

**Strukturelle und funktionelle Untersuchungen
des photophoben Rezeptor/Transducer-Komplexes
aus *Natronobacterium pharaonis***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Chemie
der Universität Dortmund

vorgelegt von Dipl.-Chem. Johann P. Klare
aus Dortmund

Dortmund, im Dezember 2002

Das Schönste, was wir erleben können, ist das Geheimnisvolle. Es ist das Grundgefühl, das an der Wiege von wahrer Kunst und Wissenschaft steht. Wer es nicht kennt und sich nicht mehr wundern, nicht mehr staunen kann, der ist sozusagen tot und sein Auge erloschen.

Albert Einstein, aus „Wie ich das Leben sehe“; in *Mein Weltbild*, S. 9

Meiner Frau Anita

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung physikalische Biochemie von Prof. Dr. R. S. Goody, unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. M. Engelhard angefertigt.

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. M. Engelhard
2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Eilbracht

Tag der Prüfung: 7. Mai 2003

Hiermit versichere ich an Eides Statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Wegener, A.-A., Klare, J. P., Engelhard, M. und H.-J. Steinhoff (2001). Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis. *EMBO J.* **20**, 5312-5319.

Klare, J. P., Schmies, G., Chizhov, I., Shimono, K., Kamo, N. und M. Engelhard (2002). Probing the Proton Channel and the Retinal Binding Site of *Natronobacterium pharaonis* Sensory Rhodopsin II. *Biophys. J.* **82**, 2156-2164.

Gordeliy, V. I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R., Büldt, G., Savopol, T., Scheidig, A. J., Klare, J. P. und M. Engelhard (2002). Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex. *Nature* **419**, 484-487.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	11
2.1	Chemikalien	11
2.2	Instrumentation	12
2.3	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	13
2.4	Molekularbiologische Methoden	15
2.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA	15
2.4.2	Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten	15
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion	16
2.4.4	Restriktion von DNA	17
2.4.5	Ligation von DNA-Fragmenten	17
2.4.6	Transformation von <i>E. coli</i>	17
2.4.7	DNA-Sequenzierung	18
2.4.8	Zellanzucht	18
2.5	Proteinchemische Methoden	19
2.5.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	19
2.5.2	Zellaufschluß und Aufreinigung der Proteine	19
2.5.3	Kopplungen mit Spinproben	20
2.5.4	Isolierung polarer Lipide aus <i>H. salinarum</i>	20
2.5.5	Rekonstitution in PM-Lipide	21
2.5.6	Immobilisierung rekonstituierter Proben in Polyacrylamid-Gelen	22
2.6	Kristallisation des NpSR _{II} /NpHtr _{II114} -Komplexes	22
2.6.1	Vorbereitung der Proteine für die Kristallisation	22
2.6.2	Kristallisationsansätze	23
2.7	Analytische Methoden	24
2.7.1	Denaturierende Protein-Gelelektrophorese	24
2.7.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	24
2.8	Biophysikalische Methoden	25
2.8.1	Laserblitz-Absorptions-Spektrometrie	25
2.8.2	ESR-Spektroskopie	30

2.8.3	Aufnahme und Auswertung der Röntgendiffraktionsdaten	42
2.9	Sequenzanalyse	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Untersuchung des Photozyklus von NpSRII	44
3.1.1	Analyse des Photozyklus von NpSRII und Mutanten	45
3.1.2	Einfluß von Natriumazid auf den Photozyklus von NpSRII	55
3.1.3	Einfluß der Protein/Lipid-Umgebung auf den Photozyklus von NpSRII	58
3.2	ESR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung am Rezeptor/Transducer-Komplex	61
3.2.1	Analyse der Primär-Sequenz des NpHtrII	61
3.2.2	Auswahl der Positionen zur Spinmarkierung	66
3.2.3	Analyse der cw-ESR Messungen	67
3.2.4	Analyse der Zugänglichkeiten	71
3.2.5	Bestimmung von Interspin-Abständen mittels Tieftemperatur-ESR	73
3.3	ESR-Untersuchungen zur Signaltransduktion im Rezeptor/Transducer-Komplex	78
3.3.1	Auswahl der Positionen zur Spinmarkierung	78
3.3.2	Analyse transienter Konformationsänderungen der Rezeptor-Helix F	80
3.3.3	Analyse transienter Konformationsänderungen im Transducer	86
3.4	Analyse der Kristallstruktur des Rezeptor/Transducer-Komplexes	91
4	Diskussion	95
4.1	Photoaktivierung des NpSRII	95
4.2	Mechanismus der Signal-Bildung im Rezeptor	99
4.3	Aufbau des Rezeptor/Transducer-Komplexes	102
4.4	Signaltransduktion innerhalb des Rezeptor/Transducer-Komplexes	110
5	Zusammenfassung	117
6	Literaturverzeichnis	119
7	Anhang	128

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
AS	Amphiphatische Sequenz
bp	Basenpaar
CheA	Chemotaxisprotein A
CheB	Chemotaxisprotein B
CheR	Chemotaxisprotein R
CheW	Chemotaxisprotein W
CheY	Chemotaxisprotein Y
CheZ	Chemotaxisprotein Z
CrOx	Kaliumtrioxalatchromat(III), $K_3[Cr(C_2O_4)_3] \cdot 3 H_2O$, Chromoxalat
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
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
<i>H. salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
Htr	halobakterieller Transducer des Rhodopsins
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilodalton
M _r	relative Molekülmasse
MCP	methyl accepting chemotaxis protein
MTS	(1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-methyl) methanthiosulfonat
MTS-4-oxy	(1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-yl) carbamidoethyl-methanthiosulfonat
<i>N. pharaonis</i>	<i>Natronobacterium pharaonis</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
OG	<i>n</i> -Octyl- β -D-glucopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR	Polymerase Kettenreaktion
NpHtrII	<i>N. pharaonis</i> Transducer des sensorischen Rhodopsins II
NpSRII	<i>N. pharaonis</i> sensorisches Rhodopsin II
rbs	ribosomale Bindungsstelle
Rho	Rhodopsin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDSL	site directed spin labeling
Tab.	Tabelle
TM	Transmembrane Helix
Upm	Umdrehungen pro Minute
VÄ	Volumen-Äquivalent
<i>wt</i>	Wildtyp
B ₂	zweites spektrales Moment
ϵ_x	Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge x nm
H_0	Breite der zentralen ESR-Linie
λ	Wellenlänge des Lichtes
Π	Zugänglichkeitsparameter

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

1 Einleitung

Jedes Lebewesen, vom einzelligen Organismus bis hin zu höchst komplexen Lebensformen wie den Säugetieren und nicht zuletzt auch dem Menschen, verfügt über Mechanismen, welche Umweltreize detektieren, verarbeiten und schließlich eine physiologische Reaktion auslösen. Dies geschieht mit Hilfe komplexer Netzwerke, sogenannter Signaltransduktionskaskaden, die sich im Laufe der Evolution an die Lebens- und Umweltbedingungen der jeweiligen Spezies angepasst haben und dieser damit das Überleben und deren Fortpflanzung ermöglichen.

Der erste Schritt in dieser Verarbeitungskette, die Wahrnehmung eines äußeren Reizes, geschieht dabei durch einen Rezeptor, welcher zumeist in der Zellmembran, die man als „Schnittstelle“ zur Außenwelt bezeichnen kann, lokalisiert ist. Eine, mit mehr als 2000 Mitgliedern, in höheren Organismen sehr weit verbreitete Familie solcher transmembranen Rezeptoren stellen die Rhodopsin-ähnlichen Sieben-Helix-Rezeptoren oder auch G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dar. Ihr Name leitet sich aus dem Umstand ab, daß sie in ihrem aktivierten Zustand mit einem Guanylnukleotid-bindenden Protein (Buck & Axel, 1991) interagieren, welches das vom Rezeptor kommende Signal an die im Zellinneren befindlichen Komponenten der Signaltransduktionskaskade weiterleitet. Als Mitglieder dieser Familie finden sich Geruchs- und Geschmacks-Sensoren (Buck & Axel, 1991), Hormon- sowie Neuro-Transmitter (Birnbaumer *et al.*, 1990) und nicht zuletzt Lichtrezeptoren (Hargrave & McDowell, 1992). Die zuletzt genannten Lichtrezeptoren, die Rhodopsine, finden sich als photosensitive Pigmente in allen drei Domänen des Lebens (Eukaria, Archaea und Eubakteria). Aufgrund des Umstandes, daß sie statt auf chemische Substanzen auf experimentell einfach und präzise zu kontrollierendes Licht reagieren, dienen sie häufig als Modell für die gesamte Klasse der transmembranen Sieben-Helix-Rezeptoren.

Besondere Aufmerksamkeit soll hier den archaebakteriellen sensorischen Rhodopsinen gewidmet werden. Sie zeigen die gleichen Strukturmerkmale, die sich für alle Rhodopsine finden. Sie durchspannen die Membran in der Form sieben transmembraner Helizes, welche eine Bindungstasche für das, kovalent über eine protonierte Schiff'sche Base (SB), an einen konservierten Lysin-Rest gebundene, Retinal-Chromophor bilden. Die Einstrahlung sichtbaren Lichtes führt zu einer Aktivierung dieser Pigmente, die daraufhin eine zyklische Reaktion, einen sogenannten Photozyklus, durchlaufen. Im Gegensatz zum Rhodopsin aus höheren Organismen, welches das G-Protein Transducin bindet und darüber eine elektrophysiologische Reaktion in Gang setzt, die schließlich zu einem Nervenimpuls führt (Stryer, 1986; Stryer, 1996), ist das archaebakterielle System einfacher aufgebaut und daher für Untersuchungen leichter zugänglich.

Dieser primitive bakterielle Sehprozeß, die sogenannte Phototaxis, läßt sich am Beispiel archaebakterieller Organismen, wie z.B. *Halobacterium salinarum* oder *Natronobacterium pharaonis* leicht beobachten. Unter neutralen bzw. konstanten Lichtverhältnissen wechseln die zur Fortbewegung dienenden, rotierenden Flagellenbündel etwa alle 10 Sekunden ihre Drehrichtung. Dies führt zu einer ungerichteten, statistischen Bewegung des Bakteriums (Spudich & Bogomolni, 1988). Wird das Bakterium mit schädlichem blauem Licht bestrahlt, reagiert es mit einer Erhöhung dieser Schaltfrequenz, während eine Bestrahlung mit orangenem Licht zu einer Erniedrigung der Schaltfrequenz führt. Als Gesamteffekt läßt sich eine Fluchtbewegung weg von blauem Licht und hin zu orangefarbenem Licht beobachten. Damit versetzt die Fähigkeit zur Phototaxis diese Bakterien in die Lage, sich in Richtung der Lichtverhältnisse zu bewegen, die für die Funktion der ebenfalls in der Zellmembran befindlichen lichtgetriebenen Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) optimal sind (Hildebrand & Dencher, 1975; Marwan & Oesterhelt, 1990) (siehe Abbildung 1.1). Diese bakteriellen Rhodopsine, die ebenfalls die oben genannten strukturellen Merkmale aufweisen, nutzen das Sonnenlicht als Energiequelle für die Translokation von Protonen (BR) bzw. Chlorid-Ionen (HR) über die Zellmembran. Damit erzeugen sie eine protonenmotorische Kraft, welche das Bakterium zur Synthese des Energieträgers ATP nutzt.

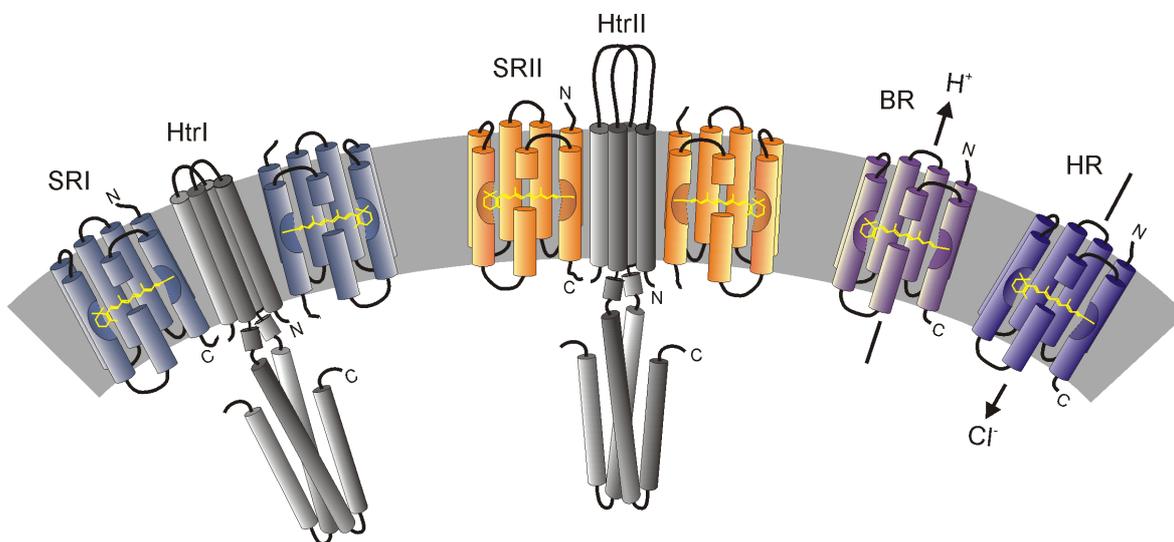


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der vier archaebakteriellen Rhodopsine. Die Darstellung der sensorischen Rhodopsine SRI und SRII mit ihren Transducern HtrI und HtrII als Komplexe mit einer 2:2 Stöchiometrie beruht auf Veröffentlichungen von Chen und Spudich (2002) (SRI/HtrI) sowie Wegener *et al.* (2001b) (SRII/HtrII). Der extrazelluläre Raum befindet sich in dieser Darstellung oben.

Als verantwortlich für die phototaktischen Fähigkeiten des *H. salinarum* konnten die sensorischen Rhodopsine SRI und SRII identifiziert werden (siehe Abbildung 1.1). SRI vermittelt die

photophile Antwort des Bakteriums auf orangenes Licht, ebenso wie, über ein langlebiges Photointermediat, die photophobe Reaktion auf blaues bzw. UV- Licht. Das SRII wurde als zusätzlicher, ebenfalls für die photophobe Reaktion auf blaues bzw. UV-Licht verantwortlicher, Rezeptor identifiziert (Bogomolni & Spudich, 1982; Spudich & Bogomolni, 1984).

Wie bereits erwähnt ist allen Rhodopsinen, sowohl den eukaryotischen als auch den archaebakteriellen, der Chromophor Retinal als prosthetische Gruppe gemeinsam. Dieser, über eine Schiff'sche Base an die Helix VII bzw. G gebundene Chromophor wechselt als Reaktion auf einen Lichtreiz seine Konformation. Im Falle des eukaryontischen Rhodopsins erfolgt dieser Konformationswechsel vom, im Grundzustand vorliegenden, 11-*cis* zu *all-trans*. Demgegenüber beobachtet man im Falle der archaebakteriellen Rhodopsine das entgegengesetzte Verhalten. Hier isomerisiert das Retinal vom Grundzustand *all-trans* durch Absorption eines Photons zu 13-*cis*.

Zudem dissoziiert der Chromophor in den archaebakteriellen Rhodopsinen nach Lichtanregung nicht vom Protein, so daß diese Rezeptoren, im Gegensatz zu den Eukaryontischen, eine zyklische Reaktion mit thermischer Relaxation des Retinals in den *all-trans* Grundzustand durchlaufen können. Diese, Photozyklus genannte, zyklische Reaktion konnte für den aus *Natronobacterium pharaonis* isolierten photophoben Rezeptor NpSRII (siehe Abbildung 1.2), ebenso wie für den Rezeptor SRI (Schmies *et al.*, 2000) sowie die verwandten Ionenpumpen BR

(Chizhov *et al.*, 1996) und HR (Chizhov & Engelhard, 2001), im Detail untersucht werden (Chizhov *et al.*, 1998). Nach photochemischer Anregung durchläuft das Protein eine Reihe sogenannter Photozyklus-Intermediate, welche sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Absorptionsmaxima spektroskopisch unterscheiden und analysieren lassen. Im Falle des in dieser Arbeit untersuchten NpSRII (in Analogie zum BR) läßt sich dieser Photozyklus nach heutigem Kenntnisstand in etwa wie folgt beschreiben. Die Absorption eines Photons führt zur *all-trans* →

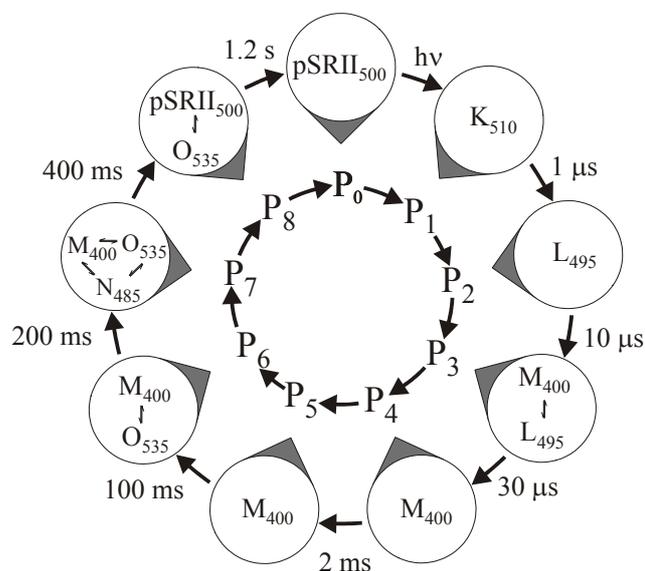


Abb. 1.2 Modell des Photozyklus des photophoben Rezeptors NpSRII aus *N. pharaonis* auf der Basis sequentieller, irreversibler Folgereaktionen. Die Absorptionsmaxima der durch die Buchstaben K, L, M, N und O bezeichneten Intermediate sind als Indizes angegeben (Chizhov, 1998 201).

13-*cis* Isomerisierung des Chromophors (NpSR_{II} → K). Auf diesen Prozeß folgen innerhalb etwa 1 Mikrosekunde Konformationsänderungen des Proteins (K → L). Infolge dieser strukturellen Modifikationen ändern sich die Protonenaffinitäten einiger Seitenketten und die Schiff-Base gibt ihr Proton an Asp-75 im extrazellulären Protonenkanal ab. In etwa zeitgleich wird auf der extrazellulären Seite ein Proton an das Medium abgegeben (L → M). Daraufhin öffnet sich der zytoplasmatische Protonenkanal und die Schiff-Base wird reprotoniert (M → N → O). Schließlich reisomerisiert das Retinal und das Protein relaxiert zurück in den Grundzustand (O → NpSR_{II}).

Ausgehend von der Kenntnis, wie der Photorezeptor auf eingestrahktes Licht entsprechender Wellenlänge reagiert, stellen sich bezüglich des gesamten Mechanismus der bakteriellen Phototaxis eine Reihe von weiteren Fragen:

1. Welches Photozyklus-Intermediat ist der signalgebende Zustand ?
2. Wie wird dieses Signal in das Zellinnere weitergeleitet ?
3. Auf welche Art und Weise wird das Signal an den Flagellarmotor übertragen ?

Eine eindeutige Antwort auf die erste Frage existiert bislang nicht. Es gibt allerdings eine Reihe von Untersuchungen, welche darauf hindeuten, daß der signalgebende Zustand durch die Deprotonierung der Schiff-Base erzeugt wird und bis zur Rückkehr des Proteins in den Grundzustand anhält (Yan *et al.*, 1991; Wegener *et al.*, 2000, 2001a; Wegener, 2001). Damit wären sowohl der M-Zustand als auch die nachfolgenden Intermediate als signalgebende Zustände anzusehen. Die genaue Kinetik des „Signal-Zustandes“ konnte bislang jedoch nicht aufgeklärt werden.

Auch die Frage, wie das vom Rezeptor erzeugte Signal in das Zellinnere weitergeleitet wird, kann bislang nur zum Teil beantwortet werden. Sicher ist, daß die sensorischen Rhodopsine in der Zellmembran mit einem Transducer-Molekül komplexiert vorliegen. Yao und Spudich (1992) gelang es, den offenen Leserahmen (ORF) des Gens eines putativen Transducerproteins zu identifizieren. Dieses HtrI (Seidel *et al.*, 1995) genannte Protein weist als Strukturelemente zwei transmembrane Helizes sowie eine große zytoplasmatische Domäne auf. Später konnte gezeigt werden, daß auch die Gene für HsSR_{II} und NpSR_{II} zusammen mit einem homologen Transducer-Protein in einem Operon lokalisiert sind (Seidel *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996a). Alle identifizierten Transducer-Proteine weisen erhebliche Sequenz-Homologien mit den eubakteriellen Chemorezeptoren (MCP = „methyl accepting chemotaxis protein“), wie beispielsweise dem Aspartatrezeptor (Tar) oder dem Serinrezeptor (Tsr) aus *E. coli*, auf. Diese lassen darauf schließen, daß diese beiden Klassen von Proteinen auch strukturell verwandt sind

(siehe Abbildung 1.3). Insbesondere für den erwähnten zytoplasmatischen Bereich läßt sich eine auffällige Homologie der Htr's zu den MCP's feststellen.

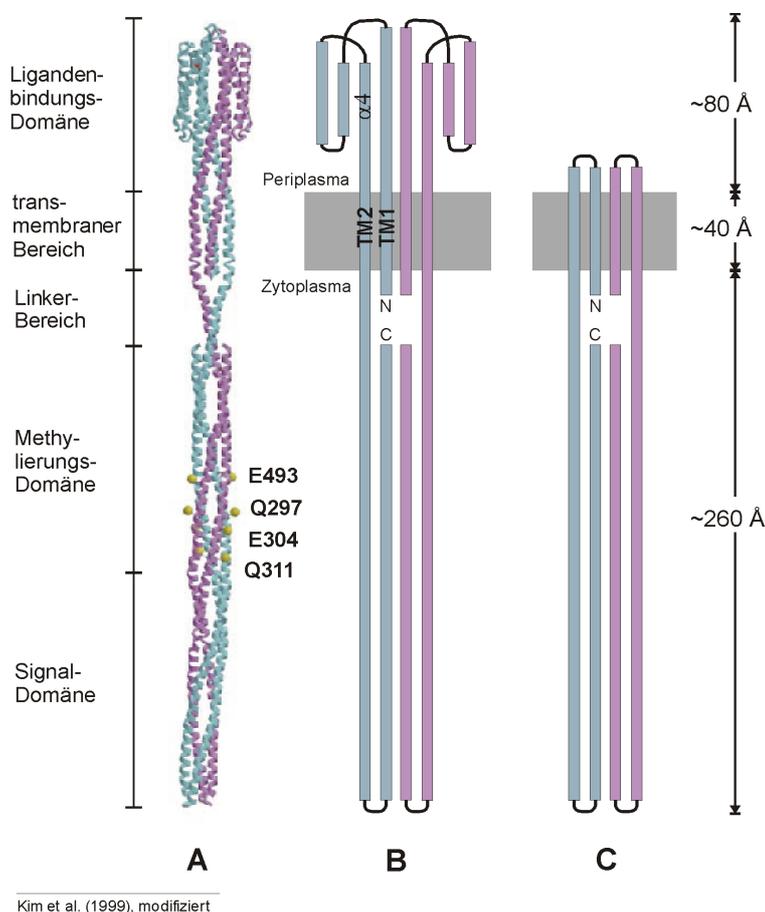


Abb. 1.3 Vergleich des Serin-Rezeptors Tsr aus *E. coli* mit dem archaebakteriellen Transducer-Protein NpHtrII. (A) Modell des Tsr Rezeptor-Dimers nach Kim et al. (Kim *et al.*, 1999) mit den entsprechenden Methylierungspositionen. (B) Schema des Tsr-Dimers. (C) Schema des NpHtrII-Dimers. Links: Einteilung der Tertiärstruktur von Tsr in fünf Teilbereiche entsprechend ihrer Funktionalität.

Auch die Signalverarbeitung im Zytoplasma erfolgt bei den archaebakteriellen Transducer-Proteinen analog zur Chemotaxis in Prokaryoten wie z.B. *E. coli*, womit man bei der Frage angelangt ist, auf welche Art und Weise das vom Rezeptor erzeugte und vom Transducer in das Zytoplasma weitergeleitete Signal an den Flagellarmotor weitervermittelt wird.

Rudolph und Oesterhelt (Rudolph & Oesterhelt, 1995, 1996; Rudolph *et al.*, 1995) konnten zeigen, daß eine dem eubakteriellen System analoge Signaltransduktionskaskade auch in dem Archaeobakterium *H. salinarum* vorhanden ist. Der Beweis für den Zusammenhang zwischen der Phototaxis und diesem Phosphorylierungssystem konnte durch Deletion des, in Anlehnung an das prokaryotische System Che-Operon genannten, Gen-Abschnittes erbracht werden. Die Deletion

Autophosphorylierungsaktivität des CheA, was zur Folge hat, daß auch kein weiteres phospho-CheY erzeugt wird. Dementsprechend setzen sowohl die Fähigkeit des CheY zur autokatalytischen Dephosphorylierung als auch der Einfluß der Phosphatase CheZ die Konzentration des phospho-CheY herunter und es kommt zu einer Verringerung der Besetzung der FliM-Proteine. Dies wiederum begünstigt die Drehung des Flagellar-Motors gegen den Uhrzeigersinn und es kann eine kontinuierliche Schwimmbewegung des Bakteriums beobachtet werden (Eisenbach, 1996).

CheA phosphoryliert jedoch nicht nur CheY. Zusätzlich ist diese Histidinkinase auch noch in der Lage, die Phosphatgruppe an die Methylsterase CheB zu übertragen, welche daraufhin den Rezeptor/Transducer demethyliert. Die Demethylierung des Rezeptors/Transducers wiederum führt zu einer Herabsetzung der Autophosphorylierungs-Aktivität von CheA und damit zu einem gegenläufigen Effekt. Umgekehrt führt ein starkes positives Signal (= geringe CheA-Aktivität) zu einer Erhöhung des Methylierungsgrades und somit zu einer Erhöhung der CheA-Aktivität. Dieser Adaptationsmechanismus erlaubt es dem Bakterium, sich unabhängig von der lokalen Konzentration eines Lock- oder Schreckstoffes auch weiterhin in Richtung graduell besserer Umweltbedingungen zu orientieren.

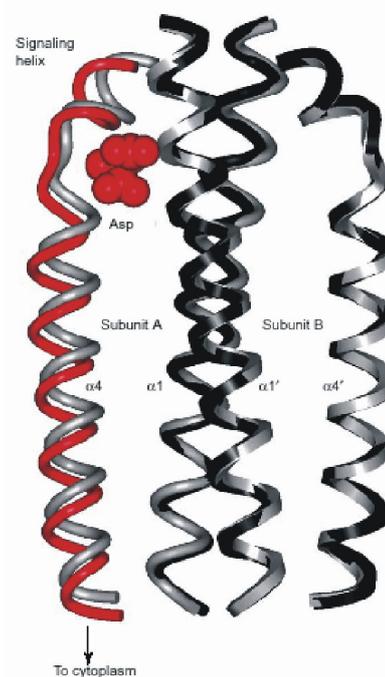
Die Analogie zwischen den Signaltransduktionswegen der Photo- und der Chemotaxis, bzw. deren offensichtlicher Zusammenhang führt zurück zu der Frage, wie das Signal des Rezeptor-Moleküls in das Zytoplasma, genauer gesagt an die Histidinkinase CheA weitergeleitet wird. CheA bindet sowohl an die Chemorezeptoren als auch an die Transducerproteine und wird von beiden offensichtlich gleichermaßen in seiner Aktivität reguliert. Erkenntnisse über die Funktionsweise der Chemorezeptoren, insbesondere bezüglich der Frage, welche Art von Konformationsänderungen zur Aktivierung des CheA führen, sollten sich also auf die Transducer-Proteine des phototaktischen Systems übertragen lassen. Umgekehrt können dementsprechend natürlich auch neu gewonnene Kenntnisse im Bereich der Phototaxis zum Verständnis der Chemotaxis beitragen.

Bislang ist die Chemotaxis weitaus besser untersucht, so daß die auf diesem Gebiet gewonnenen Erkenntnisse zur Untersuchung der Phototaxis herangezogen werden können. Insbesondere die Frage der transmembranen Signaltransduktion wurde intensiv diskutiert. Chervitz und Falke favorisieren auf der Grundlage röntgenkristallographischer Studien, ¹⁹F-NMR-Untersuchungen und zahlreicher Vernetzungs-Experimente am Aspartat-Rezeptor Tar aus *E. coli* das sogenannte „swinging-piston“-Modell. Demnach induziert die Bindung eines Aspartat-Moleküls eine Translation der Helizes $\alpha 4$ /TM2 parallel zur Membran-Normalen relativ zu den übrigen Helizes in diesem Bereich (siehe Abbildung 1.5). Sie beobachten eine Verschiebung um etwa 1,6 Å in Richtung des Zytoplasma zusammen mit einer leichten Kippbewegung der $\alpha 4$ -Helix um etwa 5°

(Chervitz & Falke, 1996). Ottemann *et al.* stützen diese These weitestgehend. Auf der Grundlage von ESR-Untersuchungen am gleichen Molekül (Ottemann *et al.*, 1999; Ottemann *et al.*, 1998) wird auch hier eine solche Translationsbewegung vorausgesagt, allerdings ohne direkte Hinweise auf eine zusätzliche Kippbewegung. Gleichwohl schließen auch diese Untersuchungen eine zusätzliche Bewegung, allerdings im Sinne einer Rotation der betroffenen Helizes, nicht aus. Inwieweit diese Konformationsänderungen zur zytoplasmatischen Signal-Domäne weitergeleitet werden, ist jedoch bislang weitgehend ungeklärt. Beide Arbeitsgruppen halten es allerdings für möglich, daß aufgrund der geringen Kompressibilität einer α -Helix dieses „Signal“ über die gesamte Länge des Rezeptor-Moleküls hin übertragen werden kann (Chervitz & Falke, 1996; Ottemann *et al.*, 1999). Somit könnten diesem Modell zufolge strukturelle Änderungen im Bereich der Wechselwirkung mit CheA hervorgerufen werden, die geeignet erscheinen, die Aktivität der gebundenen Histidin-Kinase zu beeinflussen.

Voraussetzung für die Gültigkeit dieses Modells ist damit allerdings, daß der sich der TM 2 anschließende Bereich durchgehend α -helikal ist oder zumindest eine Struktur mit äquivalenter Rigidität aufweist. Insbesondere die dem transmembranen Bereich folgende Linker-Domäne konnte bislang jedoch strukturell nicht charakterisiert werden. Zwar konnten Sequenzanalysen (LeMoual & Koshland, 1996) und weitere Vernetzungsstudien in diesem Bereich (Butler & Falke, 1998) Hinweise auf das Vorhandensein zweier amphiphatischer Helizes liefern, die Anordnung dieser Helizes konnte jedoch bislang nicht aufgeklärt werden.

Richtet man das Augenmerk zurück auf die archaebakteriellen Transducer-Proteine, ergibt sich in diesem Zusammenhang eine weitere Fragestellung. Aus Sequenzvergleichen läßt sich erkennen, daß in den Htr's ein Einschub von bis zu 105 Aminosäureresten im Vergleich zu den MCP's aus *E. coli* vorhanden ist (LeMoual & Koshland, 1996; Wegener, 2000), wobei der Anfangspunkt dieser Insertion laut Homologie-Studien am Ende der zweiten amphiphatischen Helix lokalisiert sein dürfte. Diese, sowohl für archaebakterielle Phototransducer (LeMoual & Koshland, 1996), wie auch für die Htr's IV-VI (Rudolph & Oesterhelt, 1996) und die MCP's aus einigen anderen Organismen (Alley *et al.*,



Falke und Hazelbauer (2001)

Abb 1.5 Aspartat-induzierte Konformationsänderungen in der Ligandenbindungs-Domäne von Tar nach Chervitz und Falke (1996).

1991) typische Insertion wirft zusätzliche Fragen bezüglich der Informationsweiterleitung zur Signal-Domäne auf, da trotz offensichtlich abweichender Struktur gleichwertige Konformationsänderungen zur Regulierung der Aktivität des gebundenen CheA führen sollten.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß der genaue Mechanismus der archaebakteriellen Phototaxis bislang weitgehend ungeklärt ist, insbesondere was die Signaltransduktion zwischen Photo-Rezeptor und -Transducer, sowie auch entlang des Phototransducers angeht. Neue Erkenntnisse in diesem Bereich sind dabei nicht nur für das Verständnis der Phototaxis von Bedeutung, sondern können zugleich auch zu erheblichen Fortschritten auf dem Gebiet der Chemotaxis beitragen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die von Wegener am Beispiel des photophoben Rezeptor/Transducer-Komplexes aus *N. pharaonis* gewonnenen Erkenntnisse über den Mechanismus der archaebakteriellen Phototaxis durch ergänzende Untersuchungen zu erweitern und einen Beitrag zum Verständnis der transmembranen Signaltransduktion zu leisten.

Zu diesem Zweck soll zunächst mittels der Methode der Laserblitz-Absorptions-Spektroskopie im Detail untersucht werden, auf welche Weise die Absorption eines Photons zu einer signalgebenden Konformationsänderung des Rezeptor-Moleküls führt. Zur genauen Charakterisierung dieses aktiven Zustandes, seiner Struktur und auch seiner Kinetik, soll des weiteren die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie zur Anwendung gebracht werden, die bereits erfolgreich sowohl für das strukturverwandte BR (Steinhoff *et al.*, 1994), als auch für das hier betrachtete System selbst eingesetzt werden konnte (Wegener *et al.*, 2001a, b; Wegener *et al.*, 2001c).

Im weiteren soll diese Methode dazu benutzt werden, die von Wegener gewonnenen Informationen über den Aufbau des NpSRII/NpHtrII-Komplexes zu ergänzen. Der Mechanismus der Signalübertragung vom Rezeptor- zum Transducer-Molekül, für den Wegener auf der Grundlage von ESR-Daten eine durch die Ausklappbewegung der F-Helix induzierte Rotationsbewegung der TM2 vorschlägt, wird ebenso Gegenstand der Untersuchungen sein. Besonderes Augenmerk soll dabei auf die Kinetik der entsprechenden Konformationsänderungen gelegt werden.

Ergänzend soll eine in Zusammenarbeit mit dem Labor von G. Büldt (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) vorgenommene röntgenkristallographische Analyse des membranständigen Bereiches des Signalkomplexes detaillierte Einblicke in den Aufbau dieser funktionellen Einheit liefern. Ein genaues Bild der Interaktionen innerhalb dieses Komplexes verspricht zudem mögliche Schlußfolgerungen bezüglich des Mechanismus der Signaltransduktion innerhalb dieser Einheit.

Hinsichtlich der, für die Kristallstrukturanalyse nicht zugänglichen, zytoplasmatische Linker-Domäne soll wiederum die ESR-Spektroskopie zur weiteren Strukturaufklärung herangezogen werden, um die von Wegener getroffenen Voraussagen zu überprüfen und ein möglichst vollständiges Bild bezüglich des Signaltransduktions-Mechanismus zu erhalten.

Schließlich sollen, im Hinblick auf die erwähnte Homologie zu den prokaryotischen MCP's, mögliche Implikationen für den Mechanismus der Chemotaxis Gegenstand der Diskussion sein. Insbesondere soll geprüft werden, ob sich ein einheitliches Modell für die Mechanismen der Photo- sowie der Chemotaxis auf Grundlage der gewonnenen Daten entwickeln läßt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind von p.A.-Qualität und stammen, wenn nicht gesondert erwähnt, von den Firmen Aldrich (Heidenheim), Baker (Groß-Gerau), Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm), Gibco-BRL (Neu Isenburg), Merck (Darmstadt), Riedel de Häen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim).

Molekularbiologische Reagenzien werden von den Firmen Boehringer (Mannheim), New England Biolabs (NEB, Schwalbach) und Pharmacia (Freiburg) bezogen. Die Polymerase-Kettenreaktionen werden ausschließlich mit dem Pfu PCR-System von Promega (Mannheim) durchgeführt. DNA-Ligationen erfolgen mit der T4 DNA Ligase von Gibco BRL (Neu Isenburg). RNaseA wird von Boehringer (Mannheim) bezogen.

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 NpSR_{II} und seiner Mutanten verwendete all-trans Retinal sind Produkte der Firma Sigma.

Nährmedien (Pepton 140 und Hefeextrakt) für die Zellanzucht werden von der Firma Gibco BRL 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 und setzt sich aus den Proteinen Lactalbumin (14,4 kDa), Trypsininhibitor (20 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Albumin (67 kDa) und Phosphorylase b (97 kDa) zusammen.

Die Spinlabel (1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat (MTS) und (1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-yl) carbamidoethyl-methanthiosulfonat (MTS-4-oxy) werden von der Firma Toronto Research Chemicals (TRC, Toronto) bezogen.

2.2 Instrumentation

Die Inkubation der *E. coli* Zellen erfolgt in einem Schüttler der Firma New Brunswick (Nürtingen) unter aeroben Bedingungen. Die Fermenter zur Zellanzucht stammen von der Firma Biotech International (Melsungen).

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen wird durch Elektroporation mittels eines GenePulsers der Firma BioRad (München) in Elektroporationsküvetten der Firma Invitrogen (Leek) durchgeführt.

Sedimentationen erfolgen in den Zentrifugen RC28S und RC5B der Firma Sorvall (Bad Homburg) in den Rotoren SS-34, F-28/36 sowie GS3, sowie in der Zentrifuge L8-70 der Firma Beckmann in den Rotoren Ti-70 und Ti-45.

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 oder von den Firmen Seqlab (Göttingen) beziehungsweise AGOWA (Berlin) durchgeführt.

UV/VIS-Spektren werden mit den Spektrometern Lambda 9 von Perkin-Elmer sowie DU-650 von Beckmann aufgenommen.

Polyacrylamid-Elektrophoresen erfolgen mit den Mini-PROTEAN II-System der Firma Biorad.

2.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue F⁺ Tn 10 *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^r Δ(*lacZ*)M15/*recA1* *andA1* *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)

Vektoren

pET27b ⁺	Novagen (Abingdon)
pET27bmod	(Klostermeier <i>et al.</i> , 1998)
pET27bmod- <i>npsopII-His</i>	Zur Verfügung gestellt von A. Wegener
pET27bmod- <i>npsopII-L40T/F86D-His</i>	Zur Verfügung gestellt von G. Schmies
pET27bmod- <i>npsopII-L159C-His</i>	Zur Verfügung gestellt von A. Wegener
pET27bmod- <i>nphtrII₁₁₄-His</i>	Zur Verfügung gestellt von A. Wegener
pET27bmod- <i>nphtrII₁₅₇-His</i>	Zur Verfügung gestellt von A. Wegener
pET27bmod- <i>nphtrII₁₅₇-V78C-His</i>	Zur Verfügung gestellt von A. Wegener

Oligonukleotide

Alle im folgenden aufgeführten Oligonukleotide werden von der Firma MWG (Göttingen) bezogen.

T7prom long Primer 5' TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG GAA 3'
 T7term long Primer 5' CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG C 3'

Die Schmelztemperaturen der nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide (siehe Spalte T_m/T_{mRed} (°C)) berechnen sich nach folgenden Formeln:

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

$$T_{mRed} = T_m - \left(1^{\circ}\text{C} \cdot \frac{n_{\text{Fehlpaarungen}}}{n_{\text{Gesamt}}} \right)$$

Zur Einführung von Mutationen in NpSRII-His werden folgende Oligonukleotide verwendet. Das der neu eingeführten Aminosäure entsprechende Codon ist jeweils durch Unterstreichung hervorgehoben:

<u>Mutation</u>	<u>Oligo</u>	<u>5' Sequenz 3'</u>	<u>T_m/T_{mRed} (°C)</u>
D75N	hin	CGG TAC ATT <u>AAC</u> TGG ATT CTC ACA	68/64
	rev	TGT GAG AAT <u>CCA</u> <u>GTT</u> AAT GTA CCG	68/64
I83L	hin	CAA CCC CGC <u>TCC</u> <u>TCC</u> TCT ACG ACC CT	86/82
	rev	AGG GTC GTA GAC <u>GAG</u> GAG CGG GGT TG	86/82
P183E	hin	TGC TTG GAC CGG <u>AGG</u> GCG TGG CGC T	86/78
	rev	AGC GCC ACG <u>CCC</u> <u>TCC</u> GGT CCA AGC A	86/78
T204A	hin	TGA CCT CGT <u>CGC</u> <u>GAA</u> GGT CGG ATT	76/72
	rev	AAT CCG ACC <u>TTC</u> <u>GCG</u> ACG AGG TCA	76/72

Cystein-Mutationen in NpHtrII₁₅₇-His wurden mit Hilfe folgender Primer eingeführt:

<u>Mutation</u>	<u>Oligo</u>	<u>5' Sequenz 3'</u>	<u>T_m/T_{mRed} (°C)</u>
G20C	hin	GCA CAG TTA TAC <u>GTG</u> <u>TAA</u> GAT GGG	70/62
	rev	CCC ATC TTA <u>CAC</u> GTA TAA CTG TGC	70/62
K21C	hin	GTT ATA CGG <u>GGT</u> <u>GTA</u> TGG GTG CC	72/59
	rev	GGC ACC CAT <u>ACA</u> CCC CGT ATA AC	72/59
M22C	hin	TAC GGG GAA <u>GTG</u> <u>TGG</u> TGC CGT TTT	74/61
	rev	AAA ACG GCA <u>CCA</u> <u>CAC</u> TTC CCC GTA	74/61
G23C	hin	GGA AGA TGT <u>GTG</u> CCG TTT TCA T	64/55
	rev	ATG AAA ACG GCA <u>CAC</u> ATC TTC C	64/55
A24C	hin	GGA AGA TGG <u>GTT</u> <u>GCG</u> TTT TCA TCT TC	76/68
	rev	GAA GAT GAA AAC <u>GCA</u> ACC CAT CTT CC	76/68
V25C	hin	GAT GGG TGC <u>CTG</u> <u>TTT</u> CAT CTT CG	70/61
	rev	CGA AGA TGA <u>AAC</u> <u>AGG</u> CAC CCA TC	70/61
A88C	hin	GTG ACA CCG <u>CCT</u> <u>GCT</u> CGC TTT CAA C	80/72
	rev	GTT GAA AGC GAG <u>CAG</u> GCG GTG TCA C	80/72
S89C	hin	GAC ACC GCC GCC <u>TGC</u> CTT TCA ACG	80/72
	rev	CGT TGA AAG <u>GCA</u> GGC GGC GGT GTC	80/72
L90C	hin	ACC GCC GCC TCG <u>TGT</u> TCA ACG CTG	80/72
	rev	CAG CGT TGA <u>ACA</u> CGA GGC GGC GGT	80/72
S91C	hin	GCC GCC TCG <u>CTT</u> <u>TGT</u> ACG CTG GC	78/69
	rev	GCC AGC GTA <u>CAA</u> AGC GAG GCG GC	78/69
T92C	hin	GCC TCG CTT TCA <u>TGT</u> CTG GCC GCG A	82/70
	rev	TCG CGG CCA <u>GAC</u> <u>ATG</u> AAA GCG AGG C	82/70
L93C	hin	TCG CTT TCA ACG <u>TGT</u> GCC GCG AAG GC	84/72
	rev	GCC TTC GCG GCA <u>CAC</u> GTT GAA AGC GA	84/72
A94C	hin	CTT TCA ACG CTG <u>TGC</u> GCG AAG GCC T	80/72
	rev	AGG CCT TCG <u>CGC</u> <u>ACA</u> GCG TTG AAA G	80/72
A95C	hin	CAA CGC TGG <u>CCT</u> <u>GTA</u> AGG CCT CGC G	84/72
	rev	CGC GAG GCC TTA <u>CAG</u> GCC AGC GTT G	84/72

2.4 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders erwähnt, werden molekulargenetische Methoden nach Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel (1987) angewendet.

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt nach alkalischer Lyse der *E. coli* Zellen nach Birnboim und Doly (1979). Die genomische DNA wird durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mit zwei Volumenäquivalenten Phenol/Chloroform (1:1 v/v) und im Anschluß daran mit einem Volumenäquivalent Chloroform extrahiert. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgt durch Zugabe von 2,5 Volumenäquivalenten Ethanol. Zur Fällung wird 10 min bei 0°C inkubiert, und anschließend 10 min bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und anschließend in 20-50 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, 20 µg/ml RNase A) aufgenommen.

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt unter Verwendung von Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen (Qia-Tip-20 und Qia-Tip-100). Abweichend vom Protokoll des Herstellers wird vor dem Auftrag des Lysates auf die Säulen ein RNase A-Verdau (20 µg/ml, 1 h bei 37°C) mit anschließender Zentrifugation (20 min, 10.000 × g) durchgeführt.

2.4.2 Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten

Die Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgt über die horizontale Agarose-Gelelektrophorese. Dazu werden die entsprechenden Proben in Probenpuffer (TBE-Puffer, 10 % Ficoll, 0,025 % Bromphenolblau und 0,025 % Xylencyanol) aufgenommen und auf 0,7 – 2 %ige Agarosegele in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,9 mM EDTA, pH 8,9) aufgetragen. Die Anfärbung der Banden erfolgt durch Zugabe von 0,6 mg/l Ethidiumbromid. Als Elektrophorese-Puffer dient ebenfalls TBE. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt bei einer Spannung von 3 – 4,5 V/cm. Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgt unter Verwendung eines Gel-Extraktions-Kits der Firma Qiagen (Hilden). Dazu werden die entsprechenden Banden unter UV-Licht (360 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA nach dem Protokoll des Herstellers aus diesen extrahiert.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgt mittels PCR (Mullis & Faloona, 1987). Dazu werden in der Regel 50 µl-Ansätze folgender Zusammensetzung verwendet:

- 5-20 ng DNA Matrize
- 25 pmol der entsprechenden Primer
- je 10 nmol der vier dNTP's
- 1 U Pfu-Polymerase sowie
- 5 µl 10 x Polymerase-Puffer

Die Zugabe der Polymerase erfolgt nach einem fünf-minütigen Denaturierungsschritt bei 96°C und Abkühlen der Ansätze auf Eis. Die DNA-Amplifikation erfolgt üblicherweise nach folgendem Standard-Protokoll:

- Denaturierung: 15 s bei 96°C
- Hybridisierung: 30 s bei $T_m - 5^\circ\text{C}$
- Elongation: 75 s bei 72°C

In der Regel werden 15-25 dieser Zyklen durchlaufen. Abschließend erfolgt ein weiterer Schritt von 2 min bei 72°C um die Elongation aller amplifizierten DNA-Fragmente sicherzustellen. Die Aufreinigung der PCR-Amplifikate erfolgt durch elektrophoretische Auftrennung (s.o.).

Ortsspezifische Mutationen werden mittels der „Overlap Extension“-Methode (Ho *et al.*, 1989) eingeführt. Abbildung 2.4.1 zeigt das Syntheschema dieser Methode.

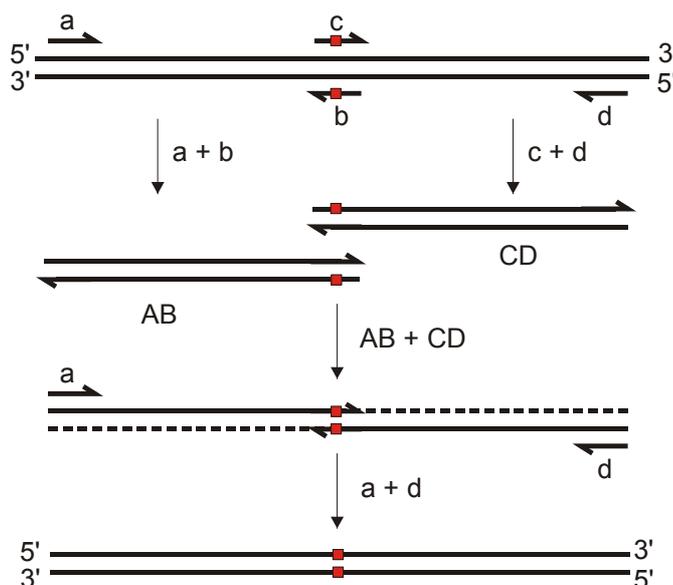


Abb. 2.4.1 Schema der „Overlap Extension“-Methode zur Einführung ortsspezifischer Mutationen (Ho *et al.*, 1989). Die rote Box kennzeichnet die Stelle der Mutation.

Es werden zwei PCR durchgeführt. Dabei werden in der ersten PCR durch Kombination eines flankierenden Primers (a,d) und einem Mutagenese-Primer (b,c) zwei DNA-Fragmente synthetisiert. In der zweiten PCR werden die isolierten DNA-Fragmente vereinigt und dienen als Matrize für die Amplifikation des vollständigen, mutierten Gens mit den flankierenden Primern a und d.

2.4.4 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgt durch Inkubation für 1 – 3 h bei 37°C mit dem entsprechenden Restriktionsenzym. Die Menge des eingesetzten Enzyms sowie die Wahl des Puffers erfolgt nach Angaben des Herstellers.

2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA erfolgt durch Inkubation von 50 ng des linearisierten Vektors mit einem zweifachen molaren Überschuss des DNA-Fragmentes und 1 U T4-DNA-Ligase in 20 µl Ligase-Puffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5 % (w/v) PEG 8000, pH 7,6) über Nacht bei RT. Anschließend wird die Ligase durch 15-minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert.

2.4.6 Transformation von *E. coli*

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen erfolgt mittels Elektroporation mit Plasmid-DNA nach der Methode von Dower *et al.* (1988). Dazu werden 10 ng Plasmid-DNA beziehungsweise 10 µl eines Ligationsansatzes (s. 2.4.5) mit 10 µl H₂O verdünnt, mit 70 µl einer 10 %igen Glycerinsuspension kompetenter Zellen (OD₅₇₈ ≈ 100) vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die Transformation erfolgt mittels eines GenePulsers (BioRad, München) durch einen Puls von 1,5 kV, 800 Ω, 25 µF und einer Zeitkonstanten von 10 ± 2 s. Die transformierten Zellen werden in 1 ml 2TY-Medium aufgenommen, 1 h bei 37°C und 200 Upm geschüttelt und anschließend auf Antibiotikahaltigen 2TY- oder LB-Agar-Platten ausplattiert.

2.4.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgen durch Cycle-Sequencing mit fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden (Sanger *et al.*, 1977). Hierzu werden in 20 μ l Reaktionsvolumen 1 μ g Plasmid-DNA, 6 μ l Big-Dye-Terminator-Mix (Applied Biosystems, ABI), 10 pmol Primer-Oligonukleotid und 2 μ l DMSO gemischt. Folgender PCR-Zyklus wird 25 mal durchlaufen:

96°C (10 s) \rightarrow 55°C (5 s) \rightarrow 60°C (4 min)

Anschließend werden die Reaktionsprodukte mit Ethanol gefällt und das Pellet nach einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol an der Luft getrocknet. Die elektrophoretische Analyse erfolgt an einem DNA-Sequencer Model 373 (ABI) oder wird von den Firmen SeqLab (Göttingen) bzw. AGOWA (Berlin) durchgeführt.

2.4.8 Zellanzucht

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt in LB-Medium (10 g Pepton(140)-Hydrolysat, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl ad 1000 ml, pH 7,2) oder 2TY-Medium (16 g Pepton(140)-Hydrolysat, 10 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl ad 1000 ml, pH 7,2) in 5 ml Reagenzgläsern oder 25-5000 ml Erlenmeyer-Kolben mit Schikane (Volumenverhältnis Kultur:Kolben = 1:3 – 1:4) bei 37°C und 200 Upm. Zur Selektion wird, soweit nicht anders angegeben, das Antibiotikum Kanamycin mit einer Konzentration von 50 μ g/ml verwendet. Die Zellvermehrung wird durch Trübungsmessung bei 578 nm ($1 \text{ OD}_{578} \approx 2 \times 10^8$ Zellen/ml) verfolgt. Die Anzucht größerer Mengen *E. coli* Zellen erfolgt in den Fermentern Biostat B (10 Liter) bzw. Biostat C (30 Liter) der Firma Braun Biotech GmbH (Melsungen).

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Proteinexpression in *E. coli*

Die Expression von NpSR_{II} und seinen Mutanten erfolgt in Anlehnung an die Methoden von Shimono *et al.* (1997) und Hohenfeld *et al.* (1999). Die Expression der verkürzten Transducer-Proteine NpHtr_{II157} und NpHtr_{II114} erfolgt mittels des gleichen Expressions-Systems. LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin werden mit einer Vorkultur auf eine OD₅₇₈ von 0,05 - 0,07 angeimpft. Bei einer OD₅₇₈ von etwa 1,0 wird die Expression durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Im Falle einer Expression des NpSR_{II} oder einer seiner Mutanten werden zeitgleich ad 10 µM *all-trans* Retinal in ethanolischer Lösung zugegeben (Zugabe von 1/5000 Kulturvolumen 50 mM Retinal in EtOH). 2 – 3 h nach Induktion werden die Zellen durch Zentrifugation (20 min, 4.500 × g, 4°C) geerntet.

2.5.2 Zellaufschluß und Aufreinigung der Proteine

Die Zellen werden in etwa 1/100 Kulturvolumen Zellwaschpuffer (150 mM NaCl, 25 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8,0, 2 mM EDTA) unter Zugabe einer Spatelspitze DNase resuspendiert. Nach der Resuspendierung werden die Zellen mittels eines Microfluidizers mechanisch bei 1000 bar aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (60 – 90 min, 100.000 × g, 4°C) werden die Zellmembranen sedimentiert und diese in 3-4 ml Puffer A (siehe S. 21) je Gramm Zellpellet homogenisiert und zur Solubilisierung über Nacht bei 4°C gerührt (NpSR_{II}/Mutanten – Rühren unter Lichtausschluß). Nach erneuter Zentrifugation (60 – 90 min, 100.000 × g, 4°C) wird der Überstand, welcher die solubilisierten Proteine enthält, auf eine mit etwa 3 Säulenvolumen Puffer B (s.u.) äquilibrierte Nickel-NTA-Agarose-Säule (Typ Superflow, Qiagen) aufgetragen. Im Anschluß daran werden unspezifisch an die Nickel-Matrix gebundene Proteine durch Waschen mit 10 Säulenvolumina Puffer C (s.u.) abgetrennt. Die Elution des Proteins erfolgt mittels Puffer D (s.u.).

Zur Abtrennung des Imidazols wird im Anschluß an die oben beschriebene Aufreinigung eine DEAE-Chromatographie durchgeführt. Dazu wird durch Verdünnen mit Puffer E (s.u.) die Salzkonzentration unter 30 mM gesenkt (NpHtr_{II157}/NpHtr_{II114}/Mutanten: unter 80 mM) und das verdünnte Eluat auf eine mit etwa 3 Säulenvolumina Puffer E äquilibrierte DEAE-Sepharose-

Säule aufgetragen. Anschließend wird mit 5 – 7 Säulenvolumina Puffer F_{NpSRII} bzw. $F_{NpHtrII}$ gewaschen und schließlich das Protein mit Puffer G eluiert.

Puffer:	A	300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8,0, 2 % DDM (w/v)
	B	300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8,0, 0,05 % DDM (w/v)
	C	300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8,0, 0,05 % DDM (w/v) + 30 mM Imidazol
	D	300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8,0, 0,05 % DDM (w/v) + 200 mM Imidazol
	E	10 mM Tris, pH 8,0, 0,05 % DDM (w/v)
	F_{NpSRII}	30 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0, 0,1 % DDM (w/v)
	$F_{NpHtrII}$	80 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0, 0,1 % DDM (w/v)
	G	500 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0, 0,1 % DDM (w/v)

2.5.3 Kopplungen mit Spinproben

Die Aufreinigung der Cystein-Mutanten des NpSRII-His sowie des NpHtrII₁₅₇-His bzw. NpHtrII₁₁₄-His erfolgt analog zu 2.5.2. Abweichend zu diesem Protokoll werden dem Eluat von der Ni-NTA-Matrix ad 10 mM DTT zugesetzt. Die Abtrennung des DTT über DEAE-Chromatographie (s.o.) erfolgt direkt vor der beabsichtigten Kopplung mit der Spinprobe, wobei die Elution mit Puffer G unter Argonatmosphäre erfolgt.

Dem DEAE-Eluat werden aus einer 10 mM Stammlösung der Spinprobe MTSSL (in DMSO) 1/100 Volumenäquivalent zugegeben und der Reaktionsansatz über Nacht bei 4°C unter Lichtausschluß leicht geschwenkt. Überschüssiger Spin-Label wird durch Wiederholung der DEAE-Chromatographie abgetrennt. Auch in diesem Fall muß der Reaktionsansatz mit Puffer F auf 30 mM (NpSRII) bzw. 80 mM (NpHtrII₁₅₇/NpHtrII₁₁₄) NaCl verdünnt werden.

2.5.4 Isolierung polarer Lipide aus *H. salinarum*

Das angewendete Protokoll orientiert sich an einer Vorschrift von Kates et al. (Kates *et al.*, 1982). Dabei wird statt ganzer Zellen nur die aufgereinigte Purpurmembraan verwendet. Die Purpurmembraanen (BR-Gehalt = 300-350 mg) werden in 200 ml 4 M NaCl resuspendiert. Nach

Zugabe von 500 ml Methanol und 250 ml Chloroform wird über Nacht unter Stickstoffatmosphäre und unter Lichtausschluß bei RT gerührt. Die Suspension wird 15 min bei $3.800 \times g$ in Metallröhrchen zentrifugiert. Die gelben Überstände werden gesammelt (unter Stickstoffatmosphäre und unter Lichtausschluß). Die Pellets werden erneut mit o.g. Methode extrahiert und die Suspension erneut zentrifugiert. Die vereinigten Überstände werden über ein 2 h in Methanol/Chloroform = 1:1 eingeweichtes Filterpapier (Whatman No. 1) abfiltriert. Es werden 500 ml H₂O und 500 ml Chloroform zugegeben und geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgt im Dunkeln über Nacht. Die Chloroformphase wird abgetrennt und unter Lichtausschluß am Rotationsverdampfer bei 30°C bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 12 ml Chloroform aufgenommen und diese Lösung 30 min bei $24.000 \times g$ bei 0°C zentrifugiert. Der Überstand wird erneut am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft. Dieser Rückstand wird in 45 ml Aceton bei 0°C im Ultraschallbad resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml einer methanolischen Lösung von 10 % MgCl₂ wird bei $1000 \times g$ (0°C) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment mehrfach mit 10 ml Aceton extrahiert, bis der Überstand farblos bleibt. Der im Ölpumpenvakuum getrocknete Rückstand wird gewogen und in einer Konzentration von etwa 40 mg/ml Methanol/Chloroform = 1:1 gelöst. Diese Lösung wird durch eine feine Kanüle in einen 20-fachen Volumenüberschuß wässriger Lösung von 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0, unter Argon und Lichtausschluß eingespritzt. Die Suspension wird im Ultraschallbad homogenisiert und im Anschluß lyophilisiert. Das Lyophilisat wird mit dem ursprünglichen Volumen Wasser versetzt und bildet eine stabile Suspension mit einer Konzentration von 2 mg/ml polaren Lipiden. Die Suspension wird bei -80°C gelagert.

2.5.5 Rekonstitution in PM-Lipide

Zur Rekonstitution in PM-Lipide werden Lösungen der aufgereinigten Membranproteine mit einem DDM-Gehalt von 0,05 % - 0,1 % verwendet. Das solubilisierte Protein wird mit der Lipid-Stammlösung in einem molaren Verhältnis von 1:15 (Rekonstitution des NpSR_{II}) bzw. 1:25 (Rekonstitution des NpSR_{II}/NpHtr_{II157}-Komplexes) gemischt und bei RT für einige Minuten geschwenkt. Die Salzkonzentration wird auf etwa 1 M NaCl eingestellt, der pH wird auf einen Wert zwischen 7 und 8 eingestellt. Anschließend werden Detergenzabsorber-Beads (BioRad) zugegeben, wobei sich 5 g Beads / 100 mg DDM als ausreichend für eine vollständige Rekonstitution herausgestellt haben. Dieser Ansatz wird über Nacht bei 4°C und unter Lichtausschluß geschwenkt. Nach Abtrennung der BioBeads werden die Membranen bei

14.000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert und das Membranpellet anschließend in dem gewünschten Puffer resuspendiert.

2.5.6 Immobilisierung rekonstituierter Proben in Polyacrylamid-Gelen

Für die Laserblitz-Absorptions-Spektroskopie, insbesondere für die Messung der Temperatur-, pH- und Azid-Abhängigkeiten des Photozyklus, werden die Proben zum leichteren Pufferwechsel in 16,5 %igen Polyacrylamid-Gelen immobilisiert (Tittor *et al.*, 1989). Dazu werden 600 μ l einer möglichst hoch konzentrierten (> 10 mg/ml) Lösung rekonstituierten Proteins mit 300 μ l 49,5 % Acrylamid, 4,5 μ l APS (10 %) sowie 1,5 μ l TEMED versetzt. Das Gel wird mit 1 mm Spacern in einer Standard-Apparatur gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation wird das Gel in Stücke der Größe 0.5×1.5 cm geschnitten.

2.6 Kristallisation des NpSRII/NpHtrII₁₁₄-Komplexes

2.6.1 Vorbereitung der Proteine für die Kristallisation

Die wie in 2.5 beschriebenen präparierten Proteine NpSRII-His und NpHtrII₁₁₄-His werden in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt und in PM-Lipide (Verhältnis Lipid:Protein = 35:1) rekonstituiert. Anschließend werden die rekonstituierten Proteine in 2 % *n*-octyl- β -D-glucopyranosid (OG) resolubilisiert. Dazu werden die pelletierten Membranen in 150 mM NaCl, 25 mM NaKPi, pH 5.1, 2 % OG im Ultraschallbad resuspendiert und die Ansätze 16 h bei 4°C unter Lichtausschluß geschwenkt. Die Lipide werden durch Zentrifugation bei $100.000 \times g$ abgetrennt und der den solubilisierten Komplex enthaltende Überstand in Amicon Centriplus YM-50 auf etwa 3-5 mg/ml ankonzentriert. Anschließend wird die OG-Konzentration durch Zugabe von 1,5 μ l 150 mM NaCl, 25 mM NaKPi, pH 5.1 auf 0.8 % eingestellt. Durch weiteres Ankonzentrieren in Amicon Centriplus YM-50 und amicon centricon YM-50 wird die Proteinkonzentration auf etwa 30-35 mg/ml gesetzt.

2.6.2 Kristallisationsansätze

Die Kristallisation des im Kristallisationspuffer (150 mM NaCl, 25 mM NaKPi, pH 5.1, 0.8 % OG) solubilisierten Komplexes in der aus Monovaccenin (Nu-Chek Prep) gebildeten kubischen Lipid-Phase wird von V. Gordeliy, R. Moukhametzianov und R. Efremov (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Als Präzipitant wird 1 M NaKPi, pH 5.6 verwendet. Die Kristalle wachsen bei 22°C.

2.7 Analytische Methoden

2.7.1 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese

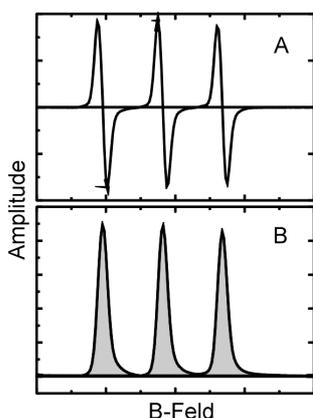
Die Durchführung der analytischen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgt nach der Methode von Schägger und Jagow (1987). Die Acrylamid-Konzentration wird in Abhängigkeit vom jeweils benötigten Trennbereich zwischen 10 % und 16 % bei einem Vernetzungsgrad von 3 % eingestellt. Die Protein-Proben werden vor dem Auftragen 30 min bei RT in Probenpuffer inkubiert.

2.7.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgt im Falle des NpSR_{II} und seiner Mutanten über die Absorption des Retinal-Chromophors bei 498 nm mit einem Extinktions-Koeffizienten von $\varepsilon = 40000 \text{ cm} \times \text{l/mol}$. Die Reinheit des Proteins kann in diesem Fall über einen Vergleich der Chromophor-Absorption mit der Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm erfolgen. Bei einem empirischen Wert von $A_{280}/A_{498} = 1,3$ kann dabei von einer Reinheit > 95 % ausgegangen werden. Im Falle des NpHtr_{II157} bzw. NpHtr_{II114} und seiner Mutanten erfolgt die Bestimmung der Protein-Konzentration nach der Methode von Ehresmann *et al.* (1973) über die Absorption bei 228,5 nm und 234,5 nm nach folgender Formel:

$$c_{\text{NpHtrII}} (\text{mg} / \text{ml}) = \frac{A_{228,5} - A_{234,5}}{3,14}.$$

Bei spinmarkierten Proteinen ergibt sich eine weitere Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung



über das Flächenintegral des ESR-Absorptions-Signals. Dieses ist der Spinzahl direkt proportional und die Konzentration kann durch Normierung mit dem Flächenintegral einer Spinprobe bekannter Konzentration bestimmt werden.

Abb. 2.7.1

Integration des ESR-Mess-Signals (A) des freien Spinlabels 4-Hydroxy-TEMPO. Das Flächenintegral (B, grau unterlegt) ist der Spinzahl direkt proportional.

2.8 Biophysikalische Methoden

2.8.1 Laserblitz-Absorptions-Spektrometrie

Transiente Absorptionsänderungen werden mit einer rechnergesteuerten Messanordnung bestimmt. Abbildung 2.8.1 zeigt den schematischen Aufbau dieser Mess-Apparatur.

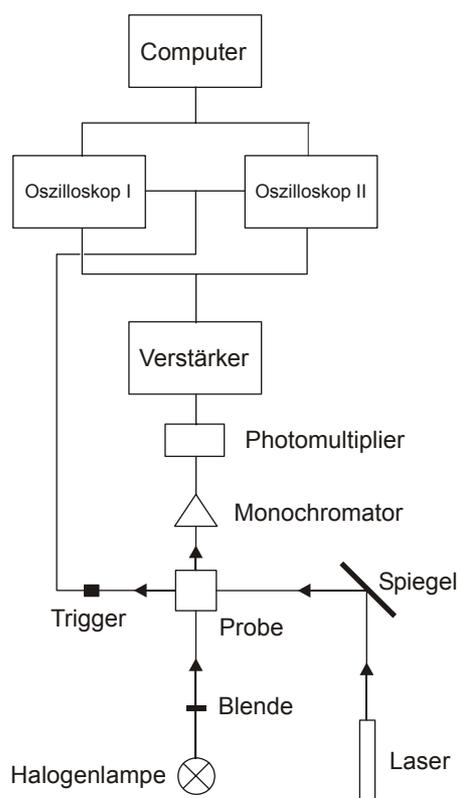


Abb. 2.8.1 Schematischer Aufbau der Laserblitz-Absorptions-Apparatur

Die photochemische Anregung der Probe erfolgt mit einem Laserpuls (Nd-YAG-Laser, ILT-405E, USSR, 485 nm, 10 ns, 2 mJ cm^{-2}). Das ungefilterte Licht einer Halogenlampe (Osram-XBO-100 W, 12 V) durchtritt die Probenküvette (Quarzglas, Schichtdicke 3 mm) im rechten Winkel zum Laserpuls und wird nach Wellenlängen-Selektion durch einen Monochromator (MDR4-LOMO, UDSSR) von einem Photomultiplier (FEU-100, UDSSR) detektiert. Mittels zwei digitalen Oszilloskopen (Le Croy 9361 und 9400 A) werden die vom Detektor kommenden Signale in zwei linearen, einander überlappenden, Zeitfenstern gespeichert. Die

Datenverarbeitung geschieht über den angeschlossenen Rechner. Üblicherweise werden für Photozyklus-Messungen pro Wellenlänge 25 Messwerte gemittelt.

Die beiden überlappenden Zeitfenster beinhalten die Absorptions-Signale, welche die Kinetik des Photozyklus 100 ns nach der Probenanregung durch den Laserpuls bis zur vollständigen Rückbildung des Grundzustandes erfassen. Mittels einer von Müller und Plesser (1991) beschriebenen Methode wird die Zahl der Messdaten auf eine logarithmische Zeitskala (250 Datenpunkte) reduziert. Die Standardabweichung wird anhand des Fehlers des Grundsignals abgeschätzt. Die Auswertung der Daten erfolgt über das Programm MEXFIT (Müller & Plesser, 1991). Dieses ermittelt über die Methode der kleinsten Quadrate für nicht-lineare Systeme einen Satz von Exponentialfunktionen. Die Summe dieser Exponentialfunktionen beschreibt die Absorptionsänderungen mathematisch. Eine solche Anpassungsfunktion wird akzeptiert, sofern sich die Standardabweichung nicht durch Hinzufügen eines weiteren Exponentialterms signifikant verbessern läßt. Aus dieser Anpassungsfunktion werden die Halbwertszeiten der Intermediate sowie deren Amplitudenspektren ermittelt. Die absoluten Intermediat-Spektren werden unter der Annahme eines kinetischen Modells irreversibler Folgereaktionen erster Ordnung für den Photozyklus ermittelt.

Analyse der Photozyklen

Die Analyse der absorptionsspektrometrischen Daten erfolgt nach der Methode von Chizhov *et al.* (1996), deren Grundlage das Lambert-Beer'sche Gesetz für $i = 1..n$ absorbierende Spezies ist:

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \sum_i \varepsilon_i \cdot c_i \cdot d \quad (1)$$

Da sich im Falle der Photozyklusmessungen die gemessenen Absorptionsänderungen immer aus den Beiträgen mehrerer Intermediate additiv zusammensetzt, ist die Daten-Interpretation entsprechend erschwert. Ein besonderes Problem stellt dabei die Bestimmung der Anzahl der beteiligten Intermediate dar (Maurer *et al.*, 1987). Die verwendete Methode setzt damit an, die experimentell bestimmten Absorptionsänderungen $\Delta A(\lambda, t)$ mathematisch durch eine Summe von Exponentialfunktionen zu beschreiben:

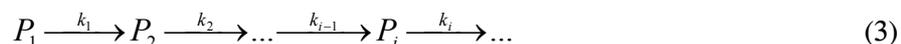
$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_i b_i(\lambda) \cdot e^{-k_i^* t} \quad (2)$$

Unter der Voraussetzung, daß die Zerfälle der Intermediate einer Kinetik erster Ordnung folgen, entspricht die zur Anpassung notwendige Zahl der Exponentialfunktionen der Anzahl n der

beteiligten Intermediate. Die multiexponentielle Analyse nach der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme liefert einen Satz apparenter Geschwindigkeitskonstanten k_i^* für die einzelnen Zerfälle. Aus diesen lassen sich die Halbwertszeiten $\tau = \ln 2/k$ der einzelnen Intermediate, sowie deren differentielle Amplitudenspektren (Müller & Plesser, 1991), berechnen.

Die Berechnung der Absolut-Spektren der Intermediate erfordert ein plausibles Reaktionsschema und die Zuordnung der apparenten Halbwertszeiten zu den einzelnen Intermediaten. Dabei wird von einer Sequenz irreversibler Übergänge erster Ordnung ausgegangen (Nagle *et al.*, 1982). Da dieses Modell eine exakte mathematische Lösung besitzt, lassen sich die Spektren der Intermediate, unter der Voraussetzung der Gültigkeit dieses Modells für das untersuchte System, folgendermaßen berechnen:

Die Kinetik einer Sequenz irreversibler Übergänge erster Ordnung



wird durch folgende Differentialgleichung beschrieben

$$\frac{dP_i}{dt} = -k_i P_i + k_{i-1} P_{i-1}. \quad (4)$$

Angenommen, alle Moleküle befinden sich zum Zeitpunkt $t=0$ im Grundzustand, läßt sich Gleichung (4) exakt lösen:

$$P_i = \sum_{j=1}^i a_{ij} \cdot e^{-k_j t}, \quad P_1(0) = 1; \quad P_{i>1}(0) = 0 \quad (5)$$

mit

$$a_{ij} = \frac{\prod_{m=1}^{i-1} k_m}{\prod_{\substack{m=1 \\ m \neq j}}^i (k_m - k_j)}. \quad (6)$$

$P_i(t)$ ist die Wahrscheinlichkeit, ein Molekül zum Zeitpunkt t im Zustand i vorzufinden. Bei n Reaktionsschritten ergibt sich für den präexponentiellen Faktor a_{ij} eine $n \times n$ Matrix. Als Konsequenz der Irreversibilität der Übergänge sind im Wahrscheinlichkeitswert P_i alle Informationen sowohl der vorangegangenen als auch des direkt nachfolgenden Reaktionsschrittes enthalten. Sind $\Delta\varepsilon_i$ die Differenzspektren der Intermediate i im Bezug auf den Grundzustand, folgt für die Absorptionsänderungen:

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_{i=1}^n \Delta b_i(\lambda) \cdot e^{-k_i^* t} = F_c \sum_{i=1}^n \Delta \varepsilon_i(\lambda) \cdot P_i(t) \quad (7)$$

F_c ist die sogenannte „cycling fraction“, d.h. der Anteil der Moleküle, welcher nach photochemischer Anregung den Zustand $i=1$ erreicht und somit den Photozyklus durchläuft. Die Matrix a_{ij} läßt sich berechnen, sobald man die experimentell ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_i^* den intrinsischen k_i zuordnet. Die Ableitung der Intermediat-Spektren hängt dann nur noch von einem unbekanntem Parameter, dem F_c , ab. Anhand der Spektren kann dessen Minimalwert mit hinreichender Genauigkeit abgeschätzt werden, wobei als Kriterium die Abwesenheit negativer Absorptionen in den Absolutspektren der Intermediate dient:

$$b_i(\lambda) = F_c \sum_{j=i}^n a_{ji} \cdot \Delta\varepsilon_j(\lambda). \quad (8)$$

Die differentielle spektrale Amplitude $b_i(\lambda)$ beinhaltet, im Gegensatz zur Wahrscheinlichkeit P_i , das Spektrum des Intermediates i und aller weiteren Intermediate ($j=i \dots n$) bis zum Ende des Photozyklus, so daß sich alle differentiellen Spektren $\Delta\varepsilon_i$ rekursiv aus dem Spektrum des letzten Intermediates n berechnen lassen:

$$\Delta\varepsilon_i = \frac{b_i(\lambda) - \sum_{j=i+1}^n a_{ij} \cdot \Delta\varepsilon_j(\lambda)}{a_{ii} F_c} \quad (9)$$

Durch Addition des Spektrums des Grundzustandes ε_0 ergeben sich dann die absoluten Spektren:

$$\varepsilon_i = \Delta\varepsilon_i + \varepsilon_0 \quad (10)$$

Die Ableitung eines kinetischen Photozyklus-Modells auf der Grundlage absorptionspektrometrischer Daten wirft jedoch ein prinzipielles Problem auf. Die experimentell ermittelten Informationen reichen nicht zur eindeutigen Bestimmung des Systems aus, da die Zahl der unbekanntem Größen die Anzahl bekannter Größen übertrifft. Daher sind üblicherweise mehrere Modelle geeignet, die gemessenen Daten mathematisch hinreichend zu beschreiben. Die Verlässlichkeit eines gewählten Modells läßt sich am besten dadurch abschätzen, ob das entsprechende Reaktionsschema physikalisch sinnvolle Aussagen zuläßt. Über die Temperaturabhängigkeit des Photozyklus läßt sich eine solche Abschätzung üblicherweise durchführen. Zum einen sollten sich die erhaltenen Intermediatspektren im betrachteten Temperaturbereich bei unveränderter Proteinstruktur und gleichem Reaktionsweg nicht signifikant ändern. Zum anderen sollten die apparenten Geschwindigkeitskonstanten bezüglich ihrer Temperaturabhängigkeit ein physikalisch sinnvolles Verhalten aufweisen. Des weiteren ist eine Abschätzung der Aktivierungsparameter der einzelnen Reaktionsschritte möglich. Ein

Näherungswert für die Aktivierungsenergie E_a kann nur eine lineare Regression auf Grundlage der empirischen Arrheniusgleichung erfolgen:

$$\ln k = \ln A - (E_a / RT), \quad (11)$$

mit der Gaskonstanten R und dem, in Anlehnung an die kinetische Gastheorie als Häufigkeits- oder Stoßfaktor bezeichneten Parameter A . Die Aktivierungs-Enthalpien ΔH^\ddagger und -Entropien ΔS^\ddagger lassen sich durch eine nichtlineare Analyse basierend auf der Eyringgleichung

$$k = \frac{k_b T}{h} e^{-\Delta H^\ddagger / RT} e^{\Delta S^\ddagger / R} \quad (12)$$

k_b = Boltzmannkonstante; h = Planckkonstante

nach der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme ebenfalls abschätzen.

2.8.2 ESR-Spektroskopie

Theoretische Grundlagen

Unter der Elektronenspinresonanz (ESR) versteht man die resonante Absorption von Mikrowellenstrahlung (hier: $\lambda = 3 \text{ cm}$) durch paramagnetische Substanzen, bei der Übergänge zwischen unterschiedlichen Energieniveaus nicht gepaarter Elektronenspins induziert werden. Als paramagnetische Substanzen dienen dabei im Falle der ESR-Spektroskopie an Biomolekülen z.B. Spinsonden (Spinlabel), stabile organische Radikale, welche kovalent an die zu untersuchenden Moleküle gebunden werden.

Der Gesamtdrehimpuls J eines Elektrons setzt sich aus Bahn- L und dem Eigendrehimpuls S zusammen:

$$\mathbf{J} = \mathbf{L} + \mathbf{S} \quad (1)$$

Der Betrag der Drehimpulsvektoren wird durch die Impulsquantenzahlen dargestellt:

$$\begin{aligned} |J| &= \sqrt{J(J+1)}\hbar \\ |L| &= \sqrt{L(L+1)}\hbar && \text{mit } L = 0,1,2,3\dots \\ |S| &= \sqrt{S(S+1)}\hbar && \text{mit } S = 1/2, 1, 3/2, 2\dots \end{aligned} \quad (2)$$

Durch die bewegte Ladung des Elektrons wird ein magnetisches Moment μ induziert. Dieses setzt sich wiederum aus den Anteilen der magnetischen Momente des Bahnlaufes μ_L und der Eigenrotation μ_S zusammen:

$$\mu_J = \mu_L + \mu_S \quad (3)$$

Für organische Radikale kann das Elektron als frei bzw. „bahnlos“ betrachtet werden, wodurch für die weitere Betrachtung in guter Näherung nur der Eigendrehimpuls betrachtet zu werden braucht. Damit ist der Gesamtdrehimpuls gleich dem Eigendrehimpuls und es ergibt sich:

$$|\mu_J| = |\mu_S| = -g \cdot \mu_B \cdot |S| \quad (4)$$

mit μ_B = Bohrsches Magneton und g = Landé-Faktor.

Der Landé-Faktor ergibt sich aus den jeweiligen Impulsquantenzahlen und vereinfacht sich durch die oben erwähnte Beschränkung auf den Eigendrehimpuls auf $g \approx 2$.

Bringt man ein ungepaartes Elektron in ein zeitlich konstantes, homogenes Magnetfeld mit der magnetischen Flußdichte B_0 , kommt es zu einer Wechselwirkung mit dem magnetischen Moment des Elektrons. Es ergeben sich zwei mögliche Orientierungen des Eigendrehimpulsvektors (Spin) zur Magnetfeldrichtung, parallel und antiparallel im quantenmechanisch erlaubten Winkel.

Die Projektion des Elektronenspins auf die Feldrichtungsachse wird als magnetische Quantenzahl m_s bezeichnet, welche wiederum durch die Spin-Quantenzahl gegeben ist:

$$m_s = S, S-1, S-2, \dots -S \quad (5)$$

Damit ergeben sich $2S + 1$ Einstellmöglichkeiten im Magnetfeld. Für ein Elektron mit $S = \frac{1}{2}$ ergeben sich somit zwei mögliche Orientierungen mit $m_s = \pm \frac{1}{2}$.

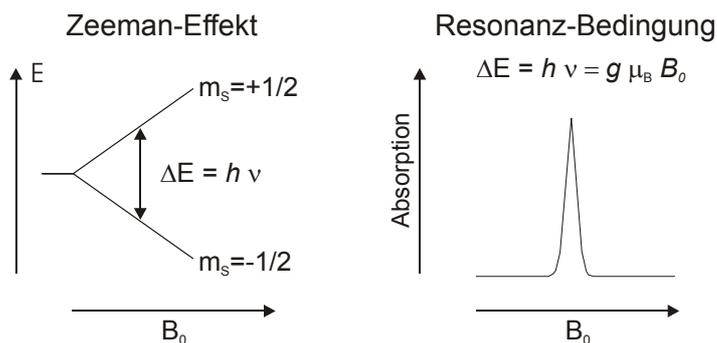
Für die Energie eines magnetischen Dipols im Magnetfeld gilt:

$$E = -\mu_s \cdot B_0 \cdot \cos \delta \quad (6)$$

Mit $\cos \delta = \frac{m_s}{|S|}$ ergibt sich aus den Gleichungen 4 und 6:

$$E = g \cdot \mu_B \cdot B_0 \cdot m_s \quad (7)$$

Damit ergibt sich für die Differenz der zwei möglichen Energiezustände $m_s = \pm \frac{1}{2}$ eines ungepaarten Elektrons $\Delta E = g \cdot \mu_B \cdot B_0$. Diese Differenz ist also abhängig von der Stärke des



Magnetfeldes. Diese Aufspaltung entarteter Energiezustände durch ein äußeres Magnetfeld bezeichnet man als Zeeman-Effekt. Wird dem System diese Energie in Form elektromagnetischer Strahlung zugeführt, findet ein

Absorptionsprozeß statt, bei welchem die Elektronen auf das energetisch höhere Niveau angeregt werden. Für den Resonanzfall gilt:

$$\Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (8)$$

Im Resonanzfall entspricht damit die eingestrahlte Frequenz der elektromagnetischen Strahlung der sogenannten Larmorfrequenz:

$$\nu_L = \frac{g \cdot \mu_B \cdot B_0}{h} \quad (9)$$

Damit kann der Elektronenspin zwischen den beiden Einstellmöglichkeiten wechseln, wobei die magnetischen Dipol-Übergänge in beide Richtungen erfolgen können, d.h. Absorption und Emission von Strahlung können gleichermaßen stattfinden. Allerdings hängt die Häufigkeit der Absorptions- bzw. Emissionsprozesse von der Besetzung der Zeeman-Niveaus ab. Nach der

Boltzmann-Verteilung gilt für die Besetzungszahlen des oberen (n_+) bzw. unteren (n_-) Energieniveaus:

$$n_+ = n_- \cdot e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (10)$$

Bei Raumtemperatur ist damit $n_- > n_+$, d.h. das untere Energieniveau ist etwas stärker besetzt, womit in der Summe eine Absorption beobachtet werden kann.

Nach der Absorption wird die ursprüngliche Besetzungsverteilung der Energieniveaus durch Relaxation wiederhergestellt, wobei zwei Relaxationsmechanismen unterschieden werden können. Zum einen kann die durch die Relaxation freiwerdende Energie an die Umgebung, das „Gitter“ abgegeben werden. Diesen Fall bezeichnet man als Spin-Gitter-Relaxation mit der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 . Aufgrund einer besseren Kopplung mit der Umgebung ist diese in Festkörpern wesentlich kürzer als in Flüssigkeiten. Zum anderen ist ein Spinaustausch paramagnetischer Nachbarmoleküle über magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen möglich. Dieser Fall wird als Spin-Spin-Relaxation, charakterisiert durch die Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 , bezeichnet. In Lösungen die Linienbreite der Resonanzlinie proportional zu $1/T_2$.

Des weiteren erzeugt die Wechselwirkung der Elektronen mit den magnetischen Momenten mit benachbarten Atomkernen eine Aufspaltung der Resonanzlinie. Dieser Effekt wird als Hyperfeinwechselwirkung bezeichnet und entsteht durch das von den Kernen erzeugte lokale B_{lok} -Feld, welches sich mit dem äußeren B_0 -Feld gemäß

$$B_{eff} = B_0 + B_{lok} \quad (11)$$

überlagert. Ein Kern mit einem Kernspin I kann $(2I+1)$ Einstellungen zum äußeren Magnetfeld einnehmen. Diese werden durch die Kernspinquantenzahl m_I bezeichnet. Damit ergeben sich für Kerne mit dem Kernspin $I=1$ (z.B. Stickstoff) drei mögliche Werte für das B_{lok} -Feld, wodurch die Absorptionslinie in $2S(2I+1)$ Linien aufgespalten wird. Da bei den gegebenen Feldstärken keine Übergänge zwischen den Kernniveaus induziert werden können, können lediglich drei Resonanzlinien gemäß $m_I = -1, 0, +1$ beobachtet werden, und zwar bei einem Resonanzfeld

$$B_{res} = B_{res}^0 - a \cdot m_I \quad (12)$$

Dabei sind B_{res}^0 = Resonanzstelle ohne Elektron-Kern-Wechselwirkung, a = Abstand der Hyperfeinlinien oder Hyperfeinkopplungskonstante und m_I das magnetische Moment des Kerns. Abbildung 2.8.2 zeigt die Hyperfeinaufspaltung der Zeeman-Niveaus durch Wechselwirkung mit dem Kernspin am Beispiel des hier verwendeten Stickstoffs.

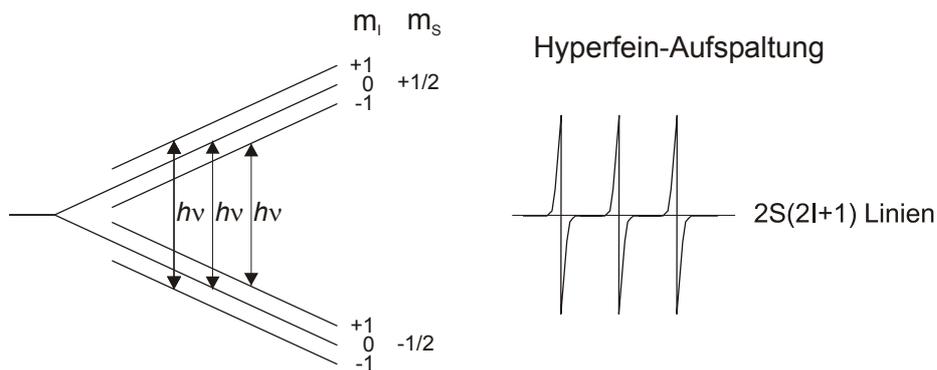


Abb. 2.8.2 Hyperfeinaufspaltung der Zeeman-Niveaus durch Wechselwirkung mit dem Kernspin am Beispiel des Stickstoffs (^{14}N) mit $I = 1$. Das resultierende Linienspektrum des freien Spin-Labels zeigt die drei Hyperfeinlinien gemäß $(2I + 1) = 3$.

Spin-Sonden

Zur Untersuchung von Proteinen mittels ESR-Spektroskopie werden, wie bereits erwähnt, üblicherweise stabile organische Radikale, wie z.B. das Nitroxid-Radikal, kovalent an eine Aminosäure des Proteins gebunden. Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten MTS-Spin-Labels ((1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl) methan-thiosulfonat) erfolgt diese kovalente Bindung an ein, über ortsspezifische Mutagenese des Proteins eingeführtes, Cystein in Form einer Disulfid-Brücke an die reaktive SH-Gruppe. Abbildung 2.8.3 zeigt schematisch die Kopplungsreaktion dieses Verfahrens, welches als „site directed spin labelling“ (SDSL) bezeichnet wird (Hubbell & Altenbach, 1994).

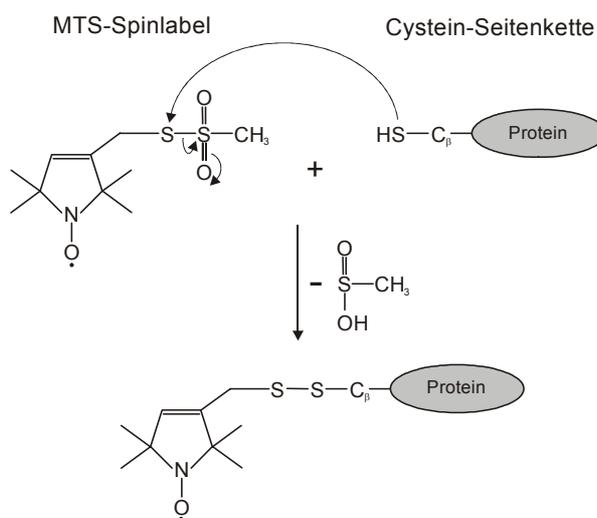
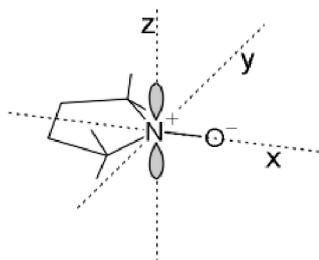


Abb. 2.8.3 Kopplungsreaktion des MTS-Spin-Labels an die Cysteinsseitenkette eines Proteins in schematischer Darstellung



Das ESR-Spektrum hängt von der Aufenthaltswahrscheinlichkeit und der Symmetrie der Verteilung um den magnetischen Kern ab. Die Lokalisierung des freien Elektrons im π_z -Hybridorbital (siehe Abbildung links) bedingt bei dem MTS-Spin-Label eine ungleichmäßige, d.h. anisotrope Wechselwirkung mit dem Kernspin des Stickstoffes. Führt man im Bezug zum π_z -Hybridorbital ein Molekülkoordinatensystem ein, läßt sich erkennen, daß das molekulare System näherungsweise axialsymmetrisch bezüglich der z-Achse ist. Der g-Faktor sowie die Hyperfeinkopplungskonstante hängen in diesem Fall ausschließlich von dem Winkel θ zwischen der Symmetrie-Achse und dem Magnetfeld ab, womit die Spektrenform durch die Zeitfenster der Molekularbewegungen des Spin-Labels beeinflusst wird. Betrachtet man nun den vollständig immobilisierten Grenzfall (Rotationskorrelationszeit $\tau > 10^{-7}$ s), z.B. in einem polykristallinen Pulver oder bei $T \ll 200$ K, so liegt eine statistische Verteilung aller möglichen Orientierungen des π_z -Orbitals vor. Das sogenannte Pulverspektrum ergibt sich damit als Superposition der gewichteten Einzelspektren der Nitroxide unterschiedlicher Orientierungen im B-Feld. Das Spektrum zeigt daher eine große

Hyperfeinaufspaltung und stark verbreiterte Linien (siehe Abb. 2.8.4 unten). Betrachtet man den anderen Grenzfall eines Spin-Labels in Lösung, so können die Moleküle eine nahezu isotrope Rotationsdiffusionsbewegung ausführen. Ist die Rotationskorrelationszeit τ kleiner als die typische Zeit für den Absorptionsvorgang, mittelt sich die Anisotropie von g und a heraus, d.h. das Spektrum wird unabhängig von der Orientierung des Labels zum B-Feld. Die Hyperfeinaufspaltung und der g-Faktor ergeben sich für Nitroxide demnach näherungsweise aus den Mittelwerten:

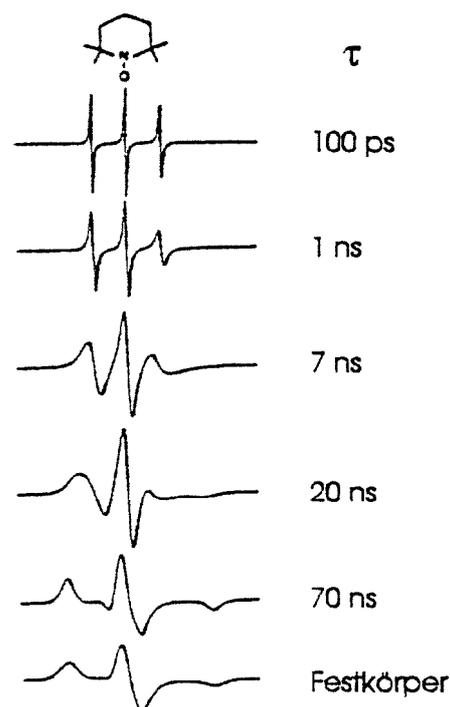


Abb. 2.8.4 Spektrenänderungen bei Rotationsdiffusion des TEMPO Spin-Labels.

$$g_0 = \frac{1}{3}(g_{\parallel} + 2 \cdot g_{\perp})$$

$$A_0 = \frac{1}{3}(A_{\parallel} + 2 \cdot A_{\perp})$$

Das Symbol \parallel bezeichnet dabei die parallele Orientierung des π_z -Orbitals zum äußeren Magnetfeld, \perp dementsprechend die senkrechte Orientierung. Das resultierende Spektrum ist gekennzeichnet durch drei scharfe Linien (vgl. Abb. 2.8.4 oben). Zwischen diesen beiden Grenzfällen gibt es einen stetigen Übergang, welcher in Abbildung 2.8.4 für unterschiedliche Mobilitäten der Spinsonde, charakterisiert durch die entsprechenden Rotationskorrelationszeiten, exemplarisch dargestellt ist. Die Rotationskorrelationszeit τ_R hängt dabei gemäß dem Stokesschen Gesetz von der Viskosität η der Lösung und dem Radius r des Moleküls ab:

$$\tau_R = \frac{4\pi \cdot \eta \cdot r^3}{3 \cdot k \cdot T} \quad (13)$$

k : Boltzmann-Konstante; T : Temperatur

Die Spektrenform wird ausschließlich durch Wechselwirkungen des an das Protein gekoppelten Spin-Labels mit Sekundär- und Tertiärstrukturen, und den daraus resultierenden Mobilitätsänderungen, beeinflusst.

Messaufbau

Die ESR-Messungen werden an selbstgebauten (Prof. Dr. H.-J. Steinhoff, Universität Osnabrück) X-Band-Spektrometern durchgeführt. Abbildung 2.8.5 zeigt den schematischen Aufbau dieser Geräte. Die Mikrowellenstrahlung wird durch ein Reflexklystron (Thomson-Varian) erzeugt und liegt im Falle des verwendeten X-Bandes bei 9,8 – 10 GHz, entsprechend einer Wellenlänge von etwa 3 cm. Die Weiterleitung der Mikrowellenstrahlung erfolgt über verlustfreie Hohlleiter (\rightarrow). Da für die ESR-Experimente eine konstante Mikrowellenfrequenz benötigt wird, wird eine automatische Frequenzkontrolle (AFC) eingesetzt. Hierzu wird ein direkt nach dem Klystron ausgekoppelter Teil der Welle als Referenz ausgekoppelt (über AS 1 und PS 1) und zu einem Teil der aus dem Resonator kommenden Welle in Bezug gesetzt. Die AFC regelt dementsprechend die Reflektorspannung des Klystrons nach. Ein weiterer Teil der Anregungswelle wird ausgekoppelt, um an der Detektor-Diode eine Vorspannung zu erzeugen, welche sich über einen Abschwächer (AS 3) und einen Phasenschieber (PS 3) in der Intensität und der Phasenlage einstellen läßt. Der in den Resonatorzweig eingespeiste Teil der Anregungswelle läuft über den Hauptabschwächer (AS 2). Mit diesem läßt sich die

Mikrowellenleistung einstellen, die mit Ausnahme der Sättigungsmessungen bei etwa 1 mW liegt. Der Zirkulator sorgt dafür, daß die Weiterleitung der Mikrowelle lediglich in Pfeilrichtung erfolgen kann.

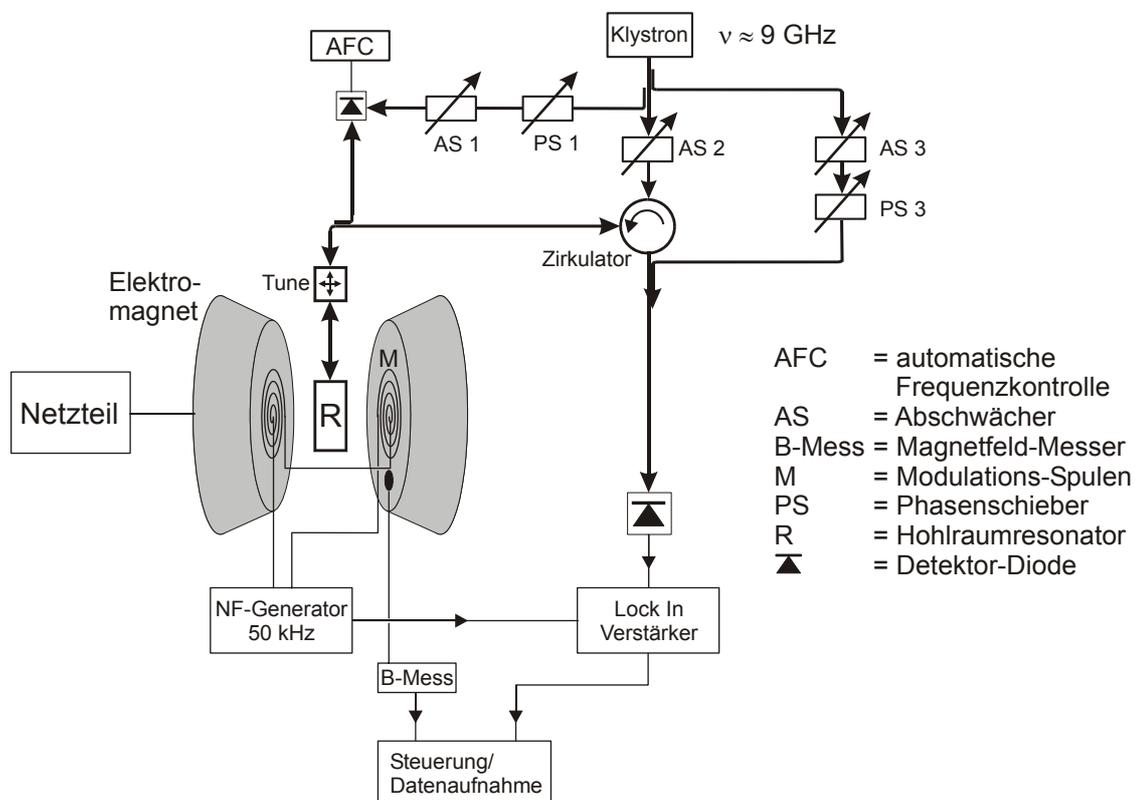
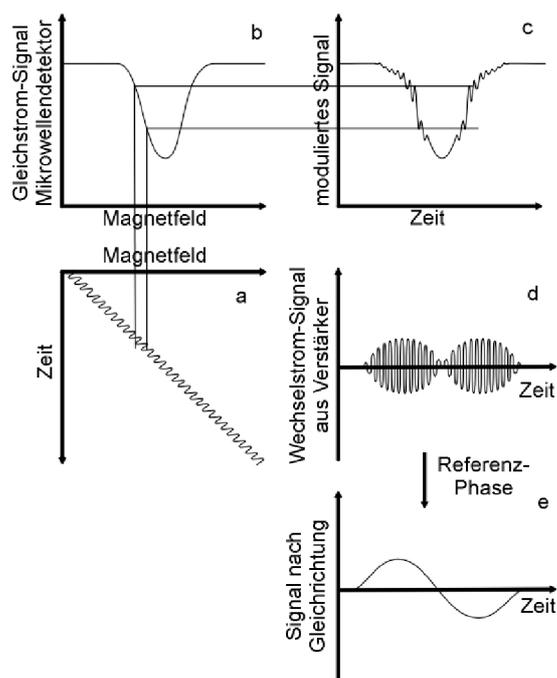


Abb. 2.8.5 Schematischer Aufbau der verwendeten ESR-Spektrometer

Bevor die eigentliche Messung erfolgen kann, muß zunächst der Resonator so an das verwendete Hohlleitersystem angepasst werden, daß die in den Resonator eingestrahlte Energie möglichst vollständig durch Dämpfung verbraucht wird und somit keine Reflektion von Mikrowellenleistung auftritt. Diese Abstimmung erfolgt durch Anpassung der Reflektorspannung am Klystron sowie an der Einkopplung der Anregungswelle in den Hohlraumresonator (Tune). Kommt es durch die im Resonator zu einer resonanzbedingten Absorption von Mikrowellenstrahlung durch die Probe, wird der Resonator „verstimmt“ und ein Anteil der Mikrowelle, der proportional zum absorbierten Anteil ist, wird reflektiert. Dieser Anteil gelangt über den Zirkulator zur Detektor-Diode und erzeugt dort ein zum absorbierten Anteil der Mikrowelle proportionales elektrisches Signal, welches verstärkt wird (Lock In) und über eine AD-Wandlerkarte vom Rechner aufgezeichnet werden kann.

Da die im Resonanzfall auftretenden Leistungsänderungen eine sehr geringe Signalamplitude haben, ist eine Verstärkung des Mess-Signals notwendig. Um dies zu erreichen, wird das Verfahren der Feldmodulation angewendet (Abb. 2.8.6). Dazu wird dem B_0 -Feld ein um drei Größenordnungen kleineres Wechselfeld mit einer Modulationsfrequenz von etwa 50 kHz (Abb. 2.8.6 a) überlagert. Das modulierte Mikrowellensignal (Abb. 2.8.6 b,c) wird von der Detektor-Diode im rauscharmen Wechselspannungsbetrieb umgewandelt. Die Verarbeitung der



Signalspannung mit der 50 kHz-Modulation als Trägerfrequenz erfolgt dann über einen Lock-In-Verstärker (Abb. 2.8.6 d), der das Signal phasenempfindlich gleichrichtet. Das resultierende Signal (Abb. 2.8.6 e) weist schließlich die Form der ersten Ableitung des ursprünglichen Signals auf. Die Größe der Wechselfeldamplitude liegt dabei üblicherweise bei etwa 1,5 – 2 Gauss, da es bei höheren Amplituden, welche mehr als die halbe Linienbreite der Resonanzlinie aufweisen, zu artifiziellen Linien-Verbreiterungen kommt.

Abb. 2.8.6 Feldmodulation: (a) harmonische Modulation des B-Feldes, (b) Absorptionslinie, (c) Signal gemessen über die Nachweis-Diode (d) Signal hinter dem Verstärker, (e) Signal nach phasenempfindlicher Gleichrichtung: 1. Ableitung des Absorptions-Signals.

Lichtinduzierte ESR-Messungen

Als Lichtquelle für die Aufnahme lichtinduzierter ESR-Spektren bzw. lichtinduzierter transients Änderungen des ESR-Mess-Signals dient eine Xenon-Blitzlampe (ILC Technologies) mit einer elektrischen Puls-Energie von etwa 80 J und einer Puls-Dauer von 200 μ s. Die Aufnahme von Differenz-Spektren zwischen dem Grundzustand und dem photo-aktivierten Zustand erfolgt durch Subtraktion der EPR-Signale zweier Zeitintervalle gleicher Länge (800 ms) aber unterschiedlicher Verzögerung nach dem Licht-Puls. Das erste Intervall wird direkt nach dem Licht-Puls aufgezeichnet, das zweite direkt im Anschluß daran, d.h. mit 800 ms Verzögerung. Die während des ersten Intervalls aufaddierten Datenpunkte entsprechen dabei den photo-aktivierten Photozyklus-Intermediaten, die im zweiten Intervall akkumulierten Datenpunkte dem

wiederhergestellten Grundzustand der Probe. Nach diesem Verfahren wird das komplette ESR-Spektrum (Start: 3400 G, Schrittweite: 0,5 G, 256 Datenpunkte) schrittweise durchfahren. Um ein akzeptables Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten, werden zwischen 20 und 200 Differenzspektren nach dieser Methode aufgenommen und aufaddiert.

Zeitaufgelöste ESR-Spektren werden bei festgelegten Magnetfeldstärken aufgenommen. Die Auswahl der Position im Spektrum erfolgt dabei üblicherweise nach dem Kriterium der maximalen Amplitude im Differenzspektrum. Wird zur Aufnahme der Kinetik eine andere Stelle im ESR-Spektrum gewählt, geschieht dies aus Gründen besserer Signal-Qualität. Die Datenaufnahme der zeitaufgelösten ESR-Spektren erfolgt mit Zeitauflösungen von 100 ms, 0,2 ms oder 0,035 ms am Nachweis-Lock In. Die Messpunkte werden grundsätzlich mit einem zeitlichen Abstand von 0,1 ms über ein gesamtes Zeitintervall von etwa 3,2 s aufgenommen. Um eine zuverlässige Basislinie zu erhalten erfolgt der Lichtblitz mit einer Verzögerung von etwa 0,4 s nach dem Beginn der Messung. Zwischen der Aufnahme der einzelnen Kinetiken liegt jeweils eine Wartezeit von 1 s, um die vollständige Rückkehr des Proteins in den Grundzustand sicherzustellen. Für jede Messung werden zwischen 1×10^3 und $3,2 \times 10^4$ Transienten gemittelt.

Leistungssättigungs-Messungen

Über die Zugänglichkeit des Nitroxid-Spinlabels gegenüber frei diffundierenden paramagnetischen Molekülen ist es möglich, detailliertere Informationen über die Umgebung des Spinlabels, d.h. der ersetzten Aminosäureseitenkette zu erhalten. Die Spinrelaxationszeit wird dabei durch die Kollisionshäufigkeit mit solchen paramagnetischen Molekülen beeinflusst. Wählt man diese Moleküle so, daß diese eine unterschiedliche Verteilung in den möglichen Umgebungen der untersuchten Protein-Seitenkette (wässrige Phase, Membran, Protein-Inneres) aufweisen, ermöglicht dies Aussagen über die Orientierung der Nitroxid-Seitenkette. Die in dieser Arbeit verwendeten Moleküle Sauerstoff und Chromoxalat zeigen die gewünschten Eigenschaften. Molekularer Sauerstoff zeigt eine hohe Löslichkeit und Diffusionsfähigkeit in Lipid-Doppelschichten, während Chromoxalat praktisch ausschließlich im wässrigen Medium zu finden ist. Im Protein-Inneren ist die Konzentration beider Proben praktisch zu vernachlässigen. Dadurch ist es anhand der Bestimmung der Kollisionsfrequenzen dieser beiden paramagnetischen Substanzen möglich, für die untersuchten Membranproteine Aussagen über die Orientierung der entsprechenden Seitenketten bezüglich Protein-Innerem, wässriger Phase bzw. Membran zu treffen.

Die Bestimmung der Kollisionsfrequenzen für molekularen Sauerstoff bzw. Chromoxalat erfolgte über das Verfahren der Leistungssättigung. Aus der Abhängigkeit der Signalamplitude der ersten Ableitung der Mittelfeldlinie von der eingestrahlten Mikrowellenleistung P ergeben sich die Leistungssättigungskurven. Sättigung liegt dann vor, wenn bei entsprechend hohem P die Anzahl der Absorptionsübergänge die der Relaxationsübergänge übertrifft. Die Kollision mit paramagnetischen Molekülen erhöht die Relaxationsrate und verschiebt damit die Sättigung zu höherer Mikrowellenleistung. Als Maß für das Sättigungsverhalten dient hier die Mikrowellenleistung $P_{1/2}$, bei der die gemessene Amplitude der Mittelfeldlinie die Hälfte des Wertes ohne Sättigung erreicht.

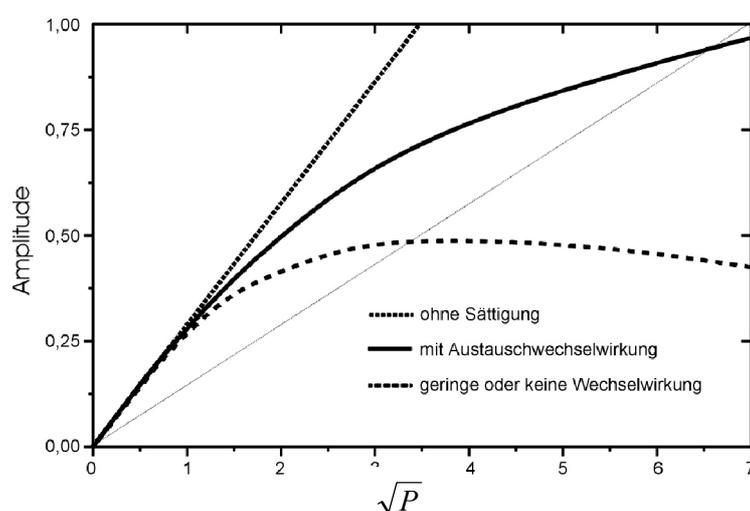


Abb. 2.8.7 Sättigungsverhalten des ESR-Signals in Abhängigkeit von der Mikrowellenleistung P mit und ohne Austauschwechselwirkung mit paramagnetischen Molekülen. Der Schnittpunkt der Hilfslinie mit der Sättigungskurve entspricht dem halben Wert des extrapolierten Verlaufs bei fehlender Sättigung. In diesem Falle wäre $\sqrt{P} = 3,5$.

Die Bestimmung der gesuchten Mikrowellenleistung $P_{1/2}$ erfolgt durch Aufnahme der Mittelfeldlinien-Amplituden als Funktion der eingestrahlten Mikrowellenleistung. Der gefundene Verlauf wird durch folgende Gleichung gemäß der Methode von Altenbach *et al.* (1994) mit einem Programm von Schweika (1997) mathematisch angepasst:

$$A'(B) = \frac{I \cdot \sqrt{P}}{\left[1 + \left(2^{1/\varepsilon} - 1\right) \cdot P/P_{1/2}\right]^{-\varepsilon}}$$

- $A'(B)$: Amplitude der 1. Ableitung der Mittelfeldlinie (als Funktion von B)
- I : Skalierungsfaktor
- ε : Faktor der Homogenität der Sättigung der Resonanzlinie (homogen: 1,5; inhomogen: 0,5)
- P : Mikrowellenleistung
- $P_{1/2}$: Leistung, bei der die Amplitude der 1. Ableitung die Hälfte des Wertes ohne Sättigung erreicht.

Aus den Differenzen der experimentell bestimmten $P_{1/2}$ in Gegenwart und Abwesenheit paramagnetischer Substanzen werden die entsprechenden $\Delta P_{1/2}$ Werte ermittelt und aus diesen der Einfluß unterschiedlicher Mobilitäten der Spinlabel durch Division durch die Mittelfeldlinienbreite eliminiert. Den dimensionslosen Zugänglichkeitsparameter Π erhält man abschließend durch Normierung auf das Referenzradikal Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) (Schweika, 1997).

Die experimentelle Durchführung der Leistungssättigungs-Messungen erfolgt in gaspermeablen Kunststoffkapillaren aus Polymethylpenten (TPX, Jagmar Ltd., Krakow, Polen). Die gewünschten Messbedingungen werden durch 15minütiges Umspülen der Proben mit Sauerstoff bzw. Stickstoff eingestellt. Die Messungen in Anwesenheit von 50 mM Chromoxalat (CrOx) werden in Gegenwart von Stickstoff durchgeführt. ESR-Spektren im Bereich der Mittelfeldlinie (3445 – 3465 G, Schrittweite 0,2 G) werden bei 10 – 11 verschiedenen Mikrowellenleistungen im Bereich von 0,5 bis etwa 70 mW aufgenommen. Die Datenpunkte der Sättigungskurven werden unter Verwendung des Programms „sattdata“ (Schweika, 1997) aus den manuell ermittelten maximalen Amplituden erhalten, und dem Programm „satfit“ (Schweika, 1997) zur Analyse zugeführt. Dieses erzeugt eine Anpassungsfunktion analog zur Methode von Altenbach *et al.* (1994) und liefert den Sättigungsparameter $P_{1/2}$. Die Normierung zur Bestimmung des dimensionslosen Zugänglichkeitsparameter Π erfolgt auf einen DPPH-Standard mit einer Linienbreite von 2,2 G und einem $P_{1/2}$ von 42 mW (Schweika, 1997).

Wechselwirkung von Spinproben

Für die Wechselwirkung zwischen paramagnetischen Nitroxid-Spinsonden kommen grundsätzlich zwei Mechanismen in Frage. Zum einen sind dies dipolare Wechselwirkungen, zum anderen sogenannte Heisenberg-Austausch-Wechselwirkungen.

In ersterem Fall geht man davon aus, daß eine paramagnetische Gruppe selbst ein Magnetfeld erzeugt. Dieses wirkt zusätzlich zum konstanten äußeren Magnetfeld auf benachbarte Spins, d.h. auf benachbarte Spinsonden ein und führt damit zu einer Veränderung der Spektrenform. Diese Änderungen äußern sich in der Form von Linienaufspaltungen und Verbreiterungen. Die Analyse dieser spektralen Veränderungen erfolgt zumeist über die Simulation der dipolaren Verbreiterungen der Resonanzlinien (Mchaourab *et al.*, 1997), wobei in dieser Arbeit die von Steinhoff *et. al* (1997) entwickelte Simulationsmethode eingesetzt wird. Diese ermöglicht es, aus Tieftemperaturspektren (170 K) Interspin-Abstände im Bereich von etwa 8 Å bis 20 Å mit einer Genauigkeit von 1–2 Å zu bestimmen. Die Aufnahme der entsprechenden ESR-Spektren bei

tiefen Temperaturen ist notwendig, um dynamische Prozesse als Ursache der Veränderung der Linienbreiten auszuschließen. Die Berechnung von Interspin-Abständen erfolgt konkret mit Hilfe des Programmes Dipfit (Steinhoff *et al.*, 1997) aus den dipolar verbreiterten Tieftemperatur-Spektren. Dazu werden zunächst die G- und A-Tensorelemente sowie die Anteile und Linienbreiten H_0 von Lorentz- und Gauss-Linien aus einem wechselwirkungsfreien Spektrum ermittelt:

g_{xx}	2,0087	A_{xx}	5,2 G
g_{yy}	2,0066	A_{yy}	4,5 G
g_{zz}	2,0026	A_{zz}	36,5 G (Startwert)

44 % Lorentz-Linie $H_0 = 3,3$ Gauss

56 % Gauss-Linie $H_0 = 3,9$ Gauss

Die Anpassung der dipolaren Linienverbreiterungen erfolgt dann über die Simulation verschiedener Interspin-Abstände, wobei alle Parameter bis auf A_{zz} konstant gehalten werden. Als Resultat dieser Simulation erhält man den mittleren Abstand mit entsprechender Verteilungsbreite sowie den A_{zz} -Tensor. Zugleich liefert die Simulation einen Wert für den Anteil einfach markierter Proteine, d.h. nicht wechselwirkender Spins. Diese entstehen aufgrund nicht vollständiger Markierung der Proteine, wobei die Effizienz der Spinmarkierung, je nach Zugänglichkeit der entsprechenden Position, üblicherweise zwischen 75% und 100% liegt.

Sogenannte Austauschwechselwirkungen lassen sich dann beobachten, wenn es zu einer Orbitalüberlappung der ungepaarten Elektronen zweier paramagnetischer Moleküle kommt. Dadurch ändert sich die lokale Spin-Dichte entweder dynamisch, d.h. durch kurzzeitige Orbitalüberlappung bei frei diffundierenden Teilchen, oder statisch in dem Falle, daß die wechselwirkenden Spins dauerhaft einen Abstand kleiner als etwa 8 Å zueinander einnehmen. Die Folge dieser Austauschwechselwirkungen ist im dynamischen Fall eine aufgrund der Fluktuationen des lokalen magnetischen Felds am Ort des Spins zu beobachtende Linienverbreiterung, wobei die Stärke dieser Verbreiterung proportional zur Überlappungshäufigkeit ist.

2.8.3 Aufnahme und Auswertung der Röntgendiffraktionsdaten

Die Kristalle des Komplexes werden von V. Gordeliy, R. Moukhametzianov und R. Efremov (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) an der Beamline ID14-1 des European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble, Frankreich vermessen. Die Detektion der Reflexe erfolgt mit einem Quantum ADSC Q4R CCD Detektor.

Die Auswertung der Daten wird von J. Labahn und J. Granzin (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) mittels der Programme MOSFILM (Leslie, 2002) und SCALA (CCP4, 1994) durchgeführt. Das Programm MOLREP (CCP4, 1994) wird verwendet um ein Polyalanin-Modell (Protein-Datenbank Zugriffsnummer 1JGJ (Luecke *et al.*, 2001)) mittels Molecular Replacement zu phasieren. Die anschließende Verfeinerung des Modells erfolgt mit dem Programmpaket CNS (Brünger, 1998). Die dreidimensionale Darstellung und Modellierung der Kristallstrukturen sowie der Interpretation von Elektronendichtekarten des Komplexes erfolgt mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991).

Die graphische Darstellung des Komplexes erfolgt mit den Programmen WebLab Viewer Light 4.2 (Accelrys Inc.) und POV-Ray 3.1 (POV Development Team, Freeware).

2.9 Sequenzanalyse

Die Analyse der Primärstruktur des NpHtrII erfolgt mit über das Internet frei zugänglichen Algorithmen (<http://pbil.ibcp.fr/>).

Sekundärstruktur-Vorhersage

- SOPM: Geourjon, C. & Deléage, G. (1994)
SOPM: a self-optimised method for protein secondary structure prediction.
Protein Engineering **7**, 157-164.
- SOPMA: Geourjon, C. & Deléage, G. (1995)
SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments.
Cabios **11**, 681-684.
- GOR4: Garnier, J., Gibrat, J.-F. & Robson, B. (1996)
GOR secondary structure prediction method version IV.
Methods in Enzymology **266**, 540-553.
- HNN: Guermeur, Y. (1997)
Combinaison de classifieurs statistiques, Application a la prediction de structure secondaire des proteines.
Dissertation.

Hydrophobizitäts-Analyse

- GREASE : Hydrophizitätsanalyse mittels der Kyte-Doolittle-Methode
Bestandteil des FASTA Programmpaketes
(http://fasta.bioch.virginia.edu/o_fasta/home.html)

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Photozyklus von NpSRII

Der erste, für die Aktivierung der Signaltransduktionskaskade notwendige, Schritt ist die Umwandlung des äußeren Reizes in eine für die Weiterleitung des Signals geeignete Konformationsänderung des Rezeptormoleküls. Trifft ein Photon geeigneter Wellenlänge auf das Rezeptormolekül, wird dieses vom Retinal-Chromophor absorbiert. Auf diese Weise photochemisch angeregt, durchläuft der Rezeptor eine Reihe von Intermediaten, über welche er durch thermischen Zerfall zurück in den Grundzustand relaxiert. Zur Weiterleitung eines Signals an das mit dem Rezeptor komplexierte Transducer-Molekül ist eine entsprechende Konformationsänderung im Bereich der Interaktionsfläche notwendig. Zumindest eines der angesprochenen Photozyklus-Intermediate sollte also mit einer entsprechenden Konformationsänderung des Proteins an geeigneter Stelle einhergehen. Damit bilden detaillierte Kenntnisse über den Photozyklus des NpSRII die Grundlage für das Verständnis der Funktionsweise bakterieller Phototaxis.

Über den Photozyklus des NpSRII existieren bereits detaillierte kinetische Untersuchungen (Chizhov *et al.*, 1998; Schmies *et al.*, 2000b). In dieser Arbeit soll die Funktion einzelner, am Protonentransport innerhalb des Proteins beteiligter, Aminosäuren durch entsprechende Mutations-Studien aufgeklärt werden. Zusätzlich soll die Analyse des Einflusses eines externen Protonen-Donors auf die Photozyklus-Kinetik weitergehende Einblicke in die Funktionsweise des Rezeptors erlauben. Des Weiteren wird, im Hinblick auf die zentrale Fragestellung nach der Natur der stattfindenden Konformationsänderungen, der Einfluß der direkten Umgebung des Rezeptormoleküls auf die Kinetik des Photozyklus untersucht. Dazu gehören sowohl die den Rezeptor umgebenden Lipid-Moleküle als auch selbstverständlich der im Komplex gebundene Transducer.

Die Analyse der Absorptions-Daten erfolgt über das von Chizhov *et al.* (1996) entwickelte Verfahren der multiexponentiellen Datenanalyse, welches in Abschnitt 2.7.1 beschrieben ist.

3.1.1 Analyse des Photozyklus von NpSR_{II} und Mutanten

Der Photozyklus des NpSR_{II} weist bezüglich der detektierbaren Intermediate große Ähnlichkeiten mit dem der Ionenpumpe BR auf. Allerdings zeichnet sich das Sensorische Rhodopsin durch eine gegenüber BR stark verlangsamte Kinetik aus, was mit der Funktion als Signalgeber für die nachfolgenden Komponenten des Phototaxis-Systems korreliert werden kann. Insbesondere, da die Verlangsamung nur den zweiten Teil des Photozyklus betrifft und zwar speziell den, durch die Reprotonierung der Schiff-Base charakterisierten, M₄₀₀-Zerfall. Dieser ist mit einer Halbwertszeit von etwa 500 ms um den Faktor 200 langsamer als im BR (siehe Abb. 3.1.3 A und E). Auch der von Váró und Lanyi postulierte (1990) und von Chizhov *et al.* (1996) für den BR-Photozyklus bestätigte irreversible Übergang M₁ → M₂, in dessen Folge sich die Zugänglichkeit der Schiff-Base ändern soll, ist beim NpSR_{II} spektroskopisch nachweisbar. Gegenüber etwa 150 µs beim BR liegt die Halbwertszeit des entsprechenden Überganges in NpSR_{II} allerdings bei etwa 2 ms.

Im BR wird der Protonentransport durch eine Reihe von Aminosäuren optimiert. Dies sind im einzelnen das an der Protonenabgabe an das Medium beteiligte und im extrazellulären Protonenkanal lokalisierte Glu-194 (Balashov *et al.*, 1997), Asp-96 als Protonendonator für die Schiff-Base, der Protonenakzeptor Asp-85, sowie Ala-215, dessen Carbonyl-Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum Indol-Stickstoff von Trp-182^{BR} bildet, die während des Überganges L → M unterbrochen wird (Lanyi & Luecke, 2001). Des weiteren bildet Thr-46 eine Wasserstoffbrücke mit Asp-96 aus (Luecke *et al.*, 1999a).

Im NpSR_{II} finden sich an den äquivalenten Positionen mit Ausnahme des Protonenakzeptors Asp-75 (Asp-85^{BR}) durchgehend andere Seitenketten. Glu-194^{BR} ist durch Pro-183^{NpSR_{II}} ersetzt und an Stelle von Ala-215^{BR} findet sich das sterisch anspruchsvollere Thr-204^{NpSR_{II}}. Einen besonders ausgeprägten Einfluß auf den Photozyklus dürfte des weiteren die Ersetzung des Protonendonors der Schiff-Base, Asp-96^{BR}, durch die neutrale aromatische Aminosäure Phe-86^{NpSR_{II}} sowie die Ersetzung von Thr-46^{BR} durch Leu-40^{NpSR_{II}} haben, da damit im NpSR_{II} die gesamte funktionelle Einheit wegfällt, welche im BR für die Reprotonierung der Schiff-Base zuständig ist.

Um festzustellen, inwieweit die oben genannten Aminosäuren die Photozykluskinetik der beiden Pigmente beeinflussen, werden entsprechende NpSR_{II}-Mutanten präpariert.

Dies sind im einzelnen die Einfach-Mutanten L40T, F86D, P183E und T204A, die Doppel-Mutante L40T/F86D, die Dreifach-Mutante L40T/F86D/P183E sowie die Vierfach-Mutante L40T/F86D/P183E/T204A. Die Positionen dieser Mutationen sowie der korrespondierenden Aminosäuren in BR sind in Abbildung 3.1.1 dargestellt.

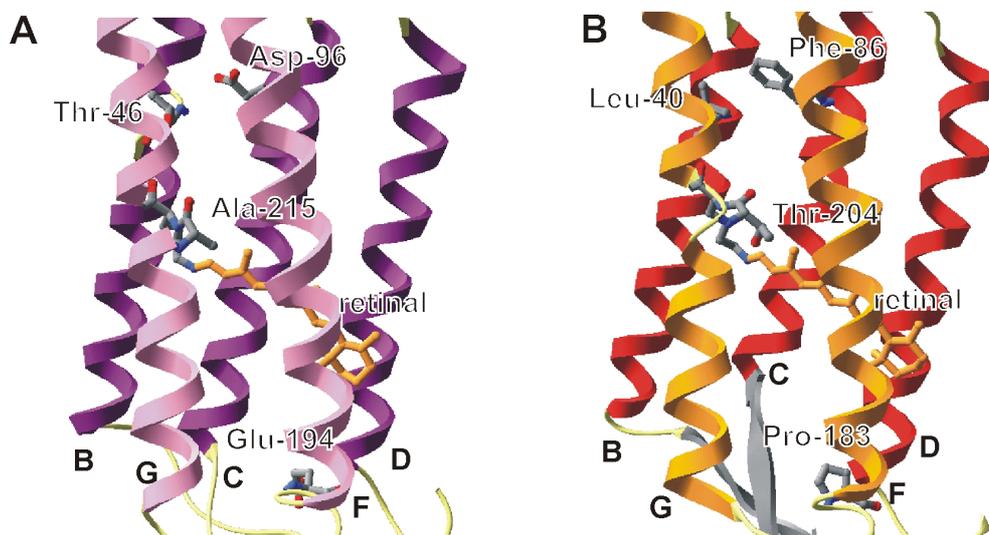


Abb. 3.1.1 Teile der Kristallstrukturen von BR (A) und NpSR II (B) in Bänderdarstellung mit den Positionen der eingeführten Mutationen im NpSR II bzw. den äquivalenten Seitenketten im BR. Die Koordinaten wurden der Brookhaven Proteindatenbank (PDB) entnommen (PDB-Codes: BR, 1C3W (Luecke *et al.*, 1999b); NpSR II, 1JGJ (Luecke *et al.* (2001))).

Die Einfach-Mutanten L40T, F86D, P183E und T204A

Abbildung 3.1.2 zeigt die Photozyklen der Einfachmutanten bei drei charakteristischen Wellenlängen. Die transienten Absorptionsänderungen bei 400 nm sind repräsentativ für Bildung und Zerfall des M_{400} -Intermediates, die bei 500 nm für Zerfall und Rückbildung des Grundzustandes. Die Kinetik des O_{550} -Intermediates wird bei 550 nm Wellenlänge verfolgt. Für die Messung werden die Proben in polare Lipide aus *H. salinarum* rekonstituiert (siehe 2.5.5). Die Messung erfolgt bei Raumtemperatur.

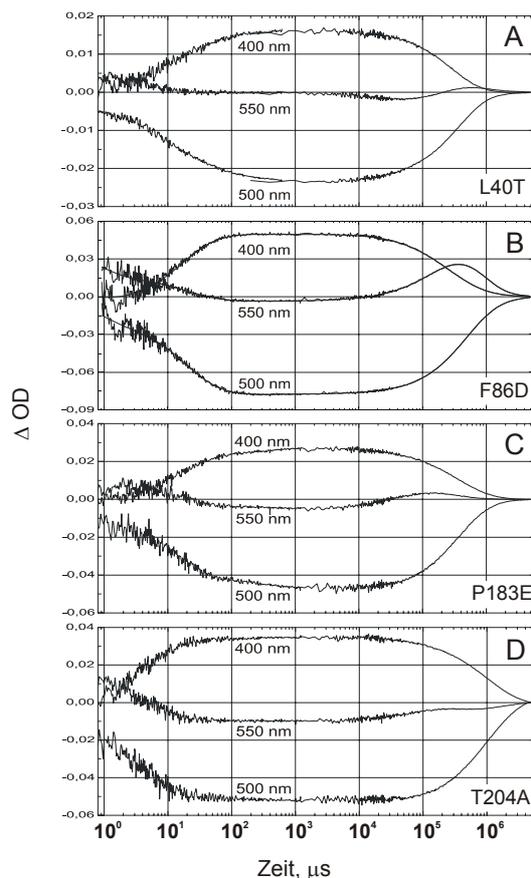


Abb. 3.1.2 Differentielle Absorptionsänderungen der Einfach-Mutanten (A) NpSR II-L40T, (B) NpSR II-F86D, (C) NpSR II-P183E und (D) NpSR II-T204A bei 400, 500 und 550 nm. Die Messung erfolgte mit rekonstituierten Proben (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) bei 25°C.

Die Photozyklen der Einfachmutanten unterscheiden sich nur geringfügig von dem des Wild-Typ NpSR II, insbesondere bezüglich der Gesamtdauer des Zyklus. Dennoch zeigen sich einige erwähnenswerte Abweichungen, welche sich an den entsprechenden Halbwertszeiten der Intermediate festmachen lassen. Diese sind in Tabelle 3.1.1 wiedergegeben.

	M-Bildung	M-Zerfall/ O-Bildung	O-Zerfall	Photozyklus beendet nach 1 s
NpSR II	12 μ s	150 ms	400 ms	75 %
L40T	8 μ s	90 ms	400 ms	76 %
F86D	10 μ s	120 ms	500 ms	70 %
P183E	12 μ s	250 ms	400 ms	76 %
T204A	6 μ s	500 ms	-*	69 %

* Aufgrund der geringen transienten Amplitude des O-Intermediates nicht bestimmbar.

Tab. 3.1.1 Kinetische Daten des NpSR II und seiner Einfach-Mutanten. Gemessen in rekonstituierter Form (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) bei 25°C.

Für die Mutante F86D findet sich, in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (Iwamoto *et al.*, 1999a), ein leicht beschleunigter M-Zerfall. Demgegenüber zeigt das NpSR_{II}-T204A eine etwa dreifache Verlangsamung dieser kinetischen Komponente sowie zusätzlich eine Beschleunigung der Bildung des M-Intermediates um den Faktor zwei. Ebenfalls erwähnt werden sollte, daß alle NpSR_{II}-Mutanten mit Ausnahme der F86D eine deutlich reduzierte transiente Amplitude des O-Intermediates aufweisen. Im Extremfall der Mutante T204A ist das O-Intermediat über die differentielle Absorptionsänderung bei 550 nm Wellenlänge nicht mehr nachweisbar.

Des weiteren weist die Mutante T204A eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um 9 nm von 498 nm auf 507 nm auf.

Die Mehrfach-Mutanten L40T/F86D, L40T/F86D/P183E und L40T/F86D/P183E/T204A

Trotz der nur marginalen Änderungen der Photozyklus-Kinetik bei den Einfach-Mutanten des NpSR_{II} lassen sich bei den Mehrfachmutanten signifikante Änderungen beobachten. Abbildung 3.1.3 zeigt die transienten Absorptionsänderungen dieser Mutanten im Vergleich zum Wild-Typ NpSR_{II}. Tabelle 3.1.2 fasst die wichtigsten kinetischen Daten zusammen.

Die Doppel-Mutante NpSR_{II}-L40T/F86D weist eine deutliche Beschleunigung des M₄₀₀-Zerfalls um den Faktor 25 auf (siehe auch Tabelle 3.1.2). Gleichzeitig erfolgt eine Beschleunigung der Bildung des O₅₅₀-Intermediates um den gleichen Faktor. Die Rückbildung des Grundzustandes, welche mit dem Zerfall von O₅₅₀ gekoppelt ist, erfolgt mit gegenüber dem Wild-Typ praktisch unveränderter Geschwindigkeit. Demzufolge läßt sich eine deutlich höhere transiente Konzentration des O-Intermediates beobachten (siehe Abb. 3.1.3 B).

Wird zusätzlich die Aminosäure Prolin an Position 183 im extrazellulären Kanal des NpSR_{II} durch die an entsprechender Stelle in BR vorliegende Glutaminsäure (Glu-194^{BR}) ersetzt, läßt sich sowohl eine weitere Beschleunigung des M₄₀₀-Zerfalls um den Faktor zwei als auch eine, um den gleichen Faktor, schnellere M₄₀₀-Bildung beobachten (Abb. 3.1.3 C). Zugleich wird auch die Kinetik der O₅₅₀-Form beeinflusst. Sowohl die Bildung als auch der Zerfall dieses Intermediates sind leicht beschleunigt, wobei sich aus der Änderung der Zerfallskinetik ebenfalls ein leicht beschleunigter Gesamtphotozyklus ergibt. Verglichen mit dem Wild-Typ ist der Gesamt-Photozyklus der Dreifach-Mutante etwa doppelt so schnell.

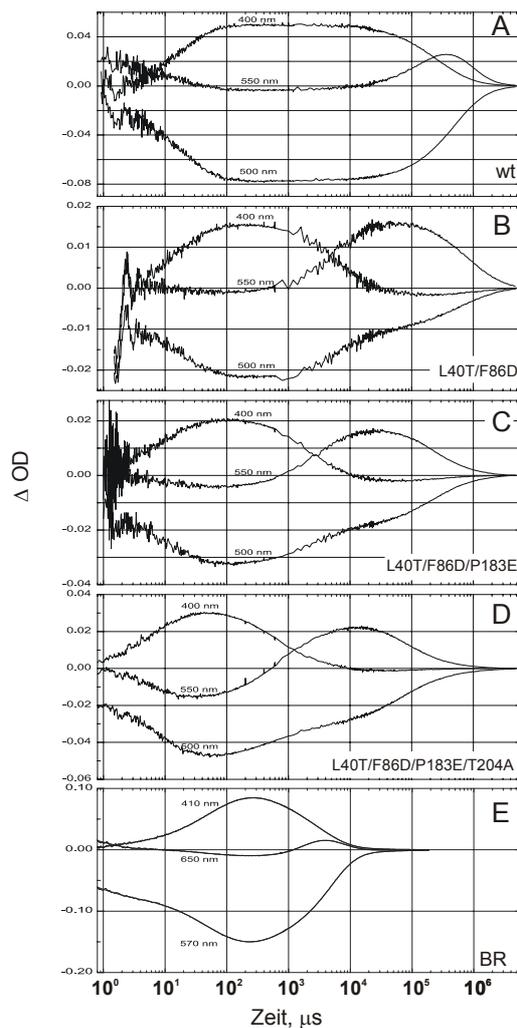


Abb. 3.1.3 Transiente Absorptionsänderungen von NpSRII (A), NpSRII-L40T/F86D (B), NpSRII-L40T/F86D/P183E (C) und NpSRII-L40T/F86D/P183E/T204A (D) bei 400, 500 und 550 nm Wellenlänge (PM-rekonstituiert, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) sowie von BR (E) bei 25°C.

	M-Bildung	M-Zerfall/ O-Bildung	O-Zerfall	Photozyklus beendet nach 1 s
Wild-Typ	12 μs	150 ms	400 ms	75 %
L40T/F86D	8 μs	6 ms	300 ms	85 %
L40T/F86D/P183E	12 μs	3 ms	160 ms	96 %
L40T/F86D/P183E/T204A	7 μs	0.5 ms	40 ms	99 %
BR*	30 μs	1.2 ms	4 ms	100 %

* Photozyklus nach ca. 100 ms beendet.

Tab. 3.1.2 Kinetische Daten des NpSRII und seiner Mehrfach-Mutanten im Vergleich mit BR. Gemessen in rekonstituierter Form (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) bei 25°C.

Die Einführung der zusätzlichen Mutation T204A in direkter Nachbarschaft der Schiff-Base führt zu einer weiteren Beschleunigung der SB-Reprotonierung. Dadurch läßt sich eine Zerfallsrate für das M_{400} -Intermediat beobachten, welche um einen Faktor von 2-3 schneller ist als die des BR (Vgl. Tab. 3.1.2). Des weiteren läßt sich anhand der transienten Absorptionsänderung bei 500 nm Wellenlänge eine um den Faktor 4 bis 5 schnellere Bildung des O_{550} -Intermediates beobachten. Zwar zeigt auch der O-Zerfall eine beschleunigte Kinetik, der Gesamt-Photozyklus wird jedoch, verglichen mit der Dreifach-Mutante L40T/F86D/P183E, nicht signifikant schneller. Erwähnenswert ist allerdings die Tatsache, daß hier, wie auch bei der Einfachmutanten T204A und einer, diese Mutation ebenfalls enthaltenden, 10-fach Mutante (Klare *et al.*, 2002) eine signifikante Beschleunigung des erstes Teils des Photozyklus zu beobachten ist.

Wie auch schon bei der Einfach-Mutante T204A läßt sich auch bei der Vierfach-Mutante eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums beobachten. Im Vergleich zu NpSRII-T204A ist dieses im Falle der Vierfach-Mutanten um weitere 2 nm auf 509 nm verschoben. Abbildung 3.1.4 zeigt das Absorptionsspektrum der in PM-Lipide rekonstituierten Mutante sowie die Parameter der Gausschen Anpassungsfunktion.

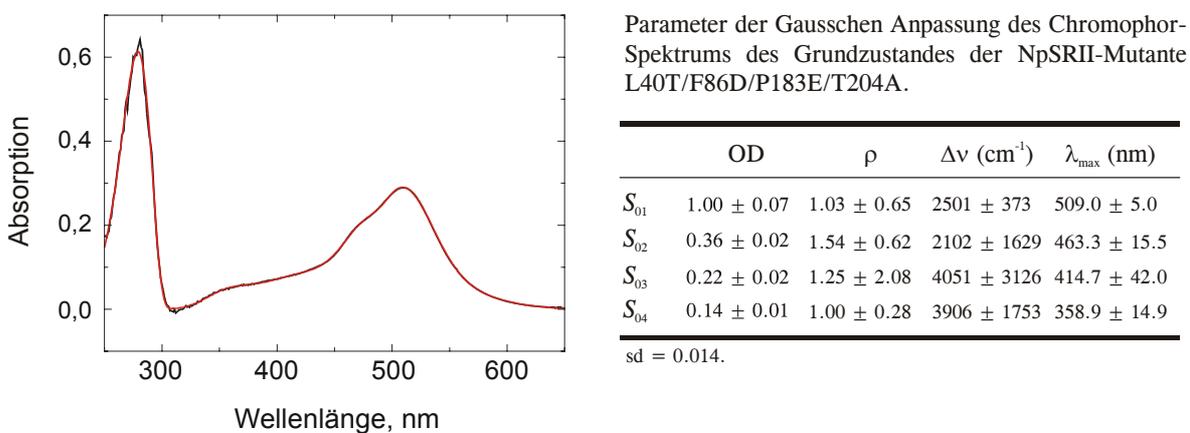


Abb. 3.1.4 Absorptionsspektrum von rekonstituiertem NpSRII-L40T/F86D/P183E/T204A bei pH 8,0 (schwarze Linie) mit entsprechender Gauss-Anpassungsfunktion (rote Linie). Pufferbedingungen: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Die Parameter der Anpassungsfunktion sind in nebenstehender Tabelle wiedergegeben.

Detaillierte Analyse des NpSRII-L40T/F86D/P183E/T204A Photozyklus

Da die Vierfach-Mutante die ausgeprägtesten Veränderungen in der Photozyklus-Kinetik verglichen mit dem Wild-Typ zeigt, erfolgt an dieser Stelle eine eingehendere Analyse der kinetischen Eigenschaften dieser Mutante. Die transienten Absorptionsänderungen werden bei 10 verschiedenen Temperaturen von 10°C bis 55°C (5°C Schrittweite) im Wellenlängenbereich von

360 bis 660 nm (10 nm Schrittweite) aufgenommen. Abbildung 3.1.5 zeigt exemplarisch die Daten bei 400 nm, 510 nm und 560 nm Wellenlänge bei 5 verschiedenen Temperaturen und deren Anpassungsfunktionen. Die Wahl der charakteristischen Wellenlängen 510 nm für den Grundzustand und 560 nm für das O-Intermediat erfolgt aufgrund der beobachteten bathochromen Verschiebung der Absorptionsmaxima.

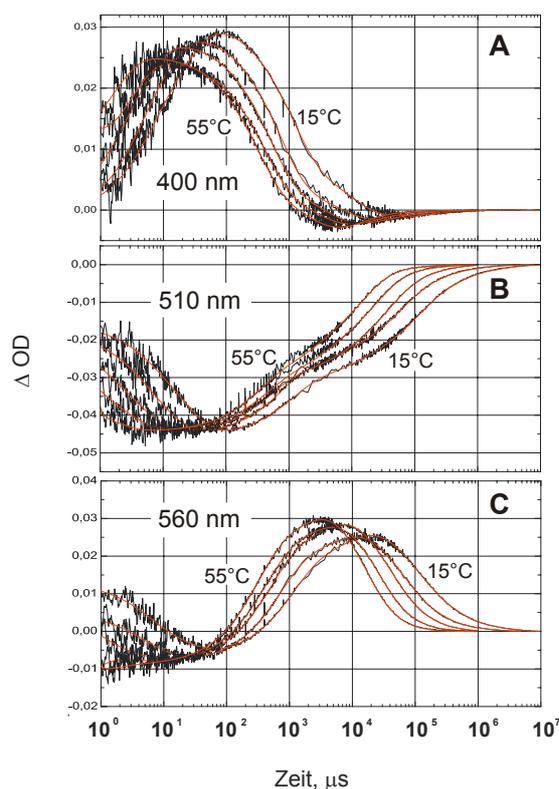


Abb. 3.1.5 Differentielle Absorptionsänderungen von NpSR II-L40T/F86D/P183E/T204A bei 400 nm, 510 nm und 560 nm Wellenlänge bei $T=15^{\circ}\text{C}$, 25°C , 35°C , 45°C und 55°C (schwarze Linien) und deren Anpassungsfunktionen (rote Linien). Alle Datensätze wurden mit rekonstituiertem Protein (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) aufgenommen.

Die Analyse der Daten erfolgt mit dem Programm MEXFIT nach der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme (Müller & Plesser, 1991; Chizhov *et al.*, 1996). Dabei werden die Datenpunkte von 500 ns bis 5 s nach dem Laserpuls unabhängig für jede Temperatur durch eine Summe von Exponentialtermen simuliert. Die Anpassung erfolgt unter der Annahme, daß sich der Photozyklus durch eine Reihe irreversibler Reaktionen erster Ordnung beschreiben läßt. Die Zahl der verwendeten Exponentialfunktionen muß dabei mit der Anzahl der Photozyklus-Intermediate übereinstimmen. Um die für die Anpassung der Daten minimal notwendige Anzahl von Exponentialtermen zu bestimmen, wird deren Zahl sukzessive erhöht, bis sich durch Hinzufügung weiterer Exponentialterme keine weitere Verbesserung der Standardabweichung

erreichen läßt. Die Absorptionsänderungen im Temperaturbereich von 10°C bis 30°C lassen sich hier mit sieben Exponentialtermen zufriedenstellend beschreiben (siehe Abbildung 3.1.5). Bei Temperaturen oberhalb 30°C kann die schnellste Komponente ($\tau_1 < 500$ ns) nicht aufgelöst werden. Das Arrheniusdiagramm in Abbildung 3.1.6 zeigt die Temperaturabhängigkeit der unabhängig voneinander ermittelten Ratenkonstanten. Da jede Ratenkonstante eine lineare Temperaturabhängigkeit aufweist, lassen sich die apparenten Aktivierungs-Enthalpien ΔH^\ddagger und -Entropien ΔS^\ddagger jedes einzelnen thermischen Zerfalls nach der Gleichung von Eyring (siehe Abschnitt 2.7.1) bestimmen (Tabelle 3.1.3).

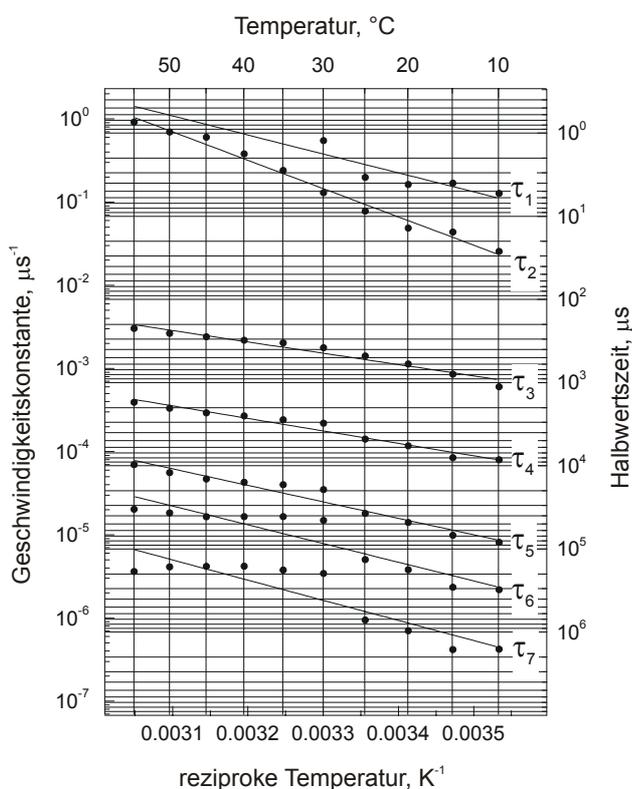


Abb. 3.1.6 Temperatur-Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_i bzw. Halbwertszeiten τ_i der NpSRII-Vierfachmutante.

	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4	τ_5	τ_6	τ_7
ΔH^\ddagger (kJ/mol)	41 ± 16	63 ± 3	24 ± 2	26 ± 2	35 ± 3	41 ± 6	44 ± 8
ΔS^\ddagger (J/mol K)	-2 ± 52	61 ± 9	-106 ± 7	-115 ± 6	-101 ± 10	-94 ± 20	-96 ± 25

Tab. 3.1.3 Apparente Aktivierungsparameter des NpSRII-L40T/F86D/P183E/T204A Photozyklus.

Es läßt sich, in Analogie zum Wild-Typ NpSR_{II} (Chizhov *et al.*, 1998) und zum BR (Chizhov *et al.*, 1996), feststellen, daß die Aktivierungsenthalpien mit Werten zwischen 24 und 63 kJ/mol kaum variieren. Die Ratenkonstanten der Intermediate werden daher vorrangig durch die Aktivierungsentropien bestimmt.

Des weiteren wird die pH-Abhängigkeit des Photozyklus der Vierfach-Mutante untersucht. Der daraus ermittelte pK-Wert im Vergleich zum Wild-Typ sollte Rückschlüsse auf die in dieser Mutante am Protonentransport beteiligten Seitengruppen liefern. Dazu werden die differentiellen Absorptionsänderungen bei 13 verschiedenen pH-Werten zwischen 5.0 und 12.1 analysiert, wobei das Hauptaugenmerk auf den Einfluß des pH auf die Kinetik des M₄₀₀-Intermediates gelegt wird. Abbildung 3.1.7 zeigt die transienten Absorptionsänderungen bei den drei repräsentativen Wellenlängen im oben genannten pH-Bereich.

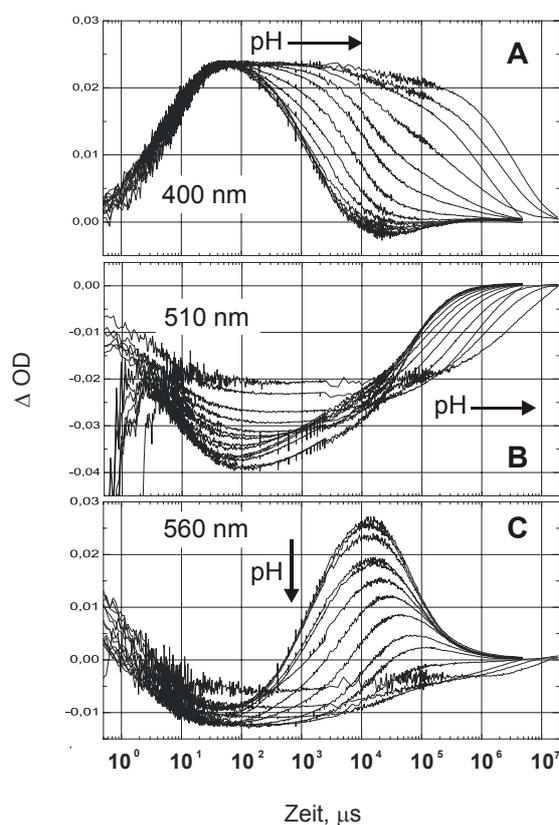


Abb. 3.1.7 pH-Abhängigkeit des Photozyklus der NpSR_{II}-Vierfach-Mutante. Die Messung der Proben erfolgt in immobilisierter Form in einem Polyacrylamid-Gel (siehe Material und Methoden). Pufferbedingungen: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 5,0 – 12,1 (13 pH-Werte), 25°C.

Es ist klar ersichtlich, daß der Photozyklus der Mutante im Bereich zwischen pH 5,0 und 8,1 unverändert ist. Bei höheren pH-Werten läßt sich eine deutliche Verlangsamung des M-Zerfalls erkennen, während die Kinetik der Bildung dieses Intermediates unbeeinflußt bleibt. Des

weiteren läßt sich mit steigendem pH eine deutliche Abnahme der transienten Amplitude des O₅₅₀-Intermediates erkennen. Bei pH-Werten >10 läßt sich im Extremfall praktisch kein O mehr anhand der differentiellen Absorptionsänderung bei 550 nm nachweisen. Zur weiteren Analyse wird der M₄₀₀-Zerfall multiexponentiell angepasst, wobei sich die Daten durch Verwendung von drei Exponentialtermen zufriedenstellend simulieren lassen. Die pH-Abhängigkeit der Hauptkomponente dieses Zerfallsprozesses wird schließlich unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung angepasst. Es ergibt sich ein pK_a von $9,5 \pm 0,2$. Im Vergleich dazu zeigt der Wild-Typ einen pK_a-Wert > 10,5 (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Einfluß von Natriumazid auf den Photozyklus von NpSRII

Die Anwesenheit externer Protonendonatoren, wie beispielsweise das hier betrachtete Natriumazid, beschleunigen sowohl im BR-D96N als auch im NpSRII die Reprotonierung der Schiff-Base (Tittor *et al.*, 1989; Miyazaki *et al.*, 1992; Takao *et al.*, 1998; Schmies, 2000). Alle bisherigen Untersuchungen diesbezüglich konnten jedoch nur ein unvollständiges Bild des Wirkmechanismus des Azid-Ions auf den NpSRII-Photozyklus zeichnen. Insbesondere die Frage, ob die Stickstoffwasserstoffsäure HN_3 direkt als Protonendonator fungiert, konnte bisher nicht zufriedenstellend geklärt werden. Aus diesem Grund soll der Effekt des Natriumazid auf den Photozyklus des NpSRII hier möglichst detailliert, d.h. über einen weiten Konzentrationsbereich und bei unterschiedlichen pH-Werten, untersucht werden. Zur Vereinfachung der experimentellen Bedingungen werden die rekonstituierten Proben immobilisiert in einem Acrylamid-Gel gemessen (siehe 2.5.6). Vergleichende Messungen mit nicht immobilisierten Proben zeigen, daß dies keinen signifikanten Einfluß auf die Photozyklus-Kinetik hat (Daten nicht gezeigt). Vor den jeweiligen Messungen werden die Gel-Proben mindestens 20 Minuten mit dem jeweiligen Messpuffer äquilibriert.

Zunächst wird die Azid-Abhängigkeit des NpSRII-Photozyklus im Konzentrationsbereich von 0 bis 4 M Azid bei pH 8,0 untersucht. Abbildung 3.1.8 zeigt den Verlauf der transienten Absorptionsänderungen bei 400, 500 und 550 nm in Abhängigkeit von der Azid-Konzentration.

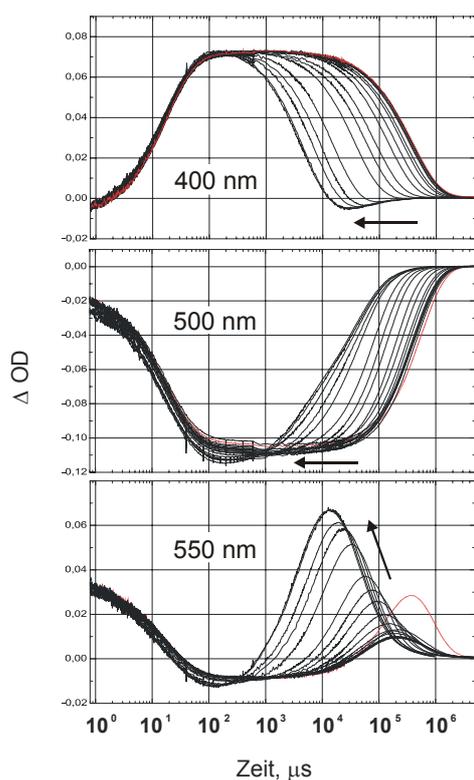


Abb. 3.1.8 Transiente Absorptionsänderungen von NpSRII (rekonstituiert, immobilisiert) in Abhängigkeit von der Azid-Konzentration. Die roten Transienten zeigen den Photozyklus ohne Azid. Die Pfeile kennzeichnen die Richtung steigender Azid-Konzentrationen.

Es ist deutlich zu erkennen, daß nicht nur der M_{400} -Zerfall mit zunehmender Azid-Konzentration beschleunigt wird. Tatsächlich erfährt der gesamte Photozyklus eine Azidabhängige Beschleunigung. Zusätzlich wird mit steigendem Azid-Gehalt eine Beschleunigung sowohl der Bildung als auch des Zerfalls des O_{550} -Intermediates beobachtet, einhergehend mit einer stetigen Erhöhung der transienten Konzentration des O_{550} . Bemerkenswert ist dabei, daß geringe Azid-Konzentrationen zunächst im Vergleich zum Photozyklus ohne Azid eine starke Dezimierung der O_{550} -Amplitude zur Folge haben. Ein Minimum der transienten Konzentration des O stellt man bei etwa 10-20 mM NaN_3 fest. Außerdem läßt sich feststellen, daß ab einer Konzentration von etwa 3 M Azid ein Sättigungseffekt auftritt, erkennbar an den nahezu identischen Kinetiken bei 3 bzw. 4 M NaN_3 . Zudem zeigen sich bei derartig hohen Konzentrationen bei Betrachtung der Kinetik des Grundzustandes (500 nm) Hinweise auf eine zusätzliche kinetische Komponente.

Der bei $\text{pH} = 8,0$ eindeutig zu beobachtende Effekt auf den Photozyklus wirft allerdings die Frage auf, ob Azid tatsächlich als Protonendonator fungiert. Bei einem pK -Wert von 4,7 liegt das Azid bei $\text{pH} 8,0$ praktisch ausschließlich in Form des Azid-Anions N_3^- vor, hätte somit also kein Proton, welches es an das Protein abgeben könnte.

Daher wird im Weiteren die Abhängigkeit des Azideffektes vom pH -Wert der Probe untersucht. Dazu werden zusätzliche Messungen analog zu den vorangegangenen bei den pH -Werten 6,5 und 5,0 durchgeführt. Diese Messungen sollen ein deutlicheres Bild der Vorgänge liefern, als die von Schmies (2000) ansatzweise durchgeführten Untersuchungen. Abbildung 3.1.9 zeigt die aus allen Messungen ermittelten Halbwertszeiten des M- bzw. O-Zerfalls im Photozyklus.

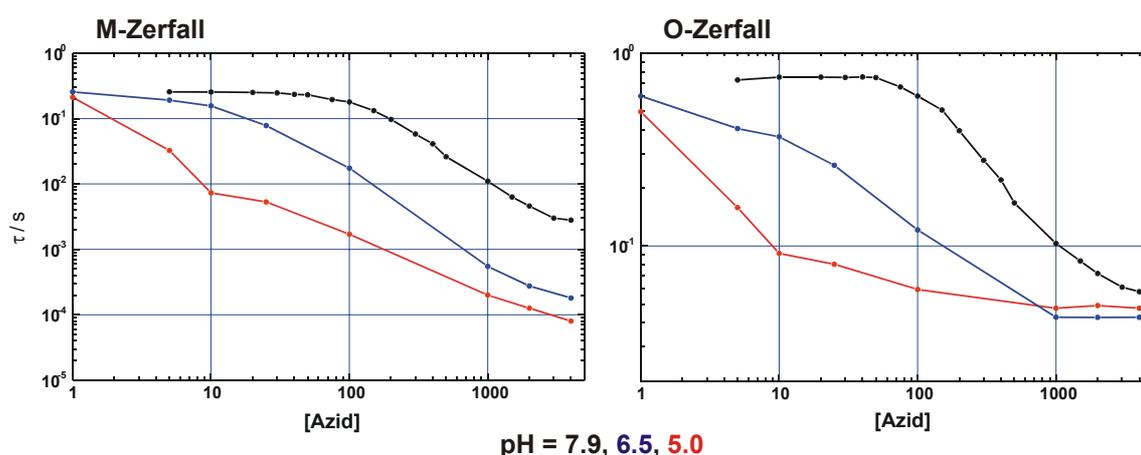


Abb. 3.1.9 pH -Abhängigkeit des Azideffektes beim NpSR II. Halbwertszeiten des M-Zerfalls (links) sowie des O-Zerfalls (rechts) bei $\text{pH} 7,9$ (schwarz), $\text{pH} 6,5$ (blau) und $\text{pH} 5,0$ (rot). Die sonstigen Pufferbedingungen sind identisch.

Es bestätigt sich das von Schmies gewonnene Resultat, daß der beobachtete Azid-Effekt stark abhängig vom pH-Wert der Probe ist. Während der Photozyklus des NpSR_{II} ohne Azid im pH-Bereich von 5,0-8,1 praktisch unverändert bleibt (siehe Abb. 3.1.7), führt eine Herabsetzung des pH-Wertes in Anwesenheit von Azid zu einer weiteren signifikanten Beschleunigung der betrachteten kinetischen Komponenten, d.h. zu einer Verstärkung des Azid-Effektes. Des weiteren läßt der Verlauf der Messkurven erkennen, daß bei Betrachtung des M-Zerfalls bei niedrigem pH selbst bei 4 M Azid keine Sättigung zu beobachten ist. Die Konzentrationsabhängigkeit der Kinetik des O-Zerfalles hingegen zeigt bei einem pH $\leq 6,5$ schon ab etwa 1 M Azid konstante Geschwindigkeitskonstanten bei steigender Azid-Konzentration, während bei pH 7,9 selbst bei 4 M Azid die Sättigung noch nicht erreicht ist.

Die vorliegenden Daten erlauben keine eindeutige Bestimmung des pK-Wertes für Azid im NpSR_{II}. Allerdings läßt sich sagen, daß dieser < 5 sein muß, also im Bereich des pK-Wertes für Azid in wässriger Lösung (4,7) oder darunter liegt (Daten nicht gezeigt).

Damit wird zwar eindeutig gezeigt, daß nicht das Azid-Ion N_3^- sondern tatsächlich die protonierte Form HN_3 die mit dem Protein wechselwirkende Spezies sein dürfte und Azid tatsächlich direkt als Protonendonator für das NpSR_{II} agiert. Das beobachtete Sättigungsverhalten deutet allerdings an, daß dem Azideffekt nicht einfach eine Art bimolekularer Reaktion zugrund liegen kann. Sollte dies tatsächlich der Fall sein, sollte bei niedrigem pH, d.h. höherer HN_3 -Konzentration wesentlich früher eine Sättigung beobachtet werden, als dies bei pH 7,9 der Fall ist. Stattdessen beobachtet man bei Betrachtung des M-Zerfalls einen gegenteiligen Effekt. Demgegenüber zeigt die Kinetik des O-Zerfalls tatsächlich das zu erwartende Verhalten. Der Wirkungsmechanismus von Azid auf den Photozyklus des NpSR_{II} scheint demnach komplexer zu sein und sich nicht ausschließlich auf die Übertragung eines Protons auf die Schiff-Base zu beschränken. Auch eine direkte Rolle des Azid-Anions im Protonentransfer ist wahrscheinlich. Denkbar ist beispielsweise die Integration eines oder mehrerer Azid-Anionen in das Wasserstoffbrücken-Netzwerk des NpSR_{II}.

3.1.3 Einfluß der Protein/Lipid-Umgebung auf den Photozyklus von NpSRII

Da der Photozyklus des NpSRII, wie bereits erwähnt, mit Konformationsänderungen einhergeht, die sich auch auf die Struktur der Protein-Oberfläche auswirken, gehört zu einer umfassenden Analyse dieser Vorgänge auch die Untersuchung des Einflusses der direkten Umgebung des Rezeptors auf den Photozyklus. Im Falle des membranständigen sensorischen Rhodopsins ist dies zum einen die Lipid-Umgebung, zum anderen selbstverständlich auch der im Komplex an den Rezeptor gebundene Transducer. Die Einflüsse dieser äußeren Parameter werden im Folgenden anhand ihrer Auswirkungen auf die Photozyklus-Kinetik untersucht. Dazu werden die differentiellen Absorptionsänderungen bei den drei charakteristischen Wellenlängen 400 nm (M_{400}), 500 nm (Grundzustand) und 550 nm (O_{550}) für folgende Proben gemessen und analysiert:

1. NpSRII, DDM-solubilisiert
2. NpSRII, PML-rekonstituiert
3. NpSRII/NpHtrII₁₅₇, DDM-solubilisiert
4. NpSRII/NpHtrII₁₅₇, PML-rekonstituiert

Im übrigen werden die Puffer-Bedingungen konstant gehalten (150 mM NaCl, 10 mM Tris·HCl, pH 7,0). Abbildung 3.1.10 zeigt die transienten Absorptionsänderungen dieser Proben.

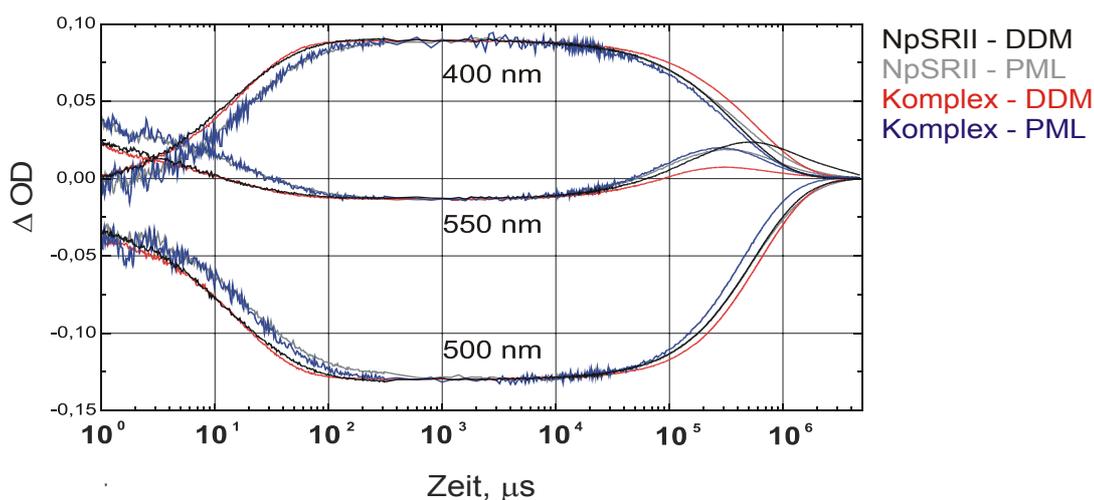


Abb. 3.1.10 Differentielle Absorptionsänderungen von NpSRII in DDM-solubilisierter Form (schwarze Linien), NpSRII in PML-rekonstituierter Form (graue Linien), NpSRII/NpHtrII₁₅₇ in DDM-solubilisierter Form (rote Linien) und NpSRII/NpHtrII₁₅₇ in PML-rekonstituierter Form (blaue Linien).

Vergleich der Photozyklen von NpSR_{II} im rekonstituierten und solubilisierten Zustand

Vergleicht man den Photozyklus des DDM-solubilisierten Rezeptors (Abb. 3.1.10, schwarze Linien) mit dem des PML-rekonstituierten NpSR_{II} (Abb. 3.1.10, graue Linien), läßt sich deutlich erkennen, daß der L → M Übergang in rekonstituierter Form gegenüber der solubilierten Form inhibiert wird. Dies äußert sich in der Verlangsamung dieses Prozesses um den Faktor zwei. Des weiteren läßt sich eine geringfügige Verlangsamung des M₄₀₀-Zerfalls beobachten, wenn diese auch im Vergleich zur M₄₀₀-Bildung deutlich weniger ausgeprägt erscheint. Demgegenüber läßt sich für die Bildung und auch den Zerfall des O₅₅₀-Intermediates eine Beschleunigung dieser Übergänge um den Faktor zwei feststellen. Demzufolge erscheint auch die transiente Amplitude des O-Intermediates im PML-rekonstituierten Zustand leicht verringert. Auf die Rückbildungsrate des Grundzustandes hat dieser Umstand allerdings keine Auswirkungen. Für beide Proben läßt sich hier dieselbe Kinetik beobachten.

Vergleich der Photozyklen des Komplexes im rekonstituierten und solubilisierten Zustand

Betrachtet man den Einfluß der Lipid-Umgebung auf den Photozyklus des Rezeptors im Komplex mit dem verkürzten Transducer NpHtr_{II157}, fällt auf, daß der L → M Übergang in diesem Fall in gleicher Weise beeinflusst wird, wie dies auch schon für den Rezeptor allein beobachtet werden konnte. Tatsächlich findet man bis etwa 30 ms nach der Anregung durch den Laserblitz keine signifikanten Unterschiede in den Photozyklen der Proben mit bzw. ohne Transducer. Demgegenüber lassen sich im Zeitbereich > 30 ms deutliche Unterschiede bezüglich der Photozyklus-Kinetiken feststellen. Der Komplex in solubilisierter Form (1:1 Stöchiometrie, Abb. 3.1.10, rote Linien) zeigt einen um den Faktor zwei bis drei verlangsamten M₄₀₀-Zerfall verglichen mit dem PML-rekonstituierten Komplex (2:2 Stöchiometrie, Abb. 3.1.10, blaue Linien). Dieser Effekt konnte bereits von einer anderen Gruppe beobachtet werden (Sudo *et al.*, 2001).

Vergleicht man den M₄₀₀-Zerfall des rekonstituierten Komplexes mit dem von NpSR_{II} allein sowohl in rekonstituierter als auch in solubilisierter Form, läßt sich ein leicht beschleunigender Einfluß der Bindung des Transducers beobachten. Die Bildung und der Zerfall des O₅₅₀-Intermediates im solubilierten Komplex sind praktisch identisch mit den entsprechenden Prozessen beim rekonstituierten Rezeptor ohne Transducer. Demgegenüber zeigt der solubilierte Komplex bei gleicher Kinetik eine um den Faktor zwei verringerte O₅₅₀-Amplitude,

was sich allerdings durch die oben bereits erwähnte Verlangsamung des M_{400} -Zerfalls bei nahezu gleicher Rückbildungsrate des Grundzustandes erklären läßt.

Betrachtet man die Kinetik der Rückbildung des Grundzustandes bei 500 nm, beobachtet man mit Ausnahme einer Beschleunigung dieser Komponente im Falle des rekonstituierten Komplexes um den Faktor zwei keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben.

3.2 ESR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung am Rezeptor/Transducer-Komplex

Strukturelle Informationen über den Rezeptor/Transducer-Komplex sind für das Verständnis des der Phototaxis zugrundeliegenden Signaltransduktions-Mechanismus unabdingbar. Daher werden in dieser Arbeit, zusätzlich zu den in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von G. Büldt (IBI2, FZ Jülich) unternommenen Kristallisationsversuchen, umfangreiche Untersuchungen mittels der ESR-Spektroskopie angestellt.

Um die geeigneten Positionen für die Einführung der Spin-Sonden in den Transducer zu bestimmen, erfolgt zunächst eine ausführliche Betrachtung der Primärsequenz. Auf der Grundlage dieser Analyse und den von Wegener ebenfalls mittels ESR-Spektroskopie gewonnenen Daten erfolgt die Auswahl der zu markierenden Positionen. Dabei wird das Hauptaugenmerk auf die Transducer-Helix TM 1 sowie auf den der TM 2 folgenden Linker-Bereich gelegt.

3.2.1 Analyse der Primär-Sequenz des NpHtrII

Die Analyse der Primärstruktur des Transducer-Proteins NpHtrII (Seidel *et al.*, 1995) erfolgt im Hinblick auf die bereits durch frühere Untersuchungen festgestellte Homologie zu den bakteriellen Chemorezeptoren (Seidel *et al.*, 1995; Wegener, 2000; Zhang *et al.*, 1996b) durch Vergleich mit den Aminosäure-Sequenzen des Serin- (Tsr) sowie des Aspartat-Chemorezeptors (Tar) aus *E. coli* (siehe Abbildung 3.2.1). Die Ausrichtung der Sequenzen gegeneinander orientiert sich an einer von Le Moual und Koshland (1996) durchgeführten Sequenzanalyse, wurde jedoch manuell nachbearbeitet.

Das Sequenzalignment zeigt zum Teil sehr deutliche Übereinstimmungen (grau unterlegt) bzw. Homologien (siehe Farbkodierung der Aminosäuren) der Sequenz des NpHtrII mit den Chemorezeptoren. Insbesondere im Bereich der zytoplasmatischen Helizes sind auch größere Sequenzabschnitte ganz oder teilweise konserviert. Auffällig ist ein im NpHtrII vorhandener und auch bei anderen archaebakteriellen Transducern (Wegener, 2000; Le Moual & Koshland, 1996) auftretender Einschub von hier 88 Aminosäuren im Anschluß an den als AS 2 bezeichneten Sequenzabschnitt.

Die beiden Sequenzabschnitte AS 1 und AS 2 wurden von Butler und Falke (1998) als amphiphatische Helizes $\alpha 4$ und $\alpha 5$ (Im Sequenzvergleich von Le Moual & Koshland (1996) werden die entsprechenden Bereiche als $\alpha 5$ bzw. $\alpha 6$ bezeichnet) zunächst für den Aspartat-Chemorezeptor aus *E. coli* identifiziert. Später konnten dann Williams und Stewart (1999) entsprechende amphiphatische Sequenzen mit wahrscheinlich α -helikaler Struktur in einer ganzen Reihe von Sensorproteinen und Chemorezeptoren sowie auch im HtrF aus *H. salinarum* identifizieren. Aus dieser Veröffentlichung wurden die Bezeichnungen AS 1 und AS 2 für diese beiden Sequenzabschnitte in diese Arbeit übernommen.

Um die Vermutung zu überprüfen, daß die Sequenzabschnitte AS 1 und AS 2 auch im NpHtrII eine α -helikale Struktur besitzen, werden Sekundärstrukturvorhersagen mit den Algorithmen SOPM, SOPMA, GOR4 und HNN (siehe 2.9) durchgeführt. Das Ergebnis dieser Vorhersagen ist schematisch in Abbildung 3.2.2 wiedergegeben. Zusätzlich erfolgt eine Hydrophobizitäts-Analyse der NpHtrII-Sequenz nach der Kyte-Doolittle-Methode (siehe 2.9), deren Ergebnis ebenfalls in Abbildung 3.2.2 zu finden ist (unten).

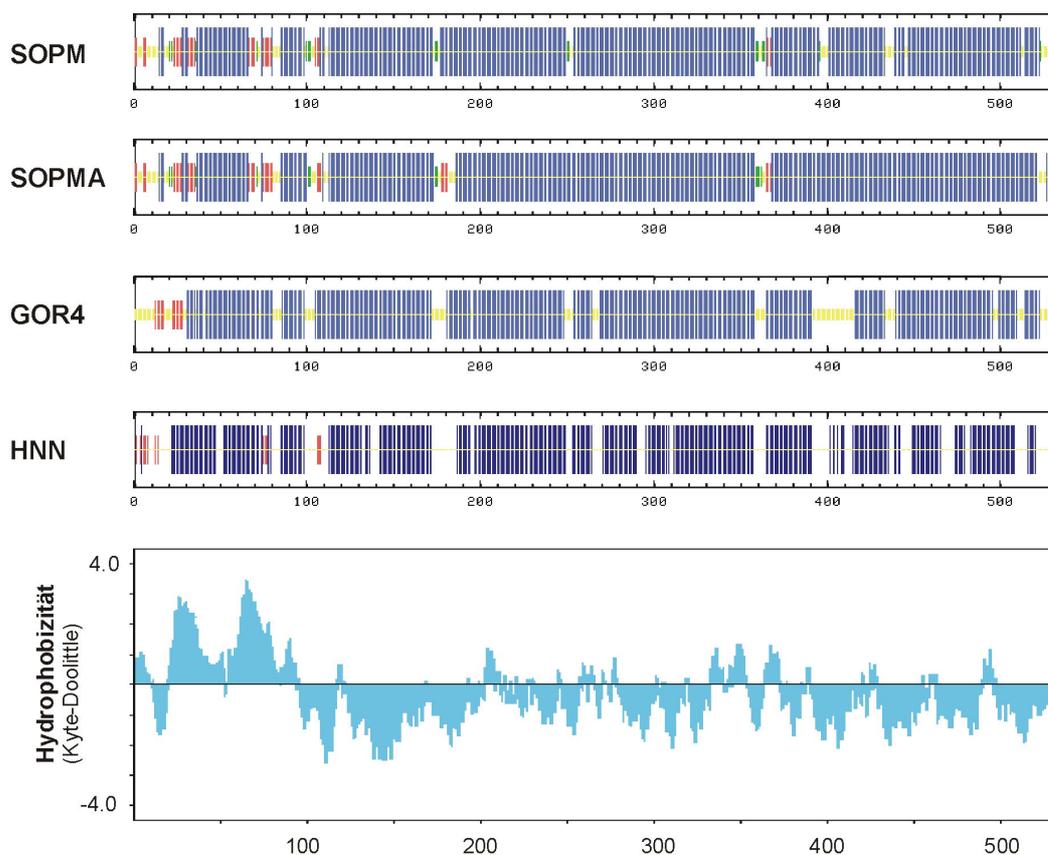


Abb. 3.2.2 Sekundärstrukturvorhersagen für NpHtrII nach den Vorhersage-Algorithmen SOPM, SOPMA, GOR4 und HNN sowie Hydrophobizitäts-Plot nach der Kyte-Doolittle-Methode (unten). Für die Sekundärstrukturvorhersagen gilt folgende Farbkodierung: α -Helix, extended β -Strand, β -Turn und random coil. Die Skalierung bezüglich der Protein-Sequenz ist bei allen Darstellungen identisch.

Alle vier Algorithmen sagen übereinstimmend für die Bereiche der AS 1 (~ 88-101) und AS 2 (~ 117-131) des NpHtrII eine α -helikale Struktur voraus. Die Betrachtung des Hydrophobizitätsplots in diesen Bereichen bestätigt zudem den amphiphatischen Charakter dieser Sequenzabschnitte. Damit erscheint es sehr wahrscheinlich, daß die von Williams und Stewart (1999) identifizierte funktionelle Einheit aus zwei amphiphatischen Helizes auch im NpHtrII vorhanden ist. Dies bestätigt die vermutete strukturelle und funktionelle Homologie der archaebakteriellen Phototransducer mit den Chemorezeptoren und anderen, ähnlich aufgebauten, membranständigen Sensor-Proteinen.

Im Hinblick auf einen möglichen Signaltransduktionsmechanismus, in welchem die amphiphatischen Helizes als funktionelle Einheit fungieren (Williams & Stewart, 1999, Butler & Falke, 1998), erfolgt eine nähere Betrachtung der Sekundärstrukturvorhersagen für den zwischen der TM 2 und der AS 1 liegenden Sequenzbereich:

	80	85	90										
Sequenz	A	T	L	G	G	D	T	A	A	S	L		
SOPM	e	h	c	c	c	c	h	h	h	h	h	h	h - α -Helix
SOPMA	e	e	c	c	c	c	h	h	h	h	h	h	c - random coil
GOR4	h	h	c	c	c	c	c	h	h	h	h	h	e - extended (β -Faltblatt)
HNN	h	h	c	c	c	c	c	h	h	h	h	h	

In guter Übereinstimmung sagen alle verwendeten Algorithmen ein „random coil“ für den Bereich L82-D85 (SOPM, SOPMA) bzw. L82-T86 (GOR4, HNN), d.h. den Bereich zwischen TM 2 und AS 1, voraus. Eine derartige, „ungeordnete Struktur“ findet sich in Proteinen sehr häufig als Verbindung zwischen α -Helizes und/oder β -Faltblättern. Dieser Bereich verbindet die, selbst wahrscheinlich relativ rigiden, Helizes TM 2 und AS 1 und ist somit vermutlich direkt in den Signaltransduktionsprozeß involviert. Wegener (2000) hat diesen Bereich bereits mittels ESR-spektroskopischer Methoden untersucht. Diese Daten werden zum Teil in die nachfolgenden Betrachtungen und Diskussionen einfließen.

Für den 15 Aminosäuren langen Verbindungsbereich zwischen der AS 1 und der AS 2 (102-116) liefern die verwendeten Vorhersagealgorithmen sehr uneinheitliche Ergebnisse (siehe Abb. 3.2.2). Daher lassen sich keine Schlußfolgerungen bezüglich der Sekundärstruktur dieser Region ziehen. Demzufolge erlauben die vorhandenen Daten auch keine Aussage bezüglich der relativen Position und Orientierung der AS 2.

An die AS 2 anschließend findet sich der bereits am Beginn dieses Abschnittes erwähnte Einschub von 88 Aminosäuren. In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist die Tatsache das Wegener (2000) für den Bereich 127-173 das für parallele „coiled-coils“ typische heptadische

Sequenzmotiv (abcdefg)_n findet, bei dem a und d typischerweise mit hydrophoben und f bzw. g mit geladenen Seitenketten besetzt sind. Bei genauerer Betrachtung der Sequenz läßt sich dieser Bereich insgesamt auf die Positionen 124-173 ausdehnen. Offensichtlich schließt dieses parallele „coiled-coil“ also einen 8 Reste langen, d.h. etwa 2 Helix-Windungen entsprechenden, Teil der AS 2 mit ein und setzt sich noch etwa weitere 11 Helix-Windungen fort. Demnach scheint die AS 2 der Bereich zu sein, in dem sich die Peptidketten der beiden im Komplex befindlichen Transducer-Moleküle „zusammenfinden“ und eine etwa 13-14 Helix-Windungen lange parallele „coiled-coil“-Struktur bilden. Der sich anschließende Bereich von Position 174 bis etwa 185 ist den meisten Vorhersagealgorithmen zufolge mehr oder weniger ungeordnet, setzt sich dann aber wieder helikal fort. Ab Position 216 geht die Primärsequenz dann in das von LeMoual und Koshland (1996) gefundene heptadische Register über und bildet mit hoher Wahrscheinlichkeit, in Homologie zu den Chemorezeptoren, das für diese typische Vier-Helix-Bündel aus, welches aus der für die Adaptation notwendigen Methylierungsdomäne sowie der, für die Bindung von CheA und CheW verantwortlichen, Signal-Domäne besteht.

3.2.2 Auswahl der Positionen zur Spinmarkierung

In vorhergehenden Untersuchungen wurde von Wegener die relative Orientierung der Transducer-Helix TM 2 im Detail analysiert. Hier soll nun der weitere Verlauf der Peptidkette, und zwar sowohl in N- als auch in C-terminaler Richtung, analysiert werden. Da die beobachteten Konformationsänderungen (Wegener *et al.*, 2001a, b) im wesentlichen im Bereich der zytoplasmatischen Hälfte der Membran lokalisiert sind, werden ergänzend zu den von Wegener untersuchten Positionen am zytoplasmatischen Ende der TM 2 die entsprechenden Aminosäurereste Lys-21 bis Val-25 am zytoplasmatischen Ende der TM 1 modifiziert (siehe Abbildung 3.2.3 A).

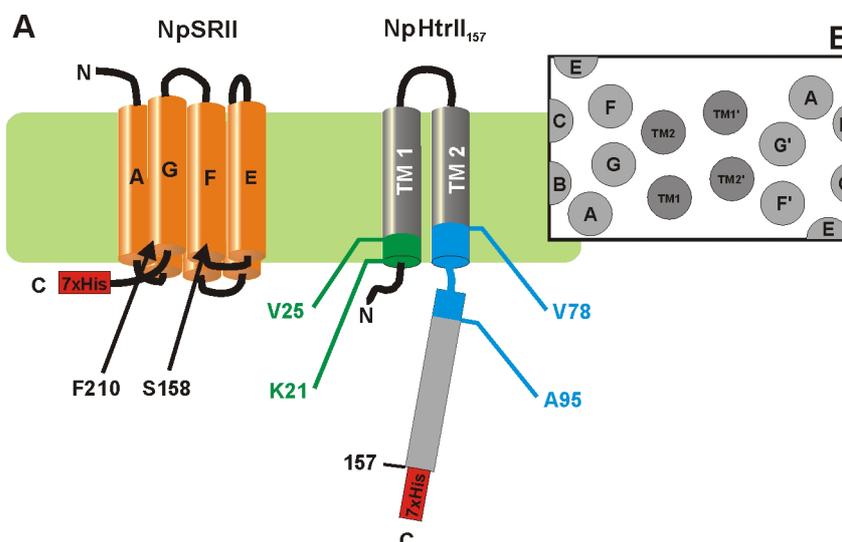


Abb. 3.2.3 (A) Strukturmodell von NpSRII und NpHtrII₁₅₇ mit Position der für die Spinmarkierung ausgewählten Aminosäuren einschließlich der bereits von Wegener (Wegener, 2000) untersuchten Bereiche (zytoplasmatische Seite unten). (B) Schema der vermuteten relativen Positionen der Rezeptor- und Transducer-Helizes im NpSRII/NpHtrII-Komplex (Sicht von der zytoplasmatischen Seite der Membran).

Die Analyse der Seitenketten-Mobilitäten sowie die Analyse von Spin-Spin-Kopplungen sollten damit Informationen über die Position und Anordnung der Transducer-Helizes liefern. Diese liefert dabei zugleich die Möglichkeit, relative Abstände innerhalb des Komplexes zu bestimmen. Zu diesem Zweck werden zusätzlich, zum Transducer hin gerichtete, Seitenketten auf den Rezeptor-Helices F und G modifiziert. Dadurch sollte es möglich sein, Aussagen über die relative Anordnung der transmembranen Helices der am Komplex beteiligten Proteine zu treffen (siehe Abbildung 3.2.3 B).

Um darüber hinaus Hinweise auf die Sekundärstruktur des, an der Signalweiterleitung beteiligten, zytoplasmatischen Teils des Transducers zu erhalten, wird zusätzlich ein, an die TM 2 angrenzender, acht Aminosäuren umfassender Teil der zytoplasmatischen Domäne modifiziert (Ala-88 bis Ala-95). Diese Positionen schließen direkt an den bereits von Wegener untersuchten Teil der Signalweiterleitungs-Domäne an (Wegener, 2000) und sind Teil der amphiphatischen Sequenz 1 (AS 1). Messungen der Seitenkettenmobilitäten sowie Zugänglichkeitsmessungen sollten hier erste Hinweise auf die mögliche Anordnung und Struktur dieser Signalweiterleitungsdomäne liefern.

3.2.3 Analyse der cw-ESR Messungen

Die Transducer-Helix TM 1

Zunächst sollen die ESR-Grundspektren der am zytoplasmatischen Ende der TM 1 zur Spin-Markierung ausgewählten Seitenketten analysiert werden. Abbildung 3.2.4 zeigt die cw-Spektren dieser Positionen sowie die vermutliche relative Anordnung dieser Seitenketten unter Annahme einer perfekten α -helikalen Struktur in diesem Bereich.

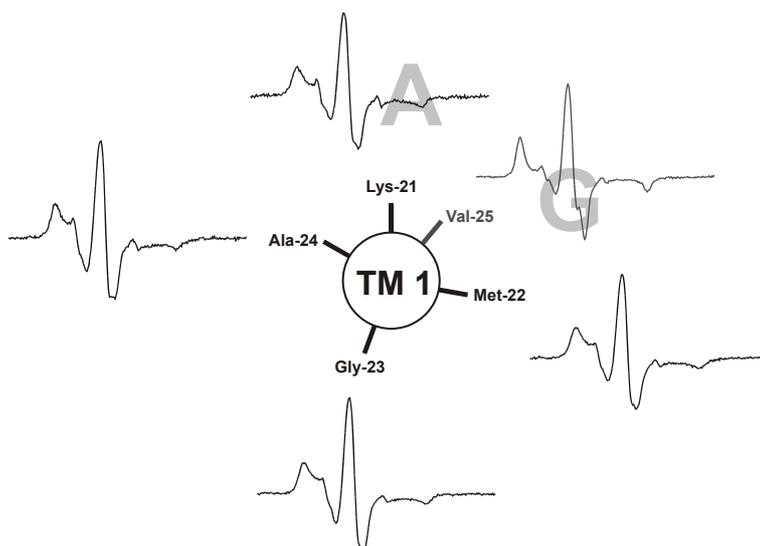


Abb. 3.2.4 Spinzahlnormierte ESR-Grundspektren der spin-markierten NpHtrII₁₅₇-Mutanten im Komplex mit NpSR_{II}, rekonstituiert in PM-Lipide (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) mit vermuteter relativer Anordnung der Aminosäureseitenketten auf der TM 1 unter Annahme einer α -helikalen Struktur. Die Buchstaben A und G (grau) repräsentieren die sich aus den gewonnenen Daten ergebende Anordnung der TM 1 relativ zu den Rezeptor-Helizes.

Die Analyse der Spektriform ergibt für alle spinmarkierten Positionen stark immobilisierte Anteile, die auf umfangreiche Wechselwirkungen mit Protein-Tertiärstrukturen bzw. der Lipid-Doppelschicht hindeuten. Besonders ausgeprägt ist der immobile Charakter erwartungsgemäß an der Position 25, da diese Seitenkette weiter im „Inneren“ des Komplexes lokalisiert sein sollte. Im übrigen erlaubt die reine Analyse der Spektriform aufgrund der großen Ähnlichkeit der gemessenen Spektren keine weitergehenden Rückschlüsse auf die relative Anordnung des ausgewählten Sequenzabschnittes.

Um weitergehende Informationen, insbesondere bezüglich der Anordnung der TM 1 relativ zu den Rezeptor-Helizes, zu erhalten, werden die spinmarkierten Transducer-Mutanten mit, an den Positionen 158 (Helix F) bzw. 210 (Helix G) spinmarkierten, Rezeptormutanten in PM-Lipide rekonstituiert. Befinden sich in diesem Fall Seitenketten in relativer räumlicher Nähe zueinander, sollten die Spinproben miteinander wechselwirken. Diese dipolaren Wechselwirkungen äußern sich in den cw-Spektren durch entsprechende Linienverbreiterungen, können also direkt abgelesen werden. Abbildung 3.2.5 zeigt die ESR-Grundspektren der zehn möglichen Kombinationen aus den erwähnten Transducer- bzw. Rezeptor-Mutanten.

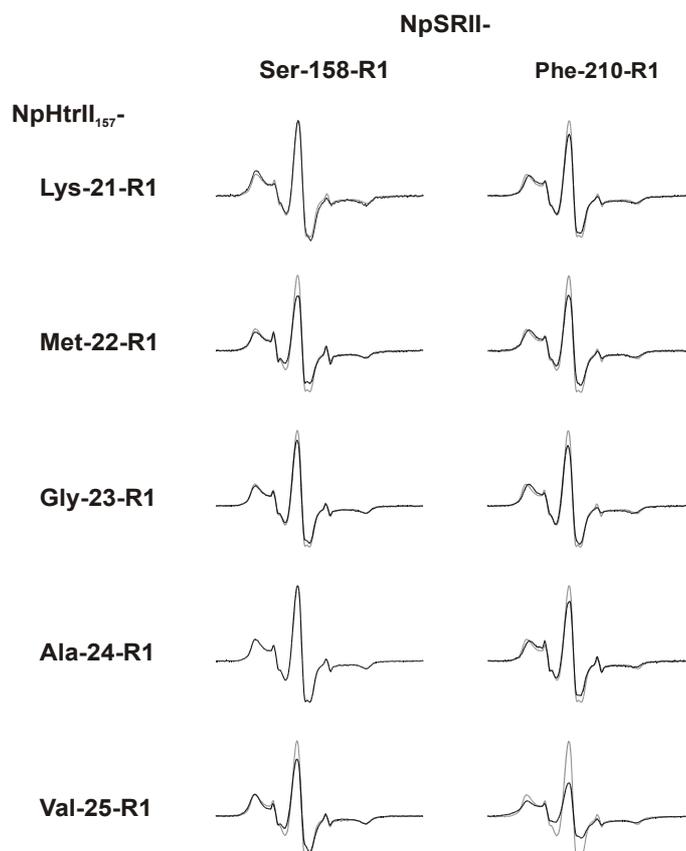


Abb. 3.2.5 Spinzahlnormierte ESR-Grundspektren von spinmarkiertem NpHtrII₁₅₇ im Komplex mit ebenfalls spinmarkiertem NpSRII (PML-rekonstituiert, 25°C). Zur Verdeutlichung der beobachteten Linienverbreiterungen sind die übrigen Spektren mit dem Spektrum unterlegt (graue Linien), welches die geringsten dipolaren Wechselwirkungen aufweist (Ala-24-R1).

Es ist deutlich erkennbar, daß die Spektren der Transducer-Mutanten in Kombination mit dem an der Helix G spinmarkierten Rezeptor durchgehend eine deutlich stärkere Linienverbreiterung aufweisen, als dies in Kombination mit dem an der Helix F markierten NpSR_{II} der Fall ist. Grundsätzlich kann daher bereits jetzt gesagt werden, das die TM 1 des Transducers näher an der Rezeptor-Helix G lokalisiert ist, was in Übereinstimmung mit der vermuteten relativen Anordnung der transmembranen Helizes im Komplex ist (siehe Abb. 3.2.3 B). Eine detailliertere Analyse der ESR-Spektren erlaubt weitergehende Rückschlüsse auf die relative Anordnung der Aminosäure-Seitenketten. Im Komplex mit NpSR_{II}-S158R1 weisen die Positionen 22 und 25 ebenfalls signifikante Linienverbreiterungen auf. Diese Seitenketten müssen also zur Helix F des Rezeptors hin orientiert sein. Die stärkste Wechselwirkung im Komplex mit NpSR_{II}-F210R1 weist die Position 25 auf. Diese Valin-Seitenkette ist also vermutlich direkt zur Helix G des Rezeptors hin orientiert.

Die Signalweiterleitungs-Domäne des NpHtr_{II}

Betrachtet man die ESR-Grundspektren der Positionen 88 – 95 der Signalweiterleitungs-Domäne des NpHtr_{II} (Abbildung 3.2.6), zeigen sich erhebliche Unterschiede in den spektralen Eigenschaften dieser Seitenketten.

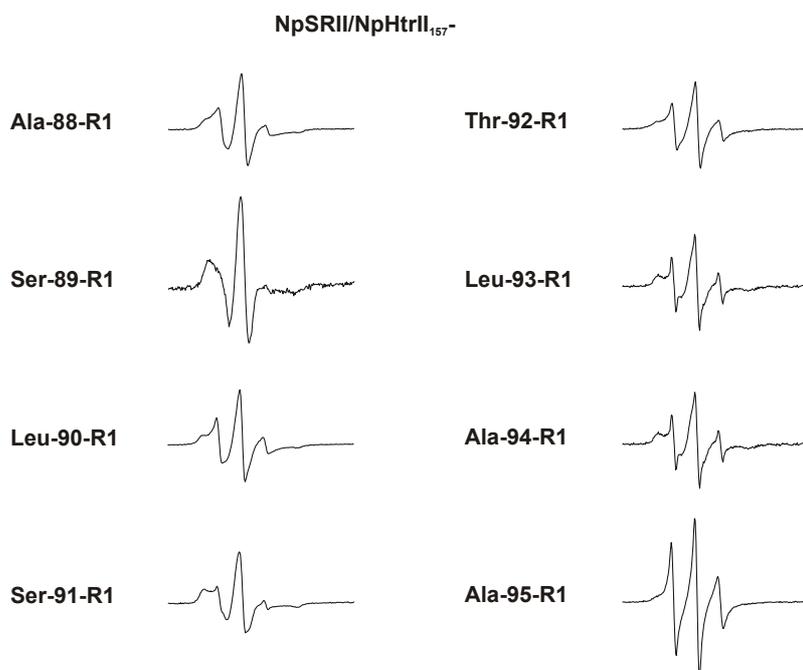


Abb. 3.2.6 Spinzahlnormierte ESR-Grundspektren der spinmarkierten NpHtr_{II,157}-Mutanten Ala-88 bis Ala-95 im Komplex mit NpSR_{II}. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit PML-rekonstituierten Proben bei RT.

Auffallend ist in erster Linie eine deutliche Zunahme der mobilen Komponente in den Spektren ab der Position 92 und auch die Spektrenform der Spinsonde an der Position 90 deutet auf eine hohe Beweglichkeit der Nitroxid-Seitenkette hin. Dieser erste Eindruck bestätigt sich bei Betrachtung der inversen Linienbreite der Hauptresonanzlinie, die als Maß für die Mobilität der Nitroxid-Seitenkette dienen kann (Hubbell *et al.*, 1996). Abbildung 3.2.7 zeigt eine Auftragung der inversen Linienbreiten gegen die Position.

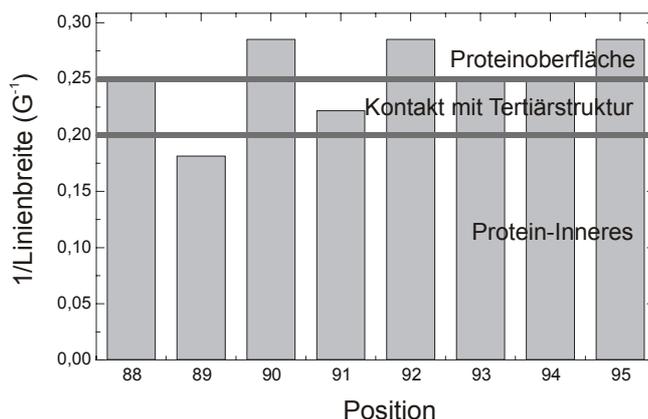


Abb. 3.2.7 Auftragung der inversen Linienbreite der Hauptresonanzlinie der spinmarkierten und mit NpSR_{II} rekonstituierten NpHtr_{II157} Mutanten gegen die Aminosäureposition als Maß für die Orientierung der Seitenkette. Die eingezeichneten Übergänge orientieren sich an Hubbell *et al.* (1996).

Es läßt sich klar erkennen, daß lediglich die Seitenketten der Positionen 88, 89 und 91 in Kontakt mit anderen Seitenketten bzw. Lipid-Molekülen stehen. Schon die Position 90 weist eine sehr hohe Mobilität auf, die sich ab Position 92 praktisch vollständig etabliert. Die nur leicht verringerten Mobilitäten der Positionen 93 und 94 zeigen, daß der Kontakt zur Membran in diesem Bereich nur noch sehr schwach ausgeprägt ist. Dies deutet darauf hin, daß sich dieser Teil des Proteins von der Membran weg in das Zytoplasma hinein orientiert. Des weiteren läßt das Muster der Mobilitäten, repräsentiert durch die inverse Linienbreite (siehe Abb. 3.2.7), im Bereich 88-91 auf eine mögliche helikale Struktur dieses Protein-Abschnittes schließen. Ausgehend von der Annahme das diese Positionen in etwa einem Turn einer nahezu parallel zur Membran verlaufenden Helix entsprechen, wären demnach die Seitenketten 89 und 91 zur Membran hin orientiert (geringe Mobilität), während 88 und 90 in die entgegengesetzte Richtung, d.h. in das wässrige Medium zeigen (hohe Mobilität).

3.2.4 Analyse der Zugänglichkeiten

Zusätzlich zur oben angestellten Mobilitätsanalyse bietet die ESR-Spektroskopie die Möglichkeit, die Zugänglichkeiten der Nitroxid-Seitenkette für paramagnetische Quencher-Moleküle zu untersuchen. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten der verwendeten Quencher-Moleküle lassen sich hierdurch ergänzende Informationen darüber erhalten, ob eine Seitenkette zu einer Protein-Tertiärstruktur, zur Lipid-Phase oder zum wässrigen Medium hin orientiert ist (siehe Abschnitt 2.8.2 - Leistungssättigungs-Messungen). Abbildung 3.2.8 zeigt die Sequenzabhängige Auftragung der Zugänglichkeitsparameter Π_{O_2} und Π_{CrOx} . Um ein umfassenderes Bild der Proteinstruktur in diesem Bereich zu erhalten, werden die vorliegenden Daten um die von Wegener gemessenen Werten für die Positionen 78 bis 87 ergänzt (Wegener, 2000).

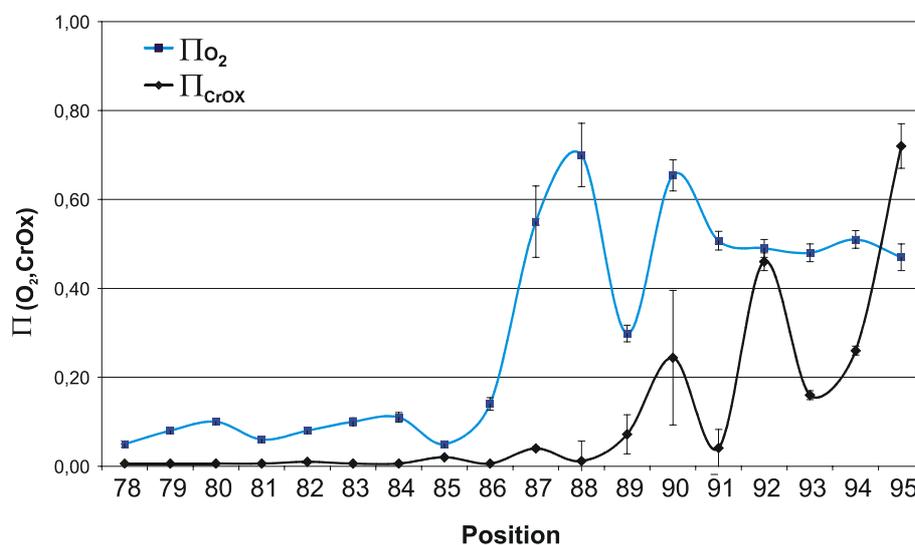


Abb. 3.2.8 Verlauf der Zugänglichkeitsparameter für Sauerstoff und Chromoxalat für die rekonstituierten Komplexe NpSRII/NpHtr_{157-xR1} in Abhängigkeit von der Position der Spinmarkierung. Die eingezeichneten Linien sind keine Anpassungsfunktion und dienen lediglich der Orientierung.

Der Sequenzbereich 78 bis 85 zeigt deutlich die für die eine α -Helix zu erwartende Periodizität mit vernachlässigbaren Zugänglichkeiten für den wasserlöslichen Quencher Chromoxalat. Der periodische Verlauf der, vom Betrag her sehr geringen, Sauerstoffzugänglichkeiten ist typisch für eine transmembrane α -Helix, die im wesentlichen von anderen Protein-Tertiärstrukturen umgeben, an einer Seite jedoch zur Lipid-Doppelschicht hin orientiert ist. Erwähnenswert ist, daß sich dieses periodische Muster über das für die TM 2 vorausgesagte Ende an Position 82 hinaus bis einschließlich Position 85 findet. Dieser Bereich ist jedoch laut Sekundärstrukturvorhersagen (siehe 3.2.1) nicht α -helikal, sondern besitzt demnach eine

sogenannte „random coil“-Struktur. Eine denkbare Erklärung für diesen Widerspruch wäre die Möglichkeit, daß dieser Sequenzbereich ebenfalls eine näherungsweise helikale Struktur aufweist, allerdings nicht im Sinne einer durchgehenden α -Helix. Ab Position 86 bzw. 87 wird diese Periodizität unterbrochen. Im Sequenz-Bereich 86 bis 89 findet man bereits eine leicht erhöhte Zugänglichkeit für Chromoxalat. Zudem wird für die Positionen 87 und 88 eine stark ansteigende Sauerstoffzugänglichkeit beobachtet. Diese Messwerte sind charakteristisch für den Übergangsbereich zwischen der Lipid-Phase und der Protein-Oberfläche. Im weiteren Verlauf etabliert sich ein praktisch konstanter Wert für Π_{O_2} , sowie ein periodischer Verlauf der Chromoxalat-Zugänglichkeiten mit zwei, vom Betrag her sehr hohen, Maxima an den Positionen 92 und 95. Dieser Verlauf der Zugänglichkeiten deutet darauf hin, daß auch in diesem Bereich möglicherweise eine helikale Struktur vorliegt. Die konstante Sauerstoffzugänglichkeit mit $\Pi_{O_2} \approx 0,5$ ist typisch für eine wässrige Umgebung (Vergleiche Altenbach *et al.* (1990)) und spricht dafür, daß diese Struktur nicht mehr in Kontakt zur Lipid-Doppelschicht steht. Zudem wäre im Falle einer Assoziation dieses Bereiches mit der Membran, unter Annahme einer helikalen Struktur, auch hier eine gewisse Periodizität zu erwarten. Die Daten für den Übergangsbereich von Position 86 bis 90 erlauben keine eindeutigen Rückschlüsse auf die vorliegende Sekundärstruktur. Zwar läßt sich auch in diesem Bereich eine gewisse Periodizität sowohl für Π_{O_2} als auch für Π_{CrOx} beobachten, das vorliegende Muster der Zugänglichkeiten weicht jedoch deutlich von der für eine α -Helix zu erwartende Periodizität von 3,6 ab. Ein Verlauf der Zugänglichkeiten wie der hier vorliegende könnte allerdings auf eine Turn-Struktur hindeuten, welche die transmembrane TM 2 mit einer nachfolgenden Helix im Sinne eines Helix-Turn-Helix Motivs verbindet.

Überträgt man die berechneten Zugänglichkeitsparameter in ein qualitatives, einem Phasendiagramm ähnliches, Bereichsdiagramm (Abbildung 3.2.9), läßt sich noch deutlicher erkennen, daß der Bereich des Proteins ab Position 89 zunehmend den Kontakt zu anderen Proteinstrukturen und auch zur Lipid-Doppelschicht verliert.

Es läßt sich anhand dieses Diagramms klar erkennen, daß die Seitenketten an den Positionen bis einschließlich 86 von anderen Proteinstrukturen umgeben sind. Im Sequenzbereich 87-89 und auch an der Position 91 dagegen befindet man sich im Übergangsbereich zwischen Protein und Lipid. Auch der nachfolgende Sequenzbereich läßt sich anhand dieser Auftragung recht gut charakterisieren. Die Seitenketten 89, 90 und 93 befinden sich im Grenzbereich zwischen wässriger und Lipid-Phase. Die übrigen Positionen, 92, 94 und speziell 95, zeigen schließlich Zugänglichkeiten, welche darauf hindeuten, daß sich dieser Sequenzbereich von der Membran weg hin zum Zytoplasma orientiert. Die Analyse der Zugänglichkeiten bestätigt also das Bild, welches durch die Mobilitätsanalyse bereits angedeutet wurde.

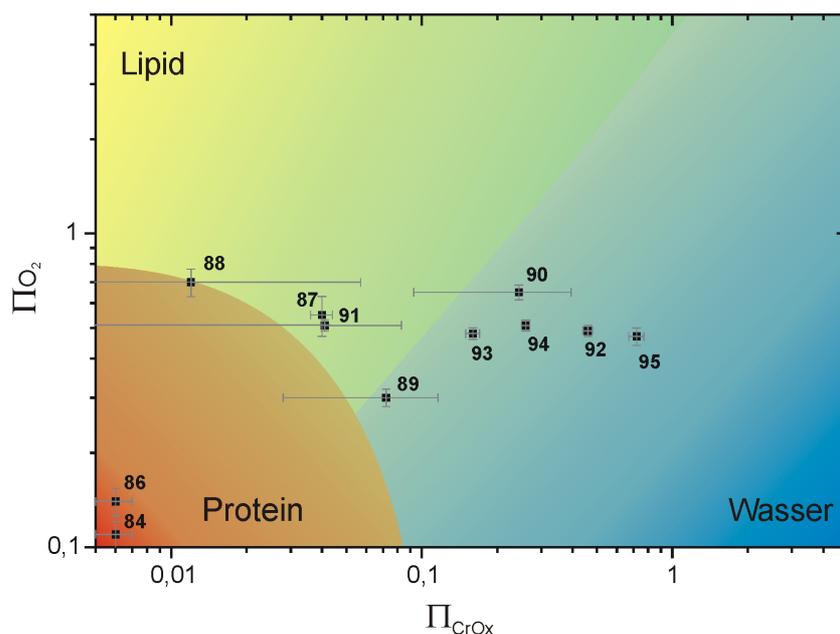


Abb. 3.2.9 Zugänglichkeitsdiagramm der mit NpSR_{II} rekonstituierten Komplexe der spinmarkierten NpHtr_{II157}-Mutanten in logarithmischer Auftragung der Zugänglichkeitsparameter. Die Aufteilung des Diagramms in die drei Bereiche der möglichen Seitenkettenorientierung Lipid, Protein und wässrige Phase erfolgt auf Grundlage empirischer Werte. Insbesondere sind die Übergänge nicht als scharfe Phasengrenzen zu verstehen, sondern dienen lediglich der Orientierung.

3.2.5 Bestimmung von Interspin-Abständen mittels Tieftemperatur-ESR

Um weitergehende Informationen über die Struktur des Rezeptor/Transducer-Komplexes zu erhalten, werden im Folgenden Abstände zwischen Spinsonden durch Simulation bzw. Analyse der zweiten Momente von Tieftemperatur-Spektren bestimmt (siehe 2.8.2 – Wechselwirkung von Spinproben).

Abstandsmessungen zur Bestimmung der relativen Lage der TM 1

Um die relative Lage der TM 1 bzw. TM 1' (siehe Abb. 3.2.3) im Rezeptor/Transducer-2:2-Komplex genauer bestimmen zu können, werden Tieftemperatur-Spektren des Komplexes mit Spinmarkierungen an den Positionen 21 bis 25 auf der TM 1 aufgenommen und zur Berechnung von Interspin-Abständen nach der Methode von Steinhoff *et al.* (1997) simuliert. Daraus ergeben

sich die Abstände von TM 1 und TM 1' im Transducer-Dimer zueinander. Des Weiteren werden diese spinmarkierten Transducer-Mutanten mit NpSR_{II}-S158R1 bzw. NpSR_{II}-F210R1 rekonstituiert gemessen, um die Abstände der entsprechenden Seitenketten der TM 1 zu den Rezeptor-Helizes F und G zu ermitteln. Abbildung 3.2.10 zeigt repräsentativ die ESR-Tieftemperaturspektren im Vergleich zu den simulierten Spektren für die Proben NpSR_{II}/NpHtr_{II}₁₅₇-M22R1 sowie NpSR_{II}-F210R1/NpHtr_{II}₁₅₇-V25R1. Tabelle 3.2.1 zeigt die Resultate der Simulation der Tieftemperatur-Spektren der in PML-Lipide rekonstituierten Proben.

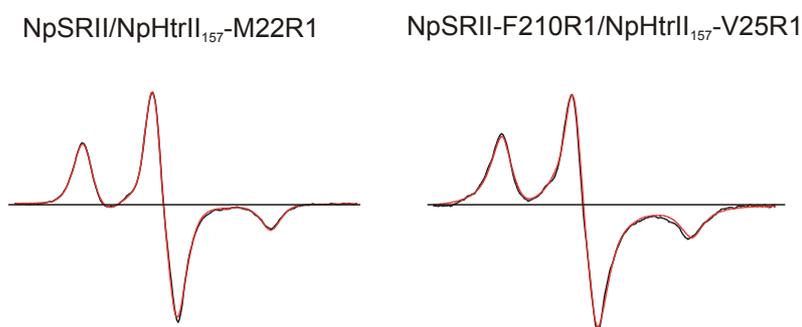


Abb. 3.2.10 ESR-Tieftemperatur-Spektren ($T = 170$ K) von NpHtr_{II}₁₅₇-M22R1 im Komplex mit NpSR_{II} und NpHtr_{II}₁₅₇-V25R1 im Komplex mit NpSR_{II}-F210R1 (schwarze Linien) im Vergleich zu den entsprechenden simulierten Spektren (rote Linien). Alle Proben lagen PML-rekonstituiert vor.

NpHtr _{II} ₁₅₇ -	21/21'	22/22'	23/23'	24/24'	25/25'
Abstand (Å)	> 19	17 ± 2	> 19	> 19	> 19
NpSR _{II} -					
NpHtr _{II} ₁₅₇ -	S158R1 (Helix F)		F210R1 (Helix G)		
21	16 ± 2		14 ± 2		
22	14 ± 2		16 ± 2		
23	> 19		> 18		
24	17 ± 2		15 ± 2		
25	> 18		12 ± 1		

Tab. 3.2.1 Aus Simulation von Tieftemperatur-Spektren ermittelte Spin-Spin-Abstände (in Å) innerhalb des Rezeptor/Transducer-2:2-Komplexes in PML-rekonstituierter Form. Angegeben ist jeweils der berechnete mittlere Abstand sowie die Abstandsverteilung.

Die für die Abstände zwischen TM 1 und TM 1' gefundenen Werte liegen mit Ausnahme der Position 22 an der methodischen Grenze von $> 19 \text{ \AA}$. Im Gegensatz zu den von Wegener gefundenen Abständen zwischen der TM 2 und TM 2' bis herunter zu 12 \AA (Wegener, 2001b) liegen TM 1 und TM 1' im Komplex also deutlich weiter voneinander entfernt als dies für TM 2 und TM 2' der Fall ist. Ausschließlich für die Spinmarkierung an Position 22 wird ein deutlich geringerer Abstand von etwa 17 \AA ermittelt. Dies legt die Vermutung nahe, das TM 1 und TM 1' so im Komplex orientiert sind, das diese Seitenketten zueinander hin gerichtet sind. Die geringste Distanz im Komplex mit ebenfalls spinmarkiertem NpSR II findet sich mit etwa 12 \AA zwischen den Positionen NpHtrII₁₅₇-V25R1 und NpSR II-F210R1. Damit bestätigt sich die Vermutung das sich die TM 1 in direkter Nachbarschaft zur Rezeptor-Helix G befindet. Die übrigen Abstände erlauben zudem weitreichende Schlußfolgerungen bezüglich der Orientierung der Seitenketten der TM 1, also deren Orientierung. So zeigt der geringe Abstand von 14 \AA der Position 22 zur F-Helix, daß diese Seitenkette nicht nur in Richtung der TM 1' orientiert ist, sondern zudem auch in Richtung der F-Helix weisen muß. Die Position 23 zeigt weder einen messbaren Kontakt zur Helix F, noch zu G. Dementsprechend muß diese Seitenkette auf der dem Rezeptor gegenüberliegenden Seite der TM 1 lokalisiert sein.

Abstandsmessungen zur Bestimmung der relativen Lage der AS 1

Um Hinweise auf die relative Lage und Position der als AS 1 bezeichneten Sequenz der zytoplasmatischen Signalweiterleitungsdomäne zu erhalten, werden zusätzlich zu Daten über Mobilität und Zugänglichkeit dieses Bereiches die Abstände der Seitenketten eines ausgewählten Abschnittes zum zytoplasmatischen Ende der Rezeptor-Helix F ermittelt. Die Wahl der Position zur Spinmarkierung im NpSR II fällt dabei auf Lys-157. Abbildung 3.2.11 zeigt, daß Abstandsmessungen zu dieser Position eine Differenzierung zwischen den möglichen Orientierungen dieses Bereiches erlauben sollten. Die Spinmarkierung der AS 1 erfolgt, ausgehend von der Annahme einer helikalen Struktur, auf der ersten putative Helix-Windung dieses Motivs, Ala-

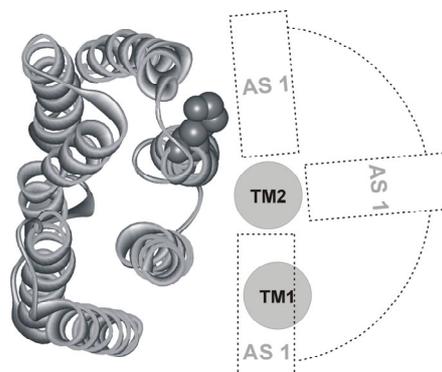


Abb. 3.2.11 Orientierung der Seitenkette von Lys-157 relativ zu möglichen Anordnungen der AS 1. Bändermodell des NpSR II nach Luecke et al. (2001). PDB:1JGJ.

88 bis Ser-91. Die ermittelten Abstände sollten unter Berücksichtigung den bekannten Geometrien einer α - bzw. einer π -Helix Rückschlüsse auf die relative Orientierung der AS 1 erlauben. Abbildung 3.2.12 zeigt die entsprechenden Tieftemperatur-Spektren sowie deren Simulationen. Tabelle 3.2.2 zeigt die Resultate der Abstandsbestimmungen aus den Simulationen. Zusätzlich wurde eine Abstandsbestimmung durch Analyse der zweiten Momente der Tieftemperaturspektren durchgeführt. Deren Resultate sind ebenfalls in Tabelle 3.2.2 angegeben.

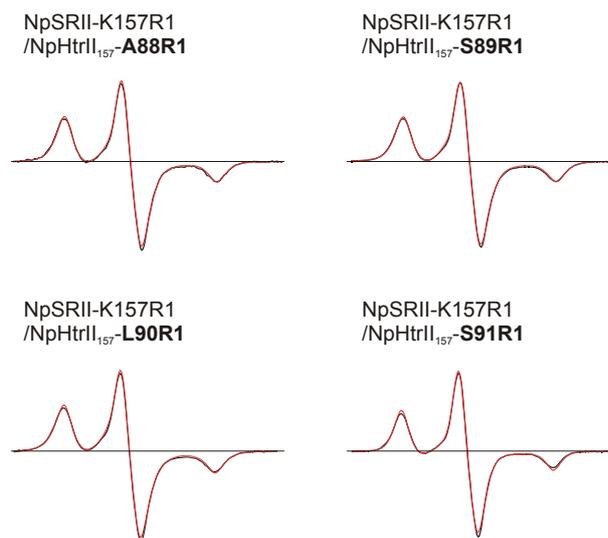


Abb. 3.2.12 ESR-Tieftemperaturspektren (170 K) der doppelt spinmarkierten Komplexe NpSR11-K157R1/NpHtrII₁₅₇-A88R1 bis -S91R1 (schwarze Linien) im Vergleich zu den simulierten Spektren (rote Linien). Die Proben liegen rekonstituiert in PM-Lipiden vor.

NpSR11-K157R1/NpHtrII ₁₅₇ -		Ala-88-R1	Ser-89-R1	Leu-90-R1	Ser-91-R1
Abstand (Å)	Simulation	13,8 ± 2,0	13,2 ± 2,0	14,5 ± 2,0	18,0 ± 2,0
	2. Moment	-*	14,8 ± 2,0	13,1 ± 2,0	-*
Anteil einfach markierter Komplex		0,64	0,61	0,46	(0,81)

Tab. 3.2.2 Spin-Spin-Abstände aus der Simulation sowie aus den zweiten Momenten der Tieftemperaturspektren zwischen NpSR11-K157R1 und NpHtrII₁₅₇-A88R1 bis NpHtrII₁₅₇-S91R1. Die Abstandsverteilung wurde für alle Proben auf 2,0 Å festgehalten. Zusätzlich angegeben ist der aus den Spektrensimulationen erhaltene Anteil an einfach spinmarkiertem Komplex.

*Abstandsbestimmung mit 2. Moment nicht möglich.

Die Abstandsbestimmungen nach den beiden unterschiedlichen Methoden liefern konsistente Ergebnisse. Die erhaltenen Abweichungen liegen in beiden Fällen, in denen eine Abstandsbestimmung über das 2. Moment möglich war, innerhalb der angenommenen Abstandsverteilung von ± 2 Å. Eine Abstandsbestimmung über das 2. Moment ist nicht möglich,

wenn die Distanz zwischen den Spinsonden größer ist als etwa 17 Å (methodische Grenze) oder das Auswertungsprogramm die Basislinie nicht korrekt bestimmen kann (hier: Ala-88-R1).

Die erhaltenen Abstände im Bereich von 13 bis 18 Å zeigen, daß sich die Seitenketten des Sequenzbereiches 88-91 des Transducers in relativer Nähe zur Helix F bzw. zum E-F-Loop-Bereich des Rezeptors befinden, jedoch nicht in deren unmittelbarer Nachbarschaft. Demnach ist eine Orientierung der AS 1 parallel zum EF-Loop des NpSR II (siehe Abb. 3.2.11) weitestgehend ausgeschlossen. Das Muster der gefundenen Abstände steht dabei nicht im Widerspruch zu der vermuteten helikalen Struktur.

3.3 ESR-Untersuchungen zur Signaltransduktion im Rezeptor/Transducer-Komplex

Die Signalübertragung zwischen zwei Proteinen beziehungsweise innerhalb eines Moleküls ist ein dynamischer Prozeß. Daher können strukturelle Daten zwar wertvolle Hinweise auf einen möglichen Mechanismus geben, für ein detailliertes Verständnis der Vorgänge sind Informationen über die Art und den zeitlichen Verlauf struktureller Änderungen im Laufe dieses Prozesses allerdings ebenfalls notwendig.

Diese Informationen kann die Aufnahme lichtinduzierter ESR-Spektren sowie im besonderen die zeitaufgelöste ESR-Spektroskopie liefern. Lichtinduzierte Differenzspektren erlauben Aussagen über die Richtung und die Größe einer Konformationsänderung, während die zeitaufgelöste ESR-Spektroskopie zusätzlich Daten über den zeitlichen Verlauf solcher Bewegungen liefert. Durch entsprechende Auswahl der Positionen für die Spin-Markierung lassen sich die dynamischen Vorgänge während der Signalübertragung damit Schritt für Schritt nachverfolgen.

3.3.1 Auswahl der Positionen zur Spinmarkierung

Die Auswahl der Positionen zur Spinmarkierung für die zeitaufgelösten ESR-Messungen orientiert sich an früheren Ergebnissen. Wegener *et al.* (2000; 2001a, b) konnten durch Spinmarkierung an den Positionen Leu-157^{NpSR_{II}} sowie Val-78^{NpHtr_{II}-157} und Leu-82^{NpHtr_{II}-157} die transiente Auswärtsbewegung der Helix F sowie eine transiente Konformationsänderung der Transducer-Helix TM 2, wahrscheinlich in Form einer Rotationsbewegung, nachweisen und zeigen, daß die TM 2-Bewegung von der Helix F-Bewegung entkoppelt ist. Allerdings erlaubte die Zeitauflösung dieser Studie (≥ 1 ms) keine Auflösung des jeweiligen Signal-Anstieges. Um diese Komponente der Konformationsänderungen ebenfalls aufzulösen, wird in dieser Arbeit ein modifizierter experimenteller Aufbau verwendet, welcher eine höhere Zeitauflösung (0,2 ms) bietet. Die Positionen für die Einführung der Spinmarkierungen wurden so gewählt, daß sie nach Wegener *et al.* (2001a, b) die stärksten lichtinduzierten Änderungen im ESR-Differenzspektrum aufweisen. Dies sind die Positionen Leu-159 im NpSR_{II} sowie Val-78 im verkürzten Transducer. Abbildung 3.3.1 zeigt die Positionen der entsprechenden Seitenketten in einem

zweidimensionalen Modell des Komplexes. Die wahrscheinliche Richtung der transienten Auswärtsbewegung der Rezeptor-Helix F ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

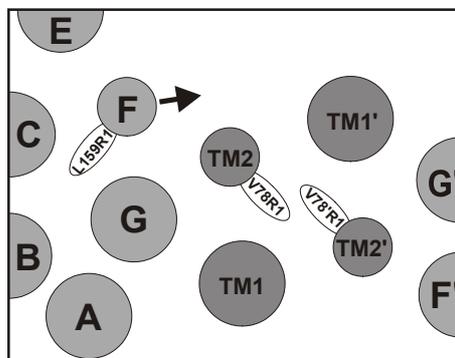


Abb. 3.3.1 Vermutliche Anordnung der Rezeptor- und Transducer-Helizes im 2:2-Komplex mit Positionen der eingeführten Spin-Markierungen für die Messung lichtinduzierter und zeitaufgelöster ESR-Spektren. Der Pfeil zeigt die vermutete Richtung der Auswärtsbewegung der Helix F nach photochemischer Anregung. Blick von der zytoplasmatischen Seite der Membran.

Des Weiteren werden die für die Positionen Lys-21 bis Val-25 (TM 1) sowie Ala-88 bis Ser-91 (AS 1) durchgeführten Abstandsbestimmungen mittels Tieftemperatur-ESR um die entsprechenden Messungen im lichtinduzierten Zustand ergänzt. Dazu werden die Proben unter Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda > 520$ nm eingefroren. Da dadurch sowohl der Grundzustand ($\lambda_{\max} = 500$ nm) als auch das O-Intermediat ($\lambda_{\max} = 550$ nm) angeregt werden, nicht aber der M-Zustand ($\lambda_{\max} = 400$ nm), ist es möglich, den signalgebenden M-Zustand zu akkumulieren. Die erhaltenen Abstände für den signalgebenden Zustand können dann mit denjenigen des Grundzustandes verglichen werden und erlauben nähere Aussagen über eventuelle Konformationsänderungen.

3.3.2 Analyse transienter Konformationsänderungen der Rezeptor-Helix F

Abbildung 3.3.2 zeigt das lichtinduzierte ESR-Differenzspektrum der Mutante NpSR_{II}-L159R1 rekonstituiert im Komplex mit NpHtr_{II}¹⁵⁷.

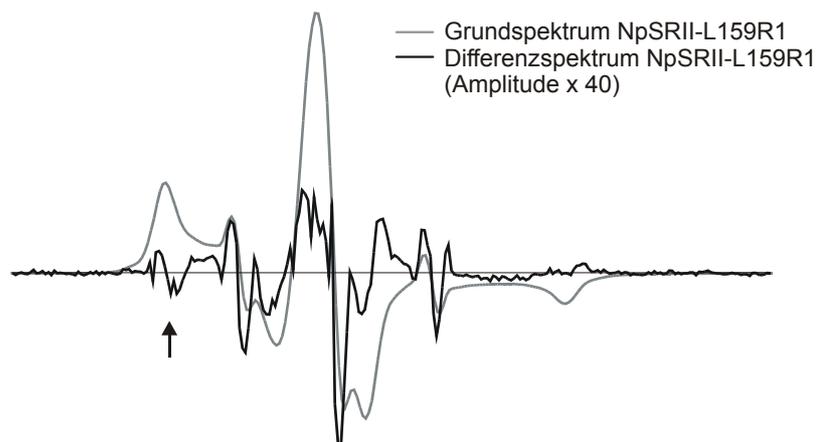


Abb. 3.3.2 Lichtinduziertes Differenzspektrum der NpSR_{II}-Mutante Leu-159-R1 im Komplex mit NpHtr_{II}¹⁵⁷ (schwarze Linie) im Vergleich zum Grundspektrum (graue Linie). Die Messung der Probe erfolgte im PML-rekonstituierten Zustand.

Das Differenzspektrum zeigt deutliche Hinweise auf eine transiente Mobilisierung der Spinsonde. Positive Amplituden werden sowohl im Bereich der Mittelfeldlinie als auch der Niedrigfeldlinie im Bereich der minimalen Hyperfeinaufspaltung beobachtet. Eine entsprechende Amplitudenveränderung läßt sich auch im Bereich der Hochfeld-Linie beobachten. Demzufolge werden im Differenzspektrum negative Amplituden in den Bereichen maximaler Hyperfeinaufspaltung, kennzeichnend für immobile Spinproben, nachgewiesen. Diese Beobachtung steht, unter Berücksichtigung der Position der Spinmarkierung (siehe Abb. 3.3.1), im Einklang mit einer transienten Auswärtsbewegung der Helix F.

Um die Kinetik dieser Konformationsänderung zu analysieren, wird die Veränderung des ESR-Signals zeitaufgelöst aufgezeichnet. Die Wahl der Position im Spektrum, d.h. die Magnetfeldstärke, orientiert sich dabei theoretisch an der Position der größten Amplitude im Differenzspektrum. Apparativ bedingt wird das qualitativ beste transiente Signal allerdings im Bereich maximaler Hyperfeinaufspaltung der Niedrigfeld-Linie bei 3423 Gauss beobachtet (siehe Pfeil in Abb. 3.3.1). Für die Aufnahme des transienten Signals werden bei einer Zeitauflösung von 0,2 ms 16.000 Akkumulationen durchgeführt. Zusätzlich erfolgt, um für den langsamen Teil der Kinetik ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten, eine zeitaufgelöste Messung bei

geringerer Zeitaufösung (10 ms) mit 1000 Akkumulationen. Nach Normierung der Amplituden der beiden ESR-Transienten werden diese kombiniert und eine Glättung des Signals durch logarithmische Mittelung durchgeführt. Bei dieser Methode werden aus den gegebenen Messwerten 20 gemittelte Werte pro Dekade erhalten. Abbildung 3.3.3 zeigt den auf diese Weise erhaltenen ESR-Transienten zusammen mit den entsprechenden differentiellen Absorptionsänderungen derselben Probe bei 400, 500 und 550 nm Wellenlänge.

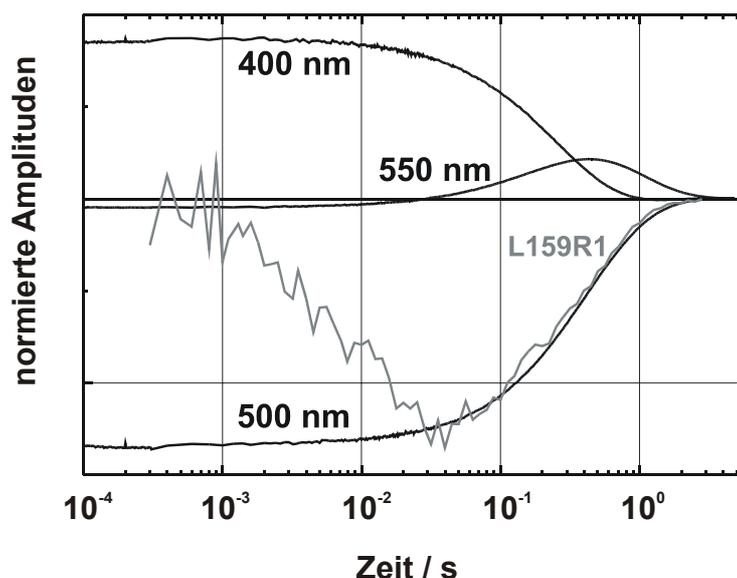


Abb. 3.3.3 Lichtinduzierter ESR-Transient (grau) der Rezeptormutante NpSR_{II}-L159R1 im PML-rekonstituierten Komplex mit NpHtr_{II}₁₅₇ mit den korrespondierenden differentiellen Absorptionsänderungen bei 400, 500 und 550 nm (schwarz). Die Amplituden des ESR-Transienten und des optischen Transienten bei 500 nm sind auf den gleichen Maximalwert normiert, um einen besseren Vergleich der Kinetik zu ermöglichen.

Das negative Vorzeichen der ESR-Transiente ist dabei konsistent mit einer transienten Immobilisierung der Spinprobe, d.h. einer verringerten Amplitude bei maximaler Hyperfeinaufspaltung im Bereich der Niedrigfeld-Linie. Die Analyse der ESR-Kinetik zeigt, daß sich beobachtete Konformationsänderung mit einer Halbwertszeit von etwa 3-4 ms stattfindet. Die Zerfallskinetik entspricht, wie schon von Wegener beobachtet, derjenigen der Rückbildung des NpSR_{II}-Grundzustandes, wie sich anhand des identischen Verlaufes des ESR-Transienten und des optischen Transienten bei 500 nm erkennen läßt.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob für die NpSR_{II}-Mutante D75N, welche kein M-Intermediat in ihrem Photozyklus aufweist, ebenfalls eine transiente Helix F-Bewegung nachweisbar ist und wenn ja, welche Kinetik diese aufweist. Zunächst werden die cw-Spektren

von Spin-markiertem wt-NpSR_{II} und der D75N-Mutante miteinander verglichen. Abbildung 3.3.4 zeigt die spinzahlnormierten Spektren der beiden Rezeptorvarianten rekonstituiert im Komplex mit NpHtr_{II157}.

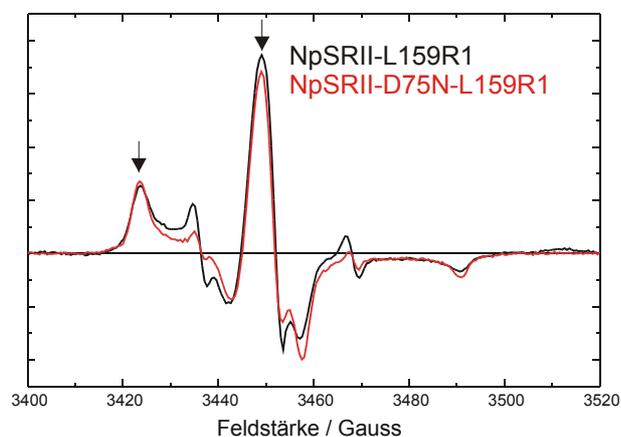


Abb. 3.3.4 Vergleich der spinzahlnormierten ESR-Grundspektren von NpSR_{II}-L159R1 (schwarz) und NpSR_{II}-D75N-L159R1 (rot) jeweils im Komplex mit NpHtr_{II157} (rekonstituiert in PM-Lipide). Die Pfeile kennzeichnen die Magnetfeldstärken 3424 und 3449 Gauss, welche für die Aufnahme transientser ESR-Signale verwendet werden.

Der Vergleich zeigt, daß die Mutation D75N signifikante Konformationsänderungen schon im Grundzustand des Rezeptors hervorruft. Diese äußern sich in einer deutlichen Erhöhung der immobilen Komponenten im ESR-Grundspektrum, d.h. die Beweglichkeit der Spinsonde ist im Falle der D75N-Mutante im Vergleich zum Wild-Typ deutlich eingeschränkt. Genaue Rückschlüsse auf die Art dieser Konformationsänderung lassen diese Resultate allerdings nicht zu. Zum Einen könnte sich bei unveränderter Lage der Spinsonde deren Umgebung so geändert haben, daß die Beweglichkeit eingeschränkt wird. Ursächlich dafür könnten sowohl eine Verschiebung der Helizes F und/oder G zur Proteinmitte hin, aber auch eine Umorientierung der L159R1 benachbarter Seitenketten sein. Zum Anderen läßt sich die beobachtete Immobilisierung auch mit einer Verschiebung der Helix F interpretieren, die der des signalgebenden Zustandes ähnlich ist. In diesem Fall könnte das erhöhte Platzangebot im Inneren des Proteins dazu führen, daß der Spinlabel weiter in den Protonenkanal eintaucht, was im Falle des Wild-Typs nicht möglich ist, dort aber eine eingeschränkte Beweglichkeit aufweist.

Die extreme Immobilität der Spinsonde in NpSR_{II}-D75N führt allerdings zu Problemen bei der Messung einer möglichen transienten Konformationsänderung bei Lichtanregung. Bei einer derart eingeschränkten Beweglichkeit führen Mobilitätsänderungen nur zu minimalen Veränderungen des ESR-Spektrums, so daß die zu erwartende Amplitude eines möglichen Differenzsignal sehr gering ist. Tatsächlich kann selbst bei geringer Zeitauflösung (10 ms) und 1.000 Akkumulationen

nur ein extrem schwaches transientes Signal beobachtet werden. Abbildung 3.3.5 zeigt die entsprechenden ESR-Transienten aufgenommen bei 3424 G (Maximum der Niedrigfeldlinie) und 3449 G (Maximum der Hauptfeldlinie). Die entsprechenden Magnetfeldstärken sind in Abbildung 3.3.4 markiert. Die beobachteten transienten Signale sind konsistent mit einer lichtinduzierten Mobilisierung der Spinsonde, können aufgrund der äußerst geringen Signalamplitude aber nicht als signifikant und damit als hinreichender Beweis für eine transiente Helix F-Bewegung dienen. Beispielsweise könnte auch ein durch den Lichtblitz hervorgerufener Temperatureffekt ursächlich für das beobachtete Signal sein.

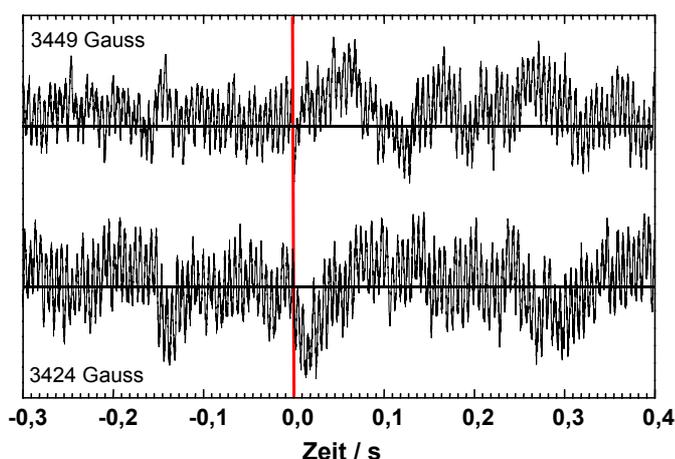


Abb. 3.3.5 Lichtinduzierte ESR-Transienten der Rezeptormutante NpSR_{II}-D75N-L159R1 im PML-rekonstituierten Komplex mit NpHtr_{II}¹⁵⁷ bei den Feldstärken 3424 Gauss (unten) und 3449 Gauss (oben). Für die Aufnahme der Transienten wurden 1000 einzelne Transienten bei einer Zeitauflösung von 10 ms akkumuliert. Die senkrechte rote Linie kennzeichnet den Zeitpunkt des Lichtblitzes.

Da diese Messungen keinen hinreichenden Aufschluß über das Vorhandensein einer transienten Bewegung der Rezeptor-Helix F erlauben, wird eine Spinsonde mit einem modifizierten Linker ((1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-yl) carbamidoethyl-methanthiosulfonat, MTS-4-oxy, R2, siehe Abbildung 3.3.6) an gleicher Position im NpSR_{II} eingeführt. Diese Spinsonde zeichnet sich durch einen verlängerten und voluminöseren Linker aus. Da die zuvor verwendete MTS-Spinsonde für die betrachtete Mutante eine extrem hohe Immobilität zeigt (siehe oben), d.h. in sehr enger Nachbarschaft zu den umgebenden Seitenketten steht, könnte MTS-4-oxy zu groß für diese „Bindungstasche“ sein und sich dementsprechend anders orientieren. Resultiert aus dieser Umorientierung eine höhere Mobilität, sollten, sofern vorhanden, transiente Mobilitätsänderungen zu einer höheren und damit beobachtbaren Differenzamplitude bei Lichtanregung führen. Tatsächlich zeigt das cw-Spektrum der NpSR_{II}-Mutante D75N-L159R2 deutlich weniger immobile Anteile als das entsprechende Spektrum mit MTSL (R1) als Spinsonde (Abbildung 3.3.6).

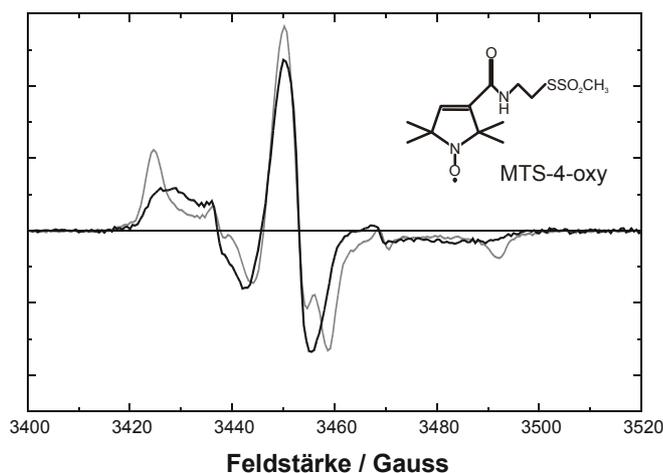


Abb. 3.3.6 ESR-Grundspektrum der NpSR II-Mutante D75N-L159R2 (schwarz) im Komplex mit NpHtr II₁₅₇ rekonstituiert in PM-Lipide im Vergleich zum entsprechenden Grundspektrum des NpSR II-D75N-L159R1 (grau). Rechts oben: Strukturformel der eingesetzten Spinsonde MTS-4-oxy.

Unter diesen Voraussetzungen sollte es möglich sein, eventuell vorhandene transiente Konformationsänderungen im Bereich der Spinsonde, d.h. im zytoplasmatischen Bereich der Rezeptor-Helix F, zu detektieren. Tatsächlich zeigt sich bei Aufnahme eines ESR-Transienten ein, wenn auch schwaches, Signal mit negativer Amplitude, d.h. die Spinsonde erfährt eine transiente Mobilisierung. Abbildung 3.3.7 zeigt den entsprechenden ESR-Transienten (Feldstärke: 3423 Gauss, 1 ms Zeitauflösung, 28.000 Akkumulationen) zusammen mit der differentiellen Absorptionsänderung der D75N-L159R2-Mutante bei 500 nm, sowie zum Vergleich den ESR-Transienten des Wildtyps bei pH 3,0 (3423 Gauss, 0,2 ms Zeitauflösung, 16.000 Akkumulationen, Spinsonde: MTSL). Bei diesem pH-Wert ist Asp75 grundsätzlich protoniert, so daß diese Seitenkette analog zur Mutante D75N nicht als Protonenakzeptor für die Schiff-Base fungieren kann. Der Photozyklus des NpSR II bei pH 3,0 ist daher weitestgehend identisch mit dem der D75N-Mutante (Schmies, 2000). Diese Analogie bestätigt sich weiterhin bei Betrachtung des entsprechenden ESR-Grundspektrums, welches ebenfalls eine deutliche Erhöhung der immobilen Anteile, bzw. praktisch vollständige Immobilisierung, aufweist (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend sollte sich diese Probe nach Lichtanregung ähnlich verhalten wie die betrachtete NpSR II-Mutante. Tatsächlich läßt sich auch in diesen Fall eine transiente Änderung des ESR-Signals beobachten, welche mit einer lichtinduzierten Mobilisierung der Spinsonde in Einklang steht.

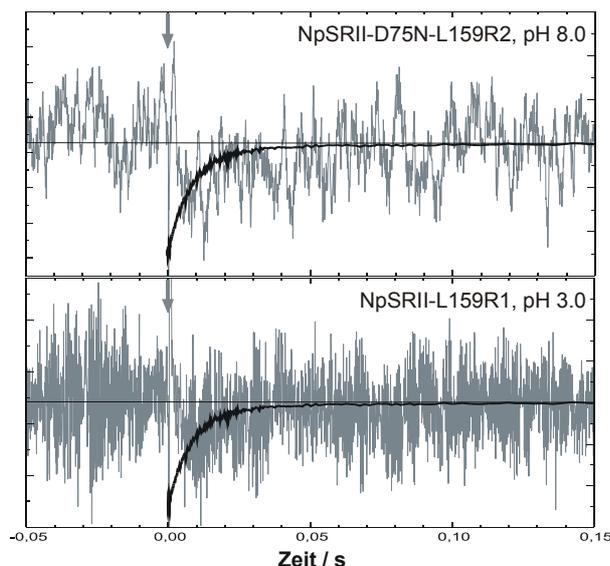


Abb. 3.3.7 Lichtinduzierte ESR-Transienten (grau) der Rezeptormutanten NpSRII-D75N-L159R2 bei pH 8 (oben) und NpSRII-L159R1 bei pH 3 (unten), jeweils im PML-rekonstituierten Komplex mit NpHtrII₁₅₇, mit der korrespondierenden differentiellen Absorptionsänderung bei 500 nm (schwarz). Der graue Pfeil kennzeichnet jeweils den Zeitpunkt des Lichtblitzes.

Somit liefert sowohl die Messung unter Verwendung des Spinlabels MTS-4-oxy als auch die Analyse des analogen Zustandes im Wild-Typ-Rezeptor bei azidem pH weitere Hinweise auf eine mögliche transiente Konformationsänderung der Helix F. In beiden Fällen steht Asp75 als Protonenakzeptor nicht zur Verfügung. Aufgrund der auch hier in beiden Fällen äußerst geringen Signalamplitude liefert die Methode der zeitaufgelösten ESR-Spektroskopie jedoch keinen endgültigen Beweis für das Vorhandensein dieser lichtinduzierten, transienten Bewegung der Rezeptor-Helix. Im Einklang mit dieser Interpretation sind die beobachteten Halbwertszeiten für die Rückkehr der ESR-Signale in den Grundzustand, welche gut mit dem Verlauf des optischen Transienten korrelieren (siehe Abb. 3.3.7), ein gutes Argument für diese Vermutung.

Die geringe Signalamplitude ließe sich dabei mit der Tatsache erklären, daß die eingeführte D75N-Mutation und auch die Protonierung von Asp75 bei pH 3.0 (Daten nicht gezeigt) offensichtlich schon zu einer Konformationsänderung des Proteins im Grundzustand führen. Die beobachtete Erhöhung der immobilen Anteile im cw-Spektrum unter Verwendung der MTSL-Sonde (Vergleiche Abb. 3.3.4) ist in Übereinstimmung mit dieser Annahme. Diese Konformationsänderung ist entweder dergestalt, daß die F-Helix ist schon im Grundzustand etwas herausgeklappt ist, so daß nur noch eine vergleichsweise kleine Bewegung möglich ist, oder sie befindet sich, bedingt durch die Mutation bzw. die Protonierung von Asp75, weiter im „Inneren“ des Proteins und sterische Wechselwirkungen erlauben aus dieser Situation heraus lediglich eine geringfügige transiente Auswärtsbewegung. Mit den vorliegenden Daten ist allerdings eine Differenzierung zwischen diesen beiden Fällen nicht möglich.

3.3.3 Analyse transienter Konformationsänderungen im Transducer

Tieftemperatur-ESR an lichtinduzierten Proben

Werden Tieftemperaturspektren (170 K) der NpHtrII₁₅₇-Mutanten Lys-21-R1 bis Val-25-R1 im Komplex mit NpSRII-S157R1 bzw. -F210R1 unter Belichtung, d.h. im M-Zustand, aufgenommen (siehe 3.3.1), so zeigt der Vergleich mit den entsprechenden Spektren im unbelichteten Zustand (siehe Abbildung 3.3.8) größtenteils keine signifikanten Unterschiede.

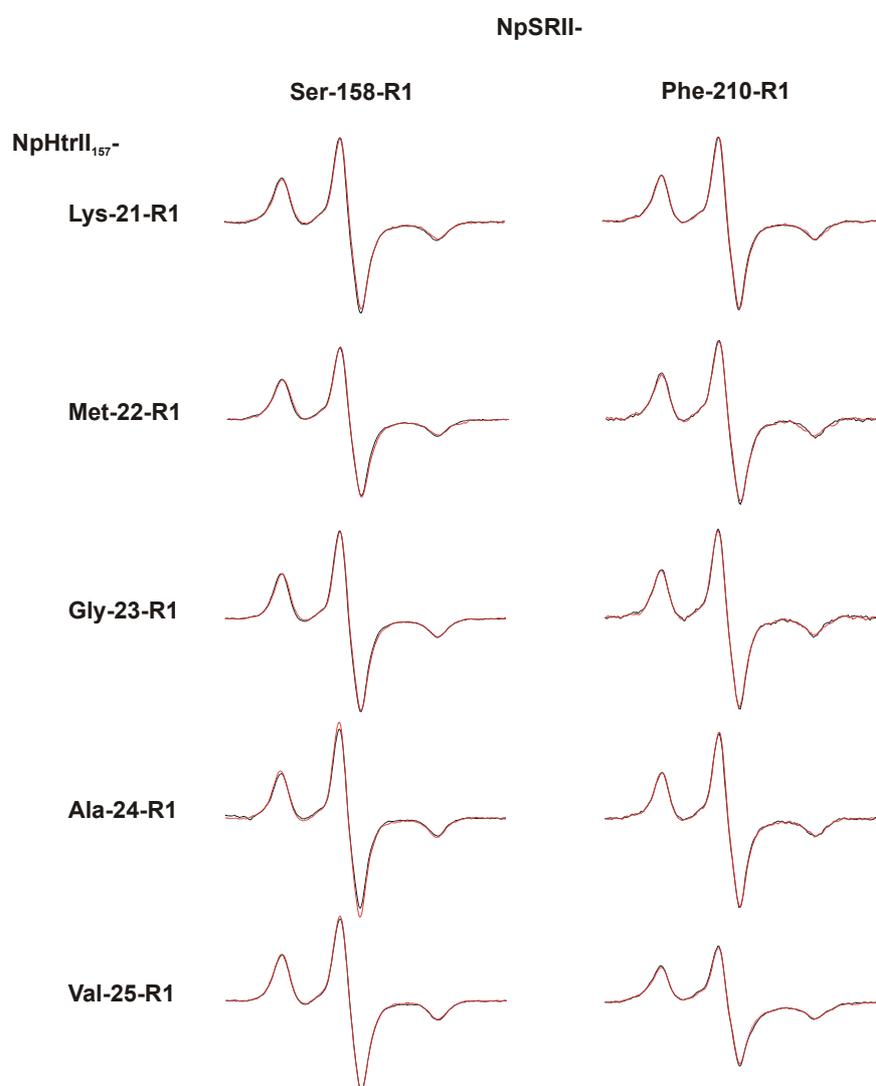


Abb. 3.3.8 Vergleich der spinzahlnormierten ESR-Tieftemperatur-Spektren (170 K) der spinmarkierten NpSRII-Mutanten S158R1 und F210R1 im Komplex mit den NpHtrII₁₅₇-Mutanten K21R1 bis V25R1 (PML-rekonstituiert) im Grundzustand (schwarz) mit dem akkumulierten M-Zustand (rot).

Lediglich der Komplex NpSR_{II}-S158R1 / NpHtr_{II}₁₅₇-A24R1 zeigt eine geringfügige Abstandsvergrößerung im M-Zustand um etwa 1 Å, die sich allerdings aufgrund der geringen Änderung der Spektrenform nicht zuverlässig quantifizieren läßt. Die weitgehend konstanten Abstände zur Position 210 des Rezeptors (Helix G) legen nahe, daß die Transducer-Helix TM 1 beim Übergang zum signalgebenden Zustand keine signifikanten Konformationsänderungen in diesem Abschnitt erfährt.

Die, bis auf die Ausnahme NpHtr_{II}₁₅₇-A24R1, ebenfalls weitgehend unveränderten Distanzen zur Position 158 auf der Rezeptor-Helix F scheinen im Widerspruch zu der nachgewiesenen Auswärtsbewegung dieser Helix zu stehen. Allerdings sind zum einen die gemessenen Abstände für 158/23 und 158/25 größer als 18 Å und liegen damit außerhalb des erfaßbaren Bereiches (siehe Tab. 3.2.1). Zum anderen erfolgt die Helix F-Bewegung nahezu senkrecht zum Verbindungsvektor zwischen F und TM 1, so daß meßbare Abstandsveränderungen kaum zu erwarten sind.

Im Weiteren wird der Vergleich zwischen dem belichteten „M“-Zustand und dem Grundzustand auch für die Tieftemperatur-Spektren der am Beginn der putativen AS 1 lokalisierten Seitenketten 88 – 91 im Komplex mit NpSR_{II}-K157R1 durchgeführt. Abbildung 3.3.9 zeigt den Vergleich der entsprechenden Spektren in belichtetem Zustand mit den unbelichteten Proben.

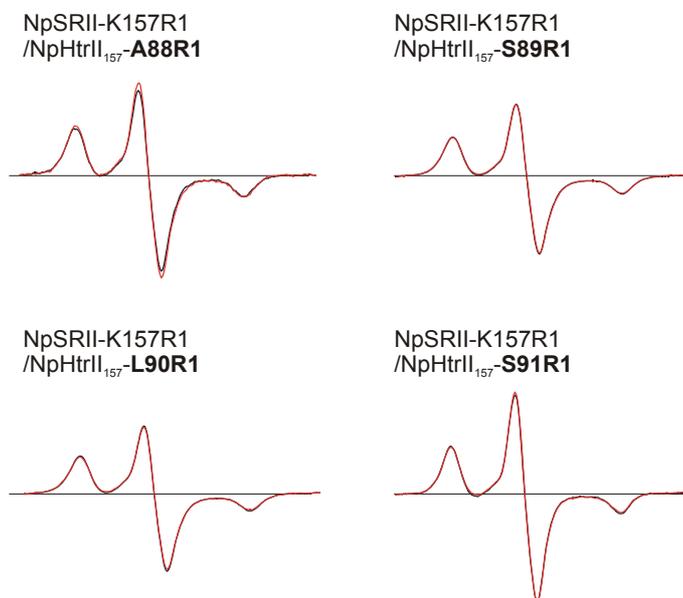


Abb. 3.3.9 Vergleich der spinnormierten ESR-Tieftemperatur-Spektren (170 K) der spinmarkierten NpSR_{II}-Mutante K157R1 im Komplex mit den NpHtr_{II}₁₅₇-Mutanten A88R1 bis S91R1 (PML-rekonstituiert) im Grundzustand (schwarz) mit dem akkumulierten M-Zustand (rot).

Tabelle 3.3.1 zeigt die aus der Simulation und aus den zweiten Momenten der im belichteten Zustand aufgenommenen Tieftemperatur-Spektren berechneten Interspin-Abstände. Die Abstandsänderung gegenüber den im Grundzustand gemessenen Abständen ist jeweils in Klammern angegeben.

NpSR11-K157R1/NpHtrII ₁₅₇₋		Ala-88-R1	Ser-89-R1	Leu-90-R1	Ser-91-R1
Abstand (Å, Licht)	Simulation	14,8 (+1,0)	14,0 (+0,8)	14,0 (-0,5)	17,3 (-0,7)
	2. Moment	-*	13,4 (-1,4)	12,8 (-0,3)	-*
Anteil einfach markierter Komplex		0,56	0,51	0,46	(0,86)

Tab. 3.3.1 Spin-Spin-Abstände aus der Simulation sowie aus den zweiten Momenten von Tieftemperatur-Spektren zwischen NpSR11-K157R1 und NpHtrII₁₅₇₋A88R1 bis NpHtrII₁₅₇₋S91R1 im belichteten Zustand. Die Abstandsverteilung wurde bei 2,0 Å festgehalten. In Klammern angegeben sind die gegenüber den im Grundzustand ermittelten Abständen gefundenen Distanz-Veränderungen.

*Abstandsbestimmung mit 2. Moment nicht möglich.

Die Simulationen ergeben lediglich geringfügige Abstandsveränderungen gegenüber dem Grundzustand. Die Distanz zwischen NpHtrII-A88R1 und NpSR11-K157R1 nimmt im angeregten Zustand um etwa 1 Å zu. Die Positionen 90 und 91 des Transducers scheinen sich dagegen der Rezeptor-Sonde leicht anzunähern. Die Abstandsmessung für S89R1^{NpHtrII} - K157R1^{NpSR11} liefert widersprüchliche Ergebnisse beim Vergleich der Methoden über die Spektrens simulation bzw. das 2. Moment. Eine genaue Betrachtung der beiden Tieftemperaturspektren (Abb. 3.3.9) zeigt jedoch, daß die Spektren für den Grund- bzw. den angeregten Zustand weitestgehend identisch sind. Die errechneten Abstandsveränderungen sind demnach auf Ungenauigkeiten bei der Spektrens simulation bzw. der Bestimmung der 2. Momente zurückzuführen. Der Abstand zwischen diesen beiden Spinsonden verändert sich also nicht signifikant mit der Bildung von M. Unter Berücksichtigung der transienten Konformationsänderung der F-Helix, und damit der Spinsonde K157R1, deuten diese Befunde darauf hin, daß sich die Helix F und die AS 1 gemeinsam bewegen.

Beachtet werden sollte jedoch, daß die gemessenen Abstandsveränderungen in der gleichen Größenordnung liegen wie die Abstandsverteilung, so daß die ermittelten Werte für die Distanzänderungen eher als Tendenz aufzufassen sind.

Analyse der Kinetik der TM 2 Bewegung

Abbildung 3.3.10 zeigt den lichtinduzierten ESR-Transienten der Transducer-Mutante Val-78-R1 im Komplex mit NpSR_{II} im Vergleich zur Rezeptormutante L159R1 und den optischen Transienten. Als geeignete Magnetfeldstärke wird diejenige gewählt, bei der das Differenzspektrum (Daten nicht gezeigt) die maximale Amplitude aufweist. Diese findet sich für das Maximum der Mittelfeldlinie bei 3450 Gauss. Für die Aufnahme des transienten Signals werden bei einer Zeitauflösung von 0,2 ms insgesamt 32.000 Akkumulationen durchgeführt. Die Glättung des Signals erfolgt durch logarithmische Mittelung mit 30 Punkten pro Dekade.

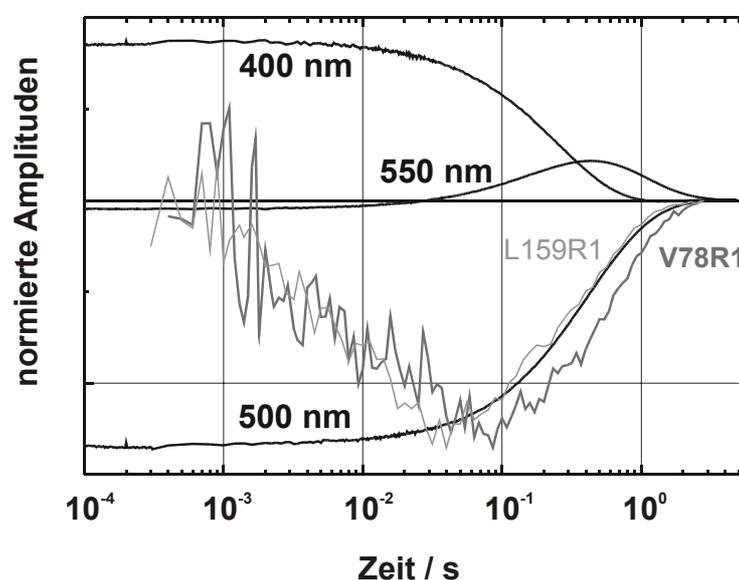


Abb. 3.3.10 Lichtinduzierte ESR-Transienten der Transducermutante NpHtr_{II157}-V78R1 (PML-rekonstituiert mit NpSR_{II}, dunkelgrau) im Vergleich zur Rezeptormutante L159R1 (PML-rekonstituiert mit NpHtr_{II157}, hellgrau) und den korrespondierenden differentiellen Absorptionsänderungen bei 400, 500 und 550 nm (schwarz). Die Amplituden der ESR-Transienten und des optischen Transienten bei 500 nm sind zum Vergleich der Kinetiken normiert. Der ESR-Transient V78R1 wurde zum besseren Vergleich mit L159R1 und dem optischen Transienten bei 500 nm an der Achse y=0 gespiegelt.

Das Vorzeichen der Transiente ist konsistent mit der positiven Amplitude im Bereich des Maximums der Mittelfeldlinie im Differenzspektrum und deutet auf eine stark verringerte dipolare Kopplung hin. Dieses Ergebnis stimmt mit vorherigen Beobachtungen überein (Wegener, 2000).

Der Vergleich mit dem ESR-Transienten der NpSR_{II}-Mutante L159R1 zeigt, daß der Anstieg des ESR-Signals bei den beiden Mutanten synchron mit einer Halbwertszeit von etwa 3-4 ms erfolgt. Demgegenüber tritt der Abfall des Signals, wie bereits von Wegener (2000) beobachtet, im Falle

der V78R1 zeitverzögert auf. Die Halbwertszeiten der Zerfallskinetik von 300 ms (L159R1) bzw. 520 ms (V78R1) liegen etwas unter den von Wegener beobachteten Werten (440 ms bzw. 720 ms). Diese Abweichung läßt sich auf die etwas höhere Meßtemperatur bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen (27°C) zurückführen, so daß die hier ermittelten Werte in guter Übereinstimmung mit den bisherigen Daten sind.

3.4 Analyse der Kristallstruktur des Rezeptor/Transducer-Komplexes

Die molekulare Architektur des Transducers ließ erwarten, daß der Rezeptor/Transducer-Komplex aufgrund des großen zytoplasmatischen Abschnittes nicht direkt für die Kristallisation zugänglich sein würde. Aus diesem Grund wurde das verkürzte Transducer-Fragment NpHtrII₁₁₄-His konstruiert, welches mit Rücksicht auf die gewählte Methode der Kristallisation in der kubischen Lipid-Phase einen möglichst kurzen zytoplasmatischen Teil aufweist. Dennoch enthält dieses Protein-Fragment laut entsprechenden Bindungsstudien alle für die Komplexbildung mit dem NpSR_{II} notwendigen Bereiche (S. Mreyen, pers. Mitteilung). Zudem inhibiert dieses Fragment die Protonenpumpaktivität des NpSR_{II} in gleicher Weise, wie dies bei dem vollständigen Transducer-Protein der Fall ist (Schmies, 2000). Sowohl der Rezeptor als auch das Transducer-Fragment wurden mit einem C-terminalen His-Tag versehen, wodurch die Proteine mittels Nickel-Affinitäts-Chromatographie in hoher Reinheit erhalten werden konnten.

Um die Proteine in geeigneter Weise für die Kristallisation aufzubereiten wurde ein Verfahren entwickelt und optimiert, bei welchem zunächst die Bildung eines 1:1-Komplexes im solubilisierten Zustand erfolgt. Im Anschluß daran erfolgt die Rekonstitution in PM-Lipide aus *H. salinarum* zur Ausbildung der 2:2-Stöchiometrie. Zusätzlich versetzt dieser Prozeß den Proteinkomplex in eine dem nativen Zustand möglichst ähnliche Lipid-Umgebung. Eine nachfolgende Resolubilisierung in dem Detergenz OG ermöglicht schließlich die Mischung mit der kubischen Lipid-Phase (siehe Material und Methoden) unter kontrollierten Bedingungen.

Die Kristallisation wurde anschließend in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Georg Büldt (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt (Gordeliy *et al.*, 2002). Die Kristallisations-Ansätze wurden von V. Gordeliy, R. Moukhametzianov und R. Efremov optimiert und ausgeführt. Die Struktur wurde von J. Labahn und J. Granzin gelöst. Dabei dienten das mittels ESR-Spektroskopie entwickelte Modell des Komplexes sowie weitere Zugänglichkeits- und Mobilitätsdaten als Zusatzinformationen.

Die dünnen, orangefarbenen Kristalle zeigen eine orthorhombische Form mit einer Größe von etwa 140 µm und streuen bis zu einer Auflösung von 1,8 Å. Der 2:2-Komplex aus NpSR_{II} und dem verkürzten Transducer NpHtrII₁₁₄ kristallisiert in der kubischen Lipid-Phase mit einem Komplex pro asymmetrischer Einheit. Das Komplex-Dimer wird dabei von einer zweizähligen

kristallographischen Achse gebildet, welche zentral zwischen den Transducer-Helizes TM 1, TM 2, TM 1' und TM 2' lokalisiert ist. Die Auflösung der Struktur beträgt 1,94 Å.

Die Struktur des NpSR_{II} endet mit der Position 225, was auf eine hohe Flexibilität des C-terminalen Bereiches hindeutet. Der aufgelöste Bereich des verkürzten Transducers beschränkt sich auf den Sequenzbereich 24-82. Sowohl der N-terminale Bereich als auch der der TM 2 folgende zytoplasmatische Bereich liegen demnach in multiplen Konformationen vor. In Einklang damit erhöhen sich die beobachteten Temperaturfaktoren deutlich von der Mitte der Membran hin zur zytoplasmatischen Seite (Daten hier nicht gezeigt).

Abbildung 3.4.1 zeigt die Sicht von der zytoplasmatischen Seite auf den 2:2-Komplex.

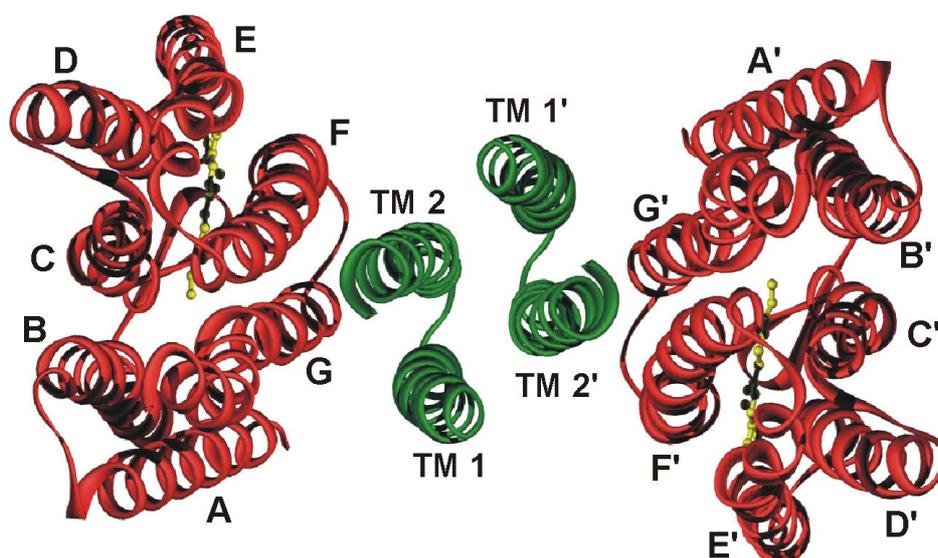


Abb. 3.4.1 Kristallstruktur des 2:2-Komplexes aus NpSR_{II} (rot) mit dem Retinalchromophor (gelb) und NpHtr_{II114} (grün) in Bänderdarstellung. Sicht von der zytoplasmatischen Seite. Die Unterscheidung zwischen den beiden achsensymmetrischen 1:1-Komplexen erfolgt durch Hinzufügen eines Apostrophs (') zu den Bezeichnungen der hier rechts liegenden Einheit.

Die Rezeptor-Helizes F und G bilden jeweils die Kontaktfläche mit den Transducerhelizes TM 1 und TM 2. Die TM 2 ist dabei etwa gleich weit von den Helizes F und G des NpSR_{II} entfernt, während die TM 1 einen deutlich größeren Abstand zu den Rezeptor-Helizes aufweist. Besonders erwähnenswert ist die auffällig große Lücke, welche von den Helizes A, G, TM 1 und TM 2 begrenzt wird. Betrachtet man die Struktur des Komplexes in der Seitenansicht (Abb. 3.4.2), läßt sich die Topologie dieser V-förmigen Lücke noch deutlicher erkennen. Während die Helizes G und TM 2 in geringem Abstand nahezu parallel verlaufen und damit die „hintere“ Begrenzung dieser Lücke bilden, entfernen sich A und TM 1 in Richtung Zytoplasma zunehmend voneinander und sind damit für die seitliche Begrenzung und die Form dieser Lücke verantwortlich.

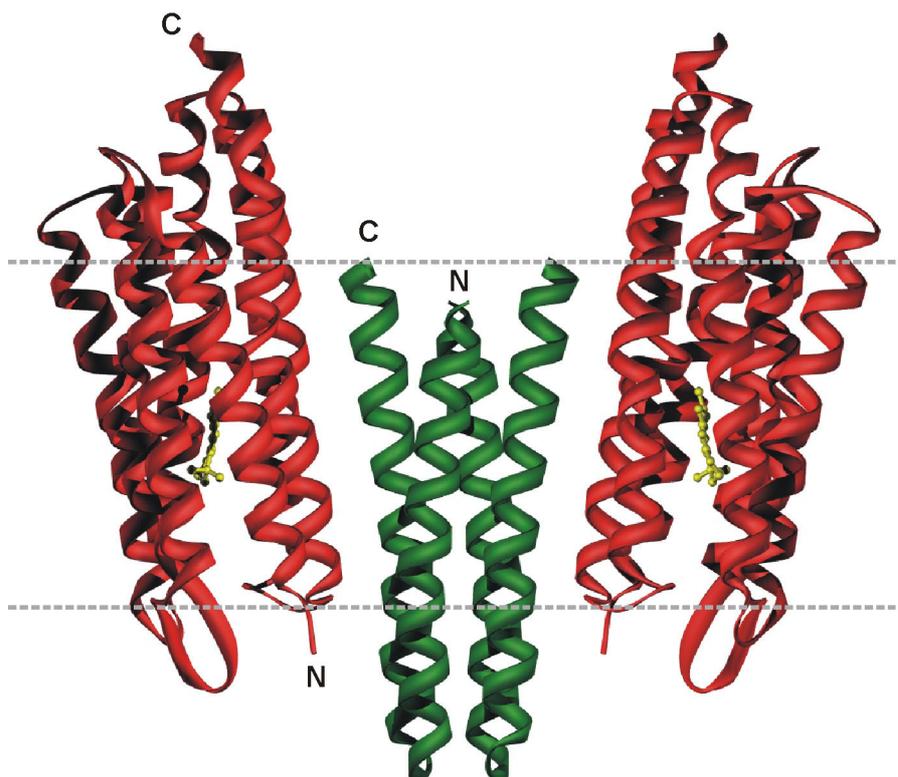


Abb. 3.4.2 Seitenansicht der Kristallstruktur des Rezeptor/Transducer-Komplexes. Die zyttoplasmatische Seite befindet sich in dieser Darstellung oben. Die grauen gestrichelten Linien schließen die vorwiegend hydrophoben Bereiche der Proteine ein und sind nicht identisch mit den Grenzen der Lipid-Doppelschicht. NpSRII: rot; NpHtrII: grün.

Des weiteren zeigt die Seitenansicht des Komplexes, daß sich die Transducer-Helizes etwa drei Helix-Windungen (Positionen 44-59) über die extrazelluläre Seite der Membran hinaus ausdehnen.

Die Kontaktfläche zwischen Rezeptor und Transducer wird hauptsächlich von van der Waals-Wechselwirkungen bestimmt. Bei genauerer Betrachtung der van der Waals-Kontakte zwischen den Transducer- und den Rezeptor-Helizes zeigt sich, daß etwa doppelt so viele vdW-Wechselwirkungen zwischen der Rezeptor-Helix G und der Transducer-Helix TM 2 existieren, als zwischen Helix F und der TM 2. Dies läßt sich durch den jeweiligen durchschnittlichen van der Waals Abstand quantifizieren. Er beträgt $4,06 \text{ \AA}$ zwischen G und TM 2 gegenüber $4,22 \text{ \AA}$ zwischen F und TM 2. Durch diese vergleichsweise starken Wechselwirkungen, welche insbesondere über interkalierende, sterisch anspruchsvolle Seitenketten (Tyr, Leu, Ile) stattfinden, werden Helix G und TM 2 fest aneinander gekoppelt.

Darüber hinaus bestehen drei Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen Thr-189 in der F-G-Loop-Region des NpSRII und Glu-43 (TM 1) sowie Ser-62 (TM 2) des Transducers. Eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxyl-Gruppe von Tyr-199 und dem Seitenketten-Stickstoff

von Asn-74 bildet einen zusätzlichen Ankerpunkt zwischen der Rezeptor-Helix F und der Transducer-Helix TM 2 (siehe Abb. 3.4.3).

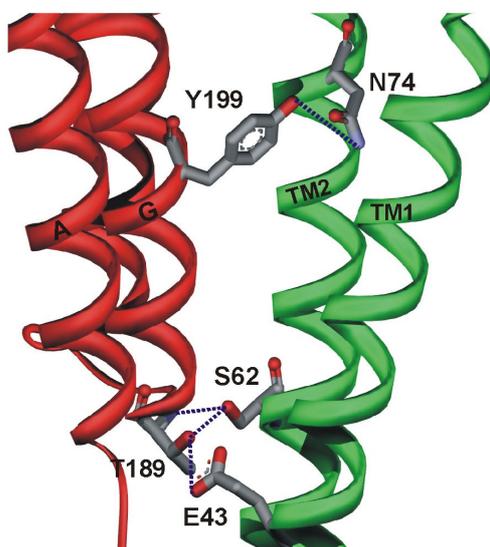


Abb. 3.4.3 Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen NpSRII (Helizes in rot) und NpHtrII (Helizes in grün). Die Helizes sowie die an den Bindungen beteiligten Seitenketten sind entsprechend bezeichnet.

Auch zwischen den vier Transducer-Helizes stabilisieren zahlreiche Interkalationen ausschließlich hydrophober Seitenketten den Komplex, so dass insbesondere die Verbindung zwischen den beiden 1:1 Hetero-Dimeren ausschließlich über van der Waals-Wechselwirkungen erfolgt.

4 Diskussion

Grundlage der archaebakteriellen Phototaxis ist die Aufnahme eines Lichtreizes durch das Rezeptormolekül, die Generierung eines signalgebenden Zustandes und die nachfolgende Weiterleitung dieses Signals an das Rezeptor-gebundene Transducer-Protein. Schließlich werden vom Transducer die zytoplasmatischen Komponenten der sich anschließenden Signaltransduktionskaskade aktiviert.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie die lichtaktivierte Isomerisierung des Retinal-Chromophors im NpSR_{II} zu Konformationsänderungen im NpHtr_{II} führt. Die strukturelle Untersuchung der Rezeptor/Transducer-Komplexes mittels der Röntgenstrukturanalyse und der ESR-Spektroskopie soll die Basis für das Verständnis dieser Vorgänge liefern. Desweiteren erfolgen kinetische Untersuchungen der beteiligten Prozesse durch die Laserblitz-Absorptions-Spektrometrie sowie die zeitaufgelöste ESR-Spektroskopie.

Anhand der so gewonnenen Daten soll ein Modell für die lichtinduzierte Aktivierung des Transducer-Proteins und die Weiterleitung dieses Signals zur CheA-Bindungsdomäne des NpHtr_{II} entwickelt werden. Die Betrachtung der Transducer-internen Signaltransduktion erfolgt dabei unter Berücksichtigung der zum Teil schon bekannten Homologien zu den bakteriellen Chemorezeptoren.

4.1 Photoaktivierung des NpSR_{II}

Wie auch bei der Protonenpumpe BR induziert die Absorption eines Photons durch den Retinal-Chromophor im Photorezeptor NpSR_{II} eine zyklische Reaktion, bei der eine Reihe spektroskopisch unterscheidbarer Intermediate durchlaufen werden, bevor das Protein thermisch in den Grundzustand relaxiert. Der wesentliche Unterschied zwischen den Photozyklen des BR und der sensorischen Rhodopsine ist eine etwa 100fach längere Zyklusdauer bei den SR's (~ 1 s) im Vergleich zur Protonenpumpe (~ 10 ms). Diese Unterschiede lassen sich mit den verschiedenen Funktionen der beiden Proteine erklären. Während das BR als effektive Ionenpumpe über einen möglichst kurzen Photozyklus verfügen sollte, muß bei einem Rezeptor die Lebensdauer des signalgebenden Zustandes ausreichen, um die nachfolgenden Komponenten der Signaltransduktionskaskade aktivieren zu können. Das M-Intermediat, welches innerhalb von

etwa 50 μ s durch die Deprotonierung der SB gebildet wird und durch dessen Reprotonierung erst nach rund 500 ms wieder zerfällt, wurde als signalgebende Spezies vorgeschlagen. Spudich *et al.* (1997) beispielsweise vermuten, daß die Deprotonierung der SB zur Auflösung einer Salzbrücke zwischen der SB und ihrem Gegen-Ion und damit zu einer Konformationsänderung führt. Ob mit der Reprotonierung der SB tatsächlich auch das photophobe Signal abgeschaltet wird, ist bislang ungeklärt. Untersuchungen von Yan und Spudich (Yan *et al.*, 1991) deuten jedoch darauf hin, daß auch das nachfolgende O-Intermediat noch physiologisch aktiv sein könnte. Wegener *et al.* (2001a, b) konnten mittels zeitaufgelöster ESR-Spektroskopie bestätigen, daß auch der O-Zustand als aktive Spezies betrachtet werden muß.

Potentiell verantwortlich für die abweichende Kinetik der Photozyklus-Intermediate sind diejenigen Aminosäure-Reste, welche im BR nachweislich am Protonentransport beteiligt sind, und im NpSR_{II} an entsprechender Position eine andere Seitenkette aufweisen. Zu nennen sind hier der Protonendonator Asp-96^{BR} (Phe-86^{NpSR_{II}}), Thr-46^{BR} (Leu-40^{NpSR_{II}}), welches eine Wasserstoffbrücke zu Asp-96 ausbildet sowie das an der Protonenabgabe an das Medium beteiligte Glu194^{BR} (Pro-183^{NpSR_{II}}). Ebenfalls betrachtet werden soll Ala-215^{BR} (Thr-204^{NpSR_{II}}), welches eine durch den Übergang L \rightarrow M unterbrochene Wasserstoffbrückenbindung zu Trp-182^{BR} ausbildet. Zudem ist diese Aminosäure direkt der Lysin-Seitenkette benachbart, an welche das Retinal über die Schiff-Base gebunden ist. Hier läßt sich zudem also ein sterischer Einfluß auf die Lebensdauer eines oder mehrerer Photozyklus-Intermediate erwarten.

Die in Abbildung 3.1.2 dargestellten Photozyklen der entsprechenden Einzel-Mutanten weisen keine signifikanten Änderungen der Kinetik auf. Die Analyse der Doppel-Mutante NpSR_{II}-L40T/F86D jedoch zeigt, daß die Einführung der Protonendonator-Gruppe des BR (Asp-96^{BR} = Phe-86^{NpSR_{II}}) zusammen mit dem benachbarten Threonin (Thr-46^{BR} = Leu-40^{NpSR_{II}}) ausreichend ist, die Kinetik des M-Zerfalls auf das Niveau des BR zu beschleunigen (Abb. 3.1.3 B). Damit werden die Beobachtungen von Schmies (2000) und Iwamoto *et al.* (1999a) bestätigt. Ein wichtiges Ergebnis ist allerdings, daß der beschleunigte M-Zerfall nicht zu einer Beschleunigung des Gesamt-Photozyklus führt. Die Bildung des O-Intermediates wird analog zur Beschleunigung des M-Zerfalls schneller. Der O-Zerfall, und damit die Rückbildung des Grundzustandes, wird allerdings nicht beeinflußt. Demzufolge führt eine schnellere Reprotonierung der Schiff-Base nicht zwangsläufig zur einer entsprechenden Beschleunigung der nachfolgenden Prozesse.

Bedingt durch die Tatsache, daß M-Zerfall und O-Bildung praktisch simultan ablaufen, beobachtet man nur eine vernachlässigbar geringe transiente Konzentration des N-Intermediates. Dies deutet darauf hin, daß Asp-86, im Gegensatz zu Asp-96 in BR, praktisch zeitgleich mit der SB reprotoniert wird. Die Ursache für den simultanen Ablauf dieser Prozesse könnte in der Öffnung des zytoplasmatischen Kanals während der Bildung von M₁ oder M₂ zu finden sein.

Gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, daß der pK_a bezüglich des M-Zerfalls von 11,5 im NpSR^{II} auf 9,5 in der Vierfach-Mutanten absinkt.

Untersuchungen von Sasaki und Spudich (1999) bzw. Iwamoto *et al.* (1999b) zufolge erfolgt im Gegensatz zu BR im NpSR^{II} erst im letzten Schritt des Photozyklus die Abgabe eines Protons an das extrazelluläre Medium. Als verantwortlich dafür wurden Seitenketten im extrazellulären Kanal identifiziert, die das für BR beschriebene Wasserstoffbrücken-Netzwerk in diesem Bereich (Rammelsberg *et al.*, 1998; Luecke *et al.*, 1999b) stören. In BR sind zwei Aminosäuren, Glu-194^{BR} und Glu-204^{BR} direkt an der Protonenabgabe an das Medium beteiligt. Im NpSR^{II} sind diese Gruppen durch Pro-183^{NpSR^{II}} bzw. Asp-193^{NpSR^{II}} ersetzt. Da die Seitenketten Asp-193 und Glu-204 beide über eine Carbonylfunktion verfügen und somit als homolog betrachtet werden können, wurde im nächsten Mutations-Schritt Pro-183 durch Glu ersetzt (P183E).

Der Photozyklus der resultierenden Dreifach-Mutante L40T/F86D/P183E zeigt lediglich eine geringfügige Beschleunigung des O-Zerfalls (Abb. 3.1.3 C), zusätzlich jedoch eine weitere Beschleunigung des M-Zerfalls. Aus diesem Resultat läßt sich ableiten, daß Deprotonierung des Protonenakzeptors Asp-75 im NpSR^{II} bereits während der Übergänge $M \rightarrow N \rightarrow O$ stattfinden könnte. Im BR ist der Protonentransfer von Asp-85 zu Glu-194 hingegen der letzte Schritt des Photozyklus (Richter *et al.*, 1996; Kandori *et al.*, 1997).

Eine wesentlich signifikantere Beschleunigung des O-Zerfalls beobachtet man nach Mutation einer weiteren Seitenkette, die jedoch nicht direkt am Protonentransport beteiligt ist. In NpSR^{II} ist das der SB direkt benachbarte Ala-215^{BR} durch eine Threonin-Seitenkette (Thr-204^{NpSR^{II}}) ersetzt. Wie auch im BR bildet diese Seitenkette eine, über ein Wassermolekül vermittelte, Wasserstoffbrückenbindung zu der Tryptophan-Seitenkette Trp-171^{NpSR^{II}} (= Trp-182^{BR}) (Luecke *et al.*, 2001; Royant *et al.*, 2001). Im M-Intermediat wird diese Wechselwirkung unterbrochen (Luecke *et al.*, 1999a; Sass *et al.*, 2000), wobei die sterisch anspruchsvollere Thr-Seitenkette in NpSR^{II} offensichtlich erheblichen Einfluß auf die Übergänge $M \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow \text{NpSR}^{\text{II}}$ hat.

Daraus ergeben sich zwei Schlußfolgerungen. Zum einen werden die Geschwindigkeiten der Protonen-Aufnahme bzw. -Abgabe nicht allein durch die direkt am Transport beteiligten Aminosäuren, sondern zudem durch die gesamte Proteindynamik bzw. Ladungsverteilung bestimmt. Zum anderen wird die Dauer des Gesamtphotozyklus nicht allein durch den Protonierungszustand der SB, sondern zudem durch den Isomerisierungszustand des Chromophors bzw. den damit gekoppelten Konformationsänderungen des Proteins bestimmt. Letztere Hypothese wurde bereits von Schmies (2000) ebenfalls auf der Grundlage detaillierter Photozyklus-Untersuchungen aufgestellt und konnte hier anhand erweiterter Mutations-Studien bestätigt werden.

Ebenfalls interessant ist der Einfluß eines externen Protonendonors auf die Photozykluskinetik des NpSR_{II}. Wie die Einführung interner Protonendonatoren durch Mutation führt die Zugabe von Natriumazid mit steigenden Konzentrationen zu einer zunehmenden Beschleunigung des M-Zerfalls, wobei die Kinetik der Bildung des O-Intermediates in gleichem Maße beschleunigt wird. Zwar erfährt auch der O-Zerfall eine Beschleunigung, welche aber weniger stark ausgeprägt ist und somit zu einer zunehmenden Akkumulation des O-Intermediates führt (siehe 3.1.2). Beachtenswert ist dabei, daß dieser Effekt bei pH 8,0 schon bei relativ geringen Azid-Konzentrationen sehr groß ist. Dies widerspricht zunächst der These, daß Azid als Protonendonor fungiert, da dieses bei dem betrachteten pH-Wert praktisch ausschließlich in Form des Azid-Ions N₃⁻ vorliegt (pK (Azid) = 4,7). Eine Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Azid-Effektes (siehe ebenfalls 3.1.2) zeigt jedoch eine signifikante Verstärkung des beobachteten Effektes auf die Photozykluskinetik. Der über diese Messungen ermittelte pK-Wert des Azid liegt unter fünf, also im Bereich des pK-Wertes im wässrigen Medium. Es ergibt sich, daß HN₃ also tatsächlich auch als Protonendonor wirkt. Offensichtlich ist aber der Wirkungsmechanismus relativ komplex und das Azid wirkt nicht allein, wie bisher vermutet, als Protonendonor für die Schiff-Base. Weitergehende Untersuchungen, insbesondere die Kristallisierung von NpSR_{II} in Gegenwart von Azid, sollten helfen können, aufzuklären in welcher Weise dieses Molekül mit den am Protonentransport beteiligten Aminosäuren wechselwirkt.

4.2 Mechanismus der Signal-Bildung im Rezeptor

In vorhergehenden Arbeiten wurde gezeigt, daß durch die Bewegung der Helix F der signalgebende Zustand erreicht wird (Wegener *et al.*, 2001a, b). Die mittels zeitaufgelöster ESR-Spektroskopie ermittelten Kinetiken der Auswärts- bzw. Rückbewegung (Abb. 3.3.3) erlauben eine Reihe von Schlußfolgerungen bezüglich des zugrundeliegenden Mechanismus.

Die Halbwertszeit der Auswärtsbewegung ($\sim 3\text{-}4$ ms) korrespondiert nicht mit der M_1 -Bildung (~ 10 μs), d.h. der Deprotonierung der SB. Vielmehr läßt sich der zeitliche Verlauf dieses Prozesses gut mit dem Übergang $M_1 \rightarrow M_2$ (~ 2 ms, (Chizhov *et al.*, 1998)) korrelieren. In BR wurde er Bewegungen des Retinal-Chromophors und/oder Konformationsänderungen des Proteins zugeschrieben (Váró & Lanyi, 1990). Der zeitliche Verlauf der Rückbewegung der F-Helix erfolgt mit der Wiederherstellung des Grundzustandes, d.h. dem O-Zerfall. Auch hier läßt sich feststellen, daß die Umkehr der Konformationsänderung nicht vom Protonierungszustand der SB bestimmt wird, da in diesem Falle die Rückbewegung der Rezeptor-Helix zeitlich mit dem M-Zerfall einhergehen müsste.

Daraus ergibt sich eine entscheidende Schlußfolgerung für den Mechanismus der Bildung/Rückbildung des signalgebenden Zustandes: Die für den Signalprozeß verantwortlichen Konformationsänderungen in NpSR_{II} sind unabhängig von den Deprotonierungs-/Protonierungsvorgängen an der SB.

Doch welche Prozesse sind nun tatsächlich für die beobachtete Bewegung der Helix F verantwortlich? Schmies *et al.* (2000b) schlagen vor, daß der Protonierungszustand von Asp-75 mitverantwortlich für die Bildung des Signalzustandes ist, da Asp-75 auch im O-Zustand noch protoniert vorliegt, die Deprotonierung also erst mit der Rückbildung des Grundzustandes erfolgt. Demgegenüber steht die Beobachtung, daß Asp-75 schon bei der Bildung des M-Intermediates von der SB protoniert wird. Eine Neutralisierung der Salzbrücke SB - Asp-75 scheidet dadurch zumindest als direkte Ursache für die Helix F-Bewegung ebenfalls aus.

Die zeitaufgelöste ESR-Spektroskopie (siehe 3.3.2) an der NpSR_{II}-Mutante D75N zeigt tatsächlich deutliche Hinweise, daß trotz dieser Mutation eine, wenn auch schwache, transiente Auswärtsbewegung der Helix F erfolgt. Zwar zeigen die ESR-Messungen anhand der stark verringerten Mobilität der Spin-Sonde zugleich, daß Asp-75 einen erheblichen Einfluß auf die Konformation der F-Helix hat, andererseits läßt das wahrscheinliche Vorhandensein einer lichtinduzierten transienten Konformationsänderung darauf schließen, daß der Protonierungszustand dieser Seitenkette nicht der auslösende Faktor für die Bildung des

signalgebenden Zustandes ist. Konsistenterweise erhält man dasselbe Ergebnis für wt-NpSRII in der aziden Form ($\text{pH} = 3$), d.h. wenn Asp-75 schon im Grundzustand protoniert ist. Ein wichtiges physiologisches Ergebnis stützt diese Hypothese: demnach ist NpSRII-D75N in *H. salinarum* in der Lage, eine photophobe Antwort auf blaues Licht zu erzeugen (Jung, K.-H., persönliche Mitteilung).

Aus diesen Überlegungen muß gefolgert werden, daß allein eine Sequenz Protein-interner Konformationsänderungen, ausgelöst durch die photochemische Aktivierung des Retinal-Chromophors, für die Bildung und den Zerfall des aktiven Zustandes verantwortlich ist. Diese Hypothese soll im Folgenden als SCC-Modell (Sequenz of Conformational Changes) der Signalgenerierung im Photorezeptor NpSRII bezeichnet werden.

Wenn Konformationsänderungen des Proteins und nicht Protonentransfer-Reaktionen ausschlaggebend für die Etablierung des signalgebenden Zustandes sind, sollten sich diese konformationellen Änderungen schon in den frühen Intermediaten des Photozyklus, also vor der Deprotonierung der SB als initialem Schritt des Protonen-Transfers, andeuten. Tatsächlich finden sich in der kürzlich aufgeklärten Struktur des K-Intermediates von NpSRII (Edman *et al.*, 2002) entsprechende Hinweise. Es zeigen sich Konformationsänderungen in der Nähe des Chromophors und eine Verschiebung des β -Ionon-Ringes sowie der 9- und 13-Methyl-Gruppen in Richtung der Seitenkette Trp-171. Diese Seitenkette steht in einer Wasser-vermittelten Wechselwirkung mit Thr-204 (siehe Abb. 4.2.1). Pebay-Peyroula *et al.* (2002) vermuteten bereits auf Grundlage der Struktur des NpSRII im Grundzustand, daß sich die beiden erwähnten Methyl-Gruppen des Retinals bedingt durch dessen Isomerisierung und Konformationsänderungen der Retinal-Bindungstasche in Richtung Trp-171 bewegen. Sie sagen voraus, daß diese Seitenkette der F-Helix dadurch in Richtung Zytoplasma verschoben und als Folge die Wasserstoffbrückenbindung mit Thr-204 unterbrochen wird. Das Lösen dieser Wechselwirkung zwischen den Helizes F und

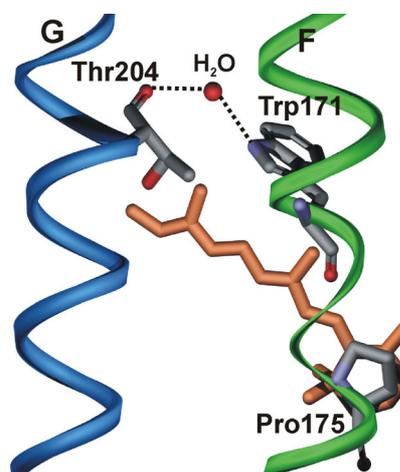


Abb. 4.2.1 Ausschnitt der Retinal-Bindungstasche des NpSRII. Gezeigt ist die H_2O -vermittelte Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thr204 und Trp171. Bei Pro-175 knickt die F-Helix leicht ab.

G und die Verschiebung der Tryptophan-Seitenkette könnte der initiale Schritt der Helix F-Bewegung, d.h. der Bildung des aktiven Zustandes, sein. Ein weiterer Beleg für diese

Hypothese ist, daß ein solcher „sterischer Trigger“ auch für das SRI aus *H. salinarum* nachgewiesen werden konnte (Yan *et al.*, 1991). Die 13-Methyl-Gruppe des Retinal im SRI ist für eine Aktivierung des Rezeptors notwendig, *all-trans*-13-desmethyl-SRI hat keine physiologische Aktivität. Demgegenüber zeigt 13-desmethyl-BR uneingeschränkte Funktionalität. Yan *et al.* erklären damit, wie die sensorischen Rhodopsine bzw. das BR von der Natur modifiziert wurden, um ihre spezifische Funktion zu erfüllen.

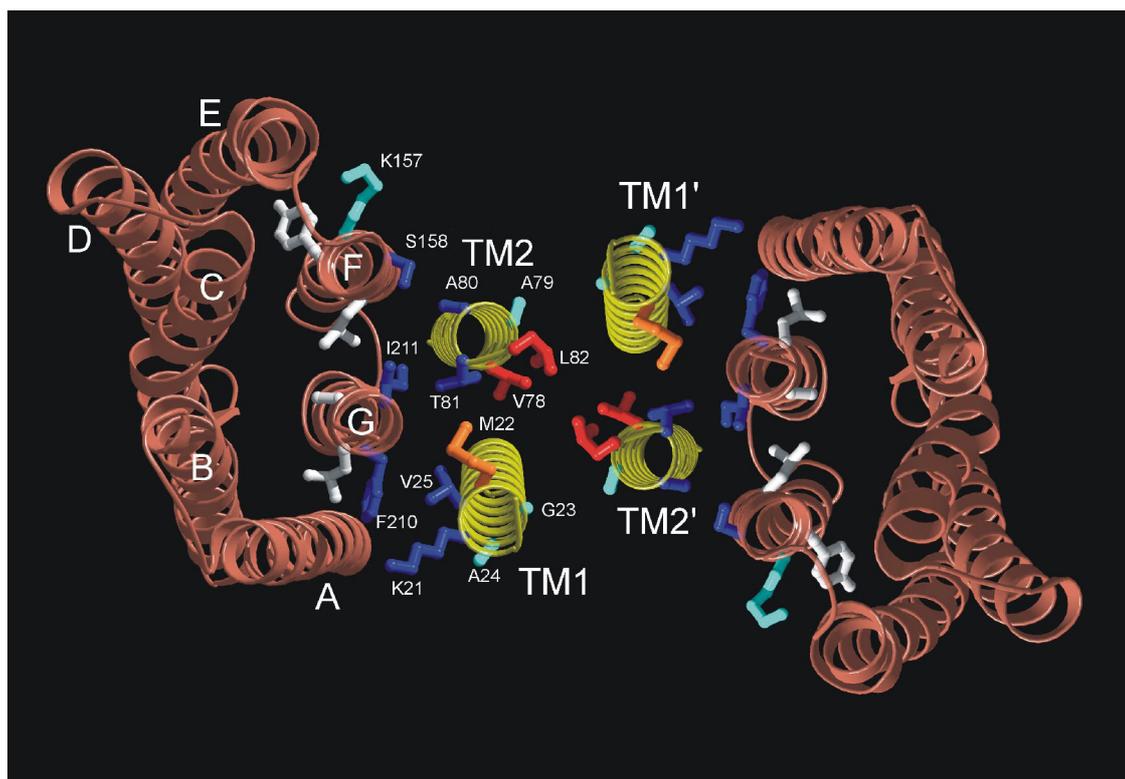
Eine Überprüfung dieser These könnte die Analyse hochaufgelöster Kristallstrukturen weiterer Photozyklus-Intermediate des NpSR_{II} ermöglichen.

4.3 Aufbau des Rezeptor/Transducer-Komplexes

Auf der Grundlage umfangreicher ESR-spektroskopischer Untersuchungen konnte Wegener (2000) bereits ein plausibles Modell der Organisation des 2:2 Komplexes entwerfen. Aufgrund fehlender Daten für die Transducer-Helix TM 1 konnte deren Position in diesem Modell bislang jedoch lediglich anhand sterischer Aspekte abgeschätzt werden. Mit den in dieser Arbeit ergänzend dazu vorgenommenen ESR-Untersuchungen an der TM 1 (siehe 3.2.3 und 3.2.5) läßt sich ein genaueres Modell des NpSRII/NpHtrII-Komplexes bezüglich der relativen Anordnung der Transducer-Helizes entwerfen (Wegener *et al.*, 2001b).

Betrachtet man die Wechselwirkungen der Transducer-Mutanten 21 bis 25 mit den NpSRII-Mutanten 158 (Helix F) oder 210 (Helix G) (siehe 3.2.3), zeigen sich ausnahmslos deutlich stärkere Wechselwirkungen zwischen der TM 1 und Helix G. Diese Daten stützen die Annahme, daß die TM 1 sich innerhalb des Komplexes in direkter Nachbarschaft zur Rezeptor-Helix G befindet. Die stärksten dipolaren Wechselwirkungen lassen sich für die Seitenketten 22 und 25 in Wechselwirkung mit der Helix G feststellen. Diese Daten sind in Einklang mit einer α -helikalen Struktur der TM 1 (siehe Abb. 3.2.3), bei der die durch die Aminosäuren Met-22 und Val-25 charakterisierte Flanke der Helix der Rezeptor-Helix G gegenüber liegt. Daraus ergibt sich eine Ausrichtung der TM 1, bei welcher die Position 22 zudem in Richtung der Rezeptor-Helix F weisen müßte. Tatsächlich findet sich für die Kombination Met-22/Ser-158 die stärkste dipolare Verbreiterung im cw-Spektrum (Abb. 3.2.4).

Betrachtet man weiterhin die entsprechenden Tieftemperatur-Spektren (siehe 3.2.5), bestätigt sich das bereits gewonnene Bild der Orientierung der TM 1. Mit Ausnahme der Position 22 (17 Å) liegen die Abstände aller Seitenketten im Transducer-Dimer außerhalb der methodischen Grenze von etwa 19 Å. Im Vergleich zur TM 2 sind TM 1 und TM 1' also deutlich weiter voneinander entfernt. Auch die bezüglich der Rezeptor-Helizes gemessenen Abstände bestätigen das durch die Raumtemperaturspektren gewonnene Bild. Die gemessenen Abstände sind zwischen der TM 1 und Helix G im Mittel deutlich geringer als zwischen der TM 1 und Helix F (siehe Tab. 3.2.1). Der geringste Abstand wird mit etwa 12 Å zwischen den Positionen Val-25 und Phe-210 beobachtet, während die Transducer-Mutante Gly-23 praktisch keine Wechselwirkung mit den Rezeptor-Helizes zeigt. Mit diesen Daten läßt sich ein recht genaues Bild der relativen Position der TM 1 im Komplex zeichnen, welches in Abbildung 4.3.1 wiedergegeben ist.



Wegener et al. (2001)

Abb. 4.3.1 Modell der transmembranen Region des 2:2-Komplexes von NpSRII mit seinem Transducer NpHtrII (Blick von der zytoplasmatischen Seite) auf Grundlage von ESR-Daten (Wegener *et al.*, 2001b). Das Modell basiert auf der Kristallstruktur des NpSRII von Luecke *et al.* (2001) (orange) und den als kanonischen α -Helizes modellierten transmembranen Transducer-Helizes (gelb). Die Orientierung der Transducer-Helizes orientiert sich an den von Wegener (2000) gewonnenen und den in dieser Arbeit ermittelten ESR-Daten. Die Farbmarkierung der dargestellten Seitenketten spiegelt die jeweilige Stärke der dipolaren Wechselwirkungen wieder. Starke Wechselwirkungen zwischen NpSRII und NpHtrII: blau; Starke WW innerhalb des Transducer-Dimers: rot. Schwache WW sind dementsprechend in hellblau bzw. orange dargestellt.

Das erhaltene Modell ist konsistent mit der prognostizierten Ähnlichkeit des Transducer-Dimers innerhalb des Komplexes mit der Organisation der transmembranen Helizes der bakteriellen Chemorezeptoren. Diese strukturelle Ähnlichkeit stützt damit die anhand von Sequenzvergleichen angestellte Vermutung, daß der Photo- und der Chemo-Taxis vergleichbare Mechanismen bezüglich der Signalübertragung an die zytoplasmatische Signaltransduktionskaskade zugrunde liegen.

Vergleicht man das ESR-Modell mit der erst kürzlich gelösten Kristallstruktur der transmembranen Region des NpSRII/NpHtrII-Komplexes (siehe Abb. 4.3.2, Abb. 3.4.1), zeigt sich eine erstaunlich gute Übereinstimmung. Insbesondere die Orientierung der Seitenketten der Transducer-Helix TM 2 konnte durch die Umsetzung der ESR-Daten in ein Struktur-Modell teilweise gut angenähert werden.

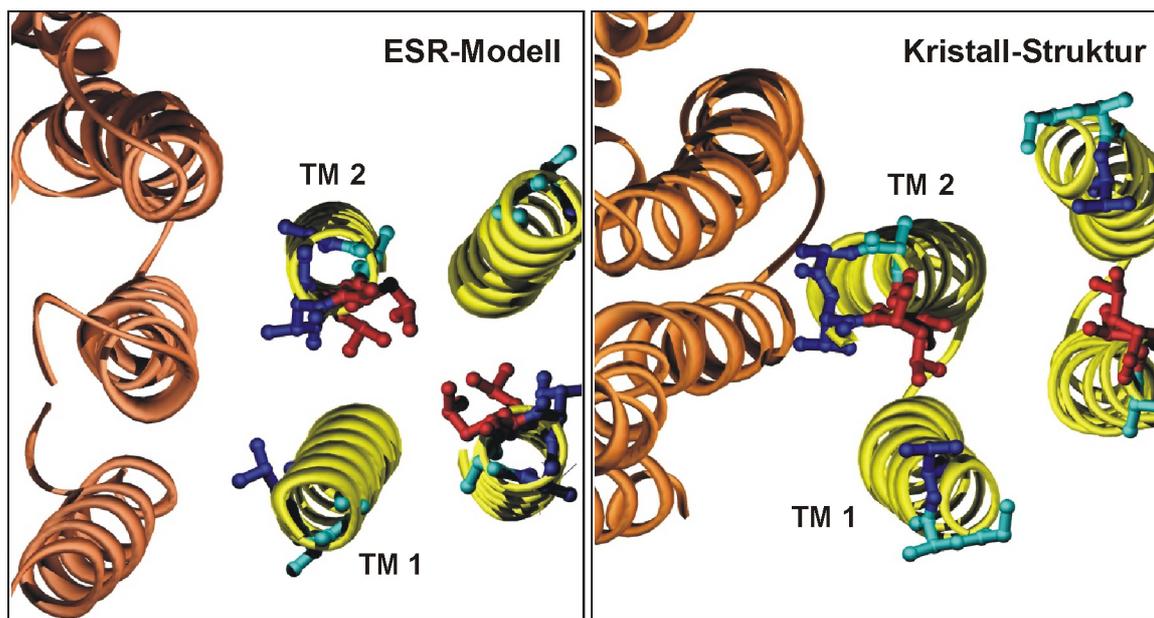


Abb. 4.3.2 Vergleich des aus ESR-Daten gewonnenen Struktur-Modells (links) des NpSRII/NpHtrII-Komplexes mit der Kristall-Struktur (rechts). Als repräsentativer Ausschnitt wurde der Bereich der Interaktion zwischen Rezeptor und Transducer bzw. Transducer und Transducer' gewählt. Blick vom Zytoplasma. Die Farbkodierung der Seitenketten ist konsistent mit Abbildung 4.3.1.

Da nur der zytoplasmatische Bereich des Komplexes ESR-spektroskopisch untersucht wurde, zeigen sich deutliche Abweichungen des ESR-Modells von der Kristall-Struktur bezüglich der Orientierung des Rezeptors zum Transducer-Dimer und bezogen auf die relative Anordnung der transmembranen Helizes der beiden Transducer-Moleküle.

Entgegen der im ESR-Modell getroffenen Annahme, daß der Rezeptor im Komplex parallel zu den Transducer-Helizes angeordnet ist, erkennt man in der Kristall-Struktur (vgl. auch Abb. 3.4.2) eine recht deutlich von der Membrannormalen abweichende Orientierung des Rezeptors. Desweiteren zeigt sich eine deutliche Biegung der TM 2 auf der zytoplasmatischen Seite zum Rezeptor hin, bzw. im Falle der TM 1 vom Rezeptor weg.

Die Kristallstruktur zeigt eine Extension der transmembranen Helizes TM 1 und TM 2 des Transducers um etwa drei Helix-Turns über die extrazelluläre Seite der Membran hinaus. Sequenzvergleichen zufolge (Zhang *et al.*, 1996b) ist dieser Bereich in HtrI aus *H. salinarum* nicht vorhanden, findet sich allerdings am N-terminalen Ende der TM 2 des HtrII aus demselben Organismus und ist dort Bestandteil der Serin-Bindungsdomäne. Vergleiche mit den homologen eubakteriellen Aspartat-Rezeptoren (Yeh *et al.*, 1996) zeigen auch dort zwei Helizes ($\alpha 4$ und $\alpha 4'$), welche über die eigentliche Bindungsdomäne hinaus verlängert ein vergleichbares Strukturelement formen.

Aus diesen Beobachtungen lassen sich Rückschlüsse auf die evolutionäre Entwicklung der archaebakteriellen Phototransducer bzw. Photorezeptoren ziehen. Die Evolution der vier

archaeobakteriellen Rhodopsine wurde von Ihara *et al.* (1999) durch zwei Gen-Duplikations-Schritte erklärt. Demzufolge entstanden im ersten Schritt aus dem „ersten“ archaeobakteriellen Rhodopsin der Vorläufer der „pumpenden“ Rhodopsine BR und HR auf der einen Seite und der Vorläufer der sensorischen Rhodopsine auf der anderen Seite. In dem jeweils zweiten Duplikations-Schritt vollzog sich dann die Differenzierung zwischen BR und HR bzw. SRI und SRII. Diesem Schema zufolge hätte dann der nach dem ersten Duplikations-Schritt entstandene Proto-Photorezeptor ein Proto-Chemorezeptor-Gen „acquiriert“, um einen entsprechend funktionellen Komplex zu bilden. Die Liganden-Bindungsdomäne, für die Funktion als Phototransducer nicht mehr notwendig, wurde dann im Laufe der Evolution ganz (HsHtrI) oder teilweise (NpHtrII) durch Deletion aus dem Transducer-Gen entfernt, während im Falle des HsHtrII diese Domäne, und damit auch die gleichzeitige Funktion als Chemorezeptor, erhalten blieb.

Eine weitere erwähnenswerte Eigenschaft des Komplexes ist die von den Helizes A, G, TM 1 und TM 2 begrenzte „Lücke“ (siehe 3.4). Fragmentierte Elektronendichte in diesem Bereich (Daten nicht gezeigt) sowie die relative Hydrophobizität im Bereich der Aminosäuren 1-10 des Transducers (siehe Abb. 3.2.2) deuten an, daß sich der, in der Kristallstruktur nicht aufgelöste, N-Terminus des NpHtrII hier in die Membran zurückfalten könnte.

Die Röntgenstrukturanalyse konnte den auf die TM 2 folgenden C-terminalen Bereich des Transducer-Moleküls nicht auflösen. Allerdings sind Kenntnisse über die strukturellen Eigenschaften dieses Bereiches von entscheidender Bedeutung für das Verständnis des Signalweiterleitungsmechanismus innerhalb des Transducer-Dimers. Um Informationen über die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur dieser Region zu erhalten, kann auf ESR-Daten über die Positionen 83-95, eine Analyse der Primärstruktur und Sequenzvergleiche mit den bakteriellen MCP's zurückgegriffen werden. Damit ist es möglich, ein Bild von den wahrscheinlichen strukturellen Eigenschaften des direkt an die TM 2 anschließenden Bereiches zu zeichnen.

Die Analyse der Seitenketten-Mobilitäten in diesem Bereich (siehe Abb. 3.2.6) zeigt, daß der Bereich bis einschließlich Position 91 in Kontakt mit anderen Proteinstrukturen oder der Lipid-Doppelschicht steht. Ab Position 92 gehen diese Wechselwirkungen verloren, woraus folgt, daß sich dieser Bereich von der Membran weg hinein in das Zytoplasma orientiert.

Ein genaueres Bild erhält man bei Betrachtung der Zugänglichkeiten für molekularen Sauerstoff bzw. Chromoxalat (siehe Abb. 3.2.7, 3.2.8). Aus dem Verlaufsmuster der Zugänglichkeiten kann man schließen, daß sich die α -helikale Struktur der TM 2 bis einschließlich Position 84 oder 85 fortsetzt. Der nachfolgende Bereich bis zur Position 87 läßt hingegen kein eindeutiges Muster erkennen. Wegener (2001) sagte für diesen Bereich eine Turn-Struktur voraus, an die sich die amphipatische Helix AS 1 (88-101) anschließt. Tatsächlich beobachtet man ab Position

88 wieder ein periodisches Muster der Zugänglichkeiten, welches sich jedoch nicht mit einer klassischen α -helikalen Struktur in Einklang bringen läßt. Isoliert betrachtet zeigen die Bereiche 88-91 und 92-95 eine für eine α -Helix typische Periode von 4. Von Position 91 zu 92 steigt die Zugänglichkeit für Chromoxalat allerdings sprunghaft an und durchbricht die Periodizität. Dieses Verhalten ist vermutlich auf den in diesem Bereich stattfindenden Übergang von der Membran zum Zytoplasma zurückzuführen. Die bereits auf Grundlage der Mobilitäten angestellte Vermutung, daß sich dieser Bereich in Richtung Zytoplasma orientiert, findet somit, insbesondere bei Betrachtung des „Phasendiagramms“ (Abb. 3.2.9), anhand der Zugänglichkeiten Bestätigung.

Weitere Informationen bezüglich der relativen Orientierung der amphiphatischen Helix 1 erhält man aus den Abstandsbestimmungen mittels Tieftemperatur-ESR (siehe 3.2.5). Die Distanzmessungen zwischen den ersten vier Seitenketten (Ala-88 bis Ser-91), d.h. der ersten putativen Helix-Windung, und Lys-157 auf der Rezeptor-Helix F ergaben Abstände von 13 -18 Å, was darauf hin deutet, daß sich diese Helix in relativer Nähe zur Helix F bzw. zum E-F-Loop-Bereich des NpSRII befindet.

Das sich die beobachteten Abstände tendenziell mit fortlaufender Sequenz erhöhen (14 Å \rightarrow 13 Å \rightarrow 15 Å \rightarrow 18 Å) läßt sich durch eine Orientierung der Helizes erklären, wie sie schematisch in Abbildung 4.3.3 wiedergegeben ist.

Die Zugänglichkeitsdaten deuten dabei darauf hin, daß die AS 1 nicht parallel zur Membran angeordnet ist, sondern sich mit aufsteigender Sequenz von dieser entfernt. Dieses Modell berücksichtigt zudem Bindungsstudien an dem Komplex, laut denen im solubilisierten Zustand (1:1-Komplex) der, sich der AS 1 anschließende, Sequenzbereich 102-114 eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor eingeht (S. Mreyen, pers. Mitteilung). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit

elektrophysiologischen Daten, die zeigen, daß dieser Sequenzbereich für eine Inhibierung der Protonenpump-Aktivität des NpSRII im Komplex verantwortlich ist (Schmies, 2000). In der Abbildung ist die Sequenz des Bereiches 102-114 angegeben. Der Vergleich mit den

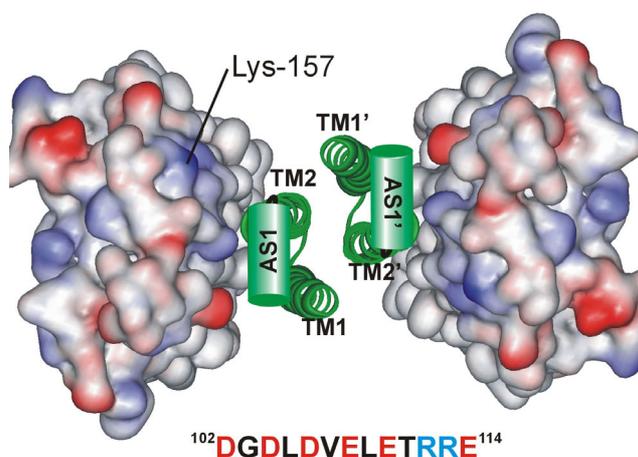


Abb. 4.3.3 Dreidimensionales Modell bezüglich der vermutlichen Position und Orientierung der AS 1 (Pos. 88-101) auf Grundlage der Kristallstruktur und ESR-Daten. Darstellung des NpSRII als Oberflächenmodell. Die Transducer-Helizes sind entsprechend gekennzeichnet.

Oberflächenladungen des Rezeptors zeigt, daß die negativ geladenen Aspartat- und Glutamat-Seitenketten des Transducers in diesem Bereich mit einer ganzen Reihe positiv geladener Arginin-Seitenketten des Rezeptors (Positionen 27, 35, 152, 162 und 164) Wechselwirkungen eingehen können.

Aus der Sequenzanalyse (siehe 3.2.1) ergibt sich, daß sich an die AS 1 und den folgenden Linker- bzw. Turn-Bereich bis Position 116 die, laut Sekundärstrukturvorhersagen ebenfalls helikale, amphiphatische Sequenz AS 2 (Positionen 117-131) anschließt. Aufgrund des sehr langen Bereiches zwischen den beiden putativen Helizes können jedoch ohne weitergehende Untersuchungen mittels ESR-Spektroskopie oder röntgenkristallographischer Methoden keine zuverlässigen Aussagen über deren relative Anordnung getroffen werden.

Die zur Sekundärstrukturvorhersage verwendeten Algorithmen geben für den Zwischenbereich keine eindeutigen Aussagen und die bereits erwähnten Bindungsstudien erlauben bislang keine Rückschlüsse auf die genaue Art der Wechselwirkung mit dem Rezeptor. Betrachtet man allerdings die Sequenzanalyse der AS 2 und des nachfolgenden Bereiches (siehe 3.2.1), ergibt sich ein recht deutliches Bild des möglichen Aufbaus des Transducer-Dimers. Ab Position 124, d.h. etwa in der Mitte der AS 2 etabliert sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ein etwa 13-14 Helix-Windungen (Positionen 124-173) langes paralleles „Coiled-coil“-Motiv, in dem die beiden Transducer-Moleküle in engem Kontakt zueinander stehen könnten. Diesem folgt laut Sekundärstrukturvorhersagen ein etwa 10 Reste umfassender ungeordneter Bereich, der dann wiederum in eine helikale Struktur übergeht. Ab Position 216, d.h. nach etwa 8 Helix-Windungen, findet sich dann ein für anti-parallele „coiled-coils“ typisches Heptaden-Motiv (LeMoual und Koshland, 1996). Hier geht die Struktur offensichtlich in das für die Chemorezeptoren typische Vier-Helix-Bündel über, für welches bereits Strukturdaten zur Verfügung stehen. Abbildung 4.3.4 zeigt die von Kim *et al.* (1999) gelöste Kristallstruktur des C-terminalen Teils der zytoplasmatischen Domäne des Serin-Chemorezeptors Tsr aus *E. coli*. In dem mit **M** bezeichneten Bereich befinden sich die Methylierungsstellen, der mit **S** markierte

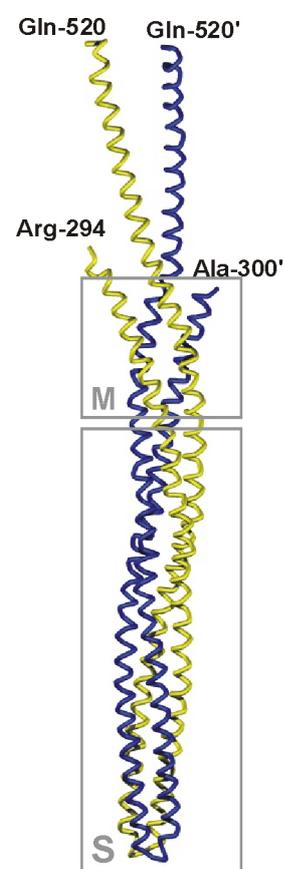


Abb. 4.3.4 Kristallstruktur des zytoplasmatischen Bereichs des Serin-Chemorezeptors Tsr (Kim *et al.* 1999). Die grauen Umrundungen kennzeichnen den Bereich der Methylierungen bzw. die Signaldomäne.

terminalen Teils der zytoplasmatischen Domäne des Serin-Chemorezeptors Tsr aus *E. coli*. In dem mit **M** bezeichneten Bereich befinden sich die Methylierungsstellen, der mit **S** markierte

Bereich wird üblicherweise als Signal-Domäne bezeichnet. Dort werden die Proteine CheA und CheW der Signaltransduktionskaskade gebunden. Die angegebenen, begrenzenden Aminosäuren im Serin-Chemorezeptor haben laut des Sequenzalignment (siehe 3.2.1) folgende Entsprechungen im NpHtrII: Arg-294^{Tsr} - Ala-250^{NpHtrII}, Ala-300^{Tsr} - Glu-256^{NpHtrII} und Gln-520^{Tsr} - Lys-490^{NpHtrII}. Auf Grundlage der vorhandenen Daten und Sequenzvergleiche läßt sich ein detaillierteres Modell des Aufbaus eines NpHtrII-Dimers entwerfen, welches in Abbildung 4.3.5 schematisch dargestellt ist.

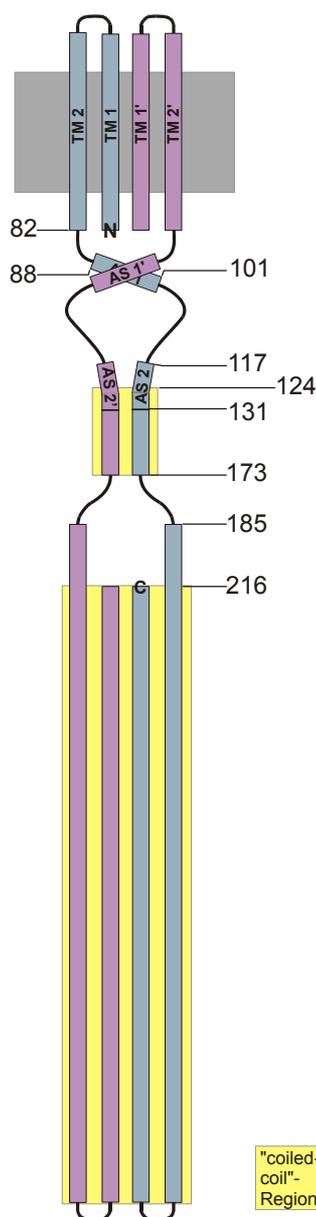


Abb. 4.3.5 Schematisches Modell des NpHtrII-Dimers auf Grundlage der vorhandenen Strukturdaten sowie der aus Sequenz-Analysen und -Vergleichen gezogenen Schlußfolgerungen. Regionen, in denen die Helizes eine „coiled-coil“-Struktur aufweisen, sind gelb unterlegt. Angegeben sind die jeweils vorhergesagten Begrenzungen der entsprechenden Strukturelemente.

Im Vergleich mit den Chemorezeptoren (Vergleiche Abbildung 1.3) würden die archaebakteriellen Phototransducer demnach also als „Einschub“ über eine zusätzliche „coiled-coil“-Struktur (124-173) sowie eine N-terminale Verlängerung der dem Vier-Helix-Bündel vorausgehenden α -Helizes (185-223) verfügen.

4.4 Signaltransduktion innerhalb des Rezeptor/Transducer-Komplexes

Auf der Grundlage ESR-spektroskopischer Daten konnten Wegener *et al.* (2001b) einen möglichen Mechanismus für die Signalübertragung vom Rezeptor zu den transmembranen Helizes des Transducers vorschlagen. Betrachtet wurden die lichtinduzierten Abstandsveränderungen markierter Seitenketten auf der TM 2, welche direkt zwischen TM 2 und TM 2' lokalisiert sind (V78R1 und L82R1). Die von Wegener gefundenen Abstandsveränderungen lassen sich dabei bei genauer Betrachtung ausschließlich mit einer Rotationsbewegung der TM 2 in Einklang bringen wie sie in Abbildung 4.4.1 schematisch

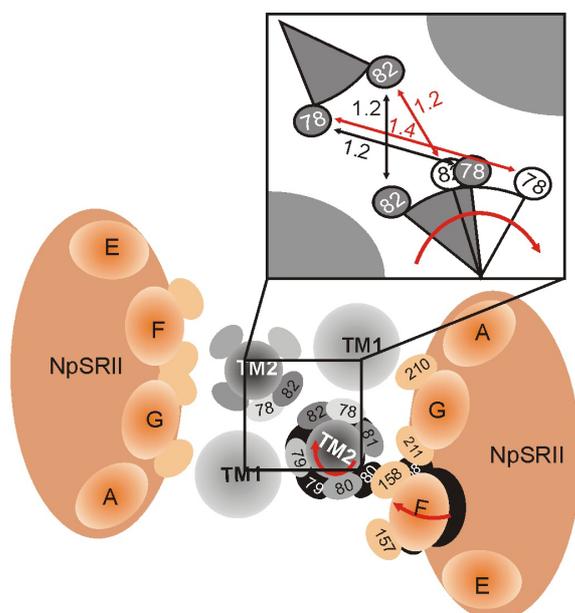


Abb 4.4.1 Schematische Darstellung der lichtinduzierten Konformationsänderungen im 2:2 Komplex von NpSRII mit NpHtrII nach Wegener *et al.* (2001b). Sicht von der zytoplasmatischen Seite. Rote Richtungspfeile kennzeichnen Konformationsänderungen. In der Ausschnittvergrößerung bezeichnen die Zahlen an den Pfeilen den Abstand zwischen den Seitenketten vor (schwarz) und nach der Lichtanregung (rot).

Wegener *et al.* (2001)

dargestellt ist. Eine zusätzliche geringfügige Verschiebung der Helix parallel zur Membran-Normalen kann allerdings auf Grundlage dieser Daten nicht ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen zusätzlich, daß TM 1 selbst keine signifikanten lichtinduzierten Konformationsänderungen erfährt. Damit scheint diese Transducer-Helix, ebenso wie die Helix G des NpSRII als Fixpunkt in dem stattfindenden Signaltransduktionsprozeß zu fungieren.

Vergleicht man dieses Modell der Signal-Übertragung vom Rezeptor zum Transducer mit den entsprechenden Modellen für die homologen Chemorezeptoren (Übersichtsartikel: Falke und Hazelbauer, 2001), scheint zunächst, trotz der auffälligen Homologie der Proteine, der Phototaxis ein anderer Aktivierungsmechanismus zugrunde zu liegen. Eine Rotationsbewegung der transmembranen Helix wird bei den Chemorezeptoren zwar nicht grundsätzlich

ausgeschlossen, wesentliches Merkmal des Signaltransduktionsprozesses scheint jedoch eine Translation der TM in Richtung des Zytoplasmas zu sein. Experimente von Jung *et al.* (2001) mit NpHtrII-Tsr bzw. -Tar-Chimären zeigen jedoch, daß das im transmembranen Bereich des Phototransducers generierte Signal geeignet ist, den zytoplasmatischen Teil eines Chemorezeptors funktionell zu modulieren. Wichtig in diesem Zusammenhang ist dabei, daß dabei mindestens die ersten 102 Aminosäuren des Phototransducers vorhanden sein müssen. Die amphiphatische Helix AS 1 ist also offensichtlich wesentlich mitverantwortlich für die Generierung des Signals.

Unter Beachtung dieses Gesichtspunktes muß demnach ein einheitlicher Mechanismus für die Photo- und die Chemo-Taxis existieren. Somit erscheint das Vorhandensein einer Translationsbewegung der TM auch in den Phototransducern geradezu zwingend zu sein.

Betrachtet man die Kristallstruktur des Komplexes im Hinblick auf die Signalübertragung Rezeptor → Transducer finden sich tatsächlich eindeutige Argumente für eine, aller Wahrscheinlichkeit nach mit einer Translation im oben genannten Sinne kombinierte, Rotationsbewegung der TM 2. Aus der raumfüllenden Darstellung der Helizes F und TM 2 in Abb. 4.4.2 läßt sich deutlich entnehmen, daß eine Auswärtsbewegung der Rezeptor-Helix in der angegebenen Richtung (breiter grauer Pfeil) eine Rotationsbewegung der TM 2 ähnlich der durch den anderen Pfeil gekennzeichneten induzieren muß.

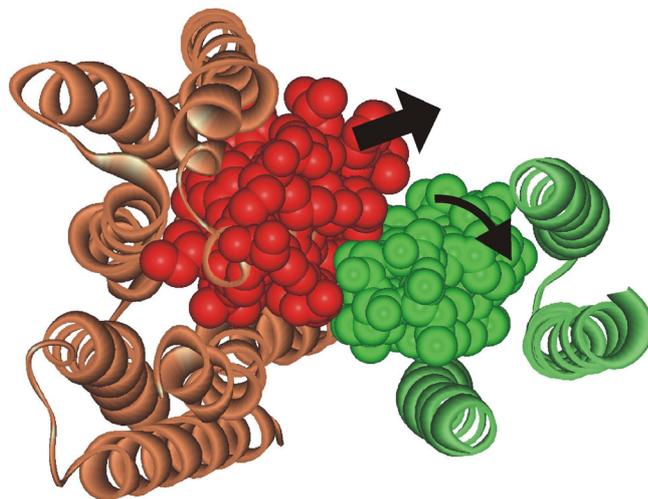


Abb. 4.4.2 Ausschnitt der Kristallstruktur des Rezeptor (rot)/Transducer (grün)-Komplexes mit Sicht von der zytoplasmatischen Seite. Für die Rezeptor-Helix F sowie die Transducer-Helix TM 2 wurde eine raumfüllende Darstellung gewählt (Kugelradius = van der Waals-Radius) um den engen Kontakt zwischen diesen beiden Helizes zu verdeutlichen. Die grauen Pfeile geben die vorgeschlagenen Bewegungsrichtungen der Helizes bei Lichtanregung an.

Zieht man die beiden Wasserstoffbrücken zwischen Helix G und TM 2 in Betracht (siehe 3.4), könnte bei Erhaltung dieser Bindungen die Rotationsachse alternativ auch auf der Verbindungslinie zwischen diesen beiden Helizes zu finden sein.

Bezüglich der möglichen Translationsbewegung läßt die Kristallstruktur weitergehende Rückschlüsse zu. Demnach verhindern im Grundzustand zahlreiche Interkalationen (nicht gezeigt) zwischen Seitenketten der Helizes F, G und TM 1 mit denen der TM 2 eine direkte Kolbenhub-Bewegung dieser Helix. Durch die angesprochene Rotationsbewegung der Helix könnten diese Interkalationen aufgehoben werden und somit eine zusätzliche Verschiebung der TM 2 in Richtung Zytoplasma erlauben. Um diesen Punkt eingehender untersuchen zu können, wird im folgenden ein Modell des signalgebenden Zustandes auf der Grundlage der Kristallstruktur, der ESR-Daten und der von den Chemorezeptoren übernommenen Translationsbewegung entwickelt.

Abbildung 4.4.3 zeigt die Superposition der Kristallstruktur des Grundzustandes für die Helizes F, G und TM 2 mit dem Modell des signalgebenden Zustandes. Die Helix F wurde dabei in Analogie zum BR an deren zytoplasmatischem Ende um $1,5 \text{ \AA}$ herausgeklappt, wobei Pro-175 als „Scharnier“ gewählt wurde. Eine solche Bewegung ist mit den entsprechenden ESR-Daten konsistent. Die Transducer-Helix wurde, ebenfalls entsprechend den ESR-Daten, um etwa 20° im Uhrzeigersinn gedreht. In Analogie zu den von den Chemorezeptoren her bekannten Daten wurde die TM 2 zugleich um etwa $1,5 \text{ \AA}$ in Richtung Zytoplasma verschoben.

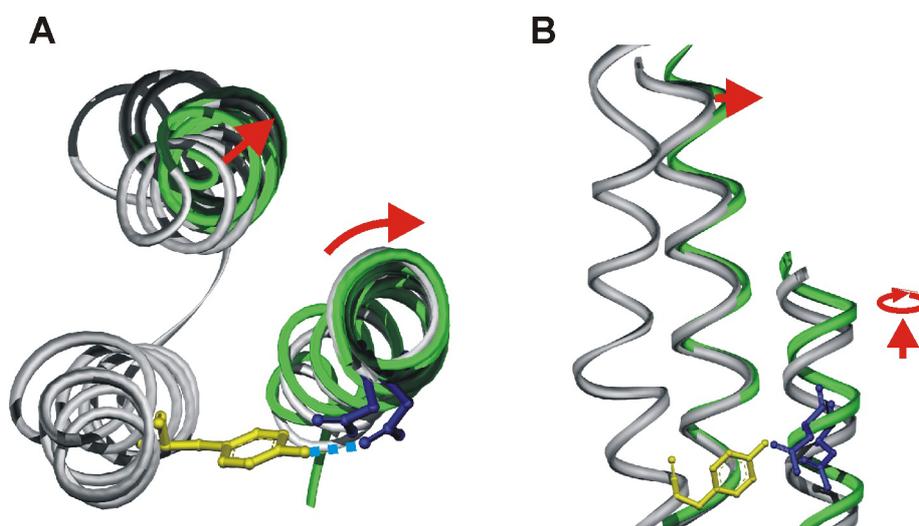


Abb. 4.4.3 Modell des signalgebenden Zustandes des NpSRII/HtrII-Komplexes. Als Ausschnitt wurden die beteiligten Helizes F, G und TM 2 gewählt. Die Struktur des Grundzustandes (grau) ist mit dem Modell des angeregten Zustandes (grün bzw. blau) überlagert. (A) zeigt die Sicht von der zytoplasmatischen Seite, (B) ist die entsprechende Seitenansicht, bei der die zytoplasmatische Seite oben liegt. Die roten Pfeile geben die entsprechenden Bewegungsrichtungen der Helizes an.

Tatsächlich zeigt sich bei genauer Betrachtung dieses Modells, daß es zu keinen nennenswerten Konflikten zwischen den Seitenketten der beteiligten Helizes kommt (nicht gezeigt). Damit erscheint die zusätzliche Translationsbewegung nicht nur wahrscheinlich, sondern eine direkte Konsequenz der Rotationsbewegung zu sein.

Doch wie läßt sich erklären, daß diese Translation im Falle der Chemorezeptoren zu einer positiven Antwort, d.h. einer Herabsetzung der CheA-Aktivität, beim NpHtrII jedoch zu einer negativen, photophoben Antwort, also einer Erhöhung der Aktivität des CheA führt?

Bei von Jung *et al.* (2001) durchgeführten Experimenten mit NpHtrII-Tar bzw. Tsr-Chimären beobachtet man bei bestimmten Konstrukten (NpHtrII(1-125)+Tar(297-Ende)) eine photophile Antwort auf die Photoaktivierung des gebundenen NpSRII. Demgegenüber zeigen Chimären aus der zytoplasmatischen Domäne des HtrI und dem transmembranen Teil des HtrII im Komplex mit NpSRII die normale photophobe Antwort in *H. salinarum* (Zhang *et al.*, 1999). Folglich könnten bestimmte Abschnitte des Transducers, vornehmlich der für archaebakterielle Transducerproteine typische „Einschub“, das von der TM 2 kommende Signal entsprechend modulieren und so das „Vorzeichen“ der Antwort bestimmen. Ebenfalls in Betracht gezogen werden kann die in den Chemorezeptoren nicht in vergleichbarem Umfang vorhandene Rotationsbewegung der Transducer-Helix.

Betrachtet man schließlich die Kinetik der Bildung bzw. Rückbildung des angeregten Zustandes (siehe Abschnitte 3.3.2 und 3.3.3), ergibt sich ein klares Bild der bei der Photoaktivierung des Komplexes ablaufenden Vorgänge. Die Bewegung der TM 2 erfolgt erwartungsgemäß synchron mit der Ausklappbewegung der F-Helix. Der relativ enge Kontakt zwischen diesen beiden Helizes im Grundzustand würde eine verzögerte Bewegung der Transducer-Helix nicht erlauben. Die Rückbewegung der Rezeptor-Helix hingegen hat keinen direkten Einfluß auf die Konformation der Transducer-Helix. Befindet sich das NpSRII wieder im Grundzustand ist die TM 2 sozusagen „frei“ und kann im Sinne einer Gleichgewichtseinstellung wieder in den eigenen Grundzustand relaxieren. Dementsprechend läßt sich für diesen Vorgang eine zeitliche Verzögerung gegenüber der Helix F-Rückbewegung beobachten. Der relativ große Zeitunterschied von mehreren 100 ms (bezogen auf die Halbwertszeiten), d.h. die relativ langsame Relaxation, weist zusätzlich darauf hin, daß die Konformationsänderungen komplexer sein müssen, als dies bei einer einfachen Rotation der Fall wäre. Eine Schraubenbewegung, bei der sich Seitenketten „aneinander vorbei“ bewegen und Interkalationen, also van der Waals-Wechselwirkungen, aufgehoben und in anderer Form neu aufgebaut werden, erscheint dabei in Zusammenhang mit den übrigen Daten als plausibelste Möglichkeit. Möglicherweise hat die auf

diese Weise hervorgerufene Entkopplung eine physiologische Bedeutung, indem sie den aktivierten Zustand des Transducers lange genug aufrecht erhält, um dieses Signal an die Histidin-Kinase des Signaltransduktions-Systems übertragen zu können.

Ein Modell für den Mechanismus der Signalweiterleitung innerhalb des Transducer-Moleküls zu der etwa 250 Å entfernten Signal-Domäne kann anhand der in dieser Arbeit angestellten Untersuchungen und jüngsten Forschungsergebnissen auf dem Gebiet der Chemotaxis-Rezeptoren entwickelt werden, bleibt aber zu einem erheblichen Teil spekulativ. Die Schraubenbewegung der Transducer-Helix TM 2 wird auf die amphiphatische Helix AS 1 übertragen und dort möglicherweise, wie bereits von Wegener (2000) postuliert, durch eine Art Hebelarm-Mechanismus verstärkt. Dieses Struktur-Element ist auch in den Chemorezeptoren vorhanden, und könnte dort dieselbe Funktion erfüllen. Diese Konformationsänderung wird auf die AS 2, welche in ein paralleles „coiled-coil“ übergeht, übertragen und könnte zu einer „Verdrehung“ dieser Einheit führen. Dieses Strukturelement findet sich nur bei den archaebakteriellen Transducern, nicht jedoch bei den Chemorezeptoren. Es ergibt sich also die Frage nach der Funktion dieses Abschnittes. Hinweise liefern Untersuchungen der phototaktischen Eigenschaften von NpHtrII-Tsr bzw. -Tar-Chimären (Jung *et al.*, 2001) in *E. coli*. Nachweisbare phototaktische Aktivität konnte dort bei Fusions-Proteinen beobachtet werden, welche die Sequenz des Phototransducers bis einschließlich Position 102 (d.h. einschließlich der AS 1) bzw. Position 125 (d.h. Schnitt direkt vor der coiled-coil-Region) enthalten. Die sich anschließende Tar- bzw. Tsr-Sequenz beginnt jeweils im Anfangsbereich des Vier-Helix-Bündels. Eine gemeinsame Eigenschaft dieser Chimären ist demnach das Fehlen der hier diskutierten Einheit. Betrachtet man die von Jung *et al.* (2001) beobachteten phototaktischen Antworten, fällt auf, daß diese eine sehr geringe Stärke aufweisen. In einem der Fälle wird eine Antwort mit umgekehrtem Vorzeichen beobachtet. Diese Resultate lassen zwei Schlußfolgerungen bezüglich der Funktionsweise des fehlenden Sequenzabschnittes zu:

1. Die betrachtete coiled-coil-Region sorgt für eine weitere Verstärkung des Signals und ist
2. dafür verantwortlich, daß an die nachfolgenden Domänen ein Signal mit eindeutigem „Vorzeichen“ weitergeleitet wird.

Das so modulierte Signal wird dann an das nachfolgende, die Methylierungs- und Signal-Domäne bildende, Vier-Helix-Bündel übertragen. Aufgrund der Länge dieser Einheit (~200 Å) ist es eher unwahrscheinlich, daß das Signal eine spezifische Konformationsänderung der Signaldomäne zur Modulation der Histidinkinase hervorruft. Stattdessen deuten eine Reihe von Untersuchungen an Chemorezeptoren darauf hin, daß eine Modulation der dynamischen Eigenschaften des Vier-Helix-Bündels durch das Signal stattfindet. Surette und Stock (1996) sehen die Stabilität dieser

coiled-coil-Region als Grundvoraussetzung für eine exakte Anordnung des Vier-Helix-Bündels im Bereich der Signaldomäne. Geht man davon aus, daß ein positives Signal im Falle der Chemorezeptoren zu einer erhöhten Dynamik dieses Bereiches führt, könnte infolgedessen die Bindung der Histidin-Kinase CheA abgeschwächt werden und gleichsam deren Dimerisierungs-Zustand beeinflussen. Dies wiederum würde eine Herabsetzung der Phosphorylierungsaktivität nach sich ziehen (Falke *et al.*, 1997).

Auch neuere Untersuchungen von Kim *et al.* (2002) deuten darauf hin, daß die Modulation der dynamischen Eigenschaften des Vier-Helix-Bündels die „Sprache“ der Signalübertragung sein könnte. Sie vermuten, daß CheA eine stärkere bzw. bezüglich der Phosphorylierungsaktivität „produktivere“ Interaktion mit dem weniger dynamischen, d.h. stabileren, Zustand dieser coiled-coil-Region eingeht. Als Beleg für dieses Modell dient die Tatsache das Mutationen der Methylierungsstellen des Chemorezeptors Tsr ebenfalls zu einer veränderten Dynamik des Rezeptors führen. Mit ähnlichen Argumenten könnte erklärt werden, wie die Adaptation des Rezeptors an konstante Stimuli durch dessen Methylierung funktioniert. Die von Kim *et al.* angestellten Studien weisen darauf hin, daß die Methylierung des Rezeptors die Stabilität des Vier-Helix-Bündels erhöht, somit die Aktivität des CheA heraufsetzt und dadurch im Sinne einer Adaptation einem konstanten Stimulus durch einen Lockstoff entgegenwirkt.

Überträgt man dieses Modell auf die durch den in dieser Arbeit betrachteten photophoben Rezeptor/Transducer-Komplex, sollte das NpHtrII im nicht aktivierten Zustand eine vergleichsweise hohe Dynamik aufweisen, welche dementsprechend eine geringe CheA-Aktivität hervorruft. Die Aktivierung des Rezeptors, die Übertragung dieses Signals auf die transmembrane Helix TM 2 des Transducers und die nachfolgende „Bearbeitung“ dieser Konformationsänderung in der sich anschließenden Domäne würden demnach zu einer Stabilisierung des Vier-Helix-Bündels der Signaldomäne führen. Infolgedessen käme es zur Initiierung der Phosphotransfer-Kette der Signaltransduktionskaskade und damit zu der beobachtbaren photophoben Antwort der Zelle.

Mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten konnte die Struktur des transmembranen Bereiches des NpSRII/NpHtrII-Komplexes im Detail aufgeklärt werden. Zusätzlich konnte die ESR-Spektroskopie erste Hinweise auf die Beschaffenheit und Anordnung der ersten amphiphatischen Sequenz liefern. Die exakte Orientierung der AS 1 und die Struktur der sich anschließenden Bereiche konnte jedoch noch nicht experimentell untersucht werden. Zur Prüfung des anhand von Sekundärstrukturvorhersagen aufgestellten Strukturmodells und der daraus abgeleiteten Hypothese über den Mechanismus der inter- und intramolekularen Signaltransduktion sind eine

Reihe weiterer Untersuchungen nötig. An erster Stelle zu nennen sind hier Versuche, die Konformationsänderungen während des Aktivierungsprozesses mittels Röntgenstrukturanalyse von Photozyklusintermediaten des Komplexes aufzuklären. Weitergehende ESR-Experimente an der AS I, der AS II und der dazwischen liegenden Linker-Region sollten Hinweise auf die Struktur dieses Bereiches und dort stattfindende lichtinduzierte Konformationsänderungen geben. Kristallisationsversuche mit längeren und gegebenenfalls modifizierten Transducerfragmenten könnten diesen Bereich auch für die Röntgenstrukturanalyse zugänglich machen. Desweiteren sollten Fusionsproteine aus der transmembranen und der Linker-Domäne des NpHtrII mit der zytoplasmatischen Domäne eines Chemorezeptors ESR-Messungen auch an diesem Bereich ermöglichen. Zusätzlich erlauben solche Konstrukte die direkte Messung einer phototaktischen Antwort und ermöglichen Studien über die Interaktionen des Transducers mit den Komponenten des Signaltransduktions-Systems.

5 Zusammenfassung

Das sensorische Rhodopsin II vermittelt zusammen mit dem im Komplex gebundenen Transducer HtrII die photophobe Reaktion auf blaues Licht im Archaeobakterium *Natronobacterium pharaonis*. In dieser Arbeit wurden der Aufbau dieses Komplexes sowie der Mechanismus der Signal-Erzeugung und -Weiterleitung mit verschiedenen biophysikalischen Methoden eingehend untersucht.

Mittels Laserblitz-Absorptions-Spektroskopie an ausgesuchten NpSR_{II}-Mutanten wurden deutliche Hinweise dafür gewonnen, daß Dauer des NpSR_{II}-Photozyklus nicht im Wesentlichen durch den Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen an der Schiffischen Base, sondern vielmehr durch den Isomerisierungszustand des Chromophors und den sich daraus ergebenden Konformationsänderungen des Proteins bestimmt wird. Zudem konnte anhand dieser Untersuchungen gezeigt werden, daß die Bildung des signalgebenden Zustandes, d.h. die Auswärtsbewegung der Helix F, nicht mit Protonentransfer-Reaktionen innerhalb des Proteins korreliert werden kann. Demnach sollten, initial durch die Isomerisierung des Retinal-Chromophors ausgelöste, Konformationsänderungen des NpSR_{II} zur Bildung des „aktiven“ Zustandes führen. Diese Hypothese wird als SCC-Modell (Sequenz of Conformational Changes) der Signalgenerierung im NpSR_{II} formuliert.

Desweiteren konnte mittels zeitaufgelöster ESR-Spektroskopie erstmals neben der Relaxation des signalgebenden Zustandes zurück in den Grundzustand auch die Kinetik der Bildung des aktivierten Komplexes aufgelöst werden. Dabei konnte experimentell gezeigt werden, daß die Konformationsänderung der Transducer-Helix TM 2 synchron mit der Ausklapp-Bewegung der Rezeptor-Helix F erfolgt. Durch Vergleich mit den vorliegenden Photozyklus-Daten konnte dieser Prozeß mit dem Übergang $M_1 \rightarrow M_2$ korreliert werden, womit zusätzlich bewiesen wurde, daß die Bildung des signalgebenden Zustandes unabhängig von Protonentransfer-Reaktionen innerhalb des Rezeptors stattfindet.

Im Anschluß an vorhergehende ESR-Arbeiten über die Struktur des Rezeptor/Transducer-Komplexes wurde durch weitere Untersuchungen ein auf ESR-Daten basierendes Struktur-Modell des transmembranen Bereiches entwickelt. Durch die in dieser Arbeit angestellten Untersuchungen an der Transducer-Helix TM 1 konnte gezeigt werden, daß diese keine lichtinduzierte Konformationsänderung erfährt, und somit zusammen mit der Rezeptor-Helix G als Bezugselement für die von den Helizes F und TM 2 durchlaufenen Konformationsänderungen fungiert.

Zusätzlich zu diesen Untersuchungen konnte in Zusammenarbeit mit der Gruppe von G. Büldt (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) die Struktur des transmembranen Teils des Rezeptor/Transducer-Komplexes durch Röntgenkristallographie aufgeklärt werden. Damit wurden zum ersten Mal zwei interagierende Membranproteine in der kubischen Lipid-Phase kristallisiert. Der Vergleich des ESR-Modells mit den Röntgenkristallstruktur zeigt weitreichende Übereinstimmungen in der Topologie des Komplexes, angefangen von der relativen Anordnung der transmembranen Helizes bis hin zu der Orientierung einzelner Seitenketten.

Durch Auswertung der Struktur-Daten konnte gezeigt werden, daß zahlreiche Interkalationen zwischen hydrophoben Seitenketten eine reine Kolbenhub-Bewegung, wie sie für die Chemorezeptoren postuliert wird, ausschließen. Sowohl die Röntgenstruktur als auch die ESR-Daten favorisieren eindeutig eine Schraubenbewegung der TM 2 als Reaktion auf die Ausklappbewegung der Helix F des NpSRII.

Zur weiteren strukturellen Charakterisierung wurde der den transmembranen Helizes des NpHtrII folgende Linkerbereich ebenfalls mittels ESR-Spektroskopie untersucht. Auf Grundlage der Abstands-, Zugänglichkeits- und Mobilitätsmessungen konnte unter Berücksichtigung der Primärsequenz und Sekundärstrukturvorhersagen ein Modell dieses Bereiches entwickelt werden. Diesem Modell zufolge schließt sich an eine kurze Turn-Struktur die amphiphatische Helix AS 1 an. Für diese konnte gezeigt werden, daß sie sich mit aufsteigender Sequenz von der Membran entfernt und dabei vermutlich entlang des Rezeptors orientiert ist. Diese Helix ist über einen weiteren, etwas längeren und mit dem Rezeptor in Wechselwirkung stehenden Linker-Bereich mit einer zweiten amphiphatischen Helix, AS 2, verbunden. Diese Helix geht nach 2-3 Windungen in ein etwa 13-14 Helix-Windungen langes paralleles coiled-coil-Motiv über. Dieses schließt wiederum über einen weiteren Linker-Bereich von etwa 12 Aminosäuren an eine weitere coiled-coil-Struktur an, welche schließlich in das von den Chemorezeptoren bekannte Vier-Helix-Bündel der Methylierungs- und Signal-Domäne übergeht.

Auf der Grundlage des Strukturmodells und aktueller Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Chemorezeptoren konnte folgende Hypothese für den Mechanismus der Signalweiterleitung entlang des Transducer-Dimers aufgestellt werden: Die durch das Ausklappen der Helix F induzierte Schraubenbewegung der TM 2 wird in der „nachgeschalteten“ Linker-Domäne amplifiziert und so moduliert, daß die Dynamik des nachfolgenden Vier-Helix-Bündel herabgesetzt wird. Dies geschieht vermutlich durch eine Art „Verwindung“ der Helizes und führt zu einer Erhöhung der CheA-Phosphorylierungsaktivität. Dies erzeugt die beobachtete photophobe Antwort der Zelle auf den Lichtreiz.

6 Literaturverzeichnis

- CCP4 (1994). The CCP4 Suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D* **50**, 760-763.
- Aharoni, A., Weiner, L., Ottolenghi, M. & Sheves, M. (2001). Nonisomerizable Non-Retinal Chromophores Initiate Light-Induced Conformational Alterations in Bacterioopsin. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6612-6616.
- Alley, M. R., Gomes, S. L., Alexander, W. & Shapiro, L. (1991). Genetic analysis of a temporally transcribed chemotaxis gene cluster in *Caulobacter crescentus*. *Genetics* **129**, 333-341.
- Altenbach, C., Greenhalgh, D. A., Khorana, H. G. & Hubbell, W. L. (1994). A collision gradient method to determine the immersion depth of nitroxides in lipid bilayers: Application to spin-labeled mutants of bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1667-1671.
- Altenbach, C., Marti, T., Khorana, H. G. & Hubbell, W. L. (1990). Transmembrane Protein Structure: Spin Labeling of Bacteriorhodopsin Mutants. *Science* **248**, 1088-1092.
- Ausubel, F. M. (1987). *Current protocols in molecular biology*. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience New York.
- Balashov, S. P., Imasheva, E. S., Ebrey, T. G., Chen, N., Menick, D. R. & Crouch, R. K. (1997). Glutamate-194 to Cysteine Mutation Inhibits Fast Light-Induced Proton Release in Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **36**, 8671-8676.
- Beja, O., Suzuki, M. T., Heidelberg, J. F., Nelson, W. C., Preston, C. M., Hamada, T., Eisen, J. A., Fraser, C. M. & DeLong, E. F. (2002). Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* **415**, 630-633.
- Birnbaumer, L., Yatani, A., VanDongen, A. M., Graf, R., Codina, J., Okabe, K., Mattera, R. & Brown, A. M. (1990). G protein coupling of receptors to ionic channels and other effector systems. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* **45**, 169-183.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523.
- Bogomolni, R. A. & Spudich, J. L. (1982). Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6250-6254.

- Brown, L. S., Kamikubo, H., Zimányi, L., Kataoka, M., Tokunaga, F., Verdegem, P., Lugtenburg, J. & Lanyi, J. K. (1997). A local electrostatic change is the cause of the large-scale protein conformation shift in bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5040-5044.
- Brünger, A. T. (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D* **54**, 905-921.
- Buck, L. & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-187.
- Butler, S. L. & Falke, J. J. (1998). Cysteine and Disulfide Scanning Reveals Two Amphiphilic Helices in the Linker Region of the Aspartate Chemoreceptor. *Biochemistry* **37**, 10746-10756.
- Cercignani, G., Frediani, A., Lucia, S. & Petracchi, D. (2000). Competition-Integration of Blue and Orange Stimuli in *Halobacterium salinarum* Cannot Occur Solely in SRI Photoreceptor. *Biophys. J.* **79**, 1554-1560.
- Chen, X. & Spudich, J. L. (2002). Demonstration of 2:2 Stoichiometry in the Functional SRI-HtrI Signaling Complex in *Halobacterium* Membranes by Gene Fusion Analysis. *Biochemistry* **41**, 3891-3896.
- Chervitz, S. A. & Falke, J. J. (1996). Molecular mechanism of transmembrane signaling by the aspartate receptor: A model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2545-2550.
- Chizhov, I., Chernavskii, D. S., Engelhard, M., Mueller, K. H., Zubov, B. V. & Hess, B. (1996). Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.* **71**, 2329-2345.
- Chizhov, I. & Engelhard, M. (2001). Temperature and Halide Dependence of the Photocycle of Halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*. *Biophys. J.* **81**, 1600-1612.
- Chizhov, I., Schmies, G., Seidel, R. P., Sydor, J. R., Lüttenberg, B. & 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.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16**, 6127-6145.
- Edman, K., Royant, A., Nollert, P., Maxwell, C. A., Pebay-Peyroula, E., Navarro, J., Neutze, R. & Landau, E. M. (2002). Early Structural Rearrangements in the Photocycle of an Integral Membrane Sensory Receptor. *Structure* **10**, 473-482.

- Ehresmann, B., Imbault, P. & Weil, J. H. (1973). Spectrophotometric Determination of Protein Concentration in Cell Extracts Containing tRNA's and rRNA's. *Analytical Biochemistry* **54**, 454-463.
- Eisenbach, M. (1996). Control of bacterial chemotaxis. *Molecular Microbiology* **20**, 903-910.
- Gordeliy, V. I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R., Büldt, G., Savopol, T., Scheidig, A. J., Klare, J. P. & Engelhard, M. (2002). Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex. *Nature* **419**, 484-487.
- Hargrave, P. A. & McDowell, J. H. (1992). Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB J.* **6**, 2323-2331.
- Hildebrand, E. & Dencher, N. A. (1975). Two photosystems controlling behavioural responses in *Halobacterium*. *Nature* **257**, 46-49.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Hohenfeld, I. P., Wegener, A. A. & Engelhard, M. (1999). Purification of Histidine tagged bacteriorhodopsin, *pharaonis* halorhodopsin and *pharaonis* sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **442**, 198-202.
- Hubbell, W. L. & Altenbach, C. (1994). Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling. *Current Opinion in Structural Biology* **4**, 566-573.
- Hubbell, W. L., Mchaourab, H. S., Altenbach, C. & Lietzow, M. A. (1996). Watching proteins move using site-directed spin labeling. *Structure with Folding & Design* **4**, 779-783.
- Ihara, K., Umemura, T., Katagiri, I., Kitajima-Ihara, T., Sugiyama, Y., Kimuzra, Y. & Mukohata, Y. (1999). Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes associated with the photocycle of bacteriorhodopsin. *EMBO J.* **10**, 163-174.
- Iwamoto, M., Shimono, K., Sumi, M. & Kamo, N. (1999a). Positioning proton-donating residues to the Schiff-base accelerates the M-Decay of *pharaonis* phoborhodopsin expressed in *Escherichia coli*. *Biophysical Chemistry* **79**, 187-192.
- Iwamoto, M., Shimono, K., Sumi, M., Koyama, K. & Kamo, N. (1999b). Light-Induced Proton Uptake and Release of *pharaonis* Phoborhodopsin Detected by a Photoelectrochemical Cell. *J. Phys. Chem. B* **103**, 10311-10315.

- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica Section A* **47**, 110-119.
- Jung, K.-H. & Spudich, J. L., (1998). Suppressor Mutation Analysis of the Sensory Rhodopsin I - Transducer Complex : Insights into the Color-Sensing Mechanism. *J. Bacteriol.* **180**, 2033-2042.
- Jung, K.-H., Spudich, E. N., Trivedi, V. D. & Spudich, J. L. (2001). An Archaeal Photosignal-Transducing Module Mediates Phototaxis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 6365-6371.
- Kandori, H., Yamazaki, Y., Hatanaka, M., Needleman, R., Brown, L. S., Richter, H. T., Lanyi, J. K. & Maeda, A. (1997). Time-Resolved Fourier Transform Infrared Study of Structural Changes in the Last Steps of the Photocycles of Glu-204 and Leu-93 Mutants of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **36**, 5134-5141.
- Kates, M., Kushawa, S. C. & Sprott, G. D. (1982). *Methods in Enzymology* **88**, 98-111.
- Kim, K. K., Yokota, H. & Kim, S.-H. (1999). Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature* **400**, 787-792.
- Kim, S.-H., Wang, W. & Kim, K. K. (2002). Dynamic and clustering model of bacterial chemotaxis receptors: Structural basis for signalling and high sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11611-11615.
- Klare, J. P., Schmies, G., Chizhov, I., Shimono, K., Kamo, N. & Engelhard, M. (2002). Probing the Proton Channel and the Retinal Binding Site of *Natronobacterium pharaonis* Sensory Rhodopsin II. *Biophys. J.* **82**, 2156-2164.
- Klostermeier, D., Seidel, R. P. & Reinstein, J. (1998). Functional Properties of the Molecular Chaperone DnaK from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* **279**, 841-853.
- Kochendoerfer, G. G., Lin, S. W., Sakmar Thomas P. & Mathies, R. A. (1999). How color visual pigments are tuned. *TIBS* **24**, 300-305.
- Lanyi, J. K. & Luecke, H. (2001). Bacteriorhodopsin. *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 415-419.
- LeMoual, H. & Koshland, D. E., Jr. (1996). Molecular Evolution of the C-terminal Cytoplasmic Domain of a Superfamily of Bacterial Receptors Involved in Taxis. *J. Mol. Biol.* **261**, 568-585.

- Leslie, A. G. W. (2002). Recent changes to the MOSFILM package for processing film and image data. *CCP4 ESF-EACMB Newslett. Protein Crystallogr.* **26**.
- Luecke, H., Schobert, B., Lanyi, J. K., Spudich, E. N. & 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.
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P. & Lanyi, J. K. (1999a). Structural Changes in Bacteriorhodopsin During Ion Transport at 2 Angstrom Resolution. *Science* **286**, 255-260.
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P. & Lanyi, J. K. (1999b). Structure of Bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **291**, 899-911.
- Marwan, W. & Oesterhelt, D.. Signal transduction in *Halobacterium halobium*. Armitage, Judith P. and Lackie, J. M. **46**, 219-239. 1990. Cambridge, Cambridge University Press. Society for General Microbiology - Biology of the Chemotactic Response.
- Maurer, R., Vogel, J. & Schneider, S. (1987). Analysis of flash photolysis data by global fit with multi-exponential exponentials. *Photochemistry and Photobiology* **46**, 255-262.
- Mchaourab, H. S., Oh, K. J., Fang, C. J. & Hubbell, W. L. (1997). Conformation of T4 Lysozyme in Solution. Hinge-Bending Motion and the Substrate-Induced Conformational Transition Studied by Site-Directed Spin Labeling. *Biochemistry* **36**, 307-316.
- Miyazaki, M., Hirayama, J., Hayakawa, M. & Kamo, N. (1992). Flash photolysis study on *pharaonis* phoborhodopsin from a haloalkaliphilic bacterium (*Natronobacterium pharaonis*). *Biochimica et Biophysica Acta* **1140**, 22-29.
- Müller, K. H. & Plessner, Th. (1991). Variance reduction by simultaneous multi-exponential analysis of data sets from different experiments. *Eur. Biophys. J.* **19**, 231-240.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-350.
- Nagle, J. F., Parodi, L. A. & Lozier, R. H. (1982). Procedure for Testing Kinetic Models of the Photocycle of Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **38**, 161-174.
- Ottemann, K. M., Thorgeirsson, T. E., Kolodziej, A. F., Shin, Y.-K. & Koshland, D. E., Jr. (1998). Direct Measurement of Small Ligand-Induced Conformational Changes in the Aspartate Chemoreceptor Using EPR. *Biochemistry* **37**, 7062-7069.
- Ottemann, K. M., Xiao, W., Shin, Y.-K. & Koshland, D. E., Jr. (1999). A Piston Model for Transmembrane Signaling of the Aspartate Receptor. *Science* **285**, 1751-1754.

- Pebay-Peyroula, E., Royant, A., Landau, E. M. & Navarro, J. (2002). Structural basis for sensory rhodopsin function. *Biochimica et Biophysica Acta* **1565**, 196-205.
- Rammelsberg, R., Huhn, G., Lübben, M. & Gerwert, K. (1998). Bacteriorhodopsin's Intramolecular Proton-Release Pathway Consists of a Hydrogen-Bonded Network. *Biochemistry* **37**, 5001-5009.
- Richter, H. T., Needleman, R., Kandori, H., Maeda, A. & Lanyi, J. K. (1996). A linkage of the pK_a's of Asp-85 and Glu-204 forms part of the reprotonation switch of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **35**, 15461-15466.
- Royant, A., Nollert, P., Edman, K., Neutze, R., Landau, E. M., Pebay-Peyroula, E. & Navarro, J. (2001). X-ray structure of sensory rhodopsin II at 2.1-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10131-10136.
- Rudolph, J. & Oesterhelt, D. (1995). Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J.* **14**, 667-673.
- Rudolph, J. & Oesterhelt, D. (1996). Deletion Analysis of the che Operon in the Archaeon *Halobacterium salinarium*. *J. Mol. Biol.* **258**, 548-554.
- Rudolph, J., Tolliday, N., Schmitt, C., Schuster, S. C. & Oesterhelt, D. (1995). Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *EMBO J.* **14**, 4249-4257.
- Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch, E. F. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harb. Lab. Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sasaki, J. & Spudich, J. L. (1999). Proton Circulation During the Photocycle of Sensory Rhodopsin II. *Biophys. J.* **77**, 2145-2152.
- Sass, H. J., Büldt, G., Gessenich, R., Hehn, D., Neff, D., Schlesinger, R., Berendzen, J. & Ormos, P. (2000). Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin. *Nature* **406**, 649-653.
- Schägger, H. & 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.
- Scharf, B. E., Fahrner, K. A., Turner, L. & Berg, H. C. (1998). Control of direction of flagellar rotation in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 201-206.

- Schmies, Georg (2000). Spektroskopische und elektrophysiologische Untersuchung der beiden archaebakteriellen Photorezeptor/Transducer-Komplexe. Dissertation, Universität Dortmund.
- Schmies, G., Chizhov, I. & Engelhard, M. (2000a). Functional expression of His-tagged sensory rhodopsin I in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **466**, 67-69.
- Schmies, G., Lüttenberg, B., Chizhov, I., Engelhard, M., Becker, A. & Bamberg, E. (2000b). Sensory Rhodopsin II from Haloalkaliphilic *Natronobacterium pharaonis*: Light-Activated Proton Transfer Reactions. *Biophys. J.* **78**, 967-976.
- Schweika. Bestimmung intramolekularer Abstände in mehrfach spinmarkierten Proteinen mittels ESR-Spektroskopie bei Raumtemperatur. 1997. Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum, Germany.
- Seidel, R. P., Scharf, B. E., Gautel, M., Kleine, K., Oesterhelt, D. & Engelhard, M. (1995). The primary structure of sensory rhodopsin II: A member of an additional retinal protein subgroup is coexpressed with its transducer, the halobacterial transducer of rhodopsin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3036-3040.
- Shimono, K., Iwamoto, M., Sumi, M. & Kamo, N. (1997). Functional expression of *pharaonis* phoborhodopsin in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **420**, 54-56.
- Spudich, E. N., Zhang, W., Alam, M. & Spudich, J. L. (1997). Constitutive signaling by the phototaxis receptor sensory rhodopsin II from disruption of its protonated Schiff base - Asp73 interhelical salt bridge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4960-4965.
- Spudich, J. L. & Bogomolni, R. A. (1984). Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature* **312**, 509-513.
- Spudich, J. L. & Bogomolni, R. A. (1988). Sensory Rhodopsins of Halobacteria. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **17**, 193-215.
- Steinhoff, H.-J., Mollaaghababa, R., Altenbach, C., Hideg, K., Krebs, M. P., Khorana, H. G. & Hubbell, W. L. (1994). Time-resolved detection of structural changes during the photocycle of spin-labeled bacteriorhodopsin. *Science* **266**, 105-107.
- Steinhoff, H.-J., Radzwill, N., Thevis, W., Lenz, V., Brandenburg, D., Antson, A., Dodson, G. & Wollmer, A. (1997). Determination of interspin distances between spin labels attached to insulin: comparison of electron paramagnetic resonance data with the X-ray structure. *Biophys. J.* **73**, 3287-3298.
- Stryer, L. (1986). Cyclic GMP cascade of vision. *Annu. Rev. Neurosci.* **9**, 87-119.

- Stryer, L. (1996). Vision: from photon to perception. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 557-559.
- Sudo, Y., Iwamoto, M., Shimono, K. & Kamo, N. (2001). *Pharaonis* Phoborhodopsin Binds to its Cognate Truncated Transducer Even in the Presence of a Detergent with a 1:1 Stoichiometry. *Photochemistry and Photobiology* **74**, 489-494.
- Sudo, Y., Iwamoto, M., Shimono, K. & Kamo, N. (2002). Tyr-199 and Charged Residues of *pharaonis* Phoborhodopsin Are Important for the Interaction with its Transducer. *Biophys. J.* **83**, 427-432.
- Surette, M. G. & Stock, J.B. (1996). Role of α -Helical Coiled-coil Interactions in Receptor Dimerization, Signaling, and Adaptation during Bacterial Chemotaxis. *J. Bio. Chem.* **271**, 17966-17973.
- Takao, K., Kikukawa, T., Araiso, T. & Kamo, N. (1998). Azide accelerates the decay of M-intermediate of *pharaonis* phoborhodopsin. *Biophysical Chemistry* **73**, 145-153.
- Tittor, J., Soell, C., Oesterhelt, D., Butt, H. J. & Bamberg, E. (1989). A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96---Asn is fully reactivated by azide. *EMBO J.* **8**, 3477-3482.
- Varo, G. & Lanyi, J. K. (1990). Pathways of the Rise and Decay of the M Photointermediate(s) of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **29**, 2241-2250.
- Wegener, A. A. (2000). Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaebakteriellen Lichtrezeptors pSRII mit seinem Transducerprotein pHtrII. Dissertation, Universität Dortmund.
- Wegener, A. A., Chizhov, I., Engelhard, M. & Steinhoff, H.-J. (2001a). Time-resolved Detection of Transient Movement of Helix F in Spin-labelled *Pharaonis* Sensory Rhodopsin II. *J. Mol. Biol.* **301**, 881-891.
- Wegener, A. A., Klare, J. P., Engelhard, M. & Steinhoff, H. J. (2001b). Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis. *EMBO J.* **20**, 5312-5319.
- Wegener, C., Savitsky, A., Pfeiffer, M., Möbius, K. & Steinhoff, H.-J. (2001c). High-Field EPR-Detected Shifts of Magnetic Tensor Components of Spin Label Side Chains Reveal Protein Conformational Changes: the Proton Entrance Channel of Bacteriorhodopsin. *Appl. Magn. Reson.* **21**, 441-452.
- Williams, S.B. & Stewart, V. (1999). Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for the linker region amphiphatic helices in transmembrane signal transduction. *Molecular Microbiology* **33**, 1093-1102.

- Yan, B., Nakanishi, K. & Spudich, J. L. (1991). Mechanism of activation of sensory rhodopsin I: Evidence for a steric trigger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9412-9416.
- Yan, B., Takahashi, T., Johnson, R. & Spudich, J. L. (1991). Identification of signaling states of a sensory receptor by modulation of lifetimes of stimulus-induced conformations: The case of sensory rhodopsin II. *Biochemistry* **30**, 10686-10692.
- Yao, V. J. & Spudich, J. L. (1992). Primary structure of an archaeobacterial transducer, a methyl-accepting protein associated with sensory rhodopsin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11915-11919.
- Yeh, J. I., Biemann, H. P., Pandit, J., Koshland, D. E. & Kim, S. H. (1996). High-resolution structures of the ligand binding domain of the wild-type bacterial aspartate receptor. *J. Mol. Biol.* **262**, 186-201.
- Zhang, W., Brooun, A., McCandless, J., Banda, P. & Alam, M. (1996a). Signal transduction in the Archaeon *Halobacterium salinarium* is processed through three subfamilies of 13 soluble and membrane-bound transducer proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4649-4654.
- Zhang, W., Brooun, A., Mueller, M. M. & Alam, M. (1996b). The primary structures of the Archaeon *Halobacterium Salinarium* blue light receptor sensory rhodopsin II and its transducer, a methyl-accepting protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8230-8235.
- Zhang, X.-N., Zhu, J. & Spudich, J. L. (1999). The specificity of interaction of archaeal transducers with their cognate sensory rhodopsins is determined by their transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 857-862.

7 Anhang

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Engelhard für die hochinteressante Aufgabenstellung und die großzügige Betreuung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. P. Eilbracht danke ich für die Betreuung seitens der Universität Dortmund sowie Herrn Prof. Dr. R. S. Goody für die Aufnahme in seine Abteilung am MPI in Dortmund.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Steinhoff danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der ESR-Spektroskopie und seine ständige Diskussionsbereitschaft, wenn es darum ging, Messergebnisse zu interpretieren oder experimentelle Klippen zu umschiffen. In diesem Zusammenhang seien auch die Mitglieder der ESR-Gruppe, Christoph Wegener, Christian Beyer und Martin Kühn genannt, die bereitwillig die Messzeit an den ESR-Geräten mit mir geteilt haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Igor Chizhov für die Einweisung in die Blitzlicht-Photolyse und seine ständige Bereitschaft, kinetische Messungen zu diskutieren und zu interpretieren.

Herrn Dr. Ralf Seidel sei gedankt für die Unterstützung bei molekularbiologischen Arbeiten.

Frau A. Reulen (nicht zuletzt für das Korrekturlesen dieser Arbeit), Frau M. Schumacher, Frau A. Göppner, Herrn M. Kolleck und Frau M. Hülseweh danke ich für die große Unterstützung, bei der Präparation von Proteinen und Lipiden sowie der Klonierung von diversen Mutanten.

Herrn A. Wegener danke ich für die Einführung in dieses Gebiet.

Großer Dank natürlich auch an alle anderen (inkl. ehemaligen) „Engelhard’s“ sowie B. Hollinderbäumer und S. Veldhoehn für das gute Arbeitsklima in unserem Büro.

Ein besonderes Dankeschön geht selbstverständlich auch an die Mitglieder des IBI-2 im Forschungszentrum Jülich für die phantastische Zusammenarbeit bei der Kristallisierung des Komplexes. Ohne Georg Büldt, Valentin Gordeliy, Ruslan Moukhametzianov, Ruslan Efremov, Jörg Labahn, Joachim Granzin und all die Anderen wäre dieser Erfolg nicht möglich gewesen. Besonders bedanke ich mich für die unglaubliche Gastfreundschaft und die temporäre „Aufnahme“ in das IBI-2.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Tudor Savopol, der in seiner Zeit am MPI die vorbereitenden Arbeiten für dieses Kristallographie-Projekt leistete und mich mit Rat und Hilfe auf dieses vorbereitet hat.

Der größte Dank gebührt selbstverständlich meiner Frau Anita, die mir die Kraft für Alles gibt.

Lebenslauf

Name:	Johann Peter Klare
Geboren:	31.07.1969 in Dortmund
Eltern:	Ingrid Klare und Johann Idek
Familienstand:	seit 1996 verheiratet mit Anita Wendt
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
1975 – 1979	Besuch der Vincke-Grundschule in Dortmund
1979 – 1988	Besuch des Einstein-Gymnasiums (Dortmund)
Mai 1988	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
Jan. 1989 – März 1990	Ableistung des Grundwehrdienstes
1990 – 1993	Studium der Ingenieur-Informatik an der Universität Dortmund
Oktober 1993	Aufnahme des Studiums der Chemie an der Universität Dortmund
Sept. – Okt. 1998	Ablegung der mündlichen Diplom-Hauptprüfung
Jan. – Aug. 1999	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund über das Thema „Aminoacylierung von pdCpA mit N ₁ -Methyl-7-aza-tryptophan zur Untersuchung von Suppressionen in zellfreien Systemen.“
November 1999	Beginn der Dissertation am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in der Abteilung von Prof. Dr. R. S. Goody unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. M. Engelhard.