

Einbau von Rezeptoren in Membran-Nanodisks

Masterarbeit

Vorgelegt von

Tobias Schubeis

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Engelhard
2. Gutachterin: PD Dr. Susanne Brakmann

Dortmund, 21.07.2009

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung „Physikalische Biochemie“ von Prof. Dr. Roger S. Goody, unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Engelhard durchgeführt.

Name, Vorname

Matr.-Nr.

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Masterarbeit mit dem Titel: „Einbau von Rezeptoren in Membran-Nanodisks“ selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift

1 Inhaltsverzeichnis

2	Einleitung.....	5
2.1	Theoretischer Hintergrund.....	5
2.1.1	Archaeabakterielle Rhodopsine und der Photorezeptor Komplex	5
2.1.2	Nanodisks als Modellmembran	10
2.2	Zielsetzung.....	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Chemikalien	16
3.2	Instrumentation	16
3.3	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	17
3.4	Molekularbiologische Methoden	18
3.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	18
3.4.2	Analyse von DNA-Fragmenten	18
3.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
3.4.4	Restriktion von DNA-Fragmenten	19
3.4.5	Ligation von DNA-Fragmenten	19
3.4.6	Herstellung elektro-kompetenter <i>E.coli XL1 blue</i> -Zellen.....	20
3.4.7	Transformation von Plasmiden in <i>E.coli</i> Zellen	20
3.4.8	DNA-Sequenzierung	21
3.5	Biochemische Methoden.....	21
3.5.1	Isolation polarer Lipide aus <i>Natronomonas pharaonis</i>	21
3.5.2	Expression und Aufreinigung der Membranproteine <i>NpHtrII</i> und <i>NpSRII</i>	22
3.5.3	Komplexbildung.....	24
3.5.4	Expression und Aufreinigung der Membrane Scaffold Proteine.....	24
3.5.5	TEV-Protease und Aufreinigung verdauter Proteine.....	25
3.5.6	Farbmarkierung von Proteinen über Michael Addition an Cystein Seitenketten	25
3.5.7	Nanodiskformation.....	25
3.6	Analytische Methoden	26
3.6.1	SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
3.6.2	Größenausschlußchromatographie (Gelfiltration).....	27
3.6.3	UV-VIS Spektroskopie.....	27
3.6.4	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	28
3.6.5	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS).....	29

3.6.6	Transmissionselektronenmikroskopie.....	29
3.6.7	Circulardichroismus (CD) Spektroskopie	31
3.6.8	Laserblitz-Absorptions-Spektroskopie.....	32
4	Ergebnisse und Diskussion	34
4.1	Transformation der Vektoren, Einfügen einer Punktmutation	34
4.2	Expression und Aufreinigung des Photorezeptorkomplexes	35
4.3	Expression und Aufreinigung der Membrane Scaffold Proteine.....	36
4.4	Expression, Aufreinigung, Labeling einer Cystein Mutante des MSPD1E3	39
4.5	Nanodisks	40
4.6	Einlagerung von sensorischem Rhodopsin II in Membran Nanodisks	42
4.6.1	Optimierung der Nanodiskformation mit eingelagertem SRII	42
4.6.2	Optimierung der Lipidkonzentration.....	43
4.6.3	Optimierung der Inkubationszeit	44
4.6.4	Optimierung der Stöchiometrie	45
4.6.5	Variation des Detergenz	46
4.6.6	SRII-Nanodisk Produktion für die Messung des Photozyklus.....	47
4.7	Einbau des Photorezeptorkomplexes SRII/HtrII in Membran Nanodisks.....	48
4.7.1	Optimierung der Nanodiskformation mit eingebautem Komplex	48
4.7.2	Optimierung der Stöchiometrie	49
4.7.3	Variation der Lipide	50
4.7.4	Variation des Detergenz	51
4.7.5	Verifikation der Nanodiskformation mit eingebautem Komplex.....	53
4.7.6	Optimierung der Aufreinigung: 1. Affinitätschromatografie.....	55
4.7.7	Optimierung der Aufreinigung: 2. Gelfiltration	57
4.8	Analytische Messungen an SRII- und Komplex Nanodisks	62
4.8.1	UV-Vis Spektroskopie	62
4.8.2	Laserblitz Absorptions Spektroskopie	63
5	Zusammenfassung.....	66
6	Ausblick.....	67
7	Danksagungen	68
8	Abkürzungsverzeichnis	69
9	Literaturverzeichnis.....	70

2 Einleitung

2.1 Theoretischer Hintergrund

2.1.1 Archaeabakterielle Rhodopsine und der Photorezeptor Komplex

Photoaktive Membranproteine werden in der tierischen und mikrobiellen Domäne als Lichtrezeptoren verwendet. Der erste Photosensor, das Rhodopsin, wurde um 1930 in photosensitiven Membranen in Rinderaugen charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül entscheidend für den Sehprozess bei Tieren ist. Ein halbes Jahrhundert später wurden die ersten mikrobiellen sensorischen Rhodopsine in dem Archaea *Halobacterium salinarum* entdeckt (Spudich, 2006). Archaea sind Einzeller, jedoch unterscheiden sie sich von Bakterien u. A. in der ribosomalen RNA Sequenz und im Zellwandaufbau. Außerdem sind sie meistens extremophil, das heißt sie sind an extreme Umweltbedingungen, wie hohe Temperaturen oder Salzkonzentrationen, angepasst. Die Voraussetzung um unter derartigen Bedingungen leben zu können ist die Fähigkeit Signale aus der Umgebung zu nutzen um Ionengradienten aufzubauen oder Zelluläre Signalweiterleitungen über die Membran zu aktivieren. Mittlerweile ist bekannt, dass dies durch verschiedene Photorezeptoren ermöglicht wird, das heißt, dass Lichtenergie verwendet wird (Sharma et al., 2006). Es handelt sich dabei um das Bakteriorhodopsin (BR), einer Protonenpumpe und dem Halorhodopsin (HR), einer Chlorid Ionenpumpe (Oesterhelt and Stoeckenius, 1971; Matsuno-Yagi and Mukohata, 1977). Der aufgebaute Gradient dient als Energiequelle für die ATP-Synthase. Bei weiteren Arbeiten an BR wurde ein Photosystem entdeckt, welches die Zellen vor schädlichem blauem Licht schützt. Für die so genannte Phototaxis sind die sensorischen Rhodopsine I (SRI) und II (SRII) verantwortlich (Bogomolni and Spudich, 1982; Takahashi et al., 1985). Unter Phototaxis versteht man die Bewegung von Organismen im Bezug auf die Einstrahlrichtung von Licht. Bei Archaea Bakterien wie *Natronomonas pharaonis* wird Bewegung durch Drehung der Flagellen erreicht. Ohne Lichtinduktion befinden sich die Zellen im Zustand des „Random Walk“, die Zellen wechseln ziellos immer wieder zwischen der vorwärts und rückwärts gerichteten Schwimmbewegung hin und her. Durch eine Bestrahlung mit blauem Licht erhöht sich die Wechselfrequenz der Drehrichtung der Flagellen, wodurch sich das Bakterium von der Lichtquelle entfernt (negative Phototaxis, photophob). Durch Bestrahlung mit orangenem Licht kommt es zu einer Verlangsamung der Wechselfrequenz, wodurch eine Bewegung in Richtung der Lichtquelle resultiert (positive Phototaxis, photophil). Das Bakterium wird so in den Bereich des Optimums für BR und HR Aktivität gelenkt. Das SRI des *H.salinarum* (*HsSRI*) vermittelt sowohl die photophile Antwort des Bakteriums auf orangenes Licht als

auch die photophobe Reaktion auf blaues Licht. SRII im Komplex mit HtrII vermittelt dagegen ausschließlich die photophobe Reaktion auf blaues Licht (Spudich and Bogomolni, 1984).

Das SRI und SRII bilden mit ihren halobakteriellen Transducer (HtrI bzw. II) einen Photorezeptorkomplex der ein Lichtsignal in eine Signaltransduktions-kaskade umwandelt, welche im Endeffekt zur Änderung der Flagellenrotation führt. Durch paramagnetische Elektronenspin Resonanz und Röntgenkristallografie konnte gezeigt werden, dass SRII und HtrII in Membranen einen 2:2 Komplex bilden (Wegener et al., 2001; Gordeliy et al., 2002). Die Signalkaskade ist in Abbildung 1 gezeigt.

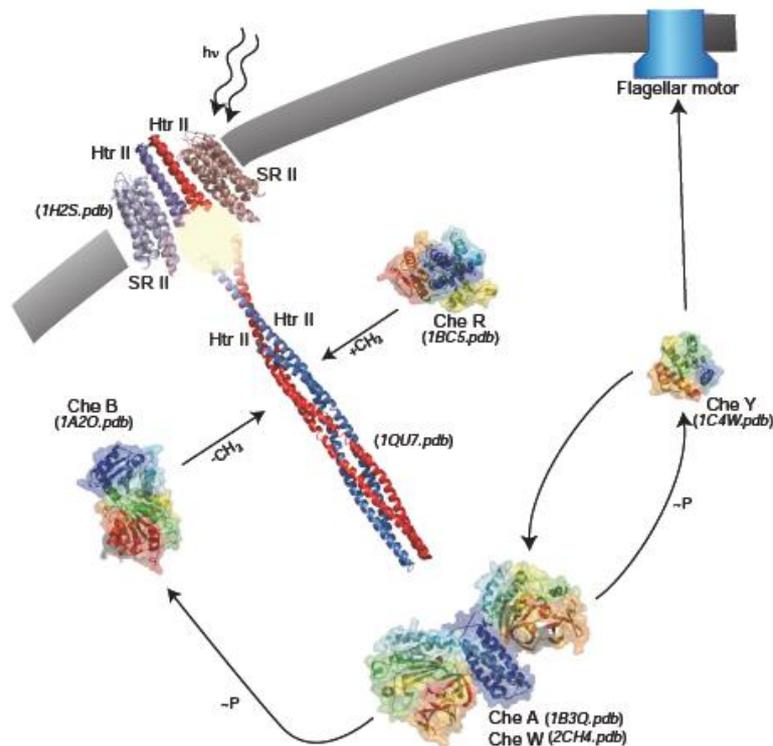


Abbildung 1: Phototaxis durch Sensorisches Rhodopsin II; durch Lichteinstrahlung wird das Signal über HtrII ins Cytoplasma geleitet, dort wird die Kinase CheA aktiviert, welche das Signal an CheB und CheY weiterleitet. CheY bewirkt am Flagellen Motor für eine Änderung der Drehrichtung, CheB ist zusammen mit CheR für die Regulation verantwortlich. (aus Dissertation M. Etzkorn)

Der Photorezeptor wird durch die Absorption von Licht aktiviert. Das Signal wird durch den Transducer an sein cytoplasmatisches Ende weitergeleitet, wo ein Zwei-Komponenten System reguliert wird (Stock et al., 2000). Der Mechanismus dieser Signalweiterleitung ist noch unklar. Im cytoplasmatischen Teil ist die Histidinkinase CheA über das Bindeprotein CheW an den Transducer Dimer gekoppelt. CheA wird durch ein Signal unter Aufwendung von ATP autophosphoryliert. Von der Kinase wird das Signal über Übertragung des Phosphates an zwei Proteine CheY und CheB weitergegeben. Phosphoryliertes CheY assoziiert mit dem Flagellar Motor und induziert die Umkehrung der Drehrichtung. Phosphoryliertes CheB sorgt zusammen mit CheR für die Adaption der Zelle. CheB-PO₄

sorgt für die Demethylierung des Transducers, die Methylierung wird konstitutiv von CheR durchgeführt, das heißt der Methylierungsgrad wird allein durch die Demethylierung bestimmt. Die Adaptation wird über eine negative Rückkopplung erreicht, indem die Demethylierung von CheB zu einer Herabsetzung der Autophosphorylierungs-Aktivität von CheA führt, während die Erhöhung des Methylierungsgrades die Autophosphorylierungs-Aktivität verstärkt. CheY wird autodephosphoryliert um den Ausgangszustand wieder herzustellen. Der Mechanismus verläuft analog zu der Chemotaxis-Signalübertragung bei *E.coli*, z.B. durch den Asparatrezeptor Tar.

Die erste Struktur eines archaeabakteriellen Rhodopsins, des BR (Purpurmembran) wurde 1975 mit Elektronenmikroskopie untersucht und beschrieben (Henderson et al.). Deutlich später wurden die Strukturen des monomeren SRII (Luecke et al., 2001), sowie im Komplex mit einem verkürzten Transducer (Gordeliy et al. 2002) über Röntgenkristallographie aufgeklärt. Die Struktur der cytoplasmatischen Domäne des *E.coli* Serinrezeptors Tsr, welche homolog zu HtrII und Tar ist, wurde von Kim et al. im Jahr 1999 veröffentlicht., die Kristallstruktur des HR wurde im Jahr 2000 gelöst (Kolbe et al., 2000). Die Modellschemen der archaealen Rhodopsine sind in Abbildung 2 gezeigt.

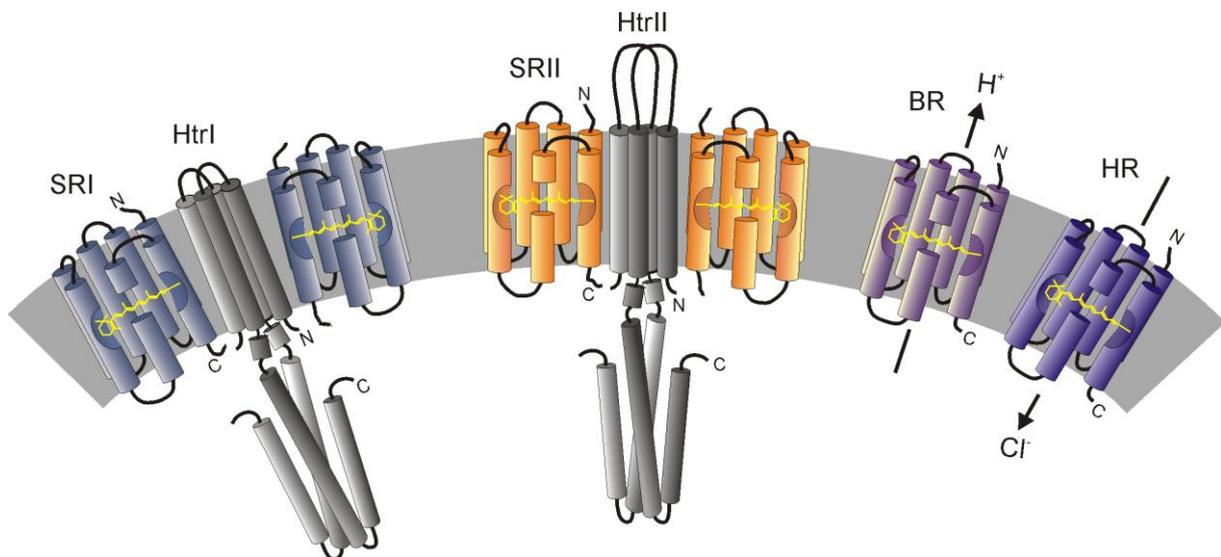


Abbildung 2: Modellschemen der Archaeabakteriellen Rhodopsine nach Klare 2003. Die sensorischen Rhodopsine sind als 2:2 Komplex mit ihren Transducern dargestellt (Wegener et al. 2001, Gordeliy et al. 2002, Chen und Spudich 2002). Es handelt sich um sieben transmembran Helix Rezeptoren, die ein Retinal-Chromophor gebunden haben.

Alle Rhodopsine zeigen eine homologe Struktur. Sie bestehen aus sieben transmembranen Helices (A-G) die jeweils durch eine kurze Loop Region miteinander verbunden sind. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit haben die sensorischen Rhodopsine im Vergleich zu den Ionenpumpen BR und HR nur eine Aminosäure Sequenz Übereinstimmung von 25%, wodurch der funktionelle Unterschied erreicht werden kann. Durch Rasterkraftmikroskopie an

einzelnen Molekülen konnten Cisneros et al. zeigen, dass die Bindung des Transducers durch das SRII die Interaktion von Helix F und G verstärkt und es zu einer Weiterleitung des Signals kommt anstatt als Ionenpumpe zu agieren wie z.B. das BR. Die Positionen der Helices unterscheiden sich zu denen des Rinderrhodopsins, trotzdem gibt es einige strukturelle und mechanistische Homologien zum menschlichen Sehpigment. Die sieben transmembranen Helices formen eine Bindungstasche für einen Retinal - Chromophor (Vitamin A - Aldehyd), welcher über eine protonierte Schiff'sche Base kovalent an einen ϵ -Amino Gruppe eines konservierten Lysin Restes in der Mitte der Helix G gebunden ist.

Die photochemische Reaktion der sensorischen Rhodopsine wird durch die Photoisomerisierung des Retinals von der all- trans zur 13-cis Konformation ausgelöst. Das Protein durchläuft daraufhin einen Photozyklus, wobei das Protein eine Reihe spektroskopisch nachweisbare Intermediate, die als K, L, M, N und O Zustand bezeichnet werden, passiert (Chizhov et al., 1998). Von den Intermediaten K und M konnten Kristallstrukturen vermessen werden. Eine spektroskopisch nicht nachweisbare irreversible Reaktion findet nach dem M Zustand statt, dabei wird ein sog. Später M Zustand eingenommen, welcher als Signalzustand identifiziert wurde (Moukhametzianov et al., 2006). Durch Konformationsänderung der Helices F und G des SRII erfolgt der Signaltransfer auf das HtrII. Die Helix F macht eine Auswärtsbewegung (Klare et al., 2004). Der Transducer antwortet auf die Aktivierung des Rezeptors mit der Drehung einer transmembranen Helix (TM2) um 15° (Wegener et al. 2001).

Das Transducer Protein aus *N.pharaonis* besteht aus 534 Aminosäuren. Die Aminosäuren 23–81 bilden den transmembranen Bereich, welcher aus zwei Helices TM1 und TM2 besteht. Im Gegensatz zu den strukturverwandten bakteriellen Chemorezeptoren Tar oder Tsr besitzt HtrII keine extrazelluläre ligandenbindende Domäne. Die vollständige Struktur ist noch nicht gelöst. Für die Linkerdomäne zwischen Membrandomäne und cytoplasmatischer Domäne, der sog. HAMP Domäne (konserviert in Histidinkinasen, Adenylylcyclasen, Methylakzeptierenden Chemotaxis Proteinen und Phosphatasen) existiert keine Kristallstruktur, da Sie sehr flexibel ist. Sie verbinden den Signaleingang mit dem Signalausgang. Einen ersten Durchbruch zum Mechanismus der Signalweiterleitung brachte die Auflösung der NMR Struktur der HAMP Domäne aus *Archaeoglobus fulgidus* die eine homodimere, 4 Helix coiled coil Struktur mit einer ungewöhnlichen interhelikalen Packung zeigte (Hulko et al., 2006). Durch paramagnetische Elektronenspin Resonanz Messung konnte gezeigt werden, dass die HAMP Domäne des HtrII in einem hoch dynamischen (dHAMP) oder einem kompakten Zustand (cHAMP) vorliegen kann (Doebber et al., 2008). Abbildung 3 zeigt die zwei vermuteten Zustandsmodelle. Die strukturellen Eigenschaften sind im Einklang mit dem „4 Helix coiled coil“ Modell nach Kim.

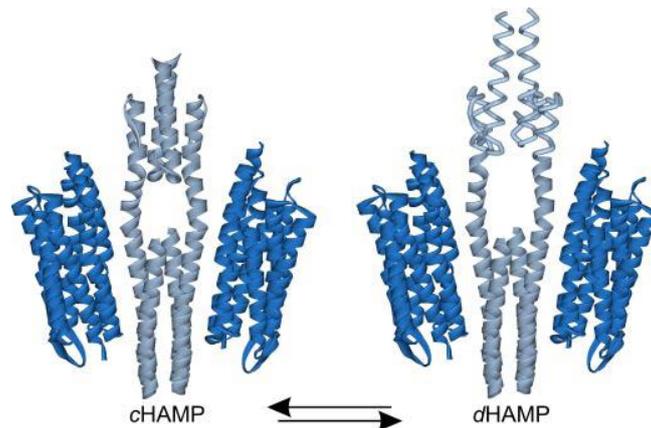


Abbildung 3: Konformationsmodelle der kompakten und der dynamischen HAMP Domäne (Doebber et al. 2008)

Die Kristallstruktur des *E.coli* Serinrezeptors, einem Homologen des HtrII, zeigte, dass die cytoplasmatischen Enden eine Trimer von Dimer Struktur ausbilden können. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise eine Trimerstruktur für die Kinaseaktivierung und damit die Signalweiterleitung erforderlich ist (Kim et al., 1999). Khursigara et al. zeigten 2008 durch Kryo-Elektronen-Tomographie ein Modell des Tsr welches die Trimer von Dimer Struktur bestätigt. Außerdem wird ein Zwei-Zustände Modell für die HAMP Domänen der Trimer Formation vorgeschlagen. Danach liegen die Trimeren Chemorezeptoren in einem Gleichgewicht zwischen zwei Konformationen vor, entweder kompakt oder ausgeweitet. Durch Ligandenbindung wird das Gleichgewicht zur geweiteten Struktur verschoben, da durch Serinbindung die CheA Aktivität abnimmt wird die geweitete Struktur als „Kinase-Off“ bezeichnet. Eine Zunahme der Methylierung des Rezeptors verschiebt das Gleichgewicht zur kompakten Konformation, dem „Kinase-On“ Zustand (Khursigara et al., 2008). Dieses Modell bestätigt die Annahmen über die Dynamik der HAMP Domäne und zeigt Übereinstimmung mit den Modellen zur HtrII HAMP Domäne.

Trotzdem ist der Mechanismus der Signaltransduktion noch nicht vollständig aufgeklärt. Zukünftige NMR und EPR Messungen könnten die funktionellen und molekularen Details der HAMP Domäne sowie der Signalübertragung vom SRII zum HtrII aufdecken. Dies ist auch von allgemeinem Interesse, da es ein gut charakterisiertes Beispiel von Membran Protein-Protein Wechselwirkungen ist.

Generell ist die biophysikalische und strukturelle Charakterisierung von Membran Proteinen aufgrund ihrer geringen Löslichkeit in wässrigen Puffern problematisch, da sie zur schnellen Aggregation oder Oligomerisierung neigen. Um die Proteine nativ in Lösung zu halten bedient man sich der Eigenschaften von verschiedenen Modellmembranen (Seddon et al., 2004). Dazu zählen zum einen Liposomen. Hierbei handelt es sich um Vesikel aus einer amphiphilen Lipid Doppelschicht. Es ist möglich multilamellare (MLVs), große (LUVs) oder

kleine unilamellare Vesikel herzustellen (SUVs). Die Vesikeln Größenverteilung ist mit dynamischer Lichtstreuung und Extrusion kontrollierbar, sie sind aber temperatursensitiv und neigen zu Instabilität. Eine weitere Möglichkeit sind Detergenzien stabilisierte Mizellen. Diese haben allerdings den großen Nachteil, dass es sich nicht um Membran Doppelschichten handelt. Das heißt es wird keine native Umgebung generiert und es ist unklar in wie weit Studien an Membranproteinen in Mizellen aussagekräftig sind. Eine andere vielversprechende Modellmembran sind Lipiddoppelschichten die durch Polyethylenglykol stabilisiert werden (Edwards et al., 1997). Diese sind gut reproduzierbar und bieten definierte Lipiddoppelschichten. Leider zeigt dieses System oft eine Polydispersität.

2.1.2 Nanodisks als Modellmembran

Phospholipiddoppelschicht Nanodisks bilden eine vielversprechende Modellmembran für die Studie von Membranproteinen unter nativen Bedingungen. Die Nanodisks bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, welche von einem Protein Mantel von definierter Größe umgeben ist (Bayburt et al., 2002). Ein Nanodisk Modell ist in Abbildung 4 abgebildet.

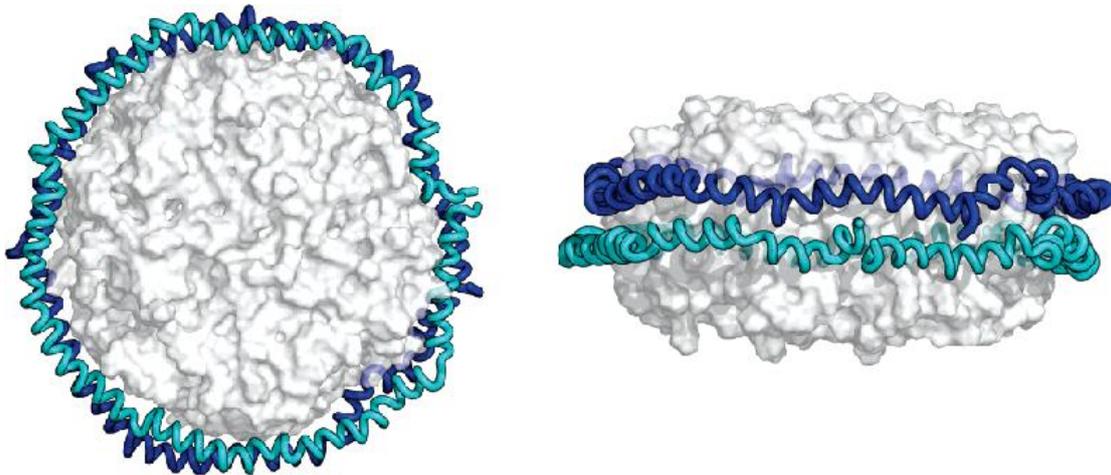


Abbildung 4: Phospholipidnanodisks, Ansicht von oben und parallel zur Lipidschicht. Zwei Proteinmonomere bilden einen Mantel der die definierte Größe einhält (Nath et al., 2007)

Durch den Proteinring wird Monodispersität und Stabilität gewährleistet. Die sogenannten Membrane Scaffold Proteine (MSP) die den Mantel bilden sind Derivate des humanen Apolipoprotein A1. Die Hauptaufgabe des ApoA1 *in vivo* ist der Transport von Cholesterin aus Gewebezellen des Körpers zurück in die Leber. Dieser Transportmechanismus ist in Abbildung 5 dargestellt. Zwei ApoA1 Monomere binden Serum - Phospholipide und bilden ein diskförmiges „High Density Lipoprotein“ (HDL). Diese interagieren mit dem Transporterprotein ABC1A woraufhin Cholesterin aus der Zellmembran in die

Apolipoproteine transferiert wird. Cholesterin wird für den Einbau mit einem Lecithin verestert. Mit zunehmender Aufnahme wachsen die Partikel zu kugelförmigen HDLs welche dann zur Leber transportiert werden.

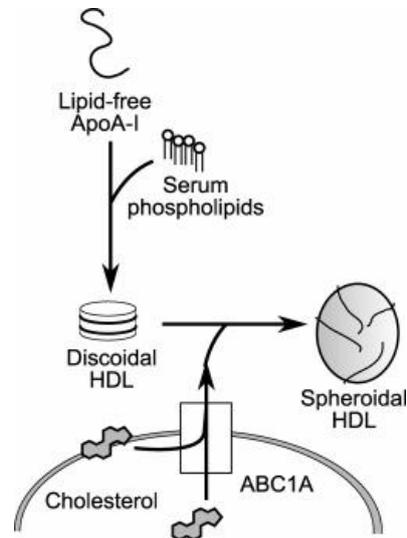


Abbildung 5: Physiologische Rolle des ApoA1 im reversen Cholesterin Transport. ApoA1 bildet mit Serum Phospholipiden diskförmige HDLs in die Cholesterin eingelagert und zur Leber transportiert wird (Nath et al. 2007).

ApoA1 besteht aus 243 Aminosäuren und besitzt eine große N-terminale α -helicale Domäne. Es existieren zwei Kristallstrukturen von ApoA1. Bei der ersten Struktur handelt es sich um das volllängige ApoA1, welches einen α -helicalen Anteil von 80% aufweist. Eine verkürzte Variante ohne N-terminale Domäne weist zu 85% α -helicale Anteile auf. Die Helices bilden einen zylindrischen Gürtel. Während dieser Arbeit wird das verkürzte ApoA1 verwendet, da der N-Terminus keinen Einfluss auf die Nanodiskformation hat. Das Protein wird im Folgenden als MSP bezeichnet. Denisov et al. präsentierten 2004 vergrößerte Konstrukte die auch zur Nanodiskformation geeignet sind. Diese sind in Abbildung 6 dargestellt. Es wurden verschiedene Konstrukte erstellt die jeweils um 22 Aminosäuren verlängert sind, welche den Aminosäuren 56-121 des MSP entsprechen. Es handelt sich um eine Insertion an Position 56 des MSP. Für diese Arbeit ist das Konstrukt MSPD1E3 von Bedeutung, da es besonders große Nanodisks ausbildet und somit mehr Protein eingelagert werden kann. Die Konstrukte wurden mit Gelfiltration und SAXS charakterisiert. Gebildete Nanodisks mit MSP und MSPD1E3 haben einen Stokes Durchmesser von 9,7 bzw. 12 nm. Außerdem werden die MSP Proteine mit His-Tag und einer Protease Schnittstelle exprimiert.

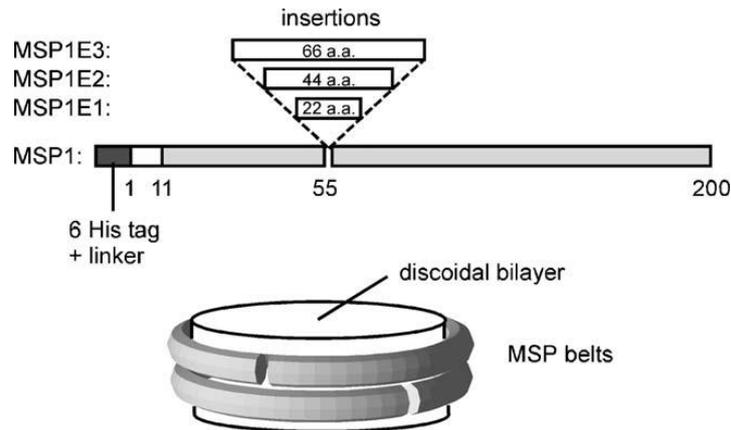


Abbildung 6: Nanodisk Konstrukte: Der Radius der Nanodisks wird vergrößert indem eine oder mehrere zusätzliche Helices in das MSP eingebaut werden (Denisov et al., 2004).

Nanodisks werden gebildet, indem reines MSP mit Detergenz stabilisierten Phospholipiden in einem bestimmten Verhältnis gemischt werden. Wenn man die Detergenzien dann entzieht findet eine freiwillige Zusammenlagerung statt. Aufgrund der ähnlichen Steroidstruktur wie Cholesterin, dem natürlichen Substrat wird meistens Natriumcholat als Detergenz verwendet. Außerdem werden hydrophobe Bio-Beads SM2 (Biorad) oder eine Dialyse genutzt um Detergenzien zu adsorbieren. Membranproteine werden durch eine Einlagerung in Nanodisks gelöst, monomerisiert und befinden sich in einer definierten Umgebung. Um eine Einlagerung zu erreichen wird das Protein in Puffer mit einem passenden Detergenz aufgenommen und mit MSP und Lipiden versetzt. Durch Adsorption der Detergenzien werden die Membranproteine in Nanodisks eingebaut.

Einige verschiedene Membranproteine konnten schon in Nanodisks eingelagert werden. Darunter auch die 7 Transmembranproteine Rhodopsin (Rind), Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* und die *E.coli* Chemotaxisproteine Tar und Tsr. Rhodopsin wurde als Monomer und als Dimer in Nanodisks eingebaut. Es konnte gezeigt werden, dass Transducin vom Rhodopsinmonomer aktiviert wird. Im Falle des Dimers wird nur eines der zwei Moleküle aktiviert. Dies gibt einen Hinweis auf Rezeptor-G-Protein Stöchiometrien und die Signalweiterleitung (Bayburt et al., 2007). Auch die Protonenpumpe des *H. salinarum* Bakteriorhodopsin konnte als Monomer in Nanodisks eingebaut werden. Dazu wurde ein 10-facher molarer Überschuss MSP eingesetzt. Die strukturelle Homogenität und Stabilität wurde mittels Größenausschlusschromatographie, Rasterkraftmikroskopie, Elektronenmikroskopie und zirkularem Dichroismus analysiert. Das BR blieb durch den Einbau in Nanodisks voll funktionsfähig (Bayburt and Sligar, 2003). In einer weiteren Studie wurden BR Trimere in Nanodisks eingebaut, es wurden die molaren Verhältnisse MSP/BR von 2:3 eingesetzt. Aufgrund der größeren Proteinmenge die eingelagert werden sollte, war eines der vergrößerten MSPs erforderlich. Es konnte das charakteristische CD Spektrum im sichtbaren Bereich von BR Trimeren nachgewiesen werden. Dieses zeigt ein Maximum bei

520 nm und ein Minimum bei 593 nm (Bayburt et al., 2006). Cappuccio et al. stellten eine zellfreie Methode zur Herstellung von BR - Nanodisks vor (Cappuccio et al., 2008).

Des Weiteren wurden bakterielle Chemorezeptoren in Nanodisks eingebaut. Diese Proteine sind in der Lage, höhere Anordnungen und Cluster zur Signalweiterleitung zu bilden (Hazelbauer et al., 2008). Um die Stöchiometrie der Proteinzusammenlagerung weiter aufzuklären, nutzten Boldog et al. Nanodisks. Mit diesem Modellsystem wollten sie zeigen welche Funktionen mit einem einzigen eingelagerten Protein Homodimer aktiv sind und wofür höhere Anordnungen erforderlich sind. Dazu wurde der Aspartat Rezeptor Tar in E.coli Lipide eingebettet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 zusammengefasst. Für die Messungen wurden unterschiedliche Präparationen von Nanodisks mit einem oder mehreren Tar Dimeren. Zwar wurden die Rezeptordimere, welche einzeln in die Nanodisks eingebaut wurden, modifiziert (Methylierung und Desaminierung) und waren in der Lage die Liganden zu binden und das Signal über die Membran weiterzuleiten, aber die Aktivierung der Kinase CheA der Chemotaxis konnte nur gemessen werden, wenn die Nanodisks mindestens 3 Tar Dimere enthielte (Boldog et al., 2006). Das zeigt, dass Trimere von Dimeren für die Chemotaxis Signalweiterleitung erforderlich sind, was mit dem Modell von Kim et al. (1999) und Khursigara et al (2008) übereinstimmt.

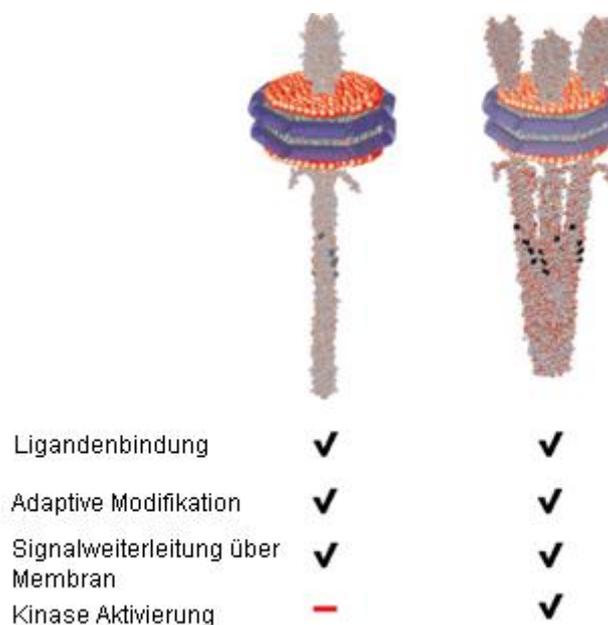


Abbildung 7: Funktionelle Aktivität der in Nanodisks eingebetten Chemorezeptoren. Die Ergebnisse für monomeren Tar Rezeptor Dimer und Trimere Dimere werden verglichen (Boldog et al. 2006).

Für die strukturelle Analyse des SRII/HtrII Komplex hat sich NMR Spektroskopie als potente Methode herausgestellt. NMR Spektroskopie an Membranproteinen gelöst in Detergenzien oder Liposomen ist wegen der Heterogenität und hohen Masse nur sehr eingeschränkt möglich. Veränderungen der Struktur sowie Instabilität bringen weitere Komplikationen. Die

Nanodisktechnologie bietet die Möglichkeit diese Hindernisse zu bewältigen, was an folgenden zwei Beispielen erläutert wird. Durch Festkörper NMR an in Nanodisks eingebauten CYPs konnten strukturelle Informationen erhalten werden. Im Vergleich zur Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass eine korrekte Faltung und Funktionalität vorliegt (Kijac et al., 2007). Das Membran assoziierte Protein Antiamoebin I besitzt antibiotische Aktivität. Durch Nanodisk Bindung und NMR Analyse konnte die räumliche Struktur des Proteins in Membranen ermittelt werden (Lyukmanova et al., 2008)

2.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist der Einbau des Photorezeptorkomplexes, Sensorisches Rhodopsin II (SRII) mit dem zugehörigen Transducer Protein (HtrII), aus *Natronomonas pharaonis* in Membran - Nanodisks. Unter Membran - Nanodisks versteht man eine Modellmembran, die im Vergleich zu verwendeten Membranen wie Liposomen oder Mizellen Vorteile bietet. Diese sind Monodispersität und Stabilität, sowie die Möglichkeit eine kontrollierte Stöchiometrie eingelagerter Membranproteine zu erreichen. Durch die Einlagerung in Nanodisks erhält man lösliche Membranproteine in einer Phospholipid Doppelschicht die durch einen Proteinmantel von definierter Größe und Form umrandet wird. Ein großes Augenmerk beim Einbau des Photorezeptors soll auf die Stöchiometrie gelegt werden. Für die bakteriellen Chemorezeptoren ist bekannt, dass die Signaltransduktion durch Trimere von Dimeren ausgelöst wird. Da das HtrII ein Struktur - Homologon der Chemorezeptoren ist soll die Gültigkeit dieser Theorie auch für den Transducer geprüft werden. Außerdem soll die Modellmembran für die aktuellen Forschungsschwerpunkte am Photorezeptorkomplex verfügbar gemacht werden. Dies sind die Signalübertragung vom SRII zum Transducer Molekül, sowie die darauf folgende Signalweiterleitung über den Transducer ins Cytoplasma. Es handelt sich dabei um ein repräsentatives Beispiel für Protein-Protein Wechselwirkungen innerhalb der Membran. Außerdem wird intensiv an Struktur und Funktion der sog. HAMP - Domäne gearbeitet, der Linkerregion zwischen Membran und cytoplasmatischer Region. Dafür werden biophysikalische Methoden wie Paramagnetische Elektronenspin Resonanz, Fourier Transformation Infrarot Spektroskopie oder Kernspinresonanz angewandt. Für diese Methoden ist eine native Umgebung der Membranproteine und die Möglichkeit Messungen an definierten Molekülmengen durchzuführen ein potentieller Fortschritt.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammen, wenn nicht gesondert erwähnt, von den Firmen Sigma-Aldrich (Heidenheim), Baker (Groß-Gerau), Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm), Gibco-BRL (Neu Isenburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg). Molekularbiologische Reagenzien werden von den Firmen Boehringer (Mannheim), New England Biolabs (NEB, Schwalbach) und Pharmacia (Freiburg) bezogen. Die Polymerase-Kettenreaktionen werden mit Taq Polymerase von Quiagen (Hilden) durchgeführt. DNA-Ligationen erfolgen mit der T4 DNA Ligase von Gibco BRL (Neu Isenburg). Zur Isolierung von Plasmid-DNA sowie PCR-Fragmenten finden Kits der Firma Qiagen (Hilden) Verwendung. Antibiotika für die Zellanzucht sowie das für die Expression des *NpSRII* verwendete all-trans Retinal sind Produkte der Firma Sigma-Aldrich. Nährmedien (Trypton 140 und Hefeextrakt) für die Zellanzucht werden von der Firma BD (Heidelberg) bezogen. Für die Isolierung der His-Tag-Proteine wird Ni-NTA-Superflow der Firma Qiagen verwendet. Der verwendete Protein-Molekulargewichtsmarker stammt von der Firma Pharmacia. Das Alexa Farbstoff wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

3.2 Instrumentation

Die Inkubation der *E. coli* Zellen erfolgt in einem Schüttler der Firma New Brunswick (Nürtingen) unter aeroben Bedingungen. Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen wird durch Elektroporation mittels eines GenePulsers der Firma BioRad (München) in Elektroporationsküvetten der Firma Invitrogen (Leek) durchgeführt. Sedimentationen werden in der Zentrifuge L80XP der Firma Beckmann Coulter (Krefeld) in den Rotoren Ti-70 und Ti-45 durchgeführt. Zellaufschlüsse werden mit einem Microfluidizer M-110S der Firma Microfluidics Corp. (Newton) durchgeführt. Polymerase-Kettenreaktionen werden in den Thermocyclern PCR-Express und PCR-Sprint der Firma Hybaid (Heidelberg) durchgeführt. DNA-Sequenzierungen werden mit dem Sequenzierungsgerät 373 von Applied Biosystems durchgeführt. UV/VIS-Spektren werden mit den Spektrometern UV-2401 der Firma Shimadzu (Duisburg) oder Nanodrop der Firma Thermo Scientific (Wilmington) gemessen. Agarose Gelelektrophoresen erfolgen mit Sub Cell GT Kammern, Polyacrylamid-Gelelektrophoresen erfolgen mit dem Mini-PROTEAN II-System der Firma Biorad. Als Stromquelle dienen PowerpacHC Geräte. Gelfiltration wird mit Säulen Superdex 75, Superdex 200 oder Superose 6 an Äkta Purifier Geräten der Firma GE Healthcare (München) durchgeführt. Dynamische Lichtstreuung wird mit Geräten des Types DynaPro Titan der Firma Wyatt

Technologies (Dernbach) gemessen. Elektrospray Massenspektrometrie wird mit Finnigan LCQ Advantage Max der Firma Thermo Scientific gemessen, vorhergehende Chromatographie erfolgt durch ein System der 1100 Serie der Firma Agilent (Böblingen).

3.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Bakterienstämme:

E. coli XL-1-Blue: F⁻Tn 10 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1 and A1 gyrA96(Nal^r) Thi hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 lac

E. coli BL21(DE3): F⁻ ompT [lon] hsdS_B (r_B⁻m_B⁺) λ(DE3)

Plasmide:

pET-28a(+), pET-27b Novagen
 pET-28a(+)-Tev-MSP1 zur Verfügung gestellt von Oliver Ernst (Charité Berlin)
 pET-28a(+)-Tev-MSPD1E3 zur Verfügung gestellt von Oliver Ernst (Charité Berlin)
 pET27bmod-N_{psrII}-His zur Verfügung gestellt von AG Engelhard
 pTrc-N_{pHtrII}wt zur Verfügung gestellt von AG Engelhard

Oligonukleotide:

Beim Design der Primer muss die Schmelztemperatur berücksichtigt werden. Sie berechnet

$$\text{sich nach: } T_m = 4^{\circ}\text{C} \cdot \sum(n_G + n_C) + 2^{\circ}\text{C} \cdot \sum(n_A + n_T) \quad (1)$$

Die Schmelztemperatur ist wichtig für die erfolgreiche Durchführung der PCR.

Verwendete Matrize: pET-28a(+)-Tev-MSPD1E3

Zur Mutation mittels der Overlapping PCR Methode wurden folgende Primer verwendet:

Tabelle 1: Basensequenzen der eingesetzten Primer

Schnittstelle	Mutation	Sequenz 5' – 3'	T _m (°C)
XbaI	-	GCG AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA	58
StuI	-	TTC ACC TCT TCC AGA TCT TTG C	60
-	S18C	ATT TTC AGG GCT GCA CCT TTA GC	63
-	S18C	GCT AAA GGT GCA GCC CTG AAA AT	63

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt mittels alkalischer Lyse von *E.coli* Zellen nach Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979). Die Enterobakterien werden mit Hilfe von SDS lysiert und die DNA mit Natriumhydroxid denaturiert. Das Lysat wird mit Kaliumacetatpuffer neutralisiert. Dabei fallen denaturierte Proteine und chromosomale DNA mit dem Kaliumsalz des Dodecylsulfats aus. Die niedermolekularen Plasmide bleiben in Lösungen und renaturieren in den neutralen Bedingungen. Die unlöslichen Bestandteile werden abzentrifugiert und die Plasmid-DNA kann aus dem Überstand isoliert werden. Hierzu wird eine Anionenaustauscher-Chromatographie-Säule der Firma Quiagen (Hilden, Qia-Tip-100) verwendet. Die negativ geladene DNA bindet dabei an das protonierte DEAE Säulenmaterial und kann mit steigender Salzkonzentration eluiert werden.

3.4.2 Analyse von DNA-Fragmenten

Zur Analyse und Aufreinigung von DNA-Fragmenten wird horizontale Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Agarose ist ein Polysaccharid das aus roten Meeresalgen gewonnen wird. Es wird durch Aufkochen in Wasser gelöst und geliert beim abkühlen. Dabei bilden sich relativ große Poren bei hoher Stabilität des Gels. Bei der Agarose Gelelektrophorese werden DNA Moleküle nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Verwendet werden dabei 1%ige Agarosegele in TBE-Puffer (89 mM TRIS, 89 mM Borsäure, 0,9 mM EDTA, pH=8,9) und 3x Probenpuffer (TBE-Puffer, 10% Ficoll, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylencyanol). Die Anfärbung der Probenbanden erfolgt mit Hilfe des Interkalators Ethidiumbromid (0,6mg/l). Zur Aufreinigung können DNA-Banden der gewünschten Größe aus dem Gel ausgeschnitten und aufgearbeitet werden.

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR ist ein System für die exponentielle Vervielfältigung kurzer DNA Stränge. Das für die Klonierung erforderliche Oligonukleotid wird mittels PCR nach Mullis und Faloona (1987) von einer Matrize amplifiziert (Mullis and Faloona, 1987). Dazu werden 50µl-Ansätze der folgenden Zusammensetzung verwendet: 5-20 ng DNA Matrize, 25 pmol der erforderlichen Primer, 10 nmol dNTP-Mix, 0,5 µl Pfu-Polymerase (entspricht 1U), 5 µl 10 x Polymerase Puffer. Es wird die sog. „Hot-Start“ Methode angewandt, wobei vor Zugabe der Polymerase

die Proben einem fünfminütigen Denaturierungsschritt und sofortigem Abkühlen auf Eis unterzogen werden. Die Amplifikation erfolgt nach dem Standard Protokoll.

Die ortsspezifische Punktmutation erfolgt über „Overlap Extension“ (Ho et al., 1989). Dabei werden in zwei PCR Ansätzen durch Einsatz von mutierten Primern die jeweiligen Sequenzen für die entsprechende Aminosäuren (hier: Ser → Cys) verändert, wobei die ursprüngliche Matrize in zwei Oligos (hier jeweils 130 Bp) geteilt wird, um in einem dritten Schritt zu dem gewünschten mutierten Oligonucleotid (260 Bp) zusammengeführt zu werden. Die Aufarbeitung von PCR-Fragmenten wird mit PCR-Purifikation-Kits der Firma Quiagen durchgeführt. Dies erfolgt analog zu Abschnitt 3.4.1. Das aufgereinigte Oligonucleotid wird dann wiederum in den Vektor kloniert.

3.4.4 Restriktion von DNA-Fragmenten

Die Restriktion, das „Schneiden“, von DNA-Doppelsträngen erfolgt mit Hilfe von Restriktionsenzymen durch Inkubation bei 37°C. Verschiedene Restriktionsenzyme schneiden DNA-Doppelstränge an spezifischen Sequenzen, welche meistens palindromisch sind. Dabei können glatte Enden oder „sticky ends“ entstehen. Die Menge des eingesetzten Enzyms ist abhängig von der eingesetzten Menge DNA. Die Wahl des Puffers erfolgt nach Angaben des Herstellers.

3.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Der Einsatz von T4-DNA-Ligase bewirkt die Ligation verschiedener DNA-Fragmente. Die DNA-Stränge müssen dafür mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut werden, damit die endständigen Basen kompatibel sind. Die Ligation des Vektors geschieht mit einem Überschuss des DNA-Fragments aus der PCR, welches kloniert werden soll. Es wird in der Regel 100ng Vektor eingesetzt. Die Menge des nötigen PCR-Fragments berechnet sich nach:

$$x(\text{ng})\text{Fragment} = \frac{\text{ng}(\text{Vektor})}{\text{Bp}(\text{Vektor})} \times 3 \times \text{Bp}(\text{Fragment}) \quad (2)$$

Die Reaktion mit 1U Enzym läuft in 4 µl (bei 20µl Ansatz) Ligase Puffer (50mM Tris/HCl, 10mMMgCl₂, 1mM ATP, 1mM DTT, 5%(w/v) PEG 8000, pH=7,6) 5-10 Stunden bei RT. Die Reaktion kann durch Erhitzen auf 65°C gestoppt werden, die Ligase wird dadurch deaktiviert.

3.4.6 Herstellung elektro-kompetenter *E.coli XL1 blue*-Zellen

Am ersten Tag werden Zellen aus eine vorhandenen Glycerinstep auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am zweiten Tag wird aus einer Reinkultur eine erste Vorkultur (V=1ml) angeimpft. Nach ca. 7 Stunden wird damit die 2. Vorkultur von 100 ml LB Medium beimpft, welche wiederum über Nacht wächst. Am dritten Tag wird die Hauptkultur (V=2L) auf eine OD von 0,06 angeimpft und bis zur exponentiellen Phase (OD ≈ 0,5) wachsen gelassen. Danach werden die Zellen durch Zentrifugation (5000 rpm, 15 min) geerntet. Die Zellen werden in 800 ml 5% Glycerin aufgenommen und erneut zentrifugiert. Diese Schritte werden mit 600, 400 und 50 ml Glycerin wiederholt. Anschließend werden die Zellen in einem Mindestvolumen (ca. 4ml) 10% Glycerin aufgenommen. Die Suspension wird in 80µl Portionen in Eppendorf Gefäßen bei -80°C eingefroren.

Die Transformationseffizienz wird über Transformation eines Vektors in die neuen kompetenten Zellen und Ausstrich von 1; 0,1; und 0,01 % Kultur auf LB-Platten. Die Transformationsrate berechnet sich dann nach folgender Formel:

$$\frac{KBE * \frac{100}{x\%}}{y(ng)} = z \text{ pro ng} * 1000 = z \text{ pro } \mu\text{g} \quad (3)$$

x = ausplattierte Zellsuspension; y = ng transformierte DNA

z = Anzahl der transformierten Zellen; KBE = koloniebildende Einheiten

3.4.7 Transformation von Plasmiden in *E.coli* Zellen

Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E.coli* Zellen erfolgt mittels Elektroporation. Bei der Elektroporation werden suspendierte Zellen in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen Pulsen hoher Stromstärke ausgesetzt. Die Zellmembran wird dabei kurzzeitig porös und die DNA kann in die Zelle gelangen. Es werden 10 µl des Restriktionsansatzes 1:2 mit Wasser verdünnt, mit 70-90µl *E.coli XL1 Blue*-Suspension vermischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Transformation wird in einer speziellen Apparatur der Firma BioRad durchgeführt. Die Zellen werden unmittelbar nach dem Puls in 1ml LB-Medium geben und 1h bei 37°C unter Schütteln (130rpm) inkubiert und danach auf Antibiotika haltigen Agar-Platten ausplattiert. Bei Wachstum ist die Transformation erfolgreich, dies ist mit Vergleich einer Probe reiner Zellen zu kontrollieren.

3.4.8 DNA-Sequenzierung

Um sicherzugehen, dass die Klonierung erfolgreich verlaufen ist, und das Fragment an der richtigen Stelle eingesetzt wurde, kann man Plasmide sequenzieren. Bei der DNA-Sequenzierung nach Sanger werden fluoreszenz-markierte dNTPs in einer PCR eingesetzt (Sanger et al., 1977). In 20 µl Reaktionsansatz werden 200-1000 ng Plasmid DNA, 6 µl Big-Dye-Terminator-Mix (Applied Biosystems), 10 pmol Primer-Oligonukleotid und 2 µl DMSO gemischt und eine PCR mit folgendem Zyklus durchgeführt: 96°C (10s) – 55°C (5s) – 60°C (360s). Danach wird das Produkt mit Ethanol gefällt, gewaschen und das Pellet anschließend getrocknet. Die Analyse der Reaktionsprodukte wird am DNA-Sequencer Model 373 (ABI) durchgeführt.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Isolation polarer Lipide aus *Natronomonas pharaonis*

Für die Zellanzucht wird folgendes Synthetische Medium benutzt.

Tabelle 2: Synthetisches Medium zum Wachstum von *N.pharaonis*

Salz	Konzentration	Salz	Konzentration
NaCl	3.4 M	Natriumacetat	20 mM
Na ₂ CO ₃	175 mM	ZnSO ₄ x7H ₂ O	3 µM
KCl	27 mM	CaCl ₂ x2H ₂ O	3 µM
MgSO ₄ x7H ₂ O	1 mM	MgCl ₂ x4H ₂ O	4 µM
Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O	2 mM	CuSO ₄ x5H ₂ O	4 µM
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	2 mM	FeSO ₄ x7H ₂ O	5 µM
NH ₄ Cl	12 mM	pH = 9.2	

Es werden 5L Medium hergestellt und über einen Faltenfilter zu je 1L in 2L Erlenmeyerkolben aufgeteilt. Diese werden daraufhin mit jeweils 50 ml Vorkultur aus einem früheren Ansatz beimpft. Die Kultur wird etwa 8-10 Tage bei 40°C, 120 rpm und Licht Bestrahlung geschüttelt bis sich eine maximale OD von etwa 0.7 eingestellt hat. Die Zellen werden durch Zentrifugation geerntet und einmal mit Basalsalz gewaschen.

Basalsalz: 250 g/l NaCl; 20 g/l MgSO₄x7H₂O; 3 g/l Natriumcitrat; 2 g/l KCl

Die Zellen werden mit Basalsalz resuspendiert, mit 15 mg DNase versetzt und bei 4°C über Nacht gegen 5L entsalztes Wasser dialysiert. Das Dialysat wird für 20 min bei 45000 rpm Zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Das Pellet wird 2x mit Wasser gewaschen, in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Die getrocknete Probe wird in einen Teebeutel gefüllt und in einem farbigen 2L Rundkolben über Nacht mit 400ml eines Gemisches aus Chloroform und Methanol (1:1) unter Argonatmosphäre extrahiert. Das Lösungsmittelgemisch wird im Rotationsverdampfer komplett eingeeengt. Der Rückstand wird in sehr wenig MeOH/CHCl₃ gelöst. Die Lipide werden über Kieselgelchromatographie aufgereinigt. Dafür werden folgende Laufmittel verwendet:

- Laufmittel 1: Diethylether / Petrolether 85:15
- Laufmittel 2: Chloroform / Ethanol 2:1 / 1% H₂O / 1% Ameisensäure
- Laufmittel 3: Chloroform / Ethanol 1:1 / 10% H₂O / 10% Ameisensäure

Die Kieselgel wird mit Laufmittel 1 aufgeschlemmt und die Säule gepackt. Dann wird die Probe auf die Säule gegeben und mit Seesand überschichtet. Die Säule wird als erstes gründlich mit Laufmittel 1 gewaschen um unpolare Fraktionen zu eluieren. Der Durchfluss wird verworfen und das Laufmittel zu 2 gewechselt. Nachdem das β -Karotin von der Säule gekommen ist wird abermals das Laufmittel gewechselt. Mit Laufmittel 3 lassen sich die polaren Lipide einfach von der Säule eluieren und sammeln. Es wird in fraktioniert gesammelt und die Fraktionen mit Dünnschichtchromatographie untersucht. Alle Fraktionen die Lipide enthalten werden zusammengefügt und am Rotoationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wird mit wenig MeOH/CHCl₃ aufgenommen. Zur Abtrennung mitgeführter Proteine wird bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand wieder eingeeengt. Dieser Vorgang wird sooft wiederholt, bis sich keine Proteine mehr im Ansatz befinden. Die sauberen Lipide werden in 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10% DDM, pH=7.4 gelöst.

3.5.2 Expression und Aufreinigung der Membranproteine *NpHtrII* und *NpSRII*

Zur Genexpression ist eine große Anzahl der Transformierten *E.coli* Zellen erforderlich. Das Enterobakterium *Escherichia Coli* wächst am besten bei 37 °C, 130rpm. Es wird LB Medium verwendet.

LB Medium (10g Trypton, 5g Hefe-Extrakt, 10g NaCl, 1000ml H₂O, pH=7,2)

Außerdem wird Antibiotikum zugegeben um Fremdbewuchs zu verhindern. Das Wachstum wird anhand der Messung der Optischen Dichte (OD) verfolgt ($1OD_{578} \approx 2 \times 10^8$ Zellen/ml). Aus einer Tages-Kultur von 2ml LB Medium wird eine Vorkultur von 200-400ml Medium angeimpft und über Nacht wachsen gelassen. Daraus wird die Expressionskultur (6 x 1,5l Medium in 5 Liter Schikanekolben) auf eine optische Dichte von ca. 0,1 angeimpft. Das Wachstum geschieht bei 37°C unter Schütteln (150rpm). Während der mittleren

logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{578} \approx 0,8$) wird die heterologe Expression des Zielproteins durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert.

- 1) *HtrII*: Es wird 50µg/ml Ampicilin zur Wachstumsselektion eingesetzt. Nach Induktion wird die Expressionskultur weitere vier Stunden geschüttelt
- 2) *SRII*: Es wird 50µg/ml Kanamycin zur Wachstumsselektion eingesetzt. Bei der Induktion wird zusätzlich 10µM all-trans Retinal zugegeben. Die Expressionskultur wird im Dunkeln weitere 3,5 Stunden geschüttelt.

Die Zellen werden durch Zentrifugation (5000rpm, 15 min, 4°C) geerntet und das Zellpellet mit Zellwaschpuffer (150mM NaCl, 25mM Na₂HPO₄, 2mM EDTA, pH=8) durch erneute Zentrifugation gereinigt und kann bei -20°C gelagert werden oder für die Protein Aufreinigung mit Zellwaschpuffer resuspendiert werden.

Zur Proteinisolierung werden die Zellen im Mikrofluidizer aufgeschlossen, die Zellsuspension wird in kleinen Mengen unter Druck durch zwei enge Öffnungen gepresst und durch Stöße und auftretenden Scherkräfte zerstört. Dann wird in der Ultrazentrifuge bei 45000rpm 1,5 Stunden, 4°C zentrifugiert. Dabei werden die Membranen samt den Zellresten sedimentiert. Das Cytoplasma wird abgetrennt und für eine Gelprobe aufbewahrt.

Zur Aufreinigung der Membranproteine wird immobilisierte Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie mit Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden) angewendet. Die Proteine besitzen dazu ein Poly-Histidin-Tag, was an das Nickel-Material bindet. Es werden folgende Puffer verwendet:

A_{mem}: 300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH=8, 2,00% DDM

B_{mem}: 300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH=8, 0,05% DDM

C_{mem}: 300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH=8, 0,05% DDM + 30 mM Imidazol

D_{mem}: 300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH=8, 0,05% DDM + 200 mM Imidazol

G_{mem}: 500 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH=8, 0,05% DDM

Das Zellpellet wird nach dem Aufschluss mit Puffer A_{mem} aufgenommen, homogenisiert und über Nacht gerührt. Dabei werden Membranproteine durch das Detergenz N-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) solubilisiert. Nach erneuter Zentrifugation (1,5h 45000rpm 4°C) wird der Überstand auf eine mit B_{mem} äquilibrierte Säule aufgetragen. Der Durchlauf wird gesammelt und die Säule mit mindestens 10 Säulenvolumen C_{mem} gewaschen. Das Protein wird zuletzt mit Puffer D_{mem} eluiert. Das Imidazol konkurriert mit den Histidinen um Bindungsstellen, bei hoher Imidazol Konzentration wird das Protein von der Säule eluiert. Die Imidazol

Konzentration im Eluat wird mit einer Dialyse gegen 5L Puffer G_{mem} bis zur Vernachlässigbarkeit verringert (Mennes et al., 2007; Shimono et al., 1997).

3.5.3 Komplexbildung

*NpSR*II und der Transducer *NpHrt*II werden in molarer Stöchiometrie von 1:1 in Puffer G_{mem} gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wird am nächsten Tag mit Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200 prep grade, GE Healthcare) aufgearbeitet. Der isolierte Rezeptor-Transducer Komplex ist für mehrere Tage bei 4°C homogen und stabil in Konzentrationen von 2-3 mg/ml.

3.5.4 Expression und Aufreinigung der Membrane Scaffold Proteine

Eingesetzte Puffer:

- (1) 40mM Tris/HCl; 0,3M NaCl, 1% Triton X 100; pH=8
- (2) 40mM Tris/HCl; 0,3M NaCl, 50mM Cholat; pH=8
- (3) 40mM Tris/HCl; 0,3M NaCl, pH=8
- (4) 40mM Tris/HCl; 0,3M NaCl; 30mM Imidazol; pH=8
- (5) 40mM Tris/HCl; 0,3M NaCl; 300mM Imidazol; pH=8
- (6) 10mM Tris/HCl; 0,1M NaCl, 1mM EDTA; pH=7,4

Die zur Verfügung gestellten Plasmide werden in *E.coli* BL21 DE3 Zellen transformiert und eine Glycerinkultur angefertigt. Daraus wird eine 20 ml Vorkultur in LB Medium und Kanamycin angesetzt. Für die heterologe Expression der Proteine His-TEV-MSP1, His-TEV-MSPD1E3 oder MSPD1E3-S18C werden jeweils 3L LB Medium aus der Vorkultur auf eine optische Dichte (OD) von 0,1 angeimpft und bei 37°C und 120 rpm geschüttelt. Bei OD von 1 wird durch Zugabe von 1mM IPTG die Expression induziert. Nach 3 Stunden werden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 5000 rpm) geerntet und in 20mM Na-Phosphat Puffer pH 7,4 gewaschen und wieder aufgenommen. Daraufhin werden die Zellen im Mikrofluidizer aufgeschlossen, sofort mit 1% Triton versetzt und eine Stunde bei 45000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine mit Puffer (1) äquilibrierte Ni-NTA Säule gegeben. Der Durchfluss wird verworfen. Die Säule wird mit je 3-4 Säulenvolumen der Puffer (2), (3), und (4) gewaschen. Das Zielprotein wird durch Puffer (5) eluiert. Alle Fraktionen werden mit SDS-PAGE analysiert. Das Eluat wird über Nacht gegen 5L Puffer (6) bei 4°C dialysiert (Bayburt et al. 2002).

3.5.5 TEV-Protease und Aufreinigung verdauter Proteine

Proteasen sind Enzyme, die Proteine spalten können. Dabei schneiden sie an einer spezifischen Aminosäuresequenz. An dem Protein his-tev-MSP ist eine Schnittstelle für die TEV-Protease kloniert, wodurch der Histidin-Tag vom Protein entfernt wird. Die Protease stammt aus dem „tobacco etch virus“ und ist eine Cystein Protease. Die Erkennungssequenz der Protease lautet: ENLYFQ. Die Spaltung erfolgt nach dem Q, wobei die folgende Aminosäure Einfluss auf die Effizienz hat. Im Falle von G wie in dieser Arbeit ist die Schnitteffizienz 100% (Kapust et al., 2002). Für die Durchführung werden Proteine im Verhältnis 1:200 Protease/Protein angesetzt. Außerdem sind für die Aktivität der Protease reduzierende Bedingungen notwendig, daher wird in jeden Ansatz 1mM DTT zugefügt. Die Ansätze werden über Nacht bei RT geschüttelt. Zur Aufreinigung des geschnittenen MSP wird der gesamte Ansatz auf eine mit Puffer (4) äquilibrierte Ni-NTA Säule gegeben. Der Durchfluss wird gesammelt und die Säule mit zwei Volumen Puffer (4) gewaschen. Die Fraktionen werden vereinigt und erneut gegen 5L Puffer (6) dialysiert (siehe 3.5.4).

3.5.6 Farbmarkierung von Proteinen über Michael Addition an Cystein Seitenketten

Aufgereinigtes MSPD1E3-S18C wird 50 µM in 10mM Tris/HCl; 0,1M NaCl, 1mM EDTA; pH=7,4 vorgelegt und mit 1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) versetzt. Die Lösung wird durch Argon Einleitung entgast und mit einem 10 fachen molaren Überschuss Alexa 680 Maleimid versetzt. Die Mischung wird drei Stunden in der Dunkelheit gerührt. Über eine Michael Addition wird eine kovalente Bindung zum Cystein Rest an Position 18 des Membran Scaffold Protein erzeugt. Ungebundener Farbstoff wird durch mehrmaliges ankonzentrieren des Proteins mit einem Amicon Zentrifugen Konzentratoren und Pufferaustausch erreicht. Die Kopplungseffizienz kann über folgende Rechnung bestimmt werden:

$$\frac{Ax}{\varepsilon} \times \frac{MW (Protein)}{mg Protein /ml} = \frac{mol (Farbstoff)}{mol (Protein)} \quad (3)$$

Ax: Absorption des Farbstoffs am Absorptionsmaximum; ε: Molarer Extinktionskoeffizient

3.5.7 Nanodiskformation

Für die Formation der Nanodisks werden aufgereinigtes MSPD1E3, SR11 oder Photorezeptor Komplex und Lipide gemischt und inkubiert. Um die Autoformation der Nanodisks einzuleiten werden 2/3 Volumen Bio-Beads SM2 (BioRad, Hercules, USA) hinzugefügt und die Probe

leicht geschüttelt. Dabei werden verschiedene Ansätze zur Optimierung angesetzt. Es können die molaren Verhältnisse, die Lipide sowie die Inkubationszeit und Formationszeit mit Biobeads variiert werden. Anschließend wird die Probe durch einen 22 µm Filter filtriert und sofort mit Gelfiltration (Superdex 200 oder Superose 6, GE Healthcare) aufgearbeitet. Für die Nanodisk Ansätze und die Gelfiltration wird Puffer (20 mM Tris, 100mM NaCl, pH=7,4) verwendet.

3.6 Analytische Methoden

3.6.1 SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine Methode um Proteine nach Ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Es wird die Methode nach Schägger und Jagow angewendet (1987). SDS (Natrium Dodecyl Sulfat) ist ein anionisches Detergenz, was die Eigenladung der Proteine überdeckt, sodass Micellen mit konstantem Masse/Ladungs-Verhältnis entstehen, und die Auftrennung im Polyacrylamidgel ausschließlich nach dem Molekulargewicht passiert. Durch Inkubation mit SDS – Probenpuffer und Erhitzen werden Proteine vollständig denaturiert.

Polyacrylamidgel ist chemisch inert und besonders stabil. Es wird durch eine Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit Hilfe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) gebildet. Es werden in der Regel 12%ige Trenngele und 4%ige Sammelgele verwendet (diskontinuierlich). Es wird eine Spannung von 80-120V angelegt. Nach der Elektrophorese werden die Proteine mit Coomassie-Blau-Färbelösung oder mittels Silberfärbung angefärbt.

Puffer:

Acrylamid-Stammlösung	30% (w/v) Acrylamid, 0,8%(w/v) Bis
Schägger/Jagow – Puffer:	3 M Tris, 10 mM SDS, pH=8,45
10% SDS	10% (w/v) Natriumdodecylsulfat in H ₂ O
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethyldiamin
10% APS	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H ₂ O
2x Probenpuffer	0,2 M Tris/HCl; 6% SDS; 30% Glycerin; 0,3 M DTT; 0,05% Bromphenolblau; pH=6,8
Kathodenpuffer (innen)	150 mM Tris/HCl; 1,5 M ε-Aminocapronsäure; pH=7
Anodenpuffer (außen)	50 mM Tris/HCl; pH=7
Färbelösung	2,5g Coomassie Blau R-250, 500 ml MeOH; 70 ml Essigsäure, H ₂ O ad 1000ml

LMW-Marker	Lactalbumin (14,4 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Albumin (66 kDa), Phosphorylase b (97 kDa)
Entfärbelösung	500 ml EtOH; 70 ml Essigsäure; H ₂ O ad 1000ml
Silberfärbung	1. Fixierlösung 40% MeOH, 10%CH ₃ COOH 2. 15 ml EtOH; 3,4g NaOAc; 0,1g Na ₂ S ₂ O ₃ ; H ₂ O ad 50ml 3. 0,05g AgNO ₃ , 30µl HCOH, H ₂ O ad 50ml 4. 1g Na ₂ CO ₃ ; 15µl HCOH; H ₂ O ad 50ml 5. Stop-Lösung: 0,04 M EDTA

3.6.2 Größenausschlußchromatographie (Gelfiltration)

Gelöste Moleküle werden nach ihrer Größe getrennt, basierend auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Für das Trennverfahren ist das hydrodynamische Volumen der Probenmoleküle verantwortlich und die Trenngele sind durch einen wirkungsvollen Einsatzbereich charakterisiert, bei dem die Molekülgröße in einem kritischen Verhältnis zu der Porengröße steht. Moleküle ab einer bestimmten Größe können nicht in die Poren eindringen und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront im Ausschussvolumen (*void volume*). Kleinere Moleküle dringen in die Poren ein und erfahren dadurch eine Verzögerung im Elutionsvolumen. Die mobile Phase dient nur als Lösungsmittel und hat keinen unmittelbaren Einfluss auf die Trennung. Durch eine Kalibrierung mit verschiedenen großen Substanzen ist auch eine Abschätzung der Molmasse und des Stokes Radius möglich. Dieser ist über die Stokes-Einstein Beziehung definiert:

$$D = \frac{T\kappa_B}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

D = Diffusionskonstante; T = Temperatur; κ_B = Boltzmannkonstante; η = Viskosität;
r = hydrodynamischer Radius (Stokes Radius)

3.6.3 UV-VIS Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektroskopie ist eine Elektronenspektroskopie, das heißt es werden Elektronen – genauer: Valenzelektronen – mit elektromagnetischen Wellen im Bereich des sichtbaren und ultravioletten Licht angeregt. Gemäß dem MO-Schema spalten Orbitale bei Überlappung in ein bindendes und ein antibindendes Orbital auf, wobei im Regelfall die Elektronen alle im bindenden Orbital Platz finden und das antibindende Orbital leer bleibt. Bei Anregung der

Elektronen wechseln diese in das antibindende Orbital. Die Rückkehr in den Grundzustand erfolgt strahlungslos.

Die Absorption elektromagnetischer Strahlung mit einer vorgegebenen Energie bzw. Wellenlänge, wird durch das Lambert – Beersche Gesetz beschrieben. Dabei wird vorausgesetzt, dass die absorbierende Substanz homogen in der Lösung stattfindet. Die Absorption A eines gelösten Stoffes ergibt sich für monochromatisches Licht als:

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (5)$$

Dabei bedeuten I_0 und I die Intensität der einfallenden bzw. aus der Messlösung austretende Strahlung, c die Konzentration des absorbierende Stoffes und d die Schichtdicke der Lösung. Die Stoffkonstante ε wird als molarer Absorptionskoeffizient bezeichnet.

3.6.4 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Wenn Licht auf kleine Partikel trifft, wird es in alle Richtungen gestreut (Rayleigh scattering), vorausgesetzt, die Partikel sind klein im Verhältnis zur Wellenlänge ($< 1/20$ tel der Wellenlänge). Wenn es sich bei der Lichtquelle um einen Laser (monochromatisch und kohärent) handelt, beobachtet man zeitabhängige Fluktuationen der Lichtstreu-Intensität. Diese Fluktuationen sind darin begründet, dass die Teilchen der Brown'schen Molekularbewegung unterliegen und sich somit die Bewegung der Teilchen relativ zur Lichtquelle ständig verändert (Doppler Effekt). Bei Kenntnis von Beziehungen zwischen dem Diffusionskoeffizienten und den Molmassen lassen sich mit der DLS Molmassenmittelwerte und Molmassenverteilungen berechnen. Je größer ein Molekül ist umso langsamer bewegt es sich und umso größer ist der Diffusionskoeffizient. Dies bedeutet, dass durch die Lichtstreuung ein Spektrum von zur Frequenz des Lasers verschobenen Frequenzen entsteht. Diese Abweichung ist sehr gering, um Sie trotzdem zu bestimmen wird nicht das Frequenzspektrum sondern das Fourier transformierte Spektrum betrachtet. Diese Funktion wird in der Lichtstreuung als Autokorrelationsfunktion bezeichnet. Sie ist ein Maß dafür, wie die Werte einer Funktion zu einem gegebenen Zeitpunkt mit den Werten der gleichen Funktion zu einem späteren Zeitpunkt über den gesamten Funktionsverlauf korrelieren. Je langsamer sich die Streuelemente bewegen umso länger bleibt die Ähnlichkeit bezüglich der Position, Geschwindigkeit und Bewegungsrichtung der Teilchen und damit auch die Ähnlichkeit der jeweils gemessenen Intensitäten erhalten. Somit kann, bei Kenntnis der

Viskosität des umgebenen Mediums, aus dem Abfall der Autokorrelationsfunktion auf die Größe der streuenden Teilchen geschlossen werden.

3.6.5 Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Durch Massenspektrometrie (MS) wird das Masse-Ladungs-Verhältnis eines Teilchens gemessen. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Als Analysator werden Quadrupel oder Ionenfallen eingesetzt. Als Detektor dient ein Photomultiplier. Bei der ESI wird die zu analysierende Lösung durch eine Metallkapillare geleitet. In einem elektrischen Feld werden die Ionen elektrophoretisch getrennt. An der Spitze der Kapillare bildet sich dabei ein Kationen-Überschuss, welche über einen Taylor-Konus aus der Kapillare austreten. Aufgrund der Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert sich die Tropfengröße, während die Dichte des elektrischen Feldes auf der Tropfen-Oberfläche zunimmt. Wenn der Radius der Tropfen kleiner als das sog. Rayleigh Limit wird, kommt es zu sog. Coulomb Explosionen, wobei kleinere Tröpfchen entstehen. Dieser Vorgang wiederholt sich solange bis letztlich winzige Tropfen von ca. 1 nm Durchmesser übrigbleiben, die nur ein ionisiertes Analytmolekül enthalten. Diese werden zum Analysator gelenkt und gemessen. Bei der ESI entstehen auch mehrfach geladene Moleküle.

3.6.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip wie ein Lichtmikroskop und wird daher hier vergleichend erläutert. Die prinzipielle Anordnung der Linsen ist in beiden Mikroskopen gleich, auch wenn das TEM in der Regel über zwei Kondensorlinsen und einer zusätzlichen Zwischenlinse verfügt. Anstelle von Glaslinsen werden allerdings elektromagnetische Linsen eingesetzt. Vor dem Objekt befindet sich eine wechselbare Kondensorblende, die den beleuchtenden Strahl begrenzt, und nach dem Objekt eine Objektivblende, die stark gestreute Strahlen ausblendet und dadurch den Streukontrast hervorruft. Über eine empfindliche CCD-Kamera kann das Bild digitalisiert werden. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 8 gezeigt. Es wird ein Abbild durch Elektronen, die das Objekt durchstrahlen, erzeugt. Als Elektronenquelle dient eine Kathode, die elektrisch aufgeheizt wird und dadurch Elektronen emittiert. Diese werden von einer Anode beschleunigt, die gegenüber der Kathode eine Potentialdifferenz von mindestens 10^5 Volt aufweist. Die Kondensorlinse fokussiert den Elektronenstrahl auf die Objektebene, wo er das Präparat durchdringt und dann von der Objektivlinse aufgeweitet wird.

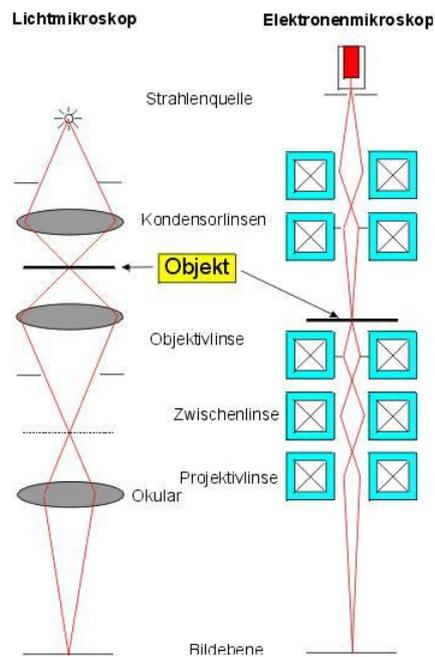


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Lichtmikroskops und eines Elektronenmikroskops (Lottspeich, Bioanalytik)

Um Wechselwirkungen mit Gasmolekülen zu vermeiden wird im Elektronenmikroskop ein Hochvakuum erzeugt. Damit die Probe nicht durch Trocknungsartefakte zerstört wird sind präparative Maßnahmen am Objekt erforderlich. Wir verwenden die Negativkontrastierung wobei die Probe auf einem Objektträger mit Schwermetallsalz (Uranylacetat) überzogen wird. Das Salz lagert sich an die Proteinmoleküle an, hüllt sie ein und füllt die Vertiefungen und Löcher auf. Die Schwermetallhülle ist strahlenresistenter als das Protein und konserviert die räumliche Struktur des Moleküls. Diese Methode erlaubt eine maximal nutzbare Auflösung von 1,0-1,5 nm. Im Wesentlichen unterscheidet man zwischen zwei Arten von Wechselwirkungen, die Elektronen bei der Durchstrahlung des Objektes eingehen: die elastische und die inelastische Streuung. beide Tragen zur Abbildung der Probe bei. Bei der elastischen Streuung handelt es sich um Wechselwirkungen der Strahlenelektronen mit den Kernen der Objektatome. Die elektrostatische, energieverlustfreie Ablenkung der Strahlenelektronen durch den Atomkern führt zu einer Interferenz mit den ungebeugten Strahlen und zur Entstehung des Phasenkontrasts. Als inelastische Streuung bezeichnet man die Wechselwirkungen von Strahlenelektronen mit der Elektronenhülle der Objektatome. Der Energietransfer bei der Wechselwirkung zwischen Strahl- und Objektelektronen ändert die Wellenlänge der Strahlenelektronen. Die Elektronenstrahlen zeigen nach Objektdurchgang ein Wellenlängenspektrum. Da die Beugung der Elektronen wellenlängenabhängig ist, werden von den Objektstrukturen unterschiedlich stark gebeugte Bildstrukturen erzeugt und miteinander überlagert. Dadurch verringern sich der Kontrast des Bildes und die Erkennbarkeit von Objektdetails. Es ist aber möglich, durch Energiefilter die inelastisch

gebeugten Elektronen von den elastisch gebeugten zu trennen und damit die Kontrastverhältnisse erheblich zu verbessern.

3.6.7 Circular dichroismus (CD) Spektroskopie

Bei CD Spektroskopie handelt es sich um eine Methode mit der die optische Aktivität asymmetrischer Moleküle in Lösung untersucht werden kann. Es wird die unterschiedliche Absorption circular polarisierten Lichtes analysiert. Optische Aktivität entsteht zum Beispiel durch die Einführung eines chiralen Zentrums in ein Molekül. In solchen optisch aktiven Strukturen ist die Lichtgeschwindigkeit für links- bzw. rechts gerichtet zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich groß. Die optisch aktive Substanz hat unterschiedliche Brechungsindizes für links- bzw. rechtspolarisiertes Licht, also unterschiedliche Absorption. Für alle chiralen Moleküle gilt, dass die Differenz $A_L - A_R$ ungleich Null ist. Dieses Verhalten bezeichnet man als Circular dichroismus. Man unterscheidet hier zwischen den Absorptionskoeffizienten ϵ_L und ϵ_R . In der CD-Spektroskopie wird die Differenz $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ gemessen. Sie wird als Elliptizität θ angegeben:

$$\theta(\lambda) = \text{const.}(\Delta\epsilon) \cdot c \cdot d \quad (6)$$

Dabei bedeuten d die Schichtdicke der Küvette und c die Konzentration der Probe. Die Abhängigkeit der Elliptizität von der Wellenlänge wird im CD-Spektrum aufgezeichnet. Eine CD-Kurve wird auch als Cotton Effekt bezeichnet. Dabei liegt der CD oft nur in der Größenordnung von 10^{-4} und erfordert daher empfindliche Messgeräte und starke Lichtquellen. Zunächst wird durch einen Monochromator Licht einer Wellenlänge λ erzeugt, das dann linear polarisiert wird. Die Polarisationssebene des Lichts wird dann mit einem Modulator, der unter dem Einfluss eines hochfrequenten elektrischen Wechselfelds alternativ eine links- und eine rechtszirkular polarisierte Welle erzeugt, moduliert, sodass ein synchron dazu geschalteter Detektor alternativ I_L oder I_R detektiert. Daraus kann die Elliptizität einer Wellenlänge berechnet werden und bei Variation der Wellenlänge ein CD Spektrum aufgenommen werden.

Die wichtigste Anwendung der CD Spektroskopie ist die Analyse von Proteinsekundärstrukturen. Dafür wird der Spektralbereich von 160 – 250 nm untersucht, darin liegen die $n \rightarrow \pi^*$ und die $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge der Peptidbindung, die im Absorptionsspektrum nur schwach und vor allem überlappt liegen. Aufgrund der Chiralität sind Peptide äußerst empfindlich für seine Sekundärstruktur. Typische Spektren sind in Abbildung G gezeigt. α -Helicale Peptide liefern CD Spektren mit einem negativen Cotton Effekt bei $\lambda=222$ nm als auch 207 nm, sowie einer positiven CD Bande bei 192 nm. Peptide die bei 215 bis 220 nm ein Minimum und bei 195 nm ein Maximum besitzen, haben dagegen

eine antiparallele β -Faltblatt Struktur. Auch ungeordnete Konformation eines Peptids liefert charakteristische CD Spektren. Die Auswertung eines CD Spektrums eines Proteins erfolgt durch Vergleich mit Standards bekannter Konformationen. Typische CD Spektren sind in Abbildung 9 gezeigt.

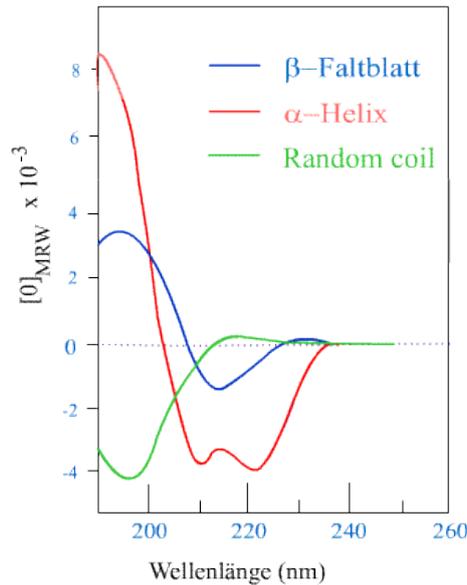


Abbildung 9: Charakteristische CD-Spektren für α -Helix, β -Faltblatt und Zufallskneul Sekundärstrukturen (Chemgapedia)

3.6.8 Laserblitz-Absorptions-Spektroskopie

Für die transienten Absorptionsmessungen wird eine Rechnergestützte Messvorrichtung nach Chizhov et al. verwendet. Abbildung 10 zeigt den schematischen Aufbau dieser Apparatur (Chizhov et al., 1996). Die photochemische Anregung der Probe erfolgt mit einem Laserpuls. Das ungefilterte Licht einer Halogenlampe durchtritt die Probenküvette (Quarzglas, Schichtdicke 3 mm) im rechten Winkel zum Laserpuls und wird nach Wellenlängen-Selektion durch einen Monochromator von einem Photomultiplier detektiert. Mittels zwei digitalen Oszilloskopen werden die vom Detektor kommenden Signale in zwei linearen, einander überlappenden, Zeitfenstern gespeichert. Die Datenverarbeitung geschieht über den angeschlossenen Computer. Es werden für Photozyklus-Messungen pro Wellenlänge 9 Messwerte gemittelt. Die beiden überlappenden Zeitfenster beinhalten die Absorptions-Signale, welche die Kinetik des Photozyklus nach der Probenanregung durch den Laserpuls bis zur vollständigen Rückbildung des Grundzustandes erfassen. Die Messdaten werden auf eine logarithmische Zeitskala (250 Datenpunkte) nach der Methode von Müller und Plessner reduziert (1991). Anhand des Fehlers des Grundsignals wird die Standardabweichung abgeschätzt. Eine Auswertung der Daten erfolgt durch das Programm MEXFIT.

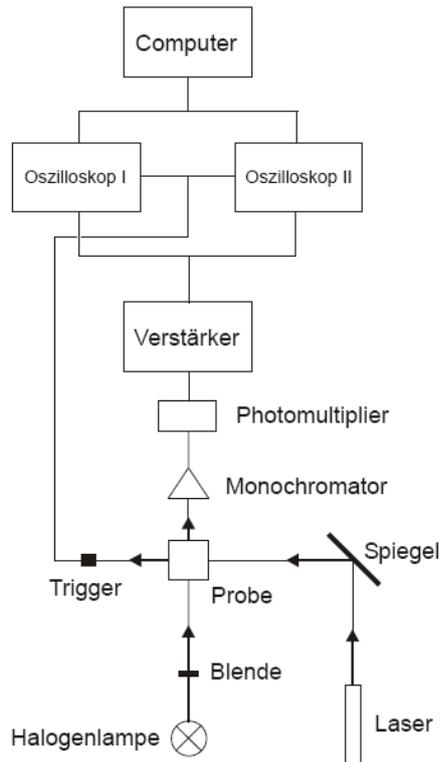


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Apparatur zur kinetischen Messung des Photozyklus des sensorischen Rhodopsins (aus Dissertation J. P. Klare)

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Transformation der Vektoren, Einfügen einer Punktmutation

Die zur Verfügung gestellten Plasmide pET27a-His-Tev-MSP1 und MSPD1E3 wurden in *E.coli* XL1 und BL21 DE3 Zellen transformiert. Die beiden Konstrukte sind mit einem Histidin Tag für eine Aufreinigung über Affinitätschromatografie sowie einer TEV-Protease Schnittstelle kloniert, um den His Tag selektiv zu entfernen.

Für ein spezifisches Labeling wurde eine Cystein Mutante des MSPD1E3 hergestellt (S18C). Die gewählte Position 18 entspricht der 3. Aminosäure des Proteins nachdem der N-Terminus durch die TEV- Protease entfernt wurde. Anhand der Kristallstruktur ist erkennbar, dass die ersten Aminosäuren keine Sekundärstruktur ausbilden. Aufgrund der ähnlichen Größe von Serin und Cystein wird diese Aminosäure gewählt um einen spezifischen Austausch durchzuführen, der die Struktur und damit die Nanodiskformation nicht beeinflusst. Das DNA Basentriplett das in diesem Falle für Serin codiert unterscheidet sich nur in einer Base vom Triplett was für Cystein codiert. Es muss also nur eine spezifische Punktmutation eingefügt werden. Mit der Overlap Extension PCR wird ein DNA Fragment mit einem spezifischen Basenaustausch hergestellt. Dazu wird der Vektor pET27a-His-Tev-MSPD1E3 isoliert und mit den Restriktionsenzymen XbaI und StuI verdaut. Über Agarose Gelelektrophorese wird der geschnittene Vektor von supercoiled DNA getrennt. Abbildung 11 zeigt das PCR Fragment der Overlap Extension PCR und den fertig geschnitten Vektor.

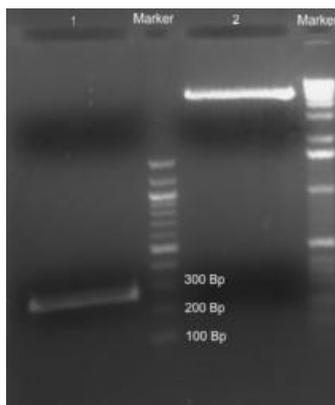


Abbildung 11: Aufreinigung des Overlap Extension PCR Fragments und des zweifach verdauten Vektors für die Klonierung einer Cystein Mutante des MSPD1E3

Das PCR Fragment wird auch mit XbaI und StuI geschnitten und dann mit dem Vektor ligiert. Das Plasmid wird durch Elektroporation in *E.coli* XL1 und BL21 DE3 transformiert. Auf Kanamycin haltigen LB Platten werden Kolonien gezogen und eine Einzelkolonie gepickt und in 1 ml Medium wachsen gelassen. Die Plasmid DNA wird isoliert und sequenziert. Anhand

der Sequenzierung kann gezeigt werden, dass erfolgreich eine Punktmutation eingefügt worden ist. Der sequenzierte Klon enthält die richtige Sequenz und wird erneut in *E.coli* Zellen transformiert. Für weiter Experimente werden 500µl Kultur mit 500µl sterilem 80% Glycerin bei -80°C eingefroren.

Die Zellen für eine heterologe Expression von *NpSRII* und *NpHtrII* werden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Auch diese Konstrukte sind mit einem Histidin Tag kloniert.

4.2 Expression und Aufreinigung des Photorezeptorkomplexes

Die Expression der Proteine SRII und HtrII in *E.coli* BL21 DE3 wird wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben durchgeführt. Für einen Ansatz von neun Litern Medium und einer Aufreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatografie erreicht man Ausbeuten von 1,4 mg Protein pro Liter Kultur für SRII und 4 mg Protein pro Liter Kultur für HtrII. Die Komplexbildung wird wie in Abschnitt 3.5.2 durchgeführt und mit einer Superdex 200 Hiprep Säule (Ge Healthcare) aufgearbeitet. Dabei wird 0.05% DDM haltiger Puffer als Laufmittel verwendet. Das Chromatogramm mit dem dazugehörigen SDS Gel ist in Abbildung 12 dargestellt. Es wird die Absorption bei 280 nm für aromatische Aminosäuren sowie bei der spezifischen Absorptionswellenlänge der Retinals bei 500 nm gemessen. Es zeigen sich drei deutliche Peaks. Der erste Peak ist das Ausschuss Volumen, dieser zeigt keine Absorption bei 500nm. Aus der SDS-PAGE Analyse kann man auf HtrII Aggregate schließen. Die beiden folgenden Peaks zeigen eine deutliche Absorption bei 500 nm. Dies bedeutet, dass beide Peaks SRII enthalten. Anhand der SDS-PAGE Analyse handelt es sich beim zweiten Peak um den erwünschten Komplex, da im Gel der entsprechenden Fraktionen Banden von SRII und HtrII detektiert werden. Beim dritten Peak handelt es sich um reines SRII, in diesen Fraktionen ist keine Bande des HtrII auf dem Gel zu erkennen. Die Komplexfraktionen werden gesammelt und ankonzentriert. Zur Kontrolle wird eine analytische Gelfiltration eingesetzt (Abb.12 unten). Dabei wird die Absorption bei 280 nm sowie 500 nm gemessen. Die Differenz der Absorptionswerte wird als Referenz für spätere Messungen verwendet. Aus dem Differenzwert für die unterschiedlichen Nanodiskansätze können Aussagen über den Erfolg der Nanodisk-formation sowie der Stöchiometrie getroffen werden. Es ist ein Absorptionsunterschied von 12.6 mAu gemessen. Das Verhältnis von A_{280} zu A_{500} ist in dieser Messung 1,8. Aus je neun Litern Kultur der Expression von SRII und HtrII kann man nach Aufreinigung der einzelnen Proteine, Komplexbildung und Gelfiltration ca. 5 mg des Komplexes gewinnen. Dies entspricht einer Ausbeute der Komplexbildung von 25-30%.

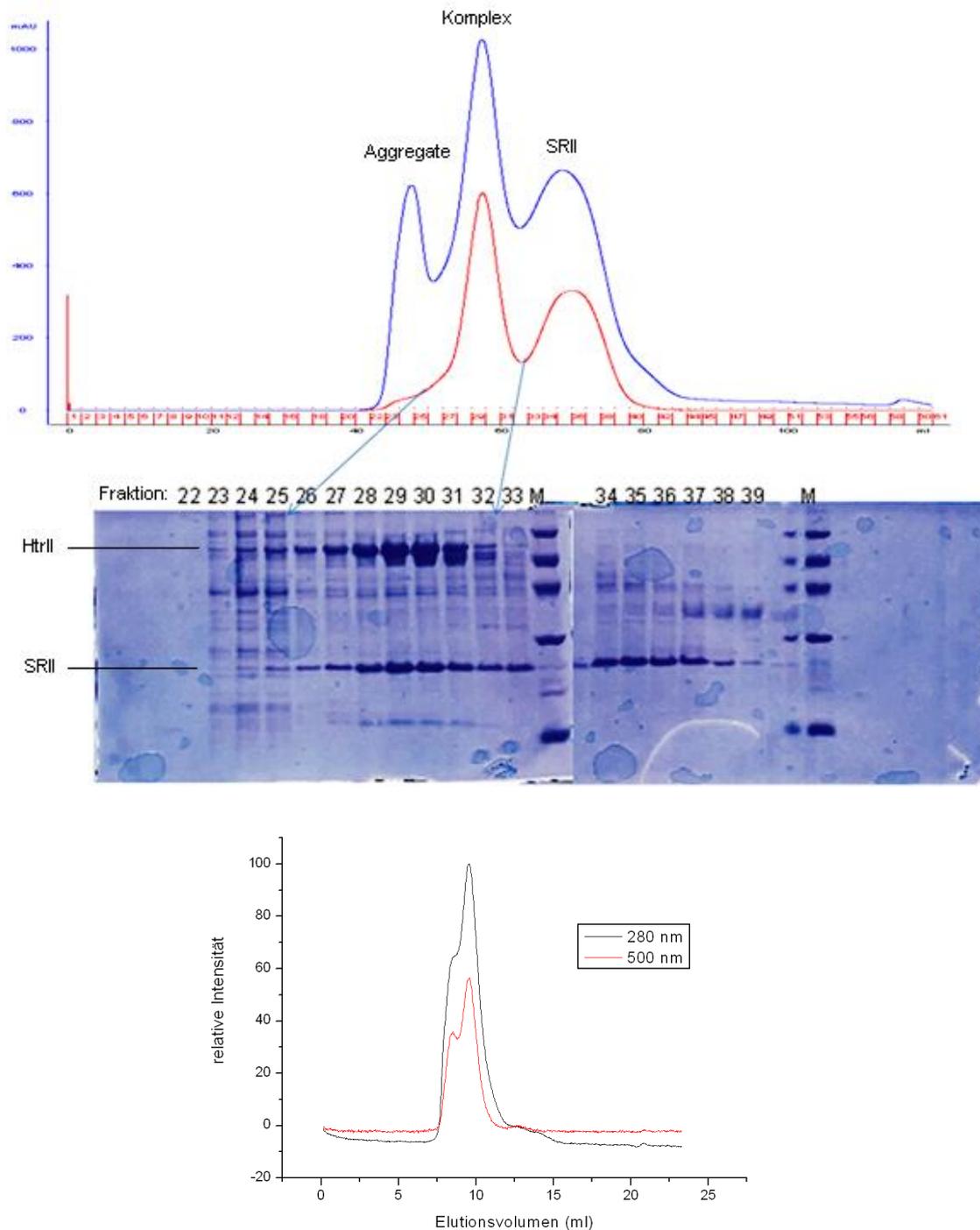


Abbildung 12: Oben: Chromatogramm der Komplex Aufreinigung über eine Superdex 200 Säule, es sind deutlich 3 Peaks getrennt worden. Über das SDS-PAGE Gel (Mitte) wird der erste Peak Transducer Aggregaten, der zweite Peak dem Komplex und der dritte Peak freiem SRII zugeordnet. Die Komplexfraktionen sind auf dem unteren Bild auf einer analytischen Gelfiltrationssäule aufgetragen

4.3 Expression und Aufreinigung der Membrane Scaffold Proteine

Die Expression der Proteine His-Tev-MSP1 (M = 25.3 kDa) und MSPD1E3 (M = 31.9 kDa) in *E.coli* BL21 DE3 wird wie in Abschnitt 3.5.4 beschrieben durchgeführt. Der lösliche bzw. cytoplasmatische Anteil wird über Ni-NTA Affinitätschromatografie aufgereinigt. Alle

Fraktionen werden gesammelt und mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der Aufreinigungen. Das Gel der MSP1 Aufreinigung zeigt, dass im Durchfluss und in den Waschfraktionen ohne Imidazol keine deutliche Bande im Bereich von 25 kDa zu erkennen ist, welche dem MSP1 entspricht. Beim Waschen der Säule mit 50 mM Imidazol wird das MSP1 schon eluiert, sodass für spätere Aufreinigungen auf eine Imidazolkonzentration von 30 mM umgestellt wird. Die Eluat Fraktionen zeigen, dass die Aufreinigung des Zielproteins mit einer Größe von ca. 25 kDa erfolgreich war. Die Eluate werden gesammelt und dialysiert. Für das MSP1 ergibt sich eine Ausbeute von 6 mg Protein pro Liter Kultur. Das Gel der MSPD1E3 Aufreinigung zeigt, dass weder Durchfluss noch eine der Waschfraktionen das Zielprotein enthält. Die Eluate enthalten das MSPD1E3 mit einer Masse von 31 kDa. Die Aufreinigung über Affinitätschromatographie führt zu einer ausreichenden Reinheit des Produkts. Auch die MSPD1E3 Fraktionen werden vereinigt und dialysiert. Für das MSPD1E3 ergibt sich eine Ausbeute von 9 mg Protein pro Liter Kultur.

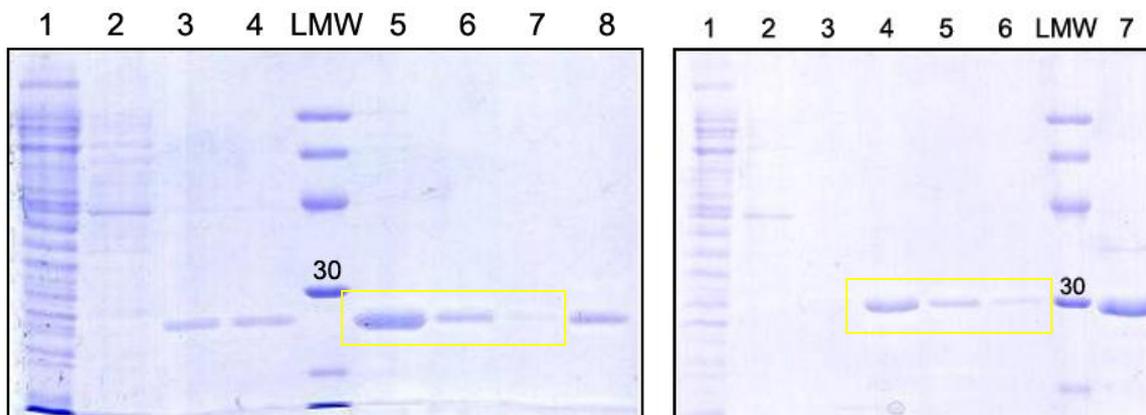


Abbildung 13: SDS-PAGE Analyse der Expression von MSPwt und MSPD1E3. Auf beiden Gelen entspricht Bahn 1 dem Durchfluss der Ni-Säule, Bahn 2-4 bzw. 2-3 den Waschfraktionen und 5-7 bzw. 4-6 den Eluatfraktionen. Man erhält eine gute Aufreinigung der Proteine.

Zur Kontrolle wird eine LC-MS Analyse durchgeführt. Die Chromatogramme und dekonvolvierten Massenspektren sind in Abbildung 14 dargestellt. Die berechnete Masse für das His-Tev-MSP1 beträgt 25309,5 g/mol. Das Chromatogramm zeigt einen einzelnen Peak bei 13,6 min Elutionszeit. Das ESI- Massenspektrum zeigt die Masse 25182 g/mol. Dabei handelt es sich um das MSP ohne Methionin, was häufig durch Proteasen abgebaut wird. Auch das Chromatogramm des MSPD1E3 zeigt hohe Sauberkeit und einen einzelnen Peak bei 14 min Elutionszeit. Die berechnete Masse des His-Tev-MSPD1E3 ist 31962,0 g/mol. Auch bei der hier gemessenen Masse von 31834 g/mol handelt es sich um das MSPD1E3 nach Abspaltung der ersten Aminosäure Methionin. Da der N-Terminus noch abgetrennt wird und das fehlende Methionin keinen Einfluss auf die Aktivität der TEV-Protease hat entsteht kein Problem für das weitere Vorgehen. Sowohl das Wildtyp MSP als auch das MSPD1E3 stehen damit für weitere Experimente zur Verfügung. Da mehrere Membranproteine in die

durch MSP geformten Nanodisks eingebaut werden sollen wird im Rahmen dieser Arbeit nur das größere Konstrukt, MSPD1E3 verwendet.

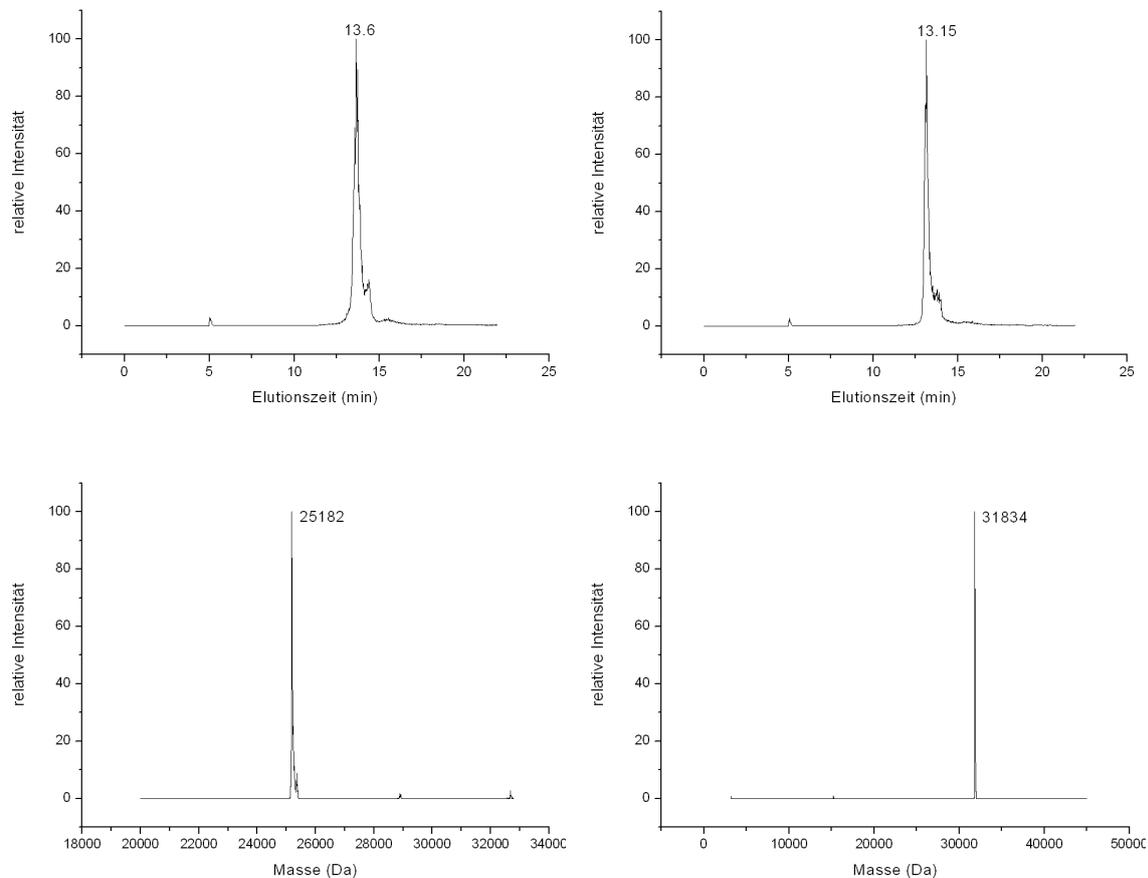


Abbildung 14: Chromatogramme und dekonvolvierte Massenspektren der Aufreinigungen des His-Tev-MSP1 (links) und His-Tev-MSPD1E3 (rechts)

Das aufgereinigte His-Tev-MSPD1E3 wird mit der TEV-Protease verdaut, um den Histidin-Tag abzutrennen. Da auch die Membranproteine, die in Nanodisks eingelagert werden sollen mit einem His-Tag exprimiert werden ist das Entfernen des His-Tags vom MSP, das den Proteinmantel der Nanodisks erforderlich um leere Nanodisks von besetzten Nanodisks über Affinitätschromatografie zu trennen Die TEV-Protease selbst hat ein His-Tag und kann ebenfalls über eine Nickel Säule vom geschnittenen Membrane Scaffold Protein (MSP) getrennt. In diesem Falle befindet sich das Zielprotein im Durchfluss der Säule. Die Kontrolle erfolgt wieder mit LC-MS. Abbildung 15 zeigt das Chromatogramm und ESI Massenspektrum für das geschnittene MSPD1E3(-). Man sieht einen einzelnen Peak und die Masse von 29989 g/mol entspricht dem geschnittenen Protein. Die TEV-Protease konnte aus der Lösung entfernt werden, was anhand des Chromatogramms als auch am Massenspektrum deutlich wird. Um zu zeigen, dass das Protein nach dem Verdau im gefalteten (nativen) Zustand vorliegt, was für die Nanodiskformation Voraussetzung ist, wird ein Circular Dichroismus-Spektrum aufgenommen, welches in Abbildung 16 gezeigt ist. Aus der Literatur

ist bekannt, dass einen sehr hoher α -helikaler Anteil zu erwarten ist. Das Spektrum zeigt die charakteristischen Minima bei ca. 208 und 223 nm die auf eine α -helikale Konformation hindeuten. Da die Messung in 100 mM NaCl Puffer durchgeführt wurde und die Chlorid Ionen mit dem CD Spektrum interferieren ist das Maximum bei <200 nm schwächer ausgeprägt. Außerdem kann ein Anteil Random Coil Struktur Einfluss auf diesen Bereich des Spektrums haben. Trotzdem zeigt die CD-Messung, dass das MSP im nativen Zustand vorliegt. Damit sind die Voraussetzungen für die Nanodisk Formation erfüllt.

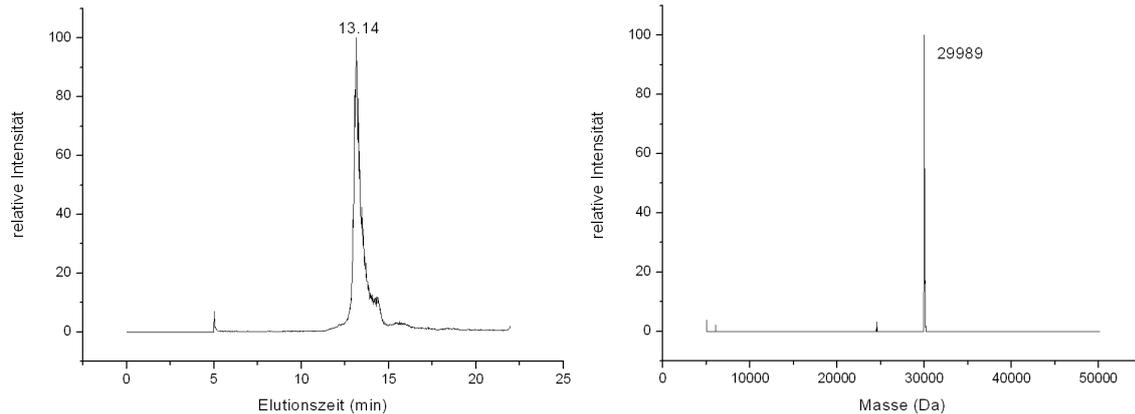


Abbildung 15: Chromatogramm und dekonvolviertes Massenspektrum des mit TEV-Protease geschnittenen MSPD1E3(-)

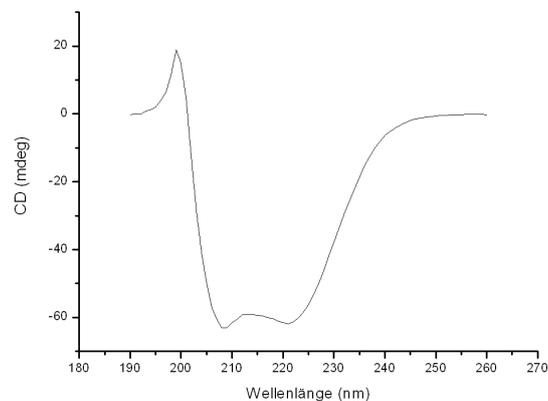


Abbildung 16: CD Spektrum des MSPD1E3(-)

4.4 Expression, Aufreinigung, Labeling einer Cystein Mutante des MSPD1E3

Das MSPD1E3-S18C wird wie in Abschnitt 3.5.4 beschrieben exprimiert und aufgereinigt. Man erhält eine Ausbeute von >5 mg Protein pro Liter Kultur. Das mutierte Cystein hat keinen Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins. Durch Kopplung mit einem Maleimid-Farbstoff

(Alexa Fluor 680) wird ein MSP mit einem Absorptionsmaximum im sichtbaren Wellenlängenbereich erzeugt. Die Kopplungseffizienz beträgt 80 %. Das entsprechende UV-Vis Spektrum ist in Abbildung 17 gezeigt. Der Farbstoff besitzt einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten ($184000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und zeigt eine deutliche Absorption bei 680 nm. Nanodisks, die mit diesem Konstrukt gebildet werden, eluieren von der Gelfiltrationssäule wie das MSPD1E3.

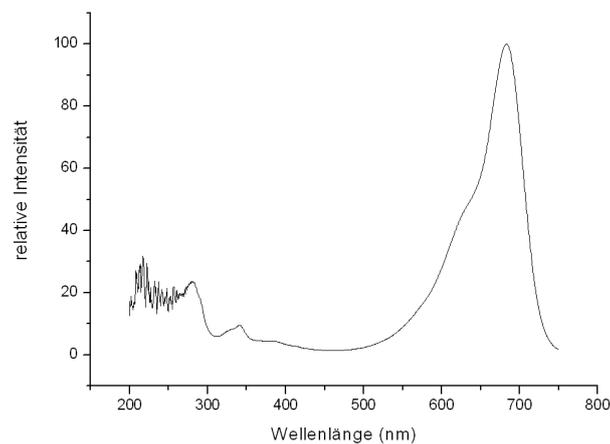


Abbildung 17: UV-Vis Spektrum des farbmarkierten MSPD1E3 (S18C)

4.5 Nanodisks

Für eine spätere Diskussion der erhaltenen Daten werden zunächst einige Ausgangspunkte ermittelt. Das sensorische Rhodopsin II liegt nach der Aufreinigung in Puffer G_{mem} (500 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.1 % DDM, pH=8) vor. Wird die Lösung mit Biobeads versetzt, um das Detergenz zu entfernen, und für eine Stunde unter Schütteln inkubiert, bilden sich Aggregate deren hydrodynamischer Durchmesser 22 μm übersteigt. Strukturen dieser Größenordnung werden vor einer Gelfiltration mit einem Zentrifugen Filter abgetrennt. Dies zeigt einerseits, dass DDM von Biobeads adsorbiert wird und daher für die Nanodisk Formation ein kompatibles Detergenz ist und andererseits, dass durch Entzug des Detergenz SRII nicht stabil ist und ggf. bei einer Gelfiltration nur im Ausschussvolumen eluieren würde. Das MSP ist in Puffern ohne Detergenzien löslich und eluiert von der Superdex 200 Gelfiltrationssäule nach 16 ml Volumen bei einem Fluss von 0.5 ml/min. Dies entspricht anhand des Proteinstandards der Masse des monomeren Proteins. Der erste Nanodisk Ansatz wird ohne Einlagerung von Membranproteinen durchgeführt. Es soll kontrolliert werden, ob die hergestellten Membran Scaffold Proteine befähigt sind Nanodisks auszubilden, außerdem muss das Elutionsvolumen der leeren Disks ermittelt werden. Hierzu wird das ungeschnittene His-Tev-MSPD1E3 verwendet.

Tabelle 3: Ansatz Nanodisks ohne Protein Einlagerung

20 μ M MSPD1E3	2 mM POPC (4mM Cholat)	Gesamtvolumen: 500 μ l
--------------------	------------------------	----------------------------

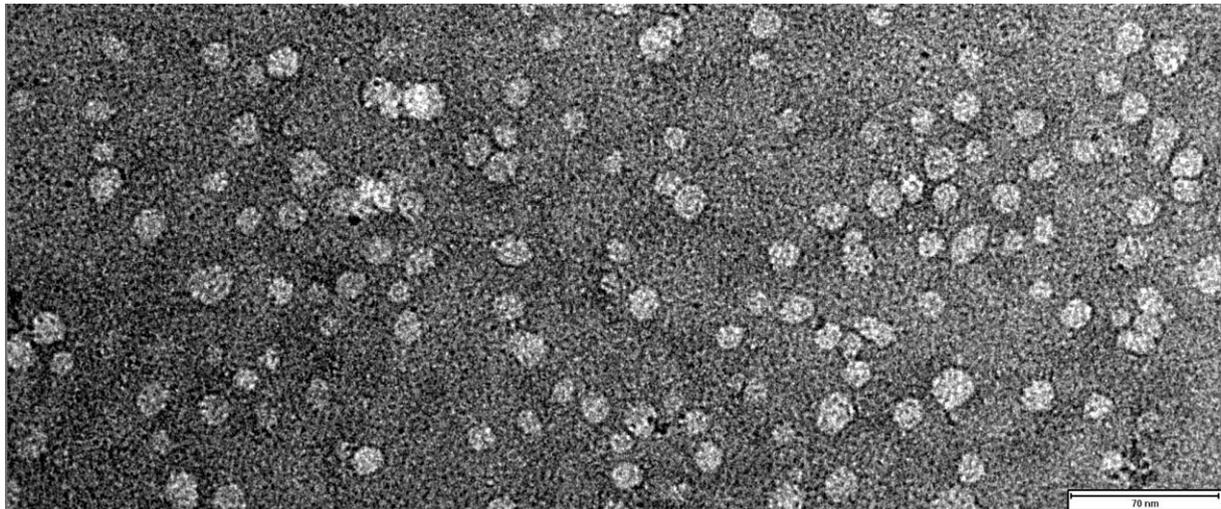
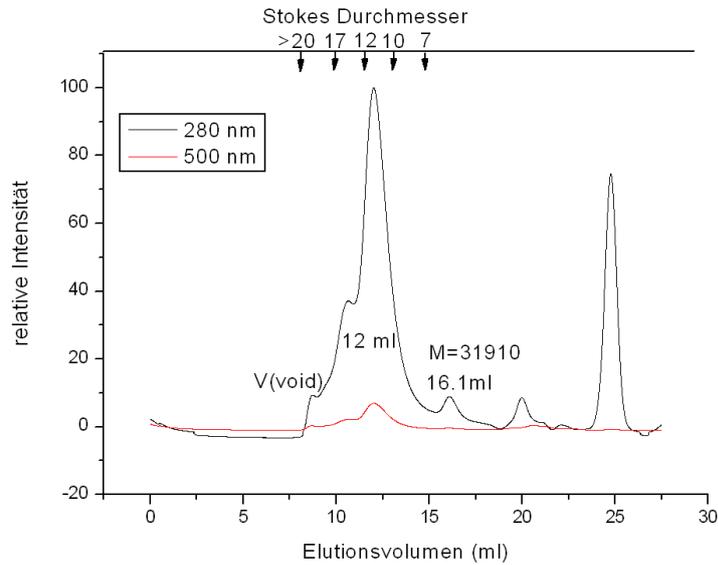


Abbildung 18: Chromatogramm der Aufreinigung leerer Nanodisks über Gelfiltration, es wurde die Absorption bei 280 und 500 nm gemessen (Oben) Elektronen-mikroskopische Aufnahme der Fraktion bei 12 ml Elutionsvolumen (Unten)

Die Komponenten werden wie in Tabelle 3 beschrieben gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit 2/3 Volumen Biobeads versetzt. Abbildung 18 zeigt das Chromatogramm der Gelfiltration des Ansatzes. Im Vergleich zum Chromatogramm des nativen MSP hat sich ein deutlicher neuer Peak bei einem Elutionsvolumen von 12 ml gebildet. Ein kleiner Peak des Monomers ist auch zu erkennen (16 ml). Das Chromatogramm zeigt, dass sich eine größere Struktur ausgebildet hat. Dabei handelt es sich um die gebildeten Nanodisks, da Aggregate im Ausschussvolumen der Säule eluieren würden (8 ml). Anhand eines Proteinstandards kann die Masse auf ca. 250 kDa abgeschätzt werden. Aussagekräftiger für globuläre Proteine ist jedoch der Stokes Radius bzw. Durchmesser. Anhand des Standards kann man auf einen Durchmesser von 11.7 nm schließen, was mit

den Literaturwerten übereinstimmt (Denisov et al. 2004). Um das Ergebnis zu bestätigen wird eine elektronenmikroskopische Aufnahme angefertigt. Die Abbildung 18 zeigt, dass sich scheibenförmige Strukturen mit einheitlicher Größe gebildet haben. Die Nanodisks haben einen Durchmesser von 11-12 nm, was die Ergebnisse der Gelfiltration bestätigt.

4.6 Einlagerung von sensorischem Rhodopsin II in Membran Nanodisks

Das sensorische Rhodopsin II aus *Natronomonas pharaonis* ist ein Protein, was aus sieben transmembranen Helices besteht. Es hat einen Retinal Chromophor gebunden und ist daher durch Messung der spezifischen Absorptionswellenlänge von 500 nm detektierbar.

4.6.1 Optimierung der Nanodiskformation mit eingelagertem SRII

Es werden zwei Ansätze mit den molaren Verhältnissen von SRII/MSP 1:10 bzw 1:2 vorbereitet.

Tabelle 4: Nanodisk Ansätze zur Einlagerung von SRII

2 μ M SRII	20 μ M MSPD1E3	2 mM POPC (4mM Cholot)	V: 500 μ l	0.05 % DDM
10 μ M SRII	20 μ M MSPD1E3	2 mM POPC (4mM Cholot)	V: 500 μ l	0.05 % DDM

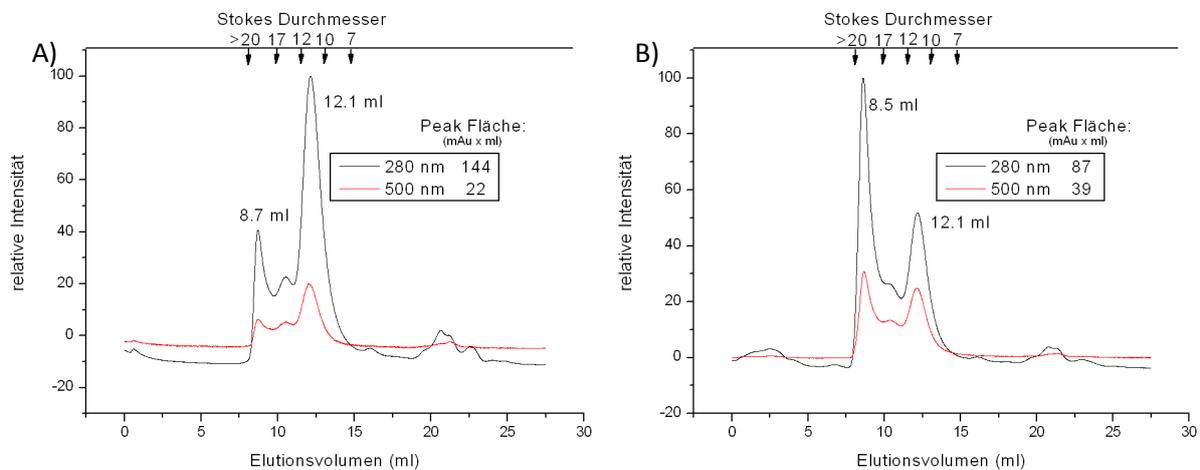


Abbildung 19: Chromatogramme der Gelfiltration über Superdex 200, A: 1:10 Ansatz, B: 1:2 Ansatz. Die Absorption wurde bei 280 und 500 nm gemessen

Die Ansätze werden wie in Tabelle 4 beschrieben gemischt, eine Stunde inkubiert und anschließend eine Stunde bei Raum Temperatur mit Biobeads geschüttelt. Die Abbildungen A) und B) zeigen die Chromatogramme der Gelfiltration über eine Superdex 200 Säule. Die Chromatogramme zeigen einige Homologien. Die Peaks mit den höchsten relativen Intensitäten sind bei 8 ml und 12.1 ml Elutionsvolumen. Das Ausschussvolumen der Säule ist 8 ml was dem ersten Peak entspricht. Bei der Fraktion im Ausschussvolumen handelt es sich also um Aggregate der Proteine. Diese können leicht auftreten wenn die stabilisierenden

Detergenzien entzogen werden. Im 1:2 Ansatz ist dieser Peak deutlich stärker ausgeprägt. Der Peak bei 12.1 ml entspricht den gebildeten Nanodisks. In beiden Chromatogrammen bei 12.1 ml eine deutliche Absorption bei 500 nm messbar, es ist also SR II vorhanden. Da sich die Elutionszeit im Vergleich zu den leeren Disks nur minimal verschoben hat kann man schlussfolgern, dass die SR II Einlagerung den Stokes Radius der Nanodisks kaum beeinflusst. Das Verhältnis A_{280}/A_{500} ist im 1. Ansatz 4:1 und im 2. Ansatz 2:1. Anhand der Peak Integrale wird die Stöchiometrie abgeschätzt. Es ist davon auszugehen, dass sich im 1. Ansatz neben den besetzten Nanodisks noch viele leere Disks befinden und dass sich in besetzten Disks nur ein SR II Molekül pro Nanodisk eingelagert hat. Im zweiten Ansatz lagern sich drei Moleküle SR II pro Nanodisk ein. Wahrscheinlich handelt es sich aber um eine Mischung von Nanodisks unterschiedlicher Stöchiometrien. Über den kleinen dritten Peak bei 10 ml kann nur eine Vermutung angestellt werden. Es müssen sich größere Fragmente gebildet haben, evtl. Cluster aus mehreren Nanodisks. Es ist festzuhalten, dass sich SR II-Nanodisks mit unterschiedlichen Stöchiometrien herstellen lassen. Um festzustellen wie die unterschiedlichen Stöchiometrien bevorzugt werden können, werden weitere Parameter variiert.

4.6.2 Optimierung der Lipidkonzentration

Als nächstes wird der Einfluss der Lipidkonzentration ermittelt. Im Vergleich zum ersten Ansatz (Tabelle 4) wird die Konzentration um 0.4 bzw. 0.8 mM verringert.

Tabelle 5: Nanodisk SR II Ansätze mit unterschiedlicher Lipidkonzentration

2 μ M SR II	20 μ M MSPD1E3	1.2 mM POPC	Summe 500 μ l	0.05 % DDM
2 μ M SR II	20 μ M MSPD1E3	1.6 mM POPC	Summe 500 μ l	0.05 % DDM

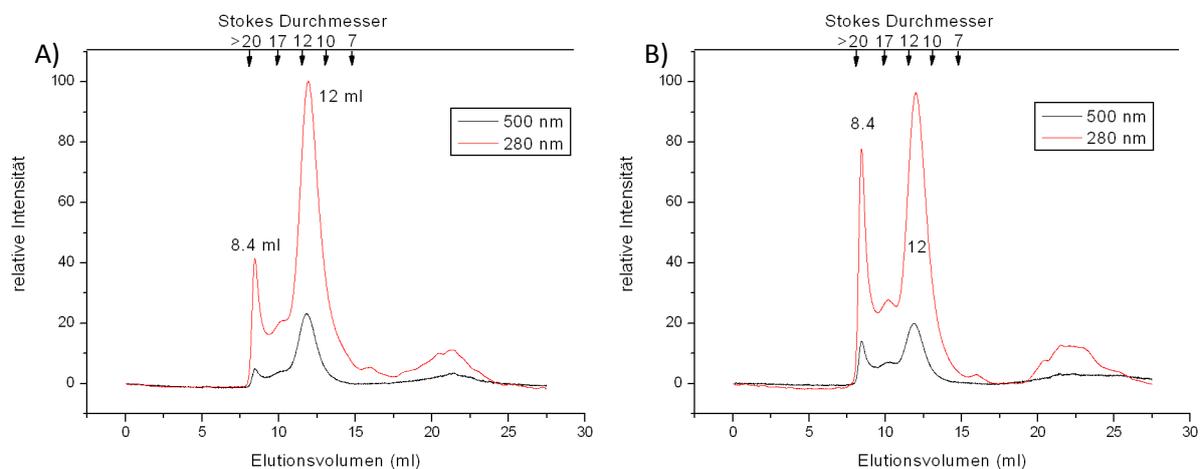


Abbildung 20: Chromatogramme der Gelfiltration der Ansätze mit unterschiedlichen Lipidkonzentrationen, A: 1.2 mM, B: 1.6 mM POPC, die Absorption wurde bei 280 und 500 nm gemessen

Die Ansätze aus Tabelle 5 werden eine Stunde bei RT inkubiert, eine Stunde bei Raum Temperatur mit Biobeads geschüttelt und dann direkt über eine Gelfiltrationssäule analysiert. Die Chromatogramme sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Variation der Lipidkonzentration hat keinen Einfluss auf die relative Intensität des Nanodisk-Peaks bei 12 ml. Es zeigt sich weiterhin das Verhältnis A280/A500 4:1. Der Peak bei ca. 10 ml ist mit geringeren Lipidkonzentrationen weniger stark erkennbar. Im Ansatz mit 1.6 mM POPC zeigt sich eine etwas höhere Aggregation. Da aber der Ansatz mit 1.2 mM POPC wiederum das Ergebnis des Ansatzes mit 2 mM bestätigt kann man schlussfolgern, dass die Lipidkonzentration ist ein weniger wichtiger Faktor ist.

4.6.3 Optimierung der Inkubationszeit

Es wird ein Ansatz vorbereitet um den Einfluss der Inkubationszeit zu ermitteln. Diese war in vorherigen Ansätzen immer auf eine Stunde festgelegt.

Tabelle 6: Nanodisk SRII Ansatz mit verlängerter Inkubationszeit

2µM SRII	20µM MSPD1E3	1,2mM POPC	Summe 500µl	0.05 % DDM	2h Ink.
----------	--------------	------------	-------------	------------	---------

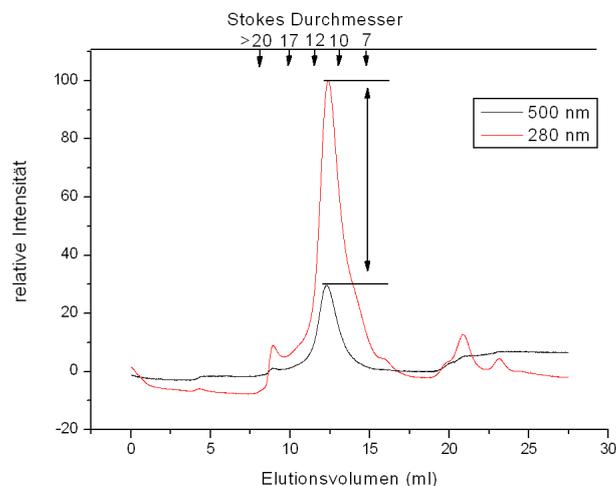


Abbildung 21: Chromatogramm der Gelfiltration des Ansatzes mit erhöhter Inkubationszeit, es wurde bei 280 und 500 nm gemessen

Der Ansatz (s. Tabelle 6) wird zwei Stunden inkubiert, eine Stunde mit Biobeads geschüttelt und direkt über Gelfiltration analysiert. Abbildung 21 zeigt das Chromatogramm des Ansatzes. Der Anteil der Aggregate ist deutlich verringert. Es zeigt sich wieder ein deutlicher Peak bei 12 ml Elutionsvolumen, welcher den gebildeten Nanodisks zuzuordnen ist. Aufgrund der deutlich höheren Absorption bei 280 nm ist davon auszugehen, dass sich noch ein Anteil leerer Disks in dem Peak befindet. Der SRII Einbau ändert das Elutionsvolumen nicht ausreichend, um die vollen von den leeren Disks zu trennen. Die höhere

Inkubationszeit wirkt sich positiv auf die Nanodisk Formation aus, die Ausbeute kann gesteigert werden.

4.6.4 Optimierung der Stöchiometrie

Da erreicht werden soll möglichst viel SRII in eine Nanodisk einzubauen, werden folgende Ansätze analysiert. SRII wird hier in einem 3:2 Verhältnis zum MSP eingesetzt.

Tabelle 7: Nanodisk Ansätze im Verhältnis SRII/MSP 3:2

30 μ M SRII	20 μ M MSPD1E3	1.2 mM POPC	Summe: 500 μ l	Inkubation: 1h
30 μ M SRII	20 μ M MSPD1E3	1.2 mM POPC	Summe: 500 μ l	Inkubation: 2h

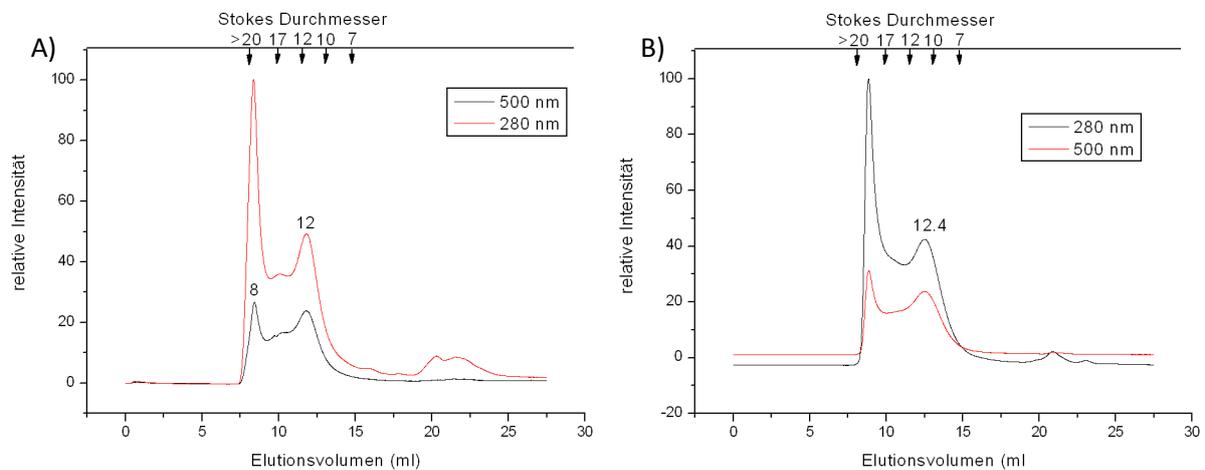


Abbildung 22: Chromatogramme der Gelfiltration der 3:2 Ansätze, A: 1h Inkubationszeit, B: 2h Inkubationszeit

Die Ansätze werden nach Tabelle 7 gemischt und nach Inkubation eine Stunde mit Biobeads geschüttelt. Die Analyse erfolgt über Gelfiltration. Abbildung 22 zeigt die Chromatogramme. In beiden Ansätzen entsteht ein großer Anteil aggregiertes Protein, sowohl MSP als auch SRII, was anhand der Absorption im Peak bei 8 ml zu erkennen ist. Der Nanodisk Peak bei 12 ml zeigt eine hohe Absorption bei 500 nm. Im Ansatz mit längerer Inkubationszeit sind nur zwei Peaks erkennbar. Der mittlere Peak kann vermieden werden. Dabei handelt es sich vermutlich um kleinere Aggregate, deren Bildung durch längere Inkubationszeit unterlassen wird. Im linken Chromatogramm errechnet sich über das Peak Integral eine Stöchiometrie von 3 SRII Molekülen pro Disk, im rechten von 4-5 SRII pro Disk. Durch den Überschuss an SRII werden keine leeren Disks gebildet.

4.6.5 Variation des Detergenz

Aus der Literatur geht hervor, dass eine Cholat Konzentration von mindestens 14 mM erforderlich ist (Bayburt et al. 2002). Dieser Wert liegt über der kritischen Mizell-Konzentration (9-12 mM). In den Folgenden zwei Ansätzen wird daher statt DDM Natriumcholat als Detergenz eingesetzt. Außerdem wird in allen weiteren Ansätzen das geschnittene MSPD1E3 verwendet. Leere Disks aus diesem MSP(-) haben ein leicht erhöhtes Elutionsvolumen von 12.9 ml, im Vergleich zu 12 ml des ungeschnittenen MSP.

Tabelle 8: 1:10 und 1:5 Ansätze mit Natrium Cholat als Detergenz

2µM SRII	20µM MSP(-)	2mM POPC	14 µM Natrium Cholat	Summe 500µl	2h Ink.
4µM SRII	20µM MSP(-)	2mM POPC	14 µM Natrium Cholat	Summe 500µl	2h Ink.

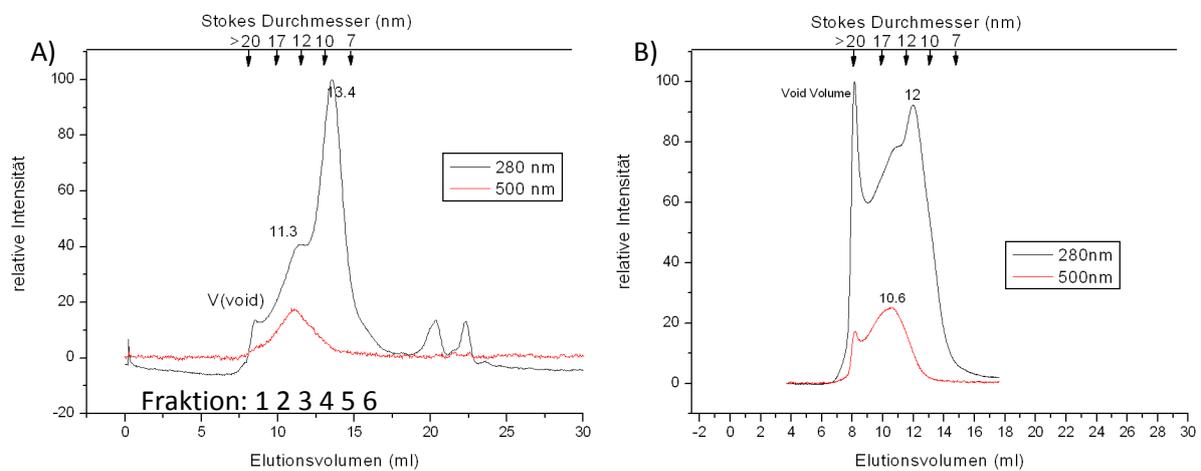


Abbildung 23: Chromatogramme der SRII Nanodisk Ansätze mit Natrium Cholat, die molaren Verhältnisse sind bei A: 1:10 und bei B: 1:5

Die Ansätze werden zwei Stunden inkubiert, eine Stunde mit Biobeads geschüttelt und sofort mittels Gelfiltration analysiert. Die Abbildung 23 zeigt die Chromatogramme der Ansätze. In der Analyse des 1:10 Ansatzes (A) erhält man 3 Absorptionsmaxima bei einer Wellenlänge von 280 nm, wobei nur der Peak bei 11.3 ml eine Absorption bei 500 nm zeigt und damit SRII beinhaltet. Der erste Peak bei 8 ml ist das Ausschussvolumen der Säule, Aggregate befinden sich normalerweise in diesem Peak, da sie mit der Lauffront eluieren. Im Chromatogramm A fällt dieser Peak klein aus. Der größte Peak ist bei einem Volumen von 13 ml zu erkennen. Dies entspricht dem Elutionsvolumen der leeren Disks. Im Peak bei 11 ml kann es sich also um reines SRII oder um SRII beladene Nanodisks handeln. Da reines SRII durch die Behandlung mit Biobeads Aggregate bildet die größer als 22µm sind und kleinere Aggregate mit der Lauffront nach 8 ml eluieren würden ist es sehr wahrscheinlich, dass SRII in Nanodisks eingebaut und von leeren Disks getrennt wurde. Dies kann an dem etwas höheren Elutionsvolumen des MSP(-) liegen und an dem Zusatz von weiteren Cholat. Die gesammelten 1 ml Fraktionen werden mittels SDS-PAGE analysiert.

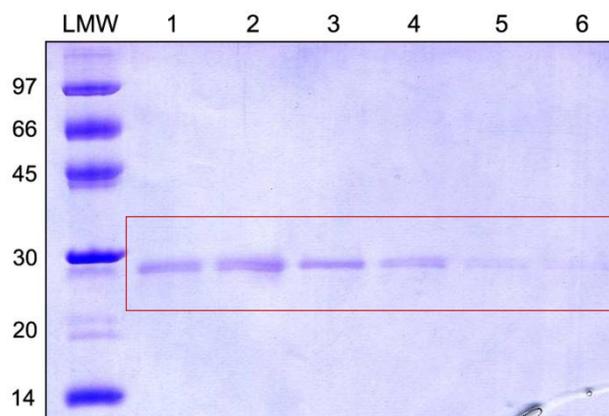


Abbildung 24: SDS-PAGE Analyse des 1:10 Ansatzes. Auf den Bahnen 1-6 ist je eine Probe aus den gesammelten 1ml Fraktionen beginnend beim Ausschussvolumen von 8 ml.

Da sich die Molmassen von SRII und MSP(-) nur um 1.5 kDa unterscheiden ist eine Auftrennung auf dem Gel nicht erkennen (siehe Abb. 24). Da „reines“ SRII aber nicht löslich ist handelt es sich bei den Banden der Fraktionen 2 und 3, welche im Chromatogramm Absorption bei 500 nm zeigen, vermutlich um eine Mischung der Proteine. Ausgehend von diesem Ergebnis ist zu erwarten, dass im 1:5 Ansatz wiederum drei Peaks auftreten, der SRII Disk Peak größer wird und der Peak der leeren Disks kleiner. Abbildung 23 zeigt das tatsächliche Ergebnis. Wie erwartet zeigen sich drei Peaks. Anhand der Absorption bei 500 nm im Ausschussvolumen ist zu erkennen, dass das SRII teilweise aggregiert ist. Daneben zeigen sich wieder zwei Peaks die den Nanodisks zuzuordnen sind. Das Verhältnis von A280 zu A500 ist hier deutlich höher. Es werden immer noch mehr leere Disks als SRII gebundene Nanodisks gebildet.

4.6.6 SRII-Nanodisk Produktion für die Messung des Photozyklus

Zusammenfassend zeigt sich, dass SRII Nanodisks nur sauber hergestellt werden können, wenn ein Überschuss SRII eingesetzt wird. Aggregate lassen sich mit der Superdex 200 Säule abtrennen und leere Disks werden nicht gebildet. Daher wird für die Messung des Photozyklus ein größerer Ansatz mit einem Überschuss SRII angefertigt. Es können 500 µl SRII Nanodisks mit einer OD bei 500 nm von 1 hergestellt werden. Diese Probe wird für die Messung des Photozyklus und der UV-Vis Analyse verwendet.

4.7 Einbau des Photorezeptorkomplexes SRII/HtrII in Membran Nanodisks

In diesem Abschnitt der Arbeit ist das Ziel den gesamten Photorezeptorkomplex aus *Natronomonas pharaonis* in Nanodisks einzubauen. Der Komplex besteht aus SRII und HtrII und liegt im nativen Zustand als 2:2 Komplex vor. Der Einbau soll wenn möglich als Trimer von Dimer Struktur erfolgen um einen Vergleich mit den struktur Homologen bakteriellen Chemorezeptoren anstellen zu können. Für diese existieren mehrere Studien die belegen, dass die Signalweiterleitung durch Trimere von Dimeren ausgeführt wird.

4.7.1 Optimierung der Nanodiskformation mit eingebautem Komplex

Es wird als erstes das Verhältnis Komplex-MSP 1:10 gewählt.

Tabelle 9: Nanodisk Ansatz für den Einbau des Komplexes

2µM Komplex	20µM MSP(-)	2mM POPC	14mM Cholat	Summe 500µl
-------------	-------------	----------	-------------	-------------

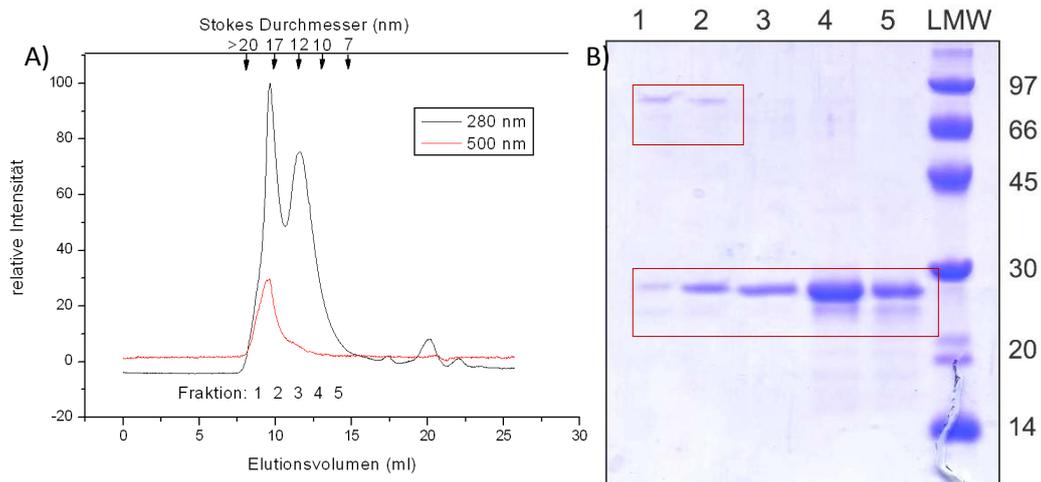


Abbildung 25: A: Chromatogramm der Gelfiltration über eine Superdex 200 Säule, es wurde die Absorption bei 280 und 500 nm gemessen; B: Analyse der Fraktionen 1-5 über SDS-PAGE

Der Ansatz wird wie in Tabelle 9 beschrieben gemischt, zwei Stunden inkubiert, eine Stunde mit Biobeads geschüttelt und dann sofort mittels Gelfiltration analysiert. In Abbildung 25 A ist das Chromatogramm dargestellt. Es sind zwei Peaks bei einer Wellenlänge von 280 nm zu erkennen, wobei nur der Peak bei ca. 9 ml Elutionsvolumen eine Absorption bei 500 nm zeigt und damit SRII enthält. Da es sich beim ersten Peak normalerweise um die Lauffront handelt kann man davon ausgehen, dass die gebildeten Strukturen nicht mit der Säule wechselwirken. Beim zweiten Peak handelt es sich um leere Disks. Die Fraktionen 1-5 werden auf einem SDS- Gel analysiert, welches in Abb.25 B gezeigt ist. In allen Fraktionen ist das MSP(-) enthalten (29 kDa). Dadurch wird bestätigt, dass es sich bei dem zweiten Peak (12 ml) um leere Nanodisks handelt. Wie erwartet zeigen sich in den ersten zwei Fraktionen die Komplexproteine SRII (27 kDa) und HtrII (80 kDa). Die Komplexbildung wird

durch die Denaturierung mit SDS aufgelöst. Da sich die Fraktionen im Ausschussvolumen befinden ist noch kein Beweis für den Einbau des Photorezeptors erbracht. Es kann sich ebenso um Aggregate der Komplexproteine und des MSP(-) handeln. Zur weiteren Analyse wird die dynamische Lichtstreuung verwendet. Die Messungen gaben aber keine diskutierbaren Ergebnisse, was für eine Aggregation spricht.

4.7.2 Optimierung der Stöchiometrie

Zum Vergleich werden Proben mit erhöhter Konzentration des SRII/HtrII Komplex angesetzt. Es werden die Proteine in molaren Verhältnissen von 1:2 und 1:1 eingesetzt.

Tabelle 10: Komplex-Nanodisk Absätze mit molaren Verhältnissen 1:2 und 1:1

10µM Komplex	20µM MSP(-)	2mM POPC	14mM Cholat	Summe: 250 µl
20µM Komplex	20µM MSP(-)	2mM POPC	14mM Cholat	Summe: 250 µl

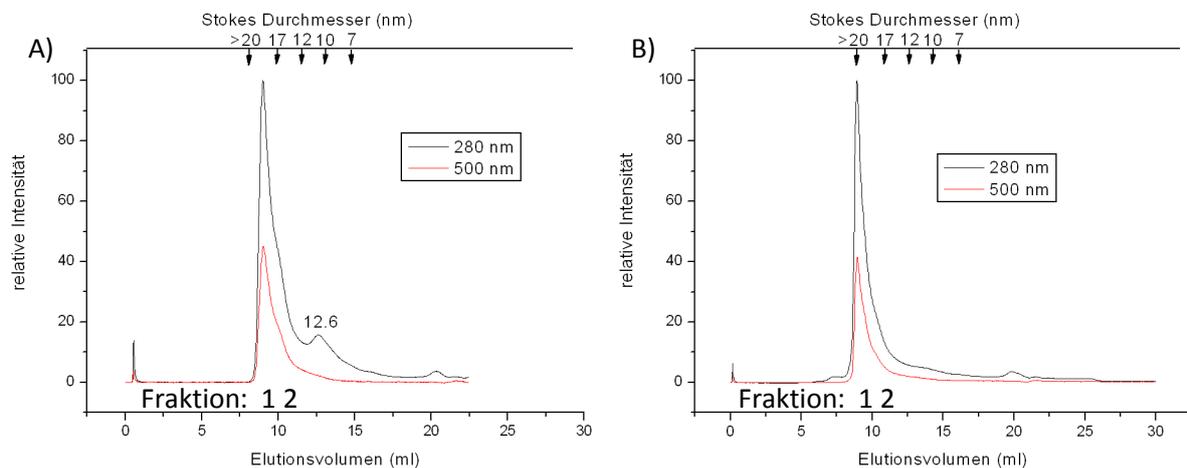


Abbildung 26: Chromatogramme der Gelfiltration der 1:2 (A) und 1:1 (B) Ansätze über eine Superdex 200 Säule, es wurde die Absorption bei 280 und 500 nm

Die Komponenten für die Nanodiskformation werden nach Tabelle 10 gemischt, zwei Stunden inkubiert, eine Stunde mit Biobeads geschüttelt und sofort über Gelfiltration analysiert. Abbildung 26 zeigt die Chromatogramme der Gelfiltration der Ansätze. Im 1:2 Ansatz zeigt das Chromatogramm (A) zwei Peaks, wobei der erste und größte Peak im Ausschussvolumen der Säule liegt. Nur dieser Peak besitzt ein Absorptionsmaximum bei 500 nm. Der Peak bei 12 ml Elutionsvolumen deutet anhand des Elutionsvolumen und der fehlenden Absorption bei 500 nm darauf hin, dass leere Nanodisks gebildet wurden. Im 1:1 Ansatz (Chromatogramm B) zeigt sich nur noch ein einziger Peak, dieser ist im Ausschussvolumen der Säule. Es werden keine leeren Disks mehr gebildet. Ob es sich im ersten Peak um Nanodisks oder Aggregate handelt ist anhand des Chromatogramms nicht ersichtlich, da der Stokes Radius der Komplex beladenen Nanodisks bisweilen nicht bekannt ist. Die jeweils ersten zwei Fraktionen der Ansätze werden mittels SDS-PAGE analysiert.

Das Gel ist in Abbildung 27 dargestellt. Wie erwartet zeigen sich in den Fraktionen eine deutliche Bande bei ca. 80 kDa, wobei es sich um den Transducer handelt, sowie bei ca. 29 kDa wobei es sich um das MSP(-) handelt. Das SRII kann nicht detektiert werden, da es keinen ausreichenden Größenunterschied zwischen SRII und MSP gibt.

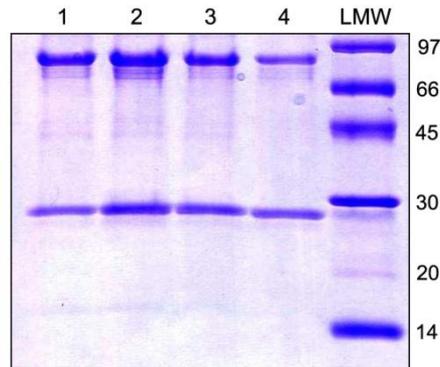


Abbildung 27: SDS-PAGE der Ansätze, auf Bahnen 1 und 2 sind die Fraktionen 1 und 2 des 1:2 Ansatzes (Abb. 26 A) aufgetragen, Bahnen 3 und 4 enthalten die Fraktionen 1 und 2 des 1:1 Ansatzes (Abb. 26 B)

4.7.3 Variation der Lipide

Um auszuschließen, dass POPC als Membranlipid inkompatibel mit dem Komplex ist wird zum Vergleich ein Nanodisk Ansatz mit isolierten Lipiden aus dem Ursprungsorganismus *Natronomonas pharaonis* angesetzt. Damit soll für den Photorezeptor eine natürliche Umgebung geschaffen werden. Die isolierten Lipide werden dazu in 50 mM Tris, 100 mM DDM pH 7.5 aufgenommen. Eine genaue Konzentrationsbestimmung ist nicht möglich, da es sich um eine Lipidmischung mit bislang ungeklärter Zusammensetzung handelt.

Tabelle 11: Komplex Ansatz mit *Np*Lipiden

10µM Komplex	15µM MSP(-)	15µl <i>Np</i> Lipide (30 mg/ml)	Summe :500µl
--------------	-------------	----------------------------------	--------------

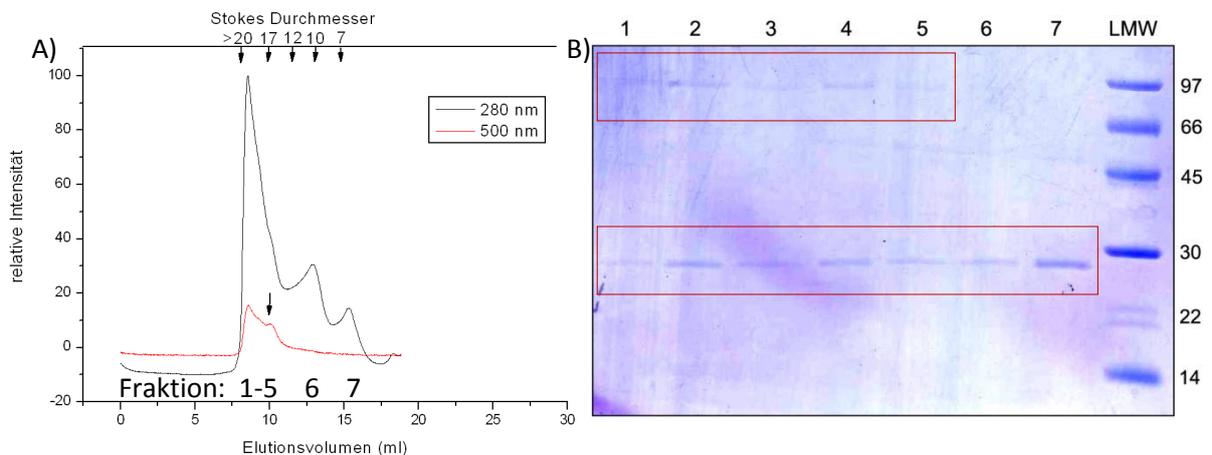


Abbildung 28: A: Nanodisk Komplex Ansatz mit *Np*Lipiden, Chromatogramm der Gelfiltration über eine Superdex 200 Säule, es wurde die Absorption bei 280 und 500 nm gemessen B: SDS-PAGE der Fraktionen der aus A

Die Komponenten werden wie in Tabelle 11 beschrieben zusammengefügt, zwei Stunden inkubiert und eine Stunde mit Biobeads geschüttelt. Die Analyse erfolgt über Gelfiltration. Das Chromatogramm ist in Abbildung 28 dargestellt. Es zeigen sich vier Peaks bei 280 nm mit abfallender Intensität. Peak 1 und 2 zeigen ebenfalls eine Absorption bei 500 nm. Die Peaks werden mittels SDS-PAGE analysiert. Das Coomassie Blau gefärbte Gel ist in Abbildung 28 B gezeigt. Das MSP(-) mit einem Molekulargewicht von 29 kDa ist in allen aufgetragenen Fraktionen enthalten. Das HtrII ist in den Fraktionen 1-5 enthalten. Es kann nicht mit Sicherheit gesagt werden ob sich Nanodisks gebildet haben. Bei Fraktion 6 handelt es sich um leere Disks, bei Fraktion 7 um monomeres MSP. Der Einsatz von *Np*Lipiden brachte bei diesem Ansatz keine Verbesserung.

4.7.4 Variation des Detergenz

Es werden noch weitere Proben mit hohen Konzentrationen des Komplexes angesetzt, dabei wird der Einfluss des Detergenz betrachtet und versucht die Nanodisk Formation der Aggregation vorzuziehen. Da sich der Stokes Radius der Nanodisks mit eingebautem SRII nicht ändert wird davon ausgegangen das auch durch den Einbau des Komplexes keine große Änderung im Elutionsvolumen der Nanodisks zu beobachten ist.

Tabelle 12: Nanodisk Komplex Ansätze mit variierten Parametern

10µM Komplex	20µM MSP(-)	2mM POPC	14 mM Cholot	Summe: 500µl
10µM Komplex	20µM MSP(-)	2mM POPC	0.1% DDM	Summe: 500µl

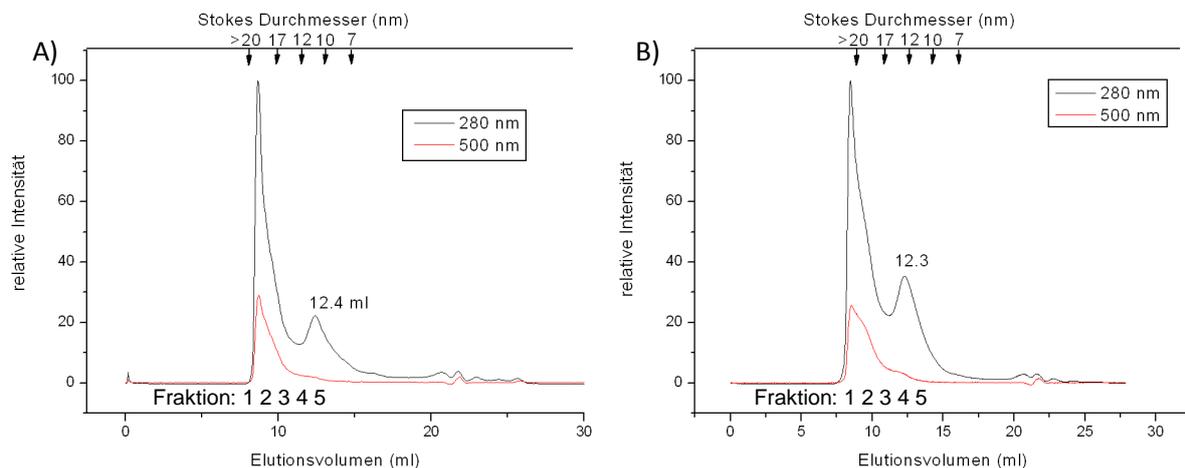


Abbildung 29: Chromatogramme der Gelfiltration über Superdex 200 Säule

Die Proben nach Tabelle 12 werden eine Stunde bei 4°C inkubiert, dann nach und nach Biobeads zugegeben bis zweidrittel des Ansatzvolumens erreicht sind. Die Ansätze werden weiter über Nacht bei 4°C geschüttelt und am nächsten Tag über Gelfiltration analysiert. Die Chromatogramme der Ansätze sind in Abbildung 29 dargestellt. Das molare Verhältnis von SRII/HtrII zum MSP ist in beiden Ansätzen 1:2. Sie unterscheiden sich von vorherigen

Ansätzen im Gesamtvolumen und der Zeit der Bio-Bead Inkubation. Es wird der Einfluss des Detergenz analysiert. Anstatt zusätzlichem Cholat ist im Ansatz B) N-Dodecyl-Maltosid hinzugefügt, das Detergenz was für die Rezeptor/Transducer Aufreinigung verwendet wird. In beiden Analysen sind zwei Peaks bei 280 nm erkennbar, wobei es sich im ersten um das Ausschussvolumen handelt. Die Kurve der Absorptionsmessung bei 500 nm zeigt aber auch im Nanodisk Peak bei 12 ml ein kleines Maximum. Hierbei kann es sich um SRII oder den SRII/HtrII Komplex in Nanodisks handeln. Dabei kommt die neue Frage auf, ob sich wirklich nur ein sehr geringer Anteil beladen wird oder ob ein die große Menge beladener Disks im Ausschussvolumen eluiert. Die Wahl des Detergenz hat keinen Einfluss auf das Ergebnis. Zur Kontrolle wird ein SDS-PAGE Gel angefertigt, was in Abbildung 30 gezeigt ist. Es sind Fraktion 1 und 5 des Chromatogrammes (Abb. 29 A) sowie Fraktionen 1,3 und 5 des rechten Chromatogrammes (Abb. 29 B) aufgetragen. Wie erwartet zeigen sich in Fraktion 1 (Bahn 1 und 3) sowohl MSP als auch Transducer Banden. Bei Fraktion 5 kann bestätigt werden, dass es sich um leere Disks handelt, da nur MSP nachgewiesen wird. Die Fraktionen 1 und 3 des rechten Chromatogramm zeigen auf dem Gel keinen Unterschied. In diesen Ansätzen kann also keine Abtrennung der beladenen Nanodisks von Aggregaten aber von leeren Disks erreicht werden.

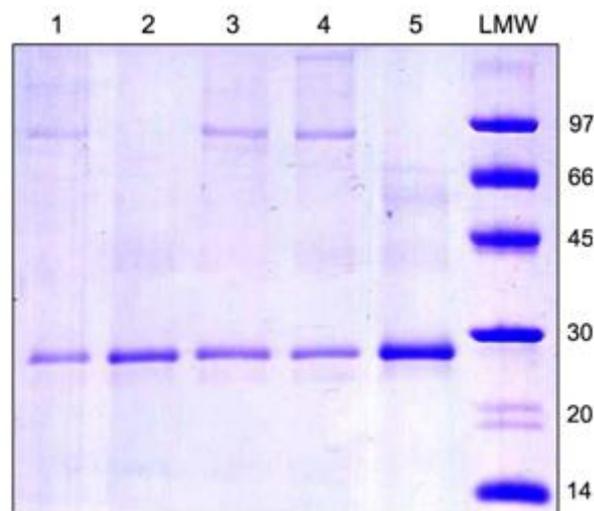


Abbildung 30: SDS-PAGE Kontrolle der Fraktionen aus der Gelfiltration. Bahnen 1,2: Fraktionen 1 und 2 aus Chromatogramm 29A, Bahnen 3,4,5: Fraktionen 1,3,5 aus Chromatogramm 29B

4.7.5 Verifikation der Nanodiskformation mit eingebautem Komplex

4.7.5.1 Dynamische Lichtstreuung

Bevor weitere Ansätze gemacht werden muss an dieser Stelle kontrolliert werden, ob überhaupt eine Nanodiskformation erreicht wird oder es sich nur um Aggregate handelt. Wenn Nanodisks nachgewiesen werden, muss eine alternative Aufreinigungsmethode gewählt werden. Dazu wird eine Analyse mit dynamischer Lichtstreuung und Elektronenmikroskopie verwendet. Für die DLS werden die Fraktionen 1 und 4 des Ansatzes mit Cholat (Abb. 29 A), sowie 3 und 5 des Ansatzes mit DDM (Abb. 29 B) verwendet. Tabelle 13 zeigt die durch DLS ermittelten Stokes Radi und Molekulargewichte.

Tabelle 13: Gemessene Radi und Molekulargewichte der Fraktionen mit DLS

Ansatz. / Fraktion	Radius (nm)	Molekulargewicht (kDa)
29A/ 1	9.3	622
29A / 4	4	84
29B / 3	9.4	638
29B / 5	5.8	210

Die berechnete Masse von Trimer von Dimer Nanodisks beträgt ungefähr: $6 \times 80 \text{ kDa}$ (HtrII) + $6 \times 27 \text{ kDa}$ (SRII) + $2 \times 30 \text{ kDa}$ (MSPD1E3) + ca. $50 \times 0,74 \text{ kDa}$ (POPC) = 740 kDa . Die Messwerte aus 29A/1 sowie 29B/3 zeigen wie erwartet ein hohes Molekulargewicht, das mit 622 kDa Nanodisks aber keineswegs ausschließt. Der Radius von 9.3 nm entspricht einem Stokes Durchmesser von 18.6 . Der Einbau des Komplexes vergrößert damit den Stokes Radius der Nanodisks um ca. 4 nm . Die Fraktionen 29A/4 und 29B/5 enthalten deutlich kleinere Strukturen. Es handelt sich anhand des Geles um MSP(-) und daher um leere Nanodisks. Der für 29B/5 gemessene Durchmesser von 11.6 nm entspricht ziemlich exakt dem Literaturwert für leere Nanodisks die aus MSPD1E3 gebildet werden (Denisov et al. 2004). Der Unterschied im Messwert der zwei Fraktionen ist auf den Konzentrationsunterschied zurückzuführen, welcher auch anhand des Geles erkennbar ist.

4.7.5.2 Elektronenmikroskopie

Zusätzlich werden einige Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop gemacht. Ausschnitte der Aufnahmen sind in Abbildung 31 gezeigt.

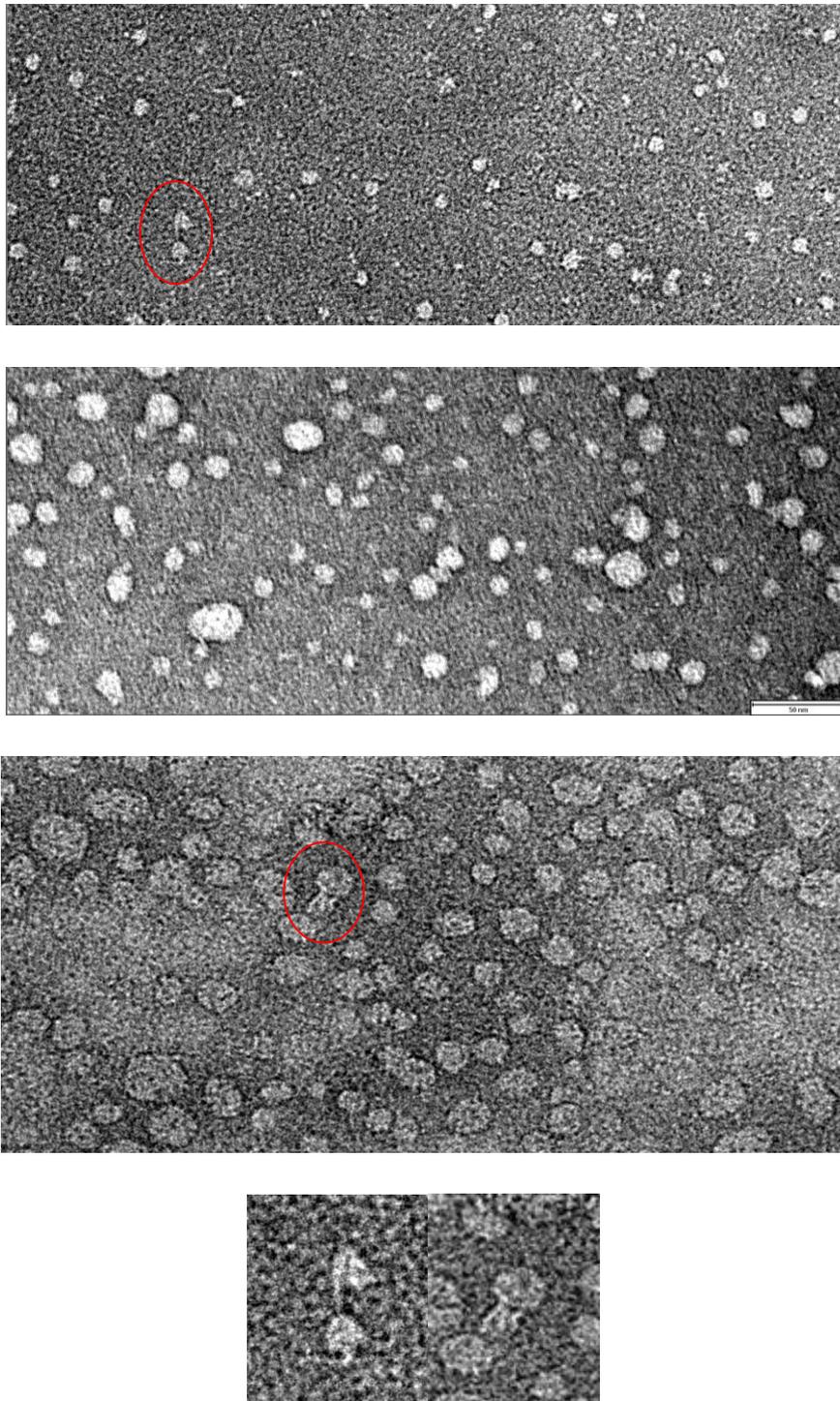


Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Komplexes in Detergenz (Oben) und in Nanodisks

Die obere Abbildung zeigt den Komplex in Detergenzien unmittelbar nach der Aufreinigung über Gelfiltration. Es zeigen sich kleine runde Fragmente mit einem geschätzten Durchmesser von 5 nm. Im rot markierten Bereich ist eine deutliche Struktur des Transducers HtrII zu erkennen. Dieser ist an eine andere kompakte Struktur gebunden, was die Komplexbildung bestätigt. Anhand des Bildes ist sowohl eine 1:1 als auch eine 2:2 Stöchiometrie des Komplexes möglich. Das nächste Bild zeigt eine Fraktion aus dem Ausschussvolumen von einem der Nanodisk Komplex Ansätze. Es sind deutlich zwei unterschiedliche Strukturen erkennbar. Ein etwas kleineres Fragment, wobei es sich um den reinen Komplex handelt und zusätzlich größere Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 12 nm wobei es sich eindeutig um Nanodisks handelt. Eine weitere Aufnahme zeigt in rot markiert deutlich eine Nanodisk mit eingebauten Transducer Molekülen. Es ist bekannt, dass sich das HtrII mehrere Nanometer ins Cytoplasma erstreckt. Anhand dieses Bildes ist auch eine Aussage über die Stöchiometrie machbar. Es ist deutlich zu erkennen, dass es sich um 3 Fragmente handelt. Da der Photorezeptor nativ einen 2:2 Komplex bildet kann hier gezeigt werden, dass es sich also um Trimere von Dimeren handelt. Dieses Ergebnis spricht für die Theorie, dass der Photorezeptor in nativer Umgebung eine Trimer von Dimer Formation annimmt. Der Komplex in Detergenzien und in Nanodisk ist im unteren Bild noch einmal im direkten Vergleich dargestellt.

Die Ergebnisse der DLS als auch der Elektronenmikroskopie zeigen, dass eine Nanodiskformation, sowie der Einbau von Komplex Trimeren funktioniert. Das Problem liegt also bei der Aufreinigung, welche daher noch optimiert werden muss.

4.7.6 Optimierung der Aufreinigung: 1. Affinitätschromatografie

In den Folgenden zwei Ansätzen wird versucht über Nickel NTA Affinitätschromatografie belegte Nanodisks von evtl. gebildeten leeren Disks zu trennen.

Tabelle 14: Ansätze Komplex Nanodisks zur Aufreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie

2µM Komplex	20 µM MSP(-)	2 mM POPC	14 mM Cholat	Summe 500 µl
2µM Komplex	20 µM MSPBlue	2 mM POPC	14 mM Cholat	Summe 500 µl

Die Proben nach Tabelle 14 werden 2 Stunden inkubiert und eine Stunde mit Biobeads geschüttelt. Danach werden die Proben auf eine äquilibrierte Ni-NTA Säule an einem FPLC System gegeben. Die entstandenen Spektren sind in der nachfolgenden Abbildung gezeigt.

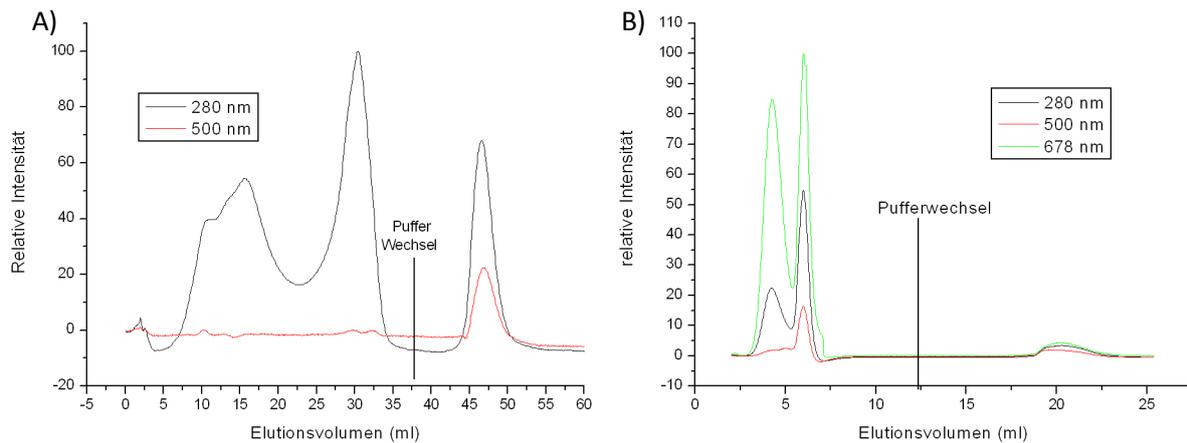


Abbildung 32: Ergebnis der Komplex Aufreinigung über Ni-NTA, A: 1:10 Ansatz mit MSP, B: 1:10 Ansatz mit MSP-S18C, es wurde die Absorption bei 280 nm, 500nm und 678 nm gemessen

Die Säule wird über 35 ml mit 30 mM Imidazol Puffer gewaschen bis die Absorption bei 280 nm wieder die Basislinie erreicht hat. Ist dies erreicht wird der Puffer zu einem 300 mM Imidazol Puffer gewechselt. Bis zum Pufferwechsel ist keine Absorption bei 500 nm gemessen. Die deutlichen Peaks bei 280 nm Wellenlänge zeigen das Proteine von der Säule eluieren und eine Aufreinigung des Komplexes stattfindet. Nach dem Pufferwechsel ist ein Peak bei 500 nm zu erkennen, was eine erfolgreiche Aufreinigung der Komplex Nanodisks vermuten lässt. Zur besseren Analyse wird derselbe Ansatz mit dem blau gefärbten Membran Scaffold Protein durchgeführt. Der gebundene tiefblaue Farbstoff hat einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten und ist mit bloßem Auge bis zu geringen Konzentrationen nachweisbar. Im Chromatogramm B) ist nur ein sehr geringer Peak bei 500 und 678 nm nach dem Pufferwechsel sichtbar, der Großteil eluiert bereits im Durchfluss. Dies deutet darauf hin, dass die gebildeten Nanodisks ineffizient mit der Säule wechselwirken. Man kann eine Trennung erreichen, aber mit einer sehr geringen Ausbeute. Vermutlich ist durch die Lipid Doppelschicht die Zugänglichkeit der Poly-Histidin Sequenzen verringert. Außerdem hat diese Methode den Nachteil, dass theoretisch die leeren Disks aber keine Aggregate der Membranproteine abgetrennt werden können, da diese genauso über einen His-Tag verfügen. Da bei Ansätzen mit höheren Proteinkonzentrationen, welche gebraucht werden um Trimere von Dimeren einzubauen, sicherlich Aggregation zu beobachten ist, ist die Aufreinigung der mit SR1I/HtrII-Komplex beladenen Disks über Nickel Affinitätschromatographie nicht die optimale Methode.

4.7.7 Optimierung der Aufreinigung: 2. Gelfiltration

Für die weiteren Ansätze wird daher eine andere Säule zur Größenausschlusschromatografie verwendet. Die Superdex 200 Säule (Ge), die bisher verwendet wurde hat einen Trennbereich der optimiert ist für Fragmente bis 600 kDa. Die in folgenden Versuchen verwendete Superose 6 Säule (Ge) hat einen Trennbereich für Fragmente bis zu 1000 kDa. Es werden folgende Ansätze vermessen:

Tabelle 15: Ansätze Komplex Nanodisks zur Aufreinigung über eine Superose 6 Säule

20 μ M MSP(-)	6 μ M Komplex	6 mM POPC	20 mM Cholat	Summe: 500 μ l
20 μ M MSP(-)	6 μ M Komplex	2 mM POPC	14 mM Cholat	Summe: 500 μ l

Die Proben werden wie in Tabelle 15 beschrieben angesetzt. Dann über zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und für drei bis vier Stunden mit Biobeads geschüttelt. Die Aufreinigung erfolgt mit der Superose 6 Säule. Die gemessenen Chromatogramme sind in den nachfolgenden Abbildungen gezeigt.

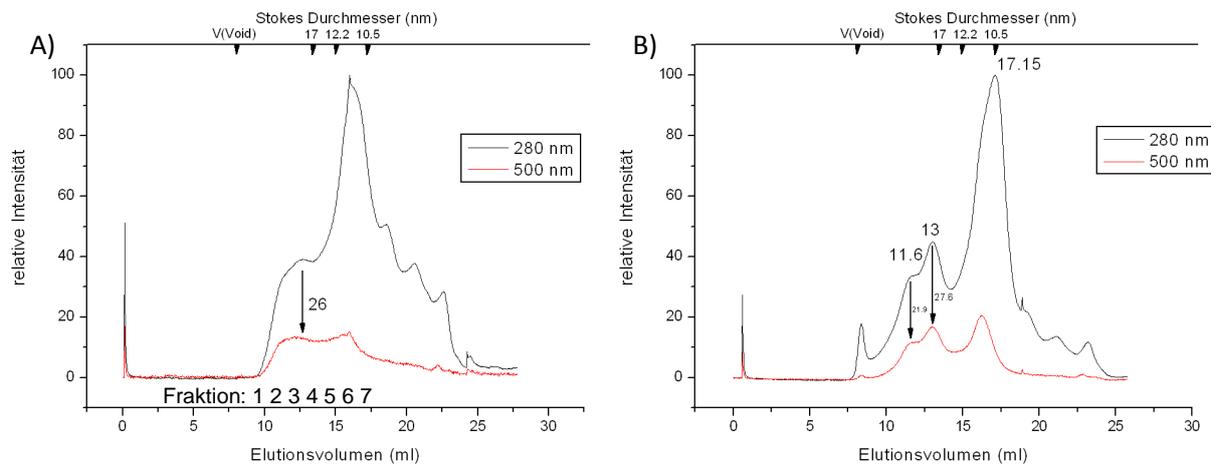


Abbildung 33: Chromatogramme der Ansätze nach Gelfiltration über eine Superose 6 Säule, es wurde die Absorption bei 280 nm und 500 nm

Im Chromatogramm A) zeigen sich zwei Peaks bei einer Absorption von 500 nm. Keiner der Peaks ist im Ausschussvolumen der Säule, was zeigt, dass diese Säule besser für die Aufreinigung geeignet ist. Anhand des Elutionsvolumen können die Stokes Durchmesser abgeschätzt werden. Dies erfolgt mit Hilfe eines Proteinstandards, dessen Elutionsvolumen und Stokes Durchmesser in den Chromatogrammen eingezeichnet sind. Der Peak enthält Moleküle mit einem Stokes Durchmesser von ca. 19 nm, der zweite Peak entspricht ca. 11.7 nm Fragmenten. Der Wert von 11.7 nm entspricht den leeren Nanodisks, da aber auch hier deutliche Absorption bei 500 nm detektiert wird handelt es sich um eine unreine Komplex Probe, die auch noch ungebundenes SRII enthält was in Nanodisks eingebaut wird. Eine

analytische Gelfiltration der Komplex Probe bestätigt dies. Der Stokes Durchmesser von 19 nm entspricht den Komplex Disks, die hier von leeren Disks und SRII Disks, die als Nebenprodukt anfallen, getrennt werden können. Dieser Wert bestätigt die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung. Das Ergebnis wird mittels SDS-PAGE kontrolliert. Auf dem Gel sind die Fraktionen 1-7 des Chromatogramms A) aufgetragen.

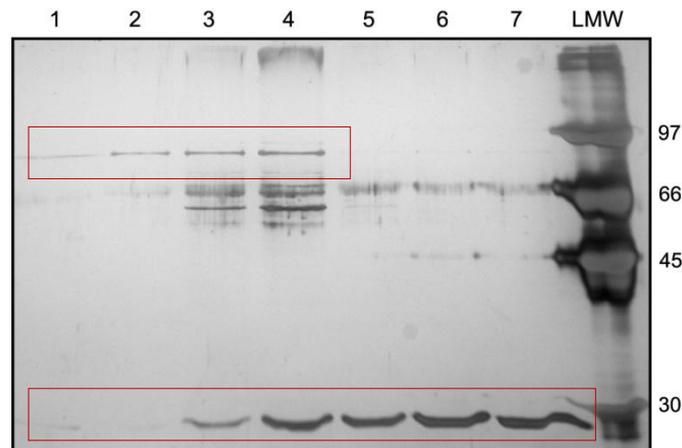


Abbildung 34: Silber gefärbtes SDS-PAGE Gel zur Analyse der Trennung von Komplex Nanodisk und leeren Disks. Die im Bereich von 80 kDa markierten Banden entsprechen dem HtrII. Die markierten Banden im Bereich von 29 kDa entsprechen dem MSP(-).

Banden des Transducers sind nur auf den ersten 4 Bahnen sichtbar, während das MSP in allen Bahnen detektiert wird. Es kann daher gezeigt werden, dass die Aufreinigung von Komplex integrierten Nanodisks über eine Superose 6 Säule erfolgreich ist.

Das rechte Chromatogramm B) zeigt einen Ansatz indem die Lipidkonzentration verringert wurde (s. Tabelle 16). Der deutlichste Peak ist in beiden Chromatogrammen der der leeren bzw. SRII Disks. Auffällig ist, dass im zweiten Chromatogramm sich ein weiterer Peak bei einem Elutionsvolumen von 11.6 ml gebildet hat. Dabei könnte es sich um Nanodisks unterschiedlicher Stöchiometrien handeln. Wie im Chromatogramm verdeutlicht sind die Verhältnisse der Absorptionen bei 280 nm zu 500 nm in den Peaks leicht unterschiedlich, was auf einen unterschiedlichen SRII Gehalt hinweist. Allerdings würde sich der Stokes Durchmesser wahrscheinlich nicht deutlich ändern wenn ein oder mehrere Komplex Moleküle pro Disk eingelagert sind. Da aber Disks die nur das SRII enthalten später eluieren und die Formation anderer löslicher Fragmente als Nanodisks in dieser Größenordnung unwahrscheinlich ist handelt es sich vermutlich dabei um Zusammenlagerungen mehrerer Komplex Disks. Zum Beispiel ist eine Wechselwirkung der Cytoplasmatischen Transducer Domänen vorstellbar. Zwischen den Chromatogrammen gibt es noch einen Unterschied. In dem Ansatz mit weniger Lipiden entstehen weniger Nebenprodukte, was deutlich an der Absorption bei 280 nm in dem Bereich von 18 – 25 ml Elutionsvolumen zu erkennen ist. Da in diesen beiden Ansätzen noch deutlich mehr leere Disks gebildet werden, wird in den

folgenden Ansätzen die MSP Konzentration verringert um einen möglichst ergiebigen Komplex Einbau zu erreichen.

4.7.7.1 Optimierung der Ausbeute

Tabelle 16: Ansätze für Komplex Nanodisks mit verringertem MSP Anteil

15 μ M MSP(-)	10 μ M Komplex	2 mM POPC	20 mM Cholat	Summe: 500 μ l
10 μ M MSP(-)	10 μ M Komplex	2 mM POPC	14 mM Cholat	Summe: 500 μ l

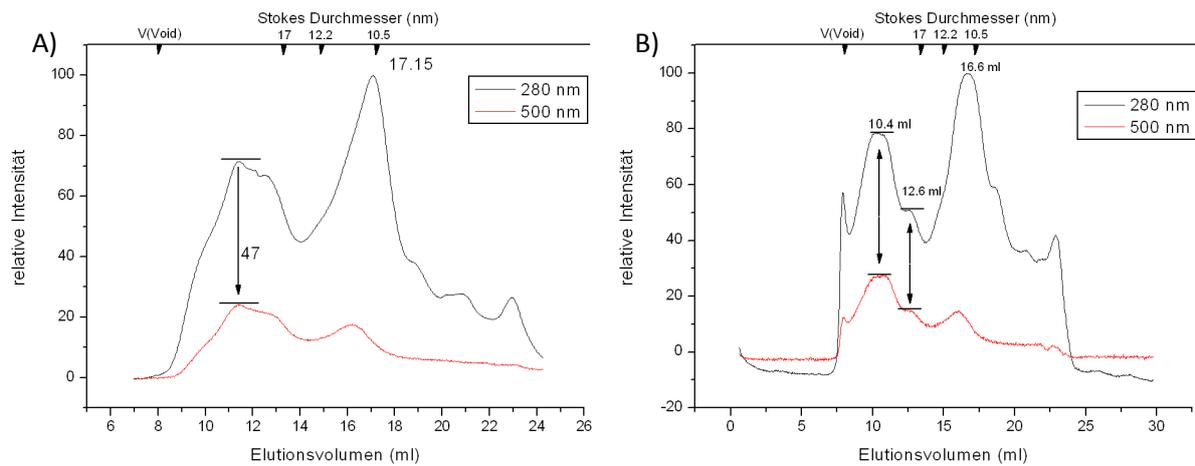


Abbildung 35: Chromatogramme der Gelfiltration über eine Superose 6 Säule, es wurde die Absorption bei 280 und 500 nm gemessen, Molare Verhältnisse Komplex/MSP, A: 2:3, B: 1:1

Durch die Verringerung der MSP Konzentration verringert sich die Ausbeute an Komplex beladenen Nanodisks nicht. Man erkennt immer noch einen großen Anteil an leeren bzw. SRII gebundenen Nanodisks. Allerdings kann im linken Ansatz der Unterschied von 10:5 (s.o.) auf 10:7 und darauf sogar auf 10:8 verbessert werden. Wie auch im vorherigen Ansatz sind hier je zwei Peaks im Elutionsbereich der Komplex Nanodisks zu erkennen. Durch die veränderten Konzentrationen wird allerdings der Peak bei ca. 11 ml stärker ausgebildet als zuvor, wobei der Peak bei 13 ml konstant bleibt. Entweder werden mehr Nanodisks mit mehreren eingebauten Komplexen gebildet, oder durch die höhere Konzentration gebildeter Komplex Disks entstehen vermehrt Zusammenlagerungen von mehreren Disks, welche etwas früher von der Säule eluieren.

Als nächster Parameter werden die Lipide variiert. Für den folgenden Ansatz werden die isolierten polaren Lipide aus *Natronomonas pharaonis* verwendet.

Tabelle 17: Ansatz Komplex Nanodisk mit *Np*Lipiden

15 μ M MSP(-)	10 μ M Komplex	15 μ l <i>Np</i> Lipide	10 mM Cholat	Summe: 500 μ l
-------------------	--------------------	-----------------------------	--------------	--------------------

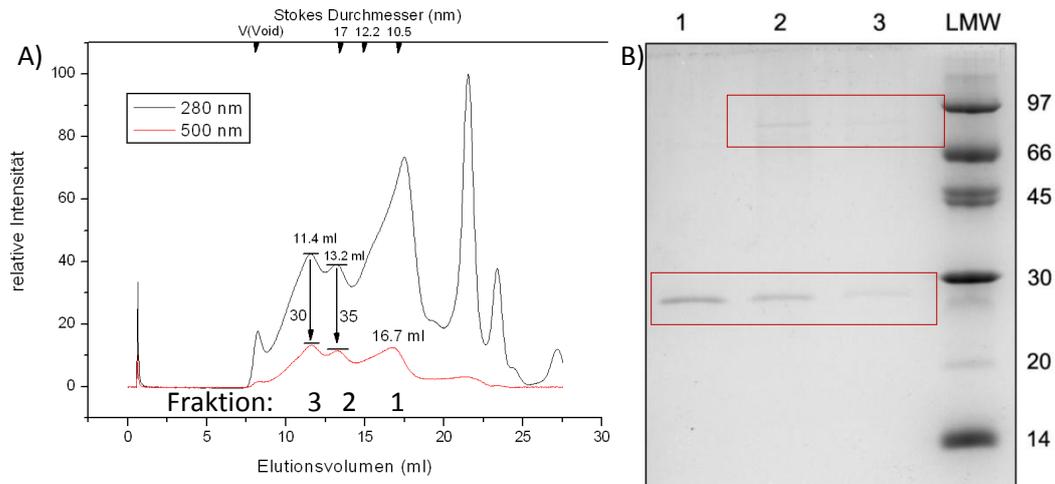


Abbildung 36: A: Chromatogramm des Ansatzes, Gelfiltration über Superose 6 Säule, B: Analyse der Fraktionen der Gelfiltration über SDS-PAGE

Abgesehen von den Nebenprodukten die beim Einsatz von *Np*Lipiden bereits vorher beobachtet wurden (s. 4.7.3) zeigt sich im hier abgebildeten Chromatogramm ein ähnliches Ergebnis wie in den vorherigen Ansätzen. Die zwei Peaks bei 500 nm die den Komplex Nanodisks zugesprochen werden sind hier allerdings besser getrennt und können über eine SDS-PAGE analysiert werden. Das Gel ist in Abbildung 36 B) gezeigt. In beiden Fraktionen 2 und 3 sind sowohl der Transducer als auch das MSP und SRII, welche auf dem Gel nicht getrennt werden. Anhand der Differenz der relativen Intensitäten von A₂₈₀ – A₅₀₀ von 30 Absorptionseinheiten im Vergleich zu 35 Absorptionseinheiten im zweiten Peak und des geringeren Elutionsvolumens kann gefolgert werden, dass in dieser Fraktion mehr Komplex eingebaut ist, diese Abschätzung bezieht sich allerdings nur auf das SRII. Eine Näherung zur Transducer Konzentration ist damit noch nicht erbracht. Da das HtrII keine spezifische Absorption besitzt und auch nur eine sehr geringe Absorption bei 280 nm hat erfolgt die Abschätzung des Verhältnisses MSP/HtrII über das Gelbild (36 B). Dazu wird ein Referenz Gel erstellt worauf Komplex und MSP in verschiedenen molaren Verhältnissen gemischt und aufgetragen werden. Da Nanodisks auf SDS Gelen wieder zerstört werden, kann man anhand der Intensität der HtrII im Verhältnis Bande zur MSP Bande eine Aussage über die Stöchiometrie machen. Das Referenzgel ist in Abbildung 37 gezeigt. Es sind die molaren Verhältnisse MSP-Komplex 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 von links nach rechts aufgetragen.

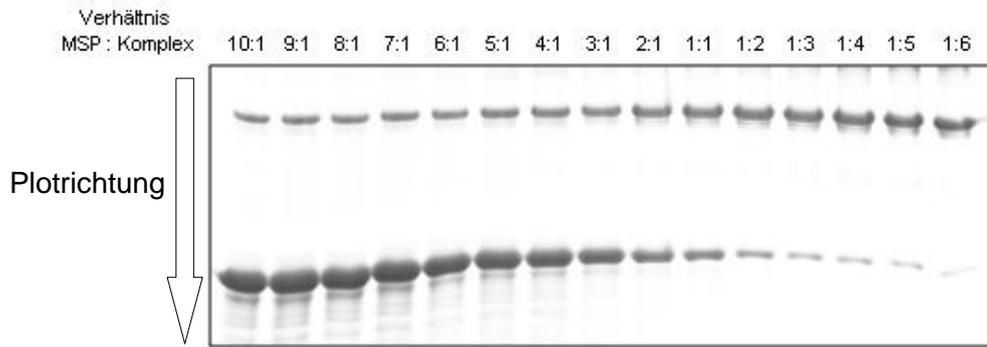


Abbildung 37: Referenzgel zur Abschätzung der Stöchiometrie, es sind MSP/Komplex Mischungen mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen aufgetragen

Mit Hilfe der Software ImageJ werden die Bahnen geplottet und die Bandenintensitäten, welche mit den molaren Verhältnissen korrelieren, grafisch dargestellt. Man erhält einen Graphen der die Farbintensitäten innerhalb der einzelnen Gel Bahnen in Plotrichtung beschreibt, das heißt man erhält ein Maximum für die HtrII Bande und ein Maximum für die MSP Bande, welche je nach Verhältnis unterschiedlich ausfallen. Ebenso werden die Bahnen 2 und 3 des Gels aus Abbildung 36 geplottet und dann mit den Graphen des Standards verglichen. Die entstandenen Graphen sind in Abbildung 38 dargestellt.

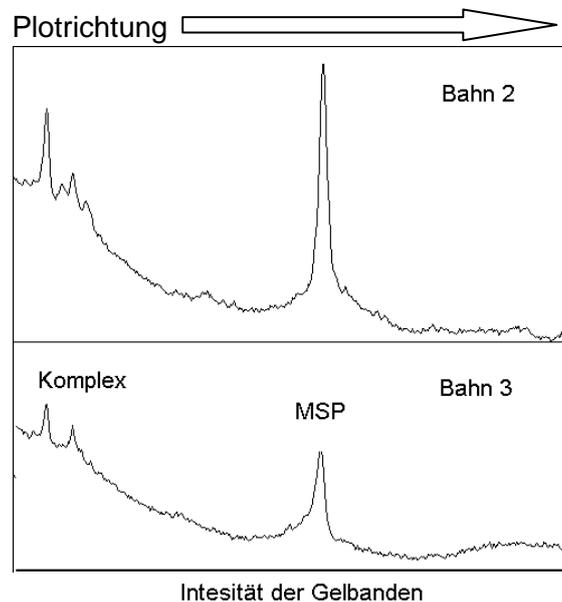


Abbildung 38: Veranschaulichung der Bandenintensität des Gels aus Abb. 36 B) mit ImageJ

Wie beschrieben zeigen sich rechts ein Maximum was die Bandenintensität des HtrII ausdrückt und links ein Maximum was die Bandenintensität des MSP ausdrückt. Unter Berücksichtigung, dass zwei MSP Moleküle eine Nanodisk bilden wird abgeschätzt, dass die Nanodisks in Fraktion 2 je ein Komplex Molekül enthalten und die Nanodisks aus Fraktion 3 je drei Komplexmoleküle enthalten, was der erwünschten Trimer Konformation entspricht.

Das Ergebnis bestätigt die Abschätzung der Stöchiometrie anhand der Absorption bei 500 nm des SRII.

Um homogene Komplex Disks für die Messung des Photozyklus herzustellen wird in einem präoperativen Ansatz der Komplex im Verhältnis von 3:2 gegenüber dem MSP eingesetzt. Das Gesamtvolumen beträgt 1 ml, da die Superose 6 Säule ein maximales Analysevolumen von 250 μ l hat, wird die Probe fraktioniert aufgereinigt. Eines der Chromatogramme ist in Abbildung 39 gezeigt.

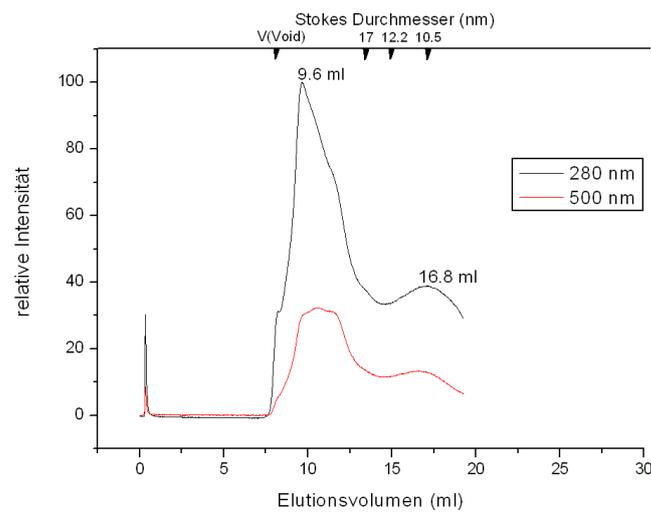


Abbildung 39: Aufreinigung des Komplexes für die Messung des Photozyklus

Es bilden sich deutlich weniger SRII Disks. Die Komplex Nanodisks eluieren in einem breiten Peak, was auf die hohe Konzentration zurückzuführen ist. Die Komplex Disks Fraktionen aller Gelfiltrationen werden gesammelt und vereinigt. Nach Ankonzentrieren erhält man ca. 300 μ l Komplex Disks mit einer OD(500 nm) von 1.

4.8 Analytische Messungen an SRII- und Komplex Nanodisks

4.8.1 UV-Vis Spektroskopie

Es werden die Absorptionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 200-700 nm der in Nanodisks eingelagerten SRII und SRII/HtrII Proben gemessen. Als Vergleich werden SRII und der SRII/HtrII Komplex in Detergenzien vermessen und jeweils in ein Spektrum aufgetragen. Die UV-Vis Spektren sind in Abbildung 40 gezeigt.

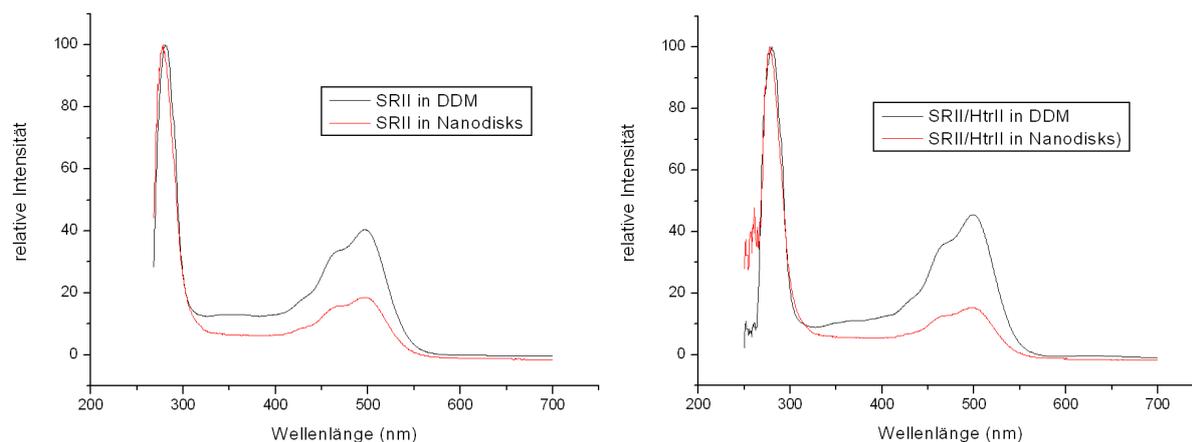


Abbildung 40: UV-Vis Spektren des SRII in DDM und Nanodisks (links), Komplex in DDM und Nanodisks (rechts)

Der Absorptionswert bei 280 nm wurde für den Vergleich der Spektren als 100% festgelegt. Das charakteristische UV-Vis Spektrum des SRII, mit Maxima bei 480 und 500 nm, in beiden allen Proben deutlich zu erkennen. Das Maximum der Absorption bei 500 nm ist in den Nanodisk Proben deutlich geringer. Durch die Absorption des Membran Scaffold Proteins bei 280 nm wird das Verhältnis A_{500}/A_{280} verändert. Dieser deutliche Unterschied ist ein Beweis für die gebildeten Nanodisks. Frühere Messungen an in Lipiden rekonstituierten SRII Proben zeigten eine verringerte Absorption des SRII bei 500 nm im Verhältnis zu 280 nm wenn es in Lipid Umgebung ist.

4.8.2 Laserblitz Absorptions Spektroskopie

Die Kenntnis über den Photozyklus des *Np*SRII ist notwendig zum Verständnis der Reizaufnahme und der Weiterleitung an die nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade in dem System der Phototaxis. Es existieren bereits detaillierte kinetische Untersuchungen über den *Np*SRII Photozyklus (Chizhov et al., 1998; Schmies et al., 2000). In dieser Arbeit soll die Laserblitz-Absorptions-Spektrometrie genutzt werden, um den Einfluss der Umgebung, das heißt den Einfluss des Einbaus des SRII bzw. des SRII/HtrII Komplexes in Nanodisks zu untersuchen. Da der Photozyklus des *Np*SRII mit Konformationsänderungen einhergeht, die sich auch auf die Struktur der Protein-Oberfläche auswirken, hat die direkte Umgebung des Photorezeptors einen Einfluß. Die transienten optischen Absorptionsänderungen werden bei drei indikativen Wellenlängen gemessen. Die Wellenlänge 400 nm repräsentiert die Bildung und den Zerfall des M- Intermediates, die Wellenlänge 500 nm den Zerfall und die Rückbildung des Grundzustandes und die Wellenlänge 550 nm steht für die Kinetik des O_{540/550}-Intermediates. Es werden die Photozyklen von SRII und dem Komplex in DDM, rekonstituiert in *Np*Lipiden und in

Nanodisks eingelagert vermessen und verglichen. Die Spektren sind in Abbildung 41 abgebildet.

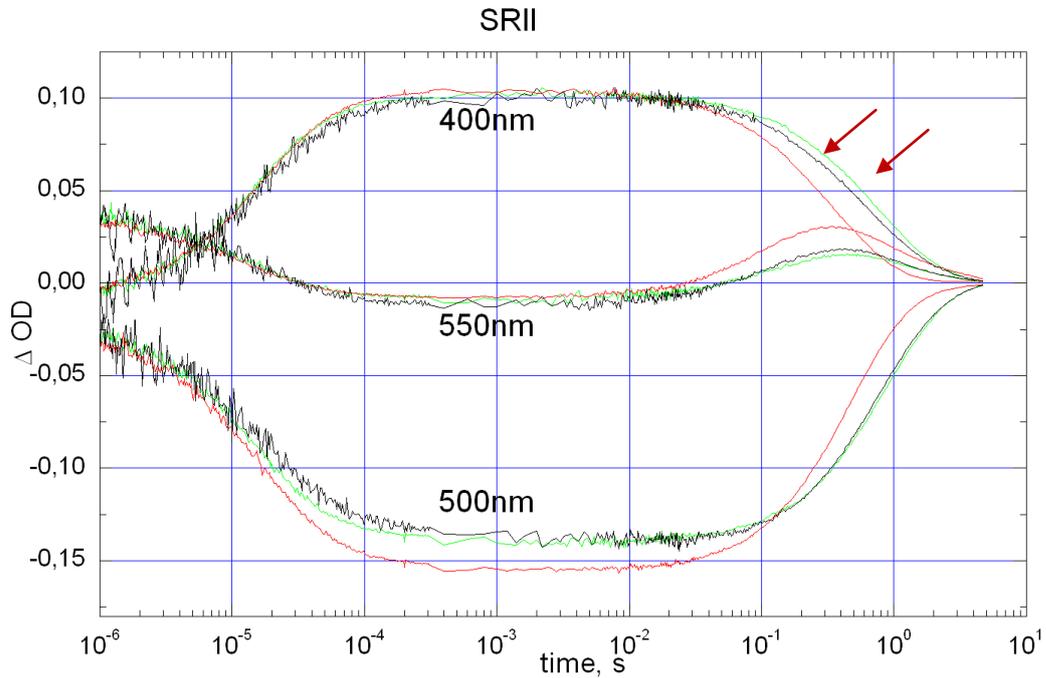


Abbildung 41: Messung des Photozyklus bei drei verschiedenen Wellenlängen. Rot: SR11 in DDM, Schwarz: SR11 in *Np*Lipiden, Grün: SR11 in Nanodisks

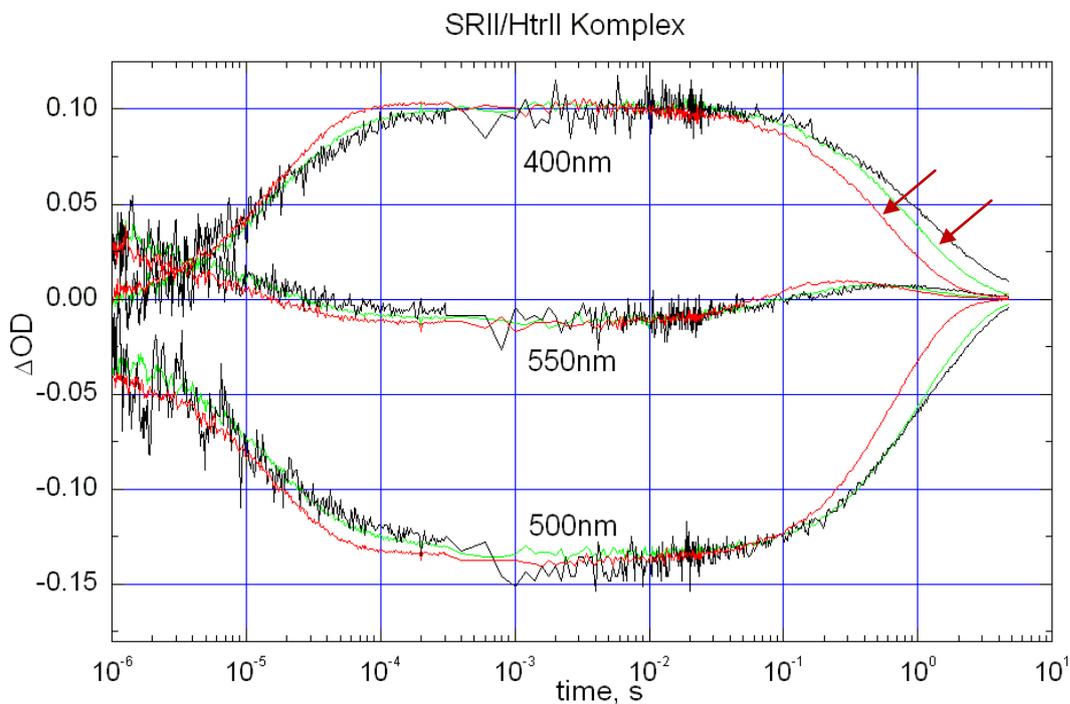


Abbildung 42: Messung des Photozyklus bei drei verschiedenen Wellenlängen. Rot: SR11/HtrII in DDM, Schwarz: SR11/HtrII in *Np*Lipiden, Grün: SR11/HtrII in Nanodisks

Die in Nanodisk eingelagerten Proteine durchlaufen alle Zustände des Photozyklus, was zeigt, dass die Photorezeptoren sowohl als ungebundenes Protein als auch im Komplex mit

dem HtrII im nativen Zustand vorliegen und voll aktiv sind. Unterschiede in der Kinetik der Proben zeigen sich nur im Rückgang des M-Zustands zum Grundzustand (siehe rote Pfeile), gemessen bei 400 nm. Diese Phase des Photozyklus ist durch mehrere schnelle Gleichgewichte und die Bildung des O-Zustands charakterisiert (Chizhov et al. 1998). Der Grundzustand wird langsamer wieder erreicht, wenn der Rezeptor in Lipid Umgebung ist. Es macht keinen Unterschied ob es sich dabei um rekonstituierte Proben in *Np*Lipide oder Proben in Nanodisks handelt. Man beobachtet eine Verlangsamung um den Faktor zwei, was auch schon vorher für rekonstituierte Proben des Komplexes beobachtet wurde (Mennes et al. 2007).

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Derivate des Humanen ApoA1 genutzt um das sensorische Rhodopsin II (SRII) und den Photorezeptorkomplex, SRII mit seinem Transducer HtrII in eine Modellmembran, die Nanodisks genannt wird, einzulagern. Nanodisks bestehen aus einer Phospholipid Doppelschicht die von einem Proteinmantel umrandet wird. Die Expression der sogenannten Membran Scaffold Proteine (MSP), die diesen Mantel bilden, erfolgt nach Bayburt et al. (2002). Von dem hier verwendeten Konstrukt MSPD1E3 wird außerdem eine Cystein Mutante kloniert um das Molekül mit einem Farbstoff zu markieren. Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Parameter variiert um einen möglichst effizienten Einbau der Membranproteine zu erreichen. Es zeigte sich, dass eine längere Inkubationszeit zu besseren Ergebnissen führt. Das sensorische Rhodopsin II kann in verschiedenen Stöchiometrien in Nanodisks eingelagert werden. Die Aufreinigung ist aber nur erfolgreich, wenn SRII im Überschuss eingesetzt wird. Dabei entstehen Nanodisks mit 4-5 eingelagerten SRII Molekülen. Der Stokes Durchmesser der SRII Disks betrug 12 nm, was auch dem Durchmesser der leeren Disks entspricht. Der SRII/HtrII Photorezeptorkomplex kann als Monomer und als Trimer in Nanodisks eingebaut werden. Die Trimer von Dimer Struktur kann dabei deutlich mit dem Elektronenmikroskop erkannt werden. Der Stokes Durchmesser der Komplex Disks beträgt 19 nm, was eine deutliche Erhöhung im Vergleich zu leeren Disks ist. Daher musste die Aufreinigung optimiert werden. Mit Hilfe von Gelfiltration kann man die Nanodisks die nur ein Komplex Molekül von den Nanodisks die Trimer Komplexe enthalten trennen. Durch Laser Flash Absorptionsmessung wird die Kinetik des Photozyklus des SRII sowie des Komplexes in Nanodisks gemessen. Das Ergebnis ist äquivalent zur Kinetik des Photozyklus von SRII bzw. SRII/HtrII Komplex der in Lipiden rekonstituiert wurde. Das SRII in Nanodisks ist also in nativer Umgebung und aktiv.

6 Ausblick

Es muss eine Methode entwickelt werden um die Stöchiometrie der eingebauten Membranproteine genauer zu bestimmen. Dafür kann man das farblich markierte MSP nutzen. Insbesondere für das reine SRII muss eine Methode gefunden werden Nanodisks mit eingebautem SRII von leeren Disks zu trennen. Dafür eignet sich zum Beispiel die Biotinylierung einer cytoplasmatischen Loop Region des SRII und eine Aufreinigung über Streptavidin gebundene Beads. Der Komplex in Nanodisks kann in verschiedenen Stöchiometrien aufgereinigt werden, allerdings müssen noch Bedingungen gefunden werden wie eine der Stöchiometrien bevorzugt werden kann. Die Menge eingebauter Proteine kann auch anhand einer Phosphat Analyse bestimmt werden. Je weniger Phospholipide pro Nanodisks detektiert werden, desto mehr Proteine nehmen den Platz in der Membran ein. Außerdem könnten Immunoblots mit spezifischen Antikörpern für eine Aussage über die Stöchiometrie, oder zum Beispiel immobilisierte Anti HtrII Antikörper für eine Aufreinigung der Komplex Nanodisks. Trotzdem stehen nach dieser Arbeit die Nanodisks für weitere Forschung am Photorezeptor zur Verfügung. Das heißt es können NMR Studien durchgeführt werden, da die Membranproteine in Nanodisks in Lösung gebracht werden. Durch Einlagerung von Spin-gelabelten Molekülen können Nanodisks für ESR Messungen verwendet werden und so die Dynamik des Photorezeptors unter nativen Bedingungen untersucht werden. Des Weiteren kann die Aktivität der Signalweiterleitung des Komplexes anhand eines Phosphorylierungsassay kontrolliert werden wie von Trivedi und Spudich 2003 beschrieben wurde (Trivedi and Spudich, 2003). Dabei kann Nanodisk Komplex mit unterschiedlichen Stöchiometrien verwendet werden.

7 Danksagungen

Vielen Dank Prof. Dr. Martin Engelhard für das lange Vertrauen und die Möglichkeit an diesem interessanten und aktuellen Thema meine Masterarbeit durchführen zu können.

Vielen Dank an Prof. Dr. Roger S. Goody für die Aufnahme in seine Abteilung und an Frau Dr. Susanne Brakmann für die Übernahme des Koreferates.

Ein besonderer Dank gilt Lin Li für die Probenvorbereitung und Mithilfe und Miria Schumacher für die ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Natürlich Danke ich auch Elmar Behrmann für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und diesbezüglicher Diskussion, sowie Igor Chizhov für die kinetischen Messungen und Hilfestellung bei der Auswertung.

Zusätzlich Danke ich auch allen anderen Mitarbeitern der Abteilung, insbesondere Ines Heinrich, Jörg Saueremann, David Wiegandt, Marc Dittmann und Louisa Heimann.

Danke natürlich auch an meine Familie, die mich immer unterstützt und mein Ding machen lässt. Und vielen Dank an meine liebe Katharina für die Unterstützung und die schöne Zeit abseits der Laborbank.

Zu guter Letzt Danke ich meinen Kommilitonen, für viele Stunden gemeinsamen Lernens und das ihr alle so ehrgeizig seid und mich dadurch angetrieben habt.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
BR	Bakteriorhodopsin
C	Cystein
CD	Circulardichroismus
CheA	Chemotaxisprotein A, Histidinkinase
CheB	Chemotaxisprotein B, Methylsterase
CheR	Chemotaxisprotein R, Methyltransferase
CheW	Chemotaxisprotein W, Adapterprotein
CheY	Chemotaxisprotein Y, Aspartatkinase
CheZ	Chemotaxisprotein Z, Phosphatase
DDM	N-Dodecyl- β -D-maltosid
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ESR	paramagnetische Elektronenspin Resonanz
HAMP	Histidine kinases, Adenyly cyclases, Methyl-accepting proteins and Phosphatases
HR	Halorhodopsin
<i>H. salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Lauria Bertani medium
MSP	Membran Scaffold Protein
MSPD1E3	Membran Scaffold Protein mit 3 zusätzlich eingefügten α -Helices
NMR	Kernmagnetische Resonanz
<i>Np</i>	<i>Natronobacterium pharaonis</i>
NpHtrII	halobakterieller Transducer des Rhodopsins aus <i>N. pharaonis</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
POPC	2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
<i>NpHtrII</i>	<i>N. pharaonis</i> Transducer des sensorischen Rhodopsins II
<i>NpSRII</i>	<i>N. pharaonis</i> sensorisches Rhodopsin II
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SB	Schiff'sche Base
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TM	Transmembrane Helix

9 Literaturverzeichnis

Reference List

- Bayburt,T.H., Grinkova,Y.V., and Sligar,S.G. (2006). Assembly of single bacteriorhodopsin trimers in bilayer nanodiscs. *Arch. Biochem. Biophys.* *450*, 215-222.
- Bayburt,T.H., Leitz,A.J., Xie,G., Oprian,D.D., and Sligar,S.G. (2007). Transducin activation by nanoscale lipid bilayers containing one and two rhodopsins. *J. Biol. Chem.* *282*, 14875-14881.
- Bayburt,T.H. and Sligar,S.G. (2003). Self-assembly of single integral membrane proteins into soluble nanoscale phospholipid bilayers. *Protein Sci.* *12*, 2476-2481.
- Bayburt,T.H., Grinkova,Y.V., and Sligar,S.G. (2002). Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Letters* *2*, 853-856.
- Birnboim,H.C. and Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* *7*, 1513-1523.
- Bogomolni,R.A. and Spudich,J.L. (1982). Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *79*, 6250-6254.
- Boldog,T., Grimme,S., Li,M., Sligar,S.G., and Hazelbauer,G.L. (2006). Nanodiscs separate chemoreceptor oligomeric states and reveal their signaling properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 11509-11514.
- Cappuccio,J.A., Blanchette,C.D., Sulchek,T.A., Arroyo,E.S., Kralj,J.M., Hinz,A.K., Kuhn,E.A., Chromy,B.A., Segelke,B.W., Rothschild,K.J., Fletcher,J.E., Katzen,F., Peterson,T.C., Kudlicki,W.A., Bench,G., Hoeplich,P.D., and Coleman,M.A. (2008). Cell-free co-expression of functional membrane proteins and apolipoprotein, forming soluble nanolipoprotein particles. *Mol. Cell Proteomics.* *7*, 2246-2253.
- Chizhov,I., Chernavskii,D.S., Engelhard,M., Mueller,K.H., Zubov,B.V., and Hess,B. (1996). Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.* *71*, 2329-2345.
- Chizhov,I., Schmies,G., Seidel,R., Sydor,J.R., Luttenberg,B., and Engelhard,M. (1998). The photophobic receptor from *Natronobacterium pharaonis*: temperature and pH dependencies of the photocycle of sensory rhodopsin II. *Biophys. J.* *75*, 999-1009.
- Denisov,I.G., Grinkova,Y.V., Lazarides,A.A., and Sligar,S.G. (2004). Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 3477-3487.
- Doebber,M., Bordignon,E., Klare,J.P., Holterhues,J., Martell,S., Mennes,N., Li,L., Engelhard,M., and Steinhoff,H.J. (2008). Salt-driven equilibrium between two conformations in the HAMP domain from *Natronomonas pharaonis*: the language of signal transfer? *J. Biol. Chem.* *283*, 28691-28701.
- Edwards,K., Johnsson,M., Karlsson,G., and Silvander,M. (1997). Effect of polyethyleneglycol-phospholipids on aggregate structure in preparations of small unilamellar liposomes. *Biophys. J.* *73*, 258-266.

- Gordeliy, V.I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R., Buldt, G., Savopol, T., Scheidig, A.J., Klare, J.P., and Engelhard, M. (2002). Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex. *Nature* *419*, 484-487.
- Hazelbauer, G.L., Falke, J.J., and Parkinson, J.S. (2008). Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem. Sci.* *33*, 9-19.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* *77*, 51-59.
- Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J.U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J.E., Lupas, A.N., and Coles, M. (2006). The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* *126*, 929-940.
- Kapust, R.B., Tozser, J., Copeland, T.D., and Waugh, D.S. (2002). The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *294*, 949-955.
- Khursigara, C.M., Wu, X., Zhang, P., Lefman, J., and Subramaniam, S. (2008). Role of HAMP domains in chemotaxis signaling by bacterial chemoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 16555-16560.
- Kijac, A.Z., Li, Y., Sligar, S.G., and Rienstra, C.M. (2007). Magic-angle spinning solid-state NMR spectroscopy of nanodisc-embedded human CYP3A4. *Biochemistry* *46*, 13696-13703.
- Kim, K.K., Yokota, H., and Kim, S.H. (1999). Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature* *400*, 787-792.
- Klare, J.P., Bordignon, E., Engelhard, M., and Steinhoff, H.J. (2004). Sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin: light activated helix F movement. *Photochem. Photobiol. Sci.* *3*, 543-547.
- Kolbe, M., Besir, H., Essen, L.O., and Oesterhelt, D. (2000). Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution. *Science* *288*, 1390-1396.
- Luecke, H., Schobert, B., Lanyi, J.K., Spudich, E.N., and Spudich, J.L. (2001). Crystal structure of sensory rhodopsin II at 2.4 Å: insights into color tuning and transducer interaction. *Science* *293*, 1499-1503.
- Lyukmanova, E.N., Shenkarev, Z.O., Paramonov, A.S., Sobol, A.G., Ovchinnikova, T.V., Chupin, V.V., Kirpichnikov, M.P., Blommers, M.J., and Arseniev, A.S. (2008). Lipid-protein nanoscale bilayers: a versatile medium for NMR investigations of membrane proteins and membrane-active peptides. *J. Am. Chem. Soc.* *130*, 2140-2141.
- M++ller, K. and Plessner, T. (1991). Variance reduction by simultaneous multi-exponential analysis of data sets from different experiments. *European Biophysics Journal* *19*, 231-240.
- Matsuno-Yagi, A. and Mukohata, Y. (1977). Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *78*, 237-243.
- Mennes, N., Klare, J.P., Chizhov, I., Seidel, R., Schlesinger, R., and Engelhard, M. (2007). Expression of the halobacterial transducer protein HtrII from *Natronomonas pharaonis* in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* *581*, 1487-1494.

- Moukhametzianov, R., Klare, J.P., Efremov, R., Baeken, C., Goppner, A., Labahn, J., Engelhard, M., Buldt, G., and Gordeliy, V.I. (2006). Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer. *Nature* **440**, 115-119.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Nath, A., Atkins, W.M., and Sligar, S.G. (2007). Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. *Biochemistry* **46**, 2059-2069.
- Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1971). Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat. New Biol.* **233**, 149-152.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467.
- Schmies, G., Luttenberg, B., Chizhov, I., Engelhard, M., Becker, A., and Bamberg, E. (2000). Sensory rhodopsin II from the haloalkaliphilic natronobacterium pharaonis: light-activated proton transfer reactions. *Biophys. J.* **78**, 967-976.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379.
- Seddon, A.M., Curnow, P., and Booth, P.J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 105-117.
- Sharma, A.K., Spudich, J.L., and Doolittle, W.F. (2006). Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends Microbiol.* **14**, 463-469.
- Shimono, K., Iwamoto, M., Sumi, M., and Kamo, N. (1997). Functional expression of pharaonis phoborhodopsin in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **420**, 54-56.
- Spudich, J.L. (2006). The multitasking microbial sensory rhodopsins. *Trends Microbiol.* **14**, 480-487.
- Spudich, J.L. and Bogomolni, R.A. (1984). Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature* **312**, 509-513.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183-215.
- Takahashi, T., Mochizuki, Y., Kamo, N., and Kobatake, Y. (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.
- Trivedi, V.D. and Spudich, J.L. (2003). Photostimulation of a sensory rhodopsin II/HtrII/Tsr fusion chimera activates CheA-autophosphorylation and CheY-phosphotransfer in vitro. *Biochemistry* **42**, 13887-13892.
- Wegener, A.A., Klare, J.P., Engelhard, M., and Steinhoff, H.J. (2001). Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis. *EMBO J.* **20**, 5312-5319.