

6 Zusammenfassung/Abstract

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Struktur und Dynamik der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins mittels Röntgendiffraktionsmethoden und zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropiemessungen. Rhodopsin ist der Photorezeptor der vertebralen Stäbchenzelle und zählt zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. In Analogie zu den anderen Mitgliedern dieser Familie fungiert im Rhodopsin der kovalent gebundene Chromophor 11-*cis*-Retinal als Antagonist und stabilisiert den inaktiven Grundzustand. Die Absorption von Licht verursacht die Isomerisierung zu all-*trans*-Retinal. Der Chromophor wirkt jetzt als Agonist und leitet die Aktivierung des Rezeptor ein. Dies ermöglicht schließlich die Bindung und Aktivierung des visuellen G-Proteins Transducin. Die bislang vorliegenden Strukturdaten über G-Protein gekoppelte Rezeptoren basieren auf der Untersuchung von zweidimensionalen Rhodopsinkristallen mittels hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie. Diese Studien geben erste Einblicke in die Transmembranregion des Rezeptors, die an der G-Proteinaktivierung maßgeblich beteiligten cytoplasmatischen Loopbereiche konnte allerdings noch nicht aufgelöst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Position der nativen Cysteinreste C140 und C316, die in den cytoplasmatischen Loopbereichen des Rhodopsins lokalisiert sind, mittels Röntgendiffraktion an multilamellaren Filmen zweidimensionaler Rhodopsinkristalle in Kombination mit Fourier-Differenzverfahren bestimmt. Dies erforderte die Herstellung von homogenen kristallinen Präparationen im mg-Bereich. Hierzu wurden die aus der Literatur bekannten Rekonstitutions- und Dialyseverfahren weiterentwickelt, wodurch der Anteil an Proteinaggregaten im Verhältnis zu kristallinen Membranstrukturen deutlich verringert werden konnte. Die Qualität der Präparationen wurde mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden überprüft. Mittels hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie und computergestützter Bildverarbeitung wurden die Gitterparameter charakterisiert. Die Gitterkonstanten einzelner Kristalle variierten im Bereich von $a = 59,1\text{--}62,4 \text{ \AA}$ bzw. $b = 83,2\text{--}90,7 \text{ \AA}$, wobei das Verhältnis b/a mit $1,42 \pm 0,03$ unabhängig von der Art der Präparation einen sehr konstanten Wert aufwies. Der Winkel γ zwischen a und b betrug $90 \pm 0,4^\circ$. Alle untersuchten Kristalle wiesen eine $p22_12_1$ -Symmetrie auf. Somit konnten die für diese Raumgruppe bekannten Phasen aus der Elektronenmikroskopie zur Auswertung der Röntgenexperimente verwendet werden. Es konnte zudem nachgewiesen werden, daß die untersuchten Mikrokristalle Reflexe bis zu einer Auflösung von $3,5 \text{ \AA}$ zeigten.

Durch Rekonstitution des Rhodopsins in Gegenwart von Cholesterin und Modifikation der Dialysebedingungen gelang die Herstellung multilamellarer Filme zweidimensionaler Rhodopsinkristalle. Die Röntgendiffraktionsexperimente wurden mit einem Drehanodengenerator als Röntgenquelle und einem linear ortsempfindlichen Detektorsystem durchgeführt. Die Seitenketten der Aminosäuren C140 und C316 wurden in Rhodopsinkristallen mit dem Schweratommarker PCMB derivatisiert und anschließend die Position der Marker mittels Fourier-Differenzverfahren ermittelt. Die Auflösung des Röntgenexperiments betrug $9,5 \text{ \AA}$. Das ausgeprägteste Maximum der Differenzdichteverteilung lag im Bereich der nach den bislang vorliegenden Strukturmodellen erwarteten Position der Aminosäure C140 am cytoplasmatischen Ende der Helix 3. Das zweite Hauptmaximum lag ca. 10 \AA vom Zentrum der Helix 7 entfernt in der Nähe der Helix 1 und wurde der Position der Aminosäure C316 zugeordnet. Die hier ermittelten Positionen der Schweratommarker stehen in Einklang mit den aus der Literatur bekannten Interaktionen der Aminosäuren C140 bzw. C316 mit anderen Aminosäureseitenketten des Rhodopsin. Somit konnte zum erstem Mal die Position einzelner Aminosäuren in den cytoplasmatischen Loopbereichen des Rhodopsins direkt bestimmt werden. Da bislang keine hochauflösenden Strukturdaten von Rhodopsin oder einem anderen G-Protein gekoppelten Rezeptor vorliegen, stellt die hier dargestellte Technik der

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

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die lichtinduzierten Veränderungen der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins mit der Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie untersucht. Diese Methode beruht auf Anregung von Fluorophoren mit kurzen, linear polarisierten Lichtpulsen, wodurch eine PhotoSelektion erzeugt wird, deren Zerfall in Folge der Fluorophorbewegung zeitaufgelöst verfolgt wird. Die Messungen wurden nach dem Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung unter Verwendung einer Apparatur durchgeführt, die speziell für den Einsatz an Synchrotronstrahlungsquellen entwickelt worden war. Die Aufnahme der Anisotropiedaten erfolgte an den Synchrotronanlagen BESSY I bzw. HASYLAB. Durch den Vergleich der Absorptionsspektren vor und nach einer Messung konnte gezeigt werden, daß auf Grund der niedrigen Intensität des Anregungslichts mit diesem Meßprinzip Anisotropiemessungen an dem lichtempfindlichen Rhodopsin möglich sind, ohne die Proben bereits durch das Anregungslicht selbst signifikant zu bleichen.

Zur Untersuchung der cytoplasmatischen Oberfläche wurden die nativen Cysteinreste C140 und C316 selektiv mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern derivatisiert. Die Anisotropiemessungen wurden an Rhodopsin in der nativen Umgebung der ROS-Membran oder in n-Octyl- β -D-glucopyranosid-Mizellen (OG-Mizellen) durchgeführt. Die empirische Anpassung der Fluoreszenzanisotropiekurven erfolgte mit einer Summe von bis zu drei Exponentialfunktionen. Die daraus resultierenden Rotationskorrelationszeiten wurden der schnellen Eigenrotationsdiffusion der Fluorophore (Pikosekundenbereich), der Bewegung der markierten Loopbereiche (mittlerer Zeitbereich, 1,4-6,0 ns) oder der Gesamtrotation der Rhodopsinmizellen (30-75 ns) zugeordnet. In ROS-Membranen wurde dagegen eine konstante Endanisotropie beobachtet, die auf die eingeschränkte Rotationsdiffusion der Membranfragmente auf der Fluoreszenzzeitkala zurückzuführen ist. Die Detektion der unterschiedlichen Zeitkomponenten hing allerdings von der Art der verwendeten Fluorophore ab. Ein großer Abstand zwischen der Sulfhydrylgruppe der markierten Cysteinreste und dem π -Elektronensystem des Fluorophors führte beispielsweise zu einer Entkopplung der Fluorophorbewegung von der Bewegung der Bindungsstelle.

Bei einer Temperatur von 5 °C und einem pH-Wert von 6,0 konnte der MII-Zustand für einen Zeitraum von 20 min stabilisiert werden, der die Aufnahme der Anisotropiekurven mit ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis ermöglichte. Der Vergleich der Anisotropiekurven des Grundzustands mit denen des MII-Zustands zeigte signifikante Veränderungen in Folge der Lichtaktivierung. Strahlungslose Energietransferprozesse wurden mit Hilfe von gezielten Kontrollexperimenten als Ursache für die beobachteten Anisotropieänderungen ausgeschlossen. Nach Übergang in den MII-Zustand wurde eine Erhöhung des Ordnungsparameters beobachtet, was auf eine Zunahme der sterischen Bewegungseinschränkung des Fluorophors zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Modellvorstellung, daß die Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors eine Konformationsänderung auf der cytoplasmatischen Oberfläche induziert, wodurch die Bindung und Aktivierung der G-Proteins eingeleitet wird. Mit diesen Experimenten konnte somit erstmals gezeigt werden, daß mit der Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie Konformationsänderungen auf der cytoplasmatischen Oberfläche des G-Protein gekoppelten Rezeptors Rhodopsin nachgewiesen werden können sind. Dies eröffnet die Möglichkeit, die dynamischen Vorgänge bei der Ausbildung der G-Proteinbindungsstelle systematisch zu untersuchen.

Abstract

The objective of this project was the investigation of the structure and mobility of the cytoplasmic surface of rhodopsin using X-ray diffraction methods and time-resolved fluorescence anisotropy measurements. Rhodopsin is the dim-light photoreceptor of the vertebrate retinal rod cells and is a member of the G protein-coupled receptor family. In analogy to other members of this family, rhodopsin's covalently bound chromophore 11-*cis*-retinal serves as an antagonist which stabilizes the inactive dark state of the receptor. Light absorption causes the photo-isomerization to the all-*trans* isomer. The chromophore now corresponds to the agonist and initiates the activation of the receptor, which finally leads to the binding and activation of the visual G protein transducin. Current available information on the structure of G protein-coupled receptors is based on the analysis of two-dimensional rhodopsin crystals using electron cryo-microscopy techniques. These studies gave first insights into the transmembrane domain of the receptor. However, understanding the mechanism of G protein mediated signal transduction requires structural knowledge on the cytoplasmic loops of the receptor, which could not be resolved until now.

Within this project the position of the two native cysteine residues C140 and C316 in the cytoplasmic loop region of rhodopsin was determined by X-ray diffraction experiments on lamellar stacks of two-dimensional crystals in combination with Fourier difference methods. This method required milligram amounts of macroscopic homogeneous crystalline samples. Thus, reconstitution and dialysis techniques have been developed to reduce the ratio between protein aggregates and crystalline membrane structures. The quality of the crystals was analyzed by high-resolution electron cryo-microscopy. Lattice constants of single crystals varied in the range of $a = 59.1\text{--}62.4 \text{ \AA}$ and $b = 83.2\text{--}90.7 \text{ \AA}$, whereas the ratio between b and a was found to be constant (1.42 ± 0.03) independent from different preparations. The angle γ between a and b was $90 \pm 0.4^\circ$. All single crystals analyzed so far showed a $p22_12_1$ symmetry. Thus, the phases from electron microscopy studies could be used to evaluate the X-ray diffraction data. Furthermore, it was demonstrated by electron cryo-microscopy that structural information could be obtained from the microcrystals to a resolution of 3.5 \AA .

Lamellar films of two-dimensional rhodopsin crystals have been produced after reconstitution of rhodopsin in the presence of cholesterol and detergent extraction under modified dialysis conditions. The X-ray experiments were performed using a rotating anode generator as the X-ray source and an one-dimensional position-sensitive detector system. The cysteine residues C140 and C316 were derivatized with the heavy-atom label PCMB and the position of the label was determined using Fourier-difference techniques. The resolution of the experiment was 9.5 \AA . The highest difference density peak was found close to the theoretically expected position at the end of helix 3 obtained from the current available structural models of the rhodopsin transmembrane domain. The second density peak was located close to helix 1 within a distance of 10 \AA to the center of helix 7. Thus the second density peak was assigned to the position of C316. The positions found for the heavy-atom labels were in a good agreement with the known interactions of the labeled cysteine side chains with other amino acids. Thus, for the first time the position of single amino acids in the cytoplasmic loop region of rhodopsin could be determined. The approach reported here offers the possibility to obtain additional structural information even from low-resolution data which could help to understand the mechanism of G protein-coupled receptor activation.

Within the second part of this project the light-induced changes at the cytoplasmic surface of rhodopsin were investigated using time-resolved fluorescence anisotropy measurements. The method is based on the excitation of a fluorescent chromophore by a short flash of linearly polarized light. In this way, a photoselection is produced. The initial anisotropic angular distribution of excited molecules will relax in time by rotational diffusion of the fluorophores.

Anisotropy measurements were carried out with a single-photon counting apparatus, which was especially designed to use synchrotron radiation as the light source. The measurements were performed at the synchrotrons BESSY I and HASYLAB, respectively. Absorption spectra of rhodopsin taken before and after a synchrotron measurement demonstrated that anisotropy data can be recorded without significant bleaching of the light-sensitive samples because of the very low intensity of the excitation pulses.

Different fluorophores were selectively attached to the native cysteine residues C140 and C316, respectively. The anisotropy decay was analyzed in native ROS-membranes and in detergent micelles using n-octyl- β -D-glucopyranoside (OG). A sum of up to three exponentials were fitted to the experimental anisotropy decay curves. The obtained rotational correlation times were assigned to the fast rotational diffusion of the fluorophores (picosecond time range), the movements of the cytoplasmic loops (1.4-6.0 ns) and to the rotational diffusion of the detergent micelles (30-75 ns). In the case of ROS-membranes, a constant term was used to describe the final anisotropy which is caused by the very slow rotational diffusion of the membranes on the fluorescence time-scale. It was found that the detection of the different time components depends on the nature of the fluorophores. For example, a long distance between the sulfhydryl group of the labeled cysteine residue and the π -electron system leads to decoupling of the fluorophore movement from the movement of the loop region.

The active MII state of rhodopsin was stabilized at low temperature (5 °C) and pH 6.0 for a time period of 20 minutes which was sufficient to record anisotropy decay curves at appropriate signal to noise ratio. The anisotropy decay curves taken from the inactive dark state and the MII state showed significant differences. It was demonstrated by control experiments that these changes were not caused by fluorescence energy transfer. An increase of the order parameter was observed within the MII state, which was interpreted as an increase of the sterical restriction of the fluorophore mobility. These findings are in good agreement with the common model that the activation of a G protein-coupled receptor is accompanied by conformational changes at its cytoplasmic surface, which finally enable binding and activation of the G protein. It was demonstrated that conformational changes at the surface of rhodopsin are detectable by the method of time-resolved fluorescence anisotropy. Thus, this approach offers promise for a systematic investigation of the mobility changes, which occur during the activation of G protein-coupled receptors.