

**Molekulare Proteinwechselwirkungen innerhalb
eines Photosignalkomplexes in Membranen
untersucht mit fluoreszenzspektroskopischen
Techniken**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jana Kriegsmann

aus Zossen

Jülich

Mai 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Jörg Fitter

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 2008

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungen und Symbole | 1 |
| Zusammenfassung | 3 |
| Summary | 4 |
| | |
| 1 Einleitung | 5 |
| 1.1 Rezeptorproteine von Bakterien | 5 |
| 1.2 Der Rezeptor-Transducer-Komplex NpSRII/NpHtrII aus <i>Natronobacterium pharaonis</i> | 10 |
| 1.3 Zielstellung der Arbeit | 12 |
| | |
| 2 Material und Methoden | 14 |
| 2.1 Fluoreszenzmarkierung der Proteine | 14 |
| 2.1.1 Proteine | 14 |
| 2.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe | 15 |
| 2.1.3 Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsspektroskopie | 17 |
| 2.1.4 Kopplung und Reinigung | 19 |
| 2.2 Herstellung von Large Unilamellar Vesicles (LUV) | 20 |
| 2.3 Herstellung von Proteoliposomen (Rekonstituierung) | 24 |
| 2.3.1 Proteinaktivität | 25 |
| 2.3.2 Vesikelgröße | 27 |
| 2.4 Herstellung von Giant Unilamellar Vesicles (GUV) | 27 |
| 2.5 Fusion von Proteoliposomen mit GUV | 29 |
| 2.6 Fluoreszenzspektroskopische Techniken | 32 |
| 2.6.1 Fluoreszenzspektroskopie | 33 |
| 2.6.2 FRET-Messungen | 35 |
| 2.6.3 2-Fokus-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (2fFCS) | 39 |
| 2.7 Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie | 44 |
| | |
| 3 Untersuchung der NpHtrII/NpSRII-Komplexbildung durch Försterresonanzenergietransfer (FRET) | 45 |
| 3.1 Fluoreszenzmarkierung der Proteine | 45 |
| 3.1.1 Reinigung der Proben von überschüssigem Farbstoff | 45 |
| 3.1.2 Unterschiede in der Markierbarkeit der Proteine | 49 |
| 3.1.3 Die Wahl der FRET-Paare | 50 |
| 3.2 Komplexbildung in Detergenzpuffer | 53 |
| 3.2.1 Kontrolle der Proteinkonzentration | 53 |
| 3.2.2 Abzug der Direktanregung | 56 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.2.3 | Bestimmung der FRET-Effizienzen in Akzeptortitrationen | 58 |
| 3.3 | Komplexbildung in Lipidmembranen | 65 |
| 3.3.1 | Kontrolle der Proteinkonzentration | 65 |
| 3.3.2 | Abzug der Direktanregung | 66 |
| 3.3.3 | Bestimmung der FRET-Effizienzen | 67 |
| 3.4 | Vergleich der Bindung in Detergenzpuffer und in Lipidmembranen | 68 |
| 3.5 | Zusammenfassung und Diskussion | 71 |
| 4 | Diffusions- und Bindungsstudien von NpSR_{II} und NpHtr_{II} in Giant Unilamellar Vesicles (GUV) | 74 |
| 4.1 | Herstellung von GUV und ihre Fusion mit Proteoliposomen | 74 |
| 4.2 | Bestimmung von absoluten Diffusionskoeffizienten mit 2fFCS (2-Fokus-Fluoreszenzkorrelationspektroskopie) | 78 |
| 4.2.1 | Kalibrierung des Gerätes | 78 |
| 4.2.2 | Messprinzip | 79 |
| 4.2.3 | Filtern von Störsignalen | 80 |
| 4.2.4 | Vergleich der Kreuzkorrelationen | 82 |
| 4.2.5 | Z-Stapel | 83 |
| 4.2.6 | Die Diffusionskoeffizienten der untersuchten Proteine | 84 |
| 4.3 | Zusammenfassung und Diskussion | 88 |
| 5 | Literaturverzeichnis | 93 |
| | Danksagung | 102 |
| | Eigenständigkeitserklärung | |

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Klare J. P., Bordignon E., Doebber M., Fitter J., Kriegsmann J., Chizhov I., Steinhoff H.-J., Engelhard M.,
Effects of Solubilization on the Structure and Function of the Sensory Rhodopsin II/Transducer Complex, *J. Mol. Biol.* 356 (2006) 1207-1221.
2. Kriegsmann J., Brehs M., Klare J., Engelhard M., Fitter J.,
Sensory Rhodopsin II/Transducer Complex Formation in Detergent and in Lipid Bilayers Studied with FRET, 2008, *Biochemistry*, under review

Abkürzungen und Symbole

| | |
|-------------------|--|
| 2D | zweidimensional |
| 2fFCS | 2-Fokus-Fluoreszenzkorrelationspektroskopie |
| 3D | dreidimensional |
| Å | Ångström, entspricht 0,1 Nanometern |
| Abb. | Abbildung |
| ACF | <i>auto correlation function</i> (Autokorrelationsfunktion) |
| BR | Bakteriorhodopsin |
| c | Konzentration |
| CCF | <i>cross correlation function</i> (Kreuzkorrelationsfunktion) |
| δ | Abstand der beiden Fokusse in 2fFCS |
| D | Diffusionskoeffizient |
| DDM | n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid |
| DLS | <i>dynamic light scattering</i> (Dynamische Lichtstreuung) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DOPE-biotinyl | 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-(Cap Biotinyl) |
| DOPE-PDP | 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[3-(2-pyridyldithio)propionat] |
| DIC | <i>differential interference contrast</i> |
| ϵ | molarer Absorptionskoeffizient |
| EDOPC | 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Ethylphosphocholin |
| F | Fraktion |
| E_{mess} | FRET-Effizienz |
| ESR | Elektronenspinresonanz |
| E_{theo} | theoretisch erreichbare FRET-Effizienz |
| Φ | Fluoreszenzquantenausbeute |
| FCS | Fluoreszenzkorrelationspektroskopie |
| FRET | Försterresonanzenergietransfer |
| γ | Markierungsverhältnis |
| $G(\tau)$ | Autokorrelationsfunktion |
| GUV | <i>giant unilamellar vesicle</i> (einschichtiges Riesenvesikel) |
| HR | Halorhodopsin |
| Htr(II) | Halobacterial transducer (II) |
| $I(\lambda)$ | Fluoreszenzintensität |

| | |
|------------------|---|
| ITO | <i>indium tin oxide</i> (Indium-Zinn-Oxid) |
| Kap. | Kapitel |
| K_D | Dissoziationskonstante |
| λ | Wellenlänge |
| LUV | <i>large unilamellar vesicle</i> (großes einschichtiges Lipidvesikel) |
| MLV | <i>multilamellar large vesicle</i> (großes mehrschichtiges Lipidvesikel) |
| mol/mol | molares Verhältnis |
| N | Teilchenzahl |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaN ₃ | Natriumazid |
| NpHtrII | <i>Natronomonas pharaonis Halobacterial transducer II</i> |
| NpSRII | <i>Natronomonas pharaonis Sensory Rhodopsin II</i> |
| kDa | Kilodalton |
| O.D. | optische Dichte |
| POPC | 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin |
| ρ | Flächendichte |
| R | Zylinder-Radius des Proteins |
| R_0 | Förster-Radius |
| rpm | <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| SR(II) | sensorisches Rhodopsin(II) |
| τ_D | Diffusionszeit |
| τ_R | Relaxationszeit |
| Tab. | Tabelle |
| T_c | Phasenübergangstemperatur für Phosphoglycerolipide, von der Gelphase zur flüssig-kristallinen Phase |
| TM | Transmembranelix |
| TRIS-HCl | Tris(hydroxymethyl-)aminomethan, Hydrochlorid |
| $U(\lambda)$ | Überlappintegral |
| w_0 | Fokusbildungsdurchmesser |
| WAE-11 | Fusionspeptid |

Die Abkürzungen für Aminosäuren entsprechen dem internationalen Ein- oder Dreibuchstaben-Code nach IUPAC-IUB-Vereinbarung (1969).

Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde detailliertes Wissen über den strukturellen Aufbau des sensorischen Rhodopsin II (NpSRII) und seines Transducers HtrII (NpHtrII) aus *Natronobacterium pharaonis* gewonnen. NpSRII stellt als Mitglied der Rhodopsin-Familie ein Modellprotein für G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren dar. Zur Erweiterung der Kenntnisse über die Struktur-Funktionsbeziehungen wurde darüber hinaus die Stärke der Komplexbildung in Detergenzpuffer untersucht. Jedoch lagen bisher nur wenige Untersuchungen zur Komplexbildung unter physiologischeren Bedingungen wie in Lipidmembranen vor. Auch zur Bindung bei physiologisch niedrigen Proteinkonzentrationen liegen bisher keine Ergebnisse vor.

Die Abschätzung der Bindungsaffinität erfolgte durch Bestimmung des Försterresonanzenergietransfers (FRET) proteingekoppelter Fluorophore bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst die NpSRII/NpHtrII-Dissoziationskonstante in Detergenzpuffer bestätigt ($K_D = 200$ nM) und anschließend die Komplexbildung in einschichtigen Lipidvesikeln (*large unilamellar vesicles*, LUV) untersucht. Der Vergleich der FRET-Effizienzen von Messungen in Detergenzpuffer und Lipidmembranen zeigt eine deutlich gesteigerte Bindungsaffinität von NpSRII und NpHtrII in Lipidmembranen, die mindestens eine Größenordnung über der in Detergenzpuffer liegt. Diese Ergebnisse unterstützen bisherige Studien, nach denen die in Detergenzpuffer gemessenen Eigenschaften integraler Membranproteine nur begrenzt aussagefähig sind.

In weiteren Untersuchungen wurden die Proteoliposomen in größere einschichtige Lipidvesikel (*giant unilamellar vesicles*, GUV) fusioniert, wodurch ein molares Protein-Lipid-Verhältnis von 1:1.000.000 erreicht wurde und somit eine Annäherung an physiologisch niedrige Proteinkonzentrationen gelang. Anhand dieses Modellsystems wurden mit Hilfe der neuartigen 2-Fokus-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (2fFCS) die Diffusionskoeffizienten von fluoreszenzmarkiertem NpSRII und NpHtrII ermittelt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass selbst bei niedrigen Protein-Lipid-Verhältnissen die NpSRII/NpHtrII-Bindung erhalten bleibt. Die Auftragung der Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit des Zylinder-Radius R ergibt eine $1/R$ -Abhängigkeit. Dies bestätigt jüngere Studien, die im Widerspruch zum weitverbreiteten Modell von Saffman und Delbrück eine stärkere Abhängigkeit zwischen dem Diffusionskoeffizienten und dem Zylinder-Radius eines diffundierenden Partikels beschreiben.

Summary

During the past few years detailed knowledge of the structure of sensory rhodopsin II (NpSRII) and its cognate transducer HtrII from *Natronobacterium pharaonis* has been gained. NpSRII, a member of the rhodopsin family, serves as a model protein for G-protein coupled receptors. To increase the state of knowledge of the relations between structure and function, earlier studies determined the strength of NpSRII/NpHtrII-binding in detergent buffer. However, little is known about the complex formation in more physiological conditions like in lipid membranes. Binding studies for low protein concentrations as they occur in *N. pharaonis* have not been performed to this date.

The evaluation of NpSRII/NpHtrII-binding was implemented by measuring Förster resonance energy transfer (FRET) of fluorescently labelled proteins at different concentrations. In this work the dissociation constant of NpSRII/NpHtrII in detergent buffer ($K_D = 200$ nM) was reproduced and the complex binding in large unilamellar vesicles (LUV) was analyzed, subsequently. A comparison of FRET-efficiencies, as observed for proteins in detergent buffer and in lipid membranes, shows increased binding affinities of NpSRII and NpHtrII in lipids of at least one order of magnitude. Hence, these results support previous studies, which show that the results observed in detergent buffers are limited in their informational value.

In further studies the proteoliposomes were incorporated into giant unilamellar vesicles (GUV) by peptide-induced membrane fusion, to mimic physiologically low protein concentrations. This led to a molar protein-lipid-ratio of 1:1,000,000, as it occurs in bacteria. From this model system exact diffusion coefficients of fluorescently labelled NpSRII and NpHtrII were determined by using the new 2fFCS-technique (two-focus fluorescence correlation spectroscopy). The results indicate, that the NpSRII/NpHtrII-binding is observed even at physiologically protein concentration. The diffusion coefficients were proportional to the inverse cylinder radius of the proteins. This is in the line with recently published studies that show discrepancies to the far spread model of Saffman and Delbrück.

1 Einleitung

1.1 Rezeptorproteine von Bakterien

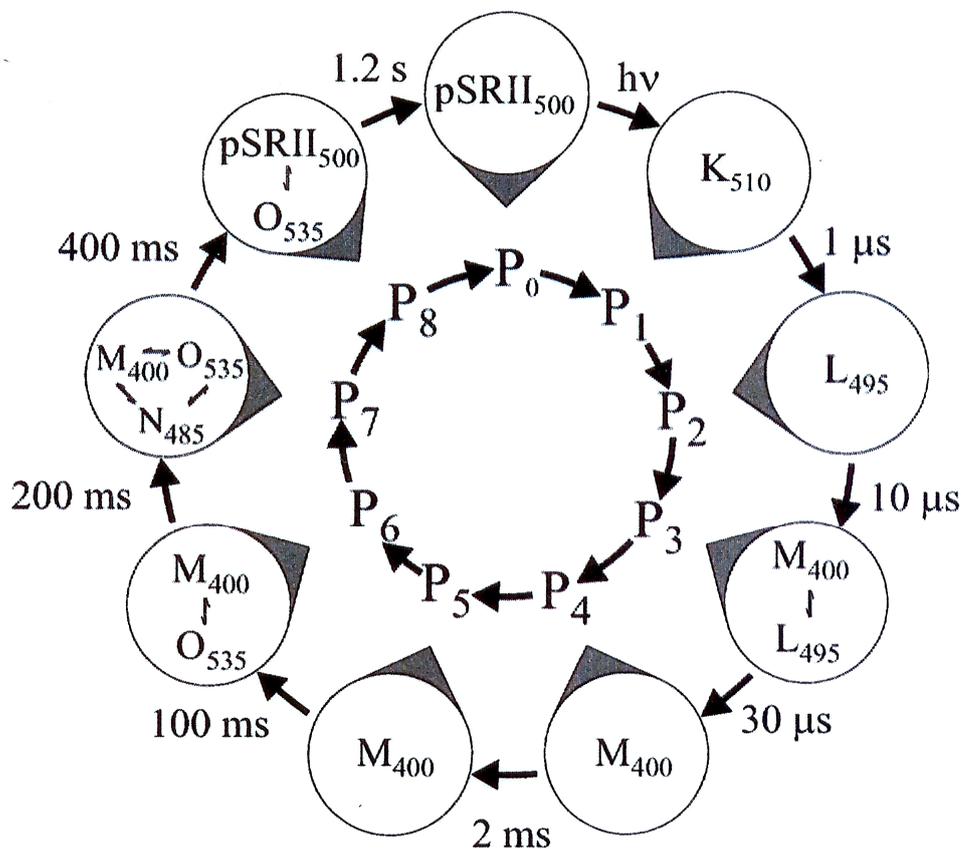
Die Reaktion auf Veränderungen in der Umgebung ist eine der fundamentalen Eigenschaften von Lebewesen. Sie basiert auf Rezeptoren in der Zellmembran, der Schnittstelle von Organismen zu ihrer Umwelt. Diese Rezeptoren werden von Membranproteinen gebildet, die einen spezifischen Reiz empfangen und in die Zelle weiterleiten können. Damit stehen sie am Anfang einer Kette von Prozessen, die schließlich zur messbaren physiologischen Reaktion des Organismus führen. Eine solche Reaktionskette läuft nach einem festem Schema ab und wird Signaltransduktionskaskade genannt, da der empfangene Reiz in Form von chemischen Kettenreaktionen durch die Zelle geleitet wird. Auch Bakterien reagieren als einfachste Lebensform bereits auf eine Reihe von Reizen wie z.B. chemische Moleküle, Magnetismus und Licht. Die Reaktionsprozesse nennt man den Reizen entsprechend Chemotaxis, Magnetotaxis und Phototaxis. Letztere tritt in verschiedenen Formen bei fast allen Lebewesen auf. Während im Tierreich die Lichtrezeption im Sehprozess perfektioniert ist, zeigen Bakterien eine primitivere Lichtwahrnehmung, die sich z. B. in einer Änderung ihrer Fortbewegungsrichtung äußert. Sie können auf die Absorption von Photonen reagieren, indem sie auf eine Lichtquelle zu schwimmen oder zellschädigendes Licht meiden.

Die Rezeptoren des menschlichen Auges und die von Bakterien haben einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau und gehören damit derselben Familie an. Es handelt sich um Rhodopsin-ähnliche Sieben-Helix-Rezeptoren, auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren genannt. Diese Familie umfasst nicht nur Lichtrezeptoren, sondern mit ihren über 2.000 Mitgliedern auch Geruchs- und Geschmackssensoren, allgemein als Chemozeptoren bezeichnet. Als Lichtrezeptoren bilden die Rhodopsine eine Besonderheit: ihre sieben Transmembranhelizes (Helix A bis G) sind rund um ein Sehpigment angeordnet, das Retinal-Chromophor. Dabei handelt es sich um ein Vitamin-A-Derivat, das kovalent über eine protonierte Schiff-Base an die Aminosäure Lysin gebunden ist. Durch sein ausgedehntes π -Elektronensystem kann es sichtbares Licht absorbieren und zeigt dabei ein charakteristisches Absorptionsspektrum.

Rhodopsine werden häufig als Modellproteine für die gesamte Proteinfamilie benutzt, da sie auf experimentell einfach und präzise zu kontrollierendes Licht reagieren. Die in der vorliegenden Studie untersuchten archaebakteriellen Rhodopsine haben überdies den Vorteil, dass das enthaltene Retinal eine zyklische Reaktion durchläuft, wie

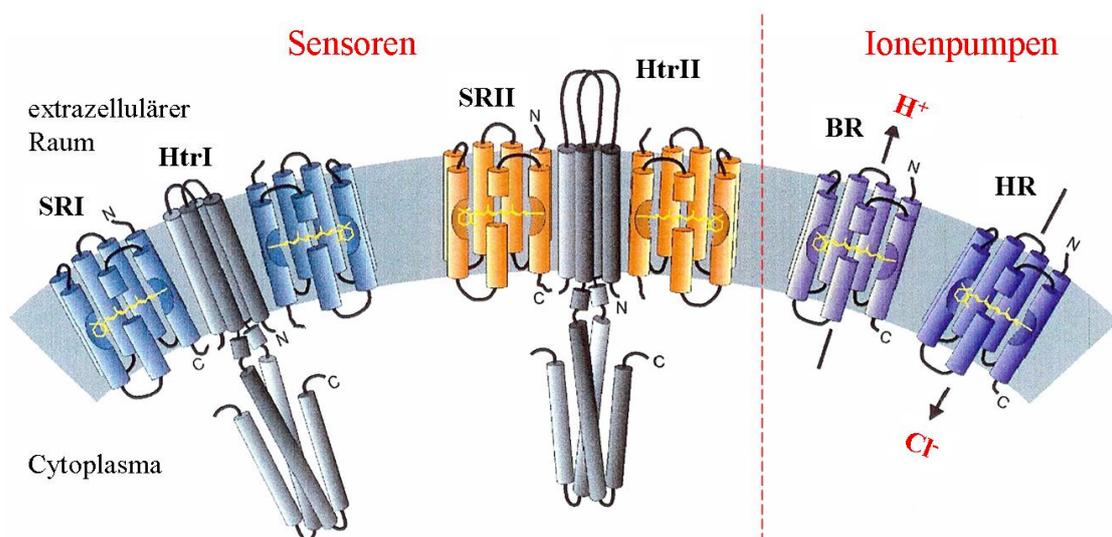
in Abb. 1.1 am Beispiel des sensorischen Rhodopsin II aus *Natronobacterium pharaonis* (NpSRII) gezeigt (Chizov, 1998). Aus seinem Grundzustand, der all-trans-Konformation, wechselt es bei Absorption eines Photons in die 13-cis Konformation. Unter thermischer Relaxation kehrt es dann in den Grundzustand zurück. Diese Reaktion wird Photozyklus genannt und ermöglicht es, das Retinal wiederholt anzuregen. Eukaryotische Rhodopsine haben dagegen keinen Photozyklus. Ihr Retinal liegt im Grundzustand als 11-cis-Variante vor und wechselt nach Anregung in den all-trans-Zustand. Dabei wird die kovalente Bindung zum Lysinrest gespalten und das Retinal tritt aus dem Rhodopsin aus. Eukaryotisches Rhodopsin kann daher in vitro nur einmal angeregt werden und erfordert aufwändigere Präparationen als die archaebakteriellen Varianten, da alle Schritte bis zur experimentellen Belichtung in vollständiger Dunkelheit oder unter Rotlicht ablaufen müssen.

Abb. 1.1 Photozyklus des Rezeptorproteins NpSRII aus *N. pharaonis*. Die Intermediate K, L, M, N und O unterscheiden sich spektral durch verschiedene Absorptionsmaxima von 400 nm (M-Zustand) bis 535 nm (O-Zustand). Das Absorptionsmaximum des Grundzustandes liegt bei $\lambda_{Abs, max} = 500$ nm. Die Intermediate können durch kinetische Zustände P mit unterschiedlichen Lebensdauern beschrieben werden. Für einen vollständigen Durchlauf benötigt der Photozyklus etwa zwei Sekunden. Abbildung nach Chizov, 1998.



Obwohl mikrobielle Rhodopsine bereits gut untersucht sind, werden vor allem in salzliebenden (halophilen) Eubakterien auch in den letzten Jahren immer wieder neue Varianten entdeckt, so zum Beispiel Proteorhodopsin aus marinem Bakterioplankton (Beja, 2000) und Xanthorhodopsin aus *Salinibacter ruber* (Balashov, 2005). Am besten erforscht sind jedoch die Rhodopsine von Halobakterien, einer Gruppe salzliebender Archaeobakterien. Sie gliedern sich in zwei Gruppen, die Ionenpumpen und die sensorischen Rhodopsine (Abb. 1.2). Zu den Ionenpumpen gehören Bakteriorhodopsin (BR) für den Protonentransport in den extrazellulären Raum und Halorhodopsin (HR) für den Transport von Chloridionen ins Zellinnere. Diese beiden Ionenpumpen dienen der Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes. Die sensorischen Rhodopsine (SR) hingegen sind Pigmente, die phototaktisches Verhalten der Zellen ermöglichen. Es existieren zwei Arten mit unterschiedlicher Funktion: SRI vermittelt die Bewegung in Richtung der Lichtquelle, während SRII die Bewegung von der Lichtquelle weg verursacht. Das Zusammenspiel dieser Rhodopsine ist für *Halobacterium salinarum* bereits gut untersucht (Jung, 2007): In sauerstoffreicher Umgebung synthetisieren die Zellen ausschließlich SRII, den abstoßenden Photorezeptor. Er detektiert UV-Strahlung und Licht niedriger Wellenlängen, das freie Sauerstoffradikale produzieren kann und sorgt dafür, dass sich das Bakterium von dieser schädlichen Lichtquelle entfernt. Der Organismus wird somit vor irreparablen Zellschäden geschützt. Nimmt die Sauerstoffkonzentration in Folge höherer Zelldichte und intensiver Sonneneinstrahlung ab, besteht diese Gefahr nicht mehr und SRII wird nicht mehr exprimiert. Die Zellen produzieren dann HR und BR zur Energiegewinnung durch ATP-Synthese und zusätzlich SRI. Dieses Rhodopsin

Abb. 1.2: Schematische Darstellung der vier archaebakteriellen Rhodopsine SRI und SRII, BR und HR. (nach Klare, 2002). Die beiden sensorischen Rhodopsine (SR) sind mit ihren benachbarten Transducern (Htr) abgebildet.



detektiert unschädliches orangefarbenes Licht höherer Wellenlängen, das optimal für die Funktion von HR und BR ist. Es bewirkt, dass sich das Bakterium auf die Lichtquelle zu bewegt um die Energiegewinnung zu optimieren. Die Gegenwart des Retinals führt zu einer sichtbaren Färbung der Rhodopsine von rot (SRII) über lila (BR) bis blau (SRI). Bakteriorhodopsin wurde vor über 35 Jahren entdeckt und umfassend erforscht (Oesterhelt, 1973), seit Beginn der 1980er Jahre wurden auch die damals neu entdeckten sensorischen Rhodopsine in Hinblick auf ihre Funktion betrachtet. Die sensorischen Rhodopsine benötigen für die Signaltransduktion ein benachbartes Protein. Es durchspannt die Membran mit zwei Helizes und besitzt eine ausgedehnte 25 nm lange cytoplasmatische Domäne. Da es bei Halobakterien die Funktion eines Signalüberträgers (lat.: traducere, übertragen) übernimmt, trägt es die entsprechende englische Bezeichnung *halobacterial transducer*, kurz Htr.

Die cytoplasmatische Htr-Domäne zeigt große strukturelle Ähnlichkeit zu Chemorezeptoren von Eubakterien wie *Escherichia coli*, (Oprian, 2003). Sie basieren auf erheblichen Sequenzhomologien, die sich auch in der analogen Funktion äußern: Beide nehmen über die jeweiligen membrangebundenen Rezeptoren einen Reiz auf und leiten die Information durch die Membran zur cytoplasmatischen Domäne. Damit wird die nachfolgende Signalverarbeitung und Signalverstärkung ausgelöst. Das von Chemosensoren detektierte Signal wird im Bakterium etwa 50fach verstärkt, d.h. eine einprozentige Änderung der Ligandenbindung hat eine 50 % häufigere Rotation der Geißel in diejenige Richtung zur Folge, die zur gewünschten Bewegungsrichtung des Organismus führt. Der Großteil dieser Signalverstärkung findet direkt am Rezeptorkomplex statt – wenn das Signal diesen verlässt, ist es bereits 36fach verstärkt (Hazelbauer, 2008). Da es bislang nicht gelungen ist, NpHtrII in voller Länge zu kristallisieren, wurde der weitgehend homologe Chemorezeptor als Modell für die cytoplasmatische Domäne des Htr

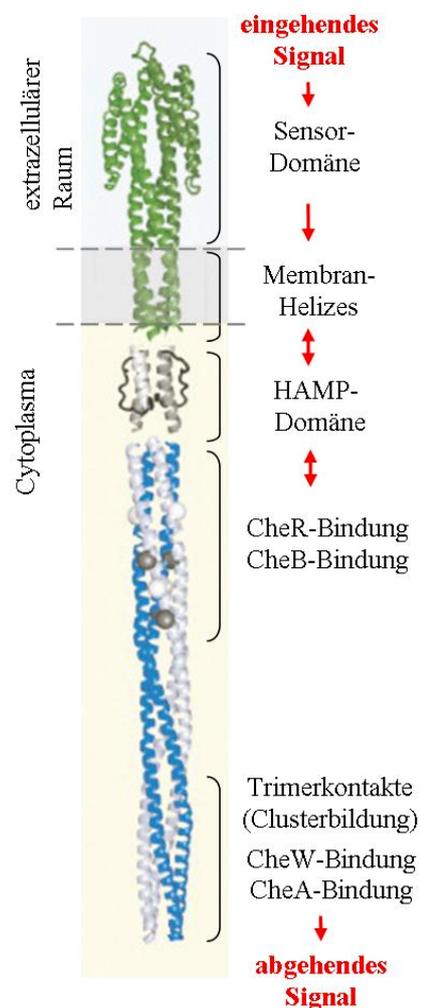


Abb. 1.3: Bau eines Serin-Chemorezeptor-Dimers nach Hazelbauer, 2008.

verwendet. Er liegt im funktionalen Zustand als *coiled-coil*, also als Doppelwendel-Homodimer vor und ist bereits gut im Hinblick auf die Funktionen seiner verschiedenen Strukturbereiche untersucht (Abb. 1.3, Hazelbauer, 2008). Transducer und Chemorezeptoren besitzen beide eine HAMP-Domäne (Bordignon, 2005) und unterscheiden sich strukturell nur dadurch, dass die Chemorezeptoren zusätzlich eine extrazelluläre sensorische Domäne zur Ligandenbindung besitzen. HtrII hat dagegen keine eigene Rezeptordomäne. Der Großteil des cytoplasmatischen Teils beider Proteine dient der Kontrolle verschiedener Kinasen, die weitere Schritte in der Signaltransduktionskaskade auslösen. Am Ende der cytoplasmatischen Domäne liegen Bindungsstellen, über die sich Chemorezeptoren zusammenlagern können.

Die Zusammenlagerungen der Rezeptorkomplexe, auch Überstrukturen oder Cluster genannt, sind seit vielen Jahren bekannt. Ihre Bedeutung liegt einerseits in der räumlichen Trennung von Zellregionen für spezialisierte Funktionen, als auch in erhöhter Rezeptorempfindlichkeit (Kim, 2002). Die vorliegenden Ergebnisse für Chemorezeptoren legen die Vermutung nahe, dass SRII und HtrII ähnliche Überstrukturen bilden. Chemorezeptoren lagern sich besonders an den Polen der Bakterienzellen zu großen Bereichen zusammen, die erstmals mit Immunogold-Markierungen nachgewiesen werden konnten (Maddock, 1993). Nachdem ihr dreidimensionaler Aufbau unter anderem mit der Röntgenkristallstrukturbestimmung der cytoplasmatischen Domäne entschlüsselt wurde (Kim, 1999), konnten Aussagen zur Feinstruktur ihrer Cluster getroffen werden. Modellierungen wiesen auf eine Gruppierung von jeweils drei Homodimeren zu einer funktionellen Einheit, dem Trimer-of-Dimer, hin. Daraus resultieren möglicherweise hexagonale Cluster (Shimizu, 2000; Kim, 2002). Aus jüngsten elektronenmikroskopischen Studien geht hervor, dass funktionale Cluster von Chemorezeptoren nur bei Anwesenheit der Histidinkinase CheA und des Adapterproteins CheW gebildet werden (Zhang, 2007). Die Bereiche beinhalten viele tausend Moleküle und sind durchschnittlich 250 nm groß, wobei die Größe stark variieren kann (Hazelbauer, 2008).

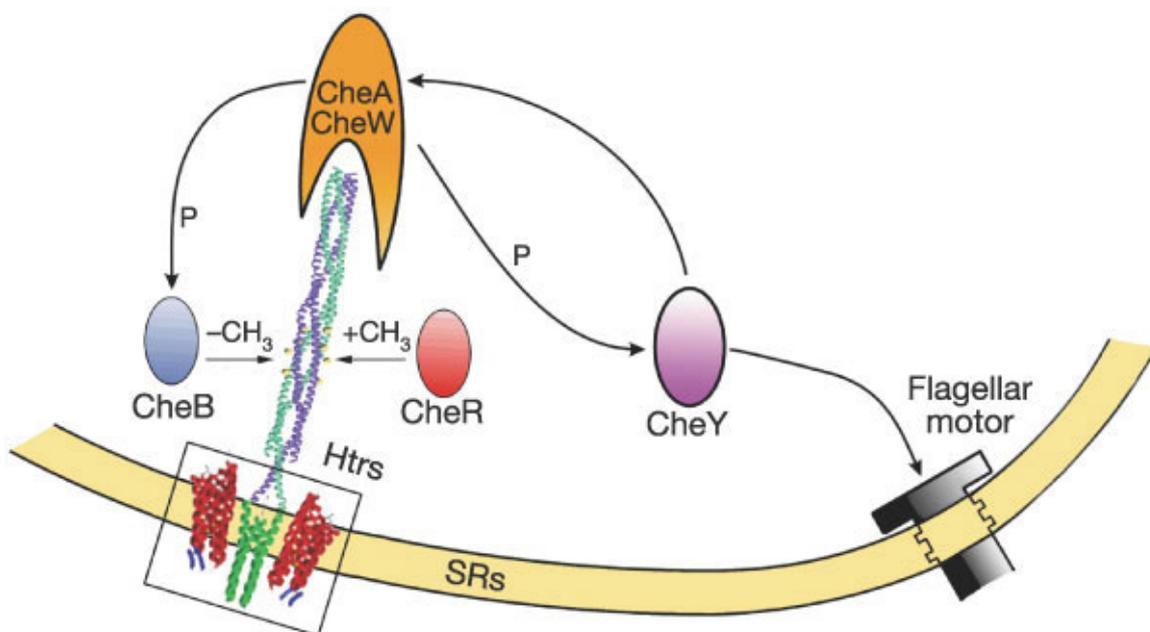
Ähnliche Cluster sind in Form der Purpormembranen auch bei Bakteriorhodopsin beschrieben. BR bildet in Bakterien große lila- bzw. purpurfarbene Flecken, die der Membran den Namen gaben und Zentren des Ionentransportes darstellen. Die Zusammenlagerungen bilden ein wabenförmiges hexagonales Gitter, das vor allem der dichteren Packung der Proteine und damit einer effizienteren ATP-Synthese dient. Für sensorisches Rhodopsin ist die Bildung von Überstrukturen noch nicht beobachtet worden. Aufgrund der weitgehenden Analogie zwischen den Transducern und Chemorezeptoren sowie der Tatsache, dass auch BR ausgedehnte Cluster bildet, ist Gleiches jedoch auch für den Komplex aus NpSRII/NpHtrII wahrscheinlich.

1.2 Der Rezeptor-Transducer-Komplex NpSRII/NpHtrII aus *Natronobacterium pharaonis*

In der vorliegenden Arbeit wurden sensorisches Rhodopsin II und sein benachbarter Transducer HtrII aus *Natronobacterium pharaonis* untersucht. Die Abkürzungen der beiden Proteinbezeichnungen lauten demnach NpSRII und NpHtrII. *N. pharaonis* ist ein ca. 2 – 3 μm langes gramnegatives Stäbchenbakterium, dessen Stoffwechsel ausschließlich auf der Reduktion von Nitraten beruht (Tindall, 1984). Es ist stark halophil und kommt daher beispielsweise in den Salzseen von Wadi Natrun in Ägypten vor (Soliman und Trüper, 1982). Seine optimalen Lebensbedingungen sind extrem: Sie werden in 45 °C warmer 20 – 25 %iger Kochsalzlösung bei alkalischen pH-Werten von 8,5 bis 9,5 erreicht. Sogar sehr alkalische pH-Werte bis 11 werden toleriert. Aus frühen Studien mit *Halobacterium salinarum* ist bekannt, dass pro Zelle etwa 430 ± 50 Kopien von SRII auftreten (Otomo, 1989).

Die Signaltransduktionskaskade von NpSRII/NpHtrII ist schematisch in Abb. 1.4 dargestellt. Nach der Absorption eines Photons durch SRII durchläuft das Retinal den Photozyklus (Chizov, 1998) und übergibt das Signal an Htr. Dieser trägt in seiner langen cytoplasmatischen Domäne Methylierungsstellen, die Bindungsstellen für die Kinasen CheB und CheR darstellen. Die Signalkaskade wird auch durch die Bindung von CheW und CheA beeinflusst (Hazelbauer, 2008). Den Übertragungsschritt zum Flagellarmotor

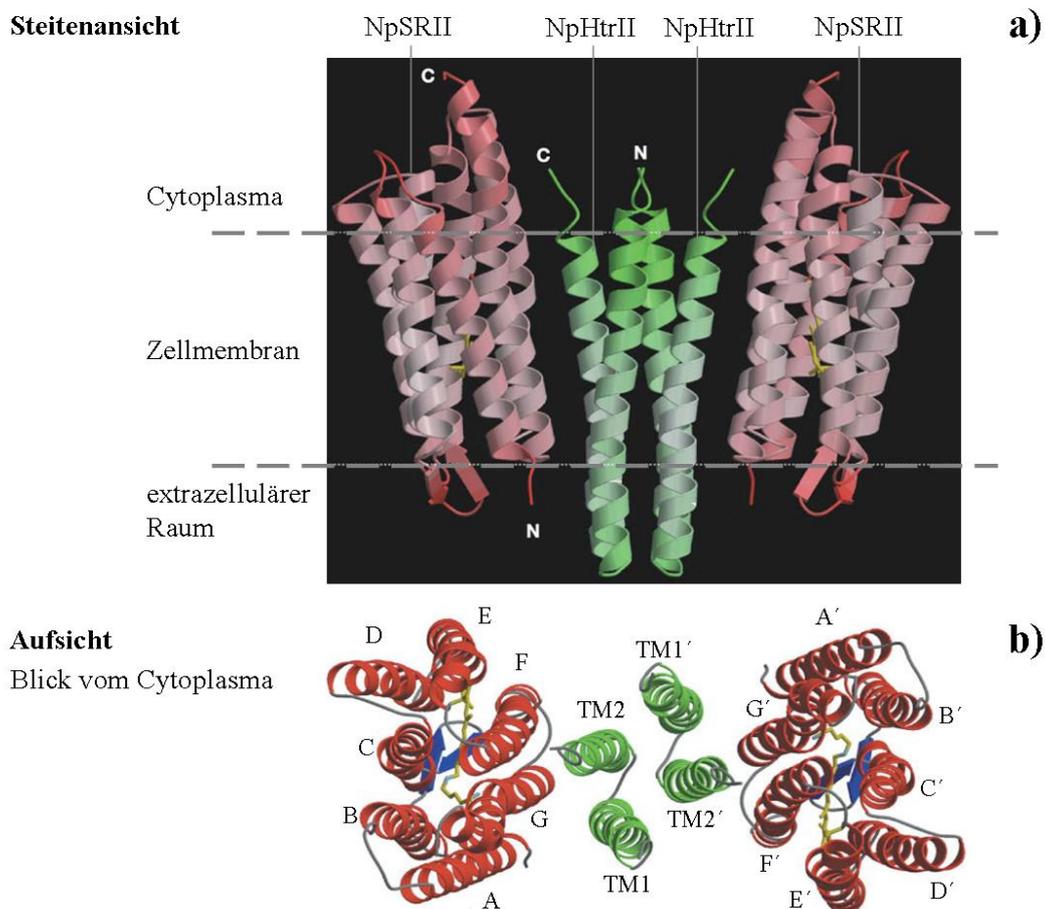
Abb. 1.4: Signaltransduktionskaskade von NpSRII/NpHtrII in *Natronobacterium pharaonis*, nach Gordeliy, 2002.



stellt die Phosphorylierung von CheY dar. Sie dient als Schalter für den Motor und steuert im Ergebnis die Drehrichtung der Flagelle.

Sowohl für NpSR_{II} als auch für die Membrandomäne von NpHtr_{II} sind dreidimensionale Röntgenkristallstrukturen mit atomarer Auflösung bekannt (Luecke, 2001; Royant, 2001; Gordeliy, 2002). Gordeliy et al. zeigten den Bau des Komplexes, bestehend aus beiden Proteinen in der kubischen Lipidphase (Abb. 1.5). Da die lange hydrophile cytoplasmatische Domäne des NpHtr_{II} für Strukturaufklärung durch Röntgenstreuung zu flexibel war, wurde sie für die Kristallisationsexperimente entfernt und nur der Transmembranteil bis 114 Aminosäuren Länge verwendet. Die resultierende Struktur zeigt einen 2:2-Komplex aus einem zentralen Homodimer von NpHtr_{II} in der Mitte und zwei außen liegenden NpSR_{II} (Abb. 1.5). Die Kristallisation erfolgte im

Abb. 1.5: Röntgenkristallstrukturen des 2:2-Komplexes aus NpSR_{II} (rot) und NpHtr_{II} (grün) a) in der Seitenansicht und b) in der Aufsicht (nach Gordeliy, 2002). Die NpHtr_{II}-Strukturen zeigen nicht die volle Länge des Proteins, sondern nur die Transmembranhelizes TM1 und TM2 bis zur Aminosäure 82. Die cytoplasmatische Domäne wurde zur Kristallisation entfernt. Die Lage der Lipidmembran ist mit grauen Strichen markiert. Der Retinal-Chromophor von NpSR_{II} ist gelb dargestellt.



molaren Protein-Lipid-Verhältnis von 1:35, das zu einer hohen Packungsdichte der Proteine führte. ESR-Studien von Wegener et al. (2001) bei einem molaren Protein-Lipid-Verhältnis von 1:25 unterstützten die These, dass NpSR_{II} und NpHtr_{II} in einem solchen 2:2-Komplex in der Membran vorliegen.

Zur Untersuchung der Struktur-Funktions-Beziehungen liegen bereits einige Studien in Detergenzpuffer vor (Sudo, 2001; Hippler-Mreyen 2003; Sudo 2004). Dabei wurde im Gegensatz zum 2:2-Komplex aus Lipidumgebung nur die Bildung eines 1:1-Komplexes von NpSR_{II}/NpHtr_{II} beobachtet. Durch isotherme Kalorimetrie (ITC) wurde eine Dissoziationskonstante $K_D = 200$ nM für diesen NpSR_{II}/NpHtr_{II}-Komplex ermittelt (Hippler-Mreyen, 2003). Neben ESR-Studien (Klare, 2004) und Messungen von Eigenschaften des Photozyklus (Pebay-Peyroula, 2002; Bergo, 2005; Moukhametzianov, 2006) wurde in letzter Zeit auch Försterresonanzenergietransfer (FRET) zur Untersuchung der Wechselwirkungen von NpSR_{II} und NpHtr_{II} angewendet (Yang, 2004; Taniguchi 2007 a und b). FRET-Studien bieten den Vorteil, dass sie in einen sehr großen Proteinkonzentrationsbereich durchgeführt werden können. Zusätzlich ermöglichen sie Messungen in Lipidmembranen und insbesondere auch die Wechselwirkung von Homodimeren. Für einige andere Membranproteine wurden Fluoreszenztechniken bereits zur Untersuchung der Proteinoligomerisierung bei niedrigen Protein-Lipid-Verhältnissen verwendet. Dabei wurden zum Teil Liposomensysteme (Li, 2005; Mansoor, 2006) aber auch Zellen (Overton, 2002; Mercier, 2002; Balannik, 2008) untersucht.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wechselwirkungen von NpSR_{II} und NpHtr_{II} in künstlichen Lipidmembranen zu untersuchen. Dabei wird versucht, Protein-Lipid-Verhältnissen nahe zu kommen, wie sie in Bakterienzellen vorliegen. Bisherige Studien fanden ausschließlich bei hohen Protein-Lipid-Verhältnissen bis 1:50 (mol/mol) statt, bei denen die Proteine relativ dicht gepackt waren (Gordeliy, 2002, Wegener 2001)). Unter physiologischen Bedingungen kommen jedoch in *Halobacterium salinarum* nur etwa 430 ± 50 pro Zelle Komplexe vor (Otomo, 1989), was einem Protein-Lipid-Verhältnis von etwa 1:1.000.000 (mol/mol) entspricht. Durch eine solche Verdünnung der Proteine soll die Bildung der 2:2-Komplexe (Gordeliy, 2002) bei nativen Protein-Lipid-Verhältnissen überprüft werden, um weitere Einblicke in die tatsächliche Anordnung der Proteine in Biomembranen zu ermöglichen. Die Bindung der beiden Proteine wird als Voraussetzung für den ersten Schritt in der Signaltransduktionskaskade betrachtet und ist daher von besonderer biologischer Relevanz. Bisherige Untersuchungen fanden vor allem in Detergenzpuffer statt, der zu Abweichungen im konformativen Verhalten und in der

Komplexbildung führt (Klare, 2006). Für die Rückführung der Membranproteine in Lipidmembranen soll ein Rekonstituierungsprotokoll entwickelt werden, das eine Untersuchung der Proteine in definierten einschichtigen Lipidsystemen ermöglicht. Darüber hinaus soll eine Methode gefunden werden, die eine Verdünnung der Proteine auf physiologische Flächendichten ermöglicht. Messungen zu derart niedrigen Protein-Lipid-Verhältnissen lagen für NpSR_{II}/NpHtr_{II} bisher nicht vor.

Die Untersuchung der auftretenden Protein-Protein-Wechselwirkungen soll mit Försterresonanzenergietransfer (FRET) erfolgen, der eine gezielte Fluoreszenzmarkierung der Proteine nötig macht. In der vorliegenden Arbeit werden daher auch Kriterien für die Güte dieser Markierung untersucht und umfassend bewertet. Parallel zu FRET-Messungen wird als weitere fluoreszenzspektroskopische Technik die 2-Fokus-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (2fFCS, Dertinger, 2007) angewendet. Für diese neue Variante der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie sollen anhand von NpSR_{II} und NpHtr_{II} erstmals Diffusionskoeffizienten integraler Membranproteine bestimmt werden.

Die 2fFCS liefert präzisere Diffusionskoeffizienten als konventionelle FCS. Aus der Diffusion kann auf den hydrodynamischen Radius der diffundierenden Partikel geschlossen. Die genaue Kenntnis der Radien ist wiederum eine Voraussetzung für zuverlässigere Aussagen zu Protein-Protein-Bindungen. In der vorliegenden Arbeit sollen daher mittels 2fFCS-Messungen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Findet eine Bindung von NpSR_{II} und NpHtr_{II} bei physiologischen Protein-Lipid-Verhältnissen statt?
2. Wird der von Gordeliy et al. 2002 beschriebene 2:2-Komplex auch bei niedrigen Protein-Packungsdichten ausgebildet?
3. Bilden sich Überstrukturen, wie sie für Chemorezeptoren bekannt sind?

2 Material und Methoden

2.1 Fluoreszenzmarkierung der Proteine

2.1.1 Proteine

Um die Wechselwirkungen der Proteine untersuchen zu können, müssen diese zunächst mit gut detektierbaren Molekülen markiert werden. Häufig werden dazu Fluoreszenzmarker benutzt, auch Fluoreszenzsonden, -farbstoffe oder Fluorophore genannt. Für die Interpretation der Ergebnisse muss die Markierungsstelle am Protein bekannt sein, um beispielsweise den Abstand zwischen beiden Fluorophoren abschätzen zu können (Becker, 2006). Eine solche ortsspezifische Kopplung der Marker ist effizient und einfach über die kovalente Bindung an Thiolgruppen der Proteine mit Maleinimidgruppen der Fluorophore umzusetzen. Thiole sind bei Aminosäuren ausschließlich in Cysteinen vorhanden. Diese Aminosäure kommt jedoch in der natürlichen Sequenz von NpSR_{II} und NpHtr_{II} nicht vor. Daher wurden für die vorliegende Studie Mutanten beider Proteine verwendet, bei denen mittels Punktmutation eine Aminosäure durch Cystein ersetzt wurde. Die Mutationen wurden an Stellen eingeführt, die sich an der vermuteten Grenzfläche von Protein und Lipidmembran befinden. Hier gekoppelte Fluoreszenzmarker bilden einen geeigneten Abstand für FRET-Untersuchungen und die Bindung von NpSR_{II} und NpHtr_{II} wird sterisch nicht behindert. Zum Einsatz kamen die Mutanten NpSR_{II}K157C und NpHtr₁₅₇V78C und A94C, die alle von Martin Engelhard und Johann Klare (MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund) zur Verfügung gestellt wurden.

Die absoluten molekularen Massen der Proteine und ihrer Mutanten betragen 26,5 kDa für NpSR_{II} und 17,4 kDa für NpHtr₁₅₇. Für einige FRET-Experimente wurde statt der NpSR_{II}-Mutante auch natürliches NpSR_{II} eingesetzt, wobei das enthaltene Retinal-Chromophor als Akzeptor des Energietransfers diente. Die Proteine waren in Detergenzpuffer gelöst, der 50 mM NaCl (Fluka, Seelze, Deutschland), 10 mM Tris-HCl (Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland) und 1 mM N-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM, Anatrace, Maumee, USA) enthielt. Wenn nicht anders erwähnt, betrug der pH-Wert bei Raumtemperatur 7,2. Die pH-Werte wurden mit Salzsäure (HCl) oder Natriumhydroxid (NaOH, beide Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland) eingestellt (pH-Meter CG841, Schott, Mainz, Deutschland). Für Präparationen in Lipidumgebung wurde der oben genannte Standardpuffer ohne Detergenz verwendet.

2.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

| Name | molekulare Masse [g/mol] | Eigenschaften in Wasser | | | Eigenschaften in Detergenzpuffer | | |
|-----------------|--------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------|----------------------------------|---------------------------------|--|
| | | $\lambda_{\text{Abs, max}}$ [nm] | $\lambda_{\text{Em, max}}$ [nm] | Φ_D | $\lambda_{\text{Abs, max}}$ [nm] | $\lambda_{\text{Em, max}}$ [nm] | molarer Absorptionskoeffizient ϵ_{max} [l/mol x cm ⁻¹] |
| Atto 425 | 524 | 436 | 484 | 0,9 | 434,0 | 464 | 45.000 |
| Alexa Fluor 532 | 813 | 531 | 554 | 0,9 | 525,5 | 550 | 81.000 |
| Alexa Fluor 633 | 1300 | 631 | 647 | 0,3 | 628,0 | 646 | 164.500 |
| Atto 655 | 812 | 663 | 684 | 0,3 | - | - | 125.000 |
| Cy7Q | 1071 | 743 | 767 | - | 744,0 | 750* | 100.000 |

Tab. 2.1: Spektrale Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in ungebundenem Zustand. Angegeben sind die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_D , das Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{Abs, max}}$ und das Emissionsmaximum $\lambda_{\text{Em, max}}$ für Wasser (laut Datenblatt), letztere auch für Detergenzpuffer (eigene Messungen). Atto 655 wurde ausschließlich für 2fFCS-Kalibrierungen in Wasser benutzt, daher liegen keine Werte in Detergenzpuffer vor. *Cy7Q zeigt nur eine sehr schwache Emission, daher ist der Wert nur ungenau bestimmbar.

Die Proteinmutanten wurden mit Maleinimidkonjugaten der Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 633 (beide Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) Atto 425, (Atto-Tec GmbH, Siegen, Deutschland) und Cy7Q (GE Healthcare Ltd., Little Chalfont Buckinghamshire, UK) markiert (Tab. 2.1). Der Fluorophor Atto 655 (Atto-Tec GmbH, Siegen, Deutschland) wurde nicht an die Proteine gekoppelt, sondern lediglich für die Kalibrierung des 2fFCS-Setup verwendet (Kap. 2.6.3). Für die spektrale Trennung von Farbstoff und Retinal eigneten sich besonders die Fluorophore Alexa Fluor 633 und Cy7Q, da sie rotes Licht mit sehr hohen Wellenlängen absorbierten, wogegen Retinal blaugrünes Licht um 500 nm absorbierte. Damit überlagern sich die Absorptionsspektren von Protein und Fluorophor im Bereich des Absorptionsmaximums kaum. Zudem hatten die Fluoreszenzsonden für die Absorptionsmaxima sehr hohe molare Absorptionskoeffizienten $\epsilon_{\text{max}} \geq 100.000 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}^{-1}$, sodass auch niedrige Farbstoffmengen gut detektiert werden konnten. Die Strukturen von Atto 425 und Cy7Q waren bekannt und sind in der maleinimidkonjugierten Form in Abb. 2.1 dargestellt. Die Strukturen von Alexa Fluor 532 und Alexa Fluor 633 unterliegen dagegen einem Patentschutz und sind

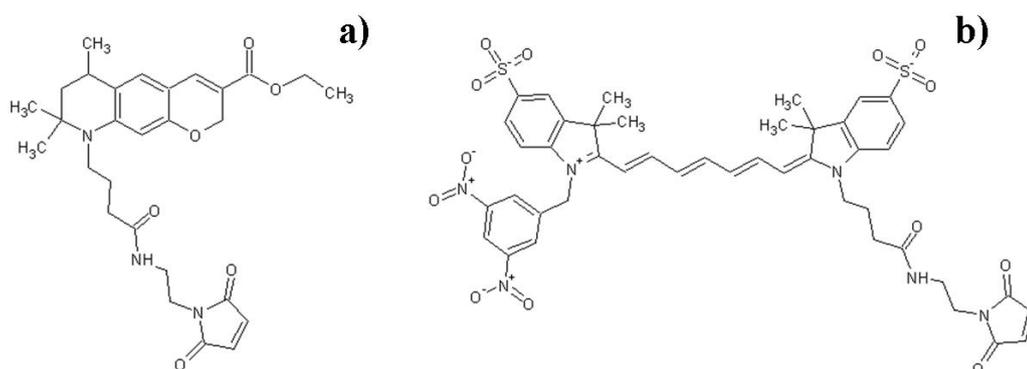
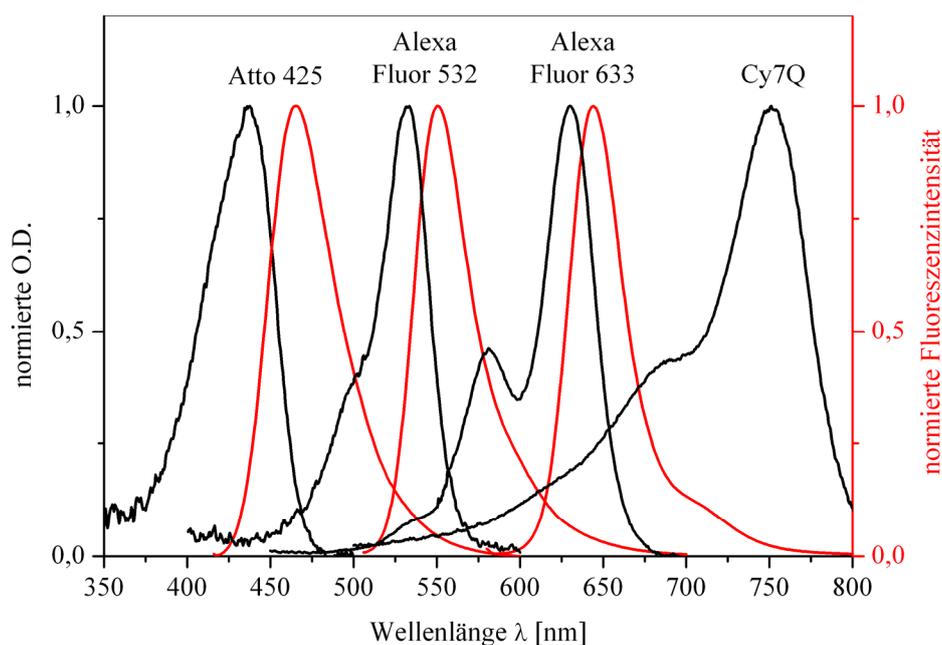


Abb. 2.1: Strukturformeln der Fluorophore Atto 425 (a) und Cy7Q (b). Die Farbstoffe tragen einen Maleinimidrest als funktionelle Gruppe (unten rechts).

nicht veröffentlicht. Die gefriergetrockneten Farbstoffe wurden zunächst in 200 μl wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) gelöst, anschließend aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Charakterisierung wurde von jedem Farbstoff das Anregungs-, Absorptions- und Fluoreszenzspektrum aufgenommen (Abb. 2.2, ohne Anregungsspektren). Die molaren Absorptionskoeffizienten ϵ wurden in Standardpuffer bestimmt und zur Berechnung der Farbstoffkonzentrationen eingesetzt.

Abb. 2.2: Spektren der ungebundenen Fluoreszenzfarbstoffe. Schwarz: Absorptionsspektrum, rot: Fluoreszenzspektrum. Bei Cy7Q fehlt das Fluoreszenzspektrum, da der Farbstoff als Fluoreszenzabsorber wirkt und selbst kaum emittiert.



2.1.3 Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsspektroskopie

In der Absorptionsspektroskopie wird die optische Dichte (O.D.) einer Probe gemessen. Sie wird auch Absorptivität (A) genannt und in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ des einfallenden Lichtes bestimmt. Bei der in dieser Arbeit verwendeten UV/Vis-Spektroskopie liegt λ zwischen 200 und 750 nm, d.h. im Bereich des UV-Lichts und des sichtbaren (englisch: *visible*) Lichts. In einigen Experimenten wird bis in den nahinfraroten Bereich von 850 nm gemessen. Die optische Dichte gibt an, wie stark sich das Licht bei Durchtritt durch eine Probe dadurch abschwächt, dass Lichtenergie von den in der Probe befindlichen Molekülen absorbiert wurde. Absorption erfolgt, wenn die Frequenz des einfallenden Lichtes mit einer Resonanzfrequenz des Moleküls übereinstimmt. Da die Resonanzen für jedes Molekül unterschiedlich sein können, entstehen unterschiedliche und typische Spektren, an denen die Moleküle identifizierbar sind. Mit bekanntem molaren Absorptionskoeffizienten ϵ einer Wellenlänge λ kann bei bekannter Küvetten-Schichtdicke d durch das Lambert-Beersche-Gesetz

$$O.D.(\lambda) = c \cdot d \cdot \epsilon(\lambda) \quad (2.1)$$

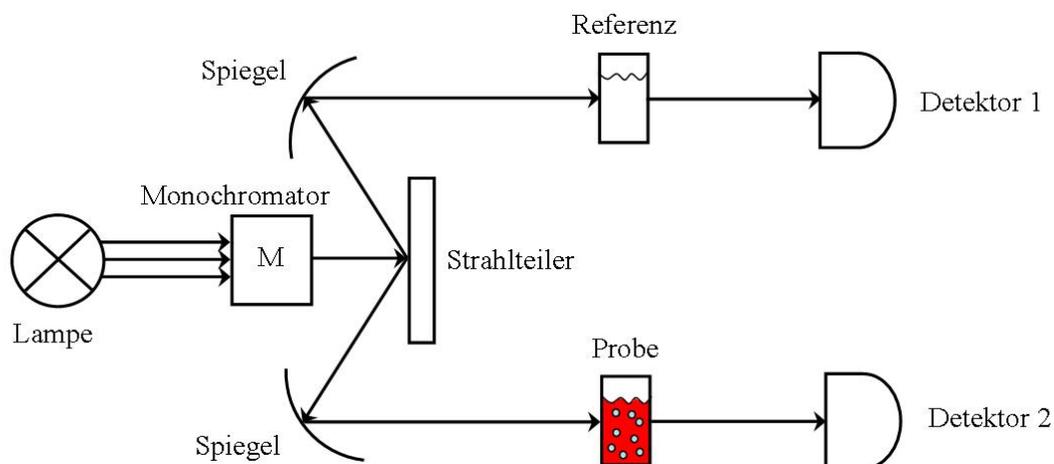
anhand der optischen Dichte einer bestimmten Wellenlänge $O.D.(\lambda)$ die Konzentration c des Absorbers in der Lösung berechnet werden.

Die optische Dichte ist auch definiert als der negative dekadische Logarithmus des Transmissionsgrades, also des Quotienten aus der Intensität des austretenden Lichts (I) und des eintretenden Lichts (I_0):

$$O.D.(\lambda) = -\lg \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (2.2)$$

Die gemessene optische Dichte sollte daher möglichst nicht größer 1 werden, da andernfalls die Transmission unter 10 % liegt und die Messung zu ungenau wird. Ist die

Abb. 2.3: Schematischer Bau eines Zweistrahl-Absorptionsspektrometers.



Probe so hoch konzentriert, muss sie verdünnt oder zur Verringerung der Schichtdicke d in dünneren Küvetten gemessen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zweistrahl-Absorptionsspektrometer UV-2101 PC und UV-2401 PC (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) verwendet, deren Strahlengang in Abb. 2.3 schematisch dargestellt ist. Das eintreffende Licht wurde zunächst im Monochromator selektiert und das Licht der Messwellenlänge im Strahlteiler geteilt. Das Messlicht traf gleichzeitig auf die Referenzküvette und die Probenküvette. Beide Signale wurden von Photodioden detektiert und die Differenz im resultierenden Spektrum dargestellt. Die Spektren wurden im Bereich von 250 – 850 nm mit 0,5 nm Auflösung und mittlerer Scangeschwindigkeit aufgenommen. Für die Messungen wurden Quarzglasküvetten (Hellma GmbH & Co.KG, Müllheim, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 0,1 bis 1 cm verwendet.

Beispiele der charakteristischen Absorptionsspektren von NpSR_{II} und NpHtr_{II}, mit denen die Konzentrationen bestimmt wurden, sind in Abb. 2.4 dargestellt. Im Fall von NpSR_{II} und seinen Mutanten wurde die optische Dichte bei $\lambda = 280$ nm bestimmt und mit dem molaren Absorptionskoeffizienten von $\varepsilon = 49.390 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ die Konzentration des Proteins ohne Retinal berechnet. Über die Höhe der Retinalbande bei $\lambda = 500$ nm und den molaren Absorptionskoeffizienten von $\varepsilon = 40.000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ wurde dann die Konzentration des im Protein enthaltenen Retinals quantifiziert und der Anteil Apoprotein (SR_{II} mit Retinal) am Gesamtprotein bestimmt. Der Wert lag je nach Expression zwischen 72 und 80 % (Tab. 3.2).

NpHtr_{II}¹⁵⁷ weist in seiner Sequenz keine Tryptophane und nur zwei Tyrosine und drei Phenylalanine auf (Klare, 2002). Die Absorptionsbande der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm ist dadurch zu schwach ausgeprägt (Abb. 2.4), um die Proteinkonzentration zuverlässig bestimmen zu können. Stattdessen erfolgte die Konzentrationsbestimmung der NpHtr_{II}-Mutanten nach der Methode von Ehresmann et al. (1973) über die optische Dichte bei 228,5 nm und 234,5 nm nach folgender Gleichung:

$$c_{\text{NpHtrII}} \text{ (mg / ml)} = \frac{O.D._{228,5\text{nm}} - O.D._{234,5\text{nm}}}{3,14} \quad (2.3)$$

Nach Fluoreszenzmarkierung der Proteine war eine Konzentrationsbestimmung anhand der Banden unterhalb von $\lambda = 300$ nm nicht mehr möglich, da in diesem Bereich auch die Indolgruppen der Farbstoffe stark absorbierten. Beide Signale überlagerten sich und ließen sich nur ungenau trennen.

Für eine verlässliche Bestimmung der Proteinkonzentration in markierten Proben wurde daher im Fall von NpSR_{II} wie oben beschrieben die optische Dichte des Retinals gemessen und auf die Gesamtproteinkonzentration geschlossen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in markierten NpHtr_{II}-Proben wurde aus sechs unabhängigen

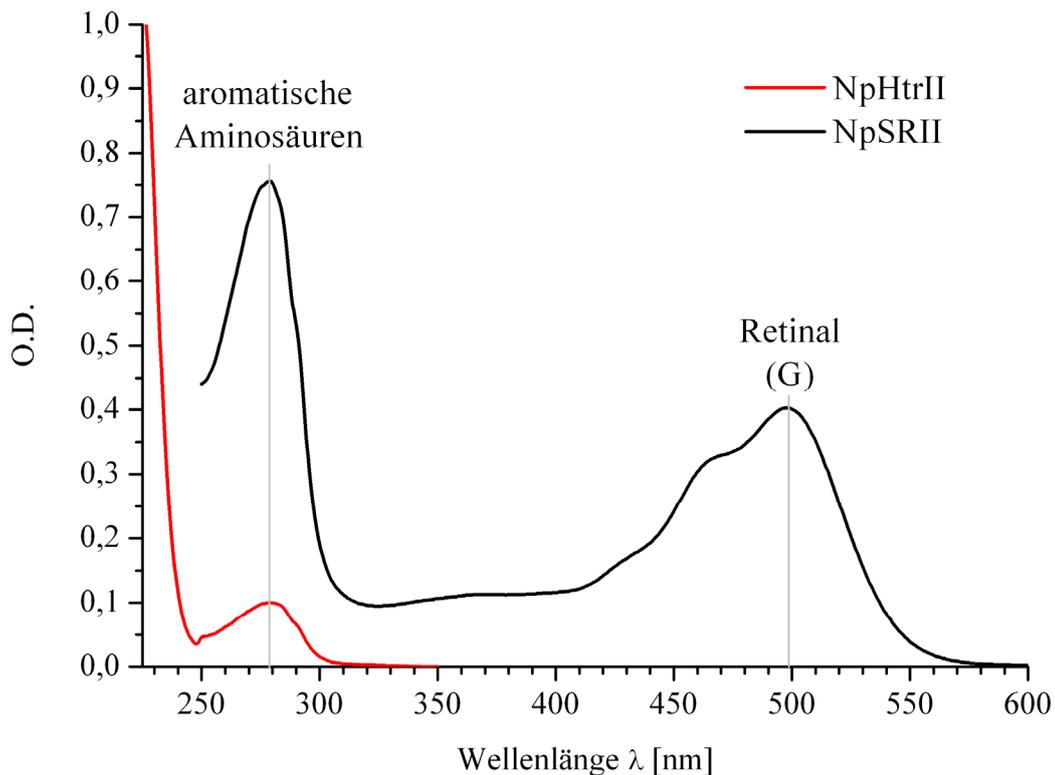


Abb. 2.4: Charakteristische Absorptionsspektren am Beispiel der beiden Proteine NpHtrII157V78C (rot) und NpSRIIK157C (schwarz) in Detergenzpuffer. Die Proteinkonzentration beträgt jeweils $10 \mu\text{M}$. Die Absorptionsbanden des Retinals im Grundzustand (G) und der aromatischen Aminosäuren sind bei NpSRII sehr ausgeprägt. NpHtrII dagegen hat kein Retinal und absorbiert bei 280 nm wesentlich schwächer, da es weniger aromatische Aminosäuren in der Sequenz trägt.

Messungen eine Kalibrierungskurve erstellt, die den prozentualen Poteinverlust nach jeder Chromatographie enthielt. Anhand dieser Kalibrierung wurde die Konzentration von NpHtrII bestimmt. Unter Verwendung der molaren Absorptionskoeffizienten der Farbstoffe ϵ_{max} (Tab. 2.1) wurde die Farbstoffkonzentration $c_{\text{Farbstoff}}$ ermittelt. Der Quotient aus Farbstoff- und Proteinkonzentration ergab das Markierungsverhältnis γ :

$$\gamma = \frac{c_{\text{Farbstoff}}}{c_{\text{Protein}}} \quad (2.4)$$

2.1.4 Kopplung und Reinigung

Für die kovalente Kopplung von Fluoreszenzmarkern an Proteine wurde zu 1 ml einer $1 - 20 \mu\text{M}$ Proteinlösung der fünffache molare Überschuss von Fluoreszenzfarbstoff gegeben und die Mischung kräftig gevortext. Da die Stammlösung des Fluoreszenzmarkers sehr hoch konzentriert war, gelangten nur wenige Mikroliter DMSO in die

Proteinlösung. Dies ist wichtig, um die Proteine nicht durch Zugabe von organischem Lösungsmittel zu denaturieren. Bei einem pH-Wert von 7,2 bis 7,5 wurde der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Abtrennung von niedermolekularem, ungebundenem Farbstoff wurde eine Größenausschlusschromatographie mit Sephadex 25G PD-10-Säulen (GE Healthcare Ltd., Little Chalfont Buckinghamshire, UK) durchgeführt. Die Eluate wurden in Fraktionen zu je 1 ml gesammelt und im Absorptionsspektrometer charakterisiert. Danach wurden die proteinenthaltenden Fraktionen vereinigt und in Amicon Ultra-4-Mikrokonzentratoren überführt (10 MCO, Millipore, Billerica, USA). Durch Zentrifugation (15 min, 3.000 rpm, 4 °C) wurde markiertes Protein aufkonzentriert und die Probe weiter gereinigt, da freie Fluoreszenzmoleküle die Siebmembran mit dem Puffer passierten. Das konzentrierte Proteingemisch wurde dann erneut auf die Säule gegeben. Die Chromatographie wurde so lange wiederholt, bis alle Proteinfractionen das gleiche Markierungsverhältnis γ hatten (Gleichung 2.4). Sämtlicher ungebundener Farbstoff war dann aus der Lösung entfernt. Da eine exakte Bestimmung von γ für die späteren Experimente entscheidend war, musste die Abtrennung freien Farbstoffs besonders sorgfältig und vollständig erfolgen. Die gereinigten, fluoreszenzmarkierten Proteine wurden bei 4 °C gelagert. Die Proben waren mehrere Wochen lagerfähig, ohne dass sich ihre spektroskopischen Eigenschaften änderten. Vor jeder Wiederverwendung einer Probe wurde ihre Qualität spektroskopisch überprüft.

2.2 Herstellung von Large Unilamellar Vesicles (LUV)

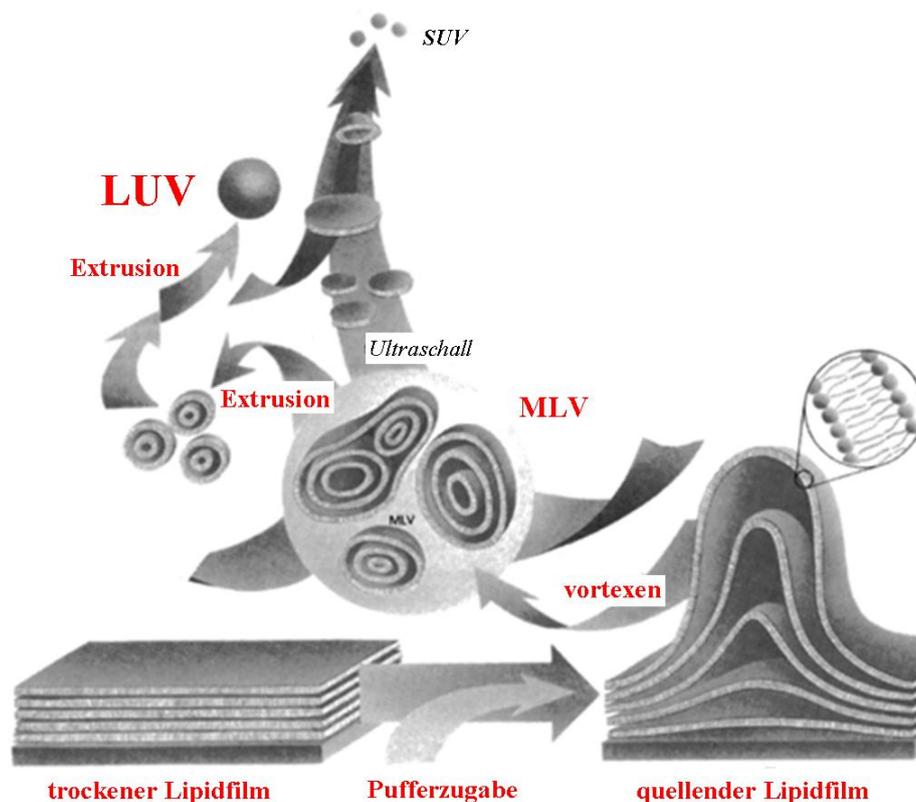
Für die Handhabung und Lagerung der Phospholipide wurden zunächst Glasfläschchen mit einem Fassungsvermögen von 4 ml (Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit 6 M Kaliumhydroxid (KOH, Fluka, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) gereinigt. Die Gläschen wurden bis zum Rand mit der KOH-Lösung gefüllt, über Nacht bei 25 °C inkubiert und danach mit reichlich destilliertem Wasser gespült. Nach Trocknung bei 60 °C im Trockenschrank (ICE 600, Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland) oder unter Stickstoffspülung wurden sie mit einer Schraubkappe verschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Die Präparation von großen, einschichtigen Lipidvesikeln mit 100 – 200 nm Durchmesser (Large Unilamellar Vesicles, LUV) erfolgte mit verschiedenen Phospholipiden, die alle bei Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA bezogen wurden. Für FRET-Studien wurden ausschließlich Vesikel aus 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (POPC) verwendet. Zu den LUV, die für die spätere Fusionierung in

GUV vorgesehen waren, wurde 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[3-(2-pyridyldithio)propionat] (DOPE-PDP) zugefügt. DOPE-PDP trägt einen Pyridinrest, der ähnlich dem Maleinimid spezifisch mit Thiolen wechselwirkt, wie sie in der Seitenkette der Aminosäure Cystein vorhanden sind. Dies ermöglicht die Bindung des Fusionspeptids WAE-11 (s. Kap. 2.6.), das jeweils einen Cysteinrest pro Molekül enthält. POPC und DOPE-PDP wurden zur Herstellung dieser LUV im molaren Verhältnis 20:1 in Chloroform gemischt. Die in Chloroform gelösten Lipide wurden unter Stickstoffatmosphäre in gereinigte Glasfläschchen aliquotiert. Die Deckeldichtungen dieser Gläser bestanden aus Teflon, da sich andere Kunststoffe bei Kontakt mit Chloroform auflösen und die Lipidchargen verunreinigen würden. Die Gläschen wurden zusätzlich mit Parafilm abgedichtet und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Herstellung von LUV ist in Abb. 2.5 dargestellt. Zunächst wurden jeweils 5 mg gelöstes Lipid in die gereinigten Gläser pipettiert. Lipidgemische wurden direkt im Glas durch Zugabe der Einzelmengen angesetzt. Zur gleichmäßigen Verteilung der Lipide wurde die Lösung mit Chloroform (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,

Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Herstellung von LUV (Large Unilamellar Vesicles). Durch Ultraschallbehandlung von MLV (Multilamellar Vesicles) ist auch die Herstellung von SUV (Small Unilamellar Vesicles) möglich. (nach Avanti Polar Lipids Inc., www.avantilipids.com).



Deutschland) auf ein Gesamtvolumen von 1 ml erweitert. Das Chloroform wurde daraufhin durch Drehen des Fläschchens in der Hand unter Stickstoffstrom abgedampft, so dass auf der Innenwand des Gläschchens ein homogener, trockener Lipidfilm entstand. Durch diese Behandlung verdampfte das Chloroform jedoch nicht vollständig, auch bei sehr kräftiger Stickstoffbespülung bleibt ein klarer, hochviskoser und blasiger Rest zurück. Um das Lösemittel vollständig zu entfernen, wurde die Probe für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Vakuum inkubiert. Der trockene Lipidfilm wurde mit 1 ml detergentenfreiem Puffer hydratisiert, was einer Endkonzentration von 5 mg/ml Lipid im Puffer entsprach. Daraufhin begannen die Lipidschichten sofort zu quellen und sich voneinander zu lösen. Wenige Minuten nach Zugabe des Puffers wurde die Suspension für zwei Minuten kräftig gevortext. Dadurch wurden die Lipidschichten von der Glasoberfläche gelöst und es bildete sich eine milchig-trübe Lösung von multilamellaren Lipidvesikeln (Multilamellar Large Vesicles, MLV) mit mehreren Mikrometern Außendurchmesser.

Die zwiebelartig aufgebauten, mehrschichtigen MLV können durch verschiedene Techniken zu LUV verkleinert werden. Dazu zählen zum Beispiel Ultraschallbehandlung und Ethanolinjektion (Woodle und Papahadiopoulos, 1989). Die wirkungsvollste Methode zur Herstellung von LUV bis 200 nm Durchmesser ist jedoch die Extrusion. Hierbei werden die MLV mit hohem Druck durch eine Polykarbonatmembran definierter Porengröße gepresst. Durch die entstehenden Scherkräfte werden die äußeren Schalen der mehrschichtigen Vesikel abgespalten und nur einschichtige Vesikel mit definierter Größe können die Poren passieren. Die Extrusionsmethode ist die schnellste Technik, um LUV herzustellen und produziert darüber hinaus gleichmäßig große Vesikel. LUV, die durch die oben genannten anderen Methoden hergestellt werden, haben deutlich breitere Größenverteilungen. Wie bei allen Prozeduren zur Präparation von LUV aus MLV muss die Extrusion oberhalb der Übergangstemperatur T_c von der Gelphase der Phospholipide zur flüssig-kristallinen Phase durchgeführt werden. Für POPC liegt T_c bei -2 °C , es ist also selbst bei Aufbewahrung im Kühlschrank immer flüssig-kristallin. In der Gelphase ist die Lipidmembran zu rigide, um durch die Poren gepresst werden zu können. Der starke Druck und die hohe Flexibilität der weichen Vesikel führen dazu, dass LUV die Extrudermembran auch passieren können, wenn sie etwas größer als der Porendurchmesser sind. Die finalen Vesikel sind dann etwa 50 % größer als die Poren der Polykarbonatmembran.

Für die vorliegende Studie wurden der LiposoFast-Basic Extruder und Polykarbonatmembranen mit 100 nm Porendurchmesser (beides Avestin Europe GmbH, Mannheim, Deutschland) benutzt. Zur Platzierung der Membran wurde einer der beiden Dichtungsringe mit Wasser benetzt. Die Extrudermembran wurde genau mittig darauf



Abb. 2.6: Einfluss der Extrusion auf die LUV-Größe, Vergleich in 1-mm-Küvetten. Die Lipidsuspension ist vor Extrusion milchig-trüb (links) und danach klar (rechts). Die kleineren Vesikel in der Lösung rechts streuen weniger stark.

gelegt, worauf sie sich sofort festsog. Der Teflonmittelteil mit der Membran wurde in die Hülse aus rostfreiem Stahl geführt. Anschließend wurde der zweite Mittelteil in die Hülse gesteckt und alles durch Verschrauben gut abgedichtet. Dabei war darauf zu achten, dass sich keine Falten oder Risse in der Membran bildeten. Dies gewährleistete, dass die Vesikelgröße einzig durch den Porendurchmesser bestimmt wurde. Die mitgelieferten gasdichten Glasspritzen wurden mit Wasser befeuchtet und an den beiden Seiten der Stahlhülse eingedreht. Das fertige Extrusionssystem wurde dreimal mit 500 μ l Puffer gespült, bevor die MLV-Suspension in eine der Spritzen gefüllt wurde. Anschließend wurde die Suspension mindestens 20mal durch die Membran von einer Spritze in die andere gedrückt, um die Vesikel zu verkleinern.

Bereits nach etwa fünf Membranpassagen war die Lipidsuspension deutlich klarer, was auf weniger Lichtstreuung durch kleinere Vesikel zurückzuführen ist (Abb. 2.6). Die klare Suspension wurde schließlich über die ursprünglich leere Spritze in ein Reaktionsgefäß überführt. Auf diese Weise wurde vermieden, dass größere MLV und Membranfragmente, die die Poren nicht passieren konnten, in die fertige LUV-Lösung gelangten. Nach Herstellung der LUV wurde ihre Größe durch Dynamische Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Mit Hilfe des verwendeten Gerätes (DynaPro-E-660, Proterion Corporation Ltd., High Wycombe, England) wurde bei einem Streuwinkel von 90° eine Autokorrelation der diffundierenden Vesikel aufgezeichnet, anhand derer der Diffusionskoeffizient D errechnet wurde. Er beschreibt die Größe des räumlichen Bereiches, die die Partikel in einer bestimmten Zeit durch Diffusion erreichen können (Banachowicz, 2006). Durch die Stokes-Einstein-Beziehung

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (2.5)$$

mit k_B = Boltzmannkonstante, T = Messtemperatur und η = Viskosität des Lösungsmittels erhält man den hydrodynamischen Radius R des diffundierenden Partikels. Die mit der oben beschriebenen Methode hergestellten LUV hatten einen Radius von 60 bis 80 nm.

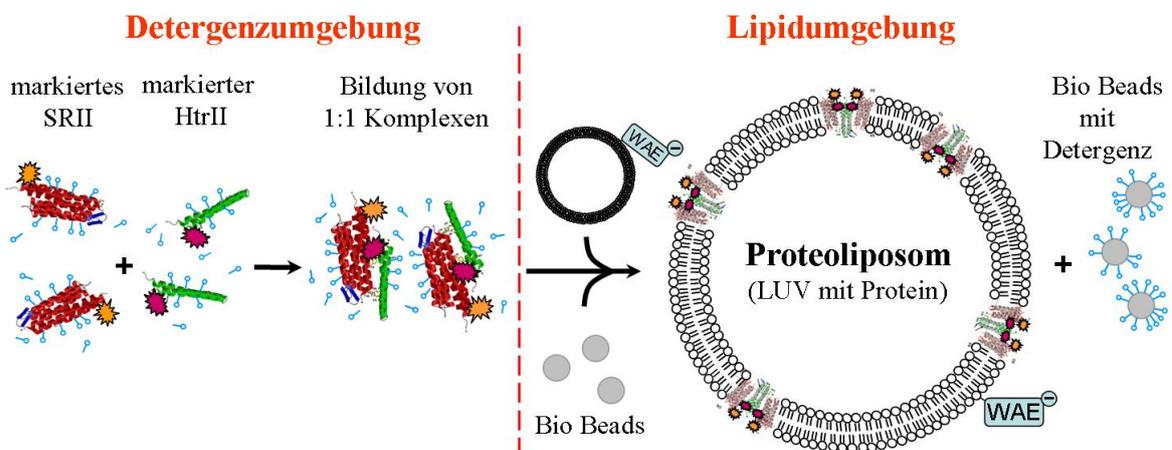
Der Durchmesser von 120 bis 160 nm korrespondierte daher gut mit der Porengröße der Polykarbonatmembranen.

2.3 Herstellung von Proteoliposomen (Rekonstituierung)

Integrale Membranproteine müssen zur Isolierung, Reinigung und Aufkonzentrierung aus den Ursprungszellmembranen herausgelöst werden (Helenius, 1975). Detergenzmoleküle im Puffer vermeiden, dass die Proteine miteinander aggregieren oder sich irreversibel entfalten. Die hydrophoben Bereiche dieser amphiphilen Moleküle binden die Transmembranregionen der Proteine und stabilisieren diese, während die hydrophilen Bereiche die Wasserlöslichkeit gewährleisten. Die Detergenzmoleküle ordnen sich so an, dass das Protein ganz in einer schlauchförmigen Mizelle verborgen ist und nur seine hydrophilen Bereiche herausragen. In gelöster Form können die Proteine so stabil gehandhabt werden. Daher werden auch Strukturuntersuchungen von Membranproteinen häufig in Detergenzpuffern vorgenommen.

Als Rekonstituierung bezeichnet man die Wiederherstellung der natürlichen Umgebung der Membranproteine, also ihre Rückführung aus Detergenzpuffer in Lipiddoppelmembranen (Zakim, 1989; Dencher, 1989). Der Transfer in Lipidmembranen ist besonders für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen wichtig. In Detergenz-mizellen sind diese Interaktionen nur eingeschränkt aussagefähig, da sie nicht die natürliche Proteinumgebung darstellen. Die Rekonstituierung erfolgte nach Rigaud et al., 1995 in LUV, deren Einschichtigkeit ausschließlich laterale Wechselwirkungen der Proteine garantierte. Das Schema des Rekonstituierungs-

Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Rekonstituierung von fluoreszenzmarkiertem NpSRII und NpHtrII in LUV (Large Unilamellar Vesicles). Die Protein tragenden LUV nennt man Proteoliposomen.



protokolls ist in Abb. 2.7 dargestellt. Zum Detergenzentzug wurde Bio-Bead SM-2 Adsorbent (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) verwendet, das vor Benutzung gereinigt wurde (Holloway, 1973). Die Menge der Bio-Beads war so gewählt, dass damit 50 mal mehr Detergenz gebunden werden konnte als im Ansatz vorlag (Rigaud, 1998). Damit wurde ein schneller, vollständiger Detergenzentzug innerhalb von zwei Stunden ermöglicht. 1 μ M fluoreszenzmarkiertes NpSR_{II} oder NpHtr_{II} (s. Kap. 2.1) wurde in verschiedenen Verhältnissen bis zu 1:8.000 (mol/mol) zum Lipid eingesetzt. Durch den hohen Überschuss an Lipid konnte FRET durch räumliche Nähe der Proteine vermieden werden (You, 2005). Wurden NpSR_{II} und NpHtr_{II} in denselben Ansatz rekonstituiert, so fand die Mischung beider Proteine bereits in Detergenzpuffer statt. Zur Bildung des 1:1-Komplexes wurde das Gemisch vor Rekonstituierung eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Wegener, 2001; Sudo, 2001). Der Rekonstituierungsansatz aus Puffer mit fluoreszenzmarkiertem Protein und LUV wurde auf 1 ml Endvolumen eingestellt. 750 mg/ml Bio-Beads wurden zugefügt und der Ansatz bei 4 °C für zwei Stunden auf einem Überkopfschüttler (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland) inkubiert.

Nach der Rekonstituierung wurde die Proteoliposomenlösung durch eine Glaspipette (Brand GmbH & Co. KG., Wertheim, Deutschland) abgenommen. Das Ende der Pipette war mit einem Bunsenbrenner erhitzt und ausgezogen worden, wodurch vermieden wurde, dass Beads in die Proteoliposomenlösung gelangten. Um an der Oberfläche der Bio-Beads haftendes Protein zu lösen, wurde der Rückstand mit 300 μ l detergenzfreiem Puffer resuspendiert und kräftig gevortext. Diese Lösung wurde ebenfalls abgezogen und in die rekonstituierte Probe aufgenommen. Im Anschluss an die Rekonstituierung wurde die Probe im Absorptionsspektrometer vermessen und die Proteinkonzentration bestimmt. Als Referenz wurde dabei die für die Rekonstitution eingesetzte Vesikellösung verwendet. Dadurch war die im Spektrum störende Rayleigh-Streuung geringer.

Je nach Mutante und Fluoreszenzmarker konnten 60 – 80 % des Proteins in die Vesikel rekonstituiert werden, 20 – 40 % adhärten an den Beads. Der Verlust von Phospholipiden während der Rekonstituierung wurde mit 20 – 30 % bewertet (Rigaud, 1997). Unter diesen Annahmen blieb das ursprüngliche Protein-Lipid-Verhältnis in etwa konstant.

2.3.1 Proteinaktivität

Bei der Überführung von Transmembranproteinen aus Lipid- in Detergenzphasen und zurück kann es zu nichtreversiblen Entfaltungen kommen, die das Protein inaktivieren

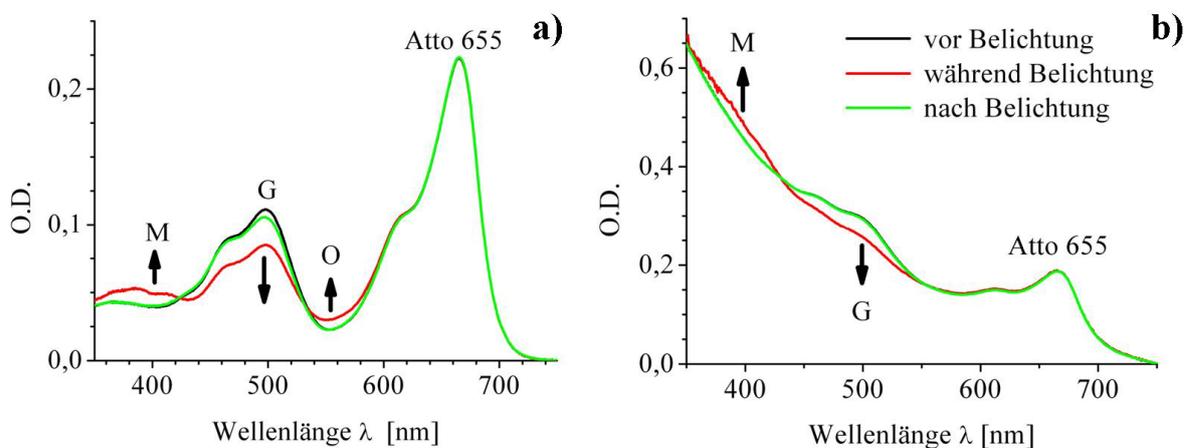


Abb. 2.8: Aktivitätstest von NpSR II a) in Detergenzpuffer und b) in Lipiden (LUV). In beiden Fällen wird der Photozyklus des Retinals während Belichtung aktiviert. Dies äußert sich in der Zunahme der Moleküle im M-Zustand und Abnahme der Moleküle im Grundzustand G. Die Spektren vor und nach Belichtung in Abb. b sind deckungsgleich, so dass das schwarze Spektrum überlagert wird.

und für weitere Untersuchungen unbrauchbar machen. Daher wurde direkt nach der Rekonstituierung ein Aktivitätstest für NpSR II durchgeführt, der die Aktivierbarkeit des Photozyklus und damit die Funktionalität von NpSR II zeigte. Die Proteoliposomenprobe wurde mit einer Laserdiode ($\lambda_{\text{Em}} = 530 \text{ nm}$, Leistung = 7 mW, Soliton GmbH, Gilding Deutschland) bestrahlt. Dazu wurde das Laserlicht mit einer Linse auf Größe des Küvettenquerschnitts aufgeweitet und die Probe von oben belichtet. Vor, während und nach der Belichtung wurde das Absorptionsspektrum gemessen (Abb. 2.8).

Sowohl vor als auch nach der Rekonstituierung war NpSR II gut photoaktivierbar. Während der Belichtung (rote Linie) wurde der M-Zustand stark angereichert. Er ist spektrometrisch gut an seiner veränderten Maximalwellenlänge von etwa 400 nm erkennbar. Gleichzeitig war die Anzahl der Moleküle im Grundzustand ($\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$) reduziert. Die Anreicherung des O-Zustandes ($\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$) war nur im Detergenzpuffer zu beobachten (Abb. 2.8 a). Nach Abschalten der Belichtung (grüne Linie) wurden die Photozyklusintermediate M und O entvölkert und alle Moleküle zeigten wieder das Absorptionsmaximum des Grundzustandes. In der Lipidprobe (Abb. 2.8 b) stieg die optische Dichte (O.D.) bei niedrigen Wellenlängen stark an. Die Ursache hierfür liegt in der Rayleigh-Streuung des Messlichts durch die Lipidvesikel. Der Aktivitätstest zeigte eine vergleichbar hohe Photozyklusaktivität von NpSR II nach der Rekonstituierung in LUV.

2.3.2 Vesikelgröße

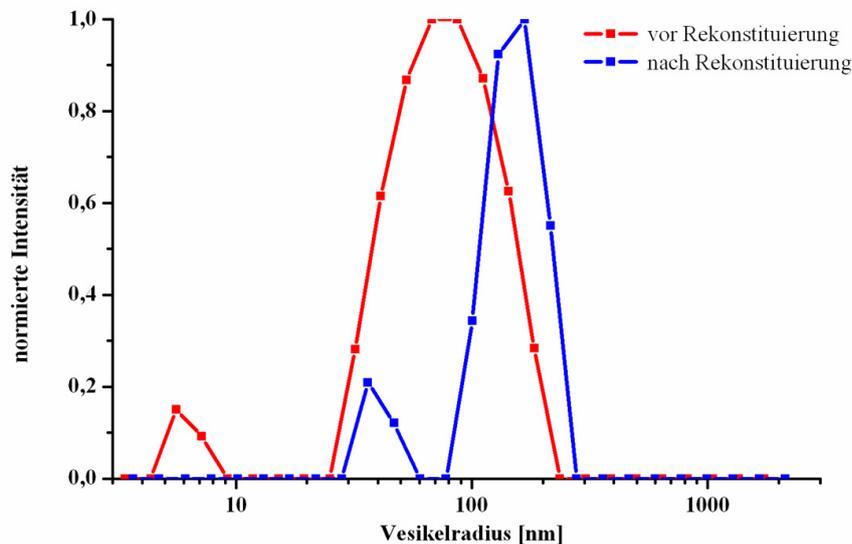


Abb. 2.9: Größenverteilung der Lipidvesikel vor und nach der Rekonstituierung. Die Proteoliposomen (blau) sind mit einem mittleren Radius von 110 nm nur wenig größer als die eingesetzten LUV (70 nm, rot).

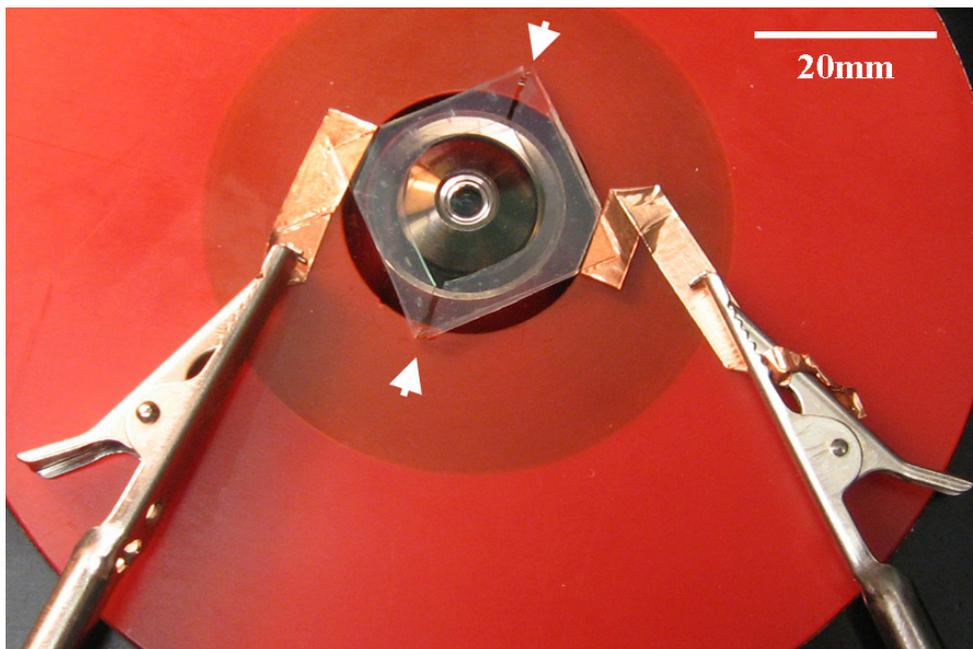
Nach erfolgter Rekonstituierung wurde die Größe der Proteoliposomen mit der DLS bestimmt (Abb. 2.9). 60 μ l der Proteoliposomenprobe wurden in eine schwarzwandige Mikroküvette (Hellma GmbH & Co.KG, Müllheim, Deutschland) gegeben und zwanzig Autokorrelationen über einen Zeitraum von je drei Sekunden aufgenommen. Die resultierenden Diffusionskoeffizienten wurden mit Gleichung 2.5 in Kugel-Radien umgerechnet und der Schwerpunkt der Verteilung bestimmt. Dabei zeigte sich im Vergleich zur eingesetzten LUV-Lösung nur eine geringe Zunahme des Vesikeldurchmessers von durchschnittlich 70 auf 110 nm. Die Ursache dafür liegt in der Öffnung der Vesikel während der Rekonstituierung und im Einbau der Transmembranproteine. Die Unilamellarität der Vesikel geht durch die Rekonstituierung nicht verloren. Proteoliposomen mit markiertem NpSR_{II} und NpHtr_{II} konnten nicht extrudiert werden (Parmar, 1997) ohne dass der Großteil der Proteine an der Extrudermembran adhärte.

2.4 Herstellung von Giant Unilamellar Vesicles (GUV)

GUV werden seit einigen Jahren als Träger integraler Membranproteine benutzt und sind bereits umfangreich charakterisiert (Korlach, 1999; Schwille, 2005; Przybylo, 2006). Die Herstellung der Vesikel mit Elektroformation (Angelova, 1986) erfolgte wie üblich oberhalb der Phasenübergangstemperatur T_c . Die GUV-Präparation basierte auf einer Lösung von 1 mg/ml 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (POPC) in

Chloroform. Der POPC-Lösung wurden 5 mol% 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholin (EDOPC) und 0,1 mol% 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-(Cap Biotinyl) (DOPE-biotinyl) (DOPE-biotinyl) zugefügt. Alle Lipide wurden bei Avanti Polar Lipids Inc. bezogen. EDOPC ist ein kationisches Lipid, das positive Ladungen in die Membran einbringt, die für eine spätere Fusion mit den Proteoliposomen benötigt werden. DOPE-biotinyl wird für die spätere Immobilisierung der GUV auf einer Neutraavidin-Oberfläche benötigt. Von dieser Lösung wurden etwa 20 μ l gleichmäßig mit einer Glaspipette auf ein mit Indium-Zinn-Oxid (Indium Tin Oxide, ITO) beschichtetes Deckgläschen (22 x 22 mm, 15 – 30 Ω /cm, SPI Supplies, West Chester, PA, USA) gespatelt. Dazu wurde nach Aufbringen des Tropfens auf der Oberfläche mit der Pipette solange über das Glas gestrichen, bis das Chloroform verdampft war und der Lipidfilm deutlich sichtbar zurückblieb. Chloroformreste wurden durch 30-minütige Behandlung der Probe im Vakuum entfernt. Auf ein zweites ITO-Deckgläschen wurden 500 μ l 0,1 mg/ml Neutraavidin (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) gegeben. Während der Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur bildete sich spontan eine irreversibel

Abb. 2.10: Elektroformationskammer zur Herstellung von GUV. Die beiden Streifen Kupferfolie sind auf das transparente obere bzw. untere ITO-Gläschen geklebt und mit Klemmen an einen Funktionsgenerator (nicht im Bild) angeschlossen, der das elektrische Wechselfeld erzeugt. Am Rand der Kammer sind die Silikonstreifen und oben und unten der Ein- und Auslasskanal zu erkennen (Pfeile). In der Mitte befindet sich der Messbereich mit etwa 15 mm Durchmesser vor dem Objektiv des Mikroskops. Die Kammer ist mit den Kupferstreifen auf eine nichtleitende Plastikscheibe (rot) geklebt.



gebundene Neutravidinschicht auf der Glasoberfläche (Bohlinger, 2004). Nach Entfernen der Inkubationslösung wurde das Deckgläschen unter Stickstoffstrom getrocknet. Die dehydrierte Proteinschicht ist nur kurz lagerfähig, deshalb sollte diese Präparation immer unmittelbar vor der Elektroformation erfolgen.

Zum Bau der Elektroformationskammer wurde an beiden Deckgläschen je ein Streifen selbstklebende Kupferfolie (Laird Technologies, Rosenheim, Deutschland) befestigt. Auf einem der beiden Gläschen wurden zwei trockene Streifen einer 1 mm dicken Silikonfolie (Versilic, Saint-Gobain Performance Plastics Verneret, Charny, Frankreich) aufgedrückt. Die Streifen waren so zugeschnitten, dass sie in diagonaler Richtung zwei Ein- und Auslasskanäle und in der Mitte der Kammer einen großen freien Bereich bildeten (Abb. 2.10). Das Silikon war mehrfach verwendbar, musste aber nach Reinigung immer gut getrocknet werden, da das System sonst nicht dicht war. Abschließend wurden die beiden Deckgläschen aufeinandergedrückt und die Kammer so geschlossen. Durch den Einlasskanal wurden 300 µl 111,5 mM Glucoselösung eingespritzt, bis die Elektroformationskammer ganz gefüllt war. An den beiden Kupferstreifen wurde die Kammer mit je einer Krokodilklemme an einen Funktionsgenerator (Modell 5043, Exact Electronics Inc., Hillsboro, USA) angeschlossen. Bei einer Wechselspannung von 1,5 V und 15 Hz bildeten sich innerhalb von zwei Stunden viele GUV, die lose auf dem Untergrund lagen.

Nach Bildung der GUV wurde die Kammer vorsichtig mit 111,5 mM Saccharoselösung gespült und für eine Stunde inkubiert. Durch die geringere Dichte der eingeschlossenen Glucose stiegen die Vesikel auf und die biotinylierten Lipide banden schließlich an der Neutravidinschicht des oberen Deckgläschens. Damit waren die GUV immobilisiert und vereinzelt und konnten als Grundlage für FCS-Messungen dienen. Zu diesem Zweck wurde die Kammer kopfüber gewendet. Anschließend wurde die Saccharoselösung durch 50 mM NaCl, 10 mM Tris ersetzt. Diesem Puffer waren zusätzlich 0,1 mol% Natriumazid (NaN_3 , Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland) zur Vermeidung von Bakterienwachstum beigemischt. Bei luftdicht verschlossener Kammer waren die GUV bei Raumtemperatur für etwa drei Tage haltbar.

2.5 Fusion von Proteoliposomen mit GUV

Die Fusion von Proteoliposomen in GUV wurde durch das amphipatische Peptid WAE-11 vermittelt (Pecheur, 1997; Kahya 2002), das aus elf Aminosäuren mit der Sequenz N-WAESLGEALEC-OH besteht. Es kommt als natürliches Fusionspeptid in Membranproteinen von Viren vor und verursacht die Fusion der Membran des Pathogens mit der Wirtszellmembran. Durch die drei enthaltenen Glutamatrete trägt es eine

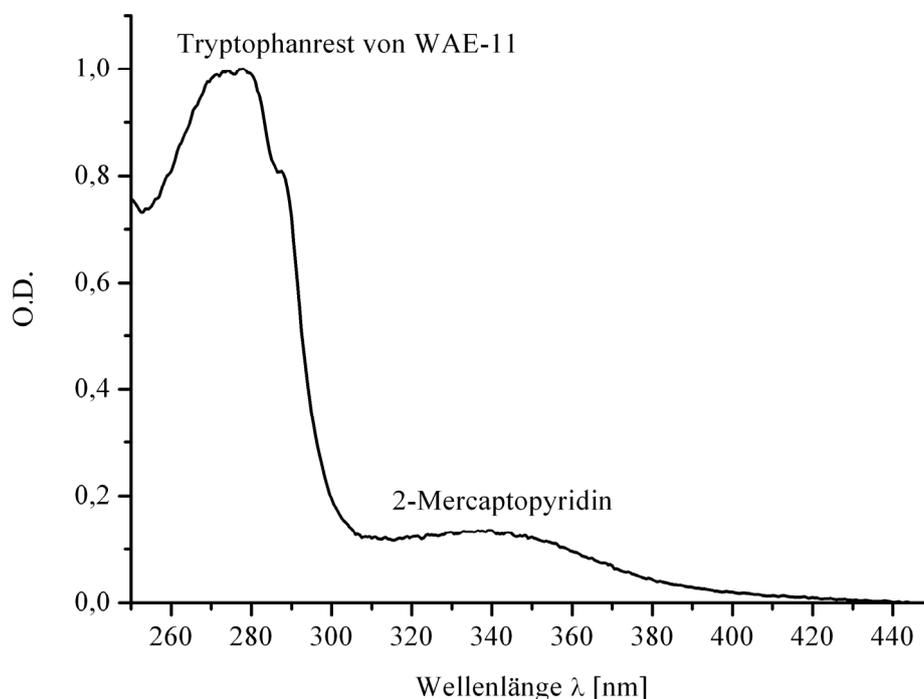


Abb. 2.11: Absorptionsspektrum nach der Bindung des Fusionspeptids WAE-11 an 10 % der DOPE-PDP-Moleküle. Aus der optischen Dichte von 2-Mercaptopyridin bei $\lambda_{Abs, max} = 343 \text{ nm}$ kann mit einer Kalibrierungskurve die Konzentration dieses Nebenproduktes berechnet werden. Daraus wird die Bindungseffizienz bestimmt.

negative Nettoladung. Ist es über den Cysteinrest an die eine Vesikelmembran gebunden, bildet es eine α -Helix mit drei Windungen und vermittelt zuverlässig die Fusion mit einem positiv geladenen Zielvesikel. Der zugrundeliegende Mechanismus beruht auf dem „Stiel-Pore-Prinzip“ (Kozlov 1989, Chernomordik 1995). Durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen WAE-11 und positiv geladenen Lipiden in der Zielmembran adhären die Vesikel aneinander und das Peptid ragt in die benachbarte Membran hinein. Die äußeren Monolayer verschmelzen miteinander und bilden den „Stiel“, ein stark gebeugtes Lipidintermediat, der schließlich zu einer „Pore“ erweitert wird. Durch Vergrößerung der Pore kommt es schließlich zur vollständigen Fusion. Der Prozess ist pH-unabhängig und führt nicht zu einer Öffnung der Vesikel (Pecheur, 1997).

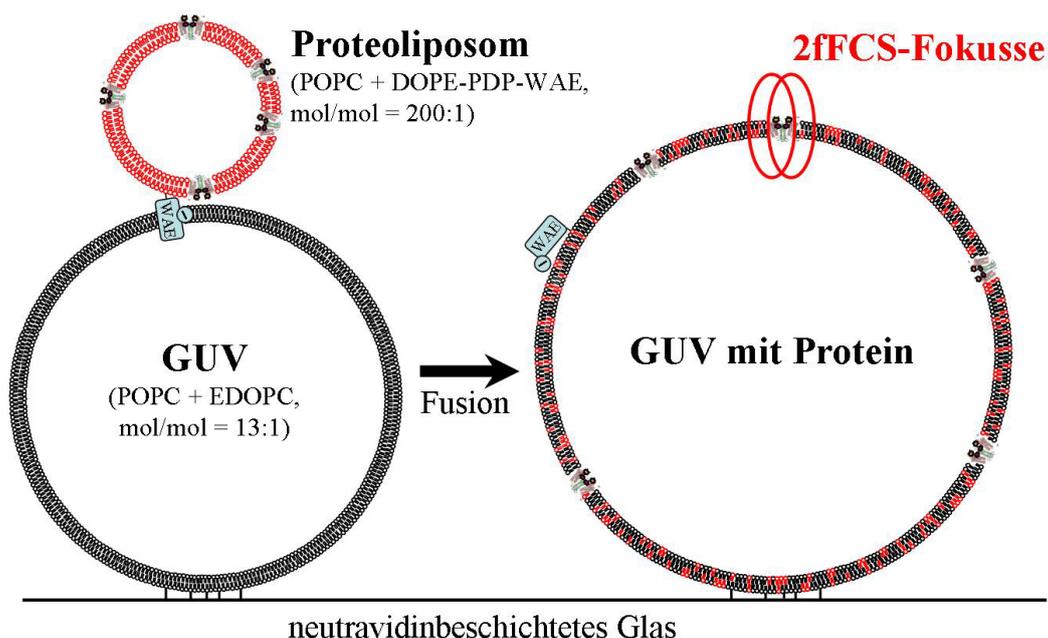
Zur Kopplung von WAE-11 (synthetisiert von JPT Technologies, Berlin, Deutschland) wurden LUV aus 5 mg/ml DOPE-PDP und POPC (1:20 mol/mol, s. Kap. 2.2) hergestellt. Während der Reaktion bildet DOPE-PDP eine Disulfidbrücke mit dem Cysteinrest des Peptids unter Abspaltung von 2-Mercaptopyridin. Dieses

Nebenprodukt liegt zum gebundenen WAE-11 in einer 1:1-Stöchiometrie vor und ist anhand der Absorption bei $\lambda = 343$ nm quantifizierbar (Abb. 2.11). Damit ermöglicht es eine indirekte Bestimmung der Bindungseffizienz.

Die LUV-Suspension wurde direkt zu lyophilisiertem, aliquotiertem WAE-11 gegeben und das Peptid darin durch mehrminütiges kräftiges Vortexen vollständig aufgelöst. Wurde das Peptid mehr als eine halbe Stunde vor dem Mischen gelöst, dimerisierte es und band nicht mehr an DOPE-PDP. Das Verhältnis von WAE-11 zu DOPE-PDP im Inkubationsgemisch betrug 5:1 (mol/mol). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Absorptionsspektrum des Gemisches aufgezeichnet und die Zunahme der optischen Dichte bei $\lambda = 343$ nm bestimmt. Mit Hilfe einer Kalibrierungskurve von 2-Mercaptopyridin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurde die Konzentration des Nebenproduktes ermittelt und so auf die Effizienz der Kopplung geschlossen. Zur Vesikelfusion war es ausreichend, wenn 10 % des vorhandenen DOPE-PDP mit WAE-11 gekoppelt waren.

In die mit WAE-11 beladenen Vesikel wurde anschließend teilweise fluoreszenzmarkiertes SRII und HtrII rekonstituiert. Im Rekonstitutionspuffer war 0,1 mol% NaN_3 enthalten, um bei späterer Zugabe der Proteoliposomen zu GUV Isoosmolarität zu gewährleisten und ein Platzen der GUV zu verhindern. Die Proteinkonzentration

Abb. 2.12: Schematische Darstellung der WAE-11-induzierten Fusion von Proteoliposomen in GUV. Durch die Fusion wird die Proteindichte in der Lipidmembran deutlich gesenkt. Der mittlere Abstand der Proteine zueinander liegt nach der Fusion in GUV bei Werten, die auch im Bakterium erreicht werden.



wurde nach der Rekonstituierung anhand des Absorptionsspektrums bestimmt. Die Vesikellösung wurde anschließend mit Puffer 1:100 verdünnt um eine für FCS-Messungen ausreichend niedrige Konzentration zu erreichen.

Für die Fusion (Abb. 2.12) wurden GUV aus POPC, EDOPC und DOPE-biotinyl mit der Elektroformationsmethode hergestellt (Kap. 2.4). Nach der GUV-Präparation wurden vorsichtig 300 μl der WAE-11-Proteoliposomen in die Elektroformationskammer gespritzt und 30 Minuten mit den GUV bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Kammer mit 5 ml 50 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1 mol% NaN_3 abwechselnd von beiden Seiten des Kanals gespült. Damit wurden nichtfusionierte Proteoliposomen vollständig entfernt und die Hintergrundfluoreszenz minimiert. Um das Austrocknen der GUV-Kammer zu vermeiden, wurde der präparierte Assay in eine luftdichte Stahlkammer gespannt (Eigenbau), die oben und unten ein Sichtfenster zum Mikroskopieren ließ. Der Assay konnte so für bis zu drei Tage für Diffusionsmessungen in den GUV-Membranen benutzt werden. Das enthaltene NaN_3 verhinderte Bakterienwachstum.

2.6 Fluoreszenzspektroskopische Techniken

Die Absorption elektromagnetischer Strahlung mit einer Frequenz im ultravioletten bis in den infraroten Bereich führt zu einem elektronisch angeregten, energiereicheren Zustand des Moleküls (Abb. 2.13). Man spricht von einem Übergang des Fluorophors vom Grundzustand S_0 in einen Singulettzustand S_1 bzw. S_2 . Die Rückkehr zum Grundzustand kann strahlungslos erfolgen, das heißt durch innere Umwandlungen oder durch Energieübertragung auf Nachbarmoleküle. Die Energieübertragung auf benachbarte Moleküle nennt man Fluoreszenzlöschung (engl.: *Quenching*). Wird die Energie im angeregten Zustand nicht durch andere Moleküle abgefangen, kann die Relaxierung, also die Rückkehr in den Grundzustand, unter der Abgabe von Photonen erfolgen. Dies wird als Lumineszenz, als Abstrahlung von Licht, bezeichnet. Lumineszenz unterteilt sich in Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Der Unterschied liegt in den angeregten Zuständen, aus denen die Rückkehr in den Grundzustand erfolgt und in der deutlich längeren Lebensdauer der Phosphoreszenz. Die Fluoreszenzlebensdauer liegt im Nanosekundenbereich, wogegen sich die Lebensdauer der Phosphoreszenz im Millisekundenbereich befindet. Beim Fluoreszenzübergang kehrt das Molekül von einem Anregungsniveau im Singulettzustand S_1 in den Grundzustand S_0 zurück. Ein Molekül, das Fluoreszenzlicht emittieren kann, wird als Fluorophor bezeichnet. Es besteht meist aus einer komplexen Anordnung mehrerer aromatischer und heterozyklischer Ringe und bildet somit ein räumlich ausgedehntes π -Elektronensystem.

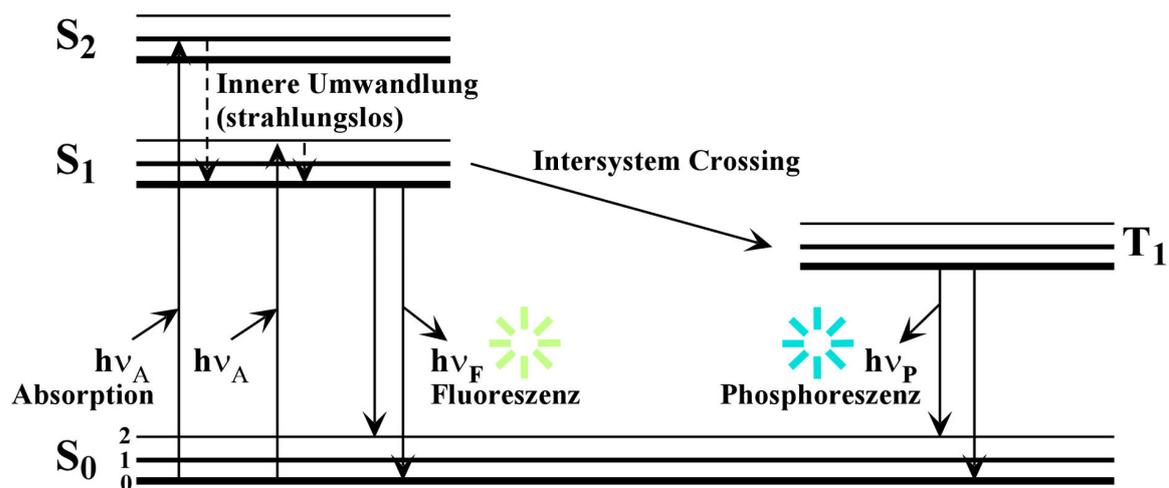


Abb. 2.13: Eine Form des Jablonski-Diagramms (nach Lakowicz, 1999).

Ein wichtiges Merkmal eines Fluorophors ist sein Absorptions- und Emissionsspektrum. Die spektralen Charakteristika, also beispielsweise bei welcher Wellenlänge die Maximalintensität der abgegebenen Strahlung liegt, sind für jeden Fluorophor spezifisch. Absorptions- und Emissionsspektrum sind zueinander annähernd spiegelsymmetrisch. Der Verlauf des Emissionsspektrums ist im Allgemeinen unabhängig von der Anregungswellenlänge. Um bei gegebener Einstrahlungsintensität ein intensives Fluoreszenzsignal zu erhalten, ist es wichtig, eine Anregungswellenlänge nahe dem Absorptionsmaximum zu wählen. Das emittierte Spektrum unterliegt dem Stokes-Shift, das heißt, es ist verglichen mit dem Spektrum der Absorption zu höheren Wellenlängen verschoben. Der Grund für den damit ausgedrückten Energieverlust liegt in den intramolekularen strahlungslosen Übergängen. Da langwelliges Licht als rotes Licht wahrgenommen wird, spricht man beim Stokes-Shift auch von einer Rotverschiebung des Emissionsspektrums (Abb. 2.2).

2.6.1 Fluoreszenzspektroskopie

Der prinzipielle Aufbau des Fluoreszenzspektrometers (Quanta Master UV-Vis, QM-7, Photon Technologies International Inc., Lawrenceville, NJ, USA) ist in Abb. 2.14 dargestellt. Das Gerät war mit einem temperierbaren Küvettenhalter und einem Photomultiplier für hohe Wellenlängen (R928, Hamamatsu) ausgerüstet. Die Probe wurde mit monochromatisiertem Licht einer Xenonlampe angeregt und die resultierende Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge im Winkel von 90° von seinem Detektor aufgezeichnet. Da es sich bei dem verwendeten Gerät um ein Ein-Strahl-Spektrometer handelte, musste die Referenzküvette mit Puffer jeweils separat gemessen

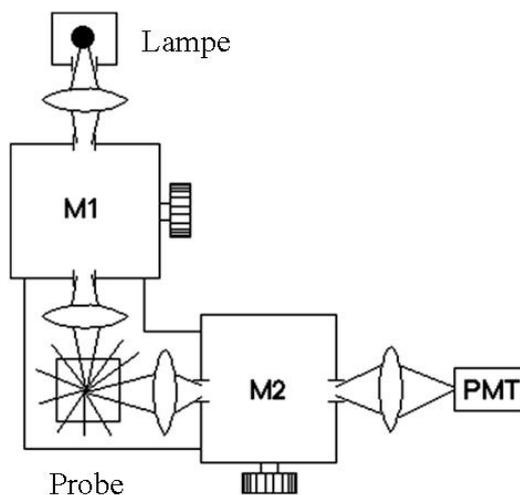


Abb. 2.14: Schematischer Strahlengang des verwendeten Fluoreszenzspektrometers.

und das resultierende Spektrum anschließend vom Probenspektrum abgezogen werden. An vier Stellen des Strahlenganges waren variable Schlitze positioniert, die auf maximal 10 mm geöffnet werden konnten. Von der Weite der Schlitze hing zum einen die Signalintensität ab, die so auf ein Maximum justiert werden konnte, ohne dass der Detektor überstrahlt wurde. Außerdem bestimmte die Schlitze die spektrale Auflösung. Für die Messung kamen Quarzglas-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm zum Einsatz. Bei sehr kleinen Probenmengen wurden schwarzwandige Mikro-Küvetten mit einem Probenvolumen von 60 μl verwendet (beide Küvettentypen von Hellma GmbH & Co.KG, Müllheim, Deutschland). Die Küvetten wurden nach jeder Messung gründlich gespült und anschließend im Stickstoffstrom ausgeblasen. Damit wurde verhindert, dass die Proben durch zurückgebliebene Wassertropfen verdünnt wurden und so die Proteinkonzentration und damit die Fluoreszenzintensität verfälschten. Während der Messung wurde die Temperatur durch ein Peltierelement kontrolliert und durch Heizen oder Kühlen des Küvettenhalters bei konstant 25,0 $^{\circ}\text{C}$ gehalten, da die Fluoreszenz-emission stark von der Temperatur abhängig ist. Die Aufnahme der Emissionsspektren begann etwa 10 nm oberhalb (d.h. rotverschoben) der Anregungswellenlänge und endete dort, wo die Fluoreszenzintensität einen Wert nahe Null erreicht hatte; frühestens aber bei 750 nm. Die Spektren wurden nach der Messung aus dem mitgelieferten Programm Felix32 exportiert und in OriginPro 7.5G weiter bearbeitet. Die Proteoliposomenproben zeigten, wie bereits in Kapitel 2.3.1 beschrieben, einen starken Streuhintergrund bei niedrigen Wellenlängen. Um die Fluoreszenzintensität des Donors zuverlässig bestimmen zu können, musste dieser Betrag vom Gesamtspektrum abgezogen werden. Dazu wurde das gemessene Spektrum mit einem exponentiellen Abfall gefittet und dieser dann von

den Rohdaten abgezogen. Die resultierenden Spektren stimmten in Form und Lage der Fluoreszenzmaxima mit denen aus Detergenzproben überein.

2.6.2 FRET-Messungen

Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) wurde erstmals 1946 von Theodor Förster beschrieben. Seit den 1970er Jahren ist FRET eine häufig verwendete und weit verbreitete Technik in den modernen Biowissenschaften, mit der sich beispielsweise Strukturänderungen und Wechselwirkungen von Makromolekülen sehr gut untersuchen lassen (Stryer, 1978). Das Prinzip beruht darauf, dass zwei Fluorophore, wie z.B. Alexa Fluor 532 und Alexa Fluor 633, Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren. Wird eine Probe, die beide Fluorophore enthält, mit blaugrünem Licht der Wellenlänge $\lambda = 500$ nm bestrahlt, absorbiert Alexa Fluor 532 dieses Licht und strahlt Fluoreszenz ab, während Alexa Fluor 633 nur sehr schwach angeregt wird und kaum fluoresziert (vgl. Abb. 2.15). Befinden sich beide Fluorophore jedoch in direkter räumlicher Nähe, wird auch Alexa Fluor 633 fluoreszieren. Der Grund dafür ist der Energietransfer vom Donor Alexa Fluor 532. FRET basiert auf einer räumlich begrenzten Dipol-Dipol-Wechselwirkung.

In der vorliegenden Arbeit war der Monochromator so eingestellt, dass der Fluorophor mit derjenigen Wellenlänge λ angeregt wurde, bei der es etwa 40 % seiner Maximalabsorption erreicht. Für Alexa Fluor 532 liegt diese Anregungswellenlänge λ_{Ex} bei 500 nm (vgl. Abb. 2.15), für Atto 425 bei 400 nm und für Alexa Fluor 633 bei 570 nm. Die Wahl dieses Wertes hat drei Vorteile: Erstens liegt diese Anregungswellenlänge deutlich vor dem Beginn der Fluoreszenzemission, sodass das gesamte Emissionsspektrum detektiert werden kann. Zweitens resultiert die annähernd halbmaximale Absorption bereits in einem Emissionsspektrum mit hinreichend gutem Signal-Rausch-Verhältnis. Würde mit kleineren Wellenlängen angeregt, wäre die Fluoreszenzintensität geringer und das Emissionsspektrum verrauschter. Das führt zu ungenauerer Bestimmung der FRET-Effizienzen. Drittens ist die direkte Akzeptor-anregung des Alexa Fluor 633 bei dieser Wellenlänge nur sehr schwach. Bei Anregung mit größeren Wellenlängen nimmt die Direktanregung des Akzeptors dagegen zu und führt dazu, dass der in der Akzeptoremission enthaltene FRET-Anteil abnimmt. Dies erhöht ebenfalls die Ungenauigkeit der FRET-Quantifizierung. Der Energietransfer ist umso größer, je größer das Überlappintegral $U(\lambda)$ zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors ist (Abb. 2.15). Allerdings muss bei der Auswahl eines FRET-Paares auch darauf geachtet werden, dass der Akzeptor nicht oder nur sehr schwach durch das Licht anregbar ist, mit dem der Donor angeregt wird. Nach Lakowicz (1999) hängt das Überlappintegral $U(\lambda)$ von dem molaren

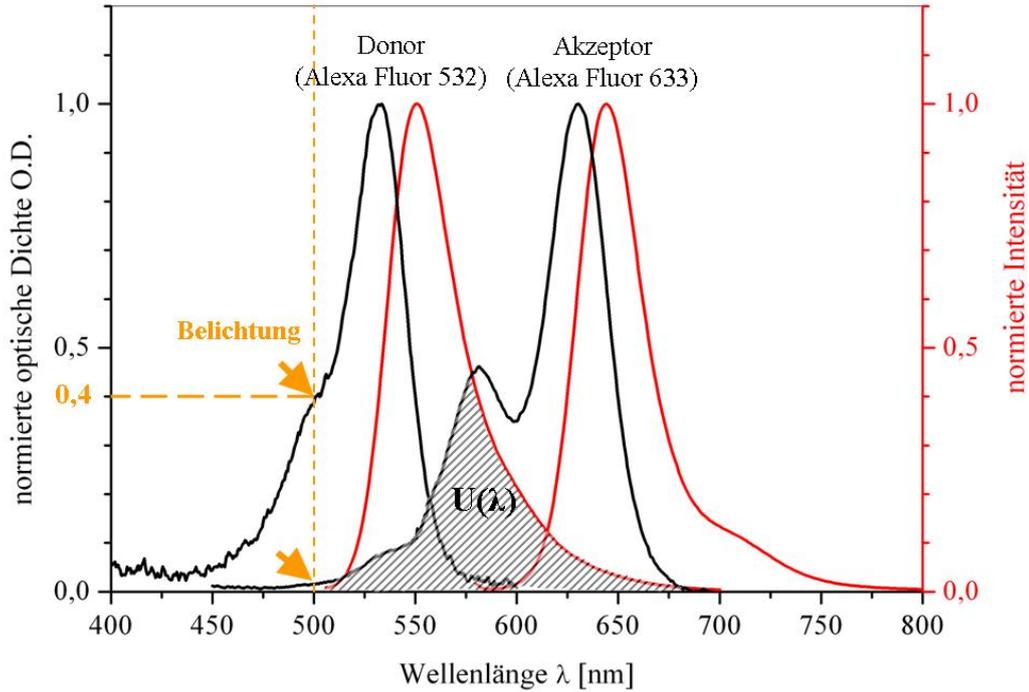


Abb. 2.15: Grafische Darstellung des für FRET benötigten Überlappintegrals $U(\lambda)$ (grau schraffiert). Zwischen dem Emissionsspektrum von Alexa Fluor 532 und dem Absorptionsspektrum von Alexa Fluor 633 ist der Überlapp groß, so dass die emittierten Photonen ein kräftiges Fluoreszenzsignal von Alexa Fluor 633 verursachen können. Bei Belichtung mit $\lambda = 500$ nm, wird Alexa Fluor 532 wesentlich stärker angeregt als Alexa Fluor 633 (Pfeile).

Absorptionskoeffizienten des Akzeptors ε_A ab:

$$U(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.6)$$

$F_D(\lambda)$ bezeichnet die Fluoreszenzintensität des Donors im Bereich λ bis $\lambda + \Delta\lambda$, wobei die gesamte Intensität (Fläche unter der Kurve) auf 1 normiert ist.

$U(\lambda)$ bestimmt den Förster-Radius R_0 , der in Ångström (Å) oder nm angegeben wird. R_0 kennzeichnet den Abstand von Donor und Akzeptor bei halber FRET-Effizienz (Abb. 2.16). In diesem Bereich ändert sich die Effizienz auch bei minimalen Abstandsänderungen sehr stark. Deshalb kann der FRET auch zur sehr genauen Bestimmung von Entfernungen zweier Fluoreszenzmarker dienen. Er wird mit dem Brechungsindex n des Mediums (1,333 für Wasser), der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors Φ_D , dem Überlappintegral $U(\lambda)$ und dem Orientierungsfaktor κ^2 aus

$$R_0 = (8,79 \cdot 10^{-5} \cdot n^{-4} \cdot \Phi_D \cdot U(\lambda) \cdot \kappa^2)^{\frac{1}{6}}. \quad (2.7)$$

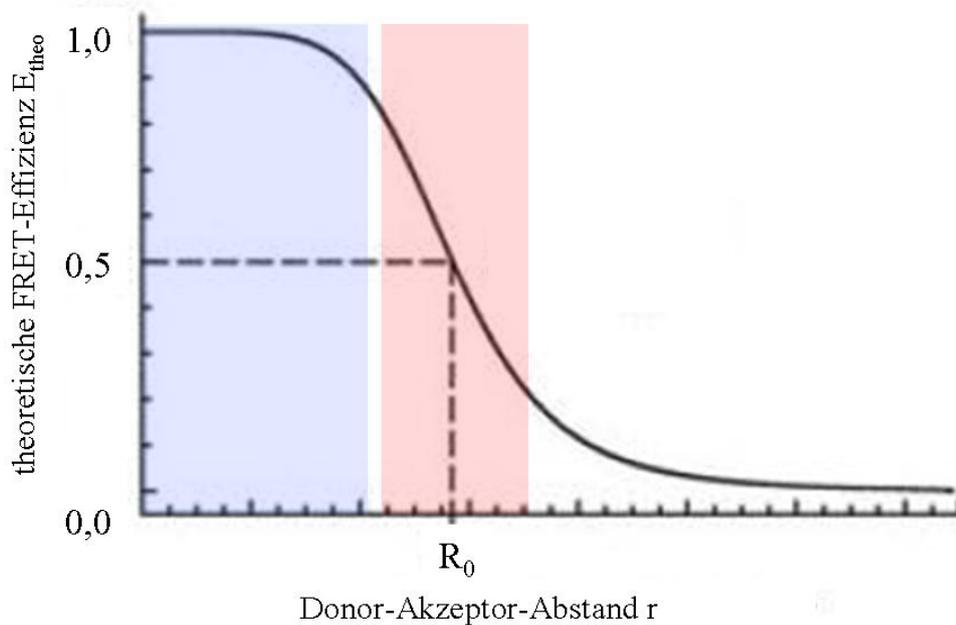


Abb. 2.16: Die Effizienz des Försterresonanzenergietransfers (FRET-Effizienz) hängt stark vom Abstand r zwischen Donor und Akzeptor ab. Bei kleinem Abstand ist die FRET-Effizienz 1,0 und der FRET vollständig. Je größer die Entfernung, desto schwächer der FRET, bei R_0 ist er nur noch mit halber Effizienz möglich. Will man Änderungen des Donor-Akzeptor-Abstandes mit Hilfe von Änderungen der FRET-Effizienz bestimmen, muss r nahe R_0 liegen (roter Bereich). Für Bindungsstudien, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, sollte der Abstand im gebundenen Zustand kleiner als R_0 sein (blauer Bereich), so dass die FRET-Effizienz 1 beträgt und die Bindung über eine Signaländerung gut zu beobachten ist.

berechnet. Die Quantenausbeute kann stark vom Umgebungsmedium des Fluorophors abhängen. Die Orientierung der beiden Dipole von Donor und Akzeptor ist im Allgemeinen nicht bekannt. Sind die Fluorophore frei beweglich, wird eine mittlere Orientierung mit $\kappa^2 = 2/3$ angenommen (Lakowicz, 1999). Sofern nicht anders angegeben, gilt dies auch in der vorliegenden Studie.

Mit Hilfe des Förster-Radius R_0 und dem tatsächlichen Abstand r der Fluorophore wurde die theoretisch erreichbare FRET-Effizienz errechnet. Je näher die Fluorophore beieinander liegen, desto mehr entspricht E_{theo} dem Wert 1 für vollständigen Energietransfer:

$$E_{\text{theo}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}. \quad (2.8)$$

Die Bestimmung der tatsächlichen FRET-Effizienz im Experiment erfolgte durch Vergleich der maximalen Donorintensitäten der Mischprobe aus Donor und

Akzeptor (I_{DA}) und einer Referenzprobe, die ausschließlich den Donor enthält (I_D). Die Donorkonzentration war in beiden Proben identisch und wurde durch Absorptionsspektroskopie überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die Berechnung der gemessenen FRET-Effizienz E_{mess} erfolgte mit

$$E_{mess} = \frac{1}{\gamma_A} \cdot \left(1 - \frac{I_{DA}}{I_D}\right). \quad (2.9)$$

Das Markierungsverhältnis des Akzeptors γ_A wird mit Gleichung 2.4 berechnet. Zusätzlich kann die experimentelle FRET-Effizienz auch ratiometrisch aus den Donor- und Akzeptorintensitäten bestimmt werden:

$$E_{mess}^{ratio} = \frac{1}{\gamma_A} \cdot \left(\frac{I_A}{I_A + \alpha \cdot I_{DA}}\right). \quad (2.10)$$

Dabei ist $\alpha = \eta_A \Phi_A / \eta_D \Phi_D$ ein Korrekturfaktor zur Berücksichtigung der Detektoreffizienz η bei verschiedenen Wellenlängen und der Quantenausbeute Φ von Donor und Akzeptor.

Für Messungen in Detergenzpuffer wurden die Ansätze im Donor-Akzeptor-Verhältnis 1:1 (mol/mol) direkt gemischt, gevortext und zum Erreichen der vollständigen Bindung eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Fluoreszenzspektrum der FRET-Probe gemessen und die maximale Fluoreszenzintensität des Donorpeaks bestimmt. Neben der oben beschriebenen Donorprobe wurde noch ein zweiter Kontrollansatz mitgeführt, der ausschließlich den Akzeptor enthielt. Auch hier war die Konzentration gleich der in der Mischprobe. Die Akzeptorprobe war nötig, um den Anteil der Direktanregung zu berechnen, der die Fluoreszenz direkt durch das Lampenlicht und nicht durch den Energietransfer verursacht. Alle drei Präparate wurden bei identischen Bedingungen gemessen. In Detergenzpuffer konnte das Verhältnis von Donor zu Akzeptor durch Zutitration von Akzeptor schrittweise verändert werden. Die FRET-Effizienzen wurden nach jedem Titrationsschritt bestimmt. Für FRET-Messungen in LUV wurden die Mischverhältnisse in Detergenzpuffer eingestellt und die Mischung dann in LUV rekonstituiert (Kap. 2.3). Da Proteoliposomen ein geschlossenes System darstellen, war das Verhältnis durch Zutitration von Akzeptor nicht mehr veränderbar.

Die theoretische FRET-Effizienz E_{theo} stellt die Obergrenze für vollständige NpSR_{II}/NpHtr_{II}-Komplexbildung dar. Das Verhältnis E_{mess}/E_{theo} ergibt daher den tatsächlichen Anteil der gebildeten Komplexe. Nach dem Massenwirkungsgesetz ist die vorliegende Gleichgewichtsreaktion durch $D+A \leftrightarrow DA$ gegeben (D: Donor-Monomere, A: Akzeptor-Monomere, DA: Donor-Akzeptor-Komplex). Mit

$$\frac{[DA]}{[DA] + [D]} = \frac{1}{1 + \frac{K_D}{A_0}} = \frac{E_{mess}}{E_{theo}} \quad (2.11)$$

kann aus dieser Beziehung die Dissoziationskonstante K_D angegeben werden. Der Parameter A_0 bezeichnet die zugegebene Akzeptorkonzentration.

2.6.3 2-Fokus-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (2fFCS)

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) ist eine weit verbreitete Methode zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten, Konzentrationen und Zylinder-Radien fluoreszierender oder fluoreszenzmarkierter Partikel. Sie ist so empfindlich, dass sie wenige, sogar einzelne ein- und austretende Moleküle als Änderung der Fluoreszenzintensität im Laserfokus wahrnehmen kann. Die räumliche Ausdehnung des Laserfokus ist beugungslimitiert und umfasst mit einer Höhe von einigen hundert Nanometern ein Anregungsvolumen im Femtoliterbereich.

Diese zeitabhängigen Fluktuationen der diffundierenden Partikel in der Fluoreszenzintensität können mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion (*auto correlation function*, ACF) quantifiziert werden (Haustein, 2007). Die ACF beschreibt die Wahrscheinlichkeit, nach gegebener Zeit den Fluorophor noch im Fokus zu detektieren. Die normierte Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ der Fluoreszenzfluktuationen $\delta F(t)$ des Signals $F(t)$ ist definiert als

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1 \quad (2.12)$$

mit

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$$

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt.$$

Eine ebenfalls häufig benutzte Funktion ist die Kreuzkorrelationsfunktion zweier Signale A und B (*cross correlation function*, CCF):

$$G_{AB}(\tau) = \frac{\langle F^A(t) \cdot F^B(t + \tau) \rangle}{\langle F^A(t) \rangle \cdot \langle F^B(t) \rangle} = \frac{\langle \delta F^A(t) \cdot \delta F^B(t + \tau) \rangle}{\langle F^A(t) \rangle \cdot \langle F^B(t) \rangle} + 1. \quad (2.13)$$

Da die relativen Fluktuationen mit steigender Partikelzahl kleiner werden, muss die mittlere Zahl der Partikel im Fokusbereich möglichst kleiner als 1.000 sein. Typischerweise ist das bei nano- bis pikomolaren Konzentrationen der Fall. Betrachtet man die freie 3D-Diffusion einer einzigen Spezies in Lösung, lautet die Autokorrelationsfunktion

$$G_{3D}(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}} \cdot \langle c \rangle} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{w_0^2}{z_0^2} \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \right) \quad (2.14)$$

mit V_{eff} = effektives Anregungsvolumen, $\langle c \rangle$ = mittlere Partikelkonzentration, τ_D = laterale Diffusionszeit, w_0 = Fokusaussdehnung, z_0 = axialer Fokusparameter. Die Fokusaussdehnung beschreibt den Durchmesser, bis zu dem die Intensität auf $1/e^2$ abgefallen ist. Mit dieser Annahme kann die Fokusaussdehnung auch als Fokusedurchmesser bezeichnet werden.

Mit

$$\frac{1}{V_{\text{eff}} \cdot \langle c \rangle} = \frac{1}{\langle N \rangle} \quad (2.15)$$

ist der erste Faktor dieser Gleichung direkt proportional zur Teilchenzahl N im Anregungsvolumen, so dass die Konzentration der diffundierenden Partikel aus der inversen Maximalamplitude $G(0)$ bestimmt werden kann. Die laterale Diffusionszeit τ_D des Partikels durch das Fokusedvolumen enthält den Diffusionskoeffizienten D :

$$\tau_D = \frac{w_0^2}{4D} \quad (2.16)$$

Die Autokorrelationsfunktion 2.14 wurde in dieser Studie zur Bestimmung der Diffusion von Atto 655 in Wasser benutzt. Dieser Wert diente als Referenz zur Kalibrierung des 2fFCS-Gerätes.

Die Diffusionsbewegung integraler Membranproteine in Lipidvesikeln kann nur in zwei Dimensionen erfolgen. Die Autokorrelationsfunktion lautet in diesem Fall

$$G_{2D}(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \quad (2.17)$$

Konventionelle FCS liefert häufig ungenaue Diffusionskoeffizienten, da die radiale Ausdehnung w_0 des Anregungsvolumens für die Bestimmung genau bekannt sein muss (Gleichung 2.14). Alle optischen Elemente weisen jedoch Toleranzen auf, die die Form des Fokus verändern können und damit die Berechnung verfälschen. So haben Änderungen der Deckglasdicke, des Brechungsindex des Mediums und der Laserleistung großen Einfluss auf die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten mit konventioneller FCS (Enderlein, 2004).

Dieser Nachteil kann durch 2fFCS (2-Fokus-Fluoreszenzkorrelationspektroskopie) überwunden werden (Dertinger, 2007). Der Vorteil dieser Methode liegt

in der Verwendung eines zweiten Fokus. Dieser überlappt den ersten Fokus in einem bekannten, festen Abstand δ . Durch die Einführung dieses „intrinsic Lineals“, ist die Form des Anregungsbereichs genauer bekannt als bei konventioneller FCS. Durch Errechnung der CCF aus den beiden ACF und unter Berücksichtigung von δ , werden die oben genannten negativen Einflüsse in der 2fFCS reduziert. Die Implementierung der Kreuzkorrelation in die Analyse von 2fFCS ist detailliert beschrieben in Dertinger et al., 2007. Die CCF ist direkt proportional zur Wahrscheinlichkeit, ein Photon im zweiten Fokus zum Zeitpunkt τ zu sehen, wenn vom ersten Fokus ein Photon zum Zeitpunkt Null detektiert wurde oder umgekehrt. Daraus wurde die Diffusionszeit ermittelt, die ein Partikel braucht, um beide Fokuse nacheinander zu passieren. Mit wohldefiniertem δ konnten nun absolute Diffusionskoeffizienten ermittelt werden. Die CCF fällt in der grafischen Darstellung im Vergleich zu den ACF deutlich flacher ab, was an dem vom Partikel zurückgelegten längeren Weg liegt. Da dieser hier beide Fokuse durchschreiten muss und nicht nur einen, ist die Wahrscheinlichkeit höher, das Partikel auch bei größeren Zeitabständen noch zu detektieren.

Die Fits der Autokorrelationen wurden unter Verwendung von Routinen aus MATLAB 7.4.0.287 (R2007a) mit drei verschiedenen Modellen durchgeführt. Modell A entsprach Gleichung 2.17 und stellt damit den Versuch dar, die Messdaten mit nur einem Diffusionskoeffizienten zu beschreiben. Für Modell B wurde ein weiterer Diffusionskoeffizient D_2 hinzugefügt, der eine zweite Spezies diffundierender Partikel beschrieb. Mit der Partikelanzahl N_2 lautet die Autokorrelationsfunktion für diesen Fall:

$$G_B(\tau) = \frac{1}{N_1 \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_1}}\right)} + \frac{1}{N_2 \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_2}}\right)} \quad (2.18)$$

Mit der dritten Variante, Modell C wurde ein Diffusionskoeffizient ermittelt und zusätzlich eine exponentielle Komponente mit der Relaxationszeit τ_R hinzugefügt, die die Amplitude A besaß.

$$G_C(\tau) = \frac{1 - A + A \exp(\tau / \tau_R)}{N(1 - A)} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \quad (2.19)$$

Für die Kreuzkorrelationsfunktionen findet man ganz analoge Ausdrücke wie Gleichungen 2.17 bis 2.19, wobei aber jeder Diffusionsterm mit dem zusätzlichen Faktor

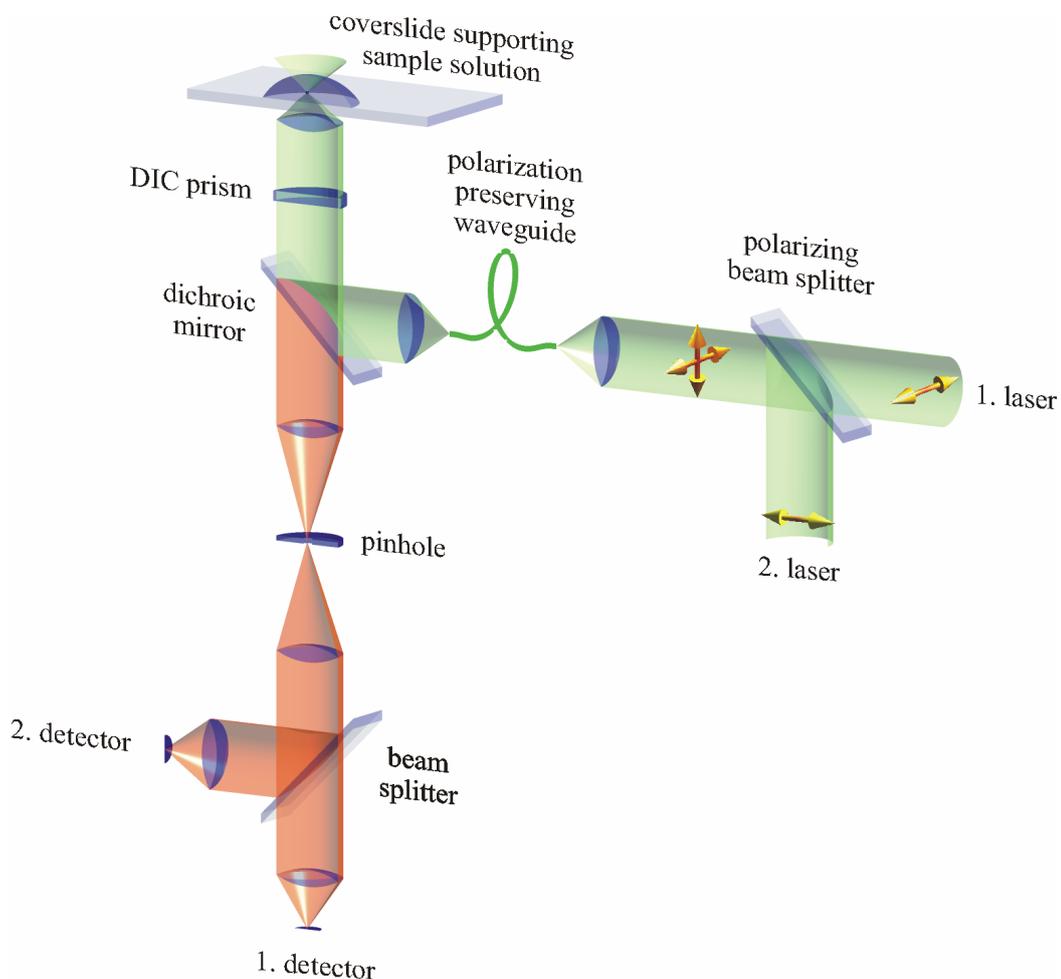
$$\exp\left(-\frac{\delta^2/w_0^2}{1 + t/\tau_D}\right) \quad (2.20)$$

multipliziert wird (für weitere Details siehe Dertinger, 2007).

Aufbau des 2fFCS-Gerätes

Der Prototyp eines 2fFCS-Gerätes wurde 2007 von Jörg Enderlein und Thomas Dertinger entwickelt und beschrieben (Dertinger, 2007). Der Aufbau der Apparatur (Abb. 2.17) basierte auf einem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop (IX 71, Olympus, Hamburg, Deutschland). Die Anregung erfolgte mit zwei identischen, abwechselnd gepulsten Laserdioden bei einer Wellenlänge von 640 nm (LDH-P-635, PicoQuant, Berlin, Deutschland). Mit Hilfe einer Steuerelektronik (PDL 808 „Sepia“, PicoQuant, Berlin, Deutschland), wurden Pulsdauer (50 ps) und Wiederholrate (40 MHz) eingestellt. Das Licht beider Laser war senkrecht zueinander linear polarisiert. Durch die Vereinigung beider Kanäle in einem polarisierenden Strahlteiler (Narrow Band Polarizing Beamsplitter Cube 633, Ealing Catalogue, St. Aspah, UK) und Einkopplung in ein polarisationserhaltendes Glasfaserkabel blieb die Polarisation der beiden Lichtpulse erhalten. Das aus der Glasfaser austretende Licht wurde erneut kollimiert, so dass

Abb. 2.17: Schematischer Aufbau des 2fFCS-Gerätes nach Dertinger, 2007.



anschließend eine kontinuierliche Folge von Laserpulsen mit wechselnder orthogonaler Polarisierung resultierte. Der Laserstrahl wurde an einem dichroitischen Spiegel (Q 660 LP, Chroma Technology, Rockingham, USA) reflektiert und mit einem DIC- oder Nomarski-Prisma (U-DICTHC, Olympus, Hamburg, Deutschland), in zwei räumlich getrennte kohärente Wellenfronten gleicher Amplitude gespalten. Die beiden Strahlen wurden mit einem Objektiv (UPLAPO 60x W, 1.2 N.A., Olympus Europa, Hamburg, Deutschland) in zwei nebeneinander liegende Fokusse gebündelt. Das Prisma war dabei so gewählt, dass ihr Abstand 400 nm betrug.

Das emittierte Fluoreszenzlicht der angeregten Partikel wurde durch eine konfokale Blende mit einem Durchmesser von 200 μm geführt. Dadurch wurde die Detektion von störendem Streulicht aus der Probe vermieden und gleichzeitig die Dicke der detektierten Schicht minimiert. Anschließend wurde der Strahl in einem Strahlteiler (Linos Photonics GmbH & Co.KG, Göttingen, Deutschland) halbiert und von zwei SPADs (Single-Photon Avalanche Diodes, SPCM-AQR-14, Perkin Elmer, Wellesley, USA) detektiert. Mit Hilfe einer Einzelphotonen-Zählelektronik (TimeHarp 200, PicoQuant, Berlin, Deutschland), wurden die Photonen beider SPADs mit einer Zeitauflösung im Pikosekundenbereich aufgenommen. Mittels TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) konnte anhand dieser sehr guten Zeitauflösung errechnet werden, ob ein Photon im ersten oder zweiten Fokus angeregt worden war. Dazu wurde der Zeitpunkt der Photonendetektion im Bezug auf den vorangegangenen Laserpuls bestimmt. Auf diese Weise konnten die ACF und die CCF für beide Fokusse berechnet werden. Bei allen Präparationen für 2fFCS-Messungen wurde die Probe möglichst unter Ausschluss von Licht gehandhabt, um das Bleichen der Fluorophore zu verhindern.

Kalibrierung des Gerätes und Messung von Diffusionskoeffizienten

Zu Beginn einer Messreihe wurde das Gerät mit Hilfe einer Referenzlösung von 40 nM Atto 655-maleimid in Wasser (Atto-Tec GmbH, Siegen, Deutschland) kalibriert. Die Kalibrierung erfolgte mit einer Laserleistung von 10 μW pro Laser bei 25,0 °C. Die Temperatur wurde während aller Messungen durch ein Wasser-Temperiersystem (F12 + MB, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) konstant gehalten, das mit einem Kupferring um das Objektiv und einem Kupferblock auf dem Objektisch verbunden war. In eine Aussparung des Kupferblocks wurde ein 0,17 mm dicker Objektträger aus Borosilikatglas (Menzel, Braunschweig, Deutschland) gelegt, auf den 30 μl der Referenzlösung pipettiert wurden. Die Messung der Temperatur erfolgte direkt im Immersionswasser unterhalb des Probetropfens. Für die Messung der Diffusionskoeffizienten von NpSR_{II} und NpHtr_{II} in GUV wurde die präparierte GUV-Kammer auf dem Objektivtisch befestigt und ein Thermometer (HH505, Omega Newport

Electronics GmbH, Deckenpfronn, Deutschland) direkt neben den ITO-Deckgläschen angebracht. Da die Diffusionsgeschwindigkeit direkt von der Temperatur abhängt, wurde diese konstant bei 25,0 °C gehalten. Im Durchlichtmodus wurden GUV mit einem Durchmesser von etwa 15 bis 50 µm gesucht. Für die Messung wurden sie zunächst in xy-Richtung so positioniert, dass die Laserfokusse zentriert lagen. Danach wurden die Fokusse in z-Richtung aufwärts bewegt, bis sie die obere GUV-Membran schnitten. Zur genauen Bestimmung der Messhöhe war das Objektiv in ein piezoelektrisches Nanopositionierungssystem (PIFOC, Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG, Karlsruhe-Palmbach, Deutschland) integriert. Die Messhöhe und Messtemperatur jeder Stufe des z-Stapels wurden notiert.

Die Leistung betrug 1 µW pro Laser, um das Bleichen der Fluorophore zu vermeiden. Zur exakten Bestimmung absoluter Diffusionskoeffizienten war die Messung von z-Stapeln nötig (Humpolickova, 2006). Hierbei wurde die Membran am höchsten Punkt des GUV in z-Achse in 0,5-µm-Schritten gescannt. Dabei durchliefen die beiden Fokusse die Membran vollständig von unten nach oben. Anhand der später im Fit ermittelten Fokusausdehnung w_0 konnte diejenige Ebene ermittelt werden, bei der sich die Membran genau in der Mitte befand. Je genauer die errechneten w_0 bei 400 nm lag, desto näher lagen die Messhöhen zur Mittelebene. Nur der in dieser Ebene gemessene Diffusionskoeffizient ist zuverlässig, da die Fokusse hier optimal überlappen.

2.7 Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie

Die Anregung der Fluorophore erfolgte mit einem Farbstofflaser (Radiant Dye Laser & Accesories GmbH, Wermelskirchen, Deutschland). Dieser enthielt DCM (4-dicyanomethylene-2-methyl-6-p-dimethylaminostyryl-4H-pyran) als aktives Medium, das Anregungslicht von $\lambda_{\text{Ex}} = 635 - 640$ nm erzeugte. Dieses Anregungslicht wurde in eine Glasfaser eingekoppelt und in einem Single-Port-Epifluoreszenz-Kondensator (TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland) gebündelt, bevor es in ein Fluoreszenzmikroskop (IX 71, Olympus Europa, Hamburg, Deutschland) gespeist wurde. Mit einem dichroitischen Spiegel (660DRLP, Omega Optical Inc., Brattleboro, USA) wurde es in das Wasserimmersions-Objektiv (60 x, 1.2 N.A., Olympus, Hamburg, Deutschland) reflektiert und traf dann auf das Präparat. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde durch dasselbe Objektiv zurückgeführt und passierte einen Filter (690DF40, Omega Optical Inc.). Das Fluoreszenzbild wurde von einer EM-CCD-Kamera (iXon DV885, 1004x1002 Pixel, 8 µm Pixelgröße, Andor Technology, Belfast, Nordirland) aufgenommen.

3 Untersuchung der NpHtrII/NpSRII-Komplexbildung durch Försterresonanzenergietransfer (FRET)

3.1 Fluoreszenzmarkierung der Proteine

3.1.1 Reinigung der Proben von überschüssigem Farbstoff

Die Proteinmarkierung erfolgte, wie in Kapitel 2 beschrieben, durch Fluorophore. Diese trugen als funktionelle Gruppe einen Maleinimidrest und wurden damit über eine kovalente Bindung an die SH-Gruppe eines Cysteins der Proteine gekoppelt. Die kovalente Bindung war sehr stabil, so dass einmal gebundener Farbstoff nicht wieder abgespalten wurde. Um sicherzugehen, dass möglichst viele verfügbare Cysteine ein Farbstoffmolekül binden, wurde der Farbstoff im fünffachen molaren Überschuss zum Protein zugegeben. Nach erfolgter Reaktion musste das Reaktionsgemisch gereinigt werden, um mit Farbstoff versehenes Protein von ungebundenem, freien Farbstoff zu trennen. Die Reinigung erfolgte durch Größenausschlusschromatographie, die die Moleküle nach ihrem Molekulargewicht trennt. In den zuletzt aufgefangenen Fraktionen war nur noch freier Farbstoff enthalten, mit einem vergleichsweise geringen Molekulargewicht von etwa 1 kDa.

Die chromatographische Trennung zur Extraktion der markierten Proteine war für viele Farbstoffe nach einem einzigen Durchlauf noch nicht ausreichend sauber (Abb. 3.1, 3.2). Zwar enthielten nur die Fraktionen eins bis vier das markierte Protein, allerdings war schon ab Fraktion zwei freier Farbstoff enthalten, dessen Anteil mit fortschreitender Elution immer mehr anstieg. Ab Fraktion fünf war nur noch freier Farbstoff und kein Protein mehr im Eluat enthalten. Daher wurden die folgenden Fraktionen, die den Großteil ungebundenen Farbstoffs enthielten, nicht mehr aufgefangen.

Der zunehmende Anteil ungebundenen Farbstoffs in den Proteinfractionen war durch auftretende Hypsochromie im Spektrum festzustellen, d.h. an einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu kleineren Wellenlängen. Diese Wellenlängenverschiebung $\Delta\lambda_{\text{Abs, max}}$ war bei den verschiedenen Farbstoffen unterschiedlich stark ausgeprägt (Tab. 3.1 und Abb. 3.1). Alexa Fluor 532 und Cy7Q zeigten sie mit 9,0 bzw. 10,0 nm sehr deutlich. Atto 425 und Alexa Fluor 633 ergaben dagegen nur eine relativ geringe Änderung von 3,0 bzw. 4,0 nm. Als Indikator für ungebundenen Farbstoff in der Probe reichte jedoch auch diese Differenz aus. Da sich während der Elution der Anteil des

| | gebunden, $\lambda_{\text{Abs, max}}$ [nm] | ungebunden, $\lambda_{\text{Abs, max}}$ [nm] | Differenz $\Delta\lambda$ [nm] |
|-----------------|--|--|--------------------------------|
| Atto 425 | 437,0 | 434,0 | 3,0 |
| Alexa Fluor 532 | 534,5 | 525,5 | 9,0 |
| Alexa Fluor 633 | 632,0 | 628,0 | 4,0 |
| Cy7Q | 754,0 | 744,0 | 10,0 |

Tab. 3.1: Lage des Absorptionsmaximums $\lambda_{\text{Abs, max}}$ der Farbstoffe nach Bindung am Protein und in ungebundenem Zustand. Alexa Fluor 532 und Cy7Q zeigen eine starke hypsochrome Verschiebung des Farbstoffspektrums in ungebundenem Zustand.

freien Farbstoffs von Fraktion zu Fraktion erhöhte, verschob sich auch das resultierende Absorptionsmaximum schrittweise zu niedrigeren Wellenlängen. Erst wenn die Absorptionsmaxima nach mehreren chromatographischen Reinigungen in allen Fraktionen übereinander lagen und dem Wert für gebundenen Farbstoff entsprachen, war der überschüssige Farbstoff vollständig entfernt.

Ein Beispiel hierfür ist in Abb. 3.1 dargestellt. Es zeigt eine Reinigung von NpHtr₁₅₇A78C-Alexa Fluor 532. Die optische Dichte aller Spektren wurde auf O.D. = 1 normiert. Nach der ersten Größenausschlusschromatographie (Abb. 3.1 a) lagen die Absorptionsmaxima der Fluorophore in den Fraktionen bei sehr unterschiedlichen Wellenlängen. Fraktion eins und zwei zeigten die höchsten Wellenlängen mit $\lambda_{\text{Abs, max}} = 534,5$ nm und 533,5 nm und einer Differenz von nur 1,0 nm. Aus diesem sehr geringen Unterschied folgte, dass in Fraktion zwei nur sehr wenig ungebundener Farbstoff vorlag. In der dritten Fraktion dieser Elution war das Absorptionsmaximum bereits deutlich stärker zu kleineren Wellenlängen verschoben und lag bei 531,5 nm. Der Unterschied zu vollständig gebundenem Farbstoff betrug 3,0 nm. Hier waren bereits deutlich mehr ungebundene Moleküle von Alexa Fluor 532 enthalten als in Fraktion zwei. In der Fraktion vier war mit $\lambda_{\text{Abs, max}} = 527,5$ nm zum Großteil freier Farbstoff enthalten. Der hypsochrome Effekt war mit einer Verschiebung von 7,0 nm fast vollständig ausgeprägt. Die Ursache für die Hypsochromie des Fluorophors liegt in veränderten Umgebungsbedingungen nach Bindung an das Protein (Buschmann, 2003).

Fraktion fünf enthielt ausschließlich freien Farbstoff. Das Absorptionsmaximum lag hier bei 525,5 nm und zeigte mit 9,0 nm die vollständige Differenz zwischen gebundenem und ungebundenem Farbstoff. Diese Fraktion wurde daher verworfen und

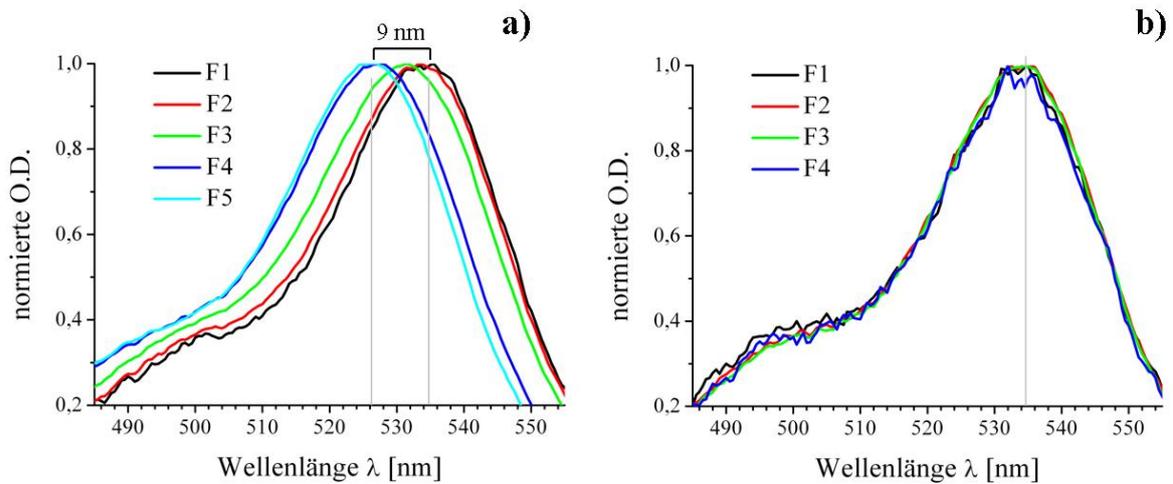


Abb. 3.1: Die ausgeprägte hypsochrome Verschiebung von Alexa Fluor 532 dient als Indikator für ungebundenen Farbstoff in der Lösung. a): Nach der ersten chromatographischen Reinigung von NpHtrII157V78C-Alexa Fluor 532 unterscheiden sich die Absorptionsmaxima der Fraktionen F1-5 um bis zu 9,0 nm. b): Nach vierfacher Reinigung unterscheiden sich die Proteinfraktionen F1-4 nicht mehr und zeigen ein einheitliches Absorptionsmaximum von $\lambda_{Abs, max} = 534,5$ nm. Diese Fraktionen enthalten ausschließlich an Protein gebundenen Farbstoff.

für weitere Aufreinigungen nicht mehr verwendet. Die Fraktionen zwei bis vier wurden weiter aufgereinigt, um den ungebundenen Farbstoff vollständig zu entfernen und das markierte Protein zu extrahieren. Das Resultat nach vier aufeinander folgenden Größenausschlusschromatographien ist in Abb. 3.1 b) dargestellt. Bei jeder einzelnen der chromatographischen Trennungen verringerte sich die Gesamtkonzentration des markierten Proteins. Dieser Proteinverlust durch die Reinigung machte sich in den abgebildeten stärker verrauschten Spektren bemerkbar. Die dargestellten Fraktionen eins bis vier enthielten das markierte Protein. Die Absorptionsmaxima der in diesen Proben enthaltenen Moleküle von Alexa Fluor 532 lagen bei $\lambda_{Abs, max} = 534,5$ nm und unterschieden sich damit nicht vom Wert der Fraktion eins in Abb. 3.1 a). Dies zeigte, dass in keiner der vier Proteinfraktionen freier Farbstoff enthalten war, und die Proben damit vollständig gereinigt waren.

Neben den Absorptionsmaxima wurde das Markierungsverhältnis γ als zweiter Parameter zur Kontrolle der Probenreinheit untersucht. Es wurde für jede Fraktion als Verhältnis von Proteinkonzentration die Farbstoffkonzentration bestimmt. Bei $\gamma = 1$ hatte jedes Proteinmolekül ein Farbstoffmolekül gebunden, bei $\gamma = 0,5$ nur jedes zweite. War neben gebundenen auch noch freier Farbstoff in den Proteinproben enthalten, wurde das Markierungsverhältnis bis hin zu Werten $\gamma > 1$ verfälscht. Als Anhaltspunkt für das

tatsächliche Verhältnis diente die zweite Fraktion, da sie ausschließlich markiertes Protein und nie freien Farbstoff enthielt. Erst wenn die Markierungsverhältnisse aller Proteinfractionen den gleichen Wert hatten, war die Probe gut gereinigt und kein freier Farbstoff mehr enthalten.

Da das Markierungsverhältnis das molare Verhältnis von Farbstoff zu Protein beschreibt, kann dieser Parameter auch grafisch dargestellt werden. Abbildung 3.2 zeigt die Absorptionsspektren von NpSRIIK157C-Alexa Fluor 633. Jedes Diagramm zeigt die Fraktionen zwei bis vier, die den Großteil markierten Proteins enthielten. Die optische Dichte des Farbstoffs wurde bei $\lambda_{\text{Abs, max}}$ für alle Darstellungen auf 1 normiert. Die Höhe der Retinalbande, die die Proteinkonzentration darstellt, fiel im Vergleich dazu durch die abweichenden Markierungsverhältnisse unterschiedlich aus. Nach der ersten Größenausschlusschromatographie (a) war die Proteinmenge in allen drei Fraktionen sehr verschieden. Fraktion zwei zeigte die höchste Retinalbande, enthielt folglich am meisten Protein im Verhältnis zum Farbstoff. In Fraktion vier war im Verhältnis zum Farbstoff dagegen wesentlich weniger Retinal vorhanden, die Retinalbande war nur schwach ausgeprägt. Nach der zweiten und dritten Reinigung (b und c) glichen sich die Verhältnisse an. Erst nach der vierten Chromatographie (d) war aber der freie Farbstoff so weit entfernt, dass die drei Kurven nahezu vollständig deckungsgleich waren. Das Markierungsverhältnis, berechnet mit Gleichung 2.4, war nun in allen drei Fraktionen gleich. Es betrug im dargestellten Beispiel 0,83, d.h. 83 % der Proteine hatten ein Farbstoffmolekül gebunden. Die ermittelten Markierungsverhältnisse γ der Proben spielten eine wichtige Rolle bei der Berechnung der FRET-Effizienzen und der Proteinkonzentrationen. Ihre genaue Bestimmung war daher von zentraler Bedeutung.

Die Menge entfernten freien Farbstoffs nahm von Mal zu Mal ab und war besonders zu Beginn hoch, als noch viel freier Farbstoff in der Probe vorlag. Zwischen (a) und (b) war der Unterschied daher sehr groß, hier wurde viel überschüssiger Farbstoff entfernt. Von (c) nach (d) ist die Änderung dagegen sehr gering und mittels Absorptionsspektroskopie nur noch schwer detektierbar.

Wie oft die Probe über die Säule gereinigt werden musste, um das markierte Protein zu extrahieren, war vom Marker abhängig. Mit Cy7Q markierte Proben zeigten bereits nach der zweiten Reinigung keine Änderung mehr. Alexa Fluor 633 war dagegen nicht so schnell aus den Ansätzen zu entfernen. Bei Proteinen, die mit diesem Fluorophor markiert wurden, waren wie beschreiben vier hintereinander folgende Säulenchromatographien nötig, um den Farbstoff vollständig zu entfernen. Bei der Markierung mit Atto 425 und Alexa Fluor 532 waren etwa drei Durchgänge nötig, bis alle Spektren deckungsgleich waren.

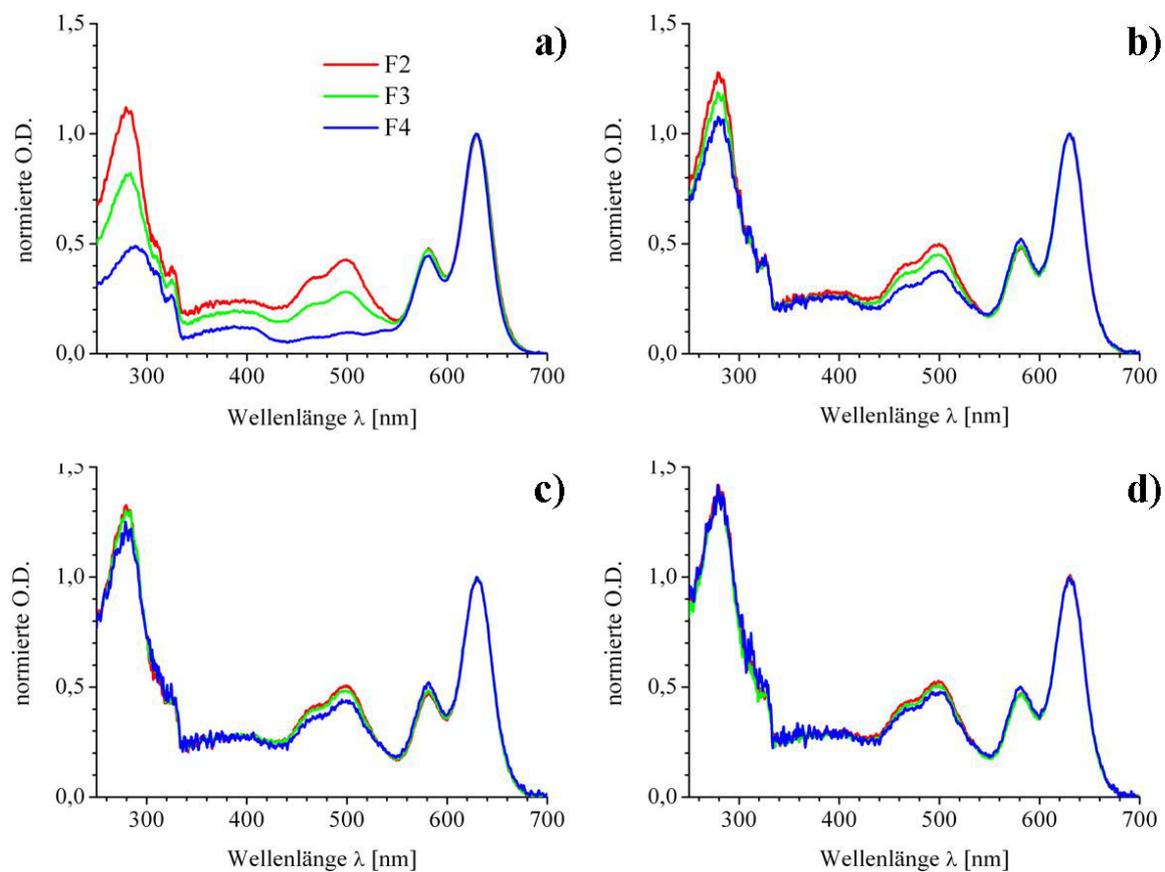


Abb. 3.2 a - d: Reinigung von NpSRIIK157C nach Markierung mit Alexa Fluor 633. Die normierten Absorptionsspektren von Fraktion 2 (rot), Fraktion 3 (grün) und Fraktion 4 (blau) gleichen sich von der ersten Größenausschlusschromatographie (a) bis zur letzten (d) immer mehr an. Nach vollständiger Reinigung der Probe (d) haben die Proteinansätze fast identische Markierungsverhältnisse, abzulesen an deckungsgleichen Spektren.

3.1.2 Unterschiede in der Markierbarkeit der Proteine

Für die vorliegende Studie wurde eine Vielzahl von Kombinationen mit Proteinen und Farbstoffen getestet. Um möglichst vollständig markierte Proteine mit $\gamma = 1,0$ zu erhalten, wurden zunächst alle Mutanten mit verschiedenen Farbstoffen inkubiert und ihre Markierungsverhältnisse bestimmt.

Die in Tabelle 3.2 angegebenen Markierungsverhältnisse γ wurde mit Gleichung 2.4 berechnet und lagen in den meisten Fällen oberhalb von 0,7. Unter der Voraussetzung, dass keine unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Protein stattfanden, waren somit etwa 70 bis 100 % der Proteinmoleküle mit je einem Farbstoffmolekül markiert. Im pH-Bereich von 7,0-7,5 sind die Thiolgruppen aus-

| Marker \ Protein | Retinal | Atto 425 | Alexa 532 | Alexa 633 | Cy7Q |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| NpHtrII _{157V78C} | - | 0,70-0,98 | 0,5-0,98 | 0,45-0,75 | 0,90-1,00 |
| NpHtrII _{157A94C} | - | - | 0,5-1,00 | 0,80-1,00 | 0,80-0,98 |
| NpSRIIK157C | 0,62-0,75 | - | - | 0,78-0,83 | 0,50-1,00 |
| NpSRII | 0,80 | - | - | - | - |

Tab. 3.2: Markierungsverhältnisse γ verschiedener Kombinationen aus Protein und Marker. Die Tabelle enthält auch die unmutierte, natürliche Variante des sensorischen Rhodopsin II, NpSRII. 80 % dieses natürlichen NpSRII enthielten Retinal, in der Mutante NpSRIIK157C waren es 62-75 %.

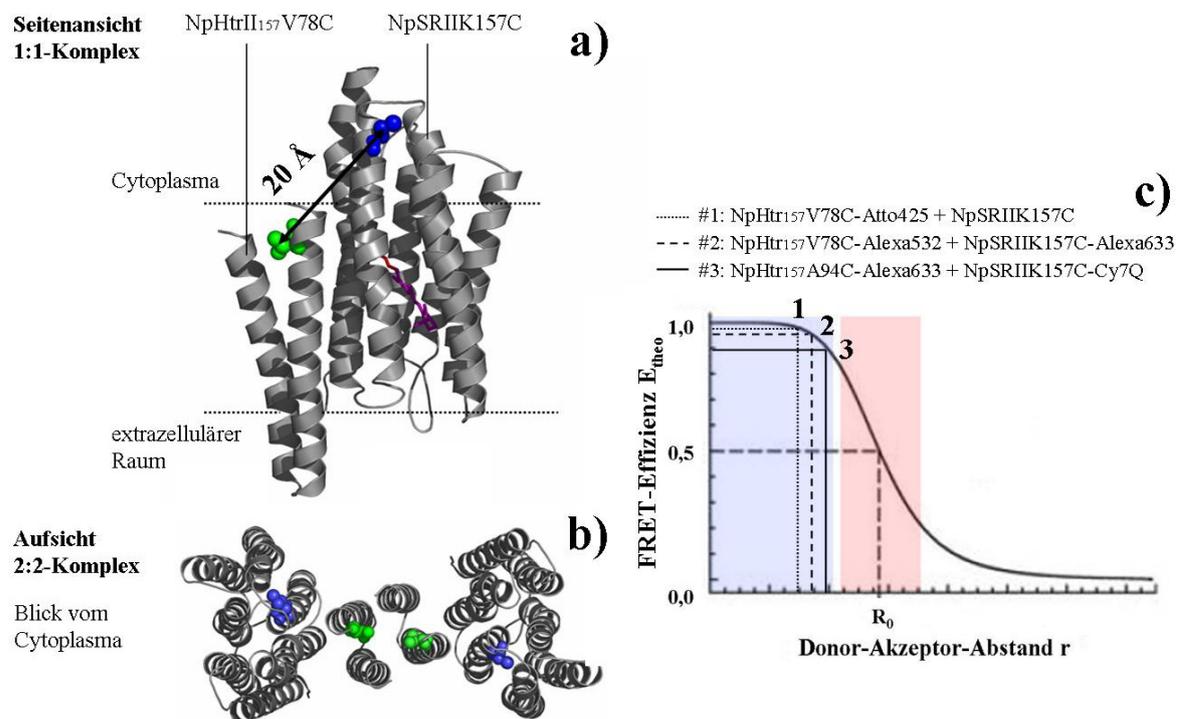
reichend nukleophil. Die in Lysinen und am N-Terminus vorkommenden Amine, die ab pH 7,5 verstärkt mit Maleinimiden reagieren können, sind hier protoniert und unreaktiv. Der unterschiedliche Grad der Markierungen war in der verschiedenen Zugänglichkeit der Cysteinreste begründet. Aminosäurereste, die ins Innere der Proteinstruktur orientiert sind, sind schlechter für die Farbstoffe erreichbar. Besonders für sehr große Farbstoffe ist die Zugänglichkeit dieser Bindungsstellen dadurch häufig eingeschränkt.

3.1.3 Die Wahl der FRET-Paare

Mit den erfolgreichen Fluoreszenzmarkierungen (Tab. 3.2) waren verschiedene FRET-Paare kombinierbar. Die Bindungsstellen der Fluorophore an den Proteinen sind in Abbildung 3.3 gezeigt. Die blauen und grünen Kugelformationen zeigen die Lage der Cysteinmutation am Protein. Durch den Linker, der die Maleinimidgruppe enthielt und den Fluorophor mit dem Protein verband, war der gebundene Farbstoff beweglich und rotierte in der Lösung. Bei Komplexbildung von NpSRII und NpHtrII betrug der räumliche Abstand der beiden Bindungsstellen etwa 20 Å, was bei einer Farbstoffausdehnung von 10 Å zu einem maximalen Donor-Akzeptor-Abstand von etwa 40 Å führte. Der Förster-Radius R_0 der drei eingesetzten FRET-Paare war etwa 1,5-mal größer. Um diejenige Kombination zu ermitteln, die den Försterresonanzenergietransfer am ausgeprägtesten zeigte, wurden drei Paare für FRET-Experimente untersucht. Den

FRET- Donor stellte jeweils der markierte Transducer dar, den FRET-Akzeptor jeweils markiertes sensorisches Rhodopsin II. Diese Richtung des Energietransfers von HtrII zu SRII bot mehrere Vorteile: Zum Einen war für die exakte Berechnung der FRET-Effizienz die genaue Kenntnis des Akzeptor-Markierungsverhältnisses γ_A (Gleichung 2.9) nötig. Im Fall des sensorischen Rhodopsins konnte dies durch eine genauere Proteinkonzentrationsbestimmung anhand der Retinalbande wesentlich zuverlässiger angegeben werden, als für den Transducer. Darüber hinaus konnte das im NpSRII enthaltene Retinal direkt als Akzeptor eingesetzt werden, da es mit Atto 425 ein ausgeprägtes Überlappintegral bildete (Abb. 3.4 a). Dadurch musste das Protein nicht zusätzlich markiert werden (Paar 1). Außerdem wurde auf diese Weise intramolekularer FRET vermieden (Paar 2), den ein mit Alexa Fluor 532 markiertes NpSRII mit seinem eigenen Retinal eingehen würde. Alexa Fluor 532 und der Grundzustand des Retinals bildeten ein ausreichend großes Überlappintegral, das bei Anregung des Farbstoffs zu großem

Abb. 3.3: Lage der Fluorophore am Proteinkomplex a) in der Seitenansicht und b) in der Aufsicht. Die Lage der Lipidmembran ist mit grauen Strichen markiert. Die Kopplungsposition der Fluorophore ist für NpSRIIK157C blau, für NpHtrII157A78C grün dargestellt. Das Retinal ist in der Seitenansicht lila markiert. In c) ist die theoretische FRET-Effizienz und der Donor-Akzeptor-Abstand der drei Farbstoffpaare 1-3 dargestellt. Die Abstände sind so gering, dass E_{theo} in allen Fällen nahe 1 liegt. Damit sind diese Paare für FRET-Experimente gut geeignet.



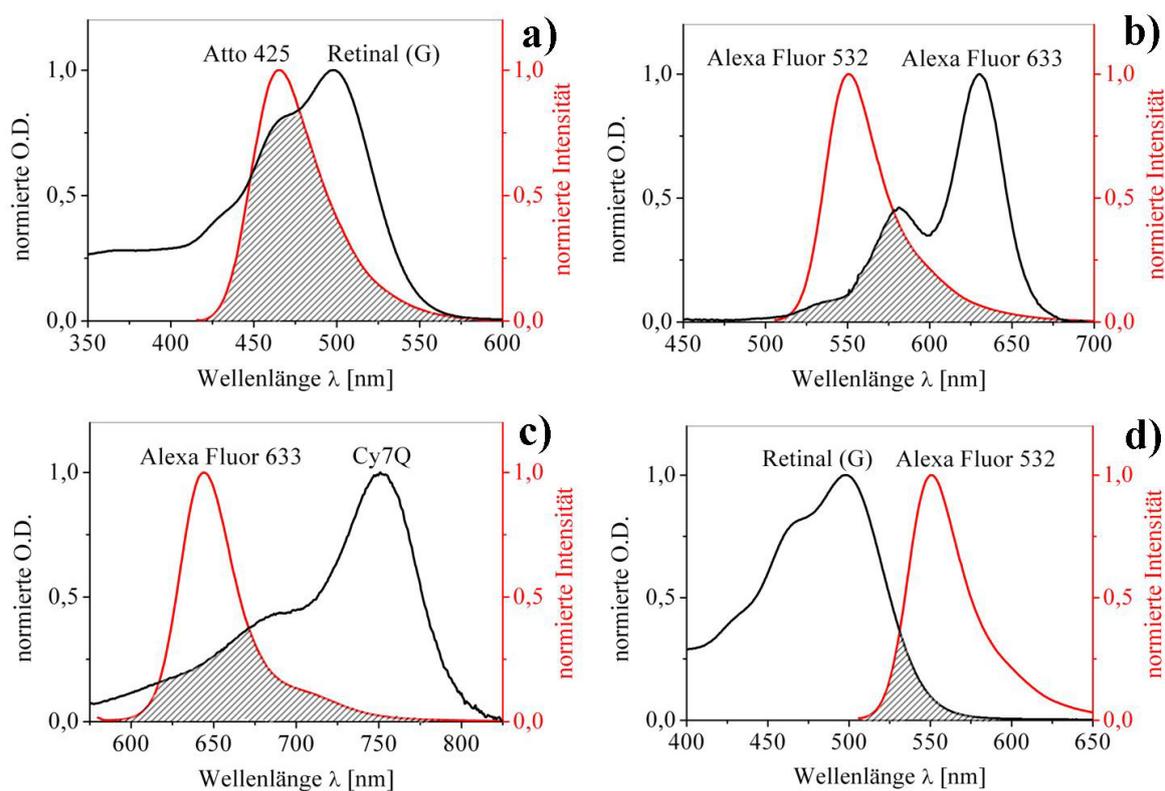


Abb. 3.4: Überlappintegrale (grau) der drei eingesetzten FRET-Paare (a, b, c) und von Alexa Fluor 532 mit dem Grundzustand des Retinals (d).

Energietransfer auf das Retinal führen würde (Abb. 3.4 d). Zunächst wurde für alle Kombinationen die theoretische FRET-Effizienz E_{theo} bestimmt, um die Obergrenze des rechnerisch möglichen Energietransfers zu ermitteln. Je größer dieser Wert war, desto günstiger ist dies für die FRET-Untersuchungen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Die angegebenen Donor-Akzeptor-Abstände konnten aufgrund der großen räumlichen Ausdehnung der Farbstoffe (bis zu 10 Å) und ihrer Beweglichkeit nur mit hohen Toleranzen bestimmt werden. Die gezeigten Werte repräsentierten den größtmöglichen Abstand. Geringere Abstände erhöhten die theoretische FRET-Effizienz. Mit den nach Gleichung 2.7 errechneten Förster-Radien R_0 wurde die theoretische FRET-Effizienz E_{theo} aus Gleichung 2.8 berechnet.

Das erste Paar bildeten NpHtrII_{157V78C}-Atto 425 (Donor) und das Retinal von NpSRIIK157C (Akzeptor). Der Akzeptor für den Energietransfer war in diesem Fall kein Fluorophor sondern der Grundzustand des Retinals. Indem als Akzeptor ein intrinsisches Chromophor und kein gekoppelter Farbstoff gewählt wurde, musste bei diesem Paar nur der Donor fluoreszenzmarkiert werden. Die theoretische FRET-Effizienz E_{theo} lag

| | FRET-Paare | | D-A distance R [Å] | Integral $U(\lambda)$ [M ⁻¹ cm ⁻¹ nm ⁴] | Orientierungs- faktor κ^2 | R_0 [Å] | FRET E_{theo} |
|---|------------|-------------|-------------------------|--|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Donor | Akzeptor | | | | | |
| 1 | Atto 425 | Retinal (G) | 30 | $1,4985 \cdot 10^{15}$ | 1/3 4/3 | 48,2 60,7 | 0,95 0,99 |
| 2 | Alexa 532 | Alexa 633 | 40 | $4,7672 \cdot 10^{15}$ | 2/3 | 65,6 | 0,95 |
| 3 | Alexa 633 | Cy7Q | 40 | $6,0839 \cdot 10^{15}$ | 2/3 | 56,9 | 0,89 |

Tab. 3.3: Bewertung der eingesetzten FRET-Paare.

zwischen 0,95 und 0,99. Das zweite Paar bildeten NpHtrII_{157V78C}-Alexa Fluor 532 (Donor) und NpSRIIK157C-Alexa Fluor 633 (Akzeptor) mit einer theoretischen FRET-Effizienz von 0,95. Das dritte Paar wurde aus dem Donor NpHtrII_{157A94C}-Alexa Fluor 633 und dem Akzeptor NpSRIIK157C-Cy7Q gebildet. Bei diesem Paar wurde der Photozyklus des Retinals von NpSRII weder durch das direkte Anregungslicht ($\lambda = 600$ nm) noch von der Fluoreszenzemission des Alexa Fluor 633 aktiviert. Licht der Wellenlänge $\lambda = 600$ nm wird vom Grundzustand des Retinals nicht mehr absorbiert (Abb. 2.4). Das Retinal befand sich daher während der gesamten Messung im Grundzustand. Obwohl das Überlappintegral zwischen Donor und Akzeptor bei diesem FRET-Paar durch eine lange linke Flanke des Absorptionsspektrums von Cy7Q sehr groß war, betrug E_{theo} nur 0,89. Der Grund dafür war die vergleichsweise geringe Quantenausbeute Φ_D des Donors Alexa Fluor 633 von 0,3 (Tab. 2.1).

Die hohen theoretischen FRET-Effizienzen nahe 1 zeigen, dass Donor und Akzeptor im Falle einer Protein-Protein-Bindung bei allen drei Paaren nahe genug beieinander lagen, um annähernd vollständigen Energietransfer zu zeigen (Abb. 3.3).

3.2 Komplexbildung in Detergenzpuffer

3.2.1 Kontrolle der Proteinkonzentration

Die Berechnungen der FRET-Effizienzen zur Bewertung der Protein-Protein-Wechselwirkungen, wurden mit den Gleichungen 2.9 und 2.10 anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten vorgenommen. Für jede FRET-Messung wurden drei Proben hergestellt, die den Energietransfer quantifizierbar machten. Der erste Ansatz enthielt nur den Donor, der zweite nur den Akzeptor. Der dritte Ansatz war die Mischprobe

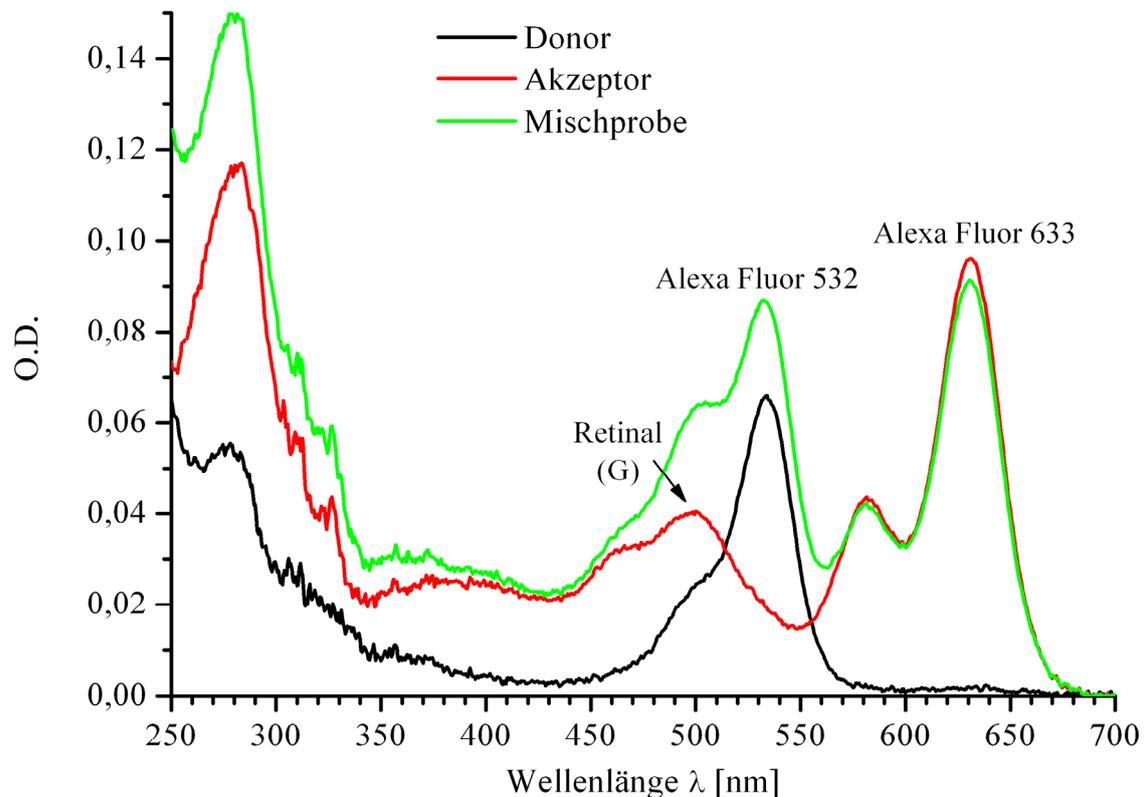


Abb. 3.5: Proteinkonzentrationen der FRET-Proben in Detergenzpuffer, hier am Beispiel von Paar 2: NpHtrII_{157A94C}-Alexa Fluor 532 (Donor) und NpSRIIA_{94C}-Alexa Fluor 633 (Akzeptor). Die Spektren der Donorprobe (schwarz) und der Akzeptorprobe (rot) überlagern sich in der Mischprobe (grün).

aus Donor und Akzeptor, die eigentliche FRET-Probe, in der der Energietransfer zu beobachten war. Zwar wurden die drei Proben bereits bei ihrer Herstellung durch Verdünnen mit Detergenzpuffer auf gleiche Konzentrationen eingestellt. Minimale Schwankungen durch Pipettierfehler, die sich auf die Berechnung der FRET-Effizienz auswirkten, ließen sich jedoch nicht vermeiden. Die Proteinkonzentrationen in den finalen Proben wurden deshalb durch Absorptionsspektroskopie überprüft, und bei Abweichungen die Fluoreszenzintensitäten entsprechend korrigiert.

Die Absorptionsspektren der drei Proben eines FRET-Experiments sind in Abb. 3.5 am Beispiel von NpHtrII_{157A94C}-Alexa Fluor 532 (Donor) und NpSRIIK_{157C}-Alexa Fluor 633 (Akzeptor) dargestellt. Das Absorptionsspektrum des Donors (schwarz) zeigte hauptsächlich das typische Spektrum von Alexa Fluor 532. Da es sich bei dem Akzeptor (rot) um markiertes SRII handelt, war neben dem Peak von Alexa Fluor 633 auch die Retinalbande im Grundzustand (G) enthalten. Die Absorptionsmaxima beider

Fluorophore entsprachen mit $\lambda_{\text{Abs, max}} = 535 \text{ nm}$ für Alexa Fluor 532 und $\lambda_{\text{Abs, max}} = 632 \text{ nm}$ für Alexa Fluor 633 den Werten für gebundenen Farbstoff (Tab. 3.1). Das Spektrum der Mischprobe (grün) bildete sich aus der Überlagerung der beiden Einzelspektren. Es enthielt sowohl die Peaks beider Fluorophore als auch die Bande des Retinals. Bei $\lambda = 632 \text{ nm}$ zeigen die unterschiedlichen optischen Dichten von Akzeptor (rot) und Mischprobe (grün) bereits abweichende Konzentrationen von Alexa Fluor 633 in beiden Proben an. Die Konzentrationen von Donor und Akzeptor wurden mit Hilfe der bekannten molaren Absorptionskoeffizienten ε der Farbstoffe (Tab. 2.1) und unter Berücksichtigung der Markierungsverhältnisse γ berechnet. Vor der Berechnung der Donorkonzentration in der Mischprobe musste allerdings die O.D. des Retinals bei $\lambda = 532 \text{ nm}$ vom Spektrum abgezogen werden. Die erhaltenen tatsächlichen Proteinkonzentrationen wichen geringfügig von den eingestellten Konzentrationen ab. Die Abweichungen wurden als Korrekturfaktoren für die später gemessenen Fluoreszenzintensitäten benutzt.

Die Komplexbildung aus NpSR_{II} und NpHtr_{II} wurde in Detergenzpuffer mit verschiedenen Akzeptor-Donor-Verhältnissen untersucht. Dafür wurde zu einer $1 \mu\text{M}$ konzentrierten Donorlösung stufenweise Akzeptor zugegeben, so dass die Menge enthaltenen Akzeptors im Verhältnis zum Donor anstieg. Während einer solchen Titration wurde nach jeder Zugabe wurde die Änderung der Fluoreszenzemission im Vergleich zur reinen Donorlösung gemessen. Auch hier war für eine exakte Bestimmung der messbaren FRET-Effizienzen eine genaue Kenntnis der Proteinkonzentrationen nötig. Nach jedem Titrationschritt wurde daher während der Equilibrierungszeit von 30 Minuten zusätzlich das Absorptionsspektrum des Ansatzes gemessen und die tatsächliche Konzentration sowie das molare Akzeptor-Donor-Verhältnis bestimmt. Ein Beispiel für eine Folge solcher Absorptionsspektren während einer Titration ist in Abb. 3.6 am Beispiel von NpHtr_{II}_{157A94C}-Alexa Fluor 633 (Donor) und NpSR_{II}_{K157C}-Cy7Q (Akzeptor) dargestellt. In der ersten Titrationsstufe (gelb) lag nur wenig Akzeptor in der Probe vor. Das molare Verhältnis von Akzeptor zu Donor betrug 0,3:1. Das Absorptionsmaximum des Donors Alexa Fluor 633 $\lambda_{\text{Abs, max}} = 632 \text{ nm}$ zeigt die höchste O.D. in diesem Spektrum. Mit zunehmender Akzeptorkonzentration stieg die O.D. des Akzeptors Cy7Q bei $\lambda = 754 \text{ nm}$ immer stärker an und auch die Retinalbande bei $\lambda = 500 \text{ nm}$ wuchs deutlich. Schließlich war der Akzeptor im dreifachen Überschuss zum Donor vorhanden (grün). Durch die ausgeprägte linke Flanke im Absorptionsspektrum des Akzeptors wurde bei steigender Konzentration auch der Donorpeak angehoben. Da Cy7Q zwei Indolgruppen enthält, absorbiert es stark bei $\lambda = 280 \text{ nm}$. Es überlagert sich dort mit der Fluoreszenz des Indolderivates Tryptophan der Proteine. Farbstoff- und

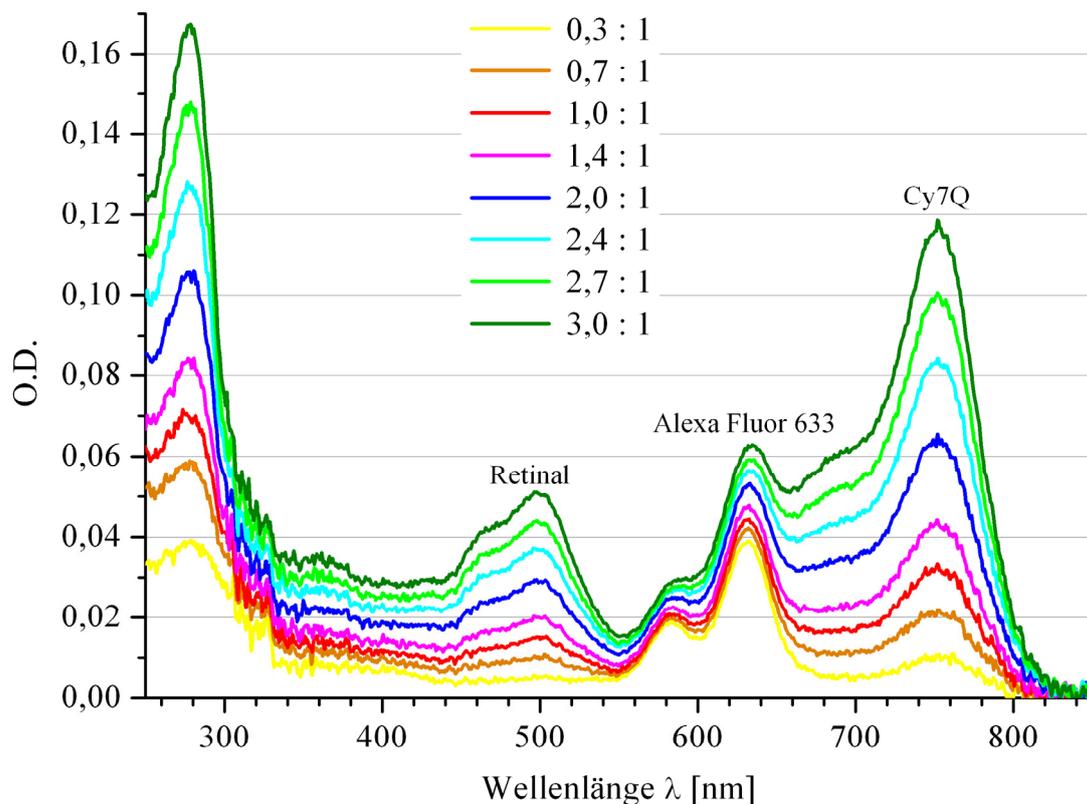


Abb. 3.6: Änderung der Absorptionsspektren bei Zutitration des FRET-Akzeptors, hier am Beispiel von Paar 3: NpHtrII157A94C-Alexa Fluor 633 (Donor) und NpSRIIK157C-Cy7Q (Akzeptor). Die Änderung des Akzeptor-Donor-Verhältnisses von 0,3:1 bis 3,0:1 kann absorptionsspektroskopisch gut verfolgt werden.

Proteinfluoreszenz können bei dieser Wellenlänge nicht unterschieden werden, da Tryptophan ebenfalls ein Indolderivat ist. Mit zunehmender Akzeptorkonzentration steigt daher auch die optische Dichte bei $\lambda = 280$ nm sehr stark an.

3.2.2 Abzug der Direktanregung

Nachdem die Proteinkonzentration der drei FRET-Proben eines Paares (Donor, Akzeptor und Mischprobe) bestimmt worden war, wurden ihre Fluoreszenzemissionsspektren gemessen. Dazu wurden alle drei Proben mit dem Anregungslicht λ_{EX} des Donors bestrahlt. Für Atto 425 betrug $\lambda_{\text{EX}} = 400$ nm, für Alexa Fluor 532 war $\lambda_{\text{EX}} = 500$ nm und für Alexa Fluor 633 lag λ_{EX} bei 570 nm. Die erhaltenen Intensitäten wurden mit den Proteinkonzentrationen aus der Absorptionsspektroskopie auf eine einheitliche Konzentration von $c = 1 \mu\text{M}$ skaliert. Um die tatsächliche Anhebung der Akzeptorintensität durch FRET betrachten zu können, erwies es sich als notwendig,

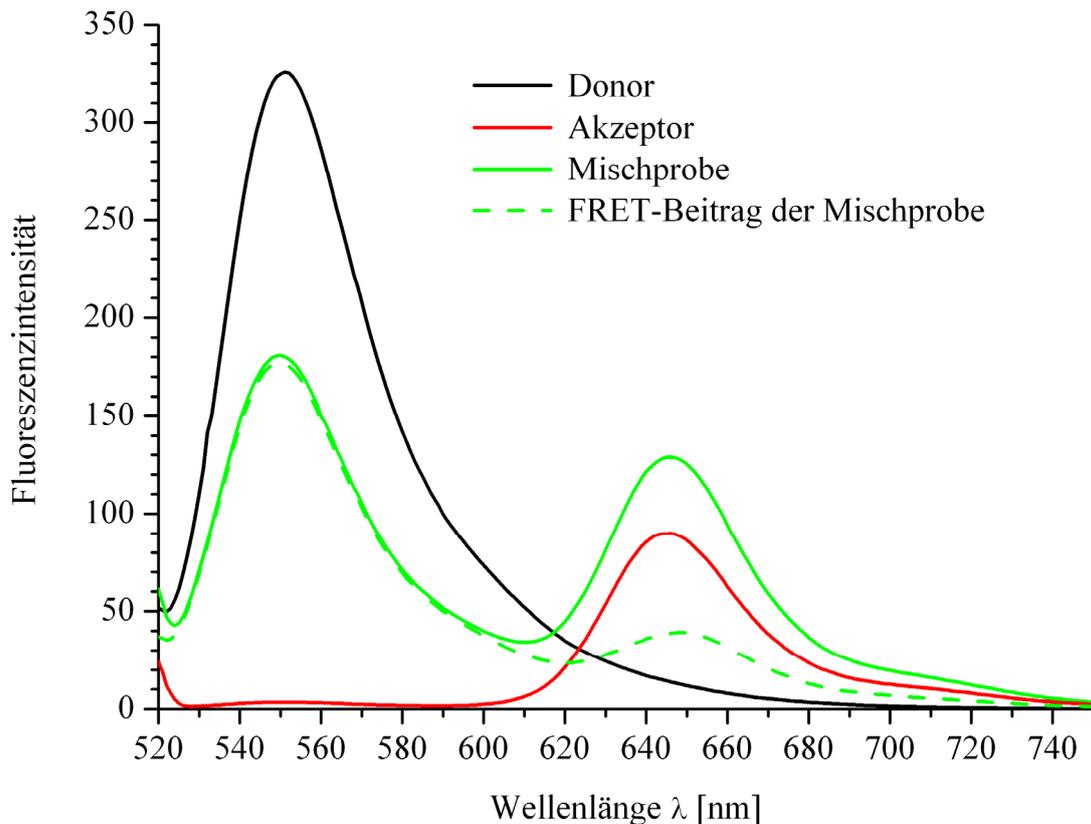


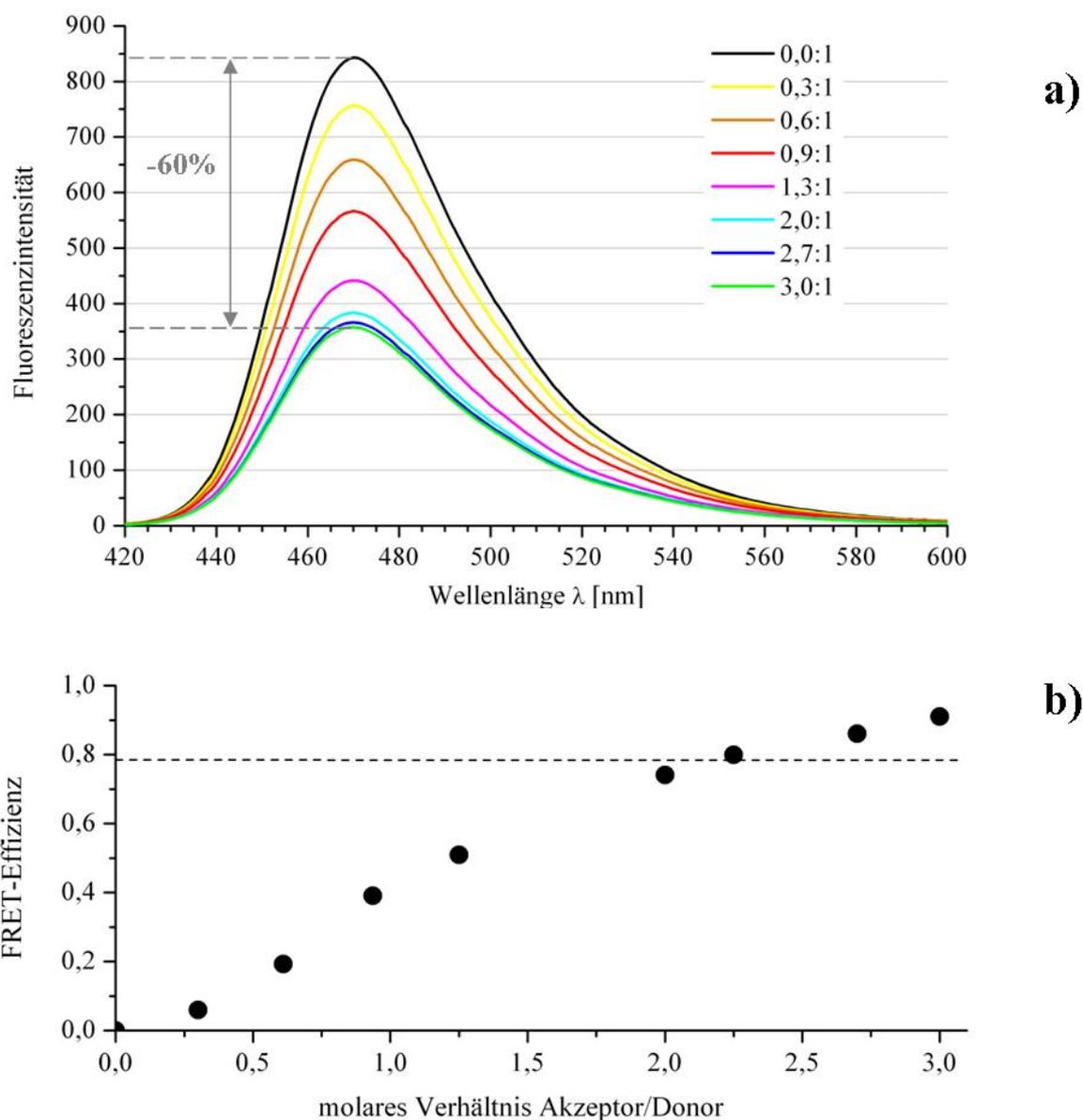
Abb. 3.7: Einfluss der Direktanregung des Akzeptors auf das Emissionsspektrum der Mischprobe am Beispiel von Paar 2. Das Differenzspektrum (grün gestrichelt) zeigt den FRET-Anteil nach Abzug der Akzeptor-Direktanregung.

die Direktanregung des Akzeptors zu bestimmen. Beide Akzeptor-Fluorophore Alexa Fluor 633 und Cy7Q absorbierten bereits Licht ab $\lambda = 500$ nm (vgl. Abb. 2.2) und fluoreszierten daher zum Teil aufgrund des Anregungslichts der Xenonlampe. In Abb. 3.7 ist dies am Beispiel von Paar 2 gezeigt. In der Mischprobe (grüne durchgezogene Linie) wird der Akzeptor Alexa Fluor 633 nicht nur durch FRET vom Donor sondern auch direkt durch das Licht der Xenonlampe angeregt. Das Ausmaß dieser Direktanregung wird durch Messung der Fluoreszenzintensität der reinen Akzeptorprobe (rot) ermittelt. Die Direktanregung kann dann aus dem Spektrum der Mischprobe abgezogen werden. Das Differenzspektrum liefert den tatsächlichen FRET-Beitrag der Mischprobe (grün gestrichelt). Wie stark die Direktanregung des Akzeptors war, wurde auf diese Weise für jedes Paar einzeln bestimmt. Die nachfolgend gezeigten Emissionsspektren sind alle um die Direktanregung korrigiert und zeigen den reinen FRET-Beitrag.

3.2.3 Bestimmung der FRET-Effizienzen in Akzeptortitrationsen

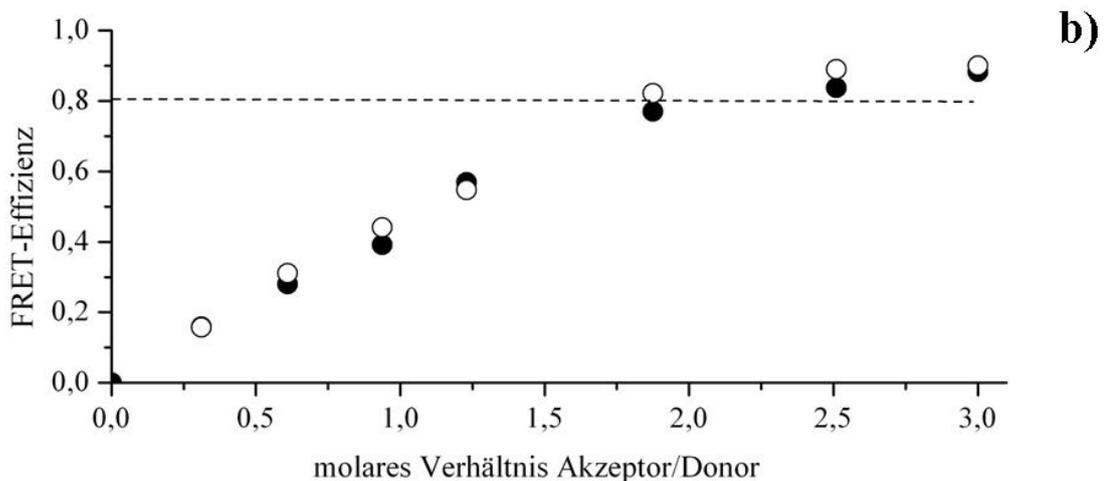
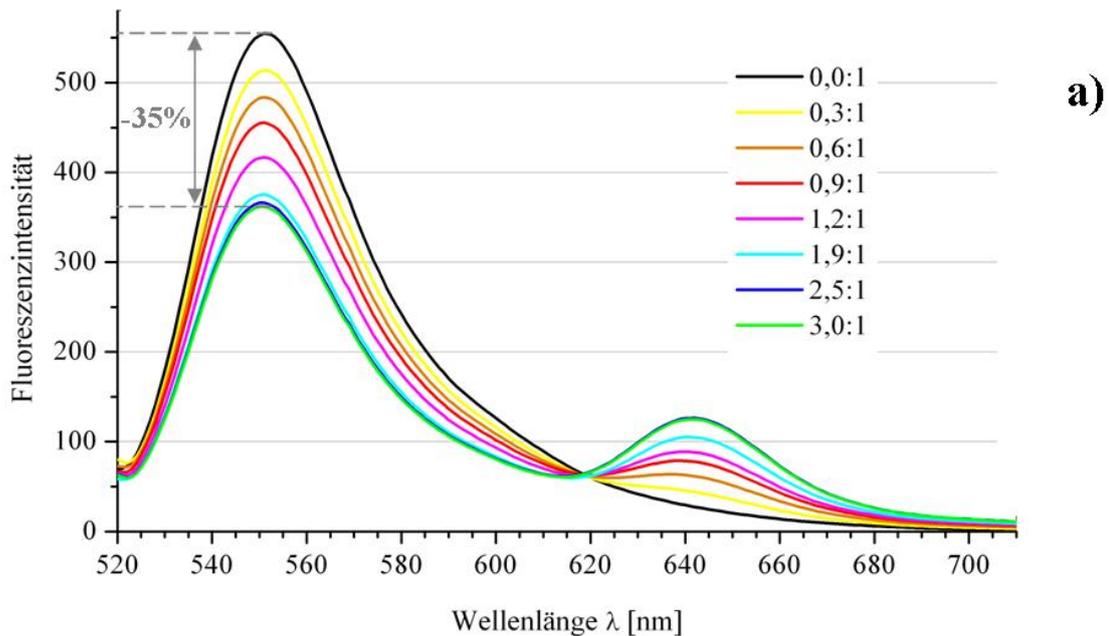
Für jedes der drei eingesetzten FRET-Paare wurden Akzeptortitrationsen durchgeführt, deren Fluoreszenzemissionsspektren in Abb. 3.8 bis 3.10 dargestellt sind. Dazu wurde der Akzeptor stufenweise zu einer Donorlösung gegeben, so dass sich die Konzentration schrittweise erhöhte. Mit Gleichung 2.9 wurden anhand der maximalen Fluoreszenzintensitäten die gemessenen FRET-Effizienzen E_{mess} jeder Stufe bestimmt, und in

Abb. 3.8: Titration von Paar 1 (Akzeptor NpSR1157C zu Donor NpHtr1157V78C-Atto 425). Die Donorintensität nimmt mit steigender Akzeptormenge ab, und ist in der letzten Titrationsstufe um 60 % reduziert.



Abhängigkeit vom molaren Akzeptor-Donor-Verhältnis aufgetragen. Die Abbildungen zeigen jeweils die Spektren der einzelnen Titrationsstufen in a) und die Auftragung von E_{mess} in b). Das schwarze Spektrum beschreibt in allen drei Abbildungen die Fluoreszenz der Donorprobe, ohne Zugabe von Akzeptor. Das Verhältnis von Akzeptor zu Donor ist hier 0,0:1. Die Spektren der unterschiedlichen Akzeptor-Donor-Verhältnisse sind farbig dargestellt, die niedrigste Akzeptorkonzentration gelb, die höchste grün. In den

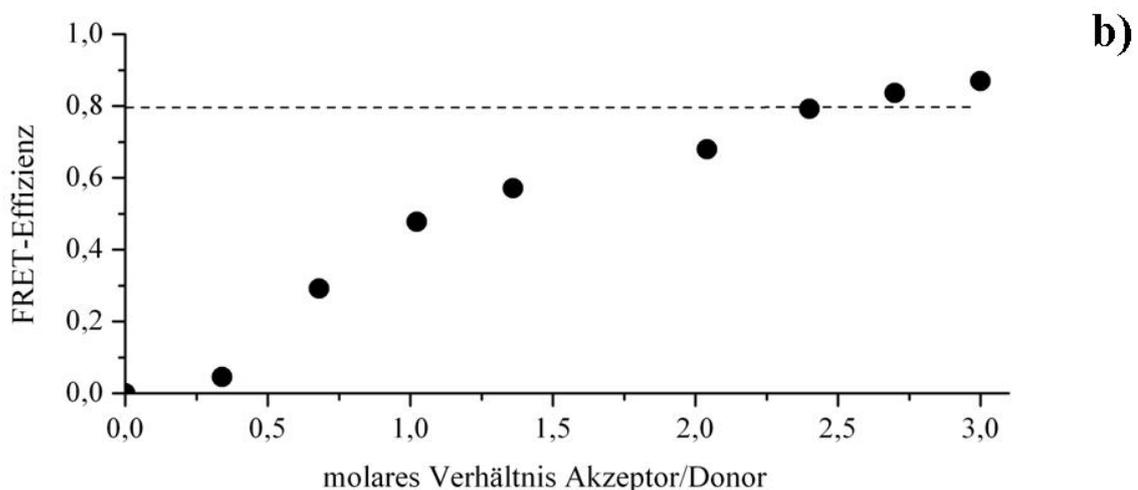
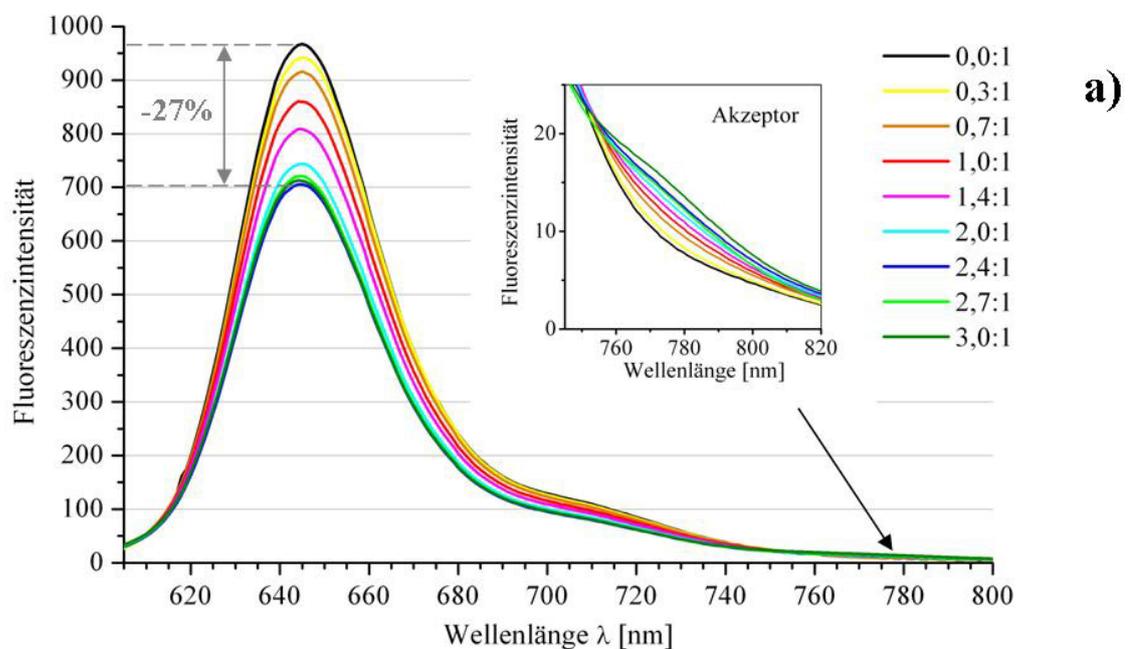
Abb. 3.9: Titration von Paar 2 (Akzeptor NpSRIK157C-Alexa Fluor 633 zu Donor NpHtrII157V78C-Alexa Fluor 532). Die Donorintensität ist bei dreifachem molarem Akzeptorüberschuss um 35 % reduziert.



Abbildungen b) ist die FRET-Effizienz von 0,8 mit einer gestrichelten Linie markiert. Die Konzentration der Donorlösungen betrug zu Titrationsbeginn $c_D = 1 \mu\text{M}$.

Bei zwei FRET-Paaren war ein charakteristischer Abfall der Donorintensität bei gleichzeitiger Zunahme der Akzeptorintensität zu verzeichnen. In Paar 1 mit dem Retinal von NpSR II als Akzeptor (Abb. 3.8) trat keine Fluoreszenzemission des Akzeptors auf, daher äußerte sich der Energietransfer ausschließlich durch die Abnahme der Donor-

Abb. 3.10: Titration von Paar 3 (Akzeptor NpSRIK157C-Alexa Fluor Cy7Q zu Donor NpHtrII157A94C-Alexa Fluor 633). Bei dreifachem molaren Akzeptorüberschuss beträgt die Abschwächung der Donorintensität lediglich 27 %. Dies ist auf ein schlechtes Markierungsverhältnis des Akzeptors zurückzuführen.



intensität. Die allgemeine Form und Lage des Donorspektrums blieb dabei unverändert. Die Zunahme der Akzeptoremission war bei Paar 2 mit Alexa Fluor 532 als Donor und Alexa Fluor 633 als Akzeptor besonders ausgeprägt (Abb. 3.9). Die vergleichsweise schwache Fluoreszenzintensität von Cy7Q im dritten Paar (Abb. 3.10) wurde vor allem durch die Farbstoffeigenschaften bedingt. Der im Farbstoffmolekül enthaltene 1,3-Dinitrobenzolrest führte dazu, dass der Farbstoff hauptsächlich als Fluoreszenzlöscher wirkte und selbst nur sehr schwach emittierte. Der maximale Abfall der Donorintensität war in den drei FRET-Paaren unterschiedlich stark ausgeprägt. Im ersten Paar (Abb. 3.8) war er mit 60 % am größten, beim dritten Paar (Abb. 3.10) mit 27 % am schwächsten. Der Grund hierfür lag in den unterschiedlichen Akzeptor-Markierungsverhältnissen. Der Anteil unmarkierten Akzeptors schwächte bei Wechselwirkung mit dem Donor NpHtrII dessen Fluoreszenzintensität nicht ab, obwohl eine Bindung vorlag. Je mehr Akzeptormoleküle markiert sind, desto stärker sinkt die Donorintensität. Bei keinem der drei FRET-Paare konnte ein vollständiger Abfall der Donorintensität beobachtet werden, was darauf zurückzuführen war, dass die Akzeptoren nie vollständig markiert waren (Tab. 3.2).

Ein Vergleich der FRET-Effizienzen aller drei Titrationsexperimente zeigte kaum signifikante Unterschiede zwischen den eingesetzten Paaren. Die Rezeptor-Transducer-Bindung war in allen drei Kombinationen deutlich zu beobachten. Auch die beiden FRET-Paare, die keine oder nur wenig Akzeptoremission zeigten, eigneten sich gut für die Bindungsstudie. Die Aktivierung des Photozyklus durch Donorfluoreszenz bei Paar 1 oder direktes Anregungslicht bei Paar 2 beeinträchtigte die Komplexbildung nicht. Die FRET-Effizienzen dieser beiden Paare unterschieden sich kaum von denen des Paares 3, bei dem es nicht zu einer Anregung des Retinals kam. In allen drei Paaren konnte eine starke Abhängigkeit der gemessenen FRET-Effizienz von der Akzeptorkonzentration beobachtet werden, die in Tabelle 3.4 zusammengefasst ist.

Die angegebenen FRET-Effizienzen wurden anhand der Graphen 3.8 bis 3.10 durch Interpolation ermittelt. Die FRET-Effizienz stieg auch dann noch deutlich an, wenn der Akzeptor bereits im Überschuss vorlag, und erreichte erst dann eine Sättigung, wenn etwa doppelt so viel Akzeptor wie Donor in der Probe vorhanden war. Für das zweite Paar mit Alexa Fluor 532 als Donor und Alexa Fluor 633 als Akzeptor wurde die FRET-Effizienz auch ratiometrisch durch Gleichung 2.10 bestimmt (weiße Symbole). Unter Berücksichtigung der Fehlertoleranz stimmten sie gut mit den FRET-Effizienzen überein, die aus den Donorintensitäten nach Gleichung 2.9 berechnet wurden. Die Daten zeigen, dass die Rezeptor-Transducer-Bindung stark von dem stöchiometrischen Verhältnis der beiden Proteine abhängt. Bei doppeltem Überschuss an Akzeptormolekülen betrug die

| | FRET-Paare | | Molares Verhältnis von Akzeptor : Donor | | | | |
|---|------------|-------------|---|------|-------|------|------|
| | Donor | Akzeptor | 0,5:1 | 1:1 | 1,5:1 | 2:1 | 3:1 |
| 1 | Atto 425 | Retinal (G) | 0,16 | 0,41 | 0,60 | 0,75 | 0,92 |
| 2 | Alexa 532 | Alexa 633 | 0,23 | 0,45 | 0,66 | 0,80 | 0,88 |
| 3 | Alexa 633 | Cy7Q | 0,16 | 0,44 | 0,61 | 0,72 | 0,87 |

Tab. 3.4: FRET-Effizienzen E_{mess} der drei untersuchten Paare in Abhängigkeit von unterschiedlichen Akzeptor-Donor-Verhältnissen. Die Konzentration des Donors betrug in allen Titrationen $c_D = 1 \mu M$.

FRET-Effizienz ca. 0,8, d.h. es waren etwa 80 % aller Transducermoleküle an ein sensorisches Rhodopsin gebunden. Dieser Wert wird bei einer K_D von 200 nM bereits mit einem Akzeptor-Donor-Verhältnis von 1:1 erreicht. In den Abbildungen 3.8 b) – 3.10 b) ist er in Form einer gestrichelten Linie dargestellt. In Tabelle 3.4 sind die gemessenen FRET-Effizienzen der drei untersuchten Paare in Abhängigkeit vom Akzeptor-Donor-Verhältnis dargestellt. Alle drei Paare zeigten einen ähnlichen Verlauf: War das Verhältnis 1:1, d.h. Donor und Akzeptor in gleicher Konzentration vorhanden, lag E_{mess} zwischen 0,41 und 0,45. Bei einer 1:1-Stöchiometrie war also weniger als die Hälfte aller Transducermoleküle an ein sensorisches Rhodopsin gebunden. Wurde die Konzentration des Akzeptors erhöht, so dass er im zweifachen Überschuss vorlag, erreichte E_{mess} Werte von 0,72 bis 0,80. Bei dreifachem Überschuss des Akzeptors änderte sich die Effizienz nur noch geringfügig und betrug dann 0,87 bis 0,92. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu vorangegangenen Studien, in denen die FRET-Effizienz bei $4 \mu M$ Proteinkonzentration bereits für eine 1:1-Stöchiometrie von Donor und Akzeptor einen Maximalwert erreicht (Yang, 2004; Taniguchi, 2007). Daher wurde zunächst die Konzentrationsabhängigkeit der Wechselwirkung von HtrII mit SRII getestet, indem die Donorkonzentration c_D von bisher $1 \mu M$ auf $4 \mu M$ erhöht wurde. Das Ergebnis ist am Beispiel von Paar 1 in Abb. 3.11 dargestellt. Auch bei höherer Donorkonzentration war mit einem molaren Akzeptor-Donor-Verhältnis von 1:1 die maximale FRET-Effizienz noch nicht erreicht. Lag der Akzeptor in doppeltem Überschuss vor, stieg auch hier die FRET-Effizienz deutlich an. Die FRET-Effizienzen zeigten bei einem molaren Akzeptor-Donor-Verhältnis von 1:1 immer noch keine Sättigung. Die Konzentrationsabhängigkeit konnte daher als Ursache für die im Vergleich zur Literatur abweichenden FRET-Effizienzen ausgeschlossen werden.

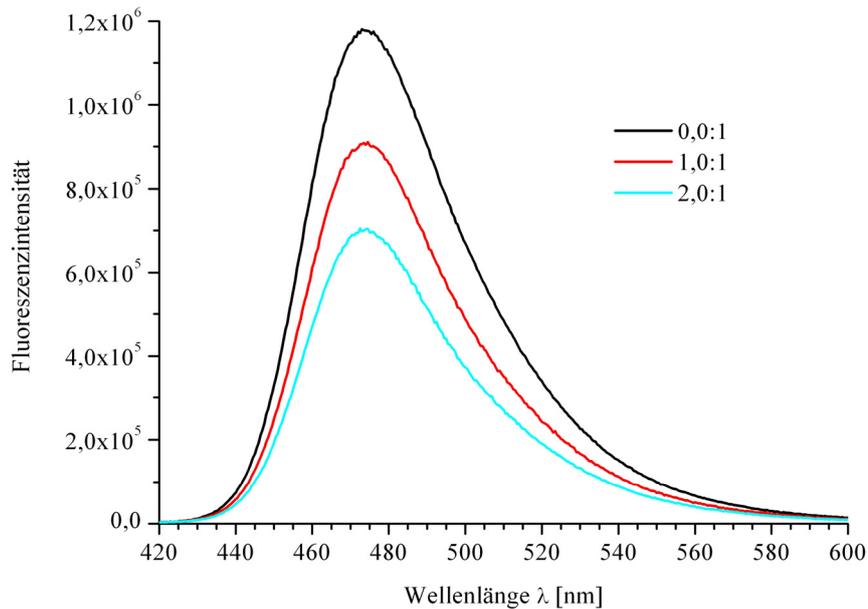
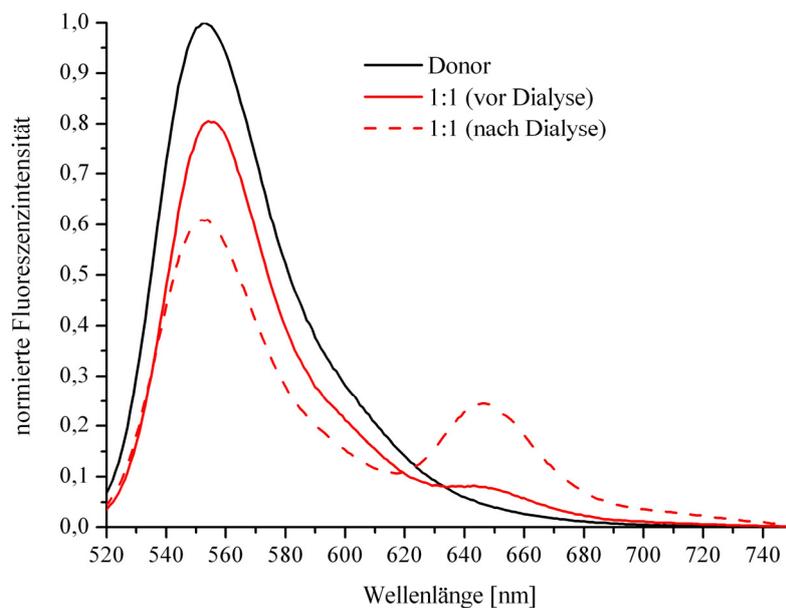


Abb. 3.11: FRET bei erhöhter Donorkonzentration von $c_D = 4 \mu\text{M}$ am Beispiel von Paar 1 (Akzeptor NpSR1157C zu Donor NpHtrII157V78C-Atto 425).

Als weitere mögliche Ursache wurde daraufhin die Erhöhung der Detergenzkonzentration durch Aufkonzentrieren der Proben in der Reinigung überprüft. Die Zunahme der Zahl leerer Detergenzmizellen in der Lösung senkt die Kollisionswahrscheinlichkeit mit Mizellen, die Proteine enthalten und verringert so die FRET-Effizienz. Die tatsächliche

Abb. 3.12: FRET nach Dialyse am Beispiel von Paar 2 (Akzeptor NpSRIK157C-Alexa Fluor 633 zu Donor NpHtrII157V78C-Alexa Fluor 532).



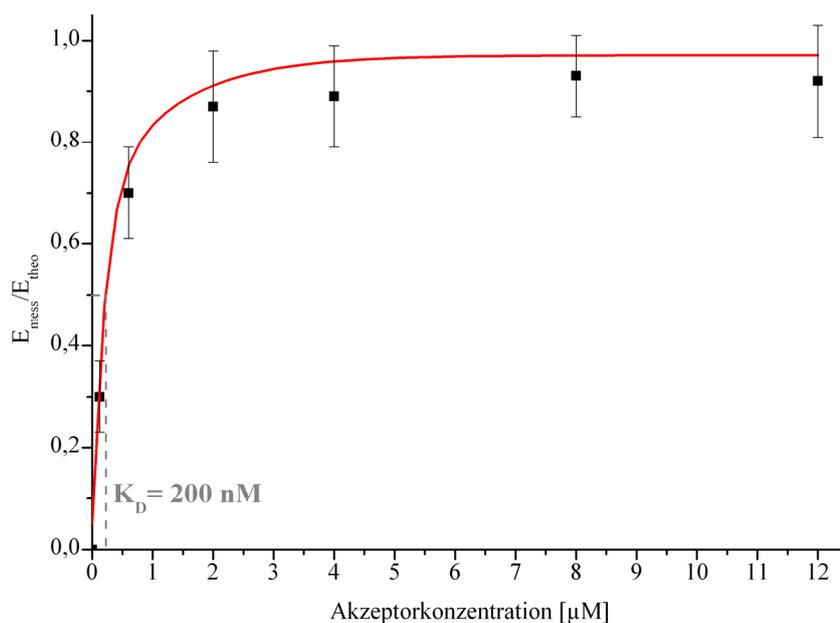


Abb. 3.13: Auftragung der FRET-Effizienz in Abhängigkeit des molaren Akzeptor-Donor-Verhältnisses. Die Datenpunkte bestätigen die Dissoziationskonstante $K_D \sim 200 \text{ nM}$ aus vorangegangenen Studien (rot).

Detergenzkonzentration der aufkonzentrierten Proben konnte analytisch nicht bestimmt werden. Um diese These zu überprüfen, wurden daher die gereinigten Proben für 16 Stunden gegen Standardpuffer mit 0,05 % DDM dialysiert. Die dialysierten Proben zeigten höhere FRET-Effizienzen als die Proben in undialysiertem Zustand (Abb. 3.12). Sie erreichten die maximale FRET-Effizienz bereits bei geringerer Akzeptorkonzentration. Tatsächlich änderte sich die FRET-Effizienz in diesen Proben nicht mehr, wenn der Akzeptor im Überschuss vorlag. Bei einem molaren Akzeptor-Donor-Verhältnis von 1:1 betrug $E_{\text{mess}} = 0,76 - 0,91$ (Tab. 3.5), bei 3:1 lag E_{mess} bei $0,75 - 0,92$.

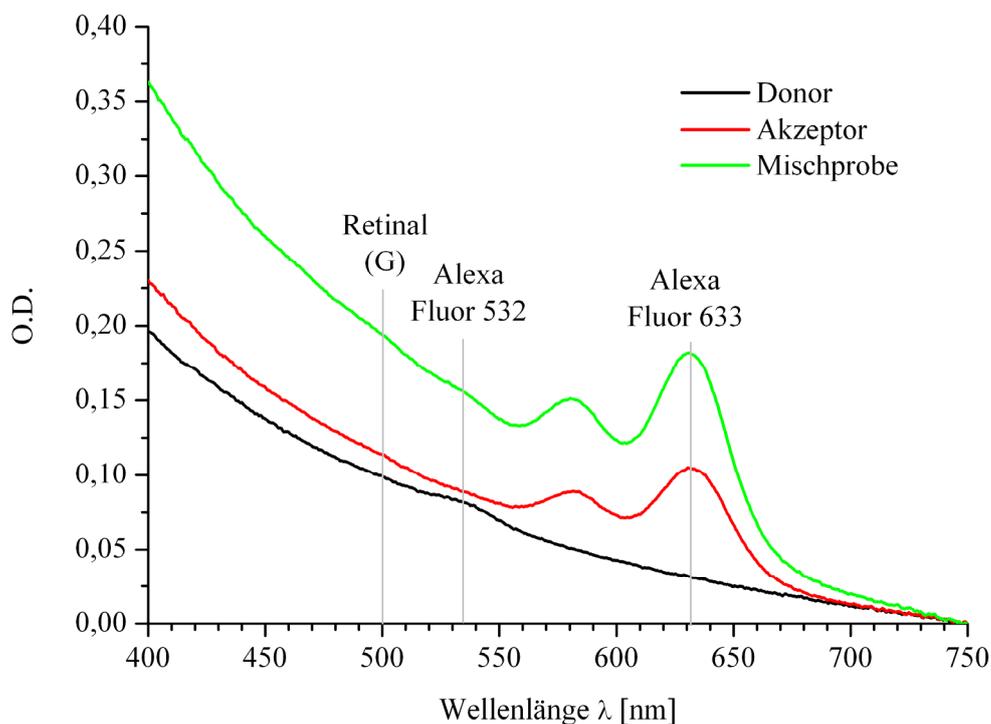
Die in dialysierten Detergenzproben gemessenen FRET-Effizienzen sind in Abb. 3.13 gezeigt. Auch hier wurden verschiedene molare Akzeptor-Donor-Verhältnisse eingestellt, wobei die Donorkonzentration $c_D = 4 \mu\text{M}$ betrug. Die Messung wurde jeweils dreimal wiederholt. Bereits ab einem molaren Akzeptor-Donor-Verhältnis von 1:1 war der Anteil von NpSR_{II}/NpHtr_{II}-Komplexen konstant. Die gemessene FRET-Effizienz E_{mess} betrug dann $0,79 - 0,96$. Wurde Akzeptor im Überschuss zugegeben, so erhöhte das die Bindungseffizienz nicht mehr. Die Datenpunkte wurden mit dem Fit (rot) aus vorangegangenen Studien für Dissoziationskonstante $K_D \sim 200 \text{ nM}$ angepasst. Der Fit beschreibt im Rahmen der Fehler gut den Verlauf der Datenpunkte. Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte daher die bereits mit ITC ermittelte Dissoziationskonstante für die Bindung des sensorischen Rhodopsin II und seines Transducers in FRET-Messungen bestätigt werden (Hippler-Mreyen, 2003).

3.3 Komplexbildung in Lipidmembranen

3.3.1 Kontrolle der Proteinkonzentration

Nachdem die FRET-Effizienz in Detergenzpuffer ermittelt worden war, wurde sie auch in Lipidmembranen gemessen, um anschließend den Unterschied der Proteinbindung in diesen beiden Umgebungen quantifizieren zu können. Dazu wurde das zweite FRET-Paar (NpHtrII_{157V78C}-Alexa Fluor 532 als Donor und NpSRIIK157C-Alexa Fluor 633 als Akzeptor) in Protein-Lipid-Verhältnissen von 1:2.000 und 1:4.000 (mol/mol) in LUV (Large Unilamellar Vesicles) rekonstituiert. Dieses Paar wurde wegen seiner guten Akzeptoremission und der günstigen Markierungsverhältnisse γ von Donor und Akzeptor gewählt. Ein weiterer Vorteil lag in den hohen molaren Absorptionskoeffizienten ϵ_{\max} der gebundenen Farbstoffe (Tab. 2.1). Aufgrund dieser Eigenschaften zeigte es auch nach Rekonstituierung auch bei einem Protein-Lipid-Verhältnis von 1:4.000 (mol/mol) noch ausreichend hohe Absorptionsbanden, um die Proteinkonzentration bestimmen zu können (Abb. 3.14). Die exakte Konzentrationsbestimmung der Proteine in Proteoliposomen war

Abb. 3.14: Absorptionsspektren der drei FRET-Proben nach der Rekonstituierung in Lipidvesikel (LUV) am Beispiel von Paar 2 (Akzeptor NpSRIIK157C-Alexa Fluor 633 zu Donor NpHtrII_{157V78C}-Alexa Fluor 532). Der starke Anstieg der O.D. bei kleinen Wellenlängen resultiert aus dem Streulicht der Lipidvesikel.

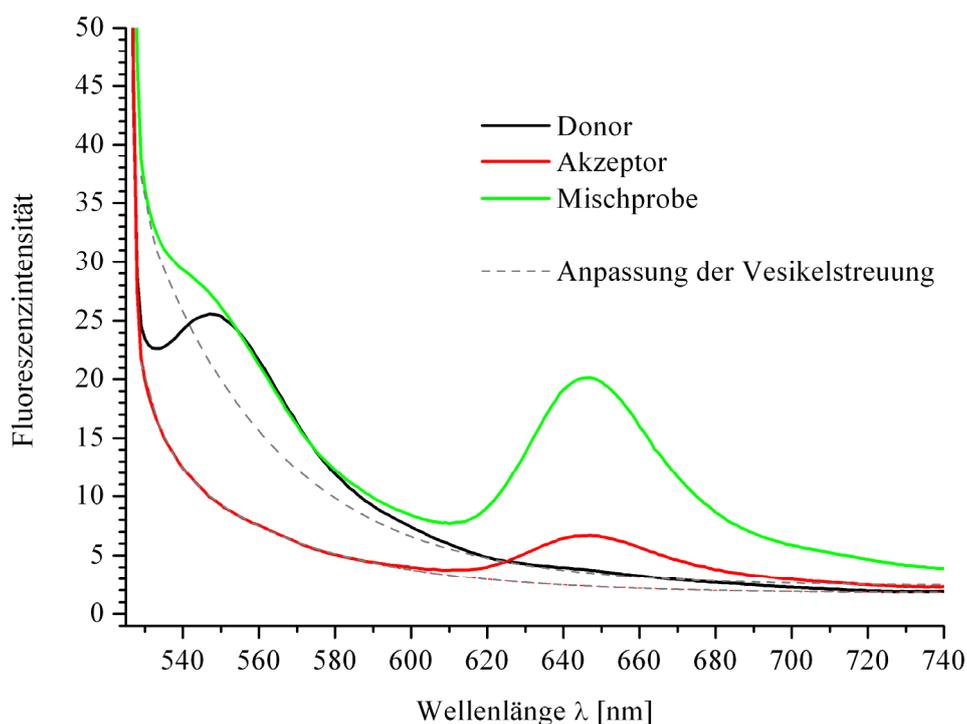


besonders wichtig, da während der Rekonstituierung ca. 20 – 40 % der markierten Proteine verloren gingen. Die Streuung des Anregungslichts verursachte eine starke Zunahme der O.D. bei kleinen Wellenlängen. Das Signal-Rausch-Verhältnis war damit im Vergleich zu Proteinkonzentrationsbestimmungen in Detergenzpuffer (Abb. 3.5) schlechter und nur bei Paar 2 ausreichend für eine zuverlässige Ermittlung der Farbstoffabsorption. Nach der Rekonstituierung der anderen beiden Paare waren die resultierenden Absorptionsbanden zu schwach ausgeprägt, um die Proteinkonzentration zuverlässig bestimmen zu können. Deshalb wurden keine weiteren Untersuchungen an Paar 1 und 3 in Lipidmembranen vorgenommen. Die aus den Absorptionsspektren berechneten Konzentrationen wurden wie bei den Messungen in Detergenz verwendet, um die gemessenen Fluoreszenzintensitäten einer gemeinsamen Konzentration entsprechend anzupassen.

3.3.2 Abzug der Direktanregung

Wie bei FRET-Messungen des Bindungsverhaltens in Detergenzpuffer (Abb. 3.6) wurde zunächst der Anteil der Akzeptor-Direktanregung durch die Xenonlampe bestimmt und vom Spektrum der Mischprobe abgezogen. Da die Proteoliposomenlösung eine hohe

Abb. 3.15: Fluoreszenzemissionsspektren der drei FRET-Proben von Paar 2 in Lipidvesikeln. Für die Spektren wurde der Streuhintergrund individuell angepasst (graue gestrichelte Linie).



Konzentration von Lipidvesikeln enthielt, war auch das resultierende Streulicht bei Wellenlängen $\lambda < 600$ nm erheblich. In Abbildung 3.15 ist dies für Paar 2 mit dem Donor NpHtrII₁₅₇V78C-Alexa Fluor 532 und dem Akzeptor NpSRIIK157C-Alexa Fluor 633 gezeigt. In den Fluoreszenzspektren zeigte sich das Streulicht als Erhöhung der Intensitäten sowohl im Donor- und Akzeptorspektrum (schwarz bzw. rot), als auch im Spektrum der Mischprobe (grün). Diese Hintergrundstreuung wurde nach Messung des Probenspektrums mit einem exponentiellen Abfall angepasst und von den Messdaten abgezogen.

3.3.3 Bestimmung der FRET-Effizienzen

Aus der Bildung der Differenzspektren von Messdaten und Streuung und nach Abzug der Akzeptor-Direktanregung resultierten die Emissionsspektren von Donor- und Mischprobe (Abb. 3.16). Sie hatten dieselbe Form wie bei Messung in Detergenzpuffern, allerdings war die Akzeptorintensität in Lipidmembranen stärker ausgeprägt. Als Ursache hierfür ist eine umgebungsbedingte Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors möglich. Daher wurde E_{mess} ausschließlich ohne Zuhilfenahme der Akzeptorintensität nach Gleichung 2.9 ermittelt.

Bei einem molaren Protein-Lipid-Verhältnis von 1:2.000 und einem Akzeptor-Donor-Verhältnis von 1:1 lag E_{mess} bei 0,79 - 0,94. Unter diesen Bedingungen war der Försterresonanzenergietransfer daher nahezu vollständig und annähernd alle Rezeptor-Transducer-Paare gebildet. Auch bei weiterer Verdünnung der Proteine zu molaren Protein-Lipid-Verhältnissen von 1:4.000 betrug die gemessene FRET-Effizienz 0,83 – 0,93. Damit war auch bei dieser Proteinkonzentration die vollständige Bindung aller NpSRII/NpHtrII-Komplexe in Lipiddoppelschichten aus POPC zu beobachten. Mit zunehmender Proteinverdünnung erreichte die Aussagefähigkeit der FRET-Messungen eine Grenze. Der Grund dafür lag in der schwächeren Absorption bei gleichzeitiger Zunahme der Vesikelstreuung. Die Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses führte zu einer ungenaueren Proteinkonzentrationsbestimmung. Bei den niedrigsten gemessenen Protein-Lipid-Verhältnissen von 1:8.000 (mol/mol) war die Konzentration nur noch fehlerbehaftet zu bestimmen. Im Rahmen der erhöhten Toleranzen konnten aber auch bei dieser starken Verdünnung gleichbleibende FRET-Effizienzen abgeschätzt werden. Die FRET-Messungen in Lipidmembranen wiesen somit auch bei den kleinsten Proteinkonzentrationen noch die vollständige NpSRII/NpHtrII-Komplexbildung auf. Die Abschätzung einer Dissoziationskonstante K_D war für die Bindung in Lipidmembranen nicht möglich, da selbst bei niedrigsten Proteinkonzentrationen im Rahmen des Fehlers noch vollständige Bindung vorlag.

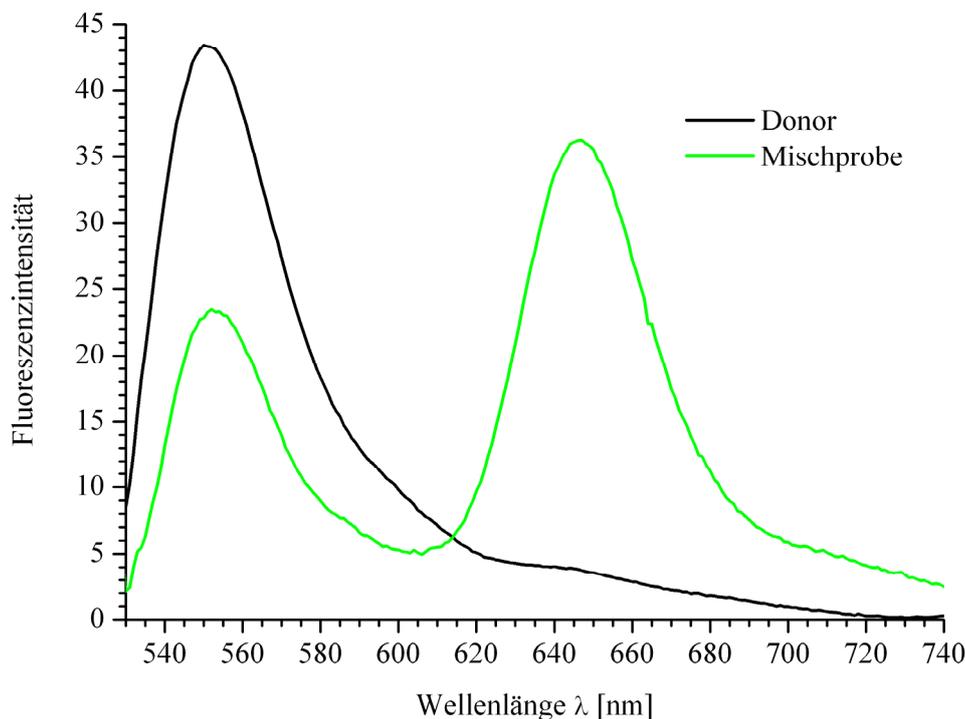


Abb. 3.16: Differenzspektren aus Abb. 3.15. Nach Abzug von Vesikelstreuung und Akzeptor-Direktanregung ähnelt die Form der dargestellten Spektren aus Lipidumgebung denen aus Detergenzumgebung. Die Akzeptoremission ist deutlich stärker ausgeprägt als bei FRET-Messungen in Detergenzpuffer.

3.4 Vergleich der Bindungsaffinitäten in Detergenzpuffer und in Lipidmembranen

Da detailliertes Wissen über die Stärke der NpHtrII/NpSRII-Komplexbildung in Detergenzpuffer aus der Literatur bekannt war, wurde zunächst diese Wechselwirkung studiert, um den methodischen Ansatz zu bewerten. Wie in Abb. 3.13 gezeigt, waren die gemessenen FRET-Effizienzen gut mit der K_D von etwa 200 nM zu beschreiben. Diese wurde in früheren Experimenten mit isothermer Titrationskalorimetrie ermittelt (Hippler-Mreyen, 2003).

Künstlich hergestellte Lipidmembranen, wie die in der vorliegenden Studie verwendeten Vesikel aus POPC, entsprechen der natürlichen Proteinumgebung besser als Detergenzmizellen. Sie bringen die Proteine in eine zweidimensionale Matrix und verändern auf diese Weise die Interaktionen der Moleküle. Phosphoglycerolipide wie

POPC kommen der physiologischen Umgebung von NpSR_{II} und NpHtr_{II} sehr nahe. Im Ursprungsorganismus *Natronobacterium pharaonis* besteht die Zellmembran aus Fettsäurediethern, die hauptsächlich Phosphatidylglycerol (PG) als Kopfgruppe tragen (Rodriguez-Valera, 2002). Die Betrachtung des Bindungsverhaltens in künstlichen Lipidmembranen lässt daher Rückschlüsse auf die Anordnung von NpSR_{II} und NpHtr_{II} im biologischen System zu. Die FRET-Effizienzen E_{mess} aus Messungen in Detergenzpuffer und Lipidmembranen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Ein Vergleich der Komplexbildungen in diesen beiden Proteinumgebungen erfordert folgende Betrachtungen:

1. Die Proteinkonzentrationen müssen in beiden Umgebungen so niedrig sein, dass die mittleren Abstände der Proteine $\langle \Delta r \rangle$, d. h. der Abstand zum nächsten Nachbar, wesentlich größer als der Förster-Radius sind. Dieser beträgt je nach Paar 50-60 Å (Tab. 3.3). Wird dieser Abstand unterschritten, repräsentieren die FRET-Ergebnisse nicht allein die Protein-Protein-Wechselwirkung. FRET kann dann auch durch die erzwungene räumliche Nähe von Donor und Akzeptor auftreten (You, 2005). Um die Zustände in Detergenzpuffer mit denen in Lipidmembranen vergleichen zu können, wurden die mittleren Abstände berechnet. Die verwendeten LUV hatten einen Radius von durchschnittlich 70 nm und eine Oberfläche von $6.160.000 \text{ \AA}^2$. Mit den Annahmen, dass die Kopfgruppe eines Lipidmoleküls 72 \AA^2 beträgt (Luzzati, 1986), enthielt ein Vesikel etwa 170.000 Lipide. Bei gleichmäßiger Verteilung der Proteine auf die LUV lagen bei Protein-Lipid-Verhältnissen von 1:2.000, 1:4.000 und 1:8.000 etwa 84, 42 bzw. 21 Proteine pro Vesikel vor. Damit betragen die mittleren Abstände zwischen den Proteinmolekülen 270 Å, 380 Å und 540 Å. Für Proteine in Detergenzpuffer wurde der mittlere Abstand aus der Konzentration berechnet. Dazu wird die Konzentration mit der Avogadro-Zahl N_a in die Partikelzahl pro Volumen umgerechnet und daraus die dritte Wurzel gebildet. Die höchste Proteinkonzentration in Detergenzpuffer führt zu einem mittleren Abstand von 450 Å und liegt damit fast eine Größenordnung über dem Förster-Radius. Diese Konzentration kann also für FRET-Untersuchungen ohne Korrekturen genutzt werden. In Lipidmembranen, die die Bewegung der Proteine in eine zweidimensionale Ebene einschränken, ist die absolute Proteinkonzentration in Lösung kein direktes Maß für den mittleren Abstand. Stattdessen muss die Proteinkonzentration mit der Konzentration der Lipide verglichen werden, um das molare Protein-Lipid-Verhältnis zu bestimmen, das zum mittleren Abstand führt. Liegt beispielsweise ein Mikromol Protein zu 2.000 Mikromol Lipid vor, beträgt der mittlere Abstand 270 Å und ist damit etwa fünfmal größer als der Förster-Radius. In den vorliegenden Experimenten wurde folglich der

| Umgebung | Donorkonzentration c [μM] | FRET-Effizienz E_{mess} |
|------------------------------------|--|----------------------------------|
| Detergenzpuffer | 0,8 – 1,3 | 0,76 – 0,91 |
| | 3,7 – 4,4 | 0,79 – 0,96 |
| Lipidmembranen, 1:2.000 1:4.000 | 0,5 – 1,5 | 0,79 – 0,94 |
| | 0,6 – 1,5 | 0,83 – 0,93 |

Tab. 3.5: Übersicht der gemessenen FRET-Effizienzen für verschiedene Protein-umgebungen. Alle Werte gelten für molare Akzeptor-Donor-Verhältnisse = 1:1.

beobachtete FRET ausschließlich durch echte intermolekulare Proteinbindung hervorgerufen.

- Bei der Überführung von Detergenz in Lipidmembranen werden die Proteine aus einem Volumen (3D-Raum) auf eine Ebene (2D-Raum) reduziert. Das führt zu einer Verringerung des mittleren Abstandes zwischen den einzelnen Molekülen. Für einen Vergleich der Stärke der Proteinwechselwirkung in Detergenz und Lipid müssen die Kollisionsfrequenzen ν verglichen werden, die umgekehrt proportional zur Diffusionszeit τ sind. Die Berechnung erfolgt mit

$$\nu \propto \frac{1}{\tau} = \frac{6D_{3D}}{\langle \Delta r \rangle^2} \quad \text{bzw.} \quad \nu \propto \frac{1}{\tau} = \frac{4D_{2D}}{\langle \Delta r \rangle^2} \quad (4.1)$$

für 3D- bzw. 2D-Diffusion. Die Diffusionskoeffizienten für NpSR_{II} und NpHtr_{II} in Detergenzmizellen liegen mit $D_{3D} \sim 7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ mehr als eine Größenordnung über den korrespondierenden Werten in Lipidmembranen ($D_{2D} \sim 2 - 6 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$, Kap. 4.2.6). Ein Ansatz zur Abschätzung der Bindungsaffinitäten von Membranproteinen in Lipidschichten ist der Vergleich der gemessenen FRET-Effizienzen unter Bedingungen mit gleichen Kollisionswahrscheinlichkeiten in Detergenz und in Lipid. Nach Gleichung 4.1 ist die Kollisionswahrscheinlichkeit in Detergenz bei einer Proteinkonzentration von $0,32 \mu\text{M}$ gleich der in Lipid bei einem molaren Protein-Lipid-Verhältnis von 1:2.000. Unter diesen Voraussetzungen beobachten wir für die Komplexbildung von NpSR_{II} und NpHtr_{II} signifikante Unterschiede in den FRET-Effizienzen aus Detergenz- und Lipidproben. Die in Detergenzpuffer gemessene FRET-Effizienz beträgt bei $0,32 \mu\text{M}$ $E_{\text{mess}} = 0,6$. Im Gegensatz dazu liegt sie in Lipidmembranen bei einem molaren Protein-Lipid-Verhältnis von 1:2.000 (dies entspricht gleicher Kollisionswahrscheinlichkeit) bereits bei $0,8 - 0,95$. Dies trifft auch für geringere Protein-Lipid-Verhältnisse von 1:4.000 (mol/mol) zu. Bei weiterer

Verdünnung der Proteine zu einem Protein-Lipid-Verhältnis von 1:8.000 (mol/mol) sind die Daten aufgrund des großen Streubeitrages etwas fehlerbehaftet, zeigen jedoch auch dort vergleichbar hohe FRET-Effizienzen. Damit kann abgeschätzt werden, dass die Bildung von NpSR_{II}/NpHtr_{II}-Komplexen auch in diesem Konzentrationsbereich vollständig erfolgt. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass die Bindung von NpSR_{II} und NpHtr_{II} in Lipidumgebung wenigstens eine Größenordnung stärker ist als in Detergenz.

Für eine genauere Bestimmung der Bindungsaffinität ist die Messung bei noch geringeren Protein-Lipid-Verhältnissen mit unvollständiger Komplexbildung nötig. Da die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektroskopie ihre Grenzen hat und für Protein-Lipid-Verhältnisse über 1:8.000 durch einen starken Anstieg der Rayleigh-Streuung zu ungenau ist, müssen geringere Konzentrationen mit alternativen Methoden untersucht werden.

3.5 Zusammenfassung und Diskussion

Für die vorliegenden FRET-Ergebnisse wurde sensorisches Rhodopsin II und sein Transducer Htr_{II} zunächst ortsspezifisch fluoreszenzmarkiert. Diese Markierung gelang bei beiden Proteinen mit maleinimidfunktionalisierten Farbstoffen so gut, dass mindestens jedes zweite Protein markiert war. Überschüssiger freier Farbstoff konnte nach durchschnittlich drei Größenausschlusschromatographien restlos entfernt werden. Die Effizienz dieser Reinigung konnte anhand zweier Parameter, dem hypsochromen Effekt und dem Markierungsverhältnis γ , zuverlässig überprüft werden. Die aus den markierten Proteinen gebildeten drei FRET-Paare zeigten bei Komplexbildung alle einen nahezu vollständigen Energietransfer, abzulesen an den gemessenen FRET-Effizienzen nahe 1. Alle drei Paare waren daher prinzipiell für Bindungsstudien einsetzbar. Die Farbstoffe stellten keine sterische Hinderung für die Protein-Protein-Wechselwirkung dar. Die Aktivierung des Photozyklus in Paar 1 und Paar 2 störte die Komplexbildung nicht, da die FRET-Effizienzen hier denen von Paar 3 entsprachen, bei dem das Retinal-Chromophor nicht angeregt wurde.

Durch Bestimmung der FRET-Effizienzen bei verschiedenen Akzeptor-Donor-Verhältnissen konnte die durch ITC ermittelte Dissoziationskonstante $K_D \sim 200$ nM für Messungen in Detergenzpuffer durch die vorliegenden FRET-Studien bestätigt werden. Der Vergleich mit FRET-Effizienzen aus Messungen in Lipidmembranen zeigt, dass die Bindung von NpSR_{II} und NpHtr_{II} in der Lipidumgebung mindestens eine Größenordnung stärker ist, als in Detergenzpuffer. Für genauere Abschätzungen der Bindungsstärken ist eine noch stärkere Verdünnung der Proteinkonzentration nötig. Dies

kann zum Beispiel durch Fusion der Proteoliposomen in GUV und anschließende Messungen mit 2fFCS (2-Fokus-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, Kap. 4.2) erreicht werden.

Wie aus der Struktur des Rezeptor-Transducer-Komplexes bekannt, spielen Tyrosin 199 und Threonin 189 aus Helix G eine wichtige Rolle für die Stärke der Transducerbindung. Insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen und aromatische Seitenketteninteraktionen verursachen die verhältnismäßig starke NpSRII/NpHtrII-Bindung (Hippler-Mreyen, 2003; Sudo, 2006). Jedoch bleibt eine wichtige Frage offen: Warum beobachten wir in Lipidumgebung eine stärkere Bindung der beiden Proteine als in Detergenzpuffer? Ausschlaggebend dafür könnte eine Vororientierung der Proteine in Lipidmembranen sein. In Detergenzpuffer sind die Proteine zufällig in alle Raumrichtungen orientiert, wogegen die Proteine in Lipid immer senkrecht zur Membranoberfläche ausgerichtet sind. Dadurch ist lediglich variabel, ob die cytoplasmatische Seite der Proteine ins Innere des GUVs oder in den Umgebungspuffer zeigt. Durch diese parallele Anordnung treffen die diffundierenden Proteine häufiger in der passenden Vororientierung aufeinander, was sich in der beobachteten, stark erhöhten Bindungswahrscheinlichkeit äußert (Grasberger, 1986). Darüber hinaus kommen auch thermodynamische Ursachen für die höhere Bindungsaffinität in Lipidschichten in Frage. Aus thermodynamischen Daten geht hervor, dass die NpSRII-NpHtrII-Bindung stark von der Entropie abhängt. Damit die Bindung stattfinden kann, müssen Detergenz- und Lipidmoleküle die Bindungsgrenzfläche verlassen. Die entropische Energie, die dafür nötig ist, kann für Detergenzmoleküle größer sein, als für die Phosphoglycerolipide, die die Lipidmembranen bilden. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Bindungsaffinitäten von Membranproteinen in Detergenzpuffer kleiner sind, als jene in Lipidmembranen. Die Ergebnisse zeigen daher, dass in die Detergenzpuffern gemessenen K_D -Werte in ihrem Informationsgehalt begrenzt sind. In Bezug auf die Charakterisierung der Bindungsstärke von Membranproteinen in Zellmembranen können sie nur eine relative Vorhersage treffen. Damit unterstützen die vorliegenden Ergebnisse bisherige Studien, die ebenfalls eine Diskrepanz zwischen Werten aus Detergenzumgebungen und Lipidmembranen finden (Klare, 2006).

Die Bindung von SRII-Molekülen oder Htr-Molekülen untereinander ist im Gegensatz zur Bindung des sensorischen Rhodopsins und seines Transducers bisher kaum untersucht. Sie wurde zusätzlich zur hier beschriebenen NpSRII/NpHtrII-Komplexbildung in einer begleitenden Diplomarbeit (Brehms, 2007) analysiert. Besonders die Bildung von NpHtrII-Homodimeren ist dabei von zentraler Bedeutung, da sie im Zentrum des 2:2-Komplexes von Proteinen postuliert werden (Gordeliy, 2002; Abb. 1.5).

In FRET-Untersuchungen bildeten in Lipidmembranen nur maximal 40 % des gekürzten Transducers NpHtr₁₅₇ Homodimere (Brehms, 2007). Diese unvollständige Bindung deutet darauf hin, dass der Membranteil des Transducers nicht ausreicht, um für einen funktionellen 2:2-Komplex zu sorgen. Dies steht im Widerspruch zu ESR-Studien (Wegener, 2001) und Röntgenkristallstrukturanalysen (Gordeliy, 2002). Die Ursache hierfür liegt in der hohen Packungsdichte der Proteine in jenen Studien. Die dort eingesetzten Protein-Lipid-Verhältnisse von 1:25 bis 1:50 (mol/mol) führten zu einer dichten Anordnung der Proteine, die auf eine scheinbar stärkere Bindung hinweist. In diesem Zustand, wo wenige Lipide in der Umgebung der Proteine vorliegen, geraten die Proteine geradezu zwangsläufig in Nachbarschaft. Diese Situation entspricht nicht der Flächendichte, wie sie in den Bakterien vorkommt (molares Protein-Lipid-Verhältnis etwa 1:1.000.000, s. Kapitel 4.3).

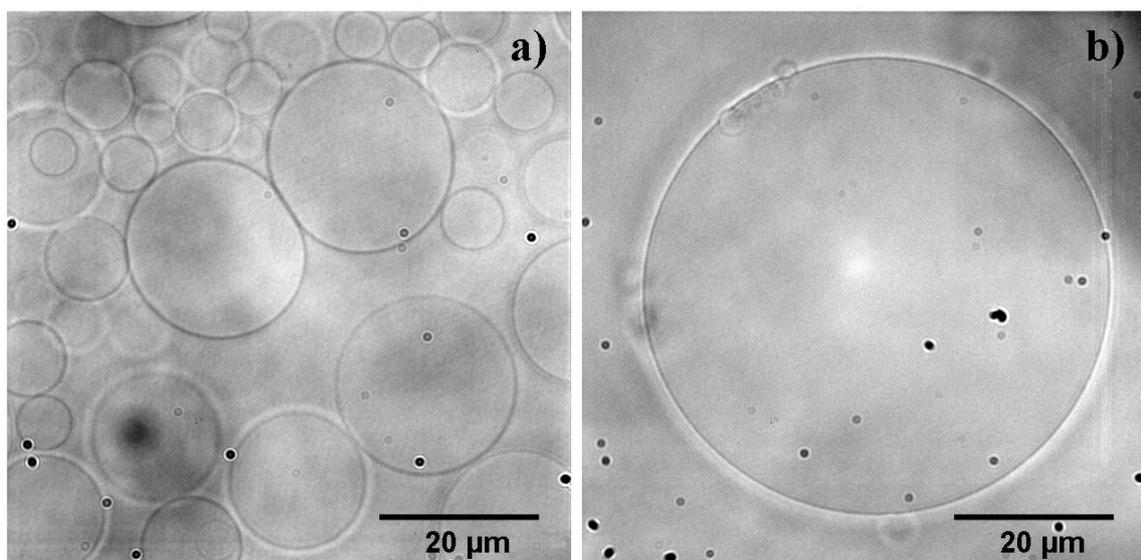
Eine Bildung von HtrII-Homodimeren ist dennoch nicht grundsätzlich ausgeschlossen, da die Bindung durch die cytoplasmatische Domäne der vollständigen Transducer stabilisiert werden kann. Nach einer kürzlich erfolgreich durchgeführten Reinigung des gesamten NpHtrII (Mennes, 2007) ist eine Überprüfung dieser These zukünftig prinzipiell möglich. Für die Untersuchung der Bindung dieser langen cytoplasmatischen Domäne in Lipidmembranen wäre der entwickelte FRET-Assay gut geeignet, denn die über 100 nm großen LUV bieten dem etwa 25 nm langen cytoplasmatischen Teil ausreichend Platz für ungehinderte Diffusion. Im Gegensatz dazu ist dies in häufig genutzten Lipidmembransystemen, wie *supported bilayer* und Membranstapeln, nicht möglich.

4 Diffusions- und Bindungsstudien von NpSR_{II} und NpHtr_{II} in Giant Unilamellar Vesicles (GUV)

4.1 Herstellung von GUV und ihre Fusion mit Proteoliposomen

Die Herstellung von GUV erfolgte mit der Elektroformationsmethode nach Angelova und Dimitrov (1986) in einer selbstgebauten Präparationskammer. Im elektrischen Wechselfeld lösten sich bereits nach wenigen Minuten die oberen Schichten des aufgespatelten Lipidfilms ab und es begann die Bildung der ersten GUV. Das schwache elektrische Wechselfeld bewirkte die vorsichtige Ablösung separierter Lipidschichten und schließlich die Bildung der Vesikel, indem es die Membranen mit kleiner Amplitude schwingen ließ. Im Mikroskop war diese Bewegung der Membranen gut zu beobachten. Wurde die Spannung von 1,5 V auf 3 V erhöht, bewegten sich die GUV deutlich schneller und mit größerer Amplitude und lösten sich eher von den Lipidschichten ab. Dadurch waren sie nach abgeschlossener Präparation mit einem Durchmesser von maximal 10 μm zu klein für die Aufnahme von z-Stapeln (Kap. 4.2.5). Die Präparationen wurden daher mit 1,5 V durchgeführt. Nach etwa zwei Stunden hatten sich viele GUV mit einer Größe von 5 bis 80 μm Durchmesser formiert (Abb. 4.1 a). Ein Großteil dieser Vesikel war bereits von der Oberfläche abgelöst. Die GUV waren so eng gepackt,

Abb. 4.1: GUV in der ITO-Kammer, a) nach der Präparation auf der Unterseite der Kammer, b) isolierter GUV von etwa 60 μm Durchmesser nach Aufsteigen und Haften auf der Oberseite der Kammer.



dass sich ihre Oberflächen berührten, und sie dicht an dicht in der Kammer lagen. Dieser Zustand erwies sich als ungeeignet für 2fFCS- Untersuchungen, da die Lipidmembranen so kaum voneinander getrennt werden konnten und eine gezielte Untersuchung einer einzelnen Membran nicht möglich war. Als weiterer Nachteil erwies sich, dass die GUV über die Oberfläche rollen konnten. Bei Messzeiten von mehr als 15 Minuten Dauer bewegten sie sich aus dem Detektionsbereich der zwei Fokusse, so dass kein Fluoreszenzsignal mehr detektiert werden konnte. Auch kleine Bewegungen innerhalb des Detektionsbereichs mussten vermieden werden, da sie die 2fFCS-Messung beeinträchtigen.

Da es nicht möglich war, die GUV zu pipettieren, ohne dass ein Großteil dabei platzte, erfolgte die Isolierung einzelner GUV berührungsfrei nach einer Methode von Iris von der Hocht (2008). Die Glucoselösung, die die GUV umgab, wurde durch isoosmotische Succroselösung ersetzt. Durch die höhere Dichte des Umgebungsmediums stiegen die wenigen abgelösten Vesikel wie „heliumgefüllte Ballons“ an die Oberseite der Kammer. Über biotinylierte Lipide, die in ihre Membran integriert waren, banden sie dort an eine Neutravidinschicht. Nach dem Wenden der Kammer konnten nun die gebundenen Vesikel untersucht werden. Da viele Vesikel noch an der Unterseite der Kammer hafteten, waren nur wenige aufgestiegen, die nun sehr vereinzelt und räumlich gut voneinander getrennt auf der Neutravidin-Oberfläche vorlagen (Abb. 4.1 b). Diese isolierten GUV konnten gezielt in 2fFCS-Messungen untersucht werden. Sie bildeten ein geschlossenes Lipidsystem zur Untersuchung integraler Membranproteine.

Die Elektroformation von GUV in dem für alle Lipidpräparationen dieser Arbeit verwendeten detergentenfreien Standardpuffer war nicht erfolgreich. Die enthaltenen Ionen der Salze kompensierten das elektrische Wechselfeld, sodass die Lipidschichten lediglich quollen, sich aber nicht bewegten. Auch eine Änderung der Feldeigenschaften (Montes, 2007) führte nicht zum Erfolg. Alternative Methoden zur GUV-Herstellung wie die Hydratisierungsmethode (Akashi, 1996; Rodriguez, 2005) führten zu einem großen Anteil multilamellarer Vesikel. Daher musste für die Präparation die erwähnte isoosmotische Glucose- bzw. Succroselösung verwendet werden. Diese wurde später für die Messungen durch detergentenfreien Standardpuffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2) ersetzt. Alle Lösungen hatten exakt dieselbe Osmolarität, da schon bei geringen osmolaren Unterschieden Schwingungen in der GUV-Membran auftraten, die zu einer Bewegung in den Messfokussen führte, und damit die Messung unmöglich machte. Zudem beeinträchtigten Unterschiede in der Osmolarität die Haltbarkeit der Vesikel. Bei geringer Hyperosmolarität (innen gegen außen), schrumpften die Vesikel langsam und schnürten kleine Lipidbläschen in die äußere Umgebung ab. Waren die Unterschiede zu groß, platzten die GUV oder fielen zusammen.

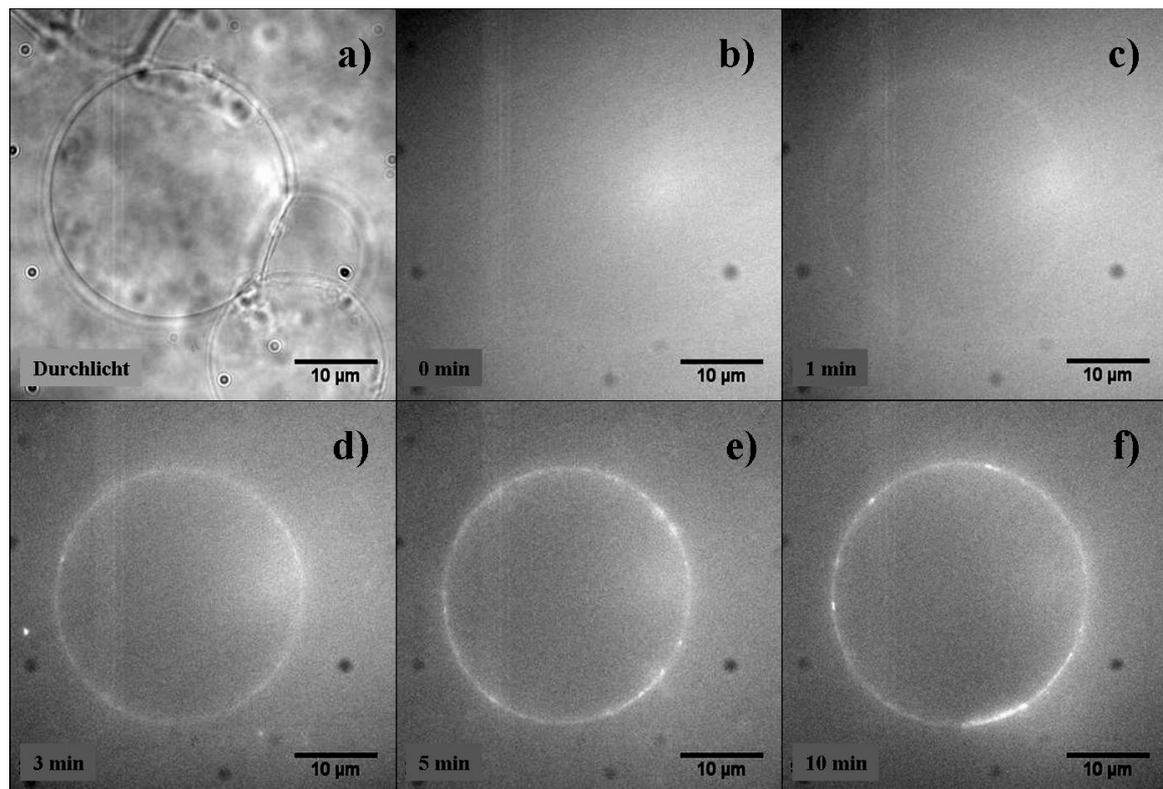


Abb. 4.2: Zeitverlauf der Fusion von Proteoliposomen in GUV.

Die Fusion von Proteoliposomen in GUV begann sofort mit dem Einpipettieren der Proteoliposomen in die Präparationskammer. Mit einem Durchmesser von maximal 200 nm waren die Proteoliposomen deutlich kleiner als die halbe Wellenlänge des Lichts und waren daher im Mikroskop nicht mehr einzeln erkennbar. Stattdessen erschienen sie nach Zugabe in der Lösung als gesteigerte Hintergrundfluoreszenz. Der Zeitverlauf der Fusion ist in Abb. 4.2 anhand von Proteoliposomen mit NpSRIIK157C-Alexa Fluor 633 dargestellt (Abb. 4.2 a zeigt die Lage des GUV im Durchlichtmodus). Während der Fusion reicherten sich markierte Proteine in der GUV-Membran an. Dadurch entstand ein ringförmiges Fluoreszenzsignal, dessen Intensität den Fortschritt der Fusion wiedergab. Bereits eine Minute nach Zugabe der Proteoliposomen in die Kammer waren so viele Fluorophore in der Membran vorhanden, dass sich der fluoreszierende Ring schwach vom Hintergrund abzeichnete (Abb. 4.2 c). Innerhalb von drei Minuten war die Fusion nahezu vollständig erfolgt und die GUV-Membran fluoreszierend erkennbar (Abb. 4.2 d). Nach fünfminütiger Inkubation war die Fusion von Proteoliposomen in GUV abgeschlossen. Aus den Zuständen fünf und zehn Minuten nach Beginn der Fusion geht keine Änderung der Fluoreszenzemission mehr hervor. Die Intensität stieg nicht mehr an. Die Flächendichte des markierten Proteins in der Membran hatte zu diesem Zeitpunkt einen konstanten Wert erreicht. Allerdings änderte sich die Signalverteilung auch nach

Abschluss der Proteoliposomenfusion kontinuierlich. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Vesikelfusion zeigte sich eine ungleichmäßige Verteilung der Signale von NpSRIIK157C-Alexa Fluor 633. Von einem gleichmäßigen Fluoreszenzhintergrund der Membran hoben sich kleinere punktförmige und einige große flächenartige Bereiche ab, in denen die Intensität deutlich verstärkt war. Dies lässt darauf schließen, dass das markierte sensorische Rhodopsin diesen Arealen angereichert war, und im Vergleich zu dunkleren Membranabschnitten gehäuft auftrat. Diese Akkumulationen waren nur bei Fusion großer Mengen von NpSRIIK157C-Alexa Fluor 633 in die GUV-Membran zu beobachten, wie sie für die Fluoreszenzmikroskopie nötig war. In 2fFCS-Messungen konnte das Auftreten von Akkumulationen nicht bestätigt werden. Für diese Messungen waren wesentlich niedrigere Konzentrationen nötig, daher wurde die Proteoliposomenlösung in 100facher Verdünnung zugegeben.

Um eine vollständige Fusion zu garantieren, wurde die Kammer erst eine halbe Stunde nach Zugabe der Proteoliposomen mit Puffer gespült. Die in der Lösung befindlichen nicht fusionierten Vesikel wurden zur Minimierung der Hintergrundfluoreszenz dadurch gründlich entfernt. Blieben diffundierende Proteoliposomen zurück, beeinträchtigten diese die späteren 2fFCS-Messungen, da sich die Fluoreszenz der GUV-Membran schlechter vom Hintergrundfluoreszenzsignal unterscheiden ließ. Die Membran war damit schwerer zu finden. Außerdem führt die 3D-Diffusion der Proteoliposomen bei der Interpretation der zweidimensionalen Proteindiffusion zu fehlerhaften Ergebnissen.

Die Fusionen fanden immer unter gleichen Bedingungen statt, um die resultierende Proteinmenge in den GUV annähernd konstant zu halten. Die Geschwindigkeit der Fusionsreaktion wurde bestimmt durch die Menge von WAE-11, das an den Membranen der Proteoliposomen gebunden war und durch Menge des positiv geladenen Lipids EDOPC in der GUV-Membran. Je höher die Ladungsdichten, desto schneller erfolgte die Adhäsion, die den kritischen Schritt in der Einleitung der Fusion darstellt. Waren die Vesikel durch elektrostatische Wechselwirkungen in direkte Nachbarschaft gebracht, verschmolzen die Membranen durch das eindringende Fusionspeptid WAE-11 sehr schnell. Auch die Menge der eingebrachten Proteoliposomen beeinflusste die Vollständigkeit und die Geschwindigkeit der Reaktion. In den vorliegenden Experimenten wurden die Proteoliposomen in sehr hoher Konzentration zugegeben, um alle WAE-11-Bindungsplätze in den GUV abzusättigen und so sicherzustellen, dass alle GUV eine ähnliche Oberflächendichte der Proteine besaßen.

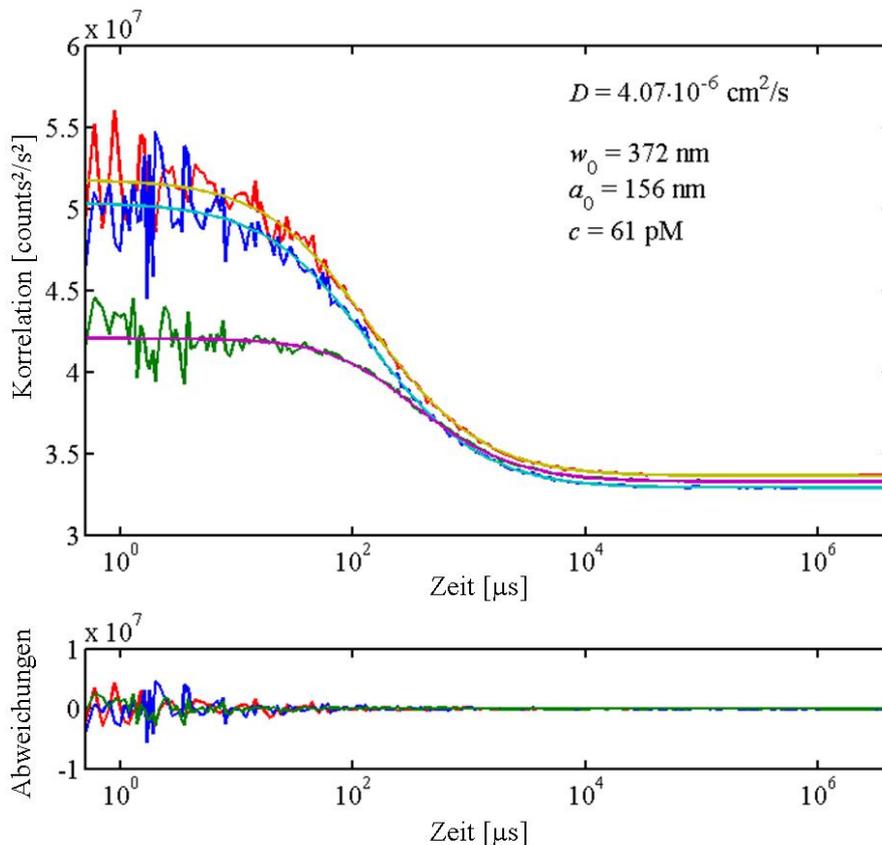
4.2 Bestimmung von absoluten Diffusionskoeffizienten mit 2fFCS (2-Fokus-Korrelationspektroskopie)

Die 2fFCS ist eine neuartige Variante der weit verbreiteten FCS-Technik (Dertinger, 2007). Die vorliegende Studie liefert erstmals Ergebnisse für integrale Membranproteine in künstlichen Lipidmembranen. Neben den Diffusionskoeffizienten der Proteine wird daher auch die Entwicklung von Messmethodik und Datenanalyse in diesem Ergebnisteil beschrieben.

4.2.1 Kalibrierung des Gerätes

Für die Messung von Diffusionskoeffizienten integraler Membranproteine wurde das Gerät zunächst mit einer 0,5 nM Lösung von Atto 655-COOH in Wasser kalibriert (Abb. 4.3). Die Temperatur wurde bei allen Messungen konstant gehalten und betrug

Abb. 4.3: Messung des Diffusionskoeffizienten D von Atto 655 in Wasser mit 2fFCS. Aus den Autokorrelationen (blau und rot) wird die Kreuzkorrelation (grün) berechnet, die den Diffusionskoeffizienten ergibt. Die Parameter w_0 (Fokusbereich), a_0 (axialer Fokusparameter) und c (Konzentration der diffundierenden Partikel) werden ebenfalls bestimmt und ermöglichen eine Bewertung der Güte der Kalibrierung.



in allen Messungen $25,0 \pm 0,3$ °C. Atto 655 ist ein umfangreich charakterisierter Farbstoff (Marme, 2003; Buschmann, 2003). Der Diffusionskoeffizient war aus der Literatur mit $D = (4,26 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$ cm²/s bekannt (Dertinger, 2007). Die Anpassung (englisch: *fit*) der Korrelationen erfolgte mit Gleichung 2.14. Nach Justage des Gerätes stimmte der Messwert der Kalibrierlösung mit der Referenz überein. Dies ermöglichte die Messung der Diffusionszeiten von in GUV diffundierenden Transducer- und Rezeptormolekülen und die anschließende Berechnung der Diffusionskoeffizienten.

4.2.2 Messprinzip

Zur Messung der Diffusion waren die Proteinmutanten NpSRIIK157C und NpHtrII₁₅₇A94C im Markierungsverhältnis $\gamma = 0,78 - 1,0$ (Tab. 3.2) mit Alexa Fluor 633 fluoreszenzmarkiert (Kap. 2.1). Mittels peptidinduzierter Membranfusion (Kap. 2.5) wurden die Proteine nach der Rekonstitution in Proteoliposomen in die ortsfesten GUV überführt. Zunächst wurden Rezeptor und Transducer getrennt voneinander in die GUV-Membran fusioniert und ihre Diffusionskoeffizienten ohne Anwesenheit des Bindungspartners bestimmt. Anschließend wurden Proteoliposomen, in die Rezeptor und Transducer im molaren Verhältnis von 1:1 rekonstituiert worden waren, in die GUV fusioniert.

Nach Zugabe der Proteoliposomen in die GUV-Kammer hafteten die proteinenthaltenden LUV auch auf der Glasoberfläche. Selbst nach mehrmaligem Spülen mit Puffer war ein hohes Fluoreszenzsignal in Oberflächennähe messbar. Ab einem Abstand von etwa sechs Mikrometern zur Glasoberfläche wurde diese Hintergrundfluoreszenz durch die konfokale Blende abgeschnitten. Durch Verwendung der GUV als Lipidumgebung konnte der Einfluss störender Oberflächeneffekte ausgeschlossen werden, da immer auf dem höchsten Punkt der Vesikel, d.h. in 20 bis 50 µm Abstand zum Glas, gemessen wurde. Nach erfolgter Fusion ließ sich die Membran durch die Fluoreszenzmarkierungen der Proteine gut vom farbstofffreien Umgebungspuffer unterscheiden. Die Konzentration der Partikel in der Lipidmembran war so gering, dass sich die Diffusion einzelner Proteine im Anregungsbereich bemerkbar machte. Wurde nicht sauber genug gespült, konnte die Membran nicht gefunden werden, da sich ihr Fluoreszenzsignal nicht von der Umgebung abhob. Da es sich bei der Membrandiffusion im Gegensatz zur Kalibrierung um zweidimensionale Diffusion handelte, wurden die Diffusionskoeffizienten mit abgewandelten Fits der Autokorrelationen ermittelt (Gleichungen 2.17 bis 2.19). Analog zur Messung im Volumen wurde auch hier eine Kreuzkorrelationsfunktion gebildet. Eine typische 2fFCS-Messung ist am Beispiel von NpSRIIK157C-Alexa Fluor 633 in Abb. 4.4 gezeigt.

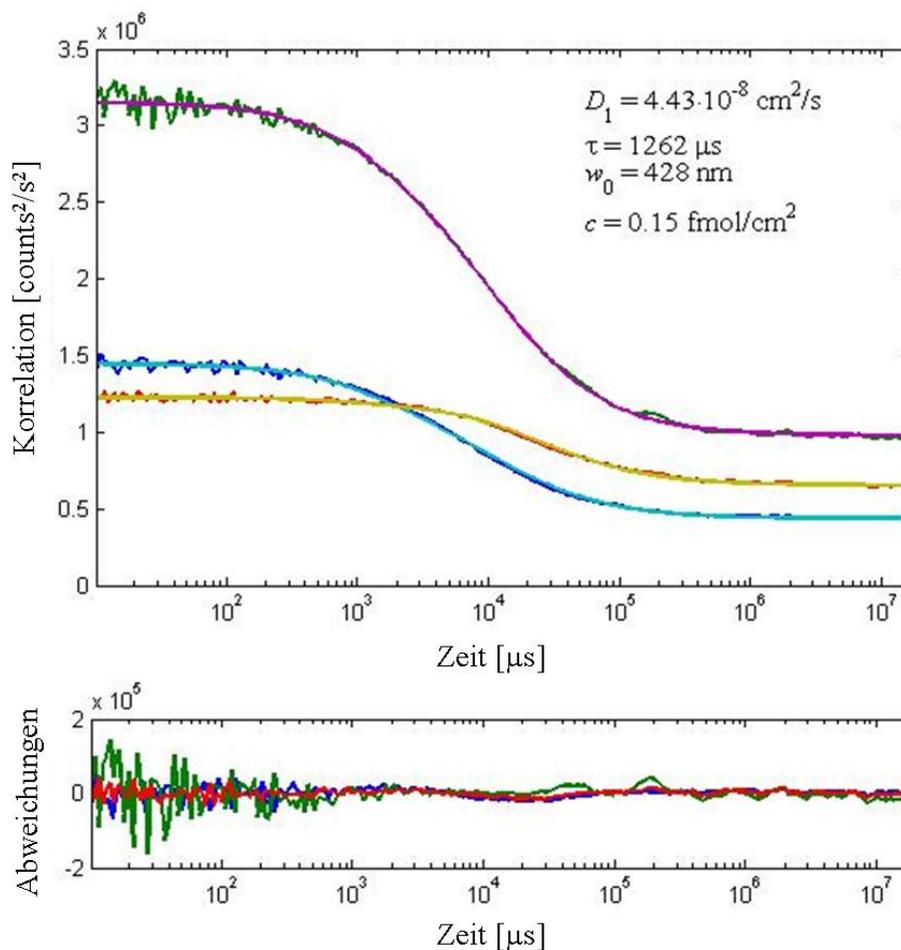


Abb. 4.4: Autokorrelationen (grün und blau) und Kreuzkorrelation (rot) einer 2fFCS-Messung von NpSRIK157C-Alexa Fluor 633. Durch den Fit der Kreuzkorrelation (gelb) wird der Diffusionskoeffizient D_1 , die Relaxationszeit τ_R , der Fokusbereich w_0 und die Konzentration c der diffundierenden Fluoreszenzpartikel beschrieben.

Die Autokorrelationen sind in grün und blau dargestellt, die Kreuzkorrelationen in rot. Die beiden Autokorrelationen hatten unterschiedliche Maximalamplituden, was in der unterschiedlichen Leistung der beiden Anregungslaser begründet war. Dieser Unterschied konnte anhand der Höhe des Hintergrundsignals auf einen einheitlichen Wert skaliert werden.

4.2.3 Filtern von Störsignalen

Um eine gute Statistik der Diffusionskoeffizienten von NpSRII, NpHtrII und der Mischung aus beiden Proteinen zu gewährleisten, wurden jeweils etwa fünfzig unabhängige Messungen durchgeführt. Da präparierte GUV in der Kammer nur für

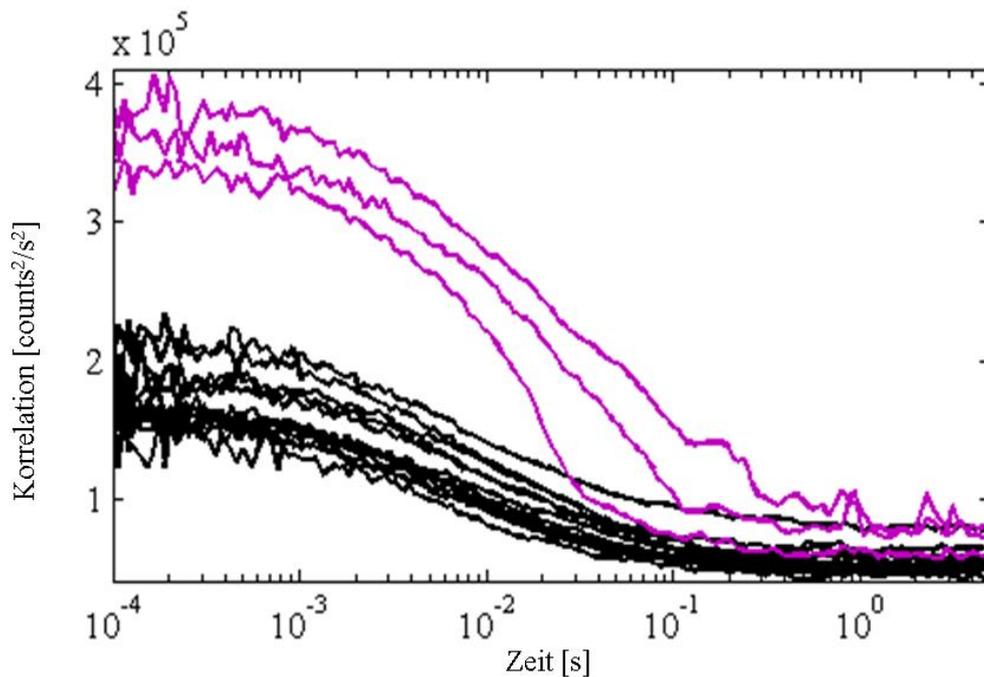


Abb. 4.5: Filtern von Störsignalen durch Segmentierung der Rohdaten. Die insgesamt detektierten Photonen einer Messung wurden der Reihe nach in Segmente von jeweils $2,5 \cdot 10^5$ Photonen unterteilt und ihre Autokorrelationen dargestellt. Störsignale in Form großer Fluoreszenzpartikel, die kurzzeitig durch den Fokus diffundieren, verursachten abweichende Autokorrelationen, im Beispiel lila dargestellt. Diese Bereiche wurden aus den Rohdaten entfernt. Aus dem verbleibenden Datensatz (schwarz) konnten so Diffusionskoeffizienten berechnet werden, ohne dass Störeinflüsse das Ergebnis beeinträchtigten.

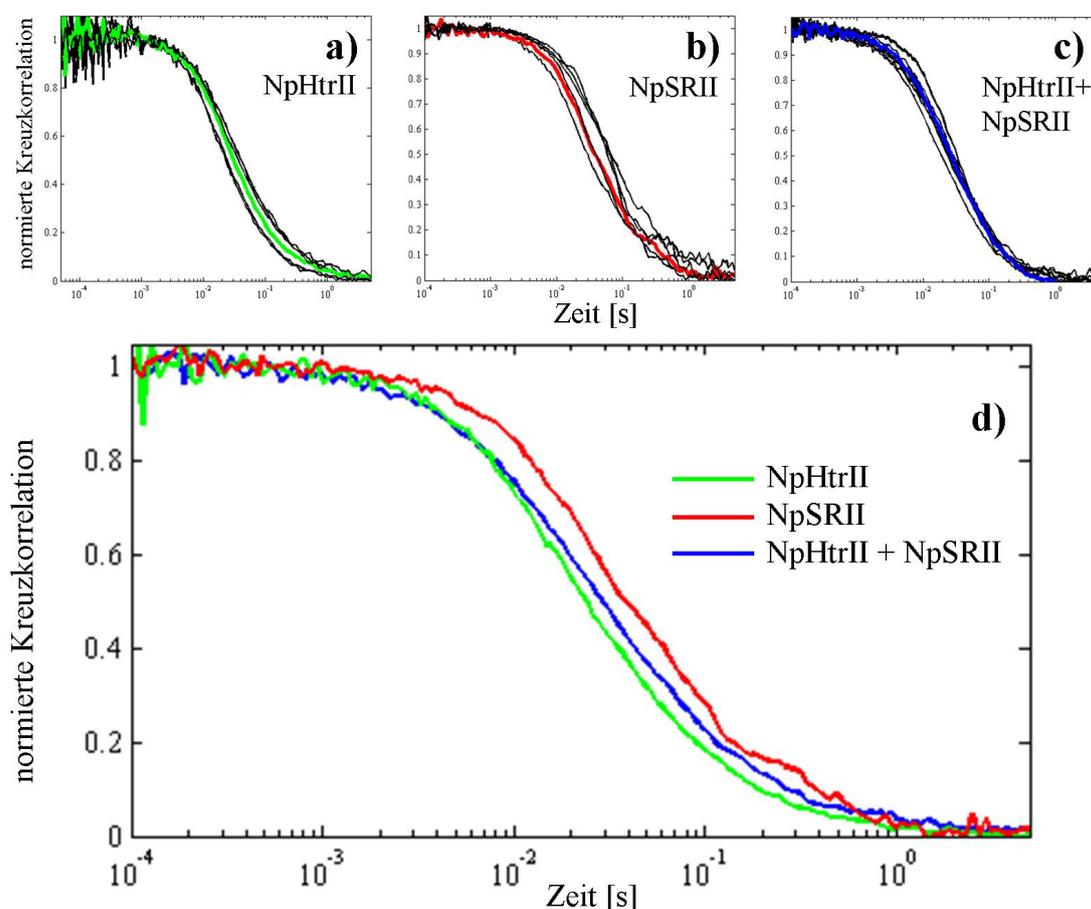
maximal drei Tage haltbar waren, waren mehr als zehn unabhängige Präparationen für jede der drei Varianten erforderlich. Dadurch wurde zusätzlich die Reproduzierbarkeit der Methode überprüft. Die den Fits zugrunde liegenden Rohdaten wurden in Segmente von jeweils $2,5 \cdot 10^5$ Photonen unterteilt und einzeln korreliert (Abb. 4.5). Stark abweichende Autokorrelationen (lila) wurden aus dem Rohdatensatz entfernt. Die Abweichungen wurden beispielsweise durch große, nicht vollständig fusionierte Proteoliposomen-Aggregate verursacht, die kurzzeitig durch die Fokusse diffundierten. Sie äußerten sich in ausgeprägten Peaks im Bereich langer Diffusionszeiten. Die ausgefilterten Abschnitte gingen nicht in die Berechnung der Diffusionskoeffizienten ein. Der bereinigte Datensatz lieferte Kreuzkorrelationen mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis und Diffusionskoeffizienten mit geringen Fehlertoleranzen. Der unbehandelte Rohdatensatz war dagegen stark verrauscht und die resultierenden Diffusionskoeffizienten zeigten Standardabweichungen von über 50 %.

4.2.4 Vergleich der Kreuzkorrelationen

In Abb. 4.6 sind die Kreuzkorrelationen einiger Messungen der mit Alexa Fluor 633 markierten Proteinmutanten zusammengefasst. Die Grafik zeigt die Daten von NpHtrII_{157A94C} (a), NpSRIIK157C (b) sowie des Gemisches aus beiden Proteinen (c). Im letzten Fall war ausschließlich NpHtrII_{157A94C} fluoreszenzmarkiert, NpSRIIK157C wurde unmarkiert zugegeben. Die verschiedenen Einzelmessungen aller drei Messvarianten wichen teilweise voneinander ab (schwarz) und schwankten mit etwa gleicher Abweichung um einen Mittelwert. Aus allen drei Kreuzkorrelationspools wurde je ein Beispielwert aus dem mittleren Bereich gewählt. Dieser repräsentative Verlauf ist für NpHtrII grün, für NpSRII rot und für die gemeinsame Diffusion beider Proteine blau dargestellt.

Der direkte Vergleich dieser drei mittleren Kreuzkorrelationen ist in Abbildung 4.6 d zu sehen. Er ließ bereits qualitative Aussagen über die Diffusion zu: NpHtrII (grün) fiel am schnellsten ab, was auf die kürzeste Diffusionszeit τ_D und den größten

Abb. 4.6: Vergleich der Kreuzkorrelationen verschiedener Messungen.



Diffusionskoeffizienten D aller drei Messungen schließen ließ. Die mittlere Kreuzkorrelation von NpSR_{II} (rot) dagegen war zu längeren Diffusionszeiten verschoben und resultierte damit in den kleinsten Diffusionskoeffizienten. Die gemeinsame Diffusion von NpSR_{II} und NpHtr_{II} ergab eine Diffusionszeit zwischen den beiden Einzelkomponenten und damit einen mittleren Diffusionskoeffizienten. Der flachere Abfall der Kreuzkorrelationen von NpSR_{II} und der Mischprobe deutete bereits auf die Anwesenheit einer zweiten Korrelationszeit τ im Bereich weniger Millisekunden hin.

4.2.5 Z-Stapel

In den ersten Messungen, die im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführt wurden, schnitten die etwa sechs μm hohen FCS-Fokuse die Membran zunächst an einem zufälligen Punkt. Dabei zeigte sich, dass der berechnete Fokusdurchmesser w_0 fast immer größer als 600 nm war und die Diffusionskoeffizienten stark schwankten. Als mögliche Ursache wurde daraufhin der Abstand der Membran zu Mittelebene der Fokuse untersucht. Entspricht der Fokusdurchmesser lediglich in einem kleinen Bereich $w_0 = 400$ nm, würde eine Entfernung von der Mittelebene rasch in fehlerbehafteten Diffusionskoeffizienten resultieren. Um diese These zu überprüfen und den Punkt zu finden, an dem die Membran genau in der Fokusmittelebene lag, wurden die Diffusionskoeffizienten im Folgenden in Abhängigkeit der Messhöhe bestimmt (Przybylo, 2006) und die Entwicklung von w_0 beobachtet. Die Messung begann bei Eintritt der Membran in die Fokuse und erfolgte in Abständen von 0,5 μm über den z-Bereich, in dem die Membran die Fokuse schneidet. Mit einer Leistung von 1 μW pro Laser und einer Messdauer von 10 bis 20 Minuten pro Stufe konnten genug Photonen für eine gute Korrelation der Daten gesammelt werden, ohne dass die Fluorophore geblühten wurden. Die Aufzeichnung des entstehenden z-Stapels konnte insgesamt mehrere Stunden dauern, daher musste jegliche Bewegung der GUV in xy-Richtung vermieden werden. Zusätzlich zur Oberflächenfixierung der Vesikel selbst wurde daher auch der gesamte Objektisch fixiert. Der resultierende z-Stapel zeigte die absoluten Diffusionskoeffizienten D als Funktion des Abstandes h zwischen der Fokusmittelebene und der GUV-Membran (Abb. 4.7). Die Datenpunkte konnten gut mit einer Parabel gefittet werden. Der Diffusionskoeffizient D (Abb. 4.7 a) erreichte bei $h = 0,0$ μm mit $4,0 \cdot 10^{-8}$ cm^2/s ein Minimum, ebenso wie der berechnete Fokusdurchmesser $w_0 \sim 400$ nm (Abb. 4.7 b). Lag die Membran etwa einen Mikrometer von der Mittelebene der Fokuse entfernt, waren beide Werte mit $D = 5,0 \cdot 10^{-8}$ cm^2/s und $w_0 = 500$ nm um etwa 20 % erhöht. Diese Beobachtung bestätigte die Vermutung, dass die Diffusionskoeffizienten stark von der Lage der Membran im Anregungsbereich abhängen. Eine korrekte Berech-

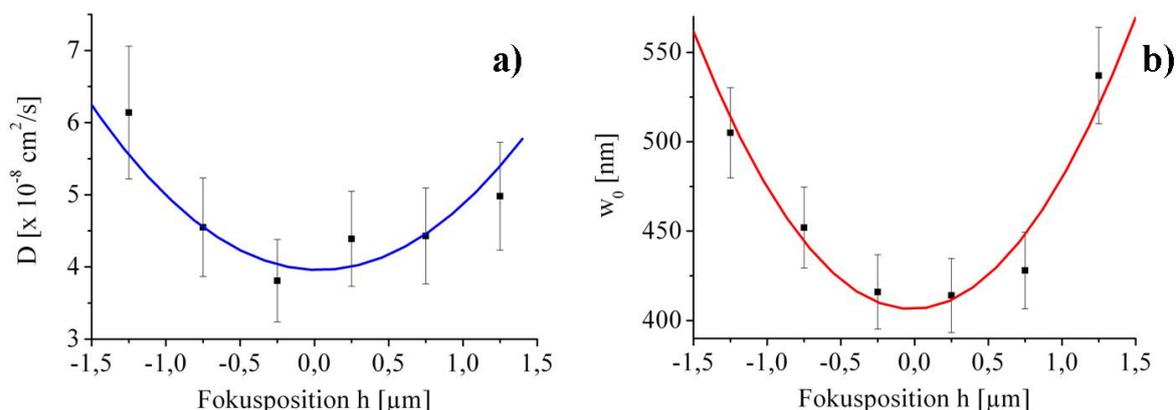


Abb. 4.7: Die Diffusionskoeffizienten und gefittete Fokusaussdehnung w_0 in Abhängigkeit von der Fokusposition, am Beispiel der Mischprobe aus NpHtrII157A94C-Alexa Fluor 633 und NpSRIIK157C.

nung konnte nur in dem etwa 1,5 μm breiten mittleren Bereich der Fokuse erfolgen, da nur hier der Durchmesser jedes der beiden Fokuse annähernd $w_0 = 400$ nm betrug, und sich die Fokuse optimal überlappten. Für alle Betrachtungen absoluter Diffusionskoeffizienten wurden daher ausnahmslos Werte mit $w_0 \leq (450 \pm 15)$ nm analysiert.

4.2.6 Die Diffusionskoeffizienten der untersuchten Proteine

Die unterschiedlichen Fitmodelle A, B und C (Gleichungen 2.17 - 2.19) ergaben eine Vielzahl von Parametern, die in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind. Die Berechnungen geben jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung wieder. Die ermittelten Werte charakterisieren umfassend die Diffusion der Proteine in den Lipidmembranen: Für Modell A wurde nur ein einziger Diffusionskoeffizient D_1 bestimmt, für Modell B zwei Diffusionskoeffizienten D_1 und D_2 und für Modell C ein Diffusionskoeffizient D_1 und eine zusätzliche Korrelationszeit τ_R . Die berechneten mittleren Fokusedurchmesser w_0 lagen in allen Fällen zwischen 416 und 453 nm, die dazugehörigen Standardabweichungen waren mit 3 bis 8 % sehr niedrig. Damit entsprach w_0 in guter Näherung dem Fokusedurchmesser der Mittelebene von $w_0 = 400$ nm und erfüllte damit die Voraussetzung für die zuverlässige Interpretierbarkeit der Diffusions- und Konzentrationsparameter.

Zunächst wurde die Güte der drei Fitmodelle charakterisiert: Die linke Spalte R^2 beschreibt die Abweichung des Fits zu den Messdaten und ermöglichte damit eine Abschätzung der Güte der Fits A, B und C. Sie beinhaltet die Summe der Fehlerquadrate, die nach Anpassung der Datensätze mit den jeweiligen Fitmodellen entstanden.

Tab. 4.1: Übersicht der Diffusionskoeffizienten für NpHtrII, NpSRII und die Mischung aus NpHtrII und NpSRII im molaren Verhältnis 1:1.

| Fit | Probe | R ² [·10 ⁻³] | Diffusion | | | | | Konzentration | | | |
|-----|--------------|--|--|--------|--|--------|------------------------|---------------|------------------------|------------------------------|---|
| | | | D ₁ [·10 ⁻⁸ cm ² /s] | % | D ₂ [·10 ⁻⁸ cm ² /s] | % | τ _R [ms] | % | w ₀ [nm] | c [fmol/cm ²] | ρ [·10 ⁶ Proteine/ mm ²] |
| A | HtrII | 0,36 | 4,15 | 100 | - | - | - | 416 | 0,31 | 1,64 | 4418 |
| | | | ± 0,29 | - | - | - | ± 17 | ± 0,15 | ± 1,11 | ± 3531 | |
| | SRII | 0,56 | 2,38 | 100 | - | - | 417 | 0,06 | 0,29 | 703 | |
| | | | ± 0,58 | - | - | - | ± 13 | ± 0,02 | ± 0,10 | ± 239 | |
| | HtrII + SRII | 0,51 | 3,99 | 100 | - | - | 425 | 0,32 | 1,55 | 6356 | |
| | | | ± 1,20 | - | - | - | ± 20 | ± 0,18 | ± 0,86 | ± 5190 | |
| B | HtrII | 0,21 | 4,26 | 66,4 | 10,10 | 33,6 | - | 453 | 0,10 | 0,38 | 1321 |
| | | | ± 0,72 | ± 31,8 | ± 15,16 | ± 31,8 | - | ± 13 | ± 0,03 | ± 0,05 | ± 442 |
| | SRII | 0,28 | 2,10 | 70,1 | 19,09 | 29,9 | - | 416 | 0,17 | 0,81 | 2160 |
| | | | ± 0,30 | ± 22,1 | ± 8,58 | ± 22,1 | - | ± 18 | ± 0,07 | ± 0,33 | ± 1369 |
| | HtrII + SRII | 0,25 | 3,06 | 63,2 | 17,87 | 35,9 | - | 420 | 0,22 | 1,08 | 5961 |
| | | | ± 0,61 | ± 10,8 | ± 4,22 | ± 9,3 | - | ± 31 | ± 0,05 | ± 0,24 | ± 3301 |
| C | HtrII | 0,22 | 5,31 | 82,9 | - | - | 129,9 | 0,33 | 3,53 | 7791 | |
| | | | ± 0,89 | ± 25,3 | - | - | ± 54,6 | ± 0,28 | ± 1,48 | ± 4657 | |
| | SRII | 0,27 | 2,56 | 73,1 | - | - | 1,9 | 0,11 | 0,55 | 1762 | |
| | | | ± 0,70 | ± 19,5 | - | - | ± 0,7 | ± 0,03 | ± 0,14 | ± 1350 | |
| | HtrII + SRII | 0,25 | 4,30 | 65,3 | - | - | 1,4 | 0,14 | 0,65 | 3151 | |
| | | | ± 0,53 | ± 12,7 | - | - | ± 0,3 | ± 0,03 | ± 0,15 | ± 1350 | |

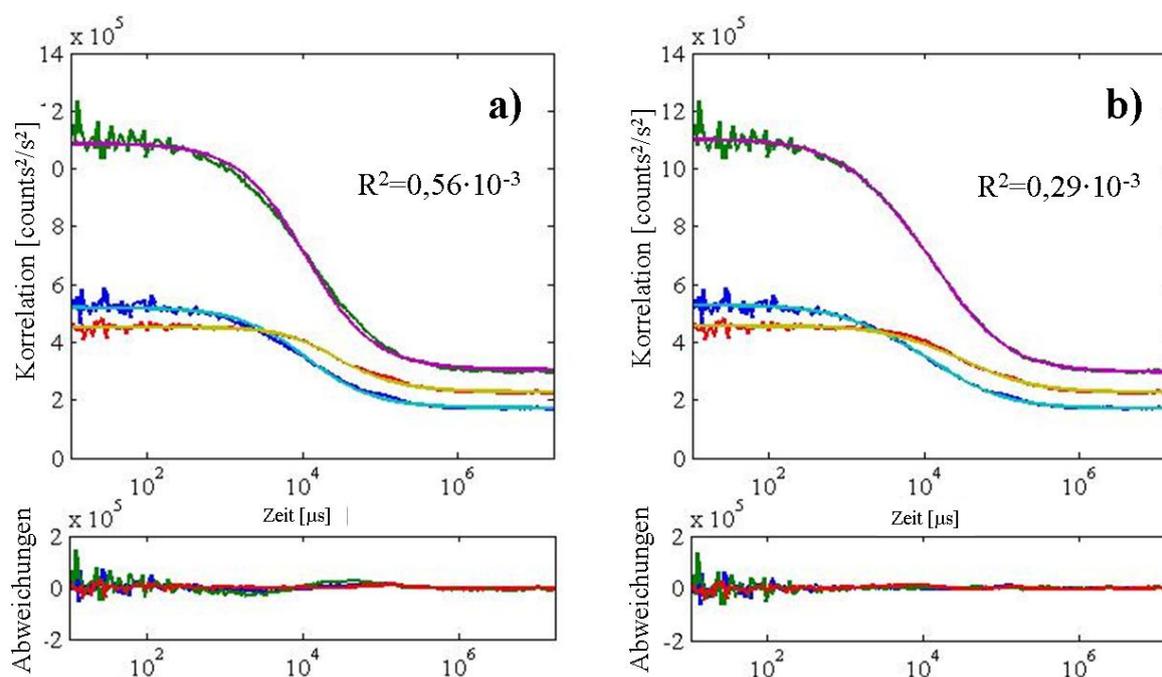


Abb. 4.8: Vergleich der Fitmodelle am Beispiel von NpSRIIK157C-Alexa Fluor 633 für Modell A (a), und Modell C (b). Die Fits aus b) stimmen wesentlich besser mit den Datenkurven überein.

Starke Abweichungen traten in Modell A auf (Abb. 4.8 a). Für dieses einfachste der drei Modelle, das den Versuch darstellte, die Daten mit nur einem einzigen Diffusionskoeffizienten zu beschreiben, war R^2 zum Teil doppelt so groß, wie für die beiden anderen Modelle. Der Fit bildete sowohl bei den Messungen der Einzelproteine als auch bei der Mischprobe nicht den Verlauf der Datenpunkte ab, sodass die resultierende Summe der Fehlerquadrate relativ groß war. Die aus diesem Modell resultierenden Berechnungen beschrieben damit die in den Messdaten enthaltenen Informationen nicht vollständig und wurden für eine Analyse der Diffusion nicht verwendet. Der Vollständigkeit halber sind sie in der Tabelle enthalten. Die Werte der Berechnungen aus B und C zeigten dagegen niedrige Abweichungen und waren für die Interpretation der Diffusion geeignet. Die Ursache hierfür lag in der Einführung eines weiteren Diffusionskoeffizienten D_2 (Modell B) bzw. einer exponentiellen Komponente in Form einer Relaxationszeit τ_R (Modell C). Der in allen Modellen ermittelte Diffusionskoeffizient der Proteine D_1 ist in der linken Spalte dargestellt und lag mit Werten von etwa 2 bis $6 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ in der Größenordnung, die mit konventioneller FCS für Membranproteine gemessen wurde (Chattopadhyay, 2002; Guigas, 2006; Doeven, 2008). Im Vergleich der Diffusionskoeffizienten von NpHtrII, NpSRII und der Mischung beider Proteine wurden für HtrII die größten Werte gemessen. Mit

$D_{\text{HtrII, B}} = (4,26 \pm 0,72) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ und $D_{\text{HtrII, C}} = (5,31 \pm 0,89) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ waren sie etwa doppelt so hoch wie die Diffusionskoeffizienten für SRII. Das sieben Membranhelizes umfassende sensorische Rhodopsin II diffundierte demnach halb so langsam in der Membran wie sein Transducer, der in der verkürzten Version nur aus zwei Membranhelizes bestand. Die Diffusionskoeffizienten der Mischung beider Proteine lagen zwischen den Werten D_{HtrII} und D_{SRII} . Bei diesen Messungen war nur NpHtrII fluoreszenzmarkiert, so dass die Verlangsamung der Diffusion nach Zugabe von NpSRII einen direkten Beleg für die Zunahme des Zylinder-Radius und damit für die Bildung von NpSRII/NpHtrII-Komplexen darstellt. Der prozentuale Anteil der Amplitude von D_1 zeigte mit etwa 70 % vom Gesamtsignal die dominante Rolle dieses Diffusionskoeffizienten. Im Vergleich zu den Parametern D_2 bzw. τ_R charakterisierte er den Großteil der auftretenden Prozesse.

Im Vergleich zum Diffusionskoeffizienten D_1 der Proteine lag D_2 in Modell B mit $2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ etwa eine Größenordnung höher. Nach jüngsten 2fFCS-Messungen liegt der Diffusionskoeffizient der Lipidmoleküle, die die Membranen bilden, bei $D_{\text{Lipid}} = 8 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ (von der Hocht, 2008). Ein mit D_2 diffundierendes Partikel müsste daher deutlich kleiner sein als diese kleinsten Einheiten der Lipidmembran. Da aber in der vorliegenden künstlichen Membran kein fluoreszierendes Partikel vorstellbar ist, der diese Bedingungen erfüllt, war eine Interpretation der zweiten Fitkomponente als Diffusionskoeffizient nicht sinnvoll. Stattdessen wurde mit Modell C zusätzlich zu D_1 ein Exponent eingeführt, der eine allgemeine Relaxationszeit τ_R beschrieb. Der Fit ergab für die Diffusion von NpSRII und der Mischprobe eine Relaxationszeit von etwa 2 ms. Damit kann er als Ausdruck intermolekularen Quenchens interpretiert werden. Die hohe Abweichungen R^2 in Fitmodell A zeigen, dass τ_R keinen artifiziellen Wert darstellt, sondern zur Beschreibung der Rohdaten nötig war. Dies wird auch durch Modell B bestätigt, in dem D_2 mit Gleichung 2.16 in Diffusionszeiten τ_D zurückgerechnet werden konnte, die ebenfalls im Bereich von etwa 2 ms lagen. Die Diffusion von NpHtrII bildete in den durchgeführten Messungen eine Besonderheit. In den Autokorrelationen dieser Spezies konnte sowohl eine durch D_2 oder τ_R ausgedrückte schnellere Komponente nicht immer gefunden werden. Aufgrund ihrer Konsistenz wurden die mit Modell C ermittelten Werte als finale Parameter interpretiert.

Aus dem linken Teil der Tabelle war eine Abschätzung der Partikelkonzentration möglich. In allen Fällen wurde zunächst aus der maximalen Amplitude $G(0)$ nach Gleichung 2.15 die Konzentration c der Fluoreszenzpartikel in den Anregungsfokussen errechnet und auf die Einheitsfläche Quadratzentimeter skaliert. Diese Konzentration c ist in fmol/cm^2 in der ersten Spalte der Konzentrationsberechnungen angegeben. Durch Multiplikation von c mit der Avogadrozahl $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ und dem

Markierungsverhältnis γ (0,5 – 1,0; Tab. 3.2) erhält man die Anzahl der Proteine pro Fläche. Sie ist in der nächsten Spalte dargestellt und als Flächendichte ρ bezeichnet. Da zusätzlich bei jeder Messung der Abstand zur Glasoberfläche notiert wurde, war für jede Flächendichte der korrespondierende GUV-Durchmesser bekannt. Auf diese Weise konnte die Anzahl der Proteine pro GUV abgeschätzt werden (Spalte ganz rechts).

Die Konzentration der diffundierenden Partikel lag zwischen 0,06 und 0,3 fmol/cm², was einer Flächendichte ρ von einigen hunderttausend bis Millionen Proteinen pro Quadratmillimeter entsprach, und damit einigen tausend Proteinen pro GUV. Die Konzentrationsberechnungen unterlagen mit Standardabweichungen von etwa 50 % deutlichen Schwankungen und bildeten daher nur Richtwerte. Dennoch waren sie für die Abschätzung des Protein-Lipid-Verhältnisses geeignet.

4.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die vorliegende Studie beschreibt erstmals mit 2fFCS ermittelte Diffusionskoeffizienten von Membranproteinen in Lipidmembranen. Die bisher einzige Studie zur Ermittlung der Diffusionskoeffizienten von Proteinen mit dieser Methode quantifiziert die Konformationsänderungen des cytosolischen Proteins Recoverin. Die dort veröffentlichten Kalzium-Bindungsstudien zeigen, dass mit 2fFCS auch kleinste Konformationsänderungen von 1 Å im Kugel-Radius detektiert werden können (von der Hocht, 2008). Da diese Messungen in Lösung erfolgten, wurden die Diffusionskoeffizienten mit dreidimensionalen Diffusionsmodellen beschrieben.

Die Anpassung der Messdaten erfolgte mit verschiedenen Fitmodellen, wobei die besten Ergebnisse unter Verwendung einer zusätzlichen exponentiellen Komponente erzielt wurden, durch die dynamisches Quenching der Fluorophore berücksichtigt wurde. Die Diffusionskoeffizienten von NpHtrII und NpSRII betragen $D_{\text{HtrII}} = (5,31 \pm 0,89) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ und $D_{\text{SRII}} = (2,56 \pm 0,70) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ und für das Gemisch beider Proteine $D_{\text{HtrII+SRII}} = (4,30 \pm 0,53) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$. Messungen der Proteindiffusion aus einer Vielzahl unabhängiger Präparationen ergaben sehr ähnliche Diffusionskoeffizienten, was die gute Reproduzierbarkeit der Fusion und die Zuverlässigkeit der Messung bestätigt. Die Flächendichte der Proteine in den GUV unterlag allerdings Schwankungen, die durch abweichende Proteinkonzentrationen nach Rekonstituierung hervorgerufen wurden. Dies wird auch durch die Schwankungen von 15 % ausgedrückt. In Extremfällen betragen sie bis zu 27 %. Eine zusätzliche Erhöhung der Toleranzen wird durch auftretende Temperaturschwankungen von $25,0 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ hervorgerufen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen der Diffusion von Membranproteinen konnten daher die extrem niedrigen Fehlertoleranzen von einigen

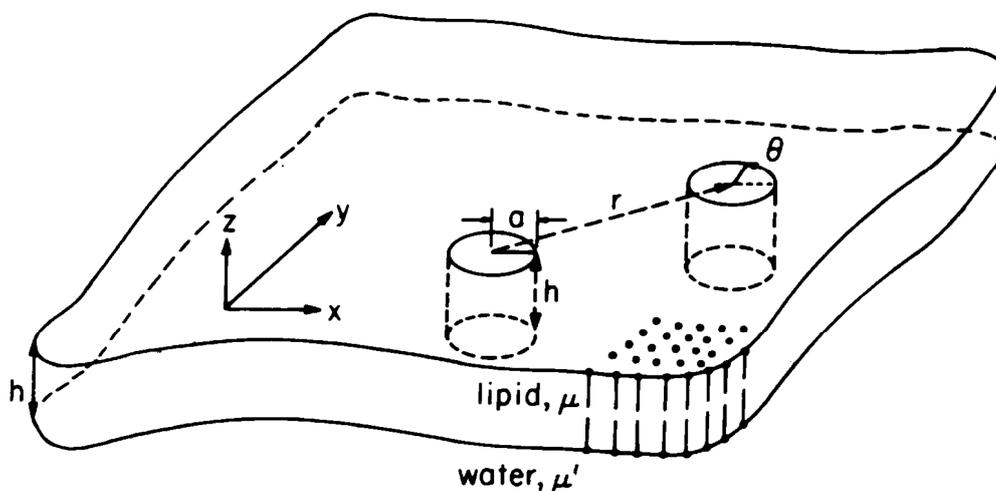
wenigen Prozent wie in vorangegangenen Studien nicht erreichen (Dertinger, 2007; von der Hocht, 2008).

Mit der Bestimmung der Diffusionskoeffizienten war die Berechnung der Zylinder-Radien der Proteine möglich (Doeven, 2008; Guigas, 2006). Durch Philip Saffman und Max Delbrück wurde 1975 eine logarithmische Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten vom Zylinderradius diffundierender Membranproteine postuliert (Saffman, 1975):

$$D_{Saffman} = \frac{k_B T}{4\pi\mu h} \left(\log \frac{\mu h}{\mu' R} - 0,5772 \right) \quad (4.1)$$

mit k_B = Boltzmannkonstante, T = absolute Temperatur, μ = Viskosität der Lipidmembran, h = Membrandicke, μ' = Viskosität des Umgebungsmediums, $R = a$ = Zylinderradius des diffundierenden Proteins (Abb. 4.9). In Abbildung 4.10 sind die Diffusionskoeffizienten von NpHtrII und NpSRII in Abhängigkeit ihrer Zylinder-Radien dargestellt. Die Radien der Monomere wurden anhand dreidimensionaler Proteine mit Hilfe des Programms O (Jones, 1991) bestimmt. Zusätzlich ist der Diffusionskoeffizient eines in der Membran diffundierenden Lipidmoleküls als Referenzwert aufgetragen (von der Hocht, 2008). Die drei Werte zeigen eine starke Abhängigkeit der Diffusionskoeffizienten von den Zylinder-Radien der Proteine. Auch sehr geringen Änderungen des Radius von weniger als 1 nm wirkten sich drastisch auf

Abb. 4.9: Schematische Darstellung des hydrodynamischen Modells eines in die Membran eingebetteten zylindrischen Partikels (aus Saffman, 1975). Der Partikel kann sich lateral in xy -Richtung bewegen und in z -Richtung drehen. Die Symbole sind im Text beschrieben.



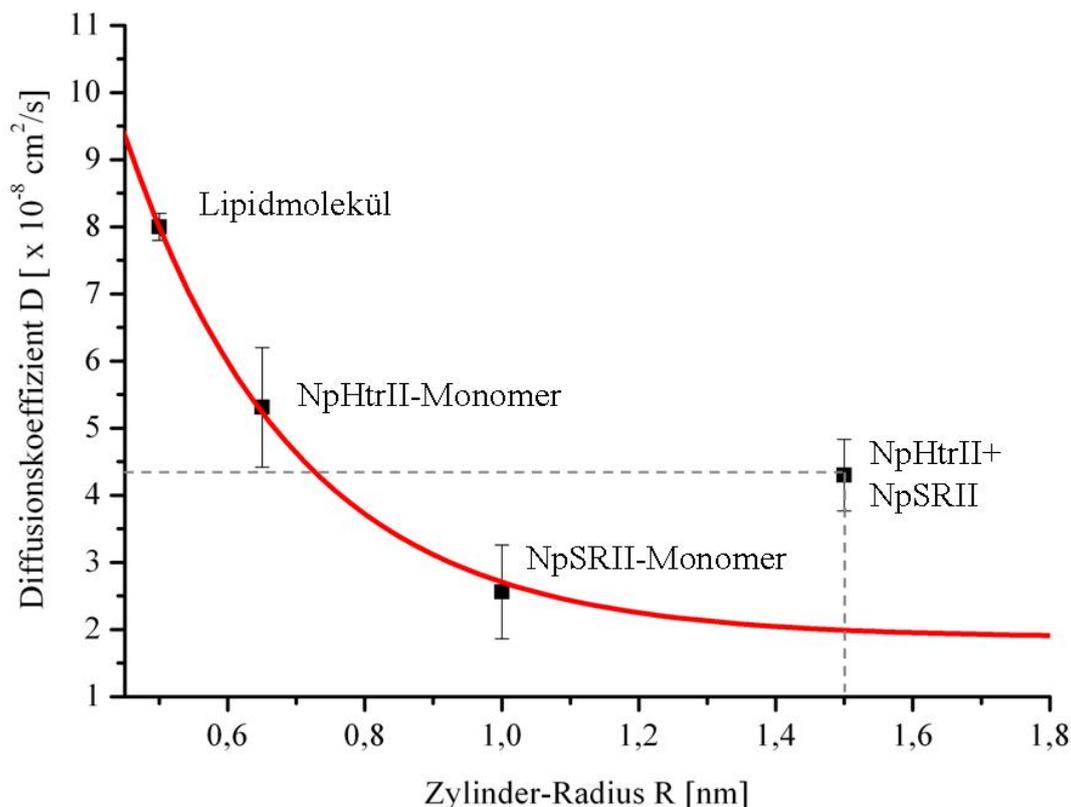


Abb. 4.10: Die Diffusionskoeffizienten D in Abhängigkeit der Zylinder-Radien R . Die rote Linie zeigt das $1/R$ -Verhalten des Diffusionskoeffizienten.

den Diffusionskoeffizienten aus. Dies steht im Widerspruch zum Modell von Saffman-Delbrück, nach dem sich der Diffusionskoeffizient durch eine logarithmische Abhängigkeit vom Zylinder-Radius erst bei wesentlich stärkeren Größenunterschieden ändert (Naji, 2007). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen dagegen eine $1/R$ -Abhängigkeit, wie sie bereits in anderen Studien festgestellt wurde (Gambin, 2006; Guigas, 2006). Der Diffusionskoeffizient der Mischprobe wurde dem Radius des Komplexes von 1,5 nm zugeordnet. Dieser Punkt entspricht nicht den Erwartungen aus dem Modell. Der Diffusionskoeffizient $D_{\text{HtrII+SRII}} = (4,30 \pm 0,53) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ wird darin einem Partikel mit $R = 0,75 \text{ nm}$ zugeordnet. Dem entsprechend wird für $R = 1,5 \text{ nm}$ ein Wert von $D \sim 2 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ erwartet. In der vorliegenden Studie ist der Diffusionskoeffizient nach Zugabe von NpSRII im Vergleich zu dem von NpHtrII jedoch bereits reduziert. Dieses Ergebnis deutet auf NpHtrII/NpSRII-Komplexbildung hin, jedoch erfolgte diese nicht vollständig, da der Diffusionskoeffizient nicht, wie für vollständige Bindung erwartet, unter dem Wert von NpSRII liegt oder diesen zumindest erreicht.

Diese unvollständige Bindung kann zwei verschiedene Ursachen haben:

1. Zum einen kann die Ursache in einer verminderten Konzentration des sensorischen Rhodopsins liegen. Bei der Rekonstituierung in LUV treten unterschiedliche Proteinverluste auf, die zu einem stöchiometrischen Ungleichgewicht der Proteine führen können. Eine Konzentrationsbestimmung des unmarkierten NpSR_{II} war nur ungenau möglich, da die Retinalbande mit einem molaren Absorptionskoeffizienten von $\epsilon_{\max} = 40.000 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}^{-1}$ im Vergleich zum Hintergrund der Vesikelstreuung nur sehr schwach ausgeprägt war. Auf diese Weise ist es möglich, dass nicht genug Bindungspartner für NpHtr_{II} vorlagen, um eine vollständige Komplexbildung zu ermöglichen. Diese Vermutung kann überprüft werden, indem NpSR_{II} in deutlichem molaren Überschuss in der Rekonstituierung eingesetzt wird.
2. Des Weiteren kann eine reduzierte Anzahl von NpSR_{II}/NpHtr_{II}-Komplexen natürlich ihre Ursache in der hohen Verdünnung der Proteine haben. Es ist denkbar, dass die Komplexbildung bei dem vorliegenden äußerst geringen Protein-Lipid-Verhältnis weniger stark ausgeprägt ist, und nicht mehr aus allen Monomeren NpSR_{II}/NpHtr_{II}-Komplexe gebildet werden. Auch diese These ist experimentell überprüfbar, indem die Proteinkonzentration und damit die mittleren Abstände der Bindungspartner geringfügig erhöht werden. Dafür müssen lediglich mehr Proteoliposomen in die GUV hineinfusioniert werden. Bei einer fünf- oder zehnfachen Erhöhung der Proteinkonzentration sollte die Anzahl der vorliegenden NpSR_{II}/NpHtr_{II}-Komplexen größer sein.

Um diese Wechselwirkung im Hinblick auf ihre biologische Relevanz einzuordnen, ist eine Bestimmung des Protein-Lipid-Verhältnisses erforderlich. Durch die Verteilung der eingefusionierten Proteine auf eine hundertfach größere Fläche als in LUV wurden die Proteine stark verdünnt. Die Konzentrationsmessungen in GUV ergaben eine Konzentration von einigen tausend Proteinen pro Vesikel. Das molare Protein-Lipid-Verhältnis betrug bei einem mittleren GUV-Durchmesser von $30 \mu\text{m}$ etwa $1:1.000.000$. Die resultierende Flächendichte der diffundierenden Partikel lag bei $0,17$ bis $0,31 \text{ fmol/cm}^2$, was im Mittel $1 \cdot 10^8$ Proteinen pro cm^2 entsprach. In Bakterien kommen etwa 430 SR_{II}-Moleküle pro Zelle vor (Otomo, 1989). Mit einem für Halobakterien typischen Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ und einer Länge von $7 \mu\text{m}$ (Rodriguez-Valera, 2002) ergibt das eine Flächendichte von etwa $9 \cdot 10^8$ Proteinen pro cm^2 . Durch die Fusion der Proteoliposomen konnten also *in vitro* physiologisch relevante Protein-Lipid-Verhältnisse eingestellt werden. Der ermittelte Diffusionskoeffizient der Mischung aus NpSR_{II} und NpHtr_{II} kann damit wichtige Informationen liefern. Die Verlangsamung der Diffusion

bei Anwesenheit beider Spezies in derselben Membran im Vergleich zur reinen Diffusion von NpHtrII ist nur durch Bindung von NpSRII und NpHtrII erklärbar. Damit folgt der Schluss, dass auch bei sehr niedrigen molaren Protein-Lipid-Verhältnissen von 1:1.000.000 eine Bindung beider Proteine erfolgt.

Die vorliegenden Änderungen der Zylinderradien sprechen für die Bildung von 1:1-Komplexen unter diesen Bedingungen. Ausgedehntere Proteinoligomere mit wesentlich größeren Zylinder-Radien konnten in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. Die bei hohen Protein-Lipid-Verhältnissen von 1:50 (mol/mol) beschriebenen 2:2-Komplexe von NpSRII und seines verkürzten Transducers NpHtrII₁₅₇ (Gordeliy, 2002; Wegener, 2001) werden daher bei physiologisch niedrigen Protein-Lipid-Verhältnissen von etwa 1:1.000.000 nicht ausgebildet. Möglicherweise ist dafür die cytoplasmatische Domäne von NpHtrII erforderlich, die bei der verwendeten Mutante fehlt. Dieser Domäne wird auch die Initiation von Clustern zugeschrieben (Hazelbauer, 2008), die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht beobachtet werden konnten. Weiterführende Experimente mit der vollen Länge des NpHtrII (Mennes, 2007) können Aufschluss über diese Vermutungen geben.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Akashi K.-I., Miyata H., Itoh H., Kinoshita K., Preparation of Giant Liposomes in Physiological Conditions and Their Characterization under an Optical Microscope, *Biophysical Journal* 71 (1996) 3242-3250.
- [2] Angelova M. I., Soléau S., Méléard Ph., Faucon J. F., Bothorel P., Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications, *Progr Colloid Polym Sci* 89 (1992) 127-131.
- [3] Balannik V., Lamb R. A., Pinto L. H., The Oligomeric State of the Active BM2 Ion Channel Protein of Influenza B Virus, *J Biol Chem.* 283 (2008) 4895-4904.
- [4] Balashov S. P., Imasheva E. S., Boichenko V. A., Anton J., Wang J. M., Lanyi J. K., Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna., *Science* 309 (2005) 2061-2064.
- [5] Banachowicz E., Light scattering studies of proteins under ompression., *Biochimica et Biophysica Acta* 79 (2006) 747-752.
- [6] Becker C. F. W., Seidel R., Jahnz M., Bacia K., Niederhausen T., Alexandrov K., Schwille P., Goody R. S., Engelhard M., C-Terminal Fluorescence Labeling of Proteins for Interaction Studies on the Single-Molecule Level, *ChemBioChem* 7 (2006) 891-895.
- [7] Beja O., Aravind L., Koonin E. V., Suzuki M. T., Hadd A., Nguyen L. P., Jovanovich S. B., Gates C. M., Feldman R. A., Spudich J. L., Spudich E. N., DeLong E. F., Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea, *Science* 289 (2000) 1902-1906.
- [8] Bergo V. B., Spudich E. N., Rothschild K., Spudich J. L., Photoactivation Perturbs the Membrane-embedded Contacts between Sensory Rhodopsin II and its Transducer, *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2005) 28365-28369.
- [9] Bohlinger P.-Y., Stamou D., Vogel H., Integrated Nanoreactor systems: Triggering the Release and Mixing of Compounds Inside Single Vesicles., *JACS* 126 (2004) 8594-8595.
- [10] Bordignon E., Klare J. P., Doebber M., Wegener A., Martell S., Engelhard M., Steinhoff H.-J., The linker region of the phototransducer in complex with sensory rhodopsin II, *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2005) 38767-38775.

-
- [11] Boukobza E., Sonnenfeld A., Haran G., Immobilization in Surface-Tethered Lipid Vesicles as a New Tool for Single Biomolecule Spectroscopy, *J. Phys. Chem.* 105 (2001) 12165-12170.
- [12] Brehs M., Photorezeptor/Transducer Komplexbildung untersucht mit FRET, Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2008).
- [13] Budyak I. L., Pipich V., Mironova O. S., Schlesinger R., Zaccai G., Klein-Seetharaman J., Shape and oligomerization state of the cytoplasmic domain of the phototaxis transducer II from *Natronobacterium pharaonis*, *PNAS* 103 (2006) 15428-15433.
- [14] Buschmann V., Weston K. D., Sauer M., Spectroscopic Study and Evaluation of Red-Absorbing Fluorescent Dyes, *Bioconjugate Chem.* 14 (2003) 195-204.
- [15] Chattopadhyay K., Saffarian S., Elson E. L., Frieden C., Measurement of microsecond dynamic motion in the intestinal fatty acid binding protein by using fluorescence correlation spectroscopy, *PNAS* 99 (2002) 14171-14176.
- [16] Chernomordik L. V., Chanturiya A., Green J., Zimmerberg J., The hemifusion intermediate and its conversion to complete fusion: regulation by membrane composition., *Biophysical Journal* 69 (1995) 922-929.
- [17] Chizhov I., Schmies G., Seidel R., Sydor J. R., Lüttenberg B., Engelhard M., The Photophobic Receptor from *Natronobacterium pharaonis*: Temperature and pH Dependencies of the Photocycle of Sensory Rhodopsin II, *Biophysical Journal* 75 (1998) 999-1009.
- [18] Cicuta P., Keller S. L., Veatch S. L., Diffusion of Liquid Domains in Lipid Bilayer Membranes, *The Journal of Physical Chemistry B* 111 (2007) 3328-3331.
- [19] Corry B., Rigby P., Liu Z.-W., Martinac B., conformational changes Involved in MscL channel Gating Measured using FRET Spectroscopy, *Biophysical Journal: Biophysical Letters* (2005) L49-L51.
- [20] Das S. K., Darshi M., Cheley S., Wallace M. I., Bayley H., Membrane Protein Stoichiometry Determined from the Step-Wise Photobleaching of Dye-Labelled Subunits, *ChemBioChem* 8 (2007) 994-999.
- [21] de Arcuri B. F., Vechetti G. F., Chehín R. N., Goni G. M., Morero R. D., Protein-Induced Fusion of Phospholipid Vesicles of Heterogeneous Sizes, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262 (1999) 586-590.
- [22] Dencher N., Gentle and Fast Transmembrane Reconstitution of Membrane Protein, *Methods in Enzymology* 171 (1989) 265-274.

-
- [23] Dertinger T., Pacheco V., von der Hocht I., Hartmann R., Gregor I., Enderlein J., Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements, *ChemPhysChem* 8 (2007) 433-443.
- [24] Diller R., Jakober R., Schumann C., Peters F., Klare J. P., Engelhard M., The trans-cis Isomerization Reaction Dynamics in Sensory Rhodopsin II by Femtosecond Time-Resolved Midinfrared Spectroscopy: Chromophore and Protein Dynamics, *Biopolymers* 82 (2006) 358-362.
- [25] Doeven K., Folgering J. H. A., Krasnikov V., Geertsma E. R., van den Bogaart G., Poolman B., Distribution, Lateral Mobility and Function of Membrane Proteins Incorporated into Giant Unilamellar Vesicles, *Biophysical Journal* 88 (2005) 1134-1142.
- [26] Doeven K., van den Bogaart G., Krasnikov V., Poolman B., Probing receptor-translocator interactions in the oligopeptide ABC transporter by fluorescence correlation spectroscopy., *Biophysical Journal* 94 (2008) 3956-3965.
- [27] Ehresmann B., Imbault P., Weil J. H., Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's., *Anal Biochem.* 54 (1973) 454-463.
- [28] Enderlein J., Gregor I., Patra D., Fitter J., Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy., *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5 (2004) 231-241.
- [29] Gambin Y., Lopez-Esparza R., Reffay M., Sieracki E., Gov N. S., Genest M., Hodges R. S., U. W., Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited, *PNAS* 103 (2006) 2098-2102.
- [30] Gordeliy V. I., Labahn J., Moukhametzianov R., Efremov R., Granzin J., Schlesinger R., Büldt G., Savopol T., Scheidig A. J., Klare J. P., Engelhard M., Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex, *Nature* 419 (2002) 484-487.
- [31] Grasberger B., Minton A. P., DeLisi C., Metzger H., Interaction between proteins localized in membranes, *PNAS* 83 (1986) 6258-6262.
- [32] Guigas G., Weiss M., Size-Dependent Diffusion of Membrane Inclusions, *Biophysical Journal* 91 (2006) 2393-2398.
- [33] Haustein E., Schwille P., Fluorescence Correlation Spectroscopy: Novel Variations of an Established Technique, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36 (2007) 151-169.
- [34] Hazelbauer G. L., Falke J. J., Parkinson J. S., Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays, *Trends in Biochemical Sciences* 33 (2008) 9-19.

- [35] Helenius A., Simons K., Solubilization of Membranes by Detergents, *Biochimica et Biophysica Acta* 415 (1975) 29-79.
- [36] Heyn M. P., Cherry r. J., Dencher N. A., Lipid-Protein Interactions in Bacteriorhodopsin-Dimyristoylphosphatidylcholine Vesicles, *Biochemistry* 20 (1981) 840-849.
- [37] Hippler-Mreyen S., Klare J. P., Wegener A. A., Seidel R., Herrmann C., Schmies G., Nagel G., Bamberg E., Engelhard M., Probing the Sensory Rhodopsin II binding Domain of its Cognate Transducer by Calorimetry and Electrophysiology, *J. Mol. Biol.* 330 (2003) 1203-1213.
- [38] Holloway P.W., A Simple Procedure for Removal of Triton X-100 from Protein Samples, *Analytical Biochemistry* 53 (1973) 304-308.
- [39] Inoue K., Sasaki J., Spudich J. L., Terazima M., Laser-Induced Transient Grating Analysis of Dynamics of Interaction between Sensory Rhodopsin II D75N and the Htr II Transducer, *Biophysical Journal* 92 (2007) 2028-2040.
- [40] Jares-Erijman A. E., Jovin T. M., FRET imaging, *Nature Biotechnology* 21 (2003) 1387-1395.
- [41] Jones T. A., Zou J. Y., Cowan S. W., Kjeldgaard M., Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models., *Acta Crystallogr.* 47 (1991) 110-119.
- [42] Jung K.-H., The Distinct Signaling Mechanisms of Microbial Sensory Rhodospins in Archaea, Eubacteria and Eukarya, *Photochem Photobiol.* 83 (2007) 63-69.
- [43] Jung K.-H., Spudich E. N., Trivedi V. D., Spudich J. L., An Archaeal Photosignal-Transducing Module Mediates Phototaxis in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* 183 (2001) 6365-6371.
- [44] Kahya N., Douwe A., Wiersma D. A., Poolman B., Hoekstra D., Spatial Organisation of Bacteriorhodopsin in Model Membranes, *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) 39304-39311.
- [45] Kahya N., Pécheur E.-I., de Boeij W.P., Wiersma D. A., Hoekstra D., Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles via Peptide-Induced Fusion, *Biophysical Journal* 81 (2001) 1464-1474.
- [46] Kates M., Kushawaha S. C., Sprott G. D., Lipids of Purple Membrane from Extreme Halophiles and of Methanogenic Bacteria, *Methods in Enzymology* 88 (1982) 98-111.
- [47] Kim K. K., Yokota H., Kim S.-H., Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor., *Nature* 400 (1999) 787-792.

-
- [48] Kim S.-H., Wang W., Kyeong K. K., Dynamic and clustering model of bacterial chemotaxis receptors: Structural basis for signaling and high sensitivity, 2002 99 (2002) 11611-11615.
- [49] Klare J. P., Strukturelle und funktionelle Untersuchungen des photophoben Rezeptor/Transducer-Komplexes aus *Natronobacterium pharaonis*, Dissertation, Universität Dortmund, Fachbereich Chemie (2002).
- [50] Klare J. P., Bordignon E., Doebber M., Fitter J., Kriegsmann J., Chizhov I., Steinhoff H.-J., Engelhard M., Effects of Solubilization on the Structure and Function of the Sensory Rhodopsin II/Transducer Complex, *J. Mol. Biol.* 356 (2006) 1207-1221.
- [51] Klare J. P., Gordeliy V. I., Labahn J., Büldt G., Steinhoff H.-J., Engelhard M., The archaeal sensory rhodopsin II/transducer complex: a model for transmembrane signal transfer, *FEBS Letters* 564 (2004) 219-224.
- [52] Korlach J., Schwille P., Webb W. W., Feigenson G. W., Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy, *PNAS* 96 (1999) 8461-8466.
- [53] Kozlov M. M., Leikin S. L., Chernomordik L. V., Markin V. S., Chizmadhev Y. A., Stalk mechanism of vesicle fusion. Intermixing of aqueous contents., *Eur Biophys J* 17 (1989) 121-129.
- [54] Lakowicz J. R., Principles of fluorescence spectroscopy, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York (1999).
- [55] Lei G., MacDonald R. C., Lipid Bilayer Vesicle Fusion: Intermediates Captured by High-Speed Microfluorescence Spectroscopy, *Biophysical Journal* 85 (2003) 1585-1599.
- [56] Li E., You M., Hristova K., Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and forster resonance energy transfer suggest weak interactions between fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane domains in the absence of extracellular domain and ligands., *Biochemistry* 44 (2005) 352-360.
- [57] Lücke H., Schobert B., Lanyi J. K., Spudich E. N., Spudich J. L., Crystal structure of sensory rhodopsin II at 2,4 anstroms: insights into color tuning and transducer interaction., *Science* 293 (2001) 1499-1503.
- [58] Luzzati V., Biological Membranes. (Academic Press, New York, 1986).
- [59] Maddock J. R., Shapiro L., Polar Location of the Chemoreceptor Complex in the *Escherichia coli* Cell, *Science* 259 (1993) 1717-1723.

- [60] Majumdar Z. K., Hickerson R., Noller H. F., Clegg R. M., Measurements of Internal Distance Changes of the 30 S Ribosome Using FRET with Multiple Donor-Acceptor Pairs: Quantitative Spectroscopic Methods, *J. Mol. Biol.* 351 (2005) 1123-1145.
- [61] Mansoor S. E., Palczewski K., Farrens D. L., Rhodopsin self-associates in asolectin liposomes., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3060-3065.
- [62] Marmé N., Knemeyer J.-P., Sauer M., Wolfrum J., Inter- and Intramolecular Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan, *Bioconjugate Chem.* 14 (2003) 1133-1139.
- [63] Mennes N., Klare J. P., Chizhov I., Seidel R., Schlesinger R., Engelhard M., Expression of the halobacterial transducer protein Htr II from *Natronomonas pharaonis* in *Escherichia coli*, *FEBS Letters* 581 (2007) 1487-1494.
- [64] Mercier J. F., Salahpour A., Angers S., Breit A., Bouvier M., Quantitative assessment of beta 1- and beta2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer., *J Biol Chem.* 277 (2002) 44925-44931.
- [65] Montes L.-R., Alonso A., Goni F. M., Bagatolli L. A., giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions, *Biophysical Journal* 93 (2007) 3548-3554.
- [66] Moukhametzianov R., Klare J. P., Efremov R., Baeken C., Göppner A., Labahn J., Engelhard M., Büldt G., Gordeliy V. I. , Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer, *Nature* 440 (2006) 115-119.
- [67] Naji A., Levine A. J., Pincus P. A., Corrections to the Saffman-Delbrück mobility for Membrane Bound Proteins, *Biophysical Journal* 93 (2007) L49-51.
- [68] Oesterhelt D., Stoeckenius W., Functions of a new photoreceptor membrane, *PNAS* 70 (1973) 2853-2857.
- [69] Oprian D. D., Phototaxis, chemotaxis an the missing link., *Trends Biochem Sci* 28 (2003) 167-169.
- [70] Otomo J., Marwan W., Oesterhelt D., Desel H., Uhl R., Biosynthesis of the Two Halobacterial Light Sensors P₄₈₀ and Sensory Rhodopsin an Variation in Gain of Their Signal Transduction Chains, *Journal of Bacteriology* 171 (1989) 2155-2159.
- [71] Overton M. C., Blumer K. J., Use of fluorescence resonance energy transfer to analyze oligomerization of G-protein-coupled receptors expressed in yeast., *Methods* 27 (2002) 324-332.
- [72] Parmar M. M., Edwards K., Madden T. D., Incorporation of bacterial membrane proteins into liposomes: factors influencing protein reconstitution, *Biochimica et Biophysica Acta* 1421 (1999) 77-90.

-
- [73] Pebay-Peyroula E., Royant A., Landau E. M., Navarro J., Structural basis for sensory rhodopsin function, *Biochimica et Biophysica Acta* 1565 (2002) 196-205.
- [74] Pécheur E.-I., Hoekstra D., Sainte-Marie J., Maurin L., Bienvenüe A., Philippot J. R., Membrane Anchorage Brings About Fusogenic Properties in a Short Synthetic Peptide, *Biochemistry* 36 (1997) 3773-3781.
- [75] Pécheur E.-I., Sainte-Marie J., Bienvenüe A., H. D., Lipid Headgroup Spacing and Peptide Penetration, but Not Peptide Oligomerization, Modulate Peptide-Induced Fusion, *Biochemistry* 38 (1999) 364-373.
- [76] Przybylo M., Sýkora J., Humpolícková J., Benda A., Zan A., Hof M., Lipid Diffusion in Giant Unilamellar Vesicles Is More than 2 Times Faster than in Supported Phospholipid Bilayers under Identical Conditions, *Langmuir* 22 (2006) 9096-9099.
- [77] Puu G., Artursson E., Gustafson I., Lundström M., Jass J., Distribution and stability of membrane proteins in lipid membranes on solid supports, *Biosensors & Bioelectronics* 15 (2000) 31-41.
- [78] Rigaud J.-L., Levy D., Mosser G., Detergent removal by non-polar polystyrene beads, *Eur Biophys J* 27 (1998) 305-319.
- [79] Rigaud J.-L., Mosser G., Lacapere J. J., Olofsson A., Levy D., Ranck J.-L., Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins., *J Struct Biol* 118 (1997) 226-235.
- [80] Rigaud J.-L., Pitard B., Levy D., Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins, *Biochimica et Biophysica Acta* 1231 (1995) 223-246.
- [81] Rodrigues-Valera F., *Halophilic Bacteria* (CRC Press, 2002).
- [82] Rodriguez N., Pincet F., Cribier S., Giant vesicle formed by gentle hydration and electroformation: A comparison by fluorescence microscopy, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 42 (2005) 125-130.
- [83] Royant A., Nollert P., Edman K., Neutze R., Landau E. M., Pebay-Peyroula E., Navarro J., X-ray structure of sensory rhodopsin II at 2.1-Å resolution, *PNAS* 98 (2001) 10131-10136.
- [84] Saffman P. G., Delbrück M., Brownian motion in biological membranes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3111-3113.
- [85] Schwille P., Kahya N., Bacia K., *Protein-Lipid Interactions* (2005).
- [86] Scotto A. W., Zakim D., Reconstitution of Membrane Proteins, *The Journal of Biological Chemistry* 263 (1988) 18500-18506.

- [87] Sharma M. K., Jattani H., Gilchrist M. L. Jr., Bacteriorhodopsin Conjugates as Anchors for Supported Membranes, *Bioconjugate Chem.* 15 (2004) 942-947.
- [88] Shimizu T. S., Le Novère N., Levin M. D., Beavil A. J., Sutton B. J., Bray D., Molecular model of a lattice of signalling proteins involved in bacterial chemotaxis, *Nature Cell Biology* 2 (2000) 792-796.
- [89] Soliman G. S. H., Trüper H. G., *Halobacterium pharaonis* sp. nov., a new extremely haloalkaliphilic archaeobacterium with low magnesium requirement, *Zentralbl. Bakteriologie, Abt. 1: Orig C* (1982) 318.
- [90] Spudich J. L., Spotlight on receptor/transducer interaction, *Nature Structural Biology* 9 (2002) 797-799.
- [91] Spudich J. L., The multitasking microbial sensory rhodopsins, *Trends in Microbiology* 14 (2008) 480-487.
- [92] Spudich J. L., Luecke H., Sensory rhodopsin II: functional insights from structure, *Curr Opin Struct Biol* 12 (2002) 540-546.
- [93] Struck D. K., Hoekstra D., Pagano R., Use of Resonance Energy Transfer To Monitor Membrane Fusion, *Biochemistry* 20 (1981) 4093-4099.
- [94] Stryer L., Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler, *Annu. Rev. Biochem.* 47 (1978) 819-846.
- [95] Sudo Y., Iwamoto M., Shimono K., Kamo N., Role of Charged Residues of pharaonis Phoborhodopsin (Sensory Rhodopsin II) in Its Interaction with the Transducer Protein, *Biochemistry* 43 (2004) 13748-13754.
- [96] Sudo Y., Iwamoto M., Shimono K., K. N., Pharaonis phoborhodopsin binds to its cognate truncated transducer even in the presence of a detergent with a 1:1 stoichiometry, *Photochem Photobiol.* 74 (2001) 489-494.
- [97] Sudo Y., Yamabi M., Kato S., Hasegawa C., Iwamoto M., Shimono K., K. N., Importance of Specific Hydrogen Bonds of Archaeal Rhodopsins for the Binding to the Transducer Protein, *J. Mol. Biol.* 357 (2006) 1274-1282.
- [98] Taniguchi Y., Ikehara T., Kamo N., Watanabe Y., Yamasaki H., T. Y., Application of fluorescence resonance energy transfer (FRET) to investigation of light-induced conformational changes of the phoborhodopsin/transducer complex., *Photochem Photobiol.* 83 (2007) 311-316.
- [99] Taniguchi Y., Ikehara T., Kamo N., Yamasaki H., Toyoshima Y., Dynamics of Light-Induced Conformational Changes of the Phoborhodopsin/Transducer Complex in the n-Dodecyl β -D-Maltoside Micelle, *Biochemistry* 46 (2007) 5349-5357.

-
- [100] Tindall B. J., Ross H. N. M., Grant W. D., *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., Two New Genera of Haloalkaliphilic Archaeobacteria, *System. Appl. Microbiol.* 5 (1984) 41-57.
- [101] von der Hocht I., *Fluorescence Spectroscopy of Recoverin Function and Conformation*, Dissertation, Universität Köln, Fachbereich Biochemie (2008).
- [102] Wegener A. A., Klare J. P., Engelhard M., S. H.-J., Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis., *EMBO J.* 20 (2001) 5312-5319.
- [103] Weiss S., *Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules*, *Science* 283 (1999) 1676-1683.
- [104] Woodle M. C., Papahadjopoulos D., *Liposome Preparation and Size Characterization*, *Methods in Enzymology* 171 (1989) 193-217.
- [105] Yamaguchi S., Shimono K., Sudo Y., Tuzi S., Naito A., Kamo N., H. Saitô, Conformation and Dynamics of the [3-¹³C]Ala, [1-¹³C]Val-Labeled Truncated pharaonis Transducer, pHtrII(1-159), as Revealed by Site-directed ¹³C solid-State NMR: Changes Due to Association with Phoborhodopsin (Sensory Rhodopsin II), *Biophysical Journal* 86 (2004) 3131-3140.
- [106] Yang C.-S., Sineshchekov O., Spudich E. N., Spudich J. L., The Cytoplasmic Membrane-proximal Domain of the HtrII Transducer interacts with the E-F Loop of Photoactivated *Natronomonas Pharaonis* Sensory Rhodopsin II, *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 42970-42976.
- [107] Yoshida H., Sudo Y., Shimono K., Iwamoto M., K. N., Transient movement of helix F revealed by photo-induced inactivation by reaction of a bulky SH-reagent to cysteine-introduced pharaonis phoborhodopsin (sensory rhodopsin II), *Photochem Photobiol.* 3 (2004) 537-542.
- [108] You M., Li E., Wimley W. C., Hristova K., Förster resonance energy transfer in liposomes: Measurements of transmembrane helix dimerization in the native bilayer environment, *Analytical Biochemistry* 340 (2005) 154-164.
- [109] Zakim D., Scotto A. W., *Spontaneous Insertion of Integral Membrane Proteins into Preformed Unilamellar Vesicles*, *Methods in Enzymology* 171 (1989) 253-264.
- [110] Zhang P., Khursigara C. M., Hartnell L. M., Subramaniam S., Direct visualization of *Escherichia coli* chemotaxis receptor arrays using cryo-electron microscopy, *PNAS* 104 (2007) 3777-3781.

*Alles muss klein beginnen,
lass etwas Zeit verrinnen
es muss nur Kraft gewinnen
– und schließlich ist es groß.*

Gerhard Schöne

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mir geholfen haben, mit und an meiner Doktorarbeit zu wachsen, insbesondere dem gesamten Institut für Neurobiologie und Biophysik 2 am Forschungszentrum Jülich:

PD DR. JÖRG FITTER, meinem Doktorvater, für die sehr angenehme Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die gute wissenschaftliche Anleitung,

PROF. DR. GEORG BÜLDT für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Forschungszentrum Jülich anfertigen zu können und für die großzügigen wissenschaftlichen Freiheiten,

PROF. DR. JÖRG ENDERLEIN (Universität Tübingen), als Entwickler des 2-Fokus-FCS unentbehrlicher Ratgeber bei der Datenanalyse und sehr inspirierenden Gesprächspartner,

PROF. DR. DIETER WILLBOLD für seine nette Unterstützung,

DR. IRIS VON DER HOCHT für die außerordentlich produktiven und freundschaftlichen Diskussionen und die vielen Tipps und Tricks bei der GUV-Präparation,

DR. INGO GREGOR für seine unbedingte Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und sein geballtes Wissen in Matlab,

PROF. DR. MARTIN ENGELHARD, DR. JOHANN KLARE UND ANNIKA GÖPPNER (MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund) für die gute Zusammenarbeit und die Anfertigung der Proteinmutanten,

ILONA RITTER, CHRISTIAN BAEKEN, BIRGIT GEHRMANN, DR. RAMONA SCHLESINGER, SASCHA LEHMANN und für ihre nette Unterstützung in den Dingen des Alltags,

unseren Diplomanden MANUEL BREHS, TOBIAS ROSENKRANZ, KARL-HEINZ „KALLE“ STRUCKSBERG und CIHAN DUY für die interessanten und lustigen Gespräche, insbesondere Manuel für seine praktische Entlastung in stressigen Phasen, sowie

DR. RENU BATRA-SAFFERLING für die lustige und freundschaftliche Bürogesellschaft.

I also would like to thank all my colleagues from foreign countries, who taught me a lot about their cultures: my co-PhD-students DIAA ATTA, PALLAVI THIAGARAJAN, ALEXANDROS KATRANIDIS, EKATERINA MOISEEVA, and many others.

Nicht zuletzt bedanke ich mich auch für die Förderung durch die DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT in Form eines Stipendiums vom GRADUIERTENKOLLEG BIOINTERFACE der RWTH AACHEN.

Ganz besonders herzlich möchte ich meiner Familie danken. Meine Eltern BERND und CHRISTINE KRIEGSMANN haben stets im Hintergrund die Daumen gedrückt und während meiner viermonatigen krankheitsbedingten Zwangspause liebevoll für mich gesorgt. Meine lieben Freunde KATRIN BERGHAIN und MARCUS MERKEL haben mir mit guten Tipps über Unstimmigkeiten hinweggeholfen. Aber die größte Hilfe bist Du, SÖREN PANSE. Ich danke Dir, dass Du mich immer wieder aufs Neue frei machst.

Jetzt ist es vollbracht!

Vielen herzlichen Dank.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Doktorarbeit eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die vorgelegte Dissertation ist in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht worden.

Jana Kriegsmann,
Schwalmtal, 26. Mai 2008