



Institut für Biologische Informationsverarbeitung
Institut 2: Biologische Strukturforschung

***Halorhodopsin – Klonierung, Expression,
Kristallisation und spektroskopische
Untersuchungen zum Mechanismus
dieser Anionenpumpe***

Dirk Fastermann

***Halorhodopsin – Klonierung, Expression,
Kristallisation und spektroskopische
Untersuchungen zum Mechanismus
dieser Anionenpumpe***

Dirk Fastermann

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3934
ISSN 0944-2952
Institut für Biologische Informationsverarbeitung
Institut 2: Biologische Strukturforschung Jül-3934
D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2001)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-52 20 · Telefax: 02461/61-61 03 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Halorhodopsin – cloning, expression, crystallization and spectroscopic investigations on the mechanism of this anion pump

Four retinal proteins have been discovered in *Halobacterium salinarum*: The sensory rhodopsins I and II which function as photoreceptors and bacteriorhodopsin (bR) and halorhodopsin (hR) which function as ion pumps. In this work, functional investigations of the anion pump hR were undertaken, with the main focus on the mechanistic analysis of the light-driven anion transport.

In order to overexpress hR, the hR gene was first linked to the promoter of bR. The expression took place in the bR negative strain L33 from *H. salinarum*. The expression level of this fusion construct was so high that hR crystallized *in vivo* in a two-dimensional lattice. Due to this, it was possible to isolate and to purify hR in a membrane-bound state. For the crystallization and spectroscopic measurements a purification method was established which preserves native structural and functional integrity.

Crystallization trials with solubilized hR using sitting drop and cubic lipidic phase method were performed. With the cubic lipidic phase, it was possible to get three dimensional crystals, but they showed no diffraction.

The chloride dependency of the hR photocycle was studied with spectroscopic measurements employing a non-time resolved chloride titration of hR membrane patches. The difference absorbance spectra showed three different states (at 540 nm, 580 nm and 650 nm) which depend on the chloride concentration. The chloride progression of the states showed three potential binding constants for chloride to hR.

Two photocycle models, one in the absence and one in the presence of chloride, were formulated from the time resolved visible measurements. Specifically, the photocycle model without chloride suggests two states: hR₅₄₀ and hR-K₆₅₀, whereas the photocycle model with chloride suggests three states: hR₅₈₀, hR-K₆₅₀ and hR-L₅₂₀. The photocycle without chloride is much faster. Chloride dependent investigations were also done with time-resolved FT-IR spectroscopy in combination with the ATR technique. With increasing chloride concentration, the formation of the hR-L intermediate was accelerated. On the other hand, the decay of the L intermediate is slowed down with increasing chloride concentration. At very high chloride concentrations, e.g. 5 M, differences in the amide I region between early and late hR-L difference spectra were detected. This implies structural changes in the protein backbone. This was corroborated with linear dichroism. The chloride dependent formation of the hR-L₁ and the decay of the hR-L₂ intermediate implies that the chloride uptake takes place during the transition from the hR-K intermediate to the hR-L₁ intermediate. In addition the transfer of the chloride to the cytoplasm occurs between the hR-L₂ intermediate and the ground state.

Halorhodopsin – Klonierung, Expression, Kristallisation und spektroskopische Untersuchungen zum Mechanismus dieser Anionenpumpe

In *Halobacterium salinarum* wurden bisher 4 Retinalproteine gefunden. Die Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) sowie die phototaktischen Proteine Sensorrhodopsin I (SRI) und Sensorrhodopsin II (SRII). Gegenstand dieser Arbeit waren funktionelle Untersuchungen der Anionenpumpe HR, wobei der Schwerpunkt auf der Analyse des Mechanismus des lichtgetriebenen Anionentransportes lag.

Zunächst wurde das HR-Gen mit dem Promotor von BR verknüpft. Die Überexpression erfolgte in dem BR-negativen *H. salinarum* Stamm L33. Dabei wurde die Expression durch den BR-Promotor so verstärkt, dass HR *in vivo* zweidimensional kristallisierte. Zudem konnte HR durch diese Anordnung in den Membranfragmenten sehr einfach im membrangebundenen Zustand erhalten werden. Um das Protein zur Kristallisation und für spektroskopische Untersuchungen einzusetzen, wurde eine schonende Reinigungsmethode etabliert.

Kristallisationsversuche mit dem solubilisierten Membranprotein mittels Dampfdiffusion und kubischer Lipidphase wurden durchgeführt. Mit der kubischen Lipidphase konnten dreidimensionale Kristalle erhalten werden, die allerdings keine Diffraktion zeigten.

Um die Chloridabhängigkeit des HR-Photozyklus zu untersuchen, erfolgte zunächst eine statische Chloridtitration von HR-Membranen. In den Absorptionsdifferenzspektren konnten drei verschiedene Zustände (bei 540 nm, 580 nm und 650 nm) mit in Abhängigkeit der Chloridkonzentration variierenden Absorptionsmaxima nachgewiesen werden. Der chloridabhängige Verlauf der Zustände lässt auf drei Bindungskonstanten für HR schließen.

Zeitaufgelöste Messungen im sichtbaren Spektralbereich führten zur Erstellung eines chloridfreien (Intermediate: HR₅₄₀ und HR-K₆₅₀) und eines chloridhaltigen Photozyklus (Intermediate: HR₅₈₀, HR-K₆₅₀ und HR-L₅₂₀). Dabei wird der chloridfreie Photozyklus wesentlich schneller durchlaufen als der chloridhaltige. Mit Hilfe der zeitaufgelösten FT-IR-Spektroskopie in Kombination mit der ATR-Technik wurde die Chloridabhängigkeit untersucht. Es konnte mit steigender Chloridkonzentration eine Beschleunigung der Entstehung des HR-L-Intermediates festgestellt werden. Der Zerfall des L-Intermediates verlangsamt sich hingegen mit steigender Chloridkonzentration. Bei sehr hohen Chloridkonzentrationen (5 M) konnten Unterschiede in der Amid I-Region zwischen frühen HR-L-Differenzspektren und den HR-L-Differenzspektren zu späten Zeiten detektiert werden. Dies lässt auf eine Strukturänderung des Proteinrückgrates schließen. Durch Messungen des Lineardichroismus konnte diese Annahme bestätigt werden. Die Abhängigkeit des Aufbaus des HR-L₁- und des Zerfalls des HR-L₂-Intermediates von der Chloridkonzentration deuten auf eine Chlorid-Ionenaufnahme beim Übergang des HR-K-Intermediates zum HR-L₁-Intermediat und eine Chlorid-Ionenabgabe beim Übergang des HR-L₂-Intermediates in den Grundzustand hin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Bakteriorhodopsin–Photozyklus	8
1.2	Der Halorhodopsin–Photozyklus	10
1.3	Zielsetzung der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Instrumentierung	14
2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	15
2.3	Mikrobiologische Methoden	18
2.3.1	<i>E. coli</i>	18
2.3.2	<i>H. salinarum</i>	19
2.4	Molekularbiologische Methoden	22
2.4.1	Molekularbiologische Standardmethoden	22
2.4.2	Polymerase Kettenreaktion	23
2.4.3	Sequenzieren der Plasmide	24
2.5	Proteinbiochemische Methoden	25
2.5.1	Isolierung der halorhodopsinhaltigen Membranen	25
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
2.5.3	Western-Blot-Analyse	28
2.5.4	Solubilisierung von Halorhodopsin	29
2.5.5	Proteinreinigung über hydrophobe Interaktion	30
2.5.6	Proteinreinigung über Gelfiltrationschromatographie	30
2.6	Röntgenographische Methoden	31
2.6.1	2D Kristallisation von Halorhodopsin-Membranen	32
2.6.2	Berechnung der Gitterkonstanten von HR	32
2.6.3	3D Kristallisationsversuche von HR mit klassischen Methoden	33
2.6.4	Kristallisation von HR mit der kubischen Lipidphase	34
2.6.5	Präparation der Kristalle für die Röntgenbeugungsexperimente	36
2.7	Spektroskopische Methoden	37
2.7.1	Statische UV/Vis-Spektroskopie: Titration von HR-Membranen mit Chlorid	37

2.7.2 Zeitaufgelöste sichtbare Spektroskopie an HR-Membranen	39
2.7.3 Zeitaufgelöste FT-IR Spektroskopie an HR-Membranen	40
3 Ergebnisse und deren Diskussion	44
3.1 Fusion des HR-Gens mit dem Promotor von BR	44
3.2 Klonierung des bop/hop-Gens in halobakterielle Vektoren und Transformation in <i>H. salinarum</i>	47
3.3 Homologe Expression von HR in <i>Halobacterium salinarum</i>	48
3.4 Isolierung und Reinigung der HR-Membranen	51
3.5 Solubilisieren von Halorhodopsin	53
3.6 Kristallisation von Halorhodopsin	56
3.6.1 2D-Kristalle von Halorhodopsin	56
3.6.2 3D Kristalle von Halorhodopsin	58
3.6.3 Kristallisationsversuche mit der „Sitting Drop“ Methode	58
3.6.4 Kristallisation von HR in der kubischen Lipidphase	59
3.7 Spektroskopische Untersuchungen des HR-Photozyklus	63
3.7.1 Statische UV/Vis-Spektroskopie: Titration von HR-Membranen mit Chlorid	63
3.7.2 Zeitaufgelöste sichtbare Spektroskopie	67
3.7.3 Zeitaufgelöste FT-IR-Spektroskopie	69
3.7.4 Vergleich der Kinetiken der FT-IR Messungen mit den sichtbaren Daten	78
4 Abschließende Diskussion der spektroskopischen Ergebnisse	81
4.1 Chloridabhängigkeit des HR-Photozyklus	81
4.1.1 Entwicklung eines chloridfreien Photozyklus-Modells	83
4.1.2 Entwicklung eines chloridhaltigen Photozyklus-Modells	85
4.2 Überlegungen zum Pumpmechanismus	87
5 Zusammenfassung	90
6 Literaturverzeichnis	92
7 Anhang	104
7.1 Abkürzungen	104
7.2 Abbildungsverzeichnis	106
7.3 Klonierungsvektoren	108

Inhaltsverzeichnis

7.4 Expressionsvektoren	109
Danksagung	110
Lebenslauf	

1 Einleitung

Die Faszination, welche von Zellen und Lebewesen ausgeht, beruht nicht zuletzt auf den in ihnen enthaltenen hocheffizienten molekularen Maschinen. Ein Beispiel ist die Verkettung der an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Komplexe, welche die Redoxenergie des NADH in Protonenmotorische Kraft (PMF) umwandeln. Mit dieser Energie ist die ATP-Synthase in der Lage, ATP (chemische Währung der „biologischen Energie“) zu erzeugen (Walker, 1998; Mitchell, 1979).

Ein weiterer wichtiger Prozess ist der molekulare Mechanismus des Sehvorganges (Wald, 1968). Dieser wird über eine Isomerisierungsreaktion des in dem Protein Rhodopsin enthaltenen Chromophoren eingeleitet. In allen drei Zweigen der Lebewesen (Eukarya, Eubacteria, Archae) finden sich Rhodopsine, welche als Modellsysteme für transmembrane heptahelikale Rezeptoren dienen. Die sieben Helizes bilden eine Tasche aus, in dem Retinal, ein Vitamin-A-Derivat, kovalent über eine Schiff'sche Base an einen Lysin-Rest gebunden ist.

Ein sehr gut untersuchtes Archae ist *Halobacterium salinarum* (früher: *H. halobium* bzw. *H. salinarium*). Es lebt in Gewässern mit etwa 4 M NaCl und Temperaturen von 40–50 °C. In der Plasmamembran sind Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) als Ionenpumpen und die Sensorrhodopsine (SRI und SRII) enthalten. Die oben erwähnte Erzeugung eines Protonengradienten zur Energiegewinnung kann in Halobakterien über Bakteriorhodopsin realisiert werden, indem es durch Lichtaktivierung Protonen aus der Zelle heraus pumpt (Oesterhelt und Stoekenius, 1973). SRI (auch: slow rhodopsin) und SRII (auch: Phoborhodopsin oder P₄₉₀) erlauben der Zelle phototaktisches Verhalten und damit die Bewegung zu optimalen Lichtbedingungen für eine effiziente Photosynthese und eine Minimierung der UV-Exposition (Manor et al., 1988).

Das in dieser Arbeit im Vordergrund stehende Halorhodopsin (HR) ist eine Anionenpumpe und gehört neben der Chlorid-ATPase aus *Acetabularia* (Gradmann et al., 1975) und der Arsenit-ATPase aus *E. coli* (Rosen et al., 1988) zu den einzigen derzeit bekannten Anionenpumpen. HR transportiert Chlorid-Ionen in die Zelle hinein und ist somit in der Aufrechterhaltung der Isoosmolarität des Zytoplasmas während des Zellwachstums involviert. Außerdem trägt der Chloridgradient zur elektromotorischen Kraft bei (Duschl et al., 1986).

Einige wichtige Charakteristika der verschiedenen bakteriellen Rhodopsine sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Primärstruktur und Eigenschaften bakterieller Rhodopsine

Die Daten wurden aus der SwissProt Datenbank entnommen. Es handelt sich hierbei um die N-terminal unprozessierten Proteinformen.

	Amino- säuren	Gewicht in Da	Sequenzhomo- logie zu BR	Eigenschaft	Funktion
BR	262	28256	100 %	H ⁺ -Pumpe	Energiegewinnung
HR	274	28874	24 %	Cl ⁻ -Pumpe	Konzentrations- ausgleich
SRI	239	25501	24 %	Sensor	Phototaxis
SRII	237	25279	29 %	Sensor	Phototaxis

Die vier beschriebenen bakteriellen Rhodopsine durchlaufen einen Photozyklus, deren Zerfallskonstanten für die Rückkehr in den Grundzustand mit 7 bis 14 ms (BR, HR) oder mit 250 bis 750 ms (SRI/II) angegeben werden. Das Retinal ist als lichtabsorbierende Gruppe der essentielle Bestandteil, der den Pumpprozess durch Lichtanregung ermöglicht. Es ist über eine ϵ -Aminogruppe des Lysins in Helix G kovalent an das Protein gebunden. Die Polyalken-Kette des freien Retinals enthält 4 isomerisierbare Doppelbindungen, wobei aufgrund der sterischen Hinderung einige Konformationen ungünstig sind. Die *all-trans*-Konformation ist im freien Retinal die energetisch günstigste Konformation, es wird jedoch in vielen Intermediaten der bakteriellen Rhodopsine die 13-*cis*-Konformation eingenommen (Pettei et al., 1977). Weiterhin kann der Rest der Aminogruppe stereochemisch verschieden sein, was als *syn* oder *anti* bezeichnet wird (Seebach und Prelog, 1982) (Abb. 1-1).

Das Absorptionsmaximum des freien Retinals liegt bei etwa 370 nm. In den verschiedenen Retinalproteinen variiert das Absorptionsmaximum, in einem weiten Bereich, zwischen 360 nm und 640 nm je nach Intermediatzustand. Die großen Unterschiede (Opsinverschiebungen) ergeben sich durch eine Änderung der Interaktion des Retinal- π -Elektronensystems zu den Ladungen der Umgebung (Kochendoerfer et al., 1999).

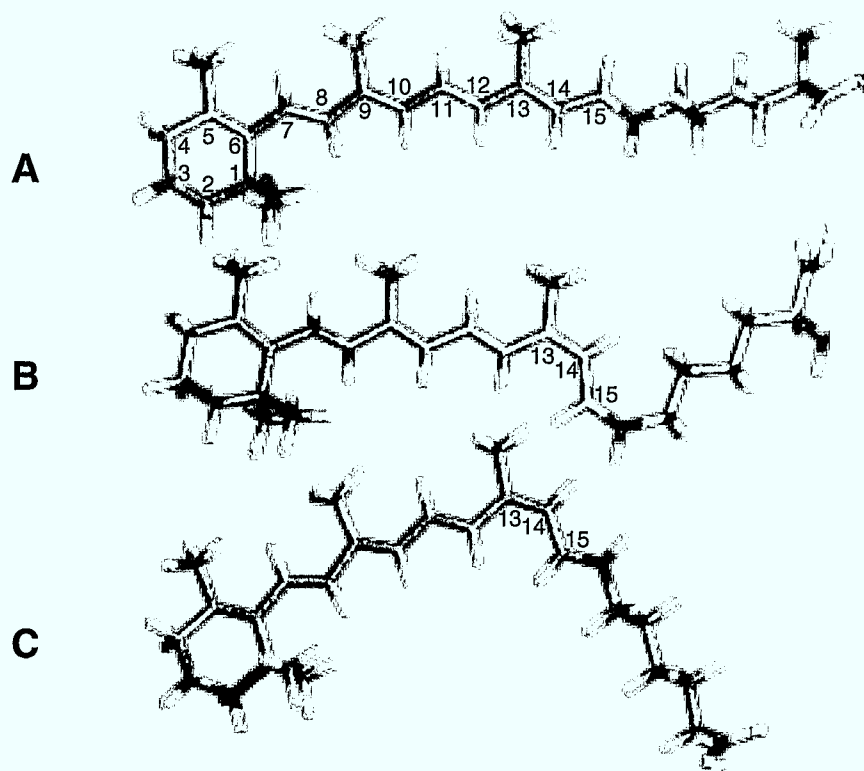


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung drei verschiedener Retinalkonformationen

Die Retinal/Lysin-Moleküle dieser Abbildung wurden mit Chem3D gezeichnet. Das Molekül **A** entspricht der *all-trans/15-anti*-, **B** dem *13-cis/15-syn*- und **C** dem *13-cis/15-anti*-Retinal.

In allen bakteriellen Retinalproteinen ist der primäre photochemische Prozess eine Reaktion, bei dem der Chromophor von *all-trans/15-anti* zu *13-cis/15-anti* isomerisiert. In den oben genannten visuellen Rhodopsinen hingegen initiiert Licht die Reaktion von *11-cis* zu *all-trans*.

Das Halorhodopsin ist dem Bakteriorhodopsin auf molekularer Ebene sehr ähnlich (Abb. 1-2).

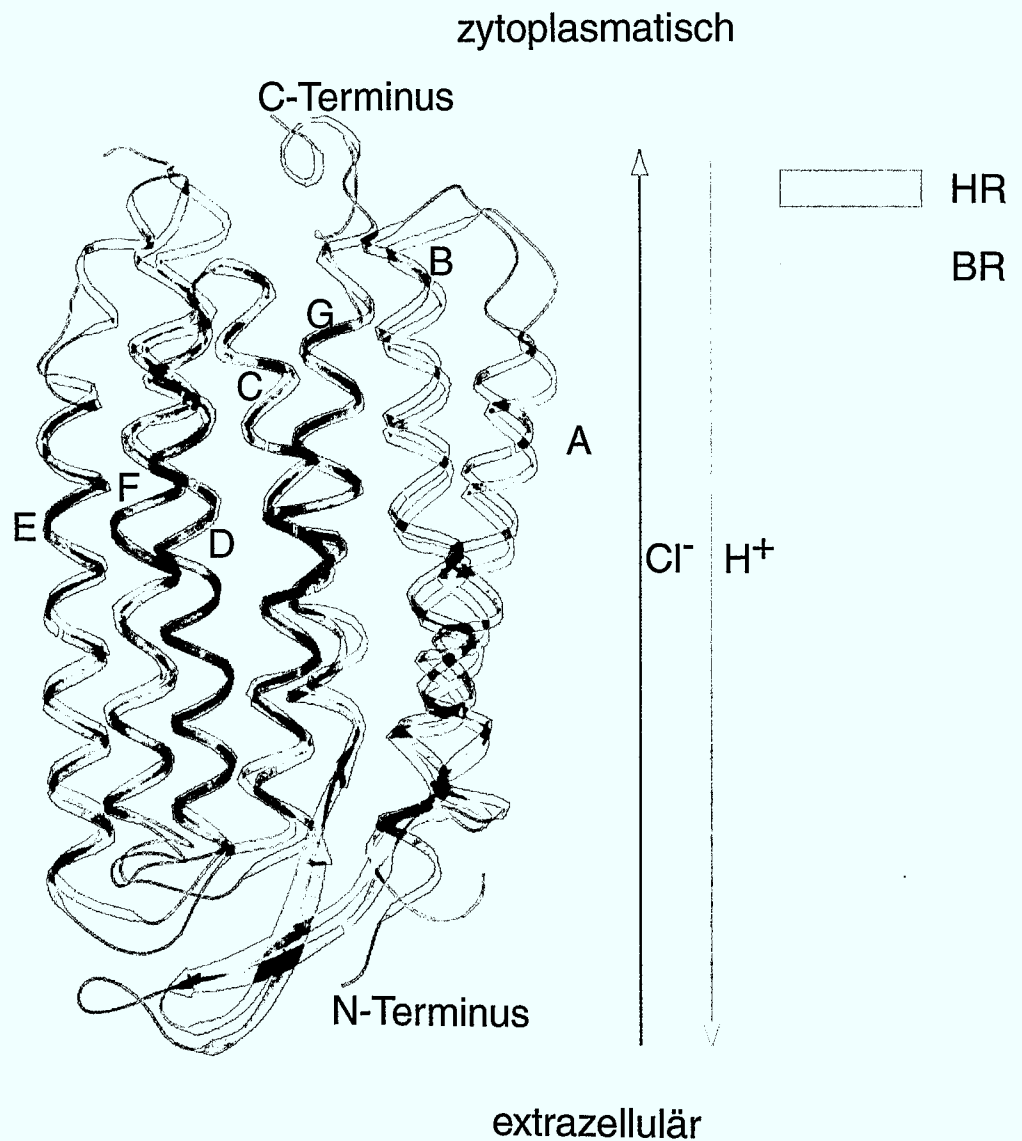


Abbildung 1-2: Überlagerung der Sekundärstrukturelemente von HR und BR

Die pdb-Koordinaten wurden aus der Proteindatabank entnommen (1E12 und 1C3W). Die Überlagerung erfolgte mit der MagicFit Funktion des Programmes spdbv3.7b2. Die Pfeile symbolisieren die Pumprichtung des jeweiligen Proteins.

In den letzten Jahren gelang es, die 3D Strukturen von HR und BR mit hoher Auflösung zu bestimmen (für HR: Kolbe et al., 2000; für BR: Pebay-Peyroula et al., 1997; Lücke et al., 1998; Lücke et al., 1999; Belrhali et al., 1999; Sass et al., 2000).

Die Struktur des Grundzustandes von Halorhodopsin bei einer Auflösung von 1,8 Å (Kolbe et al., 2000) bietet die Möglichkeit, in Kombination mit spektroskopischen Daten den molekularen Mechanismus des Anionenpumpens näher zu bestimmen.

Im der Kristallstruktur ist HR –wie BR– in Trimeren angeordnet (Abb. 1–3). In der Mitte eines HR-Trimers befinden sich drei Palmitinsäurereste, welche über die Carboxygruppen mittels H-Brückenbindungen mit den Hydroxygruppen von Ser⁷⁵ und Thr¹¹¹ verbunden sind.

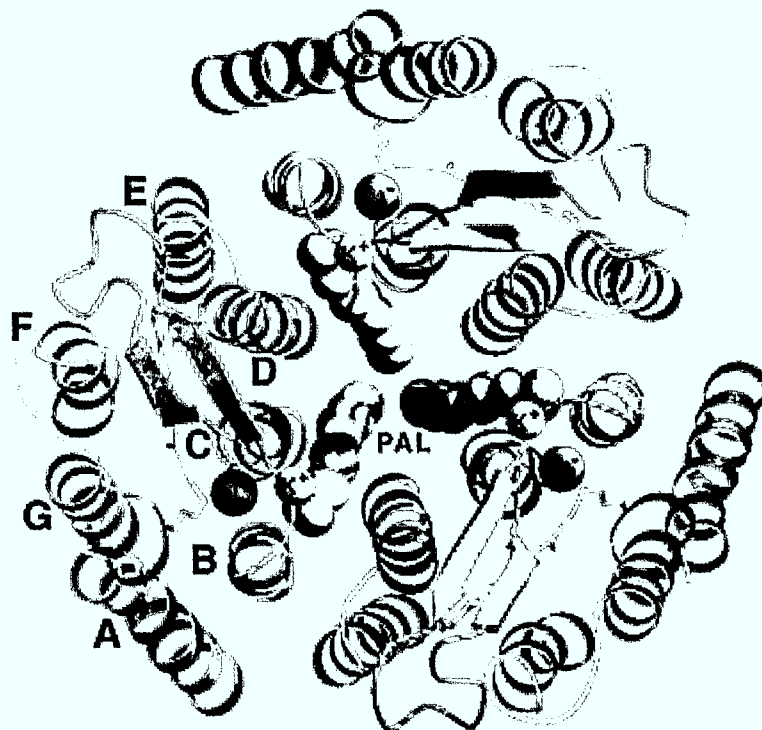


Abbildung 1–3: Quartärstruktur von HR

HR ist in Trimeren in der Kristallstruktur angeordnet, in deren Zentren sich drei Palmitinsäurereste befinden (Kolbe et al., 2000)

Die größte strukturelle Ähnlichkeit zwischen HR und BR findet sich in dem Bereich von Helix C bis Helix G (Abb. 1–2). Die Schleife zwischen den Helices B und C beginnt mit zwei antiparallelen Faltblättern (Glu⁸⁷–Met⁹¹ und Glu¹⁰⁰–Ser¹⁰⁴) und breitet sich über die gesamte extrazelluläre Seite aus. Pro⁹²–Ala⁹⁸ bilden eine Schleife zwischen den beiden Faltblättern aus, die über His⁹⁵ verankert sind. His⁹⁵ bildet zwei H–Brückenbindungen zu den Carbonylgruppen des Val²¹⁸ und Gly²²⁰ innerhalb der Schleife zwischen den Helices F und G. Dieses Histidin hat einen großen Einfluss auf den Photozyklus und die Stabilität unter Belichtung, wie in Mutationsstudien gezeigt werden konnte (Otomo, 1996). Am Ende der BC–Schleife liegt das Arg¹⁰³ als eine mögliche Chlorid–Bindungsstelle an der extrazellulären Oberfläche.

Auf der zytoplasmatischen Seite ragt der C–Terminus in die Helix G hinein und liegt damit parallel zur Membran zwischen der AB– und der EF–Schleife. Die Arginine an den Positionen 258, 52, 55, 58, 60 bilden auf der zytoplasmatischen Seite ein hoch positiv geladenes elektrisches Feld, welches möglicherweise wichtig ist für den Transport des Chlorides an die zytoplasmatische Oberfläche (Diskussion, Abb. 4–2).

Ein Chlorid–Ion befindet sich an der sogenannten primären Transportstelle in der Nähe der Schiffschens Base (Abb. 1–4). Die Solvatationshülle ist unregelmäßig und enthält 15 Wasserstoff– und 3 Nicht–Wasserstoffatome. Theoretisch können Wasserstoffbrücken zu den Wassermolekülen 506 und 512 sowie zu Ser¹¹⁵ gebildet werden. Das Thr¹¹¹ hat einen großen Einfluss auf die Transportaktivität, wie durch eine Mutation zu Val gezeigt werden konnte (Rüdiger und Oesterhelt, 1997). Das Chlorid–Ion hat einen Abstand von 3,75 Å zur protonierten Schiffschens Base, welche allerdings so orientiert ist, dass sich keine Salzbrücken bilden. Der Eingang zu der primären Transportstelle liegt vermutlich bei Glu¹⁰⁵/Arg¹⁰⁸ und ist ähnlich hydrophob wie die Transportstelle. Die 5 hydrophoben Aminosäuren der Umgebung (Leu²⁹, Leu³³, Leu⁸⁰, Val⁸⁶, Val²²⁷) sorgen wahrscheinlich für eine partielle Desolvatation des Chlorides.

Der Weg des Chlorides von der Schiffschens Base zum Zytoplasma wird vermutlich erst durch Konformationsänderung des Proteinrückgrates eröffnet. Der C–Terminus von Helix E könnte hieran beteiligt sein, da er –wie in BR– verzerrt vorliegt (Essen et al., 1998).

Bereits vor der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur wurden umfangreiche Überlegungen über das Anionenbindungsverhalten angestellt. So wurde aus der Abhängigkeit der Absorptionsspektren geschlossen, dass HR eine einzelne Bindungsstelle für Chlorid hat (Ogurusu et al., 1984). Viele andere Untersuchungen deuten auf zwei Bindungsstellen mit unterschiedlicher Spezifität hin (Schobert et al., 1986; Lanyi et al.,

1990), wobei die erste Bindungsstelle (Position 1) an der Außenseite unspezifisch bindet. Die zweite Bindungsstelle bindet transportierbare Anionen (Cl^- , Br^- , I_3^- und NO_3^-). Die Bindung an die Position 1 erzeugt im Spektrum eine hypsochrome Verschiebung um 6 bis 7 nm und die Bindung an die Position 2 eine bathochrome (Pande et al., 1989). Als Bindungsstellen wurden die Arginine an den Positionen 108 und 200 vorgeschlagen (Blanck et al., 1987).

Ein weiteres Modell geht von nur einer Bindungsstelle im Protein aus, welche in zwei verschiedenen Zuständen vorliegen kann und somit selektiv transportiert (Walter und Braiman, 1994).

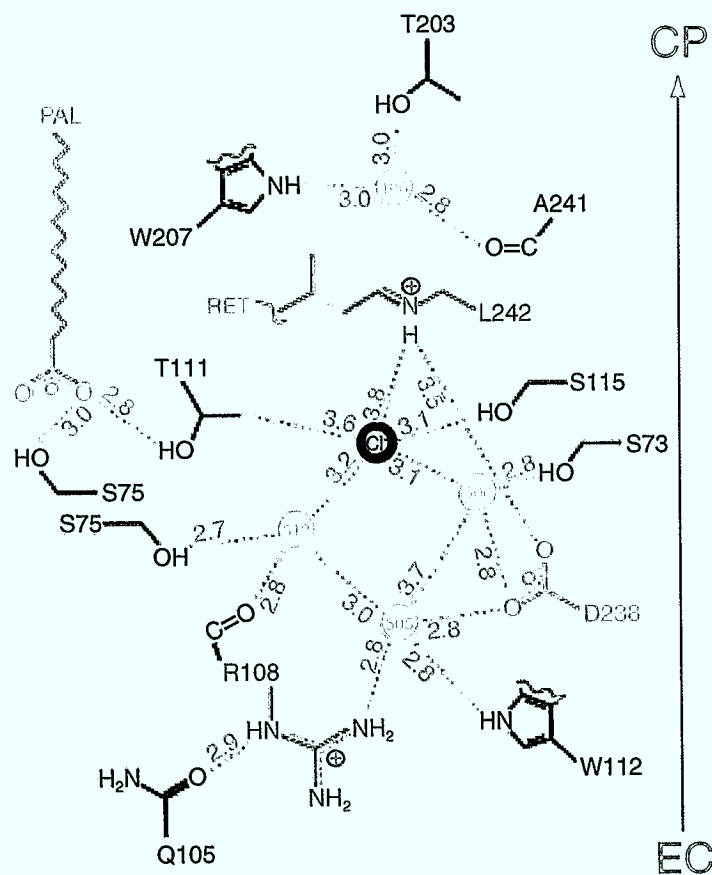


Abbildung 1-4: Wasserstoffbrückennetzwerk in der Umgebung des gebundenen Chlorid-Ions (Modifiziert aus Kolbe et al., 2000)

1.1 Der Bakteriorhodopsin-Photozyklus

Durch Absorption eines Lichtquants –im lichtadaptierten Grundzustand BR₅₆₈– durchläuft BR einen reversiblen Photozyklus, bei dem sechs Intermediate unterschieden werden können, bevor es wieder in den Grundzustand zurückkehrt

BR₅₆₈, BR-J₆₂₅, BR-K₅₉₀, BR-L₅₅₀, BR-M₄₁₂, BR-N₅₃₀, BR-O₆₄₀ und BR₅₆₈

Die Indizes geben die Absorptionsmaxima in Nanometern an. Die Konformationen und Protonierungszustände der speziellen Seitengruppen für den Protonentransport sind sehr genau untersucht worden. Die Protonenabgabegruppe der extrazellulären Seite, wird jedoch in den Forschergruppen heftig diskutiert. Erschwert werden die Untersuchungen durch eine zeitliche Überlagerung des Auftretens der einzelnen Intermediate. Im folgenden werden die Intermediate des BR-Photozyklus genauer beschrieben.

BR₅₆₈

Der Grundzustand des BR enthält nach Lichtadaption 100 % *all-trans* Retinal. Bei Dunkeladaption hingegen besteht der Grundzustand aus einer Mischung von *all-trans*- und *13-cis*-Retinal (*13-cis*-Anteil: 50–66 %) (Maeda et al., 1977; Harbison et al., 1984; Scherrer et al., 1989).

BR-J₆₂₅

Etwa 500 fs nach Absorption eines Lichtquanten beginnt die Isomerisierung des Retinals von *all-trans/15-anti* zu *13-cis/15-anti*, was sich im diesem rotverschobenen frühen Intermediat widerspiegelt (Gai, 1998).

BR-K₅₉₀

Bereits nach nur 3 ps ist das Absorptionsmaximum wieder blauverschoben. Jetzt liegt das Retinal in einer spektroskopisch erkennbaren *13-cis*-Konformation vor. Nach etwa 10 bis 100 ns tritt das BR-KL-Intermediat auf, welches sich lediglich in den HOOP (Hydrogen-Out-Of-Plane) –Moden vom BR-K-Intermediat unterscheidet (Sasaki, 1992).

BR-L₅₅₀

Nach 10 μ s liegt das Retinal in der vollständig relaxierten 13-*cis*-Konformation vor. Bis zu diesem Zeitpunkt sind keine Protonierungsänderungen der Aminosäuren zu beobachten (Gerwert 1986). Allerdings ändern einige Wassermoleküle ihre Lage (Maeda, 1997).

BR-M₄₁₂

Beim Übergang vom BR-L-Intermediat zum BR-M-Intermediat findet die Abgabe des Protons an die extrazelluläre Oberfläche statt (Heberle und Dencher, 1990). Die zunächst angenommenen Aminosäuren E204 und E194 für die Protonenabgabe wurden stark angezweifelt (Rammelsberg et al., 1998; Zscherp et al., 1999).

Die auftretende starke Blauverschiebung in diesem Intermediat beruht auf der Deprotonierung der Schiffschen Base. In dem als BR-M₁-Intermediat bezeichneten Zustand liegt die Aminosäure D85 protoniert vor (Briman et al., 1988). Die Zugänglichkeit der Schiffschen Base ändert sich zugunsten der zytoplasmatischen Seite, um eine Reprotonierung zu ermöglichen. Dieser Zustand wird als BR-M₂ bezeichnet (Sass et al., 1997; Brown et al., 1998).

BR-N₅₃₀

Nach 3 ms kommt es zu einer Reprotonierung der Schiffschen Base. Das Proton wird von der Aminosäure D96 übertragen (Gerwert et al., 1990).

BR-O₆₄₀

Es vergehen 5 ms, um vom Grundzustand das BR-O Intermediat zu erreichen. Die Absorption ist stark rotverschoben, was wahrscheinlich auf die Reisomerisierung des Retinals zurückzuführen ist. Gleichzeitig wird D96 reprotoniert (Heßling et al., 1993) und ein Proton von der zytoplasmatischen Seite aufgenommen (Lozier et al., 1975). Beim Übergang in den Grundzustand transferiert D85 sein Proton über D212 zur Protonenabgabegruppe.

Der Grundzustand ist dann nach 7 ms wieder erreicht.

1.2 Der Halorhodopsin-Photozyklus

Die Dauer des Photozyklus von Halorhodopsin beträgt etwa 14 ms (Tittor et al., 1987).
Der Zyklus verläuft über folgende Intermediate:

HR₅₇₈, HR-K₆₀₀, HR-L₅₂₀, HR-O₆₄₀ und HR₅₇₈.

Ein Schema des HR-Photozyklus ist in Abbildung 1–5 dargestellt.

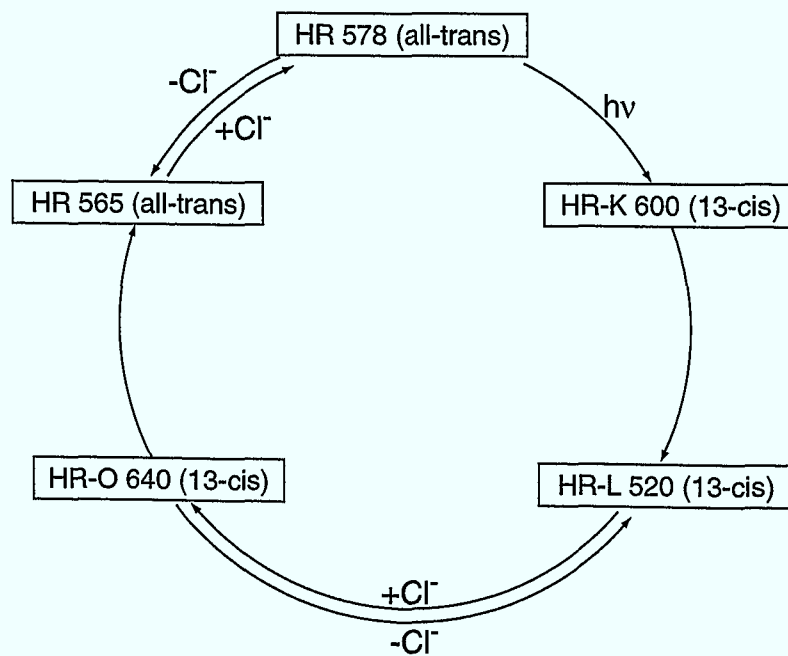


Abbildung 1–5: Schema des HR-Photozyklus aus *H. salinarum*

HR₅₇₈

Der Grundzustand des HR enthält ein Retinal in *all-trans/15-anti*-Konformation. Dieser steht in einem chloridabhängigen Gleichgewicht mit dem Intermediat HR₅₆₅, wobei das Retinal die gleiche Konformation einnimmt wie im HR₅₇₈-Intermediat. Von diesem chloridfreien Grundzustand wird ein Photozyklus über die Intermediate HR-K₆₀₀ und HR-O₆₄₀ durchlaufen (Varo et al., 1995).

Im Gegensatz zu BR läßt sich die Retinalkonformation des Grundzustandes nicht durch Lichtadaption zu 100 % *all-trans/15-anti* verschieben, sondern erreicht maximal 83 % *all-trans*-Retinalanteil (Varo et al., 1995).

Eine weitere Komponente, die sich in Halorhodopsin-Vesikeln mit Rotlicht akkumulieren läßt, ist das Iso-Halorhodopsin. Dieses enthält das Retinal in einer *9-cis*-Konformation und sein Name lehnt sich an das Isorhodopsin, einem Intermediat des Rhodopsin-Photozyklus an. Das Absorptionsmaximum von Iso-Halorhodopsin beträgt 568 nm (Zimanyi und Lanyi 1987).

HR-K₆₀₀

Das erste Intermediat des chloridhaltigen Photozyklus von Halorhodopsin, welches durch Lichtanregung aus dem HR₅₇₈-Intermediat entsteht, ist das HR-K₆₀₀-Intermediat. Die Zeitkonstante für diese Umwandlungsreaktion wird mit 0,5 ps angegeben (Polland et al., 1985). Die Entstehung basiert auf einer photochemischen Reaktion vom *all-trans/15-anti*- zum *13-cis/15-anti*-Retinal, welche jedoch zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht vollständig abgelaufen ist. FT-IR-Messungen weisen in den für Retinal charakteristischen Banden eine große Ähnlichkeit zum BR-K-Intermediat auf (Rothschild et al., 1988).

HR-L₅₂₀

Nach 1 µs bildet sich das Intermediat HR-L₅₂₀ aus, in dem das Retinal eine vollständige *13-cis/15-anti*-Konformation einnimmt (Diller et al., 1987). Auch das HR-L-Intermediat weist eine große Ähnlichkeit zum BR-L-Intermediat auf, was sich vor allem auf die FT-IR-Spektren im Fingerprintbereich stützt (Rothschild et al., 1988).

Bei der Bildung des HR-L-Intermediates werden Änderungen der Wechselwirkung zwischen Chlorid/Arginin und Chlorid/Schiffsche Base diskutiert. Dies spricht für eine Transportbewegung in diesem Intermediat (Walter et al., 1994). Ähnlich dem BR-M₁/M₂-Intermediat werden für das HR-L₅₂₀-Intermediat auch zwei Zustände ermittelt, in denen

für die Ionentranslokation wichtige Änderungen des Proteingerüsts vorliegen (Varo et al., 1995; Chon et al., 1999).

HR-O₆₄₀

Die Bildung des dem HR-L₅₂₀-Intermediat folgenden HR-O-Intermediates ist stark chloridabhängig. Das Retinal ist in einer 13-*cis*/15-*anti*-Konformation angeordnet. Dies steht im krassen Gegensatz zu der all-*trans*/15-*anti*-Konformation im BR-O-Intermediat (Ames et al., 1992).

Die von BR und HR beschriebenen Photozyklen weisen trotz der unterschiedlichen Ionenspezifität große Gemeinsamkeiten auf. So wundert es nicht, dass BR durch die Mutation D85T in eine Chloridpumpe zu verwandeln ist (Sasaki et al., 1995). D85 und D96, die in BR die Funktion des Akzeptors bzw. Donors für das Proton der Schiffischen Base erfüllen, sind in HR durch Threonin bzw. Alanin ersetzt. Der natürliche Photozyklus des Halorhodopsins enthält kein Intermediat mit deprotonierter Schiffischer Base.

In beiden Molekülen findet ein vektorieller Transport statt, in dessen Verlauf ein Substrat (z.B. Chlorid) von außen an eine katalytische Bindungsstelle bindet. Diese unterscheidet sich von der Bindungsstelle, von der das Produkt (inneres Chlorid) wieder abgegeben wird. Während des Vorgangs muß der Weitertransport durch sich reversibel ändernde Zugänglichkeiten erfolgen. Der vektorielle Transport ist somit „intrinsisch“ und unabhängig von der natürlicherweise vorhandenen Membran. Die Änderung der Zugänglichkeit wird häufig als Schalten (switch) bezeichnet. Im Falle der Retinalproteine HR und BR ist ein Modell für diesen „switch“-Vorgang entwickelt worden, in dem das Retinal bei der Photoisomerisierung von all-*trans* zu 13-*cis* einen 14-*cis*-Übergangszustand durchläuft, welcher sich in zwei thermischen Schritten umkehrt (Schulten und Tavan, 1978; Oesterhelt et al., 1986). In Halorhodopsin führt diese Rotation von 14-*cis* zu 14-*trans* zu einer Änderung der Zugänglichkeit und Affinität der Schiffischen Base für z.B. Chlorid. Dieser Rotationsschritt muß eingeführt werden, nachdem das Chlorid-Ion die maximale ionische Wechselwirkung mit der Schiffischen Base ausübt und bevor es das Molekül durch den zytoplasmatischen Kanal verlässt. Es gibt allerdings experimentelle Daten, die gegen eine C₁₄-C₁₅ Rotation des Retinals sprechen (Fodor et al., 1988).

Ein möglicher Mechanismus des Anionenpumpens, welcher sich aus den dreidimensionalen Strukturdaten und den gemessenen spektroskopischen Daten ergibt, wird in der Diskussion erarbeitet.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Halorhodopsin (HR) ist als lichtgetriebene, elektrogene Anionenpumpe einzigartig und bietet sich nicht zuletzt aufgrund der Ähnlichkeit zu BR für die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen an. Im Rahmen dieser Arbeit sollte HR im ersten Schritt in *Halobacterium salinarum* überexprimiert werden, um es in großen Mengen für weitere Studien verfügbar zu machen. Zudem sollte eine Reinigungsmethode etabliert werden, welche eine anschließende Kristallisation in zwei und drei Dimensionen ermöglicht.

Weiterhin galt es, den Mechanismus des Anionenpumpens von HR zu untersuchen. Hierzu wurden folgende spektroskopische Untersuchungen durchgeführt:

- Die Titration von HR-Membranen mit Chlorid, mittels statischer UV/Vis Spektroskopie
- Die zeitaufgelöste Spektroskopie an HR-Membranen im sichtbaren Spektralbereich
- Umfangreiche Messungen an HR-Membranen, mittels zeitaufgelöster FT-IR Spektroskopie

2 Material und Methoden

2.1 Instrumentierung

DNA-Sequenzierungen werden mit dem LI-COR 4200 Automatic Sequencer der Firma MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

Die Inkubation der *E. coli* und *H. salinarum* Bakterien erfolgt in den Brutschränken Köttermann 2737 (Gossau, Schweiz), Memmert GTRO 0214 (Schwabach), den Inkubationsschüttlern und Fermentern der Firma Infors (Basel, Schweiz). Aufgeschlossen werden die Zellen mit der French Press Hydraulikpresse/Zelle 20K von SLM Aminco (Rochester, USA). Die Beschallung der Proben erfolgt mit einem Ultraschallgerät Labsonic L mit der Nadel 40 TL von Braun (Melsungen).

Zur Durchführung der Gelfiltrationschromatographie wird eine FPLC-Anlage (Programmer GP-250 Plus, Pump P500, Detector VWM2141) von Pharmacia-LKB (Uppsala, Schweden) mit der Gelfiltrationssäule TSK G3000SW und der Vorsäule TSK SW von TosoHaas (Stuttgart) eingesetzt. Als Fraktionssammler wird ein 2211 Superrac (Pharmacia-LKB) benutzt.

UV-Vis Spektren werden mit dem Photometer UV-2110PC von Shimadzu (Duisburg) aufgezeichnet.

Die zeitaufgelösten Messungen im sichtbaren Bereich erfolgen mit dem SpectraPro-150 Spektrometer von Acton Research (Acton MA, USA) und der CCD Kamera ICCD-576-G mit dem Kontrollgerät ST138 beides von Princeton Instruments (Monmouth Junction, New Jersey, USA) durchgeführt.

Zeitaufgelöste FT-IR-Spektren werden mit dem Bruker IFS 66v (Karlsruhe) aufgezeichnet. Der eingesetzte ATR Mikrokristall stammt von der Firma SensIR (Danbury, CT, USA). Der Anregungslaser ist ein Spectra Physics GCR 12S (Darmstadt). Das PEM 50 Pyroelement stammt von Radiant Dyes (Wermelskirchen). Als Thermostat wird ein Julabo F25-MH (Allentown, PA, USA) eingesetzt.

Der Drehanoden Röntgengenerator stammt von der Firma Elliot Marconi Avionics, Typ GX21 (Hertfordshire, UK), mit einem „Image Plate Detector Mar 2000“ (Mar Research, Norderstedt). Die Glimmerscheibe stammt von der Firma Jahre GmbH (Wilhelmshaven).

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die Chemikalien stammen von den Firmen Aldrich (Heidenheim), BioRad (München), Biozym (Oldendorf), Boehringer (Mannheim), Difco (Kansas City, MO, USA), Merck (Darmstadt), Oxoid (Hamshire, England), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim) und haben die Qualität "p.a." oder "reinst". Alle Lösungen werden mit hochreinem Wasser (Millipore-Qualität) angesetzt.

Die Restriktionsenzyme werden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach), Gibco/BRL (Karlsruhe), Boehringer (Mannheim) und Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

Daneben werden folgende Enzyme benutzt:

Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)	Boehringer Mannheim
Klenow Fragment der DNA-Polymerase aus <i>E. coli</i>	Boehringer Mannheim
Mung Bean Nuklease	New England Biolabs, Schwalbach
Taq Expand High Fidelity	Boehringer Mannheim
Taq-DNA Polymerase	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Gibco/BRL, Karlsruhe

Die Sequenzierung wird mit dem Thermosequenase-Kit von Amersham (Buckinghamshire, England) durchgeführt. Zum Übersichten dient Chill-Out-Wax von Biozym (Oldendorf).

Als Molekulargewichtsstandards werden für DNA der 1 kb Marker von Gibco BRL (Neu Isenburg) und die Längenmarker VII bzw. 100 bp Ladder von Boehringer (Mannheim) benutzt.

Folgende Proteinmarker werden in der Arbeit benutzt: der Rainbow high molecular weight von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), der SDS-PAGE, Molecular Weight Standard, Broad Range von BioRad (München), und die Marker 10 kDa-Ladder; BenchMark™, Protein Ladder; BenchMark™, Prestained Protein Ladder von Gibco BRL (Neu Isenburg).

Die Chemilumineszenzdetektion wird mit Super Signal, oder Super Signal Ultra von Pierce (Rockford, USA) durchgeführt. Die Röntgenfilme XAR oder Biomax ML stammen von Kodak (Stuttgart).

Zu Reinigung und Isolierung von DNA werden folgende Qiagenprodukte (Hilden/Düsseldorf) benutzt: QIAprep Spin Miniprep Kit; QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit.

Zur Klonierung werden der Sure Clone Ligation Kit von Pharmacia (Freiburg) und der Zero Blunt PCR Cloning Kit von Invitrogen (Groningen, Niederland) benutzt.

Als Säulenmaterial für die Chromatographie kommen Chelating Sepharose Fast Flow Media, HIC Cl4B von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und StrepTactin Sepharose von IBA (Göttingen) zum Einsatz.

Das Einengen von Proteinlösung wird mit verschiedenen Konzentratoren von Sevatec (Witten) (Fugisep-Mini/Midi/Maxi), oder Amicon (Beverly, USA) (Centricon-30, -50) durchgeführt.

Plasmide

<u>Plasmid</u>	<u>Resistenz</u>	<u>Quelle</u>
pUC 18	Amp ^r	Amersham, Pharmacia Biotech, Freiburg
pCR-Blunt	Kan ^r , Zeo ^r	Invitrogen, Groningen, Niederland
pHSblue	Kan ^r , Nov ^r	U. Eidhoff, freundliche Gabe
pXL	Tet ^r , Nov ^r	R. Needleman, freundliche Gabe

E. coli-Stämme

DH5α [Hanahan, 1985]

F⁻ endA1 hsdR17 (rk⁻, mk⁺) supE44 thi-1 λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR [lacZYA-argF]-U169 (φ80dlacZDM15)

ITC Biotechnology GmbH, Heidelberg, Deutschland

BL21Codon Plus(DE3)RIL [Weiner et al., 1994]

E.coli B F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁻ Tet^r gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]
Stratagene, Amsterdam, Holland

***H. salinarum*–Stämme**

MPK40 [Krebs et al., 1991; Krebs et al., 1993] [M.P. Krebs, freundliche Gabe]
(BR⁻, HR⁺, SRI⁺, SRII⁺, Car⁺, Rub⁺, Ret⁺)

L33 [Wagner et al., 1981] [D. Oesterhelt, freundliche Gabe]
(BR⁻, HR⁺, SRI⁺, SRII⁺, Car⁻, Rub⁻, Ret⁺) eine BR negative Mutante von S9

Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide werden von den Firmen MWG (Ebersberg) oder Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert. Nicht komplementäre Bereiche, welche zur Fusion, zur Einführung von Restriktionsstellen oder von Histidin-Resten dienen, sind fett hervorgehoben.

Primer für die Amplifikation des Halorhodopsin–Gens:

	Sequenzen
FP–HR–Start	5'–ATG TCA ATC ACG AGT GTA CCC–3'
GP–HR–Stop	5'–TCA GTC GTC GCT TGA CAT GGT–3'

Primer für die Fusion des HR–Gens mit dem bop–Promotor von Bakteriorhodopsin:

	Sequenzen
bop–BamHI	5'–GGA TCC GAC GTG AAG ATG G–3'
FPlink BR/HR	5'–CAG CAG TGG AGG GGG TAT CGA TGT CAA TCA CGA GTG TAC CCG –3'
GPLink BR/HR	5'–CCG GTA CAC TCG TGA TTG ACA TCG ATA CCC CCT CCA CTG CTG –3'
End His HR	5'–GCA AGC TTT CAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG TCG TCG CTT GAC ATG GTG CC–3'

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 *E. coli*

Nährmedien

Soweit nicht anders angegeben, werden die Medien autoklaviert (120 °C, 2,1 bar, 20 min). Zusätze wie Antibiotika oder Induktoren werden sterilfiltriert (0,22 µm).

dYT

- 1,6 % (w/v) Trypton
- 1 % (w/v) Hefe-Extrakt
- 0,5 % (w/v) NaCl

Die Kulturplatten werden durch Zusatz von 1,5 % (w/v) Agar hergestellt.

Medienzusätze

- Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml in H₂O
- Kanamycin-Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O
- IPTG-Stammlösung: 1 M in H₂O
- X-gal-Stammlösung: 40 mg/ml in Dimethylformamid

Herstellung von transformationskompetenten *E. coli*

Die Herstellung der hier verwendeten transformationskompetenten Bakterien (DH5α) erfolgt, in abgewandelter Form, nach der Methode von Hanahan, 1983.

Eine ÜN-Kultur des entsprechenden Bakteriums (aus Einzelkolonie, 37 °C, 120 Upm) wird 1:100 in 100 ml DYT überimpft und nach Inkubation bei einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,7 auf 4 °C abgekühlt und sedimentiert (3000 g, Megafuge, 10 min, 4 °C). Alle weiteren Schritte erfolgen bei 0 bis 4 °C. Das Pellet wird zunächst in 20 ml TFB I-Puffer aufgenommen, erneut pellettiert und in 4 ml TFB II-Puffer resuspendiert. Aliquots zu 100 µl dieser transformationskompetenten Zellen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C bis zur Verwendung gelagert.

<u>TFB I</u>	<u>TFB II</u>
30 mM NaAc	10 mM MOPS
50 mM MgCl ₂	75 mM CaCl ₂
100 mM NaCl	10 mM NaCl
10 mM CaCl ₂	15 % (w/v) Glyzerin
15 % (w/v) Glyzerin	pH 7,0
pH 7,0	

Transformation von *E. coli*

5 bis 20 µl eines Ligationsansatzes bzw. 1 ng Plasmid-DNA werden zu 100 µl kompetenten Bakterien gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgt der Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Nach weiteren zwei Minuten auf Eis werden die Zellen in 1 ml dYT-Medium bei 37 °C für 60 Minuten geschüttelt. Nach Pellettierung (10 Sekunden bei 10000 g) werden die Zellen, je nach verwendetem Vektor, auf entsprechenden Antibiotikanährböden ausgestrichen.

Stammhaltung von *E. coli*

Die kurz- bis mittelfristige Aufbewahrung von Bakterien erfolgt auf entsprechenden Agar-Platten. Für eine langfristige Archivierung von Stämmen und Bakterienklonen werden 500 µl einer frischen ÜN-Kultur mit 500 µl Kryoprotektant (dYT-Medium, 80 % (w/v) Glyzerin) versetzt und bei -70 °C eingefroren.

2.3.2 *H. salinarum*

Nährmedien

Vollmedium (Pepton-Oxid-Medium) Antibiotikum

250 g NaCl	0,6 µg Novobiocin pro ml Medium (MPK)
20 g MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,3 µg Novobiocin pro ml Medium (L33)
10 g Fleischpepton L37	
3 g Na ₃ Citrat * 2 H ₂ O	
2 g KCl	
ad 1 l H ₂ O	
pH 6,5 (mit NaOH)	
sterilisiert 2 Stunden bei 90°C	

Transformation von *H. salinarum*

Die Transformation von Halobakterien wird nach der PEG600 Methode von Cline et al. (1989) mit leichten Modifikationen durchgeführt.

30 ml einer *Halobacterium salinarum* Zellkultur (OD 0,8–1,0) werden 5 Minuten mit 4000 Upm bei Raumtemperatur zentrifugiert und in 3 ml SPH (10 % des ursprünglichen Volumens) resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension werden 150 µl EDTA in SPH zugegeben. Die Vollständigkeit der Sphäroblastierung wird mittels Lichtmikroskop überprüft.

Zur Transformation wird 40 µl DNA–SPH–Lösung ($c_{\text{NaCl}} = 2 \text{ mol/l}$; 5 bis 10 µg gereinigte Plasmid DNA), mit 200 µl der obigen Zellsuspension durchmischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wird vorsichtig mit 240 µl PEG–Lösung (Verhältnis 1:1) durchmischt. Nach 20 minütiger Inkubation wird der Ansatz mit 10 ml REG–Lösung versetzt und für 30 Minuten bei 40 °C inkubiert. Anschließend wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 4500 Upm zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml Supportmedium mit 15 % Saccharose resuspendiert und die Zellen 48 Stunden bei 37 °C mit 120 Upm geschüttelt.

Aliquots von 100–200 µl werden ausplattiert (Platten aus Supportmedium mit Antibiotikum) und bei 40 °C für 10 bis 14 Tage inkubiert.

Support Medium (Cline & Doolittle 1987)

I	II
250 g NaCl	3 g Hefeextrakt
20 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	5 g Bacto–Trypton
3 g $\text{Na}_3\text{Citrat} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	(15 g Bacto–Agar für Platten)
2 g KCl	ad 200 ml H_2O
25 ml 2 M Tris	
ad 900 ml H_2O	
pH 7,4	

Die Lösungen I und II werden getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C unter Rühren vereinigt.

Sphäroblastenpuffer (SPH)

117 g NaCl
1,8 g KCl
15 g Saccharose
25 ml 2 M Tris
ad 1 l H₂O
pH 8,75

Regenerationslösung (REG)

204 g NaCl
37 g MgSO₄ * 7 H₂O
4 g KCl
1 g CaCl₂ * 2 H₂O
150 g Saccharose
25 ml 2 M Tris
ad 1 l H₂O
pH 7,4

PEG-Lösung

60 % (v/v) PEG 600 in SPH

EDTA-Lösung

250 mM EDTA in SPH
pH 8,75

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Durchführungen der eingesetzten Standardtechniken wie Restriktion, Klenow Reaktion und Ligation erfolgen gemäß Ausubel et al. (1989) oder nach Anweisungen des jeweiligen Enzymherstellers. Die Überprüfung der Klonierungsprodukte wird mit Restriktionsverdau und/oder Sequenzierung durchgeführt.

Die Plasmidisolierung aus transformierten *E. coli*-Zellen erfolgt mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach den Angaben des Herstellers.

Für die Reinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen bzw. Umpufferung wird das QIAquick Nucleotide Removal Kit oder das QIAquick PCR Purification Kit verwendet.

Zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis von DNA werden Agarosegele mit einer Konzentration von 0,75 – 2 % Agarose in TAE-Puffer benutzt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (10 mg/ml Ethidiumbromidlösung) wird die DNA im UV sichtbar gemacht.

<u>TAE-Puffer</u>	<u>DNA-Probenpuffer</u>
40 mM Tris-Acetat	50 % (w/v) Saccharose
1 mM EDTA	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
pH 8,0	in TAE-Puffer

Herstellung des Gesamtzellextraktes von *Halobacterium salinarum*

Es werden 200 µl einer MPK-Zellkultur in stationärer Phase für 2 Minuten mit 10000 Upm abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Dieses Zellpellet wird in 200 µl destilliertem Wasser resuspendiert. Zur Inaktivierung von Enzymen wird der Extrakt für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Mittels dieser Extrakterstellung wurde auch das bop/hop-Fusionsgen nachgewiesen.

2.4.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) (Mullis et al. 1986) stellt eine schnelle und effiziente Methode zur gezielten in vitro Vervielfältigung bestimmter DNA Fragmente dar. Weiterhin kann sie zur Mutation, Fusion, als Nachweis und in Abwandlung zur Sequenzverifizierung bestimmter DNA-Fragmente dienen.

Modifikation mittels PCR

Durch überhängende Basen von sense-Primern können die Enden von DNA-Fragmenten modifiziert werden. Über eine zweite PCR lassen sich diese Überhänge hybridisieren und in Verbindung mit den beiden äußeren Primern ist die Amplifizierung des Fusionsproduktes möglich. Weiterhin können die Überhänge so gewählt werden, daß Protein-„tags“, oder Restriktionsstellen eingefügt werden.

Zur Herstellung der Genprodukte wird das Expand-High-Fidelity-Polymerase-Gemisch, welches sich durch eine geringe Fehlerrate auszeichnet, benutzt.

Reaktionsbedingungen

Pipettierschema:

- 1 µl Primer I (100 pmol/µl) in TE-Puffer
- 1 µl Primer II (100 pmol/µl) in TE-Puffer
- 20 ng Template (Plasmid)
- 10 µl PCR-Puffer (10-fach)(P2)
- 5 µl dNTP's (je 5 mM in Tris)
- 1 µl Polymerase-Gemisch (Zugabe nach 3 min bei 95 °C)
- ad 100 µl H₂O

Thermocycler-Programm:

- Denaturierung: 3 Minuten bei 95 °C vor Zugabe des Polymerase-Gemisches
- 35 Zyklen: 1 Minute bei 95 °C
 - 1 Minute bei 58 °C
 - 1 Minute bei 72 °C

Reinigung und Klonierung von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten

Nach der Auftrennung der PCR-Produkte über ein Agarosegel und dem Ausschneiden der Produktbande aus dem Gel, erfolgt die Reinigung mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit nach dem Standardprotokoll des Herstellers.

Die Klonierung der gereinigten PCR-Produkte wird nach Angaben des jeweiligen Herstellers mit dem Zero Blunt PCR Cloning Kit durchgeführt.

2.4.3 Sequenzieren der Plasmide

Mit dem LI-COR-System können DNA-Abschnitte von über 1200 bp mit einer Reaktion sequenziert werden.

Durchgeführt wird das „Cycle Sequencing“ mit der Thermosequenasenase. Die Markierung der DNA erfolgt durch Verwendung von IRD800-gekoppelten Oligonukleotiden (dyed primer method). Über die Fluoreszenzmarkierung erfolgt die Detektion der DNA-Stränge. Gelelektrophorese und Detektion werden mit dem LI-COR 4200 Gene Reader durchgeführt. Die Reaktionen werden nach Herstellerangaben wie folgt angesetzt und mit Chill-Out-Wax überschichtet. 5,7 µl Plasmid in Trispuffer (100 ng–150 ng DNA pro 1000 Nukleotide) werden mit 0,7 µl 50 % DMSO und 0,6 µl Primer (2 pmol/µl) versetzt, dieser Ansatz auf 4 Reaktionsgefäße à 1,5 µl verteilt und weitere 1,5 µl des jeweiligen Reaktionsmix (G, A, T, C; 1 : 1 mit H₂O verdünnt) zugegeben.

Die Sequenzierungsreaktionen werden in 0,2 ml Gefäßen im Thermocycler in der Regel mit folgenden Parametern durchgeführt:

Denaturierung: 3 Minuten 94 °C
30 Zyklen: 40 Sekunden 94 °C
 40 Sekunden 50 °C
 60 Sekunden 70 °C

Nach Zugabe von 3 µl Stoppuffer wird die Probe für 2 Minuten bei 70 °C denaturiert. Für das Giessen des Gels (4,6 %iges Acrylamidgel, 66 cm lang) wird die unten beschriebene Lösung sterilfiltriert. Die Polymerisation ist nach einer Stunde abgeschlossen. Je 1,5 bis 2,5 µl der Reaktionen werden auf das Gel nach 30 Minuten Vorlaufzeit aufgetragen. Die Detektion erfolgt zeitgleich mit der Elektrophorese mittels

eines Infrarotlasers bei 800 nm. Es wird mit der Software Base ImageIR 4.0 ausgewertet (nach Angaben des Herstellers).

<u>Sequenziergel</u>	<u>10x TBE-Puffer</u>
21 g Harnstoff	162 g Tris-Base
30,5 ml H ₂ O	27,5 g Borsäure
5 ml 10x TBE-Puffer	9,3 g EDTA Na ₂ -Salz
500 µl DMSO	ad 1000 ml H ₂ O
5,6 ml 40 % Acrylamid-Bis-Acrylamid Lsg	
nach Entgasen	<u>TE-Puffer</u>
50 µl TEMED	10 mM Tris
350 µl 10 % APS	1 mM EDTA
	pH 8,0

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Isolierung der halorhodopsinhaltigen Membranen

Die Gesamtmembranfraktion aus *Halobacterium salinarum* wird nach dem modifizierten Verfahren von Oesterhelt et al. (1974) gewonnen.

Nach dem Ernten der Zellen (20 Minuten, 7000 Upm, 4 °C) werden sie in Basal-Salz-Lösung resuspendiert und nochmals zentrifugiert (s.o.). Die anschließende Lyse der Zellen wird mit deionisiertem Wasser (25 ml pro 1 g Zellen), welches mit DNase (1 mg pro 1 g Zellen) versetzt ist, bei 4 °C über Nacht unter Rühren durchgeführt.

Die Isolierung der HR-Membranfraktion wird durch fraktionierende Zentrifugation erreicht. Alle Schritte werden bei 4 °C durchgeführt.

Drehzahl in Upm	Dauer in Min.	Anzahl	Membranfraktion
6000	10	1	Überstand
8000	10	2	Überstand
21500	120	2	Pellet
35000	120	2	Pellet

Abschließend wird das Pellet in H₂O aufgenommen (etwa 1 ml H₂O pro 1 g Zellen)

Basal-Salz-Lösung

250 g NaCl
20 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
1,5 g KCl
ad 1000 ml H_2O

Reinheits- und Konzentrationsbestimmung

Zur Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von HR-Membranen wird ein UV/Vis Spektrum gemessen. Der Anteil an nativem HR wird aus dem Verhältnis A_{280}/A_{578} ermittelt. Die Konzentration ergibt sich über den Zusammenhang:

$$c = A / \epsilon d$$

wobei ϵ der molare Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), d die Schichtdicke (cm) und A die Absorption ist. Der Extinktionskoeffizient schwankt je nach Milieu. So beträgt er in HR-Membranen etwa $50000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient dazu, Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu trennen. Dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Protein-SDS-Komplexe im elektrischen Feld umgekehrt proportional zum Logarithmus der molekularen Masse des Proteins. Die Gelelektrophoresen werden in einem diskontinuierlichen Puffer in einer vertikal angeordneten Flachgel-Elektrophoresekammer nach Laemmli (1970) in der Modifizierung von Hasilik und Neufeld (1980) durchgeführt.

Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel liegt bei 12 %. Die eingesetzten SDS-Polyacrylamidgele sind 11 cm breit und 8 cm hoch. Die Zusammensetzung ist unten aufgeführt.

Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel bei der SDS-PAGE

Trenngel:	Sammelgel:
12 % (w/v) Acrylamid	3,8 % (w/v) Acrylamid
0,4 % (w/v) Bisacrylamid	0,1 % (w/v) Bisacrylamid
0,1 % (w/v) TEMED	0,1 % (w/v) TEMED
0,1 % (w/v) APS	0,1 % (w/v) APS
in Trenngelpuffer	in Sammelgelpuffer

Die in SDS-Probenpuffer vorliegenden Proteine werden 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand auf das Gel aufgetragen.

Die Trennung der Proben erfolgt bei 100 bis 220 V (konstante Spannung), bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht.

Das Anfärben der Gele erfolgt durch eine Coomassie-Färbelösung. Nach zirka 15 Minuten werden die Gele mit Entfärber (10 % (v/v) Essigsäure) behandelt, um unpezifische Färbung zu entfernen.

2x SDS-Probenpuffer

125 mM Tris/HCl
4 % (w/v) SDS
10 % (w/v) β -Mercaptoethanol
20 % (w/v) Glycerin
0,2 % (w/v) Bromphenolblau

5x Harnstoffprobenpuffer

8 M Harnstoff
0,2 M Tris/HCl
2 % (w/v) SDS
0,05 % (w/v) Bromphenolblau
0,2 M DTT

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl
0,4 % (w/v) SDS
pH 6,8

Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl
0,4 % (w/v) SDS
pH 8,8

Laufpuffer

192 mM Glycin
25 mM Tris/HCl
0,1 % (w/v) SDS

Coomassie-Färbelösung

0,05 % (w/v) Coomassie R250
10 % (v/v) Ethanol
25 % (v/v) Essigsäure

2.5.3 Western-Blot-Analyse

Um die Proteine nach der SDS-PAGE qualitativ und quantitativ zu analysieren, wird das sogenannte Western-Blot-Verfahren (Kyhse-Anderson, 1984) durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden die Proteine auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen, und anschließend ein immunochemischer Nachweis mit Antikörpern bzw. Konjugaten durchgeführt.

Auf die als Anode dienende Bodenplatte der Apparatur werden in dieser Reihenfolge vier Lagen Whatman Blotpapier, die Membran, das Gel, und weitere vier Lagen Whatman Blotpapier aufgelegt sowie der Deckel respektive die Kathode angelegt. Der Deckel wird mit einem Gewicht beschwert. Die Membran und Blotpapier werden vor dem Aufbau in Blotpuffer inkubiert.

Der Transfer der Proteine erfolgt mit konstanter Stromstärke von $1,0 \text{ mA/cm}^2$ für 2 Stunden. Anschließend wird das Gel zur Kontrolle der Bloteffizienz mit Coomassie R 250 und die Membran mit Ponceau S Lösung gefärbt. Für die immunochemische Detektion wird die Membran mit TBS Puffer wieder entfärbt.

Immunochemische Detektion

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wird die Membran anschließend mit 10 % (w/v) Milchpulver in TBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Inkubation mit dem peroxidasegekoppelten Antikörper in 10 % Milchpulver erfolgt für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Nachweis von Poly-His

Der ungebundene Antikörper wird durch Waschen der Membran (je 10 Minuten) mit TBS-T (2x) und TBS entfernt.

Bei dem verwendeten Antikörpern handelt es sich um einen Peroxidase gekoppelten Antikörper, der sich mittels Chemolumineszenz detektieren lässt. Als Peroxidasesubstrat wird „Super-Signal“ oder „Super Signal Ultra“ nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der Nachweis der Chemolumineszenz erfolgt über Röntgenfilme, welche je nach Intensität zwischen 2 Sekunden und 2 Stunden exponiert werden.

Folgende Antikörper werden verwendet:

Name	Antigen / Epitop	Eigenschaft	Herkunft	Verwendung
Anti-poly-Histidin	poly-Histidin (α -His)	monoklonal, IgG2a aus Maus, Peroxidase konjugiert	Sigma	1:5000

Blotpuffer

39 mM Glycin
48 mM Tris
20 % (v/v) Methanol

Ponceau S-Färbelösung

0,2 % (w/v) Ponceau S
3 % (w/v) Trichloressigsäure

TBS

20 mM Tris
137 mM NaCl
pH 7,4

TBS-T

20 mM Tris
137 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween 20
pH 7,4

2.5.4 Solubilisierung von Halorhodopsin

Als Detergenz für die Solubilisierung wird Natriumcholat benutzt. Die Durchführung erfolgt unter Rühren für 3 Tage bei Raumtemperatur. Die Halorhodopsinkonzentration im Ansatz wird auf 0,5 mg/ml eingestellt. Wichtig für den Grad der Solubilisierung ist eine Kaliumchloridkonzentration nahe der Sättigung.

Solubilisierungspuffer

5 % (w/w) Natriumcholat
3 M KCl
50 mM Tris/HCl
pH 7,2

2.5.5 Proteinreinigung über hydrophobe Interaktion

Als Säulenmaterial wird HIC Cl4B benutzt. Das Äquilibrieren der Säule erfolgt mit dem Solubilisierungspuffer.

Nach dem Auftragen des solubilisierten Halorhodopsin wird mit etwa 10 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen. Das Eluieren erfolgt durch Austausch des Detergenzes, wobei die Vollständigkeit anhand der Farbe detektiert wird.

Waschpuffer

0,4 % (w/w) Natriumcholat
3 M KCl
50 mM Tris/HCl
pH 7,2

Elutionspuffer

1 % (w/w) n-Oktyl- β -D-glukosid
3 M KCl
50 mM Tris/ HCl
pH 7,2

2.5.6 Proteinreinigung über Gelfiltrationschromatographie

Bei der Gelfiltrationschromatographie werden Makromoleküle nach Größe und Form voneinander getrennt. Die Trennung erfolgt von großen Molekülen zu kleinen, da kleinere Moleküle, aufgrund des porösen Säulenmaterials, eine längere Verweildauer auf der Säule haben.

Zur Durchführung wird die Säule mit 25 ml Gelfiltrationspuffer und einer Flussrate von 120 cm/h äquilibriert. 200 μ l in Gelfiltrationspuffer solubilisiertes HR (48 Stunden, RT, unter Rühren; zentrifugiert bei 100000 g, 45 min) werden über eine Probenschleife aufgetragen. Die Trennung erfolgt bei einer Flussrate von 30 cm/h. Als Laufpuffer dient der Gelfiltrationspuffer. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers werden 500 μ l Fraktionen gesammelt.

Gelfiltrationspuffer (Solubilisierung, Auftragspuffer, Laufpuffer)

500 mM Na/K-PO₄
3 M NaCl
1 % (w/w) n-Oktyl- β -D-glukosid
pH 5,6

2.6 Röntgenographische Methoden

Durch das Auftreffen von Röntgenstrahlung geeigneter Wellenlänge auf kristalline Substanzen ergibt sich ein Beugungsbild mit einer diskreten Intensitätsverteilung. Diese Intensitätsverteilung basiert auf der Interferenz der einzelnen Streustrahlen. Das Reflexionsmuster resultiert aus der Lage der Atome in der Elementarzelle. Durch Kombination der Intensitäten bzw. deren Amplituden mit den Phasen lässt sich eine Elektronendichteverteilung berechnen.

Die Reflexion der Röntgenstrahlen kann nach Bragg als Beugung an Netzebenen eines Gitters beschrieben werden. Ein unter dem Glanzwinkel θ einfallendes, paralleles Röntgenstrahlbündel der Wellenlänge λ wird an Netzebenen im Abstand d zueinander gestreut. Ein Interferenzmaximum muss stets dann zu beobachten sein, wenn die Bedingung:

$$2 d \sin \theta = n \lambda$$

erfüllt ist (Betragsformal nach der Bragg'schen Gleichung), wobei n eine ganze Zahl (die Ordnung der Interferenz) ist.

Die Bragg'sche Gleichung in Vektorform lautet:

$$\vec{S} = \vec{G}$$

d.h. Beugungsreflexe treten auf, wenn der Streuvektor $\vec{S}$ gleich dem reziproken Gittervektor $\vec{G}$ ist. Im reziproken Raum wird der Gittervektor durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\vec{G} = h \cdot \vec{a}^* + k \cdot \vec{b}^* + l \cdot \vec{c}^*$$

wobei h, k, l die Miller'schen Indizes (diese definieren die Elementarzelle des Kristalls) und $\vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^*$ die Einheitsvektoren des reziproken Raumes sind.

Durch den Vergleich der obigen Beziehungen ergibt sich das Bragg'sche Reflexionsgesetz in seiner vollständigen Form:

$$\vec{S} = h \cdot \vec{a}^* + k \cdot \vec{b}^* + l \cdot \vec{c}^*$$

In dieser Arbeit wurden zunächst Beugungsexperimente an Filmen von gestapelten 2D HR-Gittern durchgeführt. Die einzelnen 2D-Gitter liegen in diesen Filmen statistisch orientiert und translationsverschoben übereinander.

Die Auswertung der aufgenommenen Beugungsbilder beginnt mit der Indizierung der Reflexe.

2.6.1 2D Kristallisation von Halorhodopsin-Membranen

Um eine in zwei Dimensionen geordnete Struktur von Halorhodopsinmembranen zu erhalten, wird eine wässrige Lösung von etwa 20 bis 30 mg/ml auf eine Glimmerscheibe aufgetragen und bei 90 % Luftfeuchtigkeit zu einem Film eingetrocknet. Die Glimmerscheiben weisen eine Dicke von 9 bis 12 µm auf. Die optische Dichte des Filmes beträgt etwa 6 OD-Einheiten.

Um definierte Umgebungsbedingungen wie pH-Wert oder Salzkonzentrationen zu schaffen, wird der eingetrocknete Film mit etwa 50 µl einer Lösung aus 50 mM Natriumphosphat pH 6,0 wieder angefeuchtet. Der mit der Lösung bedeckte Film wird bei 100 % Luftfeuchtigkeit über 8 Stunden inkubiert. Anschließend wird die überschüssige Pufferlösung abgesaugt und der Film mit einer weiteren Glimmerscheibe und einem Gummiring abgeschlossen. Als Halterung dienen zwei Aluminiumringe, welche verschraubt werden. Der Abstand zwischen Probe und Detektor beträgt 240 mm.

2.6.2 Berechnung der Gitterkonstanten von HR

Die Beugungsaufnahme der 2D-Kristalle im Film wird mit dem Programm Fit2D (Hammersley, 1998) zirkular Integriert. Anschließend erfolgt die Indizierung der integrierten Streuintensitäten. Anstelle des eher üblichen Beugungswinkels 2θ mit einer bestimmten Intensität berechnet das Programm direkt den Wert Q mit einer bestimmten Intensität. Der Zusammenhang von Q mit dem Streuvektor S zeigt sich in folgender Gleichung:

$$\vec{Q} = 2\pi \cdot \vec{S}$$

Der Streuvektor $\vec{S}$ ergibt sich über die Beziehung:

$$|\vec{S}| = \frac{2}{\lambda} \cdot \sin \theta$$

wobei der halbe Beugungswinkel θ über den Zusammenhang:

$$\tan 2\theta = \frac{r}{L}$$

definiert ist. Die Entfernung L ist der Abstand zwischen Probe und Detektor und r der Radius des Beugungsringes

Die Berechnung der Gitterkonstanten ist unter anderem vom Typ des Gitters abhängig. Für das hexagonale Gitter, wie im Falle der Purpurmembra, ergibt sich aus dem Bragg'schen Reflexionsgesetz:

$$\frac{2}{\lambda} \cdot \sin \theta = \frac{2}{\sqrt{3} \cdot a_{BR}} \cdot \sqrt{h^2 + k^2 + hk}$$

wobei a die Gitterkonstante, λ die Wellenlänge und h und k die Miller'schen Indizes sind. Für das tetragonale Gitter am Beispiel von HR gilt:

$$\frac{2}{\lambda} \cdot \sin \theta = \frac{1}{a_{HR}} \sqrt{h^2 + k^2}$$

2.6.3 3D Kristallisationsversuche von HR mit klassischen Methoden

Die Kristallisation von Halorhodopsin-Membranen nach der „Sitting-Drop“-Methode (Dampfdiffusion) wird nach der modifizierten Vorschrift von Fukuda et al. (1990) und Kouyama et al. (1999) durchgeführt.

Die Kristallisation mittels Dampfdiffusion hat den Vorteil, dass sie einfach zu präparieren ist und nur wenig Probe erfordert. Weiterhin lässt sich über einen breiten Parameterbereich variieren. In einem abgeschlossenen System steht hierbei ein Tropfen Proteinlösung (1–40 μ l) verdünnt mit Fällungspuffer in einem Ungleichgewicht mit dem Dampfdruck des reinen Fällungsmittels. Die Ausgangskonzentration des Fällungsmittels im Tropfen ist geringer als die Konzentration des Fällungsmittels im Reservoir. Über die Zeit gleichen

sich die beiden Dampfdrücke über einen Wasserentzug aus dem Tropfen aus, was einer Konzentrationserhöhung des Proteins im Tropfen entspricht. Nach dem Äquilibrieren sollte die Proteinlösung übersättigt sein, damit sich in Abhängigkeit von der Keimbildungsrate Kristalle ausbilden können.

Die Präparation beginnt mit der Delipidierung der HR-Membranen durch eine Inkubation von 30 Minuten mit der Delipidierungslösung. Die Konzentration der HR-Membranen im Ansatz betrug 5 mg/ml. Anschließend werden die Membranen abzentrifugiert (25 Minuten, 45000 Upm, 4 °C) und mit dem Waschpuffer gewaschen (3x). Unter Rühren (48 Stunden bei 32 °C) in Solubilisierungslösung wird das HR solubilisiert. Nach dem Zentrifugieren (6500 Upm, 4 °C) wird der Überstand direkt zur Kristallisation eingesetzt.

Delipidierungslösung

0,2 % Tween 20
0,1 M NaCl
50 mM Hepes
pH 8,0

Waschpuffer

0,1 M NaCl
50 mM Hepes
pH 8,0

Solubilisierungslösung

0,25 % Octylthioglycosid
1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,16 M NaCl
0,04 M Natriumcitrat
0,02 % NaN_3
pH 5,2

Reservoirlösung

2,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,08 M Natriumcitrat

2.6.4 Kristallisation von HR mit der kubischen Lipidphase

Um die Stabilität der in solubilisiertem Zustand in der Regel sehr instabilen Membranproteine zu erhöhen können sie in eine Lipiddoppelschicht eingebracht werden (Newman et al., 1981; Page et al., 1988). Lipide zeichnen sich durch eine große Anzahl von Phasen (u.a. lamellar, hexagonal und kubisch) aus. Bei der Interaktion von Proteinen mit der kubischen Phase treten meistens zwei Anordnungen auf: (A) eine geschlossene diskontinuierliche mizellare Anordnung, in der die Lipidmizellen in einem kubischen Gitter umgeben von Wasserbereichen vorliegen; (B) die bikontinuierliche kubische Phase

in der die Lipide in einer kontinuierlichen Membrandoppelschicht vorliegen, welche zwei verschiedene Wasserkanalsysteme voneinander trennt (Abb. 2–1).

Bei der Zugabe von Membranproteinlösung, oder Detergenzmolekülen lagern diese sich in dem Lipidbereich an. In Anordnung (A) ist die Diffusion auf einen kleinen Bereich beschränkt. Das System B erlaubt hingegen eine freie Diffusion von lipidlöslichen Substanzen, welche sich dann unter den geeigneten Bedingungen zu geordneten Strukturen zusammenlagern können (Rummel et al., 1998).

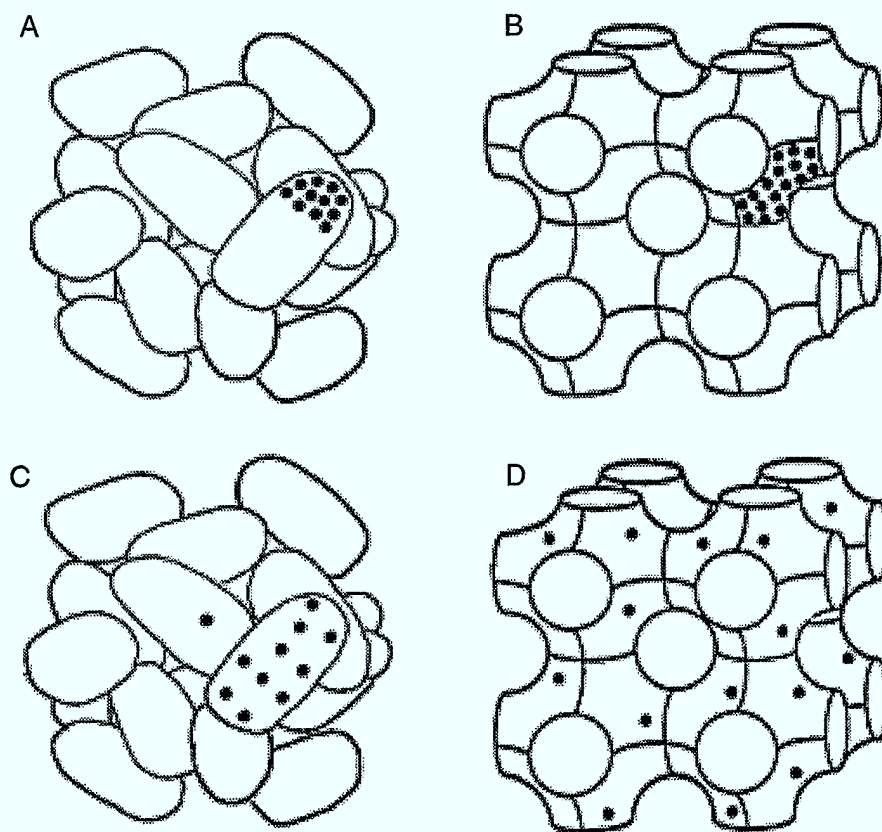


Abbildung 2–1: Schematische Ansicht der Diffusion in diskontinuierlichen (A und C) und in bikontinuierlichen Phasen (B und D) (aus Rummel et al., 1998)

Das kubische Phasesystem des Lipides 1-Monooleoyl-rac-Glycerol (MO) ist ein sehr gut untersuchtes System (Briggs et al., 1996). Genau dieses System lieferte die ersten hochauflösenden Kristalle des Membranproteins BR (Landau und Rosenbusch, 1996).

Um die Kristallisation durchzuführen, wird das gereinigte und solubilisierte Halorhodopsin (im Elutionspuffer) in einer Konzentration von etwa 3 mg/ml mit 1-Monooleoyl-rac-Glycerol (C18:1, [cis 9]) (kurz: Monoolein, oder MO) vermischt. Die Zusammensetzung der resultierenden kubischen Phase und die Durchführung der Kristallisation ist an die Veröffentlichung von Landau und Rosenbusch (1996) angelehnt. Die Kristallisation wird in PCR-Tubes durchgeführt. Das Lipid wird bei 42 °C geschmolzen und ein Lipid/Proteinverhältnis von 60 % zu 40 % eingestellt. Nach Durchmischung werden die Ansätze über Nacht bei 24 °C gelagert.

Die Bildung von Kristallen geschieht durch den Entzug von Feuchtigkeit aus der kubischen Phase, welcher durch Zugabe einer wasserentziehenden Substanz geschieht. Die Geschwindigkeit des Wasserentzuges ist entscheidend für die Bildung von geordneten Proteinstrukturen. Die weitere Lagerung erfolgt bei 24 °C.

2.6.5 Präparation der Kristalle für die Röntgenbeugungsexperimente

Um die Kristalle für die Röntgenbeugungsexperimente zu präparieren, wird die Lipidphase, in der sich die Kristalle befinden, mit einer Lösung von 10 mg/ml Lipase in gesättigter Sørensen-Salz-Lösung (pH 5,0) über Nacht inkubiert. Anschließend wird die Salzphase von der zersetzten Lipidphase durch Abschneiden getrennt und die zersetzte Lipidphase in eine gesättigte Sørensen-Salz-Lösung (pH 5,0) mit 20 % Glycerin gegeben. Die Kristalle werden dann möglichst ohne mechanischen Stress von den Lipidresten isoliert, mit der „Loop-Mounting“-Methode entnommen (Teng, 1990) und im Stickstoffgasstrom bei 100 K schockgefroren.

2.7 Spektroskopische Methoden

2.7.1 Statische UV/Vis-Spektroskopie: Titration von HR-Membranen mit Chlorid

Apparatur

Für Messungen von Absorptionsspektren halorhodopsinhaltiger Membranen (HR-Membranen) im sichtbaren und ultravioletten Wellenlängenbereich wird das Shimadzu UV-2101PC Photometer benutzt. Es handelt sich dabei um ein Zweistrahlphotometer, wobei ein Strahl zur Messung der Referenz benutzt wird. Die Eliminierung von Streulichteinflüssen erfolgt durch die Verwendung einer Ulbrichtkugel.

Probenpräparation

Die gereinigten HR-Membranen werden zur Entfernung sämtlicher Chloridionen mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen. Eine Verunreinigung mit Cytochrom lässt sich allerdings durch intensives Waschen nicht beseitigen.

Die Titration kann nicht in Lösung durchgeführt werden, da die Membranen bei einer Salzkonzentration im Puffer von über 1 M aggregieren. Zur Verhinderung der Aggregation werden zwei Arten der Probenpräparation eingesetzt:

1. Einbetten der HR-Membranen in ein Polyacrylamidgel

Es wird eine Plastikzuvette als Gussform benutzt, welche nach dem Polymerisieren des Gels zerstört wird. Das Gel wird dann in eine Quarzuvette überführt. Die Durchführung der Titration erfolgt von dem Puffer mit niedrigster Chlorid-Konzentration zu dem mit der höchsten Konzentration. Um den vollständigen Austausch zu gewährleisten, wird die Probe dreimal mit dem neuen Puffer gespült.

Zusammensetzung der HR-Polyacrylamidgele:

300 μ l Roti-Gel 30 Mix
 150 μ l HR-Membran-Lsg ($c_{HR} = 3$ mg/ml)
 750 μ l 25 mM MES-Puffer mit 1,6 M Na_2SO_4
 20 μ l APS
 1 μ l TEMED
 pH 6,0

2. Eintrocknen einer HR-Membranlösung an der Wand einer Küvette

Bei dieser Methode wird eine der inneren Wände der Quarzküvette vorsichtig mit einer HR-Membranlösung der Konzentration 3 mg/ml benetzt. Dieser Tropfen wird dann unter einem leichten Stickstoffstrom getrocknet. Die Durchführung der Messung erfolgt wie bei der ersten Methode beschrieben.

Puffer für die Titration

Grundpuffer	Zusatz von 5 mM bis 1 M Chlorid	Zusatz von 2 M bis 5 M Chlorid	Zusatz von 6 M bis 10 M Chlorid
25 mM MES	5 mM; 10 mM; 50mM; 100 mM; 500 mM; 1 M NaCl	2 M; 2,5 M; 3 M; 4 M; 5 M NaCl	3 M; 4 M; 5 M $CaCl_2$
pH 6,0	immer 1 M Na_2SO_4		

Der Wechsel von NaCl zu $CaCl_2$ erfolgte aufgrund der Löslichkeitsgrenze von Natriumchlorid, unter diesen Bedingungen bei etwa 5,5 mol/l.

Geringfügige Schichtdickenveränderungen durch Pufferwechsel und sich leicht ändernde Position des Filmes im Messstrahl während der Titrationsexperimente werden durch eine Skalierung der Spektren ausgeglichen.

2.7.2 Zeitaufgelöste sichtbare Spektroskopie an HR-Membranen

Apparatur

Die Detektion der zeitlichen Absorptionsänderung der HR-Membranen erfolgt mit Weißlicht, welches in einem Spektrographen nach Wellenlängen aufgespalten und von einem CCD-Chip detektiert wird (Abb. 2-2).

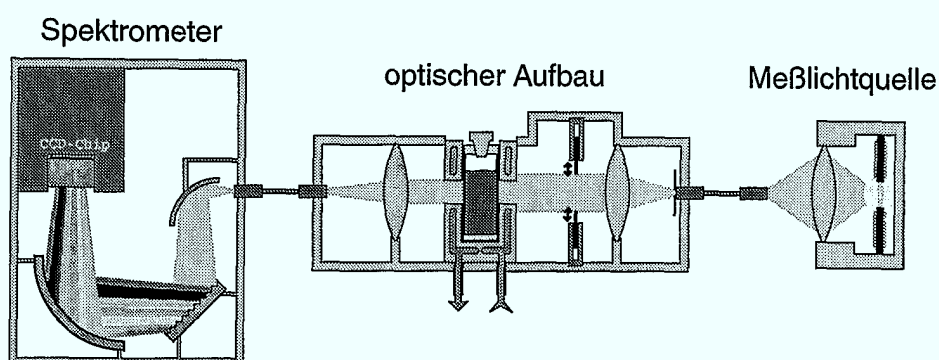


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Apparatur für zeitaufgelöste sichtbare Spektroskopie

Die Apparatur ist in 3 Teilbereiche unterteilt, die über Faserkabel miteinander verbunden sind. Die Anregung der Probe erfolgt durch seitliche Lasereinstrahlung (nicht gezeigt).

Das Licht einer Xe-Lampe wird mittels zweier Linsen in ein Glasfaserbündel eingekoppelt, und anschließend über eine Blende ein bestimmter Bereich ausgewählt. Eine weitere Linse dient dazu, das daraus austretende annähernd punktförmige Licht zu parallelisieren. Über einen danach folgenden Verschluss kann das Licht, zum Beispiel für Basislinienmessungen, abgeblockt werden. Hinter dem Verschluss befindet sich der thermostatisierte Küvettenhalter, in dem die Temperatur innerhalb der Küvette, mit einem Thermoelement, gemessen wird. Das Messlicht wird anschließend mittels einer Sammellinse in ein Glasfaserbündel eingekoppelt, welches das Licht zur spektralen Aufspaltung in einen Spektrographen (Acton) leitet. Eine CCD-Kamera von Princeton

dient der Digitalisierung und über ein Kontrollgerät werden die Daten zur Weiterverarbeitung an einen Computer übermittelt.

Mit der Mikrokanalplatte der CCD-Kamera ist eine Belichtungszeit von 7 ns möglich, durch die Intensität des Messlichtes und des Anregungslichtes ergibt sich in der Praxis eine minimale Belichtungszeit von etwa 500 ns.

Eine genaue Beschreibung der Apparatur und Durchführung der zeitaufgelösten sichtbaren Spektroskopie findet sich in der Dissertation von Hehn (2000).

Probenpräparation

Die Messungen werden an HR-Membranen, welche in 7,5 % Polyacrylamid eingebettet sind, durchgeführt (siehe Titration).

Die Pufferbedingungen sind identisch mit den oben beschriebenen Pufferbedingungen für die Titration ohne Chlorid bzw. mit 3 M Chlorid. Auch hier erfolgt vor jeder Messung eine Adaption mit Gelblicht.

2.7.3 Zeitaufgelöste FT-IR Spektroskopie an HR-Membranen

Apparatur

Die zeitaufgelösten FT-IR-Messungen werden mit einem Bruker IFS 66v Spektrometer durchgeführt (Abb. 2-3). Ein Globar (Siliziumcarbidwendel) erzeugt durch Erhitzen auf zirka 1500 °C die IR-Strahlung. Die Probenkammer wird mit trockener Luft gespült, der Rest des Gerätes ist auf 4-8 mbar evakuiert. Zur Detektion der IR-Strahlung steht ein MCT-Detektor (Hg-Cd-Te) zur Verfügung. Die bestmögliche Zeitauflösung beträgt bei step-scan Messungen 5 µs. Durch einen Breitbandfilter der Firma OCLI (optical coating laboratory inc.) kann das Schwarz-Körper-Spektrum des Globars auf den Bereich zwischen 950 und 1950 cm⁻¹ beschränkt werden. Dies dient zusammen mit einer Auflösung von 4,5 cm⁻¹ der Reduzierung der Anzahl der Interferogrammpunkte.

Um die Änderungen der Orientierungen der Helizes detektieren zu können, lässt sich ein Polarisator in den Strahlengang fahren, welcher für die Messungen parallel- oder senkrecht-polarisiertes Messlicht selektiert. Die Orientierung parallel und senkrecht bezieht sich auf die Einfallsebene des Messstrahls.

Zur Anregung der Probe wird ein Nd:YAG Laser benutzt (Spectra Physics GCR 12S), welcher einen 1064 nm Puls erzeugt, der mit Hilfe eines KH_2PO_4 -Kristalls frequenzverdoppelt wird. Es resultiert ein Laserpuls, welcher eine Wellenlänge von 532 nm besitzt. Die Energie des Anregungspulses wird durch ein an ein Oszilloskop angeschlossenes Pyroelement (Radiant Dyes PEM 50) kontrolliert und für die Messungen auf zirka 1 mJ eingestellt. Die Zuführung des Laserstrahls zur Probenkammer geschieht durch ein Faserbündel.

Die zum Spektrometer gelieferte Software Opus ermöglicht die komfortable Steuerung des Gerätes.

Sämtliche FT-IR-Messungen an Halorhodopsin wurden in Zusammenarbeit mit C. Bolwien durchgeführt. In dessen Dissertation findet sich auch eine genaue Beschreibung der technischen Details (Bolwien, Diss, 2001).

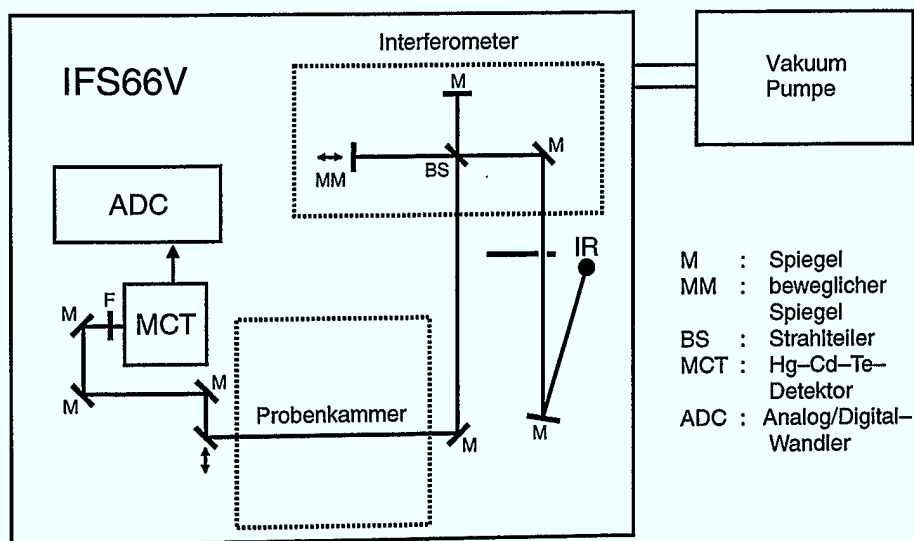


Abbildung 2-3: Schematischer Aufbau des Bruker IFS66V
(Modifiziert aus Bolwien, Diss, 2001)

Die ATR–Technik

Um Membranproteine unter definierten Pufferbedingungen zu untersuchen, bietet sich die Methode der abgeschwächten Totalreflektion (ATR = attenuated total reflection) an (Heberle, 1999).

Über ein Spiegelsystem wird der Messstrahl in einen ATR–Kristall eingekoppelt. Durch Totalreflektion wird der Strahl innerhalb des Kristalls mehrfach an der Grenzfläche zum optisch dünnerem Medium reflektiert. Auf der anderen Seite tritt der Strahl wieder aus und gelangt über ein Spiegelsystem zum Detektor (Abb. 2–4).

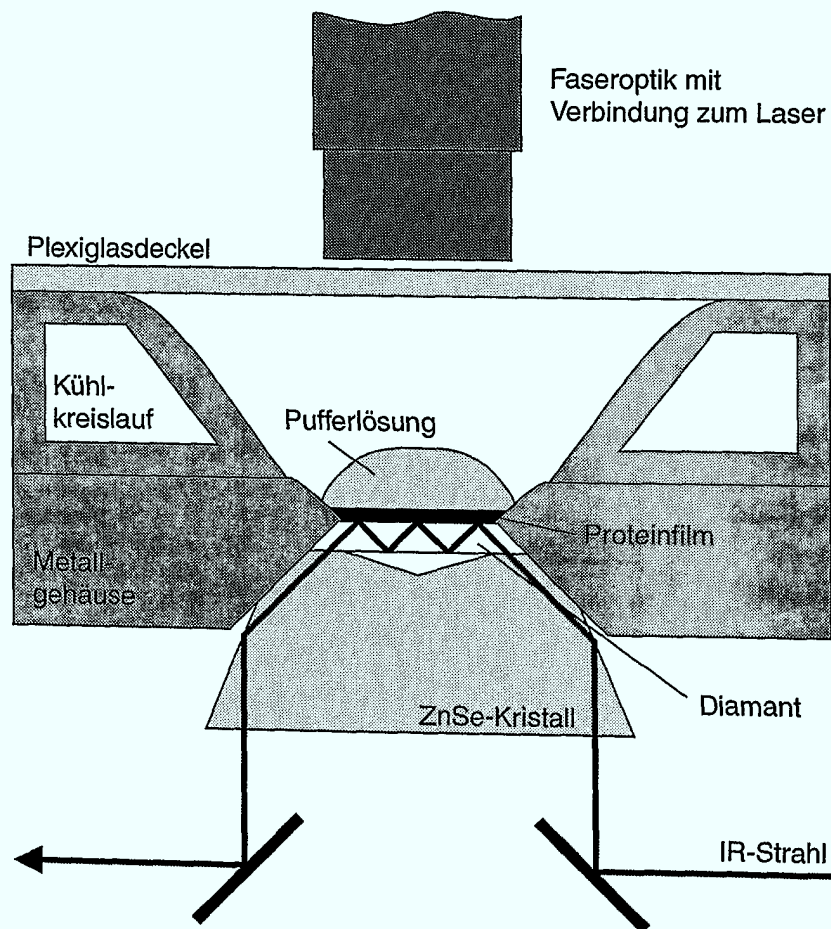


Abbildung 2–4: Schematischer Aufbau einer ATR Messzelle
(Bolwien, Diss, 2001)

Bei der Reflektion an der Grenzfläche tritt ein Teil der Intensität der Welle in den Raum jenseits des Kristalls ein, es ergibt sich eine sogenannte evaneszierende Welle. Eine direkt auf dem Kristall liegende Probe kann damit erfasst werden und zeigt Absorptionsbanden im Infrarotspektrum. Die Eindringtiefe des Strahls liegt in der Größenordnung der verwendeten Wellenlänge, so dass bei diesem Aufbau der Einfluss der Wasserabsorption unabhängig von der aufliegenden Wassermenge konstant und klein ist. Aufgrund der geringen Eindringtiefe ist ein guter Kontakt der Probe zur Kristalloberfläche ein notwendiges Kriterium für diese Messmethode. Der grosse Vorteil liegt in der inhärent kleinen Weglänge des IR-Lichtes durch das Probenvolumen. Dadurch werden Störungen, die durch die Absorption des Wassers verursacht werden, minimiert. Bei der Transmissionsmessung wird dies durch sehr dünne, abgeschlossene Probenzellen erreicht, welche wiederum den Nachteil der ungenauen Einstellung der Chloridkonzentration haben. Somit ist der ATR-Aufbau gerade für die Messung der Chloridabhängigkeit der HR-Membranen optimal geeignet.

Probenpräparation

Es werden 5 µl einer mehrmals gewaschenen wässrigen HR-Membranlösung ($c_{\text{HR}} = 2$ mg/ml) auf den ATR-Mikrokristall gegeben und mit einem schwachen Stickstoffstrom zu einem homogenen Film getrocknet. Anschließend wird der Film mit dem jeweiligen Messpuffer überschichtet, wobei durch mehrmaliges Waschen der vollständige Austausch und damit das Einstellen der Pufferbedingungen sichergestellt wird. Sobald der Film vollständig rehydratisiert ist, was über das IR-Spektrum kontrolliert wird, kann die Messung begonnen werden.

Die entsprechenden Pufferbedingungen werden wie folgt erzielt: Als Basispuffer wird ein 10 mM Na/K PO_4 -Puffer, pH 6,0 verwendet. Die Messungen ohne Chlorid werden an einem HR-Film, welcher von 100 % relativer Luftfeuchtigkeit umgeben ist, durchgeführt. Die verschiedenen Chlorid-Konzentrationen werden über Zugabe von NaCl zu dem Basispuffer erreicht. Bei Chloridkonzentrationen bis 1 mol/l wird 1 mol/l KNO_3 zugegeben, um ein Ablösen des Films zu verhindern.

3 Ergebnisse und deren Diskussion

Das Ziel der folgenden Experimente war es, Halorhodopsin (HR) aus *Halobacterium salinarum* homolog zu exprimieren und als zweidimensionales Gitter in der Membran zu erhalten. Diese "Membranpatches" sollten gereinigt und für spektroskopische Zwecke eingesetzt werden. Desweiteren galt es das Protein, zu solubilisieren und zu kristallisieren.

3.1 Fusion des HR-Gens mit dem Promotor von BR

Für die Expression von HR wurde dessen kodierender Bereich (inkl. Signalsequenz) (hop) aus dem Gesamtzellextrakt von *Halobacterium salinarum* (Stamm MPK40) zunächst mit den Primern FP-HR-Start und GP-HR-Stop über eine PCR amplifiziert (Abb. 3-1A). Nach der Ligation in den Vektor pCR-Blunt wurde eine Transformation in kompetente *E.coli* DH5 α durchgeführt. Einzelkolonien, welche unter Kanamycinselektionsdruck gewachsen waren, wurden angezogen und eine Miniplasmidisolierung vorgenommen. Es handelte sich um ein 821 Basenpaare (Bp) langes Fragment. Das Konstrukt pCRblunt_HR#3II wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt.

Für die homologe Überexpression wurde das Gen unter die Kontrolle des natürlichen Promotors des Bakterioopsingens (bop) gestellt. Das 432 Bp (393 Bp bis zum ATG und die für das Signalpeptid kodierende Sequenz von 39 Bp) lange Teilfragment des bop Gens lag in einem pUC Vektor vor (Konstrukt: pUC:bopI) und wurde von Frau R. Schlesinger zur Verfügung gestellt. Der bop Promotor ist der stärkste Promotor der vier bakteriellen Rhodopsine aus *Halobacterium salinarum* und wird in der späten logarithmischen Phase des Wachstums der Bakterien durch Lichteinfall und Sauerstoffmangel induziert (Yang und DasSarma, 1990, Shand und Bettlach, 1991). Nach Xu et al. (1995) befinden sich in der Signalsequenz ungewöhnlicherweise Promotorelemente die für die Transkription essentiell sind. Weiterhin wurde dort gezeigt, dass dieser Sequenzbereich die Stabilität der mRNA erhöht. Die Signalsequenz des bop Gens wird erst kurz vor Einbau in die Membran durch enzymatische Spaltung posttranslational modifiziert (Dunn et al., 1981, Seehra und Khorana, 1984). Auch für das Fusionsgen wird eine posttranslationale Modifikation erwartet, die zum Abschneiden der bop Signalsequenz führt. Das Ziel dieser Verknüpfung war, die Expression von HR in *H. salinarum* auf das Maß zu erhöhen, in dem BR exprimiert wird. Damit sollte eine purpurmembranartige Anordnung erhalten

werden, die eine einfache Isolierung im natürlichen membrangebundenen Zustand ermöglicht (Heymann et al., 1993).

Die Fusion wurde mit Hilfe einer zweistufigen PCR durchgeführt (Abb. 3–2). Hierbei wurden im ersten Schritt in getrennten Reaktionen die Enden der zu fusionierenden Teilabschnitte, also zum einen des hop Gens und zum anderen des Teilfragmentes des bop Gens, modifiziert. Die Modifikationen wurden über Primer mit Überhängen eingeführt. Der Anti-sense (End-His-HR) Primer enthielt neben eines Sequenzabschnittes des hop Gens die Kodierung für 6 Histidin-Reste, ein Stop-Codon und eine HindIII Schnittstelle. Über die Hybridisierung der modifizierten Enden und der flankierenden Primern konnte in einer zweiten PCR die Fusion des bop Promotors mit dem hop Gen erzielt werden. Das erhaltene PCR-Produkt wurde auf einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und das gewünschte Fragment mit einer Länge von etwa 1,4 kB daraus isoliert (Abb. 3–1B). Bei der Bande zwischen 500 und 1000 Basenpaaren handelt es sich um nicht-fusioniertes Teilfragment des hop Gens. Das Fusionsprodukt wurde in den Vektor pCR-Blunt kloniert.

Zur Kontrolle des resultierenden Konstruktes 0208_5a wurden ein BamHI/HindIII Verdau und eine Sequenzierung durchgeführt.

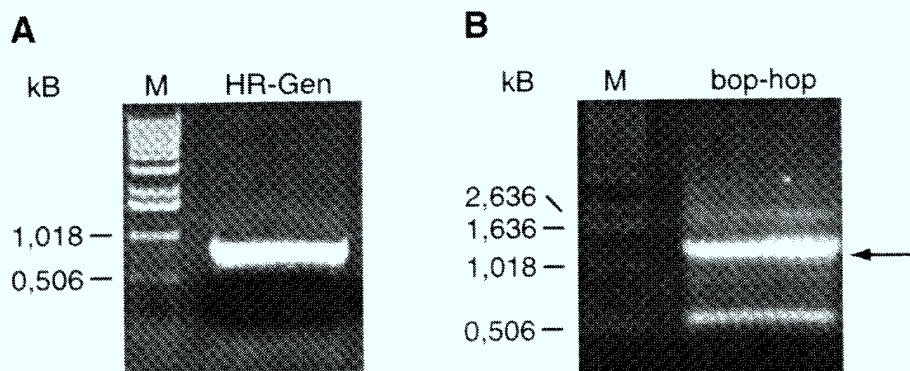


Abbildung 3–1: Präparative Agarosegele mit PCR-Produkten

A: HR-Gen (hop) aus *H. salinarum* (Stamm MPK) amplifiziert mit den Primern FP-HR-Start und GP-HR-Stop.

B: Amplifizierung der bop/hop Expressionskassette mit den Primern bop-BamHI und End-His-HR. Die Bande des gewünschten Amplifikationsproduktes ist durch einen Pfeil markiert.

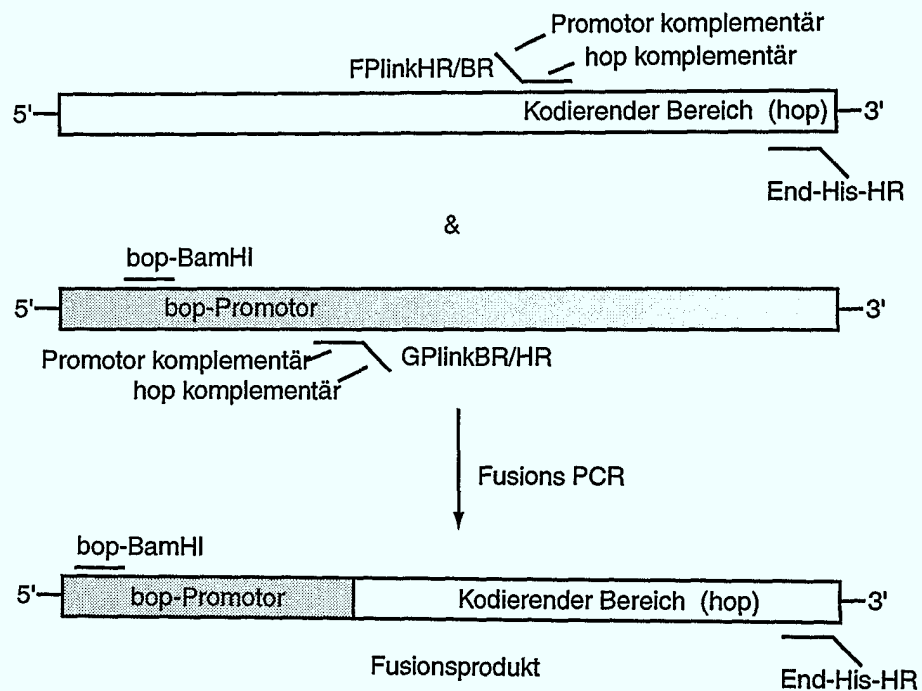


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Fusion bop/hop
PCR I und II dienen zur Modifikation der Enden der jeweiligen Genabschnitte. Mit der zweiten PCR folgt die Fusion der beiden Fragmente.

3.2 Klonierung des bop/hop-Gens in halobakterielle Vektoren und Transformation in *H. salinarum*

Die Klonierung der bop/hop-Expressionskassette in die halobakteriellen Vektoren pXL und pHSblue (siehe Anhang), wurde über die Schnittstellen BamHI und HindIII vorgenommen. In den erhaltenen Tetracyclin (pXL) beziehungsweise Kanamycin (pHSblue) resistenten Kolonien (*E.coli* DH5 α) wurde das Fusions-Gen durch Restriktion nachgewiesen (Abb. 3–3A) (pXL;DF#1(4); pHSblue;DF#1(8)).

Als Rezipienten für die Vektoren wurden die BR-negativen *Halobacterium salinarum*-Stämme MPK40 und L33 gewählt.

Die Transformation erfolgte wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben über Sphäroplastenbildung mit Hilfe von EDTA und PEG600. Die Integrität der Konstrukte wurde durch PCR-Reaktion an Gesamtzellextrakten mit den Primern bop-BamHI und End-His-HR nachgewiesen. (Abb. 3–3B).

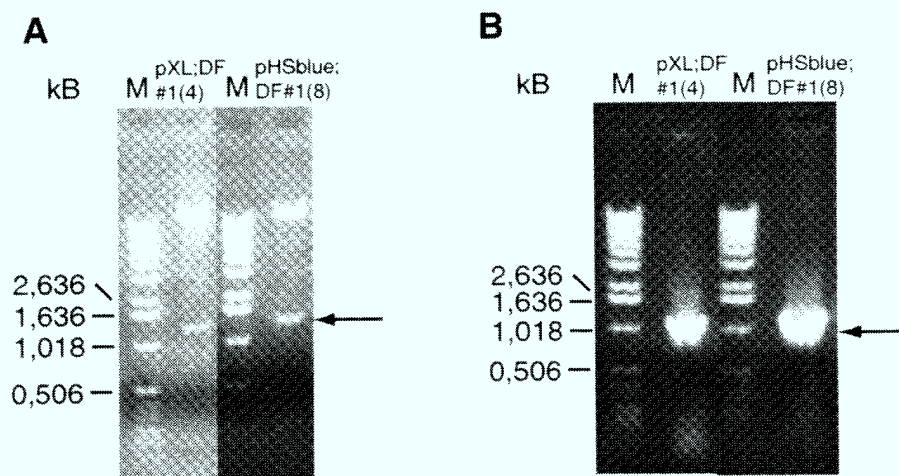


Abbildung 3–3: Kontrolle der Inserts

A: Kontrolle der Inserts der Vektoren pXL:DF#1(4) und pHSblue:DF#1(8). Die auf Pfeilhöhe liegenden Banden sind BamHI/HindIII Fragmente und entsprechen in ihrer Größe dem bop/hop Fusionsprodukt.

B: Kontrolle der Integrität der Konstrukte nach der Transformation in Halobakterien. Die DNA von Einzelkolonien wurde mit den Primern bop-BamHI und End-His-HR amplifiziert.

3.3 Homologe Expression von HR in *Halobacterium salinarum*

Zur Expression des Halorhodopsins wurden Transformanten der *H. salinarum* Stämme MPK40 und L33 unter Novobiocin–Selektionsdruck, zum einen in Schüttelkolben und zum anderen im Fermenter (nur L33), angezogen. Da sich die sehr gut exprimierenden Konstrukte pHSblue;DF#1(8)_3_MPK und pXL;DF#1(4)_2_MPK bzw. pHSblue;DF#1(8)_2_L33 und pXL;DF#1(4)_3_L33 bei den ersten Expressionstests sehr ähnlich verhielten wurde später der Einfachheit halber nur noch das Konstrukt pXL;DF#1(4)_3_L33 eingesetzt. Anhand der Wachstumskurven ergab sich im Mittel eine Wachstumsdauer von etwa 60 Stunden unter sauerstoffreichen Bedingungen, bis zur spätlogarithmische Phase (Abb. 3–4). Anschließend wurde die Expression unter Reduzierung der Sauerstoffzufuhr und mit der Beleuchtung durch Weisslicht fortgesetzt. Die Dauer dieser Expressionsphase betrug etwa 80 Stunden. Nach dieser Zeit zeigte sich für die optische Dichte der Expressionkultur in dem Fermenter ein abnehmender Absorptionswert, was auf ein Absterben der Bakterien schließen lässt. Der Zeitpunkt der Ernte wurde anhand der Wachstumskurven bzw. anhand der blau-violetten Verfärbung der Zellen festgelegt. Als besonders günstig für eine gute Ausbeute erwies sich das Stehenlassen der Expressionskultur, nach der Inkubation im Schüttelkolben. Die optimale Standzeit betrug etwa 2 bis 3 Tage bei Raumtemperatur unter der Beleuchtung mit Weisslicht. Es ist anzunehmen, dass unter diesen extremen Sauerstoffmangelbedingungen der bop Promotor besonders ausgeprägt induziert wird.

Bei dem Vergleich des Wachstumsverhaltens des Stammes L33 im Fermenter und im Kolben zeigt sich ein ähnlicher Verlauf der beiden Wachstumskurven. Nach etwa 40 Stunden war im Fermenter eine OD₄₀₀ von 0,65 und im Kolben eine OD₄₀₀ von 0,55 festzustellen. Insgesamt ließ sich für die Wachstumskurve des Fermenters ein etwas steilerer Verlauf mit im Mittel größeren OD–Werten erkennen. Dies ist auf die optimalen Wachstumsbedingungen im Fermenter zurückzuführen. Im Gegensatz zu der Schüttelkultur wird der pH–Wert im Fermenter konstant gehalten und durch den Einstrom von Luft eine optimale Sauerstoffzufuhr während der Wachstumsphase sichergestellt.

Einen deutlich langsameren Wachstumsverlauf zeigte der Stamm MPK40 in der Schüttelkolbenkultur. Nach 40 Stunden wurde in der MPK40–Kultur eine OD₄₀₀ von 0,2 gemessen. Die gesamte Wachstumskurve verläuft deutlich flacher als die des Stammes L33.

Neben der flachen Wachstumskurve liegt ein großer Nachteil des Stammes MPK40 darin, dass er Bakterioruberine produziert, welche die spektroskopischen Untersuchungen und die visuelle Kontrolle der Expression erheblich stören. Aus diesem Grunde wurde nach dem Etablieren des Systems nur noch auf den Stamm L33 zurückgegriffen. Auf eine Expression im Fermenter von MPK40 wurde aufgrund der Verunreinigung des Proteins durch die Bakterioruberine ebenfalls verzichtet. Der Einfluß der Bakterioruberine auf das Absorptionsspektrum zeigt sich in Abbildung 3–5. Die Absorptionsmaxima der Bakterioruberine liegen in einem Bereich von 400 bis 600 nm und beeinflussen damit die HR/Retinalbande, welche ein Absorptionsmaximum bei 578 nm besitzt.

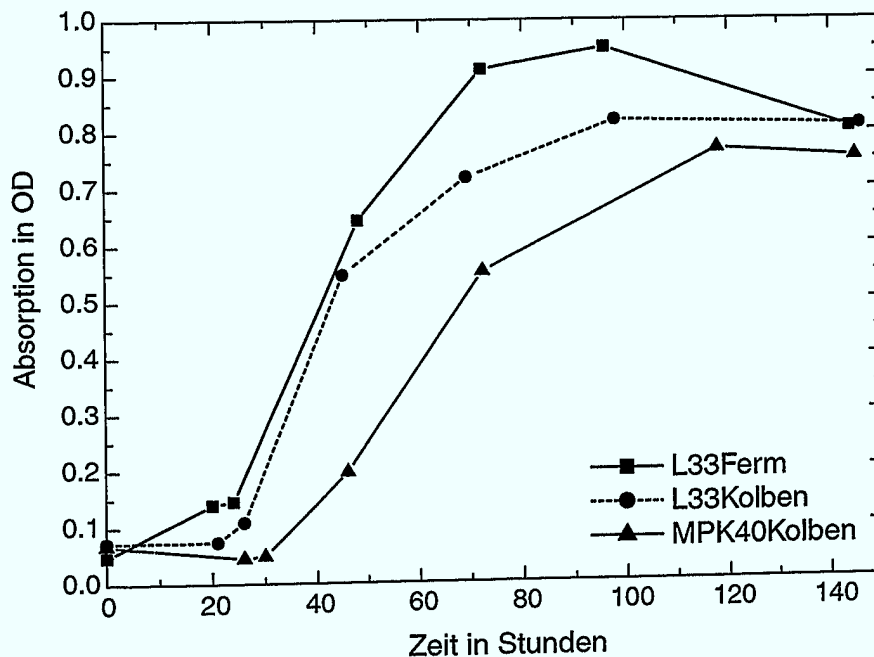


Abbildung 3–4: Vergleich der Wachstumskurven
In der Abbildung sind die Wachstumsverläufe der Konstrukte pXL;DF#1(4)_3_L33 (Fermenter und Schüttelkolben) und pXL;DF#1(4)_2_MPK (Schüttelkolben) dargestellt. Nach etwa 60 Stunden wurde die Sauerstoffzufuhr reduziert.

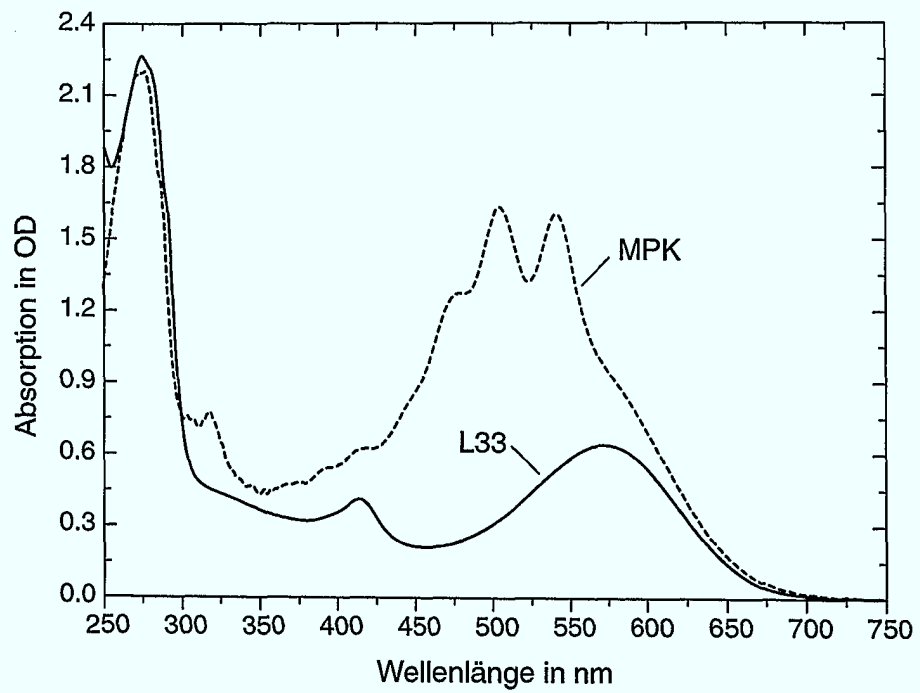


Abbildung 3-5: Absorptionsspektren gereinigter HR-Membranen aus L33 und MPK40

3.4 Isolierung und Reinigung der HR-Membranen

Die Isolierung erfolgte nach der in Kapitel 2.5.1 beschriebenen Methode für BR-Purpurmbranen von Oesterhelt et al. (1974). Die Vollständigkeit der Sedimentierung der HR-Membranen konnte nur bei deutlich höheren Drehzahlen bzw. über eine Verlängerung der Zentrifugationszeiten erreicht werden. Dies ist vermutlich auf eine geringere Masse der einzelnen HR-Membranfragmente im Vergleich zu BR-Purpurmbranen (BR-PM) zurückzuführen. Die Expressionsrate und die Qualität des gewonnenen HR war im Vergleich zu BR deutlich herabgesetzt. So wurden aus 8 L Kulturvolumen etwa 30 mg HR gewonnen, was in etwa der Hälfte einer BR-Expression (Überexpression Stamm S9: 60–80 mg) entspricht. Im UV/Vis Spektrum (Abb. 3–5) ist in dem Bereich von 410 bis 425 nm eine Absorptionsbande zu erkennen, die auf die Verunreinigung durch ein bei 415 nm absorbierendes Cytochrom zurückzuführen ist. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein membrangebundenes Cytochrom B (Sumper et al., 1976). Dieses lässt sich auch durch intensives Waschen der Membranen nicht entfernen. Der Cytochrom-Anteil hängt direkt proportional von der Sauerstoffkonzentration ab. Bei hohen Sauerstoffkonzentrationen während der Expression steigt der Anteil an. Selbst bei einer für die Expression von HR günstigen niedrigen Sauerstoffkonzentration lässt sich ein geringer Cytochromanteil nicht verhindern. In der Praxis hat sich das bereits beschriebene Stehenlassen der Bakterienkultur von zwei bis drei Tagen nach der Expression, bei Raumtemperatur, als günstig für einen niedrigen Cytochromgehalt erwiesen.

Die isolierten HR-Membranen wurden zur Überprüfung mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 3–6A). Es zeigte sich, dass im Vergleich zu BR die HR-Bande bei niedrigerem Molekulargewicht verläuft. Dies erscheint überraschend, da das Molekulargewicht von HR (27,4 kDa) das von BR (26,8 kDa) um 0,6 kDa übertrifft. Das Laufverhalten von HR im SDS-Gel wird allerdings stark durch den extrem hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren beeinflusst. Oesterhelt (1995) verweist ebenfalls auf die auch für ein Membranprotein sehr hohe Hydrophobizität von HR.

Die aus je einer Expression im Schüttelkolben und im Fermenter gewonnenen HR-Membranen wurden zum Vergleich mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 3–6B). Es zeigte sich für die Schüttelkolben-Expression eine Doppelbande auf der Höhe von 27 kDa. Dies ist auf teilweise unprozessiertes HR zurückzuführen. Wahrscheinlich kann im Gegensatz zum Fermenter, in dem während der gesamten Expression optimale

Wachstumsbedingungen herrschen, in der Kolbenkultur aufgrund der sich ändernden Kulturbedingungen die Protease, welche die Prozessierung der Vorläufersequenz durchführt, nicht optimal arbeiten. Im Fermenter hingegen wird das HR offensichtlich vollständig prozessiert, was sich in einer Bande widerspiegelt.

Um nachzuweisen, dass es sich bei der durch Coomassie-Färbung detektierten Bande um das exprimierte HR handelte, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Mit Hilfe eines gegen den Histidin-Tag gerichteten Antikörpers konnte das Protein über die 6 Histidine des C-Terminus nachgewiesen werden (Abb. 3–6C).

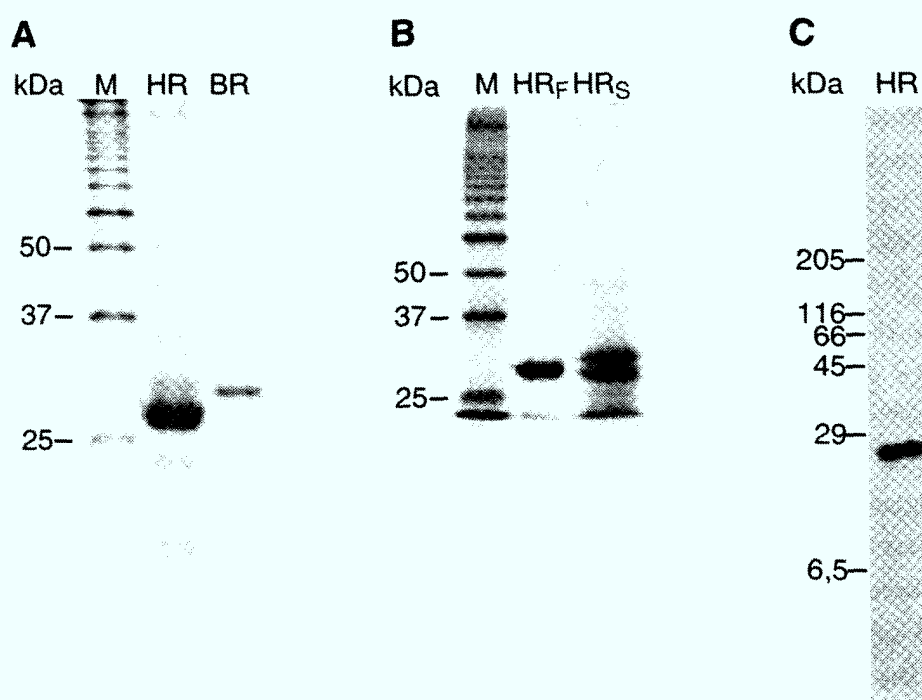


Abbildung 3–6:

Analyse von HR mittels SDS–PAGE und Western–Blot

A: SDS–PAGE mit Coomassie–Färbung: HR–Membranen aus L33 (Kolbenexpression) im Vergleich zu BR aus S9

B: SDS–PAGE mit Coomassie–Färbung: Vergleich der Expression von HR im Schüttelkolben (HR_S) mit der Expression im Fermenter (HR_F)

C: Western–Blot–Analyse von HR–Membranen aus der Schüttelkolben–Expression unter Verwendung eines His–Tag–Antikörpers

3.5 Solubilisieren von Halorhodopsin

Um das Membranprotein HR zu solubilisieren und anschließend in Kristallisationsversuchen einzusetzen, wurde zunächst versucht die für das verwandte BR etablierten Methoden zu benutzen. Somit wurde als Detergenz n-Oktyl- β -D-glykosid (OG) eingesetzt, welches im Falle des BRs nach 60 Stunden bei 4 °C zwischen 50 und 90 Prozent des Proteins solubilisiert (Dencher und Heyn, 1978). Es zeigte sich jedoch, dass sich HR im Vergleich zu BR in Detergenzien wesentlich instabiler verhält. Der Versuch, HR direkt mit OG zu solubilisieren, führte zu Ausbeuten von unter 10 Prozent. Weiterhin war die Qualität des solubilisierten HR sehr schlecht. Die Beurteilung der Qualität erfolgte über das Verhältnis der Absorption der aromatischen Aminosäuren (A_{280}) zur Absorption des gebundenen Retinals in Halorhodopsin (A_{578}). Das Absorptionsverhältnis der gereinigten HR-Membranen lag zwischen 2,0 und 3,0. Durch die Prozedur des Solubilisierens mit OG veränderte sich das Absorptionsverhältnis auf $> 4,5$. Gleichzeitig trat bei etwa 410 nm (denaturiertes HR) eine große Bande auf, welche bei etwa 360 nm (freies Retinal) eine Schulter besaß.

Eine Abtrennung des denaturierten Proteins mittels anschließender Gelfiltrationschromatographie war prinzipiell möglich. Dies läßt sich an der kleinen Absorptionsbande, die vor der Hauptfraktion nur bei der Wellenlänge von 280 nm auftrat, erkennen (Abb. 3–7). Hierbei handelt es sich vermutlich um denaturiertes HR, oder um eine Verunreinigung. Die Hauptfraktion des HR stellte sich nicht als einheitliches Absorptionsmaximum dar, sondern beinhaltete verschiedene Nebenmaxima. Diese Fraktionen wurden voneinander getrennt aufgefangen und separat weiterbearbeitet. Leider konnte durch die Abtrennung des Fremdproteins und des denaturierten HR das Absorptionsverhältnis nicht verbessert werden. Dies ist nur über eine Denaturierung des solubilisierten HR während oder direkt nach dem Säulenlauf zu erklären. Die verschiedenen gesammelten Fraktionen zeigten ebenfalls keinen Unterschied in der Stabilität und Qualität. In allen drei getrennt behandelten Fraktionen wurden Absorptionsverhältnisse zwischen 4,5 und 5 gemessen.

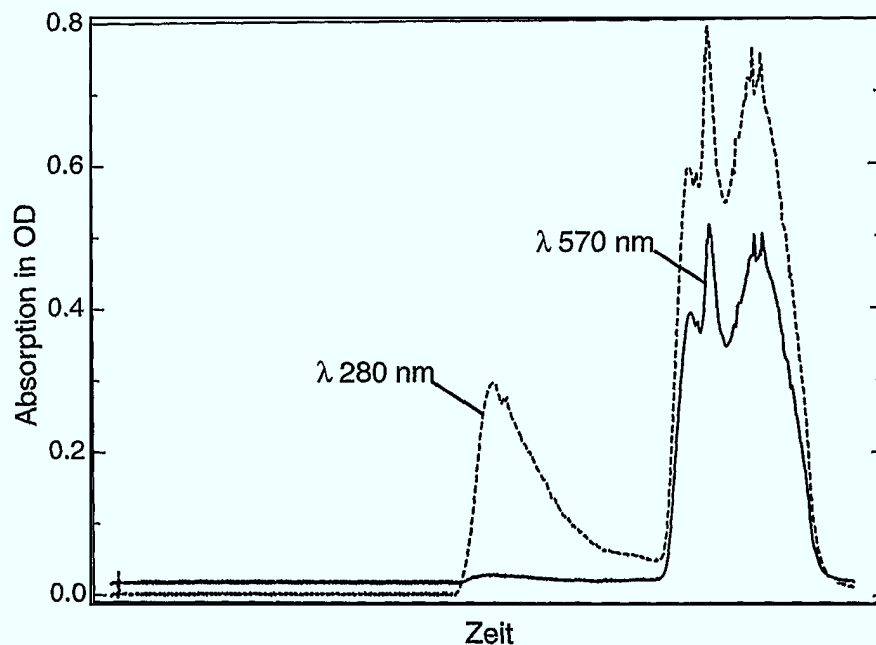


Abbildung 3-7: Gelfiltration von solubilisiertem HR
Detektiert wurden die Absorptions/Zeitverläufe der Wellenlängen 280 nm und 570 nm.

Die schlechte Solubilisierungsrate und das schlechte Absorptionsverhältnis konnte durch verschiedenste Detergenzkonzentrationen, Puffersysteme und Zusätze nicht verbessert werden.

Auch mit den Detergenzien Triton X-100 und n-Dodecyl- β -D-maltosid konnte kein zur Kristallisation einsetzbares HR solubilisiert werden.

Erst das Solubilisieren mit dem Detergenz Natriumcholat, der Reinigung durch die hydrophobe Interaktions-Chromatographie und dem Eluieren durch Austausch gegen OG (Duschl et al., 1988) führte zu einem Absorptionsverhältnis von 1,7 (Abb. 3-8). Der erzielte Reinheitsgehalt ist um 8 % höher als in der Literatur (1,85) (Steiner und Oesterhelt 1983) angegeben.

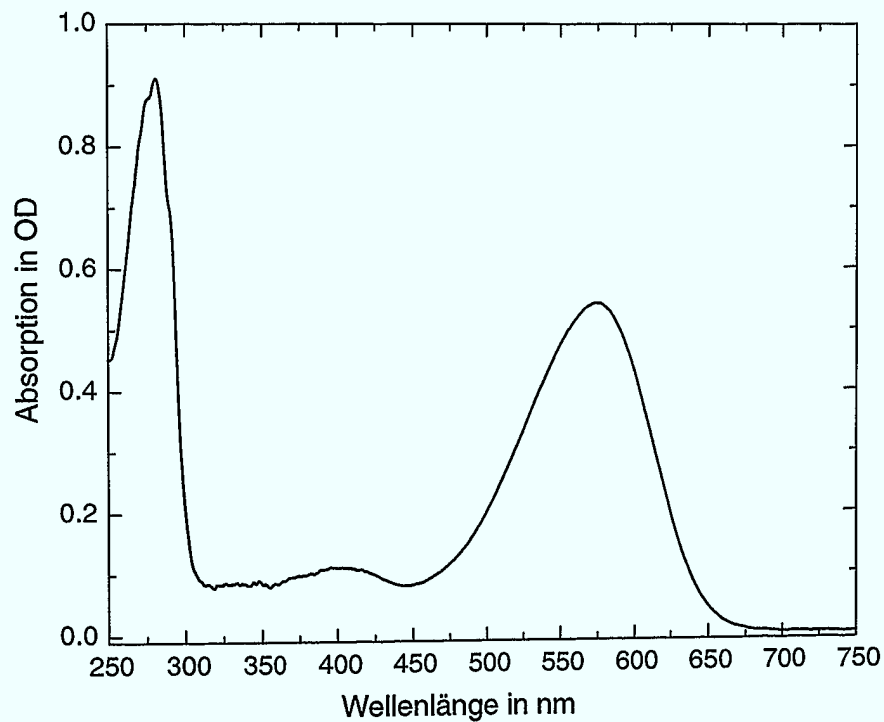


Abbildung 3–8: Absorptionsspektrum von solubilisiertem HR
Die HR-Membranen wurden mit Natriumcholat solubilisiert und das Detergenz über eine hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) gegen OG ausgetauscht.

3.6 Kristallisation von Halorhodopsin

3.6.1 2D-Kristalle von Halorhodopsin

Die Herstellung von Filmen aus 2D HR-Gittern erfolgte wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben. Zur Kontrolle wurde eine BR-Purpurmbranprobe unter gleichen Bedingungen hergestellt. Die aufgezeichneten Beugungsbilder wurden zirkular integriert und die Werte für Q (Q entspricht dem Streuvektor S multipliziert mit 2π) berechnet (Abb. 3–9A). Die Vorgehensweise und Herleitung der Formeln ist in Kapitel 2.6.2 beschrieben. Um herauszufinden, um welchen Gittertyp es sich handelt, wurden die Werte für Q gegen die jeweilige Gitterformel, welche die Miller'schen Indizes beinhaltet, aufgetragen. Da sich unter den vorliegenden Gegebenheiten ein linearer Zusammenhang ergibt, sollten die Punkte, die den einzelnen Reflexen entsprechen, auf einer Geraden liegen. Diese Bedingung ließ sich für HR am besten mit der Annahme eines tetragonalen Gitters erfüllen (Abb. 3–9B). Für BR ergab sich ein hexagonales Gitter.

Aus der Steigung der Geraden läßt sich die Gitterkonstante a berechnen. Für die Purpurmbran ergibt sich für $a_{BR} = 62,5 \text{ \AA}$ und für das HR-Gitter $a_{HR} = 98 \text{ \AA}$.

Die publizierte Gitterkonstante für HR-Membranen beträgt $102 \text{ \AA}$ (Havelka et al., 1993). Diese wurde mittels Kryoelektronenmikroskopie ermittelt, wobei eine Auflösung von $6 \text{ \AA}$ erreicht werden konnte. Die HR-Membranen für diese Versuche wurden aus dem *H. salinarum* Stamm D2 isoliert.

Der Unterschied der publizierten zu der aus den Ergebnissen berechneten Gitterkonstanten beträgt 4% . Diese Abweichung kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Ein Fehler resultiert sicherlich aus der Benutzung der Gitterkonstanten von BR für die Eichung, da deren Fehler in die Berechnung der Gitterkonstanten von HR eingeht. Zum anderen ergibt sich eine Veränderung der Gitterkonstante durch unterschiedliche Wasser- und Lipidanteile zwischen der in der Literatur eingesetzten und der in dieser Arbeit gemessenen Probe. Gerade der Lipidanteil und die Art der Lipide kann je nach Präparation und Stamm stark variieren (Corcelli et al., 2000).

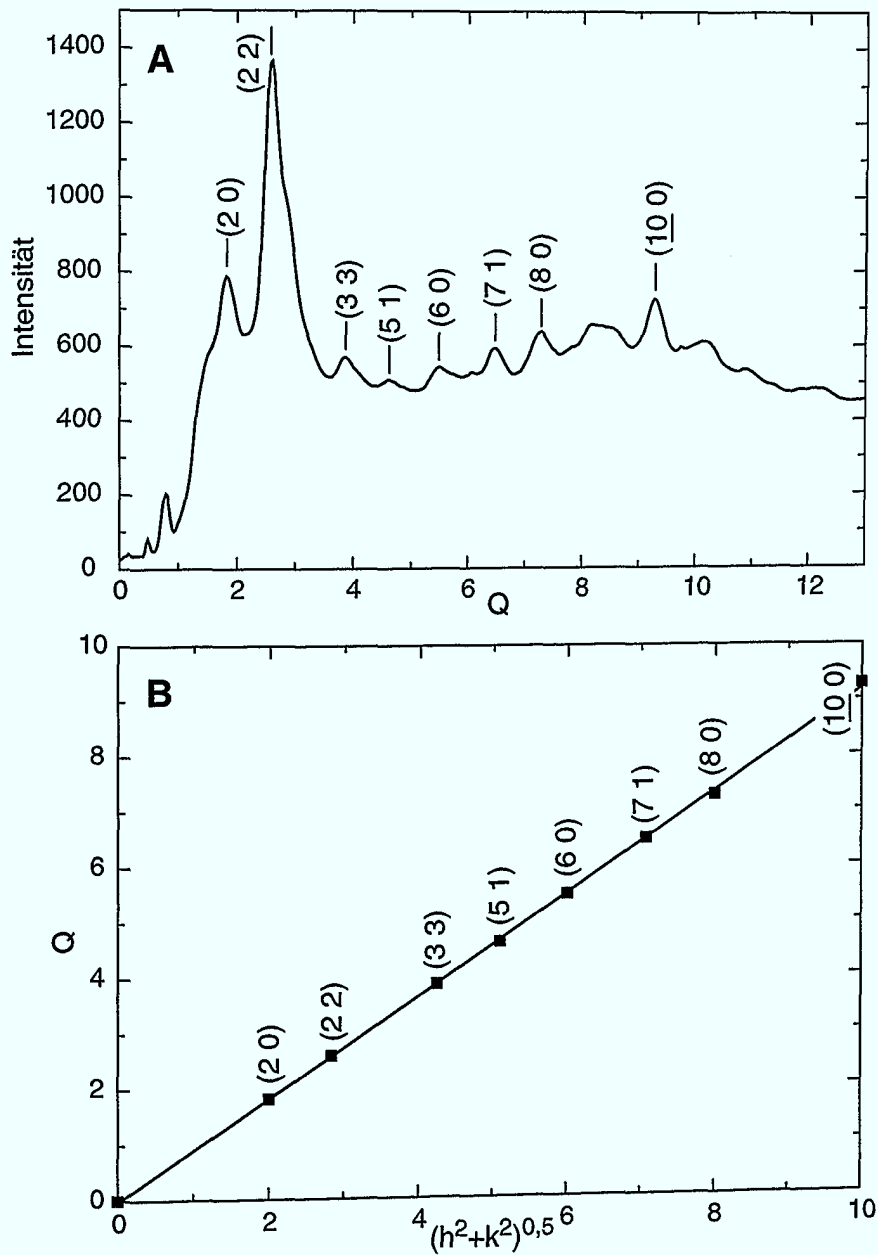


Abbildung 3-9: Streuintensitäten und Indizierung von 2D HR-Kristallen
 A: Zirkular Integriertes Beugungsmuster von HR. Gezeigt ist die Zuordnung der Miller'schen Indizes.
 B: Lineare Abhängigkeit der Werte für Q zu der Formel für das tetragonale Gitter.

3.6.2 3D Kristalle von Halorhodopsin

Die Hydrophobie des Membranproteins HR erschwert die Benutzung von Systemen zur Kristallisation, wie sie für wasserlösliche Proteine eingesetzt werden. Durch den Einsatz von Detergenzien, welche sich an die hydrophoben Bereiche anlagern und damit das Protein hydrophil machen, können klassische Methoden wie zum Beispiel die „Sitting Drop“-Technik zu Kristallisation von Protein/Detergenz-Mizellen benutzt werden (Michel und Oesterhelt, 1980; Garavito und Rosenbusch, 1980). Die Übertragung dieser klassischen Methoden der Kristallisation löslicher Proteine ist bisher allerdings nur für einige wenige Membranproteine erfolgreich verlaufen.

Eine weitere Möglichkeit, Membranproteine zu kristallisieren, ist die Einbettung in eine lipidische Umgebung über die sogenannte kubische Lipidphase (Landau und Rosenbusch, 1996).

3.6.3 Kristallisationsversuche mit der „Sitting Drop“ Methode (Dampfdiffusion)

Der erste Ansatz bestand darin, die Kristallisationsmethode für BR durch Dampfdiffusion (Fukuda et al., 1990; Kouyama et al., 1999) auf HR zu übertragen. Zur Etablierung der Methode wurde die Kristallisation für BR nachvollzogen, wobei sich bereits in den ersten Versuchen hexagonale Kristalle produzieren ließen. Bei der Übertragung der Methode auf HR, zeigten sich große Schwierigkeiten die HR-Membranen durch n-Oktylthio- β -D-glykosid (OTG) zu solubilisieren. Die BR-Solubilisierungsparameter (5 Tage, 32 °C) führten zu einer Denaturierung des HR, welche sich in einem Absorptionsverhältnis A_{280}/A_{578} von 5,5 widerspiegelt. Durch eine anschließende Gelfiltration mittels FPLC konnte das Verhältnis der Absorptionsmaxima nicht verbessert werden. Über die Variation der Parameter Zeit und Temperatur konnte gezeigt werden, dass HR sehr instabil in OTG ist. Dabei scheint schon während des Vorganges des Solubilisierens ein großer Teil zu denaturieren. Auch der Wechsel zu dem Detergenz OG brachte keine Verbesserung der Qualität.

Um den „Stress“ des Solubilisierens zu umgehen, wurden die HR-Membranen für 2 Tage bei 4 °C in Solubilisierungslösung inkubiert. Das HR befand sich nach dieser Zeit noch immer in einer membrangebundenen Form. Die Suspension wurde dann direkt in die Kristallisation eingesetzt. Das Ziel dieser Versuche war es, das Solubilisieren quasi im

Kristallisationsansatz durchzuführen und auf diese Weise sehr schonend Kristalle zu erhalten. Angelehnt ist diese Methode an die Beschreibung von Nollert et al. (1999), der die Kristallisation von BR in der kubischen Phase mit Detergenz ohne vorherige Solubilisierung beschreibt. Auf das HR übertragen blieb diese Methode bisher erfolglos. Dies ist mit der generell sehr geringen Solubilisierungsleistung der HR-Membranen durch OG und OTG zu erklären, die im Kristallisationsansatz extrem langsam bis gar nicht erfolgen dürfte. Die Stabilität der HR-Membranen ist unter diesen Bedingungen sehr hoch, was sich an 15 Monate alten Ansätzen zeigt, die noch immer die blaue Farbe von HR aufweisen.

Ein weiterer Ansatz der verfolgt wurde, war die Benutzung von Halorhodopsin, welches mit Natriumcholat solubilisiert wurde. Über die HIC-Säule wurde das Detergenz dann gegen OG bzw. OTG ausgetauscht. Die Stabilitätsprobleme bei der Präparation waren somit behoben. Allerdings veränderte sich bereits nach 3 Tagen im Kristallisationsansatz die Farbe des Proteins von blau nach gelb. Dies läßt auf eine Denaturierung schließen. Kristalle konnten leider in diesem kurzen Zeitraum nicht gewonnen werden. Auch durch eine umfangreiche Variation der Parameter (Temperatur bei der Präparation und Kristallisation, Konzentration des Detergenz, Pufferbedingungen) konnte die Stabilität nicht wesentlich erhöht werden.

3.6.4 Kristallisation von HR in der kubischen Lipidphase

Die ersten Versuche der Kristallisation von HR in der kubischen Phase bestanden erneut darin, die Kristallisationsbedingungen und Probenpräparation von BR auf HR zu übertragen. Die Bedingungen von BR führten für HR zu einer inhomogenen/faserigen Verteilung in der kubischen Phase. Erst die Reinigung und Solubilisierung nach Duschl et al. (1988) führte zu einer homogenen Verteilung des HRs in einem bestimmten Bereich der kubischen Phase (Abb. 3–10). Die Verteilung ähnelte der von BR, welches zu Anfang ebenfalls homogen verteilt in der kubischen Phase vorliegt. Dieses kann somit als Qualitätskriterium und als notwendige Voraussetzung für die Kristallisation von bakteriellen Rhodopsinen mit diesem System betrachtet werden.

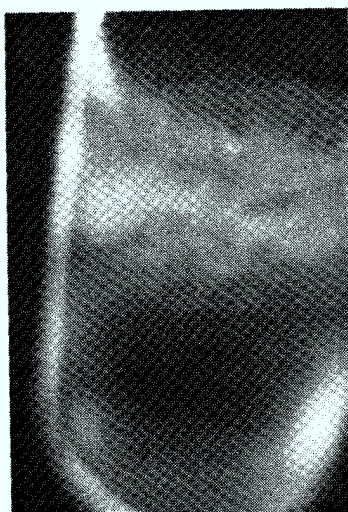


Abbildung 3-10: Verteilung des HR in der kubischen Lipidphase

In dem PCR-Reaktionsgefäß verteilt sich das solubilisierter HR homogen in bestimmten Bereichen.

Der Wasserentzug aus der kubischen Phase, welcher für die Kristallisation von essentieller Bedeutung ist, geschieht bei der BR-Kristallisation mit einem Sørensen-Salzgemisch. Bei der Kristallisation von HR konnten auf diese Weise keine Kristalle erzielt werden, und dies obwohl verschiedenste Parameter (Konzentration im Ansatz, Mischungsverhältnis des Salzes, Art der Zugabe) variiert wurden. Zur Findung eines geeigneten wasserentziehenden „Salzes“ wurden umfangreiche Versuchsreihen mit den verschiedensten Substanzen (Glyzerin, KCl, Saccharose, Sorbitol, NaAc, Na_2CO_3 , MgCl_2 , MgSO_4 , CaCl_2 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und den Polyethylenglykolen (PEGs) 600, 1000, 1500, 2000, 3350, 4000, 5000) durchgeführt. Die Stabilität des HR variierte stark in Abhängigkeit der zugegebenen Substanz. Durch die Zugabe von CaCl_2 und NH_4Cl beispielsweise, wurde der Ansatz bereits nach einem Tag gelb. Die Salze KCl und MgSO_4 verhielten sich dagegen wesentlich schonender, hier konnte die blaue Farbe des Proteins noch nach 6 Monaten beobachtet werden. Erfolg stellte sich mit den Polyethylenglykolen als wasserentziehende Substanz ein. Die abgebildeten Kristalle von HR konnten mit Polyethylenglykol (PEG) 3350 erhalten werden (Abb. 3-11).

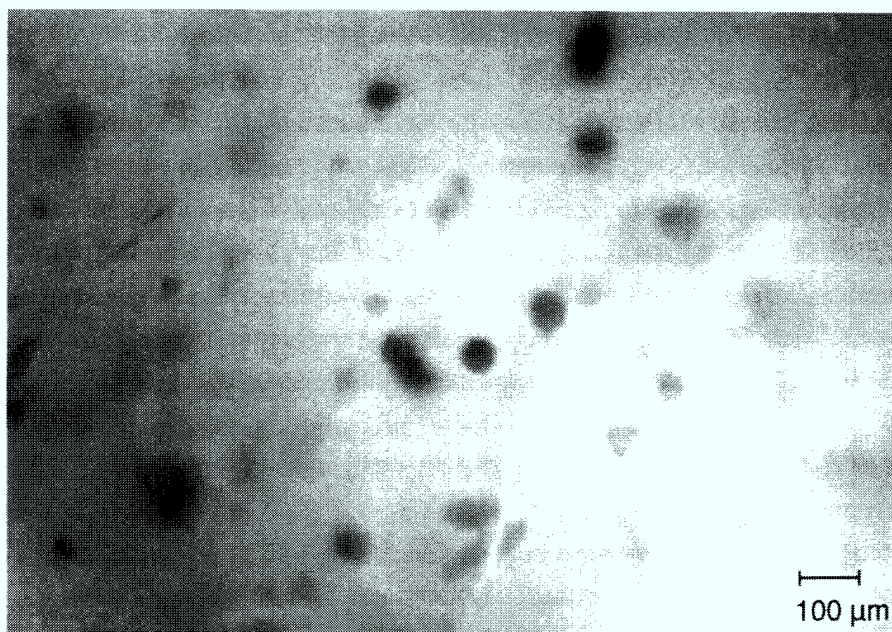


Abbildung 3–11: HR-Kristalle in der kubischen Lipidphase
Nach 3 Wochen gewachsene HR-Kristalle. Die Unschärfe resultiert aus der Schwierigkeit der Fokussierung.

Die ersten Keime zeigten sich bereits nach 4 Tagen. Das Ende des Wachstums war nach etwa 3 Wochen erreicht. Die Ausmaße der größeren Kristalle betrugen $50 \times 50 \times 20 \mu\text{m}$ ($H \times B \times T$). Die Kanten der Kristalle waren jedoch nicht scharf definiert, sondern eher brüchig, was sich durch Änderung der Kristallisationsparameter nicht verhindern ließ. Dies deutet auf Verwachsungen hin. Die Reproduktion dieser trichterförmigen Kristalle erwies sich als problemlos, allerdings zeigten alle getesteten Kristalle keine Diffraktion. Als Ursachen für die schlechten Beugungseigenschaften der Kristalle kommen mehrere Faktoren in Frage. Schnelles Wachstum kann eine Häufung von Fehlstellen und Fehlorderungen innerhalb des Kristallgitters bewirken. Solche Fehlstellen beenden nicht nur das Wachstum eines Kristalls, sondern beeinträchtigen auch die Gitterordnung, was sich wiederum ungünstig auf die Diffraktionseigenschaften auswirkt (McPherson, 1999). Eine Erhöhung der Gitterordnung durch Verzögerung der Kristallisation konnte bisher nicht erreicht werden.

Zwischenfazit: Die Vorteile der Überexpression von Halorhodopsin in *H. salinarum*

Die Expression von HR mit Hilfe des *bop*-Promotors ist aufgrund der Ähnlichkeit (GC-Anteil und Codonauswahl) der Gene optimal. Die Genprodukte BR und HR haben eine ähnliche Sekundärstruktur. Als Kofaktor ist Retinal jeweils notwendig für die richtige Faltung und Funktion des Apoenzyms. Beide Proteine haben aminoterminalen Präsequenzen, die im reifen Protein prozessiert sind. Die je nach Expressionsbedingungen bei der SDS-PAGE auftretende Doppelbande von HR tritt bei retinalnegativen Halobakterienzellen nicht auf. Es könnte sich dabei also um ein Vorläuferprotein handeln, welches in Abwesenheit von Retinal nicht proteolytisch gespalten werden kann (Hegemann et al., 1984). Für BR werden ebenfalls verschiedene Prozessierungsstufen des Vorläuferproteins beschrieben (Wöhler et al., 1988).

Die Vorteile des Expressionssystems liegen in der Verfügbarkeit großer Mengen von HR und in der hohen Stabilität durch die Umgebung der Lipide, welche während der sehr schonenden Reinigung erhalten bleibt. Dabei stieg in den Halobakterien die HR-Konzentration durch die Überexpression so weit an, dass sich *in vivo* 2D Gitter ausbildeten. Unter diesen Bedingungen ließ sich HR –ähnlich wie BR– als sehr reine Fraktion isolieren. Die Röntgenbeugungsexperimente bestätigten die gute Qualität dieser Isolation (Kapitel 3.6).

3.7 Spektroskopische Untersuchungen des HR-Photozyklus

Der HR-Photozyklus wurde insbesondere bezüglich seiner Chloridabhängigkeit mit verschiedenen spektroskopischen Methoden untersucht. Zunächst wurde eine Chloridtitration durchgeführt und die Absorptionsänderung im sichtbaren Wellenlängenbereich detektiert. Weiterhin wurden zeitaufgelöste Messungen des Photozyklus sowohl im sichtbaren als auch im infraroten Wellenlängenbereich vorgenommen. Um eine Aussage über die Ionenabhängigkeit treffen zu können, wurden die Messungen bei verschiedenen Chloridkonzentrationen durchgeführt.

3.7.1 Statische UV/Vis-Spektroskopie: Titration von HR-Membranen mit Chlorid

Wie bereits für solubilisiertes HR gezeigt wurde, haben Anionen bezüglich ihrer Art und Konzentration einen Einfluss auf das Absorptionsspektrum von HR (Steiner et al., 1984 und Schobert et al., 1986). In der vorliegenden Arbeit wurden die Absorptionsspektren von HR-Membranen bei verschiedenen Chloridkonzentrationen aufgenommen (Abb. 3–12).

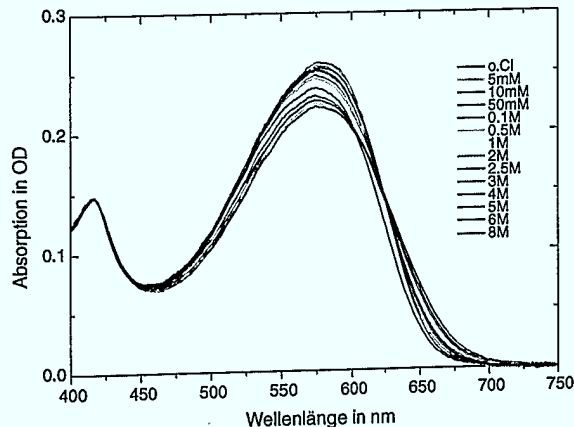


Abbildung 3–12: UV/Vis-Spektren von HR-Membranen in Gegenwart verschiedener Chloridkonzentrationen
Die Spektren wurden an einem HR-Membranfilm aufgenommen. Die Absorption bei 415 nm diente zur Skalierung der Spektren.

Da sich bei der Durchführung der Messungen geringe Veränderungen der Schichtdicke des HR-Membranfilmes durch Pufferwechsel und Positionierung im Messstrahl nicht vermeiden ließen, wurde auf die Absorptionsbande des Cytochrom B skaliert (Sumper et al., 1976). Diese Absorptionsbande weist keine Chloridabhängigkeit auf. Das Absorptionsmaximum des Chromophor von HR liegt bei 580 nm. Mit steigender Chloridkonzentration vergrößert sich die Optische Dichte am Absorptionsmaximum. Eine Ausnahme zeigt sich in dem Absorptionsspektrum von HR bei 8 M Chlorid. Der Grund liegt wahrscheinlich darin, dass diese Chloridkonzentration auch für die Halobakterien nicht mehr physiologisch ist und somit Bindungsstellen besetzt werden, die unter physiologischen Bedingungen nicht besetzt würden. Dies zeigt sich in einer deutlichen Änderung der Absorption des Chromophor.

Die chloridabhängige Veränderung der Retinalabsorption bezüglich des chloridfreien Grundzustandes von HR wurde durch Berechnung der Absorptionsdifferenzspektren ermittelt (Abb. 3–13). Dies geschah durch Subtraktion des chloridfreien Absorptionsspektrums von den chloridhaltigen Spektren.

Im sichtbaren Wellenlängenbereich lassen sich drei verschiedene chloridabhängige Zustände unterscheiden. Der erste zeichnet sich durch eine negative Absorptionsdifferenzbande bei etwa 650 nm aus, welche mit steigender Chloridkonzentration abnimmt. Desweiteren treten zwei sich überlagernde Absorptionsdifferenzbanden bei etwa 540 und 580 nm auf. Bis zu einer 3 molaren Chloridkonzentration überwiegt der Zustand mit einem Absorptionsdifferenzmaximum von 540 nm. Bei höheren Chloridkonzentrationen akkumuliert sich der Zustand bei 580 nm. Dies spricht für eine sich ab etwa 3 M Chlorid-Ionen nochmals ändernde Umgebung des Retinals. Erklärt werden kann dies mit einer Bindungsstelle für Chlorid in der Nähe des Retinals, welche eine Bindungskonstante von etwa 4 mol/l besitzen muß.

Mit diesen Titrationsexperimenten konnten Einflüsse der Chloridkonzentration auf den Grundzustand untersucht werden. Hierbei muss jedoch immer bedacht werden, dass es sich nicht um einen homogenen Grundzustand handelt, sondern dass ein Mischzustand zwischen etwa 80 % *all-trans* und 20 % *13-cis* Retinal vorliegt, was die Zuordnung der einzelnen Zustände erschwert.

Durch die Auftragung der Intensitäten der Absorption, der Zustände bei 540, 580 und 650 nm, in Abhängigkeit von der Chloridkonzentration lassen sich mögliche Bindungskonstanten abschätzen (Abb. 3–14). Somit läßt sich folgern, dass in HR

wahrscheinlich drei Bindungsstellen für Chlorid vorhanden sind, welche unterschiedliche Bindungskonstanten aufweisen. Die erste Bindungsstelle wird schon bei sehr geringen Chloridkonzentrationen besetzt, die Zweite hat eine Bindungskonstante von etwa 3 M Chlorid und die dritte Bindungskonstante dürfte einen Wert von über 5 M Chlorid aufweisen. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass es sich hier nur um eine Abschätzung handelt. Gerade der Wert der Bindungskonstanten mit der höchsten Chloridkonzentration kann aufgrund des sich stark ändernden Verhaltens der Probe bei Chloridkonzentrationen von über 8 M nur sehr unzureichend bestimmt werden.

Zur weiteren Aufklärung der Chloridabhängigkeit von HR soll der Photozyklus mittels zeitaufgelöster Spektroskopie untersucht werden.

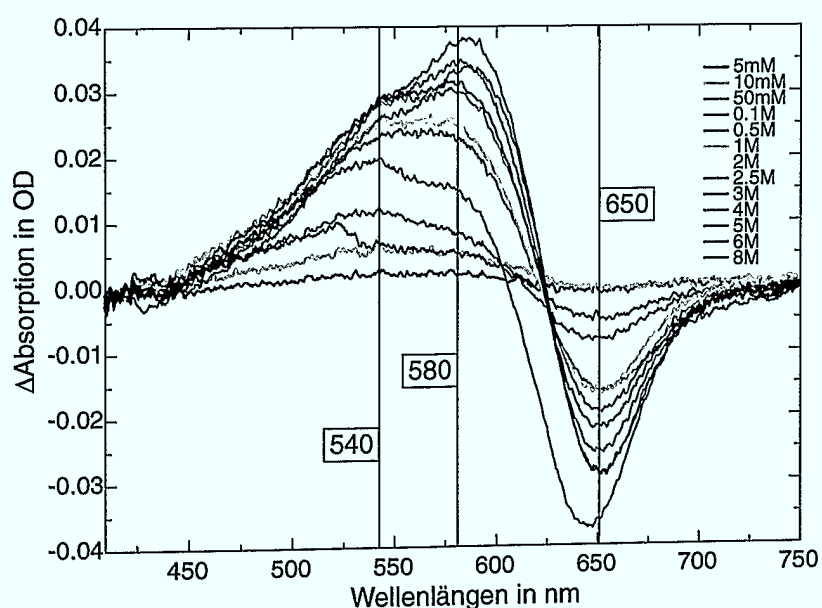


Abbildung 3-13:

Absorptionsdifferenzspektren von HR bei verschiedenen Chloridkonzentrationen

Zur Ermittlung der Differenzspektren wurde das in Abbildung 3-12 dargestellte Absolutspektrum ohne Chlorid von den Spektren mit Chlorid abgezogen. Zuvor wurde auf die Bande bei 415 nm skaliert.

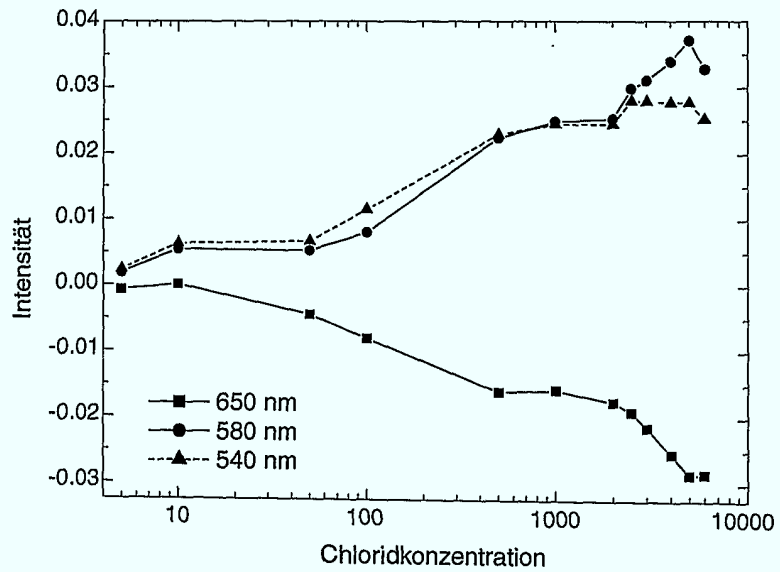


Abbildung 3-14:

Verlauf der Zustände bei 540, 580 und 650 nm in Abhängigkeit der Chloridkonzentration

Die einzelnen Intensitäten wurden aus den Absorptionsdifferenzspektren (Abb. 3-13) entnommen.

3.7.2 Zeitaufgelöste sichtbare Spektroskopie

Zur Untersuchung des HR-Photozyklus wurde zeitaufgelöste sichtbare Spektroskopie an HR-Membranen durchgeführt. Um die Probe anzuregen wurde ein frequenzverdoppelter Laserpuls mit einer Wellenlänge von 532 nm benutzt. Das Absorptionsmaximum des HR-Grundzustandes liegt bei 580 nm und ist damit 48 nm von der Anregungswellenlänge entfernt. Dies genügt jedoch, um für die Messung ausreichende Mengen HR in den Photozyklus zu überführen. Weiterhin ergab sich so der Vorteil, dass photoinduzierte Rückreaktionen des frühen K-Intermediates minimiert werden können, da dieses ein Absorptionsmaximum bei etwa 620 nm besitzt.

Die gemessenen Absorptionsdifferenzspektren wurden als 2D-Konturdiagramm dargestellt. Zur Unterdrückung der Rauschens wurde eine SVD Analyse durchgeführt (siehe Kapitel 2.7.4). Es wurde mit zwei verschiedenen Chloridkonzentrationen gemessen, zum einen ohne Chlorid (Abb. 3-15A) und zum anderen mit einer 3 M KCl-Konzentration (Abb. 3-15B).

Der in Abbildung 3-15B dargestellte chloridhaltige Photozyklus verläuft deutlich langsamer als der Photozyklus ohne Chlorid. Ohne Chlorid sind bei einer Zeit von etwa 100 μ s nur noch die abklingenden Intermediate zu erkennen. Es handelt sich um eine positive Absorptionsbande bei etwa 650 nm, welche einem K-Intermediat entspricht, und um eine negative Absorptionsdifferenzbande bei etwa 540 nm, welche auf einen chloridfreien Grundzustand von HR zurückzuführen ist. Neben der deutlichen Verzögerung des Auftretens der Intermediate tritt bei der Messung mit Chlorid ein zusätzliches Intermediat mit einem Absorptionsmaximum von 520 nm auf. Das zeitliche Maximum dieser Differenzbande liegt bei etwa 1 ms. Es dürfte sich damit um ein HR-L-Intermediat handeln, welches in dem chloridfreien Photozyklus nicht durchlaufen wird. Wie in dem chloridfreien Photozyklus tritt auch in dem Photozyklus mit Chlorid ein frühes Intermediat auf. Dessen Absorptionsmaximum allerdings bei etwa 660 nm liegt. Die geringere Intensität und die Verschiebung zu höheren Wellenlängen kann auf die Überlagerung mit der stark negativen Differenzbande des chloridbeladenen Grundzustandes von HR zurückgeführt werden. Diese hat ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 580 nm und einer Zeit von 500 μ s.

Diese gewonnenen Ergebnisse lassen sich auf das Titrationsexperiment übertragen. Die durch die negativen Absorptionsdifferenzbanden beschriebenen HR-Grundzustände treten dort zum Teil auch als Differenzbanden auf. So sollte die bei hohen

Chloridkonzentrationen auftretende Differenzbande bei 580 nm (siehe Abb. 3–13) dem chloridbeladenen Grundzustand entsprechen. Die bei geringen Chloridkonzentrationen dominante Differenzbande bei etwa 540 nm sollte dem Intermediat entsprechen, welches in dem chloridfreien Photozyklus bei 540 nm "weggeblitzt" wird. Die in der Titration auftretende, immer negativer werdende Differenzbande bei 650 nm tritt in den zeitaufgelösten Photozyklusmessungen nicht als negative Bande auf. Dies könnte an der Wellenlänge des eingestrahlten Laserpulses liegen, die mit 532 nm zu weit entfernt ist für eine Anregung dieses Grundzustandes.

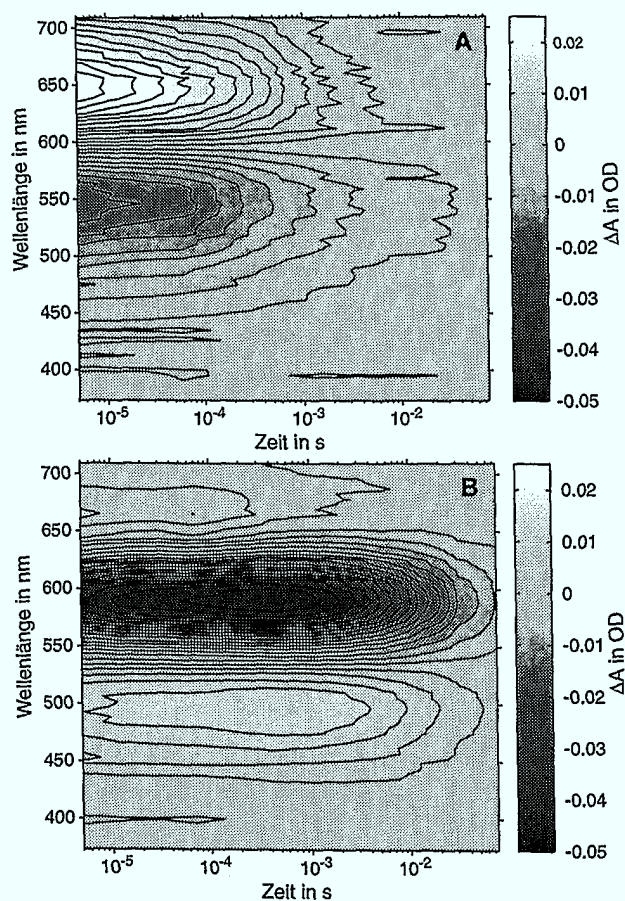


Abbildung 3–15:

Zeitaufgelöste sichtbare Differenzspektren von HR-Membranen als 2D-Konturdiagramme

A: Messung bei 1 M Na_2SO_4 , pH 6,0 und 20 °C

B: Messung bei 3 M KCl, pH 6,0 und 20 °C

3.7.3 Zeitaufgelöste FT-IR-Spektroskopie

Sehr detaillierte Informationen lassen sich mit der IR-Spektroskopie erhalten, da durch die Absorption des Proteins im infraroten Wellenlängenbereich Molekülschwingungen angeregt werden. Alle Schwingungen, die mit einer Änderung des Dipolmomentes verbunden sind, liefern eine Absorptionsbande im Spektrum.

Zuordnung der Differenzbanden

Um den Einfluss der Chloridionen auf den Photozyklus weiter zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zeitaufgelöste FT-IR-Differenzspektren aufgenommen. Die Abbildung 3-16 zeigt ein gemittelttes Differenzspektrum zwischen 0,5 und 1,5 ms nach dem Laserblitz. Es ist damit ein für das HR-L-Intermediat charakteristisches Differenzspektrum dargestellt, wobei negative Banden den Schwingungen des Grundzustandes entsprechen und die positiven Banden aus dem L-Intermediat von HR resultieren. Die Zuordnung der Banden zu bestimmten Schwingungen des HRs wurde, soweit nicht direkt angegeben, mit den Referenzen Diller et al. (1987), Rothschild et al. (1988) und Chon et al. (1999) durchgeführt. Aufgrund der grossen Ähnlichkeit des Spektrums zu BR erfolgte bei der Zuordnung auch ein Vergleich mit den Daten in der Dissertation von Zscherp (1997). Allgemein soll an dieser Stelle nochmals auf die generelle Ähnlichkeit von HR zu BR hingewiesen werden, was sich auch in der Nomenklatur der Intermediate widerspiegelt, welche dem BR-Photozyklus entnommen ist.

Im Bereich von 1700 bis 1770 cm^{-1} werden die C=O-Streckschwingungen von protonierten Carboxylgruppen beobachtet. Für das HR-L-Differenzspektrum zeigt sich hier eine sehr schwache Verschiebebande bei 1743 (-)/1737 (+) cm^{-1} . Diese ist auf die in der Nähe des β -Iononringes des Retinals vorhandene Asparginsäure 141 zurückzuführen (Asp115 in BR). Weitere wichtige Bereiche für die Änderungen der Proteinkonformation (Schwingungsmoden der Peptidbindungen) liegen zwischen 1690 und 1620 cm^{-1} (C=O-Streckschwingung; Amid I) und um 1550 cm^{-1} (C=N-Streckschwingung gekoppelt mit der N-H-Biegeschwingung in der Ebene; Amid II). Eine Differenzbande, die in diesem Bereich genau zugeordnet wurde und nicht auf einer Amid I-Schwingung beruht, befindet sich bei 1696(-)/1687(+) cm^{-1} . Es handelt sich um ein durch Punktmutation

nachgewiesenes Arginin an Position 108, welches eine wichtige Funktion beim Transport von Chlorid besitzt (Rüdiger et al., 1995).

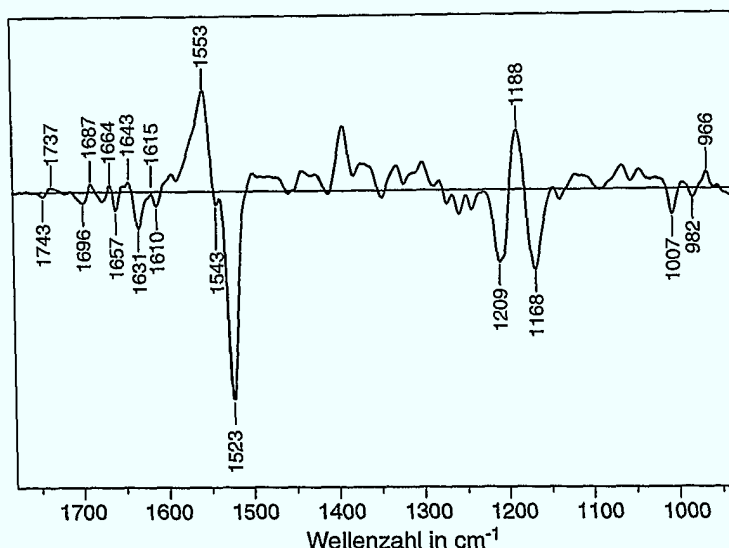


Abbildung 3-16:

FT-IR-Differenzspektrum zur Bandenzuordnung

Gemittelt charakteristisches Differenzspektrum für das L-Intermediat von HR (0,5 bis 1,5 ms nach der Laseranregung, 3 M NaCl, pH 6,0)

Die auffälligste Bande des gesamten Differenzspektrums ist die Ethenbande der delokalisierten Streckschwingung des Retinals im Grundzustand bei 1523 (–) cm^{-1} . Diese konnte auch durch Resonanz-Raman-Messungen bestätigt werden (Bolwien, Diss, 2001). Die Ethenbande des L-Intermediates wurde der Differenzbande bei 1553 (+) cm^{-1} zugeordnet, wobei diese Bande von den Änderungen in der Amid II-Region überlagert wird und daher das Absorptionsmaximum aus beiden Anteilen resultiert. Das Besondere ist, dass sich im Falle des konjugierten π -Elektronensystems des Retinals die Schwingungsanregung im Infraroten mit der elektronischen Anregung im sichtbaren Spektralbereich korrelieren lässt (Aton et al., 1977). Dies bedeutet, dass eine Verschiebung zu höheren Wellenzahlen eine Blauverschiebung im Sichtbaren ergibt. Dies zeigt sich für den Fall des HR-L-Intermediates in einer Erhöhung der C=C-Streckschwingungsbande um 30 Wellenzahlen im Infraroten und einer Absorption von 520 nm im Sichtbaren. Eine zusätzliche C=C-Streckschwingungsbande bei 1543 (–) cm^{-1} deutet auf einen zweiten

Grundzustand hin, der mit dem Laserblitz angeregt wurde. Dies verdeutlicht den inhomogenen Grundzustand von HR.

Die Bande bei 1631 cm^{-1} war ebenfalls in den Resonanz-Raman-Messungen zu bestätigen (Bolwien, Diss, 2001). Sie wurde der C=N-Streckschwingung der protonierten Schiffschen Base zugeordnet, welche allgemein im Bereich von 1600 bis 1650 cm^{-1} absorbiert. Die entsprechende HR-L-Intermediatbande findet sich bei 1643 cm^{-1} (+) (Diller et al., 1987).

Der Fingerprintbereich zwischen 1100 und 1300 cm^{-1} enthält die Streckschwingungen der C-C-Einfachbindungen des Retinals, die untereinander und mit C-H-Biegeschwingungen in der Ebene koppeln. Die Differenzbanden des Grundzustandes zeigen sich für diesen Bereich bei 1209 (–) und 1168 (–) cm^{-1} . Es handelt sich um gekoppelte C-C-Streckschwingungen, welche vor allem aus den Streckschwingungen der C-C-Einfachbindungen von C₁₄–C₁₅– und C₁₁–C₁₂ resultieren. Die dem entsprechende positive Differenzbande des HR-L-Intermediates tritt bei 1188 cm^{-1} als gekoppelte Schwingung auf. Das Bandenmuster zeigt für den Grundzustand eine all-*trans* und für das HR-L-Intermediat eine 13-*cis*-Geometrie des Retinals.

Bei 1007 cm^{-1} absorbiert im Grundzustand lediglich die Biegeschwingung (in der Ebene) der CH₃-Gruppen des Retinals. Unterhalb von 1000 cm^{-1} liegen die C-H-Biegeschwingungen aus der Ebene (hydrogen out of plane; HOOP-Banden). Hier zeigt sich eine negative Differenzbande für den HR-Grundzustand bei 982 cm^{-1} und für das HR-L-Intermediat eine schwache Differenzbande bei 966 cm^{-1} .

Zeitaufgelöste FT-IR-Differenzspektroskopie: Chloridabhängigkeit des HR-Photozyklus

Um die Chloridabhängigkeit des HR-Photozyklus genauer zu untersuchen, wurden FT-IR-Differenzspektren bei Chloridkonzentrationen von 0 , 0.5 , 1 , 2 , 3 , 4 und 5 mol/l aufgenommen. Durch den Vergleich der bei 1188 cm^{-1} aufeinander skalierten Spektren konnten chloridabhängige Unterschiede analysiert werden. Die Skalierung auf die Bande bei 1188 cm^{-1} geschieht unter der Annahme, dass dieser Zustand bei allen Chloridkonzentrationen früher oder später von unserem erfassten Zeitbereich beobachtbar durchlaufen wird (Abb. 3–17).

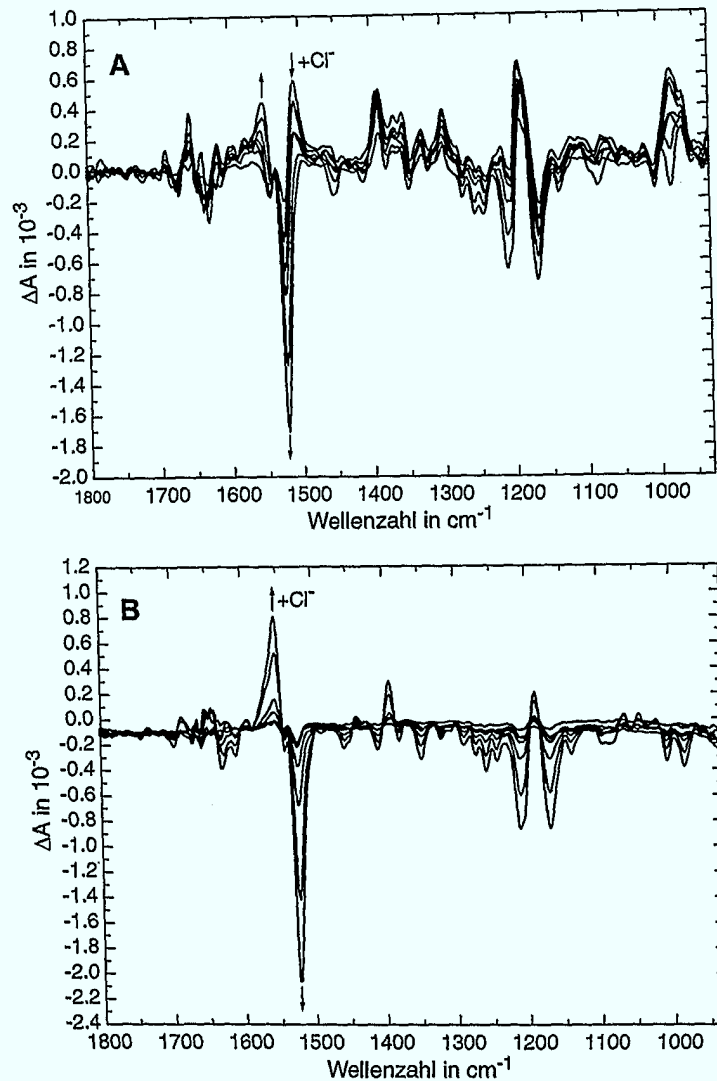


Abbildung 3-17:

FT-IR-Differenzspektren bei unterschiedlichen Chloridkonzentrationen

A: Differenzspektren von HR-Membranen bei Chloridkonzentrationen von 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 und 5 mol/l, 15 μs nach dem Laserblitz.

B: Wie A, jedoch 1 ms nach der Laseranregung.

In Abbildung 3-17A sind Differenzspektren gezeigt, die 15 μs nach dem Laserblitz aufgenommen wurden. Bei 0 M Chlorid sollte das Spektrum zu dieser Zeit für das K-

Intermediat charakteristisch sein. Die C=C-Retinalstreckschwingungs-Differenzbande bei 1508 cm^{-1} (+), welche der Retinalschwingung des K-Intermediates entspricht, wird mit steigender Chloridkonzentration kleiner. Komplementär dazu steigt die Differenzbande bei 1553 cm^{-1} (+) an. Die bereits für das L-Intermediat beschriebenen schwachen HOOP Schwingungen sind zu dieser Zeit bei den Spektren mit geringer Chloridkonzentration besonders ausgeprägt bei 981 cm^{-1} und 965 cm^{-1} , was ebenfalls typisch ist für das Spektrum des K-Intermediates, da der Chromophor verdreht vorliegt. Auch diese HOOP Moden verschwinden mit steigender Chloridkonzentration, was für ein Verschwinden des K-Intermediates spricht.

Die Abbildung 3-17B zeigt die Differenzspektren verschiedener Chloridkonzentrationen 1 ms nach der Laseranregung. Zu dieser Zeit lassen sich auch bei geringen Chloridkonzentrationen keine K-Intermediatanteile mehr erkennen. Die für das L-Intermediat charakteristische Bande bei 1553 cm^{-1} nimmt mit steigender Chloridkonzentration zu. In Abhängigkeit der Chloridkonzentration findet somit eine stärkere Anreicherung des L-Intermediates zu diesem Zeitpunkt statt.

Zur weiteren Auswertung der Chloridabhängigkeit wurde eine SVD-Analyse durchgeführt, bei der anstelle der Zeit als zweite Dimension die Chloridkonzentration gesetzt wurde (Abb. 3-18).

Für die Anregung von $15\text{ }\mu\text{s}$ nach dem Laserblitz (Abb. 3-18A) zeigen sich zwei signifikante Komponenten. Es muss berücksichtigt werden, dass bei dem mathematischen Verfahren der Singulärwertzerlegung nicht nach reinen Intermediatspektren getrennt wird. Nichtsdestotrotz zeigt sich eine Komponente, die unabhängig von der Chloridkonzentration einen konstanten Anteil besitzt und eine weitere Komponente, die in Abhängigkeit der Chloridkonzentration ansteigt.

Für die Zeit von 1 ms nach dem Laserblitz ergab sich nach der chloridabhängigen SVD-Analyse nur eine Komponente (Abb. 3-18B). Diese hängt von der Chloridkonzentration ab, indem mit steigender Chloridkonzentration ein Anstieg erfolgt, und dürfte einer Art L-Intermediat entsprechen.

Sowohl für die frühen ($15\text{ }\mu\text{s}$), als auch für die späten Zeiten (1 ms) zeigt sich eine starke Abhängigkeit der Spektren von der Chloridkonzentration. Im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen oberen Grenze der Chloridkonzentration von 3 mol/l (Schobert et al., 1986, Falke et al., 1984, Pande et al., 1989) zur Beeinflussung des Photozyklus, ergeben sich auch bei 4 und 5 mol/l noch große spektrale Änderungen.

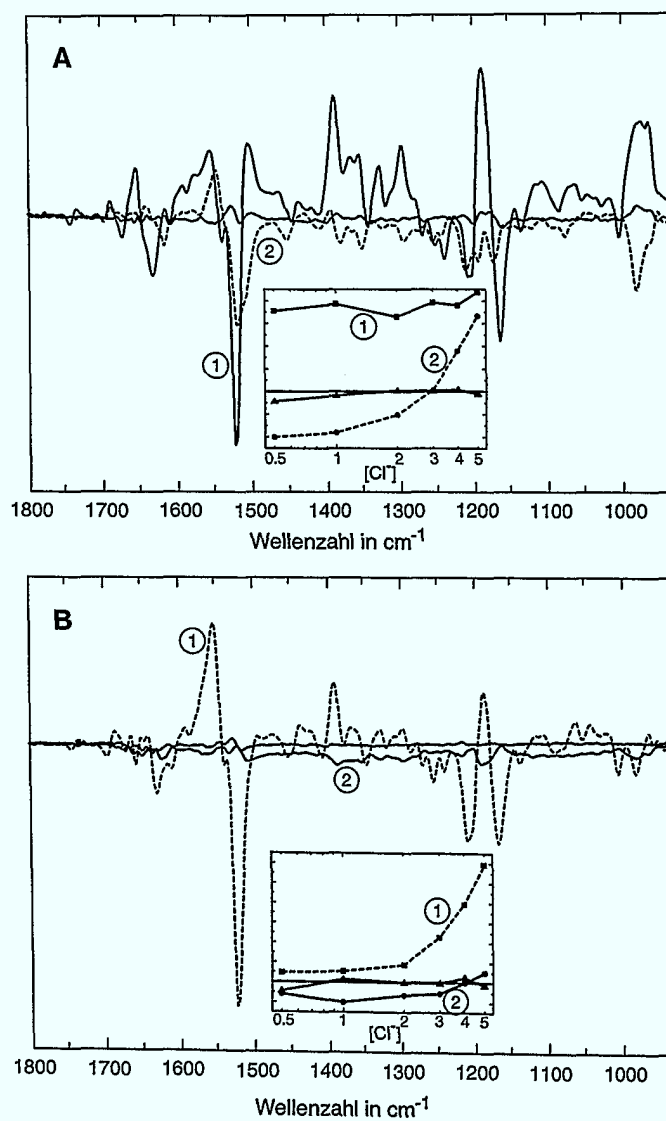


Abbildung 3-18:

SVD-Analyse der Chloridabhängigkeit

A: SVD-Analyse der Differenzspektren aus Abbildung 3-17, 15 μs nach der Laseranregung.

B: Wie A nur 1 ms nach der Laseranregung.

Änderungen des Proteinrückgrates während des Photozyklus

Um Informationen über den Photozyklus von HR bei sehr hohen Chloridkonzentrationen zu gewinnen (in der natürlichen Umgebung herrschen über 4 M Chlorid, Hartmann et al., 1980) wurden mit der ATR-Technik Differenzspektren bei 5 M Chlorid aufgenommen und bestimmte Zeiten dieser Messungen miteinander verglichen (Abb. 3–19).

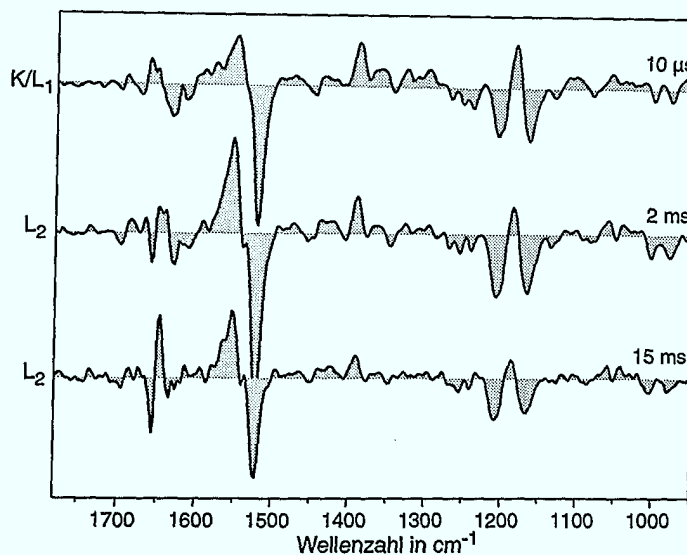


Abbildung 3–19: Vergleich der FT-IR-Differenzspektren zu verschiedenen Zeiten
Das K/L₁-Differenzspektrum wurde 10 μ s, das gemittelte L₁-Differenzspektrum 2 ms und das gemittelte L₂-Differenzspektrum 15 ms nach der Photoanregung aufgenommen. Die Messung erfolgte in: 50 mM Na/K-PO₄, 5 M NaCl, pH 6,0 bei 20 °C.

Das oberste Differenzspektrum wurde nach 10 μ s, nach der Laseranregung aufgenommen. Das Spektrum enthält hauptsächlich eindeutige L-Banden, wie zum Beispiel die der C=C-Retinalstreckschwingung bei 1554 cm^{-1} , welche auch hier von der Amid-II-Bande überlagert ist. Weiterhin lassen sich schwache Anteile des K-Intermediates erkennen, welche in der Region zwischen 950 und 1000 cm^{-1} auftauchen. Bei dieser hohen Chloridkonzentration zeigt das Differenzspektrum schon zu frühen Zeiten Charakteristika des L-Intermediates.

Für die Zeit von 2 ms nach der Photoanregung zeigt sich ein Differenzspektrum (mittleres Spektrum der Abbildung 3–19), welches einem L-Intermediat mit den oben

beschriebenen charakteristischen Banden entspricht. Das Differenzspektrum, welches zu der Zeit von 15 ms aufgenommen wurde (unteres Spektrum der Abbildung 3–19), liegt zeitlich am Ende des Photozyklus. Hier zeigen sich gegenüber dem früheren Differenzspektrum (nach 2 ms) kaum Änderungen in den für das Retinal spezifischen Differenzbanden. Große Änderungen treten jedoch in der Amid-I-Region in den Banden bei 1656 cm^{-1} (–) und 1644 cm^{-1} (+) auf. Dies lässt auf eine Änderung des Proteinrückgrats schließen. Da es sich aufgrund der gleichbleibenden Retinalkonformation nicht um ein neues Intermediat (Definition an BR angelehnt) handelt, ist es sinnvoll, zwei Zustände des L-Intermediates anzunehmen (Vgl. BR: M_1 und M_2).

Im folgenden werden Untersuchungen bezüglich der Unterschiede von L_1 und L_2 dargestellt. Das L_2 -Intermediat findet sich besonders ausgeprägt bei einer Chloridkonzentration von 5 mol/l. Der Vergleich der zeitlichen Entwicklungen der Banden bei 1554 cm^{-1} (L-Bande) und 1656 cm^{-1} (Amid-I-Bande) bei 3 mol/l und 5 mol/l Chlorid macht dies deutlich (Abb. 3–20).

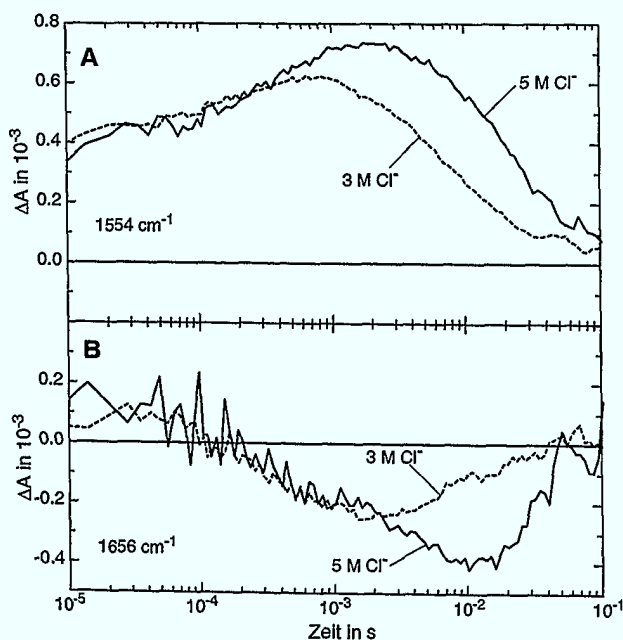


Abbildung 3–20:

Vergleich der zeitlichen Verläufe spezieller Differenzbanden bei 0 und 3 mol/l Chlorid

A: Vergleich der zeitlichen Verläufe der Differenzbanden bei 1554 cm^{-1} .

B: Wie A jedoch die Differenzbanden bei 1654 cm^{-1} .

Der vordere Bereich der L-Bande bei 1554 cm^{-1} (Abb. 3-20A) ist bei beiden Konzentrationen in etwa identisch, allerdings erreicht die Bande bei höheren Chloridkonzentrationen ein größeres Absorptionsmaximum zu einer späteren Zeit. Die Änderungen in der Amid-I-Bande bei 1656 cm^{-1} (Abb. 3-20B) finden bei einer 3 molaren Chloridkonzentration früher statt und sind deutlich weniger ausgeprägt, als in der 5 M Chloridmessung, bei der zusätzliche Änderungen detektiert werden.

Die Auswirkungen der Chloridkonzentration werden in der abschließenden Diskussion betrachtet.

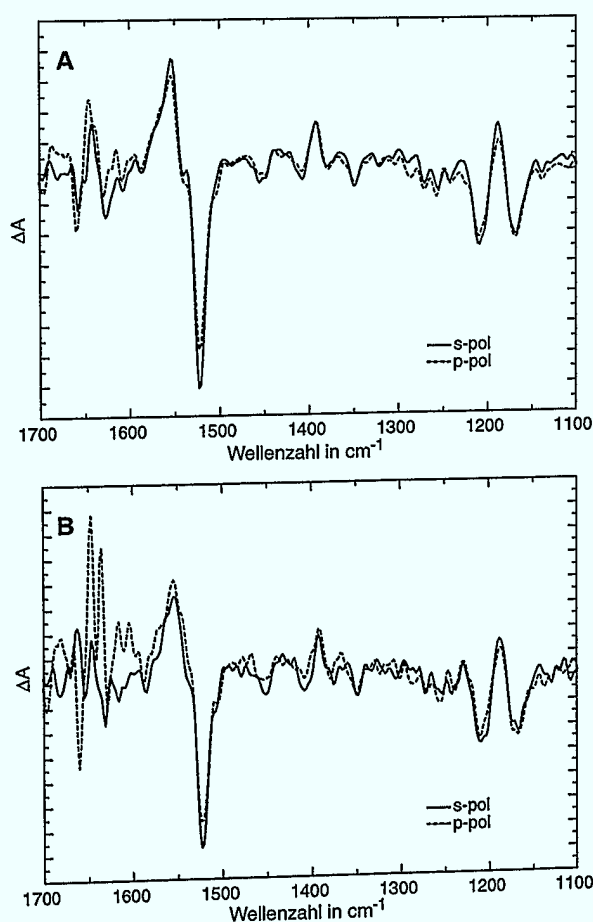


Abbildung 3-21: Differenzspektren von L_1 und L_2 mit s- bzw. p-polarisiertem Licht gemessen
 A: Differenzspektrum von L_1 (2 ms nach dem Laserblitz)
 B: Differenzspektrum von L_2 (15 ms nach dem Laserblitz)

Um die Änderungen zwischen den Intermediaten HR-L₁ und HR-L₂ (Abb. 3–19) zuzuordnen, wurden Messungen bei hoher Chloridkonzentration (5 M) mit polarisiertem Licht durchgeführt (Abb. 3–21). Durch die bevorzugt parallele Anordnung der HR-Membranfragmente – wie BR-Purpurmembranen – zur Oberfläche des ATR-Kristalls, steht das Übergangsdipolmoment senkrecht zur Kristalloberfläche, und dadurch lassen sich Änderungen der Amid-I-Region mit parallel polarisiertem Licht deutlich besser detektieren als mit senkrecht polarisiertem Licht (Marsh et al., 2001).

Die Spektren in Abbildung 3–21 A bzw. B wurden nach einer Zeit von 2 ms (L₁) und 15 ms (L₂) nach der Laseranregung detektiert. Die in L₂ hinzukommenden Banden weisen einen deutlichen Dichroismus auf. Es handelt sich somit mit hoher Wahrscheinlichkeit um Amid-I-Banden von α -Helices, welche parallel zur Membrannormalen angeordnet sind und sich in diesem Intermediat verändert haben.

3.7.4 Vergleich der Kinetiken der FT-IR Messungen mit den sichtbaren Daten

Um die zeitliche Entwicklung der Spektren der IR-Messungen und der sichtbaren Messungen jeweils mit und ohne Chlorid miteinander zu vergleichen, wurde für die Messungen mit einer Chloridkonzentration von 3 mol/l die zeitliche Entwicklung der Bande bei 588 nm (Sichtbar) und die der Bande bei 1523 cm⁻¹ (IR) gegenüber gestellt. Die Differenzbande bei 588 nm ist die größte negative Bande im Spektrum (Abb. 3–14B) und kann dem chloridhaltigen Grundzustand zugeordnet werden. Die negative IR-Differenzbande bei 1523 cm⁻¹ entspricht der C=C-Streckschwingung des Retinals des HR-Grundzustandes. Für die Messungen ohne Chlorid wurde der Vergleich zwischen der Differenzbande im Sichtbaren bei 538 nm und im Infraroten bei 1523 cm⁻¹ vorgenommen (In den FT-IR-Differenzspektren läßt sich keine Verschiebung zu höheren Wellenzahlen gegenüber dem chloridhaltigen Grundzustand erkennen.). Da sich die Differenzbanden im Sichtbaren hauptsächlich auf das Retinal beziehen und im IR die C=C-Retinalschwingung berücksichtigt wird, sollten die Zeitverläufe nach Skalierung der Banden aufeinander für die jeweiligen Chloridkonzentrationen sehr ähnlich sein. Dies läßt sich auch bestätigen (Abb. 3–22).

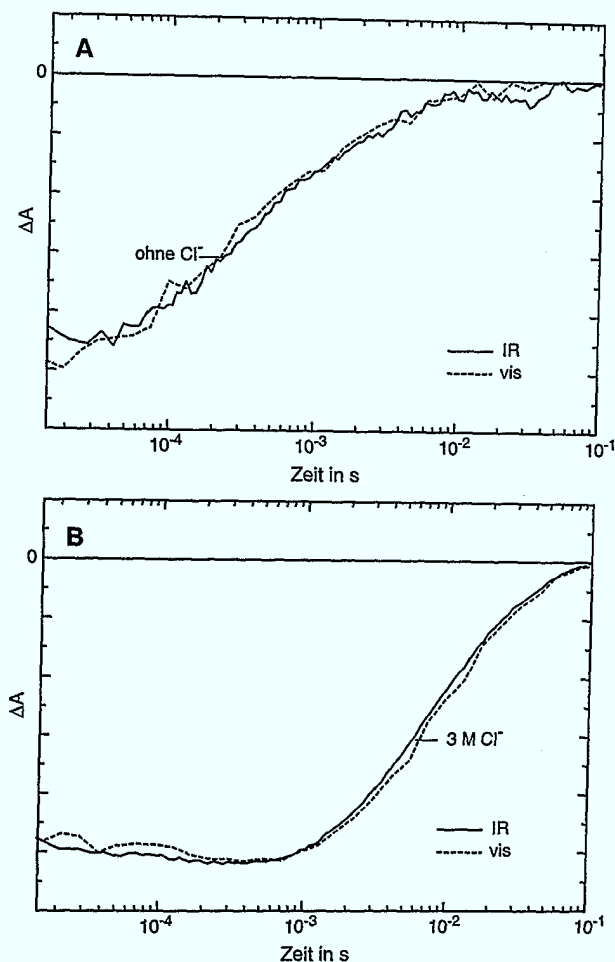


Abbildung 3–22: Vergleich der Zeitverläufe von charakteristischen infraroten und sichtbaren Differenzbanden
 A: Vergleich der aufeinander skalierten Differenzbanden bei 538 nm und 1523 cm^{-1} (ohne Chlorid).
 B: Vergleich der aufeinander skalierten Differenzbanden bei 588 nm und 1523 cm^{-1} (3 M Chlorid).

Abbildung 3–22 zeigt, dass – wie erwartet – die Zeitverläufe für die jeweiligen Chloridkonzentrationen sehr ähnlich sind. Daneben wird hier die schon in den 2D-Konturdiagrammen offensichtliche Verzögerung des chloridhaltigen Photozyklus (Abb. 3–15B) besonders deutlich. Um diese zu quantifizieren, wurden über die Anpassung durch Exponentialfunktionen Zeitkonstanten berechnet (Tabelle unten).

Zeitkonstanten der Anpassung von 2 bzw. 3 Exponentialfunktionen

		Sichtbar	IR (Bolwien, Diss, 2001)
	0 M KCl	$\tau_1 = 1,8 \text{ ms}$ $\tau_2 = 230 \text{ } \mu\text{s}$	$\tau_1 = 3,2 \text{ ms}$ $\tau_2 = 280 \text{ } \mu\text{s}$
	3 M KCl	$\tau_1 = 43 \text{ ms}$ $\tau_2 = 7,2 \text{ ms}$ $\tau_3 = 240 \text{ } \mu\text{s}$	$\tau_1 = 28 \text{ ms}$ $\tau_2 = 5,8 \text{ ms}$ $\tau_3 = 270 \text{ } \mu\text{s}$

Bei der Singulärwertzerlegung (Press et al., 1992) der zeitaufgelösten Differenzspektren im Sichtbaren zeigte sich, dass sämtliche relevanten Informationen sowohl für die chloridhaltigen als auch für die chloridfreien Messungen bereits in den ersten zwei SVD-Komponenten enthalten sind. Bei der Anpassung von Exponentialfunktionen an die ersten zwei Komponenten von $S \cdot V^T$ finden sich geeignete Lösungen mit 2 bzw. 3 Exponentialfunktionen.

Für die Messungen im Infraroten wurde ebenfalls eine SVD-Zerlegung vorgenommen (Bolwien, Diss, 2001). Hier zeigte sich für die Messungen ohne Chlorid ebenfalls eine Anpassung von 2 Exponentialfunktionen in die ersten 2 SVD-Komponenten. Für die Messung mit einer Chloridkonzentration von 3 mol/l fanden sich auch in der dritten SVD-Komponente noch Informationen, so dass diese ebenfalls bei der Anpassung durch Exponentialfunktionen berücksichtigt wurde. Für eine gute Anpassung waren aber auch hier drei Exponentialfunktionen ausreichend. Die sich ergebenden Zeitkonstanten stimmen sehr gut mit denen der sichtbaren Daten überein.

4 Abschließende Diskussion der spektroskopischen Ergebnisse

Die lichtgetriebene Anionenpumpe Halorhodopsin wurde kloniert, exprimiert, kristallisiert und spektroskopisch untersucht. Die einzelnen Resultate wurden bereits direkt in Verbindung mit den Ergebnissen diskutiert. In diesem Abschnitt sollen die übergreifenden Zusammenhänge hergestellt werden. Auf der Basis der spektroskopischen Ergebnisse wird ein Modell für den Photozyklus entwickelt. Dabei spielt die Abhängigkeit des Photozyklus von der Chloridkonzentration eine wichtige Rolle. Daneben werden Überlegungen zum Pumpmechanismus im Zusammenhang mit den Proteinstrukturdaten und den spektroskopischen Daten aus der Literatur diskutiert.

4.1 Chloridabhängigkeit des HR-Photozyklus

Die Chloridabhängigkeit des Photozyklus von HR aus *H. salinarum* ist bereits vielfach untersucht worden (Tittor et al., 1987; Zimanyi und Lanyi, 1989; Oesterhelt et al., 1985; Lanyi und Vodyanoy, 1986; Ames et al., 1992). Allerdings sind viele Details dieses Photozyklus unklar bzw. widersprüchlich. So wurde eine Abhängigkeit des HR-L-Intermediates von der Chloridkonzentration in der Form gezeigt, dass die Bildung von der Chloridbindung abhängt (Tittor et al., 1987). In einer anderen Untersuchung konnte dieser Effekt dagegen nicht beobachtet werden (Zimanyi und Lanyi, 1989). Einige Studien zeigen, dass die Amplituden des HR-L-Intermediates und des HR-O-Intermediates umgekehrt proportional mit der Chloridkonzentration variieren, in dem das Gleichgewicht zwischen den Intermediaten HR-L und HR-O mit steigender Chloridkonzentration in Richtung HR-L-Intermediat verschoben wird (Oesterhelt et al., 1985; Lanyi und Vodyanoy, 1986; Tittor et al., 1987; Zimanyi und Lanyi, 1989; Ames et al., 1992). Daher wird angenommen, dass die Abgabe des Chloridions in diesem Schritt erfolgt. Im Gegensatz zu allen anderen, konnte in einer Untersuchung beobachtet werden, dass die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des HR-O-Intermediates zum HR-Grundzustand mit steigender Chloridkonzentration abfällt (Ames et al., 1992).

Diese Unstimmigkeiten sind zum Teil auf die Unterschiede der Probenpräparationen zurückzuführen, da es sich bei allen Untersuchungen vor 1993 um Messungen an solubilisiertem oder an mit Lipiden rekonstituiertem HR handelt. Dieses liegt durch die

Reinigungsprozedur nicht mehr in der natürlichen Lipidumgebung vor. Auch bei der Rekonstitution mit Lipiden aus Halobakterien ist nicht sichergestellt, dass so die gleichen Lipide das HR umgeben wie in der natürlichen Membran. Weiterhin ist es schwierig, bei dieser Art der Probenpräparation die Chloridkonzentration exakt einzustellen. Durch die Möglichkeit der Überexpression von HR in *H. salinarum* und der schonenden Reinigung unter Erhalt der natürlichen Lipide wurde die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse erhöht (Heymann et al., 1993).

Aus den in dieser Arbeit gezeigten Daten ergibt sich, dass ein chloridfreier – exakterweise muss drauf hingewiesen werden, dass bei einer starken Bindung des Anions an HR eine minimale Chloridmenge vorhanden sein kann – und ein chloridhaltiger Photozyklus von HR existieren. Besonders deutlich zeigt sich dies durch das Auftreten eines Intermediates mit einem Absorptionsmaximum von 520 nm im Verlauf des chloridhaltigen Photozyklus, welches bei den Messungen ohne Chlorid gar nicht auftaucht (Abb. 3–14). Für das Durchlaufen des physiologischen HR-Photozyklus scheint eine bestimmte Chloridmenge (oder Menge an anderen transportierbaren Ionen) nötig zu sein. Dies zeigt sich auch in den Ergebnissen der SVD-Analysen, bei denen für die Messungen bei 0 mol/l Chlorid zwei Exponentialfunktionen und bei den Messungen mit 3 mol/l Chlorid drei Exponentialfunktionen benötigt werden. Eine weitere Evidenz liegt in der Länge der beiden Photozyklen. Der Photozyklus ohne Chlorid verläuft wesentlich schneller, wie an der letzten ermittelten Zeitkonstante von 3,2 ms zu erkennen ist.

In FT-IR-Differenzexperimenten wurde die Chloridabhängigkeit der einzelnen Intermediate in feinerer Abstufung herausgearbeitet. Ähnliche Fragestellungen wurden auch schon an anderer Stelle untersucht (Rothschild et al., 1988; Walter und Braiman, 1994; Braiman et al., 1994; Mitrovich et al., 1995; Rüdiger et al., 1995; Dioumaev und Braiman, 1997; Chon et al., 1999; Hutson et al., 2001). Allerdings sind in der vorliegenden Arbeit erstmals zeitaufgelöste FT-IR-Messungen an HR-Membranen mit der ATR-Technik durchgeführt worden. Deren Vorteile, vor allem bezüglich der Einstellung definierter Bedingungen, wurden bereits in Kapitel 2.7.3 herausgestellt.

Die FT-IR-Differenzexperimente (Abb. 3–17) zeigen, dass der Anteil des HR-K-Intermediates mit steigender Chloridkonzentration kontinuierlich abnimmt. Dieses könnte zwei Ursachen haben:

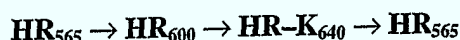
1. Das HR-K-Intermediat wird beim Übergang vom chloridfreien zum chloridhaltigen Photozyklus gar nicht mehr durchlaufen.
2. Der Zerfall des HR-K-Intermediates wird mit steigender Chloridkonzentration beschleunigt und läßt sich deshalb innerhalb der möglichen Zeitauflösung nicht mehr detektieren.

Wahrscheinlich ist die zweite Vermutung zutreffend, da mit elektrischen Messungen auch bei hohen Chloridkonzentrationen ein HR-K-Intermediat detektiert wird (Varo et al., 1995; Okuno et al., 1999). Der bei steigender Chloridkonzentration beschleunigte Zerfall des HR-K-Intermediates führt zu einer schnelleren Bildung des HR-L-Intermediates (Abb. 3-17). Aus dieser Chloridabhängigkeit lässt sich schließen, dass bei der Bildung des HR-L-Intermediates ein Chloridion aus der Umgebung aufgenommen wird. Mit steigender Chloridkonzentration ist die Wahrscheinlichkeit der Besetzung der Bindungsstelle erhöht, damit kommt es in diesem Schritt zu einer Beschleunigung des Photozyklus.

Bei einer Chloridkonzentration von 5 mol/l lässt sich zu späten Zeiten ein Intermediat detektieren, welches sich in den Retinalbanden nicht von dem HR-L-Intermediat unterscheidet. Es weist allerdings signifikante Änderungen im Bereich der Proteinbanden auf und wird deshalb als HR-L₂-Intermediat bezeichnet. Da die Akkumulation nur bei sehr hohen Chloridkonzentrationen erfolgt, ist dieses Intermediat wahrscheinlich an der Chloridabgabe beteiligt.

4.1.1 Entwicklung eines chloridfreien Photozyklus-Modells

Zunächst wird der Photozyklus ohne Chlorid betrachtet, dessen Ablauf in der Literatur wie folgt beschrieben wird:



(Tittor et al., 1987; Polland et al., 1985 und Lanyi und Vodonoy, 1986).

Bei dieser lichtgetriebenen Reaktion wird von dem chloridfreien Grundzustand HR₅₆₅ ausgegangen, welcher eine dem chloridbeladenen Grundzustand HR₅₇₈ identische all-*trans*-Retinalkonformation aufweist (Lanyi und Vodonoy, 1986). Der chloridfreie Grundzustand reagiert nach 5 ps zu einem HR₆₀₀-Intermediat (Polland et al., 1985). Die

Weiterreaktion zum chloridfreien Grundzustand erfolgt über ein HR-K₆₄₀-Intermediat (Tittor et al., 1987).

Bei einem Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit, mittels zeitaufgelöster sichtbarer Spektroskopie, gemessenen Daten zeigt sich eine Blauverschiebung des chloridfreien Grundzustandes um 25 Wellenzahlen zu 540 nm auf (Abb. 3–15A). Diese Verschiebung könnte zwei Ursachen haben. Entweder beeinflusst die positive Differenzbande bei etwa 640 nm die Lage der negativen Differenzbande. Oder es handelt sich um einen anderen chloridfreien Grundzustand, welcher durch seine Nähe zum Absorptionsmaximum der eingestrahlten Laserwellenlänge angeregt wird. Da die Retinalkonformation des Grundzustandes von HR sich nicht durch Lichtadaption vereinheitlichen lässt (in BR lässt sich der Grundzustand zu 100 % all-*trans* überführen; in HR bleiben 30 % 13-*cis*-Retinal erhalten, Hegemann et al., 1985), könnte es sich um die Anregung eines 13-*cis*-Photozyklus handeln.

Das in der Literatur beschriebene, nach 5 ps auftretende frühe Intermediat HR₆₀₀ liegt außerhalb der Zeitauflösung der Apparatur und kann somit nicht detektiert werden. Das spätere rotverschobene K-Intermediat wird hingegen als abfallende Differenzbande bei 640 nm beobachtet (Abb. 4–1).

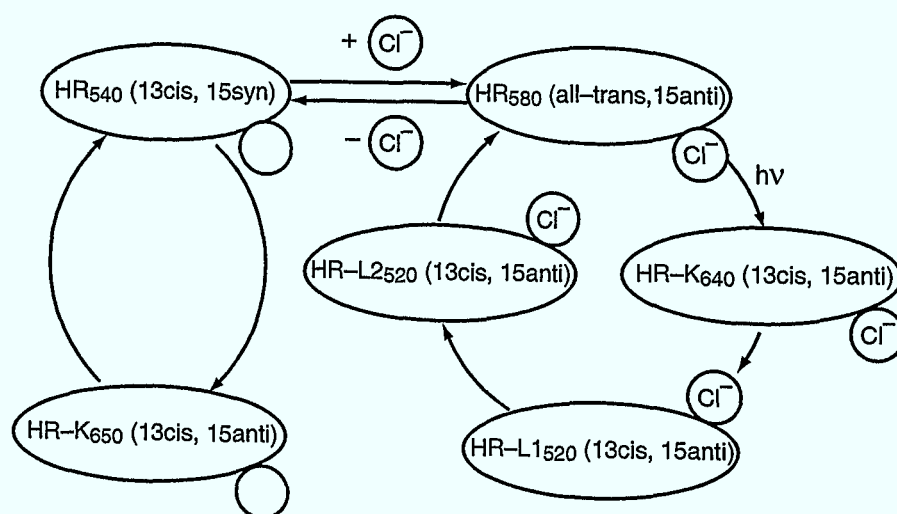


Abbildung 4–1: Schematische Darstellung des Photozyklus aus den in dieser Arbeit vorliegenden Daten

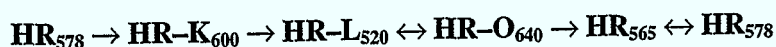
In den statischen Titrationsexperimenten (Abb. 3–13) findet sich eine chloridfreie Grundzustandsdifferenzbande bei etwa 650 nm. Vielleicht vermag auch dieser einen Photozyklus zu durchlaufen, welcher aber durch das Absorptionsmaximum des Laserpulses nicht angeregt wird. Die Grundzustandsbande bei etwa 540 nm läßt sich als negative Differenzbande im Titrationsexperiment nicht detektieren. Eine Ursache hierfür könnte die Überlagerung durch die positiven Differenzbanden in diesem Bereich sein. Ob der Zustand mit der negativen Absorptionsdifferenzbande bei 650 nm tatsächlich einen Photozyklus durchläuft, bedarf noch der Klärung.

Eine Evidenz für das Vorhandensein von zwei, mit unterschiedlicher Chloridkonzentration unterschiedlich stark ausgeprägten, Grundzuständen zeigt sich in den FT-IR-Messungen. Gerade bei geringer Chloridkonzentration ist neben der C=C-Streckschwingungsdifferenzbande bei 1523 cm^{-1} auch noch die negative Differenzbande bei 1543 cm^{-1} zu detektieren (Abb. 3–17). Diese dürfte der C=C-Streckschwingung eines gegenüber dem ersten Grundzustand blauverschobenen zweiten Grundzustandes entsprechen.

Aus den Messungen ergibt sich somit ein Schema, in dem der chloridbeladene Grundzustand mit dem chloridfreien in einem chloridabhängigen Gleichgewicht steht (Abb. 4–1).

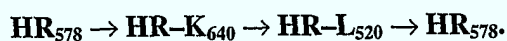
4.1.2 Entwicklung eines chloridhaltigen Photozyklus-Modells

Von physiologischer Bedeutung ist nur der HR-Photozyklus mit Chlorid, da *H. salinarum* obligat etwa 4 M Chlorid benötigt. Aus der Literatur stellt sich der Photozyklus zusammenfassend wie folgt dar:



Die Gleichgewichte zwischen den Intermediaten HR-L und HR-O bzw. HR₅₆₅ und HR₅₇₈ sind chloridabhängig. Das Intermediat des HR₅₆₅ ist aus rein mechanistischen Überlegungen in den Photozyklus eingeführt worden, um nicht die Rückisomerisierung des Retinals zu all-*trans* und die Chloridaufnahme von der extrazellulären Seite als konzertierte Reaktion beim Übergang von HR₆₄₀ zu HR₅₇₈ annehmen zu müssen (Oesterhelt et al., 1985; Tittor et al., 1987; Zimanyi et al., 1989).

Die in den hier vorliegenden zeitaufgelösten sichtbaren Messungen von HR-Membranen mit Chlorid detektierten Intermediate sind:



Das Absorptionsmaximum der Absorptionsdifferenzbande des HR-K-Intermediates liegt um 40 Wellenzahlen weiter rotverschoben als das entsprechende in der Literatur beschriebene Intermediat. Dies dürfte an der sehr ausgeprägten negativen Differenzbande bei 578 nm liegen, welche die benachbarte Bande überlagert und somit das Absorptionsmaximum zu höheren Wellenlängen verschiebt. Dieses Problem wird in den veröffentlichten Daten durch andere Messtechniken umgangen.

Weitere Untersuchungen des HR-Photozyklus haben die Aufklärung eines Zwischenzustandes beim Übergang vom HR-K-Intermediat zum HR-L-Intermediat ergeben (Zimanyi et al., 1989). Dieses Intermediat wird als HR-K/L bezeichnet. Außerdem wurde eine Unterteilung des Intermediates HR-L in die zwei Zustände HR-L₁ und HR-L₂ vorgenommen (Chon et al., 1999). Diese Unterteilung wurde bereits 1986 von Oesterhelt et al. gefordert, um den Mechanismus der Ionentranslokation erklären zu können. In den gemessenen FT-IR-Differenzspektren (Abb. 3-19) lässt sich ebenfalls ein Mischzustand erkennen, welcher hier als HR-K/L₁ bezeichnet wird und dem von Zimanyi et al. (1989) gefundenen HR-K/L zugeordnet werden kann. Auch die beiden Zustände des HR-L-Intermediates lassen sich in den FT-IR-Differenzspektren (Abb. 3-19 und Abb. 3-20) erkennen. Der Übergang des HR-L₁-Intermediates zum HR-L₂-Intermediat kann mit dem Übergang des BR-M₁-Intermediates zum BR-M₂-Intermediat verglichen werden. In BR beinhaltet dieser Schritt Strukturänderungen des Proteinrückgrats (Sass et al., 1997). Diese Strukturänderungen dienen dazu, die Zugänglichkeit des zytoplasmatischen und des extrazellulären Halbkanals zu ändern. Auch in HR beinhaltet dieser Schritt Konformationsänderungen des Proteinrückgrates, wie sich durch die polarisierten FT-IR-Messungen an HR-Membranen zeigen lässt (Abb. 3-21). Auf diese Änderung, welche vielleicht entscheidend ist für die Abgabe des Chlorid-Ions in das Zytoplasma, wird in den Überlegungen zum Pumpmechanismus näher eingegangen.

Das in der Literatur beschriebene HR-O-Intermediat konnte in den durchgeführten Messungen weder im Sichtbaren noch im Infraroten detektiert werden. Da es sich hier nicht um ein Problem der Auflösung handelt, dürfte die Existenz fragwürdig sein.

Ebenfalls kein HR–O–Intermediat – zumindest bei höheren Chloridkonzentrationen – wurde auch in anderen Untersuchungen gefunden (Varo et al., 1995; Hutson et al., 2001). In den Untersuchungen von Hutson et al. (2001) findet sich zudem noch kein HR–L₂–Intermediat, was auf die mit etwa 2 mol/l zu geringe Chloridkonzentration zurückzuführen ist.

4.2 Überlegungen zum Pumpmechanismus

Um den Pumpmechanismus von HR zu verstehen, ist es nötig, den genauen Weg des Chlorid-Ions, vom extrazellulären in den zytoplasmatischen Raum, zu kennen. Argininreste sind als mögliche Bindungs- bzw. Interaktionspartner gut geeignet, da sie stark basischer Natur sind und eine hohe Ionisationsenthalpie aufweisen. Weiterhin ist die positive Ladung deutlich besser delokalisiert als in Lysinresten, so dass keine Neutralisierung durch negativ geladene Carboxygruppen notwendig ist. Die Argininreste der HR-Struktur (Kolbe et al., 2000) sind in Abbildung 4–2 dargestellt. Weiterhin konnten anhand der Strukturdaten mit dem Programm spdbv3.7 die elektrostatischen Potentiale berechnet werden (Abb. 4–2). Eine Chloridbindungsstelle findet sich in der Kristallstruktur direkt neben der Schiffischen Base. Das Chlorid-Ion befindet sich zwischen der protonierten Schiffischen Base und der Guanidino-Gruppe von Arg¹⁰⁸.

Das Anion bildet weder direkt zum Retinal, noch zu Arg¹⁰⁸ eine Wasserstoffbrückenbindung aus. Eine weitere nicht identifizierte Chloridstelle wird an der Oberfläche der extrazellulären Seite postuliert (Schobert et al., 1986). Okuno et al. (1999) gehen sogar von zwei Bindungsstellen an der extrazellulären Oberfläche aus. Die Bindungskonstanten werden im Abgleich mit anderen Untersuchungen (Schobert et al., 1986; Falke et al., 1984) mit 60–100 mM und 5 M für die beiden Bindungsstellen an der extrazellulären Oberfläche und 20 mM für die Bindungskonstante in der Nähe des Retinals angegeben. Daneben wird eine Bindungsstelle auf der zytoplasmatischen Seite, mit einer Bindungskonstanten von 7 M, postuliert. Da die Kristalle bei einer Chloridkonzentration von 3 M gewachsen sind, ist die Nichtbesetzung der Bindungsstelle mit einer Bindungskonstanten von etwa 100 mM an der extrazellulären Oberfläche überraschend. Möglicherweise wird die Bindungsstelle aufgrund der Molekülkontakte durch die Packung im Kristall, „neutralisiert“ und damit abgesättigt.

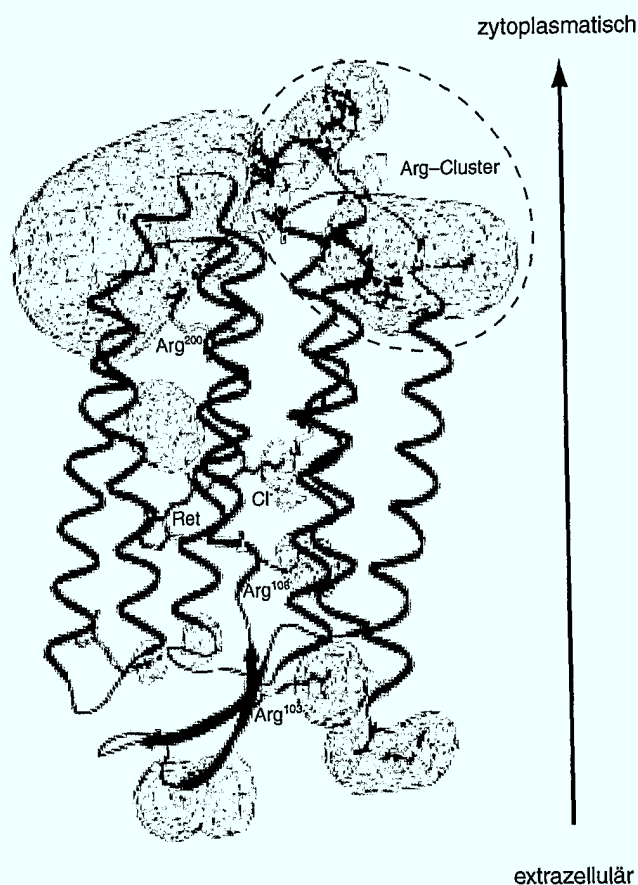


Abbildung 4-2: HR-Modell zur Erklärung des Pumpmechanismus

Das HR-Modell basiert auf den Daten von Kolbe et al., 2000. Die elektrostatischen Potentiale (blau: +; rot: -) wurden mit dem Programm spdbv3.7 berechnet.

Die Wiederbesetzung der Chloridbindungsstelle in der Nähe der Schiffsbasis geschieht laut Literatur mit dem Übergang des HR-O-Intermediates in den Grundzustand. Dieser Schritt wird als unabhängig von der Chloridkonzentration beschrieben (Zimanyi und Lanyi, 1989). Zur Stabilisierung des Chlorid-Ions in dieser Position wird ein Modell angenommen, welches die Besetzung einer zweiten Bindungsstelle an der extrazellulären Oberfläche vorsieht. In den von uns gemessenen Spektren zeigt sich allerdings eine Abhängigkeit des chloridaufnehmenden Schrittes von der Chloridkonzentration. Dieses spricht für einen offenen Kanal auf der extrazellulären Seite bis zur Bindungsstelle in der Nähe der Schiffsbasis.

Auf der zytoplasmatischen Seite bilden Arg²⁵⁸, Arg⁵², Arg⁵⁵, Arg⁵⁸ und Arg⁶⁰ ein hoch positiv geladenes Feld (Abb. 4-2). Die Aufgabe dieses Argininclusters könnte die Ausbildung eines starken elektrischen Feldes zwischen der Bindungsstelle in der Nähe des Retinals und der zytoplasmatischen Oberfläche sein, um auf diese Weise den Chloridtransport zu ermöglichen.

Im Gegensatz zum extrazellulären Transportweg lässt sich auf der zytoplasmatischen Seite kein Kanal erkennen. Dieser wird vermutlich erst durch eine Konformationsänderung, an der das C-terminale Ende von Helix E beteiligt sein könnte, geschaffen. Die Helix E ist durch eine Bindung zwischen Ala¹⁷⁸ und Trp¹⁸³ verzerrt (Kolbe et al., 2000). Die Konformationsänderung von Helix E könnte Teil der Strukturänderung des Proteinrückgrats beim Übergang des HR-L₁-Intermediates zum HR-L₂-Intermediat sein. Der Einfluss des HR-L₂-Intermediates auf die Abgabe des Chlorid-Ions wird auch in der gefundenen Akkumulation bei hohen Chloridkonzentrationen deutlich.

5 Zusammenfassung

In *Halobacterium salinarum* wurden bisher 4 Retinalproteine gefunden. Die Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) sowie die phototaktischen Proteine Sensorrhodopsin I (SRI) und Sensorrhodopsin II (SRII). Gegenstand dieser Arbeit waren funktionelle Untersuchungen der Anionenpumpe HR, wobei der Schwerpunkt auf der Analyse des Mechanismus des lichtgetriebenen Anionentransportes lag.

Zunächst wurde das HR-Gen mit dem Promotor von BR verknüpft. Die Überexpression erfolgte in dem BR-negativen *H. salinarum* Stamm L33. Dabei wurde die Expression durch den BR-Promotor so verstärkt, dass HR *in vivo* zweidimensional kristallisierte. Zudem konnte HR durch diese Anordnung in den Membranfragmenten sehr einfach im membrangebundenen Zustand erhalten werden. Um das Protein zur Kristallisation und für spektroskopische Untersuchungen einzusetzen, wurde eine schonende Reinigungsmethode etabliert.

Kristallisationsversuche mit dem solubilisierten Membranprotein mittels Dampfdiffusion und kubischer Lipidphase wurden durchgeführt. Mit der kubischen Lipidphase konnten dreidimensionale Kristalle erhalten werden, die allerdings keine Diffraktion zeigten.

Um die Chloridabhängigkeit des HR-Photozyklus zu untersuchen, erfolgte zunächst eine statische Chloridtitration von HR-Membranen. In den Absorptionsdifferenzspektren konnten drei verschiedene Zustände (bei 540 nm, 580 nm und 650 nm) mit in Abhängigkeit der Chloridkonzentration variierenden Absorptionsmaxima nachgewiesen werden. Der chloridabhängige Verlauf der Zustände lässt auf drei Bindungskonstanten für HR schließen.

Zeitaufgelöste Messungen im sichtbaren Spektralbereich führten zur Erstellung eines chloridfreien (Intermediate: HR₅₄₀ und HR-K₆₄₀) und eines chloridhaltigen Photozyklus (Intermediate: HR₅₈₀, HR-K₆₄₀ und HR-L₅₂₀). Dabei wird der chloridfreie Photozyklus wesentlich schneller durchlaufen als der chloridhaltige. Mit Hilfe der zeitaufgelösten FT-IR-Spektroskopie in Kombination mit der ATR-Technik wurde die Chloridabhängigkeit untersucht. Es konnte mit steigender Chloridkonzentration eine Beschleunigung der Entstehung des HR-L-Intermediates festgestellt werden. Der Zerfall des L-Intermediates verlangsamt sich hingegen mit steigender Chloridkonzentration. Bei sehr hohen Chloridkonzentrationen (5 M) konnten Unterschiede in der Amid I-Region zwischen frühen HR-L-Differenzspektren und den HR-L-Differenzspektren zu späten Zeiten

detektiert werden. Dies lässt auf eine Strukturänderung des Proteinrückgrates schließen. Durch Messungen des Lineardichroismus konnte diese Annahme bestätigt werden. Die Abhängigkeit des Aufbaus des HR-L₁- und des Zerfalls des HR-L₂-Intermediates von der Chloridkonzentration deuten auf eine Chlorid-Ionenaufnahme beim Übergang des HR-K-Intermediates zum HR-L₁-Intermediat und eine Chlorid-Ionenabgabe beim Übergang des HR-L₂-Intermediates in den Grundzustand hin.

6 Literaturverzeichnis

Ames, J.B., Raap, J., Lugtenburg, J. und Mathies, R.A. (1992). Resonance raman study of halorhodopsin, photocycle, kinetics, chromophore structure, and chlorid-pumping mechanism. *Biochemistry* 31, 12546–12554

Aton, B., Doukas, A.G., Callender, R.H., Becher, B. und Ebrey, T.G. (1977). Resonance raman studies of the purple membrane. *Biochemistry* 16, 2995–2999

Belrhali, H., Nollert, P., Royant, A., Menzel, C., Rosenbusch, J.P., Landau, E.M. und Pebay-Peroula, E. (1999). Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution. *Structure Fold. Des.* 7, 909–917

Blake, M.S., Johnston, K.H., Russel-Jones, G.J. und Gotschlich, E.C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* 136, 175–179

Blanck, A. und Oesterhelt, D. (1987). The halo-opsin gene. II. Sequence, primary structure and comparison with bacteriorhodopsin. *EMBO J.* 6, 265–273

Braiman, M.S., Mogi, T., Marti, T., Stern, L.J., Khorana, H.G. und Rothschild, K.J. (1988). Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: light driven proton transport involves protonation changes of aspartic acid residues 85, 96 and 212. *Biochemistry* 27, 8516–8520

Braiman, M.S., Walter, T.J. und Briercheck, D.M. (1994). Infrared spectroscopic detection of light-induced change in chloride-arginine interaction of halorhodopsin. *Biochemistry* 33, 1629–1635

Briggs, J., Chung, H. und Caffrey, M. (1996). The temperature-composition phase diagram and mesophase structure characterization of the monoolein/water system. *J. Physique II* 6, 723–752

- Brown, L.S., Dioumaev, A.K., Needleman, R. und Lanyi, J.K. (1998). Connectivity of the retinal Schiff base to Asp85 and Asp96 during the bacteriorhodopsin photocycle: the local-access model. *Biophys. J.* 75, 1455–1465
- Chon, Y.S., Kandori, H., Sasaki, J., Lanyi, J.K., Needleman, R. und Maeda, A. (1999). Existence of two L photointermediates of halorhodopsin from *Halobacterium salinarum*, differing in their protein and water FTIR bands. *Biochemistry* 38, 9449–9455
- Cline, S.W. und Doolittle, W.F. (1987). Efficient transfection of the archaeobacterium *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 169, 1341–1344
- Cline, S.W., Lam, W.L., Charlebois, R.L., Schalkwyk, L.C. und Doolittle W.F. (1989). Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Can. J. Microbiol.* 35, 148–152
- Corcelli, A., Colella, M., Mascolo G., Fanizzi F.P. und Kates, M. (2000). A novel glycolipid and phospholipid in the purple membrane. *Biochemistry* 39, 3318–3326
- Diller, R., Stockburger, M., Oesterhelt, D. und Tittor, J. (1987). Resonance raman study of intermediates of the halorhodopsin photocycle. *FEBS Lett.* 217, 297–304
- Dioumaev, A.K. und Braiman, M.S. (1997). Nano- and microsecond time-resolved FTIR spectroscopy of the halorhodopsin photocycle. *Photochem. Photobiol.* 66, 755–763
- Dunn, R., McCoy, J., Simsek, M., Majumdar, A., Chang, S.H., Rajbhandary, U.L. und Khorana, H.G. (1981). The bacteriorhodopsin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6744–6748
- Duschl, A. und Wagner, G. (1986). Primary and secondary chloride transport in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 168, 548–552
- Duschl, A., McCloskey M.A. und Lanyi, J.K. (1988). Functional reconstitution of halorhodopsin. *J. Biol. Chem.* 263, 17016–17022

- Essen, L.O., Siegert, R., Lehmann, W.D. und Oesterhelt, D. (1998). Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11673–11678
- Falke, J.J., Chan, S.I., Steiner, M., Oesterhelt, D., Towner, P. und Lanyi, J.K. (1984). Halide binding by the purified halorhodopsin chromoprotein. *J. Biol. Chem.* 259, 2185–2189
- Fodor, S.P.A., Ames, J.B., Gebhard, R., van der Berg, E.M.M., Stoeckenius, W., Lugtenburg, J. und Mathies, R.A. (1988). Chromophore structure on bacteriorhodopsins N intermediate: implications for the proton pumping mechanism. *Biochemistry* 27, 7097–7101
- Fukuda, K., Ikegami, A., Nasuda-Kouyama, A. und Kouyama T. (1990). Effect of partial delipidation of purple membrane on the photodynamics of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 29 (8), 1997–2002
- Gai, F., Hasson, K.C., Cooper Mc Donald, J. und Anfinrud, P.A. (1998). Chemical dynamics in proteins: The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin. *Science* 279, 1886–1891
- Gerwert, K., Souvignier, G. und Hess, B. (1990). Simultaneous monitoring of light induced changes in protein side-group protonation by time resolved Fourier-transform infrared spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87, 9774–9778
- Gradmann, D. (1975). Analog circuit of the acetabularia membrane. *J. Membrane Biol.* 25, 183–208
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of E.coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of E.coli. In Rickwood D., Hames B.D. *DNA cloning a practical approach*, IRL Press, 1, 109–135

- Harbison, G.S., Smith, S.O., Pardo, J.A., Winkel, C., Lugtenberg, J., Herzfeld, J., Mathies, R. und Griffin, R.G. (1984). Dark adapted bacteriorhodopsin contains 13-cis, 15-syn and all-trans, 15-anti retinal Schiff bases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1706–1709
- Hartmann, R., Sickinger, H.D. und Oesterhelt, D. (1980). Anaerobic growth of halobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3821–3825
- Hasilik, A. und Neufeld, E.F. (1980) Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts, synthesis as precursors with higher molecular weight. *J. Biol. Chem.* 255, 4937–4945
- Havelka, W.A., Henderson, R., Heymann, J.A.W. und Oesterhelt, D. (1993). Projection structure of halorhodopsin from *Halobacterium halobium* at 6 Å resolution obtained by electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 234, 837–846
- Heberle, J. und Dencher, N.A. (1990). Bacteriorhodopsin in ice: accelerated proton transfer from the purple membrane surface. *FEBS Letters* 277, 277–280
- Hegemann, P., Oesterhelt, D. und Bamberg, E. (1985). The transport activity of the light-driven chloride pump halorhodopsin is regulated by green and blue light. *Biochim. Biophys. Acta* 819, 195–205
- Heßling, B., Souvignier, G. und Gerwert, K. (1993). A model-independent approach to assigning bacteriorhodopsins intramolecular reactions to photocycle intermediates. *Biophys. J.* 65, 1929–1941
- Heymann, J.A.W., Havelka, W.A. und Oesterhelt, D. (1993). Homologous overexpression of a light driven anion pump in an archaeobacterium. *Mol. Microbiol.* 7, 623–630
- Hutson, M.S., Shilov, S.V., Krebs, R. und Braiman, M.S. (2001). Halide dependence of the halorhodopsin photocycle as measured by time-resolved infrared spectra. *Biophys. J.* 80, 1452–1465

- Khyse-Anderson, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: A single apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203–209
- Kochendoerfer, G.G., Lin, S.W., Sakmar, T.P. und Mathies, R.A. (1999). How color visual pigments are tuned. *TIBS* 24, 300–305
- Kolbe, M., Besir, H., Essen, L.O. und Oesterhelt, D. (2000). Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution. *Science* 288, 1390–1396
- Krebs, M.P., Hauss, T., Heyn, M.P., RajBhandary, U.L. und Khorana, H.G. (1991). Expression of the bacteriorhodopsin gene in *Halobacterium halobium* using a multicopy plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 859–863
- Krebs, M.P., Mollaaghababa, R. und Khorana, H.G. (1993). Gene replacement in *Halobacterium halobium* and expression of the bacteriorhodopsin mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1987–1991
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
- Landau, E.M. und Rosenbusch, J.P. (1996). Lipidic cubic phases: A novel concept for crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14532–14535
- Lanyi, J.K. und Vodyanoy, V. (1986). Flash spectroscopic studies of the kinetics of the halorhodopsin photocycle. *Biochemistry* 25, 1465–1470
- Lanyi, J.K., Duschl, A., Varo, G. und Zimanyi, L. (1990). Anion binding to the chloride pump, halorhodopsin, and its implications for the transport mechanism. *FEBS Lett.* 256, 1–6
- Lozier, R.H., Bogomolni, R.A. und Stoeckenius, W. (1975). Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* 15, 955–962

- Luecke, H., Richter, H.T. und Lanyi, J.K. (1998). Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 Å resolution. *Science* 280, 1934–1937
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J.P. und Lanyi, J.K. (1999). Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 291, 899–911
- Maeda, A., Iwasa, T. und Yoshizawa, T. (1977). Isomeric composition of retinal chromophore in dark-adapted bacteriorhodopsin. *J. Biochem.* 82, 1599–1604
- Maeda, A., Sasaki, J., Yamazaki, Y., Needleman, R. und Lanyi, J.K. (1994). Interaction of aspartate 85 with a water molecule and the protonated Schiff base in the L-intermediate of bacteriorhodopsin: a Fourier-transform infrared spectroscopic study. *Biochemistry* 33, 1713–1717
- Maeda, A., Kandori, H., Yamazaki, Y., Nishimura, S., Hatanaka, M., Chon, Y.S., Sasaki, J., Needleman, R. und Lanyi, J.K. (1997). Intramembrane signaling mediated by hydrogen-bonding of water and carboxyl groups in bacteriorhodopsin and rhodopsin. *J. Biochem.* 121, 399–406
- Manor, D., Hasselbacher, C.A. und Spudich, J.L. (1988). Membrane potential modulates photocycling rates of bacterial rhodopsins. *Biochemistry* 27, 5843–5848
- Marsh, D. und Pali, T. (2001). Infrared dichroism from the x-ray structure of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* 80, 305–312
- Mitchell, P. (1979). Keilins respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206, 1148–1159
- Mitrovich, Q.M., Victor, K.G. und Braiman, M.S. (1995). Differences between photocycles of halorhodopsin and the acid purple form of bacteriorhodopsin analyzed with millisecond time-resolved FTIR spectroscopy. *Biophys. Chem.* 56, 121–127

- Newman, M.J., Foster, D.L., Wilson, T.H. und Kaback, R. (1981). Purification and reconstitution of functional lactose carrier from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 256, 11804–11808
- Nollert, P., Royant, A., Pebay-Peyroula, E. und Landau E.M. (1999). Detergent-free membrane protein crystallization. *FEBS* 457, 205–208
- Oesterhelt, D. und Stoeckenius, W. (1973). Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2853–2857
- Oesterhelt, D., Schuhmann, L. und Gruber, H. (1974). Light-dependent reaction of bacteriorhodopsin with hydroxylamine in cell suspensions of *Halobacterium halobium*: Demonstration of an apo-membrane. *FEBS Lett.* 44, 257–261
- Oesterhelt, D. und Krippahl, G. (1983). Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants. *Ann. Microbiol. (Paris)* 134B, 137–150
- Oesterhelt, D., Hegemann, P. und Tittor, J. (1985). The photocycle of the chloride pump halorhodopsin. II. Quantum yields and a kinetic model. *EMBO J.* 4, 2351–2356
- Oesterhelt, D., Hegemann, P., Tavan, P. und Schulten, K. (1986). Trans-cis isomerization of retinal and a mechanism for ion translocation in halorhodopsin. *Eur. Biophys. J.* 14, 123–129
- Ogurusu, T., Maeda, A. und Yoshizawa, T. (1984). Absorption spectral properties of purified halorhodopsin. *J. Biochem.* 95, 1073–1082
- Okuno, D., Asaumi, M. und Muneyuki, E. (1999). Chloride concentration dependency of the electrogenic activity of halorhodopsin. *Biochemistry* 38, 5422–5429
- Otomo, J. (1996). Influence exercised by histidine-95 on chloride transport and the photocycle in halorhodopsin. *Biochemistry* 35, 6684–6689

Page, M.G.P., Rosenbusch, J.P. und Yamato, I. (1988). The effects of pH on proton sugar symport activity of the lactose permease purified from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263, 15897–15905

Pande, C., Lanyi, J.K. und Callender, R.H. (1989). Effects of various anions on raman spectrum of halorhodopsin. *Biophys. J.* 55, 425–431

Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J.P. und Landau, E.M. (1997). X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 Å from microcrystals grown in cubic lipidic phases. *Science* 277, 1676–1681

Pettei, J.M., Yudd, A.P., Nakanishi, K. und Stoeckenius, W. (1977). Identification of retinal isomers isolated from bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 16, 1955–1959

Polland, H.J., Franz, M.A., Zinth, W., Kaiser, W., Hegemann, P. und Oesterheld, D. (1985). Picosecond events in the photochemical cycle of the light-driven chloride-pump halorhodopsin. *Biophys. J.* 47, 55–59

Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T. und Flannery B.P. (1992). Numerical recipes in C. Cambridge University Press

Rammelsberg, R., Huhn, G., Lübben, M. und Gerwert K. (1998). Bacteriorhodopsin's intramolecular proton-release pathway consists of a hydrogen-bonded network. *Biochemistry* 37, 5001–5009

Rosen, B.P., Weigel, U., Karkaria, C. und Gangola, P. (1988). Molecular characterization of a unique anion pump: the ArsA protein is an arsenite (antimonate)–stimulated ATPase. In Stein, W.D. (Ed.), *The Ion Pumps: Structure, Function and Regulation*, Alan R. Liss, New York, 105–112

Rothschild, K.J., Bousche, O., Braiman, M.S., Hasselbacher, C.A. und Spudich, J.L. (1988). Fourier transform infrared study of the halorhodopsin chloride pump. *Biochemistry* 27, 2420–2424

- Rüdiger, M., Haupts, U., Gerwert, K. und Oesterhelt, D. (1995). Chemical reconstitution of a chloride pump by a single point mutation. *EMBO J.* 14, 1599–1606
- Rüdiger, M. und Oesterhelt, D. (1997). Specific arginine and threonine residues control anion binding and transport in the light driven chloride pump halorhodopsin. *EMBO J.* 16, 3813–3821
- Rummel, G., Hardmeyer, A., Widmer, C., Chiu, M.L., Nollert, P., Locher, K.P., Pedruzzi, I., Landau, E.M. und Rosenbusch, J.P. (1998). Lipidic cubic phases: new matrices for the three-dimensional crystallization of membrane proteins. *J. Struct. Biol.* 121, 82–91
- Sasaki, J., Shichida, Y., Lanyi, J.K. und Maeda, A. (1992). Protein changes associated with reprotonation of the Schiff base in the photocycle of Asp96 → Asn bacteriorhodopsin. The MN intermediate with unprotonated Schiff base but N-like protein structure. *J. Biol. Chem.* 267, 20782–20786
- Sasaki, J., Brown, L.S., Chon, Y.S., Kandori, H., Maeda, A., Needleman, R. und Lanyi, J.K. (1995). Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump, *Science* 269, 73–75
- Sass, H.J., Schachowa, I.W., Rapp, G., Koch, M.H., Oesterhelt, D., Dencher, N.A. und Büldt, G. (1997). The tertiary structural changes in bacteriorhodopsin occur between M states: X-ray diffraction and fourier-transform infrared spectroscopy. *EMBO J.* 16, 1484–1491
- Sass, H.J., Büldt, G., Gessenich, R., Hehn, D., Neff, D., Schlesinger, R., Berendzen, J. und Ormos, P. (2000). Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin. *Nature* 406, 649–653
- Sato, H., Takeda, K., Tani, K., Hino, T., Okada, T., Nakasako, M., Kamiya, N. und Kouyama, T. (1999). Specific lipid-protein interactions on a novel honeycomb lattice structure of bacteriorhodopsin. *Acta Cryst. D* 55, 1251–1256

- Scherrer, P., Mathew, M.K., Sperling, W. und Stoeckenius, W. (1989). Retinal isomer ratio in dark-adapted purple membrane and bacteriorhodopsin monomers. *Biochemistry* 28, 829–834
- Schobert, B. und Lanyi, J.K. (1986). Electrostatic interaction between anions bound to site I and the retinal schiff base of halorhodopsin. *Biochemistry* 25, 4163–4167
- Schulten, K. und Tavan, P. (1978). A mechanism for the light-driven proton pump of halobacterium halobium. *Nature* 272, 85–86
- Seebach, D. und Prelog, V. (1982). Spezifikation des sterischen Verlaufs von asymmetrischen Synthesen. *Angew. Chem.* 94, 696–702
- Seehra, J.S. und Khorana, H.G. (1984). Bacteriorhodopsin precursor. Characterization and its integration into the purple membrane. *J. Biol. Chem.* 259, 4187–4193
- Shand, R.F. und Bettlach, M.C. (1991). Expression of the bop gene cluster of Halobacterium halobium is induced by low oxygen tension and by light. *J. Bacteriol.* 173, 4692–4699
- Smith, S.O., Pardo, J.A., Mulder, P.P.J., Curry, B., Lugtenburg, J. und Mathies, R. (1983). Chromophore structure of bacteriorhodopsins O₆₄₀ photointermediate. *Biochemistry* 22, 6141–6148
- Sumper, M., Reitmeier, H. und Oesterhelt, D. (1976). Zur Biosynthese der Purpirmembranen von Halobakterien. *Angew. Chem.* 88, 203–210
- Tittor, J., Oesterhelt, D., Maurer, R., Desel, H. und Uhl, R. (1987). The photochemical cycle of halorhodopsin: absolute spectra of intermediates obtained by flash photolysis and fast difference spectra measurements. *Biophys. J.* 52, 999–1006
- Varo, G., Zimanyi, L., Fan, X., Sun, L., Needleman, R. und Lanyi, J.K. (1995). Photocycle of halorhodopsin from halobacterium salinarium. *Biophys. J.* 68, 2062–2072

- Wagner, G., Oesterhelt, D., Krippahl, G. und Lanyi, J.K. (1981). Bioenergetic role of halorhodopsin in halobacterium halobium cells. FEBS Lett. 131, 341–345
- Wald, G. (1968). Die molekulare Basis des Sehvorganges (Nobel-Vortrag). Angew. Chem. 21, 857–920
- Walker, J.E. (1998). ATP-Synthese durch Rotations-Katalyse (Nobel-Vortrag). Angew. Chem. 110, 2438–2450
- Walter, T.J. und Braiman, M.S. (1994). Anion-protein interactions during halorhodopsin pumping: halide binding at the protonated schiff base. Biochemistry 33, 1724–1733
- Woese, C. und Fox, G. (1977). Phylogenetic structure of the procaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5088–5090
- Woese, C., Kandler, O. und Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal of a domains archae, bacteria and eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4576–4579
- Xu, Z., Moffett, D.B., Peters, T.R., Smith, L.D., Perry, B.P., Whitmer, J., Stokke, S.A. und Teintze, M. (1995). The role of the leader sequence coding region in expression and assembly of bacteriorhodopsin. J. Biol. Chem. 270, 24858–24863
- Yang, C.F. und DasSarma, S. (1990). Transcriptional induction of purple membrane and gas vesicle synthesis in the archaebacterium Halobacterium halobium is blocked by DNA gyrase inhibitor. J. Bacteriol. 172, 4118–4121
- Zimanyi, L. und Lanyi, J.K. (1987). Iso-halorhodopsin: a stable, 9-cis retinal containing photoproduct of halorhodopsin. Biophys. J. 52, 1007–1013
- Zimanyi, L. und Lanyi, J.K. (1989). Transient spectroscopy of bacterial rhodopsins with optical multi channel analyzer. II. Effects of anions on the halorhodopsin on the halorhodopsin photocycle. Biochemistry 28, 5172–5178

Zscherp, C. und Heberle, J. (1997). Infrared difference spectroscopy of the intermediates L, M, N and O of the bacteriorhodopsin photoreaction obtained by time resolved attenuated total reflection spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 101, 10542–10547

Zscherp, C., Schlesinger, R., Tittor, J., Oesterhelt, D. und Heberle, J. (1999). In situ determination of transient pKa changes of internal amino acids of bacteriorhodopsin by using time-resolved attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96, 5498–5503

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Å	Angström (1 nm = 10 Å)
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BHI	Brain Heart Infusion
Bp	Basenpaar
BR	Bakteriorhodopsin
C–	Carboxy–
DDM	N–Dodecylmaltosid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	Fast Pressure Liquid Chromatographie
FT–IR	Fouriertransformation–Infrarotspektroskopie
HR	Halorhodopsin
g	Gramm, Gravitation
<i>H. salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
kB	Kilo–Basen
kDa	Kilo–Dalton
l	Liter
M	Molar
MES	2–Morpholinoethansulfonsäure
N–	Amino–
mRNA	messenger–RNA
OD	Optische Dichte
OG	Oktylglykosid

PAGE	Polyacrylamid–Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRI	Sensorrhodopsin I
SRII	Sensorrhodopsin II
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'–Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbar
v/v	Volumenanteil (volume per volume)
wt	wildtypisch
w/v	Gewichtsanteil (weight per volume)

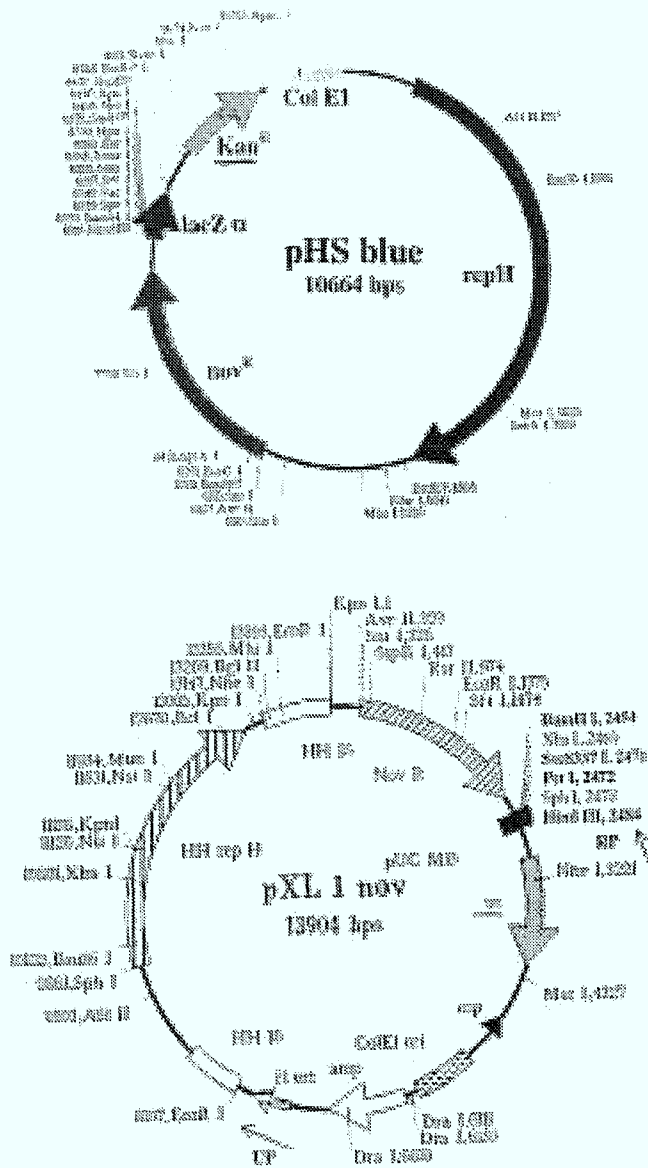
Für die 20 natürlichen Aminosäuren wurde der Dreibuchstaben– oder Einbuchstabencode nach der IUPAC–IUB–Vereinbarung (1969) verwendet.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1–1:	Schematische Darstellung drei verschiedener Retinalkonformationen	3
Abbildung 1–2:	Überlagerung der Sekundärstrukturelemente von HR und BR	4
Abbildung 1–3:	Quartärstruktur von HR	5
Abbildung 1–4:	Wasserstoffbrückennetzwerk in der Umgebung des gebundenen Chlorid-Ions	7
Abbildung 1–5:	Schematische Gesamtübersicht des HR-Photozyklus aus <i>H. salinarum</i>	10
Abbildung 2–1:	Schematische Ansicht der Diffusion in diskontinuierlichen (A und C) und in bikontinuierlichen Phasen (B und D)	35
Abbildung 2–2:	Schematische Darstellung der Apparatur für zeitaufgelöste sichtbare Spektroskopie	39
Abbildung 2–3:	Schematischer Aufbau des Bruker IFS66V	41
Abbildung 2–4:	Schematischer Aufbau einer ATR Messzelle	42
Abbildung 3–1:	Präparative Agarosegele mit PCR-Produkten	45
Abbildung 3–2:	Schematische Darstellung der Fusion bop/hop	46
Abbildung 3–3:	Kontrolle des Inserts	47
Abbildung 3–4:	Vergleich der Wachstumskurven	49
Abbildung 3–5:	Absorptionsspektren gereinigter HR-Membranen aus L33 und MPK40	50
Abbildung 3–6:	Analyse von HR mittels SDS-PAGE und Western-Blot	52
Abbildung 3–7:	Gelfiltration von solubilisiertem HR	54
Abbildung 3–8:	Absorptionsspektrum von solubilisiertem HR	55
Abbildung 3–9:	Streuintensitäten und Indizierung von 2D HR-Kristallen	57
Abbildung 3–10:	Verteilung des HR in der kubische Lipidphase	60
Abbildung 3–11:	HR-Kristalle in der kubischen Lipidphase	61
Abbildung 3–12:	UV/Vis-Spektren von HR-Membranen in Gegenwart verschiedener Chloridkonzentrationen	63
Abbildung 3–13:	Absorptionsdifferenzspektren von HR bei verschiedenen Chloridkonzentrationen	65
Abbildung 3–14:	Verlauf der Zustände bei 580 und 650 nm in Abhängigkeit der Chloridkonzentration	66

Abbildung 3–15:	Zeitaufgelöste sichtbare Differenzspektren von HR–Membranen als 2D–Konturdiagramme	68
Abbildung 3–16:	FT–IR–Differenzspektrum zur Bandenzuordnung	70
Abbildung 3–17:	FT–IR–Differenzspektren bei unterschiedlichen Chloridkonzentrationen	72
Abbildung 3–18:	SVD–Analyse der Chloridabhängigkeit	74
Abbildung 3–19:	Vergleich der FT–IR–Differenzspektren zu verschiedenen Zeiten	75
Abbildung 3–20:	Vergleich der zeitlichen Verläufe spezieller Differenzbanden bei 0 und 3 mol/l Chlorid	76
Abbildung 3–21:	Differenzspektren von L_1 und L_2 mit s– bzw. p–polarisiertem Licht gemessen	77
Abbildung 3–22:	Vergleich der Zeitverläufe von charakteristischen infraroten und sichtbaren Differenzbanden	79
Abbildung 4–1:	Schematische Darstellung des Photozyklus aus den in dieser Arbeit vorliegenden Daten	84
Abbildung 4–2:	HR–Modell zur Erklärung des Pumpmechanismus	88

7.4 Expressionsvektoren



Danke !

Herrn Prof. Dr. G. Büldt danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und der Arbeitsstelle. Seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Weiterhin möchte ich mich für die vielfältigen Weiterbildungsmöglichkeiten während der gesamten Zeit bedanken.

PD Dr. J. Heberle möchte ich für das Ermöglichen der zahlreichen spektroskopischen Messungen danken. Die Diskussion der Ergebnisse waren eine unerlässliche Hilfe. Ein Erlebnis war auch die Tagung in Birmingham.

Dr. R. Schlesinger danke ich für die grandiose und uneingeschränkte Hilfe in allen molekularbiologischen Fragen und für unermüdliches Korrekturlesen.

C. Bolwien danke ich für alles, was mit der FT-IR-Spektroskopie an HR-Membranen zu tun hat. Sein engagiertes Korrekturlesen hat sicherlich zu einer Verbesserung des Stils dieser Arbeit beigetragen.

Dr. D. Hehn sei für die Einweisung in die zeitaufgelöste sichtbare Spektroskopie und für die Unterstützung bei Computerproblemen gedankt.

Dr. D. Neff und Dr. R. Gessenich möchte ich für die Einweihung in die Geheimnisse der blaunativen Gelelektrophorese und der Kristallisation von Membranproteinen danken.

A. Eckhoff danke ich für die vielen Diskussionen und Gespräche. D. Heitbrink möchte ich für die besten Proteinfilme an einer Küvettenwand und R. Nyquist für die große Hilfe beim Deutsch/Englisch-Sprachtransfer danken.

PD Dr. J. Granzin und Dr. J. Labahn danke ich für die Beantwortung der vielen Fragen zum Thema Kristallographie.

Frau B. Gehrman sei für die Unterstützung und Hilfe in allen administrativen Fragen gedankt. A. Cousin, C. Baeken, A. Lemmens und I. Ritter danke ich für die Unterstützung bei der Expression von HR.

Allen Mitgliedern des IBI-2 sei für das angenehme Arbeitsklima sowie die ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei den verschiedensten Problemen gedankt.

Ganz besonders aber danke ich meinen Eltern, meiner Schwester Sandra und ihrem Mann Franz, die mich jederzeit unterstützt haben und mir stets hilfreich zur Seite standen.

Meinem Sohn Erik danke ich einfach dafür, dass er da ist und für die Freude, die er uns gebracht hat.

Margit

Forschungszentrum Jülich



Jül-3934
Dezember 2001
ISSN 0944-2952