

**FTIR-Spektroskopische Untersuchungen
zum Aktivierungsmechanismus des
Lichtrezeptors Rhodopsin:
Dunkelzustand und späte Photoprodukte**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie, Pharmazie
und Geowissenschaften
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Steffen Lüdeke
aus Kenzingen

Freiburg im Breisgau 2006

Dekan:	Prof. Dr. A. Bechthold
Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Prof. Dr. G. E. Schulz
Referent:	Prof. Dr. P. Gräber
Korreferent:	Prof. Dr. F. Siebert

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:	11. Mai 2006
--	--------------

Teile dieser Arbeit bilden den Inhalt folgender Publikationen:

Lüdeke, S., Beck, M., Yan, E. C., Sakmar, T. P., Siebert, F. und Vogel, R.:
The role of glu181 in the photoactivation of rhodopsin (2005)
J. Mol. Biol. **353**, S. 345-356.

Lüdeke, S., Lórenz-Fonfría, V. A., Siebert, F. und Vogel, R.:
Time-Resolved Rapid-Scan FTIR Difference Spectroscopy on a Non-Cyclic Photosystem:
Rhodopsin Photointermediates from Lumi to Meta II (2006)
Biopolymers, Online-Publikation verfügbar

Lüdeke, S., Huber, T., Siebert, F., Vogel, R., Sakmar, T. P.:
Protonation switches during rhodopsin activation: The roles of Glu 134 and Glu 247 (2006)
Manuskript in Bearbeitung

Beiträge auf Konferenzen:

Lüdeke S., Vogel R., Fan G.-B., Sheves M. und Siebert, F.:
A Rhodopsin Analog With a Slow Photocycle (2002)
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Dresden, Deutschland;
Posterpräsentation

Lüdeke S., Siebert, F. und Vogel R.:
FTIR studies on Glu181 in bovine Rhodopsin (2004)
2004 International Symposium on Retinal Proteins: "Experiments and Theory", Heidelberg,
Germany;
Posterpräsentation

Lüdeke, S., Beck, M., Siebert, F., Sakmar, T. P und Vogel, R.:
Function and Protonation States of Glutamate 181 in Bovine Rhodopsin (2005)
Joint Meeting of Swiss and German Biophysicists, Hünfeld, Germany;
Posterpräsentation und mündliche Präsentation

Lüdeke S., Siebert, F. und Vogel R.:
Rapid scan FTIR time resolved spectroscopy on bovine Rhodopsin (2005)
11th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Aschaffenburg,
Germany;
Posterpräsentation

Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Peter Gräber sehr herzlich für die Betreuung dieser Arbeit.

Einen ganz besonderen Dank richte ich an die beiden Personen, die mir diese Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht haben: Dies ist zum einen Prof. Friedrich Siebert, dem ich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit sowie für seine zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und seine stete Diskussionsbereitschaft danken möchte. Zum anderen ist dies Dr. Reiner Vogel, der mir während dieser Arbeit ein Mentor war. Durch enormen Einsatz hat er zu ihrem Gelingen beigetragen und mir dabei geholfen, ein kritischer und gewissenhafter Wissenschaftler zu werden.

Besonders herzlich möchte ich auch Prof. Thomas P. Sakmar von der Rockefeller University, New York danken. Er hat mir ermöglicht, in seinem Labor die molekularbiologischen Arbeiten durchzuführen, die für diese Arbeit eine wichtige Grundlage dargestellt haben. Die wissenschaftliche Zusammenarbeit mit ihm und seinem Team war hervorragend. Dabei möchte ich besonders Dr. Thomas Huber und Prof. Elsa C. Yan hervorheben, die meine Arbeit mit großem Interesse und Einsatz begleiteten, sowie Manija Kazmi und Kathryn Gunnarsson, die mich im Labor eingearbeitet und mich bei meinen Präparationen sehr unterstützt haben. Zudem wurde mir zusätzlich wichtiges Probenmaterial für die hier durchgeführten Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Bettina Mayer möchte ich hiermit herzlich für ihre Hilfe bei der Rhodopsin- und Transduzinpräparation danken.

Auch meinen Arbeitskollegen Ionela Radu, Daniel Winter, Jarmila Guijarro, Pascal Schwinté, Mischa Schmidt, Sven Reisdorf und Mohana Mahalingam bin ich für eine wunderbar angenehme Arbeitsatmosphäre sehr dankbar.

Wolfgang Sevenich danke ich für Rat und Tat bei allen Software und Computerfragen. Monika Jochum sei für ihre Hilfe in allen bürokratischen Angelegenheiten gedankt. Für die zuverlässige Unterstützung aus der Feinmechaniker- bzw. Elektronikwerkstatt danke ich Paul Merkt, Konrad Zander und Wolf-Dieter Schielin.

Für aufmerksame Korrekturlesearbeiten ein Extra-Dankeschön an meine Schwester Christina Lüdeke.

Für alle Unterstützung, die sich nicht in Worte fassen lässt, danke ich Mira und Judith.

Abkürzungen

Batho	Bathorhodopsin
BTP	Bis-Tris-Propan
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
1D4	Antikörper gegen C-terminales Octapeptid des Rhodopsins
DM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-Maltosid
DTT	Dithiothreitol
FTIR	Fourier Transform Infrarot
GDP/GTP	Guanosin-di/tri-phosphat
H	Helix
HOOP	<i>hydrogen-out-of-plane</i> ; Schwingungen von Wasserstoffatomen aus der Ebene eines konjugierten π -Elektronensystems heraus
IR	Infrarot
Lumi	Lumirhodopsin
Meta I	Metarhodopsin I
Meta II	Metarhodopsin II
NMR	Kernspinresonanz
OG	<i>n</i> -Octyl- β -D-Glucosid
PC	Phosphatidylcholin (L- α -Lecithin) aus frischem Eigelb
PDE	Phosphodiesterase
pMT4	Expressionsvektor mit Rhodopsingen
ROS	<i>rod outer segments</i> ; Außensegmente der Stäbchenzellen
UV-vis	Ultraviolett-sichtbar

Abkürzungen der proteinogenen Aminosäuren

G	Gly	Glycin	M	Met	Methionin
A	Ala	Alanin	S	Ser	Serin
V	Val	Valin	T	Thr	Threonin
L	Leu	Leucin	K	Lys	Lysin
I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
P	Pro	Prolin	H	His	Histidin
F	Phe	Phenylalanin	D	Asp	Asparaginsäure
T	Tyr	Tyrosin	E	Glu	Glutaminsäure
W	Trp	Tryptophan	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	Q	Gln	Glutamin

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	3
1.1	Der Sehvorgang	3
1.2	Rhodopsin	5
1.3	Rhodopsin-Aktivierung	8
1.4	Ziele der Arbeit	11
2	Materialien und Methoden	13
2.1	Präparation von Diskmembranen aus Rinderaugen	13
2.2	Reinigung von Rinderrhodopsin	14
2.2.1	Säulenvorbereitung	15
2.2.2	Probenvorbereitung	16
2.2.3	Affinitätschromatographie	16
2.2.4	Dialyse	16
2.3	Herstellung der Rhodopsin-Mutanten	17
2.3.1	Expressionsvektor pMT4	17
2.3.2	Herstellung der veränderten Plasmid-DNA für die Mutanten E247Q, E247A, E247D und E247L	17
2.3.3	Transformation der mutierten DNA in <i>E. coli</i>	20
2.3.4	Präparation der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	20
2.3.5	Sequenzierung der Plasmid-DNA	21
2.3.6	HEK 293T-Zellkulturen	21
2.3.7	Expression der Rhodopsin-Mutanten in eukaryotischen HEK 293T-Zellen durch transiente Transfektion	22
2.4	Immunoaffinitätsreinigung der Rhodopsin-Mutanten	24
2.5	Rekonstitution von Rhodopsin und Rhodopsin-Mutanten in Lipidvesikel	26
2.6	Reinigung von Transduzin	27
2.6.1	Affinitätschromatographie	29
2.7	Transduzin-Aktivitätsmessung	29
2.8	FTIR-Spektroskopie	30
2.8.1	Einführung	30
2.8.2	Lichtinduzierte FTIR-Differenzspektroskopie	34
2.8.3	Herstellung der Infrarot-Proben	36
2.8.4	Messung der statischen FTIR-Spektren	37
2.8.5	Zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Differenzspektroskopie	38

2.8.6	Darstellung der FTIR-Differenzspektren	41
2.9	UV-vis-Spektroskopie	41
3	Ergebnisse und Diskussion	44
3.1	FTIR-Differenzspektroskopie an Photointermediaten von Rhodopsin	44
3.2	Die Rolle von Glu 181 bei der Photoaktivierung von Rhodopsin	50
3.2.1	Stabilität von Mutanten der Glu 181	54
3.2.2	FTIR-Spektroskopie an Wildtyp-Rhodopsin	54
3.2.3	FTIR-Spektroskopie an der E181Q-Mutante	58
3.2.4	Experimente zur Bandenzuordnung	61
3.2.5	Diskussion	65
3.3	Protonierungswechsel bei der Rhodopsin-Aktivierung: Die Rolle von Glu 134 und Glu 247	70
3.3.1	UV-vis-Spektroskopie an E134Q und E247Q	73
3.3.2	Transduzin-Aktivierung von Wildtyp, E134Q und E247Q	74
3.3.3	FTIR-Analyse des Meta I/Meta II-Gleichgewichts bei E134Q und E247Q	74
3.3.4	Meta II-Zustand der E134Q-Mutante	76
3.3.5	Meta II-Zustand der E247Q-Mutante	82
3.3.6	Instabilität von E247Q bei alkalischem pH	82
3.3.7	Meta I- und Lumi-Spektren von E134Q und E247Q	82
3.3.8	Diskussion	88
3.4	Zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Differenzspektroskopie an Rhodopsin-Photointermediaten zwischen Lumi und Meta II	92
3.4.1	Statische Messungen der Photointermediate Lumi, Meta I und Meta II	94
3.4.2	Zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Differenzspektroskopie, analysiert mit Maximum Entropie inverse Laplace-Transformation	96
3.4.3	Zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Differenzspektroskopie, analysiert mit globalem multi-exponentiellem Fit	108
3.4.4	Zeitaufgelöste Messungen bei pH 6,0 und technische Probleme	113
3.4.5	Diskussion	115
4	Zusammenfassung	119
5	Literaturverzeichnis	122

1 Einführung

1.1 Der Sehvorgang

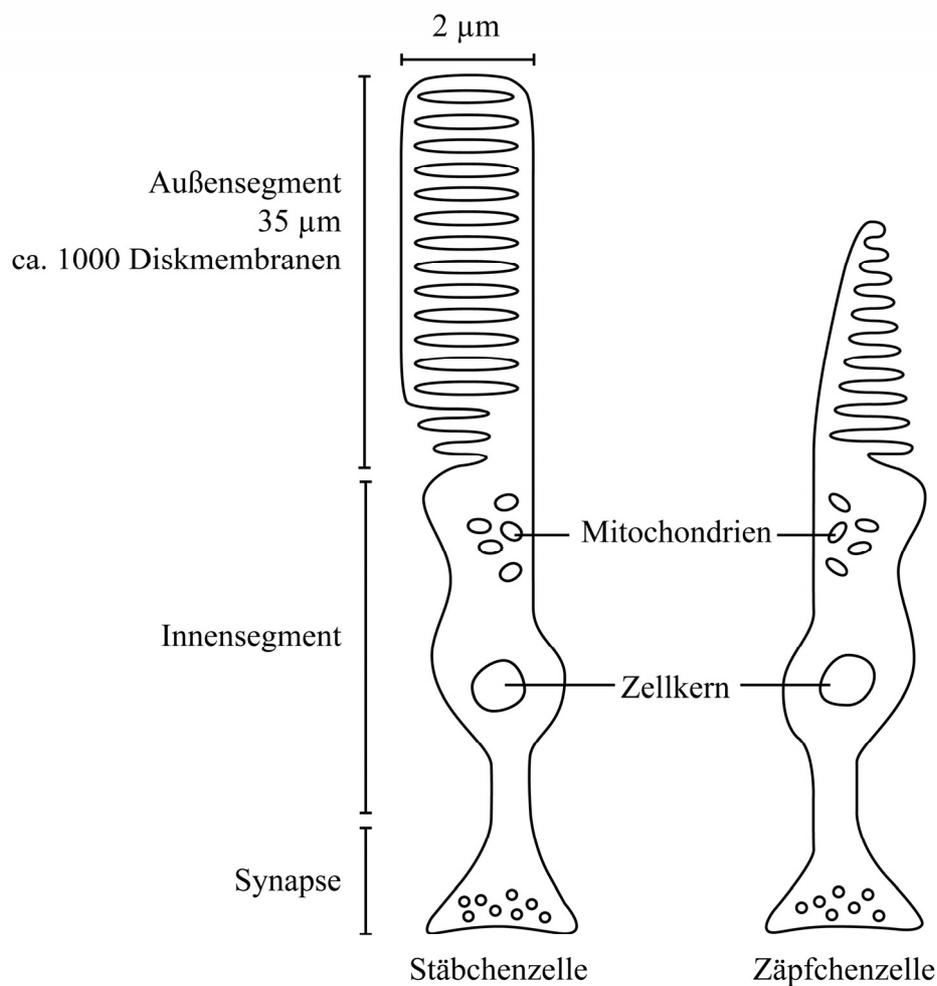


Abb. 1.1 Stäbchen- und Zäpfchenzellen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Aktivierungsmechanismen und mit den zur Aktivierung wichtigen strukturellen Merkmalen von Rhodopsin, dem Lichtrezeptor der Stäbchenzellen. Vorab soll als Grundlage die Physiologie des Sehvorgangs kurz dargelegt werden.

Der Sehvorgang beginnt mit der Absorption eines Photons durch ein Sehpigment in der Photorezeptorzelle. Bei Wirbeltieren wird zwischen zwei unterschiedlichen Typen von Photorezeptorzellen unterschieden: den Stäbchenzellen für das Nachtsehen und den Zäpfchenzellen für das Farbsehen (rot, grün, blau).

Die Photorezeptorzelle ist in der Lage, ein optisches Signal zunächst in ein (bio-)chemisches Signal und letztendlich in ein elektrisches Signal umzuwandeln (Abb. 1.2):

Der lichtaktivierte Rezeptor bindet und aktiviert das heterotrimäre G-Protein Transduzin (G_T), das aus einer α -, β - und γ -Untereinheit sowie einem GDP-Nukleotid aufgebaut ist. Bei der Aktivierung wird GDP durch GTP ausgetauscht, was zur Dissoziation der Untereinheiten führt. Die auf diese Weise aktivierte $G_{T\alpha}$ -GTP-Untereinheit bindet die γ -Untereinheit einer Phosphodiesterase (PDE). Diese γ -Untereinheit wirkt als Inhibitor der Esterase-Aktivität. Somit wird die PDE durch das Binden von $G_{T\alpha}$ -GTP an PDE_γ aktiviert. Die PDE spaltet dann zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP), das einen wichtigen Botenstoff zur Regulierung von Ionenkanälen darstellt. Die Aktivierung der PDE hat natürlich einen dramatischen Abfall der cGMP-Konzentration in der Zelle zur Folge. Dadurch schließen sich cGMP-abhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle, was zu einer Erhöhung des negativen Membranpotentials, d. h. einer Hyperpolarisation der Photorezeptorzelle, führt.

Durch den kaskadenartigen Aufbau dieser Signalkette wird eine enorme Verstärkung des Signals erzielt. Ein einzelner aktivierter Rezeptor aktiviert etwa 500 Transduzin-Moleküle, und die PDE ist in der Lage, 1000-2000 cGMP-Moleküle pro Sekunde zu hydrolysieren (Menon et al., 2001). Aufgrund dieser enormen Verstärkung liefert bereits ein einzelnes absorbiertes Photon einen messbaren elektrischen Impuls.

Genauso wichtig ist die Deaktivierung der Sehkaskade. Der Rezeptor wird durch Phosphorylierung und Bindung von Arrestin effizient abgeschaltet. $G_{T\alpha}$ -GTP deaktiviert sich durch die Abspaltung von Phosphat von GTP, was durch ein GTPase aktivierendes Protein (GAP) reguliert wird. Zusammen mit der β - und der γ -Untereinheit komplexiert $G_{T\alpha}$ -GDP wieder zu inaktivem heterotrimärem Transduzin. In Abwesenheit der aktivierenden $G_{T\alpha}$ -GTP-Untereinheit ist auch die PDE wieder inaktiv.

1.2 Rhodopsin

Rhodopsin ist ein integrales Membranprotein und die Hauptkomponente der Diskmembranen in den Stäbchenzellen. Es gehört, wie alle Sehpigmente, zur großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und ist dabei der Prototyp für die Klasse A, zu der z. B. auch adrenerge Rezeptoren wie α - oder β -Rezeptoren zählen, aber auch viele Hormonrezeptoren und auch Opioid-Rezeptoren (Gether, 2000). Im Unterschied zu allen anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden die Sehpigmente nicht durch die Bindung eines diffundierenden Liganden aktiviert. Hier ist der Ligand bereits kovalent als prosthetische Gruppe an das Apoprotein Opsin gebunden und wirkt im Dunkelzustand als

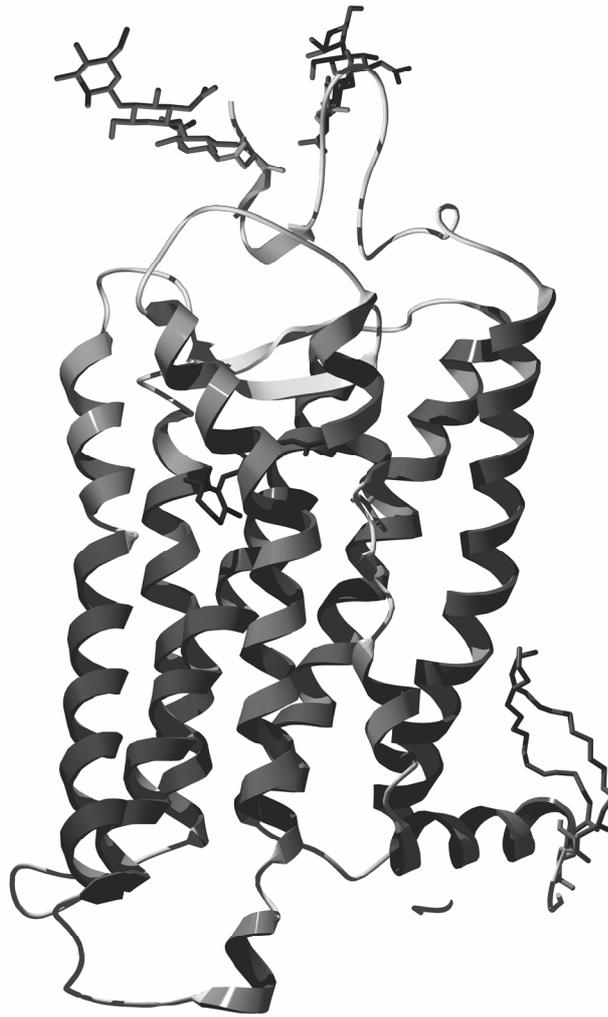


Abb. 1.3: Röntgen-Kristallstruktur von Rinderrhodopsin. Die Abbildung basiert auf den Koordinaten der Struktur 1GZM (Li et al., 2004) aus der Proteindatenbank.

inverser Agonist. Bei Rhodopsin ist diese prosthetische Gruppe das 11-*cis*-Retinal, ein Aldehyd von Vitamin A. Es dient dem Lichtrezeptor als Chromophor und startet erst durch lichtinduzierte Isomerisierung zu *all-trans* die Aktivierung des Rezeptors (siehe 1.3).

Als Modell für Lichtrezeptoren dient das Rinderrhodopsin, das sich von menschlichem Rhodopsin nur in 23 Aminosäuren unterscheidet. Es ist bisher der einzige G-Protein-gekoppelte Rezeptor, von dem die Struktur des Grundzustands durch Röntgenkristallographie aufgeklärt werden konnte (Palczewski et al., 2000; Li et al., 2004). Diese Struktur ist in Abb. 1.3 dargestellt. Die Kristallstruktur bietet nicht nur wertvolle Anhaltspunkte in der Rhodopsinforschung, sondern dient auch als Grundlage für Strukturmodelle anderer Rezeptoren.

Rinderrhodopsin hat ein Molekulargewicht von rund 40 kDa und besteht aus dem Apoprotein Opsin (348 Aminosäuren) und dem Retinal-Chromophor. Typisch für G-Protein-gekoppelte

Rezeptoren besteht Rhodopsin aus sieben transmembranären Helices. Eingebettet in die integrale Domäne befindet sich die Bindungstasche für den Retinal-Chromophor. Die kovalente Bindung von 11-*cis*-Retinal an das Apoprotein wird durch Ausbildung einer protonierten Schiffbase mit der Aminoseitenkette von Lys 296 auf Helix 7 ausgebildet (Oseroff und Callender, 1974; Ovchinnikov, 1982). Das Gegenion zur protonierten Schiffbase wird durch die Seitenkette von Glu 113 auf Helix 3 gebildet (Sakmar et al., 1989). Das Absorptionsmaximum von Rhodopsin und seinen Photoprodukten hängt natürlich stark vom Protonierungszustand ab, wird aber auch durch andere Proteinseitenketten beeinflusst, z. B. durch Glu 122 auf Helix 3 (Imai et al., 1997), die sich in unmittelbarer Nähe der Ringsstruktur des Retinal-Chromophors befindet.

Der extrazelluläre Teil ragt ins Lumen der Diskmembranen und enthält 3 Loops und den N-Terminus, der zwei N-Glycosylierungsstellen an Asn 2 und Asn 15 besitzt. Diese Glycosylierungen können für die Reinigung des Proteins mittels Lektin-Affinitätschromatographie ausgenutzt werden. Ein wichtiges strukturelles Merkmal ist, dass Loop 2, der Helix 4 und Helix 5 verbindet, über eine Disulfidbrücke zwischen C 187 und C 110 zusätzlich mit Helix 3 verknüpft ist.

Erst durch die Auflösung der Kristallstruktur wurde man darauf aufmerksam, dass sich dieser extrazelluläre Loop 2 bis zur Retinal-Bindungstasche ins Protein hineinfaltet. Dies deutet auf eine besondere Funktionalität dieses Loops hin, umso mehr, weil sich mit Glu 181 auf Loop 2 eine eventuell geladene Gruppe in unmittelbarer Nähe des Chromophors befindet. Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich ausführlich damit, die Funktion dieser strukturellen Besonderheit aufzuklären.

Die zytoplasmatische Seite enthält viele Serin- und Threoninreste, die durch die Rhodopsinkinase phosphoryliert werden können (siehe 1.1) Auf der zytoplasmatischen Seite gibt es ebenfalls drei Loops. Davon bilden die Loops 3 und 4 die Bindungsstelle für das G-Protein Transduzin (Hamm et al., 1988; Franke et al., 1992; Acharya et al., 1997).

Am zytoplasmatischen Ende von Helix 3 und Helix 7 sind Aminosäure-Motive lokalisiert, die in vielen anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren hochkonserviert sind (Sakmar et al., 2002). Dabei handelt es sich um das ERY-Motiv auf Helix 3 und das NPxxY-Motiv auf Helix 7. Das ERY-Motiv ist aus einer Glutaminsäure (in anderen Rezeptoren auch oft Asparaginsäure), einem Arginin und einem Tyrosin (auch Tryptophan) aufgebaut, das NPxxY-Motiv aus Asparagin, Prolin, Valin, Isoleucin und Tyrosin aufgebaut. Die Bezeichnungen leiten sich vom Einbuchstabencode der Aminosäuren ab. Beide Motive sind

in der Vergangenheit Gegenstand mehrerer Studien gewesen (Fahmy und Sakmar, 1993; Arnis et al., 1994; Fritze et al., 2003).

Zusätzlich zu den sieben transmembranären Helices wird zwischen Helix 7 und dem C-Terminus noch eine weitere helicale Struktur ausgebildet, die aber nicht senkrecht, sondern parallel zur Membranoberfläche ausgerichtet ist. Diese Helix 8 ist über zwei Palmitoylierungen an Cys 322 und Cys 323 (Ovchinnikov et al., 1988) in der Membran verankert. Danach folgt der C-Terminus, der für die Immunoaffinitätsreinigung ausgenutzt wird.

1.3 Rhodopsin-Aktivierung

Durch Absorption von Licht wird eine Isomerisierung des Chromophors von 11-*cis* nach all-*trans* ausgelöst (Abb. 1.4) (Wald, 1968). Alle nachfolgenden Relaxationsschritte des Proteins werden von dieser Primärreaktion angetrieben. Sie führen unter physiologischen Bedingungen innerhalb von Millisekunden zur Bildung des aktiven Photoprodukts Metarhodopsin II (Meta II), durch das Transduzin aktiviert wird (Longstaff et al., 1986). Analog zur Aktivierung anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch Liganden, kann all-*trans*-Retinal im pharmakologischen Sinne als Rezeptor-Agonist betrachtet werden, während der 11-*cis*-Isomer das Protein als inverser Agonist in der inaktiven Konformation hält. Dadurch wird praktisch jegliche Spontanaktivierung des Proteins unterbunden, was für das hervorragende Signal/Rausch-Verhältnis im Sehvorgang unabdingbar ist (Birge und Barlow, 1995). Rhodopsin weist im unbelichteten Zustand ein Absorptionsmaximum bei 500 nm auf. Beim Übergang nach Meta II kommt es zu einer Deprotonierung der Schiffbase (Longstaff et al., 1986), was sich in einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 380 nm äußert (vgl. 2.9). Diese Reaktion muss nicht unbedingt simultan mit der Bildung von Meta II erfolgen (Thorgeirsson et al., 1992). Dieser Aspekt wird im Ergebnisteil dieser Arbeit aufgegriffen.

Gleichzeitig mit der Deprotonierung der Schiffbase findet die Protonierung von Glu 113, des ursprünglichen Gegenions, statt (Sakmar et al., 1989; Jäger et al., 1994). Die Protonierung dieser Aminosäure ist ein essentieller Schritt zur Bildung von Meta II (Fahmy et al., 1995; Vogel et al., 2005; Vogel et al., 2006).

Bevor der aktive Zustand erreicht wird, werden nach der *cis/trans*-Isomerisierung des Chromophors noch einige inaktive Vorstufen durchlaufen. Diese kurzlebigen Intermediate sind spektroskopisch und kalorimetrisch (Cooper, 1981) unterscheidbar. Sie lassen sich bei tiefen Temperaturen stabilisieren und können mit spektroskopischen Methoden untersucht werden. In Abb. 1.5 ist eine schematische Darstellung der klassischen Rhodopsin-

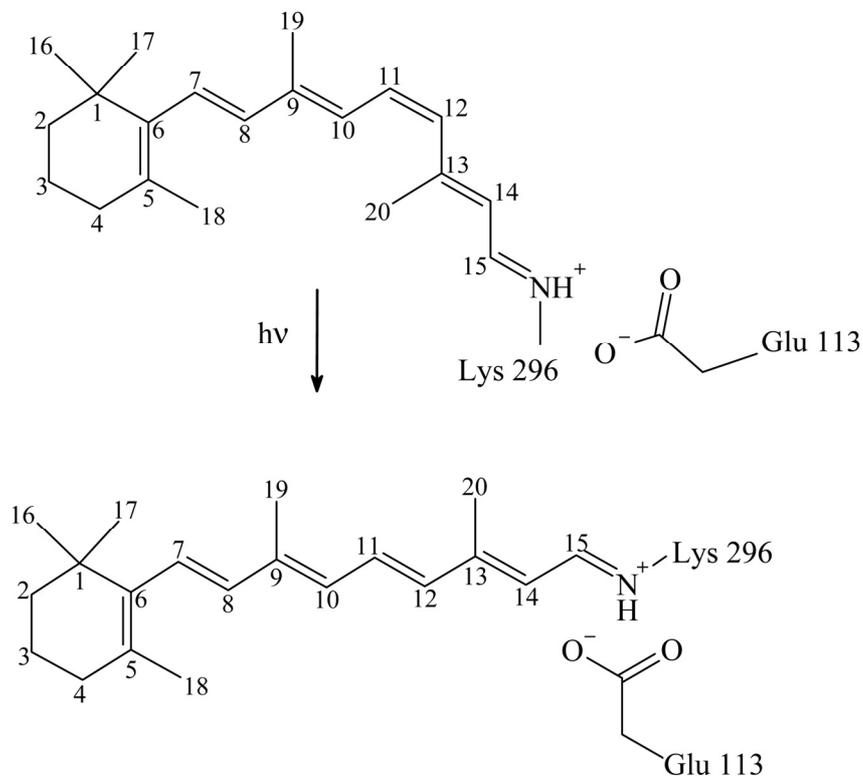


Abb. 1.4: Lichtinduzierte Isomerisierung des Retinal-Chromophors von 11-cis nach all-trans.

Intermediate, ihrer Absorptionsmaxima, ihrer Übergangstemperaturen (bezogen auf einen Zeitraum, der für Messungen praktikabel ist) und der Zeitskala, in der sie bei Raumtemperatur gebildet werden, wiedergegeben. Eine ausführliche Abhandlung über die Aktivierungsschritte von Rhodopsin findet sich in zahlreichen Review-Artikeln (Menon et al., 2001; Okada et al., 2001; Shichida und Imai, 1998).

Das erste thermisch stabilisierbare Photoprodukt ist Bathorhodopsin (Batho), gefolgt von Lumirhodopsin (Lumi) und Metarhodopsin I (Meta I), das mit dem aktiven Zustand Meta II in einem thermischen und pH-abhängigen Gleichgewicht steht (Matthews et al., 1963; Parkes und Liebman, 1984). Meta I kommt im Aktivierungsprozess eine Schlüsselrolle zu, da es sich bei hohem pH auch bei Raumtemperatur stabilisieren lässt. Ausgehend von Meta I entsteht nicht nur das aktive Photoprodukt Meta II, sondern durch thermische Isomerisierung der C=N-Doppelbindung der Schiffbase auch das inaktive Photoprodukt Meta III (Vogel et al.,

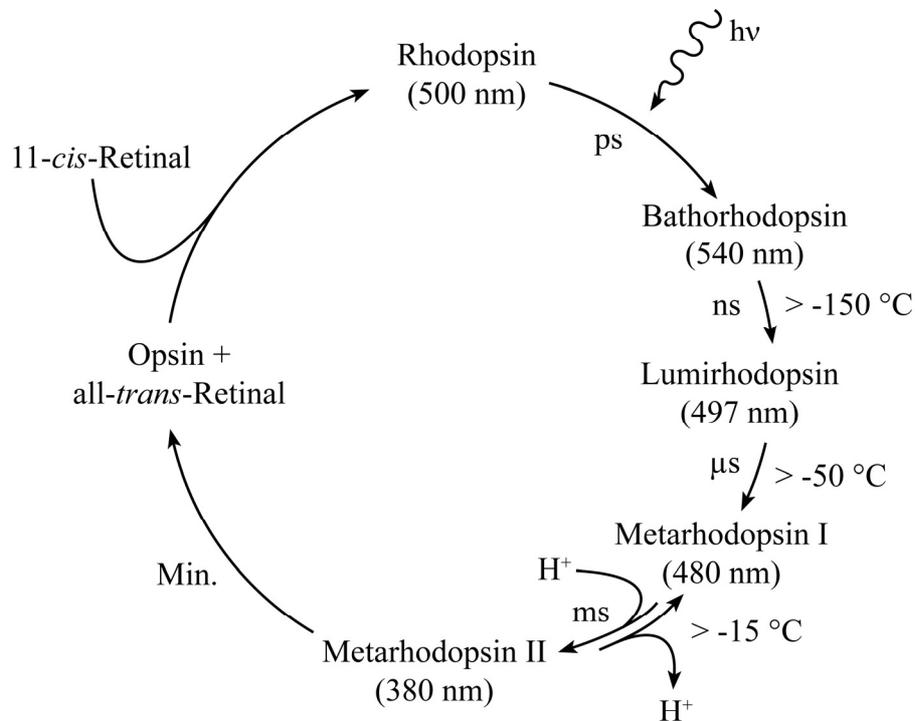


Abb. 1.5: Reaktionssequenz der lichtinduzierten Rhodopsin-Aktivierung und Regenerierung des verbrauchten Pigments in der Stäbchenzelle. Zu jedem Intermediat ist sein Absorptionsmaximum angegeben, außerdem die Temperaturen, bis zu denen es metastabil ist, und die Zeitskala, auf der es bei Raumtemperatur gebildet wird.

2004b). Von Meta I existieren auch Strukturdaten niedriger Auflösung, die durch 2D-Elektronenkristallographie erhalten wurden (Ruprecht et al., 2004).

Die Bildung von Meta II hängt neben der Protonierung von Glu 113 auch von der Aufnahme eines Protons aus dem Zytoplasma ab (Bennett, 1980; Wong und Ostroy, 1973). Die Protonenaufnahme konnte bisher noch nicht einer konkreten Gruppe auf der zytoplasmatischen Seite des Proteins zugeordnet werden. Es gilt jedoch als gesichert, dass sie in der Gegend des hochkonservierten ERY-Motivs auf Helix 3 erfolgen muss (Fahmy und Sakmar, 1993; Arnis et al., 1994). In dieser Arbeit wird diese Annahme noch einmal genauer überprüft. Dabei wird der Einfluss der Region am zytoplasmatischen Ende von Helix 3 und Helix 6 auf die Rezeptoraktivierung eingehend untersucht.

Am Ende der Aktivierungskette steht der Zerfall von Meta II in das Apoprotein Opsin und all-*trans*-Retinal. Dieses wird im Zytoplasma zunächst zu Retinol reduziert, isomerisiert und zu 11-*cis*-Retinal oxidiert (Abb. 1.2). Mit der Regeneration von Rhodopsin aus Opsin und 11-*cis*-Retinal schließt sich der Kreis (Abb. 1.5).

1.4 Ziele der Arbeit

Am Anfang der Rhodopsin-Aktivierung steht die lichtinduzierte Isomerisierung des Chromophors, also eine photochemische Reaktion. Sie treibt eine Reihe dynamischer Prozesse im Protein an, deren Einzelschritte oben als Intermediate beschrieben wurden. Dadurch wird die Ausbildung des aktiven Zustands möglich, also der Proteinkonformation, die in der Lage ist, das G-Protein Transduzin zu binden und die Sehkaskade in Gang zu setzen. Diese dynamischen Prozesse hängen nicht zuletzt von Protonierungswechseln und von intramolekularen Wechselwirkungen ab. Die Fourier-Transformation Infrarot (FTIR)-Differenzspektroskopie bietet sich als Mittel der Wahl für die Untersuchung solcher molekularer Vorgänge an, da sie Wechselwirkungen oder Protonierungszustände direkt über deren Einfluss auf Schwingungsmoden aufzeigen kann. Um die aus FTIR-Daten erhaltenen Informationen direkt mit der Struktur verknüpfen zu können, kamen dabei auch gezielt ausgewählte Rhodopsin-Mutanten zum Einsatz, die in Lipidvesikel rekonstituiert wurden, um möglichst physiologische Bedingungen zu reproduzieren. Über Vergleich der Mutanten- mit den entsprechenden Wildtypspektren sollte die Rolle der entsprechenden Aminosäure im untersuchten Prozess zugeordnet werden. Ein besonderer Schwerpunkt wurde dabei auf die Rolle des Meta I-Intermediats gelegt.

- Aus der Kristallstruktur von Rhodopsin hatte sich die überraschende Erkenntnis ergeben, dass sich der extrazelluläre Loop 2 im Dunkelzustand tief in die Bindungstasche hineinfaltet. Dadurch befindet sich mit Glu 181 eine protonierbare Gruppe in unmittelbarer Nähe des Chromophors. Dieser Aminosäure wurde später die Rolle des Gegenions zur protonierten Schiffbase in Meta I zugeschrieben (Yan et al., 2003). Dabei wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, der einen Protonierungswechsel zwischen Glu 113, dem Gegenion im Dunkelzustand, und Glu 181 in Meta I beinhaltet. Dies konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. In dieser Arbeit soll jetzt durch Verwendung von FTIR-Spektroskopie an Mutanten der Glu 181 untersucht werden, ob mit der Übernahme der Gegenionfunktion durch Glu 181 ein Protonierungswechsel verbunden ist und in welcher Weise die Bildung des aktiven Zustands mit dieser funktionellen Aminosäure zusammenhängt.

-
- Die Bildung des aktiven Zustands hängt von der Aufnahme eines Protons aus dem Zytoplasma ab. Diese Protonenaufnahme scheint in der ERY-Region auf Helix 3 zu erfolgen (Arnis et al., 1994). Die Kristallstruktur zeigt, dass Glu 134 und Arg 135 aus dem ERY-Motiv eine Salzbrücke bilden. Gleichzeitig besteht eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen Arg 135 auf Helix 3 und Glu 247 auf Helix 6. Beim β_2 -Rezeptor wurde die Aktivierung mit einem Aufbrechen der Wechselwirkung zwischen Helix 3 und Helix 6 in Verbindung gebracht (Ballesteros et al., 2001). Bei bisherigen Untersuchungen der entsprechenden Region in Rhodopsin wurden bisher leider meist Untersuchungsbedingungen gewählt, die keine quantitativen Aussagen über deren Einfluss auf das Meta I/Meta II-Gleichgewicht erlauben. Durch Spektren der in Lipidmembranen rekonstituierten Mutanten E134Q und E247Q soll im Folgenden geklärt werden, ob eine dieser beiden Gruppen direkt als Protonierungsstelle in Frage kommt. Außerdem wird erstmals die Funktion von Glu 247 bei der Rhodopsin-Aktivierung untersucht.
 - Erstmals wurde die Bildung der späten Rhodopsin-Intermediate durch zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Differenzspektroskopie gemessen. Die Vorteile dieser Methode gegenüber bisher verwendeten zeitaufgelösten Methoden werden dabei aufgezeigt. In den durchgeführten Experimenten wird untersucht, ob die zeitaufgelösten Intermediate strukturell den thermisch stabilisierten Intermediaten entsprechen. Außerdem soll geklärt werden, ob der aktive Zustand Meta II direkt aus Meta I gebildet wird, oder ob Zwischenzustände messbar sind, die sich durch tiefe Temperaturen oder pH nicht stabilisieren lassen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Präparation von Diskmembranen aus Rinderaugen

Materialien und Puffer:

Puffer A	60 mM	KCl
	30 mM	NaCl
	20 mM	Tris (pH 7,3)
	2 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
	0,1 mM	PMSF
Puffer E	5 mM	Tris (pH 7,3)
	0,5 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
	0,1 mM	PMSF

Die Isolierung der Diskmembranen aus Rinderaugen orientierte sich im Wesentlichen an einer in der Literatur beschriebenen Standardprozedur (Papermaster, 1982). Alle im Folgenden beschriebenen Schritte fanden unter Rotlicht statt.

Hierzu wurden etwa 100 aus Rinderaugen präparierte Retinae gerührt und durch Filtration durch ein doppeltes Nylonnetz homogenisiert, wobei sich die Außensegmente der Stäbchenzelle (ROS für *rod outer segments*) vom Zellkörper ablösen (vgl. Abb. 1.1). Das Homogenat wurde mit isotonem Puffer A auf 90 mL aufgefüllt und je 14 mL davon auf 6 Sucrose-Gradienten gegeben (37 % Sucrose in Puffer A). Es folgte Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (Beckman OPTIMATM L-Serie) für 30 Min. bei 15000 rpm und 4 °C in einem SW 28 Ausschwingrotor. Bei der Zentrifugation entsteht ein kontinuierlicher Dichtegradient, aus dem die ROS, die Stäbcheninnensegmente, und ein Teil der Nervenzellen als Bande (Kissen) vorsichtig abgesaugt wurden. Ein Großteil des Pigmentepithels trennte sich dabei als schwarzes Pellet ab. Die abgenommene Bande wurde dann mit 100 mL Puffer A gewaschen (20 Min., 30000 rpm, 4 °C in Ti 50.2 Festwinkelrotor). Das Pellet wurde in

sucrosehaltigem Puffer A der Dichte 1,10 g/cm³ aufgenommen und durch Stufendichtegradienten-Zentrifugation weiter gereinigt. Dafür wurden sucrosehaltige Puffer A der Dichte 1,15 g/cm³ (6 mL), 1,13 g/cm³ (10 mL) und 1,11 g/cm³ (6 mL) in Zentrifugenröhrchen übereinander geschichtet und das gelöste Pellet oben aufgegeben. Die Zentrifugation erfolgte dann 60 Min. bei 25000 rpm und 4 °C im SW 28. Hierbei trennen sich die schwereren Innensegmente und die leichteren, stark lipidhaltigen Nervenzellen von den ROS ab, die sich in der mittleren Bande der Dichte 1,13 g/cm³ sammeln. Diese Bande wurde dann in zwei Schritten abgesaugt, wobei die Fraktionen des ersten und zweiten Absaugschritts als zwei verschiedene Reinheitsqualitäten betrachtet wurden. Die beiden Fraktionen wurden mit jeweils 50 mL Puffer A gewaschen (20 Min., 25000 rpm, 4 °C in Ti 50.2). Anschließend wurden deren Pellets mit hypotonem Puffer E aufgenommen. In diesem Puffer platzen die Membranen der ROS auf und die Diskmembranen können von den Zelltrümmern der ROS, sowie von abgelösten, peripheren Membranproteinen abgetrennt werden. Dazu wurden sie dreimal mit Puffer E gewaschen, wobei die Zentrifugationsgeschwindigkeit von Schritt zu Schritt von 25000 rpm über 27000 rpm auf 29000 rpm erhöht wurde (je 20 Min., 4 °C, Ti 50.2). Es folgten noch zwei Waschschrte mit 1 mM Phosphatpuffer pH 7,0 bei zunächst 31000 rpm und dann 33000 rpm. Die Pellets wurden dann in 1 mM Phosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen und die Konzentration durch Messung der Absorptionsdifferenz zwischen gebleichtem und ungebleichtem Pigment bestimmt ($\lambda_{Max} = 500 \text{ nm}$, $\epsilon = 40000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$; vgl. 2.9) und bei -20 °C gelagert.

2.2 Reinigung von Rinderrhodopsin

Materialien und Puffer

Puffer D	250 mM Na ₂ CO ₃ (pH 8,8)
Puffer B	3 M NaCl
Puffer F	300 mM NaCl
	40 mM PIPES (pH 6,5)
	2 mM MgCl ₂
	2 mM CaCl ₂
	2 mM MnCl ₂

	0,5 mM	EDTA
Puffer G	300 mM	NaCl
	40 mM	PIPES (pH 6,5)
	2 mM	MgCl ₂
	2 mM	CaCl ₂
	0,2 mM	EDTA
Detergens I	1,2 mM	(0,06 % w/v), entspricht 6xCMC DM (<i>n</i> -Dodecyl- β -D-Maltosid; Biomol)
		oder
	82,1 mM	(2,4 % (w/v), entspricht 4xCMC OG (<i>n</i> -Octyl- β -D-Glucosid; Biomol)
Waschpuffer:	G:I (1:1)	
Solubilisierungspuffer:	20 mM	(1,0 % (w/v) DM in G
		oder
	68 mM	(2,0 % (w/v) OG in G
Elutionspuffer:	0,2 M	(39 mg/mL) Methyl- α -D-Mannopyranosid in Waschpuffer

2.2.1 Säulenvorbereitung

Vor dem Packen der Säule wurde das Säulenmaterial (Con A-Sepharose; Pharmacia) durch Schwenken suspendiert und mit der gekappten 1 mL-Spitze einer Eppendorf-Pipette in eine Mikro-Säule überführt. Nachdem sich die so überführte Con A-Sepharose abgesetzt hatte, wurde der Hahn geöffnet, um den Überstand ablaufen zu lassen. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das gewünschte Volumen an Säulenmaterial erreicht war. Dabei wurde ungefähr 1 mL Säulenmaterial pro 80-90 nmol Rhodopsin veranschlagt.

Concavalin A ist ein Lektin, das spezifisch die Zuckerreste von Rhodopsin bindet. Da für eine effiziente Bindung die Anwesenheit von Ca²⁺ und Mn²⁺-Ionen erforderlich ist, musste die

Säule mit verschiedenen Puffern bei einer Laufgeschwindigkeit von 10 mL/Std. konditioniert werden:

1. D:B (2:1) 3-faches Säulen-Bettvolumen
2. F:B (2:1) 7-faches Säulen-Bettvolumen
3. F:H₂O (1:1) 3-faches Säulen-Bettvolumen
4. G:I (1:1) 3-faches Säulen-Bettvolumen

Die Laufgeschwindigkeit wurde durch eine peristaltische Pumpe (Peristaltikpumpe P-1; Pharmacia) eingestellt.

2.2.2 Probenvorbereitung

Gewaschene Diskmembranen wurden mit im Verhältnis 1:1 mit H₂O verdünntem Puffer G auf 6 mL (ideales Volumen für den Ti 50-Rotor) aufgefüllt, kräftig gemischt und zentrifugiert (20 Min., 40000 rpm, 4 °C im Ti 50). Das Pellet wurde dann in 1 mL Solubilisierungspuffer pro 50 nmol Rhodopsin aufgenommen. Dies entspricht etwa 300 Detergenismolekülen pro Rhodopsinmolekül. Es wurde gründlich, aber wegen möglicher Schaumbildung vorsichtig durchmischt. Die Probe wurde dann in ein PE-Röhrchen überführt und über Nacht auf Eis gelagert. Die nicht solubilisierten Bestandteile wurden am darauffolgenden Tag durch Zentrifugation abgetrennt (20 Min., 40000 rpm, 4 °C in Ti 50). Der Überstand wurde dann auf die vorkonditionierte Säule aufgetragen.

2.2.3 Affinitätschromatographie

Die Säulenreinigung fand unter Rotlicht im Kühlschrank statt wie beschrieben (DeGrip, 1982). Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 8 mL/Std. aufgetragen. Das an die Con A-Sepharose gebundene Rhodopsin wurde dann mit ungefähr 10 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen. Die Elution mit Methyl- α -D-Mannose erfolgte bei 4,5 mL/Std. in Fraktionen von 1 mL. Durch Absorptionsmessung wurde die Rhodopsinkonzentration in jeder Fraktion bestimmt und so die Hauptfraktionen identifiziert.

2.2.4 Dialyse

Zucker und Salze können durch Dialyse aus dem Eluat entfernt werden. Da in OG gereinigte Proben in der Regel für die Rekonstitution in Lipidvesikel weiterverwendet und dabei ohnehin dialysiert werden, wurde dieser Schritt nur bei Reinigung in DM vorgenommen. Dafür wurde die Probe in einen Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze von 8-10 kDa (Zellutrans[®]; Roth) eingefüllt und 16 Std. im Kühlschrank gegen 1 L Phosphatpuffer (1 mM)

mit 0,01 % DM in einer 200 mL Durchflusszelle bei einer Durchflussrate von 20 mL/Std. dialysiert.

2.3 Herstellung der Rhodopsin-Mutanten

Die Herstellung der für diese Arbeit verwendeten Rhodopsin-Mutanten erfolgte im molekularbiologischen Labor von Prof. Thomas P. Sakmar, Rockefeller University, New York.

Im Folgenden werden alle verwendeten Mutanten im Ein-Buchstaben-Code nach der im Wildtyp vorkommenden Aminosäure und der Aminosäure, durch die sie in der Mutation ersetzt wird, benannt. Die hier untersuchten Mutanten E181Q, E181M, E134Q und E247Q wurden alle selbst exprimiert, wobei die E247Q-Mutation sowie die nicht untersuchten E247A, E247D und E247L-Mutationen eigenhändig vorgenommen wurden. Da die mutierte DNA derjenigen Mutanten, die für diese Arbeit nicht verwendet wurden, durchaus in zukünftigen Projekten zum Einsatz kommen könnten, wird ihre Herstellung im Methodenteil ebenfalls beschrieben. Die DNA der übrigen verwendeten Mutationen sowie zusätzlich benötigte Proben von E181Q, E181M und E134Q wurden vom Labor zur Verfügung gestellt.

2.3.1 Expressionsvektor pMT4

Zur Herstellung der Rhodopsin-Mutanten wurde der Expressionsvektor pMT4 verwendet. Er stellt ein Plasmid aus 6187 Basenpaaren dar, in den das Rhodopsin-Gen (1058 bp) einkloniert wurde. Es enthält unter anderem Replikationsursprünge, die die Replikation sowohl in *E. coli*, als auch in eukaryotischen Zellen fördern sollen. Letzterer leitet sich von dem Affenvirus SV 40 ab. Außerdem beinhaltet die Sequenz einen starken Promotor, an den die RNA-Polymerase bindet sowie ein Antibiotikaresistenzgen zur Selektion von Zellklonen, die das Plasmid enthalten.

2.3.2 Herstellung der veränderten Plasmid-DNA für die Mutanten E247Q, E247A, E247D und E247L

Materialien und Puffer:

PCR-Reaktionsansatz:	1 µL	von	10 ng/µL	pMT4-Templat
	1 µL	von	2,5 IE	<i>pfu</i> -Polymerase
	5 µL	von	10 X	<i>pfu</i> -Puffer

5 µL	von	4 mM	dNTP
1 µL	von	125 ng/µL	5'→3' Primer
1 µL	von	125 ng/µL	3'→5' Primer
36µL	H ₂ O bidest.		

Zum DNA-Verdau eingesetztes Restriktionsenzym: 1 X *dnp* I

Für die durchgeführten Punktmutationen wurde die sogenannte QuikChange-Methode von Stratagene angewendet. In Anwesenheit eines Primerpaares, das die gewünschte Mutation enthält, wird das zugrunde liegende Plasmid durch PCR (Polymerase Kettenreaktion) zunächst vermehrt. Die danach immer noch vorhandene Plasmid-DNA ohne Mutation wird im Anschluss durch einen Restriktionsverdau eliminiert. Dabei macht man sich zunutze, dass bakterielle DNA methyliert ist, die durch die PCR hergestellte DNA aber nicht. Das eingesetzte Restriktionsenzym *dnp* I kann nur methylierte DNA verdauen.

Bei den hierfür benötigten Primern handelt es sich um Oligodesoxyribonucleotide des zu mutierenden Gens, die die Mutation in der Mitte tragen, mit etwa 15 Basen vor und hinter der zu mutierenden Position. Etwa 40 % der Primerbasen sollten Guanin (G) oder Cytosin (C) sein. Außerdem sollten die Primer mit G oder C enden, allerdings mit nicht mehr als drei dieser Basen hintereinander. Durch diese Richtlinien können fehlerhafte Abweichungen bei der Mutation eingeschränkt werden.

Die benötigten Primer mit den folgenden Sequenzen wurden bei der Firma Gene Link (Hawthorne, NY) in Auftrag gegeben:

Wildtyp-Vektor (pMT4), bp 1797-1825:

```
5'  CC  ACT  CAG  AAG  GCC  GAG  AAG  GAG  GTC  ACG  3'
3'  GG  TGA  GTC  TTC  CGG  CTC  TTC  CTC  CAG  TGC  5'
```

Primer für E247Q

```
5'  CC  ACT  CAG  AAG  GCC  CAG  AAG  GAG  GTC  ACG  3'
3'  GG  TGA  GTC  TTC  CGG  GTC  TTC  CTC  CAG  TGC  5'
```

Primer für E247D

```
5'  CC  ACT  CAG  AAG  GCC  GAC  AAG  GAG  GTC  ACG  3'
3'  GG  TGA  GTC  TTC  CGG  CTG  TTC  CTC  CAG  TGC  5'
```

Primer für E247A

5' CC ACT CAG AAG GCC **GCG** AAG GAG GTC ACG 3'
 3' GG TGA GTC TTC CGG **CGC** TTC CTC CAG TGC G 5'

Primer für E247L

5' CC ACT CAG AAG GCC **CTG** AAG GAG GTC ACG 3'
 3' GG TGA GTC TTC CGG **GAC** TTC CTC CAG TGC 5'

Bei der PCR wird der DNA-Doppelstrang des Ausgangsplasmids (Templat) durch Erhitzen getrennt. Beim Abkühlen bindet dann der Primer an die Zielregion auf einem DNA-Einzelstrang („*annealing*“) und die *pfu*-Polymerase synthetisiert aus den anwesenden desoxy-Nucleotiden (dNTP) bei erneutem Erwärmen ausgehend vom Primer einen DNA-Gegenstrang (Elongation), der die Mutation enthält. Der dadurch entstandene Plasmid-Doppelstrang wird wieder durch Erhitzen getrennt, wobei nun pro Ausgangsplasmid vier Einzelstränge zur Verfügung stehen, an die nach Abkühlen der Primer binden kann. Der Zyklus aus Erhitzen, Abkühlen, Erwärmen wird mehrfach wiederholt und kann durch ein programmierbares Thermowechselgerät durchgeführt werden.

In diesem Fall wurde folgende Programmierung verwendet:

	1 Min.	95 °C
14 Zyklen	$\left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ Min.} \\ 1 \text{ Min.} \\ 9 \text{ Min.} \end{array} \right.$	95 °C (Trennung der Doppelstränge)
		55 °C (Bindung der Primer)
		68 °C (Elongation)
	7 Min.	68 °C

Zusätzlich zu den vier Mutationsansätzen lief eine Blindprobe ohne Primer-Zusatz mit. Im Anschluss an die PCR wurde zu jedem Ansatz 1 µL 1 X *dnp* I-Restriktionsenzym zugegeben, um die Ausgangsplasmide zu verdauen. Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Anfärbung überprüft.

2.3.3 Transformation der mutierten DNA in *E. coli*

Materialien:

- TOP 10 kompetente *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA)
- SOC-Medium (enthält Trypton, Hefeextrakt, NaCl, KCl, Glucose)
- LB-Medium (enthält Trypton, Hefeextrakt, NaCl)
- Ampicillin 50 mg/mL
- Ampicillin-haltige Agar-Platten

Um die aus der PCR erhaltenen mutierten Vektoren zu vermehren, wurden sie in einen bakteriellen Wirtsorganismus eingebracht (Transformation). Als Wirtsorganismus wurden TOP 10 kompetente *E. coli* verwendet, die chemisch behandelt wurden, um die Membranen besonders durchgängig für fremde DNA zu machen (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Die Bakterien wurden zunächst 30 Min. zusammen mit 1 μ L der *dnp* I-behandelten DNA auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für 43 s. Nach 2 Min. auf Eis wurden 250 μ L SOC Medium zu jedem Ansatz zugegeben und für 1 Std. bei 37 °C geschüttelt. Im Anschluss wurde jeder Ansatz auf eine Ampicillin-haltige Agar-Platte gekippt. Mit einem Glashaken, der nach jedem Schritt mit Alkohol und der Flamme eines Bunsenbrenners sterilisiert wurde, konnte die Bakteriensuspension gleichmäßig auf der Platte verteilt werden. Die Platten wurden dann im Wärmeschrank über Nacht inkubiert.

Jede Kolonie auf der Agar-Platte entstammt einem einzigen Klon. Da nur die transformierten Bakterien eine Ampicillin-Resistenz haben, sollten nur Kolonien mit der mutierten DNA vorhanden sein. Pro Ansatz wurde von je vier Kolonien mit einer Plastik-Öse eine Probe entnommen und in je 5 mL LB-Medium mit 50 μ g/mL Ampicillin gegeben (*starter culture*) und bei 37 °C für etwa 8 Std. geschüttelt.

Diese Startkulturen wurden zunächst verwendet, um DNA im analytischen Maßstab zu isolieren (Mini-Prep) und zu sequenzieren. Um DNA im präparativen Maßstab zu vermehren, wurde ebenso vorgegangen und dann 100 μ L der Startkultur zu 100 mL Ampicillin/LB-Medium gegeben und bei 37 °C geschüttelt.

2.3.4 Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli*

Sowohl die analytische (Mini-Prep), als auch die präparative (Maxi-Prep) Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen erfolgte unter Anwendung eines kommerziell erhältlichen Kits, das alle benötigten Materialien und eine detaillierte Vorschrift enthält

(QIAGEN, Hilden). Deshalb wird hier nur das Prinzip der angewendeten DNA-Isolierung beschrieben.

Zunächst wurden die Bakterienzellen in einem Na-Dodecylsulfat-haltigen Puffer lysiert. Der Puffer enthielt auch eine RNase, um Verunreinigungen durch RNA zu vermeiden. Durch Zugabe eines alkalischen Puffers fallen unerwünschte Zellbestandteile wie genomische DNA, Zelltrümmer, Proteine und Na-Dodecylsulfat aus. Die Plasmid-DNA wurde dann auf einer Anionentauschersäule gewaschen, eluiert und mit Isopropanol ausgefällt, vorsichtig mit Ethanol 70 % gewaschen und mit 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5) aufgenommen.

Eine Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte über Messung des Verhältnisses der Absorptionsmaxima bei 260 und 280 nm.

2.3.5 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Pro Ansatz wurden vier Kolonien zur analytischen DNA-Präparation ausgewählt. Um zu überprüfen, welche dieser vier Kolonien die gewünschte Mutation enthielt, musste die isolierte Plasmid-DNA einer Sequenzanalyse unterzogen werden. Auch DNA, die im präparativen Maßstab hergestellt wurde, wurde prinzipiell zur Kontrolle sequenziert.

Das Prinzip beruht auf der Polymerase-Kettenreaktion. Es wird ein Primer zugegeben, der in einem geeigneten Abstand von der mutierten Position an die DNA bindet. Zusätzlich zu den als Substrat dienenden *desoxy*-Nucleotiden, werden hier auch *didesoxy*-Nucleotide zugegeben, die bei Einbau in den DNA-Strang einen Abbruch der Elongation verursachen. Statistisch bedingt werden dabei vom Primer ausgehend DNA-Stränge jeder beliebigen Kettenlänge produziert, die mit einem *didesoxy*-Nucleosid enden. Diese sind für jede der vier Basen spezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Das Oligo-DNA-Gemisch wird dann mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die markierten terminalen Basen detektiert. Das Chromatogramm mit den für die vier Basen spezifischen Signalen kann maschinell in eine Sequenz übersetzt werden. Die Sequenzierung wurde extern von der Firma GENEWIZ (North Brunswick, NJ) durchgeführt. Es war lediglich erforderlich, einen Reaktionsansatz mit der zu untersuchenden DNA und dem gewünschten Primer einzureichen.

2.3.6 HEK 293T-Zellkulturen

Materialien:

HEK 293T-Zellen

Zellkulturschalen (BD-Falcon)

Zellkulturflaschen (BD-Falcon)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco; enthält anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine, D-Glucose, Phenolrot)

PBS (Physiologischer Puffer: 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,3 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4)

Fötale Rinderserum

Vollmedium 1: DMEM mit 10 % fötalem Rinderserum

Die 293 Zelllinie ist eine permanente Linie aus primären, menschlichen embryonalen Nierenzellen, die mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 transformiert wurden. Die 293T-Linie ist mit einem SV40-Affenvirus-Antigen transformiert. Deshalb ist sie besonders geeignet für transiente Transfektionen mit Expressionsplasmiden, die einen SV40-Replikationsursprung tragen, wie es bei pMT4 der Fall ist. Die Zellen wachsen nur, wenn sie an Oberflächen anhaften. Daher werden sie in Zellkulturschalen aus Kunststoff oder Zellkulturflaschen als Zellrasen unter einem Medium herangezüchtet.

Bei allen Schritten, die die Zellen betreffen, wurde extreme Sorgfalt angewendet, um eine Kontamination durch Pilze oder Bakterien zu vermeiden. Um dies zu gewährleisten, wurde stets unter einer Abzugshaube mit laminarem Luftstrom und mit sterilen Materialien gearbeitet.

Um Zellen zu vermehren, wurde das Vollmedium aus einer Schale abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin-Lösung vom Untergrund abgelöst. Die Zellsuspension wurde abgesaugt, mit Vollmedium auf 40 mL verdünnt und in eine Zellkulturflasche mit einer größeren Adhäsionsoberfläche gegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO_2 -Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 -Gehalt, weshalb Kulturflaschen mit gasdurchlässigem Deckel verwendet wurden. Wenn der Zellrasen am Boden einer Zellkulturflasche eine Dichtigkeit von ca. 80 % hatte (nach 2-3 Tagen), wurde er gewaschen, abgelöst, in Medium suspendiert und auf 12 Schalen verteilt.

2.3.7 Expression der Rhodopsin-Mutanten in eukaryotischen HEK 293T-Zellen durch transiente Transfektion

Materialien:

Zellkulturschalen, zu 80 % mit HEK 293T-Zellrasen bedeckt

PlusTM Reagenz (Invitrogen, Carlsbad, CA)

Plasmid-DNA

LipofectamineTM Reagenz (Invitrogen)

DMEM, serumfrei

Vollmedium 1

Vollmedium 2: DMEM mit 10 % fötalem Rinderserum

PBS

Transfektionscocktail 1 (alle Angaben pro Zellkulturschale):

3,5 µg/µL DNA

10 µL PlusTM Reagenz

750 µL DMEM (serumfrei)

Transfektionscocktail 2 (alle Angaben pro Zellkulturschale):

17 µL LipofectamineTM Reagenz

750 µL DMEM (serumfrei)

Es gibt verschiedene Prinzipien, die die Aufnahme von Plasmid-DNA in die Zellen vermitteln. Hier wurde dies durch die Bildung eines Komplexes aus der DNA und dem Reagenz LipofectamineTM (Invitrogen) erreicht. Dabei handelt es sich um eine 3:1 (w/w) Liposomenformulierung des polykationischen Lipids 2,3-Dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,Ndimethyl-1-propanaminium trifluoroacetat (DOSPA) und dem neutralen Lipid Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE). Das PlusTM Reagenz unterstützt die Wechselwirkung zwischen der DNA und LipofectamineTM.

Zur Transfektion wurde in zwei getrennten Polystyrol-Gefäßen zunächst Transfektionscocktail 1 angesetzt und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde Transfektionscocktail 2 hergestellt und nach Ablauf der 15 Min. tropfenweise in Transfektionscocktail 1 überführt. Das Gemisch wurde erneut 15 Min. inkubiert und danach mit DMEM (serumfrei) auf 4 mL pro Schale aufgefüllt. Dann wurde das Medium von den verwendeten Schalen abgesaugt und die Zellen mit dem Transfektionsmedium überschichtet. Die Schalen wurden dann 3-5 Std. bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurde auf jede Platte 4 mL Vollmedium 2 gegeben.

Wenn das Medium verbraucht war, färbte sich das darin enthaltene Phenolrot bedingt durch den dann sauren pH gelb. So ließ sich einfach erkennen, wann das Medium gewechselt

werden musste, um die Versorgung der transfizierten Zellen zu gewährleisten. Diese Fütterung wurde in der Regel 24 Std. nach der Transfektion vorgenommen.

Nach 48 Std. wurden die Zellen geerntet. Dafür wurde zunächst das Medium von den Platten gesaugt und 1 mL PBS, das 10 µg/mL der Proteaseinhibitoren Aprotinin und Leupeptin enthielt, auf jede Platte gegeben. Die Zellen wurden dann mit einem Gummiwischer vom Schalenboden geschabt und gesammelt. Ein Ablösen der Zellen mittels Trypsin war bei diesem Schritt nicht möglich, da es das exprimierte Protein hätte beschädigen können. Um zu vermeiden, dass durch Scherung freigesetzte zelleigene Proteasen das Protein verdauen, enthielt der verwendete Puffer sicherheitshalber die Proteaseinhibitoren Aprotinin und Leupeptin. Die gesammelten Zellen wurden mehrfach mit Proteaseinhibitor-haltigem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden im Dunkelraum pro verwendeter Zellkulturschale 5,5 µL von 1,4 mM ethanolischer 11-*cis*-Retinal-Lösung zugegeben und 3 Std. bei 4 °C regeneriert. Danach wurde abzentrifugiert und die Zellpellets bei -20 °C eingefroren oder gleich für die Reinigung verwendet.

2.4 Immunoaffinitätsreinigung der Rhodopsin-Mutanten

Materialien und Puffer

Sepharosegel mit angekoppeltem Antikörper ID4

Solubilisierungspuffer:	140 mM	NaCl
	50 mM	HEPES (pH 6,46 bei 20 °C)
	1 mM	CaCl ₂
	0,1 mM	PMSF
	1,5 % / 1 %	OG / DM

Waschpuffer 1:	140 mM	NaCl
	50 mM	HEPES (pH 6,46 bei 20 °C)
	1,5 % / 0,1 %	OG / DM

Waschpuffer 2:	140 mM	NaCl
	50 mM	Phosphatpuffer (pH 6,50)
	0,1 %	DM

Elutionspuffer: 0,18 mg/mL C-terminales Nonapeptid in Waschpuffer

Das Prinzip bei der Reinigung der Rhodopsin-Mutanten beruht auf Immobilisierung des Proteins an ein Gel durch Antigen/Antikörperbindung. Hierfür wird ein Antikörper gegen das C-terminale Octadecanpeptid des Rezeptors über eine hydrazonische Bindung an ein Sepharosegel (CarboLink™ Coupling Gel, Pierce) geknüpft. Der gebundene Rezeptor kann dann mit einem Puffer, der das C-terminale Nonapeptid enthält, wieder eluiert werden. Da die zu reinigenden Proteine bereits mit 11-*cis*-Retinal regeneriert waren, wurden sämtliche Reinigungsschritte unter Rotlicht durchgeführt.

Zunächst wurde das von der Ernte erhaltene Zellpellet in 1 mL Solubilisierungspuffer pro verwendeter Zellkulturschale aufgelöst. Nach etwa 5 Std. Solubilisierung bei 4 °C wurde die dabei gebildete Lösung zentrifugiert (30 Min., 30000 rpm, 4 °C im Beckman Type 45 Ti-Rotor), um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde zunächst mit Absorptionsspektroskopie auf Anwesenheit des Pigments überprüft, dann mit dem ID4-Antikörpergel vermischt und zur Antikörper-Bindung über Nacht bei 4 °C durchmischt. Dann wurde das Gel abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen wurde Waschpuffer hinzugegeben, die Gelsuspension wieder 5 Min. bei 4 °C durchmischt, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde insgesamt fünf Mal durchgeführt. Bei Reinigung in DM wurde im letzten Waschschrift Waschpuffer 1 durch Waschpuffer 2 ersetzt. Als nächstes wurde das Gel mit dem entsprechenden Waschpuffer in eine Bio-Rad PolyPrep® Mini-Säule überführt, um den Überstand auslaufen zu lassen. Dann wurde der Ablauf der Säule verschlossen und 25 µL Elutionspuffer pro Kulturschale zugegeben. Elutionspuffer und Gel wurden dann in der Säule für 30 Min. bei 4 °C durchmischt und danach über Zentrifugation bis zur Trockne eluiert. Dieser Schritt wurde noch dreimal wiederholt, sodass vier Elutionsfraktionen vorlagen. Die Pigmentkonzentration in jeder Fraktion wurde über Absorptionsspektroskopie an einem Aliquot überprüft. Die Fraktionen wurden sukzessive auf einen Centricon YM 30 Konzentrador (Millipore, Billerica, MA) gegeben und eingeeengt. Auch die Ultrafiltrate wurden spektroskopisch vermessen. Sie enthielten eventuell denaturiertes Pigment sowie das Nonapeptid, das für die Elution in großem Überschuss zugegeben worden war.

2.5 Rekonstitution von Rhodopsin und Rhodopsin-Mutanten in Lipidvesikel

Materialien und Puffer

Dialysepuffer: 1mM Phosphatpuffer (pH 6,5)

Die verwendeten Dialysierzellen wurden je nach Probenvolumen ausgewählt:

<100µL	Slide-A-Lyzer	MINI	Dialysis	Units	(Pierce), Ausschlussgrenze 7 kDa
100-500µL	Slide-A-Lyzer	Dialysis	Cassette	0.1-0.5 mL	(Pierce), Ausschlussgrenze 10 kDa
0,5-3 mL	Slide-A-Lyzer	Dialysis	Cassette	0.5-3 mL	(Pierce), Ausschlussgrenze 10 kDa
größere Volumina	Zellutrans [®]	Dialyseschlauch	(Roth),	Ausschlussgrenze 8-10 kDa	

Verwendete Lipide: L- α -Lecithin (PC, Phosphatidylcholin) aus frischem Eigelb (Sigma, bzw. Avanti polar-Lipids, Inc.)
2-Oleoyl-1-palmitoyl-3-*sn*-phosphatidylcholin (POPC; Sigma)

Um Mutanten und ihre Wildtyp-Vergleichsproben hinsichtlich des Meta I/Meta II-Gleichgewichts untersuchen zu können, ist es notwendig, die Pigmente in Lipidvesikeln zu rekonstituieren. Recht native Bedingungen können durch Lipidvesikel aus Phosphatidylcholin (PC) reproduziert werden. PC beeinflusst zwar das Meta I/Meta II-Gleichgewicht, stört aber die Konformationen der einzelnen Zustände nicht wesentlich (Beck et al., 1998a).

Zur Rekonstitution von Rhodopsin oder Rhodopsin-Mutanten in Lipidvesikel müssen die Pigmente in *n*-Octyl- β -D-Glucosid (OG) gereinigt vorliegen. Dieses Detergens hat eine sehr hohe CMC (critical micellar concentration) von ungefähr 25 mM. Dadurch lässt es sich im Gegensatz zu anderen Detergentien leicht durch Dialyse entfernen.

Rhodopsin wurde in einem molaren Protein/Lipid-Verhältnis von 1:100 rekonstituiert. Von in Chloroform gelöstem Lipid (20 mg/mL) wurde in ein tariertes Glasgefäß so viel eingewogen, dass etwa 10 mg Lipid transferiert wurden ($\delta_{\text{Chloroform}} = 1,49 \text{ kg/L}$). Das Chloroform wurde dann unter leichtem Stickstoffstrom verdampft. Um das Chloroform komplett zu entfernen, wurde das Gefäß noch für mehrere Stunden unter Vakuum getrocknet und im Anschluss die Lipidmenge ausgewogen. Dann wurde die entsprechende Menge OG 5 % zugegeben, um eine

Endkonzentration von 10 mg/mL Lipid vorliegen zu haben. Die Solubilisierung erfolgte über Nacht im Kühlschrank. Diese konzentrierte Lipidlösung konnte für mehrere Rekonstitutionen verwendet werden.

Die zu erwartende Partikelgröße der Lipidvesikel wird durch das zu dialysierende Probenvolumen beeinflusst. Bei zu großem Probenvolumen werden die Vesikel sehr klein und schwierig zu handhaben. Deshalb wurde darauf geachtet, dass das eingesetzte gereinigte Pigment in einer Konzentration von mindestens 10 μ M vorlag. Es wurde die entsprechende Menge der konzentrierten Lipidlösung zugesetzt, um das erwünschte Protein/Lipid-Verhältnis von 1:100 zu erzielen. Dieses Gemisch wurde dann lichtdicht verpackt und für 3 Std. im Kühlschrank unter Bewegung inkubiert, um eine gleichmäßige Ausbildung gemischter Lipid/Detergens-Mizellen zu gewährleisten. Dieses Gemisch wurde in eine für das entsprechende Volumen angemessene Dialysezelle gegeben und zunächst 4 Std. gegen 500 mL 50 mM Phosphatpuffer pH 6,5 im Kühlschrank dialysiert. Dann folgten 40 Std. Dialyse gegen 1 mM Phosphatpuffer pH 6,5 in einer 200 mL Durchflusszelle. Wenn Dialysekassetten wurden, wurde in vier Dialyseschritten gegen jeweils 500 mL Puffer dialysiert.

Die in Lipidvesikel rekonstituierten Pigmente wurden durch Zentrifugation gesammelt. Das Pellet wurde dann in einem kleinen Volumen des Dialysepuffers resuspendiert. Sowohl im Pellet als auch im Überstand wurde die Pigmentkonzentration durch Absorptionsmessung bestimmt, um so eine Aussage über die Ausbeute der Rekonstitution zu treffen.

2.6 Reinigung von Transduzin

Materialien und Puffer

Puffer A

Puffer E

Puffer H	20 mM	Tris (pH 7,3)
	4 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
	0,1 mM	PMSF

Puffer C	300mM	NaCl
	10 mM	Phosphatpuffer (pH 7,0)
	2 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
	0,1 mM	PMSF
Puffer P	100 mM	NaCl
	10 mM	Phosphatpuffer (pH 7,0)
	2 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
	0,1 mM	PMSF
	in H ₂ O dest./Glycerol (1:1)	

Die Reinigung des G-Proteins Transduzin aus Rinder-Netzhäuten erfolgte zunächst gleich, wie die Reinigung der Diskmembranen (siehe 2.2). Nach der Abtrennung des Pigmentepithels mittels einem kontinuierlichen Dichtegradienten konnte die Transduzinreinigung bei Tageslicht durchgeführt werden. Die Abtrennung der ROS wurde wie bei der Reinigung der Diskmembranen mit einem Sucrose-Stufendichtegradienten erreicht. Dort wurden dann die Diskmembranen durch hypotones Waschen in Puffer E von unerwünschten, löslichen Bestandteilen befreit. Bereits nach Absaugen der ROS-Bande aus dem Stufendichtegradienten und Resuspendieren in Puffer A wurde das Rhodopsin durch Belichtung aktiviert (2 Min. mit einem Diaprojektor mit >495 nm Farbfiler). Dadurch konnte Transduzin an die Diskmembranen gebunden werden. Hierbei wurde ausgenutzt, dass Transduzin in Abwesenheit von GTP zwar an lichtaktiviertes Rhodopsin bindet, aber nicht aktiviert wird (vgl. Gleichung 2.1), weshalb eine Spaltung und Ablösung des heterotrimären G-Proteins ausbleibt. So wurde ein Komplex aus aktiviertem Pigment und Transduzin erhalten, der abzentrifugiert werden konnte (20 Min., 25000 rpm, 4 °C in Ti 50.2). Die dabei erhaltenen Pellets wurden dann in hypotonem Puffer E resuspendiert, erneut belichtet und nach 30 Min. Inkubation auf Eis nochmals zentrifugiert (20 Min., 25000 rpm, 4 °C). Dann wurden genau wie bei der Reinigung der Diskmembranen drei hypotone Waschschritte mit steigenden Zentrifugationsgeschwindigkeiten angefügt. Um das Transduzin wieder vom Rhodopsin zu trennen, wurde GTP zu Puffer E zugegeben (0,1 mM) und das Pellet in 25 mL Puffer E + GTP resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (20 Min., 33000 rpm, 4 °C) befanden sich die Untereinheiten des aktivierten Transduzins im Überstand. Die Überstände

wurden gesammelt und nochmals zentrifugiert (20 Min., 40000 rpm, 4 °C). Der heterotrimäre inaktive G-Protein-Komplex regeneriert sich schließlich aus den Untereinheiten nach Abspaltung von Phosphat vom gebundenen GTP (siehe Gleichung 2.2). Das so erhaltene Transduzin wurde dann mittels Affinitätschromatographie auf Hexylagarose gereinigt.

2.6.1 Affinitätschromatographie

Der Durchfluss der Säule erfolgte über den hydrostatischen Druck und ohne den Einsatz einer peristaltischen Pumpe. Die Fließgeschwindigkeit wurde über den Höhenunterschied von Fließmittelreservoir und Ausfluss auf 1 mL in den ersten 5 Min. eingestellt. Die Säule wurde mit 100 mL Puffer H equilibriert. Vor dem Auftragen der Transduzin-haltigen Probe wurde die Gesamtproteinkonzentration mittels Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) bestimmt. Die Methode basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Coomassie® Brilliant Blue G-270 Farbstoffs in saurer Lösung bei Bindung an Proteine. Als Standard wurde eine Eichkurve mit BSA erstellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sämtliche Absorptionsmessungen, ob Standard oder Probe, stets im gleichen zeitlichen Abstand (gemessen ab der Zugabe eines Aliquots der proteinhaltigen Probe zur Reagenzlösung) aufgenommen wurden. Im Anschluss wurde die Probe über Nacht auf die Säule geladen. Gewaschen wurde mit 100 mL Puffer H. Die Elution erfolgte mit Puffer C in Fraktionen von etwa 1 mL. Die Elution wurde durch Proteinkonzentrationsbestimmung in den Fraktionen mittels Bio-Rad Protein Assay verfolgt und die Hauptfraktionen vereinigt. Diese wurden dann gegen den Glycerol-haltigen Puffer P in einem Zellutrans® Dialyseschlauch (Roth) mit der Ausschlussgröße 8-10 kDa über Nacht dialysiert.

2.7 Transduzin-Aktivitätsmessung

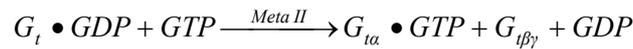
Materialien und Puffer

Puffer T	150 mM NaCl
	20 mM MES (pH 6,5)
	2 mM MgCl ₂

Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des gereinigten Transduzins wurde dieselbe Methode angewendet, mit der die Aktivität von in Lipidvesikeln rekonstituiertem Wildtyp-Rhodopsin und den Rhodopsin-Mutanten E134Q und E247Q gemessen wurde.

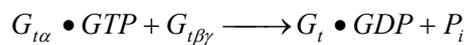
Das Prinzip beruht auf der Messung der intrinsischen Fluoreszenzintensität von Trp 207 auf der G_{α} -Untereinheit von Transduzin. Die Intensität nimmt bei der Aktivierung zu, d. h. wenn Transduzin in seine Untereinheiten G_{α} und $G_{\beta\gamma}$ zerfällt. Die Reaktion ist vom Austausch des an Transduzin gebundenen GDP durch GTP abhängig. Bei der Transduzin-Aktivierung dient das aktive Rhodopsin-Photoprodukt Meta II als Katalysator:

Gleichung 2.1



Transduzin deaktiviert sich physiologisch, indem Phosphat von gebundenem GTP abgespalten wird. Darauf folgt die Bildung des ursprünglichen inaktiven Komplexes aus α , β und γ -Untereinheit und GDP:

Gleichung 2.2



Diese Rückreaktion kann unterbunden werden, indem statt GTP nicht spaltbares GTP γ S angeboten wird. Dann erreicht die Fluoreszenz einen Sättigungswert. Die interessante Messgröße ist dabei der Anstieg der zeitlich gemessenen Fluoreszenzintensität. Sie ist ein Maß für die katalytische Aktivität des jeweils untersuchten Pigments, bzw. seines aktiven Photoprodukts.

Die Fluoreszenzemission wurde mit einem im Institut entwickelten Fluorimeter bei UV-Anregung zwischen 290 und 310 nm bei 340 nm detektiert (Vogel et al., 2000). Die Probe mit Transduzin und dem zu untersuchenden Pigment in Puffer T wurde 20 s bei >530 nm belichtet und ihre Fluoreszenzintensität aufgenommen. Nach einer Vorlaufzeit von etwa 100 s wurde GTP γ S zugegeben, sodass die Probe eine Endkonzentration von 200 μ M GTP γ S, 900 nM und 80 nM Pigment in Puffer T mit einem Gesamtvolumen von 1000 μ L hatte. Zur Bestimmung der Zeitkonstante des exponentiellen Anstiegs wurde die gemessene Intensitätskurve volumenkorrigiert, normiert, geglättet und eine Exponentialfunktion an den Anstieg nach GTP γ S-Zugabe angepasst.

2.8 FTIR-Spektroskopie

2.8.1 Einführung

Die Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Molekülen beruht auf der Anregung von Übergängen zwischen verschiedenen Energieniveaus. Infrarotes (IR) Licht, also Strahlung geringer Energie, regt Schwingungs- und Rotationsenergieniveaus an.

Elektronische Übergänge sind erst bei Strahlung höherer Energie, wie UV- oder sichtbarem (vis) Licht möglich. Die in der Spektroskopie gemessene Größe ist die Intensität (I) des die Probe durchdringenden Lichts. Sie ist immer gleich oder geringer als die Lichtintensität I_0 vor der Probe. Das Verhältnis I/I_0 wird als Transmissionsgrad und $(I/I_0) \cdot 100\%$ als prozentuale Transmission (T) bezeichnet. Für die Absorption (A) einer Probe gilt das Lambert-Beer-Gesetz:

Gleichung 2.3

$$A = -\lg T = -\lg \left(\frac{I}{I_0} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Dabei ist ε der molare Absorptionskoeffizient der Probe bei der entsprechenden Wellenlänge und pro cm Schichtdicke, c die Konzentration der Probe in M und d die Schichtdicke in cm.

In der UV-vis-Spektroskopie ist es z. B. üblich, die Absorption der Probe in Abhängigkeit von der Wellenlänge (λ) des eingestrahlt Lichts anzugeben. Da es sich bei der Absorption von IR-Licht um die Anregung von Schwingungszuständen handelt, hat es sich hier eingebürgert, die Absorption nicht in Abhängigkeit der Wellenlänge, sondern der Wellenzahl ($\tilde{\nu}$) mit der Einheit cm^{-1} darzustellen. Sie ist über die Lichtgeschwindigkeit c direkt proportional zu Frequenz ν und umgekehrt proportional zur anregenden Wellenlänge λ (gemessen in cm):

Gleichung 2.4

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}$$

Die Schwingungsfrequenzen in realen Molekülen liegen im Bereich der IR-Strahlung (400 bis 4000 cm^{-1}). Es sind nur diejenigen Schwingungen infrarot-aktiv, die mit einer Änderung des Dipolmoments verbunden sind. In symmetrischen Molekülen muss das nicht für alle Schwingungsmoden der Fall sein. Bei den Schwingungen unterscheidet man zwischen Valenzschwingungen und Deformationsschwingungen, d. h. Änderungen der Bindungslänge zwischen den an der Schwingung beteiligten Atomen und Änderungen des Bindungswinkels. Außerdem existieren noch Kombinationsschwingungen aus mehreren Schwingungen und sogenannte Oberschwingungen. Letzteres sind Schwingungen, die nicht dem ersten, sondern höheren angeregten Schwingungszuständen entsprechen. Besitzen Oberschwingungen zufällig die gleiche Frequenz wie eine reguläre Schwingung, tritt Fermi-Resonanz auf.

Die Banden des Absorptionsspektrums eines Moleküls sind ein Abbild der absorbierenden Schwingungen der Atomgruppen. Aus der Position (Frequenz) der Banden und ihrer Intensität kann auf die Kraftkonstanten der chemischen Bindungen zwischen den an der Schwingung

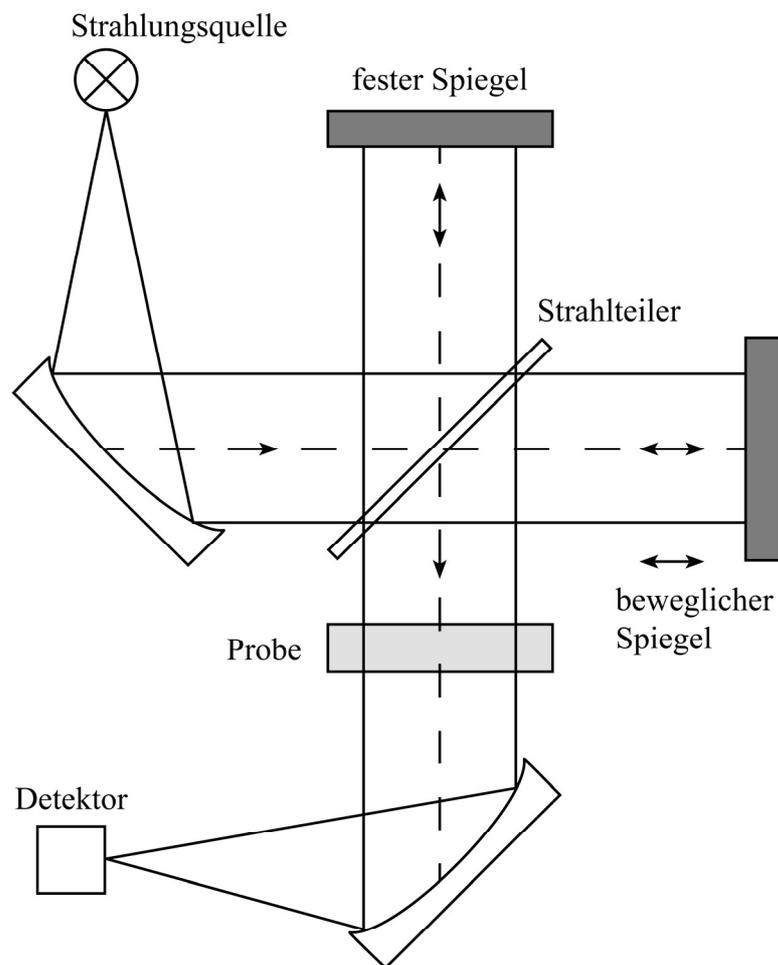


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Michelson-Interferometers.

beteiligten Atomen geschlossen werden. Diese hängen aber nicht nur von den an der Schwingung direkt beteiligten Atomen und Bindungen ab, sondern auch von der Umgebung. Auch gekoppelte weiter entfernte Bindungen haben einen Einfluss auf die Banden. Daher können aus einem IR-Spektrum auch strukturelle Informationen über Geometrie, Orientierung und Ladungsverteilung von Molekülgruppen und deren Wechselwirkung mit der Umgebung gezogen werden.

In der herkömmlichen dispersiven IR-Spektroskopie wird die Intensität direkt in Abhängigkeit der von einem Monochromator erzeugten Frequenz gemessen. Die heutzutage fast ausschließlich verwendete Methode ist die Fourier-Transformation Infrarot (FTIR) Spektroskopie. Hier wird die Probe vom gesamten Spektrum („Weißlicht“) einer IR-Strahlungsquelle (Globar) durchleuchtet.

Als eigentliche Messgröße wird das sogenannte Interferogramm detektiert, das von einem Interferometer erzeugt wird. Der einfachste Aufbau eines Interferometers ist das Michelson-

Interferometer (Abb. 2.1). Auch wenn moderne Spektrometer einen anderen modifizierten Aufbau haben, ist es besonders geeignet, das Prinzip der FTIR-Spektroskopie zu veranschaulichen. Dabei wird das polychromatische IR-Licht von einem halbdurchlässigen Spiegel (Strahlteiler) in zwei Teilstrahlen zueinander zerlegt. Während der eine eine konstante Weglänge zu einem festen Spiegel hat, wird die des anderen durch einen beweglichen Spiegel kontinuierlich verändert. Die reflektierten Strahlen werden im Strahlteiler wieder vereinigt und treten in Interferenz. Dieses Strahlenbündel tritt dann durch die Probe und wird vom Detektor erfasst. Das gemessene Interferogramm ist also eine Funktion der Intensität von der Position des beweglichen Spiegels. Würde mit monochromatischem Licht der Frequenz ν gemessen, wäre das gemessene Signal eine Intensitäts-Wellenfunktion I , die sowohl vom Gangunterschied x der beiden Strahlkomponenten (und damit der Spiegelposition), als auch von der Frequenz des eingestrahnten Lichts abhängt:

Gleichung 2.5

$$I(x) = S(\nu) \cos(2\pi\nu x)$$

Deren Amplitude würde der Intensität $S(\nu)$ des kontinuierlich eingestrahnten, monochromatischen Lichts der entsprechenden Frequenz entsprechen. Wird mit Licht mehrerer Wellenlängen gleichzeitig eingestrahlt, addieren sich diese Wellenfunktionen zu dem Interferogramm, das gemessen wird. Wird mit einem Kontinuum von Wellenlängen eingestrahlt, wird diese Addition mathematisch durch eine Integration ersetzt, was dann nichts anderes ist als eine Fourier-Transformation der Intensität $S(\nu)$. Umgekehrt lässt sich die eigentlich gewünschte frequenzabhängige Intensität $S(\nu)$ auch als inverse Fourier-Transformation des Interferogramms darstellen. Da das Interferogramm über diskrete Digitalisierungspunkte abgespeichert wird, wird diese Fourier-Transformation von der Spektrometer-Software als diskrete Fourier-Transformation (DFT) durchgeführt. Die hierfür verwendeten Digitalisierungspunkte müssen exakt festgelegt sein. Um das zu gewährleisten, wird ein He/Ne-Laserstrahl (632 nm) in das Interferometer parallel zum IR-Strahl mit eingekoppelt. Die von einer Photodiode gemessene Intensität entspricht einer Wellenfunktion wie in Gleichung 2.5. Die Nulldurchgänge dieser Wellenfunktion werden als Digitalisierungspunkte definiert und sind somit perfekt mit der Spiegelbewegung synchronisiert. Somit verfügen FTIR-Geräte über eine automatische Wellenzahlkalibrierung großer Präzision, was als „Connes-Vorteil“ bezeichnet wird. Natürlich stellt die DFT nur eine Näherung an die echte Fourier-Transformation dar, die aber durch die Wahl der Anzahl der Digitalisierungspunkte pro Frequenzperiode beliebig genau berechnet werden kann. Das „Nyquist-Theorem“ besagt, dass man pro Frequenzperiode mindestens zwei

Digitalisierungspunkte benötigt, um eine eindeutige Annäherung zu bekommen. Dadurch wird natürlich der messbare Frequenzbereich nach oben eingeschränkt. Diese Grenze wird durch die Wellenlänge des He/Ne-Lasers festgelegt, die mit ihren zwei Nulldurchgängen genau zwei Digitalisierungspunkten entspricht. Somit befindet sich die Obergrenze des messbaren Bereichs bei 632 nm oder 15800 cm^{-1} . Solch hohe Frequenzen sind für die hier durchgeführten Messungen ohnehin uninteressant. Allerdings können nicht mehr digitalisierbare Signale oberhalb dieses Bereichs Störungen verursachen und müssen deshalb durch optische Filter unterdrückt werden.

An der Spiegelposition, an der die beiden geteilten IR-Strahlen keinen Gangunterschied haben, interferiert das IR-Licht aller beteiligten Frequenzen konstruktiv. Diese Position wird als Weißlichtposition bezeichnet. Ein Interferogramm wird meist symmetrisch um die Weißlichtposition aufgenommen. So ein symmetrisches Interferogramm hat den Informationsgehalt von zwei Spektren. Die spektrale Auflösung ist proportional abhängig von der Länge des durchfahrenen Spiegelwegs. Ein längerer Weg des Spiegels verbessert zwar die spektrale Auflösung, erhöht aber gleichzeitig die Dauer eines Scans, was bei zeitaufgelösten Messungen unerwünscht sein kann.

Insgesamt bietet die FTIR-Spektroskopie einige Vorteile gegenüber der herkömmlichen dispersiven IR-Spektroskopie: Zunächst hat sie den bereits erwähnten „Connes-Vorteil“, d. h. die hohe Wellenzahlpräzision von ca. $0,01\text{ cm}^{-1}$. Außerdem sind die Messzeiten ungleich kürzer, da alle von der IR-Quelle ausgesandten Frequenzen gleichzeitig auftreffen. Dadurch wird überhaupt erst zeitaufgelöste IR-Spektroskopie ermöglicht. Als weiterer Vorteil sei noch der „Jaquinot-Vorteil“ erwähnt, der sich aus der Verwendung kreisförmiger Aperturen ergibt, die einen viel größeren Lichtdurchsatz zulassen als die schmalen Spalte von Gittergeräten.

2.8.2 Lichtinduzierte FTIR-Differenzspektroskopie

Anhand von Absorptionsspektren oder Einkanalspektren (Abb. 2.2) können bei der Untersuchung von Proteinen kaum strukturelle Aussagen gemacht werden, da sich bei so großen Molekülen zu viele Banden überlagern. Hierbei dominieren hauptsächlich Amid-Banden (Amid I und Amid II), die sich aus Schwingungen des Proteinrückgrats zusammensetzen. Zusätzlich wird das Spektrum von Absorptionsbanden des Wassers und auch des Puffers überdeckt, da solche Proben in der Regel in einem wässrigen Medium hergestellt werden.

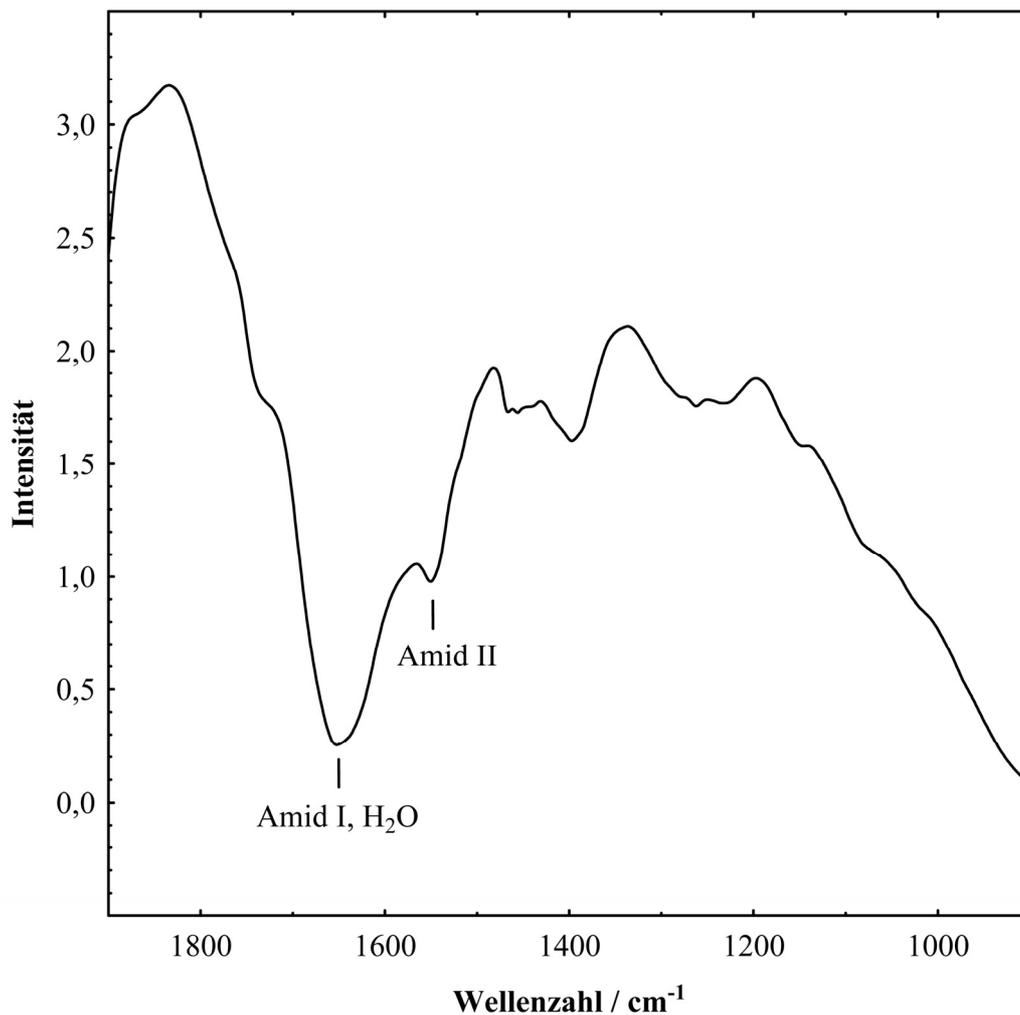


Abb. 2.2: Einkanal-Intensitätsspektrum von Rhodopsin in Diskmembranen im allgemein untersuchten Frequenzbereich. Hier überlagern sich viele Banden des Proteins. Hinzu kommen Absorptionen von anwesenden Lipiden, von Wasser und von Puffermolekülen. Daher können aus einem solchen Spektrum kaum Informationen herausgezogen werden. Amid I- und Amid II-Banden sind zwar erkennbar, werden aber auch von Schwingungsmoden des Wassers überdeckt.

Wird ein Protein auf seine funktionellen Gruppen untersucht, sind nur diejenigen Banden von Interesse, die sich während einer Reaktion ändern. Zur Beobachtung einzelner relevanter Gruppen wurde hier die Methode der lichtinduzierten Differenzspektroskopie angewendet.

Da die Reaktion durch Licht angeregt wird, werden die Probenbedingungen hinsichtlich der Proteinumgebung und des Puffers vor und nach der Reaktion perfekt reproduziert. Das Differenzspektrum zwischen zwei Absorptionsspektren oder Einkanalspektren, die unterschiedliche Zustände derselben Probe darstellen, enthält deshalb ausschließlich Banden von Gruppen, die beim lichtinduzierten Übergang in einen anderen Zustand einer reaktionsspezifischen Veränderung unterliegen. In so einem Photoprodukt-minus-Dunkelzustand-Spektrum stellen negative Banden Schwingungs-Moden des Dunkelzustands dar, während positive Banden das Photoprodukt repräsentieren. Abweichungen von dieser

Grundregel treten dann auf, wenn sich positive und negative Banden stark unterschiedlicher Intensitäten überlagern.

Viele Differenzbanden des Rhodopsins und seiner Intermediate konnten bereits bestimmten Schwingungsmoden zugeordnet werden. Diese Zuordnungen werden im Ergebnisteil dieser Arbeit genauer beschrieben.

Welches Photoprodukt bei der Differenzspektroskopie beobachtet wird, hängt von der Wahl der Messbedingungen ab. Bei Rhodopsin können die inaktiven Intermediate Batho, Lumi und Meta I durch tiefe Temperaturen stabilisiert werden. Meta I und das aktive Photoprodukt Meta II sind beide bei Raumtemperatur stabil, allerdings bei unterschiedlichen pH-Werten. So wurden zur Messung eines Meta I-Spektrums alkalische pH-Werte gewählt. Dagegen wird Meta II bei saureren pH-Werten gebildet und wurde bei entsprechenden Bedingungen gemessen. Eine weitere Möglichkeit, Photoprodukt-minus-Dunkelzustand-Spektren zu erhalten ist zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie. Hier können Übergänge zu verschiedenen Intermediaten unter identischen Rahmenbedingungen gemessen werden oder sogar Übergänge detektiert werden, die für statische Messungen nicht zugänglich sind. Außerdem können aus den zeitlichen spektralen Änderungen die Zeitkonstanten für den jeweiligen Übergang bestimmt werden. Daher wurde für bestimmte Fragestellungen in dieser Arbeit auch dieses Verfahren angewendet.

2.8.3 Herstellung der Infrarot-Proben

Proben von Rhodopsin und Rhodopsin-Mutanten beinhalteten je nach Anwendung 0,05-1,0 nmol Pigment. Hierfür wurde eine Suspension des Pigments in Membranen auf ein Sandwich-Küvetten-Fenster aus BaF₂ aufgetragen und unter schwachem N₂-Strom getrocknet. Die Sandwich-Fenster sind in der Mitte um wenige µm herunterpoliert. Dieser Unterschied der Fensterdicke zum Fensterrand bestimmt die Schichtdicke der Probe. Kreisförmig um die Proben-Plattform ist eine Nut in das Fenster eingefräst, die als Puffer-Reservoir dient. Nach dem Auftrocknen der Probe wurde der für die Messung gewünschte Puffer mit dem benötigten pH auf die Probe gegeben. Hierfür wurden 200 mM Citratpuffer für pH < 5,5, MES (Morpholinoethansulfonsäure) für pH 6,0-7,0 und BTP (Bis-Tris-Propan) für pH > 7,5 verwendet. Nach einer angemessenen Equilibrierungszeit (mind. 1 Min.) wurde die Probe mit einem planen Gegenfenster abgedeckt, wobei ein Teil des Puffers in das vorgesehene Reservoir gedrückt wurde. Die Probe wurde mit einer Blende versehen, die nur den mit Probe bedeckten Teil des Fensters freigab. Danach wurde sie in einem speziell angefertigten Probenhalter verschraubt. Um die Pufferkapazität zu erhöhen, war es bei

pH 9,5-Proben notwendig, bereits die Probensuspension durch Pufferaustausch mit alkalischem Puffer einzustellen.

Zur Herstellung von Proben in D₂O-Puffern wurde der Probenfilm zunächst zweimal mit D₂O equilibriert und wieder eingetrocknet, um H₂O restlos zu entfernen, bevor der D₂O-Puffer aufgetragen wurde.

Proben in DM (Dodecylmaltosid) wurden als Filmproben vermessen. Dafür wurde die Probe auf ein planes Probenfenster aufgetrocknet und durch Anhauchen hydratisiert. Eine Einstellung des pH wurde hierbei durch Anwesenheit von 50-100 nmol Phosphatpuffer erzielt.

2.8.4 Messung der statischen FTIR-Spektren

Die Messungen wurden an einem IFS 28 Spektrometer (Bruker, Ettlingen) mit einem MCT-Detektor (*mercury cadmium telluride*, HgCdTe) und Nicht-Linearitäts-Korrektur durchgeführt. Mit einem Spektrum zwischen 5000 und 500 cm⁻¹ konnten vor jeder eigentlichen Messung der Wassergehalt der Probe abgeschätzt und Aussagen über die Homogenität des Probenfilms getroffen werden. Da die hohe Lichtintensität bei einer so weiten Bandbreite beim MCT-Detektor jedoch zu Problemen durch starke Nicht-Linearität geführt hätte, wurde hierfür zu einem pyroelektrischen DTGS-Detektor (deuteriertes Triglycinsulfat) umgeschaltet. Dieser wurde ausschließlich zu diesem Zweck verwendet. Um Einflüsse von Wasserdampf-Rotationsbanden auf das Spektrum zu vermeiden, wurde die Probenkammer mit getrockneter Luft gespült. Die Temperatur der Proben wurde durch thermostatisierbare Durchlaufkühlung (-7 bis 30 °C), durch ein Peltierelement (-30 bis -10 °C) oder einen Stickstoff-gekühlten Kryostaten gewährleistet (-170 bis -20 °C).

Vor jeder Messung wurde solange gewartet, bis die Schwankungen in der Untergrundabsorption der Proben stabil waren. Dies wurde kontrolliert, indem mehrere Spektren im zeitlichen Abstand von 1 Min. aufgenommen wurden („Baseline-Test“). Im Idealfall sollte die Differenz dieser Spektren („Baseline“) eine Null-Linie ergeben. In der Praxis war es aber ausreichend, zu warten, bis minimale Abweichungen von der Null-Linie für den zeitlichen Abstand von 1 Min. konstant waren. In diesem Fall konnten die Spektren um diese Abweichung durch Abziehen einer gemittelten Baseline korrigiert werden.

Für ein statisches Differenzspektrum wurden vier Dunkelspektren aufgenommen, die sich jeweils aus dem Mittel von 512 doppelseitigen Interferogrammen sowohl der Vorwärts-, als auch der Rückwärtsbewegung (*double-sided forward-backward*) des Interferometerspiegels ergaben. Die spektrale Auflösung betrug 4 cm⁻¹. Dann wurde mit einem 150 W-Diaprojektor,

dessen Licht mit Hilfe eines Lichtleiters in die Probenkammer gelangte, 30 s belichtet. Je nach zu untersuchendem Intermediat wurden verschiedene optische Filter verwendet: Für Meta I und Meta II ein >530 nm Filter und für Batho und Lumi eine Filterkombination, die einen Bandpass zwischen 455 und 500 nm erzeugte. Für bestimmte Messungen wurde die Probe mit dem 477 nm Laserpuls eines Farbstoff-Lasers (FL2000, Lambda Physik, Göttingen) angeregt, der mit einem Coumarin 307-Laserfarbstoff (Radiant Dyes, Wermelskirchen) betrieben wurde. Gepumpt wurde der Farbstoff-Laser durch den UV-Puls eines XeCl-Excimer-Lasers. Der Blitz wurde mit einem Glasfaser-Lichtleiter in die Probenkammer eingekoppelt und hatte eine Energie von durchschnittlich 1,1 mJ auf einem Durchmesser von 6 mM. Nach der lichtinduzierten Anregung wurden wieder mindestens vier Datenblöcke aus 512 Scans mit 4 cm^{-1} Auflösung aufgenommen. Das Differenzspektrum (Δ Absorption) wurde aus dem letzten Intensitätsspektrum (I) vor und dem ersten Spektrum nach der Belichtung berechnet:

Gleichung 2.6

$$\Delta \text{ Absorption} = -\lg \frac{I_{\text{nach}}}{I_{\text{vor}}}$$

Zur Baseline-Korrektur wurden die vier Blöcke vor der Belichtung verwendet. Dafür wurden die je aufeinanderfolgenden Datenblöcke voneinander abgezogen und die drei so erhaltenen Baselines gemittelt. Die gemittelte Baseline entsprach dann den zeitlich abhängigen Veränderungen zwischen zwei aufgenommenen Dunkelspektren (ca. 1 Min.). Um ein Photoprodukt-minus-Dunkelzustand-Spektrum zu korrigieren, wurde die gemittelte Baseline auf den entsprechenden Zeitintervall zwischen vor und nach der Belichtung skaliert und vom zu korrigierenden Differenzspektrum abgezogen.

Die zusätzlichen Datenblöcke nach der Belichtung wurden verwendet, um langsame Reaktionen zu verfolgen, die nach Aufnahme des ersten Datenblocks noch nicht beendet waren.

2.8.5 Zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Differenzspektroskopie

In den zeitaufgelösten Experimenten wurden ebenfalls doppelseitige Interferogramme der Vorwärts- (*forward*)- und Rückwärtsbewegung (*backward*) des Interferometerspiegels aufgenommen, allerdings im zeitaufgelösten Rapid-Scan-Modus. Das bedeutet, dass hintereinander aufgenommene Interferogramme nicht wie bei statischen Messungen aufaddiert, sondern in getrennten Speicherpuffern des Datenerfassungsprozessors (*aquisition processor*, AQP) abgelegt wurden. Das Prinzip der Datenaufnahme ist in Abb. 2.3 durch eine

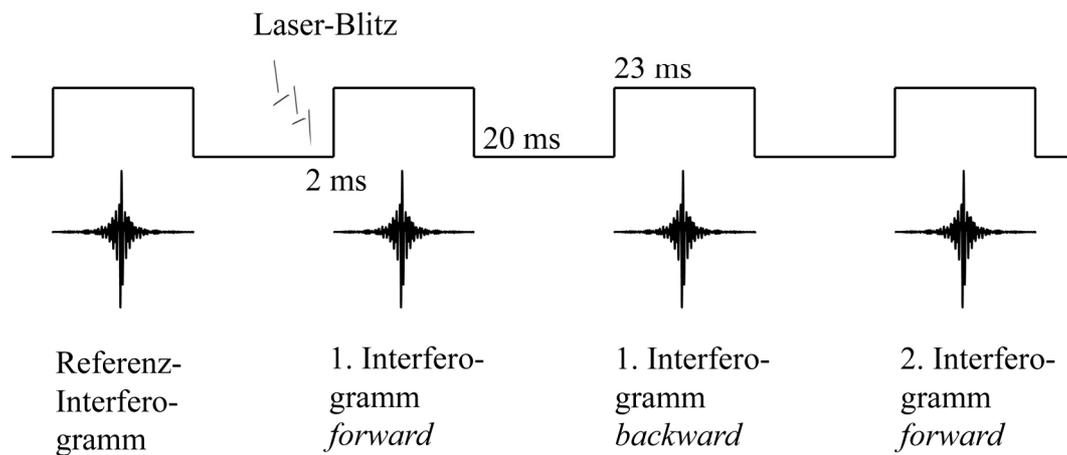


Abb. 2.3: Prinzip der Datenaufnahme bei Rapid-Scan FTIR-Differenzspektroskopie. Während jedes Rechteckimpulses („Take-Data“ Signal) erfolgt die Aufnahme eines Interferogramms. Die Datenaufnahmezeit für ein doppelseitiges Interferogramm betrug 23 ms, die Totzeit während der Spiegelumkehr 20 ms. Nach dem Vorlauf erfolgte die Laserbelichtung ca. 2 ms vor dem nächsten Rechteckimpuls. Der Laser-Blitz wurde als zeitlicher Nullpunkt festgelegt.

Rechteckimpuls-Kurve symbolisiert. Sowohl ein *forward*-, als auch ein *backward*-Scan ergaben je ein doppelseitiges Interferogramm. Die Datenaufnahmezeit betrug bei der Geschwindigkeitsstufe 15 (160 kHz) 23 ms, die Totzeit während der Spiegelumkehr 20 ms. Nach Aufnahme von acht doppelseitigen Interferogrammen aus je 128 aufaddierten Scans im Vorlauf wurde 2 ms vor dem nächsten Rechteckimpuls durch einen 477 nm Laser-Blitz belichtet (siehe oben). Die Dauer des Laserblitzes betrug ca. 20 ns. Um die Zeitauflösung zu erhöhen, wurden die aufgenommenen doppelseitigen Interferogramme geteilt, sodass das erste Spektrum bereits 14 ms nach dem Laser-Blitz aufgenommen war. Berücksichtigt man die Totzeit bei der Spiegelumkehr, betrug die mittlere Zeitauflösung für ein einseitiges Interferogramm 21 ms. Da die spektrale Auflösung mit dem Auslenkungsweg des Interferometerspiegels korreliert ist, konnte die Scan-Geschwindigkeit durch Verringerung der Auflösung auf 8 cm^{-1} erhöht werden. Wegen der eingeschränkten Kapazität des AQP-Pufferspeichers wurden nur die ersten 16 Spektren (8 bis 321 ms), in denen schnelle Prozesse enthalten waren, mit einer linearen Zeitbasis aufgenommen. Die zu späteren Zeitpunkten aufgenommenen Spektren, in denen langsamere Prozesse in der Rhodopsin-Aktivierung gemessen wurden, wurden mit einer quasi-logarithmischen Zeitbasis aufgenommen. Dafür wurde eine ansteigende Anzahl von Scans gemittelt: Zwei Scans für die Spektren 17 bis 20 (423 bis 940 ms), vier Scans für die Spektren 21 bis 24 (1199 bis 2233 ms) und acht Scans für die Spektren 25 bis 27 (2750 bis 4129 ms). Ein zusätzliches Spektrum 28 wurde zur Aufnahme des stationären Photoprodukts mit 256 Scans (15,5 s) am Ende des Experiments

aufgenommen. Die Zeitpunkte sind aus den Mittelpunkten der Interferogramme berechnet worden. Dabei entsprach der Laser-Blitz stets dem Zeitpunkt $t=0$. Weil ab der quasi-logarithmischen Zeitbasis das Aufspalten der Interferogramme keine zusätzlichen Vorteile brachte, wurden die zu einem Scan zugehörigen vier Interferogrammteile für die Spektren 17 bis 28 wieder zusammengeführt.

Alle Datensätze, die für die Analyse der zeitaufgelösten Messungen verwendet wurden, waren das Mittel aus zwölf unabhängigen Messungen. Hierfür wurden alle Spektren aus den 3D-Datenblöcken der OPUS-Spektrometer-Software (Bruker, Ettlingen) extrahiert, zu gleichen Zeitpunkten gehörenden Spektren gemittelt und in eine Datenpunkttabelle überführt.

Ausgehend von dieser Datenpunkttabelle und den zu den Spektren zugehörigen Zeitpunkten wurde eine Maximum Entropie (ME) inverse Laplace Transformation vorgenommen. Diese Berechnungen wurden freundlicherweise von Víctor Lórenz Fonfría vom Department of Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology, Showa-ku, Nagoya, Japan durchgeführt. Die Entropiefunktion stellt bei dieser Analyse eine wichtige Randbedingung dar. Sie soll gewährleisten, dass die numerische Lösung der inversen Laplace-Transformation nicht allein durch die größte Übereinstimmung mit den Messdaten zustande kommt, sondern auch gleichzeitig die einfachste mögliche Lösung darstellt. In der Minimierungsfunktion wird der Beitrag der Entropiefunktion durch einen Regularisierungsparameter gewichtet, der hier generell $10^{-5,00}$ betrug. Für die eingehende Analyse von über mehrere Wellenzahlen gemittelte Zeitverläufe wurde $10^{-5,75}$ angewendet.

Für die Auswertung durch globalen multi-exponentiellen Fit war es notwendig, den Datensatz um eine sowohl spektrale, als auch zeitliche Gewichtung zu erweitern. Die spektrale Gewichtung entsprach dabei dem Kehrwert des Rauschbetrags für jede Wellenlänge bei einem einzelnen Scan. So ein Rauschspektrum wurde ermittelt, indem zunächst vor jedem Rapid-Scan-Experiment vier Dunkelspektren zu je 256 Scans aufgenommen wurden. Aus diesen wurden, wie oben beschrieben, Baselines berechnet. Jede Baseline wurde durch einen Savitzky-Golay-Algorithmus (OPUS, Bruker, Ettlingen) geglättet und entsprach dann einer reinen, rauschfreien Baseline. Das spektrale Rauschspektrum konnte dann aus der Differenz von der ursprünglichen Baseline minus der geglätteten Baseline ermittelt werden. Die spektralen Rauschbeträge wurden dann aus dem quadratischen Mittelwert von 36 solcher Rauschspektren bestimmt. Um auf das Rauschen eines Einzelscans zu normieren, wurde das Rauschspektrum mit der Wurzel aus 256 multipliziert. Für die zeitliche Gewichtung wurde der Kehrwert der spektralen Rauschbeträge mit der Wurzel der für den entsprechenden Zeitpunkt aufgenommenen Anzahl der Scans multipliziert.

Der globale, multi-exponentielle Fit wurde dann mit dem Programm MEXFIT (Müller und Plessner, 1991) durchgeführt.

2.8.6 Darstellung der FTIR-Differenzspektren

Die FTIR-Spektren sind generell im spektralen Bereich zwischen 1900 und 900 cm^{-1} dargestellt. Aufgrund einiger Fragestellungen werden teilweise auch Darstellungen engerer spektraler Abschnitte aus den Gesamtspektren zusätzlich gezeigt. Die Ordinate bezeichnet generell Absorptionsänderungen und wurde für die FTIR-Spektren nicht skaliert, da die Absorptionsänderungen mit der Probenmenge und den Belichtungsbedingungen variieren. Um den Vergleich mehrerer Differenzspektren zu vereinfachen, wurden alle Spektren aufeinander normiert. Zur Normierung wurde die negative Fingerprint-Bande des Chromophors im Dunkelzustand um 1237 cm^{-1} verwendet und für Meta I und Meta II Photoprodukte auf $-0,002$ OD (optische Dichte) festgelegt. In Lumi- und Batho-Spektren wurde diese Bande auf $-0,0027$ OD, in Meta I-Spektren, die mit einer Auflösung von 8 cm^{-1} aufgenommen wurden, auf $-0,0015$ OD normiert. Diese Werte ergaben sich aus den zeitaufgelösten Experimenten für Lumi bzw. Meta I im Vergleich zu auf $-0,002$ OD normiertem Meta II.

2.9 UV-vis-Spektroskopie

Bedingt durch den Retinal-Chromophor als prosthetische Gruppe können viele funktionelle Untersuchungen, aber auch qualitative und quantitative Analytik bei der Präparation von Rhodopsin und Rhodopsin-Mutanten durch UV-vis Absorptionsspektroskopie durchgeführt werden.

Die Messungen wurden an einem Perkin Elmer Lambda 17-Spektrometer durchgeführt. Die Belichtung der Proben erfolgte durch einen mit einem $>530\text{ nm}$ Farbfilter und Lichtleiter ausgestatteten Diaprojektor.

Wenn funktionelle Untersuchungen an Rhodopsin oder Rhodopsin-Mutanten vorgenommen wurden, wurden Sandwich-Proben verwendet. Sie wurden genauso angefertigt, wie entsprechende Infrarot-Proben (vgl. 2.8.3). Hierbei waren die Proben zwischen den Fenstern fixiert und sehr dicht gepackt. Außerdem ist es möglich, dass Membranvesikel in diesem Probentyp zu einem kontinuierlichen Probenfilm fusionieren. Dies könnte der Grund dafür sein, dass im Gegensatz zu einer Membransuspension mit frei schwebenden kleinen Partikeln die Streueffekte bei Sandwich-Proben gering sind. Außerdem konnten Ergebnisse von UV-vis-Messungen mit diesem Probentyp gut mit IR-Messungen verglichen werden. Eine

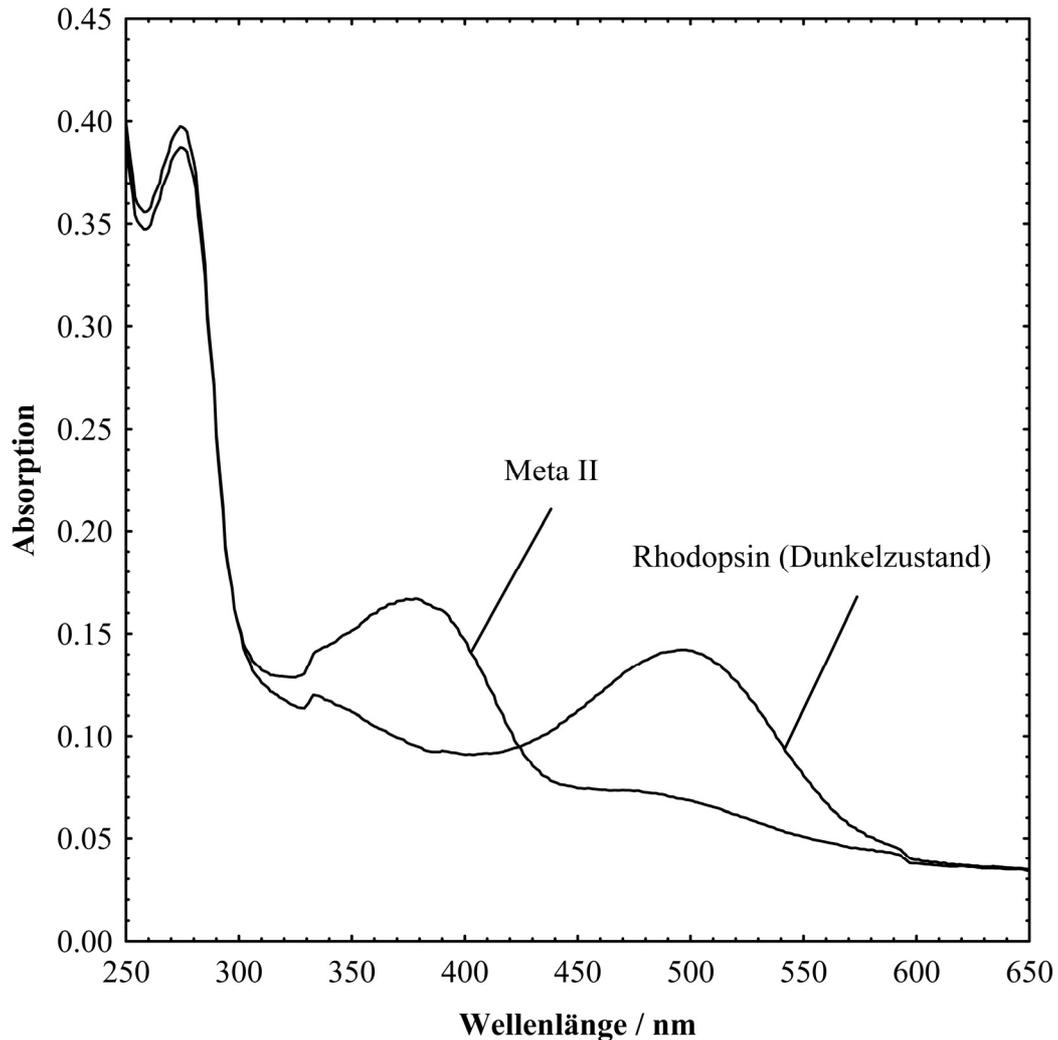


Abb. 2.4: UV-vis-Spektrum von Rhodopsin und seinem aktiven Photoprodukt Meta II in Disk-Membranen, aufgenommen in Sandwich-Proben bei 10 °C und pH 5,0. Das spezifische Absorptionsmaximum des Dunkelzustands liegt bei 500 nm, das von Meta II bei 380 nm. Zusätzlich gibt es noch ein unspezifisches Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren des Proteins bei 280 nm.

konstante Temperatur wurde hierbei durch einen thermostatisierbaren Durchlaufkühler erzielt. UV-vis-Spektren in Sandwichproben von Rhodopsin und seinem aktiven Photoprodukt Meta II mit ihren Absorptionsmaxima bei 500 nm, bzw. 380 nm sind in Abb. 2.4 dargestellt. Die Unterschiede in der Streukurve zwischen Dunkelzustand und Photoprodukt waren minimal. Konzentrationsbestimmungen wurden in einer Quarz-Mikroküvette (Hellma, Müllheim)

durchgeführt. Um hier Streueffekte zu minimieren, wurde ein Aliquot einer Membranprobe zunächst in Dodecylmaltosid (DM) solubilisiert und mit 100 mM MES-Puffer pH 6,0, der 10 mM Hydroxylamin enthielt, auf 150 μ L verdünnt. Bei gereinigten Pigmentproben in Detergens wurde soviel Detergens zugesetzt, dass die CMC bei der Verdünnung nicht

unterschritten wurde. Nach der Belichtung blich das Pigment aus, da durch die Anwesenheit von Hydroxylamin die Dissoziation des Pigments zu Retinal und dem Apoprotein Opsin gefördert wird. Beim Meta II-Zerfall freiwerdendes Retinal wird von Hydroxylamin als Retinaloxim abgefangen und steht für die Rückreaktion nicht mehr zur Verfügung. Da das Absorptionsmaximum von Retinaloxim mit 365 nm sehr weit von dem des Dunkelzustands (500 nm) entfernt ist, konnte im UV-vis Differenzspektrum das um jegliche Hintergrundabsorption bereinigte Maximum bei 500 nm für die Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Dabei wurde das Lambert-Beer-Gesetz mit einem molaren Absorptionskoeffizient von 40000 L/(mol·cm) angewendet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 FTIR-Differenzspektroskopie an Photointermediaten von Rhodopsin

Durch die Betrachtung der FTIR-Differenzspektren der Photointermediate von Rhodopsin können wertvolle Aussagen über die Struktur des jeweiligen Intermediats gemacht werden. Dabei lassen sich Aussagen aus der Intensität und Position bestimmter Banden ableiten. Zu diesem Zweck ist es wichtig zu verstehen, aus welchen Schwingungen sich die beobachteten Banden zusammensetzen.

Im Folgenden werden die wichtigsten Schwingungsmoden des Grundzustands und der Photointermediate erklärt und die Spektren in Frequenzbereiche eingeteilt, die diesen Schwingungen entsprechen. Bathorhodopsin ist das erste Photointermediat, das sich nach der Isomerisierung des Chromophors durch Tieftemperatur stabilisieren lässt (vgl. Abb. 1.5). Der Batho-Zustand ist sehr energiereich; er hat noch über 50 % der Energie des angeregten Zustands inne (Okada et al., 2001; Cooper, 1979). Dieses hohe Energieniveau lässt sich dadurch erklären, dass der Chromophor zwar bereits *all-trans* konstituiert ist, das ihn umgebende Protein allerdings mehr oder weniger in der Struktur des Grundzustands verbleibt. Somit ist der Batho-Zustand weder für das Protein noch den Chromophor energetisch besonders vorteilhaft und deshalb auch recht kurzlebig (Nanosekundenbereich). Diese Aussagen lassen sich sehr eindeutig anhand eines FTIR-Differenzspektrums von Batho zeigen (Abb. 3.1). Hier sind drei Bereiche mit vorherrschenden Photoprodukt-minus-Dunkelzustand-Banden durch einen hellen Hintergrund hervorgehoben. Diese Banden lassen sich in Batho allesamt Änderungen des Chromophors zuordnen. Da sich das Protein zwischen dem Dunkelzustand und Batho fast nicht verändert, tauchen im Batho-Differenzspektrum kaum proteinspezifische Banden auf.

Der sogenannte Fingerprint-Bereich des Chromophors zwischen 1300 und 1100 cm^{-1} enthält C-C-Streckschwingungen, die untereinander und mit C-H-Biegeschwingungen koppeln. Diese Schwingungen wurden durch Isotopenmarkierung an verschiedenen C-Atomen des Chromophors zum Teil den entsprechenden C-C-Bindungen zugeordnet (Palings et al., 1987; Ganter et al., 1988). Die stark negative Fingerprintbande des Grundzustands (bei 1237 cm^{-1}) ist in Batho besonders intensiv. Eine stark positive Fingerprintbande (bei 1200 cm^{-1}) haben nur die Photoprodukte mit einer protonierten Schiffbase (Siebert et al., 1983).

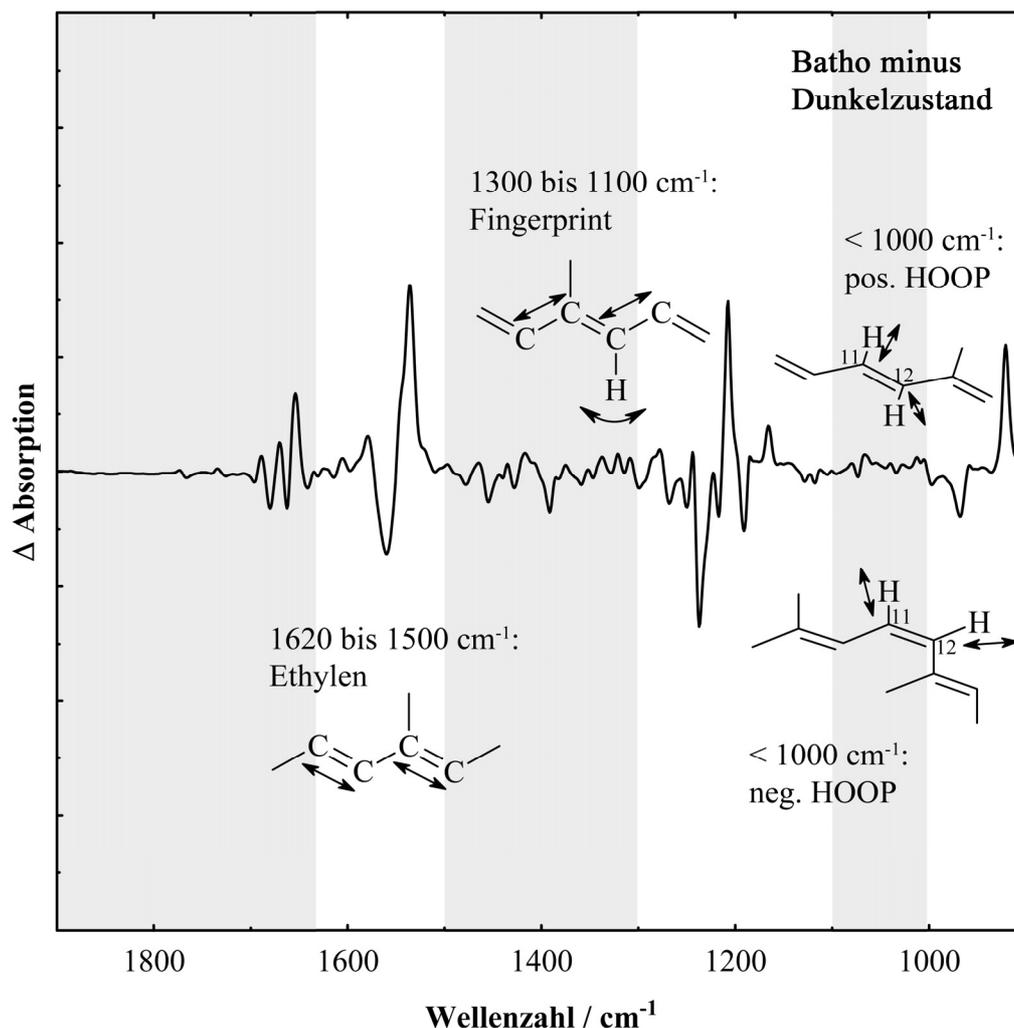


Abb. 3.1: Batho-minus-Dunkelzustand-Spektrum, aufgenommen bei $-173\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Bereiche der vorherrschenden Schwingungsmoden sind durch hellen Hintergrund hervorgehoben. Die für diese Frequenzbereiche typischen Schwingungen sind modellhaft skizziert. Dabei fällt auf, dass die auffälligsten Banden Änderungen des Chromophors zugeordnet werden können.

Die Ethylenmoden des Chromophors (delokalisierte C=C-Streckschwingung) absorbieren zwischen 1620 und 1500 cm^{-1} . Die Position dieser starken Bande ist ebenfalls stark an den Protonierungszustand der Schiffbase gekoppelt.

Unterhalb von 1000 cm^{-1} liegen die Banden der C-H-Bindungen, die aus der von der Polyenstruktur des Chromophors aufgespannten Ebene heraus schwingen. Sie werden als HOOP-Banden (*hydrogen-out-of-plane*) bezeichnet. Ihre Intensitäten sind ein Maß für die Verdrillung des Chromophors um spezifische C-C-Einfachbindungen (Fahmy et al., 1989). Im Dunkelzustand ist der 11-*cis*-Chromophor zwischen C9 und C12 des Chromophors verdrillt (vgl. Abb. 1.3), was sich im Spektrum durch eine stark negative HOOP-Bande äußert. Auch nach der Isomerisierung ist er noch stark verdrillt, weshalb im Batho-Spektrum auch eine stark positive HOOP-Bande zu sehen ist. Die Verdrillung des Chromophors dient

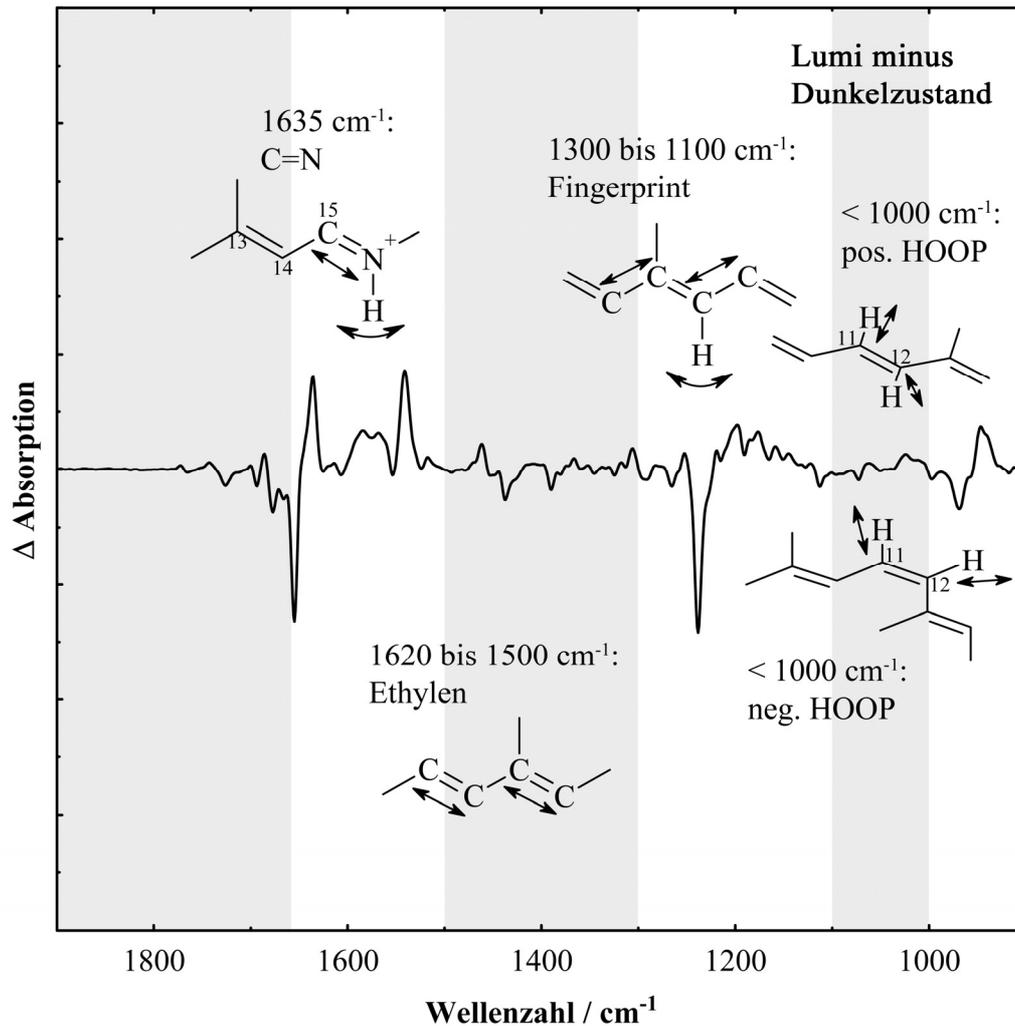


Abb. 3.2 Lumi-minus-Dunkelzustand-Spektrum, aufgenommen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ähnlich wie bei Batho sind hier hauptsächlich Schwingungsmoden des Chromophors erkennbar. Auffällig ist hier noch eine positive Bande bei 1635 cm^{-1} , die der C=N-Streckschwingung der Schiffbase in Lumi zugeschrieben wird.

als Triebfeder für die folgenden Konformationsänderungen des Proteins, die dem Chromophor letztendlich eine bequeme planare Konformation ermöglichen.

Auch im Lumi-Intermediat hat sich die Proteinkonformation gegenüber dem Grundzustand kaum verändert, allerdings weist dieses Photoprodukt eine geringere Enthalpiedifferenz gegenüber dem Dunkelzustand auf als Batho. Das scheint mit einer fortgeschrittenen Relaxation des Chromophors zusammenzuhängen. Wie bei Batho fallen auch im Lumi-minus-Dunkelzustand-Spektrum in Abb. 3.2 die großen Differenzbanden in die Frequenzbereiche für Schwingungen des Chromophors. Allerdings sind die Positionen der positiven Banden gegenüber Batho verschoben. Außerdem ist die positive HOOP-Bande in Lumi viel weniger intensiv als in Batho. Dies deutet auf eine stärker ausgeprägte Planarität des Chromophors hin.

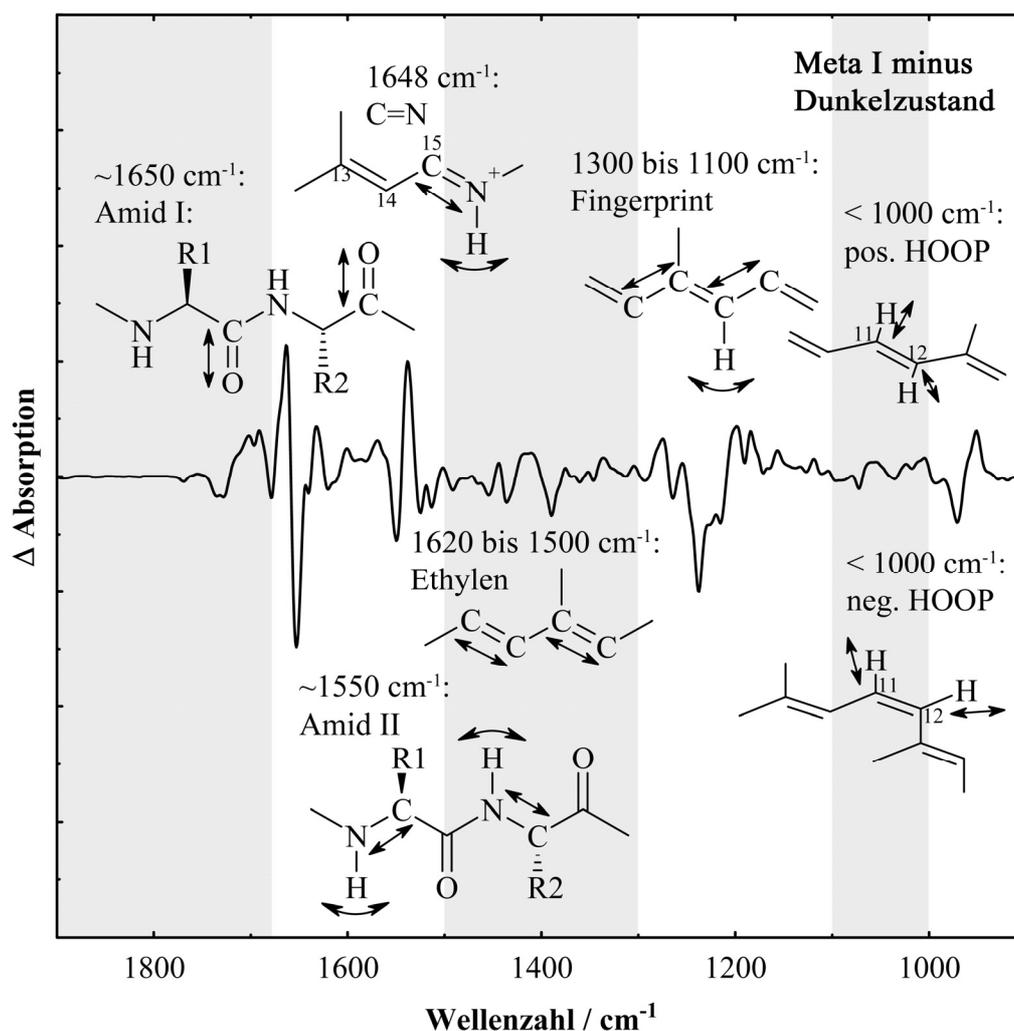


Abb. 3.3: Meta I-minus-Dunkelzustand-Spektrum, aufgenommen bei 0°C und pH 9,5. Hier zeigen sich erstmals Beiträge von Amid-Banden des Proteinrückgrats. Besonders charakteristisch ist hierbei die Amid I-Bande bei 1662 cm^{-1} .

Der Chromophor ist über eine Schiffbase mit dem Apoprotein verknüpft. Die C=N-Streckschwingungsmode konnte für das Lumi-Photoprodukt zugeordnet werden (Ganter et al., 1988). Sie befindet sich bei 1635 cm^{-1} und ist sehr charakteristisch für Lumi. Diese Schwingungs-Mode ist mit der N-H-Biegeschwingung gekoppelt und hängt deshalb stark von der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Schiffbase ab. Im Dunkelzustand liegt diese Schwingung bei 1655 cm^{-1} (Siebert et al., 1983).

Die Konformationsunterschiede des Meta I-Zustands im Vergleich zum Grundzustand äußern sich, abgesehen von chromophorspezifischen Banden, wie sie schon in Batho und Lumi beobachtet wurden, auch durch eine auffällige Protein-Bande bei 1662 cm^{-1} (Abb. 3.3). Diese Bande ist sehr breit und enthält viele Schwingungsmoden von C=O-Streckschwingungen des Proteinrückgrats. Sie wird als Amid I-Bande bezeichnet und absorbiert für gewöhnlich um

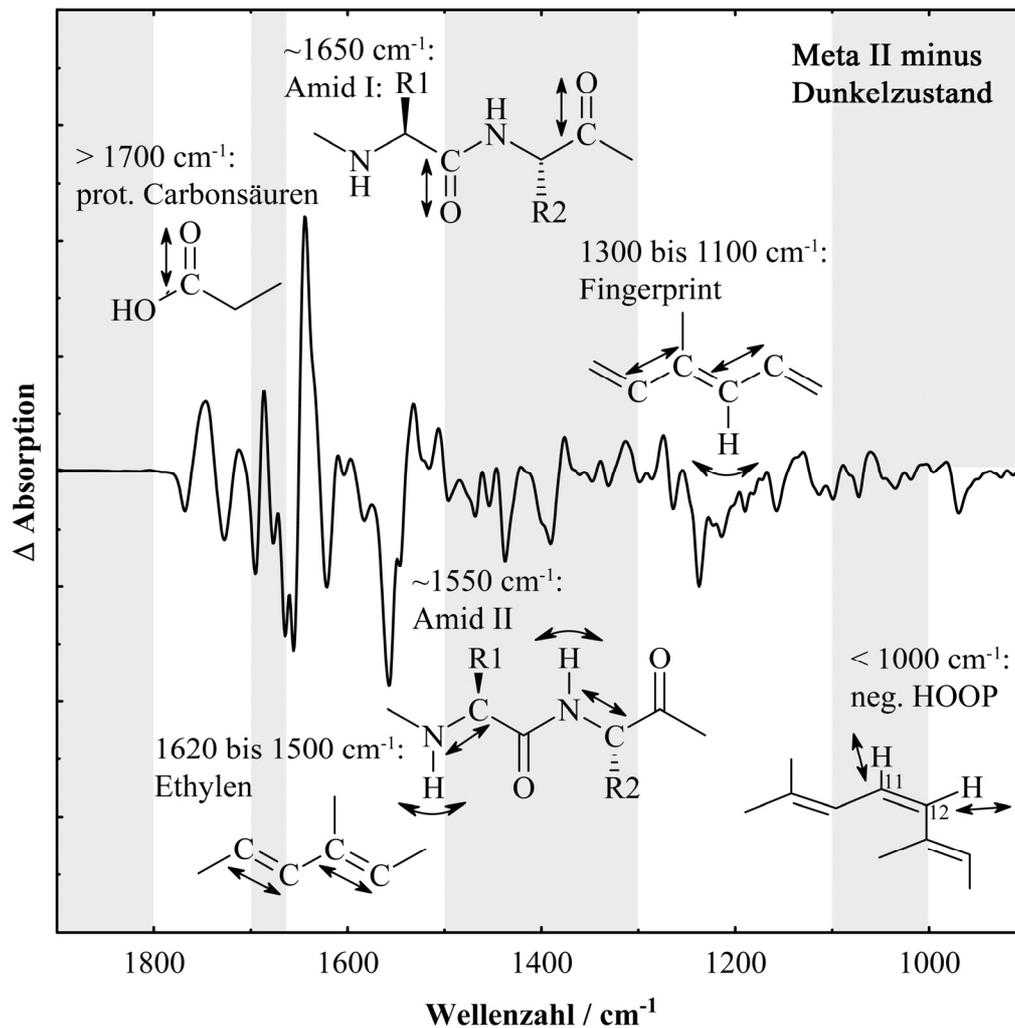


Abb. 3.4: Meta II-minus-Dunkelzustand-Spektrum, aufgenommen bei 10 °C und pH 5,0. Massive Änderungen in der Sekundärstruktur des Proteins äußern sich durch auffällige Banden im Amid I- und Amid II-Bereich. Änderungen von Wasserstoffbrücken-Bindungen mit dem Carbonyl-Sauerstoff protonierter Carbonsäuren zeigen sich als gut zuzuordnende Banden oberhalb von 1700 cm^{-1} .

1650 cm^{-1} (vgl. Abb. 2.2). Verschiebungen dieser Bande bei Konformationsänderungen können theoretisch sehr gut durch Kopplungsänderungen des Übergangsdipolmoments der einzelnen Amid-Oszillatoren beschrieben werden. Dieses von Torii und Tasumi aufgestellte Modell wird in einem Review-Artikel ausführlich beschrieben (Barth und Zscherp, 2002). Um 1550 cm^{-1} , also im selben Bereich wie die Ethylenbande (siehe oben), absorbiert auch die Amid II-Mode des Proteinrückgrats (vgl. Abb. 2.2). Sie besteht aus den kombinierten N-H-Biege- und C-N-Streckschwingungen der Peptidbindungen. Die C=N-Streckschwingung der protonierten Schiffbase liegt bei Meta I um 1648 cm^{-1} (Palings et al., 1987).

Der Meta I-Zustand ist enthalpisch (ΔH) der günstigste Zustand aller Photoprodukte (Cooper, 1981), obwohl auch dieses Photoprodukt noch eine recht ähnliche Proteinstruktur wie der

Grundzustand aufweist. Dies wurde durch Elektronen-Kristallographie an 2D-Kristallen gezeigt (Ruprecht et al., 2004).

Wie schon unter 1.3 beschrieben, befindet sich Meta I mit dem aktiven Photoprodukt Meta II in einem pH- und temperaturabhängigen Gleichgewicht. Somit lässt es sich auch bei Raumtemperatur durch hohen pH stabilisieren.

Größere Konformationsänderungen finden erst beim Übergang zu Meta II statt. Der Meta II-Zustand weist eine höhere Enthalpiedifferenz zum Grundzustand auf als der inaktive Vorgängerzustand Meta I. Dies kommt dadurch zustande, dass bei den Konformationsänderungen enthalpisch günstige intramolekulare Wechselwirkungen aufgebrochen werden. Dieser Effekt scheint aber durch den Entropiegewinn, der mit den Konformationsänderungen des Proteins und der Relaxation des Chromophors einhergeht, mehr als ausgeglichen zu werden. Da der Beitrag der Entropie (ΔS) zur freien Enthalpie (ΔG) in der Gibbs-Helmholtz-Gleichung ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) von der Temperatur abhängt, ergibt sich zwischen dem Meta I- und dem Meta II-Zustand das temperaturabhängige Gleichgewicht.

Diese starken strukturellen Änderungen können im Meta II-Differenzspektrum in Abb. 3.4 anhand von deutlichen proteinspezifischen Banden nachvollzogen werden. Das Fehlen einer positiven HOOP-Mode zeigt, dass der Chromophor im Meta II-Zustand planar und damit komplett relaxiert ist. Deutliche Amid I- und Amid II-Banden kennzeichnen das Ausmaß der Änderungen in der Sekundärstruktur des Proteins beim Übergang vom Grundzustand zum aktiven Photoprodukt.

Absorptionsänderungen von C=O-Schwingungsmoden des Proteinrückgrats (Amid I) kommen hauptsächlich durch Kopplungen der Übergangsdipolmomente zustande (siehe oben). Bei C=O-Streckschwingungsmoden von Aminosäure-Seitenketten spielt vor allem eine Rolle, wie stark ihre Kraftkonstante durch Wasserstoffbrückenbindungen zum Carbonyl-Sauerstoff beeinflusst wird. Eine Wasserstoffbrücke schwächt die Kraftkonstante der C=O-Streckschwingung und verschiebt die entsprechende Bande zu tieferen Frequenzen. Änderungen der C=O-Streckschwingung protonierter (neutraler) Carbonsäure-Seitenketten erscheinen im Bereich oberhalb von 1700 cm^{-1} . Einige der interhelicalen Wechselwirkungen, die sich bei der Rezeptoraktivierung umorientieren, werden über Carbonsäure-Seitenketten geknüpft, deren Schwingungen in diesem Bereich absorbieren. Abgesehen von wenigen Ausnahmen, wie z. B. Carbonylschwingungen von Lipidestern (Beck et al., 1998; Isele et al., 2000), absorbieren in diesem Bereich kaum Schwingungsmoden anderer Gruppen. Deshalb können hier zum Teil sehr eindeutige Zuordnungen gemacht werden. Der Bereich oberhalb von 1700 cm^{-1} ist für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen also von

besonderem Interesse: Einerseits, weil gerade Carboxylgruppen im Innern eines Proteins meistens eine besondere strukturelle oder funktionelle Bedeutung haben und andererseits, weil dieser Spektralbereich besonders anschaulich interpretiert werden kann.

C=O-Schwingungen der negativ geladenen Carboxylatgruppen absorbieren um 1400 cm^{-1} (symmetrische Streckschwingung) und 1570 cm^{-1} (asymmetrische Streckschwingung) und somit in einem komplett anderen Bereich. Diese Bereiche sind stark überlagert von Schwingungen anderer Aminosäure-Seitenketten (Barth, 2000), durch Amid II-Moden des Protein-Rückgrats und durch die starken C=C-Ethylenmoden des Retinal-Polyens. Dadurch wird eine Zuordnung der Banden in diesem Bereich erschwert, weshalb Schwingungen von Carboxylat-Gruppen kaum für die Interpretation der Spektren herangezogen werden.

Aus der Deprotonierung der Schiffbase in Meta II ergeben sich auch Konsequenzen auf die Schwingungen des Chromophors. So fehlt z. B. bei 1200 cm^{-1} eine positive Fingerprintbande, die bei den anderen Photoprodukten, die alle eine protonierte Schiffbase haben, immer noch vorhanden ist (Siebert et al., 1983). Auch vielen Schwingungen spezifischer Aminosäurereste konnten einzelne Banden bereits genau zugeordnet werden. Diese Zuordnungen werden aber in den folgenden Kapiteln gesondert an der Stelle erläutert, an welcher sie für die Interpretation der jeweiligen Ergebnisse von Bedeutung sind.

3.2 Die Rolle von Glu 181 bei der Photoaktivierung von Rhodopsin

Die Aktivierung von Rhodopsin wird zunächst von der Photoisomerisierung des Retinal-Chromophors ausgelöst. Im weiteren Verlauf der Rezeptoraktivierung folgt das Aufbrechen der Salzbrücke zwischen der protonierten Schiffbase und ihrem Gegenion Glu 113 (Sakmar et al., 1991). Nachdem die Kristallstruktur des Dunkelzustands durch eine unerwartete räumliche Nähe von Glu 181 zur protonierten Schiffbase eine besondere Funktionalität dieser Aminosäure nahegelegt hatte (Palczewski et al., 2000), wurde diese Vorstellung vor kurzem um das Modell eines Gegenionwechsels erweitert. Hierbei gibt Glu 113 die Gegenionfunktion im noch inaktiven Intermediat Meta I an Glu 181 ab (Yan et al., 2003). Hierbei sollte, ausgelöst durch eine Konformationsänderung von Loop 2 in Meta I, ein Proton von Glu 181 über ein Wassermolekül und Ser 186 auf Glu 113 übertragen werden. Strukturdaten des Meta I-Zustands deuten auf so eine Konformationsänderung von Loop 2 nicht hin (Ruprecht et al., 2004). Dennoch ist eine veränderte Orientierung von Glu 181 relativ zur Schiffbase in Meta I zu erwarten, da die E181Q-Mutation in von Yan et al. durchgeführten Experimenten einen offensichtlichen Einfluss auf den Schiffbasen-pK_a hatte. Dabei wurde der

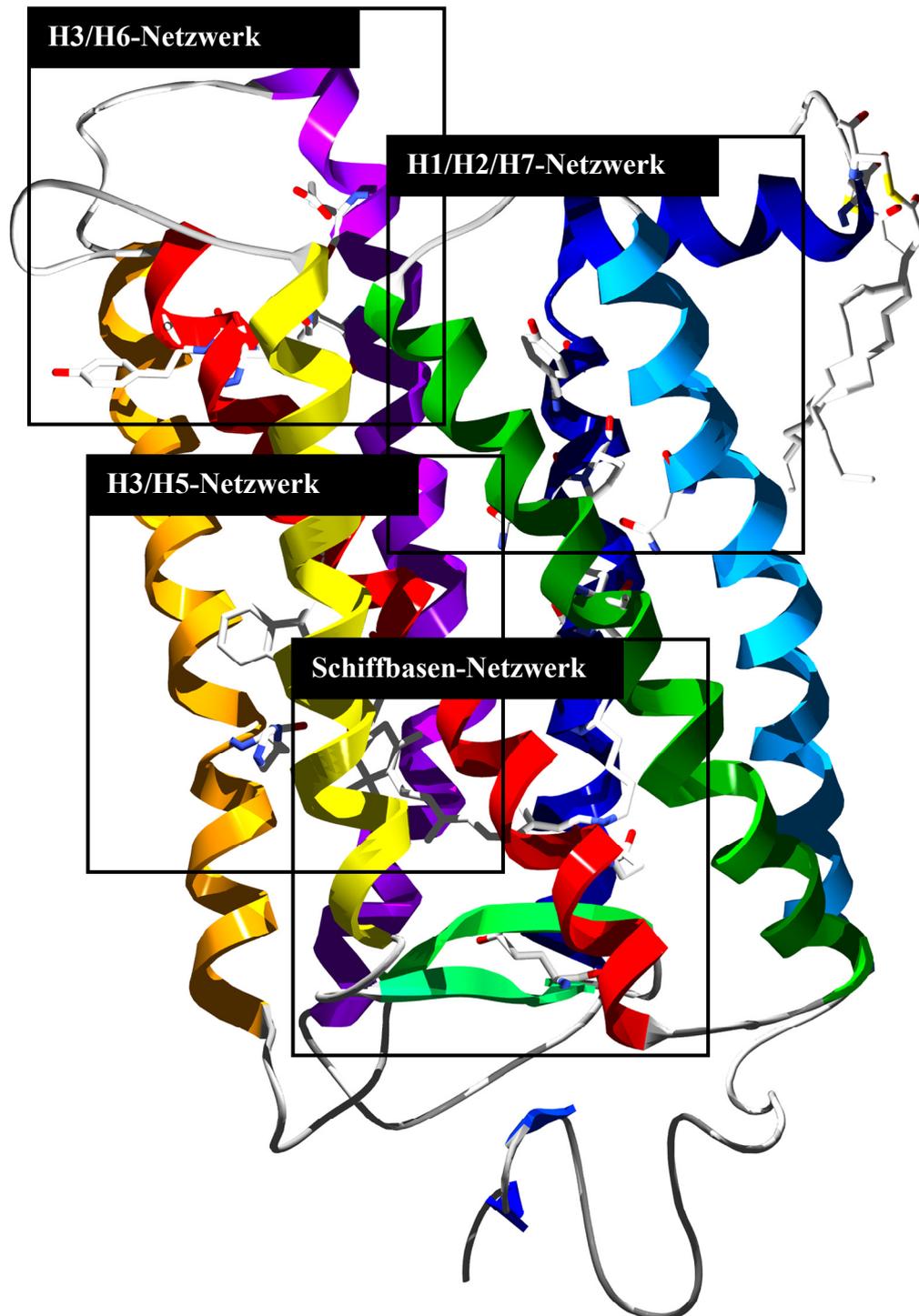


Abb. 3.5: Molekulare Modelle von Wasserstoffbrücken-Netzwerken und ihre Anordnung im Gesamtprotein. Helices sind mit „H“ bezeichnet. Eine detailliertere Ansicht der Netzwerke folgt in Abb. 3.6.

Protonierungszustand der Schiffbase in der neutralen Mutante E181Q bei verschiedenen pH-Werten mittels UV-vis-Spektroskopie bestimmt. Um den Meta I-Zustand zu stabilisieren, wurden diese Messungen im Detergens Digitonin durchgeführt. Unter diesen Bedingungen war im Gegensatz zum Wildtyp die Schiffbase in der E181Q-Mutante titrierbar. Weil der

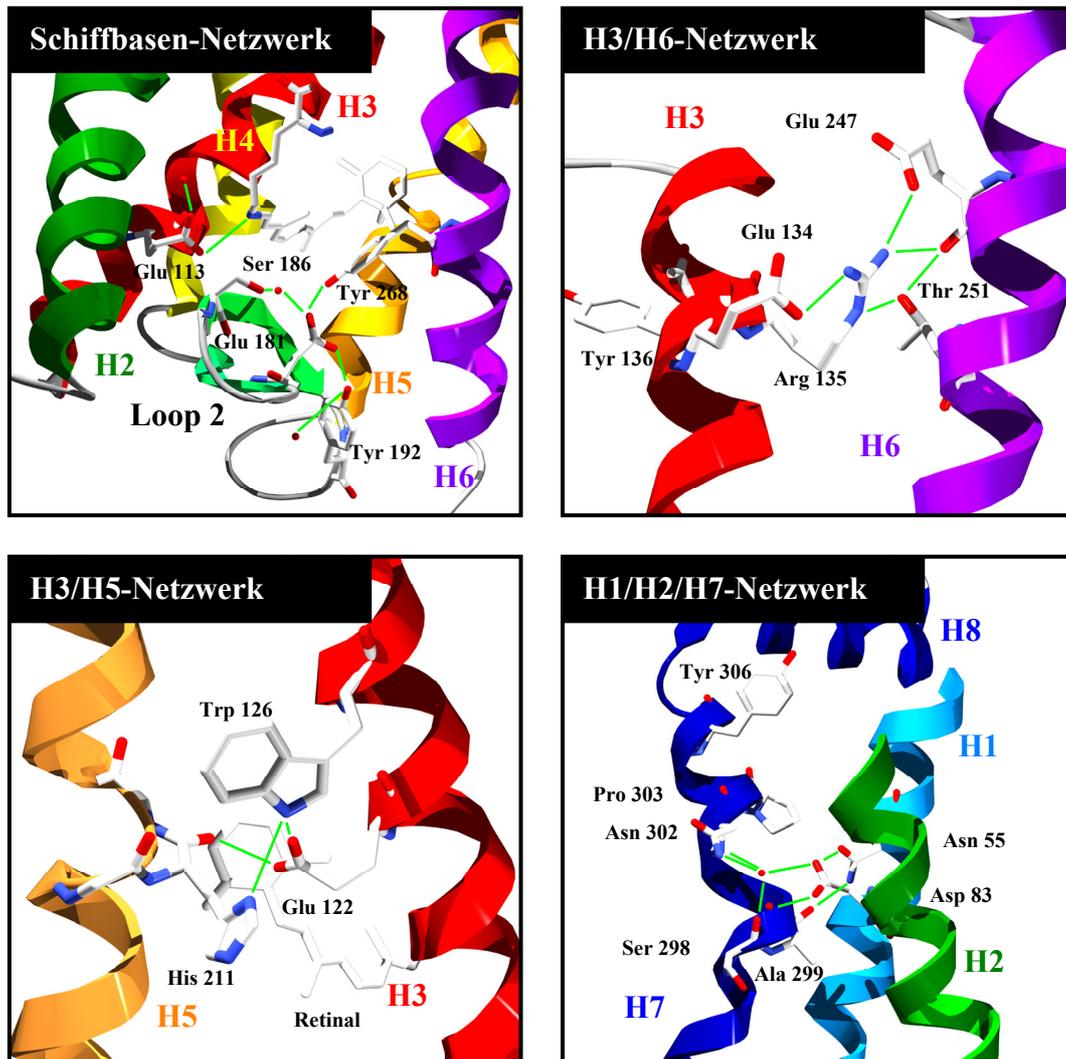


Abb. 3.6: Detaillierte Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerke in Rhodopsin. Hierbei sind Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome blau, Wassermoleküle als rote Kugeln und Wasserstoffbrückenbindungen als grüne Linien dargestellt. Helix 3 ist über Glu 134 und Arg 135 des ERY-Motivs, das mit der pH-Abhängigkeit des Meta I/Meta II-Gleichgewichts in Verbindung gebracht wird, mit Glu 247 auf Helix 6 verknüpft. Die Helices 3 und 5 stehen über Glu 122 und His 211 in Kontakt. Helix 1, 2 und 7 interagieren über Asp 83, Asn 55 und das hochkonservierte NPxxY-Motiv auf Helix 7 miteinander. Das Schiffbasen-Netzwerk beinhaltet Wasserstoffbrücken zwischen Schiffbase, Glu 113, Ser 186, einem Wassermolekül und Glu 181. Damit stellt es Wechselwirkungen zwischen Helix 3 und dem extrazellulären Loop 2 her. Dadurch wird eine Schnittstelle zwischen dem H1/H2/H7-Netzwerk und den anderen Netzwerken gebildet.

Protonierungszustand der Schiffbase üblicherweise durch das Gegenion stabilisiert wird, wurde dies als Beleg für eine Gegenionfunktionalität von Glu 181 in Meta I gewertet. Im UV-vis-Spektrum kann jedoch nicht unterschieden werden, ob es sich bei einer Änderung des Protonierungszustands um eine direkte Titration der Schiffbase handelt oder ob der Schiffbasen-pK_a durch pH-abhängige Konformationsänderungen im Protein beeinflusst wird. Daher ist die von Yan et al. beobachtete Titrierbarkeit der Schiffbase als Argument für einen Gegenionwechsel nur zulässig, wenn die Stabilisierung des Meta I-Zustands durch die

angewendeten Versuchsbedingungen (Digitonin) über den gesamten pH-Bereich gewährleistet wurde.

In derselben Arbeit zeigten Yan et al. durch Raman-Spektroskopie, dass die Mutation der Glutaminsäure zum neutralen Glutamin einen viel schwächeren Einfluss auf die HOOP-Moden des Chromophors hat, als man im Falle einer räumlich nahen negativen Ladung erwartet hätte. Diese Daten sollten indirekt belegen, dass Glu 181 im Dunkelzustand ungeladen vorliege (Yan et al., 2003). Somit käme die Gegenfunktionalität von Glu 181 dadurch zustande, indem in Meta I ein Proton von der im Dunkelzustand protonierten Glu 181 auf das bisherige Gegenion Glu 113 übertragen würde.

Eindeutiger lassen sich Protonierungsänderungen von Carboxyl-Seitenketten jedoch durch FTIR-Differenzspektroskopie nachweisen, da der spektrale Frequenzbereich zwischen 1700 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} spezifisch für die C=O-Streckschwingungen von protonierten Carboxylgruppen ist (siehe 3.1). Außerdem können bei Infrarotmessungen die Photointermediate über proteinspezifische Banden zugeordnet werden, anstatt sie ausschließlich über die Messbedingungen (z. B. Digitonin) zu definieren. Daher lag es nahe, die von Yan et al. aufgestellten Hypothesen durch FTIR-spektroskopische Experimente an Mutanten der Glu 181 zu überprüfen.

Die Mutation einer einzigen funktionellen Aminosäure kann unter Umständen enorme Konsequenzen für die Struktur der Photointermediate haben, die mit den bisher angewendeten Verfahren eventuell unerkannt geblieben sind. Dieser Aspekt bleibt in dem von Yan et al. vorgeschlagenen Modell mit dem Protonierungswechsel unberücksichtigt. Deshalb beschäftigt sich diese Arbeit auch mit dem Einfluss, den die Wechselwirkung zwischen Glu 181 und der protonierten Schiffbase auf interhelikale Netzwerke (Abb. 3.6) bei der Rhodopsin-Aktivierung ausübt und in FTIR-Differenzspektren erkannt werden kann.

Um aus einem FTIR-Differenzspektrum strukturelle Aussagen abzuleiten, werden Änderungen von Banden betrachtet, die bereits spezifischen Aminosäuren zugeordnet werden konnten. Absorptionsänderungen im Bereich protonierter Carbonsäuren lassen sich in der Regel durch Änderungen von Wasserstoffbrückenbindungen erklären (siehe 3.1), die mit dem Carbonyl-Sauerstoff protonierter Carbonsäuren geknüpft werden. Wenn diese Wechselwirkungen spezifischer Gruppen mit der Kristallstruktur des Dunkelzustands verglichen werden, können so wertvolle Informationen über die Struktur der Photoprodukte erhalten werden. In Abb. 3.5 und Abb. 3.6 werden anhand der Rhodopsin-Kristallstruktur 1GZM (Li et al., 2004) die Wasserstoffbrücken-Netzwerke dargestellt, die für die Interpretation der in dieser Arbeit gezeigten Spektren von Bedeutung sind. Dabei handelt es

sich um Wechselwirkungen zwischen den transmembranären Helices des Rezeptors (mit „H“ bezeichnet).

3.2.1 Stabilität von Mutanten der Glu 181

Zur Charakterisierung der Funktionalität von Glu 181 wurden die Dunkelzustände und späten Photointermediate der gereinigten Rhodopsin-Mutanten E181Q und E181M charakterisiert. Um physiologische Bedingungen besonders hinsichtlich des Meta I/Meta II-Gleichgewichts zu gewährleisten, wurde E181Q dafür in Phosphatidylcholin (PC) Doppelmembranen rekonstituiert (siehe Methoden).

Schon bei der Präparation der Glu 181-Mutanten wurde deutlich, dass Glu 181 einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung des Dunkelzustands zu leisten scheint. In Dodecylmaltosid (DM) konnten die meisten Mutationen von Glu 181 mit zufriedenstellenden Ausbeuten aufgereinigt werden (Yan et al., 2002). DM hat allerdings den Nachteil, dass es nicht dialysierbar ist. Während Wildtyp-Rhodopsin auch in Octylglucosid (OG) stabil ist und bei -20 °C über mehrere Monate aufbewahrt werden kann, war die E181Q-Mutante um einiges empfindlicher und musste durch sofortige Zugabe von Lipiden stabilisiert werden.

Dass Glu 181-Mutationen einen Einfluss auf die Stabilität haben, wurde auch schon früher anhand von erhöhter Hydroxylamin-Reaktivität im Dunkelzustand gezeigt (Yan et al., 2002).

Die Ursachen für diese Instabilitäten sind unklar. Am wahrscheinlichsten scheint, dass an Position 181 eine Glutaminsäure erforderlich ist, damit eine korrekte Sekundärstruktur an Loop 2 dauerhaft ausgebildet werden kann. Ist dies nicht der Fall, ist das Protein intrinsisch instabil. Möglicherweise erleichtern Mutationen der Glu 181 auch eine Dissoziation des Chromophors aus der Bindungstasche. Dies hätte die Denaturierung des Apoproteins der Glu 181-Mutante zur Folge.

Allgemein gilt, dass Proteininstabilitäten im kurzkettigen Detergens OG problematischer sind, als im langkettigen Detergens DM. Während die E181M-Mutante in DM mit hohen Ausbeuten aufgereinigt werden konnte, war sie in OG komplett instabil. Um auch E181M in PC rekonstituieren zu können, wurde versucht, das Detergens durch Adsorption an Bio-Beads (Bio-Rad, Hercules, California) zu entfernen. Da auch hier die Pigmentverluste sehr hoch waren, wurde dieser Ansatz aufgegeben und E181M in DM gemessen.

3.2.2 FTIR-Spektroskopie an Wildtyp-Rhodopsin

Abb. 3.7 (oben) und Abb. 3.8 (graue Spektren) zeigen FTIR-Differenzspektren von Wildtyp-Rhodopsin für den Übergang vom Dunkelzustand zu entweder Meta I oder Meta II. Wie

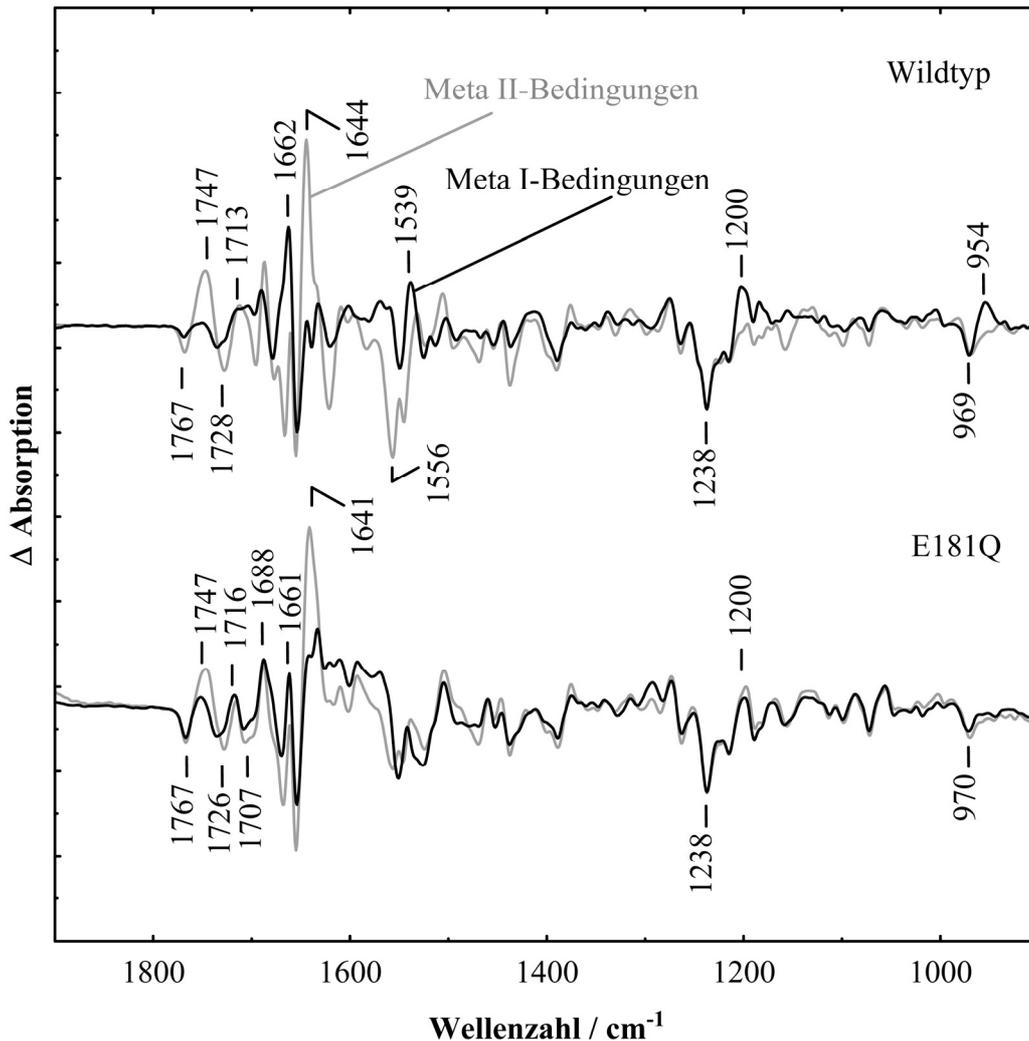


Abb. 3.7: FTIR-Untersuchungen der Meta I- und Meta II-Zustände von Wildtyp-Rhodopsin und der E181Q-Mutante. Die FTIR-Differenzspektren (Photoprodukt-Dunkelzustand) der in PC rekonstituierten Pigmente wurden unter Meta II-Bedingungen (10°C , pH 5,0, grau) und Meta I-Bedingungen (10°C , pH 9,0, schwarz) aufgenommen. Im Wildtyp ist der Übergang vom inaktiven Meta I-Zustand zum aktiven Meta II-Zustand mit großen Änderungen verbunden. Diese zeigen sich durch die Carboxylbanden von Asp 83 und Glu 122 oberhalb von 1700 cm^{-1} . Auch die durch das Protein erzwungene Verdrillung des Chromophors wird aufgehoben, was man am Verschwinden der positiven HOOP-Bande bei 954 cm^{-1} sehen kann. In der E181Q-Mutante sind diese Änderungen zum Teil schon unter Meta I-Bedingungen vorweggenommen. Offensichtlich spielt Glu 181 eine wichtige Rolle zur Stabilisierung des inaktiven Zustands in Meta I.

bereits erwähnt, geben sie sowohl Auskunft über Änderungen des Chromophors als auch Änderungen des Proteins (Siebert, 1995 und 3.1). Die Spektralbereiche unterhalb 1000 cm^{-1} beinhalten die HOOP-Schwingungen. Um 1200 cm^{-1} finden sich die Fingerprint C-C-Streckschwingungen des Retinal-Chromophors (siehe 3.1).

Amid I- und Amid II-Moden, die von überlagerten Schwingungsmoden des Proteinrückgrats herrühren, finden sich, wie unter 3.1 beschrieben, bei 1650 bzw. bei 1550 cm^{-1} . Dabei überlappt die Amid II-Bande mit der C=C-Streckschwingung des Chromophors. Der Bereich oberhalb von 1700 cm^{-1} beinhaltet die C=O-Streckschwingung protonierter (neutraler)

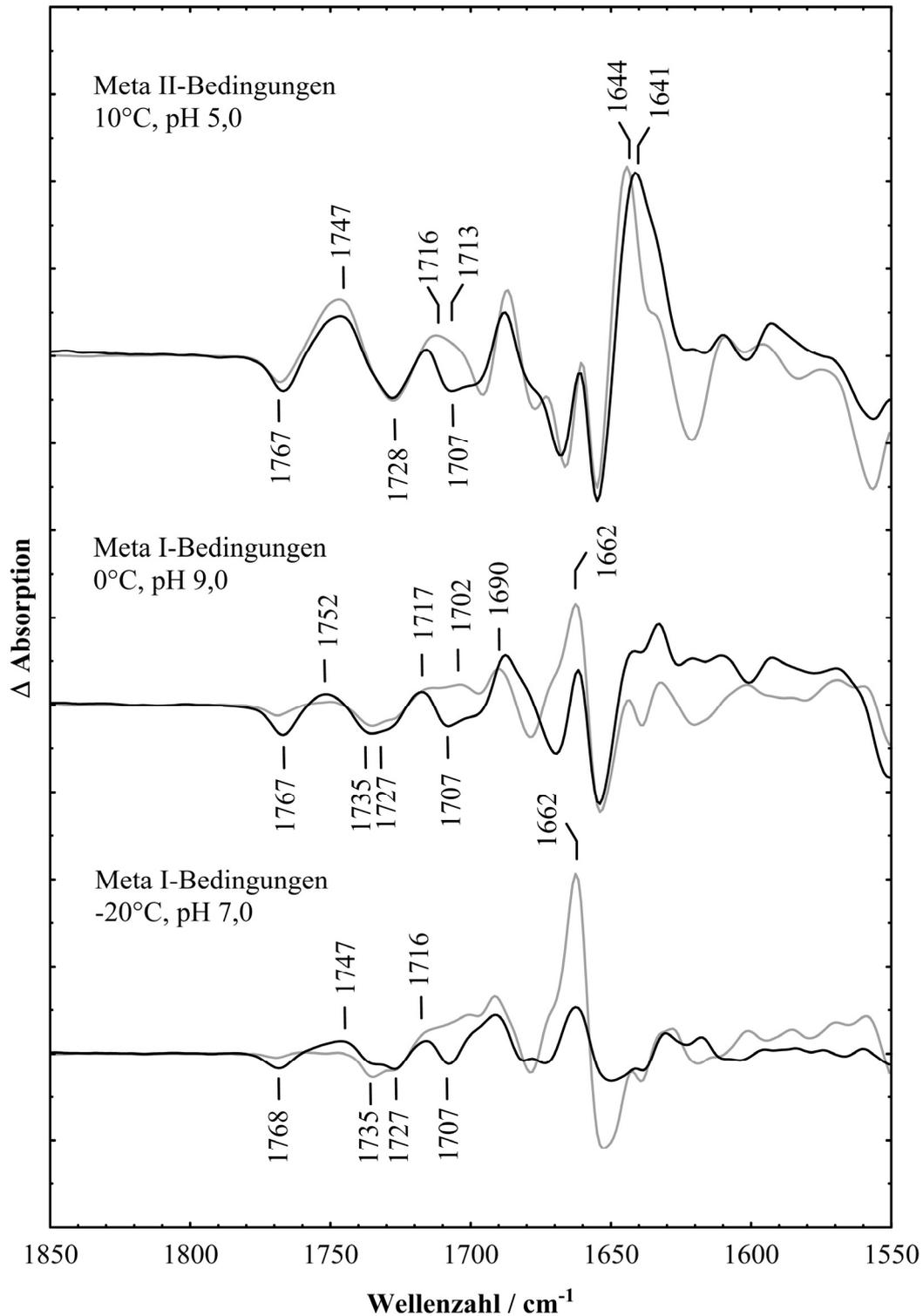


Abb. 3.8: Meta I- und Meta II-Zustände von Wildtyp-Rhodopsin und E181Q im Bereich protonierter Carbonsäuren. Die vergrößerte Darstellung der Spektren aus Abb. 3.3 erlaubt einen detaillierteren Vergleich der Absorption protonierter (neutraler) Carbonsäuren oberhalb von 1700 cm^{-1} im Wildtyp (grau) und E181Q (schwarz) unter Bedingungen, die entweder den aktiven Zustand Meta II (10°C , pH 5,0) oder Meta I durch alkalischen pH (0°C , pH 9,0) oder tiefe Temperatur (-20°C , pH 7,0) stabilisieren.

Carboxylgruppen (siehe 3.1). Die Zuordnung der Banden von protonierten Carbonsäure-Seitenketten durch gezielte Mutagenese wird dadurch vereinfacht, dass andere Protein- und Chromophorbanden in dem Bereich oberhalb von 1700 cm^{-1} fehlen. Die Bereiche, in denen die Carboxylreste absorbieren, sind hingegen zu stark von anderen Schwingungen überlagert (siehe 3.1). Daher ist es kaum möglich, einer Aminosäure mit geladener Carboxylatgruppe durch Mutation eine spezifische Bande zuzuordnen.

Eine elegante Möglichkeit, Protonierungswechsel zu untersuchen, ist das dadurch bedingte Auftauchen oder Verschwinden von Banden zu beobachten. Während dies im Bereich protonierter Carbonsäuren gut möglich ist, sind solche Absorptionsänderungen im Bereich der geladenen Carboxylreste kaum zu unterscheiden von Bandenverschiebungen, die von veränderten Wasserstoffbrückenbindungen herrühren. Deshalb wurde in dieser Studie der Schwerpunkt auf die Beobachtung der Absorptionsänderungen protonierter Carbonsäure-Seitenketten oberhalb von 1700 cm^{-1} gelegt.

Die Meta I-Differenzspektren in Abb. 3.8 (graue Spektren) zeigen eine kleine Differenzbande mit Absorptionsmaxima bei 1767 cm^{-1} für den Dunkelzustand und um 1752 cm^{-1} in Meta I, die der protonierten Asp 83 auf der transmembranären Helix 2 zugeordnet werden können (Fahmy et al., 1993; Rath et al., 1993). Asp 83 ist Teil eines Wasserstoffbrücken-Netzwerks zwischen Helices 1, 2 und 7 (Abb. 3.6). Diese positive Bande befindet sich direkt neben Banden des Dunkelzustands der protonierten Glu 122 bei 1735 cm^{-1} und 1727 cm^{-1} (Fahmy et al., 1993). Glu 122 befindet sich in der Nähe der Ringstruktur des Retinal-Chromophors auf Helix 3 und beteiligt sich sowohl an Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb von Helix 3 als auch an einer Wechselwirkung mit dem Peptid-Carbonylsauerstoff von His 211 auf Helix 5 (Abb. 3.6). In Meta I überlagert sich die Glu 122-Bande mit Amid-Moden. Dadurch entsteht eine komplexe Bande mit einem positiven Maximum bei 1702 cm^{-1} und einer Schulter bei 1717 cm^{-1} (Beck et al., 1998a). In Meta II ist die Absorption von Glu 122 beträchtlich zu höheren Wellenzahlen verschoben und bildet, zusammen mit der nach unten verschobenen Absorption von Asp 83, eine stark positive Bande bei 1747 cm^{-1} (Abb. 3.8). Diese deutlichen Verschiebungen der Schwingungsfrequenzen hängen mit den Änderungen von Wasserstoffbrücken bei der Rezeptoraktivierung zusammen.

Die positive Bande bei 1713 cm^{-1} wird der Protonierung von Glu 113 auf der transmembranären Helix 3 bei der Meta II-Bildung zugeordnet (Jäger et al., 1994). Diese Bande ist von besonderer Bedeutung, da sie die Neutralisierung des Gegenions der protonierten Schiffbase im Dunkelzustand signalisiert.

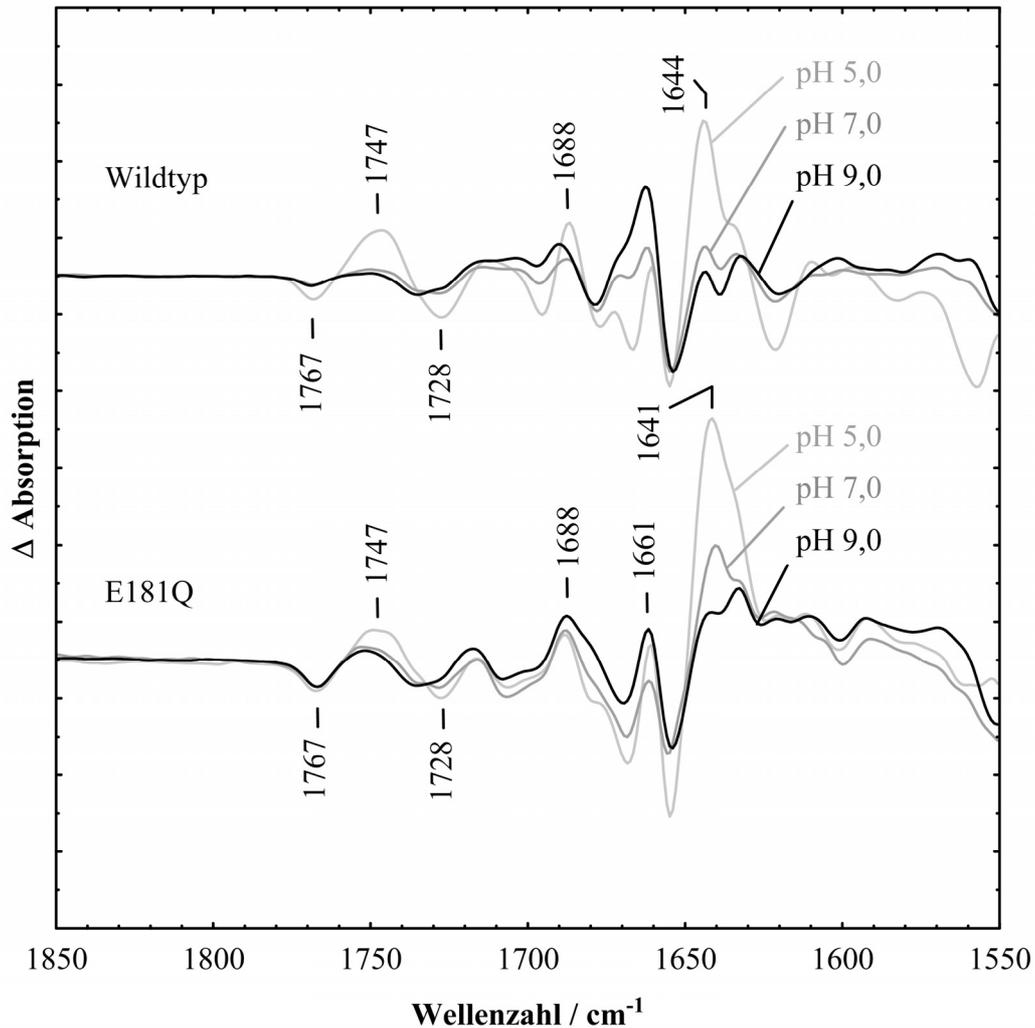


Abb. 3.9: Die pH-Abhängigkeit des Meta I/Meta II-Konformationsübergangs in Wildtyp-Rhodopsin und E181Q in PC-Doppelmembranen bei 0 °C. Die positive Meta II-Markerbande bei 1644 cm^{-1} im Amid I-Bereich kennzeichnet den Übergang von inaktivem Meta I bei alkalischem pH zu Meta II bei saurem pH. Dieser Übergang ist in E181Q verglichen zum Wildtyp nur geringfügig Richtung Meta II verschoben. Im Gegensatz dazu fällt die pH-Abhängigkeit der 1767 (+)/1728 (-) cm^{-1} -Differenzbande in E181Q mehr oder weniger weg.

Die Absorptionen der Carbonsäure-Seitenketten werden zum Teil von einer Differenzbande bei 1743 (+)/ 1724 (-) cm^{-1} überlagert. Sie gehört zum Ester-Carbonyl eines bestimmten Lipids. Bei Meta II-Bildung wird es in eine andere Umgebung eingebracht, wodurch es zu einer Bandenverschiebung kommt (Beck et al., 1998b; Isele et al., 2000).

3.2.3 FTIR-Spektroskopie an der E181Q-Mutante

Spektren der E181Q-Mutante sind in den Abb. 3.7 (unten) und Abb. 3.8 (schwarz) dargestellt. Es fällt auf, dass sich bei der E181Q-Mutante weite Teile der Spektren, die unter Meta I- bzw. Meta II-Bedingungen aufgenommen wurden, stark ähneln (Abb. 3.7). Dies gilt sowohl für proteinspezifische Banden, als auch für Fingerprintbanden bzw. HOOP-Banden des

Chromophors. Bei der E181Q-Mutante fehlt bereits im Meta I-Spektrum eine positive HOOP-Bande. HOOP-Banden erhalten ihre hohe IR-Intensität dadurch, dass Einfachbindungen in Nachbarschaft zu einer konjugierten Doppelbindung verdrillt sind und nicht mit ihr in einer Ebene liegen. Bei Wildtyp-Rhodopsin wird in Meta I eine starke positive HOOP-Bande bei 954 cm^{-1} beobachtet (Abb. 3.7, oben). Die dem C11=C12-HOOP zugeordnet worden ist (Pan und Mathies, 2001). Diese Bande fehlt in Wildtyp-Meta II, weil hier der Chromophor eine entspannte planare Orientierung einnimmt (vgl. 3.1). Die Abwesenheit der positiven HOOP-Bande in den E181Q-Spektren signalisiert also eine ausgeprägte Planarität des Chromophor-Polyens bereits unter Meta I-Bedingungen. Auch die Meta I-Markerbande bei 1662 cm^{-1} ist in der E181Q-Mutante deutlich geringer ausgeprägt als im Wildtyp (Abb. 3.8). Außerdem sind die eigentlich für Meta II typischen Intensitätsänderungen der Asp 83-Differenzbande bei $1767\text{ (-)}/1747\text{ (+)}\text{ cm}^{-1}$ (Abb. 3.8, 10 °C , pH 5,0) bei E181Q schon unter Meta I-Bedingungen deutlich erkennbar (Abb. 3.8, 0 °C , pH 9,0). Die Unterschiede zwischen den Meta I-Zuständen von Wildtyp-Rhodopsin und E181Q zeigen sich auch, wenn die Photoprodukte bei -20 °C stabilisiert werden. Das wird besonders bei Betrachtung der Asp 83 und der Amid I-Differenzbande deutlich (Abb. 3.8, -20 °C , pH 7,0). Von der Mutation sind also vor allem Banden betroffen, die empfindlich auf strukturelle Veränderungen reagieren. Daher kann man sagen, dass der Austausch der Glutaminsäure durch Glutamin an Position 181 sowohl auf die Proteinkonformation, als auch auf die Struktur des Chromophors in Meta I einen starken Einfluss hat. Dies äußert sich dann dadurch, dass bereits unter Meta I-Bedingungen viele Merkmale des Meta II-Zustands beobachtet werden.

Sowohl in den unter Meta II- als auch unter Meta I-Bedingungen aufgenommenen Spektren der E181Q-Mutante taucht eine zusätzliche negative Bande bei 1707 cm^{-1} auf. Diese negative Bande kommt, wie weiter unten begründet, von der Dunkelabsorption der C=O-Streckschwingung des neu eingeführten Glutaminrestes.

In Wildtyp-Rhodopsin ist die C14-C15-Streckschwingungsmode bei 1200 cm^{-1} nur dann vorhanden, wenn die Retinal-Schiffbase protoniert ist. Somit ist sie in Meta I stark ausgeprägt und fehlt in Meta II komplett (Abb. 3.8). Bei der E181Q-Mutante kann sowohl unter Meta I-, als auch unter Meta II-Bedingungen eine Bande bei 1200 cm^{-1} beobachtet werden, wenn auch mit verminderter Intensität (Abb. 3.7). Dies verdeutlicht, dass die Schiffbase schon in Meta I teilweise deprotoniert ist. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung zu der Studie, die einen Wechsel zu Glu 181 als Gegenion in Meta I vorgeschlagen hatte (Yan et al., 2003). Interessanterweise bleibt die Retinal-Schiffbase auch in Meta II bei E181Q unter den gewählten Bedingungen (10 °C , pH 5,0) teilweise protoniert. Bei 20 °C wird auch bei pH 6,0

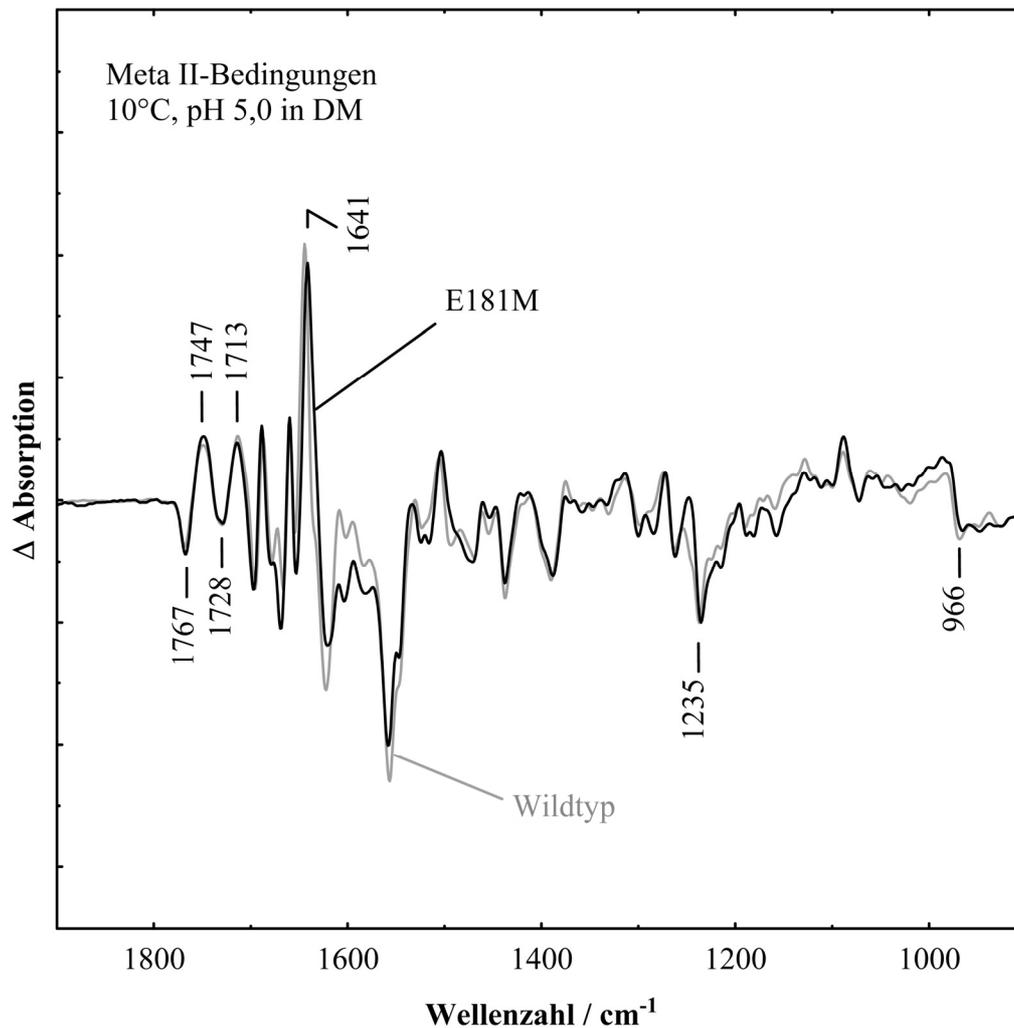


Abb. 3.10: Der Austausch der Glutaminsäure an Position 181 hat keinen Einfluss auf die spektralen Änderungen im Bereich neutraler (protonierter) Carbonsäuren während des Übergangs vom Dunkelzustand zu Meta II. E181M enthält im Gegensatz zu E181Q keine Carbonylgruppe an Position 181, die eine Bandenzuordnung im Spektralbereich oberhalb von 1700 cm^{-1} stören könnte. Bedingt durch die geringe Stabilität von E181M im dialysierbaren Detergens OG sind sowohl Wildtyp als auch E181M-Spektren im stabilisierenden Detergens DM aufgenommen.

ein Meta II-Photoprodukt gebildet. Unter diesen Bedingungen wurde in zusätzlichen Experimenten eine deprotonierte Schiffbase beobachtet (ohne Abb.). Daraus kann man schließen, dass die Schiffbase von E181Q auch in Meta II titrierbar ist, was ebenfalls mit früheren Studien übereinstimmt (Yan et al., 2003).

In Abb. 3.9 werden die Differenzspektren von Wildtyp-Rhodopsin und E181Q verglichen, die bei 0 °C und verschiedenen pH-Werten aufgenommen wurden. Die Meta II-Markerbande im Amid I-Bereich bei 1644 cm^{-1} ist sowohl in der Mutante als auch im Wildtyp pH-empfindlich. Das legt nahe, dass die Einstellung des Meta I/Meta II-Gleichgewichts auch in E181Q ein pH-Abhängigkeit aufweist und der scheinbare pK_a -Wert nur geringfügig höher ist als in Wildtyp-Rhodopsin. Im Gegensatz dazu ist die pH-Abhängigkeit anderer Banden in E181Q

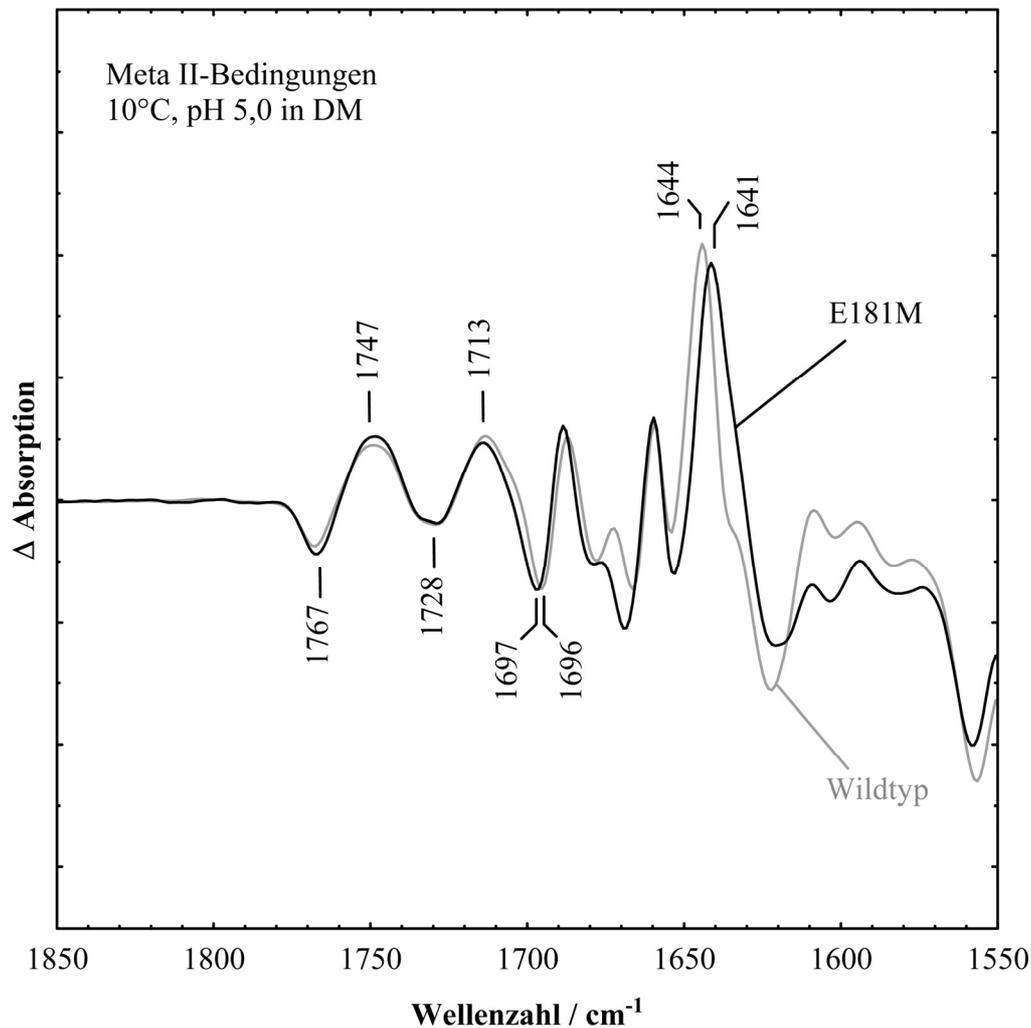


Abb. 3.11: Vergrößerte Darstellung des Spektralbereichs protonierter Carbonsäuren aus Abb. 3.10. Der Bereich oberhalb 1700 cm^{-1} scheint bei E181M nahezu identisch mit dem unter denselben Bedingungen aufgenommenen Spektrum von Wildtyp-Rhodopsin zu sein. Daher erscheint ein Protonierungswechsel zwischen Dunkelzustand und Meta II beim Wildtyp unwahrscheinlich. Außerdem wird nun eine Zuordnung spektraler Eigenschaften aus Abb. 3.3 und Abb. 3.4 möglich.

gegenüber dem Wildtyp deutlich verringert (z. B. die der Meta I-Amidbande bei 1662 cm^{-1} und der Asp 83-Bande bei $1767 (+)/1728 (-)\text{ cm}^{-1}$).

3.2.4 Experimente zur Bandenzuordnung

Zur eindeutigeren Zuordnung von Banden wurde die E181M-Mutante verwendet. Diese Mutante trägt im Gegensatz zu E181Q keine Carbonylfunktion an Position 181, die das Bandenmuster oberhalb von 1700 cm^{-1} stören könnte und stellt von seinen sterischen Eigenschaften noch eine akzeptable Annäherung an die native Glutaminsäure dar. In Meta II-minus-Dunkelzustand-Differenzspektren von E181M in DM (Abb. 3.10) sind geringe Verschiebungen der HOOP-Mode bei 966 cm^{-1} und der Fingerprint-Mode bei 1235 cm^{-1}

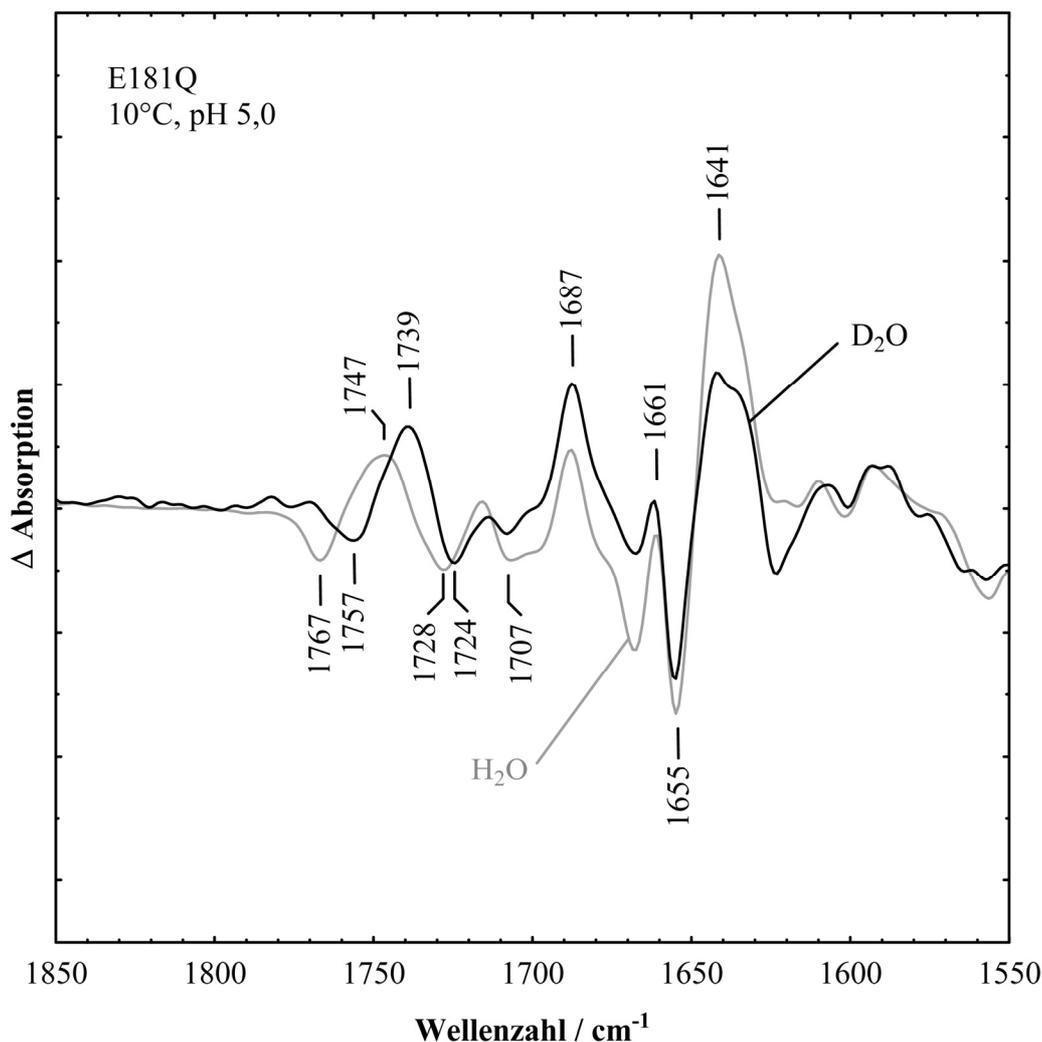


Abb. 3.12: E181Q unter Meta II-Bedingungen, jeweils in H₂O-Puffer (grau) und D₂O-Puffer (schwarz). Durch die größere Masse der zur Schwingungsmode beitragenden Atome ist die Carbonyl-Streckschwingung der COOD-Gruppe gegenüber der entsprechenden COOH-Gruppe zu tieferen Wellenzahlen verschoben, wie für die Verschiebungen der Differenzbanden von Asp 83 und Glu 122 bei 1767 (-)/1747 (+)/1728 (-) cm^{-1} deutlich wird. Bei Amidgruppen ist der H/D-Austausch weitaus geringer ausgeprägt als bei Carbonsäuren. Daher bleiben die Positionen der Carbonyl-Streckschwingungen der Amidgruppen in der Regel erhalten. Dies ist auch für die Bande bei 1707 cm^{-1} der Fall.

erkennbar. Im Spektralbereich protonierter Carbonsäuren stimmen die Spektren von E181M und Wildtyp sehr gut überein (Abb. 3.10 und Abb. 3.11). Die Amplituden der Asp 83-Differenzbande sind leicht unterschiedlich, ebenso die niederfrequente Flanke der 1713 cm^{-1} -Bande von Glu 113. Diese Unterschiede sind allerdings sehr klein. Sie hängen wahrscheinlich mit der Verschiebung einer noch nicht zugeordneten Bande bei 1697 cm^{-1} zusammen.

Die große Übereinstimmung zwischen E181M- und Wildtyp-Spektren erlaubt eine detailliertere Analyse der E181Q-Spektren. In jedem E181Q-Spektrum taucht eine Bande bei 1707 cm^{-1} auf, die das Muster der Carbonsäurebanden überlagert. Weil diese Bande im E181M-Spektrum fehlt, kann man sie der Carbonyl-Streckschwingung des Glutamins im

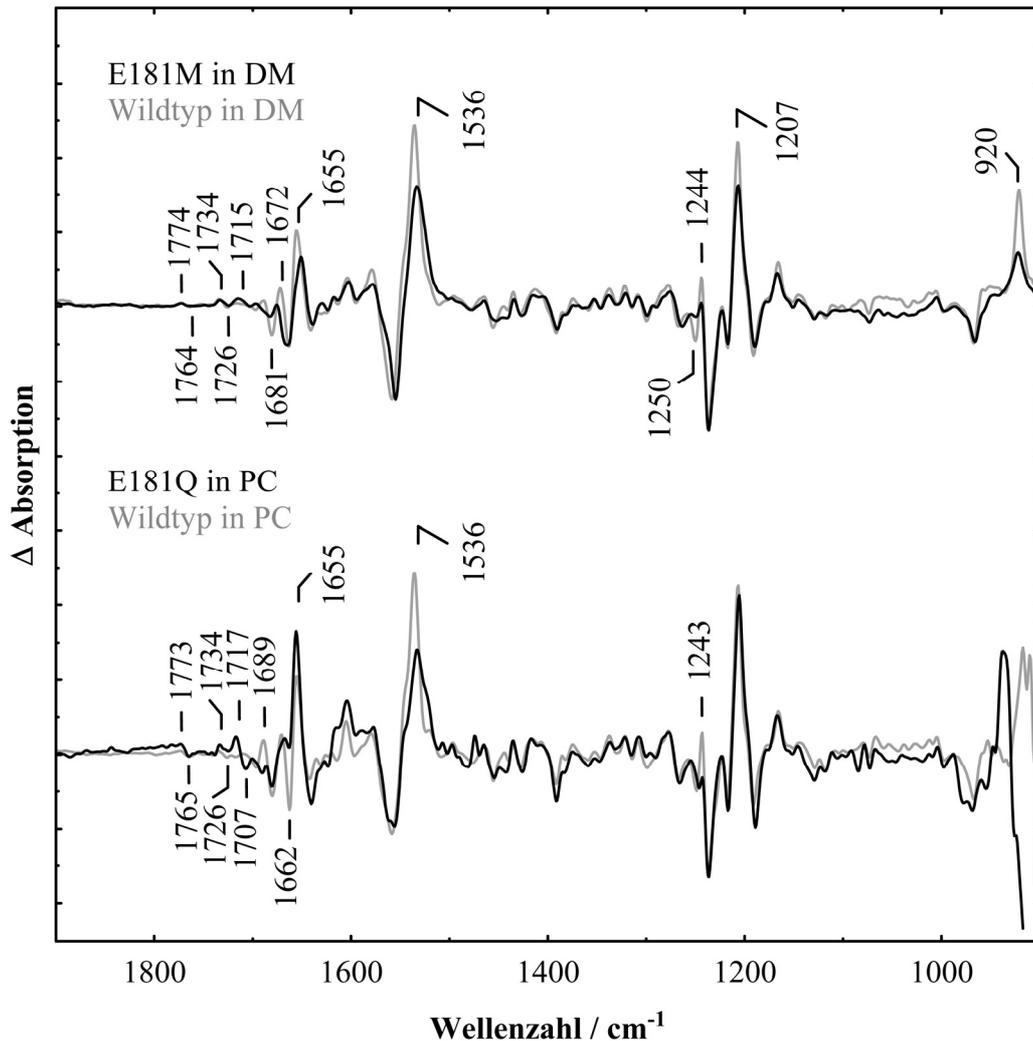


Abb. 3.13: Batho-Differenzspektren von Glu 181-Mutanten (schwarz) und Wildtyp-Rhodopsin (grau). Alle Spektren wurden bei 104 K und pH 7,0 aufgenommen. E181M und das entsprechende Wildtyp-Kontrollspektrum waren DM-Filmproben. E181Q und das dazugehörige Wildtypspektrum waren Sandwichproben der entsprechenden Pigmente in PC-Doppelmembranen. Unterschiede zwischen den Batho-Spektren von E181M und Wildtyp sind marginal und hauptsächlich durch Intensitätsunterschiede der Chromophorbanden bestimmt. Bei E181Q fällt vor allem eine zusätzlich Differenzbande bei 1717 (+)/1707 (-) cm^{-1} auf. Eine detailliertere Darstellung des betreffenden Bereichs folgt in Abb. 3.14.

Dunkelzustand von E181Q zuordnen. Die Bande ist auch unempfindlich gegenüber H/D-Austausch (siehe Abb. 3.12), was ebenfalls gegen eine Carboxylgruppe und für eine Amidgruppe spricht. Dennoch ist 1707 cm^{-1} eine ungewöhnlich hohe Frequenz für ein Amid-C=O (Barth, 2000). Eine derart große Kraftkonstante könnte durch das Fehlen von Wasserstoffbrücken-Bindungen zur Carbonylgruppe erklärt werden. Diese schwächen üblicherweise die C=O-Bindung ab und verschieben die entsprechende Bande zu niedrigeren Wellenzahlen. Eine ähnlich hohe Frequenz (1704 cm^{-1}) für ein Amid-C=O wie die hier beobachtete war schon einmal für Asn 96 in D96N-Mutanten von Bacteriorhodopsin beobachtet worden (Gerwert et al., 1989). In Meta I und Meta II ist die mutmaßliche Gln 181-

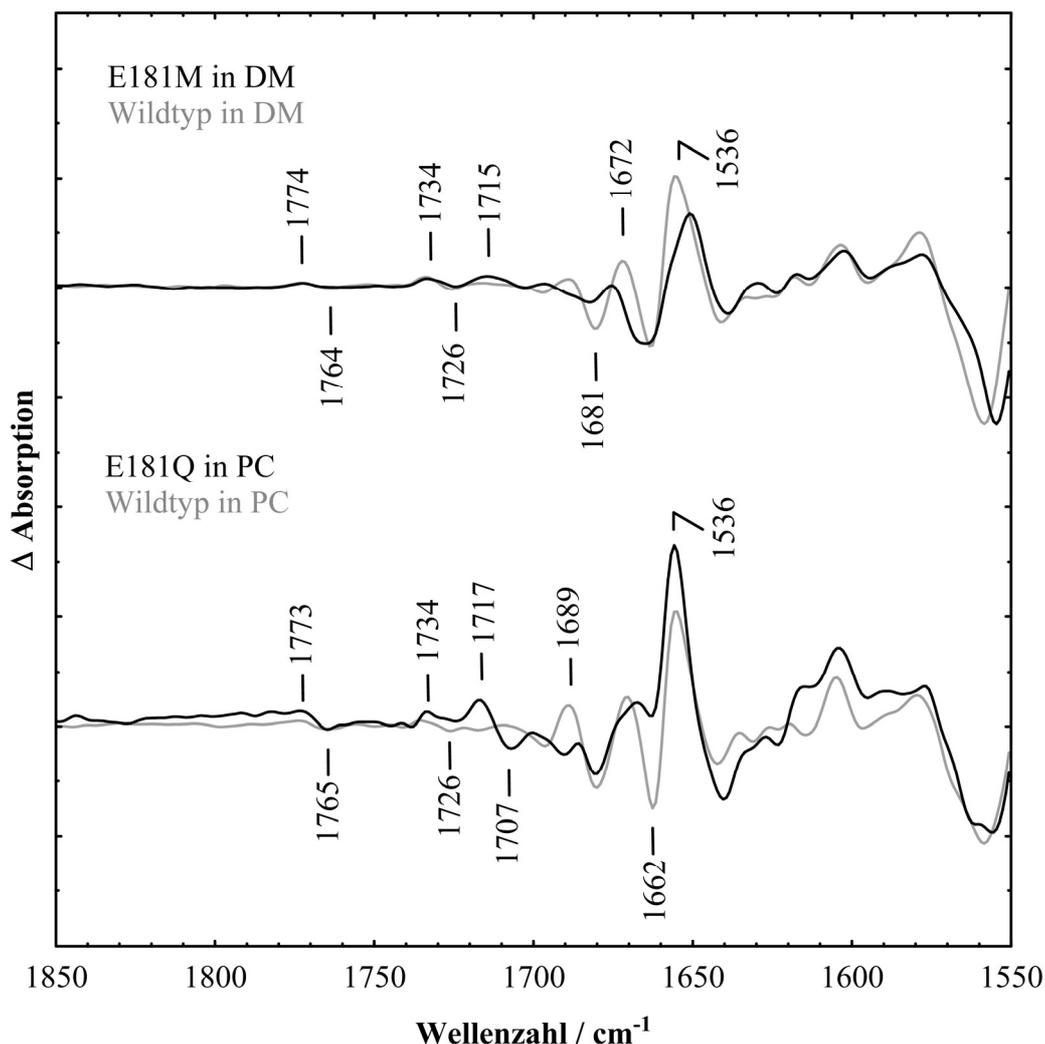


Abb. 3.14: Änderungen im Bereich protonierter Carbonsäuren beschränken sich bei Batho-Differenzspektren von Wildtyp und E181M auf die sehr kleinen Differenzbanden von Asp 83 bei 1774 (+)/1764 (-) cm^{-1} und von Glu 122 bei 1734(+)/1726(-). Zusätzlich erscheint beim E181Q-Differenzspektrum die Differenzbande der Amidcarbonyl-Streckschwingung von Gln 181 bei 1717 (+)/1707 (-) cm^{-1} .

Bande wahrscheinlich zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben, was für eine stärkere Koordinierung durch Wasserstoffbrücken spräche. In Meta II könnte die C=O-Schwingung einer Bande bei 1695 cm^{-1} zugeordnet werden, die im Wildtyp fehlt (Abb. 3.8), aber unempfindlich gegenüber H/D-Austausch ist (Abb. 3.12). In Meta I scheint sie sogar bis zu 1686 cm^{-1} nach unten verschoben zu sein (Abb. 3.8). Beides wären übliche Bandenpositionen für Amid-Carbonylstreckschwingungen.

In Batho gelingt die Zuordnung eindeutig, da der fragliche Bereich nicht durch andere Banden überlagert wird. Die meisten spektralen Änderungen im Übergang vom Dunkelzustand nach Batho sind von der *cis*-/*trans*-Isomerisierung des Retinal-Chromophors geprägt. Dementsprechend beschränken sich die Unterschiede zwischen den Batho-Differenzspektren

von E181M und Wildtyp-Rhodopsin (Abb. 3.13) hauptsächlich auf Intensitätsunterschiede der Chromophorbanden (1536, 1207, 920 cm^{-1}). Da Änderungen in den interhelicalen Wasserstoffbrücken-Netzwerken in Batho nicht zu erwarten sind, beobachtet man im Bereich protonierter Carbonsäuren oberhalb von 1700 cm^{-1} bei Wildtyp und E181M lediglich vergleichsweise schwache Differenzbanden von Asp 83 bei 1774 (+)/1768 (-) cm^{-1} und von Glu 122 bei 1735 (+)/1726 (-) cm^{-1} (Abb. 3.13 und Abb. 3.14, Nagata et al., 1998). Zusätzlich dazu erscheint im Batho-Spektrum von E181Q im Bereich oberhalb von 1700 cm^{-1} eine deutliche Differenzbande. Sie setzt sich aus der auch in den anderen Spektren aufgetauchten Bande bei 1707 cm^{-1} für den Dunkelzustand und einer Batho-Bande bei 1717 cm^{-1} zusammen. Da diese Bande sowohl im Wildtyp- als auch im E181M-Spektrum fehlt, handelt es sich dabei offensichtlich um die C=O-Streckschwingungsdifferenzbande des Amid-Carbonyls von Gln 181, obwohl vor allem die Photoprodukt-Bande in einem für Amid-Banden extrem hohen Frequenzbereich liegt (siehe oben). Dass die Intensität dieser Bande im Gegensatz zu den Banden von Asp 83 und Glu 122 sehr stark ist, lässt sich durch die extreme räumliche Nähe der Position 181 zu der isomerisierenden Doppelbindung zwischen C11 und C12 des Chromophors erklären (Abb. 3.6). Yan et al. hatten postuliert, dass die Glu 181 im Dunkelzustand und in Batho protoniert wäre (Yan et al., 2003). Dann würde man aber eine ähnlich starke Absorptionsänderung wie für Gln 181 auch für eine protonierte Glu 181 im Batho-Spektrum des Wildtyps erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall. Somit wird diese Möglichkeit durch die Messungen unter Batho-Bedingungen ausgeschlossen.

3.2.5 Diskussion

Gemäß der hochaufgelösten Röntgen-Kristallstruktur des Rhodopsin-Dunkelzustands (Palczewski et al., 2000), befindet sich Glu 181 in räumlicher Nähe zu C11 und C12 des Retinal-Chromophors und ist den Sehpigmenten der Wirbeltiere konserviert. Das rot-empfindliche Zäpfchenpigment ist dabei eine bemerkenswerte Ausnahme, bei der der Carboxylat-Rest durch ein Histidin ersetzt ist, das eine Bindungsstelle für Chlorid darstellt. Dieses ist für die spektrale Feineinstellung des Pigments in den längerwelligen Bereich zuständig (Terakita et al., 2004; Terakita et al., 2000).

Wenn man Glu 181 in Rhodopsin durch Glutamin ersetzt, wird dadurch das Meta I-Photoprodukt stark beeinflusst und hat eine titrierbare Schiffbase. Dies legt nahe, dass Glu 181 im Meta I-Zustand des Wildtyps deprotoniert vorliegt. Dadurch könnte Glu 181 in Meta I das Gegenion zur protonierten Schiffbase darstellen oder zumindest den Hauptbeitrag zu einem komplexen Gegenion aus Glu 181 und Glu 113 leisten. In dieser Studie konnte

gezeigt werden, dass der Ersatz von Glu 181 durch Glutamin eine ionische Wechselwirkung aufbricht, die im Wildtyp zur Stabilisierung der Meta I-Konformation benötigt wird. Das hat zur Folge, dass in der E181Q-Mutante einige Veränderungen, die im Wildtyp nur beim Übergang zu Meta II auftauchen, schon im Meta I-Zustand vorweggenommen werden. Diese Effekte treffen auf bestimmte konformative Merkmale zu und sind auf funktionelle Mikrodomänen im Rezeptor beschränkt. Zum Beispiel sind die Absorptionsänderungen der Asp 83 auf Helix 2, die sich an einem Wasserstoffbrücken-Netzwerk mit Asn 55 auf Helix 1 und Asn 302 vom NPxxY-Motiv auf Helix 7 beteiligt (Abb. 3.6), bereits mit denen in Meta II vergleichbar.

In anderen Bereichen des Proteins ist der Einfluss der Mutation weitaus geringer. Die pH-Abhängigkeit des Meta I/Meta II-Gleichgewichts bleibt in der E181Q-Mutante erhalten, was man an der charakteristischen Amid-Bande bei 1644 cm^{-1} erkennen kann (Abb. 3.9). Die typische Absorptionsverschiebung von Glu 122 beim Übergang von Meta I zu Meta II ist sowohl im Wildtyp als auch bei E181Q vorhanden. Daraus folgt, dass in Wildtyp-Rhodopsin die Region um die protonierte Schiffbase und das mit ihr verknüpfte Wasserstoffbrücken-Netzwerk (Abb. 3.6) eine Schnittstelle darstellt, die die Konformationsänderungen in einem Teil des Proteins mit dem eines anderen verbindet. Insbesondere scheint das Schiffbasen-Netzwerk das H1/H2/H7-Netzwerk an das protonierungssensitive H3/H6-Netzwerk zu koppeln. Wenn der Salzbrücke aus protonierter Schiffbase und dem Protein-Gegenion aufgebrochen wird, erhöht sich die Planarität des Chromophors und erlaubt dem H1/H2/H7-Netzwerk, sich unabhängig von anderen Netzwerken umzuordnen.

Protonierungszustände von Glu 181, Glu 113 und der Schiffbase

Um ein einheitliches Bild von den Veränderungen zwischen dem Dunkelzustand und den Photoprodukten zu erhalten, ist es wichtig, den beteiligten funktionellen Gruppen Protonierungszustände zuzuordnen. In einen Gegenionwechsel sind beim Übergang von Meta I nach Meta II Glu 113, Glu 181 und die Retinal-Schiffbase involviert. Die Schiffbase ist im Dunkelzustand protoniert und bleibt es bis zum Übergang nach Meta II. Glu 113, das Gegenion zur protonierten Schiffbase im Dunkelzustand (Sakmar et al., 1989), wird in Meta II protoniert und ist damit im Meta II-Photoprodukt neutral (Jäger et al., 1994). Eine protonierte Glu 181 im Dunkelzustand oder ein Protonierungswechsel zu Glu 113 in Meta I (Yan et al., 2003) kann ausgeschlossen werden. Weder Meta I-Spektren der D83N/E122Q-Doppelmutante (Beck, 1998; Lüdeke et al., 2005), noch der E122Q-Mutante (Beck et al., 1998a) weisen eine Absorptionsänderung auf, die darauf hindeutet. In diesen Spektren kann der Bereich protonierter Carbonsäuren oberhalb von 1700 cm^{-1} besonders gut ausgewertet

werden, weil hier störende Banden im fraglichen Bereich durch die Mutation eliminiert sind. Zwar ist es natürlich immer möglich, dass eine Mutation so stark die Funktionalität des Proteins stört, dass keine Aussagen mehr über andere, nicht mutierte Gruppen getroffen werden können. Dies ist in diesem Fall aber unwahrscheinlich, da es noch andere Hinweise gegen eine protonierte Glu 181 im Dunkelzustand gibt. In Batho sollte, bedingt durch die räumliche Nähe zum Chromophor, die Position 181 besonders empfindlich auf strukturelle Veränderungen reagieren, wie durch die vergleichsweise starke Differenzbande bei $1717 (+)/1707 (-) \text{ cm}^{-1}$ von Gln 181 im Batho-Spektrum von E181Q deutlich wird. Darüber hinaus gibt es dort im Bereich protonierter Carbonsäuren beim Wildtyp und E181M keine Absorptionsänderung, die ein vergleichbares Ausmaß hätte (Abb. 3.13 und Abb. 3.14). Außerdem weist das Meta II-Spektrum der E181M-Mutante keine Abweichungen zum Wildtypspektrum auf, die mit dem Fehlen einer Bande für eine protonierte Glu 181 in Verbindung gebracht werden könnten (Abb. 3.10 und Abb. 3.11). Allerdings kann einer geladenen Glu 181 keine Bande zugeordnet werden, da Carboxylat-C=O-Schwingungen in einem Bereich absorbieren, in dem sich viele Banden überlagern.

Eine eingehendere Untersuchung des Protonierungszustands von Glu 113 in E181Q wird erst durch die Zuordnung der negativen Bande bei 1707 cm^{-1} zur Amidcarbonyl-Streckschwingung von Gln 181 möglich. Es ist davon auszugehen, dass Glu 113 in E181Q unter Meta II-Bedingungen protoniert (neutral) ist. Die protonierte Glu 113 absorbiert im Meta II-Differenzspektrum bei 1713 cm^{-1} , wobei in der E181Q-Mutante die niederfrequente Flanke von der negativen Gln 181-Bande überlagert ist. Dadurch wird ein Bandenmuster wie in Abb. 3.7 und Abb. 3.4 erzeugt. Zunächst sieht dieses Bandenmuster unter Meta I-Bedingungen (Abb. 3.7) sehr ähnlich aus, was zu der Schlussfolgerung führen könnte, dass Glu 113 in dieser Mutante schon unter Meta I-Bedingungen protoniert wird. Dies stünde in krassem Gegensatz zum Wildtyp, wo Glu 113 erst beim Übergang von Meta I nach Meta II protoniert wird. Aus den E181Q-Spektren wird indes bei genauerem Hinsehen deutlich, dass die positive Bande bei 1747 cm^{-1} unter Meta I-Bedingungen viel kleiner als unter Meta II-Bedingungen ist, während die negative Asp 83-Bande bei 1767 cm^{-1} jeweils ungefähr die gleiche Amplitude aufweist (Abb. 3.7). Das bedeutet, dass die positive Bande bei 1747 cm^{-1} , die sich unter Meta II-Bedingungen wie bei Wildtyp-Rhodopsin aus Asp 83- und Glu 122-Banden zusammensetzt, unter Meta I-Bedingungen wahrscheinlich nur aus Asp 83-Beiträgen besteht. Die Glu 122-Bande ist wahrscheinlich ähnlich wie beim Wildtyp zu tieferen Wellenzahlen verschoben, was dadurch unterstützt wird, dass sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante die negativen Banden ein ähnliches Muster aufweisen (Abb. 3.7). Unter

Meta I-Bedingungen setzt sich das Bandenmuster bei 1716 (+)/1707 (-) cm^{-1} also aus der positiven Absorption von Glu 122 und der negativen Absorption von Gln 181 zusammen. Eine große zusätzliche Absorptionsbande in diesem Bereich, bedingt durch Protonierung von Glu 113 in Meta I, ist recht unwahrscheinlich. Diesbezüglich muss noch einmal darauf hingewiesen werden, dass Asp 83 und Glu 122 an komplett unterschiedlichen interhelicalen Netzwerken beteiligt sind und zwar im H1/H2/H7-Netzwerk auf der einen Seite des Rezeptors und dem H3/H5-Netzwerk auf der anderen (Abb. 3.1 und Abb. 3.6; Li et al., 2004; Sakmar et al., 2002; Beck et al., 1998a). Es ist daher naheliegend, dass jedes dieser Netzwerke unabhängig auf den Ersatz von Glutaminsäure durch Glutamin an Position 181 reagiert.

Das Gegenionwechsel-Modell

Im Dunkelzustand ist Glu 181 ca. 7 Å von der protonierten Schiffbase entfernt. Für eine effiziente Wechselwirkung in Meta I müsste dieser Abstand dort erheblich verkürzt werden. Die frühere Annahme, dass dies durch eine Konformationsänderung des extrazellulären Loops 2 und der Transmembranären Helix 3 erfolgen könnte (Yan et al., 2003), wurde durch Meta I-Strukturdaten mittlerer Auflösung nicht bestätigt (Ruprecht et al., 2004). Stattdessen wurde ein anderes Szenario vorgeschlagen, in welchem die Isomerisierung des Chromophors Glu 181 aus seiner Wechselwirkung mit Tyr 268 entlässt (Abb. 3.6) und das NH der Schiffbase so in Richtung Ser 186 und Glu 181 verkippt wird, dass sich Glu 181 durch Rotation der protonierten Schiffbase genügend annähern kann (Li et al., 2004).

Allerdings weisen die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass Glu 181 nicht unbedingt allein die Funktion des Gegenions in Meta I übernehmen muss. Sie zeigen eigentlich nur, dass der Ersatz von Glu 181 durch Glutamin eine ionische Wechselwirkung in der Schiffbasenregion in Meta I aufbricht. Wenn man die Protonierungszustände von Glu 113, Glu 181 und der Schiffbase so annimmt, wie sie sich aus FTIR-Daten ableiten lassen, würde eine Änderung des Gegenions von Glu 113 zu Glu 181 während des Übergangs vom Dunkelzustand zu Meta I keinen Protonierungswechsel erfordern. Die Ergebnisse unterstützen ein alternatives Modell, in dem beide Aminosäuren zu einem komplexen Gegenion zur protonierten Schiffbase beitragen. Den Hauptanteil daran hat im Dunkelzustand und den frühen Photoprodukten Glu 113. Durch die Neuordnung des Wasserstoffbrücken-Netzwerks und die Umorientierung der protonierten Schiffbase verschiebt sich in Meta I der Hauptbeitrag zum komplexen Gegenion von Glu 113 zu Glu 181. Es ist wahrscheinlich, dass sich Glu 113 auch in Meta I am Gegenion beteiligt - zumal es nach wie vor als gesichert gilt, dass sie in Meta II als Akzeptor des Protons fungiert, das von der Schiffbase abgegeben wird.

Der Einfluss von Glu 181 auf den pK_a der Schiffbase

Die Carboxylat-Funktion an Position 181 ist für die Rhodopsin-Aktivierung offensichtlich nicht notwendig. Mutanten, die an dieser Position eine neutrale Gruppe tragen, bilden Meta II genauso effizient (Abb. 3.7 und Abb. 3.10) und sind auch in der Lage, Transduzin zu aktivieren (Yan et al., 2002). Allerdings weisen sie im Dunkelzustand eine geringere Stabilität gegenüber thermischem Zerfall auf (z. B. bei der Reinigung mit destabilisierenden Detergentien) und haben eine beträchtlich höhere Empfindlichkeit der Schiffbase gegenüber Hydroxylamin (Yan et al., 2002). Die Möglichkeit einer geladenen Glu 181 im Dunkelzustand bietet eine Erklärung dafür, weshalb sie so wichtig für die Stabilität des Dunkelzustands zu sein scheint. Die Salzbrücke zwischen Glu 113 und der protonierten Schiffbase könnte z. B. durch Glu 181 zusätzlich stabilisiert werden. Diese Salzbrücke zwingt den Dunkelzustand in eine inaktive Konformation (Robinson et al., 1992). Dies ist unbedingt notwendig, um das Rauschniveau des Photorezeptors auch beim Nachtsehen so außerordentlich niedrig zu halten (Birge und Barlow, 1995; Baylor et al., 1980; Ebrey, 2000). Diese Stabilisierung kommt möglicherweise durch elektrostatische Wechselwirkungen von Glu 181 mit dem C11=C12-Segment der polarisierbaren Polyenstruktur zustande.

Eine negative Ladung an Position 181 würde zusammen mit dem Wassermolekül, das es mit Ser 186 verbindet, zu einer Ansammlung positiver Partialladungen im mittleren Segment des Polyens führen. In verschiedenen ^{13}C *magic angle spinning* (MAS)-NMR-Studien der letzten Jahre wurde eine derartige Ansammlung positiver Partialladungen für die chemischen Verschiebungen verantwortlich gemacht, die der Chromophor in der Proteinumgebung hat (Verhoeven et al., 2001; Creemers et al., 2002). Dafür spricht auch, dass der Chromophor im Protein ein ganz bestimmtes Muster wechselnder Bindungslängen aufweist, wie durch Doppelquanten-Festkörper-NMR gezeigt werden konnte (Carravetta et al., 2004).

Umgekehrt drückt der Polarisierungseffekt, den die Glu 181 auf die Elektronenstruktur des Polyens ausübt, die Elektronen zum Schiffbasen-Stickstoff. Dadurch wird der pK_a der Schiffbase erhöht, was natürlich die Ladungstrennung zwischen protonierter Schiffbase und Glu 113 stabilisiert. Der pK_a der Schiffbase ist in der Tat außerordentlich hoch (>16) (Ebrey, 2000; Steinberg et al., 1993). Durch zeitaufgelöste UV-vis-Spektroskopie (Thorgeirsson et al., 1993), FTIR-Spektroskopie an Rhodopsin-2D-Kristallen (Vogel et al., 2004a) und zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie an Rhodopsin (siehe 3.3) wird nahegelegt, dass der pK_a der Schiffbase in Meta I viel niedriger als im Dunkelzustand ist. Dadurch wird die Schiffbase über 20 °C sogar titrierbar (Vogel et al., 2004a). Möglicherweise ist die Erniedrigung des Schiffbasen- pK_a eine direkte Konsequenz der Verschiebung des primären Gegenionbeitrags

von Glu 113 zu Glu 181. Der hohe pK_a der Schiffbase, der für die stabile Salzbrücke zwischen protonierter Schiffbase und dem Protein-Gegenion im Dunkelzustand verantwortlich ist, wird bei der Rezeptoraktivierung also Schritt für Schritt erniedrigt. Dies geschieht, indem sich die Schiffbase umorientiert; das sie umgebende Wasserstoffbrückennetzwerk wird umorganisiert, wobei sich Glu 113 möglicherweise von der Schiffbase wegbewegt. Während des Übergangs zu Meta II fällt dann der pK_a auf einen Wert unter 2,5 ab (Vogel et al., 2001).

Eine negative Ladung an Position 181 könnte auch durch ihre räumliche Nähe eine ungewöhnlich chemische Verschiebung von C12 erklären, die in früheren NMR-Studien gemessen wurde (Han und Smith, 1995). Dass diese von Glu 113 herrühren könnte, kann mit Kenntnis der Kristallstrukturen ausgeschlossen werden.

Mit einer geladenen Glu 181 wäre die Bindungstasche zwar nicht neutral, die überschüssige negative Ladung könnte aber durch die Polarisierung des Polyens und durch Partialladungen von Wasser und polaren Aminosäure-Seitenketten stabilisiert werden (Abb. 3.6).

Potentieller Einfluss von Glu 181 auf die Photoisomerisierung

Die Photoisomerisierung des Retinal-Chromophors in Rhodopsin ist bemerkenswert, da sie mit hoher Quantenausbeute (0,67), mit <200fs extrem schnell (Peteanu et al., 1993) und ausschließlich um die C11=C12-Doppelbindung stattfindet. Das kann zum Teil durch sterische Wechselwirkungen der C13-Methylgruppe mit der Proteinbindungstasche erklärt werden, wodurch die C11=C12-Doppelbindung im Dunkelzustand unter hoher Spannung steht (Wang et al., 1996). CASPT2/CASSCF-Berechnungen für den Photoisomerisierungsweg legen anhand von Retinal-Modellen mit protonierter Schiffbase dar, dass externe Ladungen einen Einfluss auf die Stereoselektivität der Photoisomerisierungsrate haben (Cembran et al., 2004). Insbesondere könnte eine negative Ladung an Position 181 zusammen mit den sterischen Wechselwirkungen eine selektive Photoisomerisierung um Position C11=C12 katalysieren.

3.3 Protonierungswechsel bei der Rhodopsin-Aktivierung: Die Rolle von Glu 134 und Glu 247

Unter allen Photoprodukten, die bei der Rhodopsin-Aktivierung entstehen, nimmt Meta I eine Ausnahmestellung ein, da es bei Raumtemperatur mit dem aktiven Zustand Meta II im Gleichgewicht steht. Strukturelle Untersuchungen des Meta I-Zustandes (Ruprecht et al., 2004) legen nahe, dass die Helixanordnung im Großen und Ganzen dem Dunkelzustand

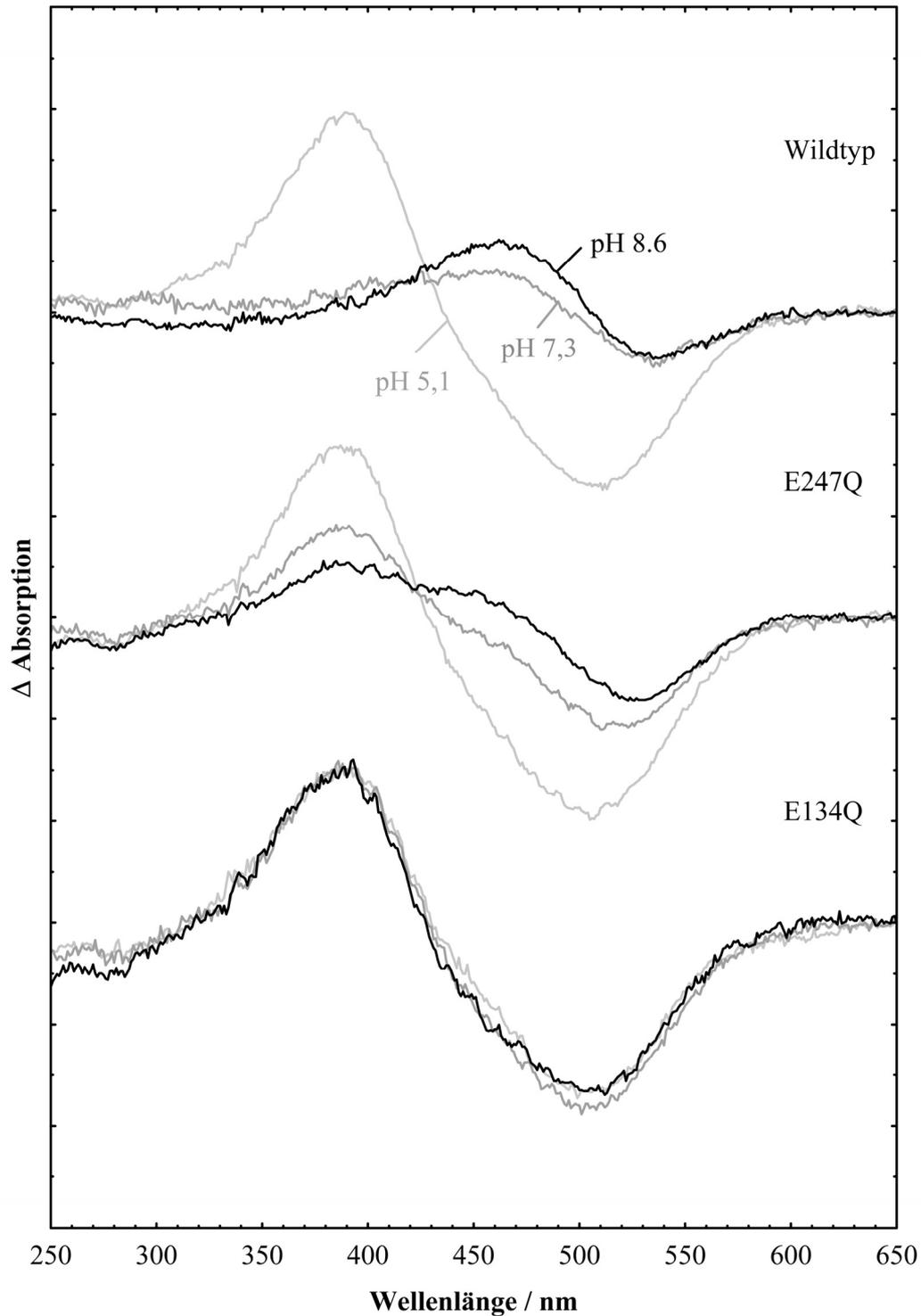


Abb. 3.15: UV-vis-Spektroskopie an Wildtyp-Rhodopsin, E247Q und E134Q. Es sind die Differenzspektren von Photoprodukt minus Dunkelzustand dargestellt. Die Spektren wurden bei 0 °C und pH 5,1, 7,3 und 8,6 aufgenommen. Bei Wildtyp-Rhodopsin erhält man bei pH 5,1 einen vollständigen Umsatz zu Meta II, das bei 380 nm absorbiert. Bei pH 7,3, entsteht größtenteils Meta I. Meta I absorbiert bei 480 nm und wird bei pH 8,6 nahezu komplett gebildet. Bei den anderen Pigmenten entsprechen die jeweiligen Grautöne denselben pH-Werten. Bei E247Q ist ähnlich wie beim Wildtyp ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen Meta I und Meta II zu beobachten, allerdings ist es deutlich auf Meta II-Seite verschoben. Bei E134Q ist das Gleichgewicht über den gesamten pH-Bereich auf Meta II-Seite verschoben.

entspricht, während beim Übergang zu Meta II bekanntlich große Helixbewegungen stattfinden. Diese werden vor allem dadurch gekennzeichnet, dass sich das zytoplasmatische Ende der transmembranären Helix 6 relativ zur transmembranären Helix 3 aus dem Helixbündel herausbewegt (Sheikh et al., 1996; Farrens et al., 1996). Der Spalt, der sich dabei öffnet, könnte ein Teil der Bindungsstelle des G-Proteins sein (Janz und Farrens, 2004; Acharya et al., 1997). Dass der Übergang vom inaktiven Zustand Meta I zum aktiven Zustand Meta II pH-abhängig ist, weist darauf hin, dass der entscheidende Schritt beim Konformationsübergang die Aufnahme eines Protons ist (Matthews et al., 1963). Durch Mutagenese konnte gezeigt werden, dass Glu 134 an dieser Protonierungsreaktion beteiligt ist (Arnis et al., 1994; Fahmy und Sakmar, 1993). Glu 134 ist ein Bestandteil des ERY-Motivs, das auf der Schnittstelle zwischen Helix 3 und dem zytoplasmatischen Loop 2 sitzt (Abb. 3.6). Dieses Motiv ist bei den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Klasse A konserviert. Es kontrolliert sowohl die Rezeptoraktivierung, als auch die Interaktion mit dem G-Protein. Wird Glu 134 durch die neutrale Aminosäure Glutamin ersetzt, gibt es keine Protonenaufnahme bei der Bildung des aktiven Zustands (Arnis et al., 1994). Der pH-Bereich für eine effiziente Wechselwirkung mit dem G-Protein verschiebt sich in den alkalischen Bereich (Fahmy und Sakmar, 1993). Der entscheidende Nachteil an all diesen Studien ist, dass sie an Pigmentproben vorgenommen wurden, die in Detergens solubilisiert sind, in der Regel in Dodecylmaltosid (DM). Einerseits ist DM ein sehr mildes Detergens, in dem der Dunkelzustand sehr stabil ist. Somit ist eine Reinigung in DM gut möglich. Auch die spektralen Eigenschaften bleiben erhalten. Andererseits beeinflusst es entscheidend den Konformationsübergang von Meta I nach Meta II. Das Konformationsgleichgewicht zwischen diesen beiden Zuständen ist in DM und ähnlichen Detergentien nicht mehr vorhanden, sondern komplett nach Meta II verschoben. Dadurch stellt der Ersatz der natürlichen Lipidumgebung durch Detergens-Mizellen eine beträchtliche Störung im Mechanismus der Rezeptoraktivierung dar.

Um die Funktionalität von Glu 134 beim Übergang zu Meta II besser verstehen zu können, war es deshalb unbedingt erforderlich, eine Umgebung herzustellen, die dem nativen System ähnelt. Deshalb wurden bei dieser Studie die verwendeten Pigmente in Phosphatidylcholin-Lipidmembranen rekonstituiert. In Abb. 3.6 ist erkennbar, dass die Helices 3 und 6 über eine Wechselwirkung zwischen Arg 135 aus dem ERY-Motiv auf Helix 3 und Glu 247 am zytoplasmatischen Ende von Helix 6 miteinander interagieren. Deshalb wurden bei den in dieser Studie durchgeführten Messungen auch Glutaminmutanten von Glu 247 verwendet, um den Einfluss einer möglichen Protonierungsreaktion an dieser Position zu untersuchen.

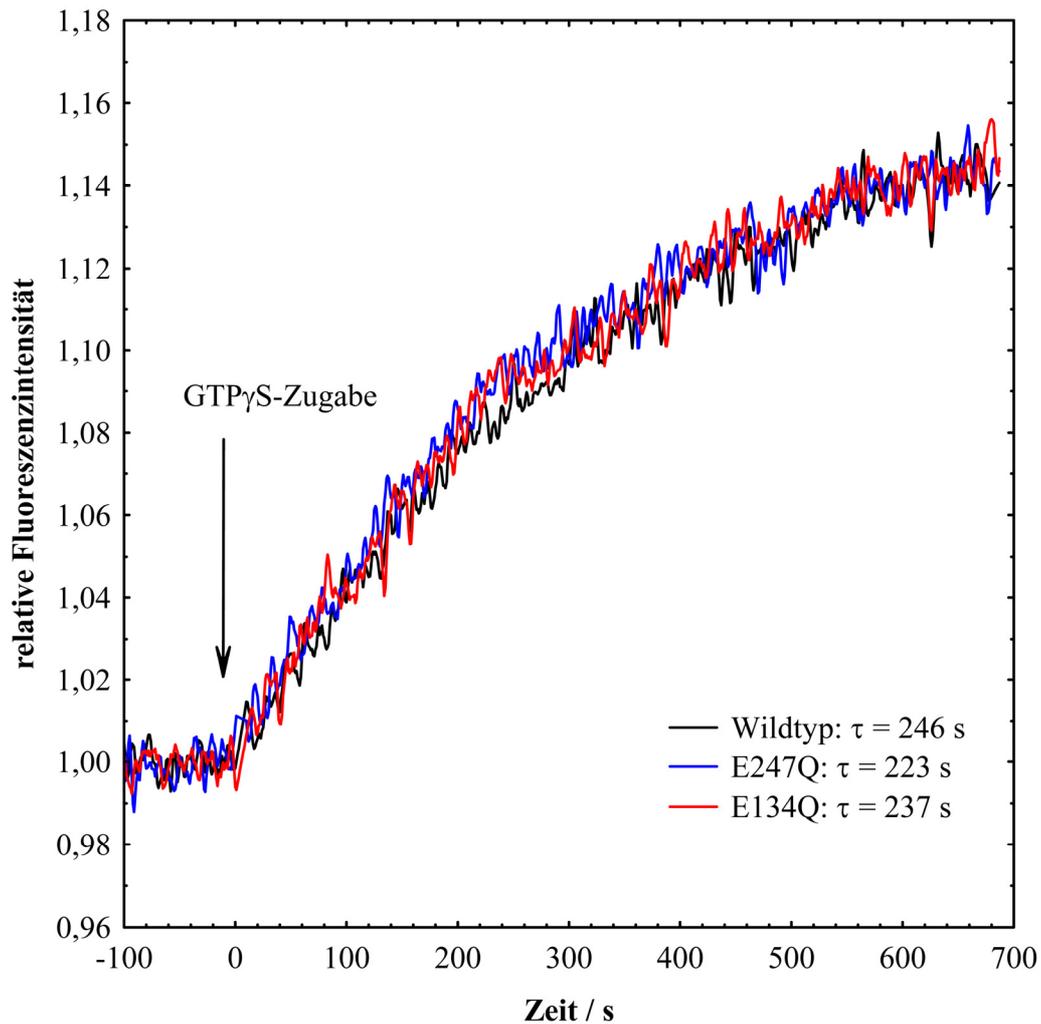


Abb. 3.16: Das Maß für die Transduzin-Aktivierung ist die Geschwindigkeit der mit der Aktivierung verbundenen Zunahme der Fluoreszenzintensität von Trp 207 auf der $G_{1\alpha}$ -Untereinheit von Transduzin. Die dargestellten Kurven sind das Mittel zweier unabhängiger Messungen bei 20 °C und pH 6,5. Die Transduzin-Aktivierung ist für Wildtyp, E247Q und E134Q unter diesen Bedingungen praktisch gleich.

3.3.1 UV-vis-Spektroskopie an E134Q und E247Q

Lichtinduzierte UV-vis-Differenzspektren des Übergangs vom Dunkelzustand zum Meta I/Meta II-Gleichgewicht wurden bei 0 °C zwischen pH 5,1 und pH 8,6 von Wildtyp-Rhodopsin und beiden Mutanten aufgenommen (Abb. 3.15). Wildtyp-Rhodopsin bildet bei pH 5,1 ein Meta II-Photoprodukt, das bei 380 nm absorbiert und bei pH 8,6 ein Meta I-Photoprodukt, das bei 480 nm absorbiert. Dazwischen, bei pH 7,3, befindet sich das Gleichgewicht der Photoprodukte hauptsächlich auf der Seite von Meta I. Auch die E247Q-Mutante bildet ein pH-abhängiges Gleichgewicht seiner Photoprodukte. Dieses ist allerdings so weit in Richtung Meta II verschoben, dass sogar bei pH 8,6 beträchtliche Beiträge von

Meta II zu erkennen sind. Die E134Q-Mutante hat bei allen untersuchten pH-Werten ausschließlich Meta II gebildet.

3.3.2 Transduzin-Aktivierung von Wildtyp, E134Q und E247Q

Um zu untersuchen, ob die in PC rekonstituierten Rhodopsin-Mutanten unter Bedingungen, die bei Wildtyp ein aktives Meta II-Photoprodukt hervorrufen, ebenfalls eine aktive Konformation bilden, wurde die Transduzin-Aktivierung untersucht. Abb. 3.16 zeigt, dass der Meta II-ähnliche Zustand, den die beiden untersuchten Mutanten bilden, eine Konformation aufweist, die die gleiche Aktivität hat wie der Wildtyp. Dies bestätigt die oben genannte Einschätzung, dass es sich bei den Einflüssen, die die Mutationen auf die in Abb. 3.15 gezeigten Spektren haben, tatsächlich um Verschiebungen des Meta I/Meta II-Gleichgewichts handelt und nicht um die Bildung sich strukturell von Wildtyp-Rhodopsin stark unterscheidender Photoprodukte, wie es z. B. bei der Untersuchung des Meta I-Zustandes der E181Q-Mutante aufgetaucht ist (siehe oben und Lüdeke et al., 2005).

3.3.3 FTIR-Analyse des Meta I/Meta II-Gleichgewichts bei E134Q und E247Q

Das pH-abhängige konformative Gleichgewicht zwischen Meta I und Meta II des Wildtyps und der Mutanten wurde anhand ihrer FTIR-Differenzspektren analysiert (Vogel et al., 2005). Hierbei wird im Bereich zwischen 1600 und 1800 cm^{-1} eine Linearkombination aus reinen Meta I- und Meta II-Referenzspektren an die bei verschiedenen pH-Werten aufgenommenen Spektren angepasst. Dieser Bereich ist bewusst ausgewählt, da er nur spektrale Änderungen beinhaltet, die sich aus Konformationsänderungen des Proteins ergeben. Dadurch wird vermieden, dass eine konformationsunabhängige Titration der Schiffbase (Fahmy et al., 1994; Vogel et al., 2001) und damit verbundene Änderungen von Chromophorbanden die Fit-Ergebnisse verfälschen. Als Referenzspektren wurden hierbei Differenzspektren aus Wildtyp-Rhodopsin verwendet.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 3.17 als relative Beiträge von Meta II zum Gesamthotoprodukt als Funktion des pH-Werts dargestellt. Unter den gegebenen Bedingungen ist das gesamte belichtete Pigment im pH-abhängigen Gleichgewicht aus Meta I und Meta II. Der Wildtyp weist eine typische Titrationskurve auf, bei der bei alkalischem pH hauptsächlich Meta I und bei saurem pH hauptsächlich Meta II gebildet wird (Matthews et al., 1963). Aus der Anpassung einer Henderson-Hasselbalch-Funktion für einen Einzel-Protonenübergang ergibt sich ein pK_a -Wert von 6,3 für die vorliegenden experimentellen

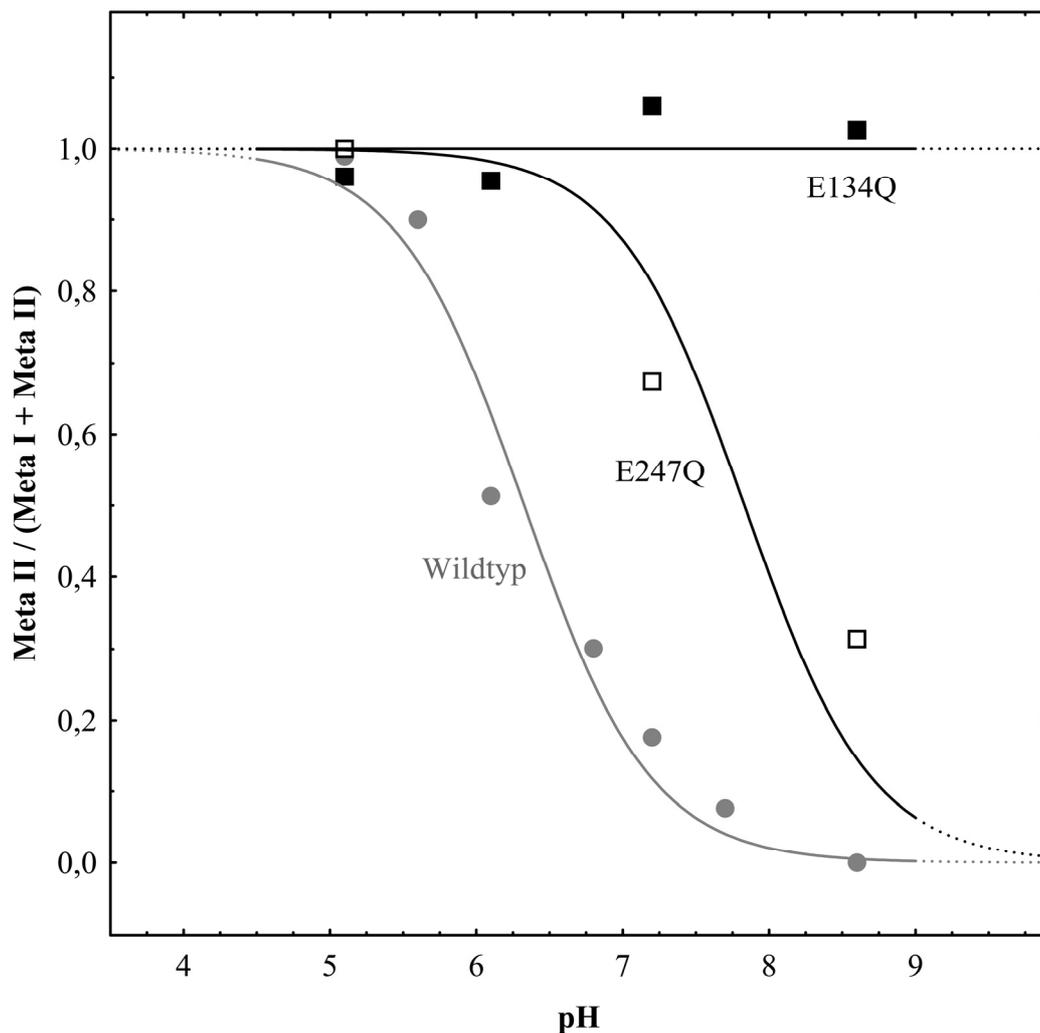


Abb. 3.17: Relativer Beitrag des aktiven Photoprodukts Meta II am Gesamtphotoprodukt. Bei 0 °C liegt das gesamte Pigment im pH-abhängigen Gleichgewicht aus Meta I und Meta II vor. Der Meta II-Anteil wurde als eine Funktion des pH-Werts für den Wildtyp (grau), die E134Q-Mutante (schwarze Quadrate) und die E247Q-Mutante (weiße Quadrate) aufgetragen. Eine Henderson-Hasselbalch-Funktion für einen Einzel-Protonenübergang wurde an die Datenpunkte angepasst. Daraus ergaben sich die pK_a -Werte 6,3 für den Wildtyp und ungefähr 7,8 für E247Q.

Bedingungen (0 °C, Pigment in PC-Lipidmembranen). Bei der E247Q-Mutante ist das Gleichgewicht deutlich in Richtung Meta II verschoben, was einer Erhöhung des pK_a -Werts von 1,5 Einheiten auf ca. 7,8 entspricht. Bei der E134Q-Mutante wurde im gesamten pH-Bereich nur Meta II beobachtet, ohne Beiträge von Meta I. Daraus folgt, dass der pK_a durch den Austausch von Glutaminsäure durch Glutamin an Position 134 um mindestens vier Einheiten weit in den alkalischen Bereich hinein verschoben ist. Dieser Bereich ist, durch Stabilitätsprobleme bedingt, für Titrationsexperimente nicht zugänglich.

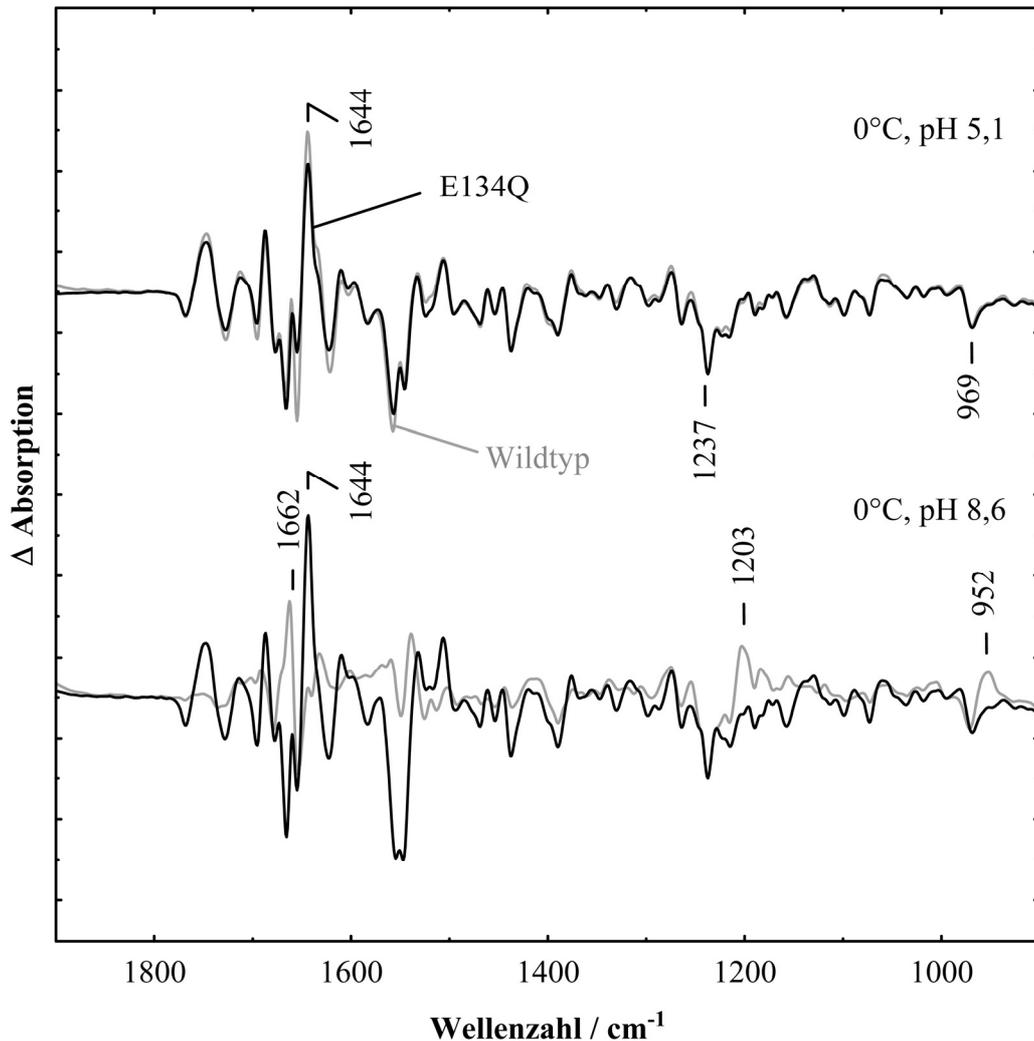


Abb. 3.18: FTIR-Differenzspektren von E134Q und Wildtyp. Die Photoprodukt-minus-Dunkelzustand-Spektren von Wildtyp-Rhodopsin (graue Spektren) zeigen den Übergang vom Dunkelzustand zu Meta II bei pH 5,1 und zu Meta I bei pH 8,6. Die Differenzspektren der E134Q-Mutante (schwarz) zeigen Meta II-Photoprodukte für beide pH-Werte.

3.3.4 Meta II-Zustand der E134Q-Mutante

Die FTIR-Differenzspektren der E134Q-Mutante, die bei 0 °C und pH 5,1 und pH 8,6 aufgenommen wurden (Abb. 3.18), zeigen Meta II-Photoprodukte bei sowohl saurem als auch alkalischem pH, was an dem charakteristischen Bandenmuster der C=O-Streckschwingungen protonierter Carbonsäuren oberhalb von 1700 cm^{-1} und der starken Amid I-Differenzbande bei 1644 cm^{-1} erkannt werden kann (vgl. Abb. 3.7). Beim Wildtyp liegt Meta II nur bei saurem pH vor. Bei alkalischem pH wird stattdessen Meta I gebildet. Charakteristische Meta I-Banden sind z. B. die Amid I-Bande bei 1662 cm^{-1} , eine Fingerprint-Bande des Chromophors bei 1203 cm^{-1} und die deutliche C11=C12 HOOP (*hydrogen-out-of-plane*)-Mode des Chromophors bei 951 cm^{-1} . Die genaue Zuordnung der Banden oberhalb von

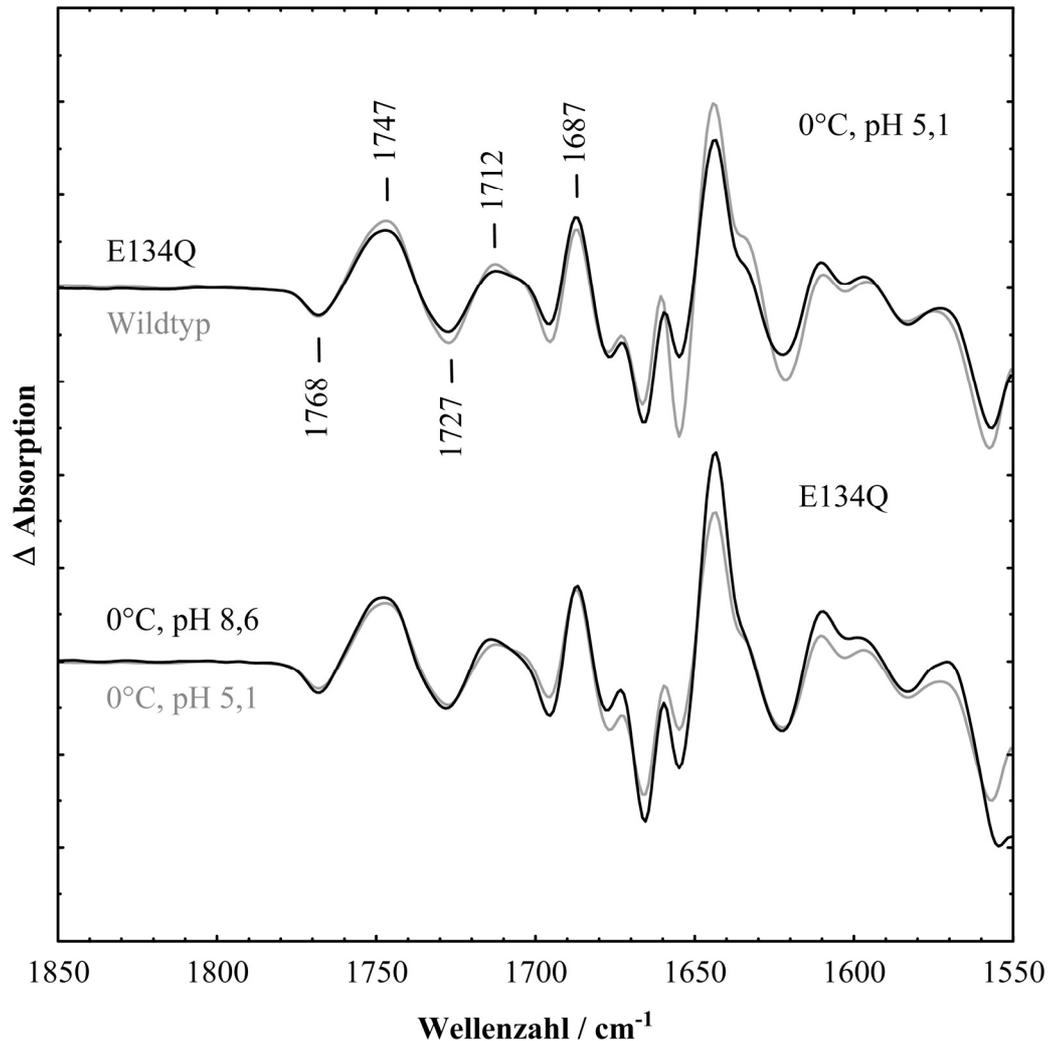


Abb. 3.19: Oben: Vergleich der Meta II-Differenzspektren von Wildtyp-Rhodopsin (grau) und E134Q (schwarz). Im Bereich oberhalb von 1700 cm^{-1} sind keine nennenswerten Unterschiede erkennbar. Unten: Vergleich der Meta II-Differenzspektren bei pH 5,1 (grau) und pH 8,6 (schwarz).

1700 cm^{-1} sowie der anderen hier beschriebenen Banden wurde bereits unter 3.1 vorgenommen.

Ein Vergleich der Meta II-Differenzspektren oberhalb von 1700 cm^{-1} zeigt keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der E134Q-Mutante (Abb. 3.19). Das deutet darauf hin, dass mögliche Protonierungsänderungen beim Übergang zu Meta II in der E134Q-Mutante ähnlich sind wie bei Wildtyp-Rhodopsin. Da Gln 134 nicht titrierbar ist, kann ein Protonierungswechsel von Glu 134 im Wildtyp klar ausgeschlossen werden. Auch beim Vergleich der Meta II-Spektren von E134Q bei alkalischem und saurem pH (Abb. 3.19) sind keine signifikanten Unterschiede im Spektralbereich oberhalb von 1700 cm^{-1} erkennbar. Um die eventuellen Unterschiede der Meta II-Zustände in Wildtyp-Rhodopsin und der E134Q-Mutante über einen größeren spektralen Bereich besser beurteilen zu können, wurde

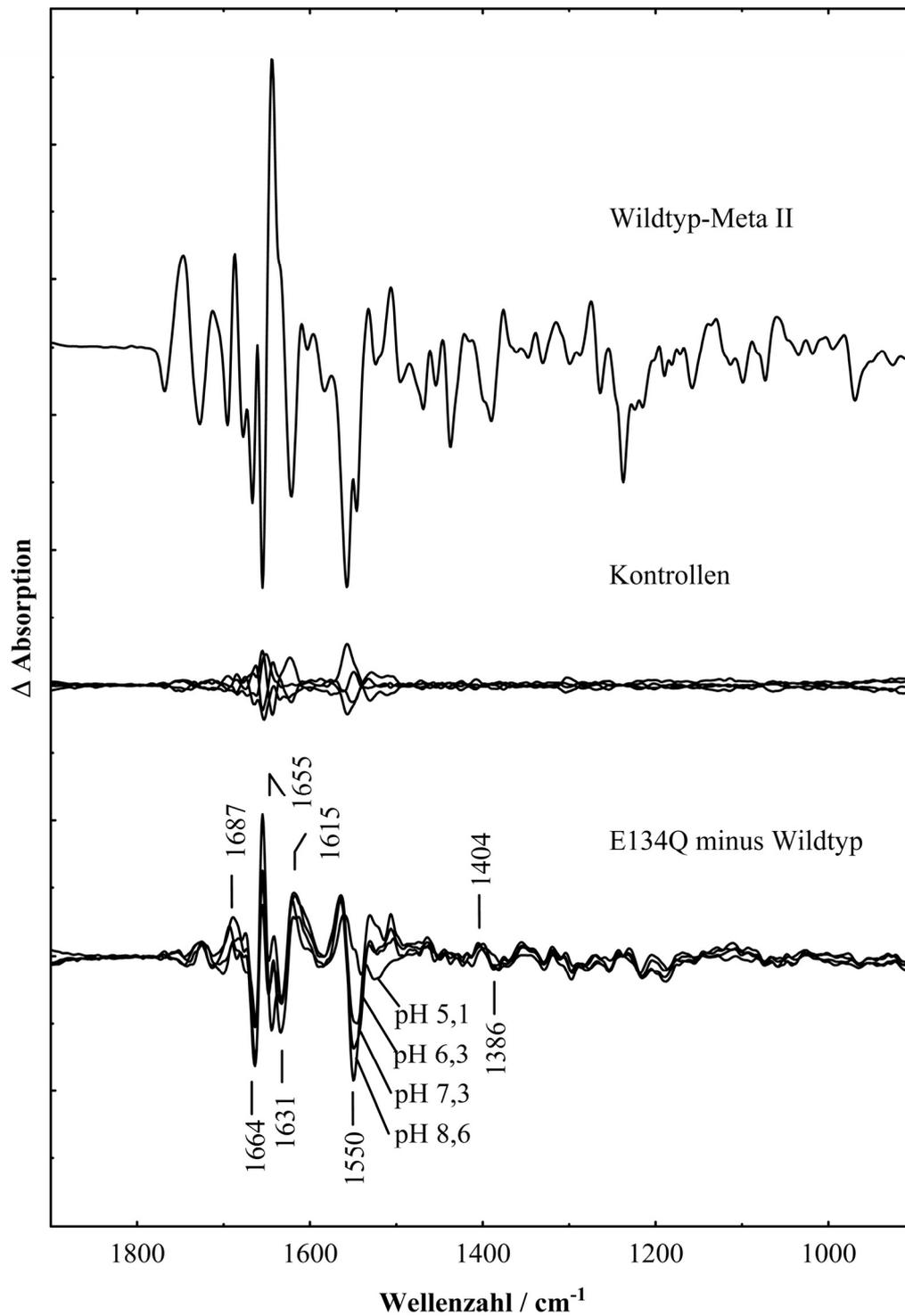


Abb. 3.20: Mutationsinduzierte Änderungen in Meta II von E134Q können anhand von Doppeldifferenzspektren aus E134 minus Wildtyp (unten) analysiert werden. Ein Wildtyp-Meta II-Differenzspektrum (oben) wurde von Meta II-Differenzspektren von E134Q bei verschiedenen pH-Werten abgezogen. Das Wildtyp-Meta II-Differenzspektrum ist das Mittel aus vier Einzelmessungen. Um die Signifikanz der Änderungen in den Doppeldifferenzspektren beurteilen zu können, sind die Abweichungen der vier Wildtyp-Messungen zum Mittel als Kontrollen dargestellt (Mitte).

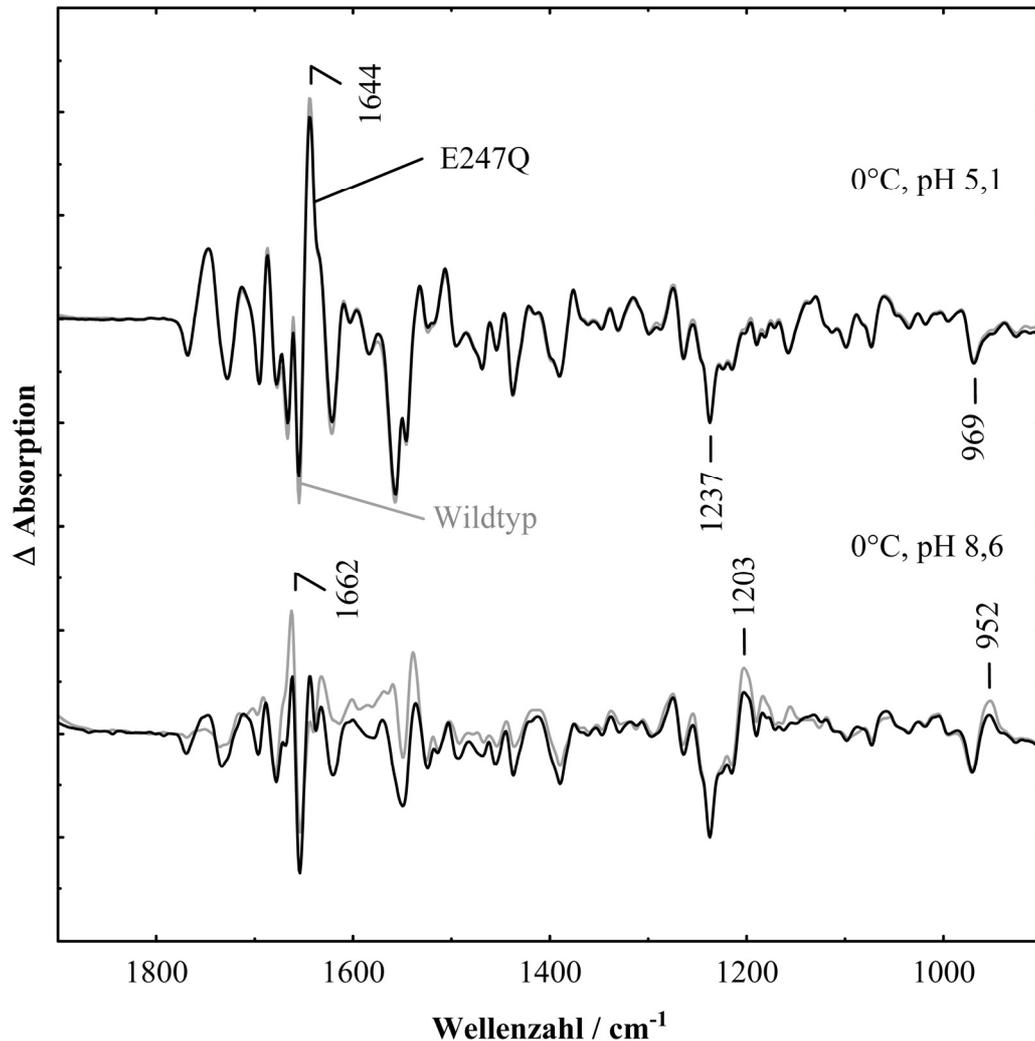


Abb. 3.21: FTIR-Differenzspektren von E247Q und Wildtyp-Rhodopsin. Bei 0 °C aufgenommene lichtinduzierte Differenzspektren von E247Q (schwarz) zeigen ein Meta II-Photoprodukt bei pH 5,1 und ein Meta I/Meta II-Gemisch bei pH 8,6. Die Wildtypspektren (grau) sind dieselben wie in Abb. 3.18.

eine Reihe Doppeldifferenzspektren aus E134Q-Meta II-Differenzspektren und einem Wildtyp-Meta II-Differenzspektrum gebildet (Abb. 3.20). Dafür wurde ein Wildtyp-Meta II-Differenzspektrum, das aus vier unabhängigen Messungen bei 0 °C und pH 5,1 gemittelt wurde, von E134Q-Meta II-Differenzspektren bei pH 5,1, pH 6,3, pH 7,3 und pH 8,6 abgezogen. Dabei sind kleine, aber reproduzierbare Unterschiede zwischen dem Wildtyp und E134Q erkennbar, die im Spektralbereich zwischen 1600 und 1700 cm^{-1} am deutlichsten werden. Im Bereich um 1664 und 1687 cm^{-1} , wo die C=O-Streckschwingungsmoden der Glutamine absorbieren, befinden sich Beiträge, die von einer Gln 134-Differenzbande im Meta II-Spektrum der Mutante kommen könnten. Wenn diese Zuordnung stimmt, würde die C=O-Streckschwingung der Mutante im Übergang zu Meta II zu höheren Wellenzahlen verschoben werden, was ein Hinweis auf eine Schwächung der Bindungsstärke von

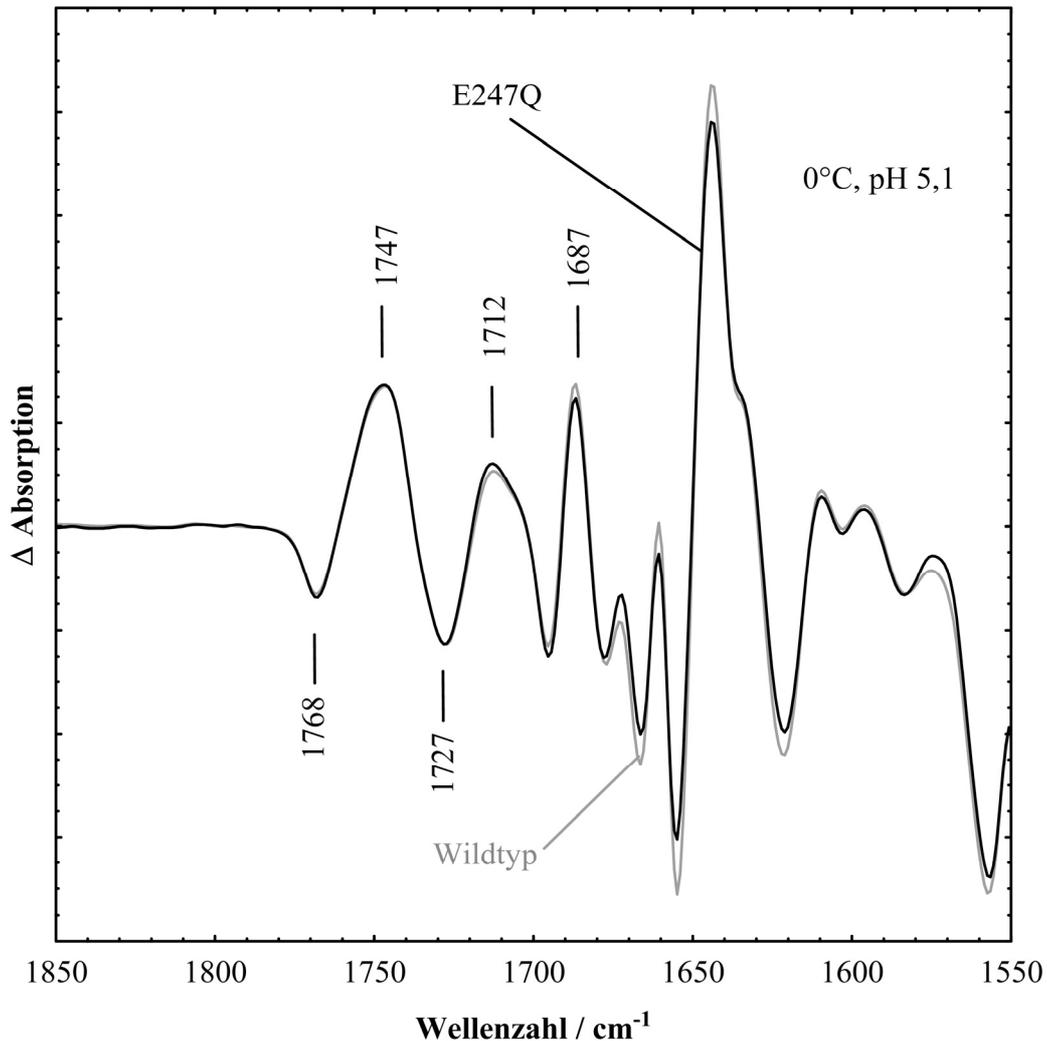


Abb. 3.22: Eine vergrößerte Darstellung der Meta II-Differenzspektren aus Abb. 3.21 von Wildtyp (grau) und E247Q (schwarz) im hochfrequenten Wellenzahlbereich zeigt ein praktisch identisches Bandenmuster im Bereich protonierter Carbonsäuren oberhalb von 1700 cm^{-1} .

Wasserstoffbrücken wäre. Dies wäre z. B. bei einer weniger polaren Umgebung um Position 134 der Fall. Die niederfrequenteren Moden in diesem Bereich sind wahrscheinlich Amid II-Moden, die durch die Mutation verändert sind. Ein negativer Beitrag um 1550 cm^{-1} weist eine auffällige pH-Abhängigkeit auf, wobei die Intensität dieser Bande bei steigendem pH zunimmt. Die Ursache dafür ist nicht ganz klar. Möglicherweise handelt es sich dabei um Veränderungen in der C=C-Streckschwingungsmode des Chromophors. Wahrscheinlich liegt die Schiffbase weder im Meta II-Zustand des Wildtyps, noch bei dem von E134Q bei pH 5,1 komplett deprotoniert vor (Vogel et al., 2001). Eine komplette Deprotonierung wird dann in den Meta II-Spektren von E134Q bei höherem pH erreicht. Eine leichte pH-Abhängigkeit der Fingerprintbanden um 1200 cm^{-1} spricht ebenfalls für Unterschiede im Protonierungsgrad der Schiffbase (Siebert et al., 1983). Sonstige Unterschiede zum Wildtyp-Spektrum im Fingerprintbereich zwischen 1300 und 1100 cm^{-1} sind zwar klein, aber über den gesamten

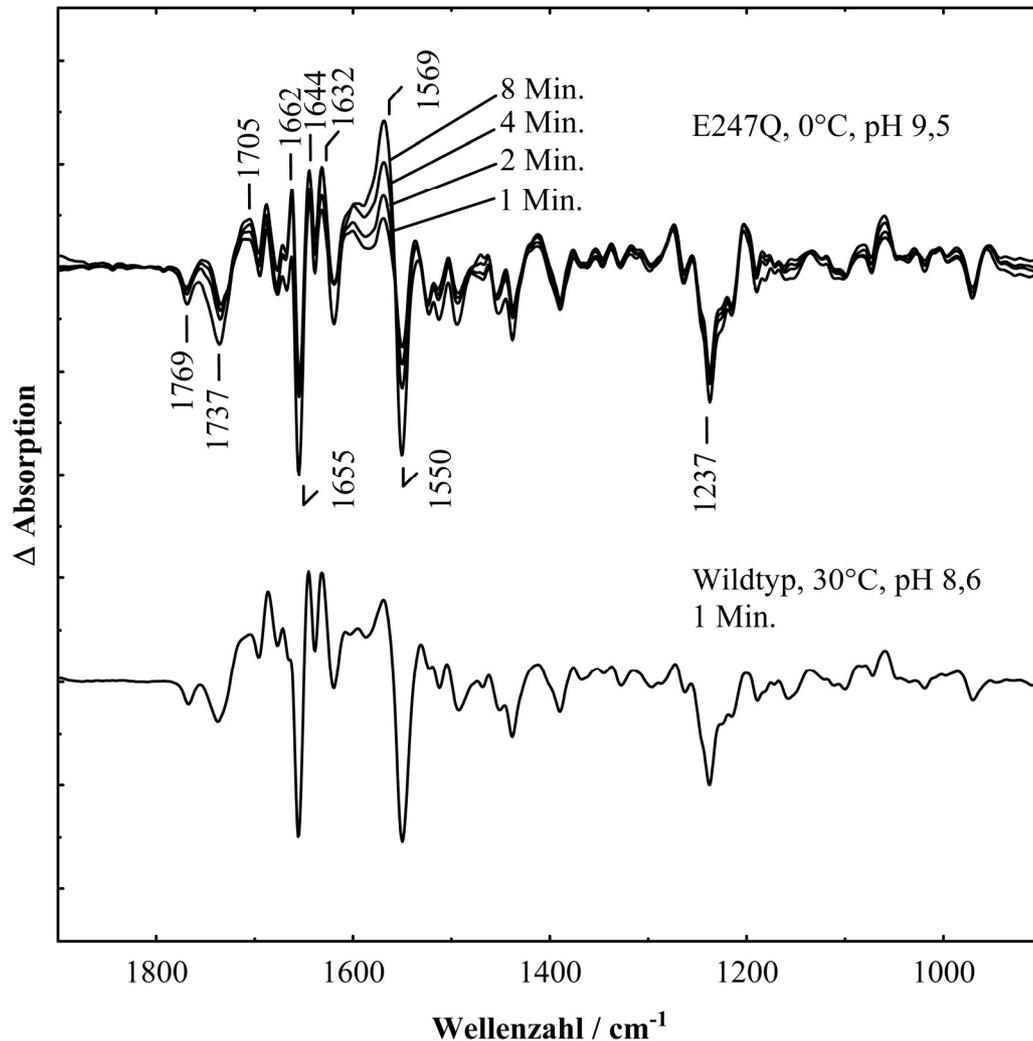


Abb. 3.23: Im Gegensatz zu Wildtyp-Rhodopsin ist das Photoprodukt der E247Q-Mutante bei 0 °C und alkalischem pH nicht stabil. Die zeitabhängigen Veränderungen im Amid-Bereich um 1559 cm^{-1} deuten auf eine Denaturierung hin (oben). Ähnliche strukturelle Veränderungen scheint es beim Wildtyp bei höheren Temperaturen zu geben. Dies wird deutlich durch die Ähnlichkeit der spektralen Änderungen in der E247Q-Mutante bei 0 °C und pH 9,5 zu denen bei Wildtyp-Rhodopsin, gemessen bei 30 °C und pH 8,6 (unten).

pH-Bereich reproduzierbar. Außerdem fallen noch kleine Absorptionsänderungen bei 1404 und 1386 cm^{-1} auf. Das ist der Bereich, in dem die symmetrischen COO^- -Streckschwingungen von Carboxylat-Gruppen absorbieren. Möglicherweise stellen diese Beiträge die Differenzbande von Glu 134 im Wildtyp dar.

Um die Signifikanz der hier beschriebenen Ergebnisse besser beurteilen zu können, sind die Abweichungen der vier unabhängigen Wildtyp-Messungen vom Mittel in Abb. 3.20 als Kontrollen dargestellt.

3.3.5 Meta II-Zustand der E247Q-Mutante

Die E247Q-Mutante bildet bei 0 °C und pH 5,1 ein Meta II-Photoprodukt, das sich von einem unter gleichen Bedingungen aufgenommenem Wildtyp-Differenzspektrum kaum unterscheidet (Abb. 3.21). Bei pH 8,6 wird eine Mischung aus zwei Photoprodukten beobachtet. Diese besteht entsprechend der Analyse in Abb. 3.17 aus rund 80 % Meta I und 20 % Meta II.

Ähnlich wie bei der E134Q-Mutante, sieht das Bandenmuster oberhalb von 1700 cm⁻¹ bei näherer Betrachtung dieses Bereichs praktisch identisch mit Wildtyp-Rhodopsin aus (Abb. 3.22). Ein Protonierungswechsel von Glu 247 im Wildtyp-Pigment beim Übergang zu Meta II kann folglich ausgeschlossen werden.

3.3.6 Instabilität von E247Q bei alkalischem pH

Differenzspektren von E247Q, die bei 0 °C und pH 9,5 in definierten zeitlichen Abständen aufgenommen wurden, deuten sehr auf eine Denaturierung des E247Q-Photoprodukts unter alkalischen Bedingungen hin (Abb. 3.23). Während der Wildtyp und die E134Q-Mutante unter gleichen Bedingungen relativ stabil waren, weist das E247Q-Differenzspektrum zeitabhängige Änderungen bei unter anderem 1705, 1655, 1644, 1632, 1559 und 1550 cm⁻¹ auf. Das entspricht in etwa den spektralen Veränderungen, die zuvor schon für sowohl die Säuren-, als auch die Basen-katalysierte Denaturierung von Rhodopsin-Photoprodukten beobachtet wurde (Vogel und Siebert, 2002). Zum Vergleich ist in Abb. 3.23 ein Spektrum von in PC rekonstituiertem Wildtyp bei 30 °C und pH 8,6 aufgeführt, das in etwa die gleichen Denaturierungsmerkmale aufweist wie die E247Q-Mutante bei 0 °C und pH 9,5. Auch der Dunkelzustand scheint eine geringere Stabilität als Wildtyp-Rhodopsin oder E134Q aufzuweisen. Während diese beiden Pigmente über Monate bei -20 °C problemlos lagerbar sind, waren Spektren, die mit frischem E247Q aufgenommen wurden, nach längerer Lagerzeit nicht mehr zu reproduzieren (ohne Abb.).

3.3.7 Meta I- und Lumi-Spektren von E134Q und E247Q

Die Lumi-Differenzspektren der Mutanten E134Q und E247Q sind denen des Wildtyp-Pigments sehr ähnlich. Die Spektren aller drei Pigmente weisen die für Lumi typische Banden wie eine Amid-Bande bei 1636 cm⁻¹, sowie die HOOP-Moden bei 959 und 947 cm⁻¹ auf. Diese enorme Ähnlichkeit dieser Tieftemperatur-Differenzspektren weist nicht nur auf eine ähnliche Konformation des Lumi-Photoprodukts hin, sondern auch auf eine ähnliche Struktur der Dunkelzustände der beiden Mutanten und von Wildtyp-Rhodopsin.

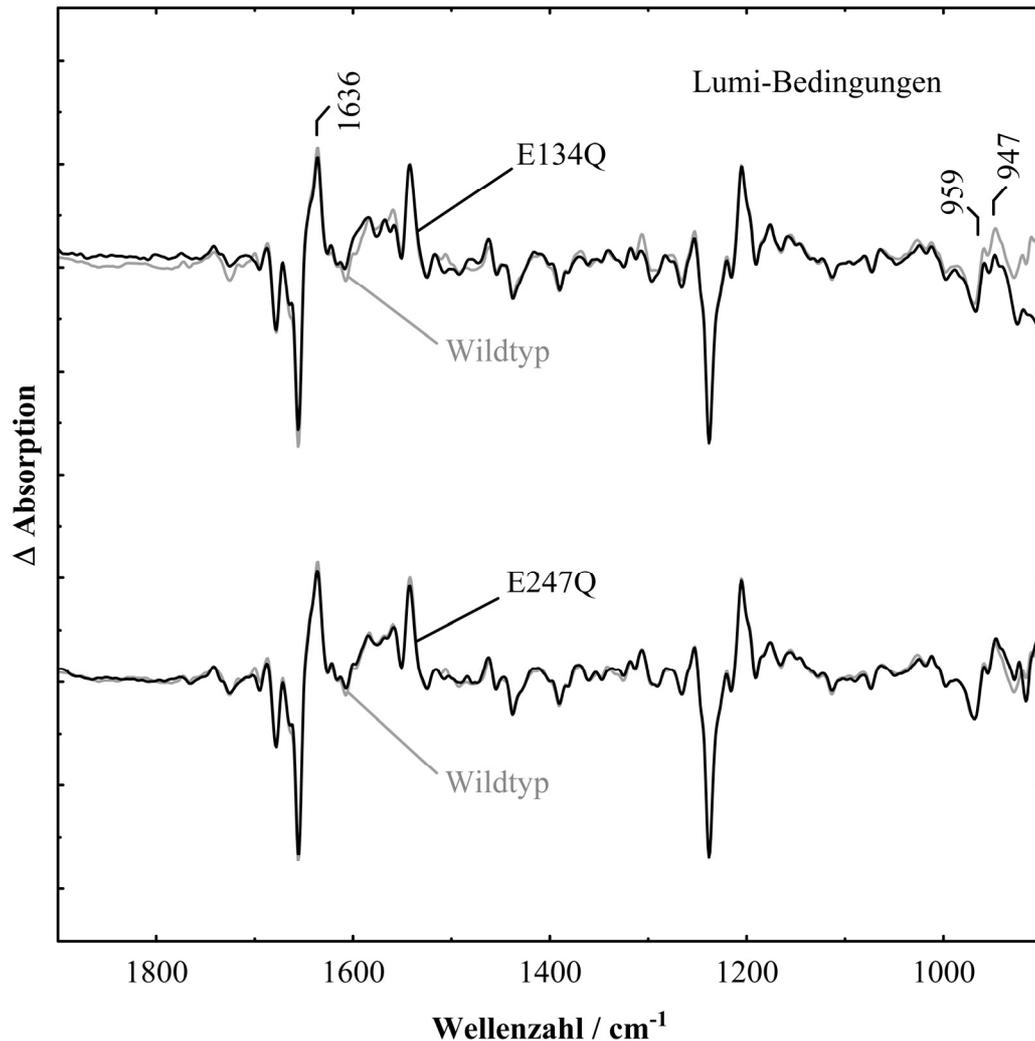


Abb. 3.24: Lumi-Differenzspektren, aufgenommen bei $-93\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $\text{pH } 8,6$. E134Q- und E247Q-Spektren sind jeweils schwarz dargestellt, das unterlegte Wildtyp-Vergleichsspektrum jeweils in grau.

Der gleiche Schluss lässt sich bei Vergleich von bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabilisierten Meta I-Differenzspektren von E247Q und Wildtyp-Rhodopsin ziehen (Abb. 3.25). Die spektralen Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp sind sowohl bei $\text{pH } 5,1$ als auch bei $\text{pH } 8,6$ minimal und allemal kleiner als die Unterschiede zwischen beiden pH -Werten, die beim Wildtyp allerdings in gleichem Maße auftreten. Diese starken Unterschiede tauchen bei Proben in Diskmembranen nicht auf. Es war leider nicht möglich, diesen Effekt zuzuordnen. Er kann sowohl von der Lipidumgebung selbst oder, indirekt von ihr beeinflusst, vom Protein stammen. Da dies bis jetzt nicht geklärt ist, sollten bei Messungen von Tieftemperaturstabilisierten Meta I-Zuständen in PC stets die gleichen pH -Bedingungen miteinander verglichen werden.

Ein anderes Bild ergibt sich bei den Tieftemperatur-Meta I-Spektren der E134Q-Mutante (Abb. 3.26). Wie beim entsprechenden Spektrum der E247Q-Mutante (Abb. 3.25) bilden bei

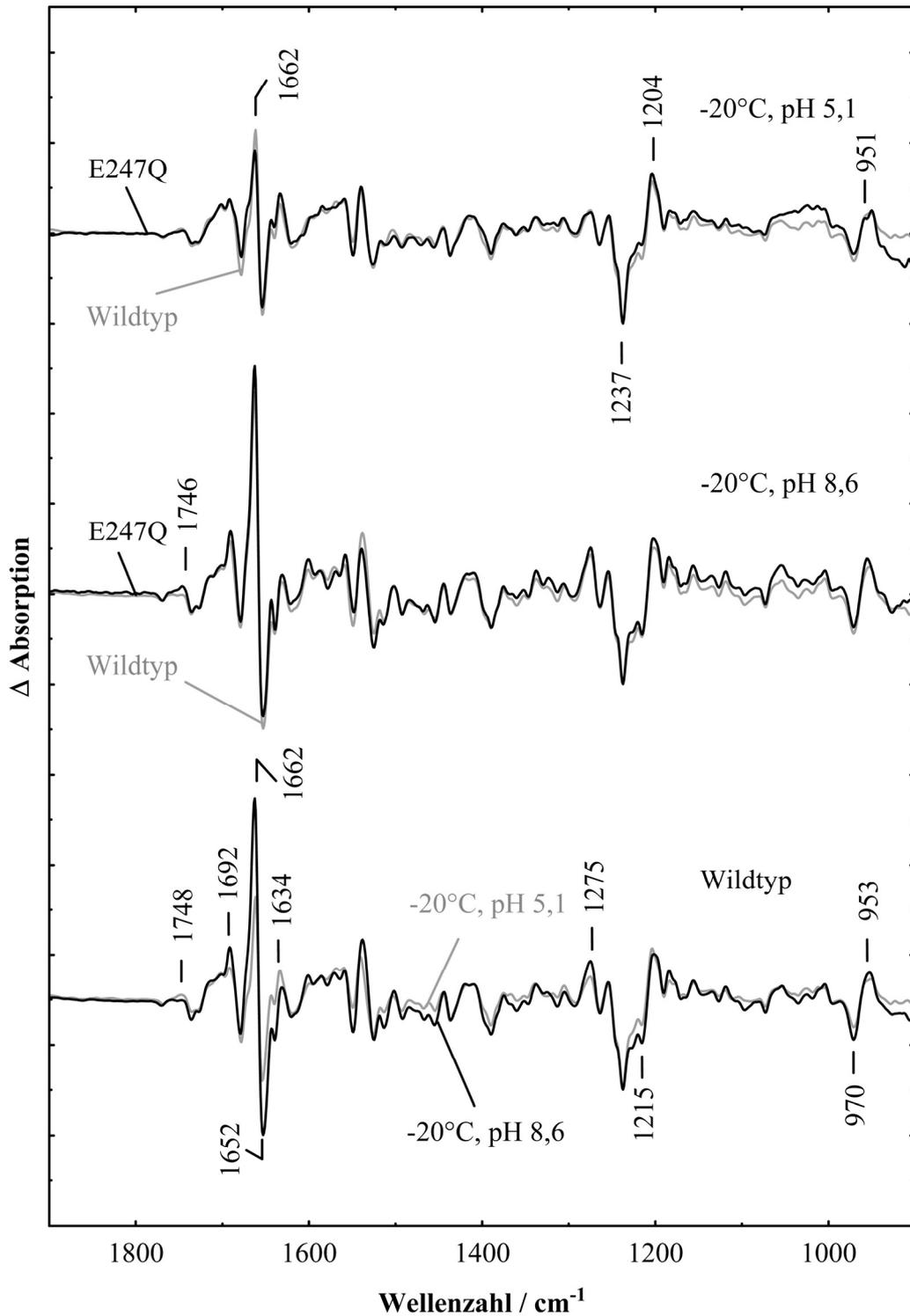


Abb. 3.25: Tieftemperatur-Meta I-Differenzspektren von E247Q und Wildtyp-Rhodopsin. Wie bei Lumi (Abb. 3.24) sind auch die bei -20°C aufgenommenen Meta I-Differenzspektren von E247Q und Wildtyp-Rhodopsin bei pH 5,1 (oben) und pH 8,6 (Mitte) praktisch identisch. Die Intensitätsunterschiede einzelner Banden zwischen pH 5,1 und pH 8,6 sind auch bei in PC rekonstituiertem Wildtyp vorhanden und größer als die Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp bei gleichem pH (unten).

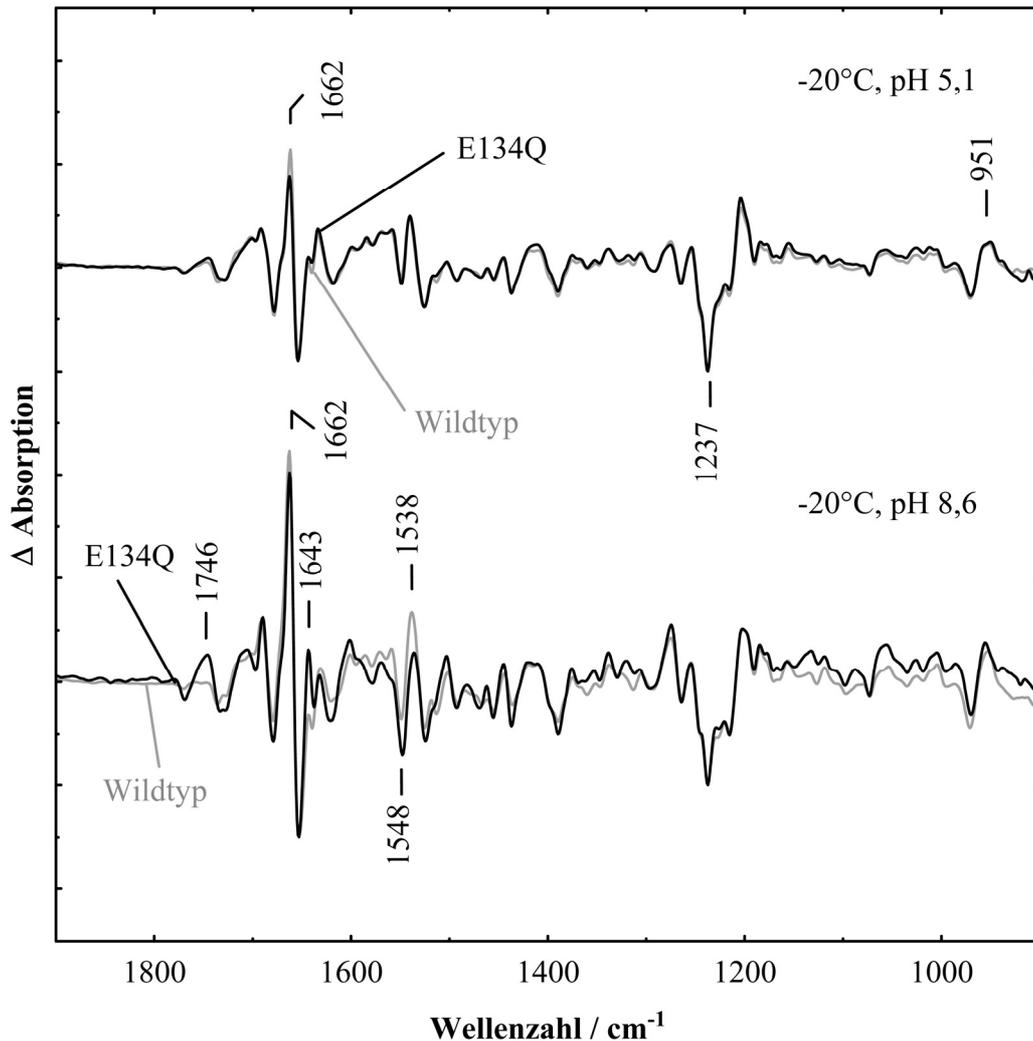


Abb. 3.26: Tieftemperatur-Meta I-Differenzspektren von E134Q und Wildtyp-Rhodopsin. Ähnlich wie bei der E247Q-Mutante (Abb. 3.25), weist E134Q bei -20 °C und pH 5,1 ein mit Wildtyp-Rhodopsin praktisch identisches Meta I-Spektrum auf. Dagegen fallen beim Differenzspektrum, das bei pH 8,6 aufgenommen wurde, bereits Beiträge auf, die Meta II zugeordnet werden können (siehe 3.1). Diese Beiträge verstärken sich im zeitlichen Verlauf (Abb. 3.27). Das hier abgebildete Spektrum ist 1 Min. nach Belichtung aufgenommen worden.

-20 °C und pH 5,1 sowohl E134Q als auch Wildtyp-Rhodopsin ein Meta I-Photoprodukt. Bei pH 8,6 hingegen ergeben sich deutliche Abweichungen zum Wildtyp, vor allem bei 1746 cm^{-1} (C=O-Streckschwingungsbande von Asp 83 und Glu 122 in Meta II) und bei 1643 cm^{-1} (Amid I-Bande in Meta II). Außerdem sind Unterschiede in der Differenzbande bei $1548\text{ (-)}/1538\text{ (+)}\text{ cm}^{-1}$ erkennbar, die mit Änderungen im Bereich der C=C-Streckschwingungen des Chromophors in Verbindung gebracht werden (siehe 3.1). All diese Änderungen deuten auf Meta II-Anteile schon bei -20 °C hin.

Im zeitlichen Verlauf verstärken sich diese Beiträge noch (Abb. 3.27). Am deutlichsten wird dies bei der negativen Ethylenbande bei 1548 cm^{-1} und bei der für Meta II typischen positiven Bande der C=O-Streckschwingungen von Asp 83 und Glu 122 bei 1748 cm^{-1} . Dennoch

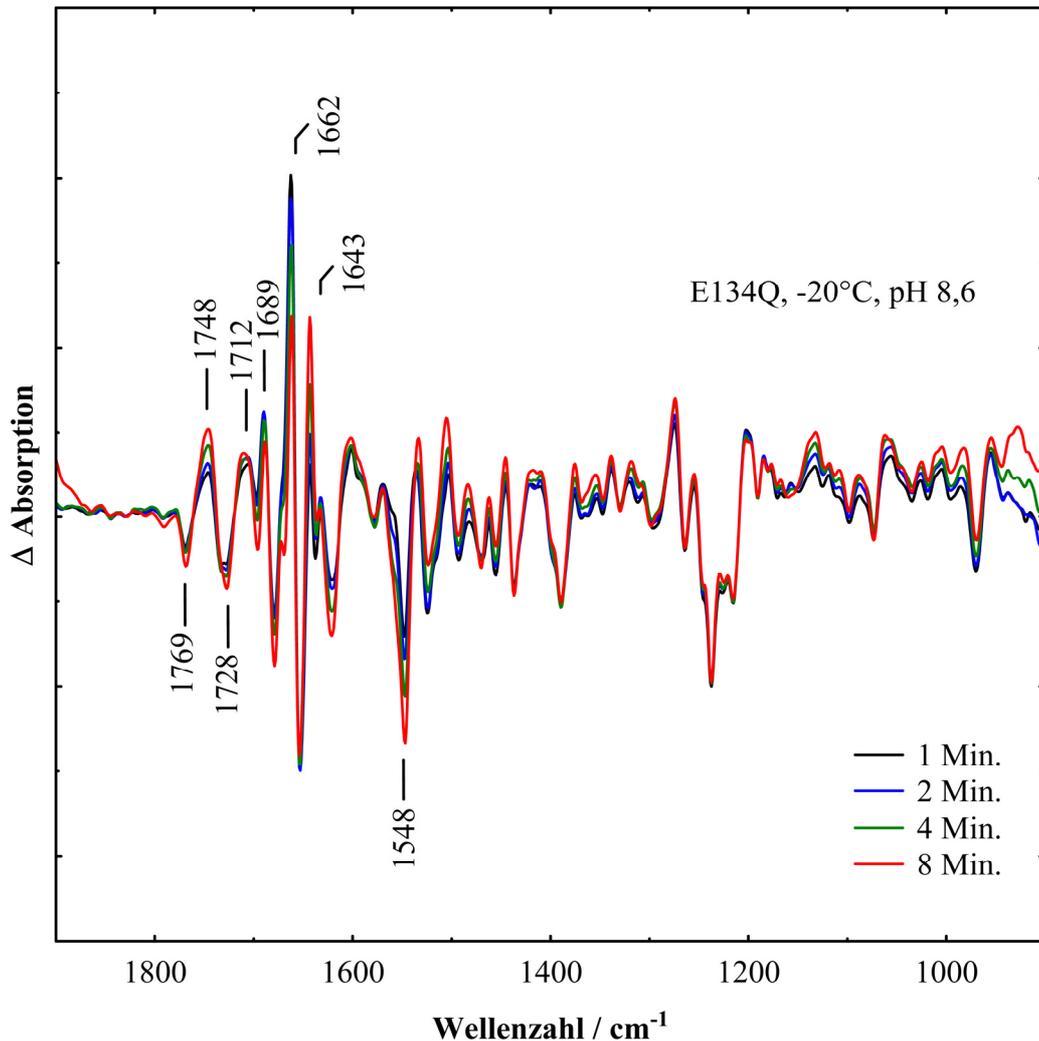


Abb. 3.27: Änderungen im Differenzspektrum von E134Q bei -20 °C und pH 8,6 im zeitlichen Verlauf. Markerbanden von Meta II (1748 cm⁻¹, 1712 cm⁻¹, 1643 cm⁻¹) nehmen weiter zu, Markerbanden von Meta I (1662 cm⁻¹) nehmen ab.

scheint es sich bei diesem Effekt nicht um einem Übergang zu einem Meta II-Photoprodukt von E134Q zu handeln, wie es bei 0 °C und pH 8,6 beobachtet wurde (Abb. 3.18). Es wurde versucht, die Meta I und die Meta II-Anteile des nach 8 Min. aufgenommenen Spektrums, wie für Abb. 3.17 beschrieben, mittels Linearkombination aus einem Meta I-Referenzspektrum und einem Meta II-Referenzspektrum zu bestimmen. Als Referenzspektren wurde ein Meta I-Differenzspektrum von Wildtyp-Rhodopsin bei -20 °C und pH 8,6 verwendet (siehe Abb. 3.25 und Abb. 3.26), als Meta II-Referenzspektrum diente das E134Q-Spektrum bei 0 °C und pH 8,6 aus Abb. 3.18. Hierbei ergaben sich stark abweichende Koeffizienten, je nachdem ob die Anpassung in einem Wellenzahlenbereich durchgeführt wurde, der für konformative Änderungen des Proteins oder für Fingerprintbanden des Chromophors charakteristisch ist. So lag der Meta II-Anteil zwischen 1600 und 1800 cm⁻¹ bereits bei 45 %. Zwischen 1300 und

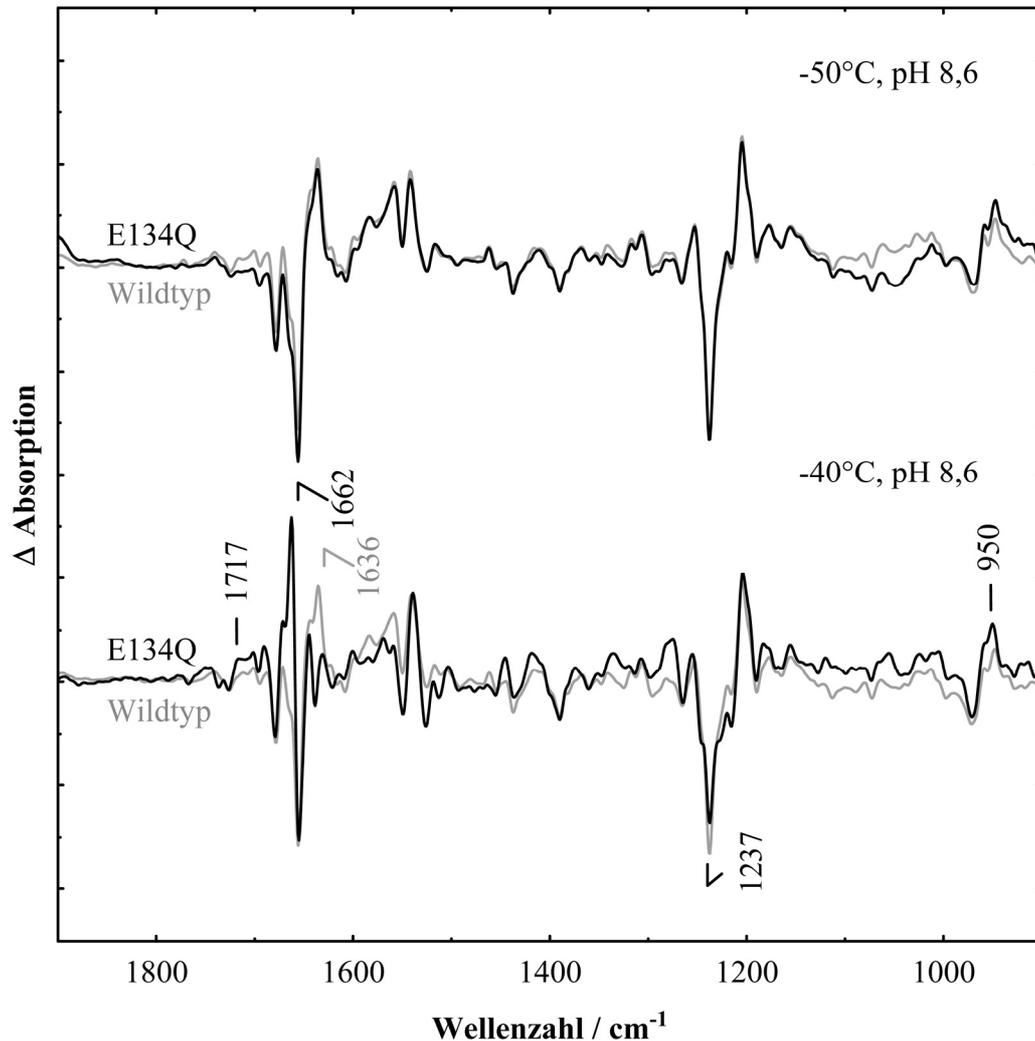


Abb. 3.28: FTIR-Differenzspektren von E134Q und Wildtyp bei pH 8,6 und -50 °C bzw. -40 °C. Bei -50 °C weisen sowohl E134Q als auch Wildtyp-Rhodopsin die Merkmale eines Lumi-Differenzspektrums auf (vgl. Abb. 3.24). Bei -40 °C sind beim E134Q-Differenzspektrum im Gegensatz zum Wildtyp schon 1 Min. nach der Belichtung einige für Meta I typische Merkmale im Spektrum vorhanden.

1170 cm⁻¹ lag er jedoch nur bei 36 %, wobei hiervon der Beitrag der Bande bei 1200 cm⁻¹, die stark vom Protonierungszustand der Schiffbase abhängt (Siebert et al., 1983), ausgenommen ist. Diese ist im betrachteten Spektrum deutlich schwächer als in der Linearkombination mit 36 % Meta I-Anteil. Dies deutet darauf hin, dass die Schiffbase im Photoprodukt der E134Q-Mutante bei -20 °C und pH 8,6 bereits teilweise deprotoniert vorliegt. Allerdings hat das einen geringeren Einfluss auf das Fingerprintbandenmuster, als die Deprotonierung der Schiffbase im Zusammenhang mit dem Übergang nach Meta II. Eine genauere Auswertung wird dadurch erschwert, dass der Übergang im messbaren Zeitbereich bei -20 °C noch nicht abgeschlossen ist. Bei höheren Temperaturen (-15 °C, -10 °C) ist dies zwar der Fall, doch erschwert hierbei wiederum der Beitrag von langsamer, regulärer Meta II-Bildung eine klare Analyse.

Auch der Übergang von Lumi nach Meta I wird von der E134Q-Mutation beeinflusst. Bei -50 °C bilden sowohl E134Q, als auch Wildtyp-Rhodopsin Lumi-Photoprodukte (Abb. 3.28), wie aus deren entsprechenden Differenzspektren deutlich wird (vgl. Abb. 3.24). Im Differenzspektrum bei -40 °C sind bei der E134Q-Mutante schon einige Veränderungen gegenüber dem Wildtyp erkennbar, die auf Anteile von Meta I hindeuten. Die Amid-Bande bei 1662 cm^{-1} , eine Markerbande für Meta I, ist schon deutlich erhöht, während die Lumi-Markerbande bei 1636 cm^{-1} deutlich schwächer ist als im Wildtyp-Vergleichsspektrum. Auch die HOOP-Bande ist im Vergleich zum Wildtyp-Spektrum bei -40 °C und pH 8,6 um 2 cm^{-1} zu 950 cm^{-1} verschoben.

3.3.8 Diskussion

In dieser Studie, aber auch in früheren Arbeiten (Arnis und Hofmann, 1993; Fahmy und Sakmar, 1993) wurden Auswirkungen gezeigt, die die Mutation von Glu 134 zu Glutamin auf das Meta I/Meta II-Gleichgewicht hat. Durch diese Effekte wird nahegelegt, dass Glu 134 in den inaktiven Zuständen, aber auch im Dunkelzustand als Carboxylat-Gruppe vorliegt. Das würde auch den Kristallstrukturdaten entsprechen, in denen Glu 134 mit dem benachbarten Arg 135 eine Salzbrücke bildet (Palczewski et al., 2000; Li et al., 2004; Abb. 3.6). Aus den oben gezeigten Daten wird deutlich, dass der Ersatz von Glu 134 durch das neutrale Glutamin zum Wegfall der pH-Abhängigkeit des Meta I/Meta II-Gleichgewichts zu Gunsten des Meta II-Photoprodukts führt, zumindest im gesamten betrachteten pH-Bereich. Glu 134 spielt also eine entscheidende Rolle für die Protonenaufnahme-Reaktion, die den Übergang von Meta I nach Meta II kontrolliert. Allerdings wird Glu 134 dabei selbst nicht protoniert. Dies wird deutlich, wenn man den Spektralbereich oberhalb von 1700 cm^{-1} des Wildtyp-Meta II-Spektrums mit dem Meta II-Spektrum von E134Q vergleicht. Hier absorbieren fast ausschließlich protonierte Carbonsäuren. Bei einer Protonenaufnahme durch Glu 134 müsste hier im Wildtyp-Spektrum eine positive Bande ihrer C=O-Streckschwingung auftauchen, die im entsprechenden E134Q-Spektrum fehlt. Da dies nicht der Fall ist, kann die Protonierung von Glu 134 in Meta II klar ausgeschlossen werden.

Deshalb wurden andere Gruppen im zytoplasmatischen ERY-Netzwerk (Abb. 3.6) als mögliche Protonenakzeptoren in Erwägung gezogen. Besonders in Betracht kam dabei Glu 247 am zytoplasmatischen Ende der transmembranären Helix 6. Sie scheint bei Betrachtung der Kristallstruktur des Dunkelzustands mit Arg 135 des ERY-Motivs eine Wechselwirkung einzugehen. Außerdem wurde durch auf Mutagenese basierenden Studien an den β_2 und α_{1B} adrenergen Rezeptoren (Ballesteros et al., 2001; Greasley et al., 2002) und am

5HT_{2A} Rezeptor (Shapiro et al., 2002) ein generelles Aktivierungsschema für Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren vorgeschlagen. Dabei hält eine homologe ionische Wechselwirkung zwischen Helix 3 und Helix 6 den Rezeptor in seiner inaktiven Konformation fest und wird bei der Rezeptoraktivierung aufgebrochen.

Die Existenz einer solchen Salzbrücke in Rhodopsin kann durch die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Durch die Neutralisierung von Position 247 in der E247Q-Mutante wird der pK_a-Wert des Meta I/Meta II-Gleichgewichts um ca. 1,5 Einheiten nach oben verschoben, was einer Vervielfachung des Verhältnisses von Meta II zu Meta I um den Faktor 30 gleichkommt. Das Aufbrechen dieser ionischen Wechselwirkung wird im Wildtyp allerdings nicht durch Protonierung von Glu 247 erzielt. Ähnlich wie bei der E134Q-Mutante ist im Wildtyp-Spektrum von Meta II, verglichen mit dem Meta II-Spektrum der Mutante, keine zusätzliche Bande einer protonierten Carbonsäure erkennbar. Außerdem ist der Einfluss der Neutralisierung von Position 247 bei weitem nicht so groß wie der Einfluss der Neutralisierung an Position 134. In der E134Q-Mutante muss der pK_a um mindestens vier Einheiten (was einer Erhöhung des Verhältnisses von Meta II zu Meta I um den Faktor 10⁴ gleichkommt) verschoben sein, um mit den Messdaten in Einklang gebracht werden zu können (Abb. 3.17). Die Neutralisierung der Aminosäurereste an Position 134 auf der transmembranären Helix 3 und, wenn auch in einem weit geringeren Maße, Position 247 auf der transmembranären Helix 6 fördern nachhaltig die Meta II-Bildung in diesen Mutanten. Allerdings ist die Ladungsverteilung der zytoplasmatischen Domäne im Meta II-Zustand dieser Mutanten anders als im Wildtyp.

Es ist schwierig, von der bekannten Struktur des Dunkelzustandes Rückschlüsse auf die exakte Struktur dieser zytoplasmatischen Region in Meta II zu ziehen. Speziell für die Schnittstelle zwischen Helix 3 und Helix 6 konnte gezeigt werden, dass der Konformationsübergang zu Meta II eine Auseinanderbewegung dieser beiden Helices beinhaltet (Sheikh et al., 1996; Farrens et al., 1996). Deshalb war es naheliegend, einen Mechanismus anzunehmen, in dem bei der Bildung des Meta II-Zustands durch Protonierung von Glu 134 oder Glu 247 eine Salzbrücke aufgebrochen wird, die diese Auseinanderbewegung in den inaktiven Zuständen verhindert. Da diese Vorstellung durch diese Arbeit nicht bestätigt werden konnte, werden noch weitere Mutagenese-Experimente nötig sein, um die tatsächliche Protonenaufnahmestelle zu identifizieren.

Während der Ersatz von Glu 134 durch das neutrale Glutamin enorme Auswirkungen auf den Übergang zu Meta II hat, scheint es kaum einen Einfluss auf die Struktur des Dunkelzustands oder der inaktiven Photoprodukte, die in Tieftemperatur-Experimenten stabilisiert wurden, zu

geben. Die Photoprodukt-minus-Dunkelzustand-Differenzspektren des Übergangs vom Dunkelzustand zu Lumi sind denen von Wildtyp-Rhodopsin sehr ähnlich, was zeigt, dass die Konformation sowohl in Lumi, als auch im Dunkelzustand durch die Mutation nicht stark gestört wird. Dies widerspricht zunächst zwar früheren Untersuchungen mit Spin-Label-Methoden, nach denen E134Q schon im Dunkelzustand eine teilweise aktive Konformation haben soll (Kim et al., 1997). Diese Messungen wurden allerdings in dem Detergens Dodecylmaltosid (DM) durchgeführt. Somit bestätigen die unterschiedlichen Ergebnisse, dass es wichtig ist, die nativen Konformationen durch Lipidmembranen zu stabilisieren, um die funktionalen Eigenschaften des Membranproteins zu erhalten.

Bei saurem pH ist auch das temperaturstabilisierte Meta I-minus-Dunkelzustand-Spektrum von E134Q kaum von dem von Wildtyp-Rhodopsin zu unterscheiden (Abb. 3.26). Trotzdem gibt es Anzeichen, die auf eine Beeinflussung des Meta I-Zustands durch die Mutation hindeuten. Zumindest bei alkalischem pH ist die Übergangstemperatur von Lumi zu Meta I in der E134Q-Mutante geringer als beim Wildtyp, wenn man unter gleichen Bedingungen aufgenommene Differenzspektren von E134Q und Wildtyp-Rhodopsin bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ vergleicht (Abb. 3.28). Auch scheinen einige, wenn auch nicht alle konformative Änderungen beim Übergang von Meta I nach Meta II in der E134Q-Mutante durch alkalischen pH katalysiert zu werden (Abb. 3.26, Abb. 3.27). Es ist allerdings auch möglich, dass diese Effekte genauso im Wildtyp existieren, aber von der umgekehrt gerichteten pH-Abhängigkeit des Meta I/Meta II-Gleichgewichts überdeckt werden. Da die Untersuchung der pH-Abhängigkeit von Aktivierungsenergien mit den hier verwendeten Methoden praktisch nicht möglich ist, konnte dieses Phänomen leider nicht genauer eingeordnet werden.

Das Proton, das im zytoplasmatischen ERY-Netzwerk (Abb. 3.6) aufgenommen wird, ist nicht das einzige Proton, das für die Meta II-Bildung wichtig ist. Durch frühere FTIR-Studien konnte gezeigt werden, dass der Übergang nach Meta II immer von der Protonierung von Glu 113, die das Gegenion zur protonierten Retinal-Schiffbase im Dunkelzustand darstellt (Sakmar et al., 1989; Zhukovsky und Oprian, 1989) begleitet ist (Jäger et al., 1994). Im Gegenzug kommt es im Übergang nach Meta II zur Deprotonierung der Schiffbase. Die Protonierung von Glu 113 wird allerdings auch dann beobachtet, wenn Bedingungen vorherrschen, die einen Meta II-Zustand mit protonierter Schiffbase erzeugen. Dies ist der Fall, wenn lösliche kleine Anionen zugegen sind (Vogel et al., 2001). Außerdem tritt dieses Phänomen in bestimmten Rhodopsin-Mutanten (Fahmy et al., 1994) und einigen Rhodopsin-Analoga auf (Vogel et al., 2000; Fan et al., 2002; Vogel et al., 2005). Glu 113 dient also nicht einfach nur als Akzeptor für das Schiffbasen-Proton. Stattdessen ist die Protonierung von

Glu 113 viel eher als die Deprotonierung der Schiffbase (Fahmy et al., 1995) ein entscheidender Schritt im Übergang nach Meta II.

Somit müssen also zwei Protonierungswechsel im Übergang von Meta I nach Meta II in Erwägung gezogen werden: Einer im zytoplasmatischen ERY-Netzwerk und ein anderer an der Schiffbasen/Glu 113-Schnittstelle. Dennoch weisen Meta I/Meta II-Titrationskurven wie in Abb. 3.17, aber auch in früheren Studien (Gibson et al., 1999; Parkes und Liebman, 1984; Vogel et al., 2005) nicht auf zwei, sondern stets auf die Aufnahme eines einzelnen essenziellen Protons hin. Dies ist ein Hinweis, dass die scheinbaren pK_a -Werte der beiden Protonierungsstellen miteinander gekoppelt sein müssen. D. h. bei Protonierung der einen steigt der pK_a der anderen so weit an, dass es ausreicht, um ebenfalls protoniert zu werden (Kuwata et al., 2001). Dieser Mechanismus setzt eine starke allosterische Kopplung zwischen der zytoplasmatischen Protonenaufnahmestelle und der Schiffbasenregion beim Übergang nach Meta II voraus. Dies konnte bereits in Studien mit Retinal-Analoga gezeigt werden. Danach stellt *all-trans*-Retinal eine Art Gerüst dar, was die Umorientierung des Helix-Arrangements vermittelt und so für diese allosterische Kopplung verantwortlich ist (Meyer et al., 2000; Vogel et al., 2006). In diesen Studien konnten speziell die 9-Methylgruppe und die Ringstruktur des Retinals als die bestimmenden Faktoren für die Koordinierung der Helix-Bewegungen identifiziert werden.

Demnach liegt hier eine Situation vor, in der die Protonierung der einen Stelle die Protonierung der anderen Stelle verursacht. Im Prinzip könnten die Meta I/Meta II-Einzelprotonen-Titrationskurven durch zwei alternative Mechanismen zustande kommen: Entweder ist die zytoplasmatische Stelle die titrierte Gruppe, deren Protonierung dann die Protonierung von Glu 113 nach sich zieht, oder Glu 113 ist die titrierte Gruppe, was die Aufnahme eines weiteren Protons auf der zytoplasmatischen Seite zur Folge hat. Mit den hier durchgeführten Experimenten kann nicht zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterschieden werden. Die erste Möglichkeit erscheint naheliegender, zumal die Protonierung von Glu 113 durch einen Übergang des Protons von der protonierten Schiffbase erfolgen kann. In Retinal-Analoga allerdings, wo die beiden Protonierungsstellen voneinander entkoppelt sind, hängt der zu tieferen Werten verschobene pK_a -Wert des Meta I/Meta II-Übergangs von der Titration von Glu 113 ab. Anders als bei mit *11-cis*-Retinal regeneriertem E134Q, wie hier verwendet, wird bei mit azyklischen Retinalanaloga oder mit 9-Demethylretinal regenerierten Pigmenten der pK_a bei E134Q im Vergleich zu Wildtyp kaum beeinflusst (Vogel et al., 2005; Vogel et al., 2006).

Für die Aktivierung von Rhodopsin sind daher zwei Protonierungswechsel notwendig: Einer an der Schiffbasen/Glu 113-Schnittstelle und ein anderer in der zytoplasmatischen Domäne an der Schnittstelle zwischen Helix 3 und Helix 6 mit dem ERY-Netzwerk um Glu 134. In dieser wird die Protonenaufnahme während des Übergangs zu Meta II hauptsächlich von Glu 134 kontrolliert, ohne selbst der Protonenakzeptor zu sein, genauso wenig wie Glu 247 auf Helix 6 an der anderen Seite der Schnittstelle. Stattdessen scheint das Proton zwischen den beiden Helices delokalisiert zu sein. Möglicherweise bildet es zusammen mit Wassermolekülen einen Cluster, der im Meta II-Zustand in diese Region eindringt.

3.4 Zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Differenzspektroskopie an Rhodopsin-Photointermediaten zwischen Lumi und Meta II

Die Kinetiken der Rhodopsin-Photointermediate wurden bereits ausführlich mit verschiedenen, vor allem UV-vis-spektroskopischen Methoden untersucht. Allerdings sind die Möglichkeiten der UV-vis-Spektroskopie hinsichtlich der Charakterisierung struktureller Übergänge eingeschränkt, da nur deren Einfluss auf das Absorptionsmaximum des Chromophors gemessen wird. FTIR-Spektroskopie detektiert hingegen zusätzlich noch die Schwingungsmoden des Proteins. Die gleichzeitige Empfindlichkeit gegenüber strukturellen Veränderungen des Proteins und des Chromophors ist sehr nützlich; dadurch lassen sich inaktive und aktive Rezeptorzustände unterscheiden, deren sichtbare Absorptionsmaxima Trugschlüsse verursachen können. Das ist z. B. der Fall, wenn aktive Zustände eine protonierte Schiffbase (Fahmy et al., 1994) bzw. inaktive Zustände eine protonierte Schiffbase haben (Ruprecht et al., 2004; Vogel et al., 2001).

Anders als bei vielen anderen photoaktiven Proteinen kehrt Rhodopsin nach der Aktivierung nicht in den Grundzustand zurück, sondern zerfällt thermisch durch Hydrolyse der Retinal-Schiffbase. Dabei dissoziiert der Rezeptor zum Apoprotein Opsin und all-*trans*-Retinal (siehe 1.3). Deshalb kann eine einzelne Rhodopsin-Probe bei zeitaufgelösten Messungen nicht mehrfach angeregt werden. Das macht komplizierter Probenwechsel-Mechanismen oder, wie in dieser Studie, die Verwendung einer annehmbaren Anzahl unabhängiger, reproduzierbarer Einzelproben erforderlich. Wegen der starken Wasserabsorption ist die Schichtdicke von Infrarotproben auf einige wenige μm begrenzt. Durchflusszellen, wie sie z. B. in der zeitaufgelösten UV-vis-Spektroskopie erfolgreich eingesetzt werden (Lewis und Kliger, 2000), sind in Verbindung mit FTIR-Spektroskopie nur für die Untersuchung gelöster Proben nutzbar (Kauffmann et al., 2001). Für hochviskose Membransuspensionen, wie im Fall von

Rhodopsin, sind sie allerdings vollkommen ungeeignet. Deshalb wurden für diese FTIR Rapid-Scan Messungen unabhängige Einzelproben verwendet. Dadurch konnten die Messungen nur eingeschränkt oft wiederholt werden, was die Möglichkeit, das Signal/Rausch-Verhältnis der zeitaufgelösten Daten durch Mitteln zu verbessern, einschränkt. Außerdem stellt diese Vorgehensweise hohe Anforderungen an die Reproduzierbarkeit der Probenpräparation.

In der Regel werden zeitaufgelöste Daten durch multi-exponentielle, globale Fit-Verfahren analysiert. Diese werden auch oft mit anderen Techniken, wie z. B. Singulärwert-Zerlegung, kombiniert, um das Rauschniveau im Datensatz zu verringern. Im globalen Fit wird die zeitliche Entwicklung der spektralen Änderungen $A(\nu, t)$ als die Summe von n exponentiellen Zerfallsprozessen mit den Amplitudenspektren $a_i(\nu)$ und der Zeitkonstante τ_i beschrieben:

Gleichung 3.1

$$A(\nu, t) = a_0(\nu) + \sum_{i=1}^n a_i(\nu) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

ν ist dabei die spektrale Komponente (Wellenlänge oder Wellenzahl) und $a_0(\nu)$ beschreibt ein zusätzliches, zeitunabhängiges Amplitudenspektrum, das bei zyklischen Reaktionen, die wieder in ihren Grundzustand zurückkehren, einer Nulllinie entspricht.

Es ist nicht selbstverständlich, dass der globale Fit stets zu einem globalen Minimum konvergiert, oft genug strebt er auch gegen ein lokales Minimum. Das hängt meist von der Wahl der Startwerte für die Parameter τ_i und n ab.

In einem anderen Ansatz wird der zeitaufgelöste Datensatz als Laplace-Transformation (LT) einer Verteilung der Amplituden $a(\nu, \lg \tau')$ einer Exponentialfunktion beschrieben, wobei $\lg \tau'$ der dekadische Logarithmus der dimensionslosen Zeitkonstante $\tau' = \tau/ms$ ist:

Gleichung 3.2

$$A(\nu, t) = LT\{a(\nu, \lg \tau')\} = \int_{-\infty}^{\infty} a(\nu, \lg \tau') \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) d \lg \tau'$$

Die Anwendung der inversen Laplace-Transformation auf die zeitaufgelösten Daten liefert dann die Verteilung der Amplitudenspektren $a(\nu, \lg \tau')$. Allerdings ist die numerische Inversion der Laplace-Transformation wegen seiner hohen Rauschanfälligkeit sehr instabil (McWhirter und Pike, 1978), weshalb sie hier mit einer Maximum-Entropie-Regularisierungsfunktion kombiniert wurde. Diese Berechnungen wurden von Víctor Lórenz Fonfría vom Department of Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology, Showa-ku, Nagoya, Japan durchgeführt. Die Methode wird in einer seiner Veröffentlichungen detailliert beschrieben (V. Lórenz Fonfría und H. Kandori, zur

Veröffentlichung eingereicht). In der angewendeten Minimierungsfunktion wird die beste Übereinstimmung zwischen Laplace-Transformation und den Messdaten gegen die einfachste mögliche Lösung abgeglichen. Hierfür dient die Shannon-Entropiefunktion als Maß und wird gewichtet durch einen Regularisierungsparameter in die Minimierungsfunktion eingepasst. Im Gegensatz zum globalen exponentiellen Fit wird die ME inverse Laplace-Transformation nicht global auf den zeitaufgelösten Datensatz angewendet, sondern lokal auf die zeitliche Änderung jedes einzelnen spektralen Datenpunkts. Abgesehen von der Wahl eines angemessenen Regularisierungsparameters hängt sie weder von vorher getroffenen Annahmen hinsichtlich der Anzahl der Zerfallsprozesse noch den damit verbundenen Zeitkonstanten ab.

In dieser Studie wurde die ME inverse Laplace-Transformation auf zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Daten angewendet, um die konformativen Änderungen von Rhodopsin in seiner nativen Disk-Membran-Umgebung zu untersuchen.

3.4.1 Statische Messungen der Photointermediate Lumi, Meta I und Meta II

Abb. 3.29 gibt einen Überblick über die statischen FTIR-Differenzspektren von Meta II und den Tieftemperatur-stabilisierten Intermediaten Meta I und Lumi. Im Gegensatz zu entsprechenden Spektren dieser Intermediate, die in früheren Kapiteln gezeigt wurden, entstammen diese von Proben mit Rhodopsin in seiner natürlichen Lipidumgebung, den Diskmembranen. Diese Proben wurden wie in den zeitaufgelösten Experimenten mit einem Laserblitz angeregt, um einen besseren Vergleich zu ermöglichen und um Sekundärphotoprodukte wie Isorhodopsin zu vermeiden. Außerdem sind die Spektren entsprechend den zeitaufgelösten Spektren mit einer Auflösung von 8 cm^{-1} aufgenommen worden. Durch diese unterschiedlichen Bedingungen können manche Banden gegenüber den weiter oben gezeigten Spektren geringfügig verschoben sein. Im folgenden Abschnitt folgt eine wiederholende Zusammenfassung der wichtigsten Banden in Abb. 3.29, die zum Teil schon unter 3.1.1 besprochen wurden (Siebert, 1995; Fahmy et al., 1993; Beck et al., 1998a).

Der Übergang vom Dunkelzustand nach Lumi (unten) wird von der C=N-Streckschwingungsmode der Schiffbase bei 1637 cm^{-1} geprägt, sowie durch die HOOP-Differenzbande des Chromophors bei $968 (-)/942 (+) \text{ cm}^{-1}$. Außerdem erscheint die negative Fingerprint-Bande der C-C-Streckschwingungen des Chromophors im Dunkelzustand bei 1238 cm^{-1} schmaler und intensiver im Lumi-Differenzspektrum als in den Meta I- und Meta II-Differenzspektren (Mitte und oben). Im Meta I-Differenzspektrum gibt es einige

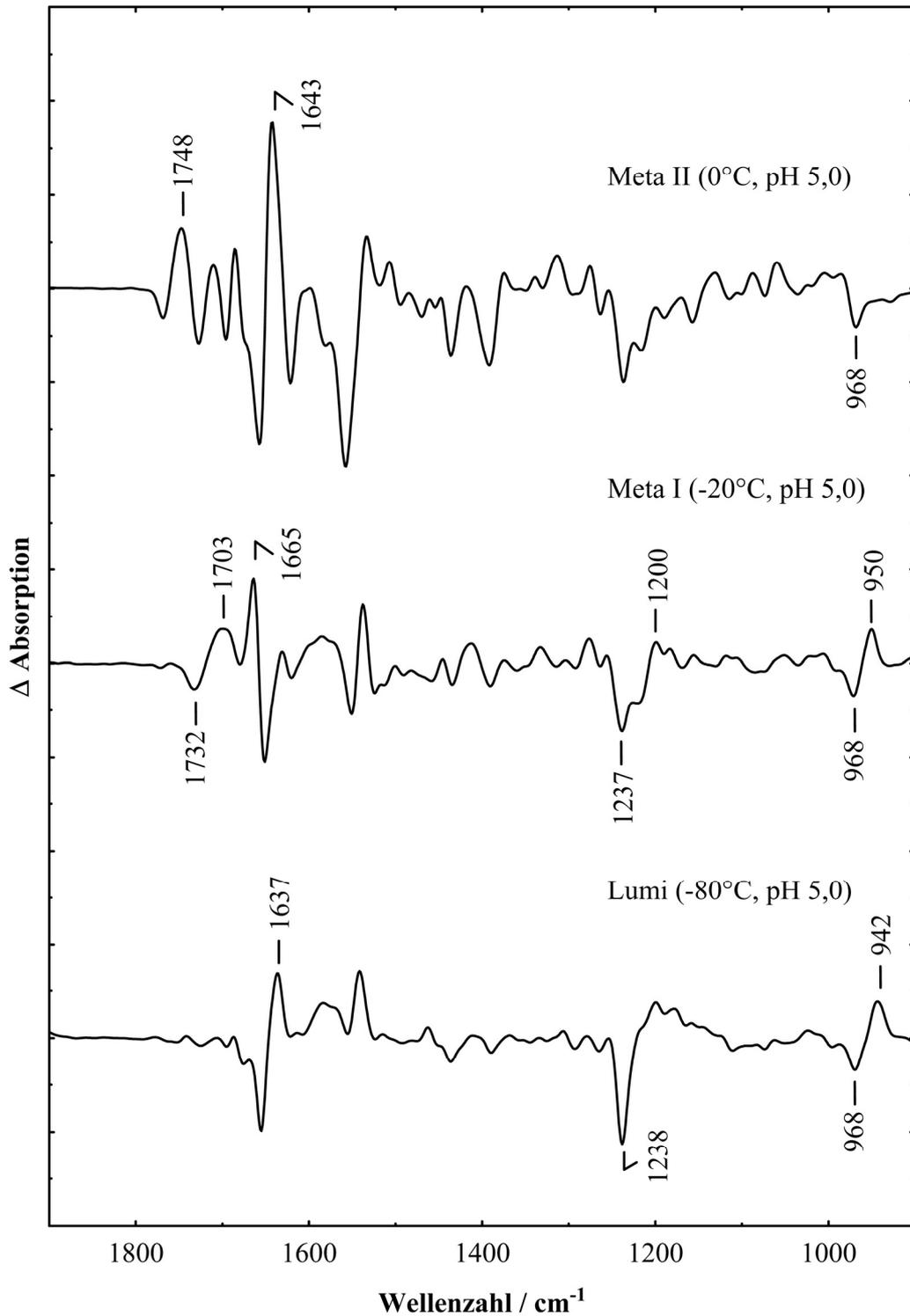


Abb. 3.29: Statische Photoprodukt-minus-Dunkelzustand-Spektren, stabilisiert bei verschiedenen Temperaturen und pH 5,0. Das Meta II-Spektrum wurde bei 0 °C aufgenommen, das Meta I-Spektrum bei -20 °C und das Lumi-Spektrum bei -80 °C. Im Gegensatz zu den entsprechenden Spektren, die in den vorherigen Kapiteln gezeigt wurden, sind diese bei einer Auflösung von 8 cm^{-1} aufgenommen worden. Dadurch wird ein besserer Vergleich zu zeitaufgelösten Spektren ermöglicht.

charakteristische Banden: die Differenzbande bei $1732 (-)/1703 (+)$ cm^{-1} , die mit Glu 122 auf Helix 3 in Verbindung gebracht wird, eine Amid I Bande des Meta I-Zustands bei 1667 cm^{-1} und eine Meta I-Fingerprint-Mode des Chromophors bei 1200 cm^{-1} . Zusätzlich ist die HOOP-Bande im Vergleich zu Lumi um 8 cm^{-1} zu tieferen Wellenzahlen verschoben. Der Übergang nach Meta II beinhaltet große konformative Änderungen (oben), die sich z. B. in einer starken Photoprodukt-Bande äußern. Dafür sind, wie bereits erwähnt (vgl. 3.1.1), die C=O-Streckschwingungen der Carboxylgruppen von Asp 83 und Glu 122 verantwortlich. Wegen der geringeren Auflösung ist die starke Amid I-Bande in Meta II bei 1643 cm^{-1} im Vergleich zu in früheren Kapiteln gezeigten Spektren leicht verschoben. Bedingt durch die Deprotonierung der Schiffbase nehmen die Fingerprint-Moden des Chromophors bei 1200 cm^{-1} in Meta II ab (Siebert et al., 1983). Das Verschwinden der HOOP-Mode hängt damit zusammen, dass die Polyen-Struktur des Chromophors in Meta II zu einer planaren Konformation relaxiert (Fahmy et al., 1989).

3.4.2 Zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Differenzspektroskopie, analysiert mit Maximum Entropie inverse Laplace-Transformation

In Abb. 3.30 A sind vier exemplarische Spektren aus den zeitaufgelösten Datensätzen der Messungen bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ und pH 5,0 für vier verschiedene Zeitpunkte dargestellt. Das Spektrum bei 8 ms zeigt den ersten Messpunkt des Experiments. Zu diesem Zeitpunkt ist der Übergang von Lumi nach Meta I noch nicht komplett abgeschlossen, im Spektrum sind allerdings vor allem Beiträge des Meta I-Photoprodukts vorhanden. Somit entsprechen die spektralen Änderungen bei 8 ms dem Übergang vom Dunkelzustand zu einem Gemisch aus Lumi und Meta I. Am folgenden dargestellten Zeitpunkt ist das Photoprodukt in den Meta I-Zustand übergegangen. Die größten spektralen Änderungen, die zum Übergang nach Meta II gehören, erfolgen dann in den beiden späten Spektren. Die dabei auftauchenden Markerbanden entsprechen im Großen und Ganzen denen, die in Abb. 3.29 oben gezeigt wurden. Der Übergang von Lumi nach Meta I bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde nicht vollständig aufgelöst; bereits das erste Spektrum wies erhebliche Anteile von Meta I auf. Deshalb wurden zusätzliche Experimente bei $-7 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt, wo ein Lumi-Spektrum ohne Meta I-Beiträge zu den frühen Zeitpunkten erhalten wurde. Dieses Spektrum für $-7 \text{ }^\circ\text{C}$ und pH 5,0 ist in Abb. 3.30 B angefügt. Abb. 3.31 A zeigt die entsprechenden Spektren für pH 9,5. Hier kann man zu den beiden ersten Zeitpunkten ähnliche Beiträge von Lumi und Meta I erkennen, wie in den entsprechenden Spektren bei pH 5,0, allerdings fehlt der Übergang zu Meta II komplett. Dass

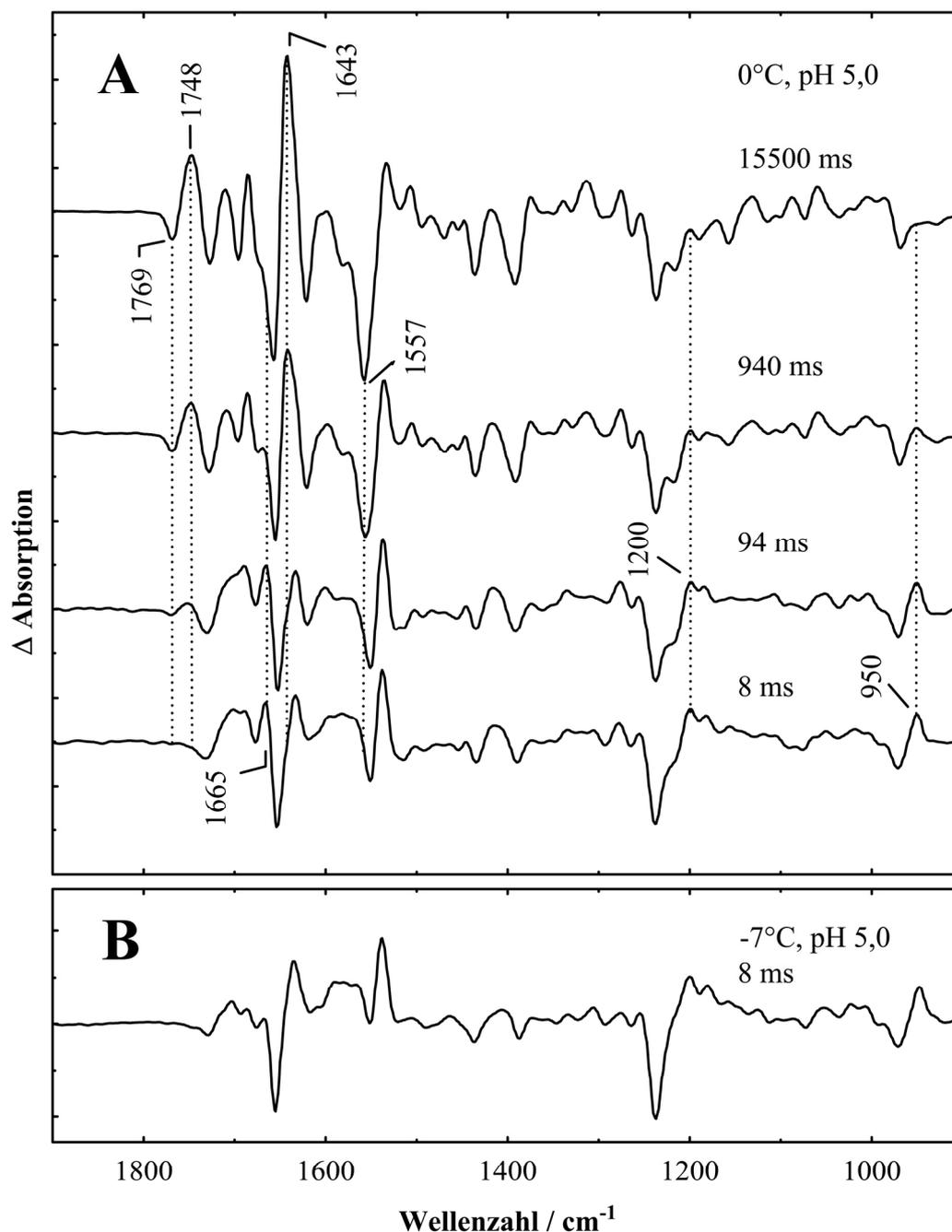


Abb. 3.30: Zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Datensätze, erhalten unter Bedingungen, die die Bildung des aktiven Zustands Meta II begünstigen (A, 0°C und pH 5,0). Hier sind exemplarisch die zeitaufgelösten Differenzspektren für verschiedene Zeitpunkte dargestellt: 8 ms, 94 ms, 940 ms und 15500 ms. Bei -7°C ist der Zerfall der Photoprodukte so stark verlangsamt, dass bei 8 ms ein Lumi-Spektrum aufgelöst werden konnte (B).

Beiträge von Meta II im bei pH 9,5 erhaltenen Datensatz fehlen, liegt am pH-abhängigen Gleichgewicht zwischen Meta I und Meta II. Dieses liegt unter diesen Bedingungen voll auf der Meta I-Seite (Matthews et al., 1963; Gibson et al., 1999).

Auch bei pH 9,5 wurden Messungen bei -7°C durchgeführt, um den Übergang von Lumi nach Meta I aufzulösen. Das zeitaufgelöste Lumi-Spektrum für -7°C und pH 9,5, das nach

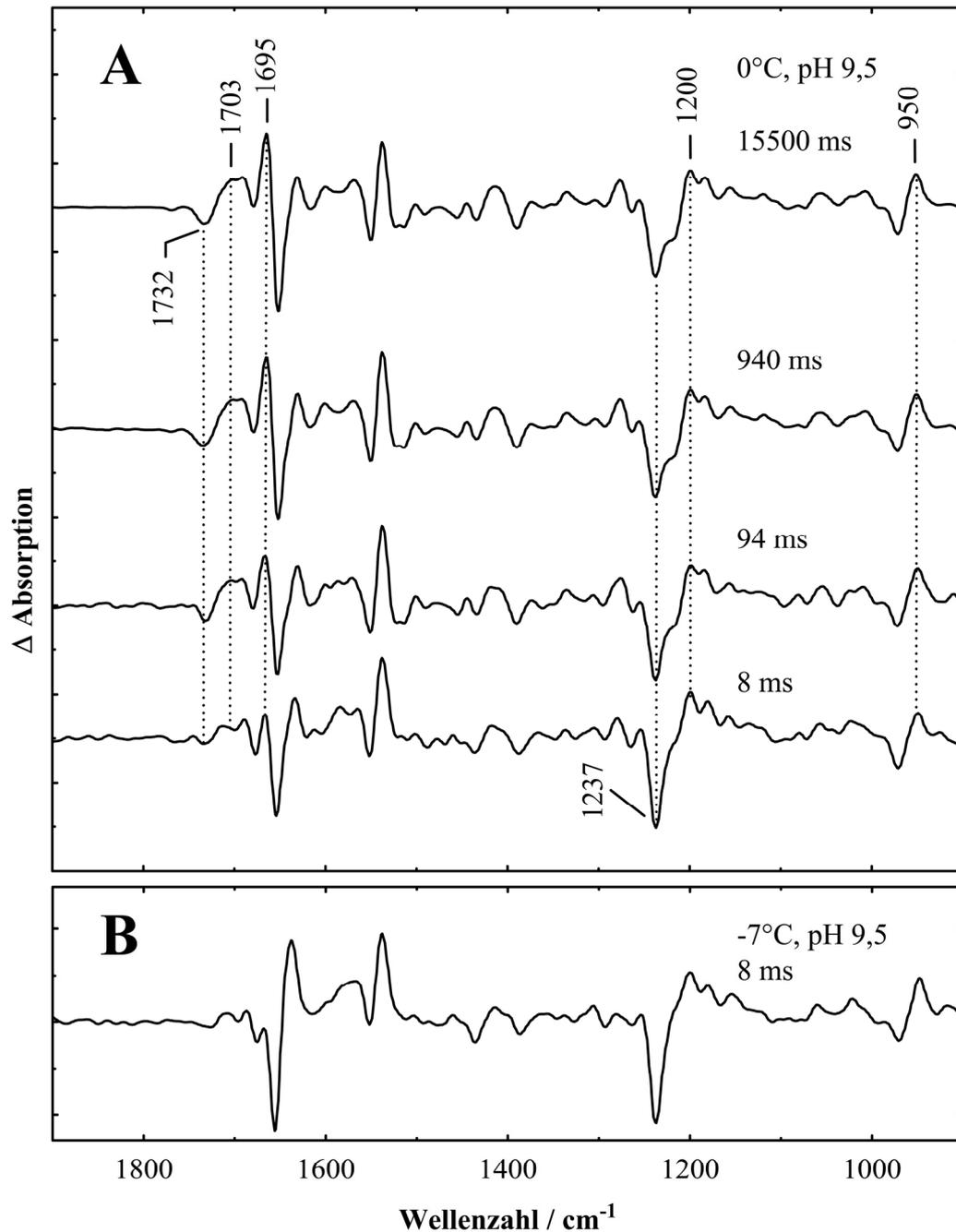


Abb. 3.31: Entsprechende Spektren wie in Abb. 3.30, nur bei 0 °C und pH 9,5 (A), bzw. -7 °C und pH 9,5 (B). Unter diesen Bedingungen ist der Übergang nach Meta II blockiert, sodass die Reaktion nur bis zum Meta I-Zustand abläuft.

8 ms erhalten wurde, ist in Abb. 3.31 B dargestellt. Es entspricht im Großen und Ganzen dem entsprechenden Spektrum bei pH 5,0 (Abb. 3.30 B)

Um den Zeitverlauf der spektralen Übergänge zu analysieren, wurde die Maximum Entropie (ME) inverse Laplace-Transformation angewendet. Abb. 3.32 ist eine zweidimensionale Darstellung der Amplitudenspektren $a(\nu, \lg \tau')$ aus der Transformation des Datensatzes, der bei 0 °C und pH 5,0 aufgenommen wurde. Diese Amplitudenspektren sind als Funktion der

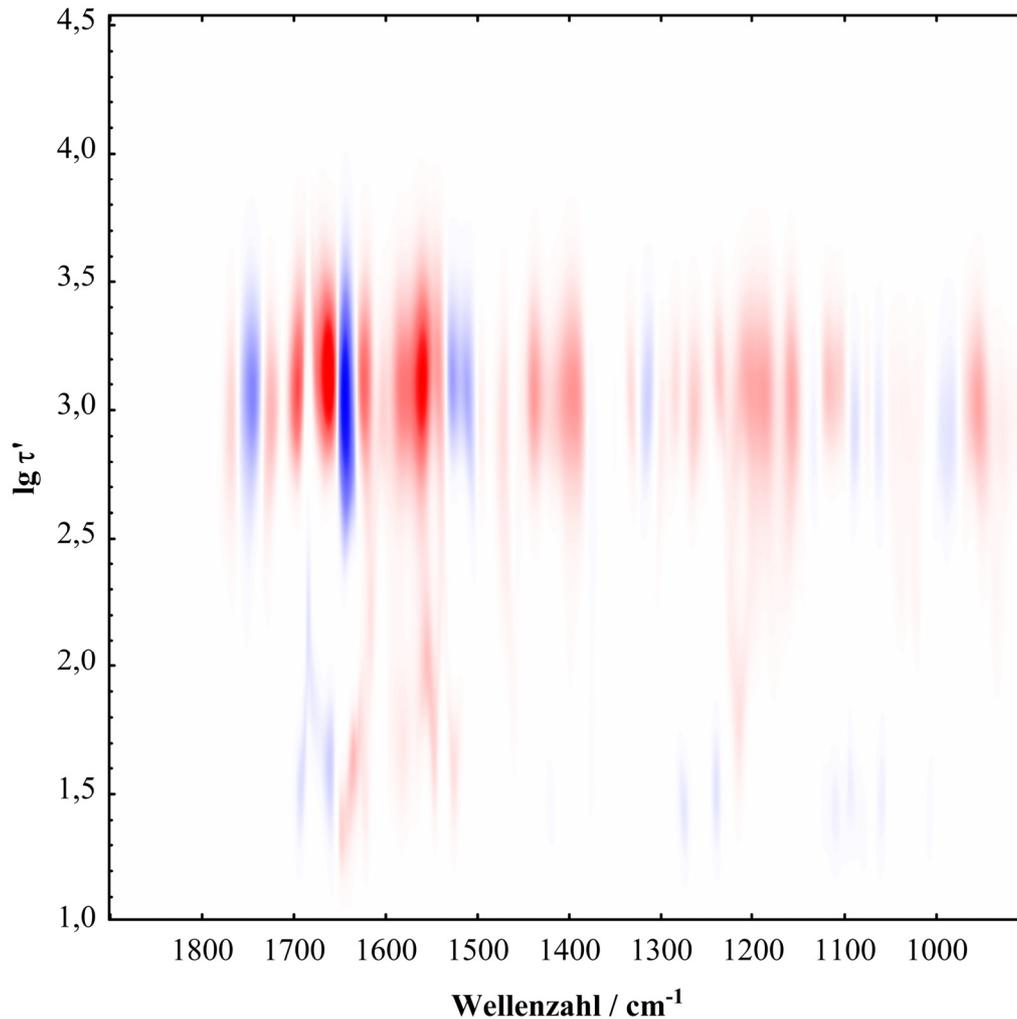


Abb. 3.32: ME inverse Laplace-Transformation des bei 0 °C und pH 5,0 erhaltenen Datensatzes (Abb. 3.30 A). Abgebildet sind die Amplituden $a(\nu, \lg \tau')$ in Abhängigkeit von der Wellenzahl ν und dem dekadischen Logarithmus der dimensionslosen Zeitkonstanten τ' ($\tau' = \tau/ms$). Die negative und positive Absorption der Amplituden ist durch blaue bzw. rote Abstufungen dargestellt. Die beiden Hauptübergänge sind gut erkennbar. Der eine gehört zum Übergang von Lumi nach Meta I, mit dem Mittelpunkt bei ungefähr $\lg \tau' = 1,50$. Der andere entspricht dem Übergang von Meta I nach Meta II mit dem Mittelpunkt um $\lg \tau' = 3,05$.

Wellenzahl ν und des dekadischen Logarithmus der dimensionslosen Zeitkonstanten τ' ($\tau' = \tau/ms$) aufgezeichnet. Die positiven und negativen Intensitäten werden durch rote bzw. blaue Farbabstufungen verdeutlicht. Nach Gleichung 3.2 entspricht ein positiver Wert im Amplitudenspektrum einer Absorption, die während eines Überganges verschwindet. Ein negativer Wert steht für eine auftauchende Absorption. Man erkennt zwei Hauptübergänge um $\lg \tau' = 1,5$ und 3, die die Übergänge von der anfänglichen Mischung aus Lumi und Meta I nach Meta I, bzw. von Meta I nach Meta II abbilden. Für den Übergang von Meta I nach Meta II beträgt die Halbwertsbreite der Verteilung seiner $\lg \tau'$ -Werte ungefähr 0,55. Die Intensitäten der spektralen Änderungen (dargestellt durch die Farbintensität) des ersten Übergangs um $\lg \tau' = 1,5$ fallen deutlich geringer aus als die des zweiten Übergangs um

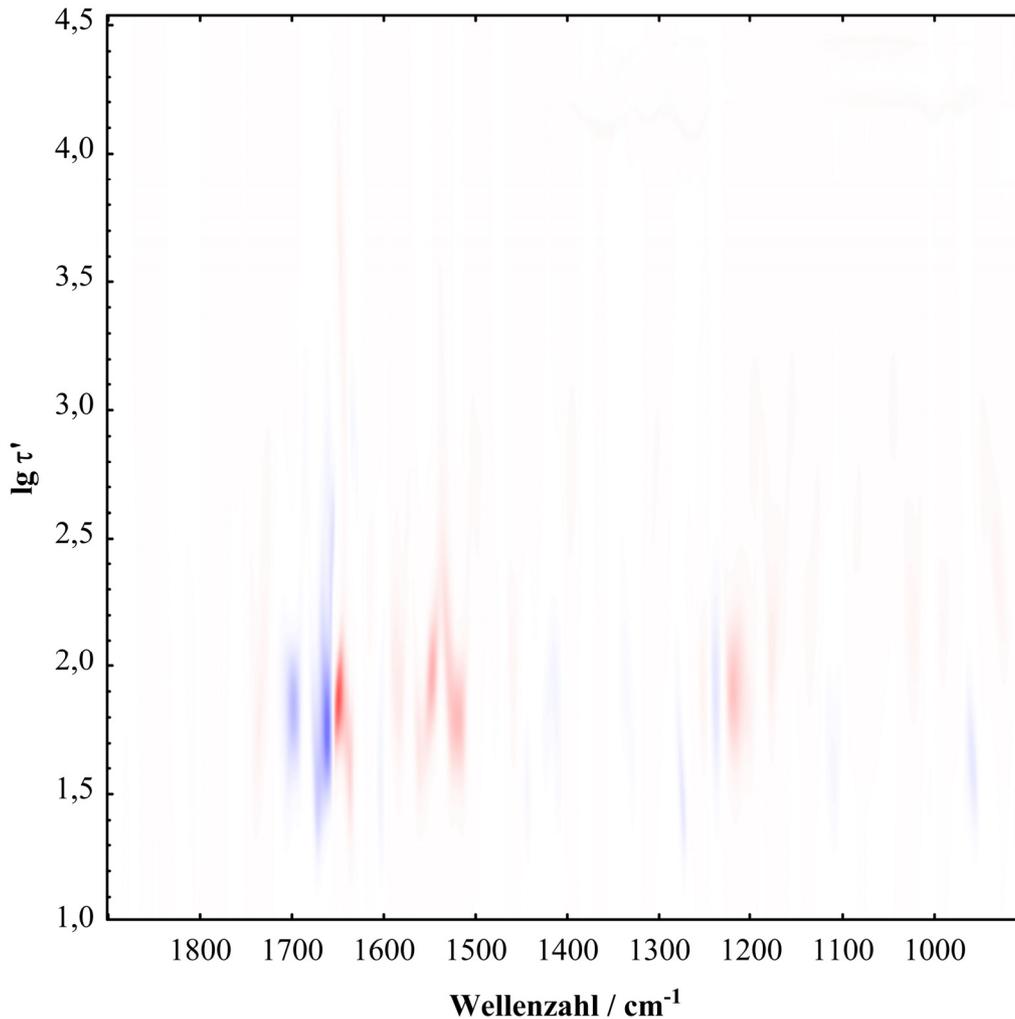


Abb. 3.33: ME inverse Laplace-Transformation des zeitaufgelösten FTIR-Datensatzes aus Abb. 3.31 A, aufgenommen bei 0 °C und pH 9,5. Unter diesen Bedingungen wird nur der Übergang von Lumi nach Meta I beobachtet.

$\lg \tau' = 3,0$. Das liegt hauptsächlich daran, dass die strukturellen Änderungen sowohl des Proteins als auch des Chromophors beim Übergang von Lumi nach Meta I viel geringer sind als beim Übergang von Meta I nach Meta II (vgl. Abb. 3.29). Außerdem wird beim Übergang um $\lg \tau' = 3,0$ der gesamte Meta I nach Meta II-Zerfall abgedeckt, während im frühen Übergang nur ein Teil des Lumi nach Meta I-Zerfalls aufgelöst wird. Das führt natürlich zu einer Verminderung der Bandenintensitäten in den Amplitudenspektren des frühen Übergangs.

In Abb. 3.33 wird eine entsprechende Analyse für den zeitaufgelösten Datensatz gezeigt, der bei 0 °C und pH 9,5 aufgenommen wurde. Hier gibt es nur einen frühen Übergang um $\lg \tau' = 1,8$ für den Zerfall der anfänglichen Lumi/Meta I-Mischung zu Meta I. Der Übergang nach Meta II ist bei diesem alkalischen pH blockiert.

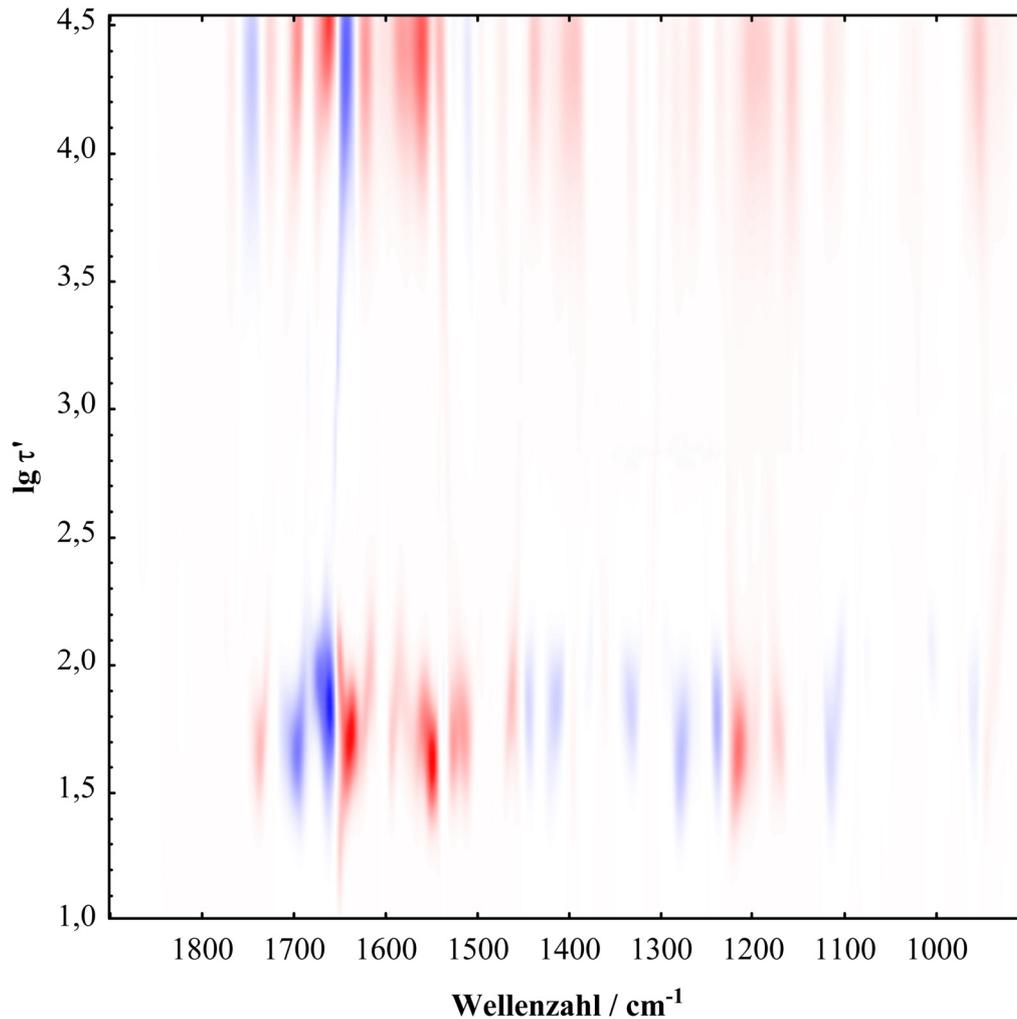


Abb. 3.34: ME inverse Laplace-Transformation des zeitaufgelösten FTIR-Datensatzes, der bei -7 °C und $\text{pH } 5,0$ aufgenommen wurde. Der Übergang um $\lg \tau' = 1,7$ ist der voll aufgelöste Zerfall von Lumi nach Meta I. Am oberen Bildrand ist der Übergang von Meta I in ein thermisches Gleichgewicht zwischen Meta I und Meta II zu erkennen.

Um den Übergang von Lumi nach Meta I zu verlangsamen, wurden zusätzliche Experimente bei -7 °C und $\text{pH } 5,0$, bzw. $\text{pH } 9,5$ aufgenommen. In diesen Experimenten konnte ein augenscheinlich reiner Lumi-Zustand in den frühen Spektren erfasst werden. Der Übergang zu Meta I wurde voll aufgelöst. Die zweidimensionalen Darstellungen der ME inversen Laplace-Transformation für die Datensätze von -7 °C und $\text{pH } 5,0$, bzw. $\text{pH } 9,5$ sind in Abb. 3.34 bzw. Abb. 3.35 gezeigt.

Um die Übergänge eingehender zu untersuchen, wurden die Beträge der Differenzabsorption einer Amplituden für den ihr zugeordneten Wert von $\lg \tau'$ über den gesamten Spektralbereich von 1900 bis 900 cm^{-1} integriert. In Abb. 3.36 A und B sind diese integrierten Absorptionen als eine Funktion von $\lg \tau'$ für die Datensätze, die bei 0 °C und $\text{pH } 5,0$ bzw. $\text{pH } 9,5$ gemessen wurden, aufgetragen. In dieser Darstellung wird der Verteilungscharakter der Amplituden

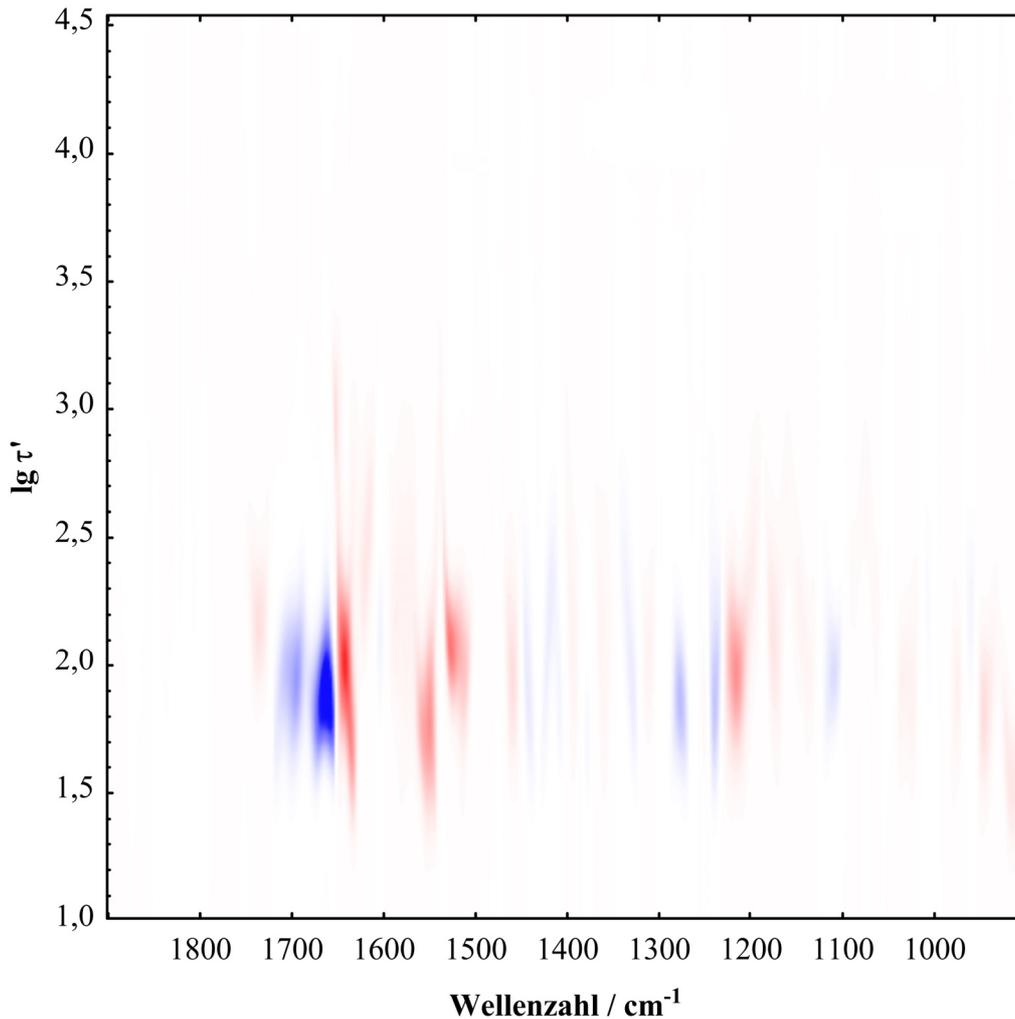


Abb. 3.35: ME inverse Laplace-Transformation des zeitaufgelösten FTIR-Datensatzes, der bei -7°C und $\text{pH } 9,5$ aufgenommen wurde. Der Übergang um $\lg \tau' = 1,9$ ist der vollständig aufgelöste Zerfall von Lumi nach Meta I.

offensichtlicher. Die Positionen der Maxima der glockenförmigen Kurven entspricht dem wahrscheinlichsten Wert für das zum entsprechenden Übergang gehörenden $\lg \tau'$. Im Fall des Übergangs von Meta I nach Meta II in Abb. 3.36 A liegt das entsprechende Maximum bei $\lg \tau' = 3,05$, was einer Zeitkonstante von etwa 1100 ms entspricht. Die Fläche unter den glockenförmigen Maxima spiegelt die globalen Absorptionsänderungen des entsprechenden Übergangs wider. Abb. 3.36 C und D zeigt die integrierten Absorptionen der Datensätze von -7°C und $\text{pH } 5,0$, bzw. $\text{pH } 9,5$. Die Maxima entsprechen dem Übergang nach Meta I und liegen für $\text{pH } 5,0$ bei $\lg \tau' = 1,70$ (50 ms) und für $\text{pH } 9,5$ bei $\lg \tau' = 1,90$ (79 ms). Dies zeigt, dass der Übergang bei $\text{pH } 5,0$ etwas schneller vonstatten geht als bei $\text{pH } 9,5$. Der gleiche

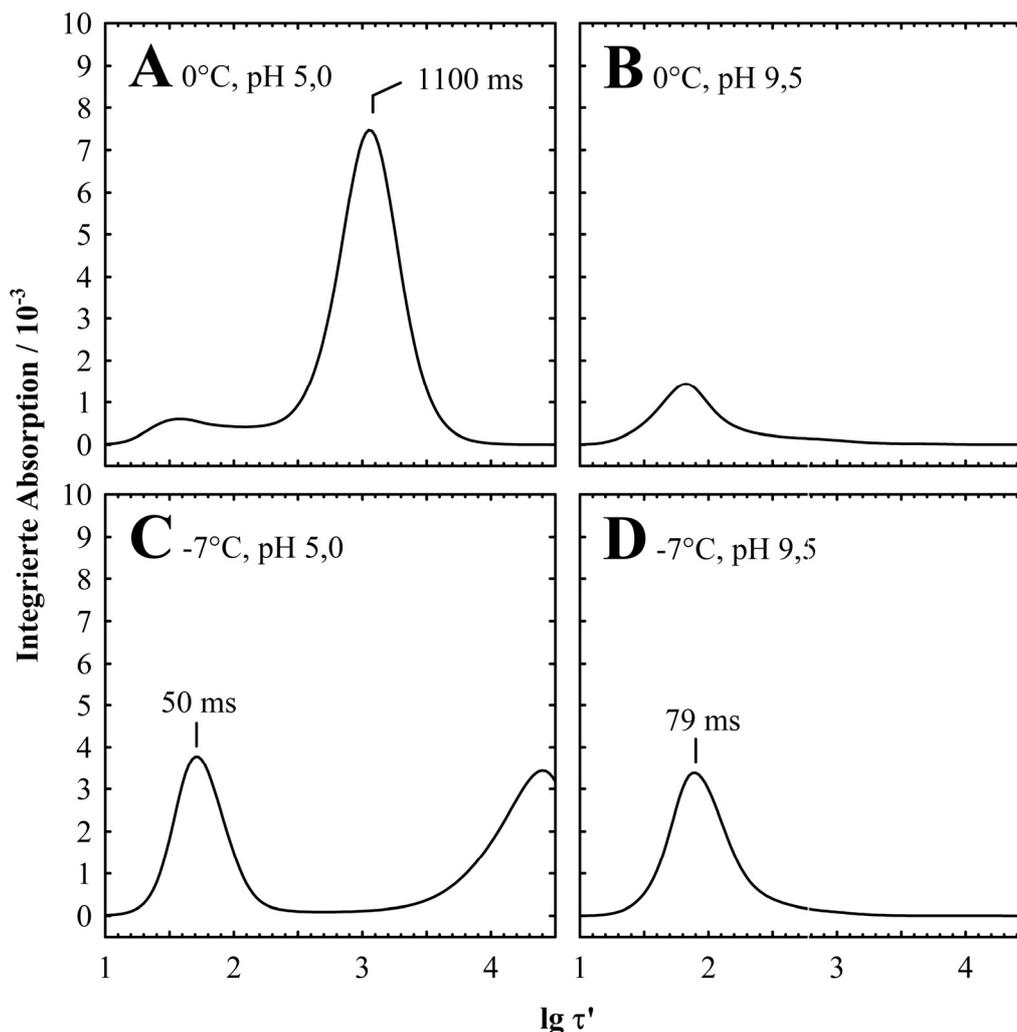


Abb. 3.36: Die integrierte Absorption der Amplituden aufgetragen gegen den dekadischen Logarithmus der dimensionslosen Zeitkonstante τ' ($\tau' = \tau/\text{ms}$). Die Beträge der Differenzabsorption der in Abb. 3.32 bis Abb. 3.35 dargestellten Amplitudenspektren wurden über den spektralen Bereich von 1900 bis 900 cm^{-1} integriert: bei 0 °C und pH 5,0 (A) bzw. pH 9,5 (B) sowie bei -7 °C und pH 5,0 (C) bzw. pH 9,5 (D). Die Glockenkurven stehen jeweils für exponentielle Zerfallsprozesse und haben ihre Maxima beim wahrscheinlichsten Wert für $\lg \tau'$. Die Fläche unter jedem glockenförmigen Maximum hängt von dem jeweiligen Übergang ab. In den Datensätzen bei 0 °C wurde der frühe Übergang von Lumi zu Meta I nicht voll aufgelöst, was sich sowohl auf die Position als auch auf die Amplitude auswirkt.

Schluss kann auch aus dem Vergleich der schnellen Übergänge bei 0 °C gemacht werden. Da der Übergang hier jedoch nicht vollständig aufgelöst wurde, ist bei 0 °C nur eine qualitative Beurteilung möglich. In den Datensätzen von -7 °C wird der gesamte Übergang von Lumi nach Meta I aufgelöst. Deshalb erscheinen die damit verbundenen Maxima um einiges größer als die des frühen Übergangs bei 0 °C, wo nur ein Teil des Lumi-Zerfalls erfasst wurde. Bei -7 °C und pH 5,0 gibt es noch ein zusätzliches Maximum bei $\lg \tau' > 4$. Es gehört zu dem stark verlangsamten Übergang von Meta I zu einem Gleichgewicht zwischen Meta I und Meta II, was sich unter diesen Bedingungen bei ungefähr der Hälfte des Gesamtübergangs einpendelt.

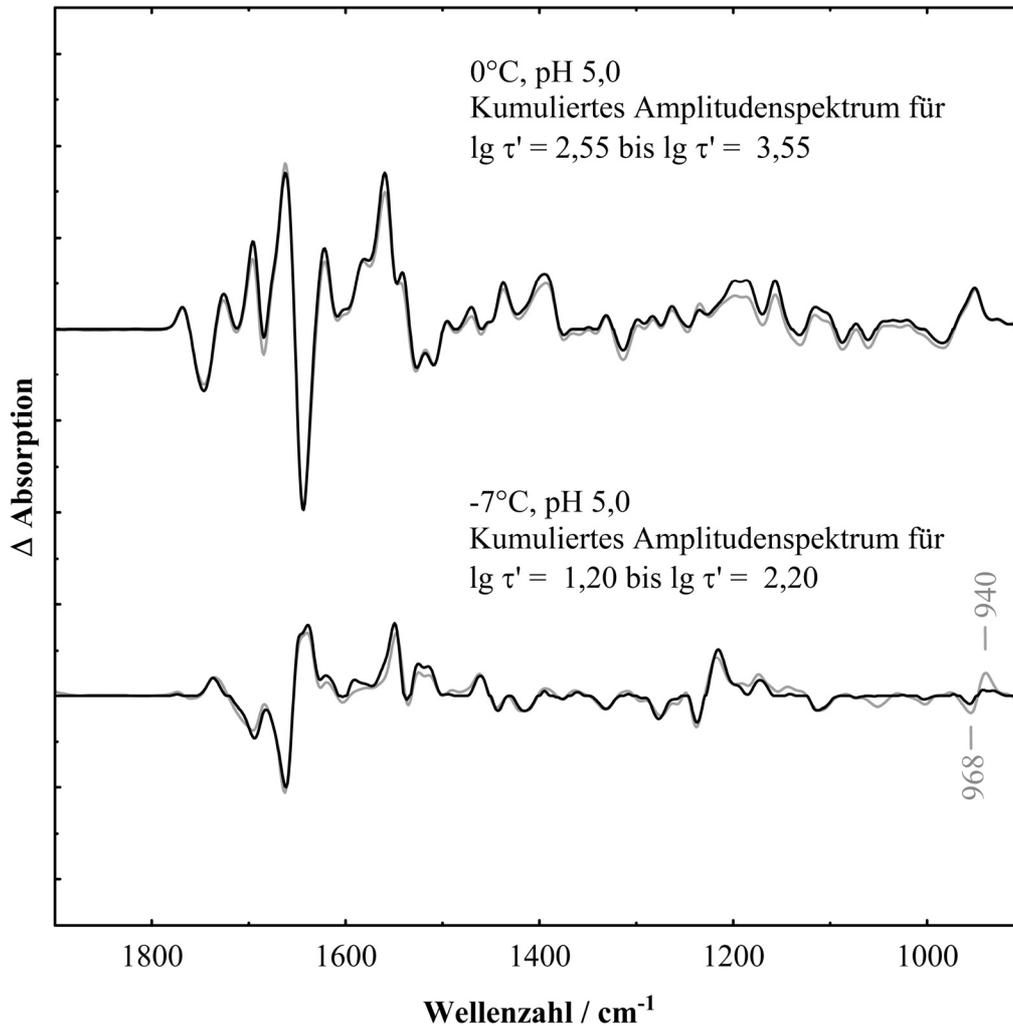


Abb. 3.37: Kumulierte Amplitudenspektren der zeitaufgelösten Daten im Vergleich zu Spektren, die aus Tieftemperatur-Messungen erhalten wurden. Durch Aufaddieren der Amplitudenspektren aus der ME inversen Laplace-Transformation des Datensatzes von 0 °C und pH 5,0 zwischen $\lg \tau' = 2,55$ und 3,55 (oben, schwarz) wird der Übergang von Meta I nach Meta II dargestellt, durch Aufaddieren der Amplitudenspektren aus dem Datensatz von -7 °C und pH 5,0 zwischen $\lg \tau' = 1,20$ und 1,22 (unten, schwarz) der Übergang von Lumi nach Meta I. Diese zeitaufgelösten Spektren werden mit Referenzspektren für die entsprechenden Übergänge verglichen (grau). Diese wurden aus Differenzspektren berechnet, die von Tieftemperatur-Messungen stammen. Die Messbedingungen dabei waren 0 °C für Meta II, -20 °C für Meta I und -80 °C für Lumi, alle bei pH 5,0 (vgl. Abb. 3.30).

In Abb. 3.37 werden die kumulierten Amplitudenspektren der in den zeitaufgelösten Messungen detektierten Übergänge mit entsprechenden Spektren verglichen, die aus den Spektren von Tieftemperatur-stabilisierten Intermediaten stammen. Die kumulierten Amplitudenspektren eines Übergangs wurden erhalten, indem die Summe der Amplituden $a(\nu, \lg \tau')$ des zeitaufgelösten Datensatzes über den Bereich gebildet wurde, der für den entsprechenden Übergang relevant ist. Im Fall des Übergangs von Lumi nach Meta I wurde dafür der Bereich zwischen $\lg \tau' = 1,20$ und 2,20 des Datensatzes gewählt, der bei -7 °C und pH 5,0 erhalten wurde. Für den Übergang von Meta I nach Meta II wurden die Amplituden

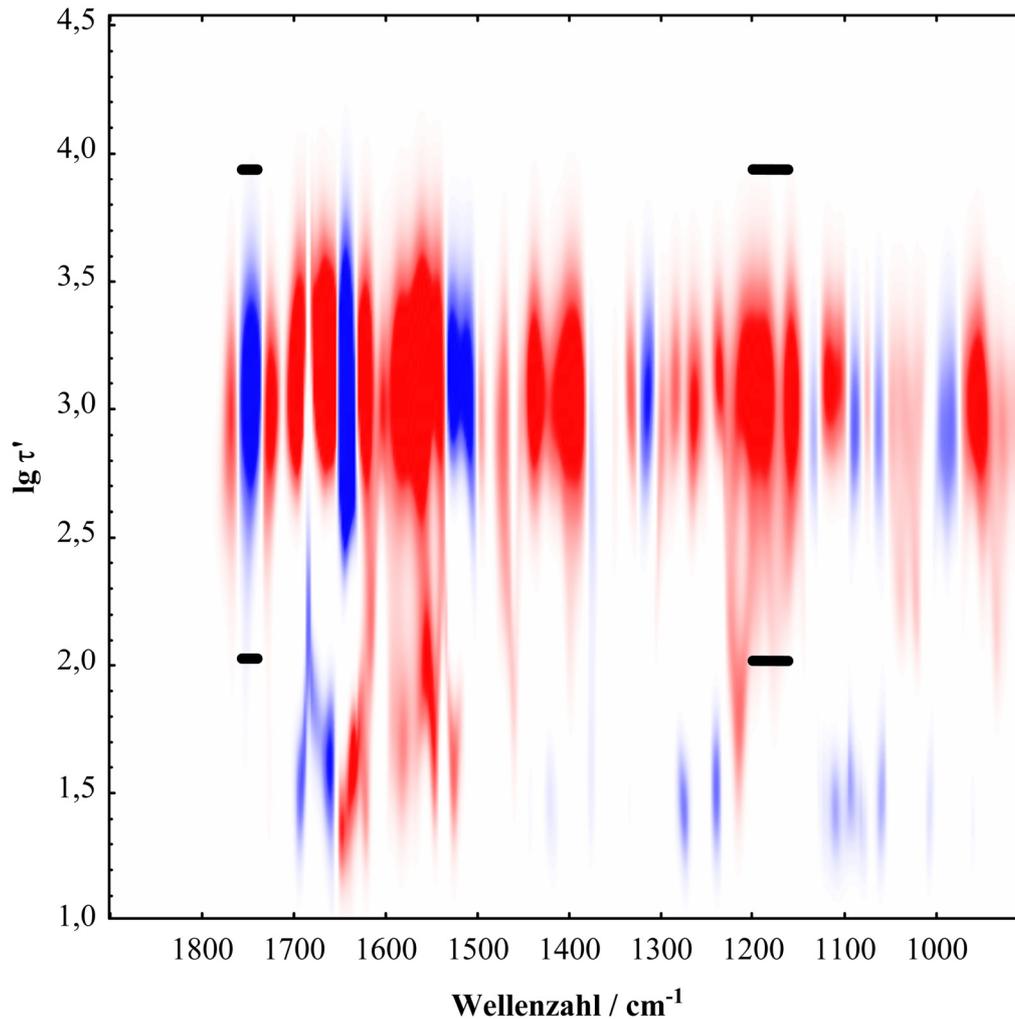


Abb. 3.38: Die ME inverse Laplace-Transformation des zeitaufgelösten Datensatzes, aufgenommen bei 0 °C und pH 5,0 aus Abb. 3.32, sind hier noch einmal mit einem verschobenen Farbgradienten dargestellt. Dadurch werden kleine spektrale Änderungen im Bereich zwischen $\lg \tau' = 2,0$ und $2,5$, d. h. zwischen den beiden Hauptübergängen von Lumi nach Meta I und von Meta I nach Meta II, stärker hervorgehoben. Durch schwarze Balken sind die Wellenzahlbereiche gekennzeichnet, deren gemittelte Absorptionsänderung in Abb. 3.39 A gezeigt wird.

zwischen $\lg \tau' = 2,55$ und $3,55$ des Datensatzes bei 0 °C und pH 5,0 verwendet. Die Vergleichsspektren sind Doppeldifferenzspektren aus den Differenzspektren der beteiligten Intermediate, die in Abb. 3.29 dargestellt sind. Wie aus Abb. 3.37 oben deutlich wird, stimmt das kumulierte Amplitudenspektrum des Übergangs von Meta I nach Meta II aus den zeitaufgelösten Messungen sehr schön mit dem berechneten Vergleichsspektrum aus den statischen Messungen überein. Dasselbe trifft auch für das kumulierte Amplitudenspektrum des Übergangs von Lumi nach Meta I zu (Abb. 3.37, unten), mit Ausnahme einer Differenzbande bei 955 (-)/ 940 (+) cm^{-1} für die HOOP-Moden des Chromophors. Diese fällt im aus dem zeitaufgelösten Datensatz abgeleiteten Spektrum kleiner aus. Der Grund dafür ist, dass diese Bande im zeitaufgelösten Lumi-Zustand mit 948 cm^{-1} (vgl. Abb. 3.30 B) viel näher

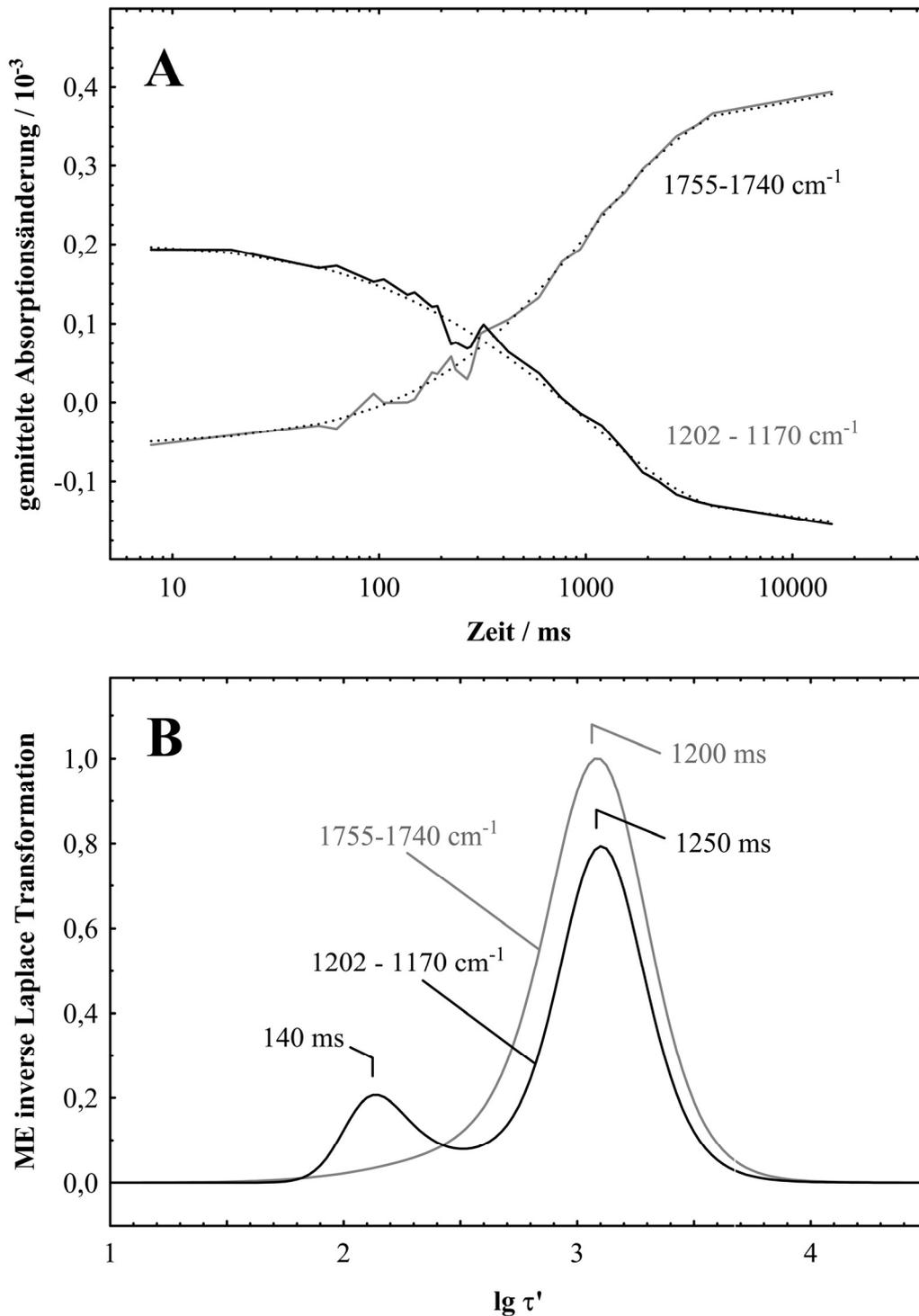


Abb. 3.39: A zeigt die Zeitverläufe der in Abb. 3.38 durch schwarze Balken markierten Spektralbereiche. Hierfür wurden die Absorptionsänderungen im zeitaufgelösten Datensatz über den Spektralbereich von 1755 bis 1740 cm^{-1} (grau) und 1202 bis 1170 cm^{-1} (schwarz) gemittelt. Der Bereich zwischen 1755 und 1740 cm^{-1} enthält dabei Absorptionsänderungen von Asp 83 und Glu 122, die den Konformationsübergang zum aktiven Meta II-Zustand widerspiegeln. Der Bereich zwischen 1202 und 1170 cm^{-1} enthält dagegen Absorptionsänderungen der Fingerprintheaden des Chromophors, die mit der Deprotonierung der Schiffbase zusammenhängen. B zeigt ME inverse Laplace-Transformation des in A gezeigten Zeitverlaufs. Die beiden Kurven sind auf den Maximalwert von $1,8 \cdot 10^{-5}$ normiert. Für die Absorptionsbande von 1755 bis 1740 cm^{-1} gibt es nur ein Maximum bei $\lg \tau' = 3,08$ (1200 ms, grau). Für die spektralen Änderungen zwischen 1202 und 1170 cm^{-1} (schwarz) existieren zwei Komponenten mit Maxima bei $\lg \tau' = 2,15$ und $\lg \tau' = 3,10$, was 140 bzw. 1250 ms entspricht. Ihre relativen Beiträge zur gesamten Absorptionsänderung betragen 17 % bzw. 83 %. Die Laplace-Transformationen der in B gezeigten Fits sind in A als gepunktete Kurven dargestellt.

an der Meta I-Position ist (950 cm^{-1}) als bei Tieftemperatur-stabilisiertem Lumi (942 cm^{-1}). Ein ähnlicher Befund ergibt sich aus den Messungen bei -7 °C und pH 9,5 (ohne Abb.). Im folgenden wird der Übergang von Meta I nach Meta II aus dem Datensatz von 0 °C und pH 5,0 noch einmal genauer betrachtet. Die ME inverse Laplace-Transformation aus Abb. 3.32 wird in Abb. 3.38 noch einmal, aber mit einem verschobenen Farbgradienten gezeigt, um kleinere spektrale Details besser erkennen zu können. Dabei fallen Banden um 1200 und 1180 cm^{-1} auf, die sich bis in den Bereich zwischen $\lg \tau' = 2,0$ und $2,5$, also in den Bereich vor dem Übergang von Meta I nach Meta II, hineinziehen. Diese Banden sind Fingerprint-Moden des Chromophors, die sich hauptsächlich aus C-C-Streckschwingungen zusammensetzen. Die positiven Beiträge im Amplitudenspektrum stehen für einen Absorptionsrückgang. Da die Intensität dieser Fingerprintbanden von dem Protonierungszustand der Schiffbase abhängt (Siebert et al., 1983), zeigt sich durch diesen Rückgang eine partielle Deprotonierung der Schiffbase. Ähnlich begründen lassen sich vermutlich auch Intensitätsänderungen um 1555 cm^{-1} , die Ethylen-Moden des Chromophors enthalten und eine Bande um 1220 cm^{-1} , die wahrscheinlich auch eine Fingerprint-Mode ist. Diese Intensitäten sind allerdings von Banden des Lumi nach Meta I-Überganges überlagert und taugen deshalb nicht für eine eingehendere Analyse. Zusätzlich gibt es noch andere kleinere Banden in diesem $\lg \tau'$ -Bereich, für die aber eine Zuordnung fehlt, wie z. B. die bei 1460 cm^{-1} . Abb. 3.39 A zeigt den zeitlichen Verlauf der Absorption des Mittels der zeitaufgelösten Daten im Bereich zwischen 1202 und 1170 cm^{-1} (schwarze Kurve). Dieser gemittelte Zeitverlauf wurde dann durch ME inverse Laplace-Transformation analysiert. Wegen dem durch die Mittelung höheren Signal/Rausch-Verhältnis konnte ein Regularisierungsparameter verwendet werden, der die Entropiefunktion etwas weniger gewichtet und deshalb auch die Auflösung kleinerer Beiträge erlaubt. Im Gegensatz zum ansonsten verwendeten Wert von $10^{-5,00}$ wurde hier ein Regularisierungsparameter von $10^{-5,75}$ verwendet. Daraus ergaben sich in der Verteilung der Zeitkonstanten zwei klar voneinander getrennte Komponenten, eine mit dem Maximum bei $\lg \tau' = 3,10$ (1250 ms), was dem Übergang von Meta I nach Meta II entspricht, und eine bei $\lg \tau' = 2,15$ (140 ms). Als Referenz für ausschließlich den Konformationsübergang von Meta I nach Meta II wurde die C=O-Streckschwingungsabsorption der protonierten Carbonsäuren Asp 83 und Glu 122 herangezogen, die sich in Meta II zu einer starken Bande bei 1745 cm^{-1} vereinigen (vgl. 3.1.1). Der Zeitverlauf der gemittelten Absorption zwischen 1755 und 1740 cm^{-1} ist in Abb. 3.39 A in grau dargestellt. Die ME inverse Laplace-Transformation liefert eine Komponente mit einem Maximum bei $\lg \tau' = 3,08$ (1200 ms). Diese Ergebnisse legen nahe, dass es bei

einem Anteil von 15 bis 20 % des Photoprodukts schon vor dem eigentlichen Übergang nach Meta II zu einer Deprotonierung der Schiffbase kommt.

In der farbintensiveren Darstellung in Abb. 3.38, scheinen sich einige der Banden, die zu dem frühen Übergang der anfänglichen Mischung aus Lumi und Meta I nach Meta I gehören, bis zu Werten von $\lg \tau' = 2,0$ herauszuziehen. Ähnliche Abweichungen kann man auch bei pH 9,5 erkennen (Abb. 3.33), allerdings für andere Banden. So eine heterogene Verteilung der Amplitudenbanden wird in den zeitaufgelösten Datensätzen, die bei -7°C aufgenommen wurden, nicht beobachtet (Abb. 3.34 und Abb. 3.35). Der Übergang ist hier voll aufgelöst und erscheint deshalb ungleich intensiver. Die scheinbare Heterogenität des frühen Übergangs in den bei 0°C aufgenommenen Datensätzen ist von daher wahrscheinlich ein Artefakt, bedingt durch die geringe Intensität der beteiligten Banden. Die relativ grobe Zeitauflösung der Rapid-Scan-Methode, mit nur fünf Datenpunkten im Zeitbereich bis 100 ms, trägt wahrscheinlich zu diesem Effekt bei.

3.4.3 Zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Differenzspektroskopie, analysiert mit globalem multi-exponentiellem Fit

Alle Datensätze wurden auch mit einem globalen multi-exponentiellen Fit ausgewertet, was allerdings zu anderen Ergebnissen führte. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse für den bei 0°C und pH 5,0 aufgenommenen Datensatz gezeigt. Dabei wird im Detail begründet, weshalb die so erhaltenen Ergebnisse nicht nur von den vorherigen abweichen, sondern sogar falsch sind.

Abb. 3.40 zeigt die Amplitudenspektren, die aus einem globalen Fit von drei Exponentialfunktionen an den zeitaufgelösten Datensatz gemäß Gleichung 3.1 erhalten wurden. Mindestens drei Exponentialfunktionen waren notwendig, um beide in diesem Datensatz beteiligten Hauptübergänge zu erfassen. Das Amplitudenspektrum zur Exponentialfunktion mit der Zeitkonstante $\tau_1 = 24$ ms beschreibt den Übergang von dem anfänglichen Gemisch aus Lumi und Meta I nach Meta I. Bei einem Vergleich mit den saubereren Lumi nach Meta I-Übergangsspektren aus Abb. 3.37 fällt auf, dass dieses Amplitudenspektrum mit Banden bei 1768, 1752, 1728, 1643 und 1560 cm^{-1} bereits kleine Anteile des Meta I/Meta II-Überganges beinhaltet. Bei dem hier eindeutig ersichtlichen schlechten Signal/Rausch-Verhältnis dieses ersten Übergangs ist es allerdings nicht verwunderlich, wenn die beiden Übergänge nicht korrekt getrennt werden. Erstaunlich ist allerdings, dass der Übergang von Meta I nach Meta II in zwei Komponenten mit spektral ähnlichen Amplitudenspektren aufgespaltet wird. Die frühere Komponente mit $\tau_2 = 847$ ms

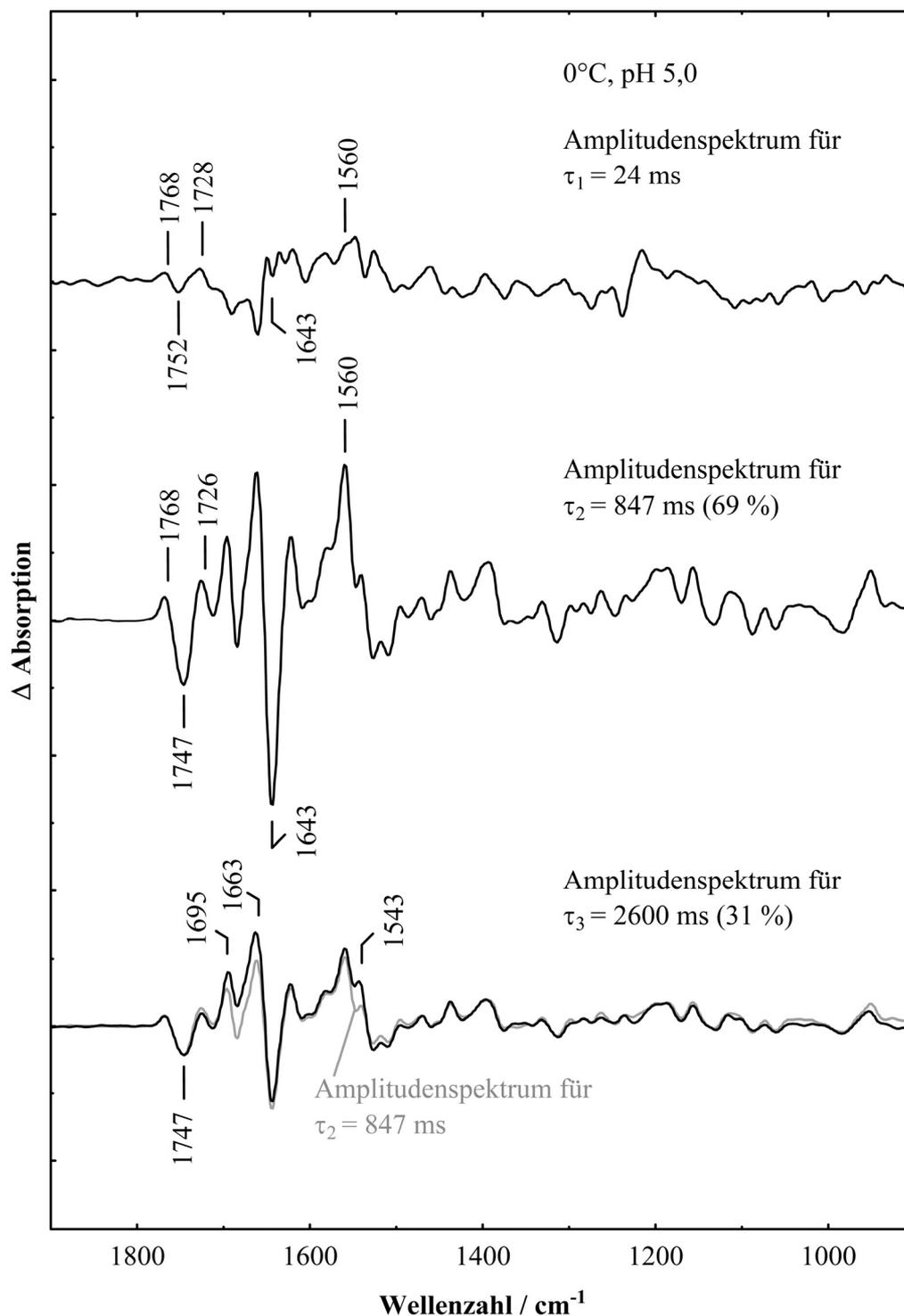


Abb. 3.40: Amplitudenspektren und Zeitkonstanten eines globalen Fits des bei 0 °C und pH 5,0 erhaltenen Datensatzes von Abb. 3.30 an drei Exponentialfunktionen gemäß Gleichung 3.1. Das Amplitudenspektrum für $\tau_1 = 24$ ms entspricht dem Übergang des Gemischs von Lumi und Meta I nach Meta I. Unterschiede zum Spektrum des Lumi/Meta I-Übergangs in Abb. 3.37 lassen sich durch Rauschen sowie Beimischungen von Beiträgen des Meta I/Meta II-Übergangs erklären. Der Übergang von Meta I nach Meta II wird in zwei Komponenten mit den Zeitkonstanten $\tau_2 = 847$ ms (Mitte) und $\tau_3 = 2600$ ms (unten) aufgespalten, die 69 bzw. 31 % zum Gesamtübergang beitragen. Zum Vergleich wurde das Amplitudenspektrum von τ_2 auf das von τ_3 skaliert und unten noch einmal dargestellt (grau).

macht ungefähr 69 % des Gesamtübergangs aus, die späte mit $\tau_3 = 2600$ ms 31 % (gemessen an der Asp 83/Glu 122-Bande bei 1747 cm^{-1}). Wird das Amplitudenspektrum von τ_2 auf die Bande bei 1747 cm^{-1} des Amplitudenspektrums von τ_3 skaliert, beschränken sich die spektralen Unterschiede auf abweichende Intensitäten der Amid-Banden bei 1695, 1663 und 1543 cm^{-1} (Abb. 3.40).

Abb. 3.41 soll verdeutlichen, wo die Unterschiede zwischen den Ergebnissen liegen, die entweder durch globalen multi-exponentiellen Fit oder aus ME inverser Laplace-Transformation erhaltenen wurden. Hierfür wurden zunächst drei Gauß-Verteilungen um die $\lg \tau'$ -Werte angenommen, die den aus dem globalen multi-exponentiellen Fit erhaltenen Zeitkonstanten 24, 847 und 2600 ms entsprachen. Die Beträge der Flächen unter diesen künstlich generierten Verteilungen sollten dabei mit den Beträgen der integrierten Absorption der in Abb. 3.40 gezeigten Amplitudenspektren übereinstimmen. Aus diesen Verteilungen wurde eine Funktion zusammengesetzt und an die integrierte Absorptionskurve für den Datensatz von $0\text{ }^\circ\text{C}$, pH 5,0 aus Abb. 3.36 A angepasst. Aus dieser Anpassung ergaben sich dann die jeweiligen Breiten der drei Verteilungen. So wurde eine integrierte Absorptionskurve erhalten, deren Maxima den Zeitkonstanten entsprachen, die der globale multi-exponentielle Fit geliefert hat und gleichzeitig die größtmögliche Näherung an diejenige Kurve darstellten, die mit Hilfe von ME inverser Laplace-Transformation berechnet wurde.

Verwunderlich ist zunächst, dass im globalen multi-exponentiellen Fit eine dritte, späte Komponente eingefügt wird (Verteilung 3), die offensichtlich nicht von der breiten Verteilung der mit ME inverser Laplace-Transformation berechneten möglichen Amplitudenspektren abgedeckt wird. Dieses Phänomen kommt wahrscheinlich durch die zeitabhängige Gewichtung der für den globalen multiexponentiellen Fit verwendeten Messdaten zustande. Da die Messdaten mit einer quasi-logarithmischen Zeitbasis aufgenommen wurden, d. h. einer zu späteren Zeitpunkten ansteigenden Anzahl von gemittelten Scans, ist das Signal/Rausch-Verhältnis für solche späteren Messpunkte entsprechend höher als für frühere Zeitpunkte. Um der dadurch bedingten stark unterschiedlichen Zuverlässigkeit der Messpunkte Rechnung zu tragen, ist es sinnvoll, die Datenpunkte entsprechend der Anzahl der für sie gemittelten Scans zu gewichten. Die korrekte Gewichtung ergibt sich hierbei aus statistischen Überlegungen. Problematisch wird dieses Verfahren, wenn die Verteilung der Amplitudenspektren für einen Übergang sehr breit ist, wie bei dem Übergang von Meta I nach Meta II wahrscheinlich der Fall. Um eine möglichst große globale Näherung an diesen extrem breiten Übergang zu finden, werden wahrscheinlich zwei exponentielle Zerfälle benötigt. Dabei würde man zwei

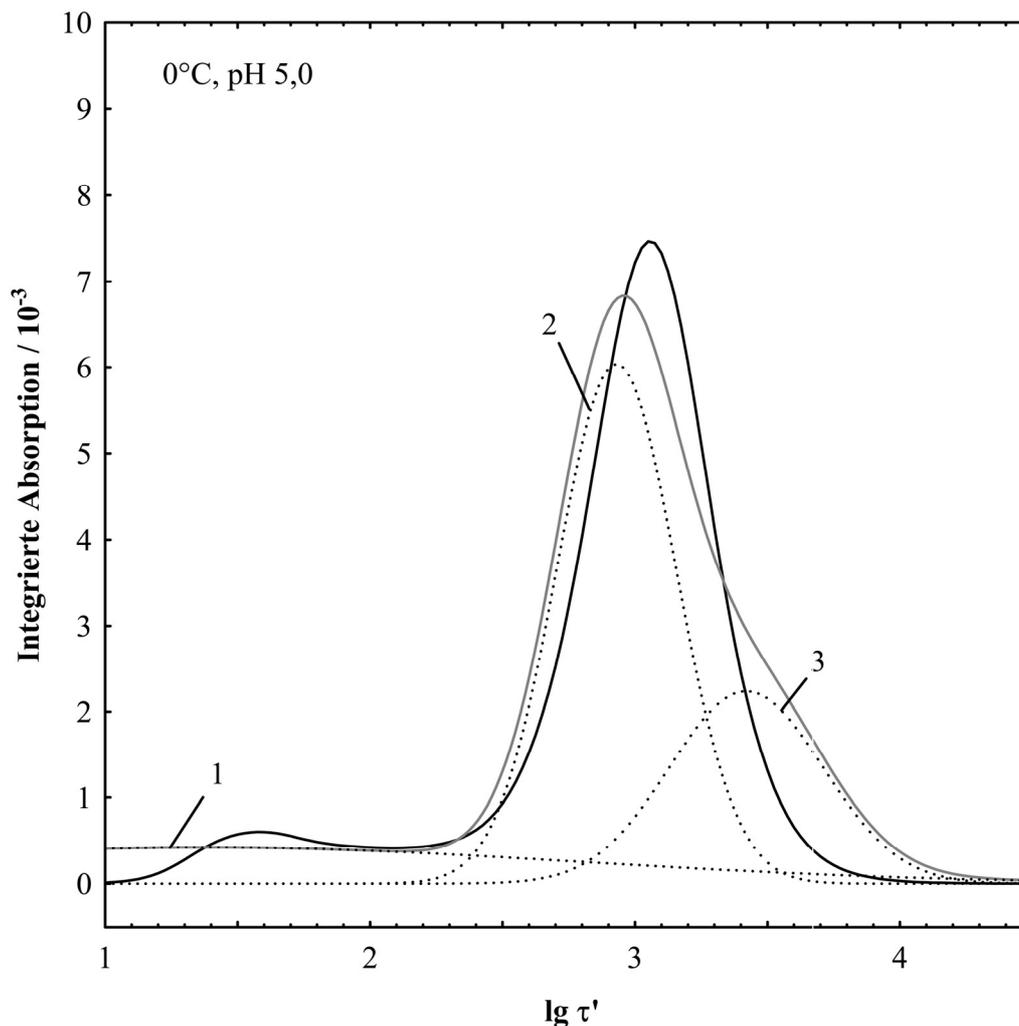


Abb. 3.41: Vergleich der Ergebnisse aus ME inverser Laplace-Transformation und multi-exponentiellem Fit. Es wurden künstlich Verteilungen um die $\lg \tau'$ -Werte generiert (gepunktet), die den Zeitkonstanten aus dem globalen multi-exponentiellen Fit entsprechen ($\tau_1 = 24$ ms, $\tau_2 = 47$ ms, $\tau_3 = 2600$ ms). Die Funktion aus der Summe dieser Verteilungen (grau) wurde an die integrierte Absorptionskurve aus Abb. 3.36 A (schwarz) angepasst.

Zerfälle erwarten, die Zeitkonstanten haben, deren $\lg \tau'$ -Werte beide in der Nähe des Maximums der breiten Verteilung aus der ME inversen Laplace-Transformation liegen. Durch die zeitabhängige Gewichtung werden allerdings spätere Übergänge höher gewichtet und dadurch der zweite Übergang nach hinten verschoben. Gefördert wird dieser Effekt eventuell noch durch Baseline-Instabilitäten, die keine statistisch erfassbare Fehlerquelle darstellen. Diese äußern sich meist als zeitlich linear anwachsende Störungen im Bereich zwischen 1730 und 1530 cm^{-1} . Für kurze Messzeiten sind diese Effekte zu vernachlässigen. Im Fall des Datensatzes von 0 °C und pH 5,0 sind die Zeitpunkte, in denen solche Effekte die wahrscheinlich stärksten Beiträge haben, gleichzeitig die Datenpunkte mit der größten Gewichtung. Da die Baseline-Instabilitäten keinen exponentiellen Zerfall beschreiben, entsteht im Fit ein Amplitudenspektrum, was sowohl die durch die Baseline-Instabilitäten

bedingten spektralen Änderungen, als auch Beiträge des echten exponentiellen Zerfalls von Meta I nach Meta II enthält (Abb. 3.40). Da die Datenpunkte in diesem kritischen Bereich zeitlich sehr weit auseinander liegen, lassen sich die gemessenen Daten durch so einen Fit trotz der in Abb. 3.41 gezeigten Abweichungen zu den real existierenden Verteilungen von möglichen Amplitudenspektren sehr gut beschreiben.

Das Maximum der berechneten integrierten Absorption für den Übergang von Meta I nach Meta II ist gegenüber der aus der ME inversen Laplace-Transformation erhaltenen integrierten Absorption zu einem kleineren $\lg \tau'$ -Wert verschoben (Verteilung 2). Das hängt damit zusammen, dass die $\lg \tau'$ -Werte der Verteilungen für verschiedene Wellenzahlen innerhalb des Übergangs von Meta I nach Meta II voneinander abweichen (Abb. 3.32). Gerade die Verteilungen im Amid-Bereich, die einen großen Beitrag zur integrierten Absorption leisten, sind eher größeren Werten für $\lg \tau'$ zugeordnet, was das Maximum der über den gesamten spektralen Bereich integrierten Absorption zu größeren $\lg \tau'$ -Werten verschiebt. Der globale multi-exponentielle Fit hingegen arbeitet mit einer Wellenzahl-abhängigen Gewichtung, um Spektralbereiche mit eher schlechterem Signal/Rausch-Verhältnis, wie z. B. den Amid-Bereich, weniger für den Fit zu berücksichtigen.

Für die Position der beiden späteren Übergänge sind also Artefakte verantwortlich, die sich aus einem unglücklichen Zusammenspiel der intrinsischen Eigenschaften des Systems, wie der Breite des Meta I/Meta II-Überganges, und den Fit-Parametern ergeben. Die Unsicherheit des Fits für den frühen Übergang ergibt sich hingegen aus dem schlechten Signal/Rausch-Verhältnis des Datensatzes in diesem Zeitbereich. Dadurch liegen viele spektrale Änderungen des Lumi-Zerfalls unter der durch die zeitliche Gewichtung bestimmten Rauschschwelle. Außerdem gibt es für einen korrekten Fit des Lumi-Zerfalls zu wenig Messpunkte, wodurch der Fit hinsichtlich der Zeitkonstante des schnellen Zerfalls nicht eindeutig ist. Daraus ergibt sich dann eine stark fehlerbehaftete schnelle Komponente mit einer Amplitude, die auch Beiträge des Meta I-Zerfalls beinhaltet (Abb. 3.40). In Abb. 3.41 äußert sich diese Unsicherheit dadurch, dass Verteilung 1 so breit ist, dass sie ein Plateau bildet, das sich bis weit in den Meta I/Meta II-Übergang erstreckt. Da die Verteilung extrem flach ist, wird der Fehler, der durch diese schnelle Komponente eingeführt wird, beim Fit vernachlässigt bzw. fällt nicht weiter auf.

Eventuell könnten die hier beschriebenen Probleme umgangen werden, indem man den Datensatz vor dem globalen multi-exponentiellen Fit einer Singulärwertzerlegung unterzieht. Dieses Verfahren wird auch in der zeitaufgelösten UV-vis-Spektroskopie erfolgreich angewendet (Lewis und Kliger, 2000). Dadurch wäre es möglich, zeitlich lineare spektrale

Änderungen wie Baseline-Effekte vom restlichen Datensatz abzutrennen. Auch schnelle Zerfälle, die wegen einer zu schlechten Zeitauflösung nicht eindeutig gefittet werden können, könnten so erkannt und vom globalen multi-exponentiellen Fit ausgeschlossen werden.

3.4.4 Zeitaufgelöste Messungen bei pH 6,0 und technische Probleme

Um die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Übergangs von Meta I nach Meta II zu überprüfen, wurden Messungen bei 0 °C und pH 6,0 vorgenommen. Unter diesen Bedingungen bildet sich kein reines Meta II wie bei pH 5,0, sondern die Reaktion endet im Gleichgewicht zwischen Meta I und Meta II. Das kann man formal auch als eine pH-abhängige Beschleunigung der Rückreaktion ansehen. Da die beobachtete Ratenkonstante einer Reaktion k_{obs} die Summe aus den Ratenkonstanten der Vorwärts- und der Rückwärtsreaktion darstellt, sollte die gemessene Zeitkonstante für den Übergang von Meta I zu dem Gleichgewicht aus Meta I und Meta II bei 0 °C und pH 6,0 kleiner sein als die entsprechende Zeitkonstante für den vollständigen Übergang von Meta I nach Meta II bei pH 5,0. Aus Abb. 3.42 wird deutlich, dass dies offensichtlich nicht der Fall ist. Anders als bei pH 5,0 (Abb. 3.30) ist die Reaktion nach 15 s noch nicht abgeschlossen. Zum Vergleich ist ein Spektrum des stationären Zustandes, aufgenommen 108 s nach der lichtinduzierten Anregung, in Abb. 3.42 B gezeigt. Dies spricht für eine starke pH-Abhängigkeit der Vorwärtsreaktion, die den Effekt des Gleichgewichts auf die Rückreaktion sogar überkompensiert. Die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Meta I/Meta II-Überganges wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Parkes und Liebman, 1984; Gibson et al., 1999; Dickopf et al., 1998; Jäger et al., 1998).

Leider konnte eine genauere Analyse dieses Effekts nicht erfolgen, da die Messdaten durch Hintergrundfluktuationen gestört wurden. Diese waren bei den oben beschriebenen Messungen noch nicht aufgetreten und sind wahrscheinlich durch ein bisher nicht identifiziertes Störsignal bedingt, das die exakte Positionierung der Digitalisierungspunkte durch den He/Ne-Laser beeinträchtigt (vgl. 2.8.1). Dies äußerte sich durch Verschiebungen und Verkrümmungen der Baseline, die zum Teil je für die Vorwärts- und für die Rückwärtsbewegung des Spiegels spiegelbildlich auftraten und sich deshalb beim Mitteln von durch Vorwärts-, bzw. Rückwärtsbewegung des Spiegels gemessenen Spektren aufhoben. Um die Zeitauflösung zu erhalten, kann eine solche Mittelung für die frühen Datenpunkte leider nicht vorgenommen werden. Aus dem 8 ms-Spektrum in Abb. 3.42 A ist ersichtlich, dass das Ausmaß der Störung auf die frühen Datenpunkte größer ist als die echten spektralen

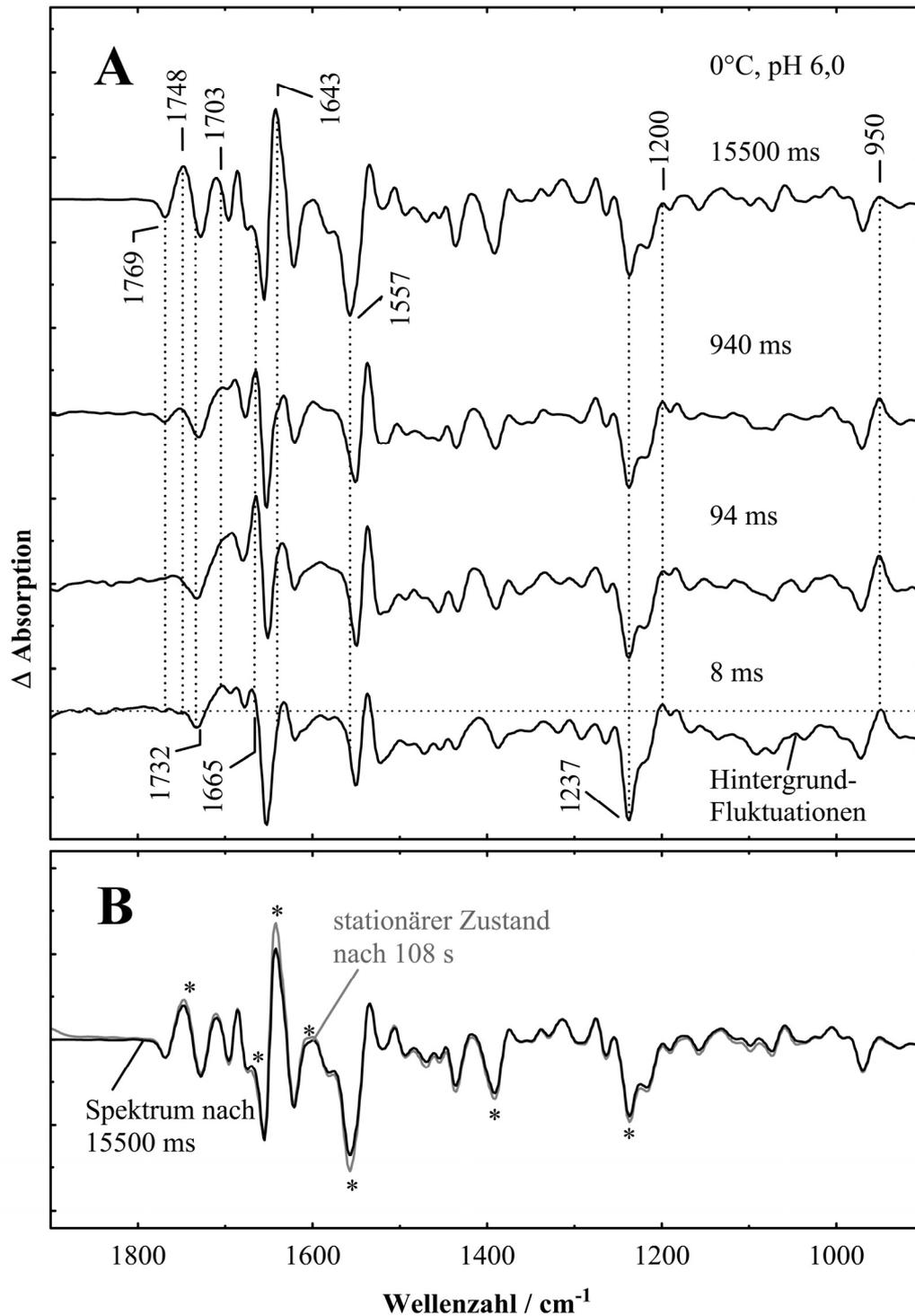


Abb. 3.42: Zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Differenzspektren, aufgenommen bei 0 °C und pH 6,0. Unter diesen Bedingungen endet der Zerfall der Photoprodukte in einem pH-abhängigen Gleichgewicht zwischen Meta I und Meta II. Hier sind exemplarisch die zeitaufgelösten Differenzspektren für 8 ms, 94 ms, 940 ms und 15000 ms dargestellt (A). Die angezeigten Wellenzahlen kennzeichnen Markerbanden von Meta I- und Meta II-Differenzspektren. Das Spektrum bei 8 ms wird durch apparativ bedingte Untergrundfluktuationen gestört, was hier durch Abweichungen von einer gepunkteten Nulllinie verdeutlicht werden soll. Der stationäre Zustand hatte sich im Verlauf des Rapid-Scan-Experiments noch nicht eingestellt. Dies wird im Vergleich des Spektrums nach 15500 ms (schwarz) zu einem Spektrum des stationären Zustands nach 108 s (grau) deutlich (B). Unterschiede sind durch * gekennzeichnet.

Änderungen. Dies macht eine zuverlässige Auswertung durch ME inverse Laplace-Transformation oder globalen, multi-exponentiellen Fit unmöglich.

3.4.5 Diskussion

Die späten Photointermediate von Rhodopsin waren schon mehrfach der Gegenstand einer ganzen Reihe von UV-vis-spektroskopischen Untersuchungen mit dem Ziel, die Abfolge der damit verknüpften Ereignisse und Gleichgewichte aufzuklären (Parkes und Liebman, 1984; Thorgeirsson et al., 1993; Jäger et al., 1998; Kuwata et al., 2001; Straume et al., 1990). Zum Teil erfolgten diese Studien auch in Kombination mit anderen Methoden, wie z. B. zeitaufgelösten Messungen von Ladungsverschiebungen (Dickopf et al., 1998) oder zeitaufgelösten Messungen der Protonenaufnahme mit Hilfe von pH-Farbindikatoren (Wong und Ostroy, 1973), um die Signifikanz ihrer UV-vis-Messungen zu unterstreichen (Bennett, 1980; Arnis und Hofmann, 1993; Szundi et al., 1998).

In dieser Studie wurde zeitaufgelöste Rapid-Scan FTIR-Differenzspektroskopie auf Rhodopsin in seiner natürlichen Membranumgebung angewendet, um die späten Übergänge, die letztendlich zur Bildung des aktiven Zustands Meta II führen, zu untersuchen. Zwar ist diese Methode der zeitaufgelösten UV-vis-Spektroskopie hinsichtlich der Zeitauflösung und dem Signal/Rausch-Verhältnis unterlegen, andererseits hat die FTIR-Spektroskopie den Vorteil, dass sowohl die Schwingungsmoden des Chromophors als auch des Proteins bei den Konformationsübergängen des Rezeptors gleichzeitig mit hoher Empfindlichkeit gemessen werden können. Das erlaubt eine eindeutige strukturelle Charakterisierung der Photointermediate, was nur durch UV-vis-Spektroskopie allein nicht möglich wäre.

Anhand der Datensätze, die bei 0 bzw. -7 °C und saurem bzw. alkalischem pH aufgenommen wurden, konnten die beiden Hauptübergänge von Lumi nach Meta I und von Meta I nach Meta II aufgelöst werden. Die offensichtlichsten Übergänge konnten auch schon in den zeitaufgelösten Differenzspektren erkannt werden (Abb. 3.30 A, Abb. 3.31 A, Abb. 3.42), indem die Markerbanden der einzelnen Intermediate betrachtet wurden. Um allerdings auch quantitative Informationen erhalten zu können, sind mathematische Anpassungsmethoden erforderlich.

Eine gängige Methode, die für die Analyse zeitaufgelöster Daten angewendet wird, ist der globale multi-exponentielle Fit, der auch oft mit anderen numerischen Verfahren, wie der Singulärwertzerlegung, kombiniert wird. Solche Methoden wurden z. B. erfolgreich für zeitaufgelöste UV-vis-Daten von Rhodopsin (Szundi et al., 1997) und Bacteriorhodopsin (Chizhov et al., 1996), aber auch für zeitaufgelöste FTIR-Daten an Bacteriorhodopsin

angewendet (Rödig et al., 1999). Die Messungen dafür erfolgten entweder an Proteinen mit einem Photozyklus oder, wie im Fall von Rhodopsin, unter Anwendung ausgetüftelter automatischer Probenwechsel-Vorrichtungen, was beides eine hohe Anzahl an Messwiederholungen und damit ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis ermöglicht. Wie unter 3.3.3 dargelegt, waren im Fall dieser Studie die Ergebnisse eines globalen multi-exponentiellen Fits nicht befriedigend. Die Annäherung an ein globales Minimum hängt von einigen Randbedingungen ab. Dazu gehören die Startwerte für die Fit-Prozedur, aber auch eine geeignete Wahl der Zeitbasis, um Artefakte durch die unterschiedlichen Gewichtungstufen vermeiden zu können.

Diese Probleme konnten durch Analyse anhand von ME inverser Laplace-Transformation vermieden werden, da sie von all diesen Parametern unabhängig ist. Bei der Analyse von Bacteriorhodopsin-Daten, gemessen mit zeitaufgelöster Step-Scan FTIR-Spektroskopie und einem vergleichsweise gutem Signal/Rausch-Verhältnis, sind die Übergänge zwischen den Intermediaten vergleichsweise schmal. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen an Rhodopsin fiel auf, dass sich die Übergänge über einen relativ breiten Zeitbereich hinziehen. Diese Breite war ja einer der Gründe für das Scheitern des globalen multi-exponentiellen Fits und kann verschiedene Ursachen haben. Einmal könnte sie natürlich wirklich mehrere, nicht-aufgelöste parallele Übergänge beschreiben, die ähnliche spektrale Eigenschaften und nur leicht verschiedene Zeitkonstanten haben. Eine solche Verbreiterung könnte auch durch Rauschen hervorgerufen werden, weil dadurch die Genauigkeit der Analyse beeinträchtigt wird. Das sollte aber für den frühen Übergang von Lumi nach Meta I (der in den $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Messungen voll aufgelöst wurde) viel eher der Fall sein, als für den später erfolgenden Meta I nach Meta II-Übergang (gemessen bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ und pH 5,0). Letzterer wurde, bedingt durch die Mittelung mehrerer Scans, mit einem viel besseren Signal/Rausch-Verhältnis gemessen. Da aber beide Übergänge eine ähnliche Halbwertsbreite haben, kann Rauschen als Ursache für die Verbreiterung des Meta I nach Meta II-Übergangs ausgeschlossen werden. Schließlich könnte die Verbreiterung auch auf eine Heterogenität des Umfelds jedes einzelnen Proteins innerhalb des Ensembles einer Einzelprobe oder, was noch wahrscheinlicher ist, durch Unterschiede zwischen den einzelnen Proben bedingt sein, die für den Datensatz gemittelt wurden. Aus Abb. 3.34 und Abb. 3.42 ist ersichtlich, was für einen Einfluss z. B. Temperatur und pH auf die Geschwindigkeit des Übergangs von Meta I nach Meta II haben. Obwohl bei der Probenpräparation höchste Sorgfalt angewendet wurde, um möglichst reproduzierbare Bedingungen hinsichtlich pH, Temperatur und Wasser- bzw. Proteingehalt bei den zur Mittelung verwendeten Proben zu gewährleisten, könnte es sein, dass kleine Abweichungen

zwischen einzelnen Proben zumindest zum Teil für die Verbreiterung der Verteilung möglicher Zeitkonstanten verantwortlich ist.

Abgesehen davon sorgt auch schon die Verwendung der Maximum Entropie-Methode zur Stabilisierung der inversen Laplace-Transformation für eine Verbreiterung der für die Übergänge berechneten Verteilungen. Hierbei spielt die Wahl des Regularisierungsparameters die entscheidende Rolle. Für die Analyse der gesamten Spektren wurde ein Regularisierungsparameter mit dem Wert $10^{-5,00}$ gewählt. Dadurch werden die Verteilungen zwar glatter, aber auch breiter; kleine zeitlich bedingte Absorptionsänderungen werden eventuell nicht aufgelöst. Andererseits werden aber Artefakte vermieden, die auf Rauschen zurückzuführen sind.

Zwar müssen bei der Anwendung von zeitaufgelöster FTIR-Spektroskopie Abstriche gemacht werden, die sich technisch bedingt nicht vermeiden lassen. Diese werden aber durch den hohen Informationsgehalt der zeitaufgelösten Daten aufgewogen. Im Datensatz, der bei 0 °C aufgenommen wurde, können die inaktiven Zustände eindeutig vom Übergang zum aktiven Meta II-Zustand unterschieden werden, der mit einer Zeitkonstante von etwa 1200 ms erfolgt. Vor dem Übergang von Meta I nach Meta II wird keine aktive Spezies gebildet. Zusätzlich wird ein kleiner Übergang mit einer Zeitkonstante von ungefähr 140 ms erfasst. Dieser zusätzliche Übergang beinhaltet eine teilweise Deprotonierung der Schiffbase, die dem Konformationsübergang nach Meta II vorausgeht. Diese frühe Schiffbasen-Deprotonierung, die etwa 15 bis 20 % des photolysierten Pigments betrifft, macht sich als eine Absorptionsabnahme von protonierungssensitiven Fingerprint-Banden des Chromophors bemerkbar. Bei Absorptionsbanden von protonierten Carbonsäuren, die man als Anzeiger für einen Konformationsübergang des Proteins ansehen kann, ist so ein früher Übergang nicht erkennbar. Hier wird ausschließlich der Hauptübergang nach Meta II um 1200 ms beobachtet. Dadurch wird deutlich, dass dieses frühe Intermediat, das bereits eine deprotonierte Schiffbase hat, aber vor dem eigentlichen Meta II-Photoprodukt auftaucht, eine inaktive Konformation haben muss.

In der Literatur findet man einige Berichte über eine oder mehrere 380 nm Spezies mit einer deprotonierten Schiffbase, die vor der Bildung des klassischen Meta II auftauchen (Thorgeirsson et al., 1993; Jäger et al., 1998; Dickopf et al., 1998; Kuwata et al., 2001; Gibson et al., 1999). Eine klare Zuordnung des hier beobachteten frühen Intermediats mit einer deprotonierten Schiffbase zu einer dieser 380 nm Spezies ist schwierig, weil dort zum Teil völlig andere experimentelle Bedingungen angewendet wurden. Unterschiedliche Temperaturbereiche, die in diesen Experimenten abgedeckt wurden, sowie insbesondere die

Verwendung von in Detergens solubilisiertem Pigment anstatt von Proben des Pigments in seiner natürlichen Membranumgebung, scheinen die Eigenschaften dieser Spezies zu beeinflussen. Eine sehr frühe als Meta I₃₈₀ bezeichnete 380 nm Spezies taucht im Zeitbereich des Lumi-Zerfalls auf, wird aber nur bei Temperaturen oberhalb von 15 °C gemessen, mit steigenden Beiträgen bei steigender Temperatur (Thorgeirsson et al., 1993). Hinsichtlich des Zeit- und Temperaturbereichs handelt es sich dabei wohl um eine andere Spezies als um die hier gefundene. In einer anderen Studie, die mit Diskmembranen bei tieferen Temperaturen (0 °C bis 10 °C) durchgeführt wurde, scheint die Bildung eines 380 nm Photoprodukts zweiphasig zu sein, sodass hier eine Unterscheidung zwischen Meta II_{fast} oder Meta II_a und Meta II_{slow}, bzw. Meta II_b gemacht wird (Dickopf et al., 1998; Gibson et al., 1999). Wie bereits erwähnt, konnte in den bei 0 °C durchgeführten Experimenten keine Bildung einer aktiven Konformation des Rezeptors vor dem Übergang zu Meta II beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass diese oben beschriebenen Spezies eine inaktive Rezeptorkonformation haben.

Strukturelle Informationen können auch aus dem frühen Übergang von Lumi nach Meta I gezogen werden. Die Experimente zeigen, dass die Zeitkonstanten dieses Übergangs bei pH 5,0 schneller sind als bei pH 9,5. Außerdem scheint die Struktur des Chromophors des bei -7 °C mit zeitaufgelösten Methoden gemessenen Lumi-Photoprodukts anders zu sein als bei -80 °C Tieftemperatur-stabilisiertem Lumi. In den zeitaufgelösten Experimenten scheint die HOOP-Bande des Chromophors im Lumi-Intermediat nahe an ihre Position im Meta I-Intermediat zu höheren Wellenzahlen verschoben zu sein.

Zeitaufgelöste Messungen an Rhodopsin sind von Natur aus schwierig, weil es keinen Photozyklus durchläuft. In der FTIR-Spektroskopie werden sie noch zusätzlich dadurch erschwert, dass es wegen der geringen Schichtdicke einer IR-Küvette schwierig ist, Methoden zu entwickeln, die auch mit den hochviskosen Suspensionen von nativen Photorezeptor-Membranen einen automatisierten, zuverlässigen Probenaustausch ermöglichen. Allerdings werden diese Einschränkungen durch die Strukturempfindlichkeit und den hohen Informationsgehalt der IR-Spektroskopie wettgemacht. So kann die FTIR-Spektroskopie auch für nicht-zyklische Photosysteme strukturelle Informationen der Photointermediate bieten, die mit UV-vis-Spektroskopie nicht erhältlich sind.

4 Zusammenfassung

Rhodopsin, der für das Nachtsehen zuständige Lichtrezeptor in Wirbeltieren, ist ein Prototyp für die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren, die durch das Binden eines Liganden aktiviert werden, enthält Rhodopsin 11-*cis*-Retinal als lichtempfindliche prosthetische Gruppe, die mit dem Apoprotein über eine protonierte Schiffbasenbindung mit Lys 296 auf Helix 7 kovalent verbunden ist. Durch Absorption eines Photons wird 11-*cis*-Retinal in sein all-*trans*-Isomer überführt, was die thermische Relaxation des Proteins bis hin zu seinem aktiven Zustand Meta II nach sich zieht. Der Meta II-Zustand ist dann in der Lage, das G-Protein Transduzin zu aktivieren.

Die verschiedenen Intermediate wurden durch FTIR-Differenzspektroskopie untersucht. Der Vorteil dieser Methode bei der Untersuchung von molekularen Vorgängen in Rhodopsin liegt vor allem darin, dass Änderungen des Proteins und des Chromophors simultan anhand der Absorptionsänderungen der Molekülschwingungen beobachtet werden können. Protonierungsänderungen oder Änderungen intramolekularer Wechselwirkungen sind in der FTIR-Differenzspektroskopie über ihren Einfluss auf die Schwingungsmoden der beteiligten Gruppen sehr gut zu beobachten. Die Verwendung von Sandwichproben ermöglichte dabei eine genaue pH-Einstellung und eine hohe Reproduzierbarkeit in der Herstellung der Proben.

Die Röntgen-Kristallstruktur des Dunkelzustands von Rhodopsin bietet Einblicke und Anhaltspunkte für viele strukturelle und funktionelle Untersuchungen. Sie offenbarte als unerwartete strukturelle Besonderheit, dass der extrazelluläre Loop 2 tief in die Bindungstasche hineingefaltet ist. Dadurch befindet sich mit Glu 181 eine protonierbare Gruppe in unmittelbarer Umgebung des Chromophors, was auf eine Funktionalität dieser Gruppe hindeutet. Anhand von UV-vis-Untersuchungen an der E181Q-Mutante hatten Yan et al. festgestellt, dass Glu 181 in Meta I die Funktion eines Gegenions zur protonierten Schiffbase hat. Anhand der hier durchgeführten FTIR-Untersuchungen an der E181Q- und E181M-Mutante, aber auch anhand früherer Untersuchungen, konnte gezeigt werden, dass Glu 181 bereits im Dunkelzustand negativ geladen ist und gemeinsam mit Glu 113 ein komplexes Gegenion bildet. Der Hauptanteil an diesem komplexen Gegenion verschiebt sich dann in Meta I von Glu 113 zu Glu 181. Ferner zeigten Spektren von E181Q eine Entkoppelung von Banden, die bei der Bildung der Intermediate in Wildtyp-Rhodopsin miteinander korreliert sind. Diese Banden werden verschiedenen Mikrodomänen und Wasserstoffbrücken-Netzwerken innerhalb des Proteins zugeordnet. Somit konnte anhand der

gemessenen Spektren nachgewiesen werden, dass die Schiffbasen-Region mit Glu 181 eine Schnittstelle darstellt, die einen konzertierten Übergang der Netzwerke zwischen Helix 1, 2 und 7 und dem Helix 3,6- bzw. dem Helix 3,5-Netzwerk in den aktiven Zustand gewährleistet.

In einer anderen Studie wurde die ERY-Region am zytoplasmatischen Ende von Helix 3 untersucht. Diese Region ist in G-Protein-gekoppelten Rezeptoren hochkonserviert und wird mit der pH-Abhängigkeit des Gleichgewichts zwischen Meta I und Meta II in Verbindung gebracht. Aus der Kristallstruktur ist ersichtlich, dass Arg 135 aus dem ERY-Motiv nicht nur eine Salzbrücke mit der benachbarten Glu 134 ausbildet, sondern auch mit Glu 247 auf Helix 6 in elektrostatische Wechselwirkung tritt. Um die Bedeutung dieser beiden Glutaminsäurereste bei der Rhodopsin-Aktivierung zu untersuchen, wurden ihre neutralen Mutanten E134Q und E247Q untersucht. Anhand von FTIR-Differenzspektren konnte gezeigt werden, dass weder die eine noch die andere Aminosäure als Protonierungsstelle für ein im Übergang nach Meta II aufgenommenes Proton in Frage kommen. Während die E134Q-Mutante über den gesamten untersuchten pH-Bereich das aktive Meta II-Photoprodukt bildete, war der pK_a des Gleichgewichts zwischen Meta I und Meta II bei der E247Q-Mutante um 1,5 Einheiten zu höheren Werten verschoben. Diese Untersuchungen trugen dazu bei, ein Modell aufzustellen, das die Rolle der Protonierungswechsel im Übergang von Meta I nach Meta II beschreibt. Dabei hängt die Aktivierung nicht nur von einer Protonierung in der zytoplasmatischen Region, sondern auch von der Protonierung von Glu 113 ab. Die pK_a -Werte dieser Protonierungsstellen sind dabei stark aneinander gekoppelt. Da die zytoplasmatische Protonierungsstelle nicht identifiziert werden konnte, werden noch weitere FTIR-Messungen an Rhodopsin-Mutanten benötigt, um einen eindeutigen Mechanismus formulieren zu können.

Die Kinetiken der Rhodopsin-Intermediate sind bereits mit einigen spektroskopischen Methoden untersucht worden. Die zeitaufgelöste UV-vis-Spektroskopie bietet dabei Daten mit extrem hoher Zeitauflösung und gutem Signal/Rausch-Verhältnis. Allerdings wird hierbei nur die Änderung des sichtbaren Absorptionsmaximums des Chromophors detektiert. Dieses hängt zwar auch von den Konformationsänderungen des Proteins ab, doch kann nicht von jeder Absorptionsänderung im sichtbaren Bereich auf eine Konformationsänderung des Proteins geschlossen werden. In dieser Hinsicht bieten FTIR-Spektren, die sowohl strukturelle Änderungen des Proteins als auch des Chromophors abbilden, einen weitaus höheren Informationsgehalt. Für diese Arbeit wurden erstmals zeitaufgelöste FTIR-Differenzspektren der späten Photointermediate von Rhodopsin im Rapid-Scan-Modus aufgenommen. Dabei

gelang es, in Messungen bei 0 und -7 °C zeitaufgelöste Spektren des Zerfalls von Lumi nach Meta I und Meta I nach Meta II auf einer Zeitskala von 8 ms bis 15,5 s zu erhalten. Bei 0 °C und pH 5,0 konnte eine partielle Deprotonierung der Schiffbase vor dem Übergang nach Meta II gemessen werden. Da Banden, die den Konformationsübergang nach Meta II signalisieren, in diesem Zeitbereich unverändert bleiben, scheint diese Spezies mit deprotonierter Schiffbase immer noch inaktiv zu sein. Ferner wurde festgestellt, dass der Übergang von Lumi nach Meta I bei pH 5,0 schneller verläuft als bei pH 9,5.

Obwohl die Zeitauflösung dieser Messungen limitiert war, zeigen sie dennoch, dass es sich lohnt, Wege zu finden, zeitaufgelöste FTIR-Messungen an Rhodopsin durchzuführen.

5 Literaturverzeichnis

Acharya, S., Saad, Y. und Karnik, S. S.: Transducin-alpha C-terminal peptide binding site consists of C-D and E-F loops of rhodopsin (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, S. 6519-6524.

Arnis, S., Fahmy, K., Hofmann, K. P. und Sakmar, T. P.: A conserved carboxylic acid group mediates light-dependent proton uptake and signaling by rhodopsin (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, S. 23879-23881.

Arnis, S. und Hofmann, K. P.: Two different forms of metarhodopsin II: Schiff base deprotonation precedes proton uptake and signaling state (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, S. 7849-7853.

Ballesteros, J. A., Jensen, A. D., Liapakis, G., Rasmussen, S. G., Shi, L., Gether, U. und Javitch, J. A.: Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6 (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, S. 29171-29177.

Barth, A.: The infrared absorption of amino acid side chains (2000) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **74**, S. 141-173.

Barth, A. und Zscherp, C.: What vibrations tell us about proteins (2002) *Q. Rev. Biophys.* **35**, S. 369-430.

Baylor, D. A., Matthews, G. und Yau, K. W.: Two components of electrical dark noise in toad retinal rod outer segments (1980) *J. Physiol* **309**, S. 591-621.

Beck, M.: Schwingungsspektroskopische Untersuchung der intramolekularen Veränderungen während der lichtinduzierten Aktivierung des Photorezeptors Rhodopsin (1998) *Dissertation*, Fakultät für Biologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Beck, M., Sakmar, T. P. und Siebert, F.: Spectroscopic evidence for interaction between transmembrane helices 3 and 5 in rhodopsin (1998a) *Biochemistry* **37**, S. 7630-7639.

Beck, M., Siebert, F. und Sakmar, T. P.: Evidence for the specific interaction of a lipid molecule with rhodopsin which is altered in the transition to the active state metarhodopsin II (1998b) *FEBS Lett.* **436**, S. 304-308.

Bennett, N.: Optical study of the light-induced protonation changes associated with the metarhodopsin II intermediate in rod-outer-segment membranes (1980) *Eur. J. Biochem.* **111**, S. 99-103.

Birge, R. R. und Barlow, R. B.: On the molecular origins of thermal noise in vertebrate and invertebrate photoreceptors (1995) *Biophys. Chem.* **55**, S. 115-126.

Carravetta, M., Zhao, X., Johannessen, O. G., Lai, W. C., Verhoeven, M. A., Bovee-Geurts, P. H., Verdegem, P. J., Kiihne, S., Luthman, H., de Groot, H. J., DeGrip, W. J., Lugtenburg, J. und Levitt, M. H.: Protein-induced bonding perturbation of the rhodopsin chromophore detected by double-quantum solid-state NMR (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, S. 3948-3953.

- Cembran, A., Bernardi, F., Olivucci, M. und Garavelli, M.: Counterion controlled photoisomerization of retinal chromophore models: a computational investigation (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, S. 16018-16037.
- Chizhov, I., Chernavskii, D. S., Engelhard, M., Mueller, K. H., Zubov, B. V. und Hess, B.: Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle (1996) *Biophys. J.* **71**, S. 2329-2345.
- Cooper, A.: Energy uptake in the first step of visual excitation (1979) *Nature* **282**, S. 531-533.
- Cooper, A.: Rhodopsin photoenergetics: lumirhodopsin and the complete energy profile (1981) *FEBS Lett.* **123**, S. 324-326.
- Creemers, A. F., Kiihne, S., Bovee-Geurts, P. H., DeGrip, W. J., Lugtenburg, J. und de Groot, H. J.: (1)H and (13)C MAS NMR evidence for pronounced ligand-protein interactions involving the ionone ring of the retinylidene chromophore in rhodopsin (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, S. 9101-9106.
- DeGrip, W. J.: Purification of bovine rhodopsin over concanavalin A-sepharose (1982) *Methods Enzymol.* **81**, S. 197-207.
- Dickopf, S., Mielke, T. und Heyn, M. P.: Kinetics of the light-induced proton translocation associated with the pH-dependent formation of the metarhodopsin I/II equilibrium of bovine rhodopsin (1998) *Biochemistry* **37**, S. 16888-16897.
- Ebrey, T. G.: pKa of the protonated Schiff base of visual pigments (2000) *Methods Enzymol.* **315**, S. 196-207.
- Fahmy, K., Jäger, F., Beck, M., Zvyaga, T. A., Sakmar, T. P. und Siebert, F.: Protonation states of membrane-embedded carboxylic acid groups in rhodopsin and metarhodopsin II: a Fourier-transform infrared spectroscopy study of site-directed mutants (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, S. 10206-10210.
- Fahmy, K. und Sakmar, T. P.: Regulation of the rhodopsin-transducin interaction by a highly conserved carboxylic acid group (1993) *Biochemistry* **32**, S. 7229-7236.
- Fahmy, K., Siebert, F., Groessjean, M. F. und Tavan, P.: Photoisomerization in bacteriorhodopsin studied by FTIR, linear dichroism and photoselection experiments combined with quantum chemical theoretical analysis (1989) *J. Mol. Struct.* **214**, S. 257-288.
- Fahmy, K., Siebert, F. und Sakmar, T. P.: A mutant rhodopsin photoproduct with a protonated Schiff base displays an active-state conformation: a Fourier-transform infrared spectroscopy study (1994) *Biochemistry* **33**, S. 13700-13705.
- Fahmy, K., Siebert, F. und Sakmar, T. P.: Photoactivated state of rhodopsin and how it can form (1995) *Biophys. Chem.* **56**, S. 171-181.
- Fan, G., Siebert, F., Sheves, M. und Vogel, R.: Rhodopsin with 11-cis-Locked Chromophore Is Capable of Forming an Active State Photoproduct (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, S. 40229-40234.

- Farrens, D. L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W. L. und Khorana, H. G.: Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin (1996) *Science* **274**, S. 768-770.
- Franke, R. R., Sakmar, T. P., Graham, R. M. und Khorana, H. G.: Structure and function in rhodopsin. Studies of the interaction between the rhodopsin cytoplasmic domain and transducin (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, S. 14767-14774.
- Fritze, O., Filipek, S., Kuksa, V., Palczewski, K., Hofmann, K. P. und Ernst, O. P.: Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, S. 2290-2295.
- Ganter, U. M., Gärtner, W. und Siebert, F.: Rhodopsin-lumirhodopsin phototransition of bovine rhodopsin investigated by Fourier transform infrared difference spectroscopy (1988) *Biochemistry* **27**, S. 7480-7488.
- Gerwert, K., Hess, B., Soppa, J. und Oesterhelt, D.: Role of aspartate-96 in proton translocation by bacteriorhodopsin (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, S. 4943-4947.
- Gether, U.: Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors (2000) *Endocr. Rev.* **21**, S. 90-113.
- Gibson, S. K., Parkes, J. H. und Liebman, P. A.: Phosphorylation alters the pH-dependent active state equilibrium of rhodopsin by modulating the membrane surface potential (1999) *Biochemistry* **38**, S. 11103-11114.
- Greasley, P. J., Fanelli, F., Rossier, O., Abuin, L. und Cotecchia, S.: Mutagenesis and modelling of the alpha(1b)-adrenergic receptor highlight the role of the helix 3/helix 6 interface in receptor activation (2002) *Mol. Pharmacol.* **61**, S. 1025-1032.
- Hamm, H. E., Deretic, D., Arendt, A., Hargrave, P. A., Koenig, B. und Hofmann, K. P.: Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit (1988) *Science* **241**, S. 832-835.
- Han, M. und Smith, S. O.: NMR constraints on the location of the retinal chromophore in rhodopsin and bathorhodopsin (1995) *Biochemistry* **34**, S. 1425-1432.
- Imai, H., Kojima, D., Oura, T., Tachibanaki, S., Terakita, A. und Shichida, Y.: Single amino acid residue as a functional determinant of rod and cone visual pigments (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, S. 2322-2326.
- Isele, J., Sakmar, T. P. und Siebert, F.: Rhodopsin activation affects the environment of specific neighboring phospholipids: an FTIR spectroscopic study (2000) *Biophys. J.* **79**, S. 3063-3071.
- Janz, J. M. und Farrens, D. L.: Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin alpha-subunit C terminus (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, S. 29767-29773.
- Jäger, F., Fahmy, K., Sakmar, T. P. und Siebert, F.: Identification of glutamic acid 113 as the Schiff base proton acceptor in the metarhodopsin II photointermediate of rhodopsin (1994) *Biochemistry* **33**, S. 10878-10882.

- Jäger, S., Szundi, I., Lewis, J. W., Mah, T. L. und Kliger, D. S.: Effects of pH on rhodopsin photointermediates from lumirhodopsin to metarhodopsin II (1998) *Biochemistry* **37**, S. 6998-7005.
- Kauffmann, E., Darnton, N. C., Austin, R. H., Batt, C. und Gerwert, K.: Lifetimes of intermediates in the beta -sheet to alpha -helix transition of beta -lactoglobulin by using a diffusional IR mixer (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, S. 6646-6649.
- Kim, J. M., Altenbach, C., Thurmond, R. L., Khorana, H. G. und Hubbell, W. L.: Structure and function in rhodopsin: rhodopsin mutants with a neutral amino acid at E134 have a partially activated conformation in the dark state (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, S. 14273-14278.
- Kuwata, O., Yuan, C., Misra, S., Govindjee, R. und Ebrey, T. G.: Kinetics and pH dependence of light-induced deprotonation of the Schiff base of rhodopsin: possible coupling to proton uptake and formation of the active form of Meta II (2001) *Biochemistry (Mosc.)* **66**, S. 1283-1299.
- Lewis, J. W. und Kliger, D. S.: Absorption spectroscopy in studies of visual pigments: spectral and kinetic characterization of intermediates (2000) *Methods Enzymol.* **315**, S. 164-178.
- Li, J., Edwards, P. C., Burghammer, M., Villa, C. und Schertler, G. F.: Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form (2004) *J. Mol. Biol.* **343**, S. 1409-1438.
- Longstaff, C., Calhoun, R. D. und Rando, R. R.: Deprotonation of the Schiff base of rhodopsin is obligate in the activation of the G protein (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, S. 4209-4213.
- Lórenz-Fonfría, V. A. und Kandori, H.: Transformation of Time-Resolved Spectra to Lifetime-Resolved Spectra by Maximum Entropy Inversion of the Laplace Transform (2006) *Appl. Spectrosc.*, zur Veröffentlichung eingereicht
- Lüdeke, S., Beck, M., Yan, E. C., Sakmar, T. P., Siebert, F. und Vogel, R.: The role of glu181 in the photoactivation of rhodopsin (2005) *J. Mol. Biol.* **353**, S. 345-356.
- Matthews, R. G., Hubbard, R., Brown, P. K. und Wald, G.: Tautomeric Forms of Metarhodopsin (1963) *J. Gen. Physiol.* **47**, S. 215-240.
- McWhirter, J. G. und Pike, E. R.: On the numerical inversion of the Laplace transform and similar Fredholm integral equations of the first kind (1978) *J. Phys. A: Math. Gen.* **11**, S. 1729-1745.
- Menon, S. T., Han, M. und Sakmar, T. P.: Rhodopsin: structural basis of molecular physiology (2001) *Physiol Rev.* **81**, S. 1659-1688.
- Meyer, C. K., Böhme, M., Ockenfels, A., Gärtner, W., Hofmann, K. P. und Ernst, O. P.: Signaling states of rhodopsin. Retinal provides a scaffold for activating proton transfer switches (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, S. 19713-19718.
- Müller, K. H. und Plesser, T.: Variance Reduction by simultaneous multi-exponential analysis of data sets from different experiments (1991) *Eur. Biophys. J.* **19**, S. 231-240.

- Nagata, T., Terakita, A., Kandori, H., Shichida, Y. und Maeda, A.: The hydrogen-bonding network of water molecules and the peptide backbone in the region connecting Asp83, Gly120, and Glu113 in bovine rhodopsin (1998) *Biochemistry* **37**, S. 17216-17222.
- Okada, T., Ernst, O. P., Palczewski, K. und Hofmann, K. P.: Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies (2001) *Trends Biochem. Sci.* **26**, S. 318-324.
- Oseroff, A. R. und Callender, R. H.: Resonance Raman spectroscopy of rhodopsin in retinal disk membranes (1974) *Biochemistry* **13**, S. 4243-4248.
- Ovchinnikov, Y.: Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships (1982) *FEBS Lett.* **148**, S. 179-191.
- Ovchinnikov, Y., Abdulaev, N. G. und Bogachuk, A. S.: Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated (1988) *FEBS Lett.* **230**, S. 1-5.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. und Miyano, M.: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor (2000) *Science* **289**, S. 739-745.
- Palings, I., Pardoën, J. A., van den Berg, E., Winkel, C., Lugtenburg, J. und Mathies, R. A.: Assignment of fingerprint vibrations in the resonance Raman spectra of rhodopsin, isorhodopsin, and bathorhodopsin: implications for chromophore structure and environment (1987) *Biochemistry* **26**, S. 2544-2556.
- Pan, D. und Mathies, R. A.: Chromophore structure in lumirhodopsin and metarhodopsin I by time-resolved resonance Raman microchip spectroscopy (2001) *Biochemistry* **40**, S. 7929-7936.
- Papermaster, D. S.: Preparation of retinal rod outer segments (1982) *Methods Enzymol.* **81**, S. 48-52.
- Parkes, J. H. und Liebman, P. A.: Temperature and pH dependence of the metarhodopsin I-metarhodopsin II kinetics and equilibria in bovine rod disk membrane suspensions (1984) *Biochemistry* **23**, S. 5054-5061.
- Peteanu, L. A., Schoenlein, R. W., Wang, Q., Mathies, R. A. und Shank, C. V.: The first step in vision occurs in femtoseconds: complete blue and red spectral studies (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, S. 11762-11766.
- Rath, P., DeCaluwe, L. L., Bovee-Geurts, P. H., DeGrip, W. J. und Rothschild, K. J.: Fourier transform infrared difference spectroscopy of rhodopsin mutants: light activation of rhodopsin causes hydrogen-bonding change in residue aspartic acid-83 during meta II formation (1993) *Biochemistry* **32**, S. 10277-10282.
- Robinson, P. R., Cohen, G. B., Zhukovsky, E. A. und Oprian, D. D.: Constitutively active mutants of rhodopsin (1992) *Neuron* **9**, S. 719-725.
- Rödig, C., Chizhov, I., Weidlich, O. und Siebert, F.: Time-resolved step-scan Fourier transform infrared spectroscopy reveals differences between early and late M intermediates of bacteriorhodopsin (1999) *Biophys. J.* **76**, S. 2687-2701.

Ruprecht, J. J., Mielke, T., Vogel, R., Villa, C. und Schertler, G. F.: Electron crystallography reveals the structure of metarhodopsin I (2004) *EMBO J.*

Sakmar, T. P., Franke, R. R. und Khorana, H. G.: Glutamic acid-113 serves as the retinylidene Schiff base counterion in bovine rhodopsin (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, S. 8309-8313.

Sakmar, T. P., Franke, R. R. und Khorana, H. G.: The role of the retinylidene Schiff base counterion in rhodopsin in determining wavelength absorbance and Schiff base pKa (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, S. 3079-3083.

Sakmar, T. P., Menon, S. T., Marin, E. P. und Awad, E. S.: RHODOPSIN: Insights from Recent Structural Studies (2002) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, S. 443-484.

Shapiro, D. A., Kristiansen, K., Weiner, D. M., Kroeze, W. K. und Roth, B. L.: Evidence for a model of agonist-induced activation of 5-hydroxytryptamine 2A serotonin receptors that involves the disruption of a strong ionic interaction between helices 3 and 6 (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, S. 11441-11449.

Sheikh, S. P., Zvyaga, T. A., Lichtarge, O., Sakmar, T. P. und Bourne, H. R.: Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F (1996) *Nature* **383**, S. 347-350.

Shichida, Y. und Imai, H.: Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals (1998) *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, S. 1299-1315.

Siebert, F.: Application of FTIR Spectroscopy to the Investigation of Dark Structures and Photoreactions of Visual Pigments (1995) *Isr. J. Chem.* **35**, S. 309-323.

Siebert, F., Mäntele, W. und Gerwert, K.: Fourier-transform infrared spectroscopy applied to rhodopsin. The problem of the protonation state of the retinylidene Schiff base re-investigated (1983) *Eur. J. Biochem.* **136**, S. 119-127.

Steinberg, G., Ottolenghi, M. und Sheves, M.: pKa of the protonated Schiff base of bovine rhodopsin. A study with artificial pigments (1993) *Biophys. J.* **64**, S. 1499-1502.

Straume, M., Mitchell, D. C., Miller, J. L. und Litman, B. J.: Interconversion of metarhodopsins I and II: a branched photointermediate decay model (1990) *Biochemistry* **29**, S. 9135-9142.

Szundi, I., Lewis, J. W. und Kliger, D. S.: Deriving reaction mechanisms from kinetic spectroscopy. Application to late rhodopsin intermediates (1997) *Biophys. J.* **73**, S. 688-702.

Szundi, I., Mah, T. L., Lewis, J. W., Jäger, S., Ernst, O. P., Hofmann, K. P. und Kliger, D. S.: Proton transfer reactions linked to rhodopsin activation (1998) *Biochemistry* **37**, S. 14237-14244.

Terakita, A., Koyanagi, M., Tsukamoto, H., Yamashita, T., Miyata, T. und Shichida, Y.: Counterion displacement in the molecular evolution of the rhodopsin family (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, S. 284-289.

- Terakita, A., Yamashita, T. und Shichida, Y.: Highly conserved glutamic acid in the extracellular IV-V loop in rhodopsins acts as the counterion in retinochrome, a member of the rhodopsin family (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, S. 14263-14267.
- Thorgeirsson, T. E., Lewis, J. W., Wallace-Williams, S. E. und Kliger, D. S.: Photolysis of rhodopsin results in deprotonation of its retinal Schiff's base prior to formation of metarhodopsin II (1992) *Photochem. Photobiol.* **56**, S. 1135-1144.
- Thorgeirsson, T. E., Lewis, J. W., Wallace-Williams, S. E. und Kliger, D. S.: Effects of temperature on rhodopsin photointermediates from lumirhodopsin to metarhodopsin II (1993) *Biochemistry* **32**, S. 13861-13872.
- Verhoeven, M. A., Creemers, A. F., Bovee-Geurts, P. H., DeGrip, W. J., Lugtenburg, J. und de Groot, H. J.: Ultra-high-field MAS NMR assay of a multispin labeled ligand bound to its G-protein receptor target in the natural membrane environment: electronic structure of the retinylidene chromophore in rhodopsin (2001) *Biochemistry* **40**, S. 3282-3288.
- Vogel, R., Fan, G. B., Sheves, M. und Siebert, F.: The molecular origin of the inhibition of transducin activation in rhodopsin lacking the 9-methyl group of the retinal chromophore: a UV-Vis and FTIR spectroscopic study (2000) *Biochemistry* **39**, S. 8895-8908.
- Vogel, R., Fan, G. B., Siebert, F. und Sheves, M.: Anions stabilize a metarhodopsin II-like photoproduct with a protonated Schiff base (2001) *Biochemistry* **40**, S. 13342-13352.
- Vogel, R., Lüdeke, S., Siebert, F., Sakmar, T. P., Hirshfeld, A. und Sheves, M.: Agonists and Partial Agonists of Rhodopsin: Retinal Polyene Methylation Affects Receptor Activation (2006) *Biochemistry* **45**, S. 1640-1652.
- Vogel, R., Ruprecht, J., Villa, C., Mielke, T., Schertler, G. F. und Siebert, F.: Rhodopsin photoproducts in 2D crystals (2004a) *J. Mol. Biol.* **338**, S. 597-609.
- Vogel, R. und Siebert, F.: Conformation and stability of alpha-helical membrane proteins. 2. Influence of pH and salts on stability and unfolding of rhodopsin (2002) *Biochemistry* **41**, S. 3536-3545.
- Vogel, R., Siebert, F., Lüdeke, S., Hirshfeld, A. und Sheves, M.: Agonists and partial agonists of rhodopsin: retinals with ring modifications (2005) *Biochemistry* **44**, S. 11684-11699.
- Vogel, R., Siebert, F., Zhang, X. Y., Fan, G. und Sheves, M.: Formation of Meta III during the decay of activated rhodopsin proceeds via Meta I and not via Meta II (2004b) *Biochemistry* **43**, S. 9457-9466.
- Wald, G.: The molecular basis of visual excitation (1968) *Nature* **219**, S. 800-807.
- Wang, Q., Kochendoerfer, G. G., Schoenlein, R. W., Verdegem, P. J., Lugtenburg, J., Mathies, R. und Shank, C. V.: Femtosecond Spectroscopy of a 13-Demethylrhodopsin Visual Pigment Analogue: The Role of Nonbonded Interactions in the Isomerization Process (1996) *J. Phys. Chem.* **100**, S. 17388-17394.
- Wong, J. K. und Ostroy, S. E.: Hydrogen ion changes of rhodopsin I. Proton uptake during the metarhodopsin I 478 metarhodopsin II 308 reaction (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* **154**, S. 1-7.

Yan, E. C., Kazmi, M. A., De, S., Chang, B. S., Seibert, C., Marin, E. P., Mathies, R. A. und Sakmar, T. P.: Function of extracellular loop 2 in rhodopsin: glutamic acid 181 modulates stability and absorption wavelength of metarhodopsin II (2002) *Biochemistry* **41**, S. 3620-3627.

Yan, E. C., Kazmi, M. A., Ganim, Z., Hou, J. M., Pan, D., Chang, B. S., Sakmar, T. P. und Mathies, R. A.: Retinal counterion switch in the photoactivation of the G protein-coupled receptor rhodopsin (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, S. 9262-9267.

Zhukovsky, E. A. und Oprian, D. D.: Effect of carboxylic acid side chains on the absorption maximum of visual pigments (1989) *Science* **246**, S. 928-930.