeziehungen zwischen der Helix 3 und 6. Dies sind weitere Belege für die Zuverlässigkeit der gefundenen Markerposition.

Unmittelbar neben der senkrecht zur Membran stehenden Helix 4 befinden sich zwei stark verschmierte Nebenmaxima in der Differenzdichte. Diese Positionen sind allerdings mehr als 10 Å von der theoretischen Position von C140 entfernt. Selbst bei einer Orientierung der Seitenkette in Richtung der Helix 4 ist dieser Abstand zu groß, um die Lage des Schweratommarkers an C140 zu repräsentieren.

Die Aminosäure C316 liegt zwischen Helix 7 und den C-terminalen Palmitoylierungsstellen. Die letzten Aminosäuren der Helix 7, die in den Strukturmodellen der Transmembranregion von Rhodopsin berücksichtigt werden, sind N310 bzw. K311 (Baldwin et al., 1997; Pogozheva et al., 1997; Herzyk und Hubbard, 1998). Die Position von C316 kann daher lediglich an Hand indirekter Struktur-Funktionsbeziehungen abgeschätzt werden. Nach ESR-Untersuchungen an spinmarkierten Cysteinmutanten kreuzt Helix 7 die Membran-Wasser-Grenzfläche auf Höhe von M309. Weiterhin deuten die ESR-Daten daraufhin, daß die Aminosäuren Y306-R314 in einer α -helikalen Konformation vorliegen (Altenbach et al., 1999b). R314 würde demnach ca. eine Helixwindung oberhalb von K311 liegen. Für das Quecksilberatom des Markers an C316 resultiert daraus ein Abstand von 9 Bindungen zum α -Kohlenstoffatom von R314 als letzte Aminosäure der Helix 7, was einem Abstand von maximal ca. 12 Å entspricht.

Das zweitstärkste Differenzmaximum (Maximum 2) befindet sich ca. 10 Å vom Zentrum der Helix 7 entfernt in der Nähe des cytoplasmatischen Endes von Helix 1 (Abbildung 4.17). Im Umkreis von 4,1 Å um dieses Maximum liegt das α -Kohlenstoffatom von Q64. Q64 ist die letzte Aminosäure der Helix 1, die in den Strukturmodellen der Transmembranregion berücksichtigt wird. Yang et al. (1996a) konnten unter geeigneten experimentellen Bedingungen in der Rhodopsinmutante H65C eine Disulfidbrücke zwischen H65C und C316 nachweisen. Die Autoren konnten an Hand der Wechselwirkungen von Spinmarkern an beiden Cysteinresten ferner belegen, daß sich H65C und C316 im Grundzustand in einem Abstand von ca. 10 Å zueinander befinden. Die Lage des Maximums 2 ist somit in guter Übereinstimmung mit dem vermutlichen Abstand von C316 zu Helix 7 und den nach gewiesenen Wechselwirkungen zwischen C316 und Helix 1. Die übrigen deutlich schwächeren Nebenmaxima liegen außerhalb der Proteinstruktur und sind weder konsistent zu den erwarteten Positionen von C140 bzw. C316 noch zu den strukturellen Einschränkungen durch die in der Literatur beschriebenen Interaktionen der beiden Reste mit anderen Aminosäuren. Sie kommen deshalb als Position der Schweratommarker an C140 bzw. C316 nicht in Frage und sind vermutlich auf Fehler der zugeordneten Reflexintensitäten auf Grund des niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses zurückzuführen.

Die Übereinstimmungen der gefundenen Markerpositionen mit den Modelldaten und den in der Literatur beschriebenen Wechselwirkungen zwischen C140 bzw. C316 und anderen Aminosäureseitenketten in Rhodopsin zeigen, daß die Position des stärksten Differenzmaximums (Maximum 1) der Position der Aminosäure C140 und die Position des zweitstärksten Maximums (Maximum 2) der Position der Aminosäure C316 entspricht. Die niedrigere Differenzdichte des Maximums 2 ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Aminosäure C316 im Bereich zwischen Helix 7 und den C-terminalen Palmitoylierungsstellen eine höhere Mobilität aufweist, als die Aminosäure C140 am Ende der Helix 3. Der Abstand zwischen den Markerpositionen beträgt 27 ± 2 Å und repräsentiert den Abstand zwischen den Sulfhydrylgruppen von C140 und C316. Experimente von Chen und Hubbell (1978) zeigten, daß die Seitenkette von C316 eine höhere Reaktivität gegenüber sulfhydrylspezifischen Reagenzien aufweist als die Seitenkette von C140. Dies ermöglicht prinzipiell die quantitative Umsetzung von C316 mit dem Reagenz 4,4'-Dithiodipyridin bei einer

Temperatur von 4 °C, wobei die Seitenkette von C140 für eine nachfolgende Markierung mit PCMB zugänglich bleibt (Albert et al., 1997; siehe auch Abschnitt 5.3.2). Diese Vorgehensweise eröffnet die Möglichkeit, in zukünftigen Experimenten die Position von C140 nach spezifischer Markierung dieser Aminosäure in 2D-Kristallen zu bestimmen, um die Ergebnisse der hier vorgestellten Experimente zu überprüfen.

Das Modell der cytoplasmatischen Oberfläche von Yeagle et al. (1997) ist zur Zeit das einzige Strukturmodell des Rhodopsins, daß neben der Position von C140 auch die Position von C316 berücksichtigt. Das Modell basiert auf NMR-Untersuchungen von Peptiden mit Aminosäuresequenzen der Loopbereiche in wäßriger Lösung. In dieser Modellstruktur beträgt der Abstand zwischen den Sulfhydrylgruppen von C140 und C316 27,3 Å. Der Vergleich der hier gefundenen Markerpositionen mit diesem Modell ist allerdings nur eingeschränkt möglich. Der Grund hierfür ist, daß die Anpassung der Oberflächenstruktur an die Modellstrukturen der Transmembranregion beispielsweise von Baldwin et al. (1997) nur zum Teil möglich ist. Das cytoplasmatische Ende von Helix 3 befindet sich in der Modellstruktur der cytoplasmatischen Oberfläche im Gegensatz zu dem Modell der Transmembranregion deutlich näher an Helix 4 und ist dementsprechend auch weiter von Helix 6 bzw. der Position oberhalb von Helix 5 entfernt. Die Differenz zwischen der Position von C140 in den beiden Modellen beträgt ca. 10 Å in der Membranebene. Als Ursache für die Unterschiede zu den Modellen der Transmembranregion, die auf elektronenmikroskopischen Strukturdaten vom Grundzustand des Rhodopsins basieren, diskutieren die Autoren die Möglichkeit, daß ihr Modell der cytoplasmatischen Oberfläche möglicherweise Eigenschaften der Struktur des lichtaktivierten Rhodopsins widerspiegelt (Yeagle et al., 1997).

Der Abstand zwischen der Position des Maximums 1, das in den hier durchgeführten Röntgenexperimenten erhalten wurde, und der Position von C140 im Modell der cytoplasmatischen Oberfläche beträgt ca. 10 Å. Dieser Abstand liegt in der Größenordnung der Entfernungszunahme zwischen Helix 3 und Helix 6 von 12-15 Å auf 20-25 Å, die während der Lichtaktivierung von Rhodopsin beobachtet wurde (Farrens et al., 1996). Im Modell der cytoplasmatischen Oberfläche liegen die α -Kohlenstoffatome von C316 und Q64 bzw. H65 ca. 18 Å voneinander entfernt. Diese Abstände sind nicht konsistent mit der in dieser Arbeit gefundenen Markerposition in der Nähe von Helix 1 und der beobachteten Disulfidbrücke zwischen H65C und C316 (Yang et al., 1996a). Die Lichtaktivierung von Rhodopsin führt allerdings zu einer Vergrößerung des Abstands zwischen Spinmarkern an H65C und C316 von ca. 10 auf 15 Å (Yang et al., 1996a). Dies weist wiederum auf eine Übereinstimmung zwischen der Modellstruktur der cytoplasmatischen Oberfläche und dem lichtaktivierten Zustand des Rhodopsins hin. Die hier durchgeführte Bestimmung der Markerpositionen an C140 und C316 erfolgte jedoch im Grundzustand von Rhodopsin. Die Übereinstimmung der Abstände der Markerpositionen und dem Modell der cytoplasmatischen Oberfläche ist daher eher zufällig.

4.5.7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Präparationen von zweidimensionalen Rhodopsinkristallen im mg-Bereich hergestellt, die die Bestimmung der Position von Schweratommarkern an den nativen Cysteinresten C140 und C316 mit Röntgendiffraktionsmethoden ermöglichte. Trotz eines niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses der Meßdaten stimmen die gefundenen Markerpositionen bei einer Auflösung von 9,5 Å gut mit den theoretisch erwarteten Positionen der Aminosäuren C140 bzw. C316 und zahlreichen in der Literatur beschriebenen Interaktionen der beiden Cysteinreste mit anderen Aminosäuren des Rhodopsins überein. Hiermit konnte zum ersten Mal die Position einzelner Aminosäuren an der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins direkt bestimmt werden. Da bislang keine hochauflösenden Strukturdaten von Rhodopsin oder einem anderen G-Protein gekoppelten Rezeptor vorliegen, stellt die hier

dargestellte Technik der Röntgendiffraktion in Kombination mit Fourier-Differenzverfahren eine wertvolle Methode dar, um selbst bei niedriger Auflösung zusätzliche Strukturdetails über diese äußerst bedeutungsvolle Proteinfamilie zu erhalten.

Mittels hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß die hergestellten Mikrokristalle eindeutig Strukturinformation bis zu 5 Å, teilweise sogar bis zu 3,5 Å Auflösung enthielten. Bislang limitierte die Qualität der multilamellaren Filme zweidimensionaler Rhodopsinkristalle die Ergebnisse der Röntgenexperimente. Die Optimierung der Herstellung der Filme kann daher in zukünftigen Experimenten die Auflösung der Röntgendaten und damit die Genauigkeit der Positionsbestimmung deutlich verbessern. Möglicherweise kann die Auflösung der Röntgendaten zusätzlich durch Tieftemperaturmessungen verbessert werden.

Prinzipiell ist mit dieser Methode auch die Untersuchung von Rhodopsinmutanten denkbar. Die Einführung von Cysteinresten in unterschiedlichen Positionen ermöglicht dabei die systematische Analyse der cytoplasmatischen Oberfläche. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt stellt allerdings die hierfür benötigte Menge an rekombinantem Rhodopsin (ca. 3-6 mg Protein pro Kristallisationsansatz) noch einen limitierenden Faktor dar. Eine große Bedeutung für das Verständnis der G-Proteinaktivierung nimmt ferner die Charakterisierung des lichtaktivierten Rhodopsins ein. Hierzu ist die Stabilisierung des MII-Zustands in 2D-Kristallen erforderlich. Die Differenz der Markerposition zwischen dem Grund- bzw. MII-Zustand könnte wertvolle Einblicke in die strukturellen Änderungen während der Rezeptoraktivierung geben.