

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

**UNTERSUCHUNG DER LIPIDVERMITTELTEN
KRISTALLISATION DER IONENPUMPEN BAK-
TERIORHODOPSIN UND HALORHODOPSIN AUS
*HALOBACTERIUM SALINARUM***

von

Hüseyin Besir

aus Bafra

München 2001

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 (3) der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Dieter Oesterhelt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

.....

Hüseyin Besir

München, den 09.05.2001

Dissertation eingereicht am 09.05.2001

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Gärtner

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2001

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:

Kolbe, M., H. Besir, L. O. Essen and D. Oesterhelt (2000): "Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 angstrom resolution" *Science*, **288** (5470), 1390-1396

In Vorbereitung für die Publikation:

Besir, H., M. Kurz, H. J. Steinhoff, D. Oesterhelt: "Investigation of lipid-mediated 2D-crystallization of Bacteriorhodopsin by freeze-fracture electron microscopy, electron paramagnetic resonance and light-induced crosslinking", in Vorbereitung

Meiner Familie und Tina

أَقْرَأُ وَرَبُّكَ الْأَكْرَمُ ﴿٣﴾

(3) Lies! denn dein Herr ist der Allgütige

الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ ﴿٤﴾

(4) Der lehrte durch die Feder

عَلَّمَ الْإِنْسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ ﴿٥﴾

(5) Den Menschen lehrte, was er nicht wußte
(Quran, 96:3-5)

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG.....	3
2.1	Archaeale Retinalproteine.....	3
2.2	Struktur von Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin.....	5
2.3	Transportzyklen von Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin.....	7
2.4	Zusammensetzung der Purpurmembran	9
2.5	Struktur der Purpurmembran.....	11
2.6	Einfluß von Retinal auf die Bildung der Purpurmembran.....	14
2.7	Funktion der Lipide in der Purpurmembran.....	15
2.7.1	Einfluss auf die Kristallisation <i>in vivo</i>	15
2.7.2	Einfluß auf den Photozyklus und Pumpaktivität von BR.....	18
2.8	Wechselwirkung von Halorhodopsin mit Lipiden	19
2.9	Einführung von Deletionen durch homologe Rekombination	20
2.10	Zielsetzung.....	23
3	ERGEBNISSE.....	24
3.1	Konstruktion des <i>bop⁻/hop⁻</i> Deletionsstammes TOM	24
3.2	Untersuchungen zur <i>in vivo</i>-Kristallisation von Bacteriorhodopsin	26
3.2.1	Mutagenese mittels Polymerase-Kettenreaktion	26
3.2.2	Isolierung der Membranfraktionen	29
3.2.3	Spektroskopische Untersuchungen	32
3.2.3.1	UV/Vis-Spektroskopie	32
3.2.3.2	Photozyklusmessungen mittels lichtinduzierter Absorptionsänderung.....	36
3.2.4	Bestimmung der Isomerenverhältnisse des Retinals.....	40
3.2.5	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Membranfraktionen	42
3.2.6	Gefrierbruchelektronenmikroskopie (EM) mit ganzen Zellen	43
3.2.7	Rotationsdiffusions-Messungen in Vesikeln	47
3.2.8	Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie.....	50
3.2.9	Lichtinduzierte Vernetzung von Bacteriorhodopsin in der Membran	57
3.2.10	Physiologische Untersuchungen.....	60
3.2.10.1	Messung der spezifischen Transportaktivität	60
3.2.10.2	Messung der Photophosphorylierungsrate	61
3.2.10.3	Untersuchung der Zellen unter phototrophen Bedingungen.....	63
3.3	Expression und Aufreinigung von Halorhodopsin.....	67
3.4	Untersuchung von 2D-Kristallen von Halorhodopsin auf D2-Zellen	70
3.5	Isolierung von Halorhodopsin mit ³H-Palmitinsäure.....	75

3.6 Mutationen in Halorhodopsin.....	80
3.7 Fusionsproteine mit Bacteriorhodopsin.....	81
4 DISKUSSION	86
4.1 Einfluß der Mutationen auf die Funktion von BR	86
4.2 Einfluß der Mutationen auf die <i>in vivo</i>-Kristallisation von BR.....	87
4.3 Welche Vorteile hat die Purpurmembran für die Zelle?	95
4.4 Kristallisation von HR in der Zellmembran.....	97
4.5 PM als Reinigungsmittel für lösliche Proteine.....	98
5 MATERIAL UND METHODEN	101
5.1 Material.....	101
5.1.1 Zentrifugen	101
5.1.2 HPLC-Apparatur und –Bedingungen.....	101
5.1.3 Chemikalien.....	101
5.1.4 DNA-Polymerasen	102
5.1.5 Nährmedien.....	102
5.1.5.1 Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	102
5.1.5.2 Nährmedien für <i>Halobacterium salinarum</i>	103
5.1.5.3 Antibiotika.....	103
5.1.6 Stämme der verwendeten Organismen.....	104
5.1.7 Vektoren	104
5.1.8 Oligonukleotide.....	105
5.2 Mikrobiologische Methoden	106
5.2.1 Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	106
5.2.2 Kultivierung und Stammhaltung von <i>H. salinarum</i>	106
5.2.3 Messung von Wachstumskurven	106
5.3 Molekularbiologische Methoden.....	107
5.3.1 Transformation von <i>E. coli</i>	107
5.3.1.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	107
5.3.1.2 Transformation durch Elektroporation	107
5.3.2 Transformation von <i>H. salinarum</i>	108
5.3.2.1 Anzucht der Zellen.....	108
5.3.2.2 Transformation.....	108
5.3.3 Isolierung von DNA.....	109
5.3.3.1 Isolierung von Vektor-DNA aus <i>E. coli</i>	109
5.3.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus <i>H. salinarum</i>	109
5.3.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	110

5.3.4	Reaktionen DNA-modifizierender Enzyme	110
5.3.4.1	Spezifische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	110
5.3.4.2	Herstellung von "glatten" Enden mit dem Klenow-Fragment	110
5.3.4.3	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	111
5.3.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	111
5.3.5	Gelelektrophorese von DNA	112
5.3.6	Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA (dsDNA)	112
5.3.7	Southern-Hybridisierung mit Digoxigenin(DIG)-markierten Sonden	113
5.3.7.1	Herstellung der DIG-markierten Sonden durch PCR.....	113
5.3.7.2	Fixierung der DNA auf Membranen (Vakuum-Blot).....	113
5.3.7.3	Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden.....	113
5.3.7.4	Detektion der hybridisierten DNA	114
5.3.7.5	Kolonie-Hybridisierung.....	115
5.4	Biochemische Methoden.....	115
5.4.1	DNA-Sequenzierung	115
5.4.1.1	Nicht-radioaktive automatisierte DNA-Sequenzierung.....	115
5.4.1.2	Reinigung von Sequenzierungsproben	116
5.4.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	116
5.4.3	Western-Blot.....	117
5.4.4	Isolierung von Membranfraktionen aus <i>H. salinarum</i>	119
5.4.5	Chromatographische Aufreinigung von Halorhodopsin	119
5.4.6	Retinalextraktion und HPLC-Analyse der Retinalisomeren	120
5.4.7	UV/Vis-Spektroskopie	121
5.4.8	Blitzlicht-Spektroskopie	121
5.4.9	Gefrierbruch und Elektronenmikroskopie.....	122
5.4.10	Elektronenspinresonanz(ESR)-Spektroskopie.....	123
5.4.11	Rotationsdiffusion von BR in Zellvesikeln	123
5.4.12	Protonentransportaktivität von BR in <i>H. salinarum</i>	124
5.4.13	Messung der Photophosphorylierungsrate in <i>H. salinarum</i>	124
5.4.14	Lichtinduzierte Vernetzung von BR in Membranen.....	125
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	127
7	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	139
8	DANKSAGUNG	141
9	LEBENS LAUF.....	143

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion ausgesuchter Aminosäuren in der archaealen Protonenpumpe Bacteriorhodopsin (BR) bei der Entstehung der zweidimensional kristallinen Purpurmembran (PM) in *Halobacterium salinarum* untersucht. Mittels gerichteter Mutagenese wurden aromatische Gruppen (W12, Y64, W80) gegen andere Reste ausgetauscht und die mutierten Gene homolog exprimiert. Die Tryptophanmutationen hatten dabei eine drastische Störung der PM-Bildung zur Folge, was auf wichtige Wechselwirkungen mit Lipidmolekülen schließen ließ. Insbesondere der Tryptophanrest W80, der mit dem Phythanylrest eines Glykolipids im Zentrum des Trimers wechselwirkt, zeigte seine essentielle Bedeutung für die PM-Bildung. Eine Abhängigkeit der PM-Bildung von der vorhandenen BR-Menge und Wachstumsphase konnte beim Wildtyp (WT) ausgeschlossen werden.

Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahmen von ganzen Zellen zeigten bei der Mutante BR-W12I zahlreiche kleinere kristalline Bereiche auf der Oberfläche, während die Zellen mit BR-W80I nahezu keine geordneten Flächen aufwiesen. Mit Hilfe von Rotationsdiffusionsmessungen in Vesikeln und Elektronenspinresonanz(ESR)-Spektroskopie von spinmarkierten Cysteinmutanten wurde eine Zunahme der Mobilität der markierten Seitenketten und des mittleren Abstands der BR-Moleküle nachgewiesen. Lichtinduzierte Proteinvernetzung zeigte eine deutliche Auflockerung der kristallinen Struktur der mutierten BR-Moleküle in der Zellmembran, vor allem bei BR-W80I.

Die Funktion von BR als Protonenpumpe wurde durch die Mutationen nicht beeinträchtigt, ebenso wurde keine durch die PM bewirkte höhere Photophosphorylierungsrate in den Zellen nachgewiesen, weshalb eine Begünstigung dieser Prozesse als Erklärung für die *in vivo*-Kristallisation ausgeschlossen wurde. Der Einfluß der Mutationen auf die spektroskopischen Eigenschaften war vergleichsweise gering. Jedoch bot die Abnahme der Lichtadaptationsfähigkeit und Zunahme des Anteils an inaktiven 9- und 11-*cis*-Retinalisomeren in lichtadaptierten Proben eine plausible Erklärung für die Bildung der kristallinen PM. Die Bildung des 9-*cis*-Isomeren führt zur Spaltung der Bindung zwischen Retinal und dem Protein. Dies wurde durch Belichtung von Zellen mit BR-W80I nachgewiesen, die innerhalb weniger Stunden ihren aktiven Chromophor in BR verloren. Demnach wird durch die kristalline Anordnung von BR die thermoreversible Isomerisierung von all-*trans*- zu 13-*cis*-Retinal so stark bevorzugt, dass die funktionelle Stabilität des Proteins gewährleistet ist. Dies erklärt den evolutionären Vorteil des kristallinen Form des BR als Purpurmembran.

Das Vorkommen von zweidimensionalen Kristallen von Halorhodopsin (HR) mit hexagonaler Ordnung im Überexpressionsstamm D2 wurde mittels Gefrierbruchelektronenmikroskopie

nachgewiesen. Eine ähnliche Anordnung wurde in 3D-Kristallen gefunden, die im Rahmen dieser Arbeit durch Aufreinigung des Proteins und Kristallisation in kubischen Lipidphasen erhalten wurden (Kolbe *et al.*, 2000). Damit wurde gezeigt, dass in den 3D-Kristallen von HR die gleiche Anordnung wie in der Zellmembran auftreten kann. Dies ließ auch auf eine physiologische Relevanz des Palmitatmoleküls schließen, das im Innern des HR-Trimers in der Kristallstruktur gefunden wurde. Die Affinität dieser Fettsäure zu HR wurde durch Markierung der Zellen mit ^3H -Palmitat untersucht. Aus diesen Experimenten ging hervor, dass die Affinität der Palmitinsäure zu HR im Vergleich zu BR nicht höher ist. Eine BR-Mutante, die in einer nichtkristallinen Anordnung vorlag, wurde als Kontrolle verwendet.

Es wurde ein Vektor konstruiert, der die Klonierung und homologe Expression von Genen für lösliche Proteine als Fusionsprotein am C-terminus von BR ermöglicht. Dies wurde mit dem Gen für das Ferredoxin von *H. salinarum* erfolgreich durchgeführt. Die rasche Aufreinigung der entstandenen PM mittels Zentrifugation in einem Saccharosedichtegradienten führte zu einer einfachen Abtrennung von einem Großteil anderer Proteine. Durch Einführung spezifischer Proteaseschnittstellen wurde auch eine Spaltung des Fusionsproteins ermöglicht. Die Koexpression löslicher Proteine mit BR in der PM bietet enorme Vorteile aufgrund der hohen Expressionsrate des Bacterioopsingens (*bop*), der Induzierbarkeit des *bop*-Promoters, die einfache Aufreinigung und der Möglichkeit zur Expression von Mutanten von essentiellen Genen ohne deren vorherige Deletion. Die Eignung dieses Systems für die einfache Isolierung von löslichen Proteinen als Fusionsprotein mit BR wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt.

2 Einleitung

2.1 Archaeale Retinalproteine

Halobacterium salinarum (früher *H. halobium*) gehört zu den halophilen Archaea, die mit den methanogenen und thermoacidophilen Archaea eine dritte Domäne im phylogenetischen Stammbaum der Lebewesen bilden (Abb. 2.1, Woese, 2000; Woese *et al.*, 1990).

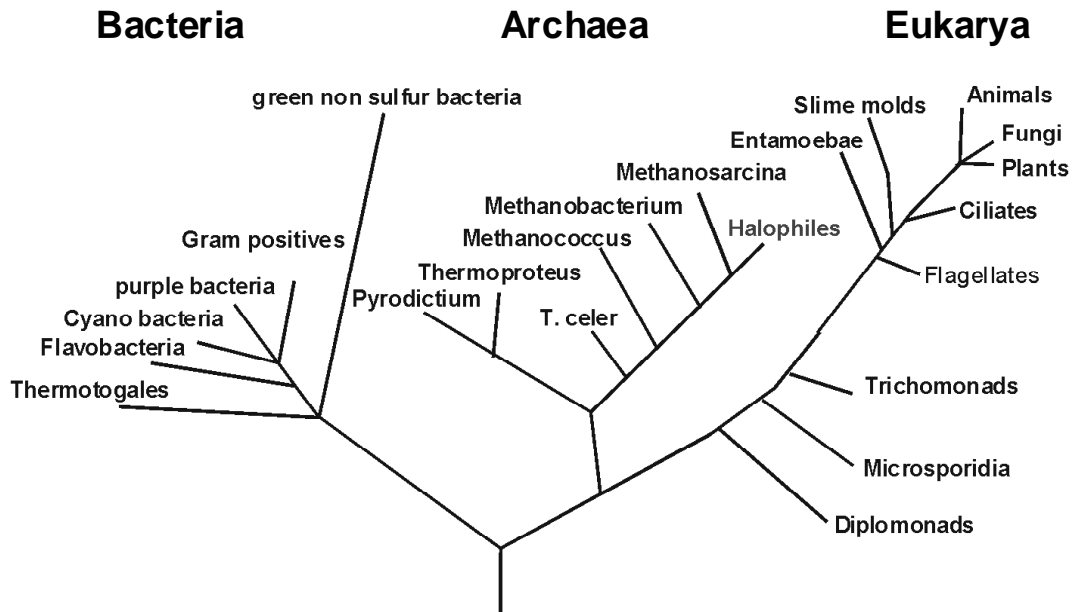


Abb. 2.1 Phylogenetischer Stammbaum der Lebewesen (aus Woese *et al.*, 1990).

Ihren Namen bekamen die Archaea aufgrund der extremen Bedingungen, unter denen sie leben können, wie hohe Temperaturen, extreme pH-Werte und hohe Salzkonzentrationen. Halophile Archaea leben in salzhaltigen Gewässern, in denen die Salzkonzentration bis zur Sättigungsgrenze ansteigen kann. Für *H. salinarum* liegen bei etwa 4.3 M NaCl optimale Bedingungen vor. Bei Wachstumstemperaturen von 40 – 50 °C ist der Sauerstoffgehalt des Wassers niedrig. Neben der Energiegewinnung über die Atmungskette haben halophile Archaea die Möglichkeit, durch Fermentation von Arginin oder eine zweite Art der Photosynthese ATP zu synthetisieren.

Letztere wird durch die auswärts gerichtete, lichtgetriebene Protonenpumpe Bacteriorhodopsin (BR) ermöglicht, die zur Familie der Retinalproteine gehört und durch vektoriellen Transport von Protonen aus der Zelle einen Protonengradienten an der Membran aufbaut, durch den die ATP-Synthese und diverse Transportprozesse ermöglicht werden (Oesterhelt und Stoekenius, 1971; Oesterhelt und Stoekenius, 1973). Alle Retinalproteine sind integrale Membranproteine mit sieben Transmembranhelices, die einen Kanal bilden, in dem der Chromophor Retinal über eine Schiffsbasis (SB) mit der ε-Aminogruppe eines hochkonservierten

Lysins verknüpft vorliegt (Oesterhelt, 1998; Spudich, 2000). In *H. salinarum* werden neben BR noch drei weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie gefunden (Abb. 2.2). Das Retinal ermöglicht diesen Proteinen die Absorption eines Photons, wodurch es von der all-*trans* zur 13-*cis*-Form isomerisiert. Daraufhin durchlaufen die Retinalproteine eine Folge von Zwischenzuständen, an deren Ende sie wieder im Ausgangszustand vorliegen. Die vom Chromophor eingefangene Energie wird im Falle der Ionenpumpen BR und Halorhodopsin (HR) für die Translokation von Protonen bzw. Chloridionen genutzt. Bei den Sensorrhodopsinen (SRI und SRII) hingegen bewirkt die absorbierte Energie Konformationsänderungen, die zur Aktivierung der assoziierten Transducerproteine Htr I und II führen.

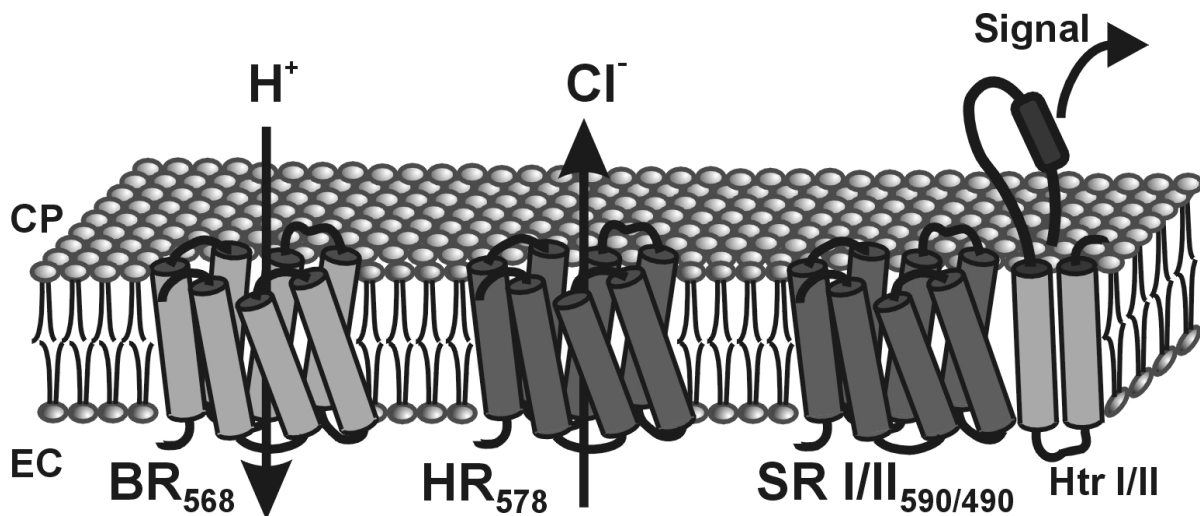


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Retinalproteine in der Membran von *H. salinarum* (modifiziert nach Oesterhelt, D, 1998); BR und HR: lichtgetriebene Ionenpumpen Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin (H^+ bzw. Cl^-), SR I/II: Lichtrezeptoren Sensorrhodopsin I und II für UV und oranges bzw. blaues Licht, mit den jeweiligen Transducerproteinen Htr I und II, die für die Weiterleitung des Lichtsignals in der Zelle sorgen (Indizes zeigen die jeweiligen Absorptionsmaxima der Pigmente an); CP: cytoplasmatisch, EC: extrazellulär.

Halorhodopsin (HR) ist dem BR strukturell sehr ähnlich (Kolbe *et al.*, 2000) und fungiert als einwärts gerichtete, lichtgetriebene Anionenpumpe, die im Licht die Chloridaufnahme während des Wachstums der Zellen unter isoosmolaren Bedingungen gewährleistet (Schobert und Lanyi, 1982). Die Ähnlichkeit der beiden Pumpen konnte durch die Einführung einer Punktmutation experimentell bestätigt werden. Dabei wurde der Protonenakzeptor D85 in BR zum entsprechenden Rest in HR (Threonin) mutiert, wodurch BR zu einer ebenfalls einwärts gerichteten Chloridpumpe umgewandelt werden konnte (Sasaki *et al.*, 1995). Durch Absorption von zwei Photonen kann HR Protonen in die Zelle transportieren (Bamberg *et al.*, 1993).

Die Sensorrhodopsine SR I und SR II unterscheiden sich von diesen Ionenpumpen durch ihre Funktion als Photorezeptoren (SR I: Bogomolni und Spudich, 1982; SR II: Takahashi *et al.*, 1985). SR I dient als Empfänger für UV und oranges Licht, was in der Zelle eine abstoßende

bzw. anziehende Reaktion auslöst. Durch das Transducerprotein Htr I wird eine Signalkaskade ausgelöst, die die Drehrichtung des Geißelapparats der Zelle ändert und so ein Wegschwimmen vom blauen bzw. Hinschwimmen zum orangen Licht ermöglicht. SR II ist ein Blaulichtrezeptor und löst in der Zelle durch Absorption von blauem Licht eine Fluchtreaktion aus.

2.2 Struktur von Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin

BR besteht in der maturen Form aus 248 Aminosäuren und liegt in der Zellmembran von *H. salinarum* in Form von zweidimensionalen Kristallen mit hexagonaler Anordnung von BR-Trimeren, der so genannten Purpurmembra (PM), vor (Blaurock und Stoeckenius, 1971; Abb. 2.3, links). Die dreidimensionale Struktur des Proteins wurde bereits mehrfach elektronenmikroskopisch (Abb. 2.3, rechts; Grigorieff *et al.*, 1996; Henderson *et al.*, 1990) und röntgenkristallographisch beschrieben, zuletzt mit einer Auflösung von 1.55 Å (Essen *et al.*, 1998; Luecke *et al.*, 1998; Luecke *et al.*, 1999b). Die Chloridpumpe HR wird unter physiologischen Bedingungen in den Zellen nur zu etwa 10 % der BR-Menge produziert, was etwa 30000 Molekülen pro Zelle entspricht. Durch homologe Überexpression konnte der Gehalt jedoch auf etwa 50 – 60 % von BR in einem Wildtypstamm (S9) erhöht werden (Heymann *et al.*, 1993). Die Überproduktion führt dazu, dass auch HR zweidimensionale Kristalle in der Zellmembran bildet, wobei jedoch nur etwa 5 % der Gesamtmenge als kristalline Membranbereiche isoliert werden. In diesen Kristallen wird eine orthogonale Anordnung von HR-Tetrameren gefunden, die jedoch abwechselnd ins Zellinnere und –äußere orientiert sind, so dass die Hälfte der HR-Moleküle „physiologisch falsch“ in die Membran eingebaut sind. Diese 2D-Kristalle ermöglichten eine elektronenkristallographische Strukturbestimmung mit einer Auflösung von 7 bzw 5 Å (Havelka *et al.*, 1995; Kunji *et al.*, 2000). Bei dieser Auflösung sind die Strukturen von BR und HR in der Projektionsdarstellung sehr ähnlich (Abb. 2.3, unten). Diese Ähnlichkeit wurde durch die hochaufgelöste Struktur von HR bei 1.8 Å bestätigt, wobei nur die Lage der Helices A und B deutlich um 2.1 bzw. 1.3 Å verändert ist, während die mittlere Abweichung der Lage der Helices C-G etwa 0.7 Å beträgt (Kolbe *et al.*, 2000). Die wesentlichen Unterschiede in der Struktur finden sich in den Bereichen außerhalb der Membran und in der Bindungsstelle des Chloridions.

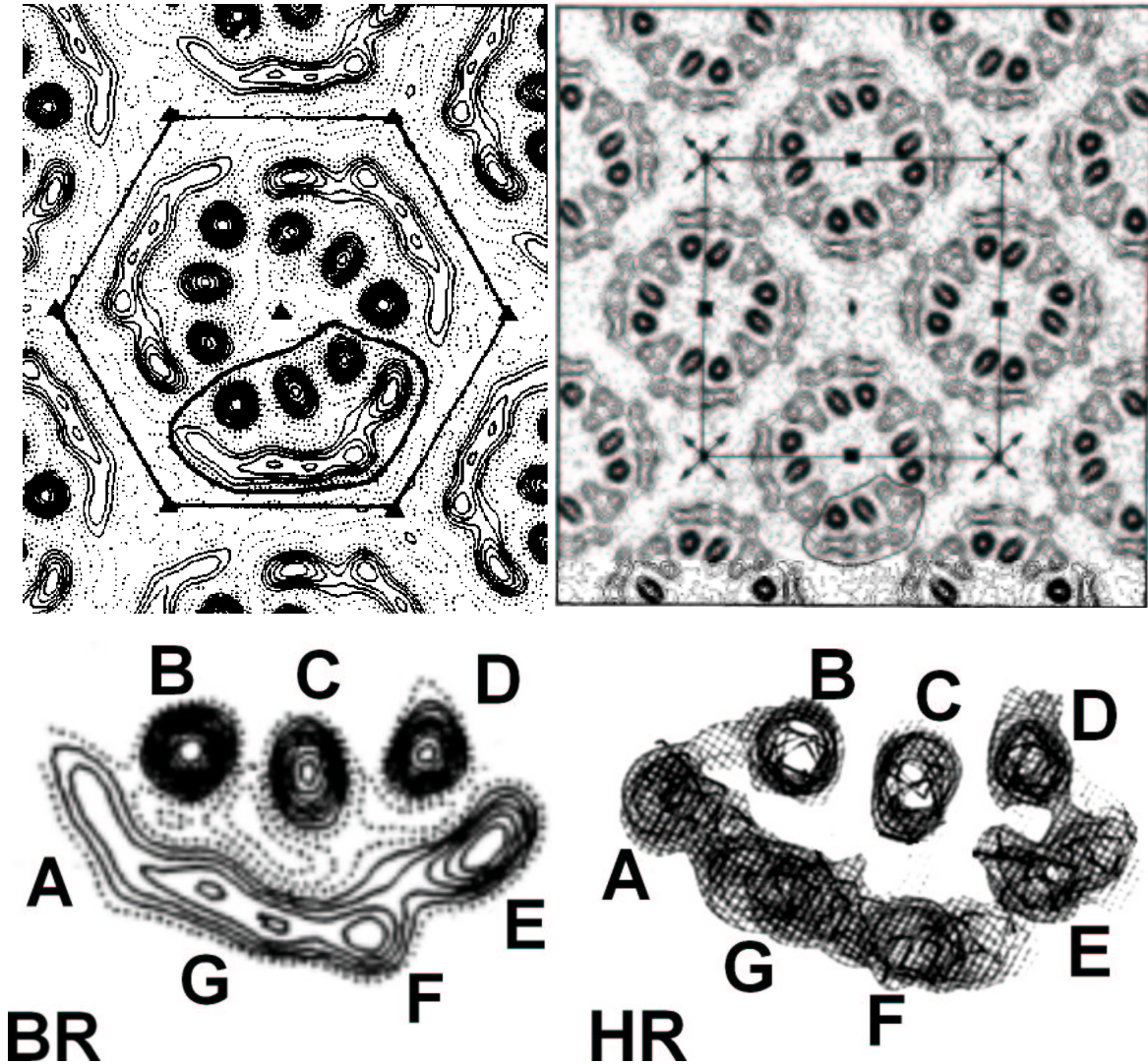


Abb. 2.3 oben: Projektionskarte der hexagonalen PM mit einem BR-Trimer im Sechseck (links) und der orthogonalen 2D-Kristalle von HR (BR aus Henderson und Unwin, 1975; HR aus Havelka *et al.*, 1993, Blick von der cytoplasmatischen Seite). Die HR-Kristalle zeigen eine antiparallele Orientierung benachbarter Tetramere; unten: Vergleich der Anordnung der Helices in Monomeren mit Blick von der cytoplasmatischen Seite bei niedriger Auflösung (HR aus Kunji *et al.*, 2000; BR aus Henderson und Unwin, 1975).

Beide 3D-Strukturmodelle sind in Abb. 2.4 dargestellt, wobei einige der Aminosäuren, die für die Funktion als Ionenpumpe wichtig sind, hervorgehoben sind. Besonders auffällig ist die Position des Chloridanions (Cl⁻), das bei optimaler Superposition beider Strukturen genau auf einem Sauerstoffatom des Carboxylatanions des Protonenakzeptors D85 in BR liegt. Im Ausgangszustand läßt diese strukturelle Übereinstimmung auf einen vergleichbaren elektrostatischen Einfluß des Chloridions auf die protonierte SB schließen. Zudem bestätigt das Strukturmodell von HR eindrucksvoll die funktionelle Vergleichbarkeit des Carboxylat- und Chloridanions, wie die bereits erwähnte Aktivität der BR-Mutante D85T als Chloridpumpe nahegelegt hatte.

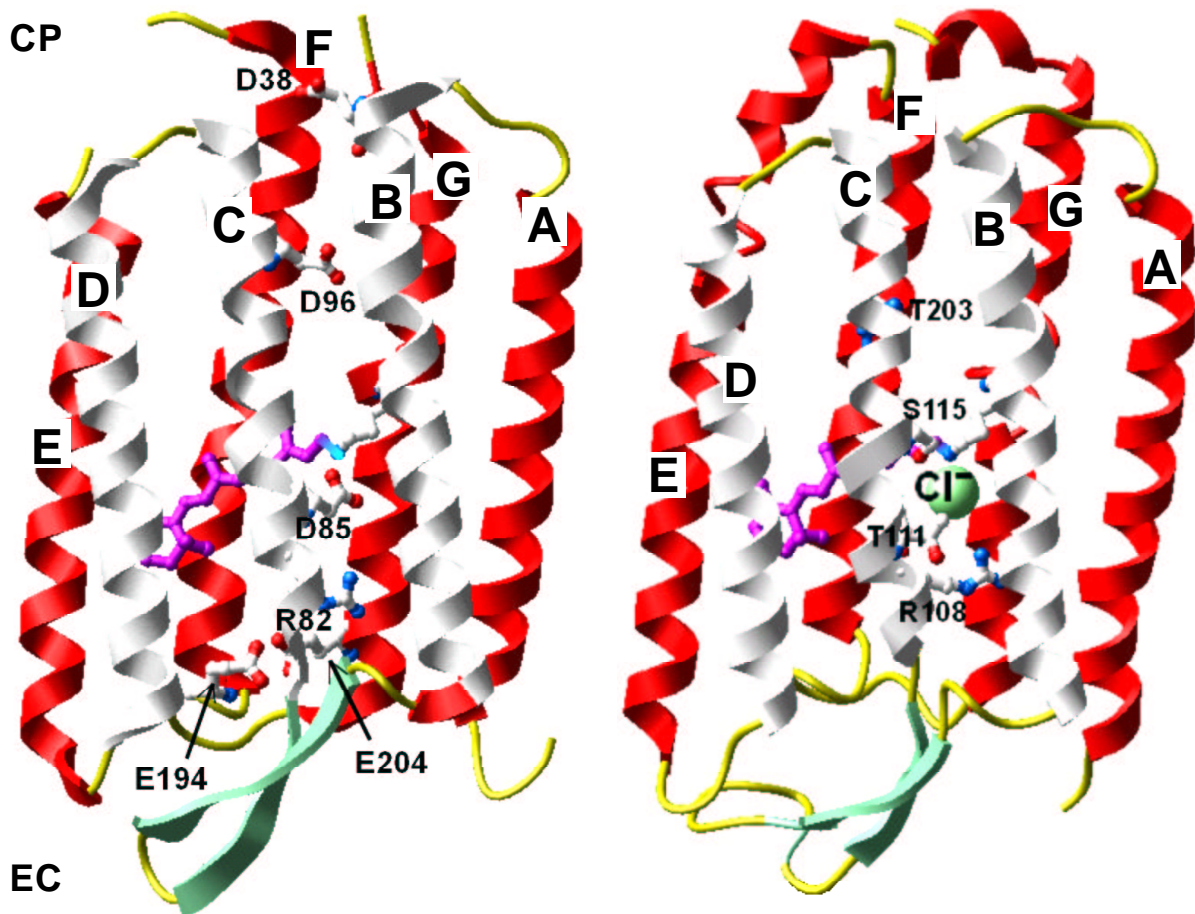


Abb. 2.4 3D-Modelle von BR (links, Luecke *et al.*, 1999b und HR (rechts, Kolbe *et al.*, 2000); wichtige Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt und beschriftet (Retinal an K216 bzw. K242 im Zentrum nicht beschriftet), das Chloridion in HR ist als Kugel dargestellt; CP: cytoplasmatisch, EC: extrazellulär.

2.3 Transportzyklen von Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin

Die Absorption von grünem Licht ($\lambda_{\max} = 569 \text{ nm}$) durch BR mit *all-trans*-Retinal führt in einer zyklischen Reaktionsfolge zum Transport eines Protons pro Lichtquant aus der Zelle. Dieser Zyklus ist nach etwa 10 ms abgeschlossen (Abb. 2.5, Haupts *et al.*, 1999; Lanyi, 1999). Dabei entsteht die thermisch angeregte Form J_{600} und nach etwa 3 ps das kurzlebige K_{590} -Intermediat ($\sim 1 \mu\text{s}$) mit *13-cis*-Retinal, das bei tiefen Temperaturen angereichert und charakterisiert werden konnte (Briman und Mathies, 1982; Bullough und Henderson, 1999; Doig *et al.*, 1991). Anschließend Konformationsänderungen führen über das L_{550} -Intermediat ($\sim 100 \mu\text{s}$) schließlich zur ersten langlebigen Zwischenstufe M, die eine Zerfallzeit im Millisekundenbereich aufweist und durch die Abgabe des Protons der SB an den Protonenakzeptor D85 ein blauverschobenes Absorptionsmaximum von 410 nm besitzt. Mit der Protonierung von D85 ist die Abgabe eines auf der extrazellulären (EC) Seite von BR gebundenen Protons verknüpft, an der unter anderem die Glutamatreste E194 und E204 beteiligt sind. Bevor die Retinylidengruppe reprotoniert wird, ändert sich die Zugänglichkeit des protonierbaren Stick-

stoffatoms von der EC zugunsten der cytoplasmatischen (CP) Hälfte, was zu einem vektorialen Transport führt. Das in Abb. 2.5 hochgestellte EC und CP bei beiden M-Intermediaten soll diese für die Vektorialität erforderlichen Zustände des M-Intermediats verdeutlichen. Nach der Zugänglichkeitsänderung entsteht durch Protonierung der SB von der CP-Seite durch D96 das N₅₆₀-Intermediat, in dem das Retinal noch in der 13-*cis*-Form vorliegt und D85 protoniert ist. Anschließend erhält D96 ein Proton von der CP-Seite. Nach thermischer Isomerisierung zu all-*trans*-Retinal entsteht das rotverschobene O₆₄₀-Intermediat, das durch die Deprotonierung von D85 im Millisekundenbereich wieder zum Ausgangszustand zerfällt. D85 gibt dabei das Proton an das Wasserstoffbrückennetzwerk ab, das bei dem ersten Protonentransfer von der protonierten SB auf D85 ein bereits vorhandenes Proton nach außen abgibt (Lecoutre *et al.*, 1995). Die Charakterisierung dieser Intermediate wurde durch Analyse von Wildtyp-BR (WT-BR) bzw. Mutanten unter geeigneten Bedingungen erleichtert, in denen der Zerfall bestimmter Intermediate verlangsamt ist und diese dadurch angereichert werden. Die Anreicherung einzelner Intermediate ist auch bei 3D-Kristallen durchführbar, so dass schließlich hochaufgelöste Strukturen einzelner Intermediate von WT-BR und Mutanten (Edman *et al.*, 1999; Luecke *et al.*, 2000; Luecke *et al.*, 1999a; Royant *et al.*, 2000; Sass *et al.*, 2000; Subramaniam und Henderson, 2000; Vonck, 2000) erhalten wurden. Jedoch wird die Aussagekraft einiger dieser Strukturmodelle als gering angesehen, insbesondere die der frühen Intermediate in WT-BR, weil die Anteile an K- und L-Intermediat in den untersuchten Kristallen nur bei 20 bzw. 35 % der Gesamtmenge von BR (Edman *et al.*, 1999; Royant *et al.*, 2000) lagen.

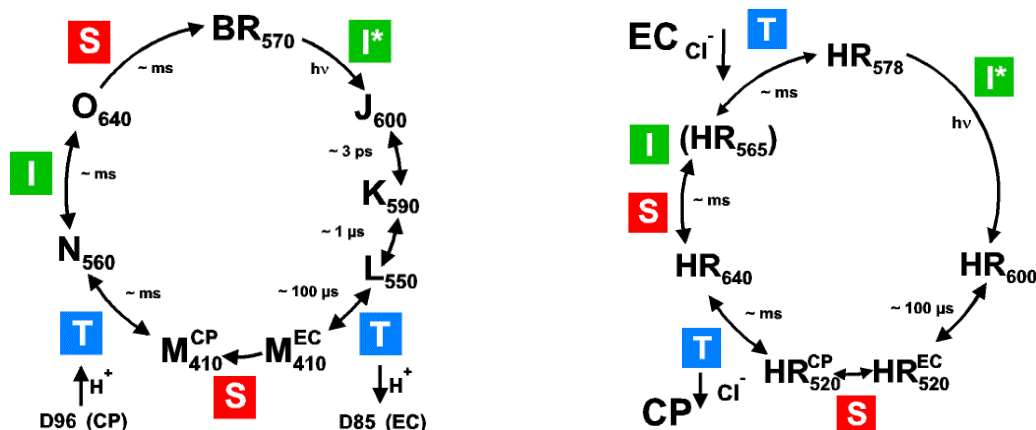


Abb. 2.5 Katalytische Zyklen von BR und HR. Ausgangszustand und Intermediate sind in Großbuchstaben dargestellt, die entsprechenden Absorptionsmaxima in nm als Indices. Die einzelnen Schritte des vektorialen Ionentransfers sind nach dem IST-Modell dargestellt (I*/I: lichtinduzierte/thermische Isomerisierung; T: Transfer; S: „Switch“; Haupts *et al.*, 1997).

Der Transportzyklus von HR wird ähnlich wie der von BR in etwa 10 ms durchlaufen, wobei die SB jedoch im Gegensatz zu BR während des ganzen Zyklus protoniert vorliegt

(Oesterhelt, 1995). Das erste, rotverschobene Intermediat HR₆₀₀ entspricht dem K₅₉₀ von BR mit 13-*cis*-Retinal. Im folgenden Intermediat HR₅₂₀ wird das Chloridion von seiner ursprünglichen Position im Ausgangszustand zur protonierten SB hin verschoben, wobei die genaue Position des Anions nicht bekannt ist. Die Lage des Chloridions muß jedoch zu einer stärkeren Lokalisierung der positiven Ladung an der protonierten SB führen, was die Blauverschiebung von λ_{\max} von 578 nach 520 nm erklärt. In diesem Zustand ändert sich analog zum M₄₁₀ in BR durch eine in beiden Fällen noch unbekannte Veränderung im Protein die Zugänglichkeit von der EC- zur CP-Seite, so dass anschließend das Chloridion in das Cytoplasma abgegeben werden kann. Dabei entsteht ein stark rotverschobenes Intermediat HR₆₄₀, das nur für Millisekunden stabil ist. Nach thermischer Isomerisierung zu all-*trans*-Retinal und erneuter Zugänglichkeitsänderung zur EC-Seite wird ein Chloridion von dieser Seite in die Bindungsstelle aufgenommen und der Ausgangszustand mit protonierter SB und chloridbesetztem aktiven Zentrum erreicht. Der Transportzyklus in HR ist noch nicht so genau erforscht, wie es für BR der Fall ist, jedoch bietet das Chloridion die Möglichkeit, in künftigen Intermediatstrukturen die Änderung der Position des Anions während des Zyklus mit röntgen- oder elektronenkristallographischen Methoden besser beobachten zu können, als es in BR aufgrund der fehlenden Elektronendichte eines Protons je möglich sein wird.

2.4 Zusammensetzung der Purpurmembran

Wie erwähnt, bildet BR in der Zellmembran spontan die zweidimensional kristallinen Bereiche der Purpurmembran (PM), in denen BR etwa 75 % der Gesamtmasse ausmacht und die restlichen 25 % aus archaealen Lipiden mit definierter Zusammensetzung bestehen (Abb. 2.6). Der hohe Proteinanteil der PM führt zu einer signifikant höheren Schwimmdichte der PM mit 1.18 g·cm⁻³ verglichen mit den übrigen Membranfraktionen. Dies erlaubt eine einfache Aufreinigung der PM und damit von BR, da die PM in einem Schritt durch Ultrazentrifugation der Gesamtmembranfraktion in einem Saccharosegradienten von allen anderen Membranproteinen abgetrennt und so in reiner Form isoliert werden kann (Oesterhelt und Stoeckenius, 1974).

Aus biochemischen und elektronenkristallographischen Untersuchungen wurde ein Verhältnis von 10 Lipidmolekülen pro BR-Molekül in der PM abgeleitet, wobei etwa 6 - 7 Phospholipide, 2 - 3 Glykolipide und ein Squalenmolekül pro BR gefunden (Grigorieff *et al.*, 1995; Kates *et al.*, 1982).

Die polaren Lipide in *H. salinarum* besitzen ausnahmslos Archaeol (*sn*-2,3-Diphythanylglycerol) als Grundkörper und unterscheiden sich somit von den bakteriellen

Fettsäureglycerinestern. Den Hauptteil der Phospholipide macht mit etwa 60 - 70 % Phosphatidylglycerolphosphatmethylester (PGP-Me) aus, während Phosphatidylglycerolsulfat (PGS) und Phosphatidylglycerol (PG) den Rest bilden. Das Verhältnis dieser Lipidspezies zueinander ist vermutlich nicht konstant, da durch Hydrolyse von PGP-Me und PGS während der Isolierung PGP bzw. PG entstehen kann. Deswegen konnte PGP-Me in früheren Untersuchungen nicht als Hauptbestandteil der Lipide identifiziert werden (Kloppel und Fredrickson, 1991).

Hauptglykolipid in der PM ist das S-TGA1 (Sulfatisiertes Triglycosylarchaol 1) (Abb. 2.6). Über die Zusammensetzung der PM-Lipide wurden in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht. Frühe Untersuchungen zeigten deutliche Unterschiede zwischen der PM und Gesamtmembran (Kushwaha *et al.*, 1975), wobei die sulfatisierten Lipide S-TGA1 und PGS ausschließlich in der PM gefunden wurden. Andere Ergebnisse ließen dagegen darauf schließen, dass der S-TGA1-Anteil konstant sei und nur die Zusammensetzung der Phospholipide in der PM und Gesamtmembran variierte (Vaver, 1978). Neuere Daten von Kates *et al.* (1982) zeigten nur noch geringe Unterschiede im PGP und S-TGA1-Gehalt (58 gegenüber 49 Mol% und 21 gegenüber 28 Mol%) von Gesamtmembran bzw. PM. Weik *et al.* (1998) konnten massenspektrometrisch einen deutlich geringeren S-TGA1-Anteil außerhalb der PM nachweisen, allerdings war eine genaue Quantifizierung mit dieser Methode nicht möglich.

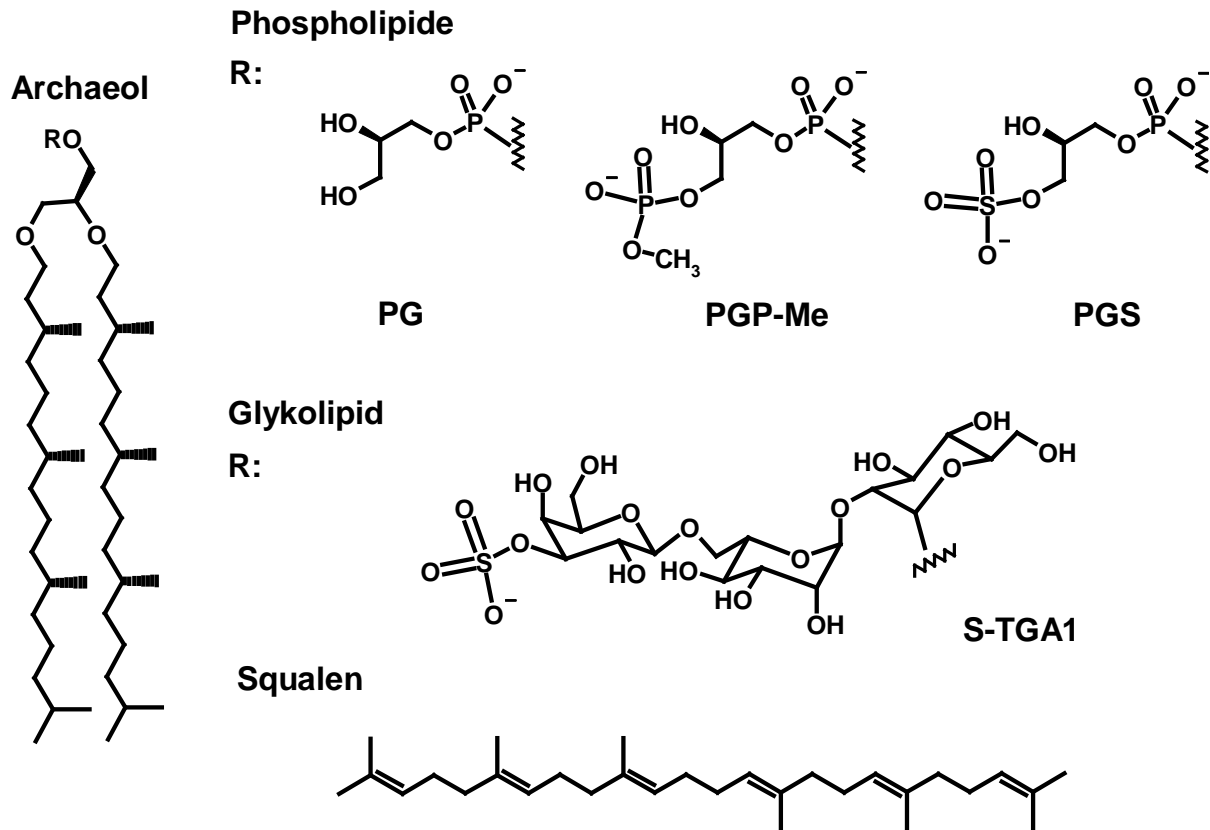


Abb. 2.6 Lipide der Purpurmembran. Alle polaren Lipide haben Archaeol (*sn*-2,3-diphythanylglycerol) als Anker; PGP-Me (Phosphatidylglycerolphosphatmethylester), PGS (Phosphatidylglycerolsulfat), PG (Phosphatidylglycerol). Neben dem Glykolipid S-TGA1 (β -Galactopyranosyl-3-sulfat-1,6- α -mannopyranosyl-1,2-glucopyranosylarchaeol) wurde auch ein Glykolipid mit vier Zuckerresten gefunden, das jedoch nur in Spuren vorhanden ist. Den Hauptteil der apolaren Lipide macht Squalen aus.

2.5 Struktur der Purpurmembran

Die definierte Lipidzusammensetzung in der PM ermöglichte genauere Untersuchungen zur Anordnung und Verteilung der Lipide in der PM. Mittels Markierung mit spezifischen Antikörpern gegen die Kopfgruppe des Glykolipids S-TGA1 konnte gezeigt werden, dass dieses Lipid ausschließlich auf der extrazellulären Hälfte der PM vorkommt (Henderson *et al.*, 1978). Eine elektronenkristallographische Untersuchung von PM, aus der zuvor mit dem Detergenz Deoxycholat ein Teil der Lipide extrahiert worden war, zeigte lokalisierte Elektrodichten bzw. „Löcher“ an definierten Positionen, die vorhandenen bzw. fehlenden Lipiden zugeordnet wurde, so dass die Anzahl der Lipidmoleküle pro BR abgeschätzt werden konnte (Grigorieff *et al.*, 1995). Eine weitere Verfeinerung des Strukturmodells der PM mit einer Auflösung von 3.5 Å in der Membranebene wurde ebenfalls aufgrund elektronenkristallographischer Daten erzielt (Grigorieff *et al.*, 1996). Die Lipidmoleküle wiesen in diesem Modell

höhere Temperaturfaktoren auf als die Proteinmoleküle, wobei die Ordnung der Moleküle auf der extrazellulären Hälfte signifikant höher war als auf der cytoplasmatischen Seite, obwohl den Lipidmolekülen auf der EC-Seite eine größere Fläche zur Verfügung stand.

Spätere elektronen- (Mitsuoka *et al.*, 1999) und röntgenkristallographische Untersuchungen (Belrhali *et al.*, 1999; Essen *et al.*, 1998; Luecke *et al.*, 1998; Luecke *et al.*, 1999b) von PM bzw. 3D-Kristallen von BR bestätigten die hohe Affinität der PM-Lipide zu BR, da in allen Strukturen zahlreiche Phythanylreste in ähnlichen Positionen gefunden werden. In einer Neutronendiffraktionsstudie von Weik *et al.* (1998) wurde, nach spezifischer Markierung der Lipidkopfgruppen mit deuterierter Glukose, das Lipid S-TGA1 an definierten Positionen in der PM lokalisiert. Dabei wurde eine deutliche Differenzdichte im Innern eines Trimers und zwischen den Trimeren detektiert (Abb. 2.7), die auf zwei Moleküle S-TGA1 pro BR-Molekül in diesen Positionen schließen ließ. In 3D-Kristallen konnten Kopfgruppen für die Lipide nur in dem Strukturmodell von Essen *et al.* (1998) identifiziert werden. Diese Kristalle waren im Unterschied zu den anderen 3D-Kristallen nicht in kubischen Lipidphasen nach Landau und Rosenbusch (1996), sondern durch epitaktisches Wachstum auf Benzamidinkristallen nach Schertler *et al.* (1993) gezüchtet worden. Im abgeleiteten Strukturmodell konnte das Ergebnis von Weik *et al.* (1998) für die Lipidmoleküle im Innern eines BR-Trimers als S-TGA1 bestätigt werden. Das zweite Glykolipidmolekül außerhalb des Trimers konnte in diesen Kristallen nicht identifiziert werden.

Da das Glykolipid nur auf der äußeren Hälfte der PM gefunden wurde und seine Position so gut definiert war, wurden spezifische Wechselwirkungen mit Seitenketten von BR und eine wichtige Rolle des Lipids für die geordnete Aggregation von BR vermutet. Weik *et al.* (1998) nahmen an, dass die Zuckerreste über hydrophobe Wechselwirkungen mit aromatischen Resten im Grenzbereich zwischen Membran und der wäßrigen Phase interagieren und so die Bildung der kristallinen PM vermitteln. Dieser Befund war die Grundlage für diese Arbeit, deren Zielsetzung im folgenden genauer dargelegt wird.

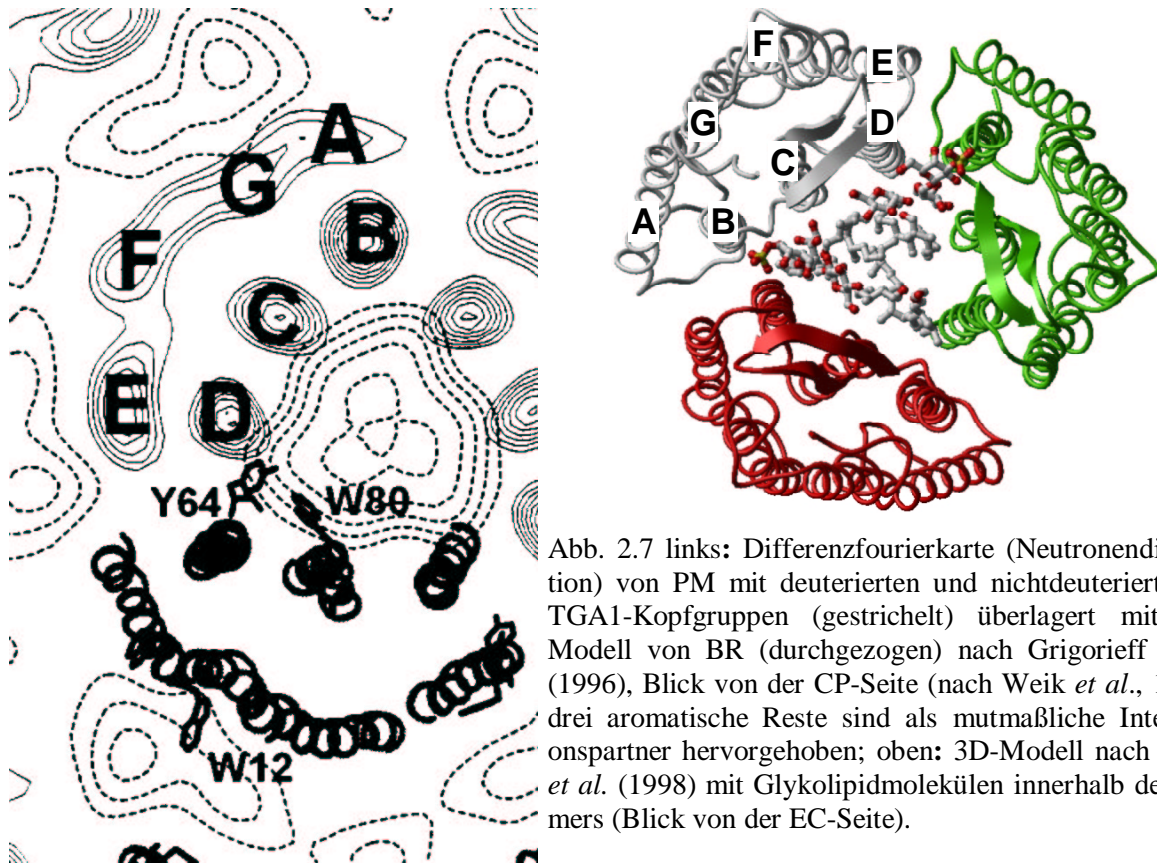


Abb. 2.7 links: Differenzfourierkarte (Neutronendiffraktion) von PM mit deuterierten und nichtdeuterierten S-TGA1-Kopfgruppen (gestrichelt) überlagert mit 3D-Modell von BR (durchgezogen) nach Grigorieff *et al.* (1996), Blick von der CP-Seite (nach Weik *et al.*, 1998); drei aromatische Reste sind als mutmaßliche Interaktionspartner hervorgehoben; oben: 3D-Modell nach Essen *et al.* (1998) mit Glykolipidmolekülen innerhalb des Trimers (Blick von der EC-Seite).

Aromatische Reste treten statistisch häufiger in Membranproteinen auf und werden in allen bisherigen 3D-Strukturen von Membranproteinen gehäuft an der Membrangrenze gefunden, wo sie offensichtlich eine wichtige Rolle für die Insertion und Verankerung der Proteine in der Membran spielen (Schiffer *et al.*, 1992, Killian und von Heijne, 2000). Das Strukturmodell von Essen *et al.* (1998) zeigte jedoch, dass keine direkten Wechselwirkungen zwischen dem Tryptophanrest W80 in Helix C und der Kopfgruppe des Glykolipids im Trimer bestehen. Für das zweite Glykolipidmolekül an einem BR-Monomer, das nach Weik *et al.* mit W12 in Helix A außerhalb des Trimers interagieren könnte, konnte zumindest für die Kopfgruppe in keiner der bisher veröffentlichten Strukturen ausreichende Elektronendichte gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass dieses Glykolipid weniger gut geordnet und somit etwas schwächer gebunden ist. Die hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipide konnten in keinem der Strukturmodelle identifiziert werden, was auf eine geringere Ordnung, verglichen mit den Glykolipiden im Trimer, schließen läßt.

2.6 Einfluß von Retinal auf die Bildung der Purpurmembran

Die Bildung der stabilen PM-Kristallstruktur in der Zellmembran hängt unter anderem von der Synthese von BR ab. In Zellen, deren Retinalbiosynthese durch Zugabe von Nicotin ins Medium unterdrückt wird, wird überwiegend das Apoprotein Bacterioopsin (BO) neben Spuren von BR in der sogenannten Braunen Membran (BM) gefunden (Sumper *et al.*, 1976). Dabei unterdrückt das Nicotin die Bildung von β -Carotin aus Lycopin, was an der starken Zunahme der Lycopinmenge in der Membran deutlich wird. Die Retinalbiosynthese wird durch das Apoprotein BO stimuliert (Sumper und Herrmann, 1976), indem membrangebundenes BO die Zyklisierung von Lycopin zu β -Carotin induziert, dessen oxidative Spaltung zu Retinal führt (Deshpande und Sonar, 1999). Die Reaktion von Lycopin zu β -Carotin wird dagegen von BR, jedoch nicht von hinzugefügtem Retinal unterdrückt (Deshpande und Sonar, 1999). Somit wird in den Zellen eine stringente Kopplung der Retinal- und Bacterioopsinsynthese gewährleistet, die zu einem nahezu äquimolaren Verhältnis zwischen Retinal und BO führt.

In einem Saccharosegradienten liegt die BM oberhalb der PM und besitzt eine geringere Schwimmdichte von $1.14 - 1.16 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Somit ist die Abtrennung der restlichen Membranproteine von BO mit dieser Methode nicht mehr möglich, da keine isolierten Membranstücke mit BO als einzigem Protein vorliegen. Das BO in nicotinbehandelten Zellen liegt überwiegend in nicht-kristalliner Form vor (Sumper, 1982). Durch Zugabe von Retinal wird BR gebildet, wobei sowohl in ganzen Zellen als auch in isolierten Membranen spontan wieder kristalline Bereiche entstehen. Der Prozeß der Kristallisation von BR in rekonstituierter BM ist jedoch unvollständig und führt zu kleineren Kristallen als *in vivo* kristallisierte PM (Hwang *et al.*, 1981). Demnach benötigt das Apoprotein BO den Chromophor, um eine für die Kristallisation optimale Tertiärstruktur einzunehmen (Hiraki *et al.*, 1978). Die spontane Entstehung der kristallinen Bereiche in rekonstituierter BM schien der von (1976) beobachteten Energieabhängigkeit der PM-Bildung *in vivo* zu widersprechen. Jedoch wurde von Sumper *et al.* lediglich das Auftreten einer PM-Fraktion nach der Rekonstitution von nicotinbehandelten Zellen mit Retinal im Saccharosegradienten als Folge eines energieabhängigen Prozesses beschrieben. Die spontane Kristallisation von BR nach Retinalzugabe zu isolierter BM führt jedoch zu kleinen kristallinen Bereichen in den Membranfragmenten mit geringerer Dichte, so dass diese nicht die Dichte der PM-Bande erreichen können. Die Bildung großer PM-Kristalle erfordert demnach die Synthese von neuem BO, was die beobachtete Energieabhängigkeit erklärt (Sumper, 1982).

Das Absorptionsmaximum von BR in rekonstituierter BM ist nach 560 nm blauverschoben (Sumper *et al.*, 1976). Bei niedrigen pH-Werten entsteht eine blaue Form der PM mit einem λ_{\max} von 603 nm (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971; Fischer und Oesterhelt, 1979), was auf die Protonierung von D85 zurückzuführen ist. Durch Protonierung des Carboxylatanions von D85 ist die positive Ladung der Schiffsbasis stärker delokalisiert, was zur beobachteten Rotverschiebung führt. Der pK-Wert für den Übergang zur blauen Form liegt in der PM bei 3.2 (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971). In der BM ist der pK-Wert jedoch deutlich nach 5.8 verschoben (Hiraki *et al.*, 1984). Das läßt auf signifikante Unterschiede in der unmittelbaren Umgebung des BR in diesen Membranen schließen, die die elektrostatischen Wechselwirkungen im Protein beeinflussen. Eine dünnschichtchromatographische Analyse zeigte keine Unterschiede in der Lipidzusammensetzung zwischen PM und BM (Hwang *et al.*, 1981). Um den Einfluß der Ionenkonzentration zu untersuchen, wurde die Rotverschiebung in BM bei 1 M NaCl titriert. Die Erhöhung der Salzkonzentration hatte eine Verschiebung des pK-Werts von 3.4 zur Folge und ist wieder dem pK-Wert von PM ähnlich. Der Effekt der Ionenkonzentration auf den pK-Wert spricht für einen direkten Einfluß der Ladungsverteilung an der Membranoberfläche. Da in der PM und BM die BR-Moleküle identisch sind, läßt dies auf eine Änderung der Lipid-Protein-Wechselwirkungen schließen. Im folgenden wird der Einfluß der Lipide auf die Stabilität und Funktion von BR in der PM erläutert.

2.7 Funktion der Lipide in der Purpurmembran

2.7.1 Einfluss auf die Kristallisation *in vivo*

BR besitzt in der PM eine ungewöhnlich hohe Stabilität bei hohen Temperaturen. Bei etwa 80 °C wird ein reversibler Phasenübergang beobachtet, der mit einer Abnahme der Ordnung verbunden ist und als Aufschmelzen des 2D-Kristalls interpretiert wurde (Fischer und Oesterhelt, 1979; Hiraki *et al.*, 1981). Erst ab etwa 100 °C tritt eine irreversible Denaturierung der PM auf. In trockenem Zustand ist die PM jedoch noch stabiler und denaturiert erst bei etwa 140 °C (Shen *et al.*, 1993). Diese einzigartige Stabilität spricht für eine Optimierung der Zusammensetzung der PM, in der die Anwesenheit der PM-Lipide eine wichtige Rolle für die Eigenschaften von BR spielt.

Der Einfluß von Lipiden auf die Kristallisation von BR wurde in zahlreichen *in vitro*-Experimenten mit solubilisiertem BR in Proteoliposomen aus verschiedenen Esterlipiden wie Lecithin, Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) oder Gemischen aus kurzkettigen und langkettigen Diglyceriden (C₁₂/C₁₆) untersucht. Dabei wurde die Abhängigkeit vom Lipid-

Protein-Verhältnis (Gulik-Krzywicki *et al.*, 1987), von den verschiedenen PM-Lipiden, der Salzkonzentration (Sternberg *et al.*, 1992; Sternberg *et al.*, 1993) und der Temperatur ermittelt (Dumas *et al.*, 1997).

Alle diese Untersuchungen hatten den Nachteil, dass BR aus seiner natürlichen Umgebung entfernt und in artifizielle Membranen eingebaut wurde, in der die verwendeten Lipide nicht halophilen Ursprungs waren und deutlich unterschiedliche Eigenschaften besaßen. Somit lagen nicht die Verhältnisse vor, wie sie in der Zellmembran von Halobakterien existieren. Beispielsweise fanden Sternberg *et al.* (1993) bei Versuchen mit solubilisiertem BR, das in DMPC-Vesikel eingebaut wurde, die PM-Lipide enthielten, hexagonal kristalline Bereiche auf der Oberfläche der Vesikel. Bei diesen wick die Gitterkonstante mit 9.2 nm jedoch deutlich von den 6.3 nm der PM ab. Solubilisiertes BR bildete dagegen ohne fremde Lipide mit extrahierten PM-Lipiden 2D-Kristalle mit etwa der gleichen Gitterkonstante wie PM. Daraus wurde eine Abhängigkeit der Bildung dieser kristallinen Bereiche von Phospholipiden und hohen Salzkonzentrationen abgeleitet, die ohne Berücksichtigung des artifiziellen Systems auf die natürliche PM-Bildung übertragen wurde. Die Ergebnisse von Sternberg *et al.* (1993) führen vielmehr zu dem Schluß, dass der Mechanismus der natürlichen Kristallisation von BR nicht auf diese Weise untersucht werden kann, sondern lediglich BR unter verschiedenen Bedingungen von der PM abweichende Kristallformen ausbilden kann. Dies war beispielsweise durch die Bildung einer orthogonalen Kristallform nach längerer Inkubation mit kationischen Detergenzien (Michel *et al.*, 1980) bzw. der Anordnung der Trimere in der monoklinen Kristallform von Essen *et al.* (1998) gezeigt worden. Im Gegensatz zu den anderen 3D-Kristallen waren die Trimere bei Essen *et al.* (1998) nicht PM-artig angeordnet.

Die folgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus dem Strukturmodell nach Essen *et al.* (1998) und soll die umfangreichen Wechselwirkungen der BR-Moleküle mit dem zentralen Lipidmolekül S-TGA1 verdeutlichen. Die Aminosäuren (Y64, L66, T67, W80, G113, G116, G120 und K129), die mit dem Lipid interagieren, sind als Stäbchen hervorgehoben.

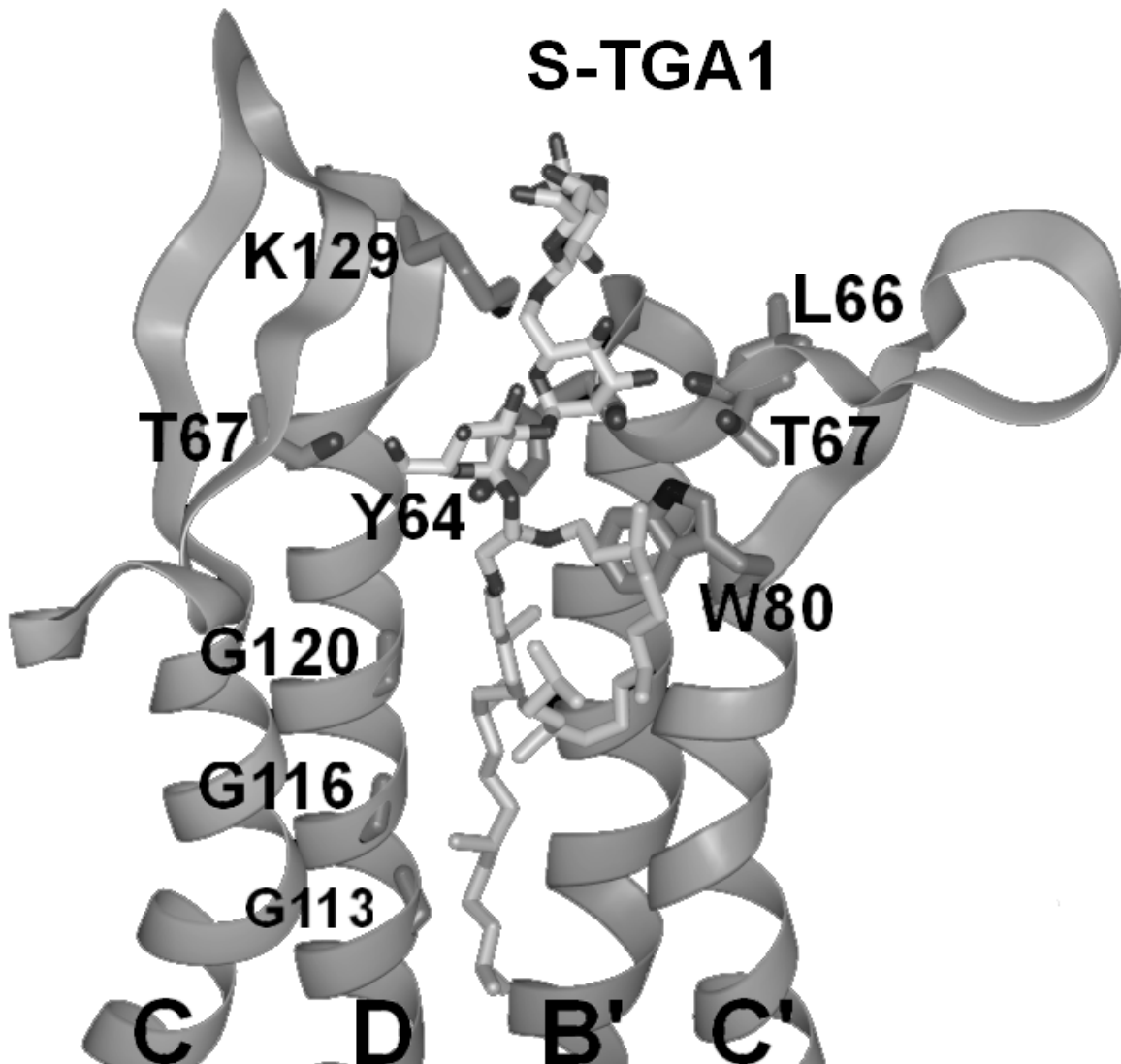


Abb. 2.8 Ausschnitt aus dem BR-Strukturmodell nach Essen *et al.* (1998) mit Helices C und D bzw. B' und C' vom benachbarten Monomeren eines Trimers; Das Glykolipid S-TGA1 besitzt van-der-Waals-Kontakte zu hydrophoben Gruppen (W80, G113, G116, G120) und H-Brücken zu OH-Gruppen (T67, Y64, evtl. K129) bzw. einem Carbonsauerstoff (L66).

Der direkte Einfluß einer Seitenkette auf die Kristallisation von BR wurde durch Krebs *et al.* (1997) durch homologe Expression einer Mutante G116L nachgewiesen. Diese Aminosäure kann nur mit einem Lipidmolekül zwischen den Helices B und D von zwei benachbarten Monomeren auf der CP-Seite wechselwirken. Aufgrund der größeren Seitenkette war die Wechselwirkung zwischen Lipid und Protein so eingeschränkt, dass von dieser Mutante nur noch etwa 50 % der BR-Menge in Form von PM isoliert werden konnte. Andere Mutationen, die von diesen Autoren untersucht wurden, betrafen Helix-Helix-Interaktionen zwischen Monomeren (G113L, G116L, I117A, I117F). Dabei wurde eine Abnahme des PM-Anteils bis auf etwa 20 % der Gesamtmenge von BR beobachtet. Weitere Reste, die spezifisch mit Lipidmolekülen wechselwirken und die PM-Bildung beeinflussen, waren nicht bekannt.

2.7.2 Einfluß auf den Photozyklus und Pumpaktivität von BR

Für die Funktion von BR als Protonenpumpe ist eine kristalline Anordnung nicht notwendig, da gezeigt werden konnte, dass auch in Triton X-100 solubilisiertes BR in der Lage ist, Protonen zu pumpen (Dencher und Heyn, 1979). Solubilisiertes BR besitzt ein deutlich blauverschobenes Absorptionsmaximum (λ_{\max}) von 552 nm gegenüber 568 nm in der PM im lichtadaptierten (la) Zustand auf, was auf Veränderungen im Bereich des Chromophors hinweist. Die Lipide in der PM beeinflussen nicht nur die Bildung und Stabilität des zweidimensionalen Gitters, sondern auch die spektroskopischen Eigenschaften von BR. Diese Blauverschiebung von λ_{\max} um 16 nm nach 552 nm (la) ist nicht nur auf eine Änderung des Retinalisomerenverhältnisses zurückzuführen. Solubilisiertes und dunkeladaptiertes BR enthält zwar mit 71 % mehr 13-*cis*-Retinal als BR in der PM (Scherrer *et al.*, 1989), besitzt jedoch mit 546 nm (Dencher und Heyn, 1978) trotz des all-*trans*-Anteils von knapp 30 % ein kleineres λ_{\max} als die für BR mit 100 % 13-*cis*-Retinal berechneten 548 nm (Sperling *et al.*, 1977).

Beim Vergleich der Photozyklen von solubiliertem und membrangebundenem BR wurden deutliche Unterschiede in den Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung und den Zerfall der Intermediate festgestellt, die auf die dichte Packung des Proteins in der PM zurückgeführt wurden (Váro und Lanyi, 1991). Nach Behandlung von PM mit milden Detergenzien wie Tween 20 (Fukuda *et al.*, 1990) bzw. niedrigen Konzentrationen (0.1 %) von Triton X-100 (Dracheva *et al.*, 1996), bei der die PM-Struktur erhalten blieb, wurden Änderungen des Photozyklus beobachtet. Nach Zugabe von extrahierten PM-Lipiden wurde wieder ein Photozyklus wie im nativen Zustand erhalten (Dracheva *et al.*, 1996). Barnett *et al.*, (1996) wiesen insbesondere Squalen und den Glykolipiden, die bei beiden Untersuchungen von Fukuda *et al.* und Dracheva *et al.* zu etwa 50 – 60 % durch die Detergenzbehandlung extrahiert werden konnten, eine herausragende Bedeutung für die Regeneration des Photozyklus zu.

Die Bedeutung der verschiedenen PM-Lipide für eine hohe Pumpaktivität wurde von Hoejberg *et al.* (1982) untersucht. Dafür wurden aus solubiliertem BR und definierten Gemischen von Lipiden Lipidvesikel hergestellt, in denen die Pumpaktivität von BR gemessen wurde. Bei Zugabe von reinem PGP wurden keine Vesikel gebildet, und das Protein aggregierte, während eine Mischung von PGP und Glykolipid zur Bildung von Vesikeln führte. PGS konnte das sulfatisierte Glykolipid nicht ersetzen, ebenso wurde allein mit sulfatisierten Lipiden ohne PGP keine hohe Pumpaktivität beobachtet. Diese Experimente zeigten, dass die höchste Pumpaktivität bei einem Verhältnis der Lipide erreicht wurde, das etwa dem in der PM entsprach.

2.8 Wechselwirkung von Halorhodopsin mit Lipiden

In allen hochaufgelösten Strukturmodellen von BR wurden, wie oben erwähnt, archaeale Lipide identifiziert, was für ihre hohe Affinität zu BR spricht. Dagegen wurden in den 3D-Kristallen von HR keine halobakteriellen Lipide lokalisiert (Kolbe *et al.*, 2000). Die Anordnung von HR in Form von Trimeren in einem hexagonalen Gitter unterscheidet sich deutlich von der orthogonalen Kristallform mit HR-Tetrameren, die aus dem Überexpressionsstamm D2 isoliert wurde (Havelka *et al.*, 1993). Zwischen den HR-Trimeren liegen Bereiche mit hexagonal kristallinen Monooleinmolekülen (MO), die als kubische Lipidmatrix für die Kristallisation dienen. Obwohl in allen Stufen während der Präparation des Proteins halobakterielle Lipide massenspektrometrisch nachgewiesen wurden (Kolbe, pers. Mitteilung), konnte keine entsprechende Elektronendichte beobachtet werden. Dies spricht für eine deutlich niedrigere Affinität der endogenen Lipide von *H. salinarum* zu HR als es bei BR der Fall ist. In BR-Kristallen aus der kubischen Phase wurden dagegen keine geordneten MO-Moleküle, jedoch zahlreiche endogene Lipide gefunden. Zu der Rolle von Lipiden für die Funktion von HR gab es bis zur Strukturbestimmung nur wenige Untersuchungen. Bei solubilisiertem und gereinigtem HR wurde eine Assoziation mit der Fettsäure Palmitat und Abhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften des Proteins von der Anwesenheit dieser Fettsäure festgestellt (Colella *et al.*, 1998; Corcelli *et al.*, 1996). Überraschenderweise wurde in der Kristallstruktur von HR im Trimerzentrum Elektronendichte beobachtet, die als Palmitat interpretiert wurde. Das Molekül liegt unterhalb der Membranoberfläche in der Nähe des aktiven Zentrums in einer Mulde, die von hydrophoben Seitenketten (L110, A113, L114, P117, M118, L121, I138 und I142) gebildet wird (Abb. 2.9), und zeigt mit der hydrophilen Carboxylgruppe in Richtung der EC-Seite. Mit den O-Atomen der Carboxylgruppe bildete es H-Brücken zu den Hydroxylgruppen von S75 und T111. Damit liegt es weniger als 7 Å vom Chloridion weg und läßt einen möglichen Einfluß auf die Funktion von HR vermuten, wie es die Ergebnisse von Colella *et al.* (1998) bereits vor der Strukturaufklärung angedeutet hatten. In Markierungsexperimenten mit ³H-Palmitat konnten sie eine Koelution von Palmitat bei der Aufreinigung von HR beobachten. Um festzustellen, ob die Palmitinsäure aus dem Medium aufgenommen oder von den Zellen synthetisiert wird, wurde das Protein aus Zellen isoliert, die in synthetischem Medium inkubiert worden waren. Dies war umstritten, da keine Fettsäuresynthasegene im Genom von *H. salinarum* gefunden werden konnten, jedoch Kates *et al.* (1982) eine β -Ketoreductaseaktivität in halophilen Archaea beobachtet hatten, die sie einer Fettsäuresynthase zuordneten. Die Experimente von Colella *et al.* (1998), in denen mittels GC/MS Spuren von Palmitat in Zellen nach Inkubation in synthetischem Medium nachgewie-

sen wurden, lassen ebenfalls auf eine *in vivo*-Synthese von Palmitinsäure schließen. Jedoch ist der Befund von Kates *et al.* (1982) nur ein schwaches Indiz für die Biosynthese von Fettsäuren in *H. salinarum*. Zudem ist das Ergebnis von Colella *et al.* (1998) als Beweis für Palmitat-synthese durch Zellen in synthetischem Medium unzureichend. In früheren Experimenten wurde ebenfalls das Vorkommen von Fettsäuren in Zellen aus synthetischem Medium untersucht, wobei jedoch festgestellt wurde, dass bereits im Medium Fettsäuren nachweisbar waren (Oesterhelt, pers. Mitteilung). Somit kann auch die Anwesenheit von Fettsäuren in den Versuchsansätzen von Colella *et al.* (1998) bereits vor der Inkubation der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Daher könnten die Fettsäuren, die in halophilen Archaea nachgewiesen wurden und fast ausschließlich für die Acylierung von Membranproteinen eine Rolle spielen (Pugh und Kates 1994), in natürlichen Habitaten der Zellen aus dem Medium aufgenommen werden. In diesem Fall wäre die spezifische Assoziation des Palmitats an HR und ein Einfluß der Fettsäure auf die Aktivität der Chloridpumpe ein Hinweis darauf, dass diese Fettsäure eine Art Vitamin für *H. salinarum* darstellt.

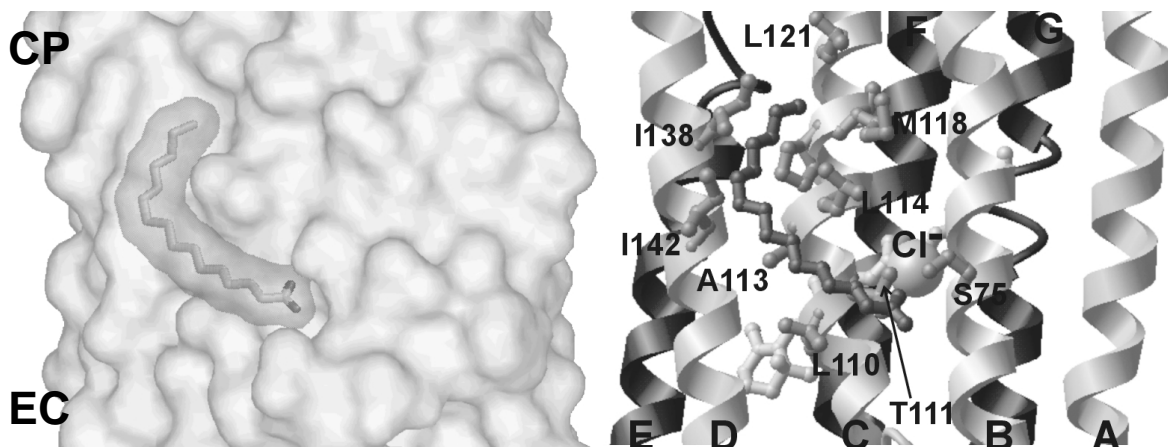


Abb. 2.9 Assoziation von Palmitinsäure mit HR; links: Oberflächendarstellung von HR und Palmitat (Stäbchenmodell mit transparenter van-der-Waals-Oberfläche); rechts: Bänderdarstellung desselben Ausschnitts von HR mit Helices A-G; als Kugel-Stäbchen-Modelle hervorgehobene Reste (P117 der Übersichtlichkeit wegen nicht beschriftet) bilden eine hydrophobe Mulde für Palmitat (dunkelgrau), dessen Kopfgruppe mit S75 und T111 H-Brücken bildet und in der Nähe des Chloridions (Kugel) liegt.

2.9 Einführung von Deletionen durch homologe Rekombination

Die meisten Informationen zur Funktion von BR und HR wurden durch homologe Expression der mutierten Gene und anschließender Charakterisierung der Mutanten erhalten. Dazu wurden zunächst Stämme isoliert, die durch Inaktivierung eines bestimmten Gens das kodierte Protein nicht mehr produzierten. In der Regel waren die Gene zwar vorhanden, jedoch war durch Punktmutationen oder Einbau von Insertionselementen im kodierenden Bereich eine Expression nicht mehr möglich. Dadurch bestand aber bei der Einführung mutierter Gene die

Möglichkeit, dass durch homologe Rekombination des mutierten Gens mit Fragmenten des noch vorhandenen Wildtypgens die ursprüngliche Sequenz wieder hergestellt wurde. Homologe Rekombination ist ein Vorgang, der in der Zelle unter anderem dazu dient, beschädigte Bereiche der DNA zu reparieren und genetische Vielfalt zu ermöglichen (Camerini-Otero und Hsieh, 1995).

Die Fähigkeit der Zellen, inaktive Wildtypgene durch Rekombination mit Fragmenten von eingeführten mutierten Genen wieder herzustellen, kann sich bei Mutagenesestudien ungünstig auswirken, da eine ständige Kontrolle der Zellen notwendig ist. Andernfalls bliebe die wiederhergestellte Expression des Wildtypgens unbemerkt und würde die Mutantanalyse verfälschen. Um diese Möglichkeit der Reaktivierung des Wildtypgens auszuschließen, ist man auf Stämme angewiesen, die keine Kopie des Wildtypgens mehr enthalten. Hingegen nutzt man eben diese Eigenschaft der Zellen, homologe DNA-Fragmente bzw. Teile davon gegeneinander auszutauschen, zur Deletion von Genen aus. In Archaea wurden Gene identifiziert, die Homologien aufweisen zu Genen, die an der DNA-Rekombination beteiligt sind, wie z.B. *recA* in *E. coli*, *rad51* in *S. cerevisiae* (Sandler *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Rekombinationsprozesse auch in *Halobacterium salinarum* sehr häufig auftreten können (Krebs *et al.*, 1993). Die Bedeutung der Fähigkeit von Archaea zur Rekombination wurde anhand einer rekombinationsdefizienten Mutante des ebenfalls halophilen Archaeons *Haloferax volcanii* demonstriert, bei der das *radA*-Gen deletiert wird. Diese Mutante zeigte eine stark erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Licht und DNA-schädigenden Reagenzien (Woods und Dyall-Smith, 1997). Dieser Befund zeigt, dass auch bei halophilen Archaea der natürliche Mechanismus der DNA-Reparatur von der Fähigkeit zur Rekombination abhängig ist.

Die Rekombinationsfähigkeit führt dazu, dass Vektoren mit homologen Bereichen zur genomischen DNA leicht ins Genom integriert werden können. Bei Anwesenheit eines Selektionsmarkers kann dies zur gezielten Transformation der Zellen genutzt werden. Der Prozess, der zum Einbau der Vektor-DNA führt („crossing over“), kann jedoch ein zweites Mal ablaufen, wobei diesmal ein Fragment aus der genomischen DNA herausgeschnitten wird. Das kann zum Verlust eines eingeführten Gens bzw. eines Abschnitts mit einer Punktmutation führen.

Zur Deletion eines Gens wird ein Vektor mit flankierenden Sequenzen ober- und unterhalb des betreffenden Abschnitts eingeführt und nach Integration der DNA in das Genom das zweite crossing over abgewartet. In der folgenden Abbildung ist der Ablauf der Rekombina-

tion von homologen Regionen am Beispiel des *bop*-Deletionsvektors pROB (Pfeiffer *et al.*, 1999) und genomischer DNA schematisch dargestellt.

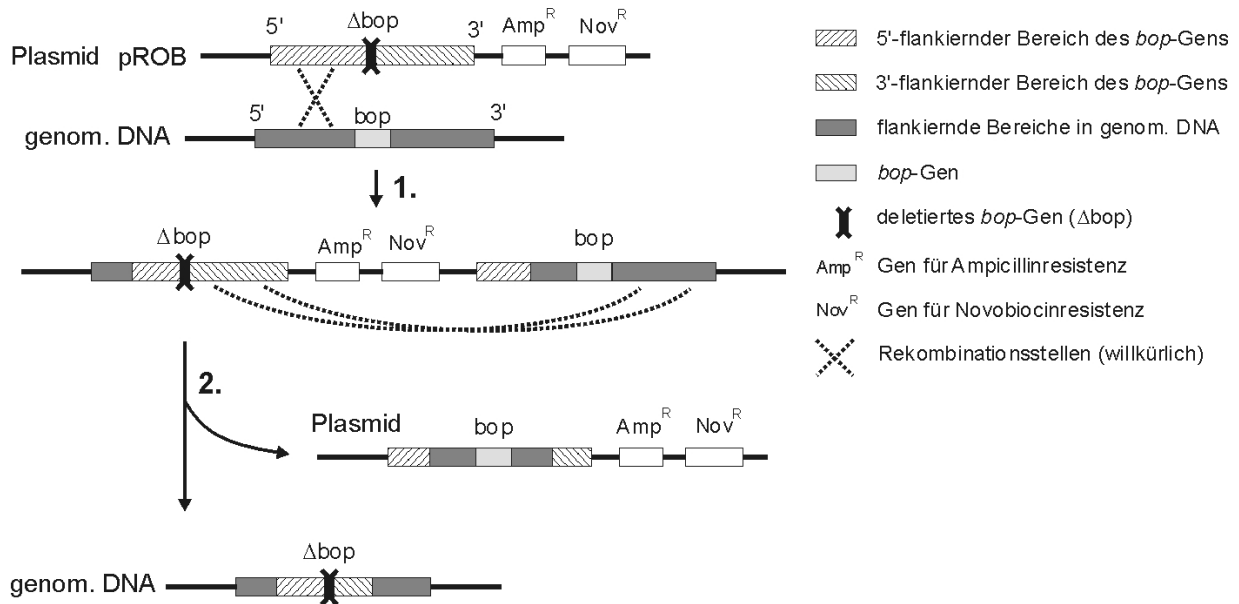


Abb. 2.10 Schema der homologen Rekombination des Vektors pROB (Pfeiffer *et al.*, 1999) mit genomischer DNA aus dem Stamm S9 zum Zwecke der Deletion des *bop*-Gens.

Diese Methode für die Erzeugung eines Deletionsstammes wurde bereits im Falle der Gene für Bacterioopsin (*bop*) und Haloopsin (*hop*) erfolgreich durchgeführt (Krebs *et al.*, 1993; Pfeiffer *et al.*, 1999 bzw. Besir, 1997). Auf dem Weg zu einem Stamm ohne Retinalproteingene wurde im Rahmen dieser Arbeit das zweite (*bop*) von vier Opsingenen deletiert.

2.10 Zielsetzung

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage nach der Funktion der kristallinen Purpormembran (PM) in der Zellmembran von *H. salinarum* und den Wechselwirkungen, die für die Entstehung der PM eine Rolle spielen. Die Klärung dieses noch nicht im Detail verstandenen Prozesses sollte zum Verständnis des Aggregationsverhaltens von integralen Membranproteinen beitragen. Durch den Vergleich der Eigenschaften von Bacteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) im Hinblick auf die Wechselwirkung mit halobakteriellen Lipidmolekülen sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf struktureller Ebene untersucht werden. Das dreidimensionale Strukturmodell von BR (Essen *et al.*, 1998) sprach für eine starke Wechselwirkung des zentralen Glykolipids mit dem Protein, insbesondere mit der Seitenkette von W80 in Helix C und Y64 in Helix B. Das zweite Glykolipid zwischen den Trimeren wurde bisher in keiner der 3D-Strukturmodelle identifiziert, jedoch von Weik *et al.* (1998) als Interaktionspartner der Seitenkette von W12 postuliert. Durch gerichtete Mutagenese sollten Seitenketten (W12, W80, Y64, T67) ausgetauscht werden, die mit den Glykolipiden der PM interagieren, und der Effekt dieser Mutationen auf die PM-Bildung und Eigenschaften des BR in der Zellmembran untersucht werden. Die Bildung von 2D-Kristallen von HR *in vivo* sollte ebenfalls untersucht werden.

Ferner sollte die Expression und Aufreinigung von Halorhodopsin für die Kristallisation in kubischen Lipidphasen durchgeführt werden. Darüber hinaus sollte die Spezifität der Wechselwirkung des Palmitats mit HR durch Markierungsexperimente untersucht werden.

Daneben sollte ein Stamm von *H. salinarum* erzeugt werden, in dem die Gene für Bacterioopsin (*bop*) und Haloopsin (*hop*) deletiert sind. Dieser soll für die Expression von mutierten *bop*- und *hop*-Genen verwendet werden.

Schließlich sollte die Expression und Aufreinigung von löslichen Proteinen in Form von Fusionsproteinen mit BR untersucht und ein leicht handhabbares System dafür entwickelt werden. Die hohe Expression des *bop*-Gens und die leichte Aufreinigung des Fusionsproteins in der PM sollten dabei für die Überproduktion und rasche Isolierung der fusionierten Proteine genutzt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion des *bop*⁻/*hop*⁻ Deletionsstammes TOM

Als Ausgangsstamm für die Deletion wurde der *hop*-defiziente Stamm WHOP (without hop) dem *bop*-Deletionsstamm SNOB (S9 (Neun) ohne hop) vorgezogen, da WHOP weniger Carotinoide produziert als SNOB und somit auch keine rötlich gefärbte Kolonien auf Platten bildet. Diese Rotfärbung hätte nach einer Transformation von SNOB eine Unterscheidung der stärker gefärbten negativen Klone von positiven Transformanten erschwert, die BR oder HR produzieren. Anschließend wurden 3 Transformanten in flüssigem Medium ohne Antibiotikum inokuliert und mehrmals nach Wachstum in frisches Medium überführt. Danach wurden diese Zellen auf Verdünnungsplatten ohne Novobiocin ausgestrichen und bei 40 °C inkubiert. Von diesen Platten wurden Einzelkolonien parallel auf Platten mit und ohne Novobiocin übertragen. Anschließend wurde mit den Platten ohne Novobiocin eine Kolonie-Hybridisierung durchgeführt und die Anwesenheit des *bop*-Gens mit einer Digoxigenin(DIG)-markierten Gensonde gegen das *bop*-Gen getestet. Diese Sonde bestand aus einem 391 bp großen PCR-Fragment aus dem *bop*-Gen. Dabei wurden bei einem Transformationsansatz *bop*-negative Klone identifiziert, die nicht mehr auf Novobiocin-Platten wuchsen, da sie offensichtlich den Vektor mit dem Gen für die Novobiocinresistenz verloren hatten. Diese *bop*-negativen Klone wurden in 35 ml Medium angeimpft und vier Tage bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurde aus diesen Kulturen genomische DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym *Pst*I verdaut. Ebenso wurde zur Kontrolle DNA von L33, der als Ausgangsstamm für die Konstruktion von WHOP verwendet wurde und das *bop*-Gen enthält, mit dem gleichen Enzym verdaut. Die Vektoren pROB und pUS-Mev wurden mit *Pst*I bzw. *Bam*HI/*Hind*III verdaut und dienten als Positivkontrollen für die Deletions- bzw. *bop*-Sonde. Nach der Auftrennung über ein Agarosegel wurde eine Southern-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurde mit einer Sonde gegen *bop* (core) und einer Sonde gegen einen Bereich außerhalb des *bop*-Gens (pre, 672 bp, 711-39 bp vor dem Startcodon von *bop*) hybridisiert.

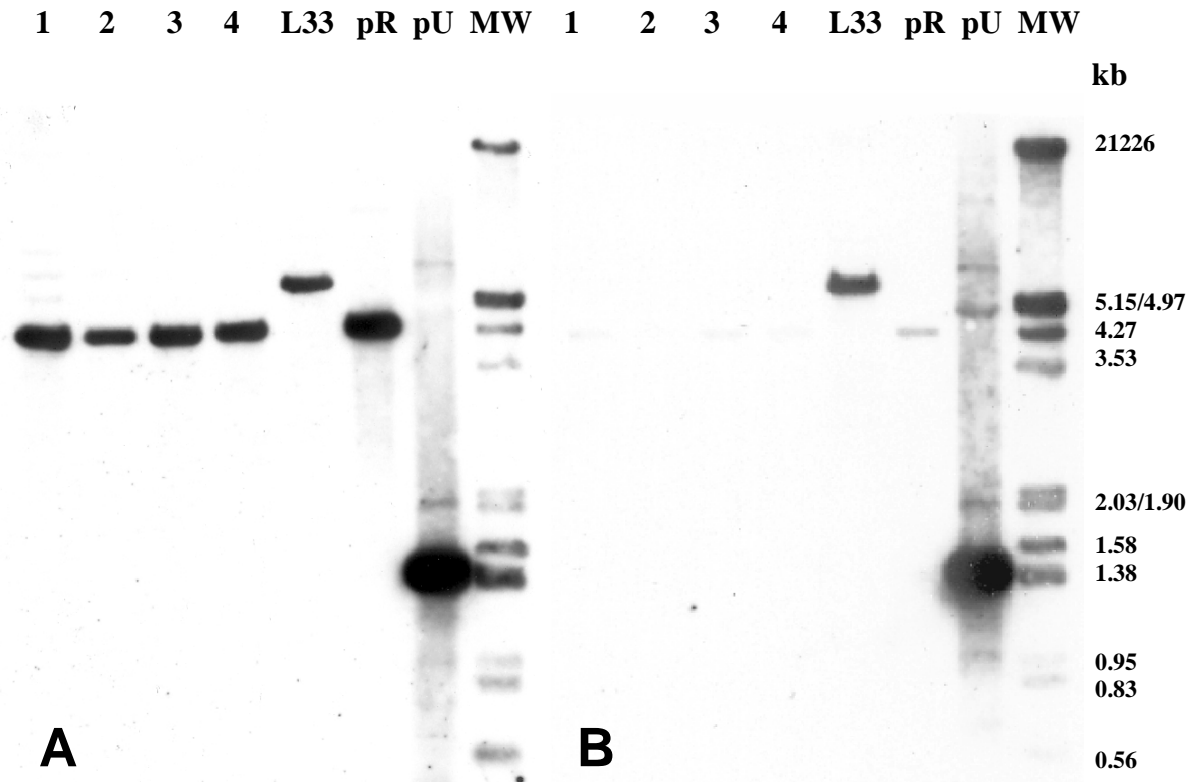


Abb. 3.1 Southern-Blot zur Detektion der Deletion des *bop*-Gens in genomischer DNA nach Verdau mit *Pst*I; A: *pre*-Sonde gegen flankierende Sequenz; B: *core*-Sonde gegen *bop*; 1-4: Genomische DNA aus verschiedenen Deletionsklonen, L33: Ausgangsstamm für die Deletion als Positivkontrolle, pR: 4.3 kb Deletionsfragment aus dem Vektor pROB, pU: Positivkontrolle mit *Bam*HI/*Hind*III-Fragment aus pUS-Mev (enthält *bop*-Gen).

Das Ergebnis der Hybridisierung ist in Abb. 3.1 dargestellt und zeigt eindeutig die zu erwartende Deletion eines etwa 1.3 kb großen Fragments, auf dem das *bop*-Gen liegt. In L33 ist das *bop*-Gen aufgrund eines etwa 520 bp großen Insertionselements ISH2 ausgeschaltet, wodurch sich der beobachtete Größenunterschied als Summe aus *bop* (789 bp) und dem Insertionselement erklärt. Der Vektor pROB enthält ein *Pst*I-Fragment aus genomischer DNA, aus dem das *bop*-Gen deletiert wurde. Deswegen befindet sich die Deletionsbande der Transformanten auf gleicher Höhe wie die Kontrollbande. In Abb. 3.1B ist der Blot mit der Sonde gegen das *bop*-Gen dargestellt. Der Kontrollvektor pUS-Mev liefert in beiden Fällen ein positives Signal, da das *bop*-Fragment in diesem Vektor auch einen Teil des Fragments der Deletionssonde enthält. Alle Klone sind demnach *bop*-negativ und Novobiocin-sensitiv, wie bereits nach der Kolonie-Hybridisierung zu erwarten war. Damit ist der *bop*- und *hop*-negative Stamm TOM (Two Opsins Missing) verifiziert. Dieser Stamm wurde anschließend weiteren Deletionsexperimenten unterzogen, woraus die Stämme SAM1 (*sop*I also missing), SAM2 (*sop*II

also missing) und NAOMI (Now all Opsins Missing) hervorgingen (M. Otsuka, unveröffentlichte Ergebnisse).

3.2 Untersuchungen zur *in vivo*-Kristallisation von Bacteriorhodopsin

3.2.1 Mutagenese mittels Polymerase-Kettenreaktion

Für die Untersuchung der Rolle der Aminosäuren, die einen Einfluß auf die Kristallisation von BR in der Zellmembran haben könnten, wurden mittels gerichteter Mutagenese einzelne Aminosäuren ausgetauscht. Die Mutationen im *bop*-Gen wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in zwei Stufen eingeführt. Die folgende Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der Reaktionen.

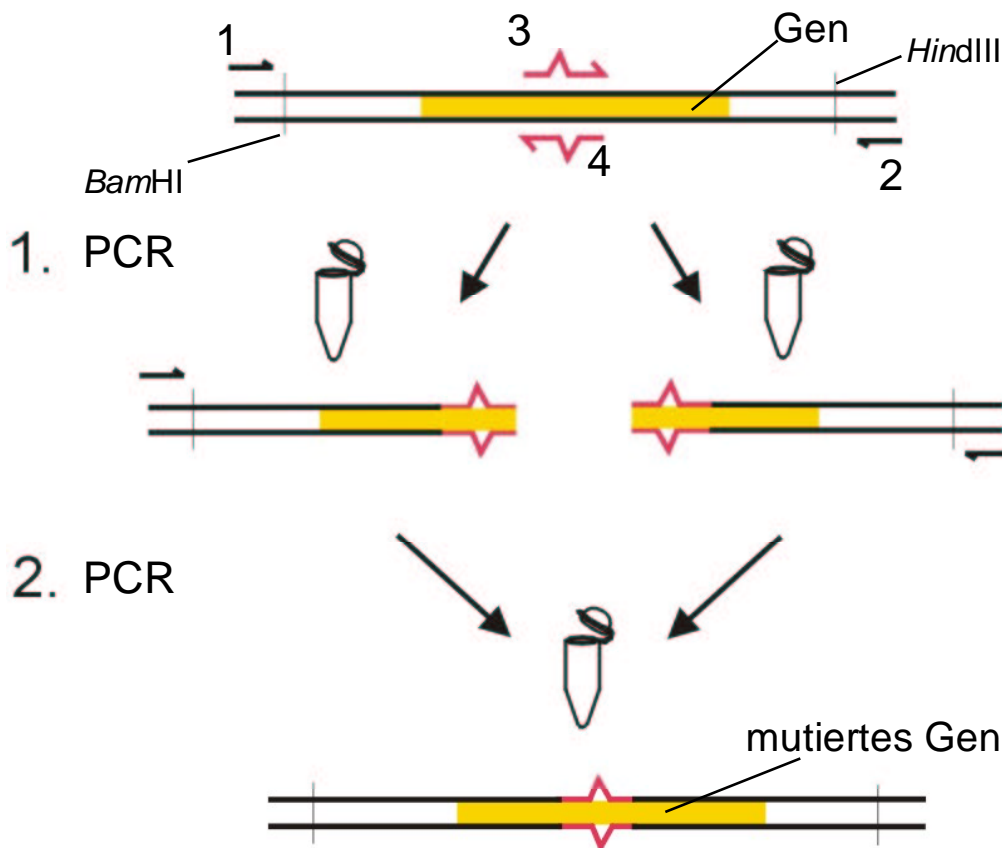


Abb. 3.2 Schema der Reaktionen bei der Einführung von Punktmutationen mittels PCR in zwei Stufen

Für jede Punktmutante wurden zwei komplementäre Oligonukleotide (Primer, 3 + 4) mit 27-30 Basen so konstruiert, dass die Mutation in der Mitte der Oligosequenz lag. Anschließend wurden zwei PCRs mit den flankierenden Primern HXseq (1) und HXrev (2), deren komplementäre Sequenzen oberhalb bzw. unterhalb der Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III lagen, durchgeführt. Die entstandenen Fragmente, die nun komplementä-

re Enden besaßen, wurden aufgereinigt und in einem neuen Ansatz gemeinsam als Matrize verwendet, diesmal nur mit den zwei flankierenden Primern. Bei diesem Schritt dienten die Teilfragmente in den ersten Zyklen als Primer für das jeweils andere, bis ein Fragment entstand, das die Mutation enthält und für beide flankierenden Primer als Matrize für die weitere Amplifikation diente. Schließlich wurde das mutierte Fragment nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Hind*III in den Vektor pUS-Mev (Schweiger, 1996) ligiert, der zuvor mit den gleichen Enzymen verdaut wurde. Zur Kontrolle der Punktmutation wurde eine Sequenzierung des *bop*-Gens im Vektor durchgeführt, um zusätzliche Mutationen, die manchmal durch Fehler der Polymerase auftreten können, auszuschließen.

Eine modifizierte Version der Mutagenese mittels PCR wurde ebenfalls etabliert, weil sie nur einen neuen Primer für jede weitere Mutation erfordert (Mikaelian und Sergeant, 1992). Folgende Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der Schritte.

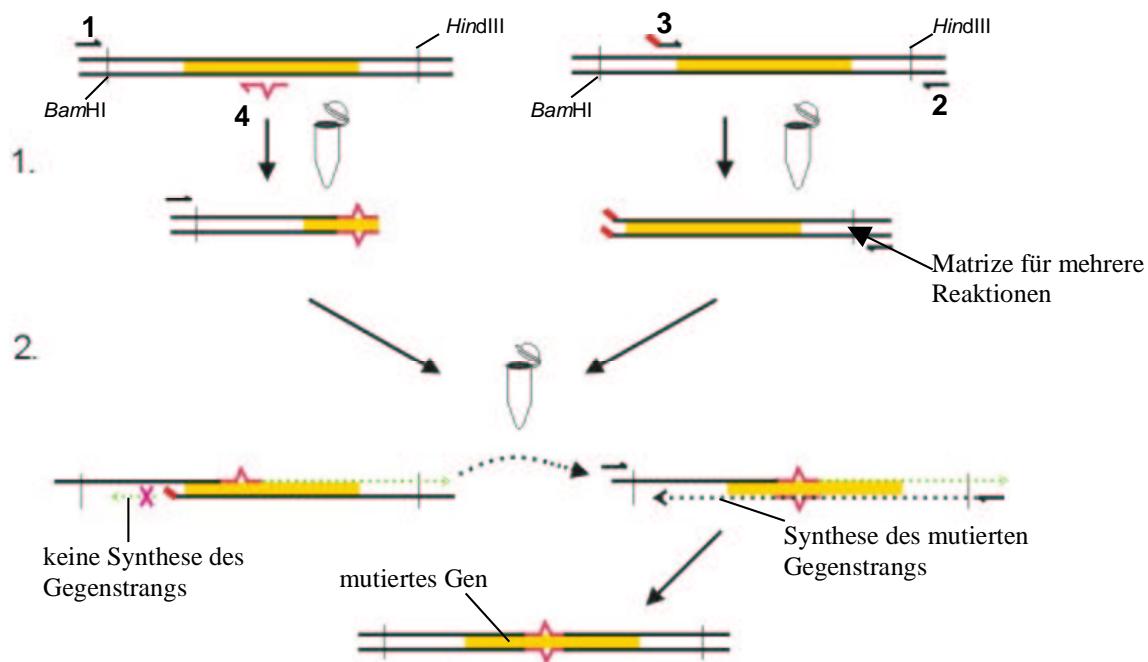


Abb. 3.3 Schematischer Ablauf der PCR in zwei Schritten für die Mutagenese mit einem mutierten Oligonukleotid und einem Genfragment mit nicht-komplementärem 5'-Ende.

Bei dieser Variante wird zunächst ein Fragment erzeugt, das das gesamte Gen bis zum flankierenden 3'-Primer HXrev (2) enthält. Als 5'-Primer dient ein Oligonukleotid (3), das etwa 40 bp vor dem Startcodon liegt und 6 zusätzliche, nicht-komplementäre Basen am 5'-Ende besitzt. So kann bei der zweiten PCR der Gegenstrang mit der Wildtyp-Sequenz nicht verlängert und somit nur der codierende Strang des mutierten Fragments als Matrize für die Amplifikation genutzt werden.

Für die homologe Expression des *bop*-Gens wurde der Deletionsstamm SNOB (Pfeiffer *et al.*, 1999) verwendet. Im folgenden wird der das Wildtypgen exprimierende Stamm als WT be-

zeichnet. Positive Transformanten waren aufgrund der hohen *bop*-Expression leicht als rotviolette Kolonien zu erkennen. Die Mutation wurde nach erfolgreicher Transformation von SNOB durch Amplifikation des *bop*-Gens aus genomischer DNA mittels PCR und anschließender Sequenzierung des erhaltenen Fragments bestätigt. In Tab. 3.1 sind die in dieser Arbeit untersuchten BR-Mutationen aufgelistet.

Einzelmutanten	Doppelmutanten
W12I	W12I/W80I
W80I	W12I/D36C
W80F	W12I/Q105C
Y64I	W12I/G106C
D36C	W12I/T157C
Q105C	W80I/D36C
G106C	W80I/Q105C
T157C	W80I/ G106C
	W80I/T157C

Tab. 3.1: Liste der erzeugten Mutanten

Für die Untersuchung des Einflusses des Glykolipids innerhalb des Trimers auf die PM-Bildung kamen nach Essen *et al.* (1998) die in Abb. 2.8 hervorgehobenen Reste Y64, L66, T67, W80, G113, G116, G120 und K129 in Frage. Die Wechselwirkung des Glykolipids zwischen den BR-Trimeren sollte durch die Mutation des Restes W12 analysiert werden. Krebs *et al.* (1997) hatten bereits den Einfluß der Mutation der Aminosäuren G113, 116 und 120 auf die PM-Ausbeute untersucht. Ebenso hatte sich die Mutation von K129 zu Histidin (Govindjee *et al.*, 1997) und Cystein (Pfeiffer, pers. Mitteilung) nicht nachteilig auf die Bildung der PM ausgewirkt.

Die Mutation von L66 wurde nicht durchgeführt, da die für die Kristallisation als wichtig erachtete Wechselwirkung mit dem Glykolipid über die Carbonylgruppe von L66 zustande kommt, so dass bei einer Mutation keine Störung dieser Interaktion erwartet wurde.

Die OH-Gruppen von Y64 und T67 bilden H-Brücken zu einem Sauerstoffatom des Glycerins (Y64) bzw. Hydroxylgruppen der Zuckerreste in der Kopfgruppe des Glykolipids. Der Austausch von Y64 gegen Isoleucin und T67 gegen Valin hatte jedoch keine Störung der PM-Bildung zu Folge. Die BR-Ausbeute bei der Mutante Y64I lag mit 25 – 30 % deutlich niedriger als in WT. Daher diente diese Mutante in einigen Experimenten als Kontrolle für den Einfluß des BR-Gehalts der Zellen auf die PM-Bildung. Diese Kontrolle war notwendig, da alle Zellen mit der Mutation W12I bzw. W80I in BR geringere BR-Mengen enthalten. Daneben wurden Zellen von den Wildtyp-Stämmen R1 und S9 verwendet, die deutlich weniger WT-BR produzieren als WT und trotzdem das gesamte BR in die PM einbauen (nicht gezeigt). So enthält der S9-Stamm (S9_{mot}), von Storch *et al.* (1999) auf hohe Motilität hin se-

lektioniert, nur 40 - 50 % der BR-Menge von WT. Zusätzlich zum niedrigen BR-Gehalt zeigt Y64I einige von WT-BR abweichende spektroskopische Eigenschaften, die weiter unten erwähnt werden und die eine genauere Untersuchung rechtfertigen.

3.2.2 Isolierung der Membranfraktionen

Die Isolierung der Membranfraktionen der BR-Mutanten erfolgt nach dem Standardprotokoll von Oesterhelt und Stoeckenius (1974) mittels Dichtegradientenzentrifugation in einem 25 – 45 %igen Saccharosegradienten (Abb. 3.4). Bei der Isolierung von cysteinhaltigen Mutanten wurde während der Aufarbeitung stets β -Mercaptoethanol in den Puffer gegeben, um die reaktive SH-Gruppe vor der Oxidation zu schützen.

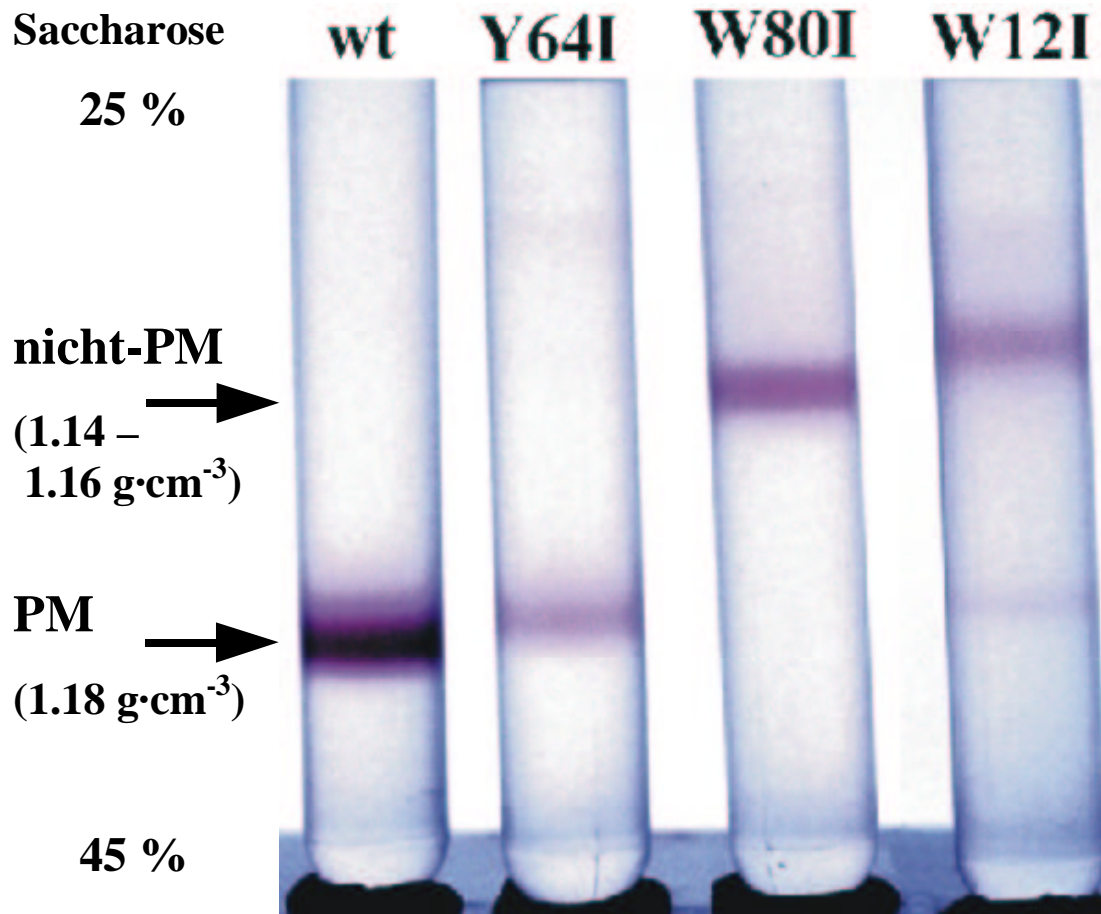


Abb. 3.4 Saccharosegradienten (25 – 45 %, w/w) mit WT-BR, Y64I, W80I und W12I aus jeweils einer 35 ml-Kultur.

Aus WT wird WT-BR quantitativ als PM-Fraktion mit der Schwimmdichte $1.18 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ isoliert. Die Verteilung der BR-haltigen Membranfraktionen für die Mutanten Y64I, W80I und W12I ist in Abb. 3.4 dargestellt. Während die Mutation Y64I keinen Einfluß auf die PM-Bildung besitzt, wird W80I überwiegend in der weniger dichten Membranfraktion (nicht-PM)

mit einer Schwimmdichte von $1.14 - 1.16 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ isoliert, wobei eine PM-Bande in den meisten Präparationen nicht detektierbar ist bzw. bei Vorhandensein weniger als 1 % der BR-Menge ausmacht. Die Mutante W12I nimmt dagegen eine Zwischenstellung ein, da sie etwa nur 10 - 15 % des BRs in Form von PM liefert. Ein längeres Wachstum der Zellen mit den BR-Mutanten ändert nichts an der Verteilung des BR im Saccharosegradienten, so dass ein Einfluß der Wachstumsdauer ausgeschlossen werden kann. Das Fehlen bzw. die kleinere Menge der PM, bezogen auf die Gesamtmenge von BR, bei den Mutanten W80I bzw. W12I, könnte daran liegen, dass keine kristallinen Bereiche mit den mutierten BR-Molekülen entstehen oder die Grösse dieser Bereiche nicht ausreicht, um bei der Lyse der Zellen als isolierte PM-Stücke aus der Zellmembran herauszubrechen. Zur Klärung dieser Frage wurden die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Experimente durchgeführt.

Die Aminosäure W80 wurde auch gegen Cystein ausgetauscht. Dabei wird auch die Mutante W80C im Saccharosegradienten wie bei W80I ausschließlich in der nicht-PM-Fraktion gefunden (Pfeiffer, 2000). Beim Austausch von W80 gegen eine Aminosäure mit aromatischer Seitenkette (W80F) wird dagegen der größere Teil (ca. 60 - 70 %) der BR-Menge in Form von PM isoliert (Abb. 3.5).

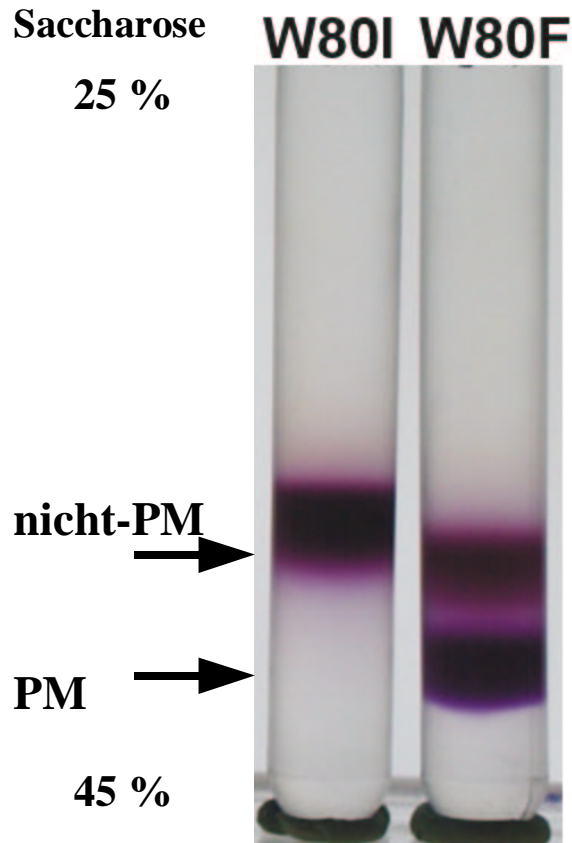


Abb. 3.5 Vergleich der Saccharosegradienten mit Membranfraktionen aus Zellen mit W80I und W80F. Die aromatische Seitenkette führte zu einer partiellen Wiederherstellung der Kristallisationstendenz.

Bei den unterschiedlichen Präparationen werden stark schwankende BR-Mengen aus WT und den Mutanten isoliert, wobei das Verhältnis bei den Kulturen einer Versuchsreihe relativ konstant bleibt. Eine Abhängigkeit der Expression von den Zutaten des verwendeten Mediums kann aber nicht ausgeschlossen werden. Diese Beobachtung war bei anderen Wachstumsexperimenten gemacht worden (Plischka, 2000). In Tab. 3.2 sind die Werte für die relativen BR-Konzentrationen und das Verhältnis von PM zur Gesamtmenge an BR in den verwendeten Zellen aufgelistet.

Probe	% von WT	%PM
WT	100	100
Y64	30-40	98
W12I	20-25	0-15
W80I	40-45	0-1
W12/80I	15-20	0
W80F	40-60	60-70
S9 _{mot}	40-50	100

Tab. 3.2: Relative BR-Mengen in WT, S9_{mot} und Mutanten.

Durch die zusätzlichen Mutationen D36C, Q105C, G106C und T157C ändert sich bei den Mutanten W12I und W80I nichts an dem Verhältnis von PM zu nicht-PM im Saccharosegra-

dienten. Die Einzelsysteine zeigen keine Störung der PM-Bildung, so dass die Tryptophanmutation dieses Verhältnis bestimmt.

3.2.3 Spektroskopische Untersuchungen

3.2.3.1 UV/Vis-Spektroskopie

Für die Konzentrationsbestimmung von BR wurden UV/Vis-Absorptionsspektren der Membranfraktionen mit WT und Mutanten aufgenommen. Als Extinktionskoeffizient wird für alle Proben der Wert $63000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ von lichtadaptierter WT-PM verwendet. Dazu wurde eine Suspension nach Verdünnung mit dem Puffer, in dem die Fraktion aufbewahrt wird, im Photometer vermessen. Zur Lichtadaptation wurde die Probe unmittelbar vor der Messung 5 min belichtet ($\lambda > 530 \text{ nm}$), dunkeladaptierte Proben wurden mindestens 24 h bei Raumtemperatur (RT) lichtgeschützt aufbewahrt. Zur Solubilisierung wurden die Proben mit 1.5 % (w/w) Triton X-100 über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Solubilisat 1 h bei 40000 rpm zentrifugiert, um unsolubilierte Membranfragmente abzutrennen, und der Überstand photometrisch vermessen.

Dabei war auffällig, dass die PM mit WT-BR unter identischen Bedingungen deutlich länger für eine vollständige Solubilisierung benötigt als die Mutanten in der nicht-PM, die schon nach etwa 3 h größtenteils solubiliert werden. In der PM sind demnach die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen deutlich stärker als in der restlichen Membran, da die Detergenzmoleküle die Lipid-Protein-Wechselwirkungen in der PM wesentlich schwerer schwächen und das BR aus der Membran herauslösen können. Dies zeigt sich auch in der Resistenz von PM gegenüber der Solubilisierung durch geladene Detergentien wie Cholat, mit dem beispielsweise HR-haltige Membranfraktionen solubiliert werden können (Duschl *et al.*, 1988). Die nicht-PM-Fractionen mit W12I, W80I und W80F können jedoch unter den gleichen Bedingungen wie HR, die weiter unten beschrieben werden, in ähnlich kurzer Zeit von etwa 1 - 2 Stunden nahezu vollständig solubiliert werden. Da auch HR in diesen Präparationen nicht in Form von PM isoliert wird, weist diese Ähnlichkeit von HR und den BR-Mutanten in nicht-kristalliner Form auf Unterschiede in der Lipidumgebung im Vergleich zu BR in der PM hin.

In Tab. 3.3 sind die für die weiteren Experimente wichtigen BR-Mutanten und ihre Absorptionsmaxima aufgelistet.

Probe	licht-adaptiert	dunkel-adaptiert	solubilisiert
WT	569*	559*	551*
Y64	565*	557*	550*
W12I	569*/560	549	545
W80I	563	552	549
W12/80I	557	553	545
W80F	567*/564	557*/553	551*/549

Tab. 3.3: Absorptionsmaxima von WT-BR und den untersuchten Mutanten bei RT in 150 mM NaCl (pH 7); solubilisierte Proben werden nach Zugabe von 1.5 % Triton X-100 zur Membransuspension erhalten, mit * markierte Werte gelten für die PM-Fractionen.

Die zusätzlich zu W12I bzw. W80I eingefügten Mutationen D36C, Q105C, G106C und T157C wirken sich nicht auf die Absorptionsmaxima oder die Kristallisationstendenz aus. Die entsprechenden Cysteineinzelmutanten bilden ebenso PM wie WT und zeigen keine Verschiebung der Absorptionsmaxima (Pfeiffer, 2000).

Es stellte sich heraus, dass bei den Proben aus der leichten Fraktion des Saccharosegradienten die Dunkeladaptation wesentlich schneller abläuft als in der PM-Fraktion. Dies wurde bereits früher bei der Braunen Membran (BM) beobachtet (Peters und Peters, 1978). Die rasche Dunkeladaptation hat zur Folge, dass die gleichen Mutanten von verschiedenen Präparationen um einige Nanometer unterschiedliche Absorptionsmaxima aufweisen, je nachdem, wie rasch die Messung nach der Belichtung durchgeführt wird. Daher wurde die Geschwindigkeit der Dunkeladaptation bei WT, W12I, und W80I ermittelt, indem die Abnahme des Absorptionsmaximums einer lichtadaptierten Probe spektroskopisch verfolgt wurde. In Abb. 3.6 ist der Verlauf der Absorptionsänderung, für WT-PM und Mutanten dargestellt.

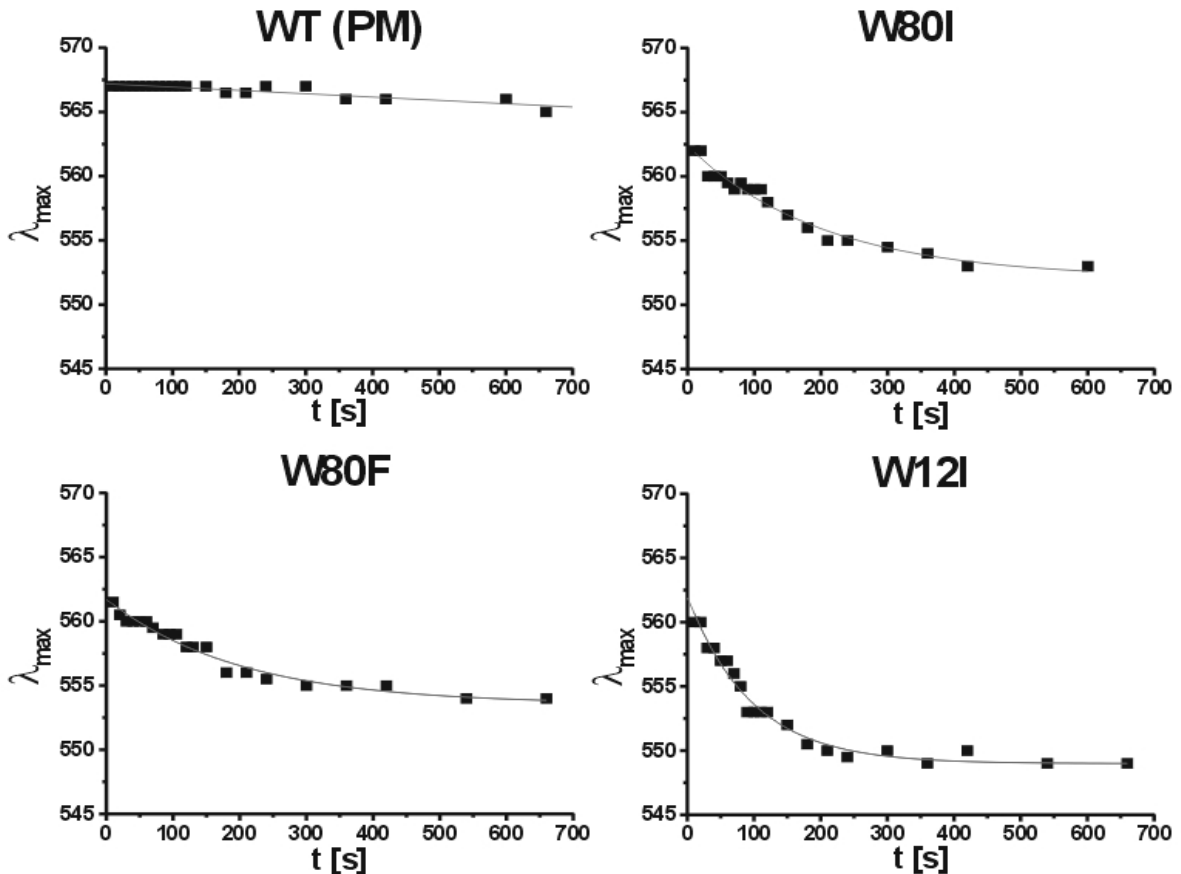


Abb. 3.6 Kinetik der Dunkeladaptation von WT-PM und den nicht-PM-Fractionen von W80I, W80F und W12I bei ca. 25 °C nach 5 minütiger Belichtung mit $\lambda > 530$ nm.

Der Unterschied in der Dunkeladaptation bei den nicht-PM-Fractionen im Vergleich zur PM ist deutlich erkennbar. Während das Absorptionsmaximum von WT-BR in der PM bei den Messbedingungen (ca. 25 °C) nur um 2 nm abnimmt, ist die Dunkeladaptation der Mutanten während der ersten Minuten bereits vollständig, wobei der Verlauf mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden kann. Die Verschiebung von λ_{max} bei WT-PM entspricht einem 13-*cis*-Anteil von etwa 15 %. Die Mutante W12I zeigt dabei die höchste Geschwindigkeit, während W80I und W80F gleich schnell adaptiert sind. Aus den angepassten Exponentialfunktionen ergeben sich Zeitkonstanten für die Mutanten von etwa 200 (W80F bzw. W80I) und 100 s (W12I). Dies liegt deutlich unter dem Wert für WT-BR in PM, der bei 28 °C mit 45 min angegeben ist (Peters und Peters, 1978).

Eine weiterer Unterschied im Absorptionsverhalten der nicht-PM-Fraktion von W80I und der PM-Fraktion von Y64I zur WT-PM zeigt sich bei der pH-Abhängigkeit der Entstehung der blauen Form von BR. Durch die Protonierung von D85 entsteht bei niedrigen pH-Werten ($\text{pH} \leq 3$) bei WT-BR eine rotverschobene Form mit einem Absorptionsmaximum von 603 nm (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971; Fischer und Oesterhelt, 1979). Eine pH-Titration der Ver-

schiebung des Absorptionsmaximums zwischen pH 2.5 und 8.5 zeigt einen um etwa 3 pH-Einheiten erhöhten Übergang von λ_{\max} von 562 auf 597 nm bei W80I. In Abb. 3.7 sind die Absorptionswerte bei 640 nm gegen den pH-Wert aufgetragen. Bei dieser Wellenlänge ist die Änderung der Absorption beim Übergang zur rotverschobenen Form von BR maximal. Nach Anpassung einer sigmoidalen Funktion ergeben sich die pK-Werte der Farbverschiebung bei WT mit 3.1 ± 0.1 und bei W80I mit 5.9 ± 0.1 . Die Mutante Y64I zeigt ein dem WT ähnliches Verhalten, wobei der pK-Wert mit 3.7 ± 0.2 etwas höher liegt. Die Steigung der Titrationskurve von Y64I ähnelt der von W80I und zeigt einen verzögerten Übergang im Vergleich zum WT. Dies deutet auf einen zusätzlichen Einfluß von protonierbaren Gruppen neben D85 bei beiden Mutanten hin.

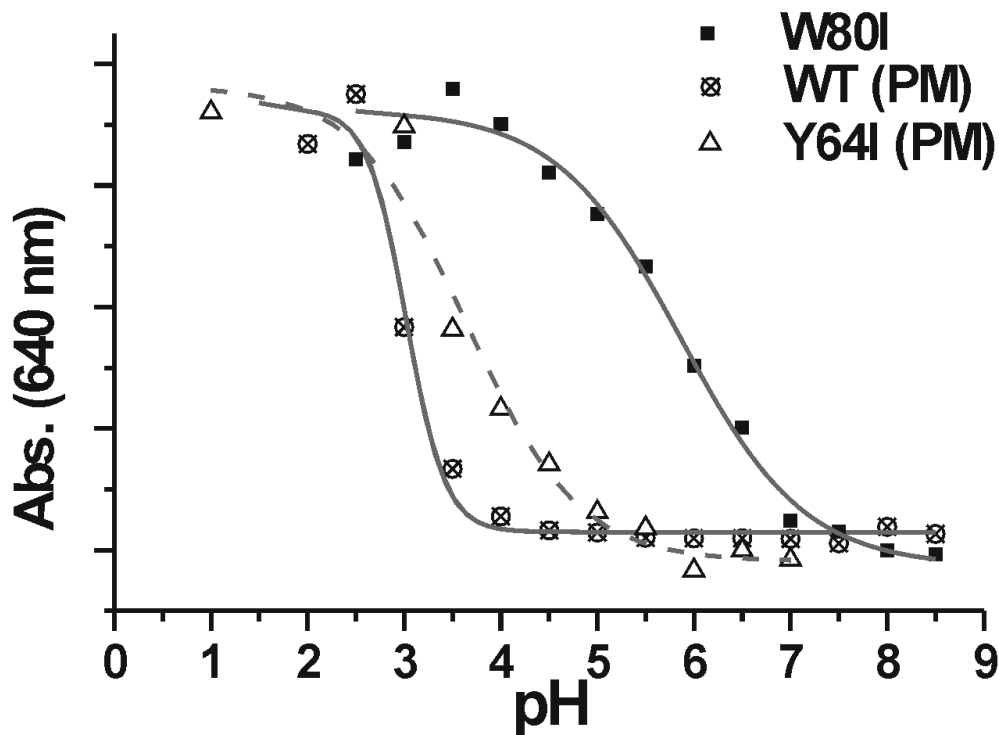


Abb. 3.7 pH-Titration von Membranfraktionen mit WT-PM, Y64I-PM und W80I (nicht-PM) zeigt durch den Anstieg der Absorption bei 640 nm einen um 3 pH-Einheiten verschobenen Übergang von der rotvioletten zur blauen Form von BR.

Trotz der unterschiedlichen pK-Werte von W80I und Y64I wird beobachtet, dass W80I- und Y64I-Membranfraktionen, die bei pH 7 gepuffert sind, beim Einfrieren blau werden und während des Auftauens langsam wieder die ursprüngliche Farbe zeigen. Eingefrorene Membranfraktionen mit W12I (nicht-PM) und WT-PM zeigen unter identischen Bedingungen keine Farbänderung. Dies könnte dafür sprechen, dass beim Einfrieren die Ladungsverteilung an der Membranoberfläche in W80I und Y64I gegenüber dem Wildtyp verändert ist.

3.2.3.2 Photozyklusmessungen mittels lichtinduzierter Absorptionsänderung

Zur Untersuchung der Photozyklen der Mutanten W12I, W80I, W12/80I und Y64I wurde die laserinduzierte Absorptionsänderung der Proben detektiert und mit den Daten von WT-BR verglichen. Dafür wurden die Proben in 150 mM KCl aufgenommen und auf eine OD von 0.3 - 0.5 eingestellt. Vor der Belichtung wurden sie zur Lichtadaptation etwa 3 min mit dem weißen Meßlicht bestrahlt. Die Membranfraktionen wurden bei pH-Werten von 5.0 und 8.0, die in Triton X-100 solubilisierten Proben bei pH 7.0 vermessen. Nach Aufnahme der Spektren wurde der Absorptionsverlauf bei 410 nm (M-Intermediat), 560 (Ausgangszustand) und 640 nm (O-Intermediat) mit einer Multiexponentialfunktion angepaßt und aus den Variablen dieser Funktion die Zeitkonstanten für die Bildung bzw. den Zerfall der Intermediate ermittelt (Tab. 3.4 und Tab. 3.5). Neben den Zeitkonstanten sind die relativen Amplituden für die M-Intermediate in Klammern angegeben.

M-Zerfall (pH5)	WT	W12I	W80I	W12/80I	Y64I
τ_1	3.1 (50)	3.3 (51)	4.5 (75)	4.2 (75)	1.1 (14)
τ_2	5.3 (50)	13.5 (47)	13.6 (25)	24.7 (25)	4.2 (86)
τ_3		147.1 (2)			

M-Zerfall (pH8)	WT	W12I	W80I	W12/80I	Y64I
τ_1	3.32 (79)	3.0 (80)	3.01 (86)	0.62 (13)	0.75 (15)
τ_2	22.94 (21)	17.4 (17)	20.49 (11)	2.40 (76)	2.85 (80)
τ_3		344.8 (2)		18.28 (11)	9.76 (6)

Tab. 3.4: Halbwertszeiten (τ_1 – τ_3 , in ms) für den Zerfall des M-Intermediats (410 nm). In Klammern sind die dazugehörigen Anteile der Komponenten an der Gesamtamplitude angegeben.

M-Zerfall (pH 7)	WT	W12I	W80I	W12/80I	Y64I
τ_1	5.4 (85)	1.4 (67)	1.0 (66)	1.3 (71)	1.1 (57)
τ_2	12.9 (14)	15.7 (17)	4.4 (13)	15.7 (15)	4.1 (17)
τ_3	119.0 (1)	57.1 (17)	43.9 (21)	57.8 (14)	87.0 (26)

Tab. 3.5: Halbwertszeiten (τ_1 – τ_3 , in ms) für den Zerfall des M-Intermediats (410 nm) für solubilierte Proben (1.5 % Triton X-100) bei pH 7.

In Abb. 3.8 und Abb. 3.9 sind die dazugehörigen Kurven mit den entsprechenden simulierten Kurven (schwarze Rauten) dargestellt. Dabei sind die Absorptionskurven für 410 nm, 560 nm und 640 nm dargestellt. Die Halbwertszeit der Entstehung des M-Intermediats liegt bei allen Proben bei 0.1 – 0.2 ms. Der Zerfall der M-Intermediate bei den Mutanten W12I und W12/80I verläuft ähnlich wie beim Wildtyp, wobei die Halbwertszeit der langsameren Komponente etwa auf das zwei- (W12I) bzw. fünffache (W12/80I) ansteigt, ihr Anteil an der Amplitude aber bis auf 25 % der Gesamtamplitude abfällt (Tab. 3.4). Der Kurvenverlauf für

W80I und Y64I bei pH 5 zeigt dagegen einen deutlichen Anstieg der Absorption bei 640 nm, der besonders bei Y64I auffällt. Bei dieser Mutante ist die schnelle Komponente des M-Intermediats mit einem Anteil von 14 % etwa auf den dreifachen Wert beschleunigt. Dies führt zu einer Anreicherung des O-Intermediats, dessen Anstieg (3.1 gegenüber 4.2 ms, WT bzw. Y64I) und Zerfall (5.3 gegenüber 6.5 ms, WT bzw. Y64I) ähnlich schnell abläuft wie im WT. Bei der Mutante W80I liegt die Zerfallszeit des Hauptanteils des O-Intermediats mit 13.5 ms deutlich über den 6.5 ms des Wildtyps, was ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der Absorption bei 640 nm führt.

Während bei pH 8 im WT aufgrund des raschen Zerfalls des O-Intermediats keine Absorptionsänderung bei 640 nm detektierbar ist, steigt bei W80I die Amplitude dieser Bande bei pH 8 sogar noch an. Dagegen ist die Amplitude des O-Intermediats von Y64I bei pH 8 deutlich kleiner als beim niedrigeren pH-Wert.

Ähnlich wie bei W80I kann bei pH 8 für die Doppelmutante W12/80I eine Zunahme der Absorption bei 640 nm beobachtet werden, was auf die Zunahme der Geschwindigkeit des M-Zerfalls bei gleichzeitigem Anstieg der Lebensdauer des O-Intermediats zurückzuführen ist. Bei W12I ist bis auf eine Zunahme des Anteils der schnellen Komponente des M-Zerfalls von 50 auf 80 % der Gesamtamplitude keine signifikante Änderung zu verzeichnen.

Der M-Zerfall bei den Triton-solubilisierten Proben ist bei allen Mutanten insgesamt verlangsamt, was an den Kurven für 410 nm deutlich wird, die auch nach etwa 100 ms noch nicht auf den Nullwert abgesunken sind. Während solubilisiertes WT-BR bei pH 7 eine Zerfallszeit des M-Intermediats mit 5.4 (85 %) und 12.9 (14 %) ms aufweist, zeigen alle Mutanten sehr ähnliche Verläufe für den M-Zerfall mit einer schnellen Komponente mit 1.0 - 1.4 ms, die etwa 60 bis 70 % der Amplitude ausmacht, während der Anteil der langsamsten Komponente mit etwa 44 bis 87 ms deutlich auf 14 bis 26 % ansteigt. Dagegen ist mit einem Anteil von 1 % die sehr langsame Komponente (119 ms) bei WT vernachlässigbar. Die größten Unterschiede im M-Zerfall zeigen die Mutanten W80I und Y64I mit der mittleren Komponente von 4.4 bzw. 4.1 ms, die gegenüber dem WT mit 12.9 ms bei ähnlichem Anteil der Amplitude deutlich beschleunigt ist. Die anderen Mutanten zeigen dagegen nur eine geringfügige Zunahme dieser Komponente, wobei der Anteil an der Gesamtamplitude bei allen ähnlich hoch ist (13 bis 17 %) liegt. In Abb. 3.9 sind analog zu Abb. 3.8 die Kurven für die Absorption bei 410, 560 und 640 nm (offene Kreise) mit den entsprechenden simulierten Kurven (schwarze Rauten) dargestellt.

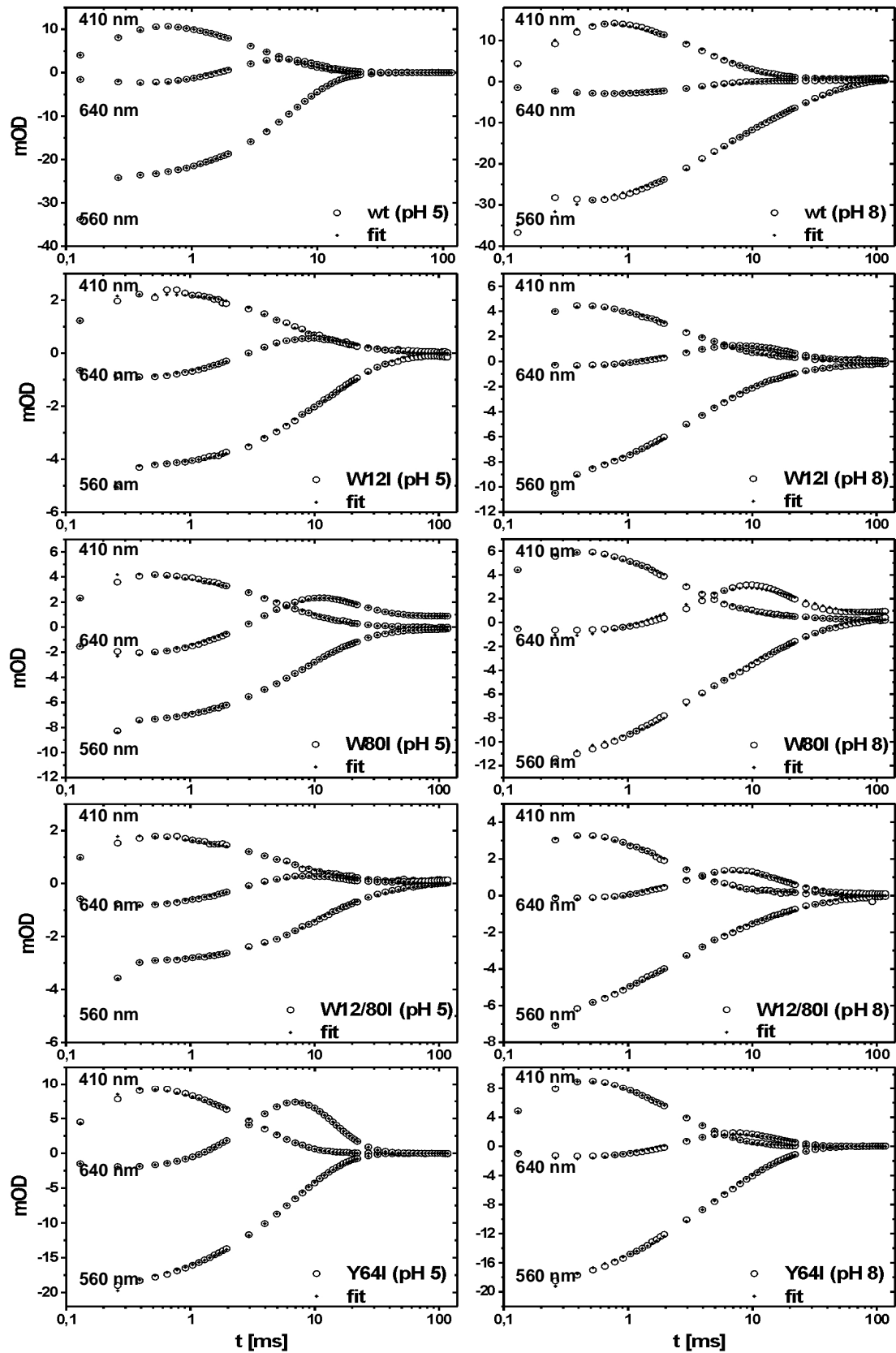


Abb. 3.8 Absorptionsverlauf bei WT und Mutanten nach laserinduzierter Absorptionsänderung bei pH 5 und pH 8 (obere Kurve: 410 nm (M-Intermediat), mittlere Kurve: 640 nm (O-Intermediat), untere Kurve: 560 nm (Ausgangszustand)). Die simulierten Absorptionsänderungen sind als schwarze Rauten, die experimentellen Werte als offene Kreise dargestellt.

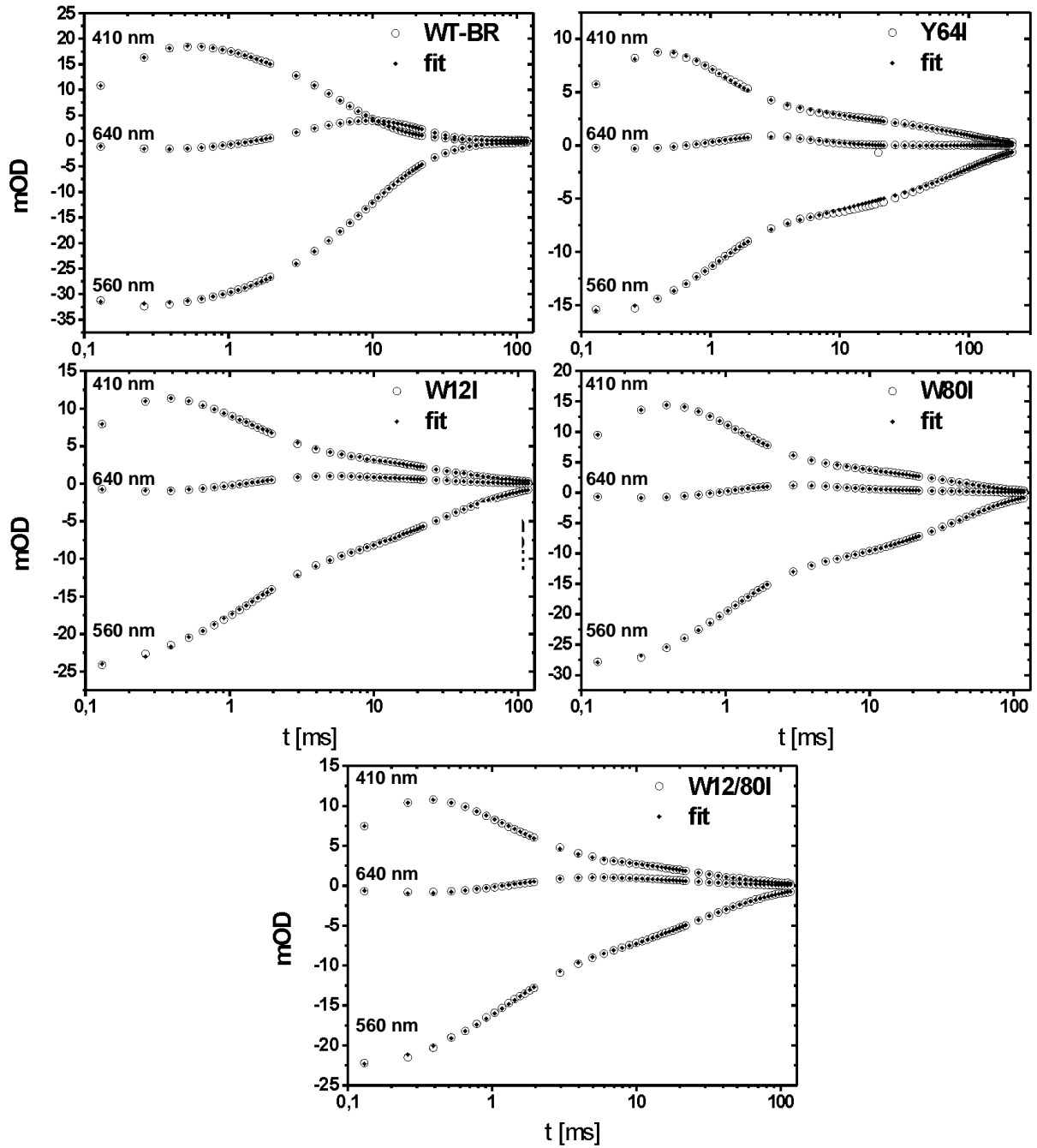


Abb. 3.9 Absorptionsverlauf bei solubilisierten Proben von WT und Mutanten nach laser-induzierter Absorptionsänderung bei pH 7 (obere Kurve: 410 nm (M-Intermediat), mittlere Kurve: 640 nm (O-Intermediat), untere Kurve: 560 nm (Ausgangszustand)). Die simulierten Absorptionsänderungen sind als schwarze Rauten, die experimentellen Werte als offene Kreise dargestellt.

3.2.4 Bestimmung der Isomerenverhältnisse des Retinals

Für die Bestimmung der Retinalisomerenverhältnisse bei WT-BR und Mutanten wurden Membranfraktionen verwendet, die über Saccharosegradienten gereinigt wurden. Für die Berechnung der Retinalverhältnisse wurde für alle *cis*-Isomere die Intensität der Banden mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten nach Plischka (2000) in dem verwendeten Laufmittel korrigiert (unten).

Isomer	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	Korrekturfaktor
all-trans	44300	1
13-cis	37800	1.17
9-cis	36500	1.21
11-cis	30800	1.44

Tab. 3.6: Extinktionskoeffizienten von Retinalisomeren in Ethylacetat/n-Hexan (5/95 %, v/v) nach Plischka (2000)

Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm aufgezeichnet. Dabei ist die Extinktion der betreffenden Isomeren um den in Tab. 3.6 angegebenen Faktor niedriger als die von *all-trans*-Retinal. Daher werden die Werte für die *cis*-Isomeren mit dem jeweiligen Wert multipliziert, so dass das molare Verhältnis angegeben werden kann. In Tab. 3.7 sind die Werte für WT-BR, Y64I, W12I, W80I sowie die Doppelmutante W12/80I zusammengestellt. Der Gehalt des jeweiligen Retinalisomeren ist als Anteil von der Gesamtretinalmenge (%) angegeben.

Probe	licht-adaptiert				dunkel-adaptiert			
	<i>all-trans</i>	<i>13-cis</i>	<i>11-cis</i>	<i>9-cis</i>	<i>all-trans</i>	<i>13-cis</i>	<i>11-cis</i>	<i>9-cis</i>
WT-BR (PM)	100.0	0.0	-	-	42.7	57.3	-	-
Y64 (PM)	96.6	3.4	-	-	48.3	51.7	-	-
W12I	79.1	9.3	1.0	10.6	43.0	55.8	-	1.2
W80I	73.5	8.8	3.4	14.3	46.1	53.2	-	0.7
W12/80I	60.7	15.7	4.0	19.6	43.5	50.9	-	5.6

Tab. 3.7: Retinalisomerenanteile in licht- und dunkeladaptierten Proben (in Mol%).

Die dunkeladaptierten Proben zeigen alle einen Überschuss an *13-cis*-Retinal wie in WT-BR. Die nicht-PM-Fractionen von W12I, W80I und der Doppelmutante enthalten daneben noch einen kleinen Anteil an *9-cis*-Retinal, der bis über 5 % bei W12/80I ansteigt. Die PM-Fraktion von Y64I zeigt einen etwas höheren *all-trans*-Anteil als WT-BR, enthält jedoch keine anderen *cis*-Isomeren.

Bei den lichtadaptierten Proben weichen die Werte der nicht-PM-Fractionen der Mutanten W12I, W80I und W12/80I jedoch wesentlich deutlicher von WT-BR ab, das bei vollständiger Lichtadaptation zu 100 % das all-*trans*-Isomer enthält. Während die kristalline PM-Fraktion der Mutante Y64I nur einen geringfügig niedrigeren Anteil all-*trans*-Retinal von etwa 97 % zeigt, enthalten die nicht-PM-Fractionen der anderen Mutanten weniger als 80 % all-*trans*-Retinal. Daneben finden sich *cis*-Isomere, deren Gesamtanteil rund 21 (W12I), 28 (W80I) bzw. 39 % (W12/80I) beträgt. Auffällig ist der in der gleichen Reihenfolge steigende Anteil an 9-*cis*-Retinal (10.6 bis 19.6 %). Bei diesem Isomer wird bei höheren pH-Werten (pH > 5) die kovalente Verknüpfung zu K216 in BR gelöst (Fischer *et al.*, 1981). In WT-BR tritt 9-*cis*-Retinal nach Belichtung der blauen PM ($\lambda_{\max} = 603$ nm), die bei niedrigen pH-Werten (< 3) entsteht, mit rotem Licht ($\lambda > 650$ nm) auf. Zunächst entsteht ein bei 500 nm absorbierendes BR, in dem das 9-*cis*-Retinal noch kovalent gebunden vorliegt. Wird der pH-Wert erhöht, dissoziiert das 9-*cis*-Isomer vom Protein, und es bildet sich Apoprotein mit freiem Retinal in der Bindungstasche ($\lambda_{\max} = 390$ nm). Durch Belichtung des O-Intermediats entsteht auch bei einem höherem pH-Wert von 6.5 eine bei 490 nm absorbierende Spezies, die ebenfalls 9-*cis*-Retinal enthält (Popp *et al.*, 1993). In den nicht-PM-Fractionen entsteht die 9-*cis*-Form ebenfalls bei Belichtung bei neutralem pH-Wert. Da die Mutante W80I einen um etwa drei pH-Einheiten verschobenen Übergang von der rotviolett zur blauen Form aufweist, könnte dies das Entstehen von 9-*cis*-Retinal während der Lichtadaptation bei pH 7 erklären. Im Gleichgewicht vorhandenes, rotverschobenes BR könnte analog zur blauen Form der PM zur 9-*cis*-Form übergehen. Die Belichtung während der Lichtadaptation erfolgt mit $\lambda > 530$ nm, so dass eine mögliche Rückreaktion des noch gebundenen 9-*cis*-Retinals (Maeda *et al.*, 1980), die bei kürzeren Wellenlängen abläuft, zur 13-*cis*- oder all-*trans*-Verbindung unwahrscheinlich ist. Die Entstehung der *cis*-Isomere in den nicht-PM-Fractionen deutet auf eine stabilisierende Wirkung des 2D-Kristalls für die all-*trans*-Konformation während der Belichtung hin, so dass gewährleistet wäre, dass durch den kristallinen Zustand alle Moleküle in den Ausgangszustand für die Pumpaktivität gelangen. Dieser Befund liefert eine mögliche Erklärung für den kristallinen Zustand von WT-BR in der Zellmembran. Um genauere Kenntnis über den Zustand der BR-Moleküle in der Membran zu erhalten, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Diese sollten Aufschluß über die detaillierten strukturellen Unterschiede der Zellmembran mit WT-BR und den Tryptophanmutanten geben.

3.2.5 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Membranfraktionen

Die Membranfraktionen von WT und den Mutanten W12I, W80I und W12/80I wurden über Saccharosegradienten isoliert und elektronenmikroskopisch untersucht, nachdem sie auf EM-Gitterplättchen mit Uranylacetat versetzt wurden. Bei der ungefärbten Probe würde das Protein den Kontrast liefern und dunkel erscheinen. Durch die sogenannte Negativfärbung mit Uranylacetat wird der Kontrast erhöht, indem sich das Schwermetall in Hohlräumen auf der Probe festsetzt und aufgrund seiner hohen Elektronendichte dunkel erscheint. Das Protein selbst erscheint dabei heller. In Abb. 3.10 sind die Aufnahmen der einzelnen Fraktionen zusammengestellt.

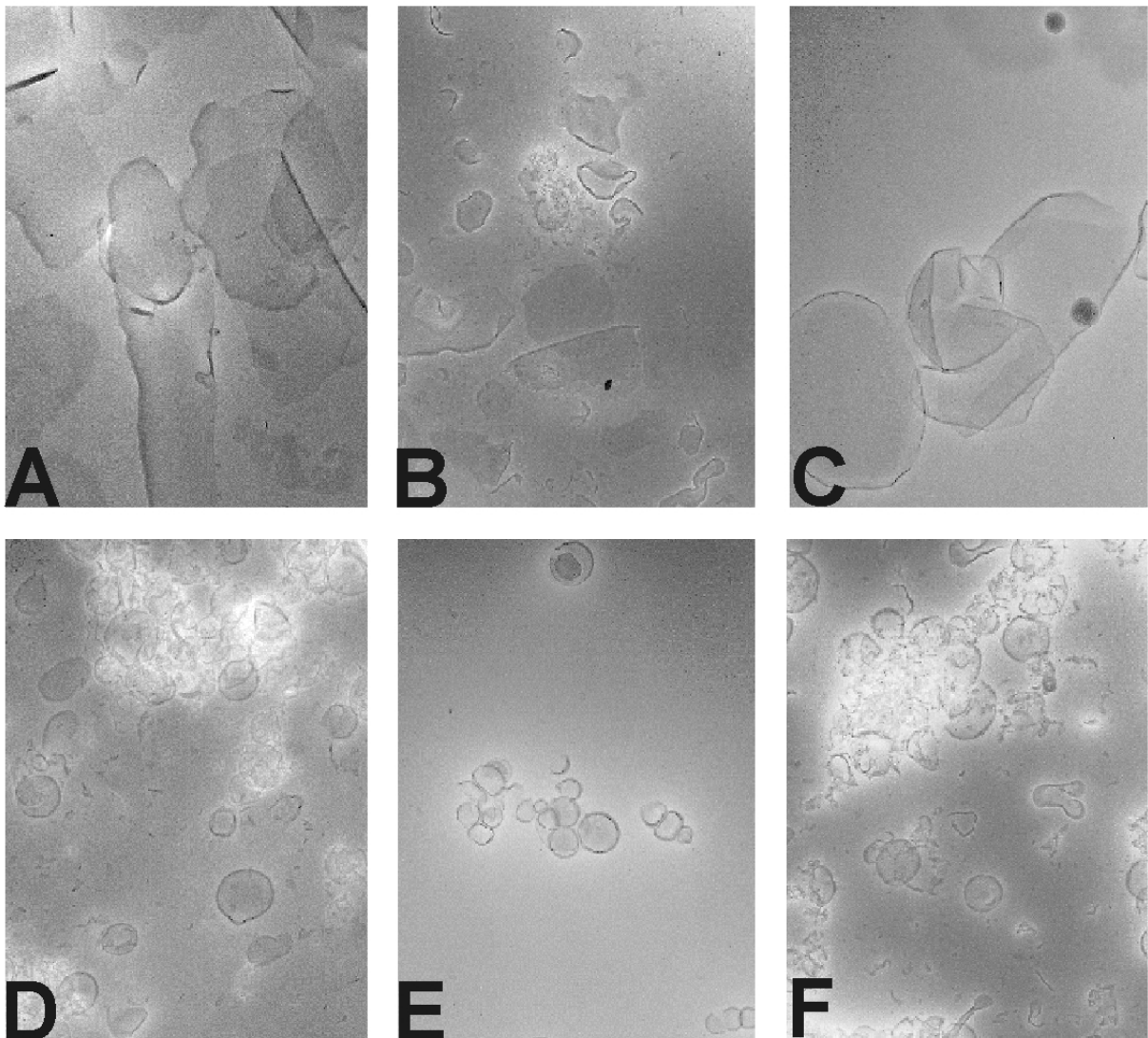


Abb. 3.10 EM-Aufnahmen von Membranfraktionen mit Uranylacetat-Färbung; **A**: WT-PM, **B**: W12I-PM, **C**: W80I-PM, nicht-PM-Fraktionen von W12I (**D**), W80I (**E**) und W12/80I (**F**).

Die PM aus WT-Zellen (**A**) weist die größten Flächen auf, während die PM-Fraktion von W12I zahlreiche kleinere Membranstücke neben wenigen größeren zeigt. Die PM-Fraktion

von W80I, die bei den meisten Präparationen nicht auftritt und bei einigen weniger als 1 % der BR-Menge ausmacht, zeigt dagegen kaum Unterschiede zum Wildtyp, was darauf hinweist, dass die beiden Tryptophanmutanten auf unterschiedliche Weise die PM-Bildung beeinträchtigen. Die untere Reihe (D - F) zeigt die nicht-PM-Fractionen von W12I, W80I bzw. der Doppelmutante W12/80I. Um die Anwesenheit von kristallinen Bereichen zu untersuchen, wurde die optische Diffraktion eines aufgeweiteten Laserstrahls durch die EM-Negative der einzelnen Proben untersucht. Die Membranstücke aus den nicht-PM-Fractionen sind nicht planar wie die PM-Fetzen und zeigen kein regelmäßiges Diffraktionsmuster im Gegensatz zur PM, wobei dies auch an der Größe und Krümmung der Oberfläche liegen könnte.

3.2.6 Gefrierbruchelektronenmikroskopie (EM) mit ganzen Zellen

Um Aufschluß über den Zustand der Zellmembran von intakten Zellen zu erhalten, wurden Gefrierbruchexperimente mit WT und den Mutanten W12I und W80I durchgeführt. Daneben wurden BR-freie SNOB-Zellen als Kontrolle verwendet.

Mit Hilfe der Gefrierbruchelektronenmikroskopie kann der Zustand einer Membran und die Lokalisierung der darin enthaltenen Membranproteine untersucht werden. Diese Methode wurde bereits häufig zur Charakterisierung von natürlichen oder künstlichen Membranen mit BR verwendet (Gulik-Krzywicki *et al.*, 1987, Sternberg *et al.*, 1992 und 1993, Usukura *et al.*, 1981). In Abb. 3.11 ist der Ablauf des Gefrierbruchprozesses schematisch dargestellt. Zunächst wird eine Zellsuspension auf einem Träger rasch in flüssigem Propan oder Stickstoff gefroren und in einer Gefrierbruchapparatur im Vakuum ($p < 10^{-6}$ bar) bei tiefen Temperaturen aufgebrochen. Dabei wird die Zellmembran häufig in der Mitte auseinandergerissen, so dass zwei Bruchflächen entstehen, in denen integrale Membranproteine eingebettet bleiben bzw. deren Löcher in der komplementären Hälfte. In der Regel befinden sich die meisten Proteine in der cytoplasmatischen Hälfte der Membran (P-Seite), da die integralen Proteine im gefrorenen Cytoplasma fixiert werden. Daher enthält die extrazelluläre Hälfte (E-Seite) der aufgebrochenen Membran wesentlich weniger Partikel. Zur Fixierung der Oberflächenstrukturen werden die Bruchflächen zunächst in einem spitzen Winkel (hier 35°) mittels einer platinbeschichteten Kohlenstoffelektrode bedampft und so eine wenige Nanometer dicke Schicht Platin/Kohlenstoff erzeugt. Diese enthält einen stabilen Abdruck der Membranoberfläche und wird anschließend von oben mittels einer zweiten Kohlenstoffelektrode bedampft und so mit einer 30 – 50 nm dicken Kohlenstoffschicht fixiert. Dieser dünne Film wird schließlich durch Abschweben vorsichtig abgezogen und nach der Reinigung auf ein Elektronenmikroskopgitter übertragen. Der große Vorteil dieser Methode ist die große Stabilität des erzeugten Ab-

drucks im Elektronenstrahl im Vergleich zu biologischen Präparaten. Dem steht jedoch die relativ niedrige Auflösung von 5 - 10 nm gegenüber.

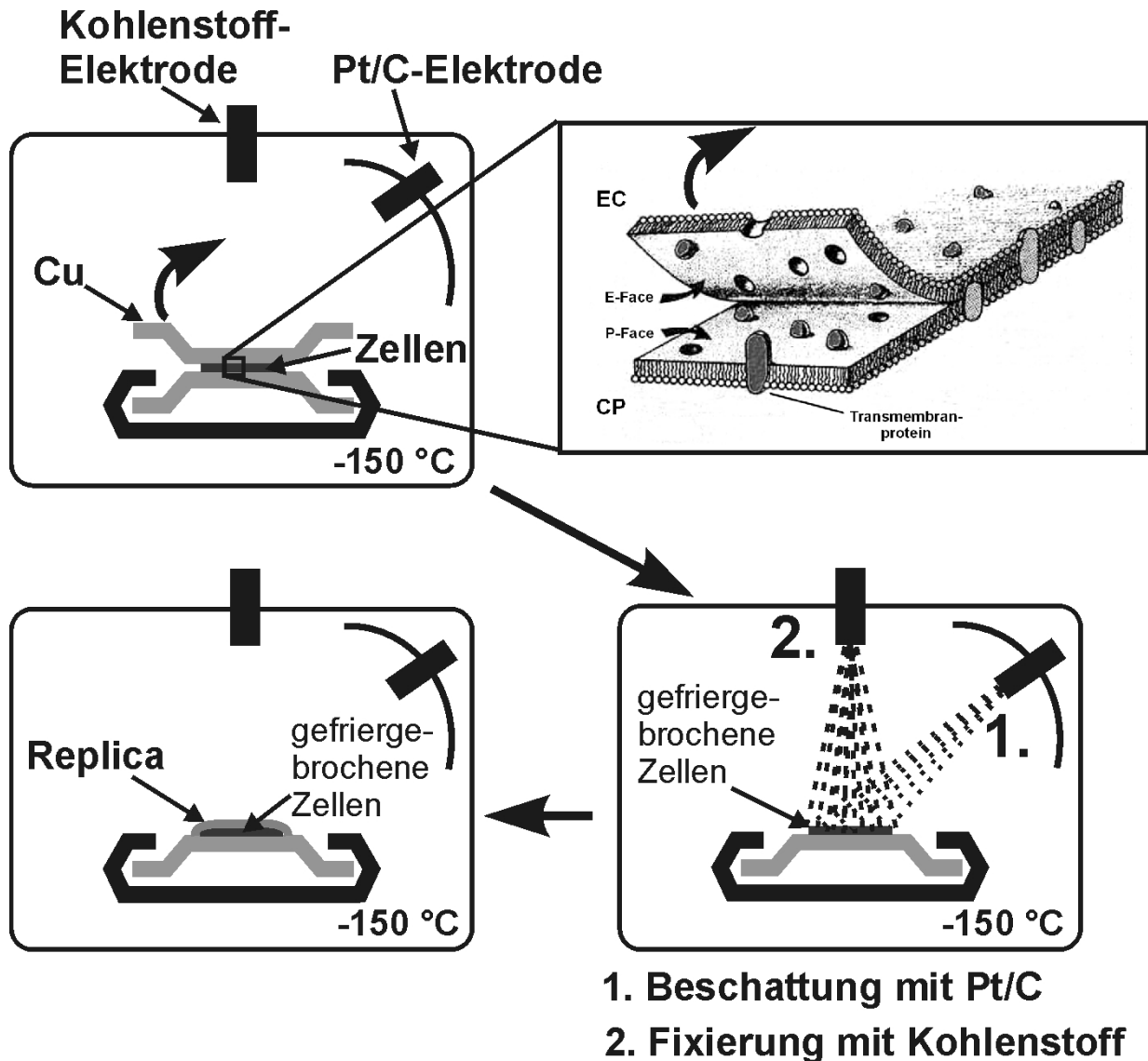


Abb. 3.11 Schematische Darstellung des Gefrierbruchprozesses mit anschließender Beschattung mit Platin/Kohlenstoff (Pt/C) und Kohlenstoff

Sechs Tage alte Kulturen mit (WT, W12I, W80I) und ohne BR (SNOB) wurden zentrifugiert, die Zellmasse zwischen zwei Kupferplättchen in flüssigem Propan schockgefroren, in einer Gefrierbruchapparatur gebrochen und mit Platin/Kohlenstoff beschattet. Nach Fixierung des so erhaltenen Abdrucks mit einer ca. 30 nm dicken Kohlenstoffschicht wurden die Replica in NaOCl-Lösung gereinigt und im Elektronenmikroskop betrachtet. Es wurden jeweils zwei Kulturen jeder Mutante für die Präparation verwendet. In Abb. 3.12 sind repräsentative Aufnahmen von den untersuchten Replica dargestellt.

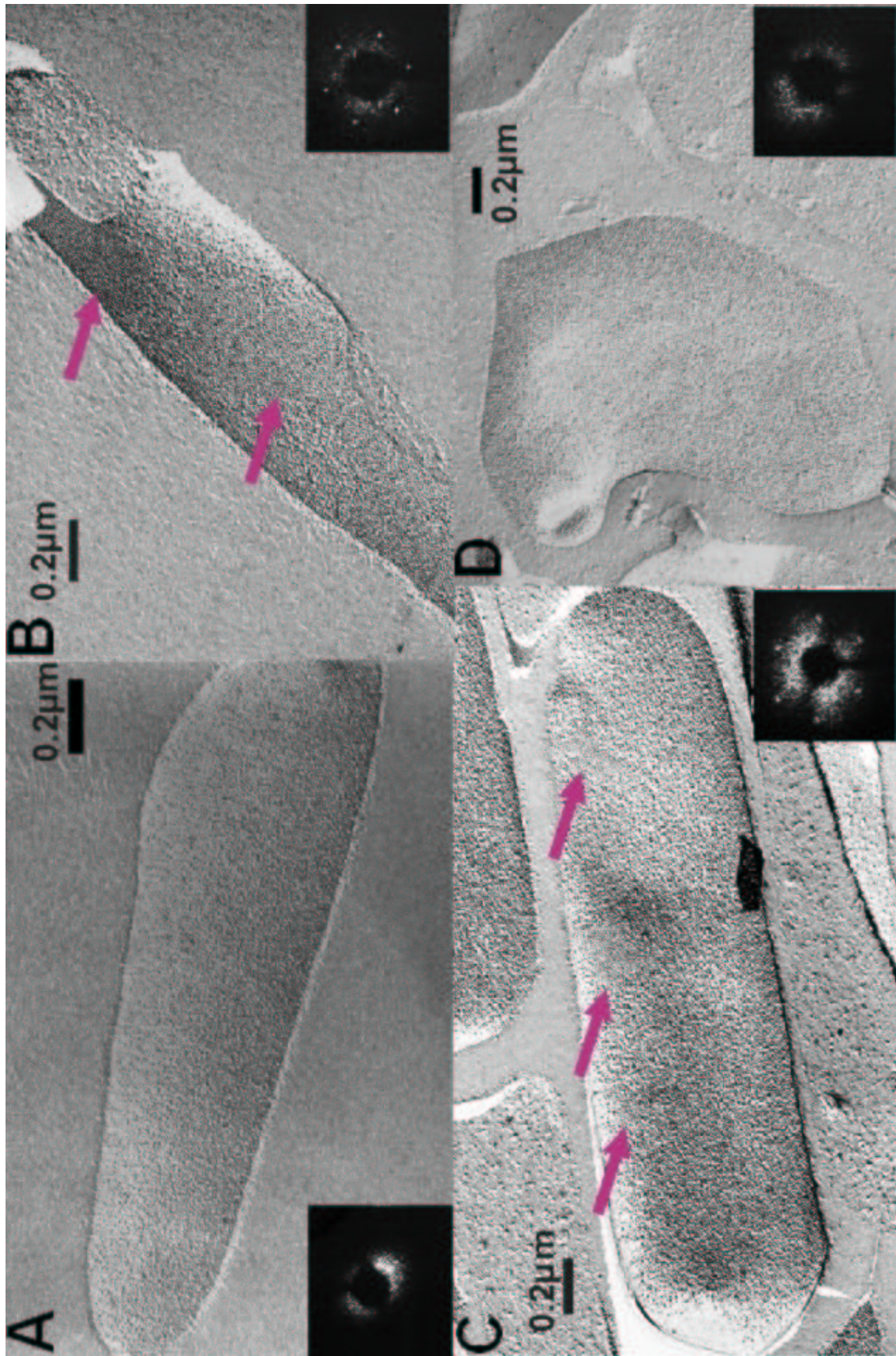


Abb. 3.12 Repräsentative EM-Aufnahmen von SNOB-Zellen ohne BR (A, Kontrolle), WT (B), W12I (C) und W80I (D). Kontrolle und W80I zeigen keine kristallinen Bereiche, während WT und W12I PM-Flächen (Pfeile) hexagonale Diffraktionsmuster aufweisen, wie die eingefügten Beugungsbilder beweisen.

Die Gefrierbruchaufnahmen bestätigen die Bilder, die von den uranylacetatgefärbten Membranfraktionen gemacht wurden. Auf den WT-Zellen (**B**) sind deutlich (Pfeile) die großen PM-Bereiche zu erkennen, die ein hexagonales Diffraktionsmuster zeigen. Die W12I-Zellen weisen überwiegend mehrere kleinere Bereiche (Pfeile in **C**) auf, die kristalline Ordnung besitzen. Größere PM-Bereiche wie bei WT-Zellen sind nur auf wenigen W12I-Zellen zu sehen. Dagegen ist die Oberfläche von fast allen Zellen mit W80I (**D**) gleichmässig mit Partikeln besetzt, die jedoch ebenso wie die Kontrollzellen (SNOB) keine Kristallinität aufweisen. Nur auf drei von 40 Aufnahmen ist auf W80I-Zellen jeweils eine kleine PM-Fläche zu sehen.

Aufgrund der Beobachtung, dass bei WT-Zellen das gesamte BR in Form von PM isoliert wird, ergibt sich die Möglichkeit, eine genauere Bestimmung des Flächenverhältnisses von PM zur Gesamtoberfläche durchzuführen. Unter der Annahme, dass die sichtbaren Zelloberflächen repräsentativ für die Gesamtoberfläche sind, wurde die Flächengröße der Membranen und der darin enthaltenen kristallinen Bereiche bestimmt. Der Fehler, der sich aufgrund der Krümmung der Zellen ergibt, wurde vernachlässigt. Zunächst wurden die Negative mit einer Vergrößerung von 26000 oder 33000 auf Fotopapier abgebildet und auf DIN A4-Papier kopiert. Für jede Probe wurden die EM-Aufnahmen der gefriergebrochenen Zellen ausgewertet, indem die sichtbaren Membranbereiche ausgeschnitten und auf einer Waage bis auf 10 µg genau abgewogen wurden. Die Ungenauigkeit der Wägung lag bei weitem niedriger als die Abweichungen beim Gewicht eines A4-Bogens von unter 1 %. Aus diesen Stücken wurden dann die deutlich sichtbaren PM-Bereiche ausgeschnitten und erneut gewogen. Das Massenverhältnis zwischen PM und Gesamtoberfläche wurde als hinreichend genaue Schätzung des BR-Anteils in der PM angenommen.

Die EM-Bilder von 20 (WT) bzw. 40 Zellen (W12I, W80I) wurden für die Auswertung verwendet. In der folgenden Tabelle sind die ermittelten Flächenverhältnisse für WT und Mutanten zusammengefasst.

	BR-Menge [%]	PM-Fläche [%]	theoret. PM-Fläche
WT	100	47.4	-
W12I	25	5.4	~12 %
W80I	35	0.6	~16 %

Tab. 3.8: Flächen der kristallinen Bereiche auf den Zellen mit WT-BR, W12I und W80I im Verhältnis zur Gesamtfläche der sichtbaren Membran.

Bei den Mutanten wird entsprechend der BR-Menge in den Zellen mit 25 (W12I) bzw. 35 % (W80I) vom WT ein Anteil der PM-Fläche von etwa 12 bzw. 16 % der Gesamtfläche erwartet, wenn die Kristallisationstendenz die gleiche wie in WT wäre. Bei W12I liegt der Wert jedoch bei 5.4 %, so dass etwas weniger als die Hälfte der BR-Moleküle in kristalliner Form

vorliegen. Im Saccharosegradienten werden jedoch nie mehr als 15 % der BR-W12I-Menge als PM isoliert. Anscheinend befinden sich 60 - 70 % der kristallinen Bereiche in der nicht-PM-Fraktion, die somit etwa 40 % der BR-Moleküle in dieser Fraktion ausmachen. Dies steht im Einklang mit den EM-Aufnahmen, in denen zahlreiche kleinere PM-Bereiche beobachtet werden. Bei der Zellyse können solche kleinen kristallinen Bereiche in spezifisch leichteren Membranstücken eingeschlossen und daher nicht als PM isoliert werden. In manchen Präparationen von W12I wurde keine PM gefunden, was mit der geringen Größe der vorhandenen kristallinen Bereiche erklärt werden kann.

Bei W80I ist die Abweichung der gefundenen PM-Fläche mit 0.6 % der Gesamtfläche von den erwarteten 16 % wesentlich größer und bestätigt die Beobachtung im Saccharosegradienten, in dem weniger als 1 % des BR als PM isoliert werden. Im Unterschied zu W12I weisen nur sehr wenige W80I-Zellen kristalline Bereiche unterschiedlicher Größe auf der Oberfläche auf, während bei W12I auf den meisten Zellen kleine kristalline Bereiche gefunden werden. Da die Gefrierbruchmethode bestenfalls eine Auflösung von 5 nm besitzt, konnte mit dieser Methode nicht geklärt werden, ob das BR in nicht-kristallinen Bereichen in Form von Monomeren oder Oligomeren vorliegt, zumal sich auf der Zelloberfläche auch andere Membranproteine befinden, die nicht von BR zu unterscheiden sind. Da keine direkte Methode zur eindeutigen Unterscheidung zwischen frei diffundierendem monomeren BR und Oligomeren in der nativen Membran vorhanden ist, wurde dieses Problem mit anderen Methoden angegangen. Es wurde darauf geachtet, dass dabei die natürlichen Lipidumgebung von BR erhalten blieb und keine Schritte benötigt wurden, die den Einsatz von Detergenzien erforderten.

3.2.7 Rotationsdiffusions-Messungen in Vesikeln

In einer Lösung mit frei beweglichen Farbstoffmolekülen ist die Wechselwirkung mit unpolarisiertem Licht isotrop, d.h. unabhängig von der Orientierung des Übergangsdipolmoments eines Chromophors. Linear polarisiertes Licht wird dagegen unterschiedlich stark absorbiert, je nachdem, wie groß der Vektor des Übergangsdipolmoments eines Chromophors in der Richtung des Polarisationsvektors ist. Die Absorption ist daher minimal, wenn der Übergangsdipolvektor senkrecht zur Polarisationssebene des Lichts steht. Wird eine Lösung mit einem polarisierten Lichtstrahl angeregt und mit einem zweiten, ebenfalls polarisierten Strahl die Absorption der Probe gemessen, so ist aufgrund der schnellen Rotation der gelösten Farbstoffmoleküle ein Unterschied in der Absorption nicht messbar.

Ist die Rotation in einer Raumrichtung eingeschränkt, so kann mit polarisiertem Anregungs- und Meßlicht mit unterschiedlicher Orientierung eine unterschiedlich hohe Absorptionsände-

rung detektiert werden. Aufgrund der Anregung ist die Anzahl der Chromophore, die in paralleler oder senkrechter Orientierung zum Meßlicht stehen, unterschiedlich hoch. Bei parallelen Polarisationsvektoren der Anregungs- und Meßlichts absorbieren weniger Moleküle das Meßlicht als bei orthogonal polarisierten Lichtstrahlen. In Abb. 3.13 ist dieser Vorgang vereinfacht für zwei Orientierungen eines Chromophors (graue Pfeile) dargestellt.

Zur Messung der Mobilität der BR-Moleküle in der Membran wurde die zeitliche Änderung der Absorptionsanisotropie für, relativ zum anregenden Laserlicht, parallel und senkrecht polarisiertes Meßlicht gemessen. Dabei wurde die Eigenschaft von BR ausgenutzt, bei Anregung in das blauverschobene M-Intermediat überzugehen, das im Millisekundenbereich zerfällt. Nach der Anregung sinkt die Absorption des Moleküls beim Absorptionsmaximum des Ausgangszustand ab und kommt nach Durchlaufen des Photzyklus auf den ursprünglichen Wert zurück. Durch Verfolgen des Wiederanstiegs der Absorption bei 550 nm kann somit die Anisotropie von BR-Molekülen in der PM bestimmt werden. Da BR in der PM nicht um die Membrannormale rotieren kann, zeigt es bei der Absorption unterschiedlich polarisierter Lichtstrahlen eine deutliche Anisotropie, die über mehrere Millisekunden nahezu konstant ist. Daher zeigen BR-Moleküle, die nicht im kristallinen Verband immobilisiert sind, klare Unterschiede zu BR in der PM im zeitlichen Verlauf der Anisotropie.

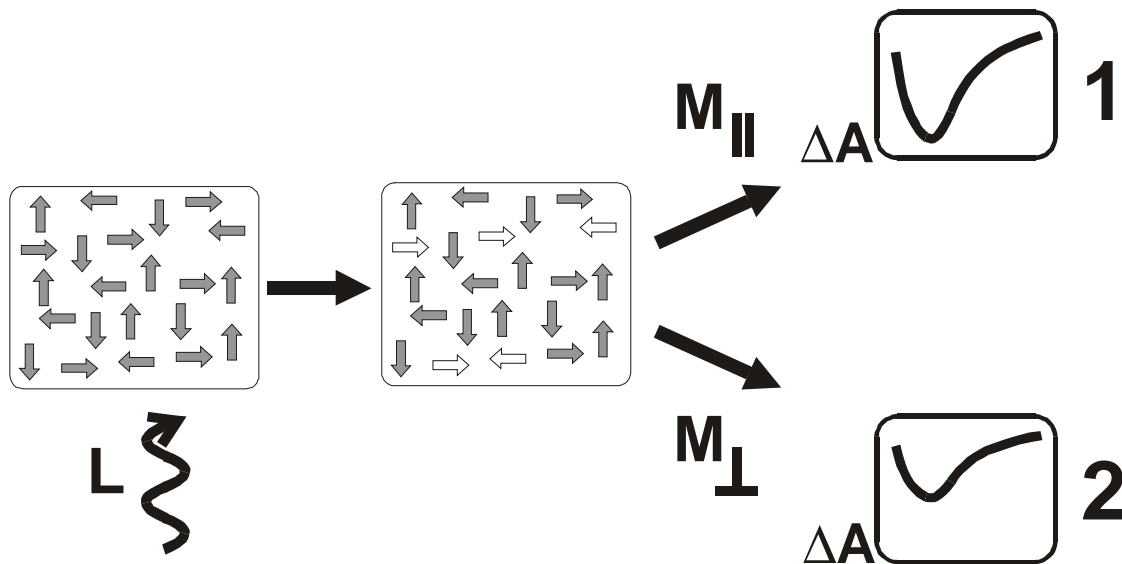


Abb. 3.13 Eine anisotrope Probe wird mit polarisiertem Laserlicht (L) angeregt und die Absorption mit dazu parallel (M_{\parallel}) bzw. senkrecht (M_{\perp}) polarisiertem Licht gemessen. Eine, im Vergleich zu M_{\perp} , kleinere Anzahl günstig orientierter Chromophore (\Rightarrow) führt bei M_{\parallel} zu einer geringeren Absorption (1), d.h. negativerem Differenzspektrum (ΔA) als bei M_{\perp} (2). Angeregte Chromophore (∇) tragen nicht zur Absorption bei.

Diese Anisotropie der Absorption ist abhängig von der Rotationsgeschwindigkeit der Moleküle und gibt daher Aufschluss über deren Beweglichkeit in einer bestimmten Umgebung. Als

Maß für die Anisotropie einer Probe dient der Anisotropieparameter $r(t)$ (s. 5.4.11), dessen zeitabhängiger Verlauf bei BR gemessen wurde.

Die Rotation der BR-Moleküle um die Membrannormale kann nur untersucht werden, wenn man die Bewegung der Membranfragmente selbst vernachlässigen kann. Um dies zu gewährleisten, wurden für die Messung Vesikel hergestellt, deren Rotationsbewegung aufgrund ihrer Größe im relevanten Zeitraum (< 5 ms), in dem die Rotation und Absorptionsänderung von BR stattfindet, keinen signifikanten Beitrag zur Rotation der BR-Moleküle leistet. Der Versuchsaufbau entsprach dem bei den Messungen des Photozyklus (s. 3.2.3.2), wobei zusätzlich Polarisationsfilter zwischen Anregungs- bzw. Meßlicht und der lichtadaptierten Probe positioniert waren. Mit den Filtern wurde die Polarisation der beiden Lichtstrahlen relativ zueinander eingestellt. Da die Wellenlänge des Lasers bei 560 lag, wurde die Absorptionsänderung bei 550 nm verfolgt. Die gemessenen Werte sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.

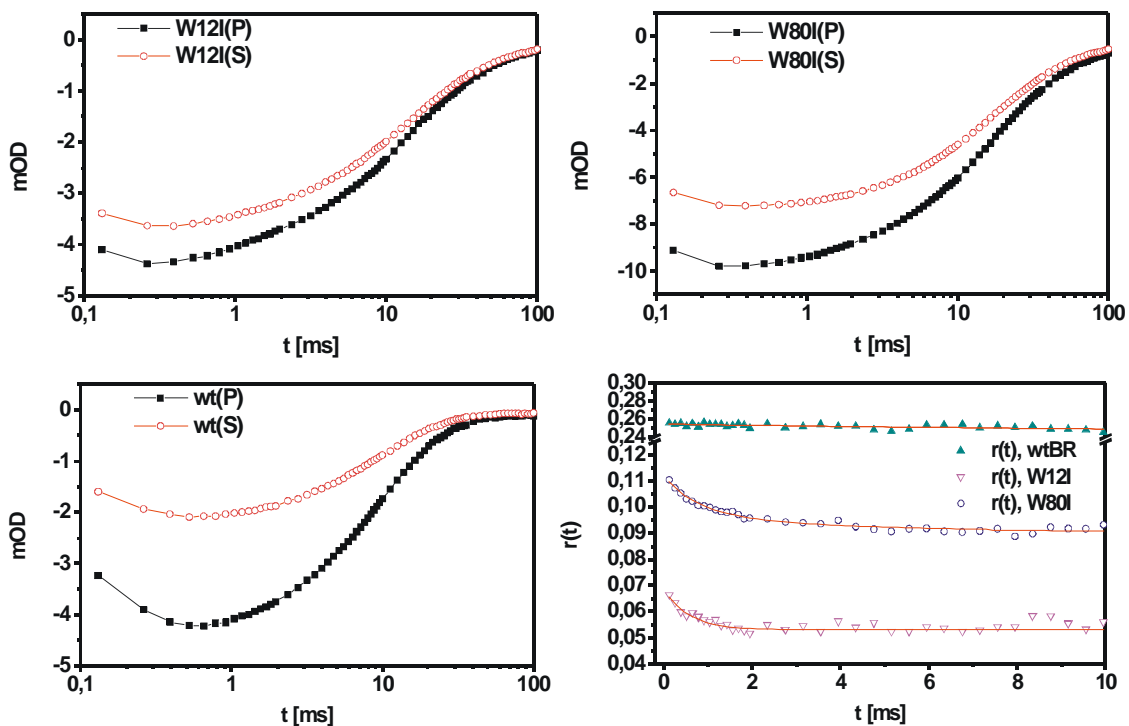


Abb. 3.14 Rotationsdiffusionsmessungen mit W12I, W80I und WT-BR in Vesikeln durch Verfolgen der Absorption bei 550 nm (P: parallel, S: senkrecht). Die zeitliche Änderung des Anisotropieparameters $r(t)$ (unten rechts) bei den Mutanten deuten auf eine deutliche Zunahme der Mobilität und somit eine Auflockerung des rigiden Kristallgitters hin.

Die Änderung von $r(t)$ von WT-BR entspricht dem bereits in der Literatur bekannten Verlauf und weist auf die starre, kristalline Anordnung der BR-Moleküle in der PM hin (Cherry *et al.*, 1977). Dagegen ist bei beiden Mutanten eine deutliche Abnahme von $r(t)$ innerhalb der ersten

1 - 2 ms zu beobachten, was auf eine größere Mobilität der Moleküle schließen läßt. Dies spricht für eine Auflockerung des Kristallgitters. Es ist jedoch mit dieser Methode eine Unterscheidung zwischen Monomeren und kleineren, möglicherweise ähnlich schnell rotierenden Oligomeren nicht möglich. Eine quantitative Aussage über die Größe der rotierenden Teilchen würde die Kenntnis des Diffusionskoeffizienten für BR in der Membran voraussetzen, der nicht genau bekannt ist. Der Unterschied in der Absorption zwischen WT-BR und den Mutanten ist auf den unterschiedlichen BR-Gehalt der Vesikel zurückzuführen. Aufgrund der geringeren BR-Menge bei W80I und W12I (~ 40 % bzw. 25 % von WT-BR) mußten entsprechend mehr Vesikel für die Messung eingesetzt werden, um gleich viel BR in jeder Probe zu haben. Wegen der hohen Lichtstreuung wurde die Lichtintensität des anregenden Lasers etwa doppelt so hoch wie bei WT-BR eingestellt, um ein genügend hohes Signal der Absorptionsänderung zu erhalten. Dadurch war eine Abnahme der absoluten Anisotropie unvermeidbar, da mit höherer Lichtintensität auch die Anregungswahrscheinlichkeit von weniger günstig orientierten Chromophoren zunimmt, woraus ein kleineres $r(t)$ resultiert. Auf den zeitlichen Verlauf von r , der die Mobilität der BR-Moleküle in der Membran anzeigt, hatte die Zunahme der Lichtintensität jedoch keinen Einfluß. Damit zeigen diese Messungen eine deutliche Zunahme der Rotationsmobilität der BR-Moleküle bei beiden Mutanten im Vergleich zu WT-BR in der PM.

3.2.8 Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie

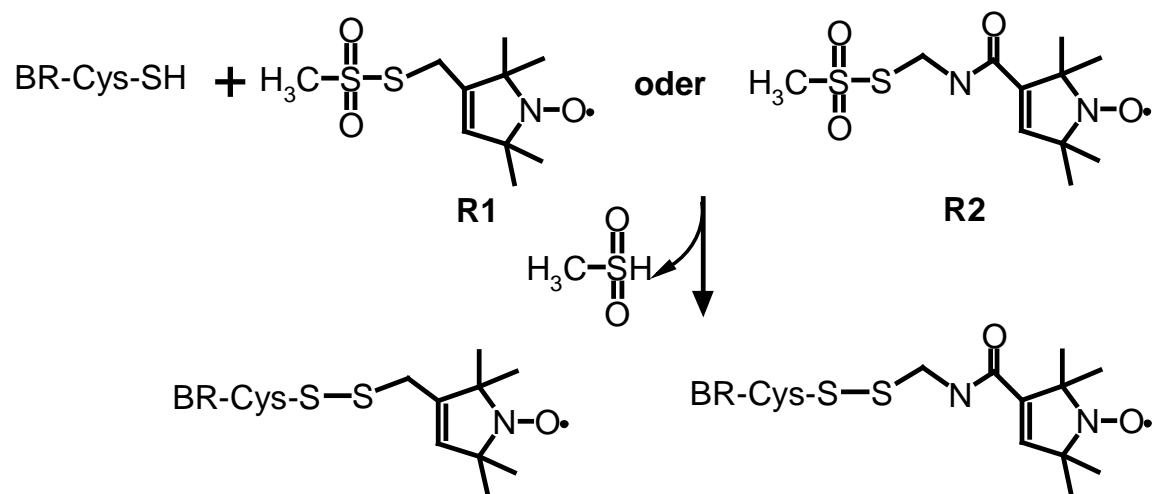
BR enthält kein Cystein, so dass es gut geeignet ist für die Einführung von Cystein in definierten Positionen und die anschließende Markierung mit SH-spezifischen Farbstoffen oder paramagnetischen Spinsonden für die ESR (Rink *et al.*, 1997; Steinhoff *et al.*, 1995).

Um die Anordnung der BR-Moleküle in den Membranen der Mutanten zu untersuchen, wurden Cysteinreste an Positionen eingeführt, die auf die 2D-Kristallisation keinen Einfluß haben und keine funktionelle Bedeutung besitzen (Q105C, G106C, T157C). Es wurden Reste ausgewählt, die nach Markierung mit einer Nitroxid-Spinsonde aufgrund ihrer Nähe zu der entsprechenden Seitenkette in benachbarten BR-Molekülen dipolare Wechselwirkungen ihrer Nitroxidseitenketten zeigen sollten.

Unter ESR versteht man die resonante Absorption von Mikrowellenstrahlung durch paramagnetische Substanzen. Hierbei werden Übergänge zwischen den unterschiedlichen Energieniveaus von ungepaarten Elektronenspins induziert. Aufgrund der Wechselwirkung mit dem magnetischen Moment eines Atomkerns mit dem Kernspin I kann das Elektron in einem externen Magnetfeld $2I + 1$ Werte annehmen. Dies führt zur sogenannten Hyperfeinaufspaltung

der ESR-Absorptionslinie. Die Absorptionslinien des ESR-Spektrums werden, bedingt durch die Art des Detektors, nicht direkt detektiert, sondern das resultierende Signal entspricht der ersten Ableitung der Absorptionkurve. Dadurch erhält man die charakteristische Signalform der in Abb. 3.16 dargestellten Spektren. Im Falle der für Proteinseitenketten verwendeten Nitroxidverbindungen befindet sich das ungepaarte Elektron im p-Orbital des Stickstoffatoms in Wechselwirkung mit dem ^{14}N -Kern, der einen Kernspin von 1 besitzt. Dies führt zu einer Aufspaltung in drei Hyperfeinlinien.

Die in den folgenden Experimenten verwendeten Spinsonden sind Thiosulfonatverbindungen, die mit SH-Gruppen reagieren können und eine Nitroxidgruppe als paramagnetische Komponente enthalten, so dass das modifizierte BR mittels ESR-Spektroskopie untersucht werden kann.



R1:MTSSL, (1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-yl)methanthiosulfonat

R2:MTS-4-Oxyl, (1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-yl)carbamidomethylmethanthiosulfonat

Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie können in Nitroxid-markierten Proteinen die Mobilität und Polarität der Umgebung einer bestimmten Seitenkette sowie der Abstand zwischen benachbarten Spinsonden im Bereich von 1 - 2 nm bestimmt werden, da mit abnehmendem Abstand der Sonden dipolare Spin-Spin-Wechselwirkungen stärker werden, was zu einer messbaren Linienverbreiterung führt. Durch geeignete Wahl der Parameter können simulierte Spektren den experimentellen Daten angepaßt und daraus ein mittlerer Abstand der Seitenketten bestimmt werden (Steinhoff *et al.*, 1997). Die gemessenen Unterschiede in der Linienbreite erscheinen zwar gering (s. Abb. 3.17), sind jedoch ausreichend für eine Beurteilung der dipolaren Wechselwirkungen der Nitroxidmoleküle.

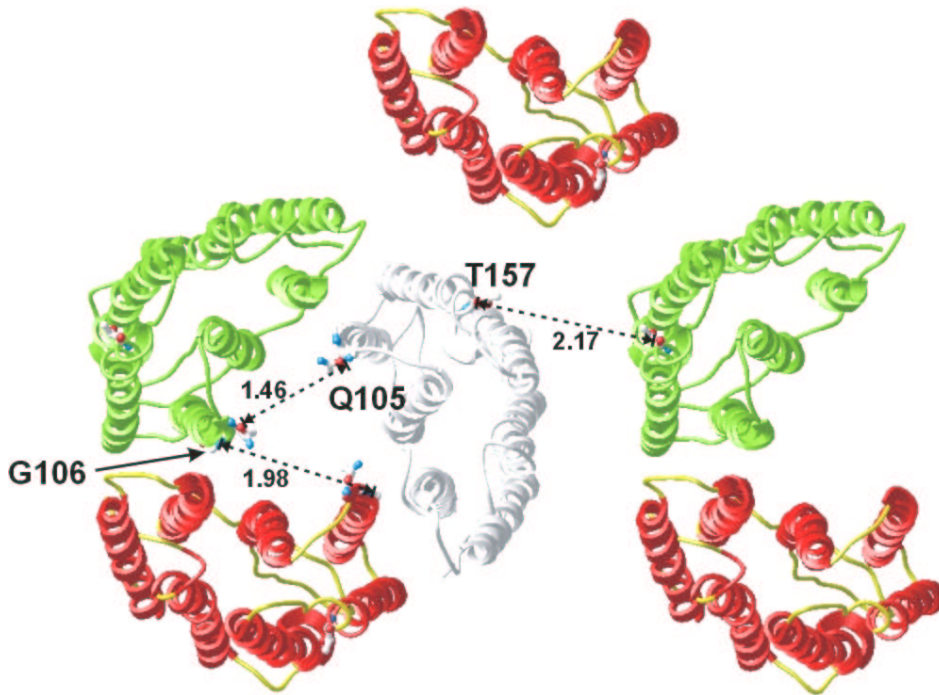


Abb. 3.15 Modell der PM mit markierten Resten auf der cytoplasmatischen Seite. Die Abstände zu den C α -Atome der symmetrieverwandten Reste sind in nm angegeben.

In Abb. 3.15 sind die markierten Positionen in einem Trimer dargestellt. Alle Reste befinden sich auf der cytoplasmatischen Seite der Membran, um Störungen der Protein-Lipid-Wechselwirkungen auf der extrazellulären Seite auszuschließen.

Die Einführung einer zweiten Mutation in W12I und W80I führt zu keiner signifikanten Änderung der Verteilung von BR im Saccharosegradienten, wobei die Ausbeute an BR etwa gleich hoch ist. Die Cystein-Einzelmutanten zeigen keine Störung der PM-Bildung. Die spektroskopischen Eigenschaften sind im Vergleich zu den Einzelmutanten W12I und W80I bzw. WT-BR ebenfalls unverändert. Es wurden Raum- und Tieftemperaturspektren (170 K) aufgenommen. Alle Proben enthielten nach der Markierung noch ungebundene Spinsonden-Moleküle, die auch durch mehrfaches Waschen nicht entfernt werden konnten. Daher weisen einige Spektren zusätzliche scharfe Peaks auf, die jedoch die Auswertung nicht beeinträchtigen (Steinhoff, pers. Mitteilung). Der Markierungsgrad war bei allen Proben ähnlich hoch, so dass hier die Vergleichbarkeit gewährleistet ist. Die nicht-PM-Fractionen der Einzelmutanten W12I und W80I wurden als Kontrollen eingesetzt, um den Einfluß der restlichen Proteine in der Membran zu untersuchen. Durch Markierung dieser Membranfraktionen wurde das Signal bestimmt, das von den restlichen Proteinen in diesen Fraktionen herrührte. Es stellte sich heraus, dass das Signal von anderen markierten Proteinen weniger als 10 % des BR-Signals bei der jeweiligen cysteinmarkierten Mutante betrug, so dass die Interpretation der Ergebnisse für die spinmarkierten Membranfraktionen nicht beeinträchtigt war. Der Makierungsgrad war bei

allen Proben einer Messreihe ähnlich hoch, so dass die Spektren nicht durch unterschiedliche Verhältnisse von BR zu Spinsonde verfälscht wurden. Alle dargestellten Spektren sind spinzahlnormiert, so dass ein direkter Vergleich der Signale möglich ist.

Die Spinsonden an Q105C bzw. G106C sollten starke dipolare Wechselwirkungen innerhalb eines Trimers aufweisen, was die Unterscheidung zwischen aggregierten und monomeren BR-Molekülen ermöglichen sollte. Analog sind bei der Mutante T157C dipolare Wechselwirkungen von Sonden in benachbarten Trimeren zu erwarten.

Es wurde festgestellt, dass die Spinsonden in der Mutante Q105C nicht die erwartete dipolare Wechselwirkung mit der Sonde am benachbarten Molekül besitzen. Demnach ist die Orientierung der Spinsonden im Vergleich zu der Orientierung der Seitenkette von Q105 signifikant verändert. Daher wurde für diese Mutante eine andere Nitroxid-Verbindung mit einer längeren Seitenkette verwendet (MTS-4-Oxyl). Der resultierende kleinere Abstand der benachbarten Sonden führte zu unterschiedlichen Signalen bei der Einzel- (Q105C) und den Doppelmutanten (W12I/Q105C, W80I/Q105C). Dies wird auch mit der kürzeren Spinsonde (MTSL) bei der Einzelmutante G106C bestätigt, bei der eine deutliche Linienverbreiterung auf einen kleineren Abstand der Spinsonden in der PM hinweist. Zum Vergleich sind die Spektren für die Mutanten Q105C und G106C mit der kurzen Nitroxidseitenkette in Abb. 3.16 dargestellt.

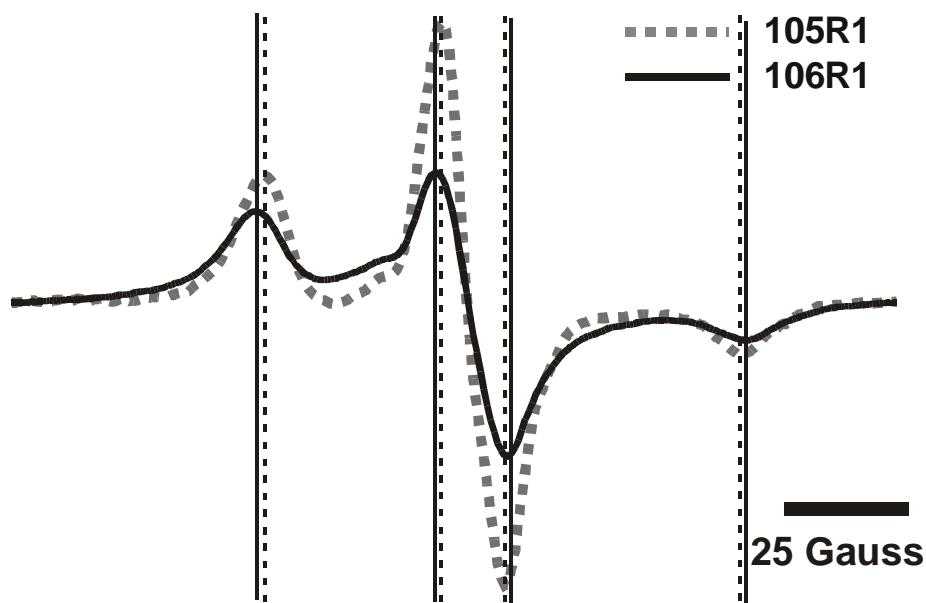


Abb. 3.16 Spinzahlnormierte Spektren von Nitroxid-markiertem 105C (105R1) und 106C (106R1). Die deutliche Linienverbreiterung (größere Abstände zwischen durchgezogenen Linien) weist auf einen kleineren Abstand zwischen den Spinsonden bei 105R1 hin.

In Abb. 3.17 sind die Spektren für die Einzel- und Doppelmutanten dargestellt. Die markierten Seitenketten werden mit 105R1, 105R2, 157R1, 106R1 bezeichnet.

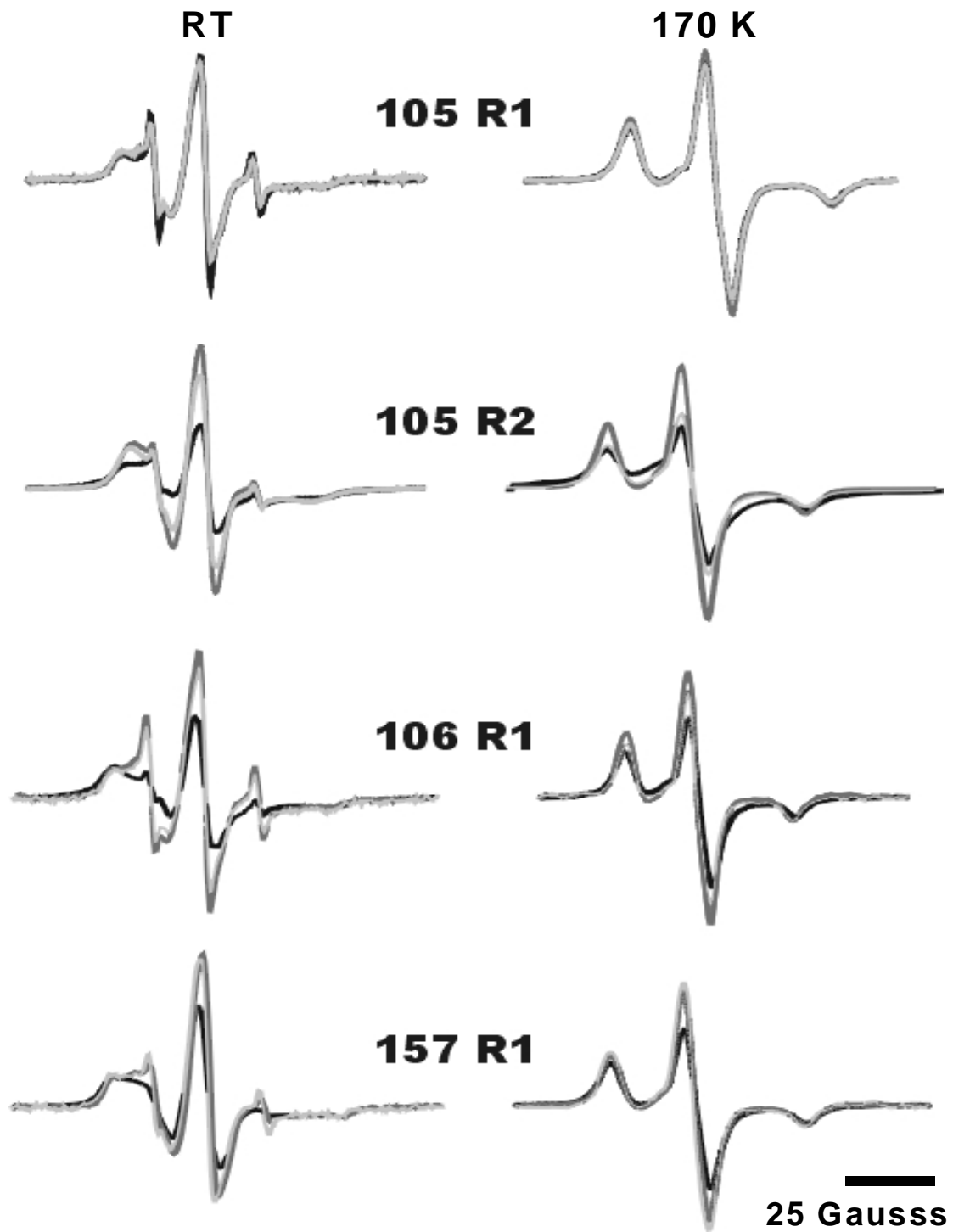


Abb. 3.17 Spinzahlnormierte Spektren von Nitroxid-markierten Einzelmutanten (schwarz) 105C (105R1 + 105R2), 106C (106R1) und 157C (157R1) mit den jeweiligen Doppelmutanten mit W12I (dunkelgrau) bzw. W80I (hellgrau) aufgenommen bei RT (links) und 170 K (rechts).

Die dipolaren Wechselwirkungen nehmen in allen W12I-Doppelmutanten stärker ab als in den W80I-Doppelmutanten. Das gilt sowohl für die Mutationen 105C und 106C, als auch für die intertrimere Mutation 157C. Die Simulation der Tieftemperaturspektren für die Mutanten liefern Werte für den mittleren Abstand, die in folgender Tabelle zusammengefaßt sind.

Markierung	mittl. Abstand \pm mittl. Verteilungsbreite [nm]
105R1	1.8 \pm 0.8
W12I/105R1	> 2
W80I/105R1	2.0 \pm 1.2
105R2	1.3 \pm 1.0
W12I/105R2	> 2
W80I/105R2	1.8 \pm 0.8
106R1	1.7 \pm 0.6
W12I/106R1	> 2
W80I/106R1	2.0 \pm 1.0
157R1	1.7 \pm 0.8
W12I/157R1	> 2
W80I/157R1	> 2

Tab. 3.9: Abstände der Spinsonden an Cysteinresten in kristallinen Einzelmutanten und nicht-kristallinen Doppelmutanten, die durch Simulation der Linienverbreiterung aufgrund dipolarer Wechselwirkungen ermittelt wurden.

Für die beiden inneren Mutationen W12I/105C und W12I/106C ist keine signifikante Linienverbreiterung festzustellen. Durch Spektrensimulation war kein bestimmter Wert für den Abstand zu ermitteln, so dass der mittlere Abstand der Spinsonden größer als 2 nm sein muß. Die Situation ist ähnlich für beide Doppelmutanten mit 157C. Bei diesen ist der mittlere Abstand der Sonden größer als 2 nm, während für die kristallinen Einzelmutanten 106C und 157C ein mittlerer Abstand von 1.7 nm (\pm 0.6 bzw. 0.8 nm) ermittelt wird. Der deutlich kleinere Wert für 105R2 (1.3 nm gegenüber 1.8 nm mit R1) ist auf die längere Seitenkette der Spinsonde zurückzuführen. Auch bei dieser Position ist für W12I mit beiden Spinsonden durch Simulation kein Abstand zu ermitteln, während W80I/105R1(R2) gegenüber der Einzelmutante deutlich vergrößerte Abstände ergibt.

Die Aussagekraft dieser Simulationen wird durch die Tatsache geschmälert, dass eine Simulation der Spektren für eine Mischung von kristallin angeordneten und ungeordneten BR-Molekülen bereits ab einem relativen Anteil von etwa 30 % ungeordneter Moleküle keinen Unterschied im mittleren Abstand der Spinsonden zeigt (Steinhoff, pers. Mitteilung). Daher sind diese Messungen für eine quantitative Aussage über den Abstand der BR-Moleküle nicht

geeignet. Die Abnahme der dipolaren Wechselwirkungen deutet jedoch klar auf eine Vergrößerung des mittleren Abstands der BR-Moleküle bei beiden Mutanten hin, wobei die Effekte für die W12I-Mutante etwas stärker erscheinen als für W80I.

Neben dieser Einschränkung lassen die bei Raumtemperatur aufgenommenen Spektren Aussagen hinsichtlich der Mobilität der Nitroxid-Seitenkette zu. Für die Mutanten mit 105R1 sind keine Mobilitätsunterschiede zwischen Einzel- und Doppelmutanten festzustellen, während mit der längeren Seitenkette bei 105R2 unterschiedlich mobile Anteile bei der Einzelmutante zu sehen sind (Abb. 3.18).

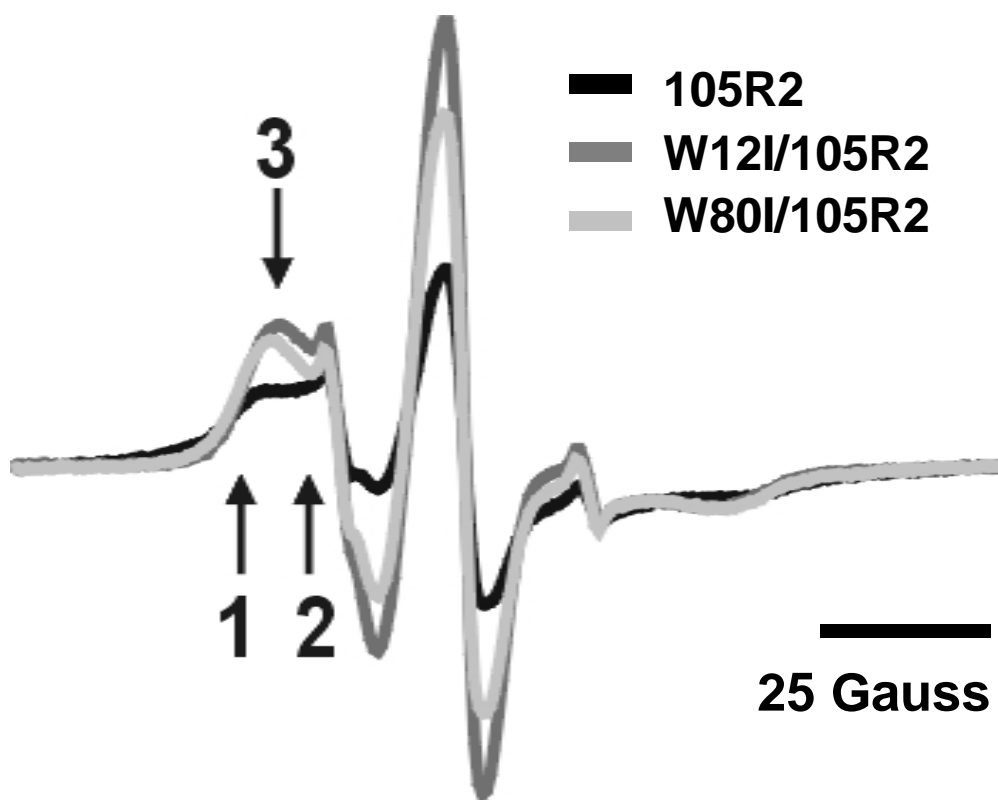


Abb. 3.18 Spinzahlnormierte Spektren von Q105C (schwarz), W12I/Q105C (dunkelgrau) und W80I/Q105C (hellgrau) mit MTS-4-Oxyl-Markierung (R2) zeigen unterschiedliche Anteile von mobilen und immobilen Nitroxid-Seitenketten.

Während die Doppelmutanten (hell- und dunkelgrau) nur eine Komponente mittlerer Mobilität aufweisen (3), zeigt die kristalline Einzelmutante 105R2 (schwarz) einen immobilen (1) und einen mobilen Anteil (2). Eine genauere Schlußfolgerung läßt sich jedoch aus diesem Spektrum nicht ableiten.

Bei den Doppelmutanten mit 106R1 ist der Unterschied zur Einzelmutante 106R1 wesentlich stärker ausgeprägt, so dass auch hier auf eine Auflockerung der Trimerstruktur geschlossen werden kann. Ähnliche, wenn auch schwächere Signale zeigen die Doppelmutanten mit 157R1. Die Unterschiede zwischen den Doppelmutanten selbst sind zu gering, um einen Vergleich untereinander zuzulassen.

3.2.9 Lichtinduzierte Vernetzung von Bacteriorhodopsin in der Membran

Mittels Proteinvernetzung sollte die ungeklärte Frage nach dem Aggregationsverhalten von BR in den nicht-PM-Fractionen geklärt werden. Dabei wurde eine Vernetzungsreaktion angewandt, bei der die Reaktionszeit möglichst kurz war, um unspezifische Vernetzungsprodukte zu vermeiden. Eine kürzlich veröffentlichte Methode für die lichtinduzierte Vernetzung von Proteinen (Fancy und Kodadek, 1999) wurde bei Membranfraktionen mit BR angewandt. In der Veröffentlichung ist nur die Vernetzung löslicher Proteine beschrieben, aber es stellte sich heraus, dass, zumindest im Falle von BR, auch integrale Membranproteine mit dieser Methode ähnlich effizient vernetzt werden können. Bei dieser Reaktion wird durch Licht ein Ru^{II} -bipyridylkomplex angeregt und der angeregte Komplex durch Persulfatanionen zum radikalischen Ru^{III} -Komplex oxidiert:

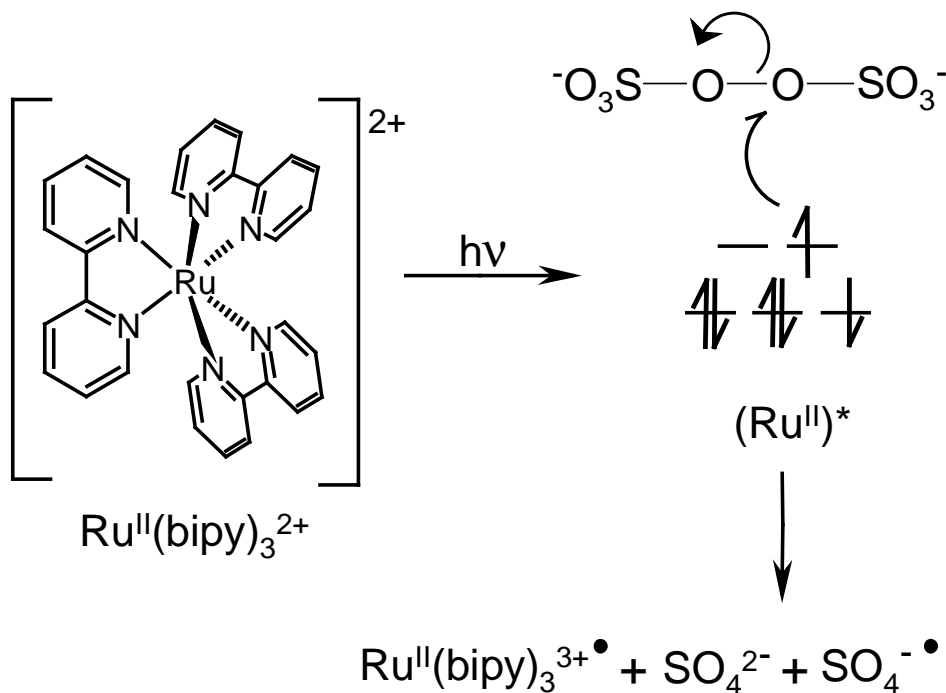


Abb. 3.19 Mechanismus der Radikalbildung nach Belichtung des Ru^{II} -Komplexes in Anwesenheit von $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ als Elektronenakzeptor (nach Fancy und Kodadek, 1999).

Der radikalische Ru^{III} -Komplex reagiert spezifisch mit Tyrosin-Seitenketten in einem Proteinmolekül und erzeugt Tyrosyl-Radikale, die mit benachbarten nukleophilen Seitenketten (Tyr, Lys, Cys) kovalente Bindungen eingehen können. Dadurch, dass die Vernetzung in kurzer Zeit (< 1 s) und direkt über die Proteinseitenketten erfolgt, besitzt diese Reaktion daher gegenüber anderen Methoden mit längeren Inkubationszeiten und zusätzlichen Vernetzungsmolekülen große Vorteile.

Die BR-haltigen Membranen wurden in mit $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bipy})_3\text{Cl}_2$ und Ammoniumpersulfat im Reaktionspuffer für 0.2 s belichtet und sofort mit dem SDS-Puffer versetzt. Die BR-

Konzentration war in allen Proben gleich. Anschließend wurde ein Teil dieser Mischung mittels SDS-PAGE in einem 13 %igen Gel aufgetrennt und ein Western-Blot (s. 5.4.3) mit einem BR-spezifischen Antikörper durchgeführt. In Abb. 3.20 ist das Ergebnis des Vernetzungsexperiments dargestellt. Als Kontrollen wurden gleiche Mengen an unbelichteten Membransuspensionen aufgetragen, die alle Reaktanden enthielten.

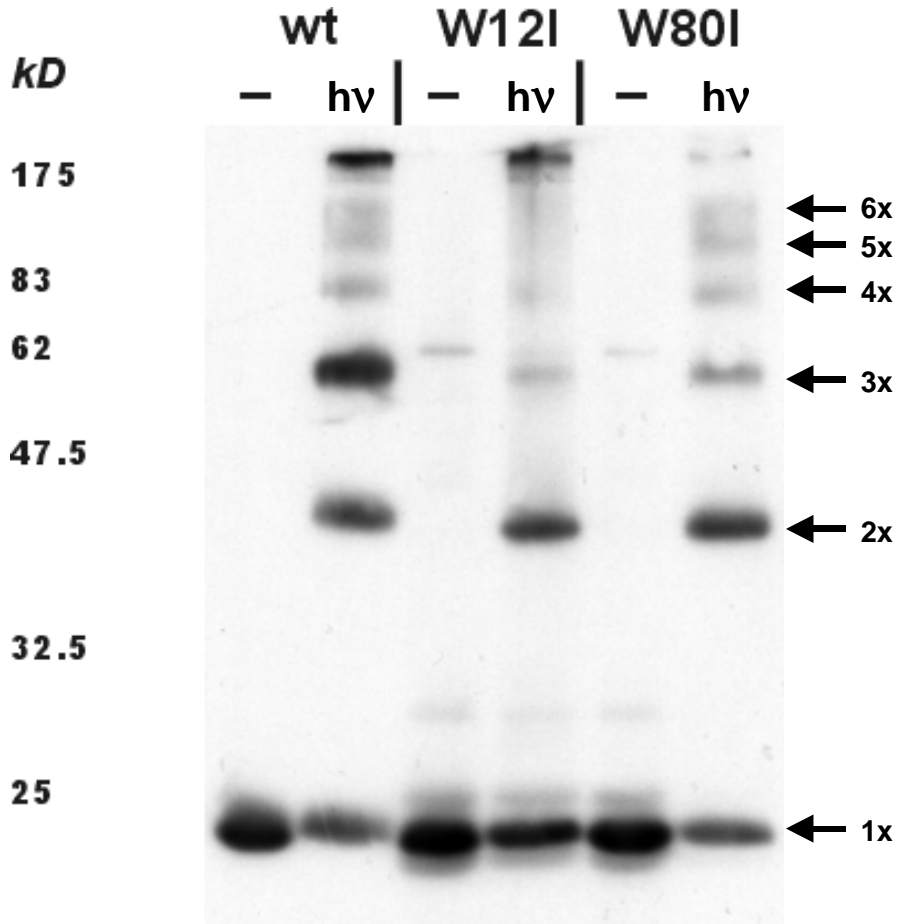


Abb. 3.20 Western-Blot nach Vernetzung von Membranfraktionen mit WT (PM), W12I und W80I (nicht-PM) durch lichtinduzierte Radikalreaktion mit $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bipy})_3\text{Cl}_2$; unbelichtete Proben mit allen Reagenzien dienten als Kontrollen (-).

Die Vernetzung verläuft sehr effizient in der kurzen Reaktionszeit, so dass ca. 60 - 70 % der vorhandenen BR-Moleküle reagieren. In Abb. 3.20 ist bei WT-BR ein Bandenmuster zu erkennen, bei dem noch Hexamere aufgelöst werden können. Die einzelnen Banden haben jeweils einen Abstand in der Molekularmasse, der der apparenten Masse (ca. 21 kD) eines BR-Monomers im Polyacrylamidgel entspricht. Höher vernetzte Oligomere sind als dunkle Bande am oberen Rand der Spur zu erkennen. Die stärkste Bande bei etwa 60 kD entspricht einem Trimer, so dass die Wahrscheinlichkeit für die Vernetzung von BR-Molekülen in der PM für Trimere am höchsten sein muß. Die Spuren mit W12I und W80I zeigen die deutlichsten Banden in Höhe des Dimers, während die Trimerbanden schwächer sind als bei WT-BR.

Da bei W12I den elektronenmikroskopischen Untersuchungen zufolge noch bis zu 40 % der nicht-PM-Fraktion BR-Moleküle in kleineren 2D-Kristallen vorliegen, weist die deutliche Bande im oberen Bereich des Blots in der W12I-Spur auf höhere Vernetzungsprodukte hin, die bei W80I nicht so ausgeprägt sind. Aufgrund der geringen Größe der 2D-Kristalle haben mehr W12I-Moleküle am Rand Kontakt zu anderen Proteinen, so dass die Trimerstruktur sich nicht in einer so deutlichen Trimerbande wie bei WT-PM widerspiegelt. Stattdessen deutet die Spur im oberen Bereich auf eine unspezifische Vernetzung der BR-Moleküle mit anderen Proteinen hin.

Bei W80I ist das Bandenmuster so ausgeprägt wie bei WT-BR, wobei jedoch bei ähnlich hohem Vernetzungsgrad das Verhältnis zwischen Dimer- und Trimerbande im Gegensatz zum WT deutlich zugunsten des Dimers ausfällt. Beim Vergleich von WT-BR und W80I wird deutlich, dass die Banden von Tetra- bis Hexameren (Abb. 3.20, 4x – 6x) ähnlich stark ausgeprägt sind. Im direkten Vergleich der einzelnen Banden untereinander weist die Trimerbande den größten Unterschied zwischen WT und Mutante auf. Dieses Experiment weist also klar auf eine Abnahme der Trimerisierungstendenz bei W80I hin.

Bei W12I trifft dies nur auf einen Teil der Moleküle zu, da auf den EM-Aufnahmen kleine kristalline Bereiche nachgewiesen wurden. Aufgrund ihrer Größe kann ein Teil der kristallinen BR-Moleküle mit Proteinen an der Peripherie vernetzt werden, was zu einer weniger deutlichen Trimerbande führt als bei BR in ausschliesslich kristalliner Form und einzigem Protein in der Membran. Eine Erklärung für diesen Befund ist die Möglichkeit, dass die kristallinen Bereiche bei W12I nicht stabil sind und ihre Größe mit der Zeit ändern, so dass die auf den EM-Aufnahmen beobachteten kristallinen Bereiche nicht immer vorhanden bzw. noch kleiner sind. Die Tatsache, dass in zahlreichen Präparationen aus Zellen mit W12I gar keine PM-Bande isoliert wird, deutet darauf hin, dass die kristallinen Bereiche nicht immer die Mindestgröße für die PM-Isolierung besitzen, so dass bei gleichem BR-Gehalt in zwei W12I-Kulturen unterschiedlich große, kristalline Bereiche in der Zellmembran vorliegen können. Die PM-Fraktion von W12I ist hinsichtlich der Vernetzung vom WT nicht zu unterscheiden (nicht gezeigt).

Aufgrund der quantitativen Unterschiede zwischen der Trimerbande von WT-BR und den Mutanten, insbesondere W80I, läßt sich aus diesem Experiment eine klare Abnahme der Trimerisierungstendenz in den nicht-PM-Fractionen der Mutanten ableiten. Dies führt zu dem Schluß, dass zumindest bei W80I die Trimerstruktur nicht vorhanden ist und das Gleichgewicht zwischen kristalliner und ungeordneter Form auf der Seite des ungeordneten Zustands der BR-Moleküle liegt.

3.2.10 Physiologische Untersuchungen

3.2.10.1 Messung der spezifischen Transportaktivität

Um die Funktion der Tryptophanmutanten unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde die Protonentranslokationsaktivität von Zellen mit WT-BR, S9_{mot}, W12I und W80I bestimmt. Die spezifischen Protonentransportaktivitäten von WT-BR und den Mutanten W12I und W80I wurden nach Oesterhelt (1982) durch Messung der pH-Änderung bei der Belichtung einer Zellsuspension ermittelt. Als Wildtyp-Kontrollzellen wurden WT-Zellen und eine Kultur mit S9-Zellen (S9_{mot}) verwendet, die auf hohe Motilität selektioniert wurden (Storch *et al.*, 1999) und etwa 50 % der BR-Menge von WT-Zellen produzieren. In Tab. 3.10 und Tab. 3.11 sind die bei den Messungen ermittelten Werte zusammengefaßt.

	OD ₆₀₀	OD ₅₆₀ BR (2ml)	µg BR in 200 µl	µg BR/OD ₆₀₀ in 200 µl	% BR /OD ₆₀₀	pmol BR in 200 µl
WT	3.85	0.234	9.96	2.59	100.0	375.0
S9_{mot}	3.9	0.115	4.87	1.25	48.3	183.4
W80I	3.7	0.083	3.52	0.95	36.8	132.5
W12I	3.35	0.049	2.09	0.62	24.1	78.6

Tab. 3.10: Dichte und BR-Gehalt der eingesetzten Kulturen.

	spez.Akt. [H ⁺ /(BR·min)]
WT	163
S9_{mot}	333
W80I	270
W12I	323

Tab. 3.11: Spezifische Aktivität von WT-BR und Mutanten.

Die Werte für die spezifische Aktivität der Mutanten liegen sehr nahe bei dem für WT-BR publizierten Wert von 270 H⁺/BR·min, was die Messungen der beiden Wildtyp-Stämme ebenso bestätigen. Der niedrigere Wert für WT rührt wahrscheinlich von partiell lysierten Zellen her, bei denen ein Teil des BR nicht zur pH-Änderung zur Verfügung steht und eine niedrigere spezifische Aktivität für ein BR-Molekül vortäuscht. Ein Vorteil der Kristallinität für die Protonentransportaktivität ist aufgrund dieser Messungen nicht ersichtlich.

3.2.10.2 Messung der Photophosphorylierungsrate

Der Einbau von BR in die nicht-PM-Fractionen beider Mutanten bot die Möglichkeit, eine Hypothese zu untersuchen, nach der die PM-Bildung eine höhere ATP-Syntheserate ermöglichen soll (Hartmann und Oesterheld, 1977). Dies wurde aus Messungen mit WT-Zellen mit PM bzw. Brauner Membran geschlossen. Dabei waren die Zellen in nicotinhaltigem Medium inkubiert worden, wodurch die Retinalbiosynthese blockiert und nur das Apoprotein in den Zellen produziert worden war. Das anschließend nach Retinalzugabe gebildete BR war nicht kristallin angeordnet und wurde zum Vergleich mit BR in PM verwendet. Bei der Messung der ATP-Syntheserate in diesen Zellen hatte sich herausgestellt, dass die ATP-Synthese deutlich verlangsamt war gegenüber den PM-haltigen Zellen. Diese Beobachtung führte zur Vermutung, dass die *in vivo*-Kristallisation von BR zu einer höheren Effizienz des photosynthetischen Gesamtprozesses führt.

Insbesondere mit der Mutante W80I konnte nun diese Hypothese zuverlässiger untersucht werden, da sich die Zellen bis auf eine Punktmutation im *bop*-Gen nicht vom Wildtyp unterscheiden und das gesamte BR in der nicht-PM-Fraktion liefern. Die Zellen wurden mit einer Lichtstärke von $12 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ (bei 550 nm) belichtet, was gewährleistete, dass die ATP-Syntheserate im linearen Bereich lag. Dies wird durch die nahezu lineare Lichtabhängigkeit bei den Zellen mit unterschiedlichem Gehalt an WT-BR bestätigt. Da in den $S9_{\text{mot}}$ -Zellen mit etwa der Hälfte des BR-Gehalts von WT die ATP-Syntheserate ebenso etwa halb so hoch war, war gewährleistet, dass bei dem höherem BR-Gehalt in WT-Zellen die ATP-Synthase nicht im Sättigungsbereich lag.

Jede ATP-Messung wurde mit zwei Proben durchgeführt, und der ATP-Gehalt jeder Probe ergab sich als Mittelwert aus drei Werten. Zur Kontrolle wurden die Zellen nach jeder Messung mit Hilfe einer 60 ml-Spritze belüftet und die Fähigkeit zur ATP-Bildung durch Atmung untersucht. Alle Proben wiesen dabei ähnlich hohe ATP-Mengen auf, so dass ein Unterschied der ATP-Synthaseaktivität zwischen Zellen mit WT-BR und Mutanten ausgeschlossen werden kann.

In Abb. 3.21 ist der Anstieg der ATP-Konzentration während der Belichtung ($\lambda > 515 \text{ nm}$) unter N_2 dargestellt. Dabei ist die Konzentration als ATP-Menge pro Gesamtvolumen der Zellen dargestellt, was sich aus der Anzahl der Zellen und dem geschätzten Volumen einer Zelle von $1.5 \cdot 10^{-15} \text{ l}$ ergibt. Die Steigung im linearen Bereich der ATP-Synthese, die jeweils aus den ersten vier Messpunkten durch lineare Regression ermittelt wurde, ergibt die Anfangsgeschwindigkeit für die ATP-Synthese, die nach der Hypothese bei den Mutanten deut-

lich kleiner sein sollte. In Abb. 3.22 sind die Photophosphorylierungsraten für die untersuchten Zellen mit dem entsprechenden BR-Gehalt aufgetragen.

Die Abhängigkeit der Anfangsrate der ATP-Synthese vom BR-Gehalt der Zellen ist hier deutlich zu erkennen, wobei die Mutanten sogar eine scheinbar höhere Syntheserate aufweisen, was jedoch auf Messungenauigkeiten bei der Absorptionsmessung zurückzuführen ist, da der Fehler sich bei der geringeren BR-Menge in den Mutanten deutlicher auswirkt.

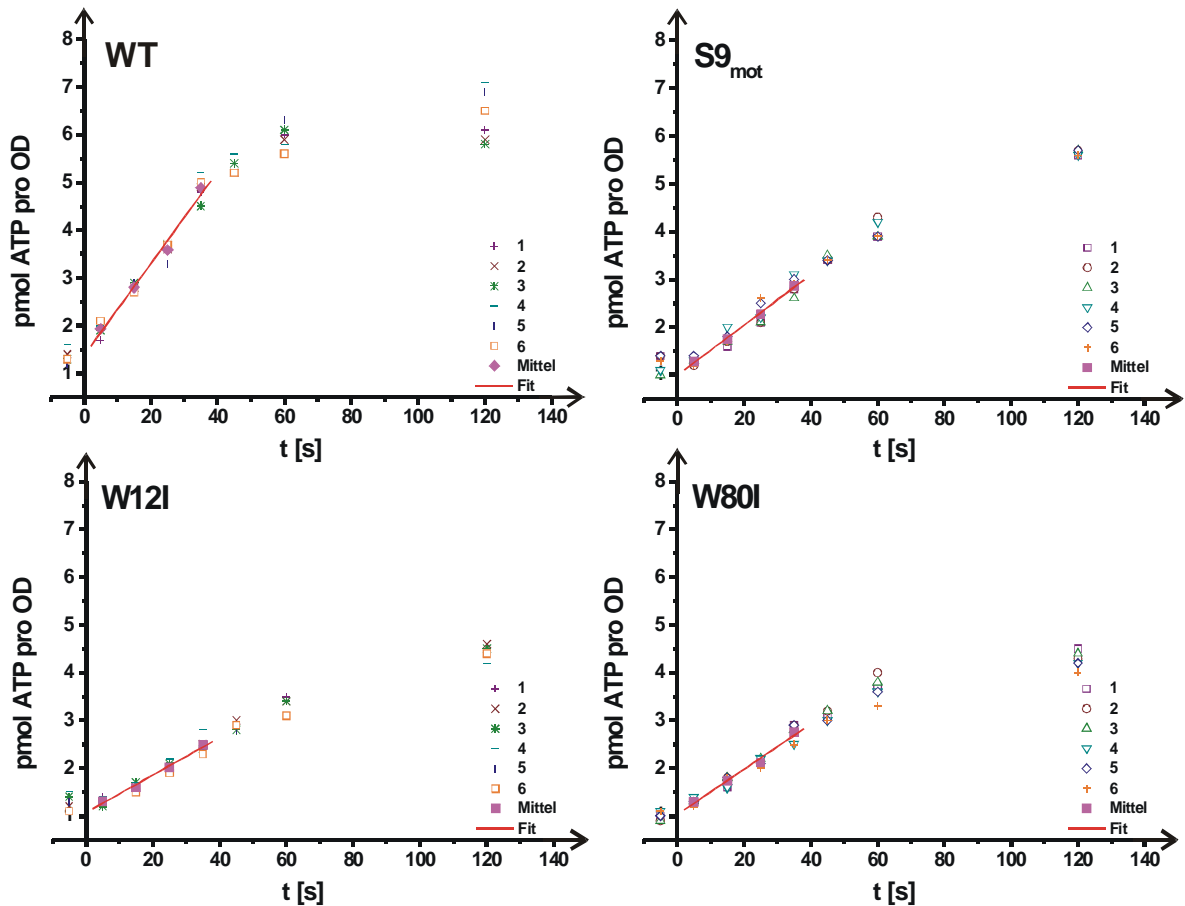


Abb. 3.21 ATP-Synthese in Zellen mit WT-BR (WT + S9_{mot}) und Mutanten W12I und W80I zeigt lineare Abhängigkeit vom BR-Gehalt der Zellen.

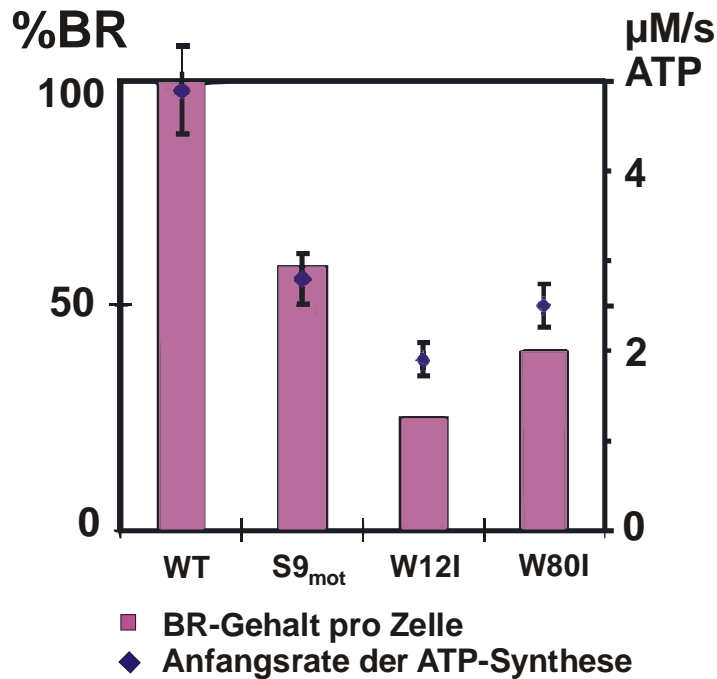


Abb. 3.22 Anfangsrate der ATP-Synthese nach Belichtung von WT-Zellen und Mutanten.

Die Kristallinität der PM stellt demnach keinen Vorteil für die Photophosphorylierungsrate dar.

3.2.10.3 Untersuchung der Zellen unter phototrophen Bedingungen

Das Wachstum der Zellen mit den BR-Mutanten W12I, W80I, W12/80I und Y64I zeigt unter aeroben Bedingungen keinen Unterschied zu Zellen mit WT-BR. Die Wachstumsgeschwindigkeit und die Fähigkeit zur aeroben ATP-Synthese sind nahezu identisch.

Für die Untersuchung des phototrophen Wachstums wurden Zellen verwendet, die zuvor aerob inkubiert wurden und dabei die für die jeweilige Mutante übliche BR-Menge enthielten. Nach Überimpfen in frisches Medium wurden die Kulturen luftdicht abgeschlossen und während der Inkubation mit einer Xe-Lampe ($\sim 19 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ bei 550 nm) belichtet. In Abb. 3.23 ist das Wachstum von diesen Mutanten und WT unter phototrophen Bedingungen dargestellt. Unter diesen Bedingungen zeigt sich, dass die BR-Mutanten ohne PM (W80I, W12/80I) bzw. mit eingeschränkter PM-Bildung (W12I) nicht mehr photosynthetisch wachsen können. Die PM-bildende Mutante Y64I zeigt dagegen keine Einschränkung des Wachstums unter diesen Bedingungen.

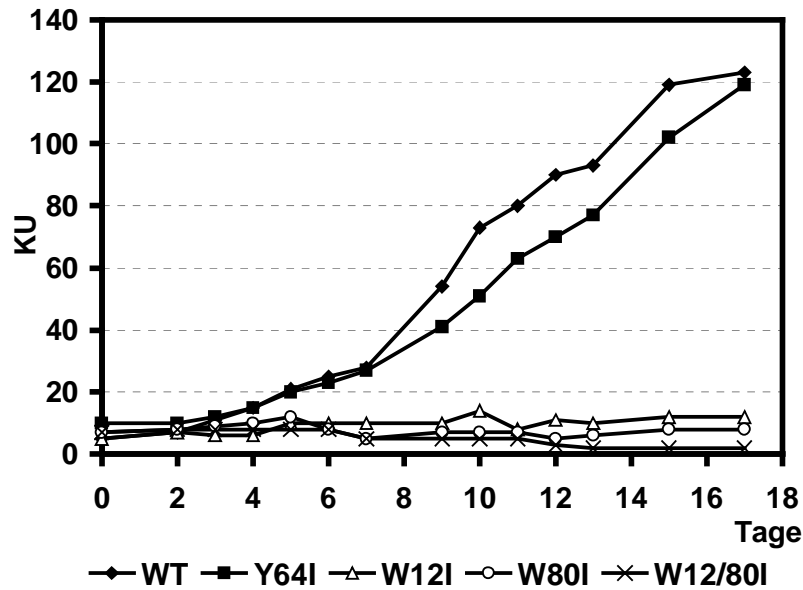


Abb. 3.23 Wachstum von Zellen mit WT-BR, Y64I, W12I, W80I und W12/80I unter phototrophen Bedingungen (KU: Kletteinheiten).

Der Vorteil der PM-Bildung für das phototrophe Wachstum wurde besonders bei einem der Wachstumsversuche mit einer Kultur der Doppelmutante W12/80I offensichtlich, die nach etwa dreimonatiger Inkubation unter anaeroben Bedingungen wieder dicht gewachsen war und eine deutlich rotviolette Färbung aufwies. Eine Sequenzierung des *bop*-Gens aus diesen Zellen zeigte, dass es sich um Wildtypzellen handelte, mit denen die W12/80I-Kultur bei der Inokulation kontaminiert worden war. Somit wurden wenige Wildtypzellen in einer Kultur mit der Doppelmutante unter phototrophen Bedingungen selektioniert.

Zur Untersuchung der Licht-Dunkeladaptation wurden PM-haltige Zellen mit WT-BR und Y64I belichtet (Diaprojektor, $\lambda_{\max} > 515 \text{ nm}$, $\sim 100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). Dabei war das BR bereits nach einer Minute lichtadaptiert. Die Kinetik der Dunkeladaptation wurde anschließend gegen eine unbelichtete Referenzprobe gemessen. Die Halbwertszeit der Dunkeladaptation entspricht mit etwa 30 min etwa dem Literaturwert für PM von 45 min (Peters und Peters, 1978), wobei der kleinere Wert aufgrund der, im Vergleich zur früheren Messung, höheren Temperatur von 33 °C bei dieser Messung erhalten wurde. In Abb. 3.24 sind die Differenzspektren der dunkeladaptierten und der zuvor belichteten Probe mit WT-BR dargestellt. Die Zellen mit Y64I zeigten bei dieser Untersuchung keinen Unterschied zum Wildtyp.

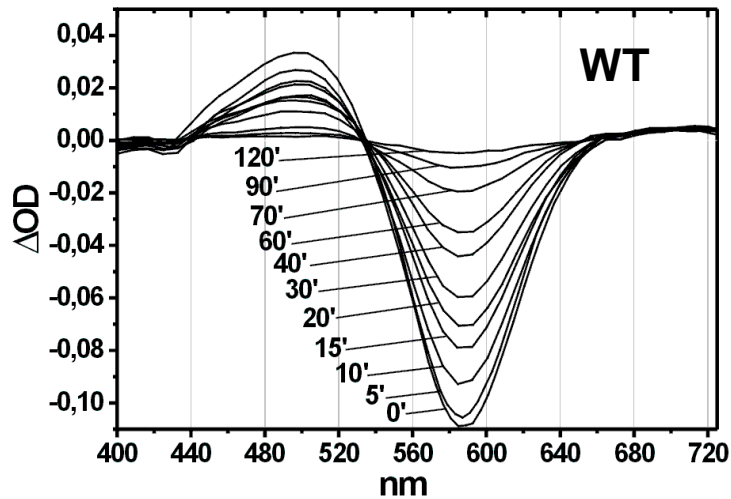


Abb. 3.24 Differenzspektren von dunkeladaptierten und belichteten Zellen mit WT-BR während der Dunkeladaptation.

Die Spektren zeigen ein charakteristisches Maximum bei etwa 500 nm und ein Minimum bei 590 nm, was die Verschiebung des BR-Absorptionsmaximums von 569 nm im lichtadaptierten zu 560 nm im dunkeladaptierten Zustand anzeigt. Nach etwa 2 Stunden ist nur noch ein kleiner Unterschied zur dunkeladaptierten Referenzprobe zu sehen und somit die Dunkeladaptation nahezu vollständig.

Im Gegensatz zu den Zellen mit PM wird das BR in den Mutanten W12I, W80I und W12/80I bei Dauerbelichtung ($\sim 100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$; vgl. Tageslicht mit $\sim 39 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ jeweils bei 550 nm) der Zellsuspension nach etwa 20 – 25 Stunden zu einem großen Teil (70 – 80 %) gebleichen. In Abb. 3.25 sind die Differenzspektren einer unbelichteten Referenzprobe mit W80I und einer Probe der gleichen Zellsuspension unter Dauerbelichtung exemplarisch dargestellt.

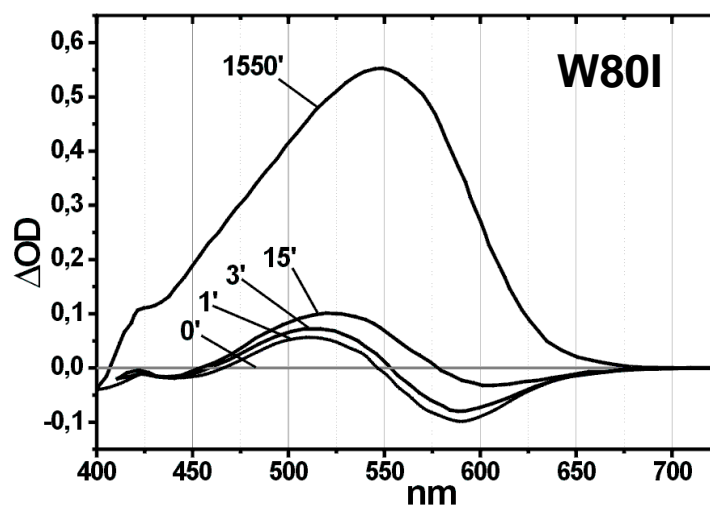


Abb. 3.25 Differenzspektren von dunkeladaptierten und dauerbelichteten Zellen ($\lambda > 515 \text{ nm}$) mit W80I bei 33 °C. Die Belichtungsdauer ist bei der jeweiligen Kurve angegeben.

Die Differenzspektren in den ersten Minuten zeigen die Lichtadaptation der Mutante an, wobei jedoch die Extrema der Differenzkurve bereits nach drei Minuten deutlich rotverschoben

und die negative Bande bei 590 nm kleiner ist. Die Verkleinerung dieser negativen Bande und die Verschiebung der positiven Bande von etwa 510 nm bis zum Absorptionsmaximum spricht eindeutig für ein Ausbleichen der BR-Moleküle in den Zellen. Das Verhalten der Mutanten W12I und W12/80I entspricht dem von W80I.

Zum Vergleich von BR in der PM und in nicht-PM-Form ist die Mutante W80I am besten geeignet, da sie den höchsten BR-Gehalt unter den Mutanten aufweist und BR nahezu ausschließlich in nicht-PM-Form enthält.

Es wurde gezeigt, dass bei Belichtung der Mutante W80I die photochemische Instabilität des Chromophors zu einer Abnahme der BR-Menge führt, so dass ein phototrophes Wachstum auf Dauer ausgeschlossen werden kann. Demnach dürften die Zellen mit PM einen entscheidenden Wachstumsvorteil im Licht unter anaeroben Bedingungen haben, die in den natürlichen Habitaten auftreten können, gegenüber Zellen, die BR in nichtkristalliner Form enthalten.

Das Ausbleichen der Zellen mit W12I zeigt außerdem, dass der Einbau von BR in die PM quantitativ erfolgen muß. Auch wenn ein signifikanter Teil der BR-Moleküle wie bei W12I kristallin vorliegt, geht durch Ausbleichen der Moleküle außerhalb der PM photoaktives BR verloren. Dadurch wird vermutlich das Gleichgewicht zwischen der PM- und nicht-PM-Form des BR so verschoben, dass sich die kristallinen Bereiche allmählich auflösen. Bei der Teilung der Zellen werden zudem die kristallinen Bereiche unter den Tochterzellen aufgeteilt, so dass dies ebenfalls zu einer Abnahme BR-Menge in kristalliner Form führt. Damit verlieren auch diese Zellen die Möglichkeit, photosynthetisch zu wachsen.

3.3 Expression und Aufreinigung von Halorhodopsin

Für die Expression von Halorhodopsin wurde der Überexpressionsstamm D2 verwendet (Heymann, 1993). Dieser wurde durch Transformation von HN5-Zellen (BR^- , HR^-) mit dem Vektor pJH-F erhalten. Die Überexpression wurde durch Anhängen des *bop*-Promotors und der *bop*-Anfangssequenz (Aminosäuren -13 bis -1) vor die Halorhodopsin(*hop*)-Sequenz erreicht. Die D2-Zellen wurden auf Agarplatten mit Halomedium ausgestrichen und bläulich gefärbte Klone in flüssiges Medium überführt. Dieser Schritt wurde mehrfach durchgeführt, um gut produzierende Zellen zu erhalten. Die Expression lag schließlich bei etwa 8 mg pro Liter Kultur. Die Kulturen wurden in Vollmedium inkubiert. Die HR-Aufreinigung wurde nach Duschl *et al.* (1988) mit geringen Modifikationen durchgeführt (s. 5.4.5). Nach der Reinigung über die Phenylsepharose-Säule (Resource CL-4B, Pharmacia) wurde das Eluat in Amicon-Konzentratoren mit einer Ausschlußgröße von 50 kD bis zu einer Endkonzentration von etwa $10 - 15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ HR eingengt. Die HR-Konzentration wurde durch Absorptionmessung ermittelt, wobei als Extinktionskoeffizient der Wert für lichtadaptiertes HR von $50000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ verwendet wurde. Anschließend wurde die konzentrierte Proteinlösung nach der Methode von Landau und Rosenbusch (1996) in geeignetem Verhältnis mit Puffer und dem Lipid Monooleyl-*rac*-glycerol gemischt, das kubische Lipidphasen und somit die Matrix für die Kristallisation bildet. Homogenisierung der Phase wurde durch wiederholte Zentrifugation erreicht. Nach wenigen Wochen begann sich das Protein in bestimmten Bereichen der Lipidphase zu konzentrieren und bildete nach einigen Monaten Kristalle, die eine Strukturbestimmung mit einer Auflösung von 1.8 \AA ermöglichten (Abb. 3.26).



Abb. 3.26 HR-Kristall in der kubischen Lipidphase aus Monoolein (Balken: 0.1 mm).

Nach der Strukturlösung wurde in dem atomaren Modell eine Punktmutation an einer funktionell unbedeutenden Stelle identifiziert (V229A), die durch Sequenzierung des *hop*-Gens in D2-Zellen bestätigt wurde (Tittor, pers. Mitteilung). Daher wurde ein neuer Wildtypstamm konstruiert, der durch Transformation des *hop*-Deletionsstammes WHOP mit dem gleichen

Fusionskonstrukt wie in pJH-F erhalten wurde, diesmal jedoch im Vektor pHUSneu (Abb. 3.27), der durch Ligation des *Bam*HI/*Hind*III-Fragments in pUS-Mev (Schweiger, 1996) entstanden ist. Die Anfangssequenz des Fusionsproteins sieht folgendermassen aus:

1 BR 14 1→ HR
BR-HR MLELLPTAVEGVSQMSITSVPGVVDAGVLGAQSAAAVRENALLSS...

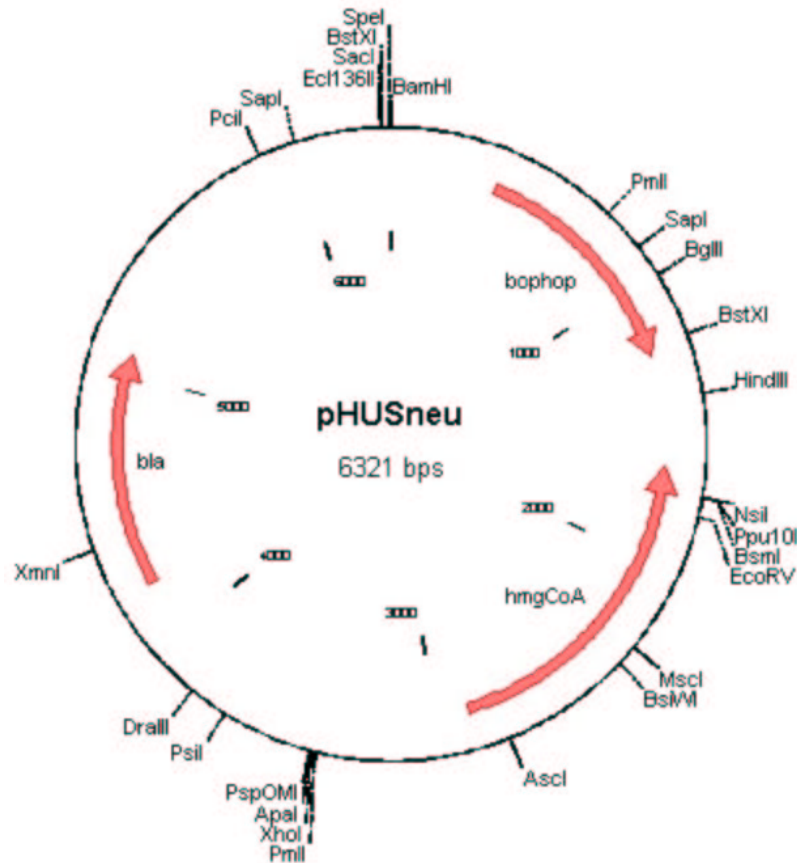


Abb. 3.27 Vektor pHUSneu für die Konstruktion des HR-Wildtypstamms HARRI.

Nach der Transformation wurden bläulich gefärbte Klone erhalten, was die HR-Überexpression anzeigte. Nach Inkubation in Flüssigmedium wurden Zellen isoliert, die ähnlich große HR-Mengen produzierten wie D2-Zellen. Der neue Wildtypstamm wurde HARRI genannt (**HA**lo**R**hodopsin **ReI**ntegrated). In Abb. 3.28 sind Saccharosegradienten mit den Membranfraktionen von HARRI-Zellen und, zum Vergleich, Gradienten von BR-W80I und BR-W80F dargestellt.

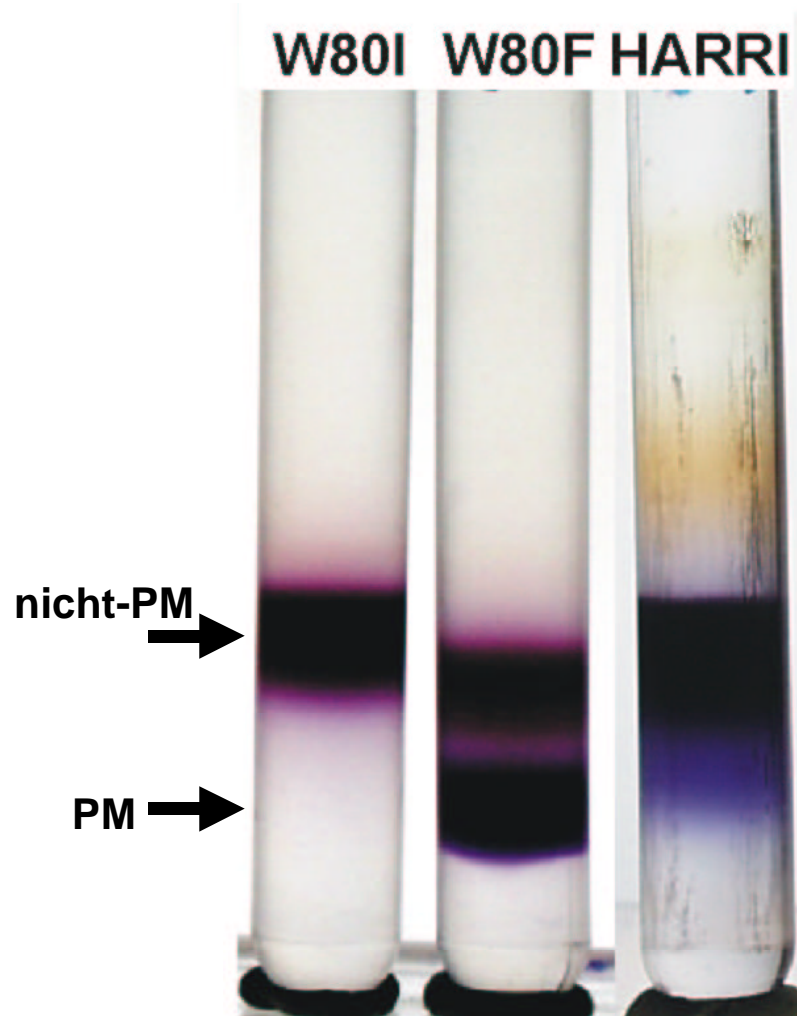


Abb. 3.28 Saccharosegradienten mit Membranfraktionen aus HARRI-Zellen (rechts, 700 ml Kultur), BR-Mutanten W80I und W80F (je 400 ml Kultur) zum Vergleich.

Es wurde bei keiner Präparation von HR aus D2 oder HARRI eine Fraktion mit der Dichte von PM („HR-PM“) im Saccharosegradienten isoliert, die HR in Form von 2D-Kristallen enthielt. Diese wurden früher bei einigen Kulturen von D2 gefunden, wodurch eine niedrig aufgelöste Projektionsstruktur von HR mit 7 Å Auflösung erhalten werden konnte (Abb. 3.29, Havelka *et al.*, 1993).

3.4 Untersuchung von 2D-Kristallen von Halorhodopsin auf D2-Zellen

Nach Überexpression von HR in D2-Zellen wurden in der Membranfraktion kristalline Bereiche gefunden, woraus mittels Elektronenkryokristallographie die 3D-Struktur von HR mit einer Auflösung von 6 Å bzw. 5 Å erhalten wurde (Havelka *et al.*, 1995; Kunji *et al.*, 2000). Die HR-Moleküle sind in den orthogonalen Kristallen mit der Raumgruppe P4212 in Form von Tetrameren angeordnet, wobei die Tetramere abwechselnd nach oben und unten orientiert sind, wie man in Abb. 3.26 sehen kann.

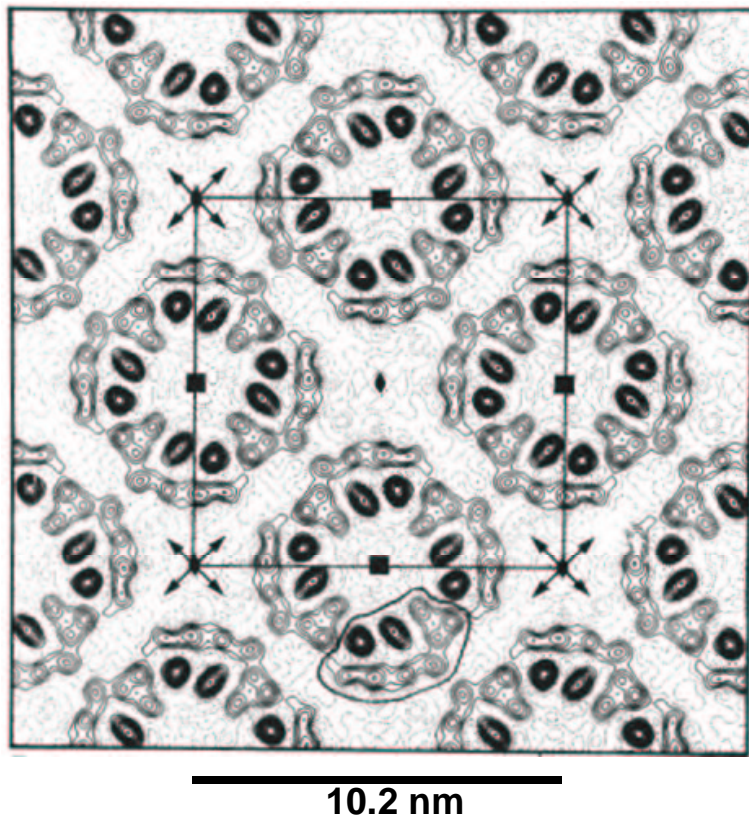


Abb. 3.29 Projektionsstruktur von Halorhodopsin in orthogonalen 2D-Kristallen aus D2 (nach Havelka *et al.*, 1993).

Untersuchungen dieser Membranen mit 2D-kristallinem HR mittels Rasterkraftmikroskopie bestätigten bei einer Auflösung von 9 Å die orthogonale Anordnung von HR-Tetrameren (Persike *et al.*, in Vorbereitung). Die alternierende Orientierung der HR-Tetramere wirft die Frage nach der physiologischen Relevanz dieser Anordnung auf, da die Hälfte der Moleküle die Chloridionen nach außen abgeben müssten, vorausgesetzt, sie wären in der „falschen“ Orientierung funktionsfähig. Hinzu kommt, dass nur etwa 5 % der isolierten „PM-Fraktion“ mit HR kristallin sind, so dass die funktionelle Bedeutung dieser Kristalle fraglich bleibt und die Anordnung lediglich eine Folge der Überexpression sein könnte.

In den Kristallen aus der kubischen Lipidphase wird eine hexagonale Anordnung von HR-Trimeren gefunden (Kolbe *et al.*, 2000), die alle in einer Richtung orientiert sind und einen Abstand der Trimerzentren von 67.3 Å aufweisen (Abb. 3.30 A). Benachbarte Schichten im Kristall sind antiparallel orientiert, so dass Protein-Protein-Kontakte hauptsächlich durch den BC-Loop vermittelt werden. Innerhalb einer Schicht haben die HR-Trimere keinen Kontakt untereinander (Abb. 3.30 B). Zwischen den Trimeren befinden sich hexagonal geordnete Monooleinmoleküle, wobei ausschließlich auf der extrazellulären Seite Elektronendichte für geordnete Lipidmoleküle gefunden wird.

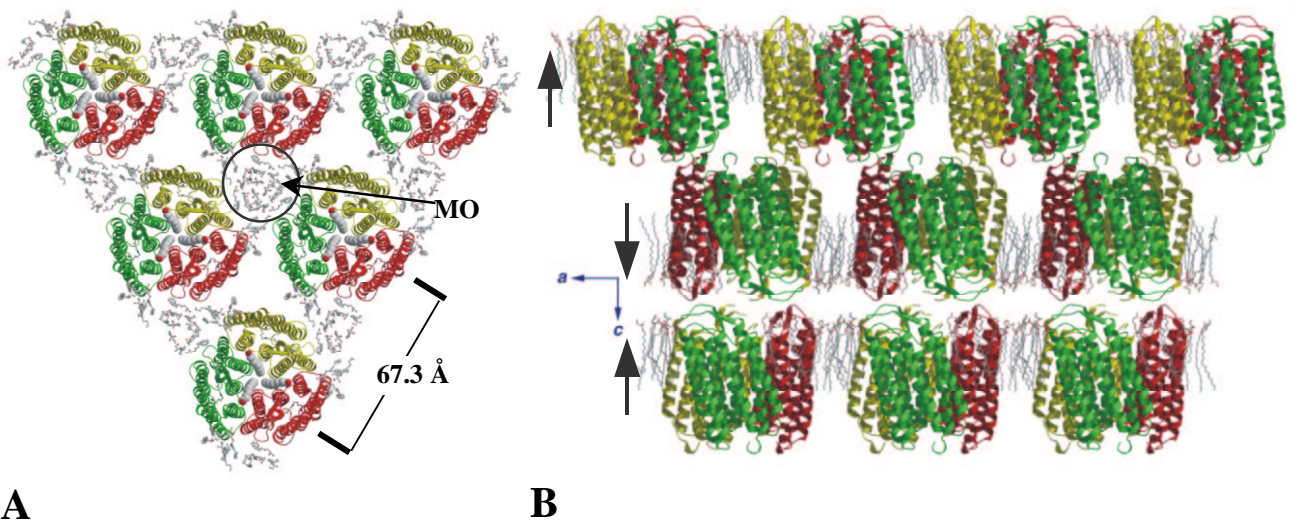


Abb. 3.30 A: Hexagonale Anordnung von HR-Trimeren und Monoolein (MO) in Kristallen aus der kubischen Lipidphase; B: Anordnung der HR-Schichten im Kristall (graue Pfeile zeigen in Richtung der extrazellulären Seite der Moleküle einer Schicht).

Der Zustand von HR in der Zellmembran des Überexpressionsstammes D2 wurde aufgrund dieses Unterschieds zwischen 2D- und 3D-Kristallen genauer untersucht. Dazu wurde die Gefrierbruchmethode verwendet, wie sie bereits für die Untersuchung der BR-Mutanten beschrieben wurde. Die Replica der D2-Zellen wurden auf die gleiche Weise präpariert wie die BR-haltigen Zellen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen überwiegend Zellen, die keine kristallinen Bereiche auf ihrer Oberfläche aufweisen. Die Anzahl der Zellen mit meist kleinen 2D-Kristallen liegt bei weniger als 5 % von allen untersuchten Zellen. In Abb. 3.31 sind einige Beispiele für die kristallinen Bereiche in der Membran von D2 sowie die dazugehörigen Diffraktionsbilder dargestellt

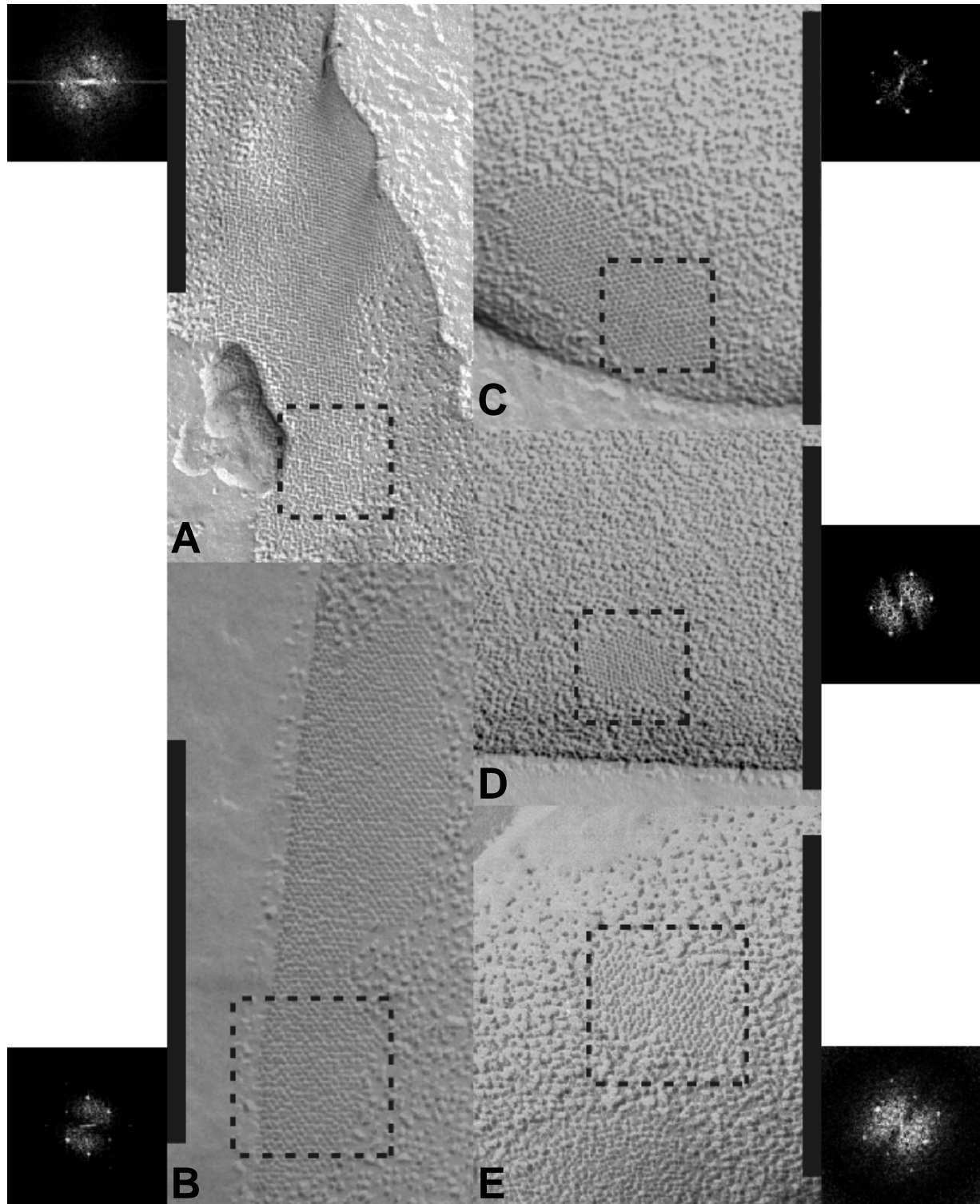


Abb. 3.31 Gefrierbruchaufnahmen von D2-Zellen mit kristallinen Bereichen (schwarze Balken entsprechen $0.5 \mu\text{m}$). Die Diffraktionsbilder von den Flächen in den gestrichelten Quadraten zeigen eindeutig die kristalline Anordnung der Partikel in der Membran.

Es werden fast ausschließlich Bereiche gefunden, die eine hexagonale kristalline Anordnung der Partikel aufweisen, wobei die Gitterkonstante in diesen Kristallen $6.85 \pm 0.26 \text{ nm}$ beträgt, was dem Wert aus den 3D-Kristallen sehr nahe kommt. Lediglich auf zwei Aufnahmen wird eine deutlich abweichende Anordnung der Partikel festgestellt (Abb. 3.31 A + E). Hier ist

wenigstens bei einer Aufnahme (Abb. 3.31 E) ein verzerrt orthogonales Gitter mit Winkeln von 82° und 98° anstatt 90° zu erkennen. Beim zweiten Bild (Abb. 3.31 A) ist die Ordnung zu gering, so dass im Diffraktionsbild wenige Reflexe zu sehen sind und keine genauere Analyse möglich ist. Die Gitterkonstante in diesen zwei Fällen beträgt 8.35 ± 0.64 nm. Dies liegt deutlich unter dem Wert von 10.2 nm für die orthogonalen 2D-Kristalle aus D2 (Havelka *et al.*, 1993), was jedoch auf die unterschiedlichen Methoden zurückzuführen ist. Die antiparallele Anordnung der HR-Tetramere im orthogonalen Gitter führt zu einer Gitterkonstante von 10.2 nm, wobei im Falle einer parallelen Orientierung die Gitterkonstante 7.2 nm betragen würde, was genau dem Abstand der Tetramerzentren entspricht. Da bei der Gefrierbruchmethode die Oberflächen der Zellen mit Platin und Kohlenstoff bedampft werden, sind unterschiedlich orientierte Trimere oder Tetramere ununterscheidbar, da nur ein Abdruck der Membran im Elektronenmikroskop betrachtet wird. In der folgenden Zeichnung ist der Unterschied zwischen der elektronenkristallographischen und Gefrierbruchmethode skizziert, wobei die antiparallel orientierten Tetramere (links) weiss und grau schattiert sind.

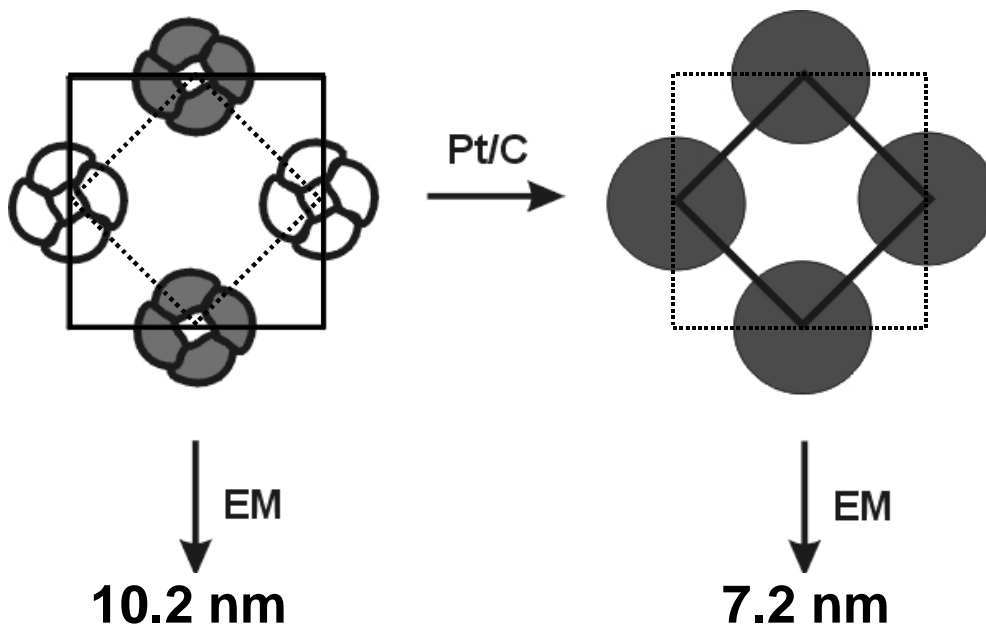


Abb. 3.32 Darstellung der Unterschiede zwischen elektronenmikroskopischer Analyse von nativen 2D-Kristallen mit HR-Tetrameren (links) und nach Beschattung der Kristalle mit Platin und Kohlenstoff (rechts).

Somit muß bei Gefrierbruchaufnahmen von orthogonalen Kristallen der Wert für die Gitterkonstante 7.2 nm betragen, zumal die Auswertung der nativen kristallinen Membranen durch Havelka *et al.* (1993) anfangs auch diesen Wert ergeben hatte, da die Reflexe für das 10.2 nm-Gitter nur sehr schwach waren.

Der für das verzerrte Gitter von D2 erhaltene Wert von 8.35 ± 0.64 nm liegt etwas höher als die Gitterkonstante der orthogonalen Kristalle, unterscheidet sich jedoch wesentlich von dem

des hexagonalen Gitters. Um auszuschließen, dass die untersuchten Flächen PM-Bereiche mit BR sind, wurden Diffraktionsbilder der Gefrierbruchaufnahmen von WT-Zellen mit WT-BR ausgewertet. Alle Zellen weisen hexagonal kristalline Flächen auf, wie man an der folgenden Abbildung der Oberfläche von einigen WT-Zellen mit den entsprechenden Diffraktionsbildern erkennen kann.

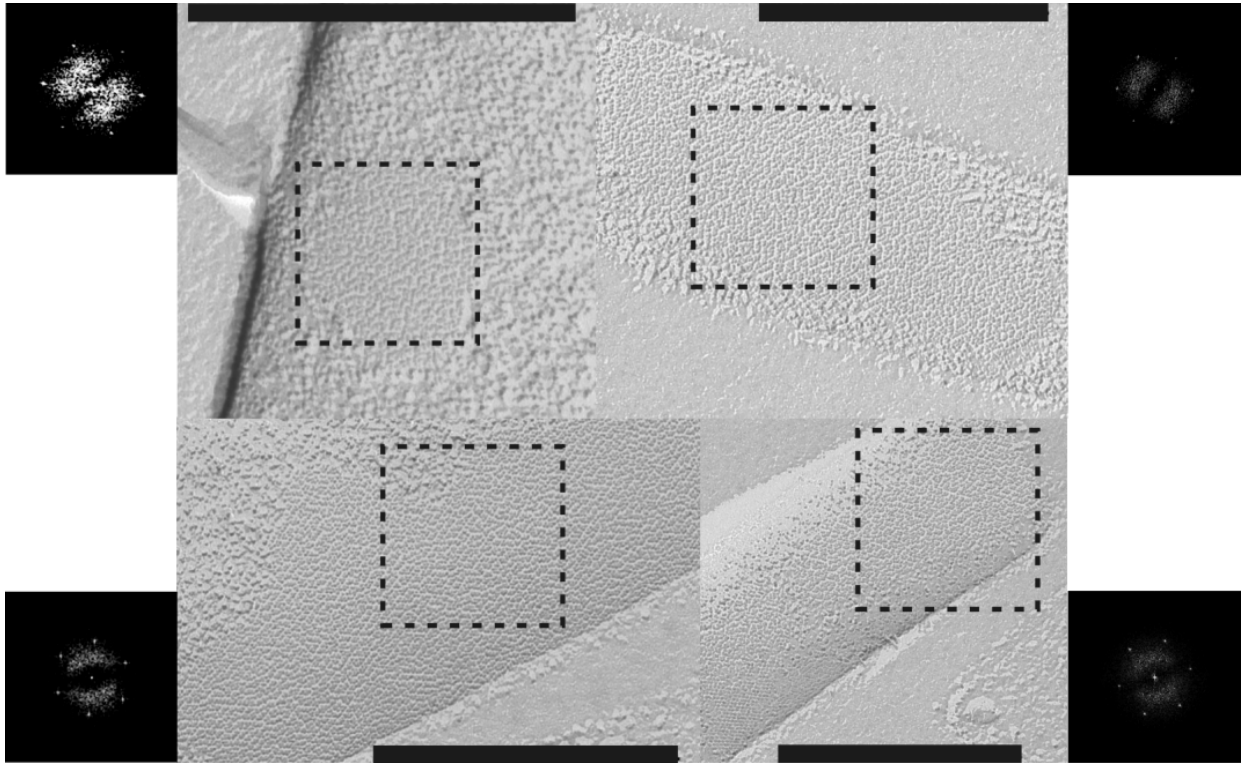


Abb. 3.33 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Replica von Zellen mit WT-BR nach Gefrierbruch und Beschattung mit Pt/C (schwarze Balken entsprechen 0.5 μm). In den eingerahmten Bereichen wurde eine Fourier-Transformation durchgeführt, um die abgebildeten Diffraktionsbilder des PM-Gitters zu erhalten.

Der Wert für die Gitterkonstante liegt bei diesen Flächen mit 5.83 ± 0.13 nm deutlich unter dem für D2-Flächen und ist etwas kleiner als die für BR-PM erwarteten 6.3 nm. Da die Präparation der Proben unter identischen Bedingungen erfolgte, kann demzufolge eine Kontamination der D2-Präparation mit Zellen, die BR-PM enthalten, ausgeschlossen werden.

Eine Unterscheidung zwischen Trimeren und Tetrameren von HR ist mit dieser Methode nicht möglich, so dass nicht ermittelt werden kann, in welcher Form HR im hexagonalen bzw. verzerrt orthogonalen Gitter vorliegt. Das Vorkommen der hexagonal kristallinen Bereiche auf D2-Zellen zeigt jedoch, dass eine ähnliche Anordnung, wie sie im 3D-Kristall gefunden wurde, mit einer ähnlichen Gitterkonstante auch in der Zelle auftreten kann.

3.5 Isolierung von Halorhodopsin mit ^3H -Palmitinsäure

Bevor die hochaufgelöste 3D-Struktur von HR vorlag, wurde eine spezifische Wechselwirkung von HR mit Palmitinsäure in der Membran von *H. salinarum* beschrieben (Colella *et al.*, 1998; Corcelli *et al.*, 1996). Dies war von Interesse, da der strukturell mit archaealen Retinalproteinen verwandte, G-Protein gekoppelte Rezeptor Rhodopsin am C-terminus palmityliert vorliegt (Ovchinnikov *et al.*, 1988). Somit bestand die Möglichkeit, dass dies eine konservierte Eigenschaft sowohl des eukaryotischen als auch des archaealen Retinalproteins darstellt, deren Aminosäuresequenzen keine signifikante Homologie aufweisen. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Palmitinsäure im Gegensatz zu Rhodopsin nicht kovalent mit HR verknüpft ist. Allerdings wurde auch ein Einfluß der Palmitinsäure auf den pK-Wert der Schiffsbasis in HR nachgewiesen, wobei der pK-Wert bei höherem Palmitatgehalt um 0.4 höher lag als bei niedrigerem Palmitatgehalt. Daher wurde eine funktionelle Bedeutung der Fettsäure für die Chloridpumpe angenommen. Im hochaufgelösten 3D-Strukturmodell von Kolbe *et al.* (2000) wurde die nichtkovalente Assoziation eines Palmitinsäuremoleküls an ein HR-Monomer bestätigt. Innerhalb eines HR-Trimers wurde auf der extrazellulären Seite Elektrodichte detektiert, die einem Palmitat zugeordnet wurde.

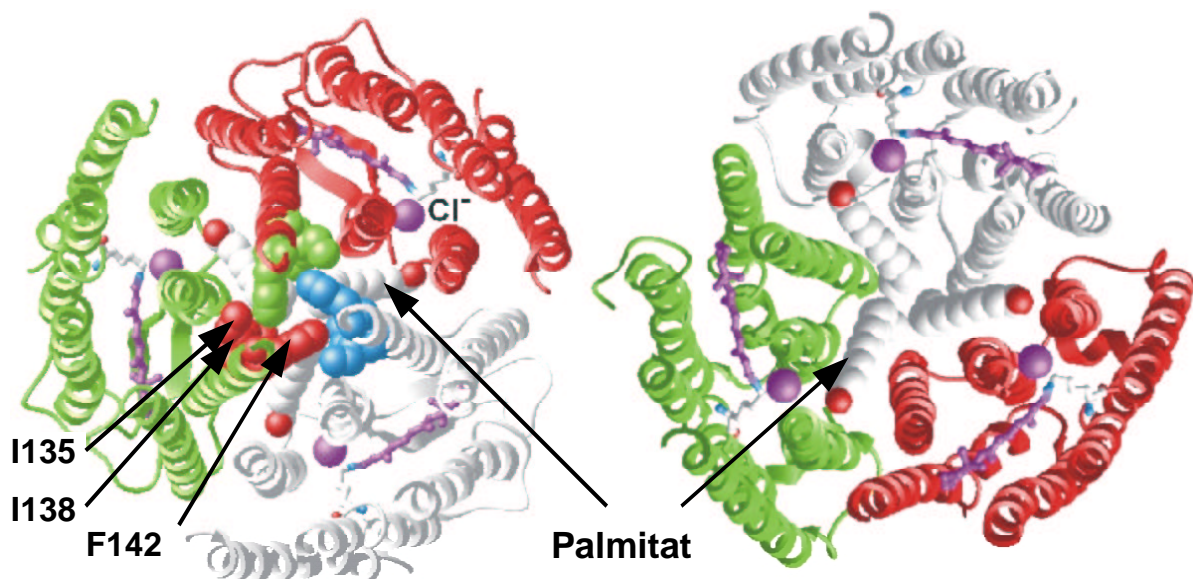


Abb. 3.34 Bänderdarstellung des Strukturmodells eines HR-Trimers nach Kolbe *et al.* (2000); links: der Blick von der CP-Seite zeigt eine Gruppe hydrophober Seitenketten (I135, I138 und F142, Kalottendarstellung), die auf dieser Seite die Öffnung zwischen den Monomeren verschließen; rechts: Blick von der EC-Seite auf drei Palmitatmoleküle als Kalottenmodell im Zentrum des Trimers in der Nähe des aktiven Zentrums mit Chloridion (Kugel) und Chromophor in Stäbchendarstellung (ein Teil der Loops ist der Übersichtlichkeit halber weggelassen).

Dabei liegt die Carboxylgruppe des Palmitats etwa 10 Å unterhalb der Membranoberfläche in der Nähe des aktiven Zentrums und bildet H-Brücken zu den OH-Gruppen von S75 und T111.

Die direkte Wechselwirkung von T111 mit dem Chloridion findet über die terminale Methylgruppe statt und nicht, wie man es erwarten würde, über die OH-Gruppe. Dies zeigt, dass der von Rüdiger und Oesterhelt (1997) gemessene Effekt der Mutation T111V mit einer verlangsamten Chloridaufnahme nicht auf das Fehlen einer Wechselwirkung des Chlorids mit der OH-Gruppe zurückzuführen sein dürfte.

Es wurde weiterhin untersucht, ob die Palmitinsäure spezifisch an HR bindet und während der Präparation für die Kristallisation gebunden bleibt. Dazu wurde eine D2-Kultur mit einer Palmitinsäurelösung mit einer spezifischen Aktivität von $52 \text{ mCi}\cdot\text{ml}^{-1}$ versetzt. Als Kontrolle wurde auch eine Kultur mit der BR-Mutante W80I mit der gleichen Menge ^3H -Palmitat markiert, da die Solubilisierung und Aufreinigung von W80I in der nicht-PM-Fraktion gleichermaßen durchführbar ist wie bei HR. Dies sollte zeigen, ob die Koelution von Palmitat spezifisch für HR ist. Das Palmitat wird in den Zellen nicht metabolisiert, wie durch Markierungsexperimente zuvor nachgewiesen wurde (Storch, pers. Mitteilung). Dabei wurden Zellen mit ^3H -Palmitat markiert und auf Palmitoylierung von Proteinen hin untersucht. Auf einem Autoradiogramm eines Proteingels wurden wenige diskrete Banden beobachtet, die darauf schließen ließen, dass das Palmitat nicht abgebaut und für die Proteinbiosynthese verwendet wurde. Daher kann die detektierte Radioaktivität in den folgenden Versuchen ausschließlich dem unveränderten Palmitat zugeordnet werden.

Zum Vergleich wurde eine Kultur mit der Mutante W80F auch mit ^3H -Palmitat markiert. Von dieser Mutante werden etwa 60 – 70 % der BR-Menge als PM isoliert, so dass bei dieser Kontrolle der Einbau von Palmitat in die PM und die nicht-PM-Fraktion untersucht werden konnte. Es stellte sich heraus, dass die PM-Fraktion bei weitem weniger Radioaktivität enthielt als die nicht-PM-Fraktion mit gleicher BR-Menge (Abb. 3.32).

Dies ist anscheinend auf die spezifische Lipidzusammensetzung der PM zurückzuführen, da der Unterschied im Lipidgehalt der beiden Fraktionen mit einer Dichte von $1.14 - 1.16 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ und $1.18 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (PM) nicht so groß ist, um diesen Unterschied der Radioaktivitätsmenge erklären zu können. Bei einem Massenverhältnis von Protein zu Lipid in der PM mit 75 % zu 25 % folgt für die leichtere Fraktion mit $1.16 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ eine Zunahme des Lipidanteils auf etwa 30 % (w/w). Bei einem Molverhältnis von 10:1 (Lipid/Protein) in der PM entspräche das etwa 2 Lipidmolekülen mehr pro Protein, unter der Annahme, dass alle Proteine die Masse von BR besitzen. Damit läge die zu erwartende Zunahme der Radioaktivitätsmenge bei etwa 25 %, wenn der Anteil des Palmitats an den Lipiden in beiden Membranfraktionen gleich wäre. Bei gleicher Proteinmenge liegt die Radioaktivitätsmenge im mittleren Bereich der beiden Fraktionen bei etwa 820 cpm (nicht-PM) bzw. 220 cpm (PM), d.h. 270 % mehr in der nicht-PM-

Fraktion. Selbst bei großzügigerer Schätzung der Lipidmenge in dieser Fraktion kann der Lipidanteil alleine nicht der Grund für diese Diskrepanz sein. Dies führt zu dem Schluss, dass die Lipide der PM die Palmitinsäure während der PM-Bildung verdrängen.

Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der Absorptionswerte für 280 und 570 nm und die dazugehörige Radioaktivität in der Fraktion.

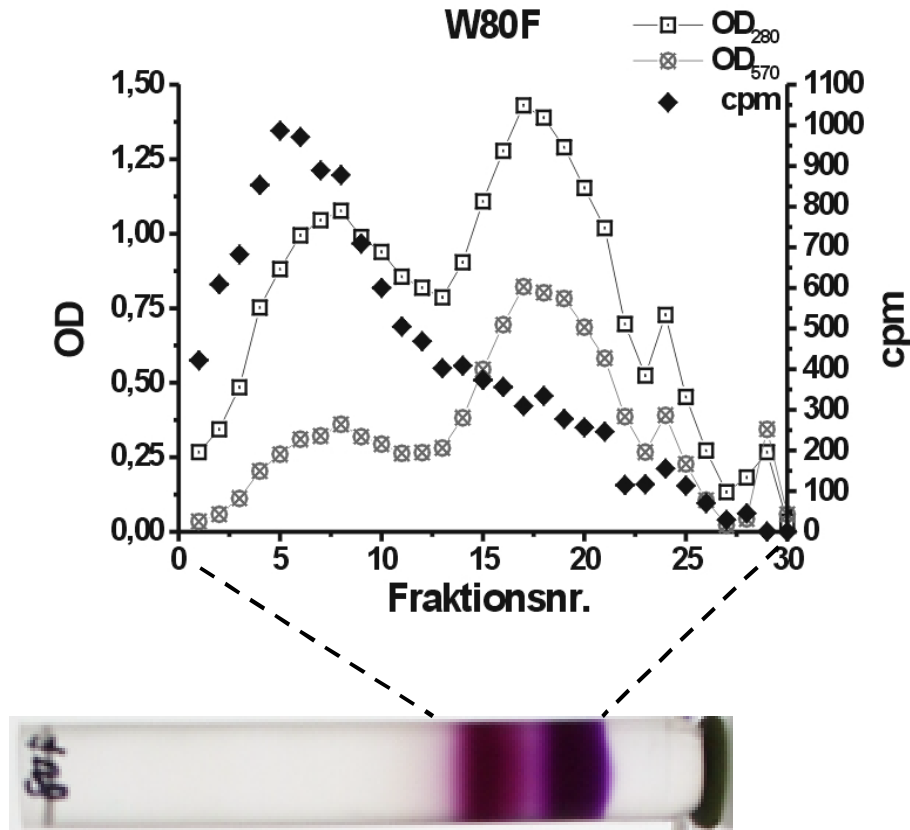


Abb. 3.35 Der Verlauf der Radioaktivität von ^3H -Palmitat in 100 μl -Fraktionen aus dem Saccharosegradient (25 – 45 %, w/w) der Gesamtmembranfraktion einer 400 ml-Kultur mit W80F (unten) zeigt einen geringen Gehalt an ^3H -Palmitat in der PM-Fraktion.

Ein Teil der Radioaktivität in der PM-Fraktion des Saccharosegradienten ist auf die schlechte Auftrennung der beiden Fraktionen zurückzuführen, wie an der Abbildung des betreffenden Gradientenröhrchens zu erkennen ist. Die Menge des eingebauten ^3H -Palmitats in der PM ist vermutlich geringer als die gemessene, da bei der manuellen Fraktionierung mit je 100 μl im Grenzbereich aufgrund der schlechten Trennung der Membranfraktionen ein Teil der nicht-PM-Fraktion mit der PM-Fraktion vermischt wurde.

Aufgrund der Anwesenheit anderer Proteine neben HR und dem ähnlichen Verlauf der Mengen des radioaktiven Palmitats bei den Membranfraktionen von HR und BR-W80I, war die Untersuchung der nicht-PM-Fractionen aus den Saccharosegradienten nicht aufschlußreich.

Um eine spezifische Bindung des Palmitats an HR zu finden, wurde die Menge an ^3H -Palmitat bestimmt, die nach der Aufreinigung über die Säule noch an das Protein gebunden

ist. Dazu wurden die Membranfraktionen mit HR und BR-W80I mit Cholat in 3 M KCl solubilisiert und über eine Phenylsepharosesäule (CL-4B Resource, Pharmacia) gereinigt und fraktioniert. Die Radioaktivität in einem Aliquot dieser Fraktionen wurde in einem Szintillationszähler detektiert. Es wurden je zwei Läufe für jede Probe mit gleichen Volumina durchgeführt, wobei der Detergenzwechsel zu Octyl- β -glucosid (β -OG) im gleichen Puffer beim zweiten Lauf früher erfolgte als beim ersten Lauf (grauer Pfeil in Abb. 3.36).

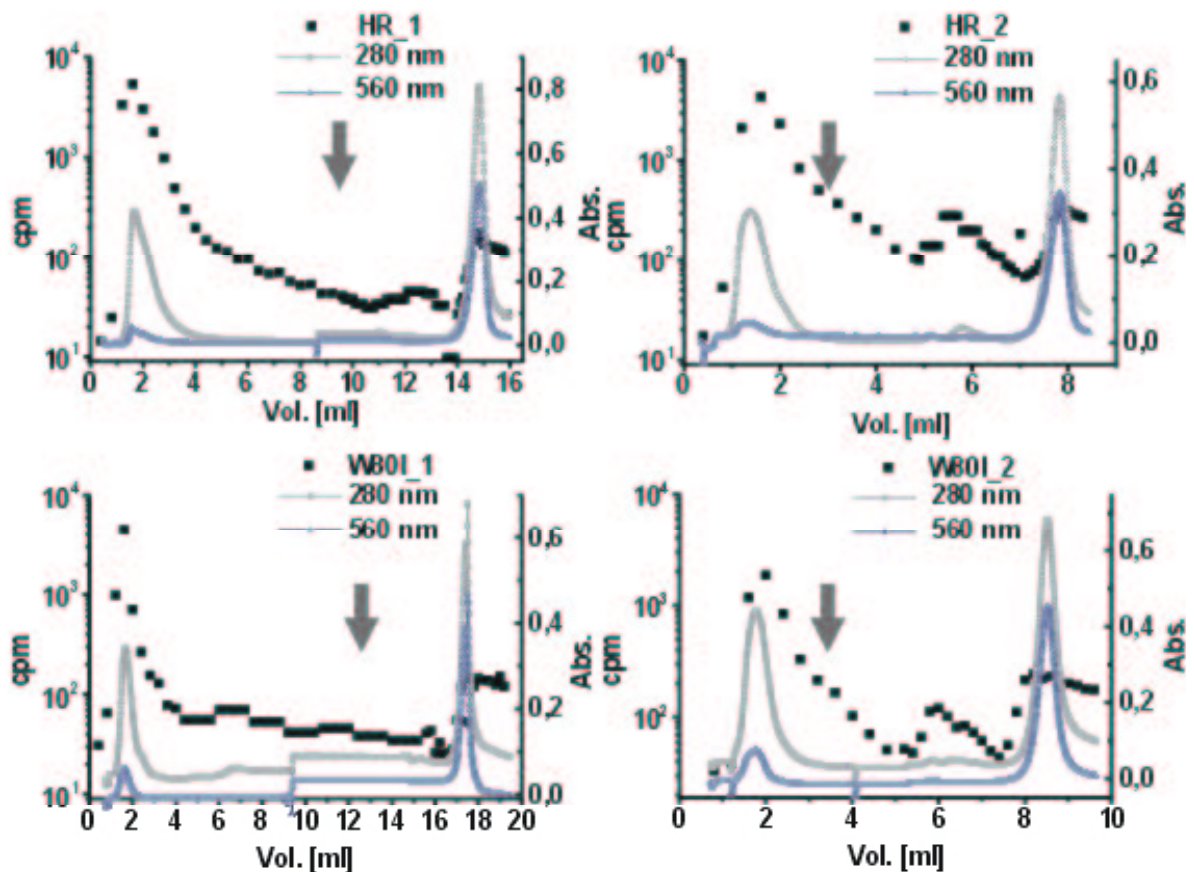


Abb. 3.36 Chromatogramme der Aufreinigung von HR und BR-W80I und Verlauf der Radioaktivität (cpm) in den gesammelten Fraktionen. Graue Pfeile zeigen den Wechsel des Detergenz im Laufpuffer von Cholat zu β -OG an.

Bei der ersten BR-Probe wurde mit etwa 2 ml mehr von Laufpuffer A gewaschen als die HR-Probe, da der Detergenzwechsel aufgrund eines Fehlers im Fraktionssammler nicht rechtzeitig stattfinden konnte. Diese Verzögerung änderte jedoch nichts am ähnlichen Elutionsverhalten der beiden Proteine. In Abb. 3.36 sind die Elutionsprofile der Radioaktivität und der Verlauf der Absorption bei 280 und 560 nm dargestellt.

Der Verlauf der Radioaktivitätsmenge korreliert sehr gut mit der Proteinabsorption. Der überwiegende Teil des ³H-markierten Palmitats befand sich im Durchlauf, wie man an der logarithmischen Skala deutlich erkennen kann. Das letzte Maximum der Radioaktivität fällt mit dem Maximum der Absorption bei 560 nm zusammen, so dass ein Teil des Palmitats bis

zuletzt an HR und BR gebunden bleibt, und zwar umso mehr, je früher der Detergenzwechsel stattfindet. Im Falle des frühen Detergenzwechsels (Abb. 3.36, HR₂ + W80I₂) erscheint in beiden Läufen ein kleines Maximum der Absorption bei 280 nm nach etwa 6 ml, der mit einem deutlichen Anstieg der Radioaktivität, jedoch nicht mit der Absorption bei 560 nm korreliert und somit nicht HR bzw. BR zugeordnet werden kann.

Ein Unterschied zwischen HR und BR ist bei dieser Reinigung nicht erkennbar, so dass die Wechselwirkung von Palmitat mit beiden Proteinen unter diesen Bedingungen ähnlich stark sein muß. Damit wird bestätigt, dass Palmitat bis zum Kristallisationsansatz mit HR zusammen isoliert werden kann, was Colella *et al.* (1998) bereits früher zeigen konnten (Abb. 3.37).

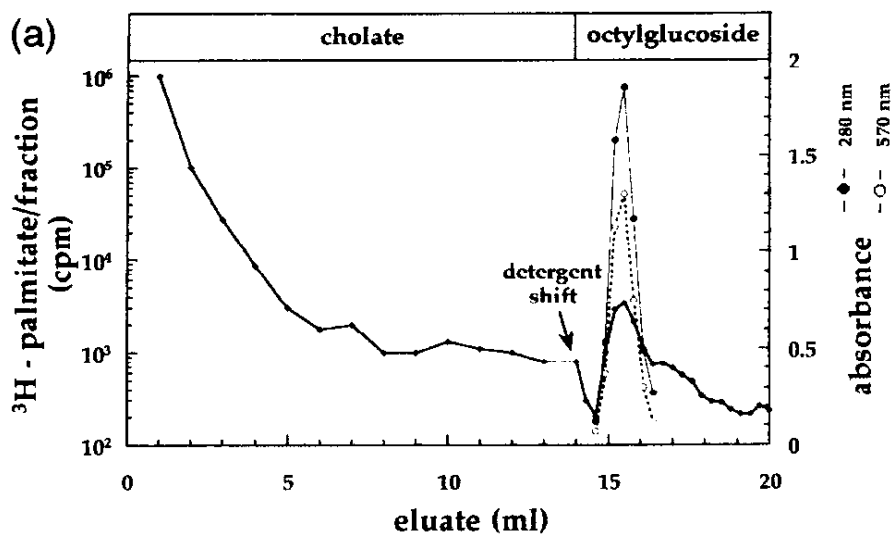


Abb. 3.37 Elutionsprofil für ³H-Palmitat-markiertes HR aus Colella *et al.* (1998)

Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass sich der größte Teil der Radioaktivität im Durchlauf befand, während an HR gebundenes ³H-Palmitat nur einen kleinen Teil der Gesamtmenge ausmachte. Im Unterschied zur früheren Interpretation ist die Assoziation von Palmitat mit HR nicht hochspezifisch. Die Wechselwirkung von Palmitat mit den BR-Molekülen aus der nicht-PM-Fraktion von W80I ist der zu HR ähnlich. Es ist zu vermuten, dass das Palmitat generell mit den hydrophoben Membranproteinen interagiert, was am zusätzlichen Proteinpeak bei den kurzen Läufen zu erkennen ist.

3.6 Mutationen in Halorhodopsin

Die hochaufgelöste Struktur von Halorhodopsin bietet die Möglichkeit, für die Funktion der Ionenpumpe bedeutende Reste gezielt zu mutieren und die Auswirkung der Mutation zu untersuchen. Es wurden zahlreiche Reste ausgewählt, die in Tab. 3.12 aufgelistet sind. Die jeweiligen Begründungen für die Auswahl dieser Mutationen sind stichpunktartig aufgeführt. Es wurden unter anderem Aminosäuren mutiert, die an der Chloridbindung beteiligt sind bzw. dabei eine Rolle spielen könnten. Für Expressionsstudien wird der bereits erwähnte Vektor pHUSneu verwendet, in den das jeweilige mutierte Fragment kloniert wird.

S73A	H-Brücke zu H ₂ O 508 in Cl ⁻ -Bindungsstelle
S76A	H-Brücke zu H ₂ O 512 in Cl ⁻ -Bindungsstelle
Y77F	H-Brücke zu H ₂ O 508 in Cl ⁻ -Bindungsstelle
S115A	H-Brücke zu Cl ⁻ (konserviert in allen HR)
P117A	konservierter Rest in allen Retinalproteinen; erst ab 250mM Cl ⁻ -Transport, $K_M(\text{Cl}^-) > 2\text{M}$ gegenüber 180mM bei WT (Rumpel, 1993)
D238A	H-Brücken zu H ₂ O 505 + NH der PSB in Cl ⁻ -Bindungsstelle (Austausch gegen kleine, neutrale Seitenkette)
D238N	H-Brücken zu H ₂ O 505 + NH der PSB in Cl ⁻ -Bindungsstelle (Austausch gegen gleichgroße, neutrale Seitenkette)
D238E	H-Brücken zu H ₂ O 505 + NH der PSB in Cl ⁻ -Bindungsstelle (zusätzliche CH ₂ -Gruppe, Änderung des Abstands)
D141G	konservierter Rest in allen Retinalproteinen; HR640-Zerfall (ohne Cl ⁻) 15x langsamer als WT; λ_{max} um 20 nm blauverschoben
M144L	evtl. Bedeutung bei Reisoomerisierung des Chromophors (in der Nähe der Polyen-Kette, konservierter Rest in Retinalproteinen)
S168A	evtl. Bedeutung bei Reisoomerisierung des Chromophors (in der Nähe der Polyen-Kette, konservierter Rest in Retinalproteinen)
Q105M	H-Brücke zu R108 (entsprechender Rest in HR von <i>N. pharaonis</i>)
S189C	Rest an der CP-Oberfläche für Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen
R103V	H-Brücke zu R108 (entsprechender Rest in HR von <i>N. pharaonis</i>)
L131,F135, I138A	hydrophober Ring auf der CP-Seite (evtl. wichtig für Aggregation des Trimers mit Palmitat)

Tab. 3.11: Liste der Mutationen in HR, die die Struktur und Funktion von HR beeinflussen könnten; die Numerierung der Wassermoleküle erfolgte nach Kolbe *et al.* (2000).

Bei einem Teil der Mutanten wurde die Expression des *hop*-Gens und die Isolierung von Membranfraktionen mit HR erfolgreich durchgeführt (S73A/T85A, S76A, Y77F, P117A, D238E, D238N). Die Mutante S73A/T85A enthält eine ungewollte, PCR-bedingte Mutation (T85A). Die weitere Charakterisierung dieser Mutanten wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

3.7 Fusionsproteine mit Bacteriorhodopsin

Die Purpurmembran läßt sich, wie beschrieben, leicht in einem Schritt isolieren und enthält als einziges Protein BR in sehr reiner Form. Es wurde bereits publiziert, dass man diese Eigenschaft der PM dazu ausnützt, lösliche Proteine mit BR zu fusionieren und in einem Schritt von den anderen Proteinen abzutrennen (Nomura *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 1999a; Turner *et al.*, 1999b). In dieser Arbeit wurde ein Vektor konstruiert, mit dem diese Methode für möglichst viele lösliche Proteine leicht angewandt werden kann. Im folgenden wird die Konstruktion des Vektors und die erfolgreiche Anwendung für das lösliche Ferredoxin (Fdx, 14.5 kD) aus *H. salinarum* beschrieben. In Abb. 3.38 ist das Fusionsprodukt aus BR und Fdx skizziert.

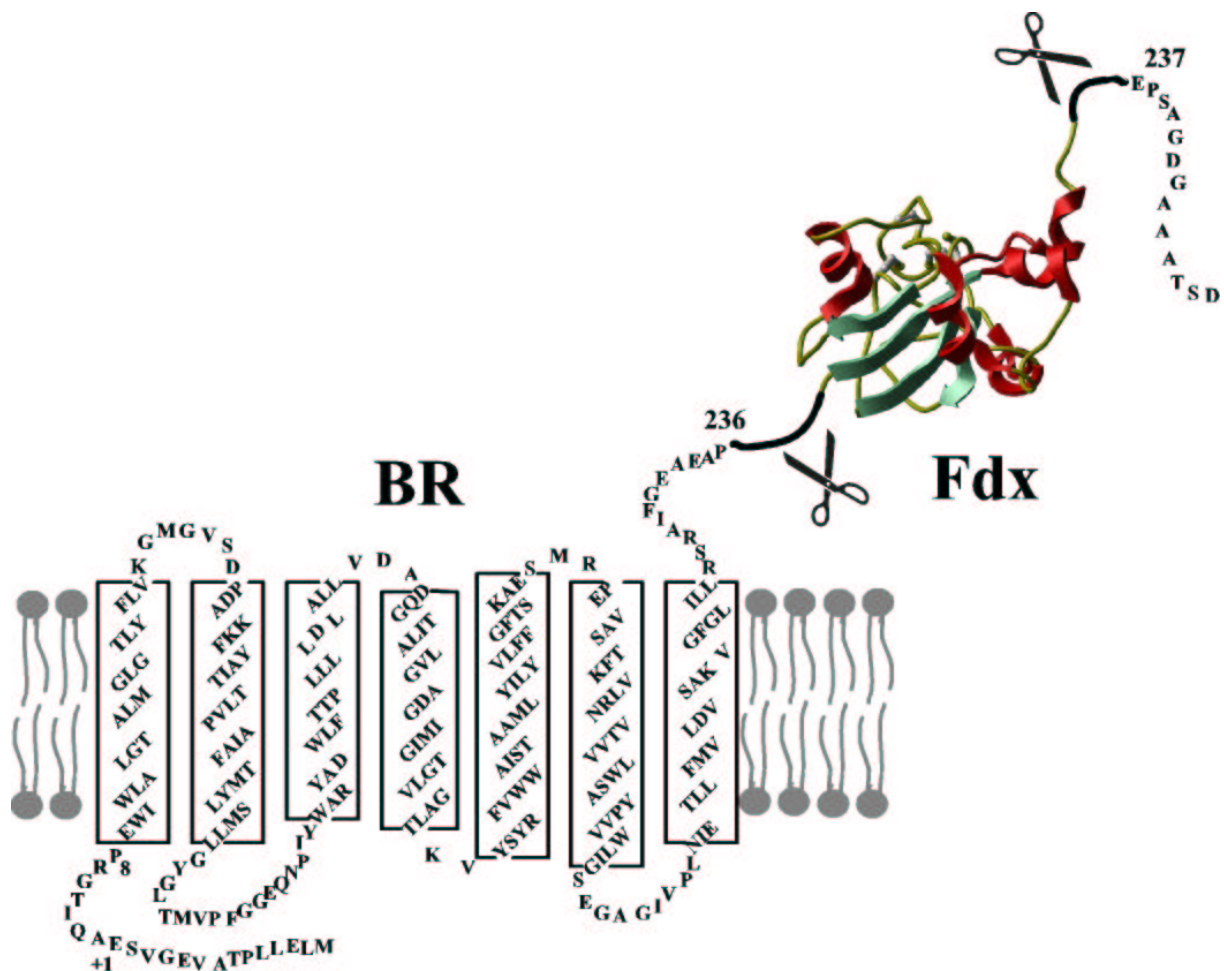


Abb. 3.38 Schematische Darstellung des Fusionsproteins BR-Fdx mit dem 2D-Strukturmodell von BR nach Essen *et al.* (1998) und 3D-Modell von Fdx aus *H. marismortui* (Frolow *et al.*, 1996). Die Scheren vor und hinter Fdx deuten die eingebauten Schnittstellen für die Protease Faktor Xa an.

Zunächst wurde das 3'-Ende des *bop*-Gens mittels PCR folgendermaßen modifiziert. Nach der Translation entstehen zwei Erkennungssequenzen (IEGR) für die Protease Faktor Xa, die von kurzen Sequenzen aus kleinen bzw. hydrophilen Aminosäuren flankiert werden. Dadurch sollte beim Verdau mit der Protease die Zugänglichkeit zur Erkennungssequenz am mem-

brangebundenen Fusionsprotein gewährleistet sein. Dazwischen befindet sich eine Sequenz mit Erkennungssequenzen von fünf Restriktionsenzymen (*Stu* I, *Bst* EII, *Nco* I, *Eco* RI, *Bgl* II), um bei der Klonierung der zu exprimierenden Gensequenzen mehrere Möglichkeiten für die Auswahl der Schnittstellen zu haben. Die Sequenz des modifizierten 3'-Endes ist unten mit der entsprechenden Aminosäuresequenz dargestellt:

```

227                                     236
cgt  gcg  atc  ttc  ggc  gaa  gcc  gaa  gcg  ccg  gcg  tcc  ggc  ATC GAGGGC
R   A   I   F   G   E   A   E   A   P   A   S   G   I   E   G
                                     Stu I   Bst EII  Nco I           Eco RI

CGGgcg  agc  gcc  acg  AGG CCT GGT AAC CAT GGc  gca  tcG  AAT Tcg  aac
R   A   S   A   T   R   P   G   N   H   G   A   S   N   S   N
      Bgl II                                     237
AGA TCT acc  gcg  tcg  ATC GAA GGT CGC gag  ccg  tcc  gcc  ggc  gac  ggc
R   S   T   A   S   I   E   G   R  E   P   S   A   G   D   G

gcg  gcc  gcg  acc  agc  gac  tga
A   A   A   T   S   D   *

```

Die Codons der zwischen P236 und E237 in BR eingefügten Sequenz sind fettgedruckt, wobei die Erkennungssequenz für Faktor Xa unterstrichen sind. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme sind durch kursive Großbuchstaben hervorgehoben. Bei dem Entwurf der Sequenz wurde einerseits darauf geachtet, dass die eingefügten Codons häufig in halophilen Sequenzen vorkommen, andererseits die Aminosäuren möglichst nur kleine oder hydrophile Seitengruppen enthalten.

In das *fdx*-Fragment wurden mittels PCR die Schnittstellen *Bst* EII und *Bgl* II unmittelbar vor dem Codon für die erste bzw. nach dem für die letzte Aminosäure eingefügt, so dass nach Verdau und Ligation in den Vektor das Ferredoxin im selben Leserahmen liegt wie BR. Die Oligonukleotide für die PCR dieses Fragments waren *fdxBstEIIseq* (5'-CGA GCA **GGT AAC** CCG ATG CCG ACG GTA GAA TAC CTC-3') und *fdxBglIIrev* (5'-CAG TCC **AGA TCT** GAT GAC GCG GTT CTG CAG GTA G-3'). Die Schnittstellen sind fett und kursiv gedruckt, während die Codons für die erste und letzte Aminosäure unterstrichen sind. Der resultierende Vektor pHUSbrfus für die Expression in *H. salinarum* ist bis auf die Modifikation am 3'-Ende des *bop*-Gens mit pUS-Mev identisch. In Abb. 3.39 ist pHUSbrfus schematisch dargestellt. Die eingefügten Schnittstellen am 3'-Ende des *bop*-Gens sind eingerahmt.

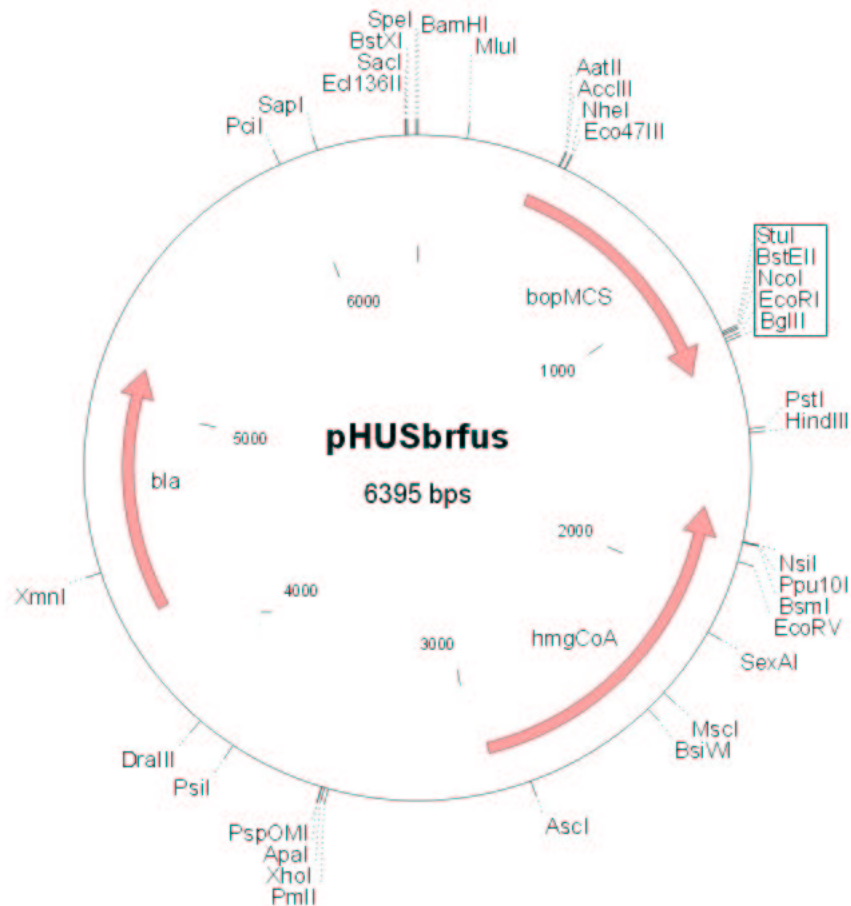


Abb. 3.39 Vektor für die Konstruktion von Fusionsproteinen mit BR. Die eingerahmten Enzyme am 3'-Ende von *bop* können für die Klonierung des zweiten Gens verwendet werden.

Nach Transformation des *bop*-Deletionsstammes SNOB wuchsen nach etwa drei Wochen farbige Klone auf den Agarplatten, von denen mehrere in flüssiges Medium überführt werden. Die Kulturen wurden unter Belichtung inkubiert. Von diesen Zellen wurde die Membranfraktion isoliert, wobei während der Isolierung Proteaseinhibitoren in den Puffer gegeben wurden, um eine unkontrollierte proteolytische Spaltung des Fusionsproteins zu verhindern. Dieser Puffer wurde auch für den Saccharosegradienten verwendet, bei dem aufgrund der zu erwartenden höheren Dichte der PM eine Saccharosekonzentration von 30 – 60 % (w/w) eingestellt wurde. In Abb. 3.40 ist ein solcher Gradient (rechts) neben einem mit WT-PM (links) als Kontrolle dargestellt. Erwartungsgemäß zeigte die PM mit dem Fusionsprotein aufgrund des höheren Proteinanteils eine höhere Schwimmdichte als WT-PM.

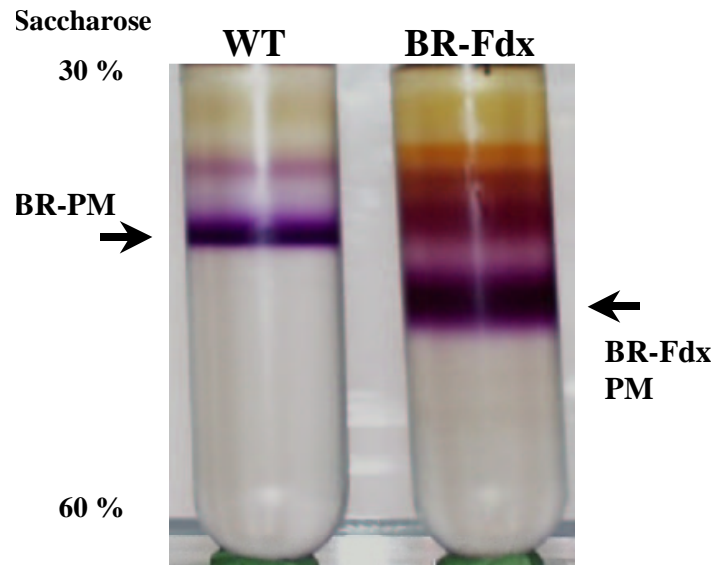


Abb. 3.40 Saccharosegradienten mit WT-PM und PM mit Fusionsprotein BR-Fdx.

Die PM-Fraktion wurde isoliert und im gleichen Puffer durch Zentrifugation gewaschen, um die Saccharose zu entfernen. Die Proben wurden auf einem 13 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Abb. 3.41 zeigt das coomassiegefärbte Gel mit zwei unverdauten Proben aus zwei Präparationen des Fusionsproteins (5 + 6), WT-BR (4) und WT-Fdx (7) als Kontrollen.

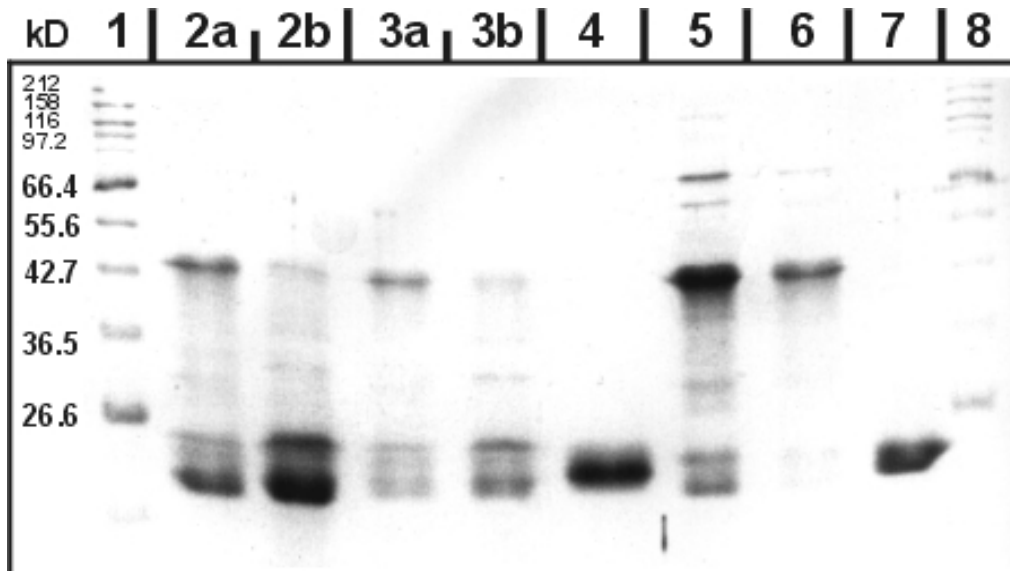


Abb. 3.41 Coomassiegefärbtes Gel nach proteolytischem Verdau von zwei Proben des Fusionsproteins BR-Fdx; 1 + 8: Proteinmarker, 2a + 2b: BR-Fdx1 verdaut mit Faktor Xa (im Verhältnis 1:200 bzw. 1:50), 3a + 3b: BR-Fdx2 verdaut mit Faktor Xa (im Verhältnis 1:200 bzw. 1:50), 4: WT-BR, 5: BR-Fdx1 (unverdaut), 6: BR-Fdx2 (unverdaut), 7: WT-Fdx.

Die PM-Fraktion mit dem Fusionsprotein zeigt eine deutliche Bande mit einer apparenten Masse von etwa 44 kD, was der Summe der Massen von BR, Fdx und der zusätzlich eingefügten Aminosäuren entspricht (416 Aminosäuren). Bei der höher konzentrierten Probe 5 ist zu erkennen, dass das komplette Fusionsprotein nicht die einzige Proteinkomponente der BR-

Fdx-PM darstellt, sondern dass ein Teil des Fusionsproteins proteolytisch in BR und Fdx gespalten worden ist, was beim Vergleich mit den Banden bei den verdauten Proben deutlich wird. Die zwei Banden bei etwa 21 und 23 kD scheinen jedoch durch unspezifischen Verdau des Fusionsproteins entstanden zu sein, da das größere Fragment (Fdx) eine kleinere Masse besitzt als das entsprechende Fragment in den verdauten Proben (2a/b, 3a/b) (ca. 24 kD). Die Fragmente von BR und Fdx sind kleiner bzw. größer als bei den Wildtypproteinen, da der C-terminus von BR durch den Verdau kürzer bzw. beide Enden von Fdx durch die Linkersequenzen länger werden. Auffällig sind noch zwei schwache Banden, die bei etwa 60 und 67 kD und somit höher liegen als BR-Fdx und nicht zugeordnet werden können. Aufgrund der deutlich größeren Menge an BR-Fdx dürfte dies jedoch bei der weiteren Reinigung von Fdx nicht gravierend sein. Möglicherweise lassen sich durch Optimierung der Expression und Isolierung der PM die Verunreinigungen abreichern, so dass man, wie erwünscht, nur BR und Fdx in der PM-Fraktion erhält.

4 Diskussion

4.1 Einfluß der Mutationen auf die Funktion von BR

Der Austausch der aromatischen Aminosäuren W12, Y64, und W80 gegen Isoleucin hat nur geringe Veränderung des Photozyklus zur Folge. Die Absorptionsmaxima sind in den nicht-PM-Fractionen von W12I und W80I im dunkeladaptierten Zustand im Vergleich zur dunkeladaptierten PM um 10 bzw. 7 nm blauverschoben. Bei lichtadaptierten Proben bleiben die Unterschiede zwischen WT-BR und Mutanten annähernd konstant (9 nm bei W12I, 6 nm bei W80I). Somit zeigen die nicht-PM-Fractionen der Mutanten ebenso wie der WT-BR in der PM einen Unterschied von etwa 10 nm zwischen der licht- und dunkeladaptierten Form. Ein signifikanter Anteil an 9-*cis*-Retinal, wie er in lichtadaptierten nicht-PM-Fractionen der Mutanten gefunden wird, trägt nicht zu einer größeren Blauverschiebung der Absorptionsmaxima bei. Der Einfluß der verschiedenen Retinalisomeren auf λ_{\max} wird im folgenden genauer erläutert.

Für BR mit 100 % 13-*cis*-Retinal liegt λ_{\max} bei 548 nm (Sperling *et al.*, 1977), mit 100 % all-*trans*-Retinal bei 569 nm. Dies führt bei steigendem 13-*cis*-Anteil zu einer Blauverschiebung des Absorptionsmaximums, das in dunkeladaptierter Form, d.h. im thermischen Gleichgewicht mit etwa 60 % 13-*cis*- und 40 % all-*trans*-Retinal, bei 559 nm liegt. Der Anteil an 13-*cis*-Retinal in den lichtadaptierten nicht-PM-Fractionen der Mutanten liegt unter 10 % und verursacht daher nur eine geringe Verschiebung des Absorptionsmaximums. Der Anteil an 9-*cis*-Retinal in den Mutanten (10 % bei W12I, 14 % bei W80I) im lichtadaptierten Zustand hat ebenfalls keine signifikante Verschiebung des Maximums zur Folge, da diese Form mit freiem 9-*cis*-Chromophor bei etwa 390 nm absorbiert (Fischer *et al.*, 1981). Deswegen hat diese blauverschobene Form auf das Absorptionsmaximum bei 560 bzw. 563 nm keinen Einfluß. Diese Eigenschaften der 9-*cis*- und 13-*cis*-Spezies erklären somit den Unterschied von 10 nm zwischen den licht- und dunkeladaptierten Formen von BR in den nicht-PM-Fractionen. Dies entspricht der Verschiebung des Absorptionsmaximums von WT-BR in PM. Der signifikante Anteil an kürzerwellig absorbierenden *cis*-Isomeren in BR von etwa 20 % (W12I) und 25 % (W80I) wirkt sich somit kaum auf die Differenz zwischen dunkel- und lichtdaptierter Form aus.

Da die kristalline Fraktion von W12I keine Unterschiede im Absorptionsverhalten verglichen mit WT zeigt, liegen die Unterschiede eindeutig an der Membranumgebung, in der die mutierten BR-Moleküle eingebettet sind. Dafür spricht auch die größere Ähnlichkeit der Absorptionsmaxima in solubilisierten Proben, in denen die Differenz zum WT bei W12I auf 5

nm und 2 nm bei W80I absinkt. Die Mutante Y64I hat im solubilisierten Zustand ein dem WT nahezu identisches λ_{\max} , während für die PM-Fraktionen die Abweichung 3 – 4 nm beträgt.

Die *in vivo*-Experimente zeigen bei den Zellen, die keine bzw. stark reduzierte PM-Ausbeuten aufweisen, keinen Unterschied in der spezifischen Protonenpumpaktivität, so dass die kristalline Anordnung der PM dafür keinen Vorteil bietet. Da die Mutante W80I weniger als 1 % des BR in Form von PM enthält, kann sie als geeignete Kontrollmutante für den Einfluß der PM auf die Pumpaktivität von BR verwendet werden. Die Kinetik der Photozyklen von WT-BR und den Tryptophanmutanten unterscheiden sich insgesamt nur wenig. Demnach müßte sich bei einer signifikant höheren Aktivität von BR in der PM eine deutliche Abnahme der Aktivität bei den Mutanten nachweisen lassen. Da dies nicht der Fall ist, scheidet eine Zunahme der Effizienz von BR in der PM-Form als Erklärung für die Bevorzugung der PM in den Zellen aus.

Die Anfangsrate der Photophosphorylierung in den Mutanten ist, wie im Wildtyp, linear abhängig von der vorhandenen BR-Menge, was eine raschere Protonenleitung auf der PM zur ATP-Synthase im Vergleich zur restlichen Membranoberfläche ausschließt. Dies wurde bei Untersuchungen mit der Braunen Membran vermutet, die in nicotinbehandelten Zellen gebildet wird und, nach Rekonstitution mit Retinal, BR in überwiegend nicht-kristalliner Form enthält. In diesen Zellen wurde bei gleicher BR-Menge eine deutlich niedrigere Anfangsrate für die Photophosphorylierung gemessen (Hartmann und Oesterheld, 1977). Hinzu kommt die Beobachtung, dass die Diffusion von Protonen an der Oberfläche der PM schneller ist als der Übertritt in das umgebende Wasser, was eine besonders effiziente Protonenleitung durch die PM-Struktur vermuten ließ (Heberle *et al.*, 1994). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass die PM-Struktur eine rasche Protonenleitung an der Membranoberfläche unverzichtbar sei und BR deswegen in der Zelle ausschließlich in Form der PM vorliegt. Die Photophosphorylierungsraten bei den Tryptophanmutante zeigt jedoch, dass eine Abnahme des PM-Anteils in der Membran nicht zu einer meßbaren Verlangsamung der ATP-Bildungsrate in der Zelle führt. Demnach ist die Protonenleitung an der Oberfläche der Zellen mit wenig bzw. ohne PM dadurch nicht verlangsamt.

4.2 Einfluß der Mutationen auf die *in vivo*-Kristallisation von BR

Die Bildung der PM wird durch den Austausch der Tryptophane W12 und W80 gegen die aliphatische Aminosäure Isoleucin signifikant gestört. Dies liegt nicht am geringeren BR-Gehalt dieser Zellen, die deutlich weniger BR produzieren als Zellen mit WT-BR. Bei anderen WT-Stämmen (R1, S9_{mut}) wird trotz geringerer BR-Ausbeute das gesamte BR in die PM einge-

baut. Die Ausbeute an PM wird bei den Mutanten auch durch längere Wachstumszeiten nicht erhöht. Die Mutation der Reste Y64 und T67, die von Essen *et al.* (1998) als wichtige Wechselwirkungspartner des Glykolipids vorgeschlagen wurden, führen nicht zu einer Störung der PM-Bildung. Der Lysinrest 129, der möglicherweise mit der Sulfatgruppe von S-TGA1 ionisch wechselwirkt, war bereits zu Histidin und Cystein mutiert worden, ohne dass die Kristallisation gestört war (Govindjee *et al.*, 1997; Pfeiffer, pers. Mitteilung). Andere Mutationen, die hauptsächlich Helix-Helix-Interaktionen beeinflussten, wurden bereits früher untersucht (Isenbarger und Krebs, 1999; Krebs *et al.*, 1997). Dabei wurde für BR ein relativ geringer Einfluß von van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Helices auf die Stabilität der hexagonalen Kristalle gefunden. Eine wichtige Rolle für die Lipide als Vermittler der BR-Aggregation wurde daher vermutet.

Die Mutante W80I zeigt in einigen Eigenschaften große Ähnlichkeiten zur Braunen Membran (BM). Dazu gehört die im Vergleich zu PM geringere Schwimmdichte von $1.14 - 1.16 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, wobei die Schwimmdichte noch kein ausreichendes Kriterium für die Tendenz zur Kristallbildung ist, da kleinere kristalline Bereiche auch rekonstituierter BM spontan gebildet werden. Dunkeladaptierte BM besitzt wie PM ein Absorptionsmaximum von 560 nm (Hiraki *et al.*, 1984). Dies weist darauf hin, dass die rekonstituierte BM aus kleinen PM-ähnlichen Bereichen mit BR besteht, die in der restlichen nicht-kristallinen Membran verteilt sind.

Die nicht-PM-Fractionen mit W12I, W80I und W80F zeigen mit Halbwertszeiten zwischen 90 und 200 s wie BM mit 145 s (Peters und Peters, 1978) eine deutlich beschleunigte Dunkeladaptation gegenüber etwa 45 min in der PM. Bei vollständig mit Retinal rekonstituierter BM steigt die Halbwertszeit bereits auf 7 min, was eindeutig für den kristallinen Zustand als Ursache für die Verlangsamung der Isomerisierung spricht.

Die BM besitzt einen pK-Wert von 5.8 für die rotverschobene Form mit einem λ_{max} von 600 nm. Dies entspricht genau dem Wert für W80I und ist damit fast 3 pK-Einheiten höher als in der PM. Für diese Farbänderung wird die durch die aciden Lipide der PM stark beeinflusste Ladungsverteilung in der PM verantwortlich gemacht (Szundi und Stoeckenius, 1987 und 1989). Auf W80I-Zellen sind praktisch keine kristalline Flächen zu sehen, so dass es naheliegend ist, diese Farbverschiebung mit einer veränderten Ladungsverteilung an der Oberfläche von BR zu begründen. Mit abnehmender Kristallgröße haben mehr BR-Moleküle Kontakt mit umgebenden Membranbereichen. Dabei ist vermutlich die optimale Zusammensetzung bzw. Anordnung der Lipide in unmittelbarer Nachbarschaft nicht mehr gewährleistet. Wie weit diese Verteilung von BR bei W80I in der Membran vorliegt, war mit den vorhandenen Methoden nicht vollständig zu beantworten.

Sowohl für W12I als auch W80I zeigen die Rotationsdiffusionsexperimente eine deutliche Zunahme der Mobilität der BR-Moleküle in Vesikeln im Vergleich zum WT. Mit der Information aus den EM-Aufnahmen kann jedoch keine Aussage über die Größe der rotierenden Teilchen gemacht werden, da in der nicht-PM-Fraktion von W12I noch knapp die Hälfte BR-Moleküle in Form von kleineren Kristallen vorliegen. Da der kristalline Anteil in der nicht-PM-Fraktion vermutlich eine der PM ähnliche, konstante Anisotropie besitzt, rührt die gemessene Zunahme der Mobilität von BR in Vesikeln mit W12I vom nicht-kristallinen Anteil der BR-Moleküle her. Je kleiner die Aggregate mit BR-Molekülen werden, desto geringer wird auch der Unterschied zwischen Monomeren und diesen Oligomeren. Daher ist eine wünschenswerte Unterscheidung zwischen Monomeren und Trimeren mit dieser Methode nicht möglich, obwohl Spekulationen über die Größe der diffundierenden Teilchen in der Literatur geäußert wurden (Cherry *et al.*, 1977). Eine Unterscheidung von einer Mischung mit kristallinem und homogen verteiltem BR und ausschließlich nicht-kristallinem BR ist somit nicht durchführbar.

Die Auflösungsgrenze der Gefrierbruchmethode liegt bei 5 - 10 nm, was etwa dem Durchmesser eines Trimers entspricht, den man als einzelnes Partikel auf der Oberfläche beobachten kann. Schätzungsweise müßten mindestens 4 Partikel geordnet vorliegen, um als kristalline Anordnung erkennbar zu sein. Wie gezeigt wurde, ist bei W80I auf den meisten Zellen keinerlei Ordnung zu sehen, so dass eine Obergrenze für die Anzahl geordneter BR-Moleküle von etwa 12 angegeben werden kann. In diesem Verband hätten mehr als die Hälfte der Moleküle Kontakte zu Membranbereichen, die nicht der PM entsprechen, so dass sich die unterschiedlichen Wechselwirkungen mit anderen Molekülen deutlich in den Eigenschaften von BR äußern müßten im Vergleich zu BR in der PM. Somit liegt das BR in der Mutante W80I in einer Art Grenzzustand des BR in der Membran vor und kann in dieser Form für die Untersuchung der Eigenschaften von niedrig aggregiertem BR in der natürlichen Membranumgebung verwendet werden kann.

Die Mutante W12I liefert stark schwankende PM-Ausbeuten, während die BR-Menge relativ konstant ist. Diese Beobachtung kann mit Hilfe der EM-Ergebnisse leicht erklärt werden. Da in allen Präparationen nur maximal ein Drittel der erwarteten PM-Menge, somit etwa 15 % der Gesamtmenge, isoliert wird und die PM-Flecken auf den gefriergebrochenen Zellen meist sehr klein sind, können anscheinend nicht genügend große PM-Stücke von der restlichen Membran abgetrennt werden. Eine Erklärung dafür ist, dass der Prozess der PM-Entstehung nicht nur in einer Richtung, d.h. die Bildung großer zusammenhängender Flecken, weniger begünstigt ist, sondern auch durch die geringere Stabilität der entstandenen PM-Bereiche die-

se leichter zerfallen als beim Wildtyp. Sonst müßte die Bildung größerer PM-Bereiche mit der gleichen Häufigkeit auftreten, wenn ein einmal gebildetes PM-Stück ebenso stabil wäre wie es beim Wildtyp der Fall ist.

Die folgende Abbildung zeigt schematisch die mögliche Beziehung zwischen den unterschiedlichen Aggregationszuständen von BR-Monomeren zu großen PM-Flächen, wobei die Länge der Gleichgewichtspfeile lediglich qualitativ die Verhältnisse in der Zellmembran wiedergeben soll. Die Bildung großer PM-Kristalle durch Fusion von kleineren kristallinen Bereichen in der Zellmembran wurde durch Neugebauer *et al.* (1978) demonstriert. Dabei findet eine Anpassung der unterschiedlich orientierten Gitter der kleinen Kristalle statt, so dass schließlich ein einheitliches Kristallgitter entsteht. Für den Prozess der Trimerisierung von BR-Monomeren, wie er auf der linken Seite der Abbildung dargestellt ist, gibt es keine geeignete Nachweismethode, so dass diese Darstellung hypothetisch ist.

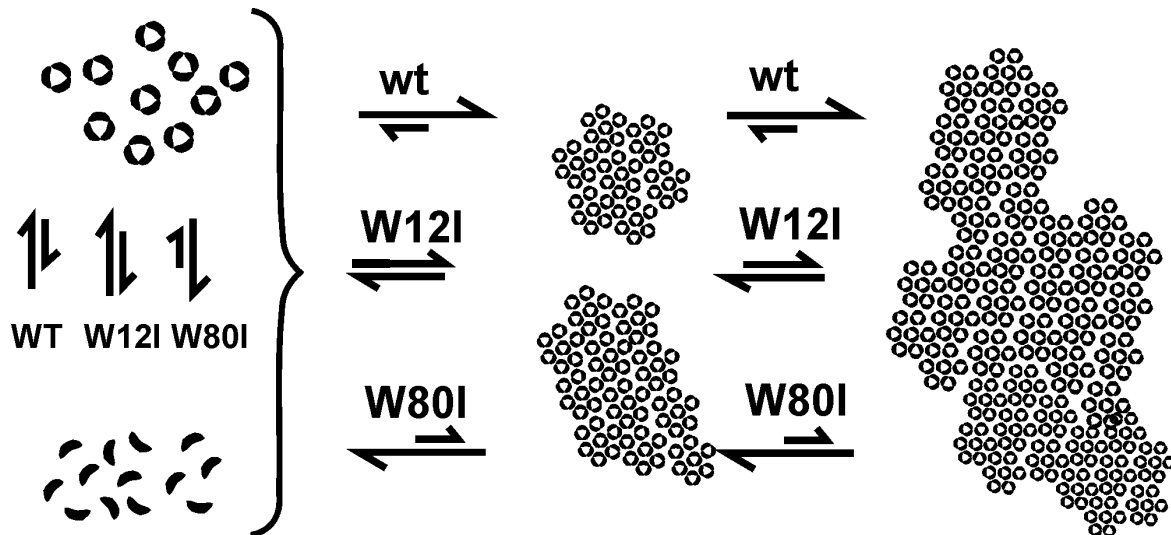


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Kristallisationseigenschaften von WT-BR und Mutanten über kleine kristalline Bereiche zu großen PM-Blättern; die Gleichgewichtspfeile verdeutlichen qualitativ die beobachteten Eigenschaften der Mutanten im Vergleich zum WT; das Verhalten von Monomeren und Trimeren (links) ist nicht charakterisiert, da eine direkte Unterscheidung zwischen diesen beiden Formen in der natürlichen Umgebung nicht möglich ist (das Größenverhältnis zwischen BR-Molekülen und PM-Bereichen ist nicht maßstabsgetreu).

Das Hauptproblem bei der Unterscheidung zwischen monomerem und trimerem BR ist, dass noch kein BR-Monomer in der natürlichen Membran nachgewiesen wurde. Monomeres BR wurde mit Hilfe der Ultrazentrifugation nur solubilisiert erhalten, wo es eindeutig als Monomer in einer Detergenzmizelle identifiziert wurde (Dencher und Heyn, 1979). Solubilisiertes BR wurde ebenfalls in Liposomen eingebaut, wo es nach Gefrierätzung möglich war, nach der Beschattung mit Platin/Kohlenstoff über die Partikelgröße einzelne BR-Monomere zu identifizieren (Gulik-Krzywicki *et al.*, 1987). Bei steigendem BR-Lipidverhältnis wurden größere

Partikel beobachtet, und es war nicht mehr eindeutig zu unterscheiden, ob Trimere oder höhere Oligomere entstanden. Dies führte zu dem Schluß, dass unter anderem die Fragen unbeantwortet sind, wie monomeres BR in seiner natürlichen Lipidumgebung sich von einem Trimer unterscheidet bzw. ob ein isoliertes Trimer identisch ist zum Trimer im PM-Gitter, insbesondere im Hinblick auf die natürliche Lipidumgebung.

Die klassische Methode zur Unterscheidung von BR-Monomeren und Trimeren bestand seit der Entdeckung des charakteristischen Circular dichroismus (CD) von PM im sichtbaren Bereich durch Heyn *et al.* (1975) in der Messung eines CD-Spektrums. Dieses zeigt einen für BR in PM einen biphasigen Verlauf (Abb. 4.2), der bereits früh einer excitonischen Wechselwirkung der Chromophore im Trimer zugeordnet wurde (Becher und Ebrey, 1976; Ebrey *et al.*, 1977; Kriebel und Albrecht, 1976).

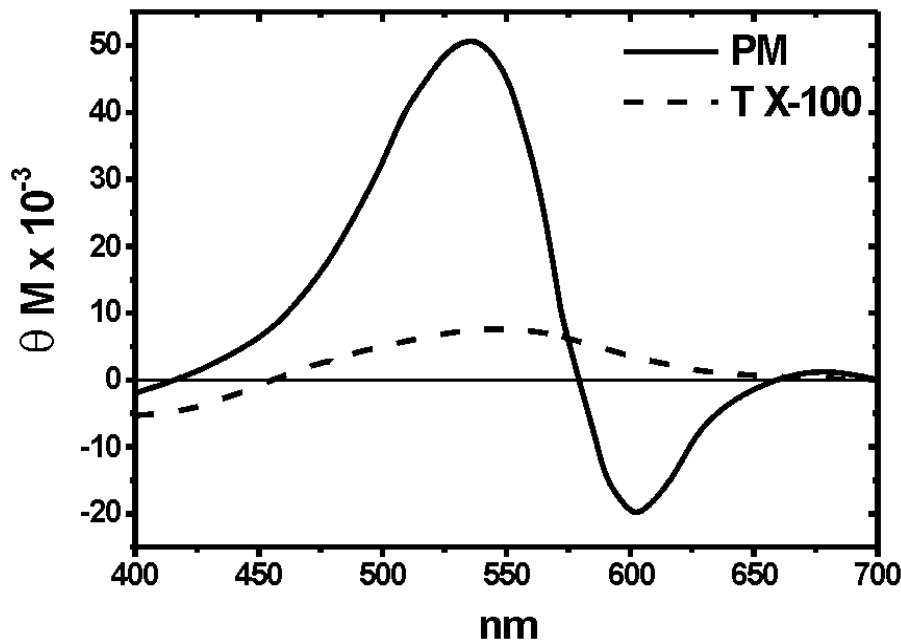


Abb. 4.2 Charakteristische CD-Spektren von BR in PM (—) und solubilisiert in Triton X-100 (- -).

Hinzu kommt die Beobachtung, dass beispielsweise in Triton X-100 solubilisiertes BR nur eine positive Bande mit viel geringerer Intensität im CD-Spektrum aufweist (Abb. 4.2). Daraus wurde geschlossen, dass der durch die chirale Proteinumgebung induzierte Circular dichroismus des Chromophors in einem BR-Monomer viel schwächer sei, während im Trimer durch Wechselwirkungen der angeregten Chromophore mit ihren Nachbarn eine deutliche Verstärkung dieses Effekts vorläge. Die Parameter wie z.B. Chromophorabstand und Übergangsdipolmoment, die zur theoretischen Herleitung des beobachteten Spektrums verwendet wurden, wichen jedoch so stark von den später genauer bestimmten Werten ab, dass die Theorie der Excitonwechselwirkung im Trimer auf ein Heptamer von Trimeren erweitert wurde,

um durch Summation der Wechselwirkungen die beobachteten Banden erklären zu können (Cassim, 1992; Hsiao und Cassim, 1979).

Obwohl zahlreiche Ergebnisse die Excitonwechselwirkung in PM stützten, wurden auch alternative Erklärungen für das CD-Spektrum gesucht und Experimente oder Berechnungen durchgeführt, um diese zu bestätigen bzw. die Excitontheorie zu widerlegen (Godfrey, 1982, Gulik-Krzywicki *et al.*, 1987, El-Sayed *et al.*, 1989; Jang *et al.*, 1990; Wu und El-Sayed, 1991; Kataoka *et al.*, 1993). Dabei wurde eine Heterogenität der Retinalkonformationen in der PM als Ursache für den beobachteten Dichroismus angenommen. Dennoch fand sich keine eindeutige und unzweifelhafte Interpretation dieses Phänomens, was aber die wenigsten Autoren daran hinderte, die biphasige Bande im CD-Spektrum als Zeichen für Excitonwechselwirkungen und somit Nachweis eines BR-Trimers zu verwenden. In zahlreichen Publikationen wird ein Phänomen, für das nicht einmal die Befürworter einen schlüssigen Beweis erbracht haben, für die Interpretation von Ergebnissen verwendet, ohne die kontroverse Diskussion dieses Phänomens zu berücksichtigen. Zusammenfassend können aus diesen Studien folgende eindeutige Ergebnisse abgeleitet werden:

- Solubilisiertes BR zeigt ein unterschiedliches Absorptions- und CD-Spektrum im Vergleich zu BR in der PM.
- Solubilisiertes BR ist monomer (s.o.) und hat ein monophasiges CD-Spektrum, was jedoch nicht notwendigerweise mit dem Spektrum eines Monomeren in der nativen Lipidumgebung identisch sein muß, da λ_{\max} verschoben und somit die Umgebung des Chromophors signifikant verändert ist.
- Monomere und kleinere Aggregate von BR in der Membran sind mit Hilfe der CD-Spektroskopie nicht zu unterscheiden.
- Kristallinität führt nicht immer zu einem biphasigen CD-Spektrum (z.B. PM der Mutante D85N (Kataoka *et al.*, 1993)).

Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurde bewusst auf die Anwendung der CD-Spektroskopie zur Bestimmung des Aggregationszustands von BR in der Membran verzichtet, da sie keine eindeutige Aussage zum Aggregationszustand der BR-Moleküle machen kann.

Eine eindeutige Unterscheidung zwischen Trimeren bzw. kleinen geordneten Aggregaten von BR und Monomeren ist auch mit Hilfe der ESR-Spektroskopie nicht möglich, da hier die Mutanten W12I und W80I sich zwar deutlich von kristallinem BR unterscheiden, jedoch durch die Anwesenheit des hohen Anteils an kristallinem W12I in der nicht-PM-Fraktion die Aussagekraft dieser Messungen abgeschwächt wird. Bereits ein Anteil von etwa 30 % ungeordneter BR-Moleküle würde eine Linienverbreiterung im ESR-Signal überdecken, so dass

bereits hier eine Aussage darüber unmöglich wird (Steinhoff, pers. Mitteilung). Die Tendenz zu mehr Mobilität und größeren mittleren Abständen unterscheidet jedoch deutlich die spinmarkierten nicht-PM-Fraktionen der Doppelmutanten von den markierten Einzelmutanten in der PM.

Die schwächeren dipolaren Wechselwirkungen in der Mutante W12I erscheinen trotz des kristallinen Anteils gegenüber W80I widersprüchlich, können jedoch durch die geringere BR-Menge in der Membran erklärt werden, die eine Abnahme der Partikeldichte insgesamt zur Folge haben muß. Kontrollaufnahmen mit BR-freien Zellen (SNOB) zeigen eine deutlich geringere Anzahl an Partikeln auf der Oberfläche, so dass die Zunahme der Partikeldichte allein auf den Einbau von BR zurückzuführen ist. Diese Beziehung gilt natürlich nicht für WT-Zellen, in denen BR quantitativ in die dichtgepackte PM eingebaut wird, und somit auf der restlichen Membran Bereiche mit geringerer Partikeldichte entstehen können.

Ähnlich verhält es sich mit dem Ergebnis aus dem Vernetzungsexperiment. Auch hier ist eine hohe Tendenz zu nichtkristallinem BR bei den Mutanten abzuleiten. Dabei spricht die kurze Reaktionszeit von 0.2 s deutlich dafür, dass nur Moleküle in unmittelbarer Nachbarschaft miteinander vernetzt werden. Dem deutlichen Signal auf der Höhe eines Trimers bei WT steht bei beiden Mutanten ein viel schwächeres Signal gegenüber, während bei diesen das Signal für das Dimer intensivsten ist. Die Ähnlichkeit der beiden Mutanten kann mit der oben geschilderten Möglichkeit der geringeren Stabilität der Kristalle von W12I erklärt werden. Hinzu kommt die Zunahme der „Oberfläche“ bei kleinen Kristallen, so dass immer mehr Kontakt von BR-Molekülen zu anderen Proteinen außerhalb der geordneten Bereiche vorhanden sein muß. Mit abnehmender Kristallgröße bei W12I könnte die Vernetzungsreaktion dieser BR-Moleküle untereinander weniger begünstigt sein, was zu einem ähnlichen Resultat führen würde wie bei W80I.

Bei W12I ist die PM-Entstehung weniger stark gestört als bei W80I, was möglicherweise an der Lokalisation von W12 auf der Trimeraußenseite liegt, da hier das vorhandene Lipid auch mit anderen Seitenketten, wie Y131 und F135 (Weik *et al.*, 1998) vom benachbarten Trimer interagieren kann und so der Effekt dieser Mutation nicht so drastisch auf die Kristallisationstendenz wirkt wie bei W80I. Diese Seitenkette von W80 hat Kontakt zu einer Phythanylseitenkette des zentralen Glykolipids S-TGA1 und bildet vermutlich zusätzlich über die NH-Gruppe des Indolrings eine H-Brücke zu einem Wassermolekül, das seinerseits mit einer OH-Gruppe eines Zuckerrests wechselwirkt. Jedoch konnte kein geordnetes Wassermolekül in den bisher publizierten Strukturmodellen in dieser Position identifiziert werden. Somit sind die Kräfte zwischen dem Lipid und W80 hauptsächlich hydrophober Natur. Dies zeigt sich deut-

lich in der PM-Ausbeute bei der Mutante W80F, bei der durch die aromatische Seitenkette die Wechselwirkung des Lipids mit der Aminosäure zum Teil wieder hergestellt ist. In Abb. 4.3 sind die durch die Mutation von W80 zu F bzw. I eingetretenen Unterschiede in der Größe der Seitenkette dargestellt. Die Seitenketten von Ile und Phe wurden *in silico* mit dem Programm SwissPDBviewer ausgetauscht und zeigen lediglich jeweils eine von mehreren energetisch günstigen Konformationen an. Der aliphatische Rest von Isoleucin (schwarz) ist wesentlich kleiner als die Tryptophanseitenkette (hellgrau), so dass die Interaktion mit der Phythanyl-kette (schwarze Kette), die sich an den hydrophoben Indolring anschmiegt und dadurch stark gekrümmt ist, nicht mehr gewährleistet ist. Der Benzolring von Phenylalanin kann diese für die optimale Positionierung des Lipids vermutlich entscheidende Wechselwirkung teilweise eingehen, obwohl auch hier ein deutlicher Größenunterschied zur Seitenkette des Tryptophans vorhanden ist.

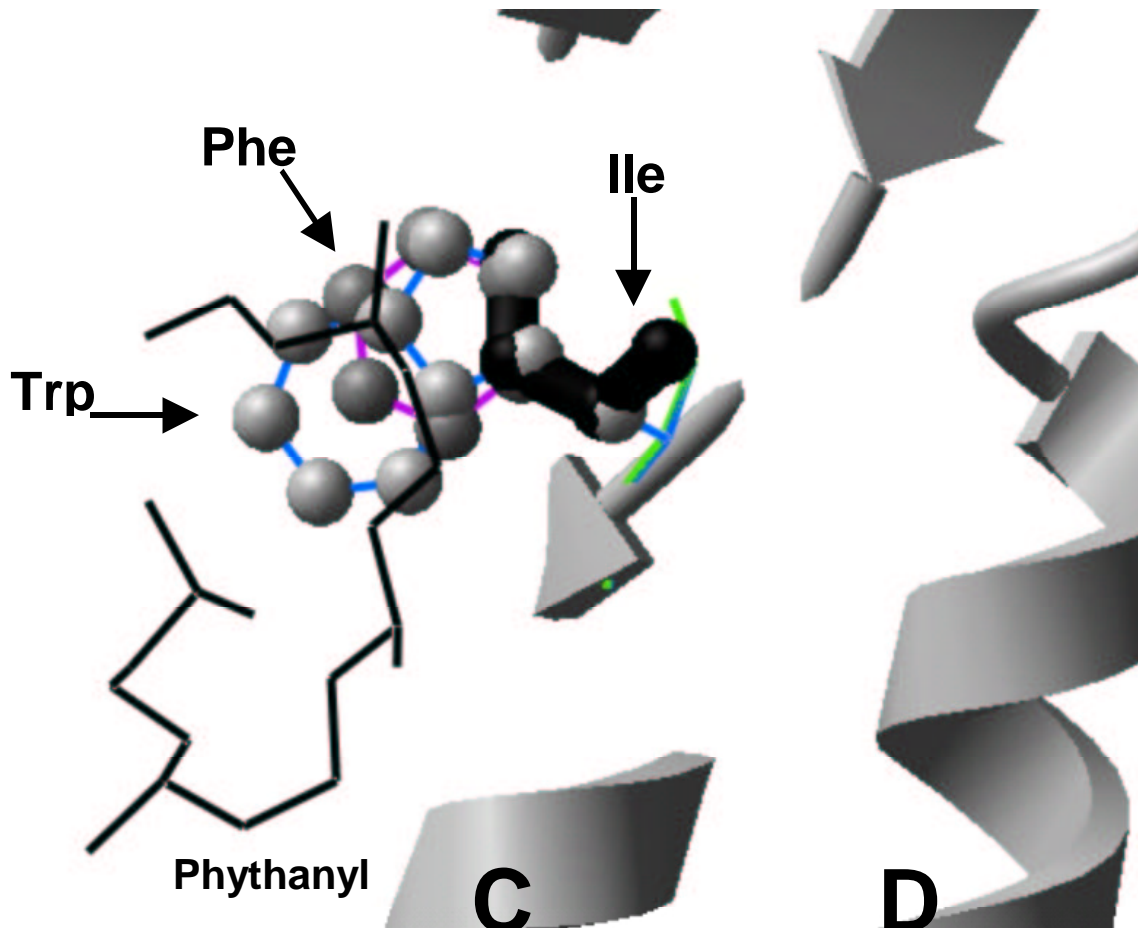


Abb. 4.3 Ausschnitt (Helices C + D) aus dem Strukturmodell nach Essen *et al.* (1998) mit einem Phythanylrest des zentralen Glykolipids, der mit W80 interagiert; durch Mutation von W80 zu Phenylalanin (Phe) bzw. Isoleucin (Ile) ändert sich die Oberfläche der Seitenkette so deutlich, dass der Einfluß dieses Restes auf den Phythanylrest stark abnimmt.

Die Änderung der Interaktion der Seitenkette mit dem Phythanylrest kann dazu führen, dass sich die Membrangrenzen verschieben, die im 3D-Kristall inner- und außerhalb des Trimers

nicht auf der selben Höhe liegen (Abb. 4.4). Der Abstand zwischen der inneren und äußeren Membrangrenze, die hier an den Glycerinresten festgelegt wird, beträgt nach Essen *et al.* (1998) etwa 5 Å. Daher können die durch die Änderung der Membrandicke veränderten Wechselwirkungen dazu führen, dass die lipidvermittelte Aggregation der BR-Moleküle nicht mehr optimal ablaufen kann. Es ist erwiesen, dass Membranproteine ihre Struktur der Lipidumgebung anpassen und umgekehrt die Lipide sich an den Proteinen ausrichten können (Gil *et al.*, 1998; Mouritsen, 1998). Dadurch können sich je nach Größe der hydrophoben Region des Proteins und der Lipidkettenlänge die Membrangrenzen relativ zum Protein verschieben, was zu einer Aggregation oder auch gleichmässiger Verteilung der Proteine führen kann.

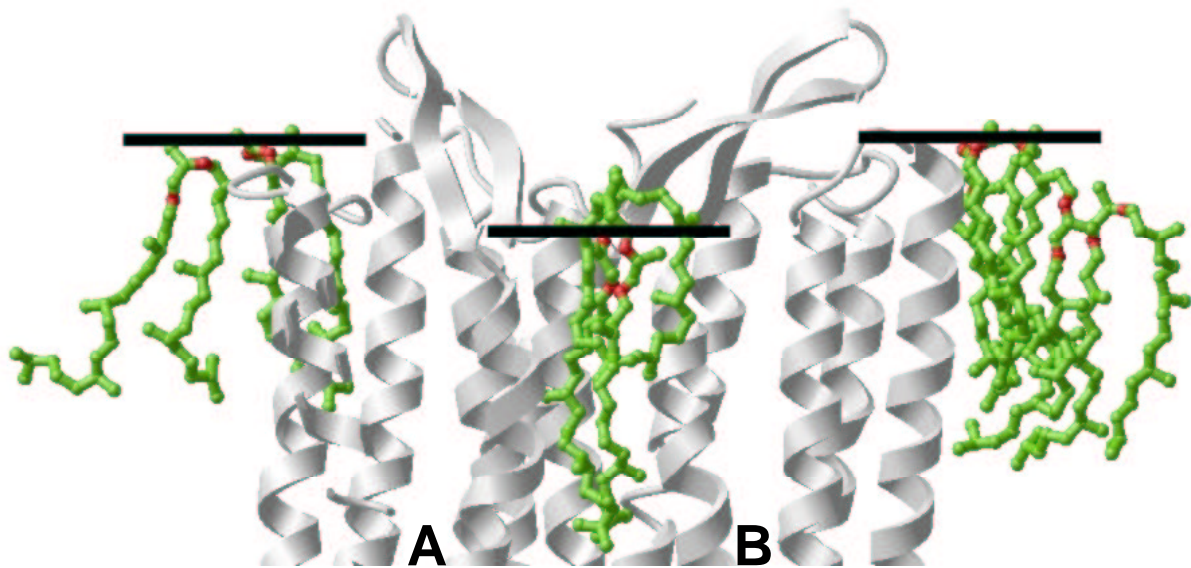


Abb. 4.4 Ausschnitt aus dem BR-Strukturmodell nach Belrhali *et al.* (1999) zeigt die extrazelluläre Membrangrenze (schwarze Balken über den Glycerinresten) innerhalb und außerhalb des BR-Trimers (nur zwei Monomere A und B teilweise sichtbar), die im Trimer nach Essen *et al.* (1998) etwa 5 Å tiefer liegt als außerhalb.

Die Veränderung der interagierenden Aminosäure am Phythanylrest des Glykolipids könnte bereits eine derartige Veränderung der anziehenden Kräfte zur Folge haben, weswegen die PM-Entstehung stark gehemmt sein kann.

4.3 Welche Vorteile hat die Purpurmembran für die Zelle?

Da die Mutanten keinen Nachteil bei der Photophosphorylierungsrate, Transportaktivität und aerobem Wachstum aufweisen, bleibt die Möglichkeit des photosynthetischen Wachstums, das nur durch BR im kristallinen Zustand gewährleistet wird, als letzte Erklärung.

Bei Belichtung der nicht-PM-Fractionen der Mutanten entsteht ein signifikanter Anteil an 9-*cis*-Retinal, das vom Protein dissoziiert. Dieses Isomer kommt im kristallinen Zustand nicht

vor. Damit wäre die photochemische Langzeitstabilität von BR vom kristallinen Zustand abhängig. Beim Wachstum mit niedriger Sauerstoffkonzentration würden die Zellen unter Belichtung allmählich den aktiven Chromophor verlieren und somit die Fähigkeit zur Energiegewinnung.

Die Retinalisomerenverhältnisse in den Mutanten und insbesondere das starke Ausbleichen in Zellen mit W80I und W12I innerhalb von Stunden sprechen für diese Vermutung. Als weiterer Vorteil ist zum einen das Ausmass der Lichtadaptation, bei der in der PM zu 100 % all-*trans*-Retinal entsteht, und zum anderen die langsame Reisomerisierung zur 13-*cis*-Form zu nennen. Dadurch haben die Zellen mit PM einen erheblichen Vorteil unter Bedingungen niedriger Lichtintensität und Sauerstoffmangel, da mindestens 20 % mehr BR-Moleküle in die aktive und längerlebige all-*trans*-Form gelangen können.

Durch Bildung von 2D-Kristallen wird BR aus dem Gleichgewicht mit frei diffundierendem BR entfernt, was vermutlich den Einbau von weiteren BR-Molekülen in die Membran begünstigt und so eine hohe Expression gewährleistet. Dabei könnte die bereits erwähnte Abnahme der Partikeldichte außerhalb der PM bei der Entstehung der PM eine Rolle spielen, da die BR-Moleküle hier maximal dicht gepackt werden und so für andere Proteine noch mehr Lipidmoleküle zur Verfügung stehen. Homogen verteiltes BR beansprucht vermutlich mehr Lipidmoleküle in seiner Umgebung als BR in der PM. Untersuchungen von Marsh und Horvath (1998) mit spinmarkierten Lipiden zeigten, dass Lipidmoleküle in unmittelbarer Nähe von integralen Membranproteinen in der Beweglichkeit eingeschränkt sind und der Austausch mit freien Lipidmolekülen deutlich verlangsamt ist. Die Anzahl der weniger beweglichen Lipidmoleküle lag beispielsweise bei Rhodopsin oder der Calcium-ATPase, die hinsichtlich der Größe des hydrophoben Bereichs mit BR vergleichbar sind, bei etwa 20 – 25 pro Proteinmolekül und damit deutlich über den 10 Lipidmolekülen pro BR in der PM. Eine derartige Wechselwirkung von BR mit einer größeren Anzahl an Lipidmolekülen als in der PM könnte neben der eigenen Aktivität zu einer Beeinträchtigung anderer Proteine bzw. der Eigenschaften der Membran selbst führen. Danon *et al.* (1978) wiesen nach, dass aerob gewachsene Zellen ohne PM während der Dialyse schneller lysierten als Zellen mit PM. Demnach bewirkt die PM eine Zunahme der Stabilität der Zellmembran, was mit dem oben erwähnten Unterschied in der Anzahl der mit BR wechselwirkenden Lipidmoleküle in der PM im Vergleich zu homogen verteiltem BR zusammenhängen könnte. Zusätzlich zum Einfluß auf die Funktion und Stabilität von BR in der Zelle wirkt sich die lipidvermittelte Kristallisation von BR anscheinend auch auf die Stabilität der gesamten Zellmembran günstig aus.

4.4 Kristallisation von HR in der Zellmembran

Es wurde mittels Gefrierbruchelektronenmikroskopie an intakten Zellen des überproduzierenden Stammes D2 gezeigt, dass HR *in vivo* ebenso ein hexagonal kristallines Gitter ausbildet wie es in den 3D-Kristallen aus der kubischen Lipidphase gefunden wird. Zuvor waren kristalline Bereiche in nativen Membranen identifiziert worden, in denen HR-Tetramere in orthogonal kristalliner Form vorlagen (Havelka *et al.*, 1993). Diese Anordnung wurde nicht in 3D-Kristallen von HR vorgefunden, so dass die Frage aufkam, ob die hexagonal kristalline Form von HR in der Zelle vorkommt. Um dies zu klären, wurden Gefrierbruchexperimente mit ganzen Zellen durchgeführt.

Auf den meisten Zellen waren keine kristallinen Bereiche zu beobachten. Nur sehr wenige Zellen zeigten Bereiche, die eine kristalline Ordnung aufwiesen, wobei diese fast alle hexagonale Symmetrie besaßen. Lediglich auf zwei Zellen waren kristalline Bereiche zu erkennen, die kein hexagonales, sondern ein verzerrt orthogonales Diffraktionsmuster zeigten. Da die D2-Zellen kein BR-enthalten und BR in der Regel große PM-Bereiche bildet, bestehen die kristallinen Bereiche aus HR-Molekülen. Gefrierbruchaufnahmen von SNOB-Zellen, die kein BR und weniger HR als D2-Zellen enthalten, zeigen keine 2D-Kristalle, so dass die kleinen kristallinen Bereiche auf D2-Zellen auf die Überexpression zurückzuführen sind. Dies spricht jedoch nicht gegen die gleichzeitige Anwesenheit von einzelnen HR-Trimeren oder Tetrameren, die mit der verwendeten Methode nicht identifiziert werden können.

Es konnte nicht geklärt werden, warum in isolierten Membranfraktionen die kristallinen Bereiche orthogonale Symmetrie aufweisen (Havelka *et al.*, 1993). Anscheinend ist die Häufigkeit der orthogonalen Kristalle so gering, dass mit der Elektronenmikroskopie mehrere hundert Zellen untersucht werden müssten, um einige davon finden zu können. Dagegen kann bei der Isolierung von Membranfraktionen der Teil der Membranen mit kristallinem HR durch Zentrifugation angereichert werden. Damit würde überwiegend diese orthogonal kristalline Form von HR in den für die Elektronenkristallographie verwendeten Fraktionen vorliegen. Die hexagonalen Kristalle sind auf den Replica der D2-Zellen zwar häufiger zu sehen, sind aber zu klein, um eine höhere Dichte der Membranstücke zu bewirken. Daher werden die hexagonal kristallinen Bereiche mit HR bei der Zentrifugation nicht angereichert.

Die Werte für die Gitterkonstanten, die deutlich von dem für BR-PM abweichen, ähneln im Falle der hexagonalen 2D-Kristalle mit 6.85 ± 0.26 nm dem im 3D-Kristall (6.73 nm, Kolbe *et al.*, 2000) und im Falle der verzerrt orthogonalen Anordnung mit 8.35 ± 0.64 nm dem Wert für den 2D-Kristall (7.2 nm, Havelka *et al.*, 1993; s. Abb. 3.29). Es konnte jedoch nicht ge-

klärt werden, ob die kristallinen Flächen aus Trimeren oder Tetrameren aufgebaut sind bzw. ob die hexagonale und orthogonale Form gleichzeitig auf einer Zelle auftreten können.

Da die Gitterkonstante von BR-PM mit 5.83 ± 0.13 nm etwa 5 - 10 % kleiner ist als die erwarteten 6.3 nm, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die realen Werte für die kristallinen Flächen auf D2-Zellen ebenfalls größer sind als die gemessenen. Die hexagonale Anordnung der Partikel könnte dafür sprechen, dass die Anordnung der HR-Moleküle in den Schichten des 3D-Kristalls dem Zustand, zumindest eines Teils, von HR in der intakten Zellmembran entspricht.

Dies würde auch die Bedeutung des Palmitats im HR-Trimer untermauern. Der Nachweis einer ähnlichen Anordnung von HR in der Zellmembran wie im 3D-Kristall könnte den Verdacht einer artifiziellen Quartärstruktur von HR aufgrund der Kristallisationsbedingungen entkräften. Damit wäre die physiologische Relevanz einer trimeren Anordnung sowie eine funktionelle Bedeutung des Palmitats nicht ausgeschlossen. Mit Hilfe der ^3H -markierten Palmitinsäure wurde bestätigt, dass diese Fettsäure auch nach der Elution von der Phenylsepharosesäule an HR gebunden bleibt. Da genügend Palmitat im Peptonmedium vorhanden sein dürfte, ist somit die Anwesenheit des Palmitats im 3D-Kristall von HR erklärbar. Eine Synthese durch die Zellen ist unter normalen Wachstumsbedingungen nicht notwendig, da in natürlichen Habitaten von *H. salinarum* genügend Fettsäuremoleküle, und somit auch Palmitat, von abgestorbenen Organismen vorhanden sind.

Es wurden keine geordneten archaealen Lipidmoleküle in der Kristallstruktur von HR identifiziert, obwohl sie massenspektrometrisch in den Kristallisationsansätzen nachweisbar waren (Kolbe, pers. Mitteilung). Die hohe Affinität von BR zu den natürlichen Etherlipiden liegt bei HR nicht vor. Da die wohlgeordneten Lipidmoleküle im 3D-Kristall sich deutlich von den Lipiden der Zellmembran unterscheiden, könnte bei einer Anordnung auf der Membran von D2-Zellen mit ähnlichen Gitterkonstanten wie im 3D-Kristall die Wechselwirkungen der Moleküle trotzdem deutlich unterschiedlich sein. Für eine endgültige Beantwortung der Frage, ob das Palmitat im Trimer in der Zelle eine essentielle Bedeutung besitzt bzw. HR-Trimere mit Palmitat in dieser Anordnung auch in der Zellmembran vorliegen, werden weitere Untersuchungen notwendig sein.

4.5 PM als Reinigungsmittel für lösliche Proteine

Mit der Fusion von Ferredoxin und BR wurde gezeigt, dass diese Methode der Koexpression von BR mit löslichen halophilen Proteinen bzw. löslichen Domänen von Membranproteinen mit dem Vektor pHUSbrfus durchführbar ist. Mit den verschiedenen Restriktionsstellen am

3'-Ende des *bop*-Gens können beliebige Sequenzen ligiert werden. Aufgrund der Lokalisierung der fusionierten Proteine an der PM bietet diese Methode enorme Vorteile gegenüber der homologen Expression mit anderen Vektoren. Es können Mutationsstudien durchgeführt werden mit Proteinen, die essentiell für den Organismus sind und daher eine Deletion des Wildtyps nicht erlauben. Dies gilt beispielsweise für Ferredoxin. Darüber hinaus ist die Anwesenheit des BR einerseits wegen des starken Promotors und der resultierenden hohen Expression vorteilhaft und andererseits für das Erkennen positiver Transformanten aufgrund der deutlichen Färbung auf den Platten. Damit hat man gleichzeitig einen optischen Selektionsmarker für die Transformation.

Die Lokalisation von löslichen Proteinen, die z.B. an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind, an der Membran dürfte eine Störung der Signalwege minimieren, wie sie bei einer erzwungenen Überexpression von diesen Proteinen auftreten könnte. Daneben bietet sich diese Methode ebenso für Proteine an, die leicht aggregieren, wenn sie in größeren Mengen produziert werden oder weil die Polymerisation für ihre Funktion *in vivo* notwendig ist (z.B. Flagelline). Die Isolierung über einen Saccharosegradienten bietet zudem die Möglichkeit, in einem einfachen Schritt den größten Teil der restlichen Proteine abzutrennen. Nach proteolytischem Verdau sollte sich die PM ebenso einfach durch Zentrifugation vom löslichen Protein abtrennen lassen. Mit einem letzten Reinigungsschritt über eine Säule ließe sich das Protein in hoher Reinheit erhalten.

Hinzu kommt die Möglichkeit, über die Änderung des Sauerstoffangebots das Expressionsniveau zu steuern, so dass man ein Werkzeug für die Untersuchung von konzentrationsabhängigen Prozessen in der Hand hat. Neben der hohen Expression der Fusionskonstrukte bietet die kristalline Anordnung von BR die Möglichkeit, strukturelle Untersuchungen an den fusionierten Proteinen durchzuführen, z.B. mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) oder EM. Mit Hilfe der AFM-Technik können, wie am Beispiel von BR in der PM gezeigt wurde (Oesterhelt *et al.*, 2000), Entfaltungsexperimente an einzelnen Molekülen durchgeführt werden, wobei die PM als Verankerung auf einem Trägermaterial dienen könnte. Damit ließen sich durch Ziehen mit der AFM-Nadel die Wechselwirkungen einzelner Domänen in einem einzelnen Molekül untersuchen, z.B. im Hinblick auf die Abhängigkeit von der Salzkonzentration, Ionenladung, Temperatur und vom pH-Wert. Dieser könnte durch Belichtung von BR zusätzlich rasch und lokal verändert werden.

Neben den physikalischen Methoden ist auch eine Verwendung zur einfachen Identifizierung von zellulären Interaktionspartnern der fusionierten Proteine denkbar, die sonst nur über Ko-Präzipitation mit spezifischen Antikörpern möglich ist. Dies ist bei hohen Salzkonzentrationen

aufgrund der schwachen Bindung von Antikörpern unter physiologischen Bedingungen jedoch schwer durchführbar. Als Hinweis auf die Eignung dieses Expressionskonstrukts für Kopräzipitationsexperimente können die nicht identifizierten Proteinbanden oberhalb der BR-Fdx-Fusionsbande dienen, welche von Proteinen stammen könnten, die mit Ferredoxin interagieren. Mit dieser Methode wären auch entsprechende *in vitro*-Experimente machbar, in denen das PM-Fusionsprotein anstelle von anorganischen, antikörperbeladenen Trägern verwendet werden könnte, um unbekannte Interaktionspartner der fusionierten Proteinen zu binden. Dies muß nicht auf halophile Proteine beschränkt bleiben, da auch mesophile Proteine mit BR fusioniert wurden (Turner *et al.*, 1999a). Aufgrund der hohen Stabilität von PM wären diese auch bei niedrigen Salzkonzentrationen einsetzbar. Für solche Untersuchungen wäre sogar eine hohe Expression des Fusionskonstrukts nicht unbedingt erforderlich, solange eine kristalline PM isoliert werden kann.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Zentrifugen

Zur Ultrazentrifugation von Volumina bis 1.5 ml diene die TL-100 Tischultrazentrifuge von Beckman mit dem Festwinkelrotor TLA-100.3 und den dazugehörigen Polyallomer-Microfuge[®]-Röhrchen (9.5 × 38 mm, 1.5 ml) unter Verwendung der entsprechenden Adaptoren. Es werden Zentrifugen von Kontron Instruments (Centrikon T-1170, TGA-50 und TGA-65 mit den Ausschwingrotoren TST 28.38 und TST 41.14), Beckman (Festwinkelrotor 45 TI), Sorvall Instruments (Sorvall RC 5C und Sorvall RC 5C Plus mit den Festwinkelrotoren GS-3 und SS-34) und Eppendorf benutzt.

5.1.2 HPLC-Apparatur und –Bedingungen

Pumpe: HPLC-Pumpe 420 von Kontron, mobile Phase: n-Hexan/Essigester (95:5, v/v), Flußrate: 1.5 ml min⁻¹ bei 40-50 bar; Injektor: Rheodyne-Injektor Modell 7125, Probenschleifen-volumen: 100 µl; Säule: NC 250 × 4.6 mm gepackt mit Lichrosorb Si 60 5 µm von Bischoff; Detektor: Uvikon 725 von Kontron, Detektionswellenlänge: 365 nm, Absorptionsbereich: 0.02 (0.05), Zeitkonstante: 1; Integrator: Chromatopac C-R1A von Shimadzu, Schreiberdämpfung 4, Schreibergeschwindigkeit 5.

Alle übrigen Geräte und Hersteller sind bei den einzelnen Methoden genannt.

5.1.3 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien werden in der höchstmöglichen Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen), Nährzusätze (Trypton und Hefeextrakt) sowie Agar von Difco (c/o Biotest, Dreieich), DNA-modifizierende Enzyme von Roche oder Amersham (Braunschweig), organische Lösemittel von Riedel de Häen (Seelze) bezogen. Für Puffer und Lösungen wird zweimal destilliertes und steril filtrierte bzw. Millipore-Wasser benutzt.

5.1.4 DNA-Polymerasen

Folgende DNA-Polymerasen mit den dazugehörigen Reaktionspuffern werden bei den Versuchen verwendet:

Polymerase	Fehlerkorrektur	
Taq [®]	nicht vorhanden	(Amersham Buchler)
Vent [®]	vorhanden	(New England Biolabs)
TaKaRa LA Taq [®]	vorhanden	(BioWhittaker)

Die Taq-Polymerase wird ausschließlich für PCRs eingesetzt, bei denen keine weiteren Klonierungsreaktionen geplant war, da die fehlende Fähigkeit zur Fehlerkorrektur zu viele Fehler in der Sequenz zur Folge hatte.

5.1.5 Nährmedien

Alle Nährmedien werden mit bidestilliertem H₂O angesetzt, 20 min autoklaviert (121°C und 2 bar) und bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Herstellung von Agarplatten werden sowohl für LB- als auch Halo-Medium vor dem Autoklavieren 15 g Bacto-Agar (Difco) zum Nährmedium zugesetzt. Das heiße Agar-Medium wird unter Rühren langsam abgekühlt und in sterile Petrischalen gegossen.

Für Antibiotika-Platten wird das Antibiotikum nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C zugesetzt. Die Agarplatten werden bei 4 °C gelagert.

5.1.5.1 Nährmedien für *Escherichia coli*

LB-Flüssigmedium: (Sambrook *et al.* 1989)

1% w/v	Bacto [®] Trypton	10.0 g	(Difco Laboratories)
0.5% w/v	Bacto [®] Hefeextrakt	5.00 g	(Difco Laboratories)
171 mM	NaCl	10.0 g	
		ad 1000 ml Wasser	

SOB-Flüssigmedium:

2% w/v	Bacto [®] Trypton	20.0 g	(Difco Laboratories)
0.5% w/v	Bacto [®] Hefeextrakt	5.00 g	(Difco Laboratories)
10.3 mM	NaCl	600 mg	
2.68 mM	KCl	200 mg	
		ad 990 ml Wasser	

Nach dem Autoklavieren werden jeweils 5 ml einer sterilen Lösung mit 2M MgCl₂ und 2 M MgSO₄ zugegeben.

5.1.5.2 Nährmedien für *Halobacterium salinarum*

Für die Medien von *H. salinarum* wird das Siedespeisesalz Salta (fein) von Südsalz eingesetzt. Das neutralisierte Fleischpepton stammte von Oxoid.

Halo-Vollmedium:

4.28 M	NaCl	250 g
81.1 mM	MgSO ₄ ·7H ₂ O	20.0 g
26.8 mM	KCl	2.00 g
10.2 mM	tri-Natriumcitrat-Dihydrat	3.00 g
1 % w/v	Pepton	10.0 g
		ad 1000 ml Wasser
		pH 7.0 wird mit 10 N NaOH eingestellt

5.1.5.3 Antibiotika

E. coli:

Für 1 l Medium wird 1 ml einer ethanolischen Stammlösung von Ampicillin (Na-Salz) mit 100 mg·ml⁻¹ eingesetzt. Die Endkonzentration im LB-Medium betrug 100 µg·ml⁻¹.

H. salinarum:

Lovastatin (Mevinolin): Eine 1000x Stammlösung (25 mM) wird aus Lovastatin-haltigen Mevinacor[®]-Tabletten (20 mg) hergestellt, indem eine Tablette mit 2 ml Ethanol extrahiert wird. Für 1 l Medium wird 1 ml der Stammlösung eingesetzt. Die Endkonzentration im Medium betrug 25.0 µM (10.1 µg·ml⁻¹).

Novobiocin: Für 1 l Medium wird 1 ml einer wässrigen Stammlösung (1000x) mit einer Konzentration von 2 mg·ml⁻¹ eingesetzt.

5.1.6 Stämme der verwendeten Organismen

E. coli:

DH5 α F⁻, endoA1, hsdR17 (r_K⁻, r_K⁺), Gibco BRL
 supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1
 Δ (argF-lacZya) U169, Φ 80dlacZ Δ M15

H. salinarum:

D2 BR⁻, HR⁺⁺, SRI⁺, SRII⁺, Car⁻, Rub⁻, Ret⁺ (Heymann *et al.*, 1993)
 HARRI BR⁻, HR⁺⁺, SRI⁺, SRII⁺, Car⁻, Rub⁻, Ret⁺ (diese Arbeit)
 S9 BR⁺⁺, HR⁺, SRI⁺, SRII⁺, Car⁻, Rub⁺, Ret⁺, Vac⁻ (Stoeckenius *et al.*, 1979)
 SNOB *bop*⁻, HR⁺, SRI⁺, SRII⁺, Car⁻, Rub⁺, Ret⁺ (Pfeiffer *et al.*, 1999)
 TOM *bop*⁻, *hop*⁻, SRI⁺, SRII⁺, Car⁻, Rub⁻, Ret⁺ (diese Arbeit)
 WHOP BR⁻, *hop*⁻, SRI⁺, SRII⁺, Car⁻, Rub⁻, Ret⁺ (Besir, 1997)

Die in dieser Arbeit erzeugten Stämme werden durch Transformation von SNOB bzw. WHOP für BR- bzw. HR-Mutanten mit mutagenisierten Derivaten von pUS-MEV bzw. pHUSneu erhalten. Kontrollstämme werden mit den jeweiligen Wildtyp-Vektoren transformiert.

5.1.7 Vektoren

Vektor	Eigenschaften	Derivat von	Referenz
pUS-MEV	Amp ^r , Mev ^r , <i>bop</i> , fl, ColE1, 6.302 kb	pWL102, pEF191, pSK	Schweiger (1996)
pROB	Amp ^r , Nov ^r , Δ <i>bop</i> ,	pBN1	Pfeiffer (2000)
pHUShop...	<i>hop</i> -Mutanten	pUS-MEV	diese Arbeit
pHUSbop...	<i>bop</i> -Mutanten	pUS-MEV	diese Arbeit
pHUSneu	WT- <i>hop</i> + <i>bop</i> -Leader-sequenz	pUS-MEV	diese Arbeit
pHUSbophop	<i>bop/hop</i> -Fusion	pUS-MEV	diese Arbeit
pHUSbrfus	<i>bop</i> -Fusion	pUS-MEV	diese Arbeit

5.1.8 Oligonukleotide

Alle hier verwendeten Oligonukleotide wurden von U. Schimanko mit Hilfe eines automatischen Synthesegeräts (394 DNA/RNA Synthesizer von ABI Applied Biosystems, sowie Modell 380 B) nach der Phosphoramidit-Methode hergestellt. Die Schmelztemperatur T_M in °C eines Oligonukleotids wird näherungsweise nach folgender Formel berechnet:

$$T_M = 4 \times (\sum C_i + \sum G_i) + 2 \times (\sum A_i + \sum T_i)$$

Die Konzentration der Oligonukleotide wird auf $20 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ eingestellt und diese bei -20 °C gelagert.

Oligonukleotide für die gezielte Mutagenese mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden so konstruiert, dass ober- und unterhalb der mutierten Base(n) jeweils 13-15 Basen aus der Gensequenz vorhanden waren.

Für die Sequenzierung von DNA werden Oligonukleotide gewählt, deren komplementäre Sequenzen etwa 50 Basenpaare vor dem zu sequenzierenden Abschnitt lagen, da die ersten 30-40 Basen einer Sequenzierungsreaktion nach der nicht-radioaktiven Dideoxy-Methode mit fluoreszenzmarkierten 2-Dideoxynukleotiden in der Regel schlecht lesbar waren.

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen werden Oligonukleotide so konstruiert, dass sie entweder vor den Erkennungssequenzen der benutzten Restriktionsenzyme hybridisierten oder selbst die benötigten Sequenzen enthielten. Die für fast alle Restriktionsenzyme benötigten zusätzlichen Basen werden je nach Empfehlung des NEB-Katalogs bzw. der REBASE-Enzymdatenbank (<http://www.rebase.neb.com>) am 5'-Ende hinzugefügt.

5.2 Mikrobiologische Methoden

5.2.1 Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*

E. coli-Zellen für DNA-Isolierungen werden bei 37 °C in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (in der Regel Ampicillin) in sterilen 15 ml-Reagenzgläsern oder 100 ml-Erlenmeyerkolben (50 ml Medium) gezüchtet.

Zur Stammhaltung wird eine Übernachtskultur mit einer Impföse auf eine Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelklone werden in 1 ml sterilem LB-Medium resuspendiert. Etwa 0.7 ml dieser Suspension werden mit 1 ml sterilem Glycerin gemischt und bei -20 °C dauerhaft gelagert.

5.2.2 Kultivierung und Stammhaltung von *H. salinarum*

H. salinarum-Zellen werden in 100 ml- (35 ml Medium) oder 2 l-Erlenmeyerkolben (0.7 - 1 l Medium) gezüchtet. Die Kulturen werden mit Vorkulturen im Verhältnis 1:20 bis 1:50 angeimpft. Zur Isolierung von Membranen werden 5 - 6 Tage alte Zellen in der stationären Wachstumsphase verwendet. Die Flüssigkulturen werden durch Zentrifugation mit 9000 g bei 4 °C (20 min) geerntet. Das Zellpellet wird in Basalsalz (Vollmedium ohne Pepton, s. 5.1.5.2) resuspendiert.

Für die Untersuchung des phototrophen Wachstums von *H. salinarum* werden in Klettkolben mit Schliffverschluss 35 ml-Kulturen angesetzt, in denen die Luft durch Stickstoff verdrängt wurde, um anaerobe Bedingungen einzustellen. Die Kolben werden zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. Die Inkubation erfolgte in einem Schüttler bei 40 °C unter einer Hochdruck-Xenonlampe.

Flüssigkulturen werden dauerhaft bei RT in sterilen 15 ml-Falconröhrchen aufbewahrt. Daneben werden frische Kulturen auch in geeigneter Verdünnung (10^{-4} - 10^{-5}) auf Agar-Platten plattiert und nach mehrtägiger Inkubation bei 37 °C luftdicht bei RT aufbewahrt.

5.2.3 Messung von Wachstumskurven

Zur Kontrolle der Wachstumsgeschwindigkeit werden 35 ml-Kulturen von *H. salinarum* in 100 ml-Seitenarmkolben (Klettkolben) kultiviert und in bestimmten Zeitabständen die Lichtstreuung in einem Klett-Photometer bestimmt. Dabei entsprach eine Klett-Einheit etwa 10^7 Zellen in 1 ml Medium.

Bei *E. coli*-Zellen wird in einem Photometer die Lichtstreuung bei 600 nm bestimmt, indem 1 ml der Flüssigkultur in einer 1 cm-Küvette gegen eine Referenz von frischem LB-Medium vermessen wird.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Transformation von *E. coli*

5.3.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

30 ml SOB-Medium werden mit *E. coli*-Zellen der Stammsammlung angeimpft und bei 37° C über Nacht bei 200 rpm geschüttelt. 10 ml dieser Vorkultur werden in 1l Hauptkultur überimpft und bei 37° C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 - 0.5 inkubiert (ca. 4 Stunden). Bei den folgenden Schritten werden die Zellen im Eisbad gekühlt. Zunächst wird die Hauptkultur 20 min. bei 4° C und 4000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet dreimal in 10 %igem, sterilen Glycerin gewaschen, wobei das Volumen bezüglich der Hauptkultur bei jedem Waschschrift verringert wird (1, 1/2, 1/10 Volumen). Nach jedem Waschschrift wird wiederum bei 4° C und 4000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 500 µl (pro Liter Kultur) 10 %igem Glycerin resuspendiert, zu je 150 µl in 1.5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen werden anschließend bei -75° C gelagert.

5.3.1.2 Transformation durch Elektroporation

Kompetente *E. coli*-Zellen werden auf Eis aufgetaut und 70 µl davon mit 5 - 10 µl eines Ligationsansatzes bzw. 5 µl einer 100-fach verdünnten Vektorlösung in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand, Bio-Rad) gut gemischt und etwa 10 min auf Eis inkubiert, damit sich die DNA an die Zellen anlagert. Die Küvette wird außen gut getrocknet, um einen Kurzschluß zu vermeiden. Die Zellen werden anschließend im Gene Pulser elektroporiert (Einstellungen: 25 µF, 1.5 kV, 800 Ω), sofort mit 0.5 ml LB-Medium versetzt und 30 - 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Aufnahme der Vektor-DNA konnten sich die Zellen regenerieren und das Resistenzgen für Ampicillin exprimieren. Es werden jeweils 100 µl der Zellsuspension auf eine oder mehrere LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.3.2 Transformation von *H. salinarum*

5.3.2.1 Anzucht der Zellen

35 ml Vollmedium werden in einem 100 ml-Kolben mit Einzelkolonien von der Platte bzw. mit 0.5 - 1 ml einer 3 - 4 Tage alten Vorkultur angeimpft und bei 40° C und 100 rpm inkubiert. Die Kulturen werden dreimal in der logarithmischen Wachstumsphase alle 1 - 2 Tage überimpft, bis die Zellen nach etwa 24 Stunden die Dichte der Vorkultur erreicht hatten.

5.3.2.2 Transformation

Die Transformation von *H. salinarum* wird nach Cline *et al.* (1989) durchgeführt. 2 ml einer schnell wachsenden Kultur werden 5 min in einem Eppendorfgefäß bei 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 200 µl SPH-Puffer (2 M NaCl, 25 mM KCl, 15 % w/v Saccharose, 50 mM Tris/HCl, pH 8.75) langsam durch leichtes Schwenken resuspendiert. Durch Zugabe von 10 µl 0.5 M EDTA in SPH-Puffer werden Sphäroblasten erzeugt, wodurch die Anlagerung und Aufnahme von DNA ermöglicht wird. Unter dem Mikroskop sind die kugelförmigen Sphäroblasten deutlich von den ursprünglich stäbchenförmigen Zellen zu unterscheiden. Für die Transformation werden 1 - 2 µg Vektor-DNA in 2 M NaCl (DNA-Lösung mit gleichem Volumen 4 M NaCl gemischt) zur Sphäroblasten-Suspension gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 220 µl PEG600-Lösung (60 % w/v in SPH-Puffer) in den Deckel des Gefäßes pipettiert, die Lösung durch vorsichtiges Schwenken gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Danach werden 1.5 ml SVL-Puffer (4.3 M NaCl, 80 mM MgCl₂, 10 mM *tri*-Natriumcitrat-Dihydrat, 1.4 mM CaCl₂, 15 % w/v Saccharose, 50 mM Tris/HCl, pH 7.4) zugegeben und die Zellen erneut 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 2 ml Vollmedium resuspendiert und im geschlossenen Reagenzglas 24 - 48 h bei 37° C auf einem Reagenzglas-Roller (TC7, New Brunswick) inkubiert. 100 - 300 µl dieser Lösung werden je nach Resistenzgen im Vektor auf Halo-Platten mit Mevinolin (25 µM) bzw. Novobiocin (2 µg/ml) ausgestrichen.

5.3.3 Isolierung von DNA

5.3.3.1 Isolierung von Vektor-DNA aus *E. coli*

Einzelkolonien werden von einer LB-Platte mit Ampicillin mit einer sterilen Impföse gepickt und 3-4 ml ampicillinhaltiges LB-Medium in einem sterilen Reagenzglas angeimpft. Die Kultur wird über Nacht bei 37 °C mit 250 rpm geschüttelt. Davon werden 3 ml 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Isolierung der Vektor-DNA erfolgte mit dem QIAprep[®] Spin Plasmid Kit (Qiagen, Düsseldorf).

Das Zellpellet wird in 250 µl P1-Puffer (100 µg/ml RNase A, 10 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0) resuspendiert und in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dazu werden 250 µl vom Lyse-Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % w/v Natriumdodecylsulfat) gegeben und durch langsames Schwenken vermischt, bis eine homogene, viskose Lösung entstanden war. Nach Zugabe von 350 µl des Neutralisationspuffers N3-Puffer wird sofort leicht geschüttelt. Dabei fallen die Proteine und genomische DNA mit dem SDS als weißer, flockiger Niederschlag aus. Nach 10 min Zentrifugation bei 9000 rpm wird der klare Überstand auf die Mini-Säulen aufgetragen. Diese werden in 2 ml Eppendorfgefäßen 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säulen werden mit 750 µl Puffer PE (ethanolhaltiger Waschpuffer) gewaschen und nach Entleeren der Auffanggefäße erneut 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert, um den ethanolhaltigen Puffer PE vollständig von der Vektor-DNA abzutrennen. Anschließend werden die Säulen in sterile Eppendorfgefäße aufgesetzt und die DNA mit 50 µl H₂O eluiert.

5.3.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus *H. salinarum*

2 ml einer frisch gewachsenen Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0.6-1.0 werden in einem Eppendorfgefäß bei 4000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 400 µl Lysepuffer (100 mM NaCl, 100 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.5 % w/v Natriumdodecylsulfat) versetzt. Mit einer Pipette wird die Zellsuspension homogenisiert und anschließend mit 800 µl 100 %igem Ethanol überschichtet. An der Phasengrenze ausfallende chromosomale DNA wird mit einer 10 µl-Glaskapillare aufgewickelt und herausgezogen. Die beiden Phasen werden durch Schütteln gemischt und die Kapillare mit der DNA für 7-10 min in der Lösung stehengelassen. Danach wird die DNA für 10 min in 100 %iges Ethanol, 20 s in Ether eingetaucht und für mindestens 20 min luftgetrocknet. Die Spitze der Glaskapillare mit der

DNA wird abgebrochen und in einem Eppendorfgefäß mit 400 µl TE-Puffer (10 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8) über Nacht bei 4 °C stehengelassen.

5.3.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem Qiaex[®] Gel Extraction Kit (Qiagen, Düsseldorf) nach Herstellerangaben. Das Agarose-Gel wird auf einem UV-Schirm beleuchtet und das zu isolierende DNA-Fragment mit einem Skalpell herausgeschnitten. In einem Eppendorfgefäß wird das Gewicht des Gelstückchens bestimmt und pro 100 mg Gel 300 µl QX1-Puffer zugesetzt, um die Agarose aufzulösen. Nach Zugabe von 10 µl Glas-*milch* (QIAEX II) wird die Lösung 10 min bei 50 °C inkubiert, um die DNA an die Glaskügelchen zu adsorbieren, wobei die Lösung alle 2 min geschüttelt wird. Das Gemisch wird 30 s bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgetrennt. Nach Waschen mit 500 µl QX1-Puffer und zweimal 500 µl Puffer PE (jeweils 30 s bei 14000 rpm zentrifugiert) wird das Pellet an der Luft getrocknet und nach Zugabe von 20 µl H₂O resuspendiert. Nach 5 min bei RT (bei Fragmenten > 4 kb 10 min bei 50 °C) wird erneut zentrifugiert und der Überstand mit der DNA in ein steriles Eppendorfgefäß überführt.

5.3.4 Reaktionen DNA-modifizierender Enzyme

5.3.4.1 Spezifische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Je nach Konzentration werden 1 - 5 µl Vektor-DNA mit 1 µl der Enzymlösung und 1/10 des Endvolumens an Enzympuffer (10 x Puffer von New England Biolabs) auf ein Endvolumen von 10 - 20 µl mit sterilem H₂O verdünnt und 1 - 3 h bei 37 °C bzw. bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Zum Verdau von genomischer DNA werden 20 µl DNA-Lösung mit 2 µl der Enzymlösung und 10 µl Enzympuffer auf ein Endvolumen von 100 µl verdünnt und über Nacht bei der angegebenen Temperatur inkubiert.

5.3.4.2 Herstellung von "glatten" Enden mit dem Klenow-Fragment

Für das Auffüllen der kohäsiven Enden aus dem Restriktionsverdau wird der Verdauansatz zunächst 20 min bei 65° C inaktiviert. Anschließend werden 1.5 µl dNTP-Lösung (1.25 mM pro dNTP), 5 µl 10 x Restriktionspuffer H und 1 U Klenow-Fragment pro µg DNA zugegeben und auf ein Endvolumen von 50 µl eingestellt (1 U $\hat{=}$ die Menge Enzym, die 10 nmol dNTPs in 30 min bei 37° C zu einer säureunlöslichen Form umsetzt). Die Lösung wird 15 min

bei 25° C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0.5 M EDTA gestoppt, wobei die für die Enzymaktivität wichtigen Mg²⁺-Ionen komplexiert werden. Zur Hitze-Inaktivierung des Enzyms wird die Lösung 20 min bei 75° C inkubiert.

5.3.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

In einem Gesamtvolumen von 10 - 30 µl werden Insert- und linearisierte Vektor-DNA mit passenden kohäsiven Enden in einem molaren Verhältnis von 3:1 bis 5:1 mit etwa 1 U T4-Ligase pro µg DNA und einer entsprechenden Menge 5 x Ligasepuffer (5 mM ATP, 50 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 25 % w/v PEG8000, 250 mM Tris/HCl, pH 7.6) über Nacht bei 9 - 12 °C inkubiert. Die Inkubation wird in vielen Fällen auf 2 - 4 h bei RT abgekürzt, wodurch die Transformantenausbeute nicht signifikant geringer wird. Als Kontrolle für eine anschließende Transformation von *E. coli*-Zellen wird der gleiche Ansatz mit H₂O statt des Inserts verwendet, um den Anteil der rezirkularisierten Vektor-DNA zu bestimmen. Für eine Rezirkularisierung eines Vektors mit glatten Enden wird 1 µl des Ansatzes aus der Reaktion mit dem Klenow-Fragment nach 20 min Hitze-Inaktivierung bei 75 °C eingesetzt und auf ein Endvolumen von 50 µl verdünnt, um eine Oligomerisierung zu unterdrücken.

5.3.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für eine PCR werden 1 µl Vektor-DNA bzw. 2 µl einer Lösung von genomischer DNA eingesetzt. Ein Standardansatz enthielt bei Einsatz der Vent[®] DNA-Polymerase (New England Biolabs):

x µl	DNA
2 µl	sense-primer (20 pmol/µl)
2 µl	reverse-primer (20 pmol/µl)
5 µl	10 x Vent [®] -PCR-Puffer
8 µl	dNTPs (1.25 mM pro dNTP)
1 µl	100 mM MgSO ₄
1 µl	Vent [®] DNA-Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O

Ein 3-Stufen-PCR-Protokoll enthielt 25 Zyklen mit folgenden Einstellungen:

1. "Schmelzen" der DNA:	30 s	95° C
2. Annealing:	30 s	x ° C
3. Verlängerung:	y min	72° C

Bei der 2. Stufe wird die primerspezifische Schmelztemperatur T_M anhand der Basenzusammensetzung nach der unter (Oligonukleotide) erwähnten 2°/4°-Regel abgeschätzt.

Die Hybridisierungstemperatur x lag in der Regel 4 - 6° unterhalb von T_M . Die Verlängerungszeit y wird mit 1 min pro 1 kb des amplifizierten Fragments angesetzt.

Beim Einsatz anderer korrekturfähiger DNA-Polymerasen wird das Protokoll den Herstellerangaben entsprechend modifiziert. Beispielsweise werden häufig bei hohem GC-Gehalt der amplifizierten DNA 1-2 μ l DMSO hinzugefügt, was die Bildung von stabilen Sekundärstrukturen in bestimmten Bereichen unterdrücken und somit die Synthese begünstigen sollte.

5.3.5 Gelelektrophorese von DNA

Eine 0.8 - 1.5 %ige Agarose-Suspension (Seakem, Neu Zeeland) in TAE-Puffer (1 mM EDTA, 40 mM Tris-Acetat, pH 8.5) wird in der Mikrowelle aufgeköcht, bis eine klare, schlierenfreie Lösung entstand (mit zunehmender Größe der DNA-Fragmente wird die Konzentration der Agarose erniedrigt). Nach Abkühlen auf ca. 50 °C werden 2 μ l Ethidiumbromid-Lösung (10 mg·ml⁻¹) direkt ins Gel gegeben und die Lösung in eine Gelkammer (Agagel mini, Biometra, Göttingen) mit passendem Kamm gegossen. Nach Erstarren des Gels werden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen eingefüllt, wobei parallel ein Größenmarker (1 kb-ladder, Gibco BRL, Karlsruhe) mit bekannten Fragmentgrößen aufgetragen wird. Die Elektrophorese wird in TAE-Puffer bei 60-80 V durchgeführt. Zur Detektion und Aufnahme der DNA-Fragmente wird das Gel auf einem UV-Schirm ($\lambda = 366$ nm) belichtet und mit einer Kamera photographiert. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert sehr stark unter UV-Licht, wodurch die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden können.

5.3.6 Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA (dsDNA)

Ein Aliquot der DNA-Lösung wird mit H₂O verdünnt und die Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen. In proteinfreien Proben sollte das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ ca. 2 betragen. Die Konzentration der Ausgangslösung berechnet sich nach folgender Formel:

$$c(\text{dsDNA}) = 50 \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \quad [\mu\text{g/ml}]$$

5.3.7 Southern-Hybridisierung mit Digoxigenin(DIG)-markierten Sonden

5.3.7.1 Herstellung der DIG-markierten Sonden durch PCR

Eine DIG-markierte DNA-Sonde für eine Southern-Hybridisierung wird mit geeigneten Primern mittels einer PCR hergestellt, wobei zum Standard-Reaktionsansatz zusätzlich 1 µl DIG-markiertes dUTP zugegeben wird. Die Sonde wird über ein Agarose-Gel gereinigt (läuft im Vergleich zu unmarkiertem Fragment etwas langsamer) und mit dem Qiaprep Gel Extraction Kit eluiert, wobei 50 µl H₂O statt 20 µl verwendet werden.

5.3.7.2 Fixierung der DNA auf Membranen (Vakuum-Blot)

Für einen Southern-Blot wird die genomische DNA über Nacht verdaut und 20 µl eines 100 µl-Ansatzes in einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt, wobei 10 µl des DIG-markierten Größenstandards (Roche) aufgetragen werden. Das Gel wird unter UV-Licht für die Fixierung zurechtgeschnitten. Anschließend wird das Gelstück auf dem Schüttler für 5 min in 0.25 M HCl, 30 min in 0.5 M NaOH und zuletzt 30 min in Tris-Waschlösung (3 M NaCl, 0.5 M Tris/HCl, pH 7.5) gewaschen.

Eine Vakuum-Blot-Apparatur wird mit Parafilm so abgedichtet, daß nur noch eine Fläche in der Größe des Gels offen war. Darauf werden 3 mittelstarke, in 10 x SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M *tri*-Natriumcitrat-Dihydrat) getränkte Whatman-Papieren gelegt. Die Nylon-Membran (Hybond-N, Amersham) wird so zugeschnitten, daß sie etwas größer ist als das Gel, und auf das Whatman-Papier gelegt. Das Gel wird vorsichtig aufgelegt, damit keine Luftblasen eingeschlossen wurden, und erneut mit Whatman-Papieren abgedeckt. Danach wird eine Vakuum-Pumpe angeschlossen und der Druck in der Apparatur auf 20 - 40 psi (2 - 3 h) eingestellt. Zwischendurch werden einige ml 10 x SSC auf das Whatman-Papier gegossen, um es feucht zu halten. Nachdem die Dicke des Gels auf etwa 1 mm abgenommen hatte, wird die Nylon-Membran abgenommen und die DNA in einem UV-Crosslinker (Stratalinker, Stratagene) kovalent auf der Membran fixiert.

5.3.7.3 Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden

Bei allen Waschschrritten wird darauf geachtet, daß nicht mehrere Membranen in einem Gefäß gewaschen wurden, da hierbei an den Kontaktflächen die Benetzung mit den Hybridisierungslösungen unvollständig sein und somit eine Detektion verfälscht werden konnte.

Zunächst wird eine Suspension von Blocking Reagens (10 % w/v, Roche) in Puffer 1 (0.1 M Maleinsäure, 0.15 M NaCl, pH 7.5) hergestellt und nach starkem Rühren autoklaviert, wobei die Lösung homogen wird. Die Lösung wird langfristig bei 4 °C aufbewahrt.

Nach der Fixierung der DNA wird die Membran mit etwa 10 - 15 ml Prähybridisierungspuffer (PHB: 50 % v/v Formamid, 5 x SSC-Puffer, 20 % v/v Blocking Lösung, 0.1 % v/v N-Laurylsarcosin, 0.02 % w/v Natriumdodecylsulfat) in einen Frischhaltebeutel eingeschweißt und im Hybridisierungs-ofen (Biometra, Göttingen) bei 42 °C ca. 60 min inkubiert. Inzwischen werden 5 µl der DIG-Sonde in 10 µl Formamid 5 min in kochendem H₂O erhitzt und in Eis abgeschreckt, wobei das Formamid eine Anlagerung der Einzelstränge verhinderte und so die Sonde in nächsten Schritt mit komplementären Bereichen der DNA auf der Membran hybridisieren konnte. Die Formamid-Lösung wird in 5-10 ml PHB gegeben und die Membran damit über Nacht bei 42 °C unter Schütteln inkubiert. Die Membran wird danach zunächst zweimal in Hybridisierungs-Waschpuffer 1 (2 x SSC, 0.1 % w/v Natriumdodecylsulfat) für 5 min bei RT und anschließend in einem Frischhaltebeutel 2 x 15 min bei 68 °C in Hybridisierungs-Waschpuffer 2 (0.1 x SSC, 0.1 % w/v Natriumdodecylsulfat) im Hybridisierungs-ofen geschüttelt.

5.3.7.4 Detektion der hybridisierten DNA

Die Membran wird für 3 min in Waschpuffer (0.3 % v/v Tween 20 in Puffer 1) und 30 min in Puffer 2 (10 % v/v Blocking Lösung in Puffer 1) geschüttelt. Der Antikörper gegen die DIG-Sonde (Anti-Digoxigenin Alkalische Phosphatase F_{ab}-Fragment, Boehringer Mannheim) wird in einer Verdünnung von 1:10000 in 20 ml Puffer 2 gelöst und die Membran darin 30 min lang bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen im Waschpuffer und einmal im Puffer 3 (0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂·6 H₂O, 0.1 M Tris/HCl, pH 9.5) für jeweils 15 min werden 10 µl des Lumineszenzsubstrats CSPD (Boehringer Mannheim) in 1 ml Puffer 3 zwischen zwei Folien auf der Membran verteilt und diese für 10-15 min im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Danach wird sie kurz auf ein Papiertuch gelegt und mit Frischhaltefolie möglichst faltenfrei umschlossen. In einer Expositionskassette wird die Membran auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm-ECL, Amersham) gelegt und dieser je nach Intensität der Lumineszenz für 30 - 120 min, wenn nötig über Nacht exponiert und entwickelt.

5.3.7.5 Kolonie-Hybridisierung

Für das Screening von Transformanten auf die An- bzw Abwesenheit eines bestimmten Gens werden die Einzelkolonien von Verdünnungsplatten auf jeweils zwei Agar-Platten in einem Raster aufgetragen (50 - 150 Kolonien pro Platte) und 3 - 4 Tage inkubiert, bis sie einen Durchmesser von ca. 1 mm hatten. Eine runde Nylon-Membran (Hybond-N, Amersham) wird für die spätere Zuordnung der Kolonien eindeutig mit Bleistift markiert und vorsichtig auf eine Platte aufgelegt. Die Membran wird durch das Nährmedium befeuchtet und die Zellen von der Platte auf die Membran übertragen. In einer Plastikschiessel werden zwei Whatman-Papiere mit frisch angesetztm und leicht erwärmtem Blot-Puffer (2 x SSC, 5 % w/v Natriumdodecylsulfat) gut durchtränkt, die Membran mit den Kolonien nach oben darauf gelegt und im Mikrowellenherd bei 900 W für 4 min erhitzt, wobei die DNA der Zellen auf der Nylon-Membran festgebacken wird. Anschließend wird nach dem üblichen Protokoll hybridisiert und detektiert (s. 5.3.7.3 und 5.3.7.4). Die Platte wird im Brutschrank inkubiert, damit die Klone weiter wachsen können. Die interessierenden Klone werden nach der Detektion von der Platte gepickt und weiter untersucht.

5.4 Biochemische Methoden

5.4.1 DNA-Sequenzierung

5.4.1.1 Nicht-radioaktive automatisierte DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode durch PCR mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden unter Gebrauch des ABI PRISM[®] dRhodamine[™] oder BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits von Perkin-Elmer Applied Biosystems.

BigDye[™]-Sequenzierungsmix: AmpliTaq[®]-DNA-Polymerase, dNTPs (dATP, dCTP, dITP anstatt dGTP und dUTP anstelle von dTTP), BigDye[™]-Terminatoren (fluoreszenzfarbstoffmarkierte ddNTPs), *rTth*-Pyrophosphatase, MgCl₂ und Tris/HCl-Puffer, pH 9.0.

dRhodamin[™]-Sequenzierungsmix: Ampli Taq[®]-DNA-Polymerase, FS, dNTPs (dATP, dCTP, dITP anstatt dGTP und dTTP), dRhodamin[™]-Terminatoren (fluoreszenzfarbstoffmarkierte ddNTPs), *rTth*-Pyrophosphatase, MgCl₂ und Tris/HCl-Puffer, pH 9.0.

Für eine Sequenzierung werden 0.5-1 µg Vektor-DNA aus einer Standard-Minipräparation oder 0.2-0.5 µg eines gereinigten PCR-Produkts eingesetzt. Im Falle des dRhodamin-Sequenzierung enthält ein Ansatz folgende Lösungen:

1-2	µl	DNA
0.5	µl	Primer (20 pmol/µl)
6	µl	dRhodamin TM -Sequenzierungsmix
ad 20	µl	H ₂ O

Beim BigDyeTM-Sequenzierungsansatz werden 4 µl des BigDyeTM Sequenzierungsmix zugegeben und ein Endvolumen von 14 µl eingestellt.

Es wird standardmäßig 30 s bei 94 °C denaturiert und 4 min bei 60 °C verlängert, um eine optimale Detektierbarkeit der Basensequenz über einen weiten Bereich zu gewährleisten. Die Konzentration der DNA-Stücke nahm nicht exponentiell zu wie bei einer PCR-Amplifizierung, sondern linear, da nur ein Primer eingesetzt wird. Die Primer werden so konstruiert, daß die Schmelztemperatur deutlich über 60 °C lag, so daß nach dem Schmelzen bei 95 °C kein Annealing durchgeführt werden mußte und der Zyklus sich auf zwei Schritte verkürzte. Eine Sequenzierungsreaktion wird in 30 Zyklen durchgeführt.

5.4.1.2 Reinigung von Sequenzierungsproben

Die synthetisierten DNA-Fragmente werden über Gelfiltrationssäulen (MicroSpinTM G50 Spinocolumns, Pharmacia) gereinigt. Dafür wird zunächst das Säulenmaterial durch vortexen resuspendiert, der Schraubdeckel um eine Vierteldrehung geöffnet und der Verschuß am Säulenende abgebrochen. Die Flüssigkeit in den Säulen wird durch Zentrifugation 4000 rpm für 1 min in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß entfernt und die Säule in ein steriles Eppendorfgefäß gestellt. Die 14 bzw. 20 µl der Sequenzierungsprobe werden vorsichtig auf das Säulenmaterial aufgetragen und erneut für 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf (ca. 50 µl) enthielt die farbstoffmarkierten DNA-Fragmente. Die Probe wird schließlich in einer Vakuumzentrifuge (SpeedvacTM, Bachhofer, Reutlingen) zur Trockne eingengt und zur Detektion aufgearbeitet.

5.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE werden 12 - 14 %ige Trenngele mit einer Dicke von 0.75 mm verwendet. Für ein Gel wird eine Mischung aus Lösung 1 (ProtogelTM, ultra rein: 30 % w/v Acrylamid, 51.9 mM N,N'-Methylenbisacrylamid), Lösung 2 (0.4 % w/v Natriumdodecylsulfat, 8.0 mM

EDTA, 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8) und H₂O mit folgender Zusammensetzung angesetzt (ca. 10 ml/Gel):

Konzentration	12%	13%	14%
Lösung 1 (% v/v)	40.0	43.3	46.7
Lösung 2 (% v/v)	25.0	25.0	25.0
H ₂ O (% v/v)	35.0	31.7	28.3

Zu 10 ml dieser Lösung werden 4 µl TEMED (1,2-Bis(dimethylamino)-ethan) und 35 µl einer 10 %igen (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung gegeben, um die Polymerisation zu starten. Nach raschem Umrühren werden die Gele in die vorbereitete Apparatur gegossen und mit n-Butanol überschichtet, um Luftblasen auf den Gelen zu vermeiden. Nach dem Erstarren wird das 4 %ige Sammelgel wie beschrieben gemischt, wobei nun 13.3 % v/v Lösung 1, 32 % v/v Lösung 3 (0.4 % w/v Natriumdodecylsulfat, 8.0 mM EDTA, 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8) und 54.7 % v/v H₂O zugegeben werden. Nach Überschichten des Trenngels mit der Sammelgel-Mischung werden die Kämme unverzüglich eingesetzt und die Gele zur vollständigen Polymerisation stehengelassen.

Eine Probe enthielt in der Regel 2 - 5 µg Protein, wobei hohe Salzkonzentrationen sich ungünstig auf das Laufverhalten im Gel auswirkten. Nach Zugabe des 5 x Laufpuffers (2.3 % w/v Natriumdodecylsulfat, 0.5 M Tris, 0.1 % w/v Bromphenolblau, 10 % w/v Glycerin) wird die Probe ohne vorheriges Aufkochen mit einer Hamiltonspritze aufgetragen. Der Tris-Glycin-Laufpuffer setzte sich aus 0.2 % w/v Natriumdodecylsulfat, 250 mM Glycin und 25 mM Tris zusammen.

Zunächst wird in der Elektrophoresekammer SE250 (Hoefer Scientific Instruments) für 10-20 min eine Stromstärke von 20 mA angelegt, bis die blaue Front in das Trenngel hineingelaufen ist. Danach wird die Stromstärke auf 40 mA erhöht.

Nach dem Lauf werden die Gele ca. 30 min in der Färbelösung (50 % v/v Methanol, 10 % v/v Essigäure, 0.01 % w/v Coomassie Blue R-250) gefärbt und überschüssiger Farbstoff mit Entfärbelösung (50 % v/v Methanol, 10 % v/v Essigäure) gewaschen. Bei Gelen, die für einen Western-Blot verwendet werden sollten, wird auf das Färben verzichtet bzw. dies nach dem Blot durchgeführt.

5.4.3 Western-Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung wird das Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dafür wird die Transfermembran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und kurz

mit Methanol benetzt. Nach kurzem Spülen wird sie für 5 min im Transferpuffer (20 % v/v Methanol, 192 mM Glycin, 0.01 % w/v Natriumdodecylsulfat, 25 mM Tris/HCl, pH 8.6) äquilibriert. Das Gel wird blasenfrei auf der Anode der Blotapparatur auf drei zurechtgeschnittene, in Puffer eingeweichte Whatman-Papiere gelegt und mit der Transfermembran bedeckt. Darauf werden wiederum drei feuchte Whatman-Papiere gelegt und anschließend die Kathode aufgesetzt. Der Transfer erfolgte mit einer Stromdichte von 1.2 mA cm² für 90 min. Beim Auseinandernehmen der Apparatur werden zunächst die Ränder des Gels auf der Membran markiert, bevor diese abgezogen wird.

Die Detektion der Proteine erfolgte durch immunologischen Nachweis mit spezifischen Antikörpern und anschließender enzymatischer Chemilumineszenzreaktion mittels ECL-Immunostaining Kit (Amersham).

Die Transfermembran wird 3 min in TBST-Puffer (0.15 M NaCl, 0.055 % w/v Tween 20, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4) mit gewaschen und anschließend für 1 h in 15 ml TBST-Puffer mit 5 % (w/v) BSA und 2 % Trockenmilch (w/v) geschwenkt. Danach wird die Membran 3 min in TBST-Puffer gewaschen und wieder 15 min im gleichen Puffer mit 5 % BSA inkubiert, bevor der primäre Antikörper gegen BR bzw. HR in einer Verdünnung von 1:6000 hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert wird. Nach zweimaligem Waschen mit TBST-Puffer für je 10 min wird die Membran 15 min in 15 ml TBST-Puffer mit 5 % (w/v) BSA geschwenkt. Daraufhin werden 1.5 µl des sekundären Antikörpers (mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertes Protein A) hinzugegeben und ca. 60 min bei RT inkubiert. Schließlich wird die Membran einmal 15 min, dann dreimal 5 min in TBST-Puffer gewaschen.

Die Membran wird unter Rotlicht für 1 min mit 2 ml einer 1:1 Mischung der beiden Lösungen des ECL-Kits getränkt und überschüssige Lösung durch Aufsaugen mit einem Papiertuch entfernt. Nach dem Einwickeln der Membran in Frischhaltefolie werden mehrere Röntgenfilme unterschiedlich lange (2 sec bis 30 min) auf der Membran exponiert und in einer Entwicklermaschine (X-OMAT 35, Kodak) entwickelt.

5.4.4 Isolierung von Membranfraktionen aus *H. salinarum*

Die Isolierung der BR-haltigen Membranfraktionen wird nach dem Protokoll von Oesterhelt und Stoeckenius (1974) durchgeführt. Eine stationäre Kultur wird 20 min bei 4 °C und 8000 rpm in SS34- (35 ml-Kulturen) oder GS3-Bechern (700 ml-Kulturen) zentrifugiert. Die Zellen werden in ca. 1/50 Volumen Basalsalz resuspendiert und nach Zugabe einer Spatelspitze DNase über Nacht bei 4 °C gegen 10 l H₂O dialysiert. Das Lysat wird 30 min bei 4 °C und 40000 rpm im Ti45-Rotor zentrifugiert, das Pellet in 1 - 2 ml Puffer pro Liter Kultur resuspendiert und gepottert. Die Gesamtmembranfraktion (GMF) wird auf einen Saccharosegradienten (25-45 %, w/w) aufgetragen und je nach Menge 14 h bei 25000 rpm im TST28-Rotor bzw. 35000 rpm im TST41-Rotor zentrifugiert. Die BR-haltigen Banden werden isoliert, zweimal durch 30 minütige Zentrifugation bei 40000 rpm und 4 °C in Puffer gewaschen und in Puffer resuspendiert. Die Ausbeute an BR bzw. HR wird spektroskopisch bestimmt ($\epsilon_{568}(\text{BR}) = 63000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{578}(\text{HR}) = 50000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

5.4.5 Chromatographische Aufreinigung von Halorhodopsin

Die Isolierung der Membranfraktion von HR-haltigen *H. salinarum*-Zellen wird analog zur BR-Isolierung durchgeführt, wobei hier 1000 anstatt 700 ml in 2l Erlenmeyer-Kolben angeimpft werden. Nach 6 Tagen bei 37 °C und 100 rpm werden die Zellen bei 4 °C zentrifugiert. Die Pellets werden rasch mit 20 - 30 ml eiskaltem Basalsalz und einer Spatelspitze DNase pro 1000 ml Kultur resuspendiert. Zuvor wird der Puffer (0.1 M NaCl, 25 mM Tris/HCl, pH 7.2), in dem die Lyse durchgeführt werden sollte, im Eisbad gekühlt. Unter Rühren des Puffers im Eisbad wird die Zellsuspension im Verhältnis 1:10 (v/v) langsam in den kalten Puffer zuge tropft (lichtgeschützt bzw. etwas abgedunkelt). Das Lysat wird im Dunkeln über Nacht im Kühlraum weitergerührt, bei 40000 rpm im Ti45-Rotor abzentrifugiert, einmal im Puffer gewaschen, gepottert und auf einen Saccharosegradienten (25-45 % w/w im gleichen Puffer) aufgetragen. Nach 14 h bei 25000 rpm im TST28-Rotor wird die HR-Fraktion isoliert und zweimal im gleichen Puffer gewaschen und in so viel Puffer resuspendiert, dass die OD₅₇₀ bei etwa 10 lag (5 mg·ml⁻¹ HR), und die Suspension bei -20 °C aufbewahrt.

Die Aufreinigung des HR erfolgte nach Duschl *et al.* (1988) mit geringen Modifikationen. Die Schritte werden entweder unter Rotlicht durchgeführt, oder die Gefäße werden in Alufolie eingewickelt, um sie vor Licht zu schützen. Vor der Solubilisierung des HR mit Natriumcho lat wird die Membransuspension auf eine OD₅₇₀ von 4 eingestellt, indem sie mit 0.1 M NaCl in 25mM Tris (pH 7.2) verdünnt wird. Anschließend wird so viel festes Salz (NaCl oder KCl)

in dieser Suspension gelöst, dass die Salzkonzentration der im Laufpuffer (4 M NaCl bzw. 3 M KCl) entsprach. Sobald das Salz gelöst war, wird die Natriumcholat-Lösung (20 % w/v in 25mM Tris, pH ~7.6) im Verhältnis 1:3 (v/v) zugegeben, so dass die Natriumcholatkonzentration bei 5 % (w/v) lag. Die Suspension wird 40-60 min bei RT gerührt und anschließend 30 min bei 40000 rpm und 15 °C zentrifugiert. Der rotviolette Überstand wird für die darauf folgende Affinitätschromatographie eingesetzt.

Das Solubilisat wird in einer FPLC-Apparatur über eine Säule mit Phenylsepharose CL-4B (Pharmacia, Säulenvolumen 1 ml) aufgereinigt, indem man die hohe Affinität von HR zur hydrophoben Matrix nutzte, um es von anderen Proteinen abzutrennen. Dafür wird die Säule im steril filtrierten Laufpuffer A (0.4 % w/w Natriumcholat, 4 M NaCl bzw. 3 M KCl in 50 mM Tris/HCl, pH 7.2) äquilibriert und nach Auftragen der Probe mit etwa 10 ml von Puffer A bei einer Flussrate von 1.5 ml·min⁻¹ gespült, wobei alle Fremdproteine und ein Teil des HR von der Säule gewaschen werden. Danach wird Laufpuffer B (1% w/w Octyl-β-glycosid anstatt 0.4 % w/w Natriumcholat im gleichen Puffer) über die Säule geleitet, wodurch das HR eluiert wird. Es werden jeweils 1.5 ml-Fractionen in Reagenzgläsern gesammelt. Während des Laufs konnten verschiedene Parameter wie der Verlauf der Absorption (280 und 560 nm) und des pH-Werts auf dem angeschlossenen PC verfolgt werden. Nach dem Ende des Laufs werden die HR-reichsten Fractionen vereinigt und über ein Membranfilter (50 kD Ausschlussgröße, Amicon) aufkonzentriert. Die konzentrierte Probe wird anschließend für die Präparation von Kristallisationsansätzen in kubischen Lipidphasen verwendet.

5.4.6 Retinalextraktion und HPLC-Analyse der Retinalisomeren

Alle Schritte bei der Extraktion werden unter Rotlicht und auf Eis durchgeführt. 250 µl einer dunkeladaptierten (24 h bei RT) oder lichtadaptierten (5 min Belichtung mit einem Diaprojektor, 150 W, OG 530) BR-Membransuspension ($OD_{560} \approx 1 - 1.5$) werden mit dem gleichen Volumen eisgekühlten 2-Propanols und 300 µl n-Hexan versetzt und gut gemischt. Zur Phasentrennung wird 1 min zentrifugiert und die organische Phase abgenommen. Diese wird über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und erneut zentrifugiert. 100 µl dieser Lösung werden mit einer Hamilton-Spritze in die HPLC-Apparatur (Lichrosorb 60/5 µm, s. 5.1.2) injiziert. Die Auftrennung wird mit einem n-Hexan/Ethylacetat-Gemisch (95:5, v/v) und einer Flussrate von 1.5 ml·min⁻¹ durchgeführt. Die Zuordnung der Retinalisomeren erfolgte über Vergleich der Retentionszeiten von Referenzspektren. Der Anteil der Isomeren wird anhand der auto-

matisch ermittelten Integrale der Peaks unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten bestimmt.

5.4.7 UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektren werden mit einem Lambda2-Spektrophotometer von Perkin-Elmer, der an einen PC angeschlossen war, aufgenommen. Für die Messungen werden Quarzglasküvetten mit 500 µl oder 100 µl Volumen und 1 cm Schichtdicke verwendet.

5.4.8 Blitzlicht-Spektroskopie

Transiente Absorptionsmessungen werden an einem Multidiodenarray-Spektrophotometer (Uhl *et al.*, 1984) durchgeführt. Die Blitze (18 ns, 2-5 mJ, $\lambda = 585$ nm) werden von einem Farbstofflaser (FL3001, Lambda Physics) erzeugt, der von einem Excimer-Laser (EMG 53 MSC, Lambda Physics) gepumpt wird. Für die Anregungswellenlänge $\lambda = 585$ nm wird der Farbstoff Rhodamin 6B verwendet. Das weisse Meßlicht wird hinter der Probe an einem Gitter spektral zerlegt. Die Absorptionsänderungen werden mit einer zeitlichen Auflösung von 130 µs simultan von 32 Photodioden (spektrale Auflösung: 10 nm, Empfindlichkeit: 0.1 mOD, $\lambda = 360 - 760$ nm) detektiert. Vor jeder Messung werden die Proben 1-2 min im Meßlicht lichtadaptiert. Die Spektren werden nach Konvertierung in ASCII-Dateien auf einem PC weiterverarbeitet.

Der Verlauf des Entstehens und Zerfalls verschiedener Photozyklusintermediate wird mit Hilfe des Programms SigmaPlot (Version 4.0, Jandel Scientific) als Summe von Exponentialfunktionen simuliert:

$$A(t) = A_0 + \sum A_i \cdot e^{-(k_i \cdot t)}$$

Dabei wird auf eine optimale Anpassung der simulierten Kurven an die Messdaten geachtet. Aus den Parametern der simulierten Kurven mit der geringsten Abweichung von den Messpunkten werden die Amplituden A_i und die Geschwindigkeitskonstanten k_i ermittelt.

5.4.9 Gefrierbruch und Elektronenmikroskopie

In einem Eppendorfggefäß wird eine Zellsuspension von *H. salinarum* zentrifugiert und einige Mikroliter des Pellets auf ein Kupferplättchen aufgetragen. Ein weiteres Plättchen wird aufgelegt und die Probe rasch in flüssiges Propan getaucht, das mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Das Einfrieren in flüssigem Propan wird aufgrund der höheren Abkühlrate im Vergleich zum flüssigen Stickstoff vorgezogen. Danach werden die Proben in ein Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff überführt. Die Plättchen werden anschließend in der Gefrierbruchapparatur (BAF 400T, Balzers, Liechtenstein) bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ auseinandergebrochen und die Bruchflächen mit einer Platin-Kohlenstoff-Elektrode in einem Winkel von 35° relativ zur Plättchenoberfläche bedampft. Danach wird die Pt-haltige Schicht durch senkrechtes Aufdampfen von Kohlenstoff fixiert. Die Schichtdicke wird mit Hilfe eines akustischen Signals kontrolliert, wobei die steigende Tonfrequenz eine Zunahme der Schichtdicke signalisierte. Die Dicke der Pt/C-Schicht und der fixierenden Kohlenstoffschicht lag bei etwa 2 nm bzw. 30 nm. Die Plättchen werden anschließend bei RT vorsichtig in eine 1 %ige (w/v) NaOCl-Lösung getaucht, wobei darauf geachtet wurde, dass die dünne Haut (Replica) auf den Plättchen abgelöst wurde, ohne sich zu verfallen. Diese Replica werden ca. 1 h in dieser Lösung von Zellrückständen befreit und noch zweimal vorsichtig mit einer Platinöse in destilliertes H_2O überführt und gewaschen. Anschließend werden die Replica möglichst glatt auf Kupfernetzen für die Elektronenmikroskopie aus dem Wasser gefischt und an der Luft getrocknet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit verschiedenen Vergrößerungen werden an dem 100kV-Modell 100CX von JEOL gemacht. Die Kristallinität von bestimmten Membranbereichen wird anhand von Diffraktionsbildern kontrolliert, die mit Hilfe einer optischen Bank oder durch Fourier-Transformation der digitalisierten Negative am PC erstellt werden.

Von den Negativen (Vergrößerungsfaktor 33000 bzw. 26000) werden Positive erstellt und diese auf DIN A4 Papier ($80\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$) kopiert. Die sichtbaren Membranbereiche und die darin enthaltenen, deutlich unterscheidbaren kristallinen Bereiche werden sorgfältig ausgeschnitten und gewogen. Das Massenverhältnis der kristallinen Bereiche zur gesamten Membran wird als hinreichend genaue Abschätzung der realen Flächenverhältnisse von kristalliner PM zur Zelloberfläche angenommen. Die Abweichungen durch die Krümmung der untersuchten Zelloberflächen werden vernachlässigt.

5.4.10 Elektronenspinresonanz(ESR)-Spektroskopie

Die Markierungen von Cystein-Mutanten und die Aufnahme der ESR-Spektren von spinmarkierten BR-Proben werden im Rahmen einer Kooperation von Matthias Kurz und Dr. Heinz-Jürgen Steinhoff (Ruhr-Universität, Bochum) durchgeführt nach Steinhoff *et al.* (1997).

5.4.11 Rotationsdiffusion von BR in Zellvesikeln

Die Rotationsdiffusion von BR wird nach Cherry *et al.* (1977) durch Messung der Zeitabhängigkeit der Anisotropie der blitzinduzierten Absorptionsunterschiede bei 550 nm untersucht. Die Messungen werden an Zellvesikeln durchgeführt, die nach Oesterhelt (1982a) durch Gefrieren und Auftauen der Zellen erzeugt werden. Aufgrund der Größe der Vesikel wirkte sich die bezüglich der Zeitskala der Messung (< 5 ms) langsame Rotation der Vesikel nicht auf die Messung aus. Eine Zellsuspension wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und stehen gelassen. Nach Verdampfen des Stickstoffs taut die Suspension wieder auf, wodurch die Zellen aufbrechen und ihr Zytosol verlieren. Nach Zentrifugation bei 100000 g werden die Vesikel gegen 80 mM MgSO₄ (20 mM Tris/HCl, pH 8.0) dialysiert. Nach erneuter Zentrifugation werden die Vesikel schließlich im selben Puffer resuspendiert und für die Messung eingesetzt. Die Absorptionsänderungen werden an der bereits beschriebenen Blitzlicht-Apparatur (s. 5.4.8) mit folgenden Modifikationen durchgeführt. Zwei Polarisationsfilter werden vor dem Meßlicht und dem anregenden Laserlicht angebracht. Die Bleichung des Grundzustands von lichtadaptierten (5 min im Meßlicht) BR-Proben wird jeweils mit, relativ zum Meßlicht, parallel und senkrecht polarisiertem Laserlicht (560 nm) aufgenommen. Jedes Spektrum wird als Summe aus jeweils zehn Einzelspektren erhalten. Die Messungen werden bei RT durchgeführt.

Der Anisotropie-Parameter $r(t)$ wird nach folgender Formel errechnet:

$$r(t) = \frac{A_{\parallel}(t) - A_{\perp}(t)}{A_{\parallel}(t) + 2A_{\perp}(t)}$$

Dabei sind $A_{\parallel}(t)$ und $A_{\perp}(t)$ die Absorptionsänderungen zum Zeitpunkt t nach dem Blitz mit parallel und senkrecht polarisiertem Anregungslicht.

5.4.12 Protonentransportaktivität von BR in *H. salinarum*

Die Messung der Protonentransportaktivität in ganzen Zellen erfolgte nach Oesterhelt (1982b). Zellen aus einer 5 - 6 Tage alten Kultur werden bei 20 °C und 7000 rpm zentrifugiert, in Basalsalz ohne Citrat vorsichtig resuspendiert und auf eine OD₅₆₈ von 4 eingestellt. In einer bei 20 °C thermostatisierten Küvette werden 200 µl der Zellsuspension in 8 ml Basalsalz ohne Citrat pipettiert und mit 20 µl einer wäßrigen Tetraphenylphosphoniumbromid-Lösung (TPP⁺, 100 mM) versetzt, um den Einfluß des elektrochemischen Gradienten an der Zellmembran auf die Pumpaktivität des BR zu unterdrücken. Der pH-Wert lag bei allen Messungen zwischen 6.8 - 6.95. Vor jeder neuen Probe wird die pH-Elektrode in der Zellsuspension ca. 1 h äquilibriert. Die Küvette wird mit einer Hg-Dampfampe (OG 515, KG3) belichtet und die Änderung des pH-Werts in der Suspension in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet. Durch Neutralglasfilter werden verschiedene Lichtintensitäten eingestellt. Nach jeder Messreihe mit unterschiedlichen Lichtstärken wird mit einer bestimmten Menge H⁺ (5 µl 10 mM HCl) die pH-Änderung gemessen, um die von den Zellen erzeugten Änderungen zu quantifizieren. Die BR-Menge in den Zellen wird durch Absorptionsmessung eines lysierten Aliquots aus der konzentrierten Suspension bestimmt.

Die Volumenaktivität VA wird nach folgender Formel berechnet:

$$VA[\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}] = v_{\text{in}}[\mu\text{V} \cdot \text{s}^{-1}] \cdot \frac{n(\text{H}^+)[\text{nmol}] \cdot 60 \text{ s}}{A(\text{HCl})[\text{mV}] \cdot V_{\text{Küv}}[\text{ml}]}$$

v_{in} : Anfangsgeschwindigkeit der pH-Änderung

$A(\text{HCl})$: Amplitude des Eichsignals von 10 mM HCl

$n(\text{H}^+)$: Stoffmenge der zugegebenen H⁺

$V_{\text{Küv}}$: Volumen der Suspension in der Küvette (8.2 ml)

Mit der bekannten Konzentration $c(\text{BR})$ konnte man die spezifische Aktivität des BR nach

$$\text{spez. Aktiv. } [\text{H}^+ \cdot \text{BR}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}] = \frac{VA[\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}]}{c(\text{BR})[\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}]}$$

berechnen.

5.4.13 Messung der Photophosphorylierungsrate in *H. salinarum*

Die Bestimmung der Photophosphorylierungsrate wird nach Oesterhelt (1982b) durchgeführt. Dafür werden 5 - 6 Tage alte Zellen bei 6000 rpm zentrifugiert und in 50 ml (pro Liter Kultur) Basalsalz mit Citrat vorsichtig resuspendiert (über Nacht auf einem langsamen

Schüttler bei RT, gepuffert mit 10 mM Tris/HCl, pH ~ 6.6). Die Zellsuspensionen werden auf eine OD₆₀₀ von ca. 4 - 5 eingestellt. In einer bei 25 °C temperierten und mit Parafilm abgedichteten Küvette werden 7ml dieser Suspension unter N₂ (durch Waschflasche mit Basalsalz geleitet) etwa 1 h im Dunkeln gerührt, damit ein stabiles ATP-Niveau erreicht wird. Die Küvette wird mit einem ca. 20 cm entfernten Diaprojektor belichtet (Filter OG530, KG4 + 25 % Neutralglasfilter). Die Lichtintensität an der Probe betrug etwa 12 mW·cm⁻², was innerhalb des linearen Bereichs liegt, in dem die ATP-Synthese nicht in Sättigung ist. Die Messung der ATP-Konzentration erfolgte mit dem Luciferin-Luciferase-System in einem Lumineszenzmessgerät. Vor jeder neuen Messung erfolgte eine Eichung mit einer ATP-Lösung mit bekannter ATP-Menge (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 pmol). Die Probenahme erfolgte jeweils 10 min, 5 min, 10 s vor und 5, 15, 25, 35, 45, 60, 120 und 300 s nach dem Einschalten des Projektors, wobei jeweils 100 µl der Suspension sofort in 5 ml eisgekühltem Phosphat-Puffer (0.1 mM EDTA, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) lysiert werden. Zu je 500 µl des Lysats werden in der Messküvette 100 µl des Luciferin-Luciferase-Gemischs injiziert. Dafür werden 100 mg Firefly Lantern Extract (Sigma) mit 5 ml einer 1mM EDTA in 0.1 M NaH₂PO₄ (pH 7.4) extrahiert, zentrifugiert und mit 100 µl einer 1M MgSO₄-Lösung versetzt. Diese Lösung wird dann mit einer Lösung von 10 mM MgSO₄ in 0.1 M Tris/HCl (pH 7.4) im Verhältnis 1:4 (v/v) verdünnt. Die BR-Konzentration (mg·ml⁻¹ BR pro OD) wird nach Zentrifugation und Lyse von 2 ml der Zellsuspension und Messung des Absorptionsspektrums in 500 µl Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.0) bestimmt. Die Anfangsrate der ATP-Synthese wird durch lineare Regression der ersten 4 Messpunkte nach der Belichtung bestimmt. Zur Kontrolle der Fähigkeit aller untersuchten Zellen zur ATP-Synthese werden am Ende einer Messung mittels einer Spritze etwa 50 ml Luft in ca. 40 s in die Zellsuspension eingeleitet und erneut eine Probe zur ATP-Messung entnommen.

5.4.14 Lichtinduzierte Vernetzung von BR in Membranen

Der Versuch wird nach Fancy und Kodadek (1999) mit geringen Modifikationen durchgeführt. 14 µl der BR-haltigen Membransuspension werden in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß mit 2 µl des 10 x Reaktionspuffers (1.5 M NaCl, 150 mM NaH₂PO₄, pH 7.5) und 2 µl einer 2.5 mM Lösung von Ru^{II}(bipy)₃Cl₂ (Sigma) versetzt. Die Endkonzentration von BR betrug 2 µM (OD₅₆₀ ≈ 0.125). Kurz vor der Belichtung werden 2 µl einer 25 mM (NH₄)₂S₂O₈-Lösung zugegeben und gut gemischt. Die Belichtung (0.2 s) der Probe erfolgte unverzüglich mit einer Xe-Lampe (150 W) in einem Abstand von etwa 25 cm mit weißem Licht (GG400, KG3, λ = 400 - 750 nm). Sofort nach der Belichtung wird die Reaktion durch Zugabe von 7 µl des 4 x

Natriumdodecylsulfat-Probenpuffers (0.2 M Tris, 8 % w/v Natriumdodecylsulfat, 2.88 M β -Mercaptoethanol, 40 % w/v Glycerin, 0.4 % w/v Bromphenolblau) gestoppt. Die Belichtung wird im offenen Gefäss durchgeführt, damit die Zeit bis zur Pufferzugabe möglichst kurz blieb. Je 8 μ l dieser Proben werden auf einem 13 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, und die Proteinbanden nach dem Lauf im Western-Blot immunochemisch detektiert.

6 Literaturverzeichnis

- Bamberg, E., J. Tittor und D. Oesterhelt (1993): "Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 639-643
- Barnett, S. M., S. Dracheva, R. W. Hendler und I. W. Levin (1996): "Lipid-induced conformational-changes of an integral membrane-protein - an infrared spectroscopic study of the effects of Triton X-100 treatment on the purple membrane of halobacterium-halobium ET1001 " *Biochemistry* , **35**, 4558-4567
- Becher, B. und T. G. Ebrey (1976): "Evidence for chromophore-chromophore (exciton) interaction in the purple membrane of Halobacterium halobium" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 1-6
- Belrhali, H., P. Nollert, A. Royant, C. Menzel, J. P. Rosenbusch, E. M. Landau und E. Pebay-Peyroula (1999): "Protein, lipid and water organization in Bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution" *Structure with Folding & Design*, **7**, 909-17
- Besir, H. (1997): "Konstruktion und Charakterisierung eines Haloopsin-defizienten Stammes von *Halobacterium salinarum*" Diplomarbeit, LMU München
- Blaurock, A. E. und W. Stoeckenius (1971): "Structure of the purple membrane" *Nature (London), New Biol.*, **233**, 152-155
- Bogomolni, R. A. und J. L. Spudich (1982): "Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6250-6254
- Braiman, M. und R. Mathies (1982): "Resonance Raman spectra of Bacteriorhodopsin's primary photoproduct: Evidence for a distorted 13-cis retinal chromophore" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 403-407
- Bullough, P. A. und R. Henderson (1999): "The projection structure of the low temperature K intermediate of the Bacteriorhodopsin photocycle determined by electron diffraction" *J. Mol. Biol.*, **286**, 1663-1671
- Camerini-Otero, R. D. und P. Hsieh (1995): "Homologous recombinant proteins in prokaryotes and eukaryotes" *Annu. Rev. Gen.*, **29**, 509-552
- Cassim, J. Y. (1992): "Unique biphasic band shape of the visible circular dichroism of Bacteriorhodopsin in purple membrane. Excitons, multiple transitions or protein heterogeneity?" *Biophys. J.*, **63**, 1432-1442
- Cherry, R. J., M. P. Heyn und D. Oesterhelt (1977): "Rotational diffusion and exciton coupling of Bacteriorhodopsin in the cell membrane of *Halobacterium halobium*" *FEBS Letters* **78**, 25-30

- Cline, S. W., W. L. Lam, R. L. Charlebois, L. C. Schalkwyk und W. F. Doolittle (1989): "Transformation methods for halophilic archaebacteria" *Can J Microbiol*, **35**, 148-52
- Colella, M., S. Lobasso, F. Babudri und A. Corcelli (1998): "Palmitic acid is associated with halorhodopsin as a free fatty acid radiolabeling of halorhodopsin with 3H-palmitic acid and chemical analysis of the reaction products of purified halorhodopsin with thiols and NaBH₄" *Biochim. Biophys. Acta*, **1370**, 273-279
- Corcelli, A., S. Lobasso, M. Colella, M. Trotta, A. Guerrieri und F. Palmisano (1996): "Role of palmitic acid on the isolation and properties of halorhodopsin" *Biochim. Biophys. Acta*, **1281**, 173-181
- Danon, A., H. Degani und Caplan, S.R. (1978): "The effect of the purple membrane of H. halobium on the osmotic fragility and water permeability of the cells" *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, S. R. Caplan und M. Ginzburg (Eds.), Vol. 1, 217-224
- Dencher, N. A. und M. P. Heyn (1978): "Formation and properties of Bacteriorhodopsin monomers in the non-ionic detergents octyl-beta-D-glucoside and Triton X-100" *FEBS Letters*, **96**, 322-326
- Dencher, N. A. und M. P. Heyn (1979): "Bacteriorhodopsin monomers pump protons" *FEBS Letters*, **108**, 307-310
- Deshpande, A. and S. Sonar (1999): "Bacterioopsin-triggered retinal biosynthesis is inhibited by bacteriorhodopsin formation in Halobacterium salinarium" *J. Biol. Chem.*, **274**, 23535-23540
- Doig, S. J., P. J. Reid und R. A. Mathies (1991): "Picosecond time-resolved resonance Raman spectroscopy of Bacteriorhodopsin's J, K, and KL intermediates" *J. Phys. Chem.*, **95**, 6372-6379
- Dracheva, S., S. Bose und R. W. Hendler (1996): "Chemical and functional-studies on the importance of purple membrane-lipids in Bacteriorhodopsin photocycle behavior" *FEBS Letters*, **382**, 209-212
- Dumas, F., M. M. Sperotto, M. C. Lebrun, J. F. Tocanne und O. G. Mouritsen (1997): "Molecular sorting of lipids by Bacteriorhodopsin in dilauroylphosphatidylcholine / distearylphosphatidylcholine lipid bilayers" *Biophys. J.*, **73**, 1940-1953
- Duschl, A., M. A. McCloskey und J. K. Lanyi (1988): "Functional Reconstitution Of Halorhodopsin Properties Of Halorhodopsin-Containing Proteoliposomes" *J. Biol. Chem.*, **263**, 17016-17022

- Ebrey, T. G., B. Becher, B. Mao, P. Kilbride und B. Honig (1977): "Exciton interactions and chromophore orientation in the purple membrane" *J. Mol. Biol.*, **112**, 377-397
- Edman, K., P. Nollert, A. Royant, H. Belrhali, E. Pebay-Peyroula, J. Hajdu, R. Neutze und M. Landau Ehad (1999): "High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the Bacteriorhodopsin photocycle" *Nature*, **401**, 822-826
- El-Sayed, M. A., C. T. Lin und W. R. Mason (1989): "Is there an excitonic interaction or antenna system in Bacteriorhodopsin?" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5376-5379
- Essen, L. O., R. Siegert, W. D. Lehmann und D. Oesterhelt (1998): "Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the Bacteriorhodopsin-lipid complex" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11673-11678
- Fancy, D. A. und T. Kodadek (1999): "Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: Rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6020-6024
- Fischer, U. und D. Oesterhelt (1979): "Chromophore equilibria in Bacteriorhodopsin" *Biophys. J.*, **28**, 211-30
- Fischer, U., P. Towner und D. Oesterhelt (1981): "Light induced isomerization, at acidic pH, initiates hydrolysis of Bacteriorhodopsin to bacterio-opsin and 9-cis-retinal" *Photochem. Photobiol.*, **33**, 529-537
- Frolow, F., M. Harel, J. L. Sussman, M. Mevarech und M. Shoham (1996): "Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin" *Nature Struct. Biol.*, **3**, 452-8
- Fukuda, K., A. Ikegami, A. Nasuda-Kouyama und T. Kouyama (1990): "Effect of partial delipidation of purple membrane on the photodynamics of Bacteriorhodopsin" *Biochemistry*, **29**, 1997-2002
- Gil, T., J. H. Ipsen, O. G. Mouritsen, M. C. Sabra, M. M. Sperotto und M. J. Zuckermann (1998): "Theoretical analysis of protein organization in lipid membranes" *Biochim. Biophys. Acta*, **1376**, 245-66
- Godfrey, R. E. (1982): "Photoselection and circular dichroism in the purple membrane" *Biophys. J.*, **38**, 1-6
- Govindjee, R., E. S. Imasheva, S. Misra, S. P. Balashov, T. G. Ebrey, N. Chen, D. R. Menick und R. K. Crouch (1997): "Mutation of a surface residue, lysine-129, reverses the order of proton release and uptake in Bacteriorhodopsin - guanidine-hydrochloride restores it" *Biophys. J.*, **72**, 886-898

- Grigorieff, N., E. Beckmann und F. Zemlin (1995a): "Lipid location in deoxycholate-treated purple membrane at 2.6 Å" *J. Mol. Biol.*, **254**, 404-415
- Grigorieff, N., T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin und R. Henderson (1996): "Electron-crystallographic refinement of the structure of Bacteriorhodopsin" *J. Mol. Biol.*, **259**, 393-421
- Gulik-Krzywicki, T., M. Seigneuret und J. L. Rigaud (1987): "Monomer-oligomer equilibrium on Bacteriorhodopsin in reconstituted proteoliposomes. A freeze-fracture electron microscope study" *J. Biol. Chem.*, **262**, 15580-15588
- Hartmann, R. und D. Oesterhelt (1977): "Bacteriorhodopsin-mediated photophosphorylation in Halobacterium halobium" *Eur. J. Biochem.*, **77**, 325-35
- Haupts, U., J. Tittor, E. Bamberg und D. Oesterhelt (1997): "General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: The isomerization/switch/transfer (IST) model" *Biochemistry*, **36**, 2-7
- Haupts, U., J. Tittor und D. Oesterhelt (1999): "Closing in on Bacteriorhodopsin: Progress in understanding the molecule" *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**, 367-399
- Havelka, W. A., R. Henderson, J. Heymann und D. Oesterhelt (1993): "Projection structure of halorhodopsin from Halobacterium halobium at 6 Å resolution obtained by electron cryo-microscopy" *J. Mol. Biol.*, **234**, 837-846
- Havelka, W. A., R. Henderson und D. Oesterhelt (1995): "Three-dimensional structure of halorhodopsin at 7 Å resolution" *J. Mol. Biol.*, **247**, 726-738
- Heberle, J., J. Riesle, G. Thiedemann, D. Oesterhelt und N. A. Dencher (1994): "Proton Migration Along the Membrane-Surface and Retarded Surface to Bulk Transfer" *Nature*, **370**, 379-382
- Henderson, R., J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann und K. H. Downing (1990): "Model For The Structure Of Bacteriorhodopsin Based On High-Resolution Electron Cryo-Microscopy" *J. Mol. Biol.*, **213**, 899-930
- Henderson, R., J. S. Jubb und S. Whytock (1978): "Specific labeling of the protein and lipid on the extracellular surface of purple membrane" *J. Mol. Biol.*, **123**, 259-274
- Henderson, R. und P. N. T. Unwin (1975): "Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy" *Nature (London)*, **257**, 28-32
- Heymann, J. A. W., W. A. Havelka und D. Oesterhelt (1993): "Homologous overexpression of a light-driven anion pump in an archaebacterium" *Mol. Microbiol.*, **7**, 623-630

- Heyn, M. P., P. J. Bauer und N. A. Dencher (1975): "Natural CD label to probe the structure of the purple membrane from *Halobacterium halobium* by means of exciton coupling effects" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 897-903
- Hiraki, K., T. Hamanaka, T. Mitsui und Y. Kito (1978): "Formation of the two-dimensional hexagonal lattice of Bacteriorhodopsin in reconstituted brown membrane" *Biochim. Biophys. Acta*, **536**, 318-322
- Hiraki, K., T. Hamanaka, T. Mitsui und Y. Kito (1981): "Phase transitions of the purple membrane and the brown holo-membrane. X-ray diffraction, circular dichroism spectrum and absorption spectrum studies" *Biochim. Biophys. Acta*, **647**, 18-28
- Hiraki, K., T. Hamanaka, T. Mitsui und Y. Kito (1984): "The absorbance spectrum of the brown holo-membrane and the comparison of pI values of Bacteriorhodopsin solubilized from purple membrane and from brown holo-membrane" *Biochim. Biophys. Acta*, **777**, 232-240
- Hoejberg, B., C. Lind und H. G. Khorana (1982): "Reconstitution of Bacteriorhodopsin vesicles with *Halobacterium halobium* lipids. Effects of variations in lipid composition" *J. Biol. Chem.*, **257**, 1690-1694
- Hsiao, T. L. und J. Y. Cassim (1979): "Calculations of the Visible Absorption and Circular Dichroic Spectra of the Purple Membrane Based on a 7 Nearest-Neighbor Exciton Model" *Biophys. J.*, **25**, A311-A311
- Hwang, S. B., Y. W. Tseng und W. Stoeckenius (1981): "Spontaneous aggregation of Bacteriorhodopsin in brown membrane" *Photochem. Photobiol.*, **33**, 419-427
- Ihara, K., T. Amemiya, Y. Miyashita und Y. Mukohata (1994): "Met-145 is a key residue in the dark adaptation of Bacteriorhodopsin homologs" *Biophys. J.*, **67**, 1187-1191
- Isenbarger, T. A. und M. P. Krebs (1999): "Role of helix-helix interactions in assembly of the Bacteriorhodopsin lattice" *Biochemistry*, **38**, 9023-30
- Jang, D. J., M. A. El-Sayed, L. J. Stern, T. Mogi und H. G. Khorana (1990): "Sensitivity of the retinal circular dichroism of Bacteriorhodopsin to the mutagenetic single substitution of amino acids: tyrosine" *FEBS Letters*, **262**, 155-158
- Kataoka, M., K. Mihara, H. Kamikubo, R. Needleman, J. K. Lanyi und F. Tokunaga (1993): "Trimeric mutant Bacteriorhodopsin, D85N, shows a monophasic CD spectrum" *FEBS Letters*, **333**, 111-113
- Kates, M., S. C. Kushwaha und G. D. Sprott (1982): "Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria" *Methods Enzymol.*, **88**, 98-111

- Killian, J. A. und G. von Heijne (2000): "How proteins adapt to a membrane-water interface" *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 429-434
- Kloppel, K. D. und H. L. Fredrickson (1991): "Fast atom bombardment mass spectrometry as a rapid means of screening mixtures of ether-linked polar lipids from extremely halophilic archaeobacteria for the presence of novel chemical structures" *J Chromatogr*, **562**, 369-76
- Kolbe, M., H. Besir, L. O. Essen und D. Oesterhelt (2000): "Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 angstrom resolution" *Science*, **288**, 1390-1396
- Krebs, M. P., W. X. Li und T. P. Halambeck (1997): "Intramembrane substitutions in helix-d of Bacteriorhodopsin disrupt the purple membrane" *J. Mol. Biol.*, **267**, 172-183
- Krebs, M. P., R. Mollaaghababa und H. G. Khorana (1993): "Gene replacement in Halobacterium halobium and expression of Bacteriorhodopsin mutants" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1987-1991
- Kriebel, A. N. und A. C. Albrecht (1976): "Excitonic interaction among three chromophores: An application to the purple membrane of Halobacterium halobium" *J. Chem. Phys.*, **65**, 4575-4583
- Kunji, E. R., S. von Gronau, D. Oesterhelt und R. Henderson (2000): "The three-dimensional structure of halorhodopsin to 5 Å by electron crystallography: A new unbending procedure for two-dimensional crystals by using a global reference structure" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4637-42
- Kushwaha, S. C., M. Kates und W. G. Martin (1975): "Characterization and composition of the purple and red membrane from Halobacterium cutirubrum" *Can. J. Biochem.*, **53**, 284-292
- Landau, E. M. und J. P. Rosenbusch (1996): "Lipidic Cubic Phases - a Novel Concept For the Crystallization Of Membrane Proteins" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14532-14535
- Lanyi, J. K. (1999): "Progress toward an explicit mechanistic model for the light-driven pump, Bacteriorhodopsin" *FEBS Letters*, **464**, 103-107
- Lecoutre, J., J. Tittor, D. Oesterhelt und K. Gerwert (1995). "Experimental-evidence for hydrogen-bonded network proton-transfer in bacteriorhodopsin shown by fourier-transform infrared-spectroscopy using azide as catalyst" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4962-4966.
- Luecke, H., H. T. Richter und J. K. Lanyi (1998): "Proton Transfer Pathways In Bacteriorhodopsin At 2.3 Angstrom Resolution" *Science*, **280**, 1934-1937

- Luecke, H., B. Schobert, J. P. Cartailler, H. T. Richter, A. Rosengarth, R. Needleman und J. K. Lanyi (2000): "Coupling photoisomerization of retinal to directional transport in Bacteriorhodopsin" *J. Mol. Biol.*, **300**, 1237-55
- Luecke, H., B. Schobert, H.-T. Richter, J.-P. Cartailler und J. K. Lanyi (1999a): "Structural changes in Bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution" *Science*, **286**, 255-262
- Luecke, H., B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler und J. K. Lanyi (1999b): "Structure of Bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution" *J. Mol. Biol.*, **291**, 899-911
- Maeda, A., T. Iwasa und T. Yoshizawa (1977): "Isomeric composition of retinal chromophore in dark-adapted Bacteriorhodopsin" *J. Biochem.*, **82**, 1599-604
- Maeda, A., T. Iwasa und T. Yoshizawa (1980): "Formation of 9-cis- and 11-cis-retinal pigments from Bacteriorhodopsin by irradiating purple membrane in acid" *Biochemistry*, **19**, 3825-3831
- Marsh, D. und L. I. Horvath (1998). "Structure, dynamics and composition of the lipid-protein interface. Perspectives from spin-labelling" *Biochim Biophys Acta*, **1376**, 267-96
- Michel, H., D. Oesterhelt und R. Henderson (1980): "Orthorhombic two-dimensional crystal form of purple membrane" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 338-342
- Mikaelian, I. und A. Sergeant (1992): "A General And Fast Method To Generate Multiple Site Directed Mutations" *Nucl. Acids Res.*, **20**, 376
- Mitsuoka, K., T. Hirai, K. Murata, A. Miyazawa, A. Kidera, Y. Kimura und Y. Fujiyoshi (1999): "The structure of Bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution" *J. Mol. Biol.*, **286**, 861-82
- Mouritsen, O. G. (1998): "Self-Assembly And Organization Of Lipid-Protein Membranes" *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.*, **3**, 78-87
- Mukohata, Y., Y. Sugiyama, Y. Kaji, J. Usukura und E. Yamada (1981): "The white membrane of crystalline bacterioopsin in Halobacterium halobium strain R1mW and its conversion into purple membrane by exogenous retinal" *Photochem. Photobiol.*, **33**, 593-600
- Neugebauer, D. C., H. P. Zingsheim und D. Oesterhelt (1978): "Recrystallization of the purple membrane in vivo and in vitro" *J. Mol. Biol.*, **123**, 247-57
- Nomura, S., N. Kajimura, K. Matoba, T. Miyata, R. Ortenberg, M. Mevarech, H. Kamikubo, M. Kataoka und Y. Harada (1999): "Ordered structure formation of Bacteriorhodopsin-hDHF in a plasma membrane" *Langmuir*, **15**, 214-220

- Oesterhelt, D. und W. Stoeckenius (1971): "Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*" *Nat. New Biol.*, **233**, 149-152
- Oesterhelt, D. und W. Stoeckenius (1973): "Functions of a new photoreceptor membrane" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 2853-2857
- Oesterhelt, D. und W. Stoeckenius (1974): "Isolation of the cell membranes of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane" *Methods Enzymol.*, **31**, 667-678
- Oesterhelt, D. (1982a): "Reconstitution of the retinal proteins Bacteriorhodopsin and halorhodopsin" *Methods Enzymol.*, **88**, 10-17
- Oesterhelt, D. (1982b): "Photophosphorylation and Reconstitution of Photophosphorylation in Halobacterial Cells" *Methods Enzymol.*, **88**, 350-355
- Oesterhelt, D. (1995): "Structure and function of halorhodopsin" *Israel J. Chem.*, **35**, 475-494
- Oesterhelt, D. (1998): "The structure und mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea" *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 489-500
- Oesterhelt, F., D. Oesterhelt, M. Pfeiffer, A. Engel, H. E. Gaub und D. J. Muller (2000): "Unfolding pathways of individual Bacteriorhodopsins" *Science*, **288**, 143-146
- Ovchinnikov, A., N. G. Abdulaev und A. S. Bogachuk (1988): "Two Adjacent Cysteine Residues In The Carboxyl-Terminal Cytoplasmic Fragment Of Bovine Rhodopsin Are Palmitylated" *FEBS Letters*, **230**, 1-5
- Peters, R. und J. Peters (1978): "Light-dark-adaptation of Bacteriorhodopsin in brown membrane" *Dev. Halophilic Microorg.*, **1**, 315-321
- Pettei, M. J., A. P. Yudd, K. Nakanishi, R. Henselman und W. Stoeckenius (1977): "Identification of retinal isomers isolated from Bacteriorhodopsin" *Biochemistry*, **16**, 1955-1959
- Pfeiffer, M. (2000): "Studies on Dynamics und Function of Bacteriorhodopsin from *H. salinarum*" Dissertation an der LMU München, Utz-Verlag München, ISBN 3-89675-835-7
- Pfeiffer, M., T. Rink, K. Gerwert, D. Oesterhelt und H. J. Steinhoff (1999): "Site-directed Spin-labeling Reveals the Orientation of the Amino Acid Side-chains in the E-F Loop of Bacteriorhodopsin" *J. Mol. Biol.*, **287**, 163-171
- Plischka, P. (2000): "Untersuchungen zur Chemie, Isomerisierung und Farbe des Retinalchromophors in Bacteriorhodopsinmutanten" Dissertation, LMU München

- Popp, A., M. Wolperdinger, N. Hampp, C. Bräuchle und D. Oesterhelt (1993): "Photochemical conversion of the O-intermediate to 9-cis-retinal-containing in Bacteriorhodopsin films" *Biophys. J.*, **65**, 1449-1459
- Pugh, E. L. und M. Kates (1994): "Acylation of proteins of the archaeobacteria *Halobacterium cutirubrum* und *Methanobacterium thermoautotrophicum*" *Biochim. Biophys. Acta*, **1196**, 38-44
- Rink, T., J. Riesle, D. Oesterhelt, K. Gerwert und H. J. Steinhoff (1997): "Spin-labeling studies of the conformational-changes in the vicinity of d36, d38, t46, and e161 of Bacteriorhodopsin during the photocycle" *Biophys. J.*, **73**, 983-993
- Royant, A., K. Edman, T. Ursby, E. Pebay-Peyroula, E. M. Landau und R. Neutze (2000): "Helix deformation is coupled to vectorial proton transport in the photocycle of Bacteriorhodopsin" *Nature*, **406**, 645-648
- Rüdiger, M. und D. Oesterhelt (1997): "Specific Arginine and Threonine Residues Control Anion Binding and Transport In the Light-Driven Chloride Pump Halorhodopsin" *EMBO Journal*, **16**, 3813-3821
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989): "Molecular Cloning a Laboratory Manual Second Edition Vols. 1 2 and 3" *Sambrook, J., E. F. Fritsch And T. Maniatis. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*
- Sandler, S. J., L. H. Satin, H. S. Samra und A. J. Clark (1996): "RecA-like genes from three archaean species with putative protein products similar to Rad51 and Dmc1 proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *Nucl. Acids Res.*, **24**, 2125-2132
- Sasaki, J., L. S. Brown, Y. S. Chon, H. Kandori, A. Maeda, R. Needleman und J. K. Lanyi (1995): "Conversion of Bacteriorhodopsin into a chloride-ion pump" *Science*, **269**, 73-75
- Sass, H. J., G. Buldt, R. Gessenich, D. Hehn, D. Neff, R. Schlesinger, J. Berendzen und P. Ormos (2000): "Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type Bacteriorhodopsin" *Nature*, **406**, 649-653
- Scherrer, P., M. K. Mathew, W. Sperling und W. Stoeckenius (1989): "Retinal Isomer Ratio In Dark-Adapted Purple Membrane And Bacteriorhodopsin Monomers" *Biochemistry*, **28**, 829-834
- Schertler, G. F. X., H. D. Bartunik, H. Michel und D. Oesterhelt (1993): "Orthorhombic crystal form of Bacteriorhodopsin nucleated on benzamidine diffracting to 3.6 Å resolution" *J. Mol. Biol.*, **234**, 156-164

- Schiffer, M., C. H. Chang und F. J. Stevens (1992): "The functions of tryptophan residues in membrane proteins" *Protein Eng.*, **5**, 213-214
- Schobert, B. und J. K. Lanyi (1982): "Halorhodopsin is a light-driven chloride pump" *J. Biol. Chem.*, **257**, 10306-13
- Schweiger, U. (1996): "Funktionelle Charakterisierung der Retinalbindungstasche von Bacteriorhodopsin durch spezifische Mutagenese" Dissertation, LMU München
- Shen, Y., C. R. Safinya, K. S. Liang, A. F. Ruppert and K. J. Rothschild (1993): "Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140 °C in two-dimensional films" *Nature*, **366**, 48-50
- Song, L., D. F. Yang, M. A. Elsayed und J. K. Lanyi (1995): "Retinal isomer composition in some Bacteriorhodopsin mutants under light and dark-adaptation conditions" *J. Phys. Chem.*, **99**, 10052-10055
- Sperling, W., P. Carl, C. N. Rafferty und N. A. Dencher (1977): "Photochemistry and dark equilibrium of retinal isomers and Bacteriorhodopsin isomers" *Biophys. Struct. Mech.*, **3**, 79-94
- Spudich, J. L., C. S. Yang, K. H. Jung and E. N. Spudich (2000): "RETINYLIDENE PROTEINS: Structures and Functions from Archaea to Humans" *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 365-392
- Steinhoff, H. J., N. Radzwill, W. Thevis, V. Lenz, D. Brandenburg, A. Antson, G. Dodson und A. Wollmer (1997): "Determination Of Interspin Distances Between Spin Labels Attached to Insulin - Comparison Of Electron Paramagnetic Resonance Data With the X-Ray Structure" *Biophys. J.*, **73**, 3287-3298
- Sternberg, B., C. L'Hostis, C. A. Whiteway und A. Watts (1992): "The essential role of specific Halobacterium halobium polar lipids in 2D-array formation of Bacteriorhodopsin" *Biochim. Biophys. Acta*, **1108**, 21-30
- Sternberg, B., A. Watts und Z. Cejka (1993): "Lipid-induced modulation of the protein packing in two-dimensional crystals of Bacteriorhodopsin" *J. Struct. Biol.*, **110**, 196-204
- Stoeckenius, W., R. H. Lozier und R. A. Bogomolni (1979): "Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria" *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 215-278
- Storch, K. F., J. Rudolph und D. Oesterhelt (1999): "Car: a cytoplasmic sensor responsible for arginine chemotaxis in the archaeon Halobacterium salinarum" *EMBO Journal*, **18**, 1146-1158
- Subramaniam, S. und R. Henderson (2000): "Molecular mechanism of vectorial proton translocation by Bacteriorhodopsin" *Nature*, **406**, 653-657

- Sumper, M. (1982): "The brown membrane of *Halobacterium halobium*: the biosynthetic precursor of the purple membrane" *Methods Enzymol.*, **88**, 391-395
- Sumper, M., H. Reitmeier and D. Oesterhelt (1976): "Biosynthesis of the purple membrane of halobacteria" *Angew. Chemie. International Ed. in English*, **15**, 187-94
- Szundi, I. und W. Stoeckenius (1987): "Effect Of Lipid Surface Charges On The Purple-To-Blue Transition Of Bacteriorhodopsin" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3681-3684
- Szundi, I. und W. Stoeckenius (1989): "Surface pH Controls Purple-To-Blue Transition Of Bacteriorhodopsin A Theoretical Model Of Purple Membrane Surface" *Biophys. J.*, **56**, 369-384
- Takahashi, T., Y. Mochizuki, N. Kamo und Y. Kobatake (1985): "Evidence that the long-lifetime photointermediate of s-rhodopsin is a receptor for negative phototaxis in *Halobacterium halobium*" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 99-105
- Turner, G. J., L. J. Miercke, A. K. Mitra, R. M. Stroud, M. C. Betlach und A. Winter-Vann (1999a): "Expression, purification, and structural characterization of the Bacteriorhodopsin-aspartyl transcarbamylase fusion protein" *Protein Expr. Purif.*, **17**, 324-38
- Turner, G. J., R. Reusch, A. M. Winter-Vann, L. Martinez und M. C. Betlach (1999b): "Heterologous gene expression in a membrane-protein-specific system" *Protein Expr. Purif.*, **17**, 312-23
- Uhl, R., B. Meyer und H. Desel (1984): "A polychromatic flash photolysis apparatus (PFPA)" *J. Biochem. Biophys. Methods*, **10**, 35-48
- Usukura, J., E. Yamada und Y. Mukohata (1981): "Some observations on the morphogenesis of lattice structure in the purple membrane" *Photochem. Photobiol.*, **33**, 475-481
- Váro, G. und J. K. Lanyi (1991): "Effects of the crystalline structure of purple membrane on the kinetics and energetics of the Bacteriorhodopsin photocycle" *Biochemistry*, **30**, 7165-7171
- Vaver, V. A. (1978): "Structural studies of Bacteriorhodopsin lipids" *Membr. Transp. Processes*, **2**, 21-30
- Vonck, J. (2000): "Structure of the Bacteriorhodopsin mutant F219L N intermediate revealed by electron crystallography" *EMBO Journal*, **19**, 2152-2160
- Weik, M., H. Patzelt, G. Zaccai und D. Oesterhelt (1998): "Localization Of Glycolipids In Membranes By In Vivo Labeling and Neutron Diffraction" *Mol. Cell*, **1**, 411-419
- Woese, C. R. (2000): "Interpreting the universal phylogenetic tree" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8392-96

- Woese, C. R., O. Kandler und M. L. Wheelis (1990): "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576-79
- Wu, S. und M. A. El-Sayed (1991): "CD spectrum of Bacteriorhodopsin. Best evidence against exciton model" *Biophys. J.*, **60**, 190-197

7 Abkürzungen und Symbole

2D, 3D	zweidimensional, dreidimensional
³ H-Palmitat	8,9-Ditritiumpalmitat
Å	Ångström (10 ⁻¹⁰ m)
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>atomic force microscopy</i>)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Braune Membran
<i>bop</i>	Bacterioopsingen
BO	Bacterioopsin
bp	Basenpaare
BR	Bacteriorhodopsin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
CP	Cytoplasma, cytoplasmatisch
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
da	Dunkeladaptiert
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat (mit N = A, C, G, T)
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat (mit N = A, C, G, I, T und U)
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	(±)- <i>threo</i> -1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
ε _x	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei x nm
EC	Extrazellulärraum, extrazellulär
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
ESR	Elektronenspinresonanz
<i>fdx</i>	Ferredoxingen
Fdx	Ferredoxin
FPLC	rasche Protein-Flüssigkeitschromatographie (<i>fast protein liquid chromatography</i>)
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GMF	Gesamtmembranfraktion
h	Stunde
HCl	Salzsäure
<i>hop</i>	Haloopsingen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
<i>H. salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
HR	Halorhodopsin
ISH2	Insertionselement 2 in <i>H. salinarum</i>
kb	Kilobase(n)
kD	Kilodalton
la	lichtadaptiert

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

λ	Wellenlänge
λ_{\max}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums
M, mM, nM	molar, Millimolar, Nanomolar
Mev	Mevinolin
min	Minute
MO	1-Monooleyl- <i>rac</i> -glycerol
MTSSL (= R1)	(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-yl)methanthiosulfonat
MTS-4-Oxyl (= R2)	(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-yl)carbamidomethylmethanthiosulfonat
OD _x	optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
OG	<i>n</i> -Octyl- β -glucosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG _x	Polyethylenglykol (x: mittlere Molmasse)
PG	Phosphatidylglycerol
PGP-Me	Phosphatidylglycerolphosphatmethylester
PGS	Phosphatidylglycerolsulfat
PHB	Prähybridisierungspuffer
PM	Purpurmembran
r (t)	zeitabhängiger Anisotropieparameter
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
Ru ^{II} (bipy) ₃ Cl ₂	Tris(bipyridyl)-ruthenium(II)dichlorid
s, ms	Sekunde(n), Millisekunde(n)
SB	Schiffsche Base
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPH	Sphäroblastenlösung
SVL	Sphäroblastenverdünnungslösung
SR I	Sensorrhodopsin I
SR II	Sensorrhodopsin II
S-TGA1	Sulfatisiertes Triglycosylarchaeol 1
T	Temperatur
T _M	Schmelztemperatur eines Oligonucleotids
τ	Zerfallszeit
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-ethylendiamin (1,2-Bis(dimethylamino)-ethan)
TPP ⁺	Tetraphenylphosphonium
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)
UV/Vis	Ultraviolett/Sichtbar (<i>Ultraviolet/Visible</i>)
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse

Für Aminosäuren wird der Ein- oder Dreibuchstabencode verwendet.

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Prof. Dr. Dieter Oesterhelt durchgeführt. Die Gefrierbruchexperimente und Elektronenmikroskopie wurden in der Gruppe von Prof. Dr. Sevil Weinkauf am Institut für Ultrastrukturforschung in Jena und an der TU München ausgeführt. Die ESR-Versuche fanden in der Gruppe von Heinz-Jürgen Steinhoff an der Ruhr-Universität in Bochum statt. Ich möchte allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr. Dieter Oesterhelt für seine großzügige Unterstützung, unzählige Ideen, die Freiheit, eigene Ideen zu verwirklichen, und für anregende Diskussionen, in denen es nicht nur um den Inhalt dieser Arbeit ging,

Prof. Dr. Wolfgang Gärtner für hilfreiche Ratschläge und seine Bereitschaft, für diese Arbeit als Zweitgutachter zu wirken,

Prof. Dr. Heinz-Jürgen Steinhoff und Matthias Kurz für ihre Zusammenarbeit bei der Aufnahme, Auswertung und Diskussion der ESR-Spektren,

Prof. Dr. Sevil Weinkauf und Dr. Johannes Scheuring für die Einführung in die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie und ihre Gastfreundschaft in Jena und München,

Dr. Jörg Tittor für seine Hilfsbereitschaft, hilfreiche Diskussionen, die Messungen an der Blitzkiste und die unendliche Freundlichkeit, mit der er mich so häufig beim Dartspiel gewinnen ließ,

Dr. Heiko Patzelt für Diskussionen und Ideen, die grossen Anteil an der Entstehung dieser Arbeit hatten, etliche Ziggis, die beim gemeinsamen Kännchen vernichtet wurden und nicht zuletzt mein erstes Auto, das mir trotz seines Alters noch gute Dienste geleistet hat,

Dr. Eva-Kathrin Schmidt für ihre schier unerschöpfliche Geduld bei der Korrektur dieser Arbeit, die die Verständlichkeit zahlreicher Passagen dramatisch verbessert hat,

Frau Eleonore Haack, ohne die ein reibungsloser Ablauf der Vorgänge in der Abteilung nicht gewährleistet wäre, für ihre stete Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft,

Frau Susanna von Gronau für die große Hilfsbereitschaft bei etlichen Wachstumsversuchen

DANKSAGUNG

Frau Uta Schimanko für die äusserst rasche und zuverlässige Synthese der Oligos,

Frau Dr. Karin Rodewald und Kiki Weyrauch für die DNA-Sequenzierung,

Dr. Harald Engelhardt, Dr. Dieter Typke und Frau Ute Santarius für die Elektronenmikroskopie in der Abteilung Baumeister,

Dr. Stefan Paula für die Messung von Photozyklen, der Rotationsdiffusion und Hilfe bei der Konvertierung der Daten,

Dr. Florian Storch und Dr. Maia Kokoeva für ihre stete Hilfsbereitschaft und zahlreiche Tips, die einem das Leben im Labor erleichterten,

Michael Kolbe für die beste und erfolgreichste Kooperation, die man sich wünschen kann,

Dr. Matthias Pfeiffer für die „endskorrekte“ Betreuung und so vieles, was hier aufzuzählen mir unmöglich wäre,

Mirjam Aregger, Dr. Hui-Chung Chou, Christoph Oppawsky, Dr. Chie Otsuka, Dr. Nadja Patenge, Dr. Martin Rüdiger, Rita Wiemeyer und Dr. Andreas Wolf für ihre Hilfe, den Spass und die äusserst angenehme Atmosphäre im Hefelabor,

allen Mitarbeitern der Abteilung Oesterhelt für die angenehmen vier Jahre, die ich mit ihnen verbringen durfte,

meiner Familie für ihre immerwährende Unterstützung und ihr Verständnis für die Doktorarbeit, wegen der ich ihr häufig zu wenig Zeit widmen konnte,

und Tina für ihr Verständnis und Ihren Beistand in guten und schlechten Tagen und nicht zuletzt für die Hoffnung auf ein Leben nach der Doktorarbeit.

9 LEBENS LAUF

Name: Hüseyin Besir
Geburtsdatum: 10.10.1972
Geburtsort: Bafra (Türkei)
Staatsangehörigkeit: türkisch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/1978 – 08/1982 Grundschule in München
09/1982 – 08/1991 Maria-Theresia-Gymnasium München
Abschluss: Abitur

Studium:

10/1991 – 07/1997 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität,
München
Wahlfach: Pharmakologie und Toxikologie
11/1996 Diplomprüfung
01/1997 - 07/1997 Diplomarbeit zum Thema „Konstruktion und Charakterisierung
eines haloopsindefizienten Stammes von *Halobacterium salinarum*“ am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried,
Abteilung Membranbiochemie (Prof. Dr. D. Oesterhelt)

Dissertation:

09/1997 – 07/2001 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martins-
ried unter der Leitung von Prof. Dr. D. Oesterhelt zum Thema
„Untersuchung der lipidvermittelten Kristallisation der Ionen-
pumpen Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin aus
Halobacterium salinarum“