

## 5 Die Dynamik der cytoplasmatischen Loopbereiche

### 5.1 Einführung

Erst die Lichtaktivierung von Rhodopsin ermöglicht die Bindung und Aktivierung des visuellen G-Proteins Transducin. Der Übergang vom Grundzustand in den lichtaktivierten MII-Zustand muß daher von strukturellen Änderungen an der cytoplasmatischen Oberfläche begleitet sein, die zur Ausbildung der Transducinbindungsstelle im aktivierten Rhodopsin führen. Untersuchungen mit verschiedenen biochemischen und biophysikalischen Methoden geben erste Einblicke in die Natur dieser strukturellen Änderungen (z.B. Sheikh et al., 1996; Farrens et al., 1996; siehe Abschnitt 1.3.5), allerdings liegen bislang noch keine detaillierten Strukturdaten über die cytoplasmatischen Loopbereiche des Rhodopsins vor.

Die Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie eröffnet die Möglichkeit, die Dynamik der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins mit Hilfe von kovalent gebundenen Fluorophoren zu untersuchen. Die Methode beruht auf der linear polarisierten Anregung der Fluorophore mit kurzen Lichtpulsen, wodurch eine Photoselektion erzeugt wird, deren Abbau als Folge der Fluorophorbewegung zeitaufgelöst verfolgt wird. Dadurch erhält man einen Zugang zu der Dynamik der markierten Bereiche auf der Oberfläche und Hinweise auf sterische Einschränkungen durch die Proteinumgebung. Der Vergleich der Fluoreszenzanisotropiekurven unterschiedlicher Photointermediate ermöglicht darüber hinaus eine Aussage über die Änderung der Bewegungsparameter an der Proteinoberfläche in Folge der Lichtaktivierung des Rhodopsins.

### 5.2 Zielsetzung und experimentelle Strategie

Im Rahmen dieser Experimente sollte das Fluoreszenzanisotropieverhalten der cytoplasmatischen Loopbereiche zwischen der Helix 3 und 4 bzw. zwischen Helix 7 und den C-terminalen Palmitoylierungsstellen durch seitenkettenspezifische Markierung der nativen Cysteinreste C140 und C316 untersucht werden. Insbesondere sollten die Änderungen der Anisotropieparameter nach Übergang vom Grundzustand in den lichtaktivierten MII-Zustand studiert werden.

Die Untersuchung des photolabilen Rhodopsins mit Fluoreszenztechniken erfordert die Anregung der Proben mit möglichst geringer Lichtintensität, um eine Photolyse des Rhodopsins zu verhindern. Die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung stellt daher die geeignete Methode zur Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz bzw. Fluoreszenzanisotropie dar, da hierbei bereits mit sehr geringen Anregungsintensitäten ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis erzielt werden kann (Lakowicz, 1999). Eine entsprechende Apparatur wurde von Herrn Matthias Gläsel in der AG Heyn entwickelt, die speziell für die Verwendung von Synchrotronstrahlungsquellen als Anregungslicht ausgelegt war (Gläsel, 2000). Auf diese Weise konnten die Vorteile der Synchrotronstrahlung (hohe Wiederholraten der Anregungspulse bei variabler Wellenlänge) mit den Vorzügen der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (niedrige Anregungsintensität) optimal zur Untersuchung des Rhodopsins kombiniert werden.

Wie bereits in Abschnitt 4 ausgeführt wurde, sind in Rhodopsin unter milden Reaktionsbedingungen lediglich die Cysteinreste C140 und C316 für sulfhydrylspezifische Reagenzien zugänglich (De Grip et al., 1975; De Grip und Daemen, 1982). Experimente von Chen und Hubbell (1978) wiesen außerdem auf Reaktivitätsunterschiede der beiden Reste untereinander hin, wobei die Seitenkette von C316 deutlich reaktiver als die von C140 ist. Dies ermöglicht die selektive Markierung der beiden Positionen in Abhängigkeit von der Wahl geeigneter experimenteller Parameter wie z.B. Temperatur, Reaktionszeit, pH-Wert und Ionenstärke. Das

Gleichgewicht zwischen den Photointermediaten MI und MII ist ebenfalls von den äußeren Bedingungen abhängig, so daß bei sorgfältiger Wahl der experimentellen Bedingungen bevorzugt der lichtaktivierte MII-Zustand erzeugt und stabilisiert werden kann.

Die Fluoreszenzdepolarisation von Fluorophoren, die an Proteine gekoppelt sind, oder nativen Fluorophoren, wie die Seitenkette des Tryptophans, ist ein sehr komplexer Prozeß und führt häufig zu einem multiexponentiellen Abklingverhalten (siehe z.B. Tanaka et al., 1994; Dong et al., 1997; Nishimoto et al., 1998). Bei der Interpretation der Fluoreszenzdaten müssen daher auch Prozesse wie z.B. die unterschiedlichen Formen von Energietransfer auf die Fluoreszenzanisotropie berücksichtigt werden. Die Reduktion der Schiff-Base mit Natriumborhydrid zu N-Retinylopin stellt hierbei eine Möglichkeit dar, Rhodopsinproben unter Ausschluß von Energietransfer zu untersuchen, da hierbei der Chromophor zwar kovalent gebunden bleibt, das Absorptionsmaximum jedoch von  $\lambda = 498 \text{ nm}$  nach  $\lambda = 333 \text{ nm}$  verschoben wird (Bownds und Wald, 1965).

### 5.3 Seitenkettenspezifische Markierung der Cysteinreste C140 und C316

#### 5.3.1 Präparation und Reinigung von Rhodopsin

Als Ausgangsmaterial für die Fluoreszenzexperimente wurden ROS-Membranen aus Netzhäuten von Augen frisch geschlachteter Rinder nach der Standardmethode von Papermaster und Dreyer (1974) bzw. McDowell und Kühn (1977) isoliert (vgl. Abschnitt 4.3.1). Zur Untersuchung der Loopedynamik in Mizellen wurde Rhodopsin in n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (OG) solubilisiert und mittels ConA-Affinitätschromatographie gereinigt. Das Absorptionsverhältnis  $A_{280 \text{ nm}}/A_{500 \text{ nm}}$  nach Reinigung betrug 1,7-1,9 und belegt einen sehr hohen Reinheitsgrad (De Grip, 1982). Entsprechend konnten elektrophoretisch neben Rhodopsin keine weiteren Proteinbestandteile nachgewiesen werden.

#### 5.3.2 Markierung von C140 und C316 mit thiolreaktiven Fluoreszenzmarkern

Die unterschiedliche Reaktionskinetik der cytoplasmatischen Cysteinreste ermöglichte die selektive Markierung von C140 und C316 in ROS-Membranen und OG-Mizellen mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern. Die Position C316 wurde bei niedrigen molaren Verhältnissen zwischen Marker und Rhodopsin bei relativ kurzer Reaktionszeit markiert, während unter diesen Bedingungen die Position C140 nicht umgesetzt wird. Dies führte zwar häufig nur zu einer relativ niedrigen Markierungsstöchiometrie, was jedoch für die Durchführung der Fluoreszenzmessungen mit zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung völlig ausreichend war (Tabelle 5.1). Eine niedrige Markierungsstöchiometrie war sogar für Experimente mit ROS-Membranen vorteilhaft, da hierdurch der Einfluß von Energieübertragung durch Homoennergietransfer zwischen den gebundenen Fluorophoren reduziert wird (siehe Abschnitt 5.6.3).

Zur selektiven Markierung der Position C140 wurde die Seitenkette von C316 zunächst durch Reaktion mit DTP auf Eis blockiert. Der typische Verlauf der Reaktion von Rhodopsin mit DTP in Abhängigkeit von der Temperatur ist in Abbildung 5.1 am Beispiel der OG-Mizellen dargestellt. Auf Eis wird zunächst der reaktivere Cysteinrest C316 quantitativ umgesetzt, wobei die Thiolgruppe von C140 für eine nachfolgende Markierung mit Fluoreszenzmarkern zugänglich bleibt. Erst eine Erhöhung der Temperatur auf 20-25 °C ermöglicht hierbei auch die quantitative Umsetzung der Position C140. Ein weiterer Vorteil der Reaktion liegt darin, daß das am Protein gebundene 4-Thiopyridin im Bereich der Proteinbande absorbiert und die Absorption des  $S_0/S_1$ -Übergangs der verwendeten Fluoreszenzmarker somit nicht überlagert (Grassetti und Murray, 1967).

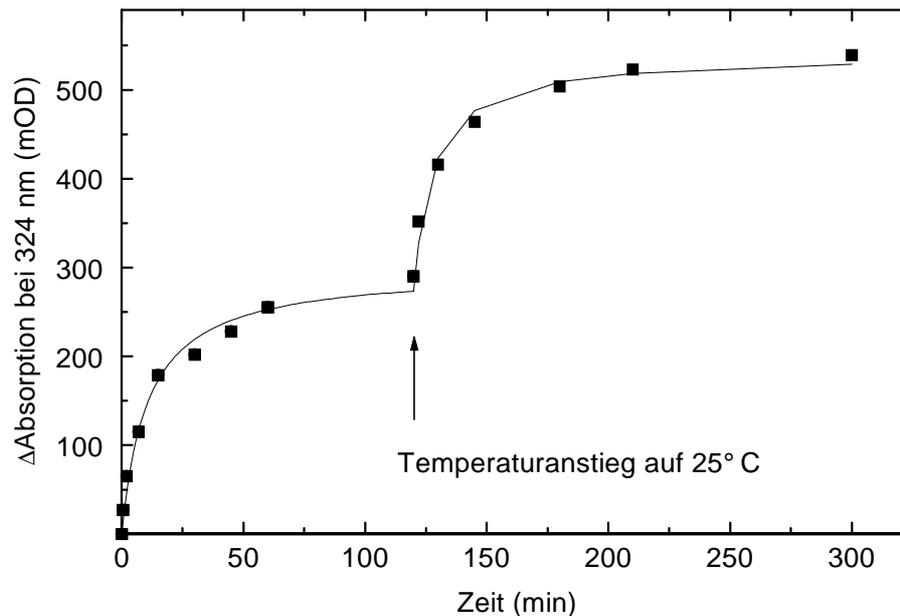


Abbildung 5.1: Zeitverlauf der Reaktion von Rhodopsin mit DTP in OG-Mizellen. Die Reaktion wurde auf Eis durch Zugabe eines 4-fachen Überschusses an DTP gestartet. Der Verlauf der Reaktion wurde an Hand der Absorptionsänderung bei  $\lambda = 324$  nm verfolgt. Nach Umsetzung von einem Cysteinrest (C316) pro Rhodopsinmolekül wurde hier zur Demonstration des Reaktionsverhaltens die Temperatur auf  $25^\circ\text{C}$  erhöht. Erst jetzt erfolgt die Umsetzung der zweiten Gruppe (C140). Bedingungen:  $20\mu\text{M}$  Rhodopsin in  $10\text{ mM}$  HEPES pH 6,9,  $30\text{ mM}$  OG,  $80\mu\text{M}$  DTP.

Im Rahmen der hier durchgeführten Markierungsreaktion wurde die Reaktion mit DTP nach quantitativer Blockierung der Position C316 abgebrochen und anschließend die Position C140 selektiv markiert. Hierzu war in der Regel ein höherer Überschuss an Marker über Rhodopsin nötig, als bei der Markierung der Position C316. Die Reaktionsbedingungen sowie die Ergebnisse der unterschiedlichen Markierungsreaktionen sind in Tabelle 5.1 zusammengestellt. Bei der Nomenklatur der Proben steht die Abkürzung ROS für markiertes Rhodopsin in ROS-Membranen bzw. OG für Rhodopsin in OG-Mizellen gefolgt von der Bezeichnung des selektiv markierten Cysteinrests und der entsprechenden Abkürzung des Markers.

Zum Nachweis der Markerposition wurde das Rhodopsin proteolytisch mit Thermolysin verdaut, das Polypeptidketten auf der N-terminalen Seite von Leucin spaltet. Im Dunkeln entstehen dabei bevorzugt zwei Peptidfragmente mit einer molekularen Masse von ca.  $24\text{--}30\text{ kDa}$  (F1) bzw.  $14\text{--}18\text{ kDa}$  (F2). Das F2-Fragment enthält die C-terminale Region mit der Retinalbindungsstelle, das F1-Fragment die N-terminale Region inklusive der Kohlenhydratseitenketten (Pober und Stryer, 1975; Pober, 1982). Dementsprechend befindet sich C140 im F1-Fragment, C316 dagegen im F2-Fragment, so daß die Fluoreszenz der markierten Fragmente einen eindeutigen Beleg der Markerposition darstellt. Abbildung 5.2 demonstriert die Spezifität der durchgeführten Fluoreszenzmarkierung. Nach Coomassiefärbung sind die Spaltfragmente deutlich zu erkennen (Abbildung 5.2 A, Bahn 3). Wie hier am Beispiel der Probe ROS-C140-AF dargestellt, läßt sich nach selektiver Markierung der Position C140 die Fluoreszenz des Markers lediglich im F1-Fragment nachweisen (Abbildung 5.2 A, Bahn 4). Abbildung 5.2 B zeigt die Fluoreszenz der Spaltfragmente nach Markierung unterschiedlicher Positionen mit Texas Red, Abbildung 5.2 C nach Markierung mit Fluorescein.

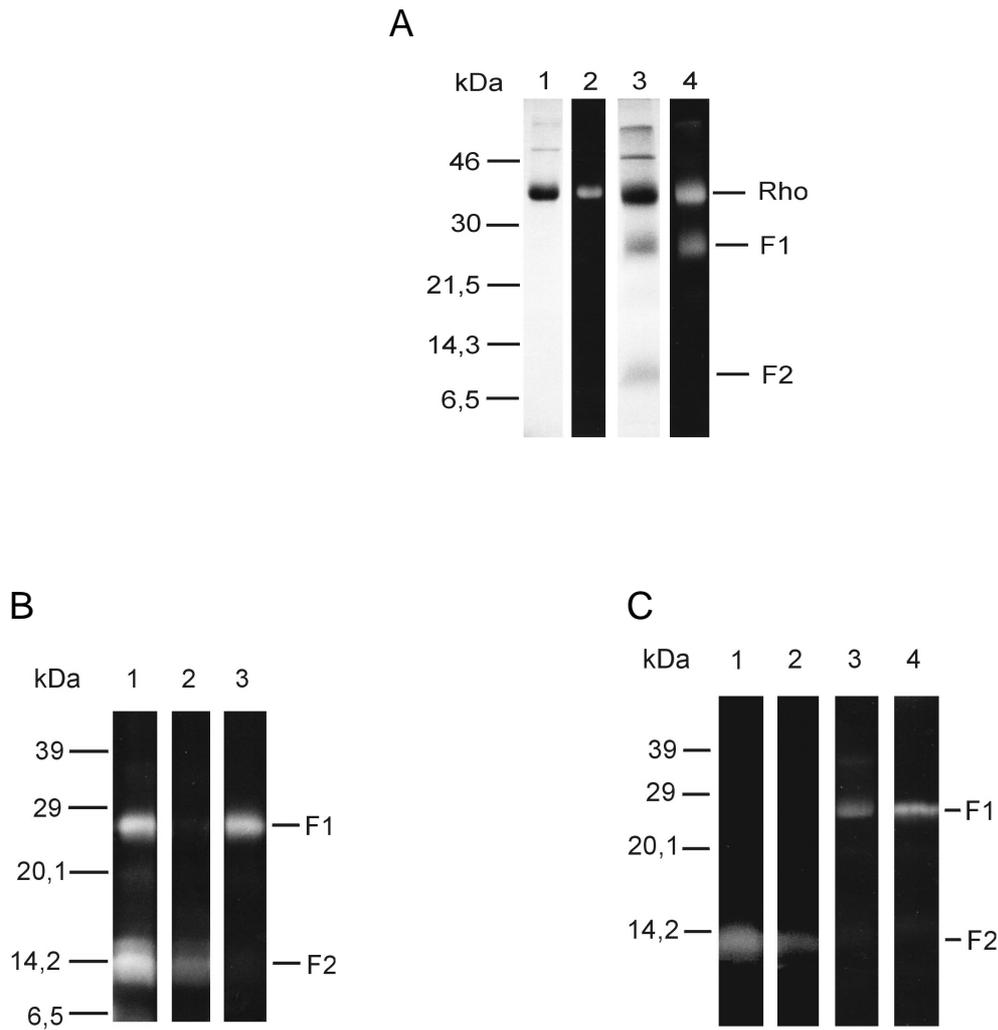


Abbildung 5.2: Nachweis der selektiven Markierung der Cysteinreste C140 und C316. (A) Proteinmuster der Probe ROS-C140-AF vor (Bahn 1 und 2) und nach proteolytischer Spaltung mit Thermolysin (Bahn 3 und 4). Die Abkürzung Rho kennzeichnet die Bande des monomeren Rhodopsins. Nach selektiver Markierung der Position C140 ist die Fluoreszenz des Markers ausschließlich im F1-Fragment nachweisbar. (B) Fluoreszenz der Spaltfragmente von Rhodopsin nach Markierung mit Texas Red in OG-Mizellen. Bahn 1: Markierung der beiden Positionen C140 und C316; Bahn 2: selektive Markierung der Position C316; Bahn 3: selektive Markierung der Position C140. (C) Fluoreszenz der Spaltfragmente von Rhodopsin nach Markierung mit Fluorescein. Bahn 1: selektive Markierung der Position C316 in ROS-Membranen; Bahn 2: selektive Markierung der Position C316 in OG-Mizellen; Bahn 3: selektive Markierung der Position C140 in ROS-Membranen; Bahn 4: selektive Markierung der Position C140 in OG-Mizellen.

Probe	Reaktions- stöchiometrie (mol Marker: mol Rhodopsin)	Reaktionszeit und Abweichungen von den Standardbedin- gungen <sup>(1)</sup>	Markierungs- stöchiometrie  (Molekül Marker pro Rhodopsinmolekül)
ROS-C140-AF	50:1	1,5-4,5 h	0,13-0,5
ROS-C316-AF	10:1	2 h, ohne NaCl	0,15-0,35
ROS-C140-TR	5:1	4,5 h	0,5-0,65
ROS-C316-TR	4:1	2 h, ohne NaCl	0,35-0,5
ROS-C140-AEDANS	50:1	5 h	0,5
ROS-C316-AEDANS	10:1	2 h auf Eis	0,25
ROS-C140-DNZ	10:1	20 h	0,75
ROS-C316-DNZ	5:1	5 h	0,6
OG-C140-AF	25:1	6 h	0,25-0,35
OG-C316-AF	5:1	2 h	0,30-0,36
OG-C140-AF/C316-AF <sup>(2)</sup>	40:1	4 h	1,55
OG-C140-TR	10:1	6 h	0,45-0,75
OG-C316-TR	2:1	2 h auf Eis	0,15-0,35
OG-C140-TR/C316-TR <sup>(2)</sup>	10:1	6h	1,1
OG-C140-AEDANS	50:1	7 h	0,9
OG-C316-AEDANS	5:1	2,5 h auf Eis	0,4
OG-C140-DNZ	10:1	20 h	0,7
OG-C316-DNZ	2:1	3 h	0,2-0,3

(1) Standardreaktionsbedingungen für ROS-Membranen: Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl bei 20 °C; für OG-Mizellen: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl und 30 mM OG bei 20 °C

(2) Die Markierung beider Cysteinreste diente zur Untersuchung des Homoenergietransfers

Tabelle 5.1: Reaktionsbedingungen der Markierung von Rhodopsin mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten sulfhydrylspezifischen Fluorophoren. Angegeben sind die stöchiometrischen Verhältnisse der Reaktionen zwischen Rhodopsin und dem jeweiligen Marker, die Reaktionszeiten sowie gegebenenfalls Abweichungen von den Standardbedingungen. Die angegebenen Bereiche der Markierungsstöchiometrie repräsentieren die Ergebnisse unterschiedlicher Markierungsreaktionen.

## 5.4 Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Fluorophore

### 5.4.1 Absorptions- und Emissionseigenschaften

Abbildung 5.3 zeigt die normierten Absorptions- und Emissionsspektren der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fluorophore. Vor Aufnahme der Spektren wurden die Fluorophore kovalent an Cystein gekoppelt, um den Einfluß der Bindung an die Sulfhydrylgruppe auf die spektralen Eigenschaften zu berücksichtigen (Die Kopplung an Cystein wird im folgenden durch den Buchstaben C gefolgt von der Abkürzung des Markers symbolisiert). Zur Kopplung wurden 50 µM Cystein in 1 mM Tris-HCl pH 7,0 und 150 mM KCl 20 min mit einem 2-fachen Überschuß des jeweiligen Markers bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nicht umgesetztes Cystein bzw. Marker chromatographisch über eine Sephadex G25f-Säule entfernt. Die dargestellten Gleichlichtfluoreszenzspektren wurden von Herrn M. Gläsel (AG Heyn) unter Verwendung einer Doppelmonochromatorapparatur (Kratos Spektrofluorometer

RRS 1000) mit einer Xenon-Bogenlampe als Anregungslichtquelle aufgenommen (Gläsel, 2000). Der Spektralbereich der Apparatur lag zwischen 350 und 750 nm. Die Datenaufnahme erfolgte bei einer Meßgeschwindigkeit von 50 nm/min bei einer spektralen Spaltbreite von 0,5 nm. Die optische Dichte der Proben betrug maximal 0,05 OD. Gleichlichtfluoreszenzspektren der markierten Rhodopsinproben wurden mit der maximalen Meßgeschwindigkeit von 200 nm/min aufgenommen, um den Einfluß der Photolyse auf die Spektren zu minimieren. Die Spektren von C-AF und C-TR zeigen eine geringe Stokes-Verschiebung, was zu einer starken Überlagerung der Absorptions- und Emissionsbanden führt. Die Spektren von C-AEDANS bzw. C-DNZ weisen dagegen eine deutlich niedrigere bzw. keine Überlagerung auf. Die Werte für die entsprechenden Überlagerungsintegrale sind in Tabelle 5.2 aufgeführt.

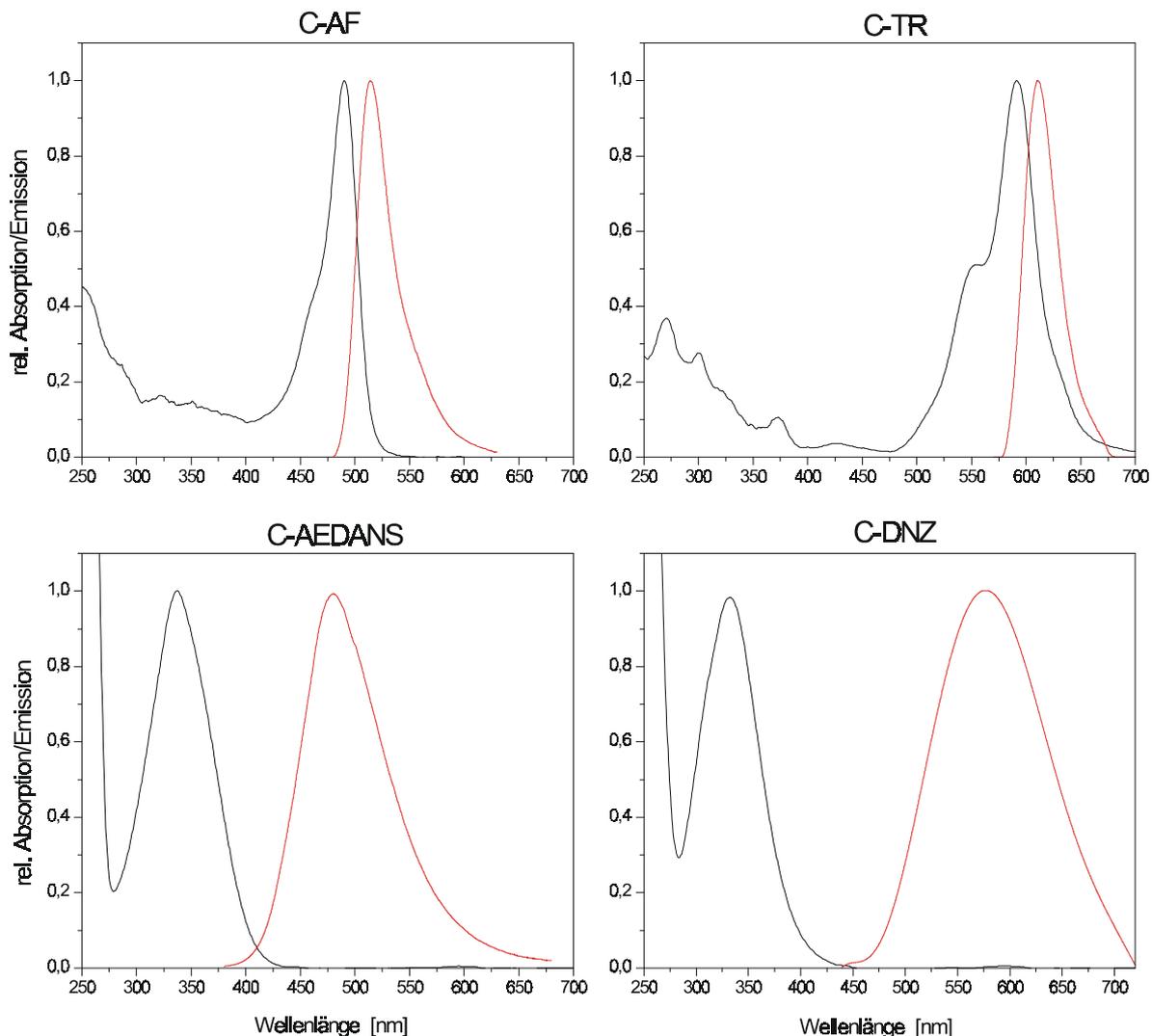


Abbildung 5.3: Normierte Absorptions- und Emissionsspektren der in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore nach Kopplung an freies Cystein.

Die spektrale Überlagerung der Absorptions- und Emissionsbanden der Fluorophore ermöglicht das Auftreten von Homoenergie transfer. Nach Kopplung der Fluorophore an Rhodopsin muß zusätzlich die mögliche spektrale Überlagerung zwischen der Absorptionsbande des Retinalchromophors und der Emissionsbande der Fluorophore berücksichtigt werden. In Abbildung 5.4 sind schematisch die Absorptionsspektren von Rhodopsin im Grund- und

MII-Zustand im Vergleich zu den Emissionsbanden von C-AF bzw. C-TR dargestellt. Im Grundzustand ist eine deutliche Überlagerung zwischen der Retinalbande und der Emissionsbande des Fluoresceins zu erkennen, die nach Photoaktivierung auf Grund der Blauverschiebung der Retinalbande im MII-Intermediat drastisch reduziert wird. Im Fall von Texas Red wird der Energietransfer zum Retinal im MII-Zustand sogar völlig unterbunden.

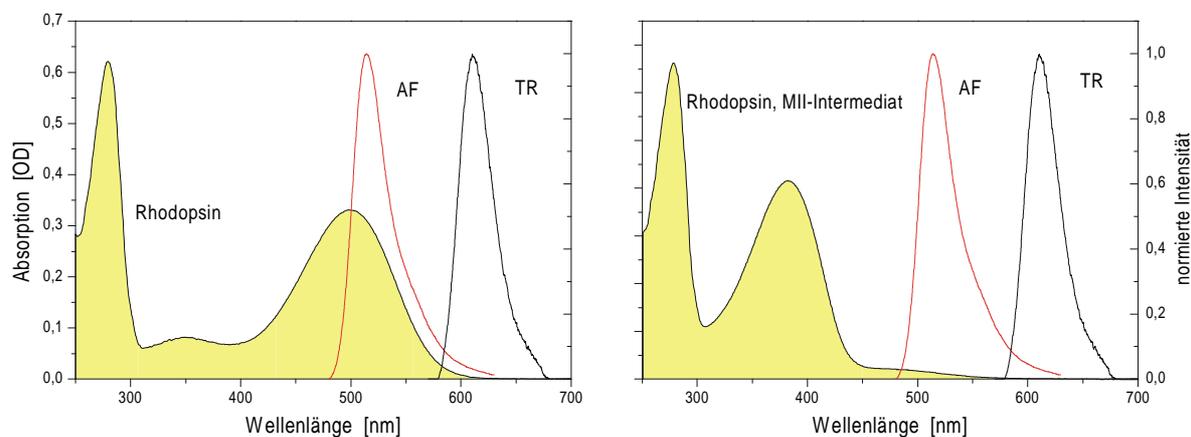


Abbildung 5.4: Absorptionsspektren von Rhodopsin in 10 mM Tris-HCl pH 7,0, 150 mM NaCl und 30 mM OG im Grundzustand (links) und MII-Zustand (rechts). Zur Veranschaulichung der spektralen Überlagerung mit der Emissionsbande der Fluorophore sind zusätzlich die normierten Emissionsbanden von C-AF und C-TR dargestellt. Die Fläche der Rhodopsinspektren ist grau unterlegt.

Durch Vergleich der Spektren in Abbildung 5.3 mit Abbildung 5.4 lassen sich analog die Energietransferverhältnisse zwischen Rhodopsin und den übrigen Fluorophoren abschätzen. Nach Kopplung der Fluorophore an Rhodopsin ist daher das Auftreten von Energietransfer nicht auszuschließen. Die Überlagerungsintegrale zwischen der Retinalbande von Rhodopsin in OG-Mizellen und den unterschiedlichen Emissionsbanden sind ebenfalls in Tabelle 5.2 angegeben.

	IAF	TR	IAEDANS	DNZ
$J / 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ M}^{-1}$	7,3	7,9	0,1	0,0
$J_{\text{Rho}} / 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ M}^{-1}$	24,1	0,6	8,9	12,9

Tabelle 5.2: Überlagerungsintegrale zwischen den Emissionsbanden der verwendeten Fluorophore und den Absorptionsbanden der Fluorophore bzw. des Retinalchromophors. Die Bestimmung des Überlagerungsintegrals  $J$  erfolgte an Hand der Absorptions- und Emissionsspektren der Fluorophore nach Kopplung an freies Cystein. Das Integral  $J_{\text{Rho}}$  bezieht sich auf die Überlagerung der Fluorophoremission mit der Retinalbande in OG-Mizellen. Die relativen Fehler der Überlagerungsintegrale betragen ca. 5 % (Gläsel, 2000).

Die Lage des Emissionsmaximums eines Fluorophors reagiert sensitiv auf die Polarität der Umgebung. Der Vergleich der Emissionsmaxima der markierten Rhodopsinproben mit Gleichlichtfluoreszenzspektren der an Cystein gekoppelten Fluorophore in Methanol-Wassergemischen bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen wiesen auf eine wässrige Umgebung der Fluorophore nach Kopplung an die Proteinoberfläche hin. Quenching-Experimente mit einfach negativ geladenen Iod-Ionen zeigten eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Quencher-Konzentration und belegten somit, daß die Fluorophore an der Oberfläche des Rhodopsins für die Wechselwirkungen mit Iod-Ionen aus der umgebenden Lösung zugänglich waren (Gläsel, 2000).

### 5.4.2 Fluoreszenzanisotropiemessungen an freien Fluorophoren

Zunächst wurden die freien, ungebundenen Fluorophore in wässriger Lösung untersucht, um deren Fluoreszenzdepolarisation zu charakterisieren. Diese Daten wurden benötigt, um den Beitrag der Eigenrotation der Fluorophore zu der komplexen Fluoreszenzdepolarisation der Marker nach Bindung an die Proteinoberfläche zu beurteilen. Insbesondere beeinflusst die Größe der Fluorophore den zeitlichen Verlauf der Anisotropie. Zusätzlich diente die Anisotropiemessung des freien IAF als Standardtest zur Kontrolle der Meßapparatur sowie zur Bestimmung des G-Faktors.

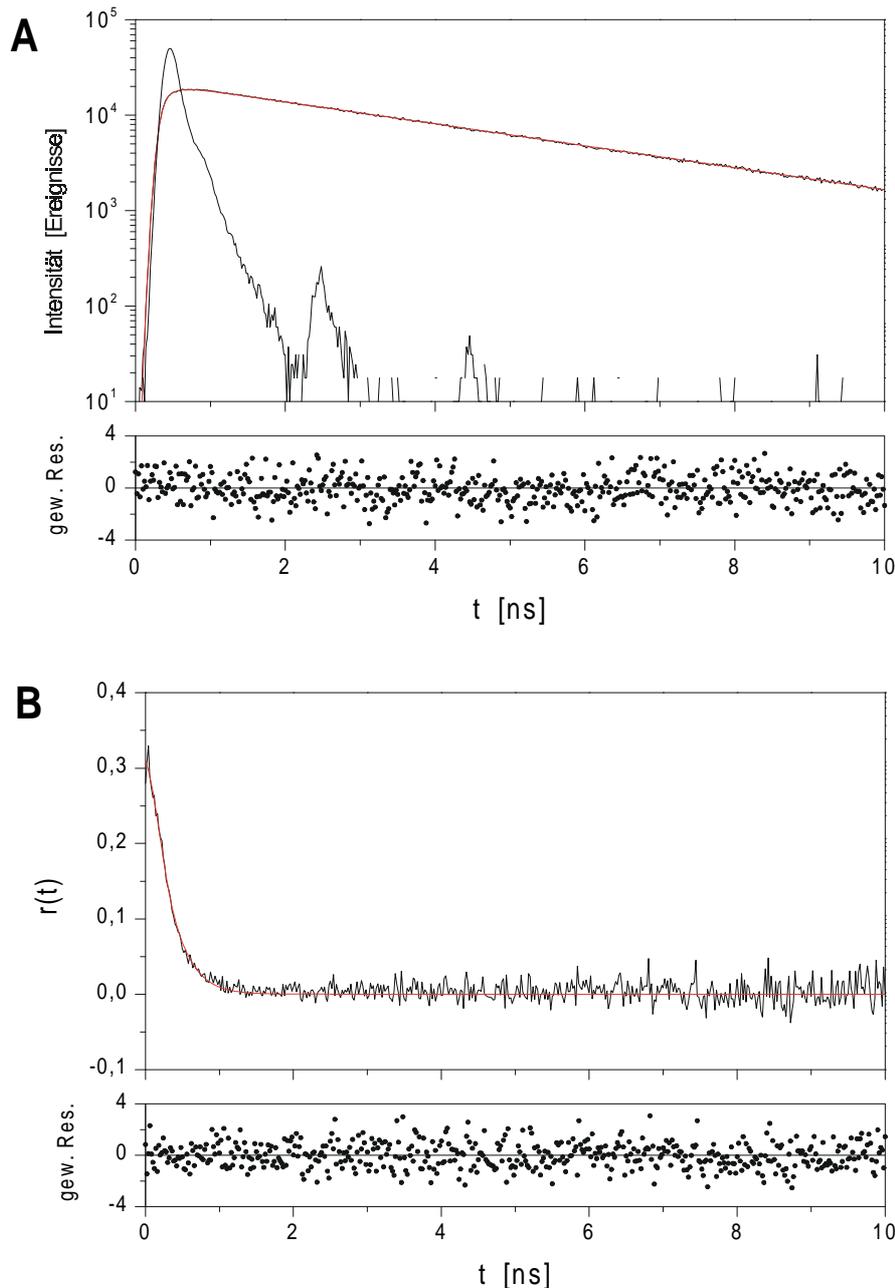


Abbildung 5.5: Zeitaufgelöste Fluoreszenz und Anregungsprofil (A) bzw. Fluoreszenzanisotropie (B) von freiem IAF in 10 mM Tris-HCl pH 7,0, 150 mM KCl bei 15 °C. Unter den Kurven sind die gewichteten Residuen der Anpassung mit einer Exponentialfunktion dargestellt.

Abbildung 5.5 zeigt das typische Fluoreszenzverhalten von freiem IAF in wäßriger Lösung. Die Fluoreszenzanisotropiekurve  $r(t)$  klingt bei uneingeschränkter Rotationsdiffusion des Fluorophors auf einen Wert von  $r_\infty = 0$  ab. Dies ist ein Beleg für die korrekte Bestimmung des G-Faktors, der typischerweise im Bereich von  $1,000-1,050 \pm 0,003$  lag. Der Fluoreszenzzerfall ( $\tau = 4,01 \pm 0,05$  ns) und die Anisotropiekurve ( $\phi = 0,19 \pm 0,02$  ns) zeigen ein monoexponentielles Abklingverhalten, das nach dem einfachen Modell eines kugelförmigen Rotors ohne Bewegungseinschränkung zu erwarten ist. Die Anfangsanisotropie  $r_0$  betrug für ungebundenes IAF  $0,376 \pm 0,004$  in 95 % (v/v) Glycerin bei  $-1$  °C. Unter diesen Bedingungen ist die Bewegung der Moleküle auf Grund der hohen Viskosität so stark verlangsamt, daß der Wert für  $r_0$  mit sehr hoher Genauigkeit bestimmt werden kann. Mit der verwendeten Apparatur wurde für Diphenylhexatrien in Glycerin bei  $-5$  °C eine Anfangsanisotropie von  $0,390 \pm 0,003$  erhalten (Gläsel, 2000). Dieser Wert zeigt eine gute Übereinstimmung mit Literaturdaten (Kawato et al., 1977; Heyn, 1989) und demonstriert die Leistungsfähigkeit der Apparatur. Die Abweichung von dem theoretischen Wert von  $r_0 = 0,4$  kann auf eine geringfügig unterschiedliche Orientierung der Übergangsdipolmomente der Absorption bzw. Emission oder auf apparative Einflüsse wie ein unzureichendes Lösungsverhältnis der Polarisatoren und minimale Kollimationsfehler des Strahlengangs zurückgeführt werden. Als weitere Ursache kommt eine extrem schnelle Bewegungskomponente in Betracht, die zeitlich nicht mehr aufgelöst werden konnte.

Die Fluoreszenzparameter der verwendeten Fluorophore sind in Tabelle 5.3 zusammengestellt. Mit Ausnahme von IAEDANS zeigten alle Fluorophore ein monoexponentielles Abklingverhalten. Die Fluoreszenzkurve von IAEDANS wies dagegen zwei Zeitkomponenten auf, die vermutlich auf eine Reaktion des Farbstoffs mit Wasser zurückzuführen sind (Eftink et al., 1987). Die Anfangsanisotropien  $r_0$  wurden jeweils in 95 % (v/v) Glycerin bei  $-1$  °C bestimmt. Mit Hilfe von Viskositätsreihen wurden die effektiven Volumina der freien Fluorophore ermittelt. Hierzu wurde der Glyceringehalt der Proben unter sonst identischen Bedingungen schrittweise von 0-60 % (v/v) Glycerin erhöht. Die Diffusion eines Körpers ist von der Viskosität der Umgebung abhängig, wobei eine Erhöhung der Viskosität zu einer Verlangsamung der Bewegung führt. Das Modell eines sphärischen isotropen Rotors liefert nach (Gl. 2.51) einen linearen Zusammenhang zwischen der Viskosität und der Rotationskorrelationszeit. Diese lineare Abhängigkeit konnte mit allen untersuchten Fluorophoren zwischen 0-40 % (v/v) Glycerin bestätigt werden. Oberhalb einer Konzentration von 40 % (v/v) Glycerin wurden dagegen Abweichungen von dem linearen Verhalten beobachtet. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Fluorophore in der Realität keine idealen kugelförmigen Moleküle sind und daher bei hoher Viskosität mehrere Bewegungskomponenten aufgelöst werden können. Der lineare Bereich zwischen 0-40 % (v/v) Glycerin ermöglichte jedoch die Bestimmung der Rotationsvolumina mit ausreichender Genauigkeit (Tabelle 5.3).

	IAF	TR	IAEDANS	DNZ
$\tau$ / ns ( $\pm 0,05$ )	4,01	4,15	2,50 <sup>(1)</sup>	2,65
$\phi_{\text{rot}}$ / ns ( $\pm 0,02$ )	0,19	0,3	0,18	0,10
$r_0$ ( $\pm 0,004$ )	0,376	0,385	0,220	0,305
$V_{\text{eff}} / 10^{-22} \text{ cm}^3$ ( $\pm 0,1$ )	7,7	11,0	5,8	3,1

(1) Die Fluoreszenzlebensdauer von IAEDANS wurde als Mittelwert über zwei Abklingzeiten bestimmt.

Tabelle 5.3: Fluoreszenzparameter der freien Fluorophore. Die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  und die Rotationskorrelationszeit  $\phi_{\text{rot}}$  wurden in wäßriger Lösung (10 mM Tris-HCl pH 7, 150 mM NaCl, 15 °C) durch Anpassung der Meßdaten mit einem Exponentialterm erhalten. Die Anfangsanisotropie  $r_0$  wurde dagegen in 95 % (v/v) Glycerin bei  $-1$  °C bestimmt. Das effektive Rotationsvolumen  $V_{\text{eff}}$  wurde aus den Daten der Viskositätsreihen ermittelt.

## 5.5 Meßparameter der Anisotropiemessungen an Rhodopsin

Für die Durchführung von Fluoreszenzanisotropiemessungen an Rhodopsin ist die Frage, ob der lichtempfindliche Photorezeptor bereits durch das Anregungslicht gebleicht wird, von entscheidender Bedeutung. Abbildung 5.6 zeigt die Absorptionsspektren einer mit Fluorescein markierten Rhodopsinprobe vor und nach einer Messung am HASYLAB. Die Messung erfolgte bei maximalem Ringstrom kurz nach einer Neuinjektion. Die Anregungswellenlänge lag bei  $\lambda = 492$  nm und somit nahe am Absorptionsmaximum der Retinalbande. Dennoch zeigen die Spektren, daß im Verlauf der Messung auf Grund der sehr geringen Anregungsintensität die Probe nur unwesentlich gebleicht wurde. Die Ergebnisse der Rhodopsinmessungen im Grundzustand wurden daher nicht durch das Auftreten von Photointermediaten in Folge der Photolyse des Rhodopsins beeinflusst.

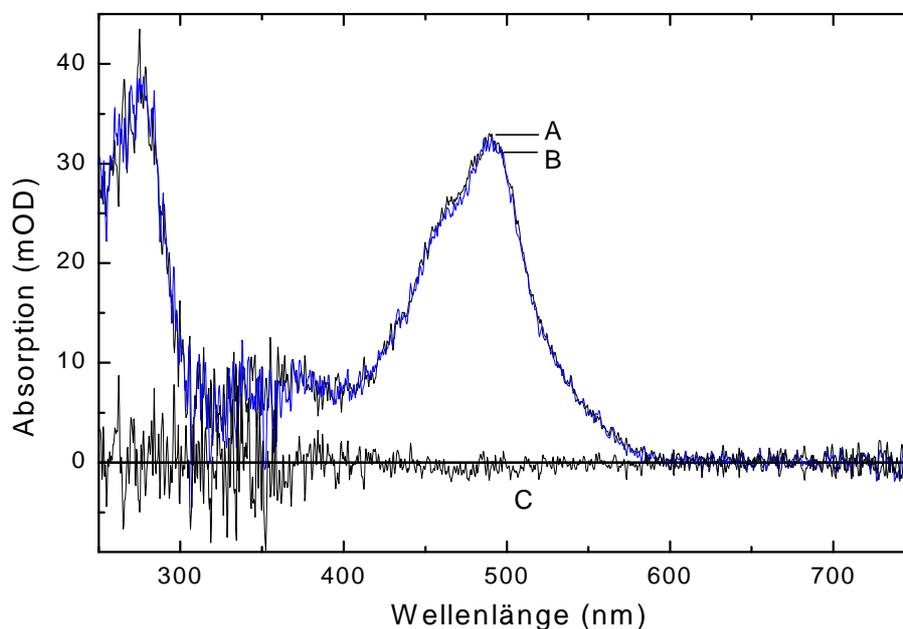


Abbildung 5.6: Absorptionsspektren der Rhodopsinprobe OG-C316-AF vor (A) und nach einer Messung (B) am HASYLAB. Die Absorptionsdifferenz (C) bei  $\lambda = 498$  nm liegt unterhalb von 1 mOD. Dies entspricht einem gebleichten Anteil der Probe von unter 5 %. Bedingungen: 2  $\mu$ M Rhodopsin in 10 mM MES, pH 6,0, 150 mM NaCl, 30 mM OG, 15 °C, Meßdauer: 40min bei einem Ringstrom von 124 mA.

Für Untersuchungen des MII-Intermediats wurden die Rhodopsinproben 2 min auf Eis mit einer Kaltlichtlampe (Schott KL1500, Kantenfilter OG515) gebleicht. Die zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropiemessungen wurden bei einem pH-Wert von 6,0 und einer Temperatur von 5 °C durchgeführt. Diese Bedingungen wurden gewählt, da ein niedriger pH-Wert das Gleichgewicht zwischen MI und MII auf die Seite von MII verschiebt (Kliger und Lewis, 1995; Dickopf et al., 1998). Die niedrige Temperatur wiederum stabilisiert das MI/MII-Gleichgewicht und verzögert den weiteren Zerfall des MII-Intermediats (Kliger und Lewis, 1995). Unter den gewählten experimentellen Bedingungen wurde an Hand von Absorptionsspektren ein Gleichgewichtsverhältnis zwischen MI und MII von 0,06 in OG-Mizellen bzw. 0,11 in ROS-Membranen erzielt, wobei zur Auswertung der Spektren die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{MI}(478 \text{ nm}) = 44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bzw.  $\epsilon_{MII}(380 \text{ nm}) = 38000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  verwendet wurden (Kibelbek et al., 1991). Mit Hilfe der empirischen Näherungsformel von

Parkes und Liebman (1984) kann die Lage des MI/MII-Gleichgewichts in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert in ROS-Membranen nach

$$\ln(MII / MI) = -9464/T - 1,608 \cdot (pH) + 44,87$$

berechnet werden. Demnach sollte der MI-Anteil in ROS-Membranen unter den angegebenen Bedingungen bei ca. 20 % liegen. Diese Abweichung kann allerdings mit der hier verwendeten höheren NaCl-Konzentration im Vergleich zu den Experimenten von Parkes und Liebman (1984) erklärt werden, da eine hohe Ionenstärke das MI/MII-Gleichgewicht auf die Seite von MII verschiebt (DeLange et al., 1977).

Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  des MII-Zustands beim Zerfall zu MIII betrug unter den angegebenen Bedingungen 90 min in OG-Mizellen und 108 min in ROS-Membranen. Die Werte wurden nach Belichtung an Hand der Absorptionsabnahme bei  $\lambda = 380$  nm bestimmt. Unter den hier gewählten Bedingungen blieben bei 5 °C somit ca. 90 % des erzeugten MII-Intermediats im Verlauf einer Meßdauer von 15-20 min erhalten, die zur Aufnahme einer Anisotropiekurve mit ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis genügte. Eine höhere Temperatur führte dagegen zu einem deutlich schnelleren MII-Zerfall. Farrens und Khorana (1995) geben eine Halbwertszeit von ca. 15,9 min für Rhodopsin in 0,1 % Laurylmaltosid bei pH 6 und 20 °C an. Im Vergleich zu der Größenordnung der Änderung der MII-Konzentration als Folge des MII-Zerfalls spielt der mögliche Einfluß des Anregungslichts auf die Gleichgewichtslage der Photointermediate keine Rolle.

Abbildung 5.7 und Abbildung 5.8 zeigen exemplarisch den Verlauf der Fluoreszenzabklingkurven bzw. Fluoreszenzanisotropiekurven von Rhodopsin im Grundzustand in OG-Mizellen und ROS-Membranen nach Markierung der Position C316 mit Fluorescein. Die entsprechenden Fluoreszenzparameter sind in Tabelle 5.4 zusammengestellt. Zur Anpassung der Fluoreszenzabklingkurven wurden hier drei Exponentialterme benötigt, wobei die Fluoreszenzlebensdauern ( $\tau_i$ ) im Bereich von 0,3-0,5 ns, 1,2-1,9 ns bzw. 3,3-4,3 ns lagen. Ein multiexponentielles Abklingverhalten wird häufig bei Fluoreszenzmessungen an Makromolekülen beobachtet (Tanaka et al., 1994; Dong et al., 1997; Nishimoto et al., 1998). Als mögliche Ursachen werden in der Literatur eine statistische Verteilung der Lebensdauern, Energietransferprozesse und die Wirkung von angrenzenden Aminosäureseitenketten oder Ionen der Umgebung als Quencher-moleküle diskutiert (Alcala et al., 1987; Wu und Brand, 1994; Wahl, 1975).

#### A

Probe	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\tau_1$ /ns	$\tau_2$ /ns	$\tau_3$ /ns	$\chi^2$
OG-C316-AF	0,349	0,283	0,367	0,480	1,750	4,20	1,87
ROS-C316-AF	0,423	0,350	0,227	0,420	1,530	3,660	1,11

#### B

Probe	$r_0$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$r_\infty$	$\phi_1$ /ns	$\phi_2$ /ns	$\phi_3$ /ns	$\chi^2$
OG-C316-AF	0,304	0,048	0,042	0,215	-	0,364	3,41	44,43	1,07
ROS-C316-AF	0,351	0,160	0,117	-	0,074	0,293	4,289	-	1,15

Tabelle 5.4: Parameter des Fluoreszenz- (A) und Fluoreszenzanisotropiezerfalls (B) der Rhodopsinproben OG-C316-AF und ROS-C316-AF. Die aufgeführten Größen sind:  $\alpha_i$ ,  $\tau_i$  die relativen Amplituden bzw. Fluoreszenzlebensdauern des i-ten Exponentialterms der Fluoreszenzabklingkurve,  $r_0$  die Anfangsanisotropie,  $r_\infty$  die Endanisotropie,  $\beta_i$ ,  $\phi_i$  die Amplituden bzw. Rotationskorrelationszeiten des i-ten Exponentialterms der Anisotropiekurve,  $\chi^2$  der Minimierungsparameter der Anpassung.

Zur Anpassung der Fluoreszenzanisotropiekurve der OG-C316-AF-Probe wurden drei Exponentialterme benötigt. Die Anpassung der Anisotropiekurve der ROS-C316-AF-Probe erfolgte nach (Gl. 2.41) mit zwei Exponentialtermen und einer konstanten Endanisotropie.

Beide Messungen weisen eine Rotationskorrelationszeit im ps-Zeitbereich auf, die in der Größenordnung der schnellen Eigenrotation des freien Fluoresceins liegt (vgl. Tabelle 5.3). In Mizellen wird im Gegensatz zu den ROS-Membranen eine Langzeitkomponente beobachtet, die auf die Rotation der gesamten Mizelle zurückzuführen ist. In beiden Systemen tritt hier zusätzlich eine mittlere Rotationskorrelationszeit auf, die auf die Kopplung zwischen dem Fluoreszenzmarker und der Oberfläche des Proteins zurückzuführen ist. Diese Zeitkomponente ist vermutlich auf die Bewegung des interhelikalen Bereichs zurückzuführen, an den der Fluorophor gebunden ist.

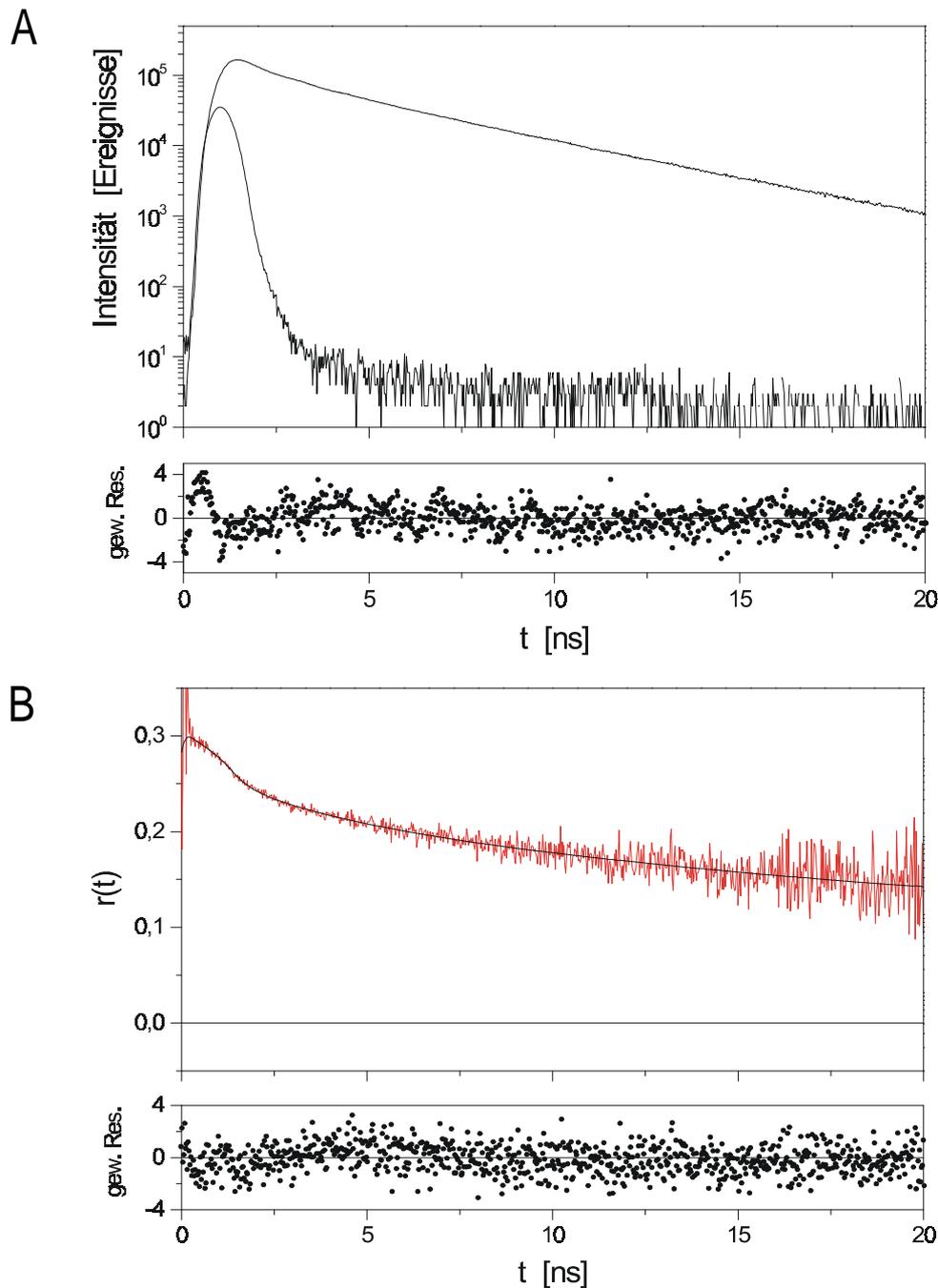


Abbildung 5.7: Fluoreszenzabklingkurve und Anregungsprofil (A) bzw. Fluoreszenzanisotropiezerfall (B) der Rhodopsinprobe OC-C316-AF in 10 mM MES pH 6,0, 150 mM NaCl, 30 mM OG bei 5 °C. Unter den Kurven sind die gewichteten Residuen der Anpassung mit jeweils drei Exponentialfunktionen dargestellt.

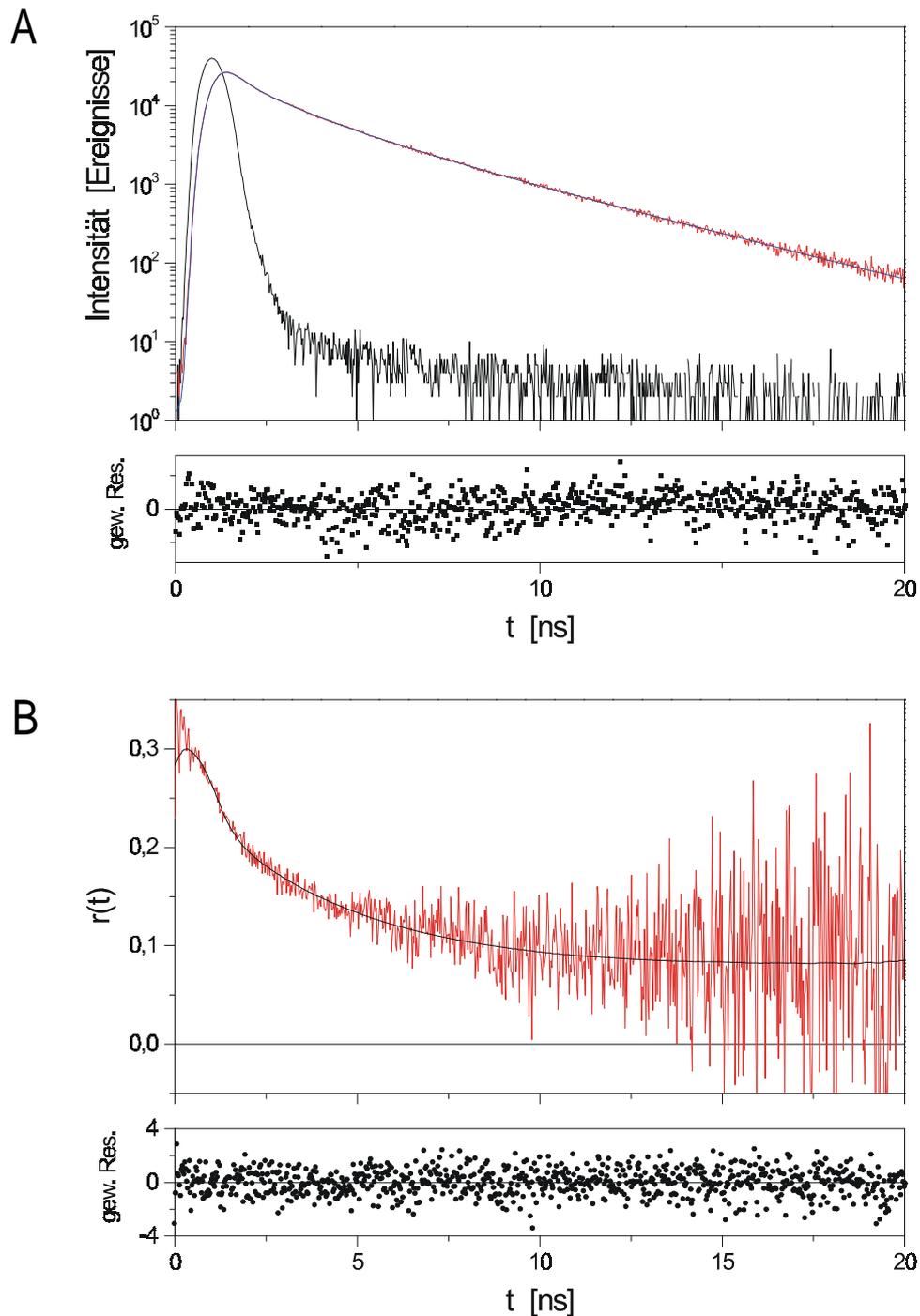


Abbildung 5.8: Fluoreszenzabklingkurve und Anregungsprofil (A) bzw. Fluoreszenzanisotropiezerfall (B) der Rhodopsinprobe ROS316AF in 10 mM MES pH 6,0, 150 mM NaCl bei 5 °C. Unter den Kurven sind die gewichteten Residuen der Anpassung mit jeweils drei Exponentialfunktionen (A) bzw. zwei Exponentialfunktionen und einem konstanten Endanisotropiewert (B) dargestellt.

## 5.6 Einfluß des Energietransfers auf die Fluoreszenzanisotropie

Die spektrale Überlagerung zwischen den Emissionsbanden der Fluorophore mit den Absorptionsbanden der Fluorophore bzw. des Retinalchromophors ermöglicht prinzipiell das Auftreten von strahlungslosen Energietransferprozessen (vgl. Abschnitt 5.4.1). Einen direkten Hinweis auf die Existenz von Energietransferprozessen lieferte das bei allen Fluorophoren

beobachtete komplexe Fluoreszenzabklingverhalten. Deshalb wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um eine Aussage über den möglichen Einfluß des Energietransfers auf die Fluoreszenzanisotropie treffen zu können.

Neben dem intramolekularen Heteroenergietransfer zwischen Fluorophor und Retinal können vor allem in ROS-Membranen komplexe Energiemigrationen zwischen den Fluorophoren unterschiedlicher Rhodopsinmoleküle bei ausreichend kleinem Abstand auftreten (intermolekularer Homoenergietransfer). In Mizellen ist dagegen bei spezifischer Markierung von einem Cysteinrest lediglich intramolekularer Heteroenergietransfer zu erwarten. Homoenergietransfer sollte in Mizellen erst bei Markierung mit zwei Fluorophoren pro Rhodopsinmolekül auftreten. Auf Grund dieser unterschiedlichen Probeneigenschaften konnten die verschiedenen Transferprozesse getrennt voneinander untersucht werden. Die spektrale Verschiebung der Retinalabsorptionsbande nach Photolyse des Rhodopsins oder Reduktion der Schiff-Base mit Natriumborhydrid (Bownds und Wald, 1965) erleichterte zusätzlich die Charakterisierung der Transferprozesse, da hierdurch der Retinalchromophor in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge des Fluorophors als Akzeptor ausgeschlossen wird und somit der Heterotransfer unterbunden werden kann.

Die analytische Beschreibung des Energietransfers in komplexen biologischen Systemen erfordert jedoch Modellannahmen über die Orientierung der Donator- bzw. Akzeptormoleküle oder im Fall von Fluorophoren in Membranen die Berücksichtigung der speziellen zweidimensionalen geometrischen Verhältnisse (Dale et al., 1979; Yguerabide, 1994). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beobachteten Energietransferprozesse allerdings nicht analytisch untersucht, sondern lediglich der mögliche Einfluß des Energietransfers auf die Fluoreszenzanisotropie qualitativ beurteilt. Eine weitergehende Analyse der Energietransferprozesse in fluoreszenzmarkiertem Rhodopsin findet sich bei Gläsel (2000).

### 5.6.1 Die Fluoreszenzanisotropie ohne Energietransfer

Zur Untersuchung der Fluoreszenzanisotropie ohne Energietransfer wurden gebleichte Rhodopsinproben oder Proben mit reduzierter Schiff-Base verwendet. Abbildung 5.9 zeigt die Absorptionsspektren einer Fluorescein-markierten Rhodopsinprobe vor und nach der Reduktion der Schiff-Base.

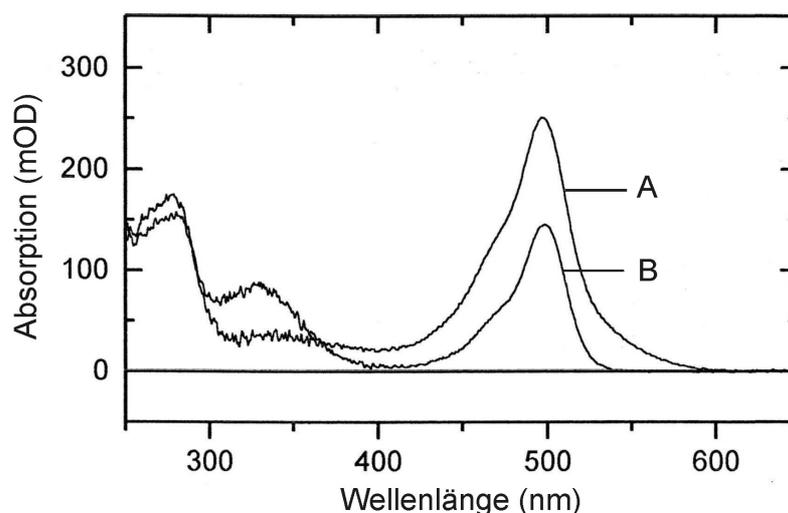


Abbildung 5.9: Absorptionsspektren der Probe OG-C316-AF vor (A) und nach (B) der Reduktion der Schiff-Base mit Natriumborhydrid. Die spektrale Verschiebung der Retinalbande von  $\lambda = 498$  nm nach  $\lambda = 333$  nm ist deutlich zu erkennen. Die verbleibende Bande bei  $\lambda = 495$  entspricht der Absorption des gebundenen Fluoresceinmarkers.

Die Reduktion der Schiff-Base führt zu einer starken spektralen Verschiebung der Chromophorbande, wodurch der Energietransfer zwischen dem Fluorophor an der Oberfläche und dem Chromophor in der Transmembranregion unterbunden wird.

Auch unter Ausschluß des Energietransfers wurden zur Anpassung der Fluoreszenzabklingkurven drei Exponentialterme benötigt, wobei die mittlere Fluoreszenzlebensdauer in der Größenordnung der Lebensdauer der freien Fluorophore lag. Für Fluorescein-markierte Rhodopsinproben lagen die Lebensdauern beispielsweise im Bereich von 3,7-3,9 ns im Gegensatz zu 4,01 ns für freies IAF.

Die Parameter der Fluoreszenzanisotropie verschiedener Messungen ohne Energietransfer sind in Tabelle 5.5 zusammengestellt. Die Messungen erfolgten unter Standardbedingungen bei 15 °C. Für die Anpassung der Anisotropiekurven der Fluoresceinproben wurden wiederum drei Exponentialterme für OG-Mizellen und zwei Exponentialterme plus eine konstante Endanisotropie für ROS-Membranen benötigt. Dasselbe Anisotropieverhalten wurde in ROS-Membranen nach Markierung der Position C140 mit 4-Chlor-7-hydroxycoumarin beobachtet (Gläsel, 2000). Zur Anpassung der übrigen Fluorophore wurden dagegen nur zwei Exponentialterme benötigt. In Mizellen dominiert die Amplitude der längsten Rotationskorrelationszeit das Depolarisationsverhalten. Im Fall des DNZ-markierten Rhodopsins in OG-Mizellen lag die kleinere Rotationskorrelationszeit im ns-Bereich und somit deutlich über der Rotationskorrelationszeit des ungebundenen Markers. Diese Zeit wurde daher der Komponente  $\phi_2$  zugeordnet. Die kleineren Rotationskorrelationszeiten der TR- bzw. AEDANS-Proben lagen dagegen im Subnanosekundenbereich.

OG-Mizellen	$r_0$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\phi_1$ /ns	$\phi_2$ /ns	$\phi_3$ /ns	$\chi^2$
OG-C316-AF <sup>(1)</sup>	0,35	0,07	0,07	0,21	0,14	2,6	46	1,04
OG-C316-AF <sup>(2)</sup>	0,30	0,07	0,06	0,17	0,18	2,57	44	0,99
OG-C316-TR <sup>(1)</sup>	0,29	0,05	-	0,24	0,43	-	36	1,22
OG-C316-DNZ <sup>(2)</sup>	0,30	-	0,05	0,25	-	1,4	50	1,00
OG-C140-AF <sup>(1)</sup>	0,32	0,04	0,04	0,24	0,27	1,75	42	0,98
OG-C140-AF <sup>(2)</sup>	0,35	0,07	0,07	0,21	0,12	1,69	51	0,98
OG-C140-TR <sup>(1)</sup>	0,27	0,03	-	0,24	0,46	-	60	1,01
ROS-Membranen	$r_0$	$\beta_1$	$\beta_2$	$r_\infty$	$\phi_1$ /ns	$\phi_2$ /ns		$\chi^2$
ROS-C316-AF <sup>(1)</sup>	0,37	0,15	0,08	0,14	0,18	2,7		1,21
ROS-C140-AF <sup>(2)</sup>	0,36	0,17	0,08	0,11	0,19	3,44		0,97
ROS-C140-Cm <sup>(1,3)</sup>	0,35	0,10	0,06	0,19	0,58	6,2		1,15
ROS-C140-AEDANS <sup>(2)</sup>	0,36	0,27	-	0,90	0,48	-		1,09

(1) gebleicht

(2) Messung mit reduzierter Schiff-Base

(3) Die Ergebnisse dieser Messung wurden von Gläsel (2000) übernommen

Tabelle 5.5: Anisotropieparameter unterschiedlicher Rhodopsinproben ohne Energietransfer. Angegeben sind die Werte der Anfangsanisotropie  $r_0$  und Endanisotropie  $r_\infty$  sowie die Amplituden  $\beta_i$  und Rotationskorrelationszeiten  $\phi_i$  des jeweiligen Exponentialterms. Die Messungen erfolgten unter Standardbedingungen bei 15 °C.

Bei den Messungen an OG-Mizellen dominiert die Gesamtrotation ( $\phi_3$ ) den Zerfall der Anisotropie unabhängig von der Art des verwendeten Fluorophors bzw. der Bindungsstelle, die Summe der Amplituden  $\beta_1$  und  $\beta_2$  ist kleiner als in ROS-Membranen. Der Vergleich der Messungen untereinander ergibt jedoch keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Rotationskorrelationszeit im mittleren Zeitbereich ( $\phi_2$ ) und der Position der gebundenen

Fluorophore. Der Wert für  $\phi_2$  ist beispielsweise nach Markierung der Position C316 mit Fluorescein in OG-Mizellen größer als nach Markierung der Position C140. In ROS-Membranen sind die Größenverhältnisse dagegen umgekehrt; hier wurde nach Markierung der Position C140 ein größerer  $\phi_2$ -Wert gefunden.

### 5.6.2 Heteroenergietransfer

Zur Untersuchung des Heteroenergietransfers wurden Messungen an Rhodopsin im Grundzustand und nach Reduktion der Schiff-Base durchgeführt. Unter der Voraussetzung, daß die Reduktion der Schiff-Base die Oberflächenstruktur nicht wesentlich beeinflußt, ermöglichen diese Experimente eine Aussage über den Energietransfer zwischen Fluorophor und Retinalchromophor. Unterschiede im Transferverhalten, die möglicherweise durch den Übergang vom Grund- in den MII-Zustand hervorgerufen werden könnten, sind hierbei ausgeschlossen.

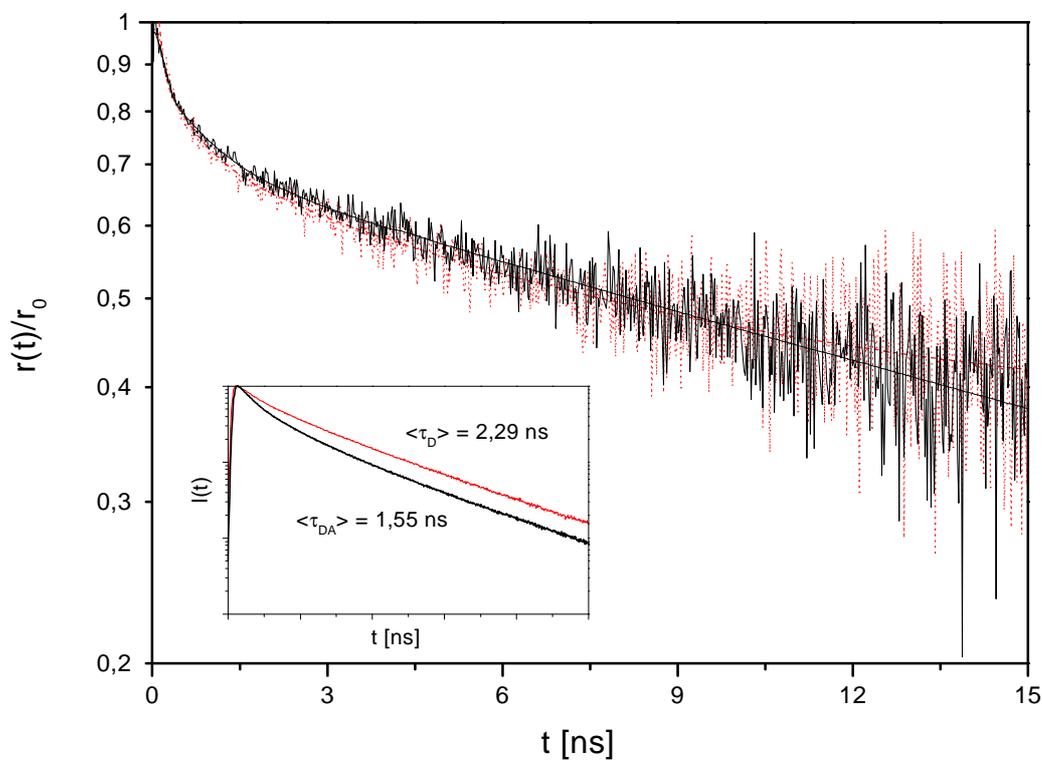


Abbildung 5.10: Vergleich der normierten Anisotropiekurven der Rhodopsinprobe OG-C316-AF im Grundzustand und mit reduzierter Schiff-Base (gepunktete Linie). In dem verkleinerten Fenster sind die entsprechenden normierten Fluoreszenzintensitäten über den gleichen Zeitbereich dargestellt.

Abbildung 5.10 zeigt die entsprechenden Anisotropiekurven der Probe OG-C316-AF mit und ohne Energietransfer. Zum Vergleich sind die Kurven auf einer normierten logarithmischen Skala dargestellt. In dieser Darstellungsform besitzen die Kurven einen gemeinsamen Anfangswert und Abweichungen im hinteren Zeitbereich werden verstärkt. Die zugehörigen normierten Fluoreszenzintensitäten sind verkleinert abgebildet. Zur Anpassung der Fluoreszenzabklingkurven und Anisotropiekurven wurden in beiden Fällen drei Exponentialfunktionen benötigt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Fluoreszenzintensität nach Reduktion der

Schiff-Base langsamer abklingt; die Ausschaltung des Retinalchromophors als Akzeptor führt somit zu einer verlängerten mittleren Fluoreszenzlebensdauer.

Trotz der Unterschiede im Abklingverhalten der Fluoreszenzintensitäten wiesen die Verläufe der Anisotropiekurven mit und ohne Heteroenergietransfer keine signifikanten Differenzen auf. Die geringen Unterschiede zwischen den Kurven lagen im Bereich der Abweichungen, die bei Messungen von Proben aus unterschiedlichen Präparationen bzw. Meßzeiten beobachtet wurden. In Abbildung 5.10 ist die stärkste Differenz der Anisotropie im Langzeitbereich zu beobachten, wobei die Meßergebnisse für die Mizellenrotation auf Grund der Langlebigkeit dieser Bewegungskomponente generell größere Schwankungen aufwiesen. In ROS-Membranen war der Einfluß des Heteroenergietransfers etwas stärker, lag aber dennoch nicht signifikant über der Streuung der Meßwerte unterschiedlicher Probenpräparationen. Aus diesen Beobachtungen kann man daher schließen, daß der Heteroenergietransfer zwischen dem Fluorophor an der Oberfläche und dem Retinalchromophor in der Membranregion des Rhodopsins keinen signifikanten Einfluß auf die Fluoreszenzanisotropie ausübt.

### 5.6.3 Homoenergietransfer

Die physikalische Grundlage für den Homoenergietransfer ist eine geringe Stokes-Verschiebung zwischen der Absorptions- und Emissionsbande des Fluorophors. Die hier verwendeten Fluorophore IAF bzw. Texas Red wiesen eine geringe Stokes-Verschiebung auf, was entsprechend zu relativ großen Überlagerungsintegralen führt (vgl. Abschnitt 5.4.1). Neben der spektralen Überlagerung ist die Stärke des Homotransfers auch vom Abstand der Transferpartner und der Orientierung deren Übergangsdipolmomente abhängig. Da es sich hier bei Donator und Akzeptor um identische Moleküle handelt, ist der Homoenergietransfer im Gegensatz zum Heteroenergietransfer reversibel, weshalb sich die Fluoreszenzlebensdauer in Folge des Homotransfers nicht ändert.

Der Einfluß des Homoenergietransfers auf die Fluoreszenzanisotropie wurde mit Rhodopsinproben in OG-Mizellen nach Markierung der beiden Cysteinreste C140 und C316 mit Fluorescein und Texas Red im Vergleich zu Proben, bei denen nur die Position C316 selektiv markiert war, untersucht. Die Schiff-Base der Fluorescein-markierten Proben wurde zusätzlich mit Natriumborhydrid reduziert, um den Homotransfer als isolierten Prozeß zu studieren. Die erhaltenen Meßkurven zeigen deutlich, daß die Fluoreszenzanisotropie der zweifach markierten Proben gegenüber den einfach markierten Proben schneller depolarisiert (Abbildung 5.11). Die Reduktion der Schiff-Base im Fall der AF-Proben demonstriert weiter, daß allein der Homoenergietransfer die Anisotropiefunktion signifikant beeinflusst. Die TR-markierten Rhodopsinproben wurden dagegen im Grundzustand gemessen, da die spektrale Überlagerung zwischen der Emissionsbande des TR-Fluorophors und der Retinalbande nur gering ist. Dementsprechend ist auch der mögliche Anteil des Heteroenergietransfers in den TR-Proben gering. Im vorhergehenden Abschnitt konnte zudem gezeigt werden, daß der Heteroenergietransfer keinen signifikanten Einfluß auf die Anisotropie ausübt. Die Messungen mit TR im Grundzustand belegen daher, daß es sich bei diesen Experimenten tatsächlich um einen Effekt des Homoenergietransfers und nicht um ein Artefakt durch die Reduktion der Schiff-Base handelt.

In Purpurmembranen wurde nach selektiver Markierung von Cysteinmutanten des Bacteriorhodopsins (A160C und V130C) mit Fluorescein in Abhängigkeit von der Markierungsstöchiometrie der gleiche Effekt des Homoenergietransfers auf die Fluoreszenzanisotropie beobachtet (Gläsel, 2000). Das Membranprotein Bacteriorhodopsin liegt bereits in der nativen Purpurmembran als zweidimensionaler Proteinkristall vor, wobei die Einheitszelle von einem Trimer aus drei Bacteriorhodopsinmolekülen besetzt ist. Die hohe Flächendichte des Proteins in der Purpurmembran führt dazu, daß auf Grund der geringen Abstandsverhältnisse

Homoenergietransfer zwischen den Fluorophoren benachbarter Proteinmoleküle auftreten kann.

Rhodopsin liegt zwar in der ROS-Membran nicht kristallin vor, sondern kann sich in der Membranebene frei bewegen, dennoch ist die Flächendichte des Rhodopsins in ROS-Membranen ebenfalls sehr hoch (Hargrave und McDowell, 1992). Daher wurden die Anisotropiemessungen in ROS-Membranen mit einer niedrigen Markierungsstöchiometrie durchgeführt, um von vorne herein den möglicherweise auftretenden Homoenergietransfer zu reduzieren.

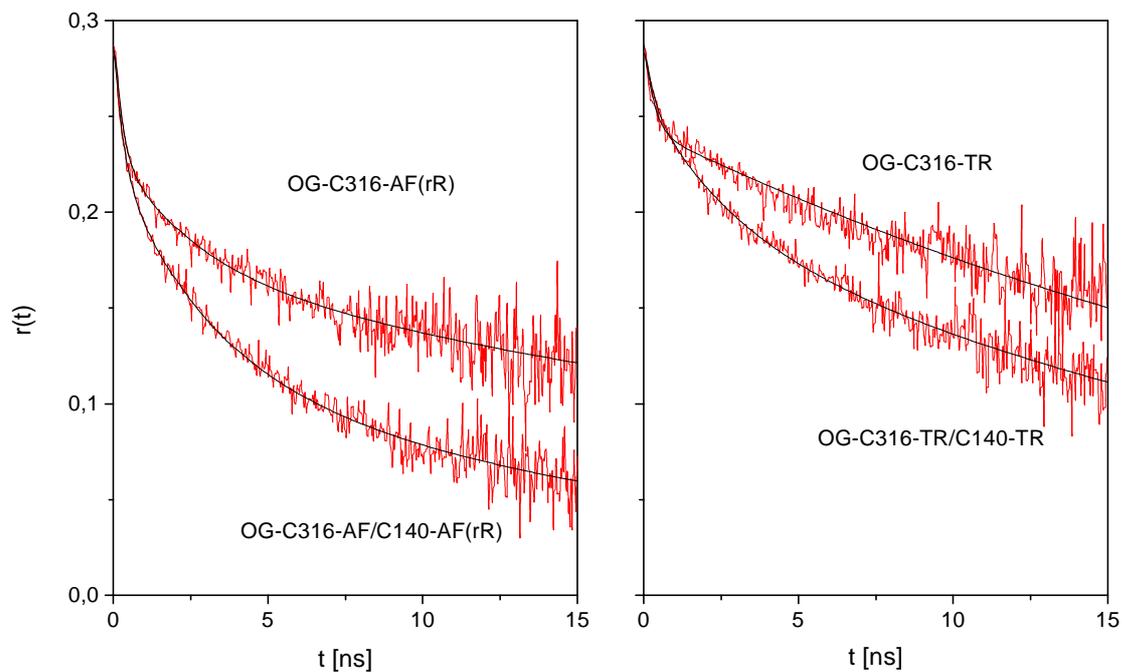


Abbildung 5.11: Fluoreszenzanisotropiekurven von Rhodopsin in OG-Mizellen mit (Markierung der Positionen C140 und C316) und unter Ausschluß von Homoenergietransfer (selektive Markierung der Position C316). Die Abkürzung rR steht für die reduzierte Schiff-Base in den AF-Proben. Die Messungen erfolgten unter Standardbedingungen bei 15 °C.

## 5.7 Einfluß von Viskosität und Temperatur auf die Fluoreszenzanisotropie

Die Geschwindigkeit von Diffusionsvorgängen ist von der Viskosität der Umgebung abhängig. Die Variation der Viskosität in der Probenlösung stellt deshalb ein einfaches Mittel zur Überprüfung dar, ob das beobachtete Depolarisationsverhalten der Proben auf eine Rotationsdiffusionsbewegung zurückzuführen ist.

In Abbildung 5.12 sind die Fluoreszenzanisotropiekurven zweier Rhodopsinproben in verschiedenen viskosen Medien dargestellt. Die unterschiedlichen Anfangsanisotropien der beiden Meßreihen sind auf die Aufnahme der Daten an den unterschiedlichen Synchrotronanlagen zurückzuführen. Bei den Messungen der Probe ROS-C316-AF wurde die Viskosität durch eine zunehmende Glycerinkonzentration erhöht. Zur Reduzierung von Energietransferprozessen wurde die Probe im MII-Zustand gemessen. Die zunehmende Viskosität führte im vorderen Zeitbereich zu einem langsameren Zerfall der Anisotropie, wobei die Endanisotropie konstant blieb. Die Zunahme der D<sub>2</sub>O-Konzentration zeigte einen vergleichbaren Effekt auf das Depolarisationsverhalten von Rhodopsin in OG-Mizellen. Hier wurde der Energietransfer durch Reduktion der Schiff-Base unterbunden. Die Meßkurven der Probe OG-C316-AF fallen

im vorderen Zeitbereich ebenfalls langsamer ab. Zusätzlich wurde eine geringfügige Verlangsamung der Mizellenrotation beobachtet. Die relativen Änderungen des Anisotropieverhaltens in  $D_2O$  waren allerdings kleiner, da sich die Viskosität beim Übergang von Wasser zu  $D_2O$  lediglich um den Faktor 1,22 ändert, wohingegen der Faktor zwischen Wasser und Glycerin bei 30 % (v/v) Glycingehalt einen Wert von 3 hat (Handbook of Chemistry and Physics, 1986).

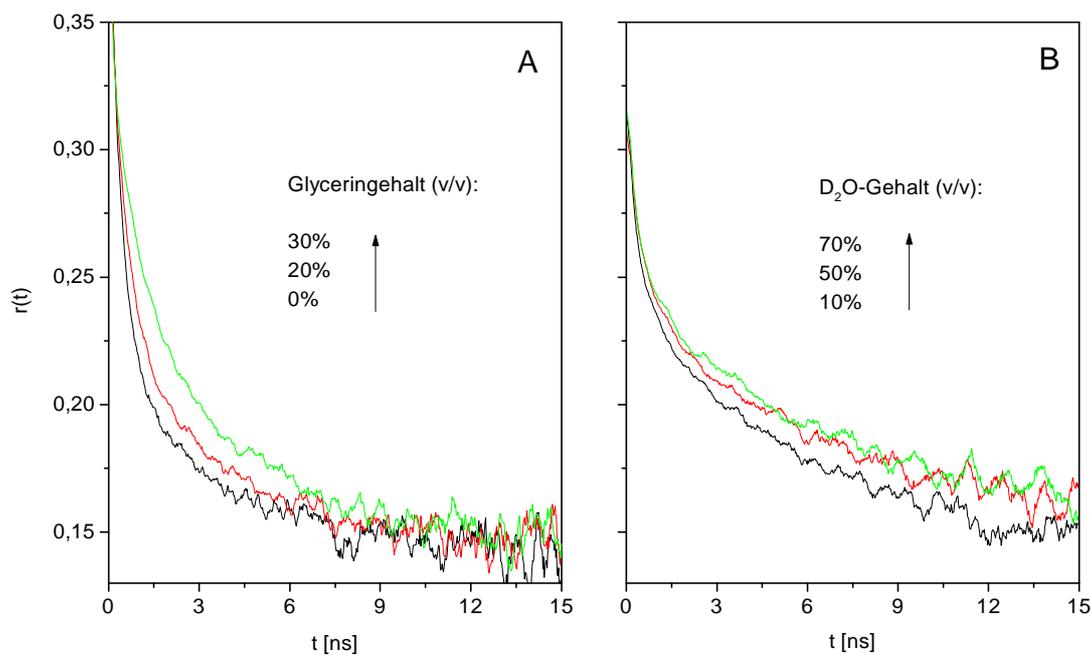


Abbildung 5.12: Fluoreszenzanisotropiekurven der Proben ROS-C316-AF im MII-Zustand (A) und OG-C316-AF mit reduzierter Schiff-Base (B) in Abhängigkeit von der Viskosität der Lösung. Zur besseren Übersicht wurden die Meßkurven über 5 Datenpunkte geglättet. Mit Ausnahme des Glycerin- bzw.  $D_2O$ -Gehalts erfolgten die Messungen unter Standardbedingungen.

Die Zugabe von Saccharose zur Probenlösung führte bei steigendem Saccharosegehalt ebenfalls zu einer Verlangsamung des Anisotropiezerfalls im vorderen Zeitbereich bei konstanter Endanisotropie. Die Messungen wurden wiederum mit der Probe ROS-C316-AF im MII-Zustand durchgeführt (Abbildung 5.13). Diese Experimente belegen, daß die Erhöhung der Viskosität mit unterschiedlichen Mitteln eine reproduzierbare Verlangsamung der Diffusionsbewegung verursacht.

Ohne konkrete Modellannahmen über die geometrischen Verhältnisse in den komplexen Systemen (kovalente Kopplung des Fluorophors an die Oberfläche des Rhodopsins in Mizellen bzw. ROS-Membranen) kann aus den verlängerten Rotationskorrelationszeiten kein direkter Zusammenhang mit konkreten Komponenten einer Diffusionsbewegung abgeleitet werden (Kinosita et al., 1977; Lipari und Szabo, 1980). Aus dem Kurzzeitverhalten der Anisotropiefunktion kann allerdings modellunabhängig näherungsweise eine mittlere Diffusionskonstante berechnet werden, die im Gegensatz zu den empirischen Parametern der Anpassung mit Exponentialtermen eine reale physikalische Bedeutung hat (Gl. 2.52). Der reziproke Wert dieser Diffusionskonstante ermittelt an Hand der Daten der Probe ROS-C316-AF in Saccharose ist in Abbildung 5.13 über den Quotienten aus Viskosität und Temperatur aufgetragen. Die Darstellung belegt eine lineare Abhängigkeit der mittleren Diffusionskonstante von der Viskosität. Im Gegensatz zu freiem Fluorescein führt die Extrapolation der Daten jedoch nicht durch den Koordinatenursprung, sondern ist vertikal

verschoben. Dieser Effekt konnte in weiteren Viskositätsreihen mit den Proben OG-C316-AF (mit reduzierter Schiff-Base), OG-C316-TR (mit und ohne Reduktion der Schiff-Base) und ROS-C140-AF im MII-Zustand reproduziert werden. Aus dem Anstieg der Funktion  $1/D = f(\eta/T)$  wurden Eigenvolumina der gebundenen Fluorophore mit  $(6,5 \pm 1,5) \times 10^{-22} \text{ cm}^3$  und  $(8,9 \pm 1,4) \times 10^{-22} \text{ cm}^3$  für Fluorescein an der Position C316 bzw. C140 und  $(12,3 \pm 1,6) \times 10^{-22} \text{ cm}^3$  für Texas Red an der Position C316 ermittelt. Diese Werte stimmen gut mit den Eigenvolumina der freien Fluorophore überein (vgl. Tabelle 5.3). Daraus kann man schließen, daß die schnelle Depolarisation der Rhodopsinproben mit dem Eigenvolumen der Fluorophore korreliert ist und durch deren Diffusionsbewegung bestimmt wird, obwohl die konkreten Bewegungsmodi selbst unbekannt sind.

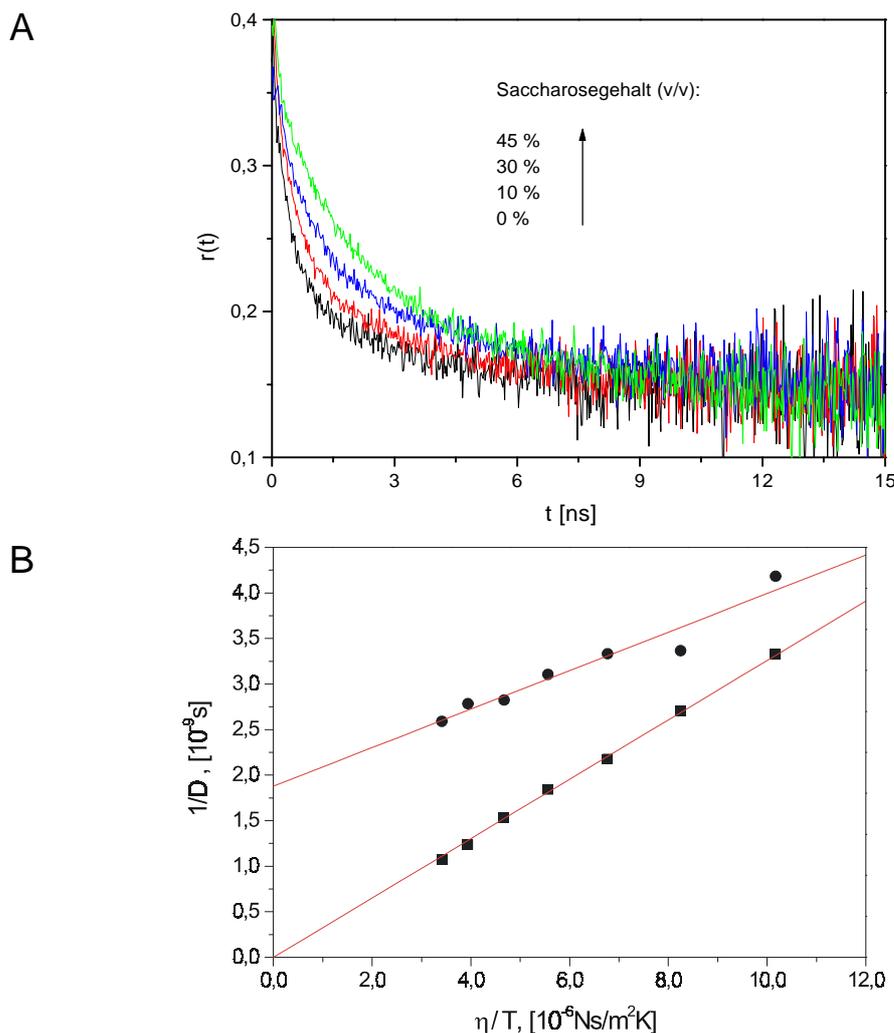


Abbildung 5.13: Fluoreszenzanisotropiekurven der Proben ROS-C316-AF im MII-Zustand in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration (A). In (B) sind die reziproken Diffusionskonstanten der Messungen der Probe ROS-C316-AF im MII-Zustand (Kreise) und von freiem IAF (Quadrate) über dem Quotient aus Viskosität und Temperatur aufgetragen.

Die bislang in diesem Abschnitt dargestellten Betrachtungen der Fluoreszenzanisotropie beruhen auf der Änderung der Viskosität bei konstanter Temperatur. Die Viskosität läßt sich ebenfalls durch Änderung der Temperatur bei konstanter Probenlösung beeinflussen, wobei eine Erhöhung der Temperatur allgemein zu einer Beschleunigung der Diffusionsbewegung führt. In biologischen Systemen wie Mizellen oder Membranen können allerdings in

Abhängigkeit von der Temperatur Phasenübergänge auftreten, die auf die Bewegungsfreiheit der Kohlenstoffketten der Lipide zurückzuführen sind. Die Konformation von Polypeptiden oder Aminosäureseitenketten kann ebenfalls Temperaturübergänge aufweisen. Nishimoto et al. (1998) beobachteten beispielsweise mit zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropiemessungen eine abrupte Bewegungszunahme der Tryptophanseitenkette in einer Lysozymmutante oberhalb von 30 °C. Daher kann die Bewegung der Fluorophore an der Oberfläche des Membranproteins Rhodopsin neben der Temperaturänderung allein zusätzlich von sterischen Bewegungseinschränkungen auf Grund von Temperaturübergängen beeinflusst werden.

Bei Variation der Temperatur zwischen 5 bis 40 °C wurden in der Tat Änderungen des Anisotropieverhaltens sowie der relativen Amplituden der Exponentialterme beobachtet. Im Fall der Rhodopsinproben OG-C316-AF und OG-C316-AF trat eine Abnahme des Ordnungsparameters  $S_2$  (Gl. 2.55) oberhalb von 20 °C auf, was auf eine temperaturabhängige sterische Bewegungseinschränkung hindeutet. In ROS-Membranen wurde dagegen eine kontinuierliche Zunahme des Ordnungsparameters über den gesamten Temperaturbereich festgestellt. Nach Untersuchungen von Lamba et al. (1994) liegt die Phasenübergangstemperatur von ROS-Membranen nahe 0 °C. Dies steht in Einklang mit dem hier beobachteten kontinuierlichen Verlauf des Ordnungsparameters, die Ursache für den Anstieg des Ordnungsgrades in ROS-Membranen ist allerdings unklar. Die Temperatur hat demnach einen Einfluß auf die Anisotropiefunktion, der aber nicht allein auf die Änderung der Viskosität zurückzuführen ist, sondern zusätzlich von thermischen Einflüssen auf die Lipid- bzw. Proteinumgebung des Fluorophors überlagert wird.

## 5.8 Lichtinduzierte Änderungen der Fluoreszenzanisotropie

Das Hauptziel dieser Untersuchungen war die Frage, ob sich das Anisotropieverhalten der an die cytoplasmatische Oberfläche gebundenen Fluorophore im Zuge der Lichtaktivierung des Rhodopsins ändert. Dazu wurde der Anisotropieverlauf verschiedener Rhodopsinproben im Grundzustand mit dem des MII-Zustands bei 5 °C und einem pH-Wert von 6,0 verglichen.

Diese experimentellen Parameter stellen ein Optimum zur Erzeugung und Stabilisierung des MII-Intermediats dar und wurden bereits in Abschnitt 5.5 ausführlich erläutert.

Abbildung 5.14 zeigt exemplarisch die Fluoreszenzanisotropiekurven von Rhodopsin in OG-Mizellen im Grundzustand und MII-Zustand nach selektiver Markierung der Positionen C140 und C316 mit Fluorescein bzw. Texas Red. Die Meßkurven sind auf einer normierten logarithmischen Skala dargestellt. Unabhängig von der Art des Fluorophors und der Bindungsposition sind reproduzierbare Unterschiede im Anisotropieverlauf zwischen dem Grundzustand und dem MII-Zustand deutlich zu erkennen. Die Meßkurven zeigen eine erhöhte Bewegungseinschränkung der Fluorophore an der Proteinoberfläche im MII-Intermediat.

Mit Ausnahme der Probe OG-C316-AF wiesen die Anisotropiekurven bei einer Temperatur von 5 °C nur zwei Zeitkomponenten auf. Die zugehörigen Fluoreszenzabklingkurven wurden mit drei Exponentialtermen angepaßt, wobei in allen Fällen eine Zunahme der mittleren Fluoreszenzlebensdauern nach Übergang in den MII-Zustand beobachtet wurde (Tabelle 5.6). Die Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauern ist auf den verringerten Heteroenergietransfer durch die Verschiebung der Retinalabsorptionsbande zurückzuführen, die mit dem Übergang in den MII-Zustand verbunden ist. Wie in Abschnitt 5.6.2 gezeigt werden konnte, hat der Heteroenergietransfer jedoch keinen signifikanten Einfluß auf die Anisotropie. Daher können die beobachteten Änderungen des Anisotropieverlaufs tatsächlich den lichtinduzierten Änderungen an der Oberfläche des Rhodopsins zugeordnet werden.

Probe	$\langle \tau_{\text{Grundzustand}} \rangle$ / ns	$\langle \tau_{\text{MII}} \rangle$ / ns
OG-C316-AF	2,30	3,34
OG-C140-AF	2,35	2,86
OG-C316-TR	3,55	4,13
OG-C140-TR	3,26	3,97

Tabelle 5.6: Mittlere Fluoreszenzlebensdauern der Rhodopsinproben OG-C316 und OG-C140 im Grundzustand und MII-Zustand nach Markierung mit Fluorescein und Texas Red. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die in Abbildung 5.14 dargestellten Anisotropiemessungen.

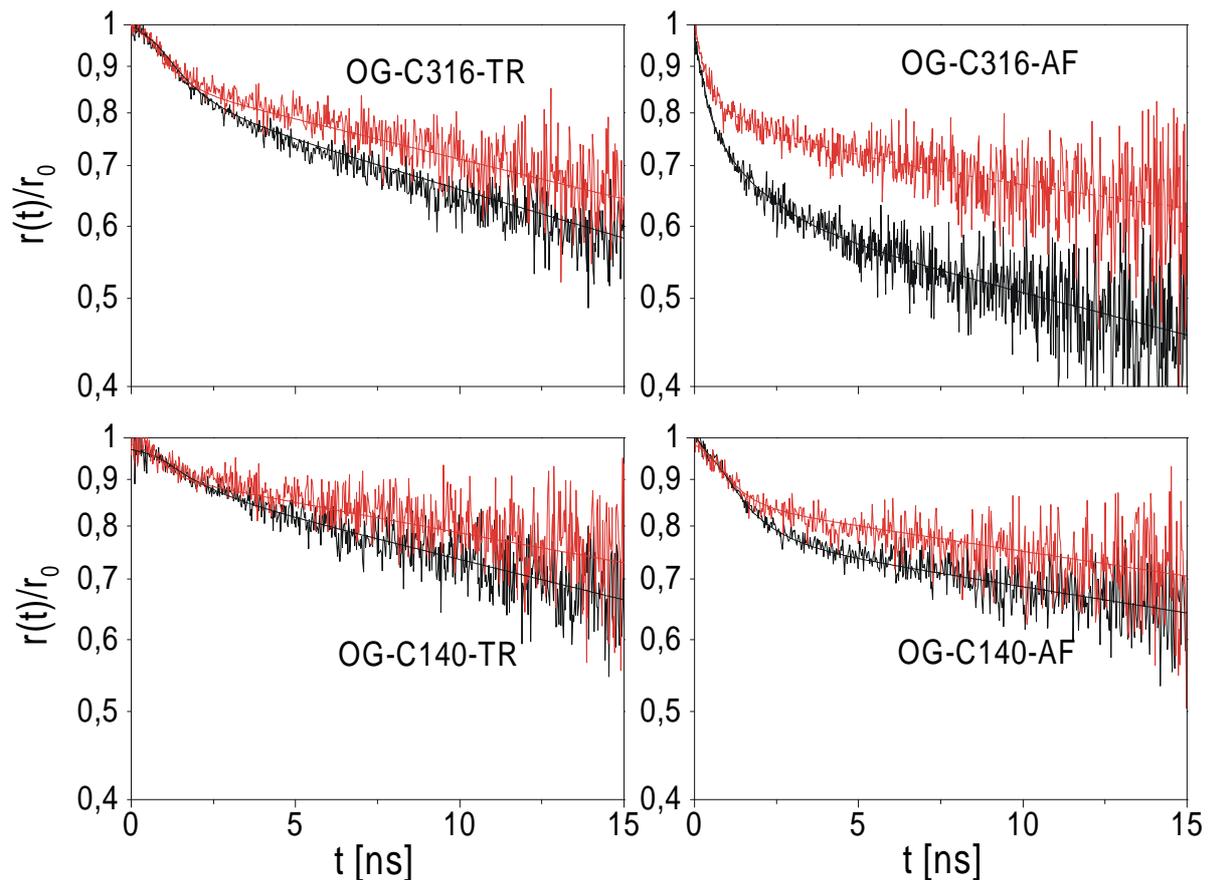


Abbildung 5.14: Normierte Fluoreszenzanisotropiekurven von Rhodopsin in OG-Mizellen im Grundzustand (durchgezogene Linien) und im MII-Zustand (gepunktete Linien). Dargestellt sind jeweils die Meßdaten nach Markierung der Position C316 und C140 mit Fluorescein bzw. Texas Red. Die Messungen wurden unter Standardbedingungen bei pH 6,0 und 5 ° C durchgeführt.

In ROS-Membranen wurde nach Markierung der Positionen C140 und C316 mit Fluorescein ein vergleichbarer Effekt beobachtet (Abbildung 5.15). Die drastische Erhöhung der Endanisotropie von 0,071 auf 0,172 (ROS-C140-AF) bzw. 0,074 auf 0,147 (ROS-C316-AF) belegt eindeutig eine Erhöhung der Bewegungseinschränkung als Folge der Lichtaktivierung. Neben dem Heteroenergie-transfer kann in ROS-Membranen prinzipiell auch Homoenergie-transfer auftreten. Der Einfluß des Homoenergie-transfers auf den Zerfall der Fluoreszenz-anisotropie kann hier jedoch vernachlässigt werden, da sich dessen Quantität beim Übergang vom Grundzustand in den MII-Zustand nicht ändert.

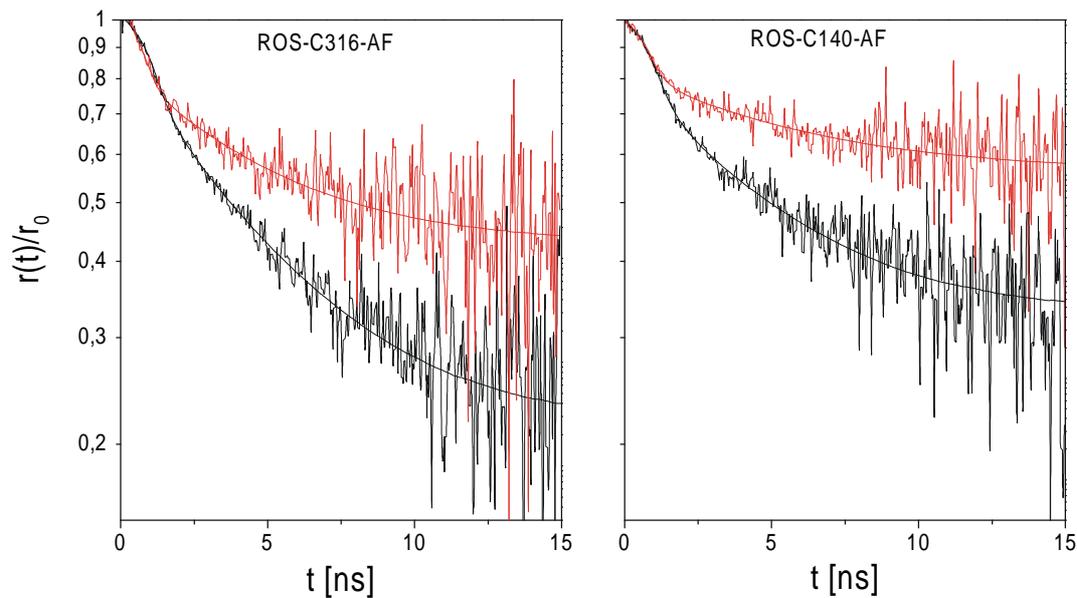


Abbildung 5.15: Normierte Fluoreszenzanisotropiekurven von Rhodopsin in ROS-Membranen im Grundzustand (durchgezogene Linien) und im MII-Zustand (gepunktete Linien) nach Markierung der Position C316 und C140 mit Fluorescein (Standardbedingungen bei pH 6,0 und 5 ° C).

Die Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie ermöglicht an Hand der in Abbildung 2.5 beschriebenen einfachen geometrischen Verhältnisse bereits ohne konkrete Annahmen über die tatsächlichen Bewegungskomponenten des Fluorophors die Bestimmung des Ordnungsparameters  $S_2$  (Gl. 2.55). Der Ordnungsparameter  $S_2$  stellt ein Maß für die Bewegungsfreiheit eines Fluorophors an der Oberfläche eines Makromoleküls dar. Die entsprechenden Werte sind neben den Mizellenrotationskorrelationszeiten in Tabelle 5.7 zusammengestellt.

Die Ordnungsparameter der Rhodopsinproben in OG-Mizellen liegen nahe eins und zeigen geringe Unterschiede zwischen der Position C140 und C316. Diese Werte sind relativ hoch. Die Ursache hierfür liegt in der Aufnahme der Anisotropiekurven an der Synchrotronanlage BESSY I. Die Breite der Anregungspulse von bis zu 900 ps am BESSY I verursachte auf Grund der eingeschränkten Auflösung im Kurzzeitbereich relativ niedrige Anfangsanisotropiewerte von 0,31 für Fluorescein bzw. 0,28 für Texas Red. Am HASYLAB wurden dagegen für Fluorescein-markierte Rhodopsinproben Anfangsanisotropiewerte von 0,37 bestimmt. Da die Anfangsanisotropie in die Bestimmung des Ordnungsparameters eingeht, führt dies zwangsläufig zu höheren  $S_2$ -Werten. Dennoch können die unter identischen Bedingungen ermittelten Parameter der Rhodopsinintermediate untereinander verglichen werden.

Die Daten beider Fluorophore deuten darauf hin, daß in OG-Mizellen bereits die Umgebung der Detergensmoleküle die Bewegung der Fluorophore gegenüber der nativen Umgebung in ROS-Membranen einschränkt. Im Fall der Fluorescein-markierten Rhodopsinproben wurde eine Erhöhung des Ordnungsparameters im MII-Zustand festgestellt, die in ROS-Membranen deutlich höher ist, als in OG-Mizellen. Den höchsten Ordnungsparameter wies Rhodopsin in OG-Mizellen nach Markierung mit Texas Red auf. Hier wurde außerdem keine weitere Erhöhung des Ordnungsparameters in Folge der Lichtaktivierung beobachtet, sondern lediglich eine Verlängerung der Gesamtrationskorrelationszeit. Die reproduzierbare Verlängerung der Gesamtrationskorrelationszeit in Mizellen in Folge der Lichtaktivierung des Rhodopsins läßt sich mit einer Zunahme des Rotationsvolumens erklären. Dieser Befund ist in Einklang mit zeitaufgelösten photoakustischen Experimenten von Straßburger et al. (1997). Die Autoren beobachteten ebenfalls eine Zunahme des Rhodopsinvolumens nach

Photolyse, wobei allerdings die Volumenänderung ( $31 \pm 3$  ml/mol für den Übergang von Rhodopsin im Grundzustand zu Lumirhodopsin) zeitlich noch vor der MII-Bildung auftrat.

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

Tabelle 5.7: Vergleich der modellunabhängigen Ordnungsparameter  $S_2$  unterschiedlicher Rhodopsinproben im Grundzustand und MII-Zustand. Zusätzlich sind die Rotationskorrelationszeiten für die Gesamtbewegung der Mizellenrotation angegeben. Die maximalen Fehler betragen  $\Delta\phi_{\text{rot}} = \pm 11$  ns bzw.  $\Delta S_2 = \pm 0,02$ .

Aus dem Kurzzeitverhalten der Fluoreszenzanisotropie kann ebenfalls modellunabhängig in Näherung eine mittlere Diffusionskonstante  $\bar{D}_M$  nach (Gl. 2.52) bestimmt werden. Die entsprechenden Werte sind für die Fluorescein-markierten Rhodopsinproben in Tabelle 5.8 zusammengestellt. Auch hier führt die Pulsbreite von 900 ps der Synchrotronanlage BESSY I auf Grund der eingeschränkten Auflösung im Kurzzeitbereich zu relativ unsicheren Ergebnissen. Der Fehlerbereich der mittleren Diffusionskonstante wurde an Hand von bis zu acht Wiederholungsmessungen an Fluorescein-markierten Bacteriorhodopsinmutanten abgeschätzt und betrug  $\Delta\bar{D}_M = \pm 0,16 \cdot 10^9 \text{s}^{-1}$ . Die mittlere Diffusionskonstante des Fluoresceins liegt nach Kopplung an die Oberfläche des Rhodopsins im Bereich von  $0,07$ - $0,56 \cdot 10^9 \text{s}^{-1}$ , wobei eine Tendenz zu einer Zunahme der Rotationsgeschwindigkeit nach Übergang in den MII-Zustand zu beobachten ist. Die Rotationsdiffusionskonstante des freien IAF wurde zum Vergleich mit  $0,88 \cdot 10^9 \text{s}^{-1}$  bestimmt.

	$\bar{D}_M / 10^9 \text{s}^{-1}$	
	Grundzustand	MII-Zustand
OG-C316-AF	0,15	0,26
OG-C140-AF	0,07	0,14
ROS-C316-AF	0,24	0,56
ROS-C140-AF	0,08	0,51

Tabelle 5.8: Mittlere Diffusionskonstanten bei  $5^\circ \text{C}$  der Fluorescein-markierten Rhodopsinproben im Grundzustand bzw. MII-Zustand.

## 5.9 Diskussion

### 5.9.1 Seitenkettenspezifische Markierung der Position C140 und C316

Wie bereits in Abschnitt 4.5.2 im Zusammenhang mit den Experimenten zur Schweratommarkierung der cytoplasmatischen Cysteinreste C140 und C316 diskutiert wurde, ermöglicht die Reaktivität der beiden Seitenketten im Dunkeln unter milden Reaktionsbedingungen eine Markierung mit sulfhydrylspezifischen Reagenzien (De Grip und Daemen, 1982). Weiterhin ist die Seitenkette der Position C316 deutlich reaktiver als die Seitenkette der Position C140 (Chen und Hubbell, 1978). Unter Ausnutzung dieser Reaktivitätsunterschiede konnte bei niedriger Reaktionsstöchiometrie zwischen dem jeweiligen Fluorophor und Rhodopsin und bei einer kurzen Reaktionszeit die Position C316 selektiv markiert werden. Im Falle des Fluoresceins führte die Reaktion in Abwesenheit von NaCl zu einer Erhöhung der Selektivität, was auf die Wechselwirkungen zwischen dem protonierbaren Fluorophor und der Oberflächenladung des Rhodopsins zurückzuführen ist (DeLange et al., 1997). Eine niedrige Temperatur senkt drastisch die Reaktivität der Position C140 gegenüber C316 (Chen und Hubbell, 1978). Dieser Effekt wurde ausgenutzt, um C316 selektiv mit TR bzw. IAEDANS zu markieren.

Zur Markierung der Position C140 wurde die Position C316 zunächst durch eine Reaktion mit 4,4'-Dithiodipyridin auf Eis blockiert. Dabei blieb die Sulfhydrylgruppe der Position C140 für die Reaktion mit den gewünschten Fluoreszenzmarkern zugänglich, die anschließend bei hoher Reaktionsstöchiometrie und langen Reaktionszeiten durchgeführt wurde. Eine vergleichbare Strategie wurde bereits von Albert et al. (1997) angewandt, um die Seitenkette von C140 selektiv mit Spin-reaktiven Reagenzien zu markieren.

Die selektive Kopplung der Fluorophore an C140 bzw. C316 konnte durch limitierte Proteolyse des markierten Rhodopsins mit Thermolysin und gelelektrophoretischer Analyse der Spaltfragmente eindeutig nachgewiesen werden. Hierbei entstehen zwei Peptidfragmente, von denen das größere F1-Fragment (24-30 kDa) die Position C140, das kleinere F2-Fragment (14-18 kDa) die Position C316 enthält (Pober und Stryer, 1975; Pober 1982). Nach Markierung der Position C140 konnte dementsprechend die Fluoreszenz der Marker ausschließlich im F1-Fragment, nach Markierung der Position C316 im F2-Fragment detektiert werden.

### 5.9.2 Der Zerfall der Anisotropie nach Kopplung der Fluorophore an Rhodopsin

Die Fluoreszenzanisotropiemessungen wurden nach dem Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung mit einer Apparatur durchgeführt, die speziell auf die Verwendung von Synchrotronstrahlungsquellen als Anregungslicht ausgelegt war (Gläsel, 2000). Ein großer Vorteil liegt hierbei in der Durchstimmbarekeit der Anregungswellenlänge, wodurch die Verwendung unterschiedlicher Fluorophore ermöglicht wird. Die Aufnahme der Daten erfolgte im sogenannten "single bunch"-Betrieb bei einer Wiederholrate der Anregungspulse von 5 MHz. Dies war erforderlich, da die Wiederholrate im "multi bunch"-Betrieb von 500 MHz wegen der Totzeit der Meßelektronik zu einem hohen Verhältnis zwischen den Anregungspulsen und den registrierten Photonen im Bereich von ca.  $10^4:1$  geführt hätte. Dies würde im Fall des lichtempfindlichen Rhodopsins zu einem starken Ausbleichen der Proben im Verlauf der Messung führen. Mit Hilfe von Absorptionsspektren konnte gezeigt werden, daß im "single bunch"-Betrieb weniger als 5 % der Probe durch das Anregungslicht gebleicht wurde und somit zeitaufgelöste Anisotropiemessungen an Rhodopsin mit ausreichender Zählstatistik durchgeführt werden konnten. Die Notwendigkeit des "single bunch"-Betriebs limitierte auf der anderen Seite die zur Verfügung stehende Meßzeit. Die meisten

Experimente wurden daher lediglich mit Fluorescein und Texas Red durchgeführt. Die übrigen Fluorophore wurden im allgemeinen verwendet, um zusätzlichen Aufschluß über den Eigenanteil der gebundenen Fluorophore am Anisotropieverhalten zu gewinnen.

Die Kopplung der Fluorophore an die Oberfläche des Rhodopsins führte zu einem komplexen Fluoreszenzabklingverhalten, das in der Regel eine Anpassung mit drei Exponentialfunktionen erforderte. Ein derartiges Abklingverhalten wird in der Literatur häufig für extrinsische und intrinsische Fluorophore in biologischen Makromolekülen beschrieben (siehe z.B. Tanaka et al., 1994; Dong et al., 1997; Nishimoto et al., 1998). Messungen an Bacteriorhodopsin- und Rhodopsinmutanten, die an derselben Apparatur durchgeführt wurden, zeigten ein vergleichbares Ergebnis (Gläsel, 2000). Als Ursache für das komplexe Fluoreszenzverhalten in Proteinen werden Energietransferprozesse, eine statistische Verteilung der Fluoreszenzlebensdauern sowie Wechselwirkungen zwischen dem Fluorophor und angrenzenden Aminosäuren diskutiert (Wahl, 1975; Alcalá et al., 1987; Wu und Brand, 1994). Bei den hier untersuchten Rhodopsinproben mit kovalent gebundenen Fluorophoren spielen Energietransferprozesse eine besondere Rolle; die im Abschnitt 5.9.3 ausführlich diskutiert wird.

Die empirische Anpassung der Anisotropiekurven der Rhodopsinproben erfolgte mit einer Summe von bis zu drei Exponentialtermen. Die Anpassungen enthielten einen Term mit einer schnellen Rotationskorrelationszeit im Subnanosekundenbereich ( $\phi_1 = 0,12\text{-}0,5$  ns), einen zweiten Term mit einer mittleren Rotationskorrelationszeit ( $\phi_2 = 1,4\text{-}6,2$  ns) und im Fall der OG-Mizellen eine zusätzliche Langzeitkomponente ( $\phi_3 = 30\text{-}74$  ns). Im Fall der ROS-Membranen bestand der dritte Term aus einer konstanten Endanisotropie mit Werten zwischen 0,07 und 0,20. Die von Null verschiedene Endanisotropie weist auf eine verbleibende Ordnung der Übergangsdipolmomente hin und wurde als eine eingeschränkte Bewegungsfreiheit der Fluorophore interpretiert.

Die schnelle Zeitkomponente  $\phi_1$  wird allgemein der schnellen Eigenbewegung der Fluorophore um deren Bindungsstelle zugeordnet (Haran et al., 1992; Dong et al., 1997; Döring et al., 1997). Diese Interpretation wird durch die Rotationskorrelationszeiten der freien Fluorophore gestützt, die ebenfalls im Subnanosekundenbereich lagen. Die Langzeitkomponente wurde der Gesamtrotation der Rhodopsinmizellen zugeordnet. Die Größenordnung dieser Komponente kann mit Hilfe des Mizellenvolumens in grober Näherung abgeschätzt werden. Hierzu wurde für Rhodopsin eine Zylinderform mit einem Radius von 15 Å zu Grunde gelegt und die Detergenumgebung als Zylindermantel um das Protein simuliert. Mit einer Länge der OG-Moleküle von ca. 15 Å und einer Höhe des Zylinders von ca. 40 Å (dieser Wert entspricht ungefähr der Höhe des Transmembranbereichs von Rhodopsin nach Baldwin et al., 1997) ergibt sich für dieses einfache Modell nach (Gl. 2.50) und (Gl. 2.51) eine Rotationskorrelationszeit von 31 ns. Die beiden Gleichungen gelten streng genommen nur für kugelförmige Rotoren. Dennoch zeigt diese grobe Abschätzung, daß die Größenordnung der beobachteten Langzeitkomponente in der Tat der Gesamtrotation der Mizellen zugeordnet werden kann.

Obwohl die verwendeten Fluorophore keine ideal kugelförmigen Rotoren darstellen, zeigten die Anisotropiekurven der freien Fluorophore in wäßriger Lösung einen monoexponentiellen Verlauf. Eine Aufspaltung der Rotationsbewegung in mehrere Bewegungskomponenten auf Grund der Asymmetrie der Moleküle wurde ausschließlich in extrem viskosen Medien beobachtet. Daraus folgt, daß die nach Kopplung an Rhodopsin beobachtete mittlere Zeitkomponente  $\phi_2$  nicht auf eine Komponente der Eigenbewegung der Fluorophore zurückzuführen ist. Es ist viel mehr anzunehmen, daß es sich hierbei um einen Bewegungsbeitrag der Bindungsstelle zur Depolarisation handelt. Vergleichbare Rotationskorrelationszeiten wurden bei Untersuchungen des Anisotropiezerfalls intrinsischer und extrinsischer Fluorophore in Proteinen bereits früher beschrieben. Je nach Art der untersuchten Systeme ordnen die Autoren diese Komponente einer Bewegung einer Proteindomäne (Hamman et al.,

1996), eines einzelnen Loopbereichs (Juszczak et al., 1997) oder Fluktuationen der Orientierung des Fluorophors relativ zu seiner Proteinumgebung (Döring et al., 1997) zu.

Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben wiesen die Fluorescein-markierten Rhodopsinproben in der Regel alle drei oben beschriebenen Anisotropiekomponenten auf. Ebenfalls drei Zeitkomponenten wurden mit dem Fluorophor 4-Chlor-7-hydroxycoumarin nach Kopplung an Rhodopsin beobachtet (Gläsel, 2000). Bei den Fluoreszenzmarkern IAEDANS und TR fehlte die mittlere Zeitkomponente. Auch Haran et al. (1992) konnten nach Kopplung von IAEDANS an die 3-Phosphoglyceratkinase ebenfalls nur eine schnelle Rotationskorrelationszeit im Subnanosekundenbereich detektieren. Der Abstand zwischen dem konjugierten  $\pi$ -Elektronensystem des Fluorophors und der Sulfhydrylgruppe der markierten Cysteine beträgt für TR ca. 15 Å bzw. für IAEDANS ca. 10 Å im Vergleich zu ca. 5 Å für IAF. Die großen Abstände führen vermutlich zu einer Entkopplung der Diffusionsbewegung der Fluorophormoleküle von der Bewegung der Bindungsstelle. Nach Kopplung von DNZ an Rhodopsin konnte dagegen keine Kurzzeitkomponente detektiert werden. Schneider et al. (1988) konnten unter Verwendung des Dansylmarkers ebenfalls keine Pikosekundenkomponente bei Anisotropiemessungen an Immunglobulinen nachweisen. Vermutlich liegt die schnelle Eigenbewegung des Dansylmarkers unter der Auflösungsgrenze oder wird durch die Kopplung an die Proteinoberfläche unterbunden. Bei der empirischen Anpassung der Anisotropiekurven der Fluorescein-markierten Rhodopsinproben mit drei Exponentialtermen konnte jedoch keine signifikante Abhängigkeit der Amplituden und Rotationskorrelationszeiten von der Position der Bindungsstelle nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür liegt einerseits darin, daß diese empirischen Parameter nicht voneinander unabhängig sind und andererseits die Bewegung des Fluorophors die Rotationsdiffusion dominiert.

Untersuchungen an Bacteriorhodopsin, die an der gleichen Apparatur durchgeführt wurden, führten zu vergleichbaren Ergebnissen (Gläsel, 2000). Nach Markierung verschiedener Positionen in den interhelikalen Loopbereichen des Bacteriorhodopsins mit Fluorescein wies die Anisotropieabklingkurven ebenfalls drei Komponenten auf, wobei die Rotationskorrelationszeit der mittlere Komponente zwischen 1,8-6,0 ns lag. Mit Texas Red bzw. IAEDANS konnte dagegen auch dort keine mittlere Komponente, mit dem Dansylmarker keine schnelle Pikosekundenkomponente nachgewiesen werden.

Zur weiteren Charakterisierung des Anisotropiezerfalls wurden äußere Parameter der Messung variiert. Die Erhöhung der Viskosität der Probenlösung durch Zugabe von D<sub>2</sub>O, Glycerin oder Saccharose führte in allen Fällen zu einer signifikanten Verlängerung der Rotationskorrelationszeiten im vorderen Zeitbereich und zu einer Herabsetzung der mittleren Diffusionskonstante. Bei OG-Mizellen wurde zusätzlich eine geringfügige Verlangsamung der Gesamttrotation festgestellt. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit einer Interpretation der Anisotropiekomponenten als unterschiedliche Bewegungskomponenten der Fluorophore an der Oberfläche des Rhodopsins.

Bei Variation der Temperatur wurde in OG-Mizellen eine Abnahme des Ordnungsparameters  $S_2$  oberhalb von 20 °C beobachtet, was auf eine erhöhte Fluorophorbeweglichkeit oberhalb dieser kritischen Temperatur hinweist. Als Ursache hierfür kommen ein Phasenübergang der Detergensmoleküle oder ein temperaturabhängiger Konformationsübergang im Proteingerüst in Frage (Nishimoto et al., 1998). Dieser Temperatureffekt trat jedoch unabhängig von der Bindungsstelle und der Art des Fluorophors auf. Ein vergleichbarer Effekt wurde auch nach Kopplung von Fluorophoren an unterschiedliche Positionen im Loopbereich zwischen den Helices 1 und 2 in Rhodopsinmutanten sowie in Bacteriorhodopsinmizellen und Purpurchmembranen beobachtet (Gläsel, 2000). Für einen thermischen Übergang einer Polypeptidkette würde man dagegen ein unterschiedliches Temperaturverhalten in Abhängigkeit von der jeweiligen Proteinumgebung erwarten. In ROS-Membranen liegt die Phasenübergangstemperatur nahe 0 °C (Lamba et al., 1994). Demnach sollte in ROS-Membranen keine Temperatur-

schwelle in dem untersuchten Bereich zwischen 5 und 40 °C auftreten. Bei den Messungen an ROS-Membranen wurde zwar in der Tat keine Temperaturschwelle beobachtet, allerdings wurde hier eine kontinuierliche Zunahme des Ordnungsparameters mit steigender Temperatur festgestellt. Dies deutet auf eine Zunahme der Bewegungseinschränkung hin. Die Ursache hierfür ist unklar. Möglicherweise erfordert die extrem niedrige Rate der Dunkelaktivierung des Rhodopsins in der nativen Membranumgebung unter physiologischen Temperaturen eine äußerst starre Konformation des Rezeptors.

### 5.9.3 Der Einfluß von Energietransferprozessen

Die Überlagerung der Rotationsdiffusion mit Energietransferprozessen führt im allgemeinen zu einem komplexen Verlauf der Fluoreszenzanisotropie (Szabo, 1984; Tanaka, 1998). Mit Ausnahme des DNZ-Fluorophors wiesen alle verwendeten Fluoreszenzmarker eine spektrale Überlagerung der Absorptionsbande mit der jeweiligen Emissionsbande auf. Dies ermöglicht das Auftreten von Homoenergietransfer, sobald der Abstand zwischen den Fluorophormolekülen ausreichend klein ist (der Abstand zwischen Donator und Akzeptor muß dabei kleiner als ca. 100 Å sein; Lakowicz, 1999). Die spektrale Überlagerung der Fluorophoremission mit der Absorptionsbande des Retinals führt zusätzlich zum Auftreten von Heteroenergietransfer. Um aus dem Verlauf der Fluoreszenzanisotropiekurven Aussagen über die Bewegung der Fluorophore an der Oberfläche des Rhodopsins treffen zu können, mußte daher der Einfluß des Energietransfers auf die Anisotropie untersucht werden. Dies war um so mehr erforderlich, da die Lage der Retinalabsorptionsbande in Folge der Lichtaktivierung des Rhodopsins von  $\lambda_{\max} = 498$  nm im Grundzustand nach  $\lambda_{\max} = 380$  nm im MII-Zustand verschoben wird, wodurch sich die Transferverhältnisse drastisch ändern können.

Der Vergleich zwischen Anisotropiemessungen an Rhodopsin mit und unter Ausschluß von Heteroenergietransfer ergab allerdings, daß der Heterotransfer keinen signifikanten Einfluß auf die Fluoreszenzanisotropie hatte. Die Experimente wurden mit dem Fluoresceinmarker durchgeführt, der im Grundzustand des Rhodopsins die stärkste spektrale Überlagerung mit der Retinalbande aufwies. Im Kontrollexperiment wurde der Energietransfer durch Reduktion der Schiff-Base mit Natriumborhydrid unterbunden. Dies führte zwar zu einer deutlichen Verlängerung der mittleren Fluoreszenzlebensdauern, signifikante Veränderungen im Verlauf der Anisotropiekurven traten allerdings nicht auf. Dasselbe Ergebnis wurde mit Anisotropiemessungen an Fluorescein-markierten Bacteriorhodopsinmutanten erhalten. Auch hier konnte in Mizellen und Purpurmembranen eine Beeinflussung des Anisotropiezerfalls durch Heteroenergietransfer ausgeschlossen werden (Gläsel, 2000). Diese experimentellen Ergebnisse stimmen in ausgezeichneter Weise mit einem theoretischen Modell von Tanaka und Mataga (1982) überein. Die Autoren sagten für ein Makromolekül mit einem starr gebundenen Akzeptor und einem Donator, der interne Diffusionsbewegungen ausführen kann, einen vernachlässigbaren Einfluß des Heteroenergietransfers auf die Anisotropie voraus. Im Fall der beiden Retinalproteine Rhodopsin und Bacteriorhodopsin ist der Akzeptor, der Retinalchromophor, in der Transmembranregion eingebettet und kann sich deshalb, dem Modell entsprechend, nicht frei bewegen.

Im Gegensatz dazu wurde ein starker Effekt des Homoenergietransfers auf den Zerfall der Anisotropie festgestellt. Die Experimente zur Untersuchung des Homotransfers wurden mit Rhodopsin in OG-Mizellen nach Markierung der beiden Cysteinreste C140 und C316 mit Fluorescein bzw. Texas Red durchgeführt. Als Vergleich dienten Rhodopsinproben, bei denen nur die Position C316 markiert war. Der TR-Fluorophor weist nur eine geringe spektrale Überlagerung mit der Absorptionsbande des Retinals auf. Infolgedessen ist der Heterotransfer hier vernachlässigbar. Im Falle der Fluoresceinproben wurde der Heterotransfer durch Reduktion der Schiff-Base mit Natriumborhydrid unterbunden. Somit stand ein Probenensemble zur Verfügung, mit dem der intramolekulare Homoenergietransfer als isolierter

Prozeß untersucht werden konnte. In beiden Fällen wurde eine drastische Beschleunigung des Anisotropiezerfalls in Gegenwart von Homoenergietransfer beobachtet. Dieses Ergebnis stimmt wiederum mit Anisotropiemessungen an Bacteriorhodopsinmutanten in Purpormembranen überein (Gläsel, 2000). In diesem System wurde der intermolekulare Homoenergietransfer nach Kopplung von Fluorescein an die Oberfläche des Bacteriorhodopsins und Bleichen des Retinals mit Hydroxylamin als isolierter Prozeß untersucht. Mit steigender Markierungsstöchiometrie wurde dort ein beschleunigter Zerfall der Fluoreszenzanisotropie festgestellt. Blackman et al. (1998) beobachteten einen vergleichbaren Effekt des Homotransfers bei Anisotropiemessungen an einem Erythrozyten-Anion-Austausch-Protein (AEI), das mit Eosin-5-maleimid markiert wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Energietransferprozesse lediglich empirisch untersucht. Eine weitergehende Analyse des Energietransfers in Rhodopsin wurde von Matthias Gläsel durchgeführt (Gläsel, 2000). Nach einem Modell von Karolin et al. (1998) für den Spezialfall des intramolekularen Homoenergietransfers und Abschätzung minimaler und maximaler Werte für den mittleren Orientierungsfaktor  $\langle \kappa^2 \rangle$  zwischen den Übergangsdipolmomenten von Donator und Akzeptor konnten hierbei minimale und maximale Abstände zwischen den Fluorophoren an Position C140 und C316 in OG-Mizellen bestimmt werden. Nach Markierung mit Fluorescein lag der Abstand zwischen C140 und C316 im Bereich von 22-32 Å, nach Markierung mit Texas Red im Bereich von 26-39 Å. Gemäß der Röntgendiffraktionsexperimente, die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, beträgt der Abstand zwischen den Cysteinresten C140 und C316  $27 \pm 2$  Å (vgl. Abschnitt 4.5.6). Die mit Hilfe des Homoenergietransfers bestimmten Abstände liegen somit in einem sinnvollen Bereich, die starken Schwankungen der Werte zeigen aber zugleich die Grenzen der Fluoreszenzmethode auf. Ohne genaue Kenntnis des Orientierungsfaktors sind nur relativ grobe Abstandsschätzungen möglich.

Eine vergleichbare Vorgehensweise ermöglichte die Abschätzung der Abstände zwischen der Fluorophorbindungsstelle an der Oberfläche und dem Retinal in der Transmembranregion durch Analyse der Heteroenergietransferparameter. Demnach betragen die Abstände zwischen den  $\alpha$ -Kohlenstoffatomen von C140 und C316 und dem C<sub>10</sub>-Atom des Retinals 26,3-43 Å bzw. 28,5-32,2 Å (Gläsel, 2000). Nach dem theoretischen Strukturmodell von Pogozheva et al. (1997) beträgt der Abstand zwischen dem  $\alpha$ -Kohlenstoffatom von C140 und dem C<sub>10</sub>-Atom des Retinals 34,6 Å. Die mit Hilfe der Heteroenergietransferparameter ermittelten Abstandsbeziehungen liegen somit wiederum in einem realistischen Bereich. Die von Gläsel (2000) bestimmten Abstandswerte sind jedoch insgesamt kleiner als die von Wu und Stryer (1972) angegebenen Abstandsbeziehungen. Wu und Stryer (1972) ermittelten für drei unterschiedliche Bindungsstellen in Rhodopsin Abstände von 75, 55 bzw. 48 Å zum Retinal. Die Autoren konnten die Position der Bindungsstellen nicht näher spezifizieren, schlossen aber aus der Art der verwendeten Fluoreszenzmarker, daß es sich bei den ersten beiden Bindungsstellen um Cysteinreste handelte. Nach dem gegenwärtigen Stand der Erkenntnis über die Reaktivität der Cysteine in Rhodopsin muß es sich dabei um die Positionen C140 und C316 handeln.

#### 5.9.4 Die Lichtaktivierung des Rhodopsins

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzanisotropiemessungen im Grundzustand und MII-Zustand des Rhodopsins wurden in OG-Mizellen bzw. ROS-Membranen nach selektiver Markierung jeweils eines Cysteinrests durchgeführt. Der Homoenergietransfer konnte daher lediglich in ROS-Membranen auftreten, wurde aber durch eine niedrige Markierungsstöchiometrie möglichst reduziert. Da sich die Abstandsverhältnisse zwischen einzelnen Rhodopsinmolekülen in ROS-Membranen zudem im Zuge der Lichtaktivierung nicht ändern, wird das Anisotropieabklingverhalten der Rhodopsinintermediate in gleichem

Maße vom Homoenergietransfer beeinflusst, so daß ein Vergleich der Anisotropiekurven ohne Quantifizierung des Homotransfers möglich ist. Der Heteroenergietransfer hatte dagegen keinen signifikanten Einfluß auf die Fluoreszenzanisotropie. Daher können die Änderungen der zeitaufgelösten Anisotropie in Folge der Lichtaktivierung des Rhodopsins auf die Veränderungen der cytoplasmatischen Oberfläche zurückgeführt werden.

Die Durchführung der Messungen bei einer Temperatur von 5 °C und einem pH-Wert von 6,0 ermöglichte die Stabilisierung des lichtaktivierten MII-Intermediats über einen Zeitraum, der für die Aufnahme der Anisotropiekurven mit ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis ausreichend war. Die Anisotropiekurven von Rhodopsin in OG-Mizellen zeigten nach Markierung mit Fluorescein und Texas Red signifikante Veränderungen nach Übergang in den MII-Zustand. Die Erhöhung der Gesamtrationskorrelationszeit kann mit der Zunahme des Proteinolumens erklärt werden und steht in Einklang mit photoakustischen Untersuchungen der Rhodopsinaktivierung (Straßburger et al., 1997). Diesen Untersuchungen zur Folge resultiert die Volumenzunahme aus der Isomerisierung des Retinalchromophors, tritt zeitlich allerdings noch vor der MII-Bildung auf. Im Fall der Fluorescein-markierten Rhodopsinproben wurde in OG-Mizellen eine geringfügige Zunahme des Ordnungsparameters  $S_2$  beobachtet, was auf eine erhöhte sterische Einschränkung der Fluorophorbeweglichkeit hindeutet. Die drastische Erhöhung der Endanisotropie in der nativen Membranumgebung der ROS-Membran macht deutlich, daß es sich hierbei nicht um einen Effekt der Detergenzmoleküle handelt, sondern tatsächlich um Veränderungen an der Proteinoberfläche. Zusätzlich wurde in ROS-Membranen nach Übergang in den MII-Zustand eine schnellere Diffusionsbewegung beobachtet. In OG-Mizellen lagen die Änderungen dagegen innerhalb des Fehlerbereichs.

Bei allen Fluorescein-markierten Proben wurde eine höhere Bewegungseinschränkung des Fluorophors an der Position C140 im Vergleich zu der Position C316 beobachtet. Nach dem Sekundärstrukturmodell des Rhodopsins besitzen die hier untersuchten Loopbereiche eine vergleichbare Länge, wobei jeweils ca. 10-11 Aminosäuren zur wäßrigen Umgebung hin exponiert sind (vgl. Abbildung 1.5). Die Aminosäure C140 befindet sich nach den bislang vorliegenden Strukturdaten bzw. Strukturmodellen am Ende der Helix 3, wohingegen K311 die letzte direkt zugängliche Aminosäure der Helix 7 ist (Baldwin et al., 1997; Pogozeva et al., 1997). Demnach befindet sich C316 nahezu in der Mitte des Loopbereichs zwischen Helix 7 und den C-terminalen Palmitoylierungsstellen. Neuere ESR-Daten deuten allerdings daraufhin, daß Helix 7 zwar die Membran-Wasser-Grenzfläche bereits auf Höhe von M309 durchstößt, die Helix aber vermutlich erst auf Höhe der Aminosäure R314 endet (Altenbach et al., 1999b). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Röntgendiffraktionsexperimente belegen einen Abstand von ca. 10 Å zwischen der Position von C316 und dem Zentrum der Helix 7 (vgl. Abschnitt 4.5.6). Auf Grund der größeren Entfernung von C316 zu der benachbarten Transmembranhelix sollte man daher auch eine geringere Bewegungseinschränkung an dieser Bindungsposition im Vergleich zu C140 erwarten.

Die beobachtete Zunahme des Ordnungsparameters stimmt gut mit der Vorstellung überein, daß erst die Lichtaktivierung des Rhodopsins die Bindung und Aktivierung des visuellen G-Proteins Transducin an der cytoplasmatischen Oberfläche ermöglicht. Aus der Literatur ist bekannt, daß die hier untersuchten Loopbereiche zwischen Helix 3 und Helix 4 bzw. Helix 7 und den C-terminalen Palmitoylierungsstellen an der Interaktion mit Transducin beteiligt sind (König et al., 1989; Franke et al., 1992). Eine mögliche Erklärung besteht darin, daß die Aminosäuren der cytoplasmatischen Oberfläche in Folge der Lichtaktivierung einen starrere Konformation einnehmen, was schließlich zur Ausbildung der Transducinbindungsstelle führt.

Die bislang durchgeführten Experimente belegen, daß mit der Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie lichtinduzierte Änderungen an der Oberfläche des Rhodopsins detektiert werden können. Eine weitergehende Interpretation der Anisotropiedaten erfordert

allerdings die Anpassung der Meßkurven unter Verwendung geeigneter Modelle, mit denen die konkreten Bewegungskomponenten des Fluorophors beschrieben werden können. In der Literatur werden verschiedene derartige Bewegungsmodelle diskutiert (siehe z.B. Kinoshita et al., 1977; Lipari und Szabo, 1980; Szabo, 1984; van der Meer et al., 1984; Fujiwara und Nagayama, 1985), deren Ziel die Beschreibung der Verteilungsfunktion  $f(\theta)$  der Übergangsdipolmomente der Absorption bzw. Emission in Abhängigkeit von den Bewegungskomponenten des Fluorophors ist.

Die Eignung dieser Modelle zur Beschreibung des Anisotropieverhaltens von Rhodopsin wurde von Gläsel (2000) überprüft, wobei vor allem das erweiterte Bewegungsmodell von van der Meer et al. (1984) zur Anwendung kam. Das Modell beruht auf der Annahme einer schnellen Rotation des Fluorophors um eine Symmetrieachse, wobei die Symmetrieachse selbst eine langsamere Schwankungsbewegung vollzieht. In dem hier untersuchten System kann die Schwankungsbewegung der Symmetrieachse als eine Bewegung der Loopbereiche interpretiert werden. Die Anpassung liefert dabei einen direkten Zugriff auf die Diffusionskonstanten bzw. Ordnungsparameter der beiden Bewegungskomponenten. Die Anpassung der Meßkurven von Fluorescein-markiertem Rhodopsin in ROS-Membranen zeigte eine Erhöhung der Ordnungsparameter nach Übergang in den MII-Zustand, was auf eine sterische Einschränkung sowohl der Rotationsbewegung des Fluorophors, als auch der Schwankungsbewegung der Loopbereiche hindeutet. Die Lichtaktivierung führte außerdem zu einer schnelleren Rotationsdiffusion des Fluorophors, die Geschwindigkeit der Schwankungsbewegung blieb jedoch unverändert.

### 5.9.5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die lichtinduzierten Änderungen der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins mit der Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie untersucht. Hierzu wurden die nativen Cysteinreste C140 und C316 selektiv mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Die Messung der Anisotropiekurven erfolgte nach der Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung mit einer Apparatur, die speziell für den Einsatz von Synchrotronstrahlungsquellen entwickelt wurde (Gläsel, 2000). Es konnte gezeigt werden, daß mit diesem Meßprinzip auf Grund der niedrigen Anregungsintensität zeitaufgelöste Anisotropiemessungen an Rhodopsin möglich sind, ohne den photolabilen Rezeptor bereits durch das Anregungslicht zu bleichen.

Die Messungen wurden in ROS-Membranen und OG-Mizellen durchgeführt. Die empirische Anpassung der Meßkurven erfolgte mit einer Summe von bis zu drei Exponentialtermen. Die resultierenden Rotationskorrelationszeiten wurden der Eigenbewegung der Fluorophore (Pikosekundenbereich), der Bewegung der Bindungsstelle (mittlerer Zeitbereich, 1,4-6 ns) oder der Gesamtrotation der Rhodopsinmizellen (30-75 ns) zugeordnet. Im Fall der ROS-Membranen wurde eine konstante Endanisotropie beobachtet, die auf die eingeschränkte Bewegung der Membranfragmente auf der Fluoreszenzzeitkala zurückzuführen ist. Die Abhängigkeit des Anisotropieverlaufs von der Viskosität belegt, daß die Bewegung der Fluorophore an der Oberfläche des Rhodopsins sensitiv auf Veränderungen der Umgebung reagiert.

Der Vergleich der Anisotropiekurven von Rhodopsin im Grundzustand und im MII-Zustand ergab, daß mit der Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie lichtinduzierte Änderungen auf der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins nachweisbar sind. Der Einfluß von strahlungslosen Energietransferprozessen zwischen Fluorophor und Retinalchromophor (Heteroenergietransfer) bzw. zwischen gleichartigen Fluorophormolekülen (Homoenergietransfer) wurde durch Kontrollexperimente charakterisiert und konnte als Ursache für die beobachteten Änderungen des Anisotropiezerfalls ausgeschlossen werden. Die ersten Ergebnisse zur Untersuchung der Rhodopsinaktivierung deuten vor allem auf eine

Zunahme der Bewegungseinschränkung in Folge der Lichtaktivierung hin. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Modellvorstellung, daß die Photoaktivierung des Rezeptors eine Konformationsänderung an der cytoplasmatischen Oberfläche induziert, die erst die Bindung und Aktivierung des G-Proteins Transducin ermöglicht. Eine weitergehende Beschreibung der Bewegungsvorgänge auf der cytoplasmatischen Oberfläche erfordert die Verwendung bzw. Entwicklung von geeigneten Modellen zur Anpassung der Meßdaten, mit denen die konkreten Bewegungskomponenten des Fluorophors genauer analysiert werden können.

Die bislang durchgeführten Experimente ergaben, daß die Detektion der einzelnen Bewegungskomponenten auch von der Art der verwendeten Fluorophore abhängt. Mit Texas Red konnte beispielsweise die mittlere Zeitkomponente der empirischen Anpassung nicht nachgewiesen werden. Es muß daher überprüft werden, ob die Analyse der Bewegungskomponenten durch geeignete Fluorophore verbessert werden kann. Diese sollten vor allem einen möglichst geringen Abstand zu der Bindungsstelle aufweisen, um einer Entkopplung der Fluorophorbewegung von der Bewegung der Bindungsstelle entgegenzuwirken. Denkbar ist hierbei auch die Verwendung von intrinsischen Fluorophoren wie z.B. Tryptophanreste, die durch gezielte Mutagenese an unterschiedlichen Positionen in die interhelikalen Loopbereiche eingeführt werden können. Zur Zeit wird in der AG Heyn ein Pikosekundenlasersystem zur Durchführung von zeitaufgelösten Anisotropiemessungen aufgebaut. Damit kann nicht nur die Qualität der Meßdaten durch eine bessere Auflösung im Kurzzeitbereich verbessert werden, sondern auch die Limitierung der Meßzeit durch die Notwendigkeit des "single bunch"-Betriebs der Synchrotronanlagen aufgehoben werden. In Zukunft können detaillierte Kenntnisse über die Dynamik der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins dazu beitragen, das Verständnis der Rezeptoraktivierung auf molekularer Ebene zu verbessern.