

**Spektroskopische und elektrophysiologische Untersuchung
der beiden archaebakteriellen
Photorezeptor/Transducer-Komplexe**

Dissertation

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

vorgelegt von Dipl.-Chem. Georg Schmies
aus Gelsenkirchen

Dortmund, im Dezember 2000

Meinen Eltern

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. M. Engelhard und dem Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main in der Abteilung biophysikalische Chemie von Prof. Dr. E. Bamberg unter dessen Leitung angefertigt.

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

Tag der Prüfung:

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

- I. Chizhov, G Schmies, R. Seidel, J.R. Sydor, B. Lüttenberg & M. Engelhard (1998),
The Photophobic Receptor from *Natronobacterium pharaonis*: Temperature and pH
Dependencies of the Photocycle of Sensory Rhodopsin II,
Biophys. J., **75**, 999-1009
- G. Schmies, I. Chizhov & Martin Engelhard (2000),
Functional Expression of His-tagged Sensory Rhodopsin I in *Escherischia coli*,
FEBS Lett., **466**, 67-69
- G. Schmies, B. Lüttenberg, I. Chizhov, M. Engelhard, A. Becker & E. Bamberg (2000),
Sensory rhodopsin II from the haloalkaliphilic *Natronobacterium pharaonis*: Light-
activated proton transfer reactions,
Biophys. J., **78**, 967-976
- G. Schmies, M. Engelhard, P. G. Wood, G. Nagel & E. Bamberg,
Electrophysiological Characterization of Specific Interactions between Bacterial
Sensory Rhodopsins and their Transducers,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *im Druck*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	10
2.1	Chemikalien	10
2.2	Instrumentation	10
2.3	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	11
2.4	Molekularbiologische Methoden	13
2.4.1	Zellanzucht	13
2.4.2	Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten	13
2.4.3	Isolierung von Plasmid DNA	13
2.4.4	Amplifikation von DNA-Fragmenten	14
2.4.5	Restriktion von DNA	14
2.4.6	Ligation von DNA-Fragmenten	15
2.4.7	Transformation von <i>E. coli</i>	15
2.4.8	DNA-Sequenzierung	15
2.5	Proteinchemische Methoden	16
2.5.1	Expression und Isolierung des pSRII-His und Mutanten in <i>E. coli</i>	16
2.5.2	Rekonstitution in PM-Lipide	16
2.5.3	Expression der sensorischen Rhodopsine in <i>Xenopus</i> -Oocyten	17
2.5.4	Präparation von Oocytenmembranen	18
2.5.5	SDS-PAGE	18
2.5.6	Westernblot	19
2.6	Biophysikalische Methoden	19
2.6.1	Laserblitz-Absorptionsspektrometrie	19
2.6.2	Voltage-Clamp	21
2.6.3	Black-Lipid-Membrane	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Expression der sensorischen Rhodopsine in <i>E. coli</i>	24
3.2	Absorptionsspektrometrische Analyse der SR-Photozyklen	32
3.2.1	Photozyklus von pSRII und Mutanten	32
3.2.2	Photozyklus von SRI	54
3.3	Analyse der pSRII-Photoströme mit der Black-Lipid-Membrane	58
3.3.1	Photoströme des pSRII	59
3.3.2	Photoströme des pSRII-F86D	63

3.4	Expression der SR's und SR/Htr-Komplexe in <i>Xenopus</i> -Oocyten	66
3.4.1	Klonierung der DNA-Matrizen	67
3.4.2	<i>In-vitro</i> Synthese der cRNA	71
3.4.3	Mikroinjektion von cRNA in Oocyten	72
3.4.4	Immunologischer Nachweis der Expression von pSRII und pHtrII	73
3.5	Voltage-Clamp Untersuchungen der SR und SR/Htr-Komplexe	74
3.5.1	Photoströme des pSRII und pSRII-F86D	74
3.5.2	Photoströme des pSRII-L40T/F86D	82
3.5.3	Photoströme des sSRII	83
3.5.4	Photoströme des SRI	85
3.5.5	Photoströme der SR/Htr-Komplexe	90
4	Diskussion	96
4.1	Expression der sensorischen Rhodopsine in <i>E. coli</i>	96
4.2	Expression der SR's und SR/Htr-Komplexe in <i>Xenopus</i> -Oocyten	98
4.3	Photozyklen der SR`s	99
4.4	Physiologische Interpretation der SR-Photozyklen	109
4.5	Die Wechselwirkungen der Rezeptoren mit ihren Transducern	111
5	Zusammenfassung	116
6	Literaturverzeichnis	118
7	Anhang	125

Abkürzungen

Abb	Abbildung
BLM	black-lipid-membrane
bp	Basenpaar
cRNA	kodierende RNA
CheA	Chemotaxisprotein A
CheB	Chemotaxisprotein B
CheR	Chemotaxisprotein R
CheW	Chemotaxisprotein W
CheY	Chemotaxisprotein Y
CheZ	Chemotaxisprotein Z
DM	N-Dodecylmaltosid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
ESR	Elektronen-spin-Resonanz
<i>H. salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
Htr	halobakterieller Transducer des Rhodopsins
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilodalton
MES	2-Morpholineethansulfonsäure
MCP	methyl accepting chemotaxis protein
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
<i>N. pharaonis</i>	<i>Natronobacterium pharaonis</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pHtrII	pharaonis Transducer des sensorischen Rhodopsins II
pSRII	pharaonis sensorischen Rhodopsin
rbs	ribosomale Bindungsstelle
Rho	Rhodopsin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	Sensorisches Rhodopsin
Tab.	Tabelle
TEA-Cl	Tetraethylammoniumchlorid
VC	Voltage-Clamp
wt	Wildtyp

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

1. Einleitung

In jedem Lebewesen und jeder Zelle existieren faszinierende molekulare Netzwerke die Reize aus der Umwelt empfangen, verarbeiten und schließlich eine physiologische Reaktion auslösen. Diese Netzwerke, auch Signaltransduktionskaskaden genannt, werden durch die Wechselwirkung zahlreicher Proteine wie z. B. Enzyme, Kinasen, Ionenkanäle gesteuert.

Am Anfang einer Kaskade steht jedoch immer die Wahrnehmung des Reizes durch einen Rezeptor. In höheren Organismen spielen Sieben-Helix-Rezeptoren (GPCR's), die mit einem guanylnucleotid-bindenden Protein (G-Protein) gekoppelt sind, eine Schlüsselrolle in unzähligen sensorischen und hormonellen Signalkaskaden. Es verwundert daher nicht, daß ein Großteil von Arzneimitteln auf derartige Rezeptoren wirken.

Rhodopsine, die als photoaktive Pigmente in allen Domänen des Lebens (Eukaria, Archaea, Eubacteria) vorkommen, dienen als Modell für transmembrane Sieben-Helix-Rezeptoren. Im Tierreich der Eukaria vermittelt das Rhodopsin (Rho) über das G-Protein Transducin den komplexen Sehprozeß (Wald (1968)). In Archaeobakterien stellen die sensorischen Rhodopsine (SR's) ebenfalls Photorezeptoren dar, daneben dienen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) als lichtgetriebene Ionenpumpen. Erst kürzlich entdeckte man im Schimmelpilz *Neurospora crassa* und im Planktonbakterium *g-Proteobacteria* Rhodopsine, deren physiologische Funktion bisher unbekannt ist (Biezke et al. (1999), Bèjà et al. (2000)). Alle Rhodopsine besitzen die gleichen Strukturmerkmale. Sieben transmembrane Helices bilden eine Bindungstasche, in der Retinal als Chromophor kovalent über eine protonierte Schiff'sche Base (SB) an einen konservierten Lysinrest gebunden ist. Licht aus dem sichtbaren Spektralbereich aktiviert die Pigmente und induziert eine zyklische Reaktion (Photozyklus).

Zum Verständnis, wie die Rezeptoren den Lichtreiz über die Membran ins Innere der Zelle transportieren, bietet sich die Untersuchung der archaeobakteriellen sensorischen Rhodopsine an, denn sie vermitteln einen im Vergleich zu höheren Organismen relativ primitiven Sehprozeß, genannt Phototaxis.

Am besten ist das in gesättigten Salzlösungen lebende *Halobacterium salinarum* untersucht, dessen Plasmamembran neben den beiden Photorezeptoren SRI und SRII auch die Ionenpumpen BR und HR enthält (siehe Abbildung 1.1).

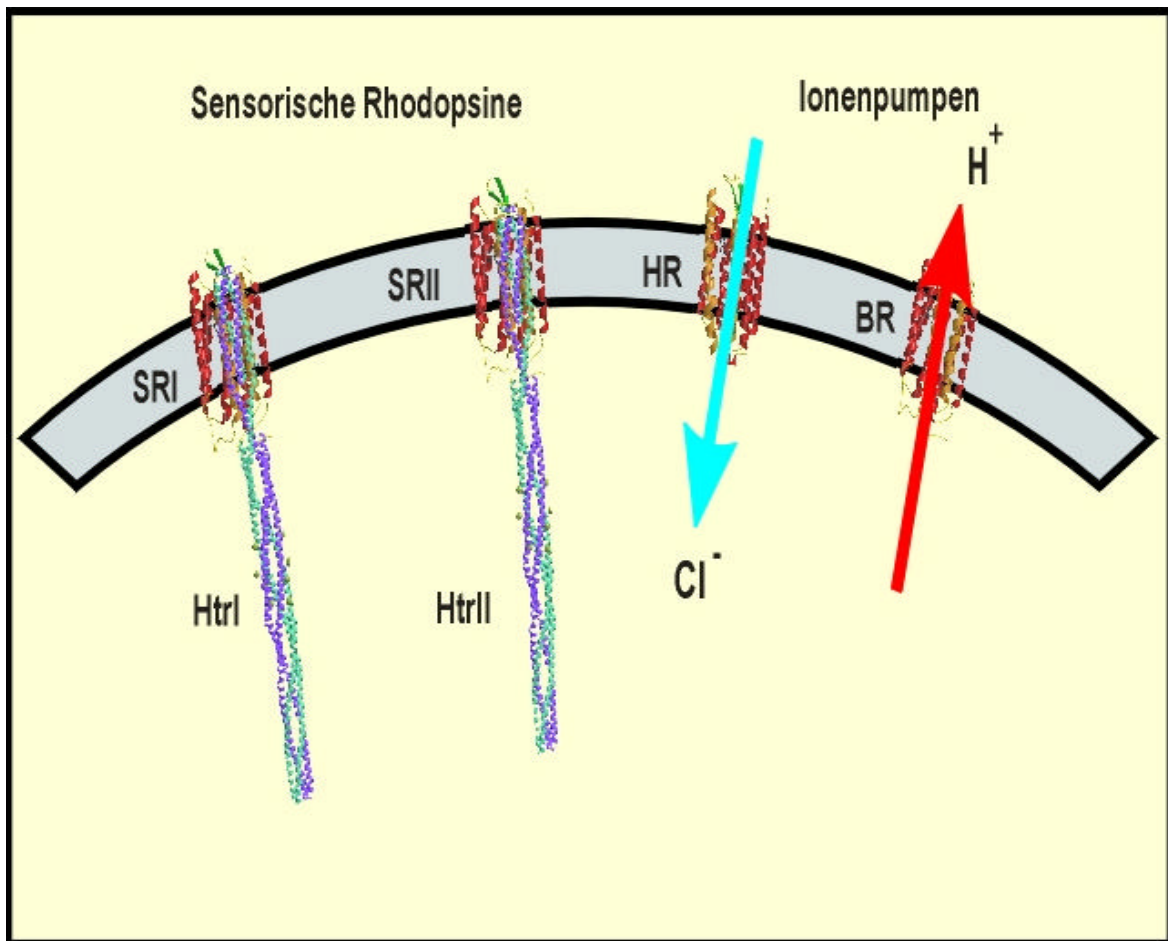


Abb. 1.1 Archäobakterielle Rhodopsine. In der Plasmamembran des *Halobacterium salinarum* befinden sich alle dargestellten Pigmente. Die Kristallstrukturen des BR und HR sind aus Sass et al. (2000) und Kolbe et al. (2000) entnommen. Kristallstrukturen der sensorischen Rhodopsine und ihrer Transducer liegen nicht vor. SR's werden daher durch BR und Htr's durch den Chemorezeptor Tsr (Kim et al. (1999) repräsentiert.

H. salinarum reagiert zur optimalen Anpassung an die Lichtverhältnisse selektiv auf Änderungen der Lichtintensität. Zur Fortbewegung dienen dem stäbchenförmigen Archaeon rotierende Flagellenbündel, die an einen Geißelmotor gekoppelt sind. Unter stationären Bedingungen wechselt die Drehrichtung der Flagellen alle 20-30 Sekunden spontan, was zu einer ungerichteten Bewegung führt (Hildebrand und Schimz (1986), Spudich und Bogomolni (1988)). Eine Intensitätszunahme von anziehendem, orangefarbenen oder abstoßendem, blauen bzw. UV-Licht verringert oder erhöht die Umkehrfrequenz des Geißelmotors. Auf diese Weise finden die Zellen den optimalen spektralen Bereich für die Aktivierung der Ionenpumpen BR und HR (Hildebrand und

Dencher (1975), Marwan und Oesterhelt (1990)). SRI und SRII vermitteln die Phototaxis in *H. salinarum*. SRI ist für die photophile Antwort auf orangefarbens Licht verantwortlich, während SRII sowie ein langlebiges Photointermediat des SRI eine photophobe Reaktion auf blaues bzw. UV-Licht auslösen (Spudich und Bogomolni (1984), Bogomolni und Spudich (1982)). In anderen Archaeobakterien existieren analoge Rezeptoren, z.B. entspricht pSRII aus *Natronobacterium pharaonis*, auch Phoborhodopsin genannt, dem SRII (Seidel et al. (1995)). Im Gegensatz zu den Rhodopsinen der höheren Organismen aktivieren die archaeobakteriellen Photorezeptoren kein G-Protein gekoppeltes Netzwerk, sondern eine 2-Komponenten Signaltransduktionskaskade, wie man sie aus der eubakteriellen Chemotaxis kennt (zusammengefaßt in Falke (1997)). In Abbildung 1.2 ist ein vereinfachtes Schema der archaeobakteriellen Phototaxis wiedergegeben.

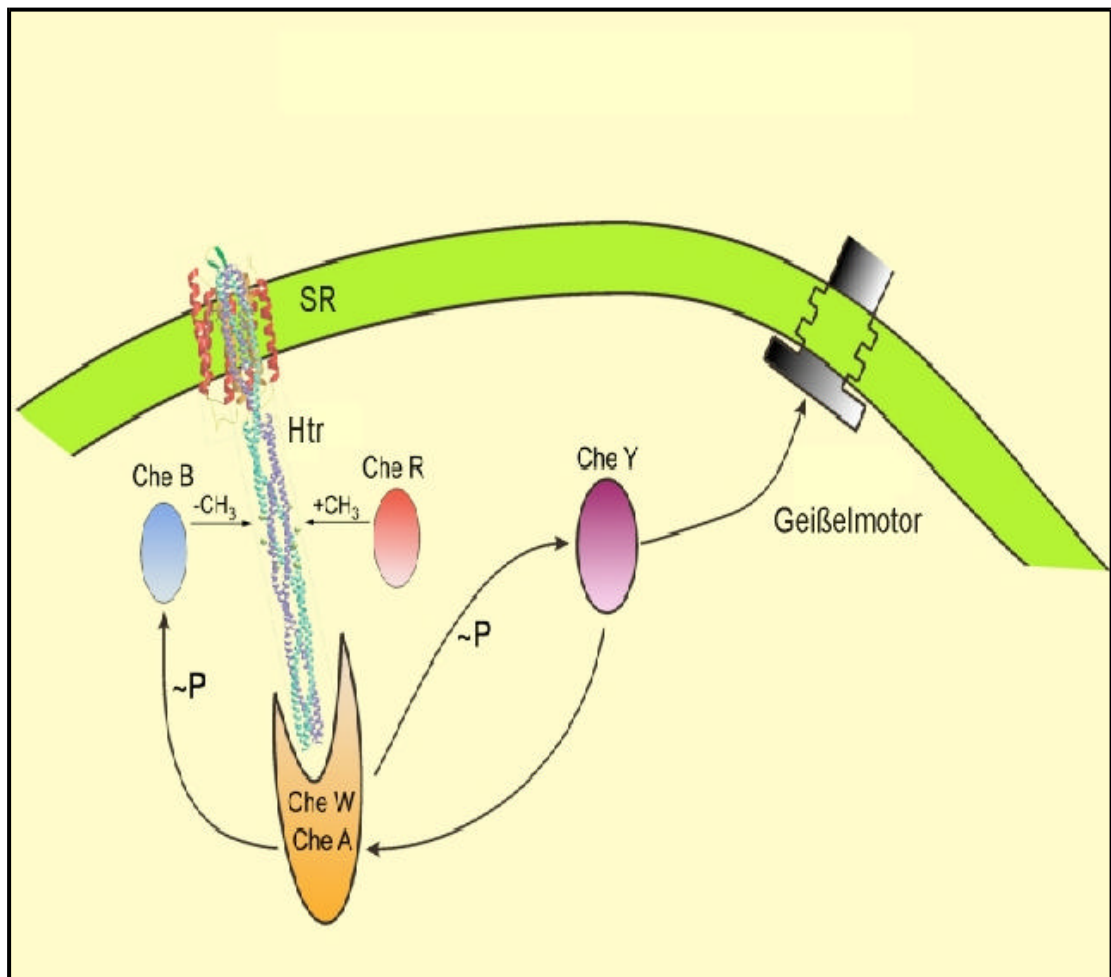


Abb. 1.2 Archaeobakterielle Phototaxis

Die Phototaxis wird durch die Absorption eines Photons eingeleitet, die eine zyklische Reaktion der Rezeptoren induziert. Während dieses Photozyklus durchlaufen die SR's verschiedenen Intermediate und treten mit ihren halobakteriellen Transducern (Htr's) in Wechselwirkung. Die Transducer HtrI und HtrII zeigen auffallende strukturelle Ähnlichkeit zu den Chemorezeptoren (MCP's) der Eubakterien, wie z.B. dem Aspartatrezeptor (Tar) oder dem Serinrezeptor (Tsr). Sie bestehen aus zwei transmembranen Helices (TM) und einer zytoplasmatischen Domäne, die mit dem Netzwerk im Inneren der Zelle in Wechselwirkung tritt. Die Signalverarbeitung im Zytoplasma erfolgt analog zur Chemotaxis in *Escherischia coli* (Rudolph und Oesterhelt, (1994, 1996)). Htr reguliert wie z.B. der Aspartatrezeptor Tar die Aktivität der Histidinkinase CheA, die mit dem Kopplungsprotein CheW assoziiert ist. CheA überträgt eine Phosphatgruppe auf ein Regulatorprotein CheY, welches im phosphorylierten Zustand an den Geißelmotor bindet und dessen Umkehrfrequenz moduliert. Neben CheY phosphoryliert CheA eine Methylesterase CheB, welche daraufhin das Htr demethyliert. Da der Methylierungsgrad des Transducers die Aktivierung von CheA bestimmt, ermöglicht diese autokatalytische Verzweigung die Adaptation des Signals. Zusätzlich wird das Regulatorprotein CheY durch Dephosphorylierung abgeschaltet, was entweder autokatalytisch oder durch eine Phosphatase CheZ erfolgt. Hierdurch wird die Signalgebung nach einer Stimulation zeitlich begrenzt und die Empfindlichkeit des phototaktischen Systems regeneriert.

Im Gegensatz zur Verarbeitung des Lichtreizes durch die zytoplasmatischen Komponenten der Signaltransduktionskette liegen über die einleitende Reizaufnahme durch den membrangebundenen Rezeptor und die Signalweitergabe an den Transducer kaum Informationen vor. Grundlage für das Verständnis der Rezeptor/Transducer Wechselwirkung ist eine genaue Kenntnis des Photozyklus der sensorischen Rhodopsine.

Was passiert, wenn der Rezeptor ein Photon absorbiert?

Die Beantwortung dieser Frage erleichtern umfangreiche Informationen über die Protonenpumpe BR, das als erstes archaebakterielles Rhodopsin von Oesterhelt und Stoeckenius (1971) entdeckt wurde und große strukturelle Ähnlichkeit zu den Photorezeptoren aufweist. Bis heute ist der Photozyklus des BR Gegenstand unzähliger Untersuchungen mit einer großen Bandbreite biophysikalischer Methoden. Da sich die Absorptionseigenschaften aller Rhodopsine nach der Absorption eines Photons ändern, eignet sich die Laserblitz-Spektroskopie zur spektralen und kinetischen Charakterisierung der Photointermediate des Photozyklus. Mit Hilfe dieser Methode stellte erstmalig Lozier

et al. (1975) ein Modell des BR-Photozyklus auf. Demnach durchläuft das BR in einer Sequenz irreversibler Folgereaktionen, die anhand ihrer Absorptionsspektren identifizierten Intermediate K, L, M, N und O.

Spätere Untersuchungen zeigen, daß BR in seiner thermischen Relaxation nicht nur diese fünf, sondern mindestens sieben Intermediate durchläuft. Weil aber nur die fünf spektralen Spezies K, L, M, N und O bekannt sind, mußte das einfache Modell von Lozier et al. (1975) im Laufe der Zeit durch die Einführung von Parallel-, Verzweigungs- und Gleichgewichtsreaktionen modifiziert werden (zusammengefaßt in Lanyi und Varo (1995)). Chizhov et al. (1996) postulieren schnelle Quasigleichgewichte zwischen den spektralen Intermediaten und kehren formal zum simplen sequenziellen Reaktionsschema zurück.

Neben der kinetischen Charakterisierung des BR-Photozyklus wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften der Ionenpumpe eingehend untersucht. Racker und Stoeckenius (1974) entdeckten bereits sehr früh nach seiner Entdeckung, daß BR Protonen aus der Zelle pumpt. Detaillierte Informationen über den Protonentransport lieferten dann insbesondere Untersuchungen mit der Black-Lipid Membrane Technik (Bamberg (1979)). In Verbindung mit IR-spektroskopischen Messungen konnten die Schlüsselschritte des Pumpmechanismus weitgehend aufgeklärt werden (Engelhard et al. (1995), Gerwert et al. (1989)). Eine jüngere Entwicklung auf diesem Gebiet ist die funktionelle Expression von BR in *Xenopus*-Oocyten, die eine elektrophysiologische Analyse mit Voltage- und Patch-Clamp Techniken ermöglicht (Nagel et al. (1995), (1998)).

Aktuelle, hochaufgelöste Kristallstrukturen des BR und seiner Intermediate K und M und N sichern die Erkenntnisse aus den biophysikalischen Studien ab, so daß ein verlässlicher Mechanismus des Photozyklus zur Verfügung steht (Strukturen zusammengefaßt in Kühlbrandt (2000)).

Die Absorption eines Photons induziert eine all-trans/13-cis Isomerisierung des Retinals (BR-K) innerhalb von wenigen Picosekunden (Dobler et al. (1988)), auf die das Protein innerhalb einer Mikrosekunde mit Konformationsänderungen (K-L) reagiert (Braiman und Mathies, (1982)). Hierdurch ändern sich die Protonenaffinitäten verschiedener Aminosäurereste und die SB protoniert Asp85 im extrazellulären Protonenkanal (L-M) (Butt et al. (1988), Braiman et al. (1988)). An die Deprotonierung der SB ist die Abgabe eines Protons über Arg85 und Glu204 an das Medium gekoppelt (Richter et al. (1994), Balashov et al. (1997)). Im M-Zustand, dessen Bildung nach etwa 50 Mikrosekunden abgeschlossen ist, wechselt die SB nach ihrer Deprotonierung ihre Orientierung zum

Inneren der Zelle, worauf das zytoplasmatische Ende der Helix F um $3,5 \text{ \AA}$ ausschwingt und den Protonenkanal öffnet (Subramamin und Henderson (2000), Luecke et al. (1999)). Daraufhin protoniert Asp96 die SB von der zytoplasmatischen Seite (M-N) (Butt et al. (1989)). Schließlich reisomerisiert das Retinal (N-O) und innerhalb von 10 Millisekunden relaxiert BR unter Konformationsänderungen in den Grundzustand (O-BR), wobei Asp96 und Asp85 ihren ursprünglichen Protonierungszustand einnehmen.

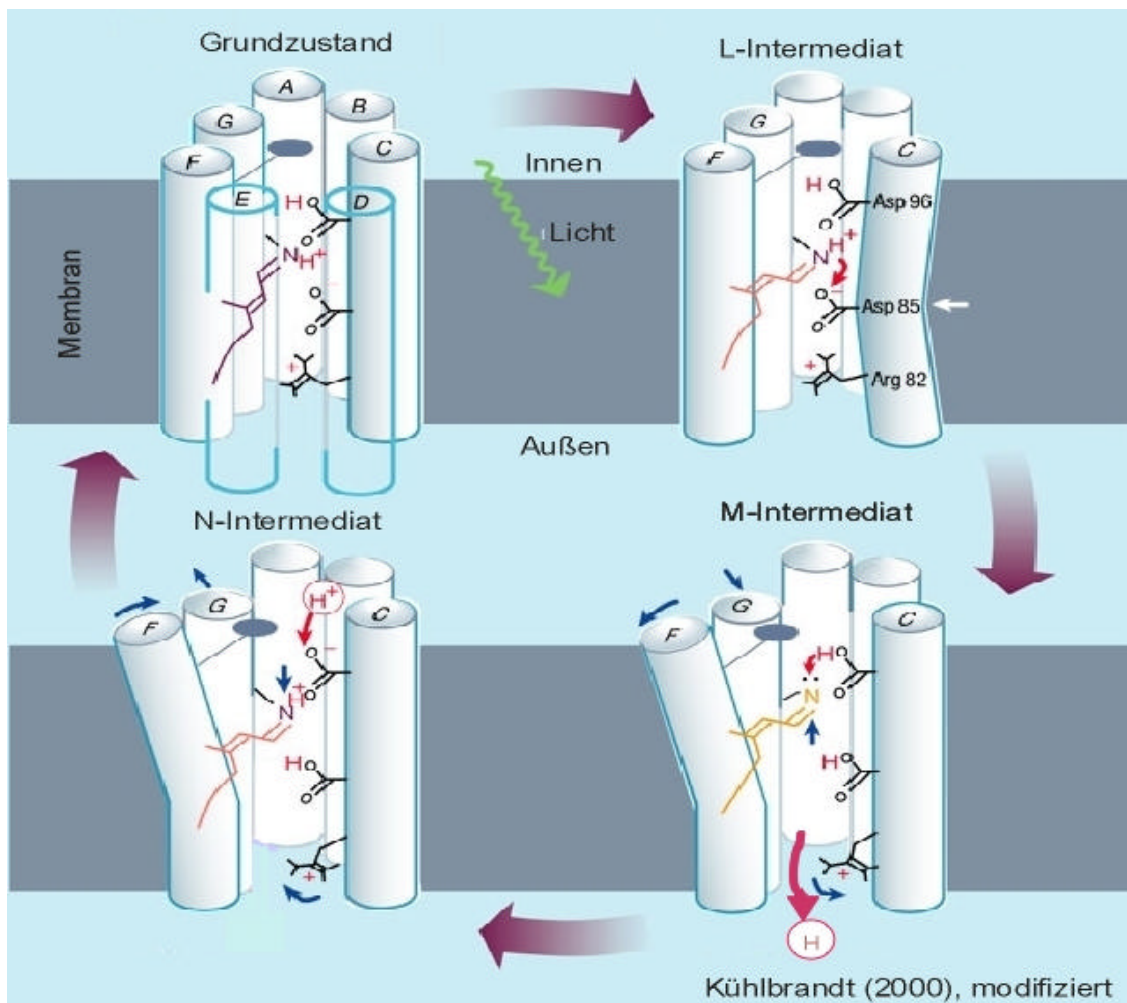


Abb. 1.3 Schema des BR-Photozyklus

Derart detaillierte Informationen über die Photozyklen der sensorischen Rhodopsine gibt es bislang nicht. Ähnlichkeiten zum BR sind aber offensichtlich: Die Rezeptoren SRI, SRII und pSRII durchlaufen alle die Intermediate K, L und M (Bogomolni et al., 1987, Scharf et al. (1992)). Für das SRII (*H. salinarum*) und pSRII (*N. pharaonis*) ist auch das O-Intermediat nachgewiesen (Tomioka et al. (1985), Imamoto et al. (1992)). Ein

N-Intermediat ist bisher für kein SR bekannt. Auffallend ist, daß die Photozyklen der Rezeptoren im Vergleich zur Protonenpumpe BR etwa 100fach langsamer sind, wobei in allen SR's die Lebensdauer des M-Intermediates auf >500 ms vergrößert ist. In dieser Eigenschaft spiegelt sich die Rezeptorfunktion der sensorischen Rhodopsine wieder, die ein langlebiges Intermediat für die Signalübertragung erfordert. Im Falle des SRI ist diese Notwendigkeit leicht einsehbar, weil das M-Intermediat als photophober Rezeptor für blaues Licht dient.

Ebenso wie die Kinetik der Photozyklen, sind die elektrophysiologischen Eigenschaften der Rezeptoren nur ungenau bestimmt und es liegen z.T. widersprüchliche Ergebnisse vor. Am besten untersucht ist SRI, dessen Fähigkeit Protonen aus dem Zytoplasma zu pumpen, eindeutig belegt ist. Jedoch ist der Mechanismus unklar - während Bogomolni et al. (1994) einen 1-Photonenprozeß wie beim BR annehmen, postulieren Haupts et al. (1995, 1996) einen 2-Photonenprozeß, bei dem das M-Intermediat das zweite Photon absorbiert.

Der Protonentransport der photophoben Rezeptoren SR_{II} und pSR_{II} ist ungeklärt. Sasaki et al. (1999) berichten, daß der Photozyklus elektroneutral ist, weil die Protonenauf- und abgabe von der gleichen (extrazellulären) Seite erfolgt. Lüttenberg (1999) und Imamoto et al. (1999) vermuten hingegen mit einem auswärts gerichteten Protonentransport einen elektrogenen Photozyklus des homologen pSR_{II}.

Eine exakte Kenntnis der Protonentransferreaktionen ist von großer Bedeutung, denn sie spielen eine essentielle Rolle in der Signaltransduktion. Verhindert man z.B. beim SR_{II} durch ortsspezifische Mutagenese den Protonentransfer von der SB auf die primäre Akzeptorgruppe Asp73 (Asp85 im BR), ist der Rezeptor konstitutiv aktiviert (Spudich et al. (1998)). Das gleiche Phänomen beobachtet man auch für das G-Protein gekoppelte menschliche Rhodopsin (Rao und Oprrian, (1996), Fahmy et al. (1995)). Wahrscheinlich gibt es demnach zwischen den archaebakteriellen und den eukaryontischen Rezeptoren trotz ihrer evolutionären Entfernung gemeinsame funktionelle Mechanismen zur Signalweitergabe, die unabhängig von der folgenden Signalkaskade sind.

Für die archaebakteriellen Rezeptoren kennzeichnen Protonentransferreaktionen auch die Wechselwirkung mit ihren Transducern. So beeinflußt HtrI die elektrophysiologischen Eigenschaften des SRI beträchtlich. Bogomolni et al. (1994) beobachten eine komplette Hemmung des Protonenpumpens durch die Bindung des HtrI. Weil zudem im SRI/HtrI-Komplex die Kinetik der SB-Reprotonierung (M-Zerfall) seine pH-Abhängigkeit verliert, spekulieren Spudich und Mitarbeiter, daß HtrI den zytoplasmatische Protonenkanal blockiert (Spudich und Spudich (1993), Spudich (1994)). Der Effekt des HtrI auf den

Protonentransport des SRI ist aber nicht eindeutig geklärt, denn Haupts et al. (1996) beobachteten keine Inhibierung des Pumpens durch HtrI, sondern einen einwärts gerichteten Protonenstrom.

Im Falle der photophoben Rezeptoren SRII und pSRII liefern die experimentellen Befunde ebenfalls kein einheitliches Bild – HtrII hat zwar einen Einfluß auf die Kinetik des SRII-Photozyklus, aber nicht auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors (Sasaki und Spudich (1998), Sasaki et al. (1999)). Beim pSRII hat der Transducer pHtrII dagegen keinen Effekt auf den zeitlichen Verlauf des Photozyklus (Wegener et al. (2000)). Die Ladungsverschiebungen des pSRII/HtrII-Komplexes sind bisher nicht untersucht.

Über die Domänen der Rezeptor/Transducer Wechselwirkungen liegen hingegen konsistente Informationen vor. Mutagenesestudien am SRI/HtrI-Komplex belegen, daß protonierbare Reste des HtrI die photochemischen Eigenschaften des SRI beeinflussen. Diese Reste liegen alle in einem N-terminalen Fragment, welches die ersten 147 Aminosäuren des Transducers umfaßt (Jung und Spudich (1996, 1998), Krah et al. (1994), Perazzona et al. (1996)). Anhand photochemischer und physiologischer Untersuchung chimärer Transducer demonstrierten Zhang et al. (1999), daß SRI und SRII ihre Transducer spezifisch durch die transmembranen Helices wahrnehmen.

Wie aber die Signalübertragung von den Rezeptoren auf die Transducer erfolgt, ist unklar. Vermutlich erfolgt die Aktivierung der Transducer durch Konformationsänderungen während des Photozyklus des Rezeptors (Spudich und Lanyi (1996)). Erste experimentelle Hinweise liefern aktuelle ESR-Messungen mit pSRII, die eine Ausklappbewegung der Helix-F wie beim BR belegen (Wegener et al. (2000)).

Kristallstrukturen, die näheren Aufschluß geben könnten, liegen weder für einen der Rezeptoren, noch für die Transducer oder gar für einen Komplex beider Proteine vor. Nicht einmal die Stöchiometrie der Komplexe ist bekannt – gewiß ist nur, daß HtrI in Analogie zu den Chemorezeptoren als Dimer, und der pSRII/pHtrII-Komplex im äquimolaren Verhältnis vorliegt (Zhang und Spudich (1998), Wegener, persönliche Mitteilung). Um die Rezeptor/Transducer-Wechselwirkung zu verstehen, müssen daher weiterhin zahlreiche biochemische Daten über die photochemischen Eigenschaften der Proteine gesammelt werden, aus denen allgemeine Prinzipien abgeleitet und auf ein Modell der Signaltransduktion übertragen werden können.

Zielsetzung dieser Arbeit ist die spektroskopische Charakterisierung und die elektrophysiologische Untersuchung der archaebakteriellen Rezeptor/Transducer-Komplexe. Bei allen Untersuchungen richtet sich das Hauptaugenmerk auf das pSRII/pHtrII-System aus *N. pharaonis*, weil sich pSRII gegenüber den halobakteriellen SRI und SRII durch eine größere Stabilität, Zugänglichkeit und einfacherer Photochemie auszeichnet (Scharf et al. (1992), Hohenfeld et al. (1998)).

Zunächst sollen mittels zeitaufgelöster Laserblitz-Spektroskopie die Photozyklen des SRI und pSRII kinetisch analysiert werden. Hierbei sollen insbesondere die Unterschiede zur Ionenpumpe BR und deren strukturellen Ursachen durch ortsspezifische Mutagenese geklärt werden. Dem geht die Expression der Pigmente in *E. coli* voraus, die im Falle eines halobakteriellen SR's bisher nicht beschrieben ist.

Der Schwerpunkt der Arbeit liegt bei der elektrophysiologischen Charakterisierung der Rezeptoren und der Rezeptor/Transducer-Komplexe. Um dies zu ermöglichen soll das *Xenopus*-Expressionssystem für die sensorischen Rhodopsine und ihrer Transducer etabliert werden. Dieser unkonventionelle Ansatz begründet sich durch die funktionelle Expression des BR in *Xenopus*-Oocyten durch Bamberg und Mitarbeitern, mit der erstmalig ein prokaryontisches Protein mit leistungsstarken Voltage- und Patch-Clamp Techniken untersucht werden konnte (Nagel et al. (1995, 1998)). Die elektrophysiologische Charakterisierung der Rezeptoren soll zusätzlich durch die BLM-Technik ergänzt und abgesichert werden.

Mit der heterologen Expression der Proteine in *Xenopus*-Oocyten sollen die elektrophysiologischen Eigenschaften der sensorischen Rhodopsine und der mögliche Einfluß ihrer Transducer analysiert werden. Geplant ist mit diesem Ansatz ein Assay zur Detektion der Rezeptor/Transducer-Interaktion zu entwickeln, mit dem der Signalgebungsmechanismus z.B. durch Mutagenesestudien untersucht werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.a. Qualität und stammten von den Firmen Aldrich (Heidenheim), Baker (Groß-Gerau), Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm), Gibco-BRL (Neu Isenburg), Merck (Darmstadt) Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim).

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Pharmacia (Freiburg) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte ausschließlich mit dem Expand High Fidelity PCR-System von Boehringer (Mannheim).

Ligationen wurden mit der T4 DNA Ligase von Gibco BRL (Neu Isenburg) durchgeführt. RNaseA stammte von Boehringer (Mannheim), ebenso wie Kolagenase A.

Der verwendete Proteinmarker von Bio-Rad (München) enthielt Phosphorylase B, Rinder Serum Albumin, Ovalbumin, Kohlenstoffanhydrase, Trypsin Inhibitor (Sojabohne) und Lysozym.

Der 1kB DNA-Marker stammte von Gibco BRL (Neu Isenburg).

Die verwendeten Antibiotika waren von Sigma (Steinheim), Caseinhydrolysat und der Hefe-Extrakt von Gibco BRL (Neu Isenburg).

Die Reinigung der Proteine mit Histidin-Tag erfolgte mit Ni^{2+} -Agarose der Firma Qiagen (Hilden). Zur Reinigung von Plasmid-DNA wurde ein Kit ebenfalls von Qiagen benutzt.

2.2 Instrumentation

Die Inkubation der *E. coli* Bakterien erfolgte in einem Schüttler der Firma New Brunswick (Nürtingen). Der Fermenter für die Zellanzucht stammte von der Firma Biotech International (Melsungen). Aufgeschlossen wurden die Zellen mit dem Microfluidizer M-110S von Microfluidics Corporation (Newton, USA).

Zur Transformation kompetenter *E. coli* Zellen durch Elektroporation wurde der GenePulser der Firma Bio-Rad (München) verwendet.

PCR erfolgten mit dem PCR-Express System von Hybaid (Heidelberg).

DNA-Sequenzierungen erfolgten mit dem 373 Sequenzierungsgerät von Applied Biosystems.

SDS-PAGE Analysen wurden mit dem Mini-ProteanII von Bio-Rad (München) durchgeführt.

Zur Einengung von Proteinlösungen wurden Micro- und Nanoseps der Firma Pall Filtron (Dreieich) benutzt.

Die Säulenchromatographische Proteinreinigung erfolgte mit Säulen der Firma Bio-Rad.

UV/VIS-Spektren wurden mit den Spektrometern Lambda 9 von Perkin Elmer und DU 650 der Firma Beckman aufgenommen.

Die Beschallung rekonstituierter Proteine erfolgte mit einem Stab Branson Sonifier 250 der Firma Heinemann (Schwäbisch Gmünd) oder einem Bad Laboson 200 von Bender und Hobein (Ismaning).

2.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

E. coli XL1-Blue F^- : Tn 10 *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^f **D**(*lacZ*)*M15/recA1 endA1 gyrA96*(NaI^r) *thi hsdR17* (*r_k*⁻ *m_k*⁺) *supE44 relA1 lac* (Bullock et al., 1987)

E. coli BL21(DE3) F^- *ompT [Ion] hsdS_B* (*r_B*⁻ *m_B*⁻) **I**(DE3) Studier und Moffatt, 1986)

pET27	Novagen
pET27bmod	Derivat des pET27 (Hohenfeld et al. (1999))
psopFSEco	Ferrando-May et al. (1993)
pNK4	Derivat des pNKS2-myc (Gloor et al. (1993))

Die im folgenden aufgeführten Oligonukleotide wurden mit einem Beckman Oligo 1000 synthetisiert und über eine NAP-10 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) entsalzt.

T7prom primer	5'TAATACGACTCACTATAGGG3'
T7term primer	5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG3'
sopIhin	5'TGGTGCGCCATGGACGCCGTCGCAA3'
sopIEcI	5'GGGGACGGAATTCTCGTCCGC3'
psopII86Dhin	5'CATCGTCTACGACCTCGGGCTGC3'
psopII86Drev	5'GCAGCCCGAGGCTGTAGACGATG3'
psopII40Thin	5'TACTACGTGACGACCGTCGGCATCAGT3'
psopII40trev	5'ACTGATGCCGACGGTCGTCACGTAGTA3'
psopIIR162Ahin	5'TCGCTGTACGTCGCCCTCCGAAAC3'
psopIIR162Arev	5'GTTTCGGAGGGCGACGTACAGCGA3'
psopIIR164Ahin	5'ACGTCCGCCTCGCAAACCTGACG3'
psopIIR164Arev	5'CGTCAGGTTTGCGAGGCGGACGT3'
Nc-1	5'CGCGTCAATAACACCCCATGGCGCTG3'
Ec-1	5'CCAGCGGCTGCTCTTAAGCGGACAA3'
pHtrII-Psthin	5'CAACACGGAAGTGCAGGCCGAAGC3'
pHtrII-Pstrev	5'GCTTCGGCCTGCAGTTCCGTGTTG3'
pHtrIIsachin	5'CGATGGAAGAGCTCAACGAAGACGT3'
pHtrIIsacrev	5'ACGTCTTCGTTGAGCTCTTCCATCG3'
pHtrIID85Nhin	5'CTGGGCGGTAACAACGCCGCCT3'
pHtrIID85Nrev	5'AGGCGGCGGTGTTACCGCCCAG3'
pHtrII-Helix-hin	5'GCTGCCACGCTGTAATGAGACACCGCC3'
pHtrII-Helix-rev	5'GGCGGTGTCTCATTACAGCGTGCCAGC3'
pHtrII-Helix+-hin	5'GACCCGTCGCTAATGAGAAATCGGCG3'
pHtrII-Helix+-rev	5'CGCCGATTTCTCATTAGCGACGGGCT3'
pHtrII-Hel-10hin	5'CCTGCTCGGGTAATGACTCGGACTCG3'
pHtrII-Hel-10rev	5'CGAGTCCGAGTCATTACCCGAGCAGG3'
pNK4Nde-hin	5'GAATAAGCTTGAGCTCGGACCAATCGGTCCCCGC- CGATCATATGGTG3'
pNK4Nde-rev	5'TGCCGACGAGCATGCCGATTGCG3'

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Zellanzucht

Die Anzucht der *E. coli* Zellen erfolgte in 2TY Medium (16 g Caseinhydrolysat, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1000 ml H₂O, pH 7,2) unter Verwendung von 5 ml Reagenzgläsern oder 25-5000 ml Erlenmeyerkolben bei 37°C und 200 Upm in einem Schüttler. Für die Anzucht größerer Mengen *E. coli* Bakterien zur Proteinpräparation wurde ein 30 l Fermenter der Firma Braun Biotech GmbH (Melsungen) benutzt. Die Zellvermehrung wurde durch Trübungsmessung spektrometrisch durch die Bestimmung der Absorption bei 578 nm verfolgt. Bei Kulturen, die ein pET-Plasmid enthalten, wurden dem Medium 50 mg/l des Antibiotikums Kanamycin, denen mit pUCBM20- oder pNK4-Plasmiden 100 mg/l Ampicilin zugesetzt.

2.4.2 Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierbei wurden die DNA-Proben in Probenpuffer (TBE-Puffer, 10 % Ficoll, 0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylencyanol) aufgenommen und auf Gele mit 0,7 – 1,2 % Agarose in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,9 mM EDTA, pH 8,9) gegeben. Durch Zugabe von 0,6 mg/l Etidiumbromid wurden die DNA-Banden gefärbt. Die Trennung der DNA-Fragmente wurde durch das Anlegen einer Spannung von 3-4,5 V/cm erreicht. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde das Gel-Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet, nachdem die gewünschte Bande unter UV-Licht (360 nm) aus dem Gel geschnitten wurde.

2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA für analytische Restriktionen wurde nach alkalischer Lyse der *E. coli* Zellen nach Birnboim und Doly (1979) isoliert, indem die genomische DNA durch Zentrifugation entfernt und der Überstand mit zwei Volumenäquivalenten Chloroform/Phenol (1:1 v/v) und anschließend zweimal mit einem Volumenäquivalent Chloroform extrahiert wurde.

Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 2,5 Volumenäquivalente Ethanol zugesetzt, 10 min bei 0°C inkubiert, und 10 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Das DNA-Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

Die präparative Isolierung von Plasmiden erfolgte mittels der Anionenaustauschersäulen Qia-Tip-20 und Qia-Tip-100 eines QiaGen-Kits (Hilden). Abweichend von der Arbeitsvorschrift des Herstellers wurde vor dem Auftragen des Lysats auf die Säule ein RNase Verdau durch Zugabe von 10 µg/ml RNase A und einstündiger Inkubation bei 37°C durchgeführt.

2.4.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mittels PCR (Mullis und Faloona (1987)) amplifiziert. In der Regel wurden 10 ng DNA-Matrize, 25 pmol Primer, 5 nmol jedes dNTP's und 1 u Hifi-Polymerase (Boehringer Mannheim) in 50 µl Ansätzen verwendet. Die Amplifikation der DNA im Thermocycler erfolgte in zwei Schritten, wobei fünf Zyklen mit 15 s bei 97°C, 30 s bei 58-65°C (abhängig von der Hybridisierungstemperatur der Primer, die über die Basenzusammensetzung abgeschätzt wurde) und 45 s bei 72°C und anschließend zehn Zyklen mit 15 s bei 97°C und 60 s bei 72°C durchlaufen wurden.

Ortsspezifische Mutationen wurden mit der "Overlap Extension" Methode nach Ho et al. (1989) eingeführt.

2.4.5 Restriktion von DNA

DNA wurde durch 1,5h Inkubation bei 37°C mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten. Die Menge des eingesetzten Enzyms sowie die Wahl des Puffers erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.4.6 Ligation von DNA Fragmenten

Bei der DNA-Ligation wurden 50 ng Plasmid-DNA und die 2-fache molare Menge des Fragmentes mit 1 u T4 DNA Ligase in 50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT und 5 % (w/v) PEG 8000 bei pH 7,6 in einem Volumen von 20 µl ü.N. bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Ligase durch 15minütiges Erhitzen des Ansatzes bei 65°C.

2.4.7 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* Bakterien wurden durch Elektroporation mit Plasmid-DNA nach der Methode von Dower et al. (1988) transformiert. Hierzu wurden 5 µl aus dem Ligationsansatz (s. 2.4.6) mit 15 µl H₂O verdünnt, mit 70 µl einer 10 % Glycerinsuspension kompetenter Zellen (OD₅₇₈ ≈ 100) vermengt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die Transformation erfolgte mit einem GenePulser (BioRad, München) durch einen Puls von 1,5 kV, 800 Ω, 25 µF und einer Zeitkonstante von 10 ± 2s. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 2TY-Medium aufgenommen, 1h bei 37°C und 200 Upm geschüttelt und auf antibiotikahaltigen 2TY-Agar Platten ausplattiert.

2.4.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem ABI 373 DNA Sequenzierungsapparat von Applied Biosystems auf der Basis fluoreszenzmarkierter Terminatoren nach Angaben des Herstellers.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Expression und Isolierung des pSRII-His und Mutanten in *E.coli*

Die Expression von pSRII erfolgte in Anlehnung an die Methoden von Shimono et al. (1997) und Hohenfeld et al. (1999). 2TY-Medium mit 50 mg/l Kanamycin wurden mit einer Vorkultur auf eine $OD_{578} = 0,05$ angeimpft. Bei einer $OD_{578} = 0,6$ wurde die Expression durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und *all-trans* Retinal (10 μ M Endkonzentration) zugesetzt. 2h nach Induktion wurden die Zellen durch 20minütige Zentrifugation bei 4500 x g und 4°C geerntet, mit Aufschlußpuffer (300 mM NaCl, 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,2) gewaschen und nach der Resuspendierung mechanisch mittels eines Microfluidizers bei 1000 bar aufgeschlossen. Anschließend wurden zunächst durch 45minütige Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C die Zelltrümmer entfernt und danach durch 1h Zentrifugation bei 100.000 x g und 4°C die Zellmembranen isoliert. Zur Solubilisierung der Membranen wurden diese in Aufschlußpuffer mit 2 % DM resuspendiert und 2h bei 4°C moderat gerührt. Nach 1h Zentrifugation bei 100.000 x g und 4 °C wurde der Überstand 1h bei 4°C mit Ni-NTA Agarose geschwenkt. Danach wurde die proteinbeladene Ni-NTA Agarose auf eine Säule gegeben und mit Waschpuffer (300 mM NaCl, 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0,1 % DM (w/v), 50 mM Imidazol, pH 7.2) gewaschen, bis weder Retinal ($\lambda_{\text{max}} = 360$ nm), Cytochrome ($\lambda_{\text{max}} = 410$ nm) und unspezifisch gebundene Proteine ($\lambda_{\text{max}} = 280$ nm) im Eluat absorptionspektrometrisch detektiert werden konnten. Im letzten Schritt wurde das gereinigte pSRII-His (bzw. pSRII-His Mutanten) durch Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 150 mM eluiert.

2.5.2 Rekonstitution in PM-Lipide

Für die Rekonstitution der sensorischen Rhodopsine wurden den solubilisierten Proben in einem Volumen von 1-2 ml ein 15-facher molarer Überschuß an PM-Lipiden ($M_r \approx 1000$ g/mol) sowie 30 % (v/v) Detergenz-adsorbierende Bio-Beads SM-2 (Biorad, München) zugesetzt und das Gemisch ü.N. oder mindestens 3h geschwenkt. Anschließend wurden die Bio-Beads durch Filtration entfernt, das rekonstituierte Protein durch 1h Zentrifugation bei

100000 x g und 4°C pelletiert und in Detergenz-freien Puffer aufgenommen. Durch eine Ultraschall Behandlung wurden Lipidaggregate gelöst.

2.5.3 Expression der sensorischen Rhodopsine in *Xenopus*-Oocyten

***In vitro* Transkription von cRNA**

Die *in-vitro* Transkription von cRNA erfolgte mit dem SP6-mMessageMachine –Kit der Firma Ambion nach Angaben des Herstellers. Als DNA-Matrize wurden 0,5 – 1 µg der XbaI-linearisierten Plasmide pNK4 und pNK4mod verwendet. Die cRNA, welche mit einer Ausbeute von 10 – 15 µg isoliert werden konnte, wurde in DEPC-Wasser aufgenommen, so daß eine Konzentration von 0,8 – 1 µg/µl cRNA vorlag. Das Produkt wurde aliquotiert und bei – 80°C gelagert.

Präparation von *Xenopus*-Oocyten

Die Oocyten wurden von verschiedenen Mitarbeitern des MPI für Biophysik in Frankfurt aus Ovarmaterial weiblicher, geschlechtsreifer Frösche operativ entnommen. Das Ovargewebe wurde in ORI aufgenommen, mittels Pinzetten mechanisch entflechtet und das Bindegewebe partiell durch Zugabe von Kollagenase A (30 mg/ml) enzymatisch verdaut. Bei 18°C lösten sich die Mehrzahl der Oocyten vom Bindegewebe. Nach mehrmaligen Waschen der isolierten Oocyten wurden diese in ORI gelagert und für die Mikroinjektion selektiert.

ORI: 110mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,6 (220 mosM)

Mikroinjektion von cRNA in *Xenopus*-Oocyten

Die Injektion von cRNA erfolgte durch eine mechanisch ausgezogene Glaskapillare mit einem inneren Durchmesser von 26-32 µm in der Spitze, die auf eine Injektionspumpe gespannt wurde. Für die Untersuchung der sensorischen Rhodopsine wurde die Injektionsmenge variiert, in der Regel wurden 10 – 20 ng cRNA injiziert. Zur

Untersuchung der Rezeptor/Transducer-Komplexe wurde ein Teil der Oocyten mit 15 ng cRNA der sensorischen Rhodosine, und ein anderer Teil zusätzlich mit 50 ng Transducer cRNA (etwa 3fach molarer Überschuß) injiziert. Nach der Injektion wurden die Oocyten bei 18°C unter Lichtausschluß in ORI in Gegenwart von 1µM *all-trans* Retinal inkubiert.

2.5.4 Präparation von Oocytenmembranen

Für den immunologischen Nachweis von pSRII-His und pHtrII-His wurden unabhängig voneinander 50 Oocyten mit jeweils 20 ng cRNA injiziert und drei Tage unter Lichtausschluß bei 18°C in ORI und 1µM *all-trans* Retinal inkubiert. Zudem wurden als Kontrolle 2x50 nicht injizierte Oocyten unter gleichen Bedingungen gelagert. Nach drei Tagen erfolgte die Präparation der Plasmamembranen nach einer von Peter de Vries (MPI für Biophysik, Frankfurt) ausgearbeiteten Vorschrift. Hierzu wurden die Oocyten mechanisch mit einem Homogenisator zerstört. Zur Isolation der Plasmamembranen wurde das Homogenisat in 2 ml 10 % (w/v) Saccharose, 50 mM NaCl und 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,2 aufgenommen und zweier Dichtegradientenzentrifugationen unterworfen. Der erste Gradient setzte sich aus 10 % (w/v) (100 µl), 20 % (w/v) (400 µl) und 50 % (w/v) (1,6 ml) Saccharose zusammen. Nach 45min Zentrifugation bei 45.000 x g wurde die 20 % (w/v) Fraktion entnommen auf einem Nykodenz-Dichtegradienten gegeben der sich analog dem Saccharose-Gradienten zusammensetzte. Nach erneuter Zentrifugation (45min, 45.000xg) wurden die Plasmamembranen durch 30min Zentrifugation der 20 % (w/v) Fraktion bei 100.000 x g pelletiert und in 20 µl Puffer (50 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,4) resuspendiert. Anschließend wurden je 5 µl auf ein SDS-PAGE gegeben.

2.5.5 SDS-PAGE

Die Gelelektrophorese erfolgte in 0,75 mm Vertikalgelen nach der Methode von Schägger und Jagow (1987). Die Gele hatten eine Polyacrylamidkonzentration von 12 %. Mittels Coomassie wurden die Proteine angefärbt.

2.5.6 Westernblot

Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden auf eine Immobilon-P Membran mit einem Semidry Blotter (1h bei $1,2 \text{ mA/cm}^2$) der Firma Satorius transferiert. Der Anodenpuffer enthielt 300 mM Tris, 10 % Methanol, pH 10,4, der Kathodenpuffer 25 mM Tris, 40 mM 6-Amino-n-kapronsäure, 10 % Methanol, pH 9,4.

Zur Detektion des C-terminalen 7xHistin-Tags von pSRII und pHtrII wurde der monoklonale Penta-His-Antibody der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.6 Biophysikalische Methoden

2.6.1 Laserblitz-Absorptionsspektrometrie

Die transienten Absorptionsänderungen wurden mit einer rechnergesteuerten Meßanordnung bestimmt, deren schematischer Aufbau in Abbildung 2.1 wiedergegeben ist. Mit einem Laserpuls (Nd-YAG-Laser, 532 nm, 10 ns Pulsdauer, 2 mJ/cm^2 , ILTI40E, UDSSR) wird die Probe photochemisch angeregt. Im rechten Winkel zum Laserspuls durchtritt ungefiltertes Licht einer Halogenlampe (Osram-XBO-100 W, 12 V) durch die Probenküvette (Quarz, Schichtdicke 0,5 cm) und wird nach Wellenlängenselektion durch einen Monochromator (MDR4-LOMO, UDSSR) von einem Photomultiplier (FEU-100, UDSSR) detektiert. Die Signale des Detektors werden in zwei digitalen Oszilloskopen (Le Croy 9361 und Le Croy 9400A) mit zwei linearen Zeitfenstern gespeichert und zur Datenverarbeitung an einen Rechner weitergeleitet. Hierbei werden pro Wellenlänge 25 Signale gemittelt.

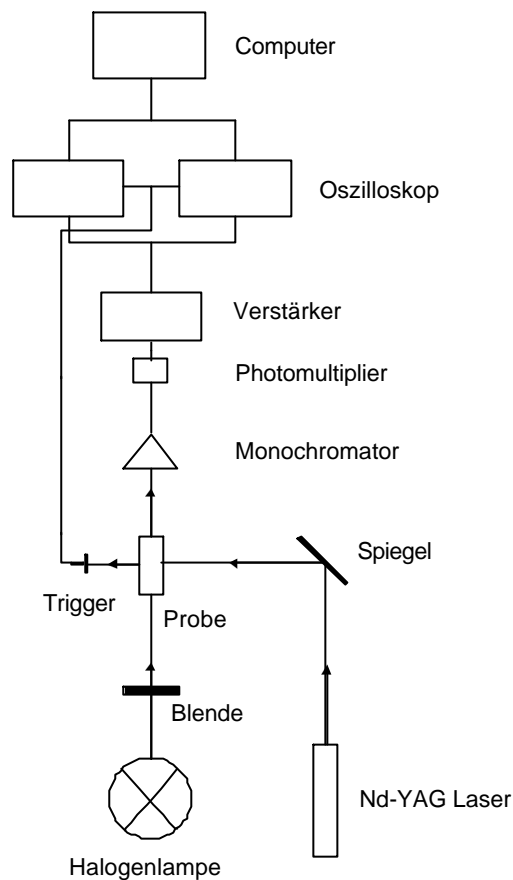


Abb. 2.1 Schematischer Aufbau der Laserblitz-Absorptionsapparatur

Datenverarbeitung und Analyse

Die Absorptionssignale wurden in zwei einander überlappenden Zeitfenstern gespeichert, die die Kinetik des Photozyklus 100 ns nach Anregung der Probe durch den Laserpuls bis zur vollständigen Rückbildung des Grundzustandes erfassen. Die Zahl der Meßdaten wurde nach einer von Müller und Plesser (1991) beschriebenen Methode auf eine logarithmische Zeitskala reduziert (250 Datenpunkte) und deren Standardabweichung anhand des Fehlers des Grundsignals abgeschätzt.

Zur Ermittlung der Kinetik des Photozyklus und der spektralen Charakterisierung der Intermediate wurden die experimentellen Daten wie folgt ausgewertet. Das MEXFIT-Programm (Müller und Plesser, 1991) ermittelte mit der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme einen Satz von Exponentialfunktionen, deren Summe die Absorptionsänderungen mathematisch beschreibt. Anpassungsfunktionen mit vier bis neun

Exponentialtermen wurden auf diese Weise für jede der insgesamt neun Temperaturen berechnet. Als Kriterium für die Güte einer Anpassungsfunktion dienten die Standardabweichung des Schätzer ihres Fehlers und die Oberfläche der gewichteten Differenzen von den gemessenen und den berechneten Daten. Eine Anpassungsfunktion wurde akzeptiert, wenn diese Oberfläche keine systematischen Abweichungen zeigt und die Standardabweichung sich nicht durch Hinzufügen eines weiteren Exponentialterms signifikant verbessern ließ. Diese Datenauswertung lieferte die apparenten Halbwertszeiten der Intermediate und ihre Amplitudenspektren. Hieraus wurden unter der Annahme, daß der Photozyklus dem kinetischen Modell irreversibler Folgereaktionen erster Ordnung genügt, die absoluten Spektren der Intermediate ermittelt.

2.6.2 Voltage-Clamp

Die elektrophysiologische Charakterisierung der heterolog in Oocyten exprimierten Pigmente erfolgte mittels Zwei-Elektroden Voltage Clamp. In Abbildung 2.2 ist der schematische Aufbau der Meßapparatur dargestellt. Eine intrazelluläre Elektrode e_v (Ag/AgCl) bestimmt das Membranpotential der Oocyte, während eine andere Elektrode e_i einen Strom injiziert, so daß das eingestellte Potential aufrecht gehalten wird. Hierfür sind die beiden Elektroden über eine Rückkopplungsschaltung miteinander verbunden. Als Referenz zur Bestimmung des Membranpotentials dient eine Badelektrode e_b , die in eine 1 M KCl Lösung taucht und nur über eine Agar-Salzbrücke mit dem Oocytenbad verbunden ist. Vor jeder Messung fand ein Nullabgleich des Membranpotentials und der Stromelektrode statt. Die Widerstände der Ag/AgCl-Elektroden (3 M KCl) lagen zwischen 1,5 und 5 M Ω . Über einen Rechner wurde das Meßprogramm unter Verwendung des ISO2-Steuer- und Auswertungsprogramms realisiert. Die Einstellung des Membranpotentials erfolgte manuell. Als Verstärker diente das Modell Turbo-Tec-05 der Firma NPI-Electronics (Tamm) und als Filter der KH 3323filter der Firma Krohn-Hite (Avon, USA).

Badpuffer:

d12: (90 mM NaCl, 5 mM BaCl₂, 20 mM TEA-Cl, 10 mM MOPS, pH 7,6)

h: (90 mM NaCl, 5 mM BaCl₂, 2 mM CaCl₂, 20 mM TEA-Cl, 10 mM MES, pH 5,6)

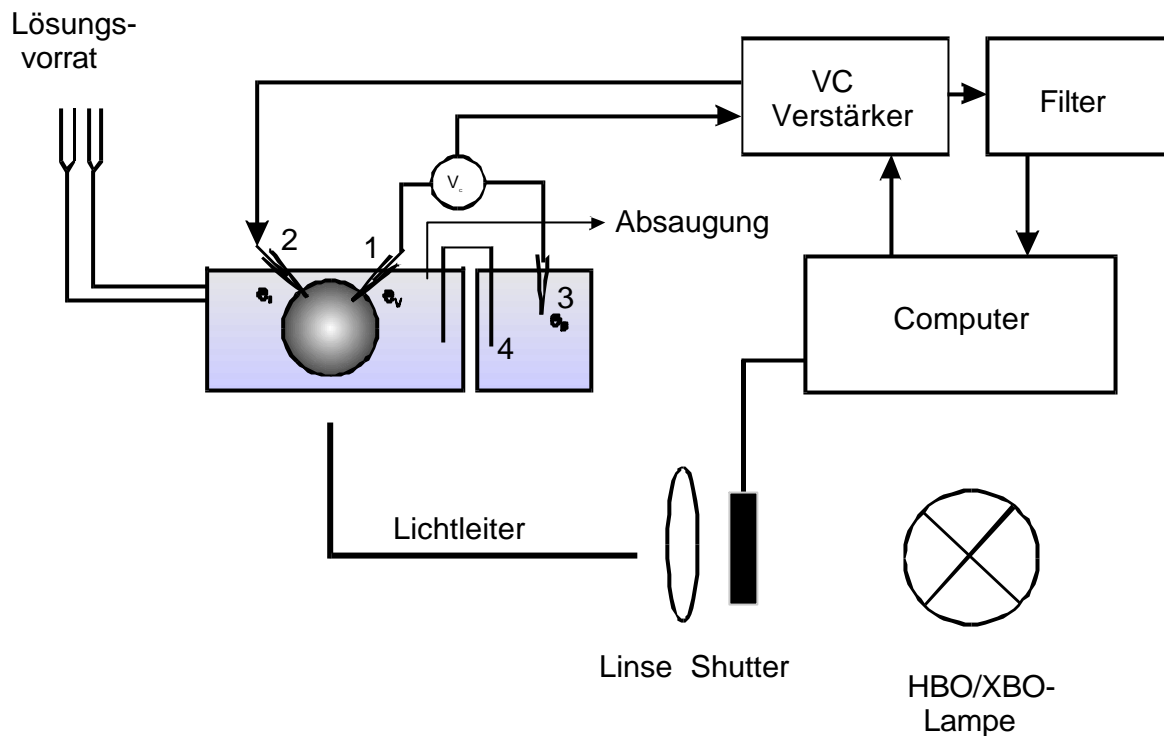


Abb. 2.2 Schematischer Aufbau des Zwei-Elektroden Voltage-Clamp. (1) Stromelektrode, (2) Spannungselektrode, (3) Referenz bzw. Badelektrode, (4) Agar-Salzbrücke

2.6.3 Black-Lipid Membrane

Die Bestimmung der Photoströme des pSR_{II} und Mutanten nach heterologer Expression in *E. coli* erfolgte an einer Black-Lipid-Membrane (BLM). Der Schematische Aufbau der Meßapparatur ist in Abbildung 2.3 wiedergegeben. Eine Teflonkammer mit UV-durchlässigen Fenstern ist in zwei Hälften geteilt, die durch eine kreisrunde Öffnung (1 mm Durchmesser) miteinander verbunden sind. Beide Kammerhälften sind jeweils über Agar-Salzbrücken mit einer Ag/AgCl-Elektrode verbunden, die in eine 100 mM NaCl-Lösung taucht. Eine Elektrode ist mit einem Spannungsgenerator gekoppelt, die andere ist über einen Verstärker mit einem Oszilloskop verbunden, der die Daten an einen Rechner übermittelt.

Zur Herstellung der BLM, welche die Kammeröffnung filmartig verschließt, wurden beide Seiten mit 1,3 ml BLM-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 6,8) gefüllt und mit 3 µl Lipidmischung (Diphytanoylphosphatidylcholin/Octadecylamin 60:1 in 1,5 % Decan) versetzt. Bei erfolgreicher Ausbildung der BLM wurde die Leitfähigkeit G und die

Kapazität C über das Anlegen einer Spannung von 100 mV bzw. einer Dreiecksspannung von ± 5 mV bestimmt werden, gemäß:

$$G = I/U \text{ und } C = I \Delta t / \Delta U \quad (I = \text{Strom, } U = \text{Spannung}).$$

Die Leitfähigkeit G und die Kapazität C der BLM lagen etwa bei $G = 0,01\text{-}0,05$ nS und $C = 3$ nF.

Zur Ermittlung der Photoströme wurden 25 μl rekonstituiertes Protein ($\text{OD}_{500} = 1\text{-}2$) in eine der beiden Kammern gegeben und die Suspension etwa 30 min durch einen Rührfisch moderat gerührt. Nach erfolgreicher Anlagerung an die BLM konnten die kapazitiven Photoströme durch Belichtung der Kammer mittels einer HBO-Lampe (2 W/cm^2) ermittelt werden. Die Wellenlängenselektion erfolgte durch Filter. Zur Ermittlung der stationären Signale wurden die elektroneutralen Ionophore 1799 (2,6-Dihydroxy-1,1,1,7,7,7-hexafluoro-2,6-bis-trifluoromethylheptan-4-on, $4 \mu\text{M}$) und Monensin ($4 \mu\text{M}$) zugesetzt, welche die Leitfähigkeit der BLM je nach Meßbedingung auf etwa $1G = 0 - 50$ nS erhöhen.

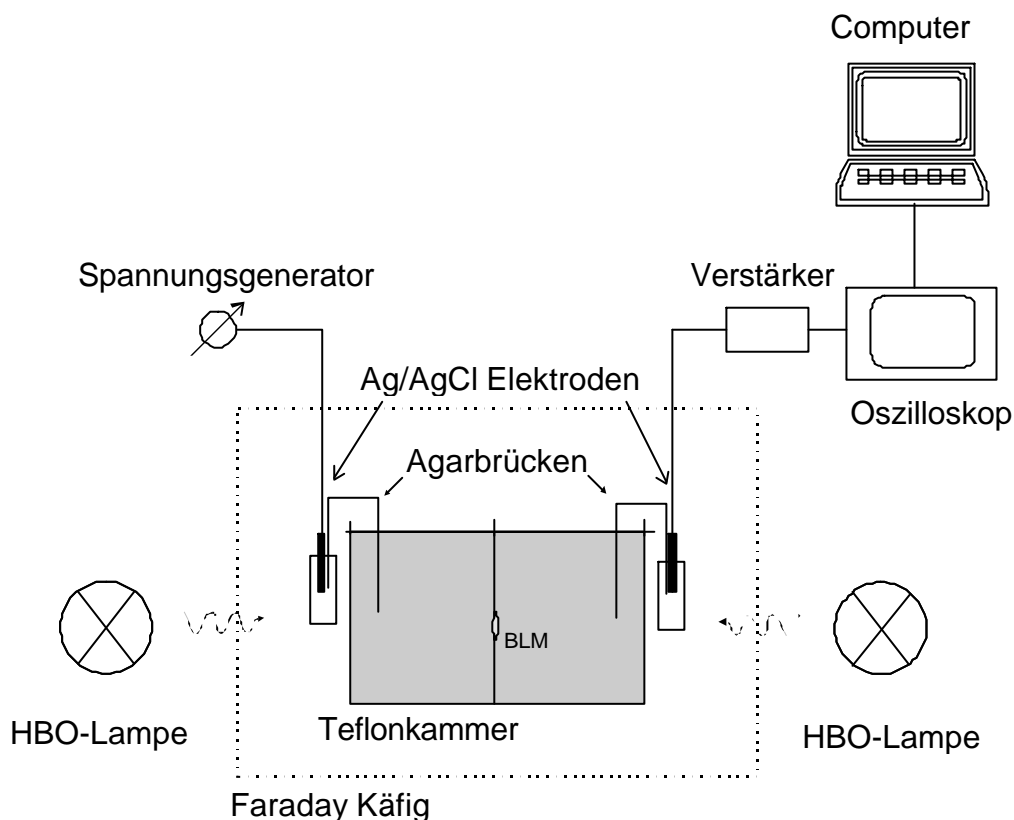


Abb. 2.3 Schematischer Aufbau der BLM-Apparatur

3 Ergebnisse

3.1 Expression der sensorischen Rhodopsine in *E. coli*

Klonierung der Expressionsvektoren

Zur Expression von pSRII, pSRII-Mutanten und SRI wurde das von Studier und Moffat (1986) entwickelte T7-Expressionssystem verwendet. Hierbei befindet sich das Zielgen in einem Vektor unter Kontrolle des T7-Bakteriophagen-Promotors. Die Expression des Zielgens wird durch die Synthese der T7-RNA-Polymerase in der Wirtszelle induziert. *E. coli* BL21 (DE3) enthält eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase Gens unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors, der durch IPTG induziert wird. Demnach führt eine IPTG-Zugabe zur selektiven Expression des Zielgens in *E. coli* BL21 (DE3). Als Expressionsvektor für *psopII* diente das Plasmid pET27bmod-*psopII*-His (Hohenfeld et al. (1999)):

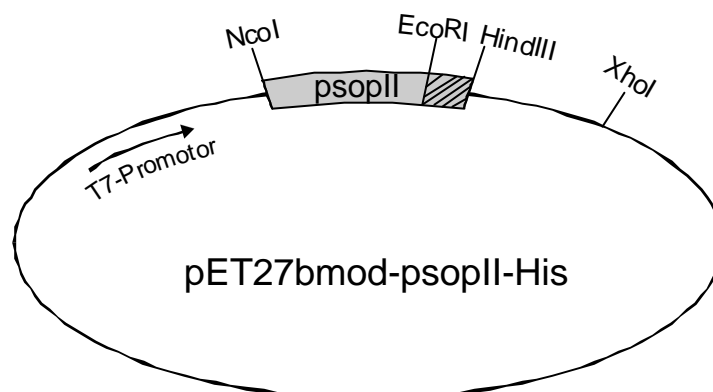


Abb. 3.1 Expressionsvektor für *psopII*-His

Bedingt durch die Fusion mit einem Histidin-Tag kodiert das *psopIIHis* folgende Peptidsequenz:

psopIIHis: ¹MVGL.....AVADE²⁴¹NSHHHHHHH.

Die ortsspezifischen Mutationen L40T und F86D wurden mit Hilfe der "Overlap Extension" Methode eingeführt (Ho et al. (1989)). In Abbildung 3.2 ist das Syntheschema dargestellt. Bei dieser Methode werden zwei PCR durchgeführt. In der ersten PCR werden durch Kombination eines flankierenden Primers (a,d) und einem Mutageneseprimer (b,c) zwei DNA-Fragmente synthetisiert. In der zweiten PCR werden die gereinigten DNA-Fragmente vereinigt und als Matrize für die Amplifikation des vollständigen, mutierten Gens mit den flankierenden Primern verwendet (a, d).

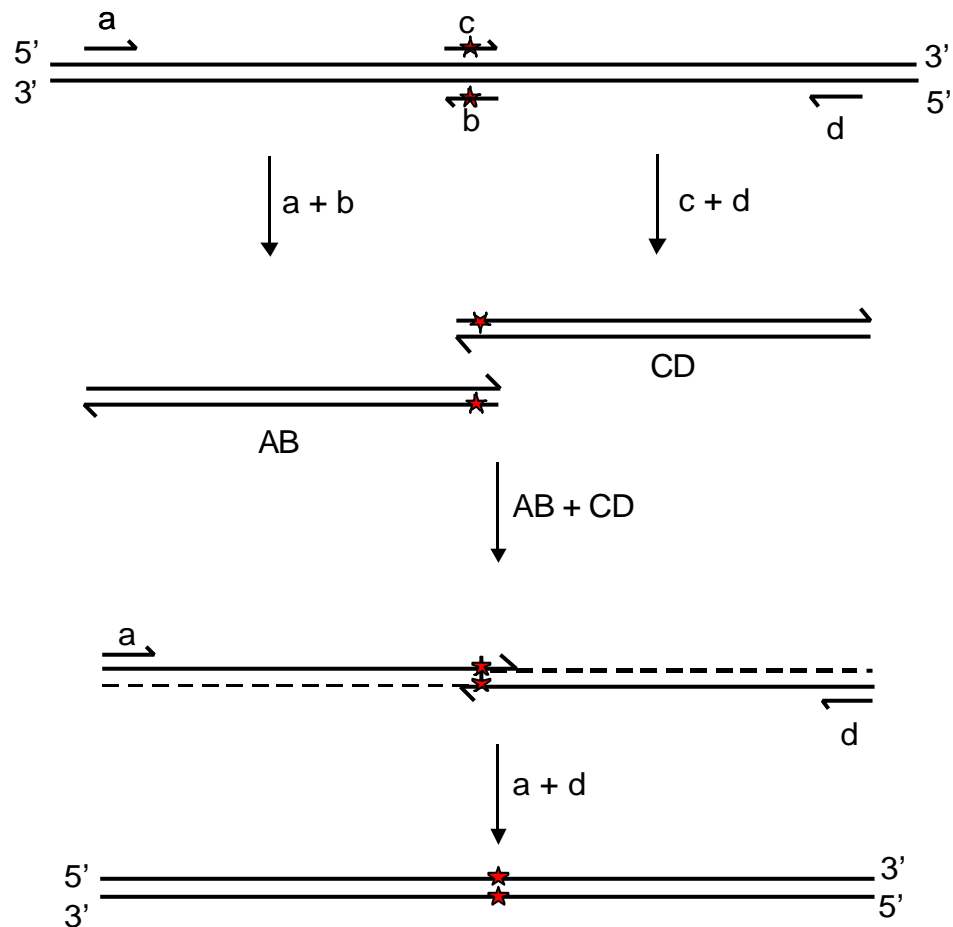


Abb. 3.2 Schema der "Extension Overlap" – Methode zur Einführung ortsspezifischer Mutationen (Ho et al., 1989). Die Mutation ist durch einen Stern gekennzeichnet.

Als Matrize zur Einführung der Mutationen L40T und F86D ins *psopII* diene das Plasmid pET27bmod-*psopII*-His. Flankierend wurden der T7-Promotor sowie T7-Terminator-Primer und als Mutageneseprimer die Paare *psopIII*L40Thin/rev sowie *psopII*F86Thin/rev verwendet. Die synthetisierten DNA-Fragmente *psopII*-His-L40T, *psopII*-His-F86D und *psopII*-His-L40T/F86D wurden mit NcoI und HindIII geschnitten und mit einem ebenfalls NcoI/HindIII-geschnittenen pET27bmod-*psopII*-His ligiert. Nach der Transformation dieser Konstrukte in *E. coli* XL1-Blue Zellen wurden die positiven Klone nach der Isolierung der Plasmide durch Sequenzierung selektiert. Zur Expression der Mutanten wurden pET27bmod-*psopII*-His-L40T, pET27bmod-*psopII*-His-F86D und pET27bmod-*psopII*-His-L40T/F86D in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

Für die Expression von *sopI* wurde ebenfalls das Plasmid pET27bmod verwendet. Die Klonierungsstrategie für den Expressionvektor pET27bmod-*sopI*-His ist in Abbildung 3.3 wiedergegeben. Durch PCR wurde *sopI* aus dem Plasmid pSopFS-Eco (Ferrando-May et al. (1993), welches Prof. Dr. Dieter Oesterhelt (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt hat, amplifiziert. Hierbei erfolgte unter Verwendung der Primer *sopI*hin und *sopI*rev eine Umwandlung der ursprünglichen C- und N-terminalen EcoRV-Schnittstellen in eine N-terminale NcoI- und eine C-terminale EcoRI-Schnittstelle. Wegen der Einführung eines C-terminalen Histidin-Tags wurde gleichzeitig das Stop-Kodon TGA durch das Glutaminsäure-kodierende Basentriplett GAG ausgetauscht. Der Zielvektor pET27bmod-*sopI*-His wurde durch Ligation des NcoI/EcoRI-geschnittenen *psopII*-DNA-Fragmentes mit dem ebenfalls NcoI /EcoRI verdauten Vektor pET27bmod-*psopII*-His erhalten und sequenziert. Diese Klonierung erlaubt die Expression von *sopI* mit C-terminalem Histidin-Tag, wobei folgende Peptidsequenz kodiert wird:

sopI-His: ¹MDAV.....TAADE²⁴⁰NSHHHHHHH.



Abb. 3.3 Klonierung des Expressionsvektors pET27bmod-sopI-His für die Synthese von SRI

Präparation von pSRII und Mutanten

Die Expression von *psopII* bzw. *psopII*-Mutanten und die Reinigung der Proteine erfolgte nach der Methode von Shimono et al. (1997) und Hohenfeld et al. (1998). Bei diesem Verfahren werden die Pigmente durch Ni-NTA Affinitätschromatographie über den C-terminalen Histidin-Tag gereinigt. Wie man am Verhältnis der Chromophor-Absorptionen bei 500 nm zu den Absorptionen des Proteinrückgrates bei 280 nm erkennt, können pSRII, und pSRII-Mutanten in hoher Reinheit präpariert werden. In Abbildung 3.4 ist exemplarisch das UV/VIS-Spektrum des pSRII dargestellt. Sowohl für pSRII, als auch für die Mutanten pSRII-L40T, pSRII-F86D und pSRII-L40T/F86D wird ein ideales Verhältnis A_{500}/A_{280} von 1:1,5 erreicht (Krebs et al. (1995)). Die Ausbeuten weichen unterhalb der einzelnen Pigmente deutlich ab (siehe Tabelle 3.1). Während beim Wildtyp und der Mutante pSRII-L40T etwa 1 mg Protein pro Liter Zellkultur präpariert werden kann, reduziert sich die Ausbeute im Falle von pSRII-F86D und pSRII-L40T/F86D 10-20fach. Iwamoto et al. (1999) registrieren ebenfalls eine deutlich verminderte Ausbeute der Mutanten pSRII-F86D und pSRII-L40T/F86D im Vergleich zum Wildtyp, was auf eine systematisch verminderte Expression der Mutanten schließen läßt und nicht auf Verluste während der Reinigung.

Tabelle 3.1: Ausbeuten der pSRII-Präparation

	Wildtyp	pSRII-L40T	pSRII-F86D	pSRII-L40T/F86D
mg Protein/ L Zellkultur	1	0,9	0,1-0,2	0,05-0,1

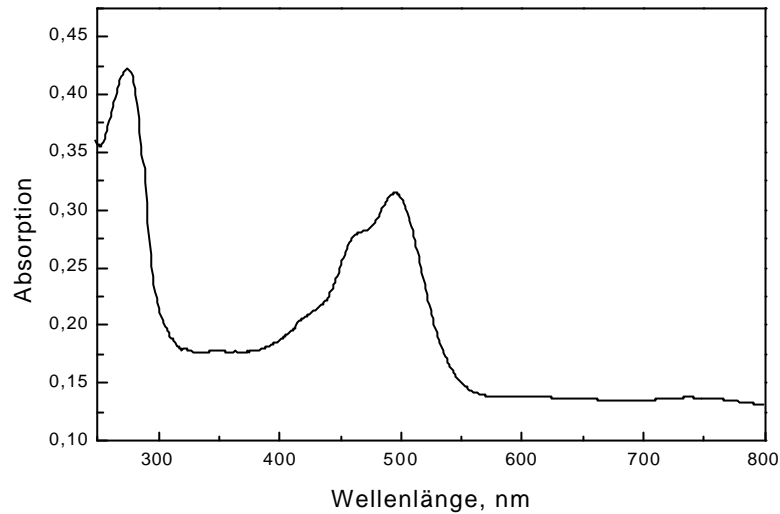


Abb. 3.4 Absorptionsspektrum von pSRII nach Reinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Präparation von SRI

Im Unterschied zum pSRII sind die halobakteriellen Rezeptoren SRI und SRII wegen ihrer Empfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen biochemisch wesentlich schwieriger zugänglich. Zum Beispiel denaturieren SRI und SRII bei Salzkonzentrationen unterhalb von 2 M NaCl innerhalb von wenigen Minuten und auch unter optimierten Bedingungen sind die Proteine bei RT nur bedingt stabil (Scharf et al. (1992)). Unter Berücksichtigung dieser Eigenschaften konnte mit dem SRI erstmalig ein sensorisches Rhodopsin aus *H. salinarum* in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Hierzu wurde die Methode von Shimono et al. (1997) und Hohenfeld et al. (1998) derart modifiziert, daß die Aufarbeitung der geernteten Zellen möglichst wenig Arbeitsschritte und einen geringen Zeitaufwand erfordert. Zudem enthielten sämtliche Puffer 4 M NaCl. In Abbildung 3.5 ist ein Foto der geernteten Zellen 2h nach der Induktion durch IPTG dargestellt.

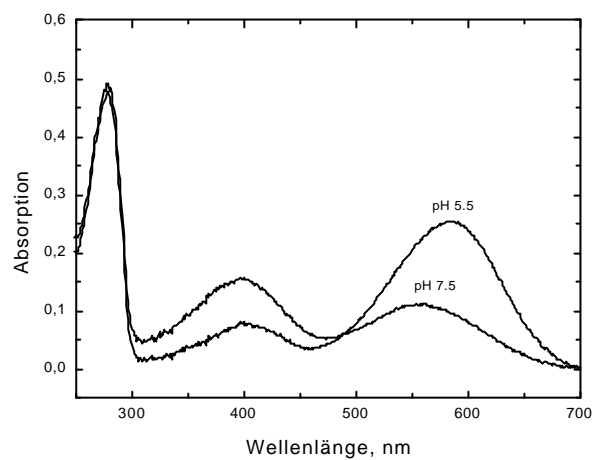
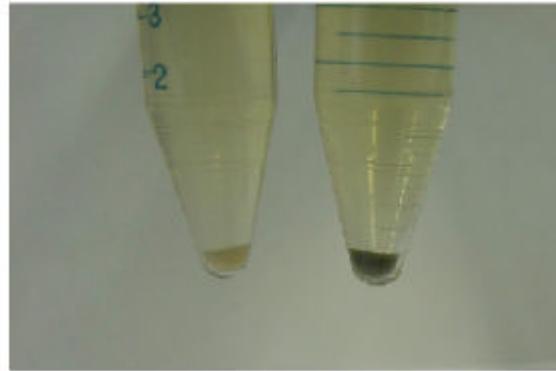


Abb. 3.5 Oben: Transformierte (pET27bmod-sopI-His) *E. coli* BL21(DE3) Zellen 2h nach Induktion. Den Zellen im rechten Gefäß wurde zusätzlich zum IPTG *all-trans* Retinal zugesetzt. Unten: Absorptionsspektrum vom heterolog exprimierten und gereinigtem SRI. Die pH-abhängige Verschiebung des Absorptionsmaximums wird durch das Dissoziationsgleichgewicht von Asp76 bewirkt (Rath et al. (1994)). Die Bande um 400 nm im Spektrum vom SRI konnte bisher nicht eindeutig interpretiert werden. Anhand der stark hypsochromen Verschiebung wird davon ausgegangen, daß eine deprotonierte SB vorliegt (Krebs et al. (1993)).

Anhand der Blaufärbung des Zellpellets wird deutlich, daß SRI, welches maximal zwischen 550 nm und 590 nm absorbiert, mit hohen Ausbeuten synthetisiert wird. Nach dem mechanischen Aufschluß der Zellen im Microfluidizer werden vor der Solubilisierung der Membranen durch zweistündige Inkubation in Gegenwart von DM (2 % w/v) lediglich die Zelltrümmer durch 45minütige Zentrifugation bei 5000 x g abgetrennt. Dem Solubilisat wird nach erneuter Zentrifugation bei 5000 x g direkt das Ni-NTA zugesetzt, welches nach 45minütiger Inkubation unter leichtem Schwenken eine tiefblaue Farbe annimmt. Die

Abtrennung von unspezifisch gebundenen Proteinen und Verunreinigungen erfolgt in einer Chromatographiesäule durch einen pH-Gradienten. Nach dem Waschen bei pH 6,0, werden bei pH 5,4 typische Verunreinigungen an Cytochromen ($\lambda_{\max} = 410 \text{ nm}$) entfernt. Im letzten Schritt wird das gereinigte SRI bei pH 4,0 eluiert und umgehend auf pH 7,0 titriert. Diese Modifikationen des in Abschnitt 2 detailliert dargestellten Verfahrens ermöglichen die Präparation von gereinigtem SRI innerhalb von zwölf Stunden nach dem Animpfen der Zellkultur. Die Ausbeute liegt mit bis zu 3 mg Protein pro Liter Zellkultur 3fach höher als bei der heterologen Expression von pSRII (siehe Tabelle 3.1).

In Abbildung 3.5 ist das Spektrum des gereinigten SRI wiedergegeben. Anhand der Absorption des Chromophors bei 580 nm im Vergleich zu denen des Proteinrückgrates bei 280 nm kann eine Reinheit des SRI von $>95 \%$ abgeschätzt werden (Krebs et al. (1995)). Zum homolog exprimierten SRI erkennt man keine Unterschiede der Absorptionseigenschaften. Wie Krebs et al. (1995) berichten, verschiebt sich das Absorptionsmaximum reversibel mit zunehmendem pH von 580 nm bei pH 5,5 auf 550 nm bei pH 7,5, wobei zusätzlich die Amplitude der Bande bei 400 nm abnimmt. Diese Verschiebung ist auf das Dissoziationsgleichgewicht von Asp76 zurückzuführen, welche einen pK_a von 7,2 besitzt (Rath et al. (1994)). Auch die im folgenden Abschnitt beschriebene Analyse des Photozyklus liefert keine Hinweise auf abweichende Eigenschaften des heterolog exprimierten SRI.

3.2 Absorptionsspektrometrische Analyse der SR-Photozyklen

Die Kenntnis der Photozyklen ist die Grundlage für die Analyse der Reizaufnahme und Aktivierung der Signaltransduktionskaskade durch die sensorischen Rhodopsine (SR). Photochemisch angeregt, relaxieren die Rezeptoren durch thermischen Zerfall über verschiedene Intermediate in den Grundzustand, wobei sich die Absorptionseigenschaften des Proteins ändern. Somit lassen sich durch die Untersuchung der transienten Absorptionen mittels Laserblitzspektroskopie die Intermediate charakterisieren und die Kinetik des Photozyklus bestimmen. Wegen der Komplexität der Photozyklen gibt es verschiedene Ansätze zur Analyse der Absorptionsdaten. Chizhov et al. (1996) entwickelten ein standardisiertes Verfahren, welches in dieser Arbeit verwendet wurde. Im Anhang (Abschnitt 7) ist eine Beschreibung der verwendeten Analysemethoden wiedergegeben. Zunächst wird die minimale Anzahl der Exponentialterme bestimmt, die für eine Simulation der experimentellen Daten ausreicht. Unter der Annahme, daß sich der Photozyklus durch irreversible Folgereaktionen erster Ordnung beschreiben läßt, werden aus den Amplitudenspektren der Exponentialterme die Absorptionsspektren der Photointermediate berechnet.

3.2.1 Photozyklus von pSRII und Mutanten

Obwohl der pSRII-Photozyklus bereits von verschiedenen Gruppen untersucht wurde, existiert kein detailliertes kinetisches Modell. Durch die Beschränkung der Analysen auf wenige Wellenlängen und/oder auf ein Zeitfenster, daß entweder die frühen oder die späten Reaktionsschritte in der Sequenz erfaßt, konnten bisher nicht alle bekannten Intermediate auf der Grundlage eines Datensatzes charakterisiert werden (Miyazaki et al. (1991), Scharf et al. (1992), Hirayama et al. (1992), Imamoto et al., (1992)). Mit der absorptionsspektrometrischen Untersuchung des pSRII-Photozyklus nach der Methode von Chizhov et al. (1996) sollte ein kinetisches Modell entwickelt werden, welches auf ein mathematisch reproduzierbares Verfahren beruht und den kompletten Photozyklus ab 500 ns nach Aktivierung des pSRII beschreibt. Hierbei sollten die Absorptionsspektren aller Intermediate ermittelt werden. Mit diesem Modell als Arbeitsgrundlage sollte eine Plattform geschaffen werden, die eine schnelle und standardisierte Charakterisierung von pSRII-Mutanten ermöglicht.

Multiexponentielle Datenanalyse

Für die Datenerfassung wurde eine in PM-Lipide rekonstituierte pSRII-Probe mit einer $OD_{500} = 1$ verwendet. Hierbei wurde sowohl in *H. salinarum*, als auch in *E. coli* exprimiertes pSRII verwendet, wobei keine unterschiedlichen Eigenschaften der Proben festgestellt wurden. Die Absorptionsänderungen des pSRII wurden bei 12 verschiedenen Temperaturen von 10°C bis 65°C (5°C Schrittweite) im Wellenlängenbereich von 360 nm bis 660 nm (10 nm Schrittweite) aufgenommen. In Abbildung 3.6 ist exemplarisch der Datensatz bei 25°C dargestellt. Man erkennt drei charakteristische Banden bei 400 nm, 500 nm und 550 nm, welche das M_{400} -Intermediat, den pSRII-Grundzustand und das O_{540} -Intermediat repräsentieren. Im folgenden beschränkt sich die bildliche Darstellung des pSRII-Photozyklus auf diese drei diagnostischen Wellenlängen.

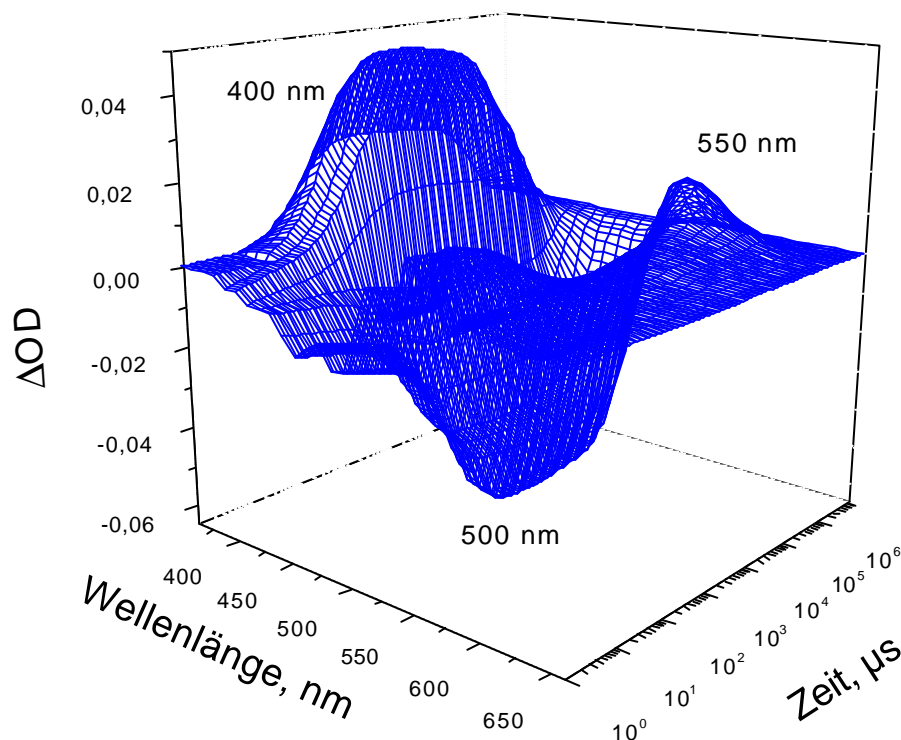


Abb. 3.6 Transiente Absorptionen des in PM-Lipiden rekonstituierten pSRII bei 25°C und pH 8,0 (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl).

Mit dem MEXFIT-Programm wurde jeder Datensatz nach der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme analysiert (Müller und Plesser (1991), Chizhov et al. (1996)). Hierbei wurden die Datenpunkte von 500 ns bis 10 s nach dem Laserpuls unabhängig für jede Temperatur durch eine Summe von Exponentialtermen simuliert. Unter der Annahme, daß sich der pSRII-Photozyklus durch eine Sequenz irreversibler Reaktionen 1. Ordnung beschreiben läßt, muß die Zahl der Exponentialfunktionen mit der Anzahl der Intermediate des Photozyklus übereinstimmen. Die Exponenten stellen dann die apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_i^* der einzelnen thermischen Zerfälle dar, aus denen sich die Halbwertszeiten ($\tau_i = \ln 2/k_i^*$) der Intermediate berechnen lassen. Um die minimale Anzahl der Exponentialfunktionen zu bestimmen, die zur Simulation der experimentellen Daten ausreicht, wurde deren Zahl sukzessive erhöht, bis sich die Standardabweichung der gewichteten Residuen nicht mehr signifikant verringerte. Die Ergebnisse dieser Datenanalyse sind in Abbildung 3.7 und Tabelle 3.2 wiedergegeben.

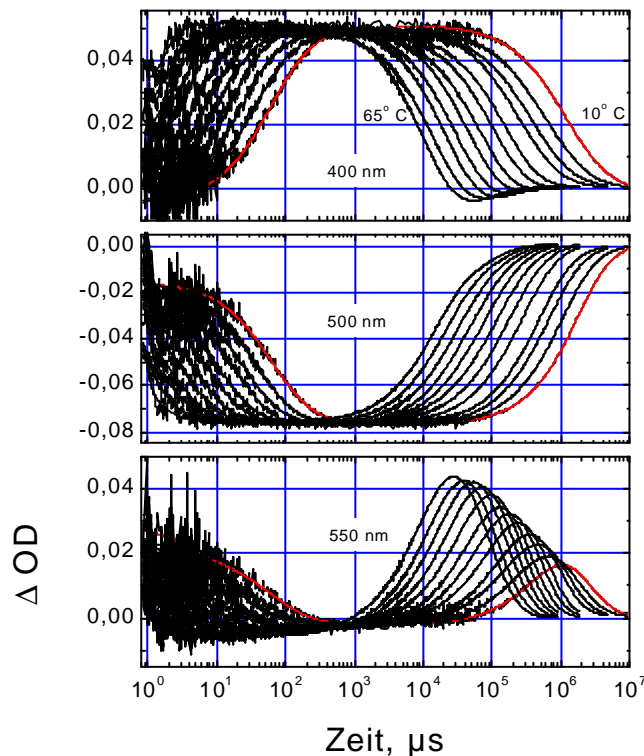


Abb. 3.7 Differentielle Absorptionsänderungen des pSRII im Temperaturbereich von 10°C bis 65°C und deren Anpassungsfunktionen (exemplarisch für 10°C in Rot). Alle Datensätze wurden mit rekonstituiertem pSRII bei pH 8,0 (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl) aufgenommen.

Für die Absorptionsänderungen bei 10°C bis 35°C ergeben sich acht Exponentialfunktionen, ansonsten reichen sieben Funktionen für eine Anpassung der experimentellen Daten aus. In Abbildung 3.8 sind die Amplitudenspektren aller Exponenten (b_i , Gl. 8, Abschnitt 7) und die daraus abgeleiteten differentiellen Spektren (ϵ_i , Gl. 9, Abschnitt 7) dargestellt. Am einheitlichen Verlauf der Spektren erkennt man bereits, daß die für jede Temperatur unabhängig ermittelten Exponenten korrelieren. Der Wegfall von τ_1 bei der Simulation der Datensätze, die oberhalb von 35°C aufgenommen wurden, rührt daher, daß τ_1 Werte < 500 ns annimmt und mit der Meßanordnung nicht mehr detektiert werden kann. Aus der Datenanalyse geht hervor, daß der pSRII-Photozyklus acht kinetisch unterschiedbare Intermediate durchläuft von denen das kurzlebigste nur bis 35°C aufgelöst werden kann.

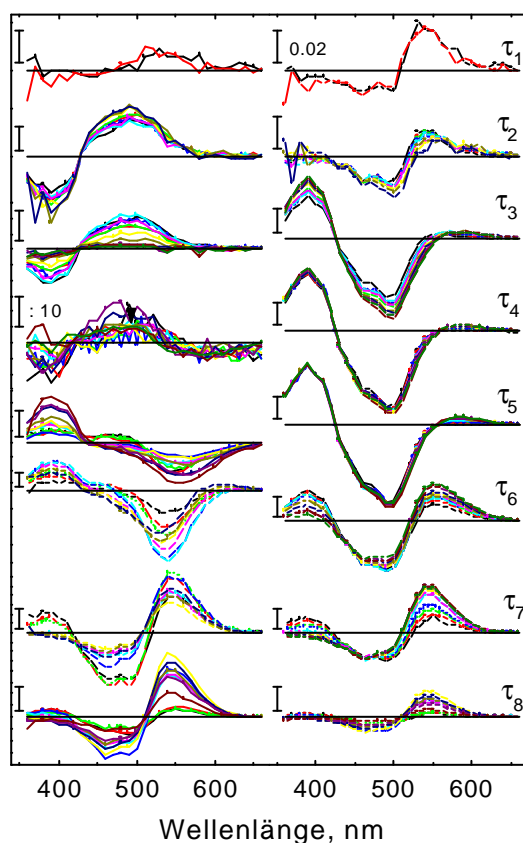


Abb. 3.8 Amplitudenspektren (b_i , linke Hälfte) der Exponenten und deren korrespondierende Differenzspektren für alle beobachteten Temperaturen (ϵ_i , rechte Hälfte). Die Differenzspektren wurden nach Gl. 9 (Abschn. 7) berechnet.

Temperatur- und pH-Abhängigkeit der app. Geschwindigkeitskonstanten

Ein wichtiges Kriterium für die physikalische Relevanz der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k_i^* und ihrer Zuordnung zu einem bestimmten Intermediat ist deren Temperaturabhängigkeit. Im Arrheniusdiagramm (Abbildung 3.9) wird die Korrelation der unabhängig voneinander ermittelten Ratenkonstanten ersichtlich.

Jede Ratenkonstante weist eine lineare Temperaturabhängigkeit auf, wie sie für das zugrunde liegende Modell sequentieller Folgereaktionen zu erwarten ist. Dadurch lassen sich die apparenten Aktivierungsenthalpien ΔH^\ddagger und -Entropien ΔS^\ddagger jedes einzelnen thermischen Zerfalls nach der Gleichung von Eyring (Abschnitt 7, Gl. 12) abschätzen (Tabelle 3.3).

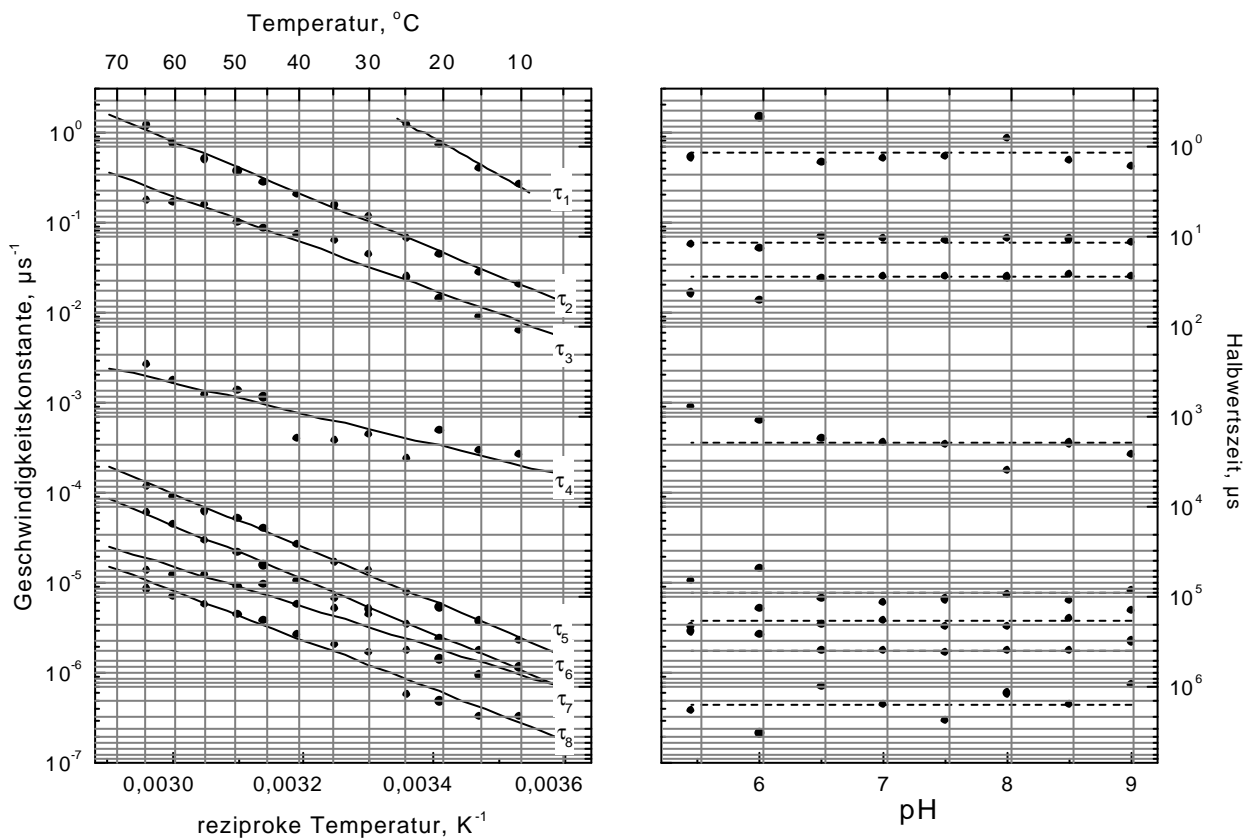


Abb. 3.9 Temperatur- (rechts) und pH-Abhängigkeit (links) der apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_i^* bzw. Halbwertszeiten τ_i .

Es wird deutlich, daß die Halbwertszeit der Intermediate in erster Linie von der Aktivierungsentropie bestimmt wird, da die Aktivierungsenthalpie mit Werten um 50 kJ/mol kaum variiert. Diese Tendenz ist auch beim BR festzustellen (Chizhov et al. (1996)).

Tab. 3.2 Apparente Aktivierungsparameter des pSRII-Photozyklus*

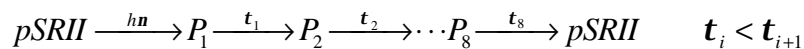
	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4	τ_5	τ_6	τ_7	τ_8
ΔH^\ddagger (kJ/mol)	74 ± 4	55 ± 1	48 ± 3	30 ± 4	55 ± 1	55 ± 1	41 ± 3	50 ± 3
ΔS^\ddagger (J/ molK)	120 ± 15	31 ± 1	30 ± 4	-94 ± 10	-43 ± 3	-49 ± 3	-102 ± 11	-78 ± 10

* ermittelt durch Anpassung nach Eyring (12)

Weitere Informationen liefert die pH-Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten, die ebenfalls in Abbildung 3.9 dargestellt ist. Man erkennt deutlich, daß die ermittelten Ratenkonstanten im beobachteten Bereich von pH 9,0 bis pH 5,5 kaum von der Protonenkonzentration beeinflusst werden. Lediglich bei $\tau_4 - \tau_7$ ist von pH 6,0 zu pH 5,5 eine Tendenz zu erkennen, die auf eine 2fache bis maximal 5fache Beschleunigung der entsprechenden Reaktionsschritte hinweisen. Ob diese Tendenz signifikant ist, läßt sich an dieser Stelle wegen der geringen Anzahl von zwei Datenpunkten aber nicht beurteilen. Bei Datenpunkten unterhalb von pH 5,5 ist die Interpretation erschwert, da, wie später gezeigt wird, durch die Protonierung von Asp75 eine pSRII-Spezies pSRII^{aci} entsteht, die einen unabhängigen Photozyklus aufweist (siehe "Untersuchung des extrazellulären Protonenkanals").

Absolute Spektren der Intermediate und kinetisches Modell

Aus den apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_i^* lassen sich auf Basis des Modells einer Sequenz irreversibler Folgeraktionen 1. Ordnung die Absorptionsspektren der einzelnen Intermediate berechnen (Nagle (1991), Chizhov et al. (1996)). Hierzu müssen die ermittelten Konstanten k_i^* den intrinsischen Übergängen (P_i) von einem zum anderen Intermediat zugeordnet werden. Bei acht kinetisch aufgelösten Intermediaten ergeben sich selbst bei diesem einfachsten Modell insgesamt $8! = 40320$ verschiedene Möglichkeiten der Zuordnung, die alle zu unterschiedlichen Intermediatspektren führen. Allerdings ergeben die meisten Kombinationen physikalisch bedeutungslose Spektren, die z.B. negative Absorptionen oder unrealistische Amplituden aufweisen. Desweiteren erleichtert die Bandbreite der Werte über sechs Größenordnungen eine sinnvolle Zuordnung der Ratenkonstanten. Letztlich lieferte die Annahme einer systematischen Verlangsamung der Zerfälle in der Sequenz, wie sie auch bei den anderen archaeabakteriellen Rhodopsinen postuliert wird, das beste Modell (Bogomolni et al. (1987), Scharf et al. (1992)):



Auf der Grundlage dieser Sequenz lassen sich die Absolutspektren der Intermediate berechnen (Gl. 9, Abschnitt 7). Die hierfür notwendige "Cycling Fraction" F_c , die den Anteil der Moleküle beschreibt, die nach Belichtung den Photozyklus durchläuft, wurde mit $11 \pm 1\%$ bestimmt. Grundlage bei der Bestimmung war die Abwesenheit von negativen Absorptionen und realistische Extinktionskoeffizienten, dh., die Intermediate weisen in den absoluten Spektren alle ähnlich starke Absorptionen wie der Grundzustand auf. Der niedrige Anteil von 11 % angeregter Moleküle ist auf die Anregungswellenlänge von 532 nm zurückzuführen, welche mit 34 nm recht weit neben dem Absorptionsmaximum liegt.

Die berechneten Absorptionsspektren der Intermediate, sowie deren Gauss-Anpassungen (Birge (1990)) sind in Abbildung 3.10 für jede beobachtete Temperatur dargestellt. Obwohl acht Übergänge (P_1 bis P_8) kinetisch aufgelöst wurden, sind in den Spektren durch Anpassung mittels Gauss-Funktionen nach Birge (1990) nur fünf spektral distinkte Banden nachweisbar (siehe Abbildung 3.10). Anhand der spektralen Verschiebung der Absorptionsmaxima relativ zum Grundzustand und ihren kinetischen Eigenschaften lassen sich diese Banden in Anlehnung an die BR-Nomenklatur dem K_{510} , L_{495} , M_{400} , N_{485} und

O_{540} -Intermediate zuordnen. K_{510} , L_{495} und M_{400} sind in den Spektren von P_1 (K), P_2 (L), sowie P_4 und P_5 (beide M) als einzelne, temperaturunabhängige Banden identifiziert. Das O_{540} -Intermediat ist in P_6 zusammen mit M_{400} zu erkennen, wobei sich systematisch die Amplitude von O_{540} mit zunehmender Temperatur vergrößert, während die M_{400} -Absorption abnimmt. Ähnlich verhält es sich mit N_{485} , das in P_7 von der intensiven Bande des O_{540} überlagert ist und nur bei den Spektren bei $10^\circ\text{C} - 30^\circ\text{C}$ zu erkennen ist. P_8 stellt eine Superposition der Banden von O_{540} und des Grundzustandes dar.

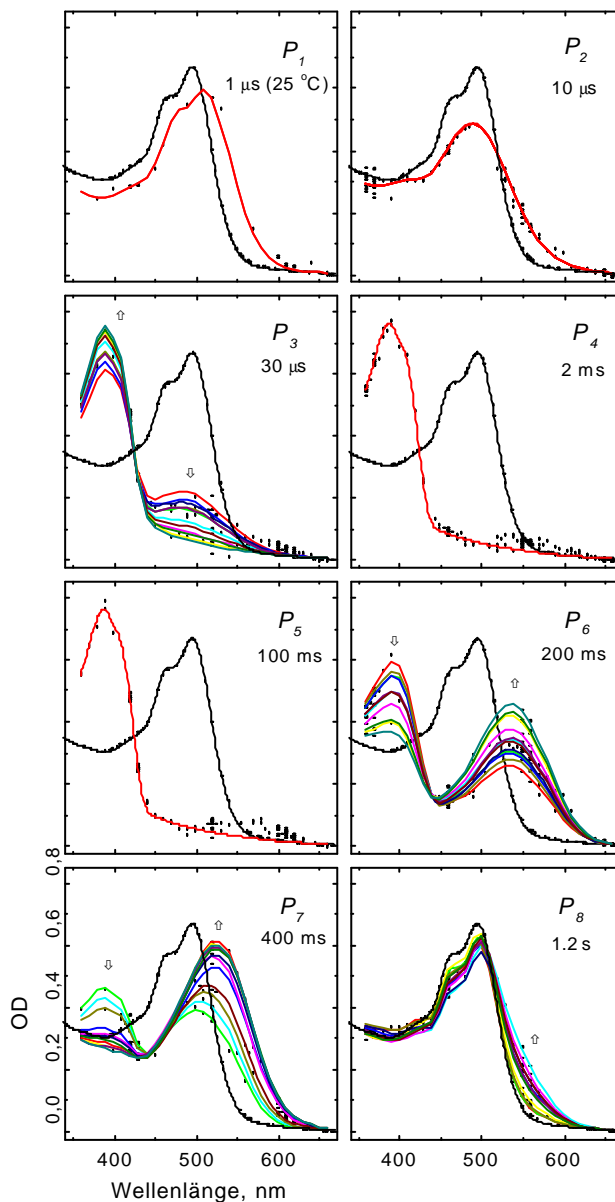


Abb. 3.10 Absorptionsspektren der Intermediate im Temperaturbereich von $10^\circ\text{C} - 65^\circ\text{C}$. In jedem Graphen ist der Grundzustand wiedergegeben (schwarz) und die berechneten Punkte des jeweiligen Intermediatspektrums für jede beobachtete Temperatur. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Gauss-Fits der berechneten Spektren (Chizhov et al. (1998), Birge (1990)). Die Pfeile in den Spektren P_3 , P_6 , P_7 und P_8 geben den systematischen Verlauf der Amplituden mit zunehmender Temperatur wieder.

Das Auftreten mehrerer Absorptionsbanden in den berechneten Spektren der kinetisch aufgelösten Intermediate wurde bereits von Chizhov et al. (1996) bei der Analyse des BR-Photozyklus mit der gleichen Analysemethode registriert. Die Autoren erklären diese Beobachtung durch schnelle Quasigleichgewichte zwischen zwei spektral unterscheidbaren Intermediaten, welche kinetisch nicht aufgelöst werden können. Durch dieses Modell läßt sich auf einfache Art die für den BR-Photozyklus lang diskutierte Frage erklären, warum die Zahl der Exponentialfunktionen, die zur Beschreibung der experimentellen Daten notwendig ist, die Anzahl der spektralen Intermediate übersteigt. Zudem behält durch diese Annahme das einfachste kinetische Modell irreversibler Folgereaktionen 1. Ordnung seine Gültigkeit, wenn die Gleichgewichtsreaktionen wesentlich schneller erfolgen als die Bildung und der Zerfall der Quasigleichgewichte (Chizhov et al. (1996)). Übertragen auf den pSRII-Photozyklus, stellen P_3 , P_6 , P_7 und P_8 temperaturabhängige Quasigleichgewichte zwischen L_{495} und M_{400} (P_3), M_{400} und O_{540} (P_6), M_{400} und N_{495} (P_7 bei 10°C - 30°C) bzw. N_{485} und O_{540} (P_7 ab 30°C) und O_{540} und pSRII $_{500}$ (P_8) dar.

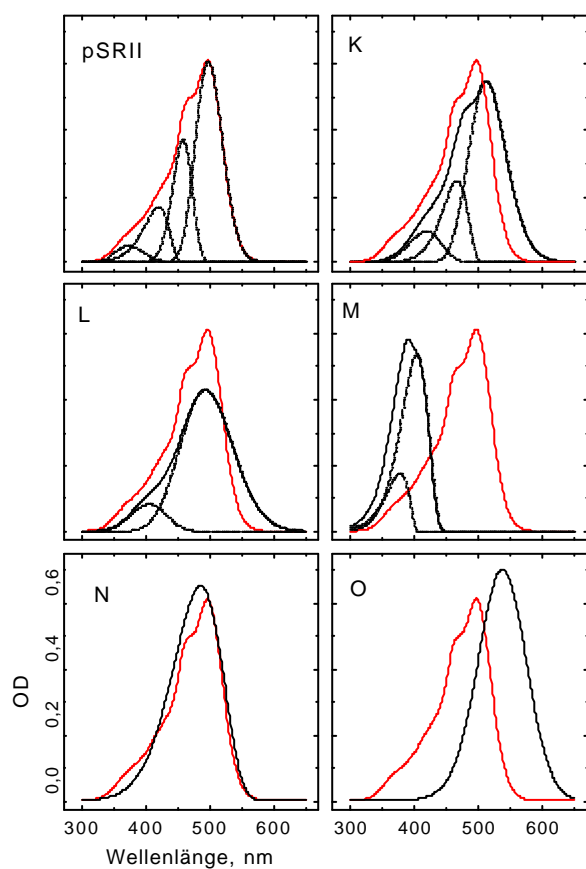


Abb. 3.11 Spektren der Intermediate K, L, M, N und O. Die Spektren wurden durch Anpassung der berechneten Spektren in Abb. 3.4 nach Birge, (1990) und Metzler und Harris (1979) ermittelt.* Um die spektrale Verschiebung zu verdeutlichen, ist in jeder Abbildung auch das pSRII-Grundspektrum wiedergegeben. Bei den Spektren mit Feinstruktur (pSRII, K, L, M) sind zusätzlich die Einzelbanden der Komponenten als gestrichelte Linien dargestellt. *

$$n > n_{\max} - \frac{\Delta nr}{(r^2 - 1)}; \quad e(n) = 0, n \leq n_{\max} - \frac{\Delta nr}{(r^2 - 1)}$$

$$e(l) = e_{\max} \exp \left\{ -\frac{\ln 2}{(\ln r)^2} \left[\ln \left(\frac{(l/l_{\max} - 1)(r^2 - 1)}{\Delta nr} + 1 \right) \right]^2 \right\}$$

$\Delta\nu$ (cm^{-1}) ist die Halbwertsbreite, ε ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) ist der molare Extinktionskoeffizient. Die Hintergrundstreuung wurde polynomisch durch $A + B/\lambda^C$ ($A = -0,03 \pm 0,01$, $B = (3,7 \pm 1,3) \times 10^9$, $C = 3,9 \pm 0,6$) simuliert. Die einzelnen Parameter sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3 Parameter der Gaussianpassung der Intermediatspektren

	$\epsilon_{\max} \times 10^{-4} \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$	ρ	$\Delta\nu \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$\lambda \text{ (nm)}$
pSRII	$3,85 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,06$	2015 ± 152	$497,0 \pm 1,3$
	$2,3 \pm 0,3$	$1,26 \pm 0,25$	1735 ± 333	$457,5 \pm 3,1$
	$1,1 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,4$	2808 ± 1722	419 ± 15
	$0,3 \pm 0,4$	$1,0 \pm 1,5$	3790 ± 3000	371 ± 26
χ^2	0,0001			
K	$3,5 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,3$	2620 ± 850	511 ± 6
	$1,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 2,4$	2256 ± 6090	466 ± 50
	$0,6 \pm 3$	$1,3 \pm 1,9$	3500 ± 6000	417 ± 110
χ^2	0,009			
L	$2,7 \pm 0,02$	$1,13 \pm 0,07$	4000 ± 270	$493 \pm 1,5$
	$0,8 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$	4010 ± 400	$404 \pm 4,5$
χ^2	0,002			
M	$3,4 \pm 0,1$	$1,65 \pm 0,25$	3265 ± 930	403 ± 4
	$0,95 \pm 0,8$	$1,9 \pm 0,4$	3237 ± 880	377 ± 4
χ^2	0,001			
N	$4,1 \pm 0,4$	$1,58 \pm 0,04$	3917 ± 102	486 ± 2
χ^2	0,0002			
O	$4,4 \pm 0,2$	$1,13 \pm 0,02$	2719 ± 55	$536 \pm 1,5$
χ^2	0,0002			

Auf der Grundlage dieser Überlegung läßt sich aus den Spektren der Intermediate das in Abbildung 3.11 dargestellte kinetische Modell des pSRII-Photozyklus herleiten. Nach photochemischer Anregung wird innerhalb der Nachweisgrenze ($< 100 \text{ ns}$) K_{510} (P_1) gebildet, welches mit einer Halbwertszeit von $\tau_1 = 1 \mu\text{s}$ (25°C) zu L_{495} (P_2) zerfällt. L_{495} geht mit $\tau_2 = 10 \mu\text{s}$ (25°C) in ein temperaturabhängiges $L_{495} \leftrightarrow M_{400}$ Gleichgewicht über, wobei sich das Verhältnis systematisch von 25 % M_{400} bei 10°C auf 100 % M_{400} bei 65°C verschiebt. Anschließend wird mit $\tau_3 = 30 \mu\text{s}$ auch bei 25°C reines M_{400} (P_4) gebildet. Das langlebige M_{400} in P_4 erfährt mit $\tau_4 = 2 \text{ ms}$ eine Umwandlung in ein weiteres M_{400} (P_5), welche spektroskopisch nicht voneinander unterscheidbar sind. Dies könnte ein Hinweis auf den postulierten molekularen Schalter sein, der den Orientierungswechsel des M-Intermediates von der extrazellulären Seite zum Zytoplasma beschreibt (Oesterhelt et al. (1992)). Das M_{400} zerfällt mit $\tau_5 = 100 \text{ ms}$ und $\tau_6 = 400 \text{ ms}$ über zwei Quasigleichgewichte mit O_{540} (P_6 und P_7) und N_{485} (P_7), wobei im letzteren (P_7) die O_{540} und N_{485} –Amplituden überwiegen und bei Temperaturen oberhalb 35°C 100 % O_{540} vorliegt. Am Ende des Photozyklus zerfällt O_{540} mit $\tau_8 = 1,2 \text{ s}$, in dessen Spektrum (P_8) bereits typische Absorptionen des pSRII-Grundzustandes dominieren.

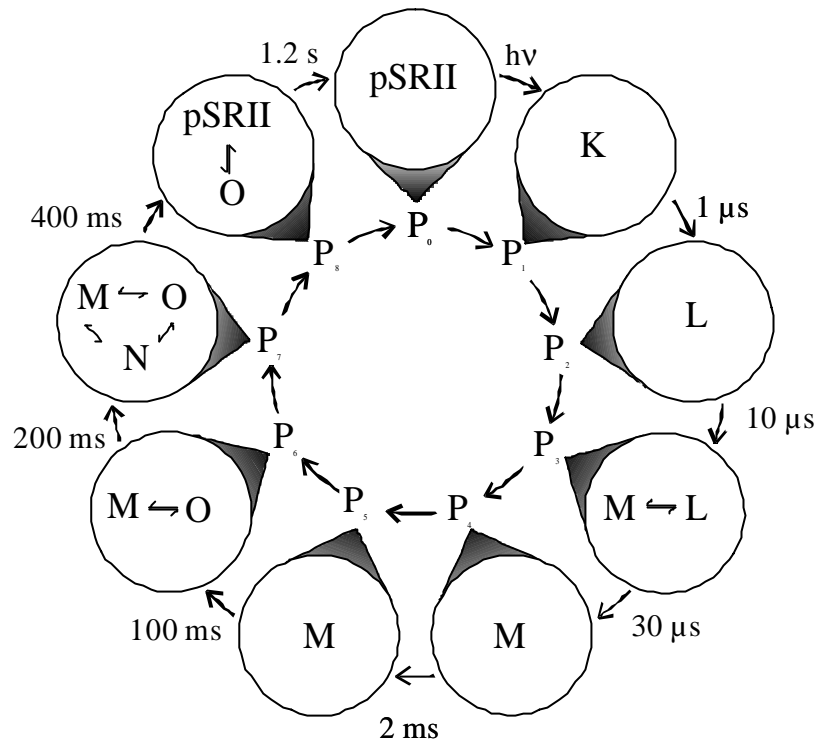


Abb. 3.12 Modell des pSRII-Photozyklus

Dieses Modell weist große Ähnlichkeit mit dem Photozyklus der Ionenpumpe BR nach Chizhov et al. (1996) auf. Der Reaktionsweg einschließlich der Quasigleichgewichte ist nahezu identisch und es scheint, als sei lediglich die Kinetik der beiden Photozyklen verschieden. Während die Bildung von M_{400} (P_4) analog zu BR innerhalb von $50 \mu\text{s}$ erfolgt, verlangsamt sich der M_{400} -Zerfall etwa 200fach auf 500 ms bis 1 s . Auf molekularer Ebene bedeutet dies, daß die den M_{400} -Zerfall charakterisierende Reprotonierung der SB im pSRII gehemmt ist. Diese verlangsamte Reprotonierungsreaktion ist konsistent mit den vorhandenen strukturellen Daten. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von pSRII und BR, stellt man eine weitgehende Homologie im extrazellulären Teil des Protonenkanales fest, der die Deprotonierung der SB bestimmt (Seidel et al. (1995), Luecke et al. (1999)). Im zyttoplasmatischen Kanal hingegen, wo die Reprotonierung der SB stattfindet, sind viele der polaren oder geladenen Reste im BR, wie z. B. Thr46 und Asp38 (BR) im pSRII gegen die aliphatischen Aminosäuren Leu40 und Gly32 ausgetauscht. Insbesondere findet man an der Position der SB-Protonendonorguppe Asp96 im pSRII die neutrale Aminosäure Phe86, wodurch die langsame Aufnahme eines Protons von der zyttoplasmatischen Seite erklärt werden kann.

Trotz der unterschiedlichen Geschwindigkeit der SB-Reprotonierung durchläuft nach dem hier postulierten Modell das angeregte pSRII die gleichen Intermediate mit ähnlichen Quasigleichgewichten wie BR. Daher sollten die Reaktionsmechanismen beider Proteine weitgehend homolog sein und auch das pSRII ein Proton über die Membran nach Außen transportieren. Um dieses Modell zu überprüfen, wurde der Einfluß ortsspezifischer Mutationen im extrazellulären und zytoplasmatischen Protonenkanal untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf die kinetische Charakterisierung des M_{400} -Intermediate gelegt, weil dessen Bildung und Zerfall vermutlich mit der Protonenabgabe und -aufnahme des Proteins gekoppelt ist. Diese im folgenden dargestellten Experimente sollten wichtige Informationen in Hinblick auf die elektrophysiologischen Untersuchungen liefern. Zudem können die Resultate zum Verständnis der Signalübertragung beitragen, da M_{400} als das physiologisch aktive Intermediate vermutet wird, welches mit dem Transducer in Wechselwirkung tritt (Yan und Spudich (1991), Yan et al. (1991))

Untersuchung des extrazellulären Protonenkanals

Photozyklus der Mutante pSRII-D75N und pSRII^{aci}

Mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß mit der Bildung von M_{400} das Proton der SB auf ein Aspartat an der Position 75 im extrazellulären Protonenkanal übertragen wird (Engelhard et al. (1996)). Ein Austausch von Asp75 gegen die ungeladene Aminosäure Asparagin (Asn) sollte daher drastische Folgen für die Photochemie des pSRII haben. In der Tat beobachtet man bei der pSRII-Mutante D75N ein von 498 nm auf 522 nm bathochrom verschobenes Absorptionsmaximum und eine Auflösung der Feinstruktur (Lüttenberg (1999)). Eine ähnliche spektrale Verschiebung wurde auch bei anderen archaebakteriellen Rhodopsinen als Folge einer Neutralisierung der Gegenladung zur SB festgestellt (Zhu et al. (1997), Scharf und Engelhard (1994), Kimura et al. (1984)). Da sich die Gegenladung zur SB nicht nur durch Mutation, sondern auch durch eine Protonierung neutralisieren läßt, sollte sich der pK_a von Asp75 im pSRII durch eine Analyse der pH-Abhängigkeit der pSRII-Absorptionen bestimmen lassen. Zu diesem Zweck wurden die Absorptionsspektren einer rekonstituierten pSRII-Probe bei 22 verschiedenen Protonenkonzentrationen zwischen pH 8,0 und pH 0,5 aufgenommen. In Abbildung 3.12 sind exemplarisch die Spektren bei pH 8,0, pH 3,0 und pH 0,5 dargestellt.

Mit zunehmender Protonenkonzentration verschiebt sich ausgehend von pH 8,0 das Absorptionsmaximum systematisch bathochrom auf 525 nm bei pH 4,5, was dem Absorptionsmaximum der Mutante pSR_{II}-D75N (522 nm) entspricht. Das ursprüngliche Spektrum kann nahezu wiederhergestellt werden, indem man die Protonenkonzentration weiter auf pH 0,5 erhöht und zusätzlich eine Kochsalzkonzentration von 3 mol/l einstellt. Diese pH-Abhängigkeit der Absorptionsspektren läßt sich zum einen mit der Titration von Asp75 zwischen pH 8,0 und pH 3,5 erklären. Zum anderen deutet die Regeneration des ursprünglichen Spektrums bei pH 0,5 und 3M Kochsalz auf eine wenig affine Chloridionen-Bindungsstelle in der Nähe der SB, wie sie auch bei BR beobachtet wurde (Fischer und Oesterhelt (1979), Dér et al. (1991)). Das Chlorid übernimmt in diesem Fall die Rolle des Gegenions zur SB womit die hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums erklärbar ist.

Zur Abschätzung des pK_a von Asp75 wurden Differenzspektren durch Subtraktion der Absorptionen bei pH 8,0 von denen bei niedrigeren pH-Werten gebildet und die Integrale der positiven Banden gegen den pH-Wert aufgetragen. Eine sigmoidale Anpassung lieferte einen Wendepunkt, der einem pK_a (Asp75) = $5,6 \pm 0,1$ entspricht (Abb. 4.13).

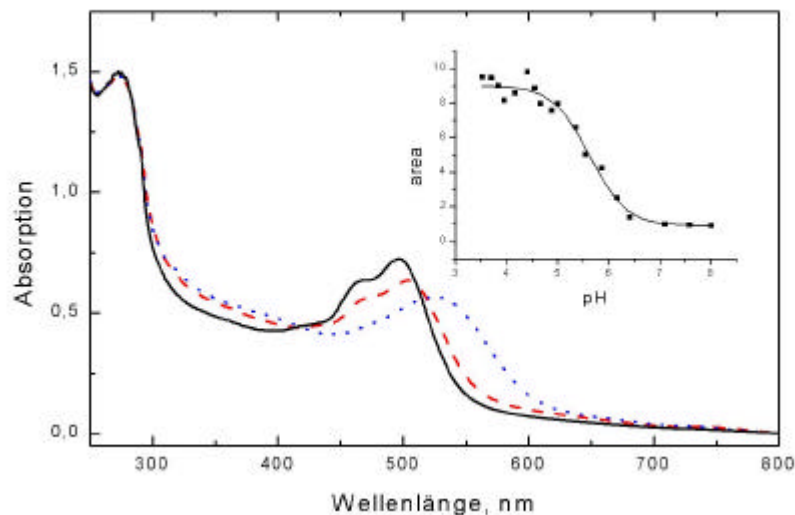


Abb. 4.13 Absorptionsspektrum von rekonstituiertem pSR_{II} bei pH 8,0 (durchgezogene Linie), pH 3,0 (gepunktete Linie) und pH 0,5, 3M NaCl (gestrichelte Linie). Die Titrationskurve von Asp75 wurde aus der Analyse der Absorptionsspektren bei pH-Werten zwischen pH 8,0 und pH 3,5 abgeleitet. Es wurden Differenzspektren durch Subtraktion des Spektrums bei pH 8,0 von denen >pH 8,0 gebildet und die positiven Banden gegen den pH aufgetragen. Eine sigmoidale Anpassung ergibt einen pK_a (Asp75) von $5,6 \pm 0,1$.

Um die Auswirkungen der Neutralisierung von Asp75 auf den pSRII-Photozyklus zu untersuchen, wurden die transienten Absorptionen der Mutante pSRII-D75N bei pH 8,0 und des wt-pSRII^{aci} (dh. wt-pSRII bei pH 3,0) analysiert. In Abbildung 3.14 sind die differentiellen Absorptionsänderungen bei den drei diagnostischen Wellenlängen dargestellt. Beide Photozyklen sind nahezu identisch und unterscheiden sich drastisch von dem des Wildtyps bei physiologischem pH. Innerhalb des zeitlichen Detektionslimits (200 ns) wird ein Intermediat gebildet, welches bei 560 nm maximal absorbiert und über einen Zeitraum von ~ 10 ms stabil ist. Dieses Intermediat zerfällt mit einer Halbwertszeit von $\tau = 28$ ms (pSRII-D75N) bzw. 65 ms (pSRII^{aci}) wobei zeitgleich der Grundzustand regeneriert wird. Ein M₄₀₀-Intermediat wird nicht nachgewiesen, wie man deutlich an der Abwesenheit von Absorptionen um 400 nm erkennt.

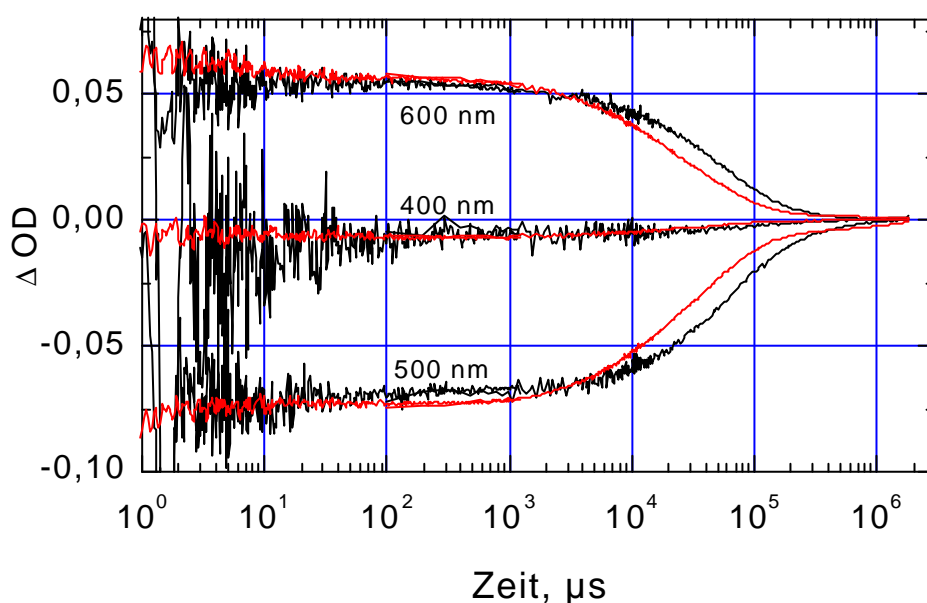


Abb. 3.14 Differentielle Absorptionsänderungen von pSRII-D75N (rot, 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 % DM) und pSRII^{aci} (schwarz, pSRII bei 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 3,0, 0,1 % DM) bei 20°C. Eine multiexponentielle Analyse des Datensatzes (360 nm – 700 nm, 10 nm Schritte) liefert für pSRII-D75N zwei Halbwertszeiten $\tau_1 = 7$ ms und $\tau_2 = 28$ ms. Eine einfach exponentielle Anpassung der differentiellen Absorptionen bei 600 nm ergibt für pSRII^{aci} eine Halbwertszeit $\tau = 65$ ms.

Die Absorptionsänderungen machen deutlich, daß Asp75 eine essentielle Rolle im Photozyklus spielt und als Protonenakzeptors bei der Bildung des M_{400} -Intermediates dient. Anhand der identischen Photozyklen von pSRII-D75N und pSRII^{aci} ist gezeigt, daß tatsächlich Asp75 bei der pH-abhängigen Analyse der Absorptionsspektren titriert wurde und somit der ermittelte pK_a von 5,6 eindeutig diesem Rest zugeordnet werden kann. Es stellt sich die Frage, ob das gebildete Intermediat einer bekannten Spezies des Photozyklus zugeordnet werden kann. Die spektrale Verschiebung des Absorptionsmaximums relativ zum Grundzustand, sowie die schnelle Bildungsgeschwindigkeit sind für das K-Intermediat kennzeichnend. Allerdings spricht die lange Lebensdauer in der Größenordnung von Millisekunden deutlich gegen ein K, welches in allen archaebakteriellen Rhodopsinen eine Halbwertszeit von $\sim 1\mu s$ besitzt. Das Absorptionsmaximum und die Lebensdauer spricht für ein O-Intermediat. Aber selbst wenn man den BR-Photozyklus zu Grunde legt, ist die Bildungsgeschwindigkeit um mindestens zwei Größenordnungen für ein charakteristisches O-Intermediat zu schnell. Im BR relaxiert die korrespondierende Mutante BR-D85N über das K, L und N-Intermediat (Briman et al (1988), Needleman et al. (1991)). Eine analoge Sequenz kann für pSRII-D75N und pSRII^{aci} ausgeschlossen werden, da kein Intermediat mit bathochrom verschobenem Absorptionsmaximum (L, N) nachgewiesen werden kann. In diesem Fall ist für eine Zuordnung der transienten Absorptionen eine detailliertere Analyse der Intermediatspektren erforderlich. Jedoch kann im Hinblick auf den vermuteten Pumpprozess des pSRII angenommen werden, daß in Analogie zum BR, der Protonentransport durch die Inhibierung der M_{400} -Bildung in pSRII-D75N sowie pSRII^{aci} gehemmt ist.

Untersuchung des zytoplasmatischen Protonenkanals

Die Photozyklen der Mutanten pSRII-F86D, pSRII-L40T und pSRII-L40T/F86D

Die Reprotonierung der SB (M_{400} -Zerfall) erfolgt nach dem abgeleiteten pSRII-Modell vermutlich vom Zytoplasma. Um die strukturellen Ursachen für den langsamen M_{400} -Zerfall beim pSRII zu untersuchen, wurden verschiedene pSRII-Mutanten hergestellt und kinetisch charakterisiert. Hierzu wurden die aliphatischen Aminosäuren im zytoplasmatischen Protonenkanal des pSRII gegen die korrespondierenden, für den Protonentransport im BR wichtigen, polaren oder geladenen Reste ausgetauscht.

Zunächst wurde die Mutante pSRII-F86D untersucht. An korrespondierender Position findet sich im BR die Protonendonorggruppe der SB Asp96 (Butt et al. (1986)). Entfernt man im BR Asp96 durch die Mutation D96N, beobachtet man einen auf das pSRII-Niveau verlangsamten M-Zerfall (Tittor et al. (1989)). Da Asp96 (BR) im pSRII nicht konserviert, sondern durch Phe86 ersetzt ist, sollte durch die Einführung von Asp an diese Position der M_{400} -Zerfall beim pSRII beschleunigt werden.

In Abbildung 3.15 A/B sind die transienten Absorptionen wiedergegeben und denen des Wildtyps gegenübergestellt. Man erkennt deutlich, daß die Photozyklen von pSRII und pSRII-F86D nahezu identisch verlaufen. Durch eine multiexponentielle Datenanalyse lassen sich für die Mutante alle acht Intermediate des Wildtypes mit fast identischen Halbwertszeiten identifizieren. Diese sind in Tabelle 3.4 wiedergegeben. Offensichtlich hat die einfache Mutation Phe→Asp an Position 86 keinen Einfluß auf den Photozyklus. Dies mag daran liegen, daß der pK_a der Asparaginsäure durch die unterschiedliche Proteinumgebung in der pSRII Mutante verändert ist, so daß Asp86 die Rolle als Protonendonator nicht erfüllen kann. Zum Beispiel erkennt man in der Kristallstruktur von BR eine Wechselwirkung mit einem Threonin (T46) (Luecke et al. (1999)), an dessen Stelle in der Sequenz des pSRII ein Leucin (L40) zu finden ist. Leucin, als aliphatische Aminosäure, ist nicht in der Lage, Wasserstoffbrücken mit Asp86 auszubilden. Daher wurde mit der Doppelmutante pSRII-L40T/F86D Threonin eingeführt, um die Proteinumgebung von Asp86 der von Asp96 im BR anzupassen.

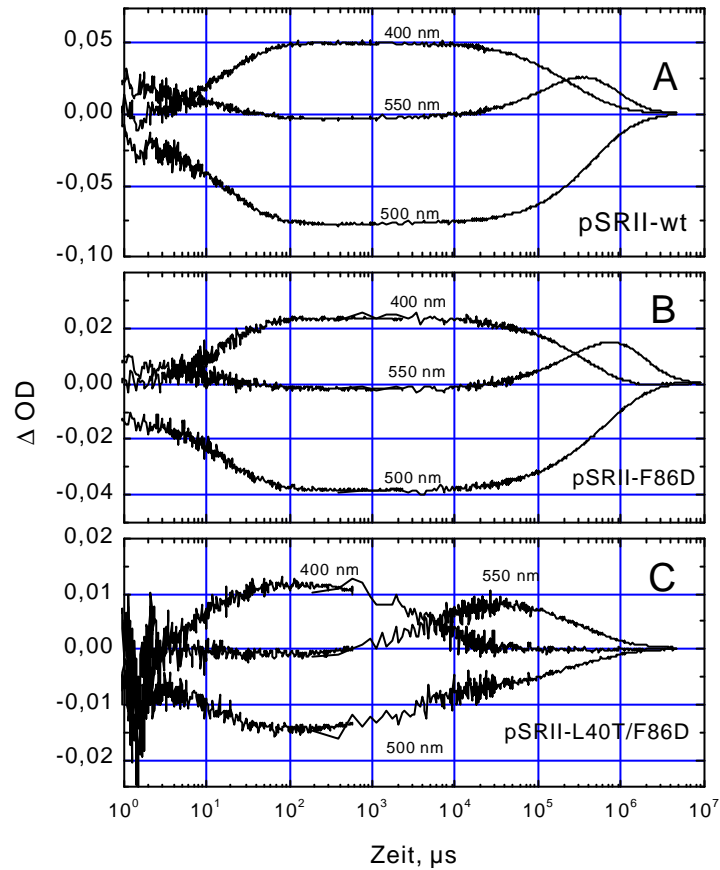


Abb. 3.15 Differentielle Absorptionsänderungen von pSRII (A), pSRII-F86D (B) und pSRII-L40T/F86D (C) bei 20 °C und pH 8,0 (300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl).

Tab. 3.4 Apparente Halbwertszeiten von pSRII und Mutanten bei 20°C (pH 8,0)

	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4	τ_5	τ_6	τ_7	τ_8
pSRII	1 μ s	17 μ s	50 μ s	1,5 ms	120 ms	300 ms	500 ms	1,5 s
F86D	1 μ s	11 μ s	36 μ s	1,3 ms	90 ms	350 ms	570 ms	1,3 s
L40T		10 μ s	85 μ s	12 ms	110 ms		480 ms	1,8 s
L40T/F86D			20 μ s		7 ms	60 ms	370 ms	1,2 s

Bereits an den Absorptionsänderungen (Abb. 3.15C) erkennt man, daß in der Doppelmutante der M_{400} -Zerfall um zwei Größenordnungen beschleunigt ist. Die Gesamtdauer des Photozyklus ist aber unverändert, da der Zerfall des O_{540} -Intermediates nicht beeinflußt ist und deshalb O_{540} akkumuliert. Deutlich werden die Unterschiede zum Wildtyp durch die multiexponentielle Datenanalyse. Wegen der geringen Signalamplitude ($0,01 \Delta OD$ bei 400 nm), bedingt durch die geringe Proteinkonzentration ($OD_{500} = 0,3$) und eines Laserartefaktes (Abb. 3.14 C) konnten nur fünf Intermediate aufgelöst werden. Hiervon sind in erster Linie die frühen, kurzlebigen Intermediate mit $\tau < 10 \mu s$ betroffen. Die ermittelten Konstanten konnten anhand der absoluten Spektren den Intermediaten des Wildtyps zugeordnet werden (Tabelle 3.4). Für den M_{400} -Zerfall ergeben sich zwei Konstanten $\tau_5 = 7 \text{ ms}$ und $\tau_6 = 60 \text{ ms}$. Die dominierende schnelle Phase ist vergleichbar mit dem M-Zerfall in BR ($\tau = 5 \text{ ms}$, Chizhov et al. (1996)). O_{540} hingegen zerfällt mit der gleichen Geschwindigkeit ($\tau_7 = 370 \text{ ms}$ und $\tau_8 = 1,2 \text{ s}$) wie im pSRII ($\tau_7 = 500 \text{ ms}$ und $\tau_8 = 1,5 \text{ s}$). Hierdurch zeigt sich deutlich, daß die Lebensdauer des angeregten Proteins nicht über die Reprotonierung der SB reguliert wird, da der O_{540} - und der M_{400} -Zerfall kinetisch voneinander entkoppelt sind.

Zur Kontrolle, ob diese beobachteten Effekte tatsächlich auf die Doppelmutation L40T/F86D zurückzuführen sind, wurde ebenfalls die einfache Mutante pSRII-L40T hergestellt und deren Photozyklus analysiert. Die ermittelten Halbwertzeiten sind in Tabelle 3.4 wiedergegeben. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp registriert werden.

Einfluß von externen Protonendonatoren auf den M_{400} -Zerfall

Sowohl im pSRII, als auch in der BR-Mutante D96N beschleunigt die Gegenwart von Salzen schwacher anorganischer Säuren, wie das Natriumazid, die Reprotonierung der SB (Miyazaki et al. (1992), Takao et al. (1998), Tittor et al. (1989)). Unklar ist, ob das Azidion die Protonierung der SB durch ein anderes Substrat katalysiert, oder Stickstoffwasserstoffsäure HN_3 direkt als Protonendonator wirkt (Braun und Lanyi (1996)). Zudem stellt sich die Frage, ob sich die Zugabe von Azid auf den kompletten Photozyklus auswirkt, oder, wie im Falle der pSRII-Mutante L40T/F86D, selektiv der M_{400} -Zerfall beschleunigt wird. Um den Effekt von Natriumazid auf den Photozyklus genauer zu untersuchen wurden die Absorptionsänderungen des pSRII, pSRII-F86D und pSRII-L40T/F86D bei verschiedenen Azidkonzentrationen und pH-Werten analysiert. In Abbildung 3.16 ist die Konzentrationsabhängigkeit des Azideffektes für pSRII dargestellt.

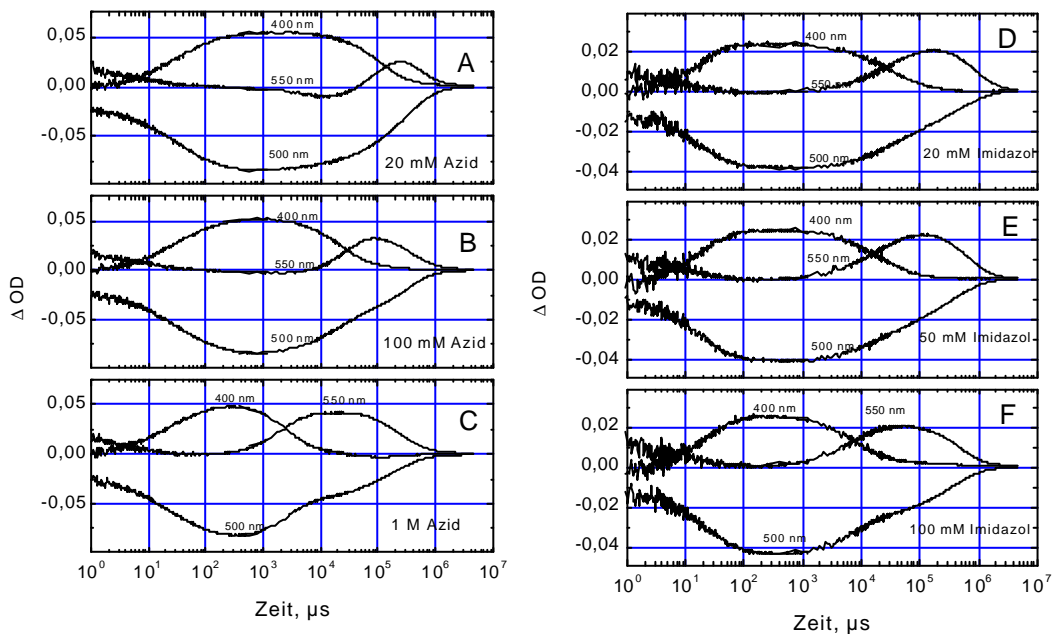


Abb. 3.16 Transiente Absorptionen von pSRII bei 20 mM (A), 100 mM (B) und 1M (C) Natriumazid (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 % DM), sowie für pSRII-F86D bei 20 mM (D), 50 mM (E) und 100 mM (F) Imidazol (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 % DM). Die Absorptionsänderungen wurden bei 400 nm, 500 nm und 550 nm aufgenommen.

Man erkennt, daß der M_{400} -Zerfall von pSRII proportional mit zunehmender Azidkonzentration beschleunigt wird, die Dauer des kompletten Photozyklus (~ 2 s) aber unverändert ist. Der gleiche Effekt wird bei den pSRII Mutanten L40T, F86D und L40T/F86D beobachtet (Daten nicht gezeigt). Wie im Falle der Doppelmutante pSRII-L40T/F86D lassen die Absorptionsänderungen bei Zugabe von Azid erkennen, daß die Reprotonierung der SB nicht die Lebensdauer des angeregten pSRII bestimmt. Hier zeigt sich ein Unterschied zur BR-Mutante D96N. Bei dieser Mutante wird kein O-Intermediat nachgewiesen und der Turnover des Photozyklus korrespondiert mit dem M-Zerfall. Folgerichtig ist in Gegenwart von Azid korrespondierend mit dem M-Zerfall auch der gesamte Photozyklus beschleunigt (Tittor et al (1989)).

In Abbildung 3.17 ist die pH-Abhängigkeit des Azideffektes dargestellt. Bei gleicher Konzentration (250 mM NaN_3) verstärkt sich die Wirkung des Azids bei einer Absenkung des pH-Wertes von pH 7,5 auf pH 6,0 signifikant. Zusammen mit der linearen Beschleunigung des M_{400} -Zerfalls, die selbst bei 1 M Azid keine Sättigung erreicht, spricht dieses Resultat klar gegen einen katalytischen Mechanismus. Die pH-Abhängigkeit des Azideffektes deutet vielmehr auf eine direkte Protonierung der SB durch HN_3 , deren Konzentration mit einem pK_a von 4,1 bei pH 6,0 etwa 30fach höher ist als bei pH 7,5.

Im Falle der Mutanten pSRII-F86D und pSRII-L40T/F86D hat Imidazol die gleiche Wirkung auf den Photozyklus wie Azid (siehe Abb. 3.16 D-F). Der Photozyklus des Wildtyps wird jedoch nicht beeinflusst. Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß der Effekt des Imidazols an die Gegenwart von Asp86 gekoppelt ist. Die Ursache für die Selektivität von Imidazol ist unbekannt. Denkbar ist eine Wechselwirkung mit Asp86, die den pK_a und somit den Protonierungsgrad dieser potentiellen Donorgruppe der SB zugunsten des ungeladenen Zustandes verschiebt. Andererseits könnte Imidazol ($\text{pK}_a = 7,1$) wie HN_3 direkt ein Proton auf die SB übertragen, jedoch sterische oder elektrostatische Unterschiede in der Umgebung der SB seine Zugänglichkeit im Falle des Wildtyps herabsetzen.

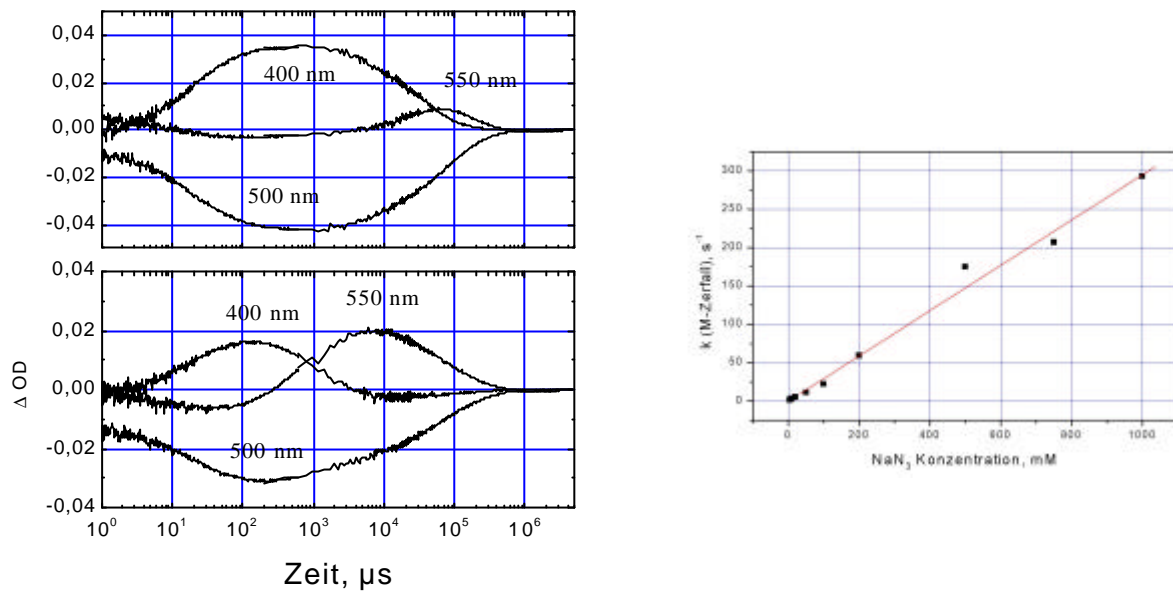


Abb. 3.17 Linke Abbildung: Absorptionsänderungen von pSRII in Gegenwart von 250 mM Natriumazid (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 0,1 % DM) bei pH 7,5 (oben) und pH 6,0 (unten) Rechte Abbildung: Abhängigkeit des M₄₀₀-Zerfalls von der Azidkonzentration. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden durch monoexponentielle Anpassung der differentiellen Absorption bei 400 nm ermittelt.

Der Einfluß von Hintergrundlicht

Die Untersuchungen mit der Laserblitz-Spektroskopie stellen "Single-Turnover"-Experimente dar, bei denen zu einem klar definierten Zeitpunkt eine einmalige Anregung der Proteine erfolgt. Hier liegt ein prinzipieller Unterschied zu den in Abschnitt 3.3 und 3.4 beschriebenen elektrophysiologischen Experimenten, bei denen die Proben unter kontinuierlicher Belichtung analysiert werden. Dadurch kommt es zur Akkumulation von Photointermediaten, die bei den optischen Messungen ausgeschlossen sind. Um die Lichtverhältnisse bei den elektrophysiologischen Untersuchungen zu simulieren, wurde die Photozyklen von pSRII und pSRII-F86D in Abwesenheit und Gegenwart von weißem Hintergrundlicht bestimmt. Hierzu wurde die Lichtintensität der XBO-Lampe erhöht, die als Strahlungsquelle für die Messung der Absorptionen diente. In Abbildung 3.18 sind die Photozyklen des pSRII wiedergegeben.

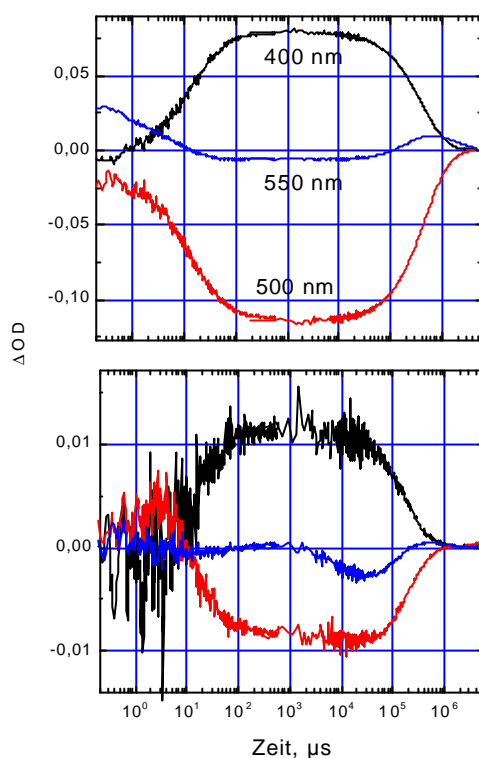


Abb. 3.18 Photozyklus des pSRII ohne (oben) und mit (unten) weißem Hintergrundlicht. Unter Verwendung der identischen Probe wurde die Lichtintensität der XBO-Lampe, die zur Messung der Absorptionen dient, erhöht. Die Messung erfolgte bei 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH8,0 und 1 % DM.

Man erkennt einen deutlich veränderten Verlauf der transienten Absorptionen in der Gegenwart von Hintergrundlicht. Das Amplitudenverhältnis der Kurven bei 400 nm (M_{400}) und 500 nm (pSRII) ist genau umgekehrt - zudem ist das Vorzeichen der Absorptionen bei 550 nm invertiert. Hierdurch wird ersichtlich, daß die Intermediate M_{400} und O_{540} bei Hintergrundlicht angereichert werden. Für die Mutante pSRII-F86D wird ein analoges Verhalten beobachtet. Allerdings deuten FTIR-Untersuchungen darauf hin, daß bei pSRII-F86D der Anteil an Intermediaten mit protonierter SB größer als beim Wildtyp ist (F. Siebert, Universität Freiburg, persönliche Mitteilung).

3.2.2 Der SRI-Photozyklus

Eine erste detaillierte Analyse des SRI-Photozyklus und Ableitung eines kinetischen Modells erfolgte von Bogomolni et al. (1987). Ergebnisse späterer Untersuchungen weichen z.T. deutlich von diesem Modell ab (Olsen et al. (1992), Spudich und Spudich (1993), Bogomolni et al. (1994), Haupts et al. (1996), Jung et al. (1999)). Die Diskrepanzen innerhalb der verschiedenen Arbeiten zeigen, daß die Analyse des SRI-Photozyklus im Vergleich zum pSR II und BR offensichtlich komplizierter ist. Zum einen erschwert die geringe Stabilität des SRI seine Isolierung und schränkt die Modifikation der äußeren Meßbedingungen wie z. B. Temperatur, pH, Intensität des Lasers ein. Zum anderen liegt in der Struktur des SRI-Grundzustandes eine systematische Komplikation in der Analyse des Photozyklus. Wie in Abschnitt 3.1 diskutiert wird, erkennt man im Absorptionsspektrum des SRI mindestens drei Spezies die bei 400 nm (SRI_{400}), 550 nm (SRI_{550}) und 580 nm (SRI_{580}) maximal absorbieren. Sicher ist, daß die durch eine protonierte und deprotonierte Asp76 charakterisierten Spezies SRI_{580} und SRI_{550} zwei unterschiedliche, sich überlagernde Photozyklen durchlaufen, die eine Analyse der Absorptionsdaten erschweren. SRI_{400} ist bisher nicht charakterisiert.

Durch die Untersuchung des SRI-Photozyklus sollte ein Modell auf der Basis der multiexponentiellen Datenanalyse erstellt werden. Da als Probe das heterolog in *E. coli* exprimierte und gereinigte SRI diente, sollte zudem die Aktivität des Proteins getestet und mögliche Unterschiede zum homolog exprimierten SRI ermittelt werden.

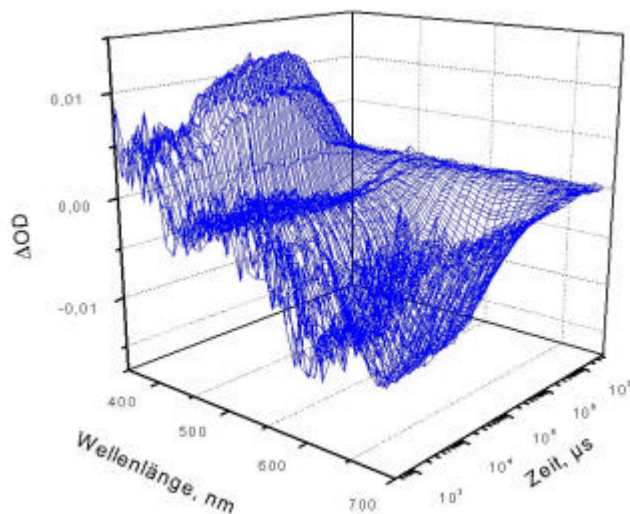


Abb. 3.19 Transiente Absorptionen von SRI bei pH 6,0 (4 M NaCl, 50 mM MES, 0,05 % DM) und 20 °C.

Die transienten Absorptionen wurden bei 46 Wellenlängen zwischen 350 nm und 700 nm (10 nm Schrittweite) bei pH 6,0 und pH 5,5 (20 °C) aufgenommen. Aufgrund der Instabilität des SRI konnten bei pH 4,0 nur die Absorptionsänderungen bei 380 nm und 580 nm, die das M-Intermediat und den Grundzustand repräsentieren, aufgenommen werden. In Abbildung 3.19 ist für pH 6,0 der komplette Datensatz dargestellt, die charakteristischen Absorptionen bei 380 nm und 580 nm für den gesamten pH-Bereich sind in Abbildung 3.20 wiedergegeben. Es können lediglich zwei intensive Banden registriert werden, die dem M_{380} und dem SRI_{550} bzw. SR_{580} zugeordnet werden können. Ein O-analoges Intermediat mit bathochrom verschobenem Spektrum, das in allen anderen archaebakteriellen Rhodopsinen beobachtet wird, ist nicht zu erkennen. Im Gegensatz zum pSRII ist der SRI-Photozyklus deutlich vom pH abhängig. Mit zunehmender Protonenkonzentration nimmt die Amplitude von M_{380} systematisch ab. Bei pH 4,0 ist M_{380} kaum noch nachweisbar. Diese pH-Abhängigkeit reflektiert die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen SR_{550} und SR_{580} in Richtung SR_{580} mit zunehmender Protonenkonzentration, denn SR_{580} akkumuliert sehr wenig M_{380} (Spudich et al. (1995)).

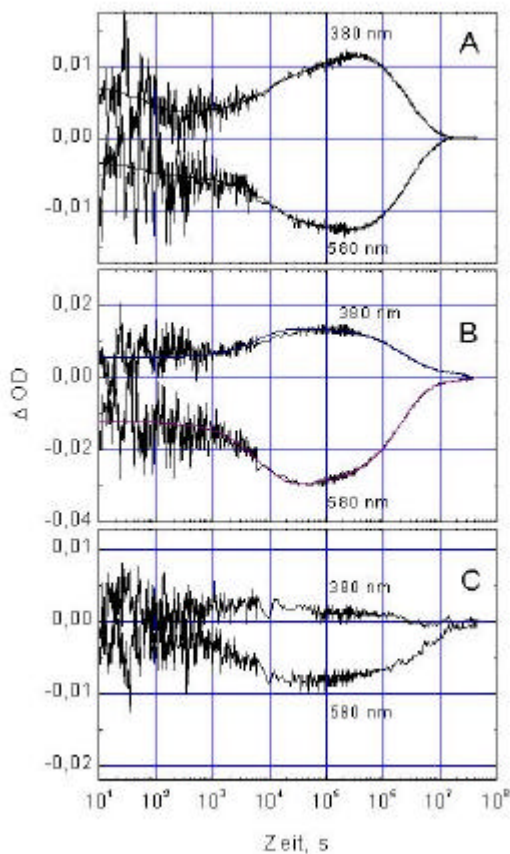


Abb. 3.20 Transiente Absorptionen von SRI bei pH 6,0 (A), pH 5,5 (B) und pH 4,0 (C) bei 20 °C (4 M NaCl, 50 mM MES, 0,05 % DM). Die dünnen Linien in A und B repräsentieren die multiexponentielle Anpassung.

Die multiexponentielle Datenanalyse liefert für den SRI-Photozyklus bei pH 6,0 und pH 5,5 drei, bzw. zwei Halbwertszeiten, welche die Bildung und den Zerfall des M_{380} beschreiben. Eine weitere Komponente mit $\tau < 100 \mu\text{s}$ kann für die Bildung von M_{380} angenommen werden, da bereits zum Zeitpunkt der Datenaufzeichnung Absorptionen bei 380 nm vorliegen. In Tabelle 3.5 werden die Halbwertszeiten den bisher publizierten Daten gegenübergestellt.

Tabelle 3.5: Vergleich der Halbwertszeiten des SRI-Photozyklus mit publizierten Daten

	Puffer	M_{380}-Bildung	M_{380}-Zerfall
<i>diese Arbeit</i>	<i>pH 5.5</i>	<i>4 ms</i>	<i>1.5 s</i>
	<i>pH 6.0</i>	<i>7 ms; 100 ms</i>	<i>2.2 s</i>
Olson et al. (1993)	pH 5.5	n.b.*	214 ms; 1.26 s
Bogomolni & Spudich (1987)	pH 6.8	270 μs	750 ms
Haupts et al. (1996)	pH 5.5	20 μs ; 400 μs	600 ms
	pH 6.8	30 ms; 400 μs	1.3 s
Jung et al. (1999)	pH 5.0	10 μs ; 11 ms	n.b.*
	pH 6.0	11 μs ; 17 ms	

* nicht bestimmt

Die Unterschiede zwischen den Untersuchungen sind wahrscheinlich auf verschiedene Probenpräparationen und/oder Pufferzusammensetzungen zurückzuführen, die beim SRI im Vergleich zum pSRII größeren Einfluß auf die kinetischen Eigenschaften haben. Trotzdem sind die ermittelten Halbwertszeiten größenordnungsmäßig konsistent mit den bekannten Daten: M_{380} wird innerhalb von Millisekunden gebildet, während der Zerfall und die korrespondierende Rückbildung des SRI-Grundzustandes nach einigen Sekunden erfolgt.

Aus den Halbwertszeiten wurden die absoluten Spektren der Intermediate berechnet (siehe Abschnitt 7), aus denen ein Modell des SRI-Photozyklus abgeleitet werden konnte. In Abbildung 3.21 sind die Absorptionsspektren P_1 , P_2 und P_3 für pH 6,0 dargestellt. In jedem Spektrum werden zwei Banden bei 380 nm und 560 nm registriert, was auf schnelle Quasigleichgewichte zweier spektral unterscheidbarer Intermediate deutet (vergl. Abschnitt 3.2.1). Anhand der Verschiebung der Absorptionsmaxima relativ zum Grundzustand können diese Banden den Intermediaten M_{380} und I_{560} zugeordnet werden (Bogomolni et al. (1987)). Beim irreversiblen Übergang von P_1 zu P_2 verschiebt sich das

Quasigleichgewicht zwischen M_{380} und L_{560} in Richtung M_{380} . Die Bande bei 560 nm in P_3 kann anhand der Position in der Reaktionssequenz und der langen Halbwertszeit $\tau_3 = 2,2$ s nicht dem L_{560} -, sondern dem N-Intermediat mit ähnlicher spektraler Verschiebung zugeordnet werden. Ein N-Intermediat wurde bisher für das SRI nicht nachgewiesen.

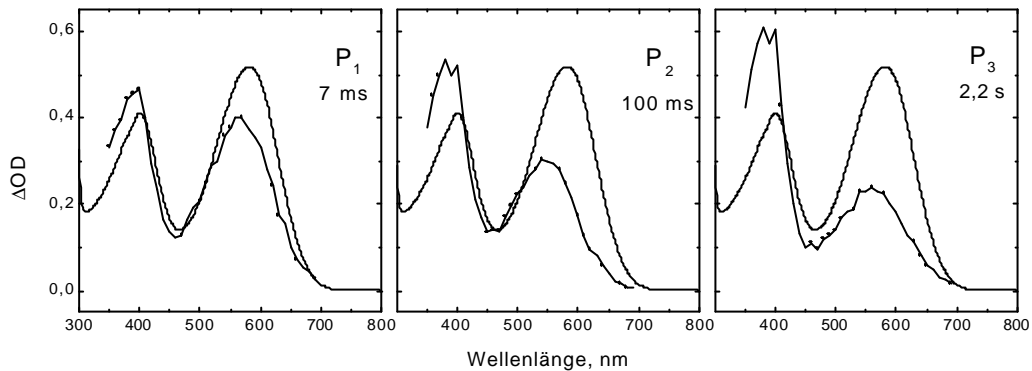
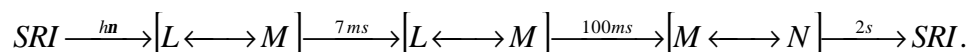


Abb. 3.21 Absolute Absorptionsspektren der kinetischen Intermediate $P_1 - P_3$. Die Spektren wurden unter der Annahme einer Sequenz irreversibler Folgereaktionen nach Abschnitt 7 berechnet. Um die spektrale Verschiebung der Banden zu verdeutlichen ist in jeder Abbildung das Grundspektrum dargestellt.

Aus diesen Überlegungen läßt sich für den SRI-Photozyklus bei pH 6,0 folgende Sequenz ableiten:



Bei der Ableitung dieses Modells muß in Betracht gezogen werden, daß die zugrunde liegenden Absorptionsänderungen eine Superposition der Photozyklen von SR_{550} und SR_{580} darstellen, wodurch bei der Berechnung der absoluten Spektren ein systematischer Fehler vorliegen könnte. Dennoch liefert die Analyse des SRI-Photozyklus wichtige Informationen über den prinzipiellen Verlauf der schlecht charakterisierten thermischen Relaxation des SRI, welche eine Grundvoraussetzung für die Interpretation der elektrophysiologischen Eigenschaften dieses Pigmentes ist.

3.3 Analyse der pSRII-Photoströme mit der "Black-Lipid"-Membrane

Die Anlagerung von Purpurmembranen an die BLM führt zu einer Sandwich-Struktur, wie sie in Abbildung 3.22 dargestellt ist (Bamberg et al. (1979)). Hierbei ist die Orientierung, bei der die extrazelluläre Seite des BR zur BLM zeigt, bevorzugt. Durch die kapazitive Kopplung der proteinhaltigen Membran mit der BLM lassen sich mit dieser Anordnung die Photoströme des BR analysieren.

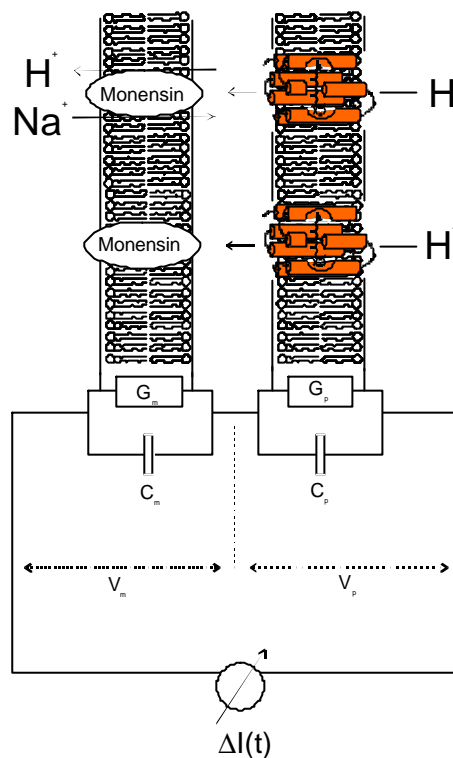


Abb 3.22 Schema der BLM-Anordnung. G_m und G_p stellen die Leitfähigkeit der BLM und der proteinhaltigen Lipidschicht dar. C_m und C_p sind deren korrespondierende Kapazitäten.

Der kapazitive Strom kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$I(t) = I_0 e^{\left(\frac{-t}{\tau}\right)} \quad , \text{ mit } I_0 = I_{p0} \frac{C_m}{C_m + C_p} \quad \tau = \frac{C_m + C_p}{G_m + G_p}.$$

I_0 ist der Anfangsstrom, der im Falle einer Ionenpumpe exponentiell in einen stationären Photostrom I_{p0} abfällt, welcher durch die Aktivität des Proteins und der Kapazität C der BLM (C_m) sowie der proteinhaltigen Membran (C_p) bestimmt wird. τ stellt die

Systemzeitkonstante dar, die von C_m , C_p und deren korrespondierenden Leitfähigkeiten G_m und G_p abhängt. Bei der verwendeten Meßapparatur liegt der Wert von τ bei 0,9 - 1 s. Stationäre Photoströme können bei dieser Anordnung nur detektiert werden, wenn die Leitfähigkeit der BLM durch Zugabe von Entkopplern, wie dem elektroneutralen Ionophor Monensin, von $\sim 10^{-9}$ S/cm² auf $\sim 10^{-6}$ S/cm² vergrößert wird.

Lüttenberg (1999) führte mit dem pSRII und Mutanten erste Untersuchungen der Photoströme mit der BLM-Technik durch und konnte zeigen, daß auch der Photorezeptor unter bestimmten Bedingungen Protonen pumpt. Daher sollte eine Analyse der Photoströme von pSRII und der Mutante pSRII-F86D eine Korrelation der elektrischen mit den absorptionsspektrometrischen Daten zulassen, die Informationen über den Mechanismus des Photozyklus liefert. Hiermit kann die Konsistenz des in Abschnitt 3.2.1 dargestellten kinetischen Modells überprüft werden. Insbesondere sollten die Protonentransferschritte, die mit der Bildung und den Zerfall des vermutlich physiologisch aktiven M₄₀₀-Intermediates gekoppelt sind, charakterisiert werden.

3.3.1 Photoströme des pSRII

In Abbildung 3.23 ist der Photostrom von pSRII unter verschiedenen Bedingungen dargestellt. Bei neutralem pH 6,8 registriert man unmittelbar mit der Belichtung (500 nm, OG 495 cut-off) einen negativen transienten Strom, der innerhalb von wenigen Millisekunden auf die Grundlinie abklingt (Abb 3.23 A). Ein stationärer Photostrom ist nicht zu erkennen. Die Richtung des transienten Signals entspricht einer Verschiebung von positiven Ladungen zur proteinfreien Seite der BLM. Setzt man die gleiche bevorzugte Orientierung des pSRII bei der Anlagerung an die BLM voraus, findet wie beim BR ein auswärts gerichteter Protonentransfer statt (Fahr et al (1981)). Berücksichtigt man neben dem Vorzeichen das schnelle Auftreten und Abklingen des transienten Stroms, so kann dieses Signal den Ladungsverschiebungen im Zuge des Protonentransfers von der SB auf Asp75 zugeordnet werden, welcher innerhalb von 50 μ s bei der Bildung von M₄₀₀ abgeschlossen ist (vergleiche Absch. 3.2.1).

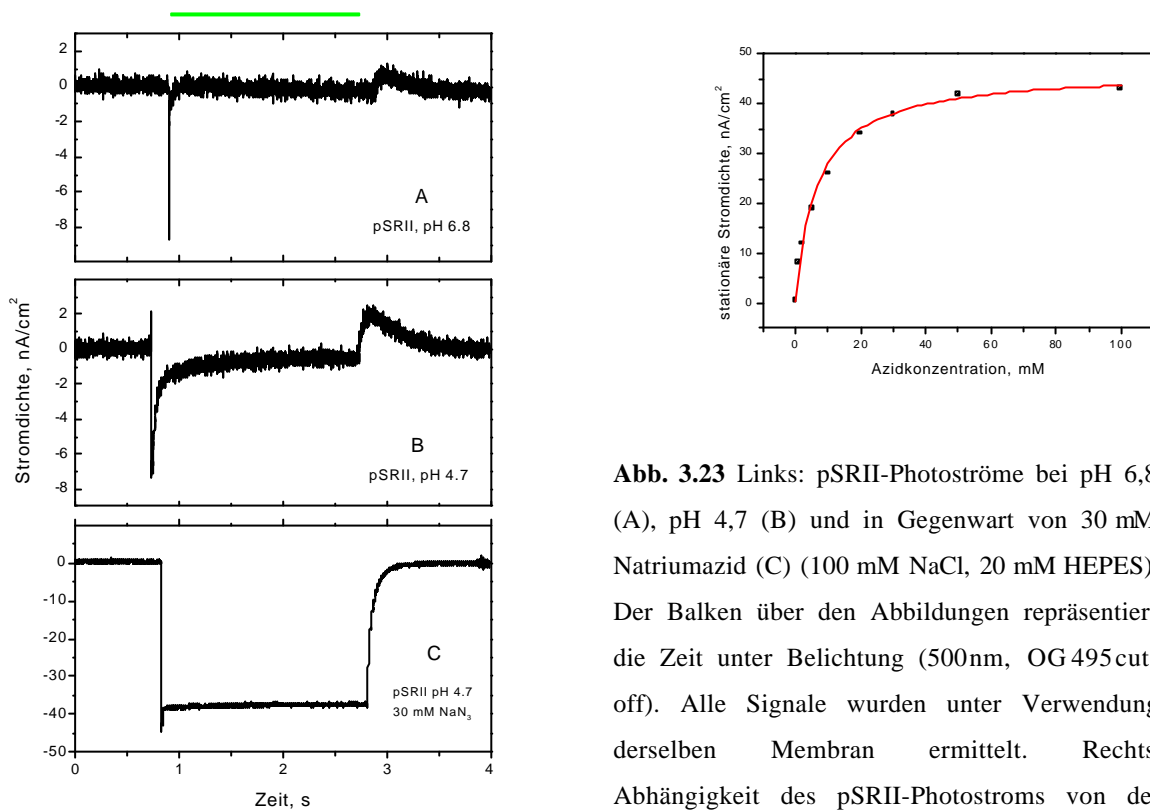


Abb. 3.23 Links: pSRII-Photoströme bei pH 6,8 (A), pH 4,7 (B) und in Gegenwart von 30 mM Natriumazid (C) (100 mM NaCl, 20 mM HEPES). Der Balken über den Abbildungen repräsentiert die Zeit unter Belichtung (500nm, OG 495 cut-off). Alle Signale wurden unter Verwendung derselben Membran ermittelt. Rechts: Abhängigkeit des pSRII-Photostroms von der Azidkonzentration (pH 4,7). Zur Abschätzung

einer Bindungskonstante K_m wurden die Daten hyperbolisch angepaßt ($y = ax/b+x$, mit $a = I_{\max} = 46 \pm 1$ nA/cm² und $b = K_m = 7 \pm 1$ mM).

Eine Herabsetzung des pH auf pH 4,7 führt zu einem geringen stationären Photostrom von 0,6 nA/cm² in gleicher Richtung (Abb 3.23 B). Der stationäre Strom belegt, daß pSRII eine auswärts gerichtete Protonenpumpe darstellt. Auffällig am transienten Signal bei pH 4,7 ist eine zusätzliche positive Komponente. Diese könnte pSRII^{aci}, der pSRII-Spezies mit protonierter Asp75 und einem Absorptionsmaximum von 525 nm zugeordnet werden. In Abschnitt 3.2 wurde gezeigt, daß pSRII^{aci} die gleichen photochemischen Eigenschaften wie die Mutante pSRII-D75N hat und an der BLM einen positiven transienten Photostrom liefert (Lüttenberg (1999)). Da für Asp75 ein pK_a von 5,6 abgeschätzt wurde, sollten unter den Meßbedingungen bei pH 4,7 etwa 75 % der pSRII-Moleküle als pSRII^{aci} vorliegen. Demnach stellt das Signal in Abb. 3.22B eine Überlagerung des negativen Photostroms von pSRII und dem positiven transienten Strom von pSRII^{aci} dar.

In Gegenwart von Natriumazid wird der stationäre Strom von pSRII deutlich verstärkt (Abb. 3.23 C). Bereits 1 mM Azid führt zu einer etwa 10fachen Verstärkung des Signals.

Bei 50-100 mM Azid tritt eine Sättigung ein und man registriert mit 40 nA/cm^2 einen Pumpstrom, der in der gleichen Größenordnung liegt wie man ihn beim BR beobachtet (Bamberg et al (1979)). Aus dieser Sättigungskurve läßt sich eine apparente Bindungskonstante von $K_m = 7 \text{ mM}$ abschätzen (Abb. 3.23).

Wie bei den optischen Messungen, ist der Effekt des Azids abhängig vom pH-Wert und verstärkt sich mit zunehmender Protonenkonzentration. In Abbildung 3.24 sind die pSRII-Photoströme in Gegenwart von 10 mM Azid bei pH 6,8 und pH 5,5 gegenübergestellt. Bei gleicher Leitfähigkeit der BLM von $\sim 60 \mu\text{S/cm}^2$ erhöht sich der stationäre Strom von 5 nA/cm^2 auf 23 nA/cm^2 bei niedrigem pH.

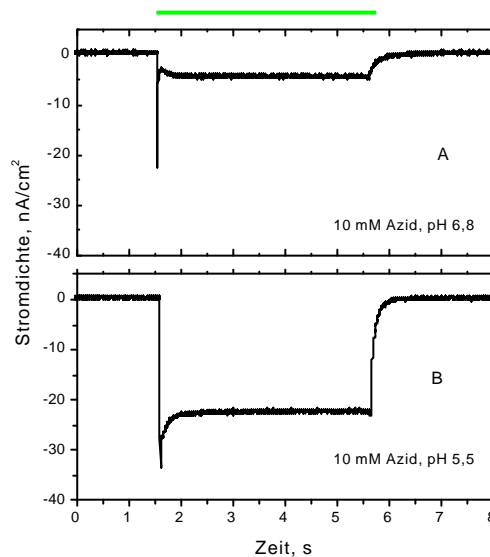


Abb. 3.24 pSRII-Photostrom in Gegenwart von 10 mM Natriumazid bei pH 6,8 (A) und pH 5,5 (B). Der Balken über den Abbildungen repräsentiert die Zeit der Belichtung (500 nm, OG 495 cut-off). Beide Signale wurden unter Verwendung derselben Membran aufgenommen.

Der pSRII-Photostrom ist von der Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes abhängig (Abb. 3.25). Blaues Licht (400 nm) verursacht eine typische Inhibierung des stationären Signals (Abb. 3.25 A). Dieses Quenching ist in Gegenwart von 10 mM Azid aufgrund des größeren Signals deutlicher zu erkennen. Ursprünglich wurde der Quenching-Effekt von Blaulicht für das BR beschrieben und dadurch erklärt, daß im Zuge des durch Blaulicht induzierten M-Zerfalls, die Protonenaufnahme von der extrazellulären Seite erfolgt (Ormos et al. (1978)). Daraus resultiert ein elektroneutraler 2-Photonenzyklus, den ein Teil der aktivierten Moleküle durchläuft, der somit dem elektrogenen 1-Photonenzyklus entzogen wird.

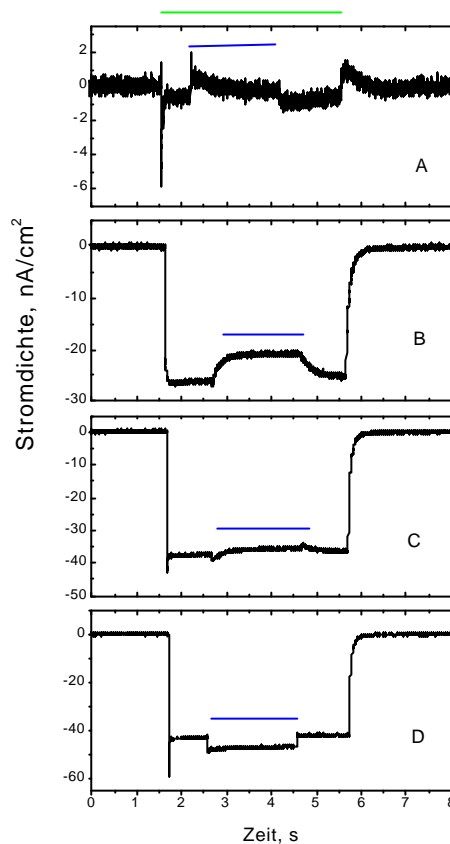


Abb. 3.25 Der Effekt von blauem Licht (400 nm, K40 Breitbandfilter) auf den pSRII-Photostrom bei 0 mM (A), 10 mM (B), 50 mM (C) und 100 mM (D) Natriumazid (100 mM NaCl, 20 mM HEPES, mit Tris/HCl auf pH 4,7 titriert). Die Balken über den Abbildungen repräsentieren die Zeit unter Belichtung mit grünem Licht (unterer Balken, 500nm, OG 495 cut-off) und blauem Licht (oberer Balken, 400 nm, K40 Breitbandfilter). Alle Signale wurden unter Verwendung derselben Membran aufgezeichnet.

Die Hemmung des pSRII-Photostroms durch Blaulicht ist abhängig von der Azidkonzentration (Abb. 3.25). Mit zunehmender Azidkonzentration verringert sich das Quenching, bis bei 30-50 mM Azid keine Verminderung des Photostroms mehr beobachtet wird (Abb. 3.25C). Bei noch höheren Azid-Konzentrationen tritt eine Verstärkung des Signals durch zusätzliches Blaulicht ein (Abb. 3.25D). Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte der zunehmend beschleunigte M_{400} -Zerfall mit steigender Azidkonzentration sein, der zu einer Abnahme der M_{400} -Population unter kontinuierlicher Belichtung führt. Da der pSRII-Grundzustand bei 400 nm noch geringfügig absorbiert (siehe Abb. 3.11), könnte seine Anregung durch blaues Licht gegenüber dem Quenching dominieren und somit die Verstärkung des Photostroms bei hohen Azidkonzentrationen

unter nicht sättigenden Lichtbedingungen hervorrufen. Folgerichtig führt eine Belichtung von pSRII mit Blaulicht ohne grüner Hintergrundbelichtung (grün, 500 nm) auch zu einem stationären Photostrom (Abb. 3.26).

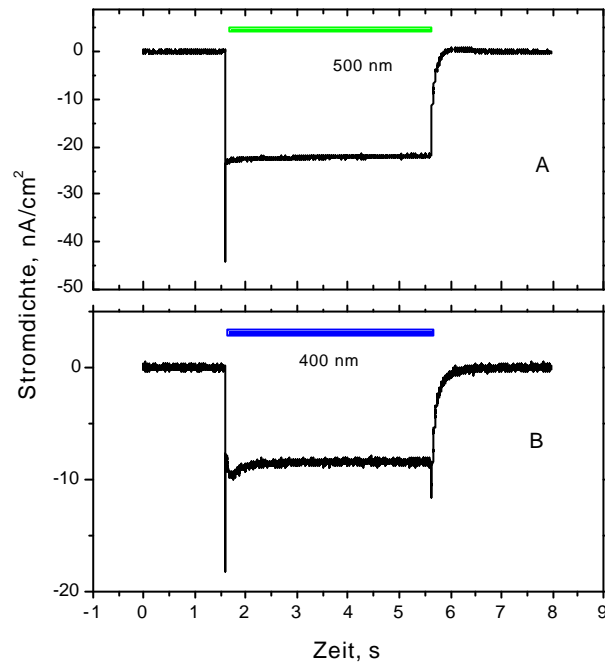


Abb 3.26 Photostrom des pSRII in Gegenwart von 50 mM Natriumazid unter grünem Licht (A, 500 nm, OG 495 cut-off) und blauem Licht (B, K40 Breitbandfilter). Beide Signale wurden unter Verwendung derselben Membran ermittelt.

3.3.2 Photoströme des pSRII-F86D

Die Photoströme der Mutante pSRII-F86D sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Unter den gleichen Bedingungen, bei denen der Wildtyp lediglich ein transientes Signal liefert, generiert pSRII-F86D einen stationären, auswärts gerichteten Photostrom (Abb 3.27A). Dieser stationäre Strom bei neutralem pH kann nur auf eine verstärkte Pumpaktivität des pSRII durch die Einführung von Asp86 in den zytoplasmatischen Protonenkanal zurückgeführt werden. Der Einfluß von Azid auf den Photostrom der Mutante ist identisch zum Wildtyp. Man registriert eine signifikante Verstärkung der Signale mit zunehmender Azidkonzentration, wobei dieser Effekt mit zunehmender Protonenkonzentration größer wird (Abb. 3.27C). Auch das Quenching unter blauem Licht und die hierbei beobachtete

Abhängigkeit von der Azidkonzentration ist homolog zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Andererseits registriert man, daß Imidazol bei der Mutante pSRII-F86D die gleiche Wirkung auf die Signale wie Azid besitzt (Abb. 3.27B), während der Photostrom des Wildtyps nicht beeinflußt wird. Dieser Befund ist konsistent mit dem selektiven Einfluß des Imidazols auf die Absorptionsänderungen von pSRII-F86D (Abschn. 3.2.1).

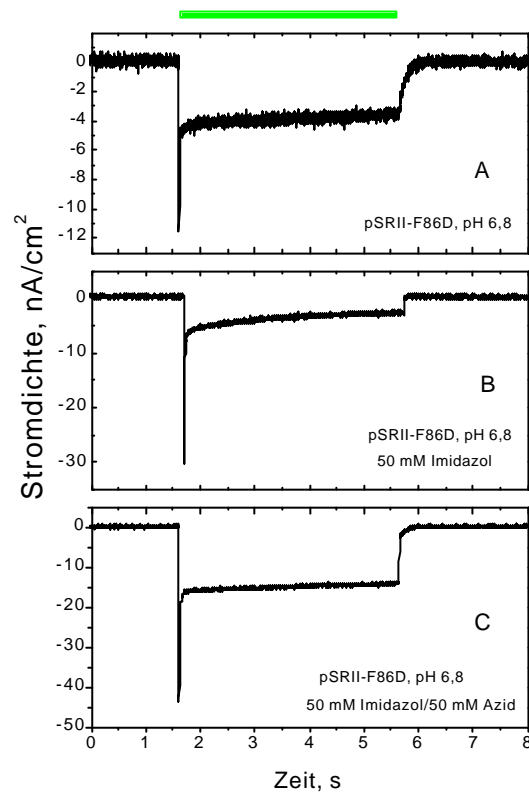


Abb 3.27 Photoströme der Mutante pSRII-F86D bei pH 6,8 (A) und in Gegenwart von 50 mM Imidazol (B), sowie 50 mM Natriumazid /50 mM Imidazol (C) (100 mM NaCl, 20 mM HEPES). Der Balken über der Abbildung repräsentiert die Belichtung (500 nm, OG 495 cut-off). Alle Signale wurden unter Verwendung derselben Membran ermittelt.

Vergleicht man die absorptionsspektrometrischen Daten mit den Photoströmen, stellt sich die Frage, warum man bei der Mutante im Gegensatz zum Wildtyp unter physiologischem pH einen stationären Strom beobachtet, obwohl beide Photozyklen nahezu identisch sind (Absch. 3.2.1). Wegen der vergleichbar großen Amplituden der transienten Photoströme, muß das stationäre Signal von pSRII-F86D durch einen schnelleren Pumpzyklus hervorgerufen werden und kann nicht mit einer unterschiedlichen Anzahl aktiver Moleküle

erklärt werden. Dieser Widerspruch ist noch drastischer wenn man die Photoströme nach Zugabe von Azid bzw. Imidazol betrachtet, da man aus den optischen Daten lediglich einen beschleunigten M_{400} -Zerfall, aber keinen größeren Photozyklus-Turnover beobachtet. Dieser ist mit einer Dauer 1-2 s unverändert. Die Photoströme, die mit bis zu 50 nA/cm^2 an die Größe der Signale des BR reichen, lassen sich mit einem derart langsamen Pumpzyklus nicht erklären. Zweifelsfrei erkennt man allerdings aus der Konzentrationsabhängigkeit des Azid- bzw. Imidazoleffektes sowohl bei den Absorptionsänderungen, als auch den Photoströmen, daß der beschleunigte M_{400} -Zerfall mit einer Verstärkung der Pumpaktivität korreliert. Die Ursache für die Diskrepanz zwischen der Gesamtdauer des Photozyklus und den Photoströmen könnte in den systematisch unterschiedlichen Meßbedingungen liegen. Während die elektrischen Daten unter Dauerbelichtung ermittelt werden, stellen die optischen Messungen "Single-Turnover"-Experimente dar, bei denen eine einmalige Anregung der Probe erfolgt. Ein möglicher Pumpzyklus, der auf einem 2-Photonen Prozeß basiert, kann mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Daß die Voraussetzungen für einen 2-Photonen Mechanismus gegeben sind, konnte durch die in Abschnitt 3.2.1 dokumentierte Akkumulation von M_{400} und O_{540} unter kontinuierlicher Belichtung gezeigt werden.

Neben pSRII und pSRII-F86D wurde zusätzlich die Mutante pSRII-L40T untersucht. pSRII-L40T unterscheidet sich in seinen electrophysiologischen Eigenschaften nicht vom Wildtyp.

Die Doppelmutante pSRII-L40T/F86D konnte nicht untersucht werden, weil durch die geringe Expression des Pigmentes in *E. coli* keine ausreichende Menge an Protein zur Verfügung stand.

Ebenfalls erfolglos blieb die Analyse des SRI. Zwar stand durch eine starke Expression in *E. coli* ausreichend Probenmaterial zur Verfügung, jedoch konnte wegen der Instabilität des Pigmentes, die einen hohen Salzgehalt der Puffer erfordert, keine Sandwich-Struktur an der BLM ausgebildet werden.

3.4 Expression der SR's und SR/Htr-Komplexe in *Xenopus*-Oocyten

Die Mikroinjektion von mRNA in *Xenopus*-Oocyten ist eine Möglichkeit zur heterologen Expression physiologisch aktiver Membranproteine (Gurdon et al. (1971)). In der Regel erfolgt zunächst eine *in vitro* Synthese von cRNA, die dann in die Oocyte injiziert wird. Bei erfolgreicher Expression und Inkorporation in die Plasmamembran der Zelle kann das Protein mittels elektrophysiologischer Methoden untersucht werden. Mit dem Zwei-Elektroden Voltage-Clamp wird die Leitfähigkeit der Oocytenplasmamembran bei konstantem Membranpotential verfolgt. Das Prinzip des Voltage-Clamp ist in Abbildung 3.28 dargestellt.

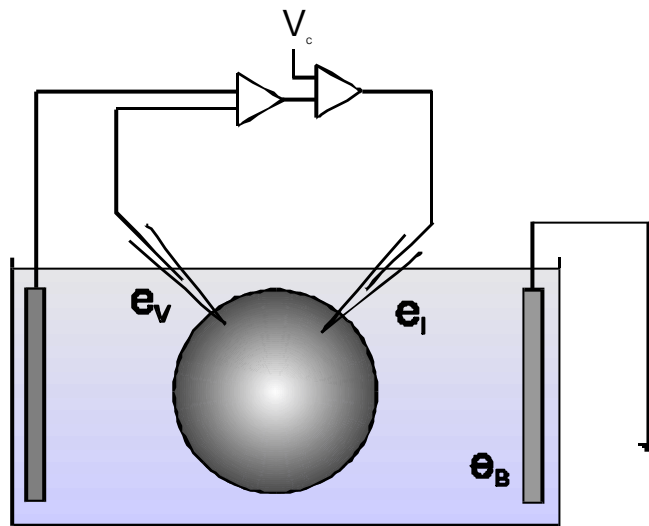


Abb. 3.28 Schematische Darstellung des Zwei-Elektroden Voltage-clamp. Über die Potentialelektrode (e_v) wird das Membranpotential der Oocyte bestimmt, welches der Potentialdifferenz zwischen der Potentialelektrode (e_v) und der Badeelektrode (e_B) entspricht. Falls das Membranpotential von der regelbaren Klemm- oder Sollspannung (V_c) abweicht, wird über einen Rückkopplungsmechanismus durch die Stromelektrode (e_i) ein Strom injiziert, der diese Abweichung kompensiert. Auf diese Weise wird das Membranpotential auf die Sollspannung (V_c) geklemmt.

Das Membranpotential wird ständig durch die sogenannte Potentialelektrode bestimmt und mit der vorgegebenen Klemmspannung verglichen. Treten durch eine veränderte Leitfähigkeit der Membran Unterschiede zwischen beiden Werten auf, wird durch eine zweite Elektrode ein Strom injiziert, der das Membranpotential auf die Klemmspannung zurückführt.

Der injizierte Strom ist die Meßgröße aus der sich die Membranleitfähigkeit nach dem Ohm'schen Gesetz ableiten läßt. Mit dieser Methode sollten die sensorischen Rhodopsine sowie die Rezeptor/Transducer Komplexe untersucht werden, da eine Belichtung der Oocyte im Falle einer Pumpaktivität der Pigmente zu einer Veränderung der Membranleitfähigkeit führt.

3.4.1 Klonierung der DNA-Matrizen

Für die *in-vitro* Synthese der cRNA muß das Zielgen in einen Vektor kloniert werden, der als Matrize für die Transkription des Zielgens dient. Für eine effiziente Translation in den Oocyten sind eine Reihe von Faktoren zu beachten. Im Bereich des AUG-Startkodons bedarf es einer geeigneten Sequenz, damit ein Initiationskomplex mit der 40S Untereinheit des Ribosoms gebildet werden kann. Zur Stabilisierung der RNA sollte zudem eine Polyadenylierung des 3'-Endes erfolgen.

Als Grundlage für die Klonierung der sensorischen Rhodopsine und ihrer Transducer in einen Matrizenvektor, der diese Eigenschaften erfüllt, diente das Plasmid pNK4-psopII. Dieser Vektor wurde vom pNKS2-myc (Gloor et al. (1995)) abgeleitet und von Dr. Philip Wood (MPI für Biophysik, Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. In Abbildung 3.29 ist der pNK4-psopII dargestellt.

Klonierung von SRI und pSRII

Die Klonierungsstrategie für die Matrizenvektoren zur *in vitro* Synthese der cRNA von SRI, pSRII und pSRII-Mutanten ist in Abbildung 3.29 dargestellt. *psopII* wurde durch Restriktion mit NcoI und XhoI aus dem Plasmid pNK4-psopII entfernt. Die DNA-Fragmente mit den Genen *sopI*-His, *psopII*-His, *psopII*-L40T-His und *psopII*-L40T/F86D-His wurden aus den entsprechenden pET27bmod-Plasmiden, (Abschnitt 3.1) isoliert und mit dem geschnittenen Vektor pNK4-psopII über NcoI/XhoI Schnittstellen ligiert. Die erhaltenen Vektoren pNK4-sopI-His, pNK4-psopII-His, pNK4-psopII-L40T-His und pNK4-psopII-L40T/F86D-His besitzen durch diese Klonierung eine Sequenz, die einen C-terminalen Histidin-Tag kodiert (vergl. Abschnitt 3.1).

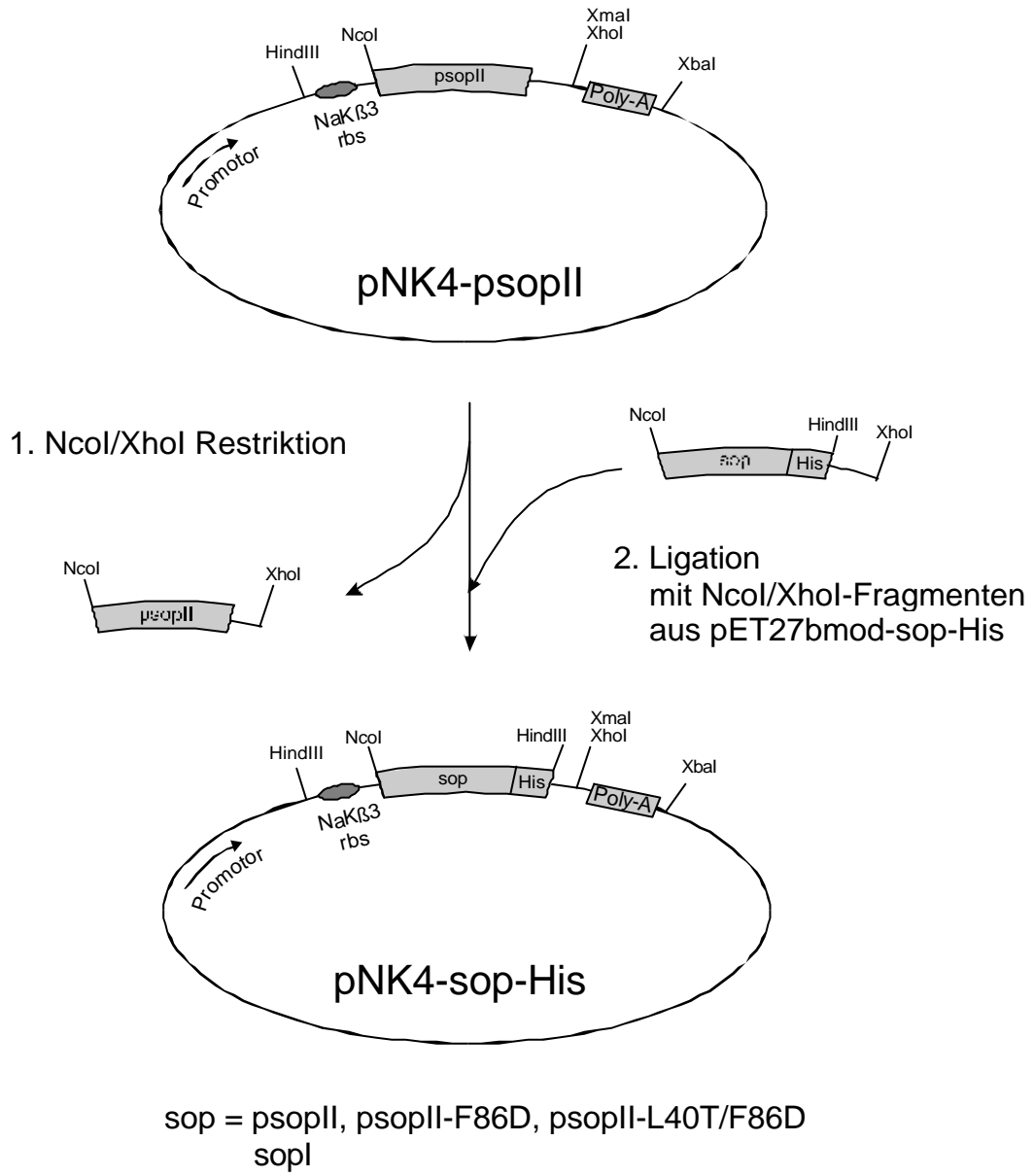
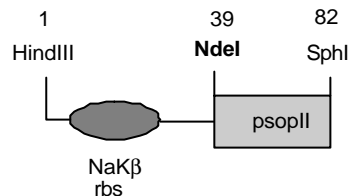


Abb. 3.29 Klonierungsstrategie der Matrizenvektoren für *sopI* und *psopII* und Mutanten

Klonierung von SRII

Im Plasmid pET27b(+)-sopII, welches von Johann Klare (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) zur Verfügung gestellt wurde, ist *sopII* via N-terminaler NdeI- und C-terminaler BclI-Schnittstelle enthalten. 270 Basen stromabwärts des Stop-Kodons befindet sich eine XhoI-Schnittstelle. Um das *sopII* in gleicher Weise wie die anderen Gene der Rezeptoren in den pNK4-Vektor klonieren zu können, wurde durch PCR die NcoI-Schnittstelle des pNK4-psopII Vektors in eine NdeI-Schnittstelle umgewandelt.

Zunächst erfolgte die Synthese des folgenden DNA-Fragmentes mittels des Primerpaares pNK4Nde-Hin/Rev:



Durch die Ligation dieses Fragmentes mit dem HindIII/SphI geschnittenen Vektor pNK4-psopII wurde das Plasmid pNK4mod-psopII erhalten (das *psopII* besitzt eine natürliche SphI-Schnittstelle 43 Basen stromaufwärts des Start-Kodons ATG). Hierdurch konnte anschließend das *psopII* aus *N. pharaonis* durch Restriktion mit NdeI/XhoI entfernt und durch das aus dem pET27b(+)-sopII isolierte NdeI/XhoI-Fragment, welches das *sopII* aus *H. salinarum* enthält, ersetzt werden. Es resultiert das in Abbildung 3.30 dargestellte Plasmid pNK4-sopII :

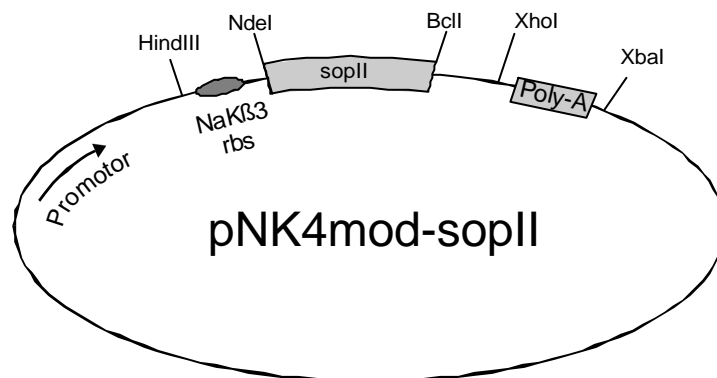


Abb. 3.30 Plasmid für die *in-vitro* Synthese von SRII cRNA

Klonierung von *HtrI* und *pHtrII*

Die Transducer wurden analog zu den Rezeptoren über *NcoI/XhoI* (*phtrII*) oder *NdeI/XhoI* (*htrI*) in die Plasmide pNK4 bzw. pNK4mod kloniert. In Abbildung 3.31 sind die eingeführten DNA-Fragmente und die Zielplasmide pNK4-pHtrII-His und pNK4mod-HtrI dargestellt.

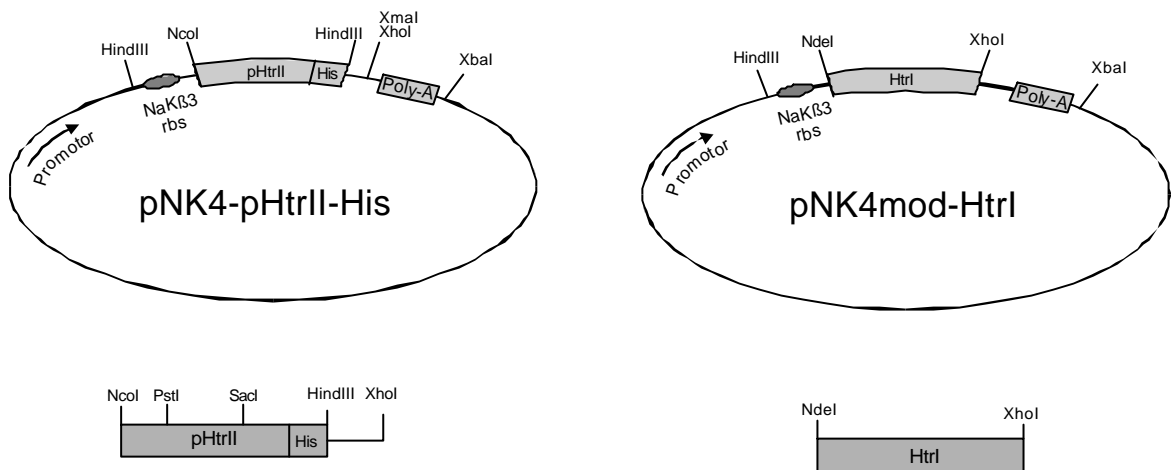


Abb. 3.31 Plasmide für die *in vitro* Synthese der *pHtrII*-His cRNA und *HtrI* cRNA.

Im Falle des *htrI* stammt das DNA-Fragment aus dem Vektor pET27b(+)-*HtrI*, welches von Johann Klare zur Verfügung gestellt wurde. In diesem Vektor ist das aus der genomischen DNA des *H. salinarum* Stammes L33 amplifizierte *htrI* mit N-terminaler *NdeI*- und C-terminaler *XhoI*-Schnittstelle enthalten.

Das *phtrII* mußte zunächst in den pET27bmod kloniert werden, wodurch gleichzeitig ein C-terminaler Histidin-Tag eingeführt werden konnte. In Hinblick auf spätere ortsspezifische Mutationen wurde eine Kasette des *phtrII* synthetisiert, die weitere Modifikationen erleichtern sollte. In Abbildung 3.32 ist der Syntheseweg wiedergegeben. Aus dem Plasmid pRPS1, welches ein genomisches 2,6 kB Fragment mit *phtrII* und *psopII* sowie deren flankierende Sequenzen enthält (Seidel et al (1995)), wurden drei Fragmente des *phtrII* durch PCR amplifiziert. Mittels des Primerpaares *Nc-I/PstI* erfolgte die Einführung einer *NcoI*-Schnittstelle am Start-ATG und durch stille Mutation eine *PstI*-Schnittstelle 486 Basen stromabwärts. Durch die Verwendung der Primer *SacIhin* und *EC-4* wurde das Stop-Kodon in GAG (Glu) mutiert und eine *EcoRI*-Schnittstelle

eingeführt. Die Synthese des mittleren *phtrII* Fragmentes erfolgte mit dem Primerpaar PstIhin/SacIrev.

Nach der Ligation der drei *phtrII* Fragmente mit dem NcoI/EcoRI-geschnittenen Plasmid pET27bmod-psopII-His wurde im letzten Schritt das NcoI/XhoI-Fragment aus dem pET-Vektor in den pNK4 kloniert.

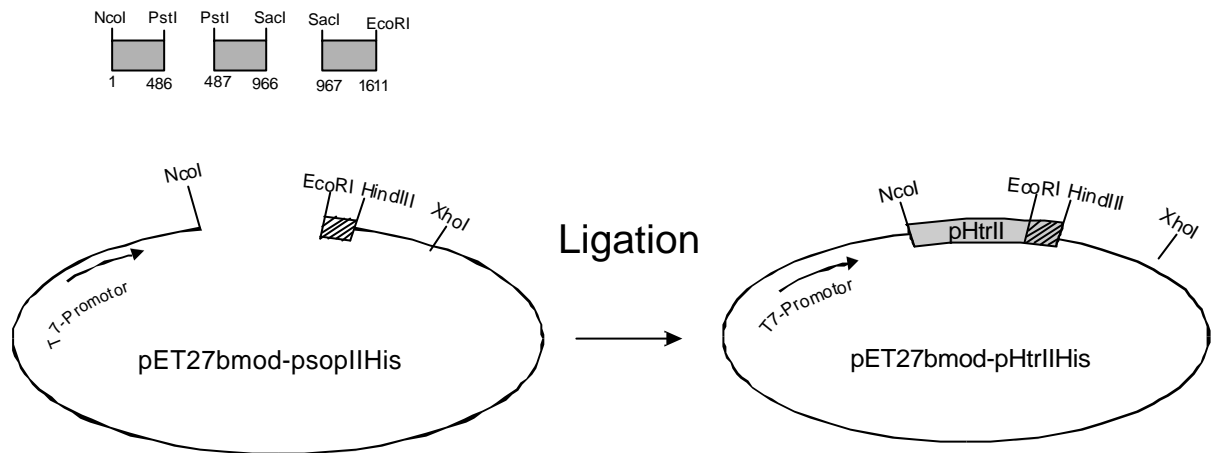


Abb. 3.32 Klonierung einer *phtrII* Kassetten. Die *phtrII* Fragmente wurden aus einem genomischen 2,6 kb DNA-Fragment aus dem Plasmid pRPS1 (Seidel et al. (1995)) durch PCR synthetisiert. Das NcoI/XhoI-Fragment wurde anschließend in den Matrizenvektor pNK4 kloniert.

3.4.2 *In-vitro* Synthese der cRNA

Als Matrizen für die *in-vitro* Synthese der cRNA dienten folgende Vektoren:

pNK4-psopII-His, -psopII-L40T-His, -psopII-L40T/F86D-His

pNK4-sopI-His,

pNK4mod-sopII,

pNK4-pHtrII-His und

pNK4mod-HtrI.

Die pNK4-Plasmide erlauben die Präparation von cRNA mit einem 3'-Polyadenosin-Ende, das die Stabilität der RNA erhöht und einer 5'-Sequenz, welche die ribosomale Bindungsstelle der β -Untereinheit der Na,K-ATPase aus *Xenopus laevis* kodiert. Letztere

sollte als eukaryotische Signalsequenz die Expression der prokaryontischen Gene verstärken und die Inkorporation in die Plasmamembran der Oocyte sicherstellen.

Unter Kontrolle des SP6-Phagenpromotors erfolgte die Synthese der cRNA mit Hilfe des mMessageMachine-Kits (Ambion), welches die cRNA mit einer 7-Methyl-Guanosin(5')ppp(5')Guanosin-Schutzgruppe am 5'-Ende ausstattet. Hierbei wurden jeweils 500 ng der XbaI-linearisierten Plasmide eingesetzt. Die Ausbeuten nach der in Abschnitt 2 beschriebenen Präparation liegen bei 10-15 µg cRNA.

3.4.3 Mikroinjektion von cRNA in Oocyten

Die Mikroinjektion der Oocyten erfolgte durch eine Glaskapillare deren Spitze einen Innendurchmesser von 24-32 µm hatte. Über eine Pumpe an einem Mikromanipulator konnte ein Volumen mit einer Genauigkeit von 0,5-1 nl RNA-Lösung injiziert werden.

Um die Expressionsbedingungen zu optimieren, wurden für SRI, SRII und pSRII-F86D jeweils unterschiedliche Volumina zwischen 5 nl und 50 nl (1 µg/µl RNA) injiziert und die Photoströme nach 2, 3, 4 und 5 Tagen bestimmt. Es konnten jedoch für keinen Fall genau definierten Parameter für eine maximale Expression ermittelt werden, da sich herausstellte, daß sich die Translation der RNA und die Inkorporation der Pigmente in die Plasmamembran in den einzelnen Oocytenchargen z.T. deutlich unterschieden. Prinzipiell müßte jede Charge und jede Oocyte separat optimiert werden, was nicht möglich ist.

Allerdings stellten sich reproduzierbare Tendenzen und Rahmenbedingungen für die Expression der sensorischen Rhodopsine heraus.

Bei allen Pigmenten konnten unabhängig von der injizierten cRNA-Menge nach etwa zwei Tagen Photoströme gemessen werden, die ihren Maximalwert in der Regel nach drei bis vier, spätestens aber nach fünf Tagen erreichten. Ab 15 –20 nl (ng) injizierter cRNA war eine Sättigung der Expressionrate zu beobachten. Größere Mengen an cRNA als 30 ng führten zu einer verminderten Qualität der Zellen, was sich in erhöhten Leckströmen, geringeren Ruhepotentialen und einem früheren Absterben der Oocyten ausdrückt. Generell wurde beobachtet, daß die Verträglichkeit der pSRII-cRNA größer war als die der SRI-cRNA. Die cRNA von SRII scheint toxisch für die Zellen zu sein, da diese nach der Injektion rasch absterben und bereits nach 1,5-2 Tagen Ruhepotentialen von <-10mV aufweisen, während bei nicht injizierten Kontroll-oocyten Ruhepotentialen von -15 mV bis -30 mV ermittelt wurden.

3.4.4 Immunologischer Nachweis der Expression von *psopII* und *phtrII*

Die cRNA des pSRII und des pHtrII kodiert für einen C-terminalen Histidin-Tag, der einen immunologischen Nachweis der Expression beider Gene zuläßt. Hierzu wurden unabhängig voneinander je 50 Oocyten mit 30 ng pSRII-cRNA, pHtrII-cRNA und Wasser injiziert. Nach dreitägiger Inkubation wurden die Plasmamembranen der Oocyten in Anlehnung an einer von Peter de Vries (MPI für Biophysik, Frankfurt) ausgearbeiteten Vorschrift durch aufeinanderfolgende Saccharose und Nycodenz-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Anschließend wurden die Membranen auf ein SDS-Gel aufgetragen, geblottet und mit einem Antikörper gegen den Histidin-Tag (Penta-His, Qiagen) inkubiert. In Abbildung 3.33 sind das SDS-Gel und der Westernblot dargestellt.

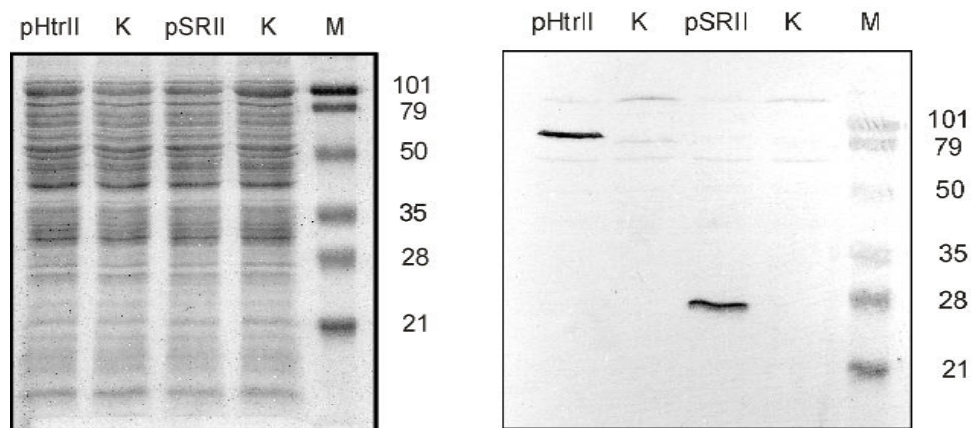


Abb.3.33 SDS-PAGE (links) und Westernblot (rechts) von Oocytenmembranen, die aus unabhängig voneinander, mit je 30 ng pSRII-cRNA, pHtrII-cRNA und Wasser injizierten Oocyten durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurden. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem 5xHis Antikörper (Ratte) von Qiagen.

Die Bandenmuster des SDS-Gels sind nahezu identisch. Man erkennt keine intensivere Bande im Falle der Membranen der Oocyten, die mit der cRNA von pSRII und pHtrII injiziert wurden. Demnach wird weder der Rezeptor noch der Transducer überproportional stark exprimiert. Im Westernblot hingegen registriert man zwei distinkte Banden bei 26 kDa und 85 kDa die dem pSRII und dem HtrII zugeordnet werden können. Obwohl nicht völlig ausgeschlossen werden kann, daß in den Membranpräparationen Kontaminationen vom Endoplasmatischen Retikulum vorliegen, deutet der

Antikörpernachweis auf eine Inkorporation beider Pigmente in die Plasmamembran. Die ähnlichen Intensitäten beider Banden lassen auf eine gleich starke Expression der Pigmente schließen, was in Hinblick auf die Koexpression des pSRII mit pHtrII eine wichtige Information zur Abschätzung der Menge zu injizierender RNA darstellt.

3.5 Voltage-Clamp Untersuchungen der SR und SR/Htr-Komplexe

3.5.1 Photoströme des pSRII und pSRII-F86D

Die Photoströme von pSRII und der Mutante pSRII-F86D wurden vier Tage nach der Injektion von jeweils 15-20 ng RNA unter Voltage-Clamp Bedingungen untersucht. In Abbildung 3.33 sind die repräsentativen Signale des pSRII dargestellt.

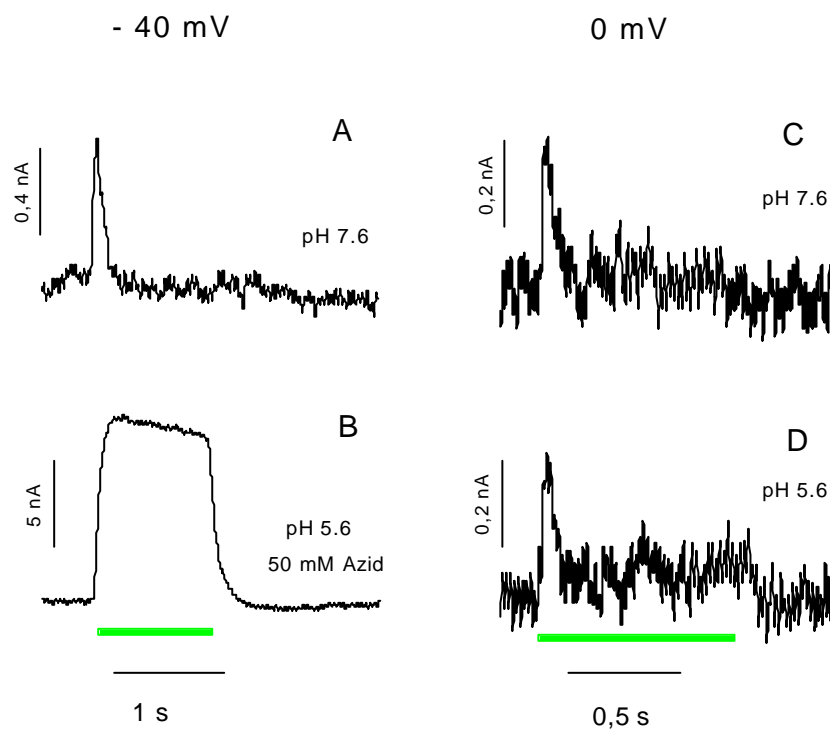


Abb. 3.34 Photostrom von pSRII. Die Signale wurden vier Tage nach der Injektion von 20 ng cRNA und Inkubation der Oocyten bei 18 °C (ORI + 1 μ M *all-trans* Retinal) aufgenommen. Die Ströme in A und B wurden an der selben Oocyte unter Standardbedingungen (A, Puffer d12) und in der Gegenwart von 50 mM Azid (B, Puffer h + 50 mM NaN_3) bei -40 mV (50 Hz Filter) gemessen. In C und D sind die Signale einer Oocyte bei pH = 7,6 (C, Pufferd12, 0 mV) und pH 5,6 (D, Puffer h) und 0 mV (50 Hz Filter) dargestellt.

Bei neutralem pH 7,6 und -40 mV registriert man unmittelbar mit der Belichtung (500 nm, K 50 Breitbandfilter) einen transienten positiven Photostrom, der einer auswärts gerichteten Verschiebung von positiven Ladungen (Protonen) entspricht (Abbildung 3.34A). Bei den meisten Oocyten werden Signale von 0,8- 1,2 nA gemessen, nur in Ausnahmefällen (< 5 % der Oocyten) können Ströme von 2-3 nA beobachtet werden. Eine Erhöhung der externen Protonenkonzentration auf pH 5,6 führt zu einem sehr geringen stationären Strom in gleicher Richtung, der allerdings nur bei -0 mV in schlechter Auflösung detektiert werden kann (Abbildung 3.34C+D). In Gegenwart von Natriumazid ist der stationäre Strom mit 10 – 15 nA signifikant verstärkt (Abbildung 3.34B). Dieser Effekt wird mit zunehmender Protonenkonzentration größer. In Abbildung 3.34 ist das Aktionsspektrum von pSRII in Gegenwart von Azid dargestellt. Hierbei wurden die stationären Ströme in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Anregungslichtes ermittelt. Man beobachtet eine direkte Korrelation der normierten Amplituden mit dem Absorptionsspektrum des pSRII, wodurch belegt ist, daß die aufgenommenen Signale durch den exprimierten Rezeptor hervorgerufen werden.

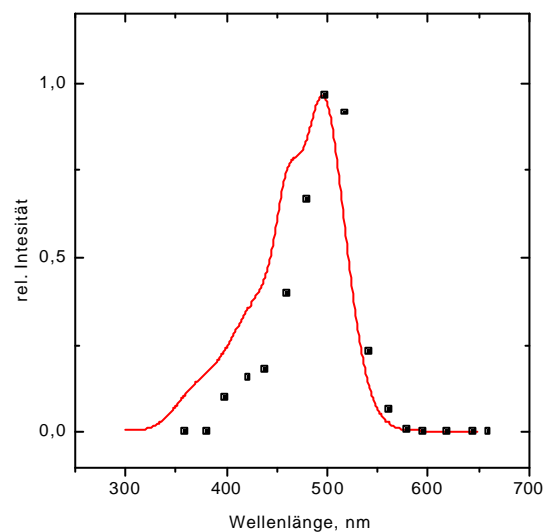


Abb. 3.35 Aktionsspektrum der pSRII Photoströme in Gegenwart von 50 mM Natriumazid (Puffer h) bei -40 mV. Mittels einer XBO-Lampe und Schmalband-Interferenzfiltern wurden die Photoströme bei 16 Wellenlängen zwischen 398,3 nm und 660,0 nm ermittelt. Die Normierung der Signale erfolgte auf Grundlage der vor jeder Messung bestimmten Strahlungsintensität sowie der Strahlungsengie gemäß $E = h c / \lambda$. h ist das Planck'sche Konstante und c die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum.

In Abbildung 3.36 sind typische Photoströme der Mutante pSRII-F86D wiedergegeben. Im Unterschied zu Wildtyp liefert pSRII-F86D auch bei neutralem pH 7,6 und Abwesenheit von Natriumazid ein stationäres Signal von 1-2 nA (Abb. 3.36A).

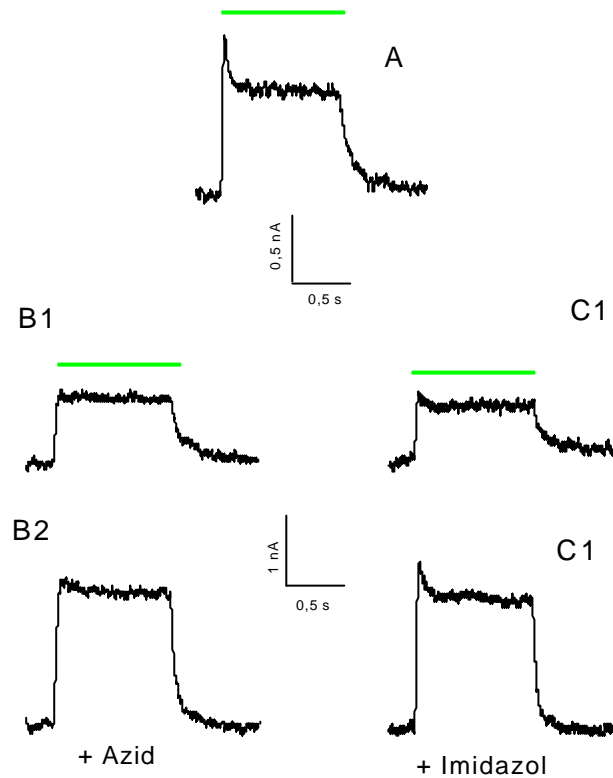


Abb. 3.36 Photostrom von pSRII-F86D unter grünem Licht (500 nm, K50-Breitbandfilter) bei -40 mV (A, Puffer d12). Die Signale in B1(Puffer d12) und B2 (Puffer h + 50 mM Azid), sowie C1(Puffer d12) und C2 (Puffer d12 + 200 mM Imidazol) wurden jeweils an derselben Oocyte gemessen und geben die Verstärkung des Pumpstroms durch Azid und Imidazol wieder. Alle Signale wurden mit 50 Hz gefiltert.

Der Photostrom von pSRII-F86D fließt in die gleiche Richtung wie der des Wildtyps und kann in Analogie zum BR einem auswärts gerichteten Protonentransport zugeordnet werden. Natriumazid und Imidazol verstärken die Pumpaktivität von pSRII-F86D. Wie schon bei den optischen- und den elektrischen BLM-Messungen wirkt Imidazol selektiv auf die Mutante und hat keinen Einfluß auf die Eigenschaften des Wildtyps.

Die Anwesenheit eines stationären Signals der Mutante kann prinzipiell durch einen im Vergleich zum Wildtyp beschleunigten Pumpzyklus oder einer größeren Anzahl aktiver Moleküle erklärt werden. Letzteres ist unwahrscheinlich, da die ähnlich großen Amplituden beider transients Signale eine vergleichbare Translation beider RNA's belegen (Abb. 3.35A, 3.36A). Um den beschleunigten Pumpzyklus von pSRII-F86D zu

dokumentieren, wurden pSRII und die Mutante in verschiedenen zeitlichen Abständen nach einer ersten Belichtung durch einen zweiten Lichtpuls erneut angeregt. In Abbildung 3.37 sind die ermittelten Photoströme dargestellt. Während die Mutante bereits 50 ms nach dem Ende der ersten Belichtungsphase ein maximales Signal liefert, kann der Wildtyp erst nach 1,5 s die ursprüngliche transiente Amplitude regenerieren.

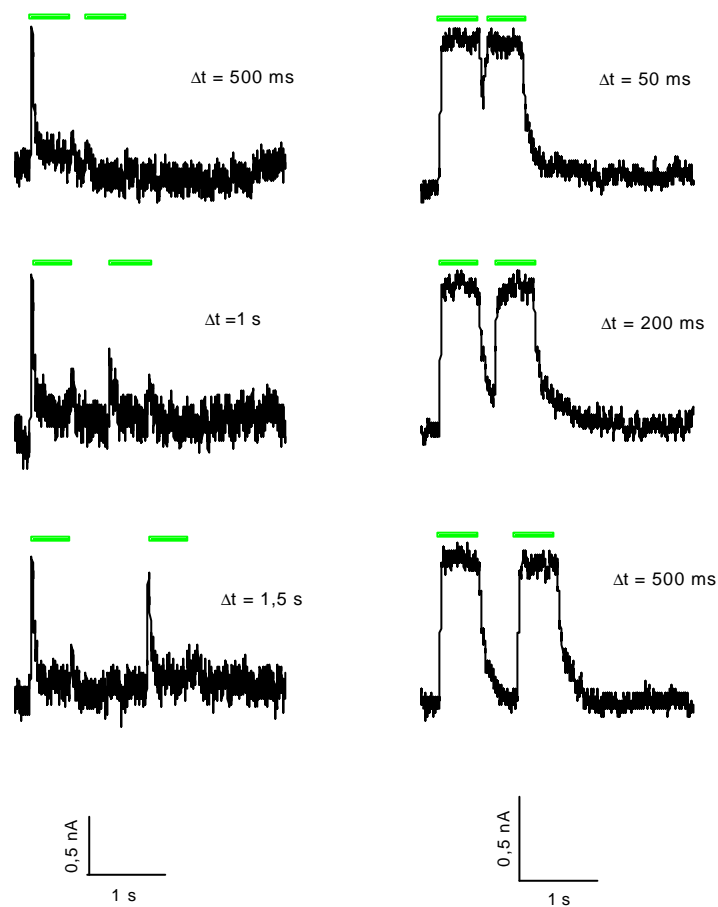


Abb. 3.37 Anregung von pSRII (linke Seite) und pSRII-F86D (rechte Seite) in verschiedenen Abständen nach einer ersten Belichtungsphase. Die Signale wurden bei -40 mV (50 Hz, Puffer d12) aufgenommen. Alle Signale wurden mit 50 Hz gefiltert.

Die langsame Relaxationszeit des pSRII entspricht mit 1,5 s genau der Dauer des Photozyklus nach einfacher Anregung durch einen Laserpuls. Da sich der Photozyklus der Mutante nicht signifikant von dem des Wildtyps unterscheidet, läßt sich die kurze Relaxationszeit, wie bereits im Abschnitt 3.3 diskutiert wurde, nicht mit den optischen Daten erklären. Dieser Befund deutet auf einen 2-Photonenmechanismus des Protonenpumpens von pSRII-F86D, der den Turnover durch einen schnellen photochemischen Zerfall eines Intermediates beschleunigt.

Spannungsabhängigkeit der Photoströme

Ein wichtiges Merkmal bei der Untersuchung vom Ladungstransport über eine Membran ist die Abhängigkeit der Ströme vom Membranpotential. Zum einen enthält die Spannungsabhängigkeit der Photoströme Informationen über den Transportmechanismus und zum anderen lassen sich durch die Einstellung der Klemmspannung im Voltage-Clamp physiologisch relevante Membranpotentiale simulieren. In Abbildung 3.38 sind die Photoströme von pSRII in Gegenwart von 50 mM Natriumazid und von pSRII-F86D bei verschiedenen Membranpotentialen wiedergegeben.

Man registriert in beiden Fällen ein lineares Strom/Spannungs-Verhalten mit abnehmender Amplitude der Signale bei zunehmend größeren negativen Potentialen. Bei etwa -100 mV ist kein stationärer Photostrom mehr zu erkennen und auch das transiente Signal verschwindet bei -130 bis -140 mV. Eine Umkehrung der Transportrichtung wird bei keinem Potential beobachtet. Bereits für das BR wurde ein lineares Strom/Spannungs-Verhalten ermittelt (Nagel et. al. (1995), (1998)). Allerdings ist dessen Umkehrpotential mit -250 mV signifikant zu größeren negativen Werten verschoben (Michel und Oesterhelt (1979)), was auf eine wesentlich geringere Pumpleistung des pSRII bzw. pSRII-F86D schließen läßt. Desweiteren läßt sich aus der Empfindlichkeit der Photoströme gegenüber dem Membranpotential schließen, daß die Ladungsverschiebung während des Pumpzyklus im pSRII wesentlich größer ist als im BR. Das wiederum zeigt größere Konformationsänderungen im Rezeptor an.

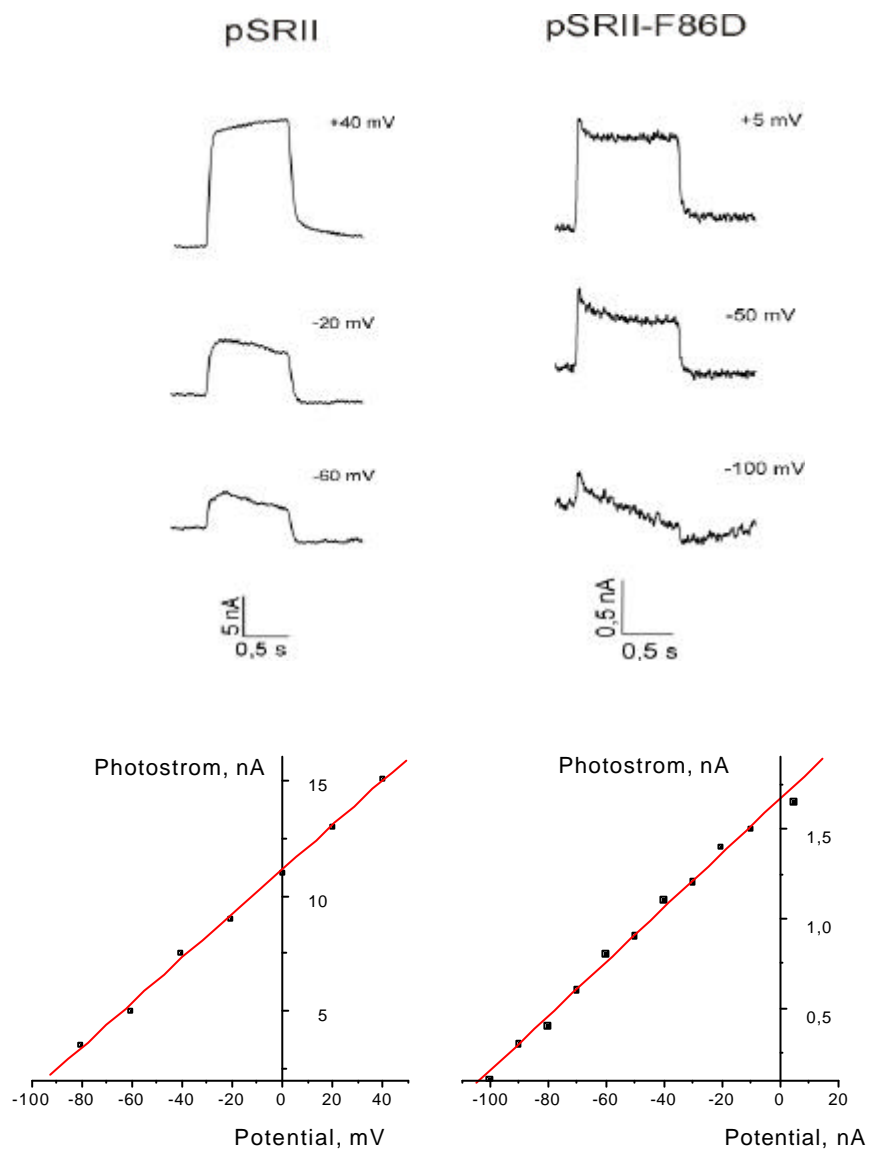


Abb. 3.38 Spannungsabhängigkeit des Photostroms von pSRII (linke Seite, Puffer h + 50 mM Natriumazid) und pSRII-F86D (rechte Seite, Puffer d12). In den unteren Diagrammen ist der stationäre Photostrom gegen das Membranpotential aufgetragen. Alle Signale wurden mit 50 Hz gefiltert.

Kinetische Analyse der Photoströme

Die geringere Pumpleistung von pSRII bzw. pSRII-F86D wird ebenfalls durch das langsame Abklingen ("Off-Response") der pSRII-Photoströme nach dem Ausschalten des Lichtes angedeutet, welches die Relaxation der unter Belichtung akkumulierten Intermediate wiedergibt. Die Kinetik dieser Relaxation korreliert deshalb mit der Geschwindigkeit des Photozyklus. In Abbildung 3.39 ist die kinetische Analyse dieser Relaxation wiedergegeben.

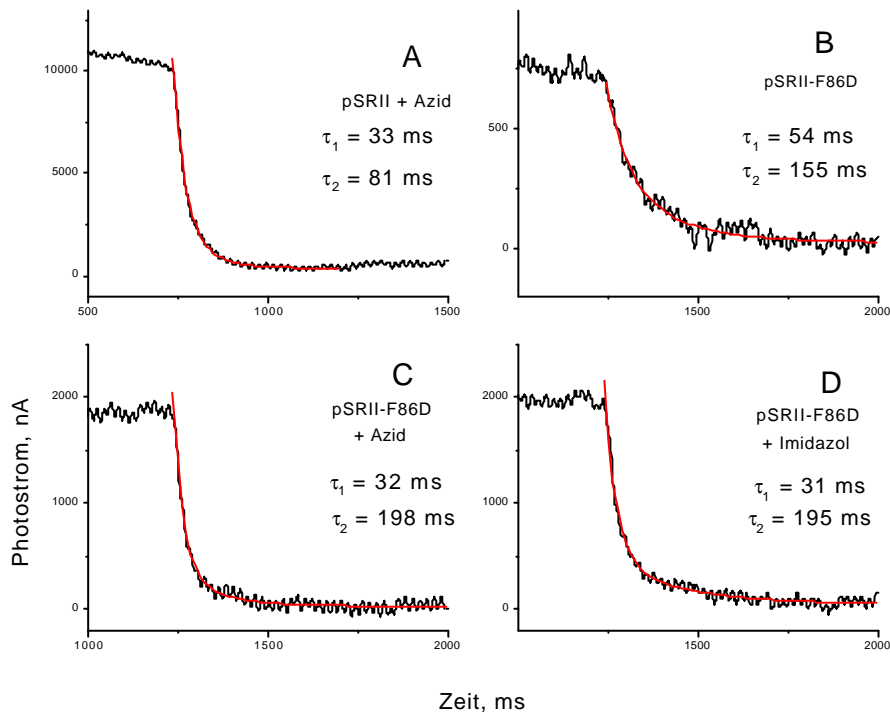


Abb. 3.39 Exponentielle Anpassung der Abklingkurven bei -40 mV unter Verwendung der Beziehung:

$I = I_0 + A_1 \exp(t-t_0)/\tau_1 + A_2 \exp(t-t_0)/\tau_2$. I stellt den Photostrom, t die Zeit, $\tau_{1,2}$ die beiden Zerfallskonstanten und $A_{1,2}$ die Amplituden der Exponentialterme dar. Im einzelnen wurden folgende Parameter ermittelt: (A): $I_0 = 360$ nA, $t_0 = 737$ ms, $A_1 = 8530 \pm 551$, $\tau_1 = 33 \pm 1$ ms, $A_2 = 1887 \pm 570$, $\tau_2 = 81 \pm 10$ ms; (B): $I_0 = 25$ nA, $t_0 = 1248$ ms, $A_1 = 353 \pm 60$, $\tau_1 = 54 \pm 8$ ms, $A_2 = 318 \pm 63$, $\tau_2 = 155 \pm 14$ ms; (C): $I_0 = 50$ nA, $t_0 = 1241$ ms, $A_1 = 1665 \pm 21$, $\tau_1 = 32 \pm 1$ ms, $A_2 = 443 \pm 21$, $\tau_2 = 198 \pm 8$ ms; (D): $I_0 = 9$ nA, $t_0 = 1236$ ms, $A_1 = 1843 \pm 25$, $\tau_1 = 31 \pm 1$ ms, $A_2 = 234 \pm 25$, $\tau_2 = 194 \pm 16$ ms. Alle Signale wurden mit 50 Hz gefiltert.

Untersucht wurde das Abklingen des Photostroms von pSRII in Gegenwart von Natriumazid und pSRII-F86D mit und ohne Zusatz von Azid oder Imidazol. In allen Fällen erfolgt die Relaxation des Signals biphasisch Halbwertszeiten. In Gegenwart von Azid oder Imidazol werden sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante eine nahezu identische schnelle Phase mit $\tau_1 \approx 30$ ms ermittelt. In Abwesenheit der externen Protonendonatoren ist diese Phase beim pSRII-F86D mit $\tau_1 \approx 50$ ms verlangsamt. Die langsame Komponente variiert zwischen $\tau_2 = 81$ ms (pSRII mit Azid) und $\tau_2 = 198$ ms (pSRII-F86D mit Azid). Die Bestimmung von τ_2 ist allerdings durch ein Driften der Grundlinie, wie z.B. in Abbildung 3.39A zu erkennen ist, mit einem systematischen Fehler behaftet. Dieser Fehler wird deutlich, wenn man die Ströme von pSRII-F86D (Abb. 3.39 B,C) vergleicht, die an derselben Oocyte in Abwesenheit und Gegenwart von Azid gemessen wurden. Obwohl die Amplitude des Signals nach Zugabe von Azid etwa doppelt so groß ist (bei gleicher Anzahl an Molekülen), ist die Relaxation des Stroms, die durch τ_2 bestimmt wird, verlangsamt. Trotz der Ungenauigkeit in der Bestimmung von τ_2 wird aber deutlich, daß das Abklingen des Photostroms beim pSRII bzw. pSRII-F86D im Vergleich zum BR signifikant verlangsamt ist, welches mit $\tau_1 = 5$ ms und $\tau_2 = 20$ ms erfolgt (Nagel et al. (1998)). Hierdurch kann auch ohne Kenntnis der Anzahl aktiver Proteine eine geringere Pumpaktivität des Photorezeptors gegenüber dem BR demonstriert werden.

3.5.2 Photoströme des pSRII-L40T/F86D

Die Analyse des Photozyklus der pSRII-Mutante L40T/F86D zeigt einen M_{400} -Zerfall mit einer Halbwertszeit von 7 ms auf, der ähnlich schnell erfolgt wie beim BR (siehe Abschnitt 3.2.1). Aufgrund der Korrelation der Amplitude des pSRII-Photostroms mit der Lebensdauer des M_{400} , erwartet man für pSRII-L40T/F86D eine Pumpleistung, die mit der des BR oder des pSRII in Gegenwart von Natriumazid vergleichbar ist. In Abbildung 3.40 sind die Ergebnisse der Voltage-Clamp Untersuchung zusammengefasst.

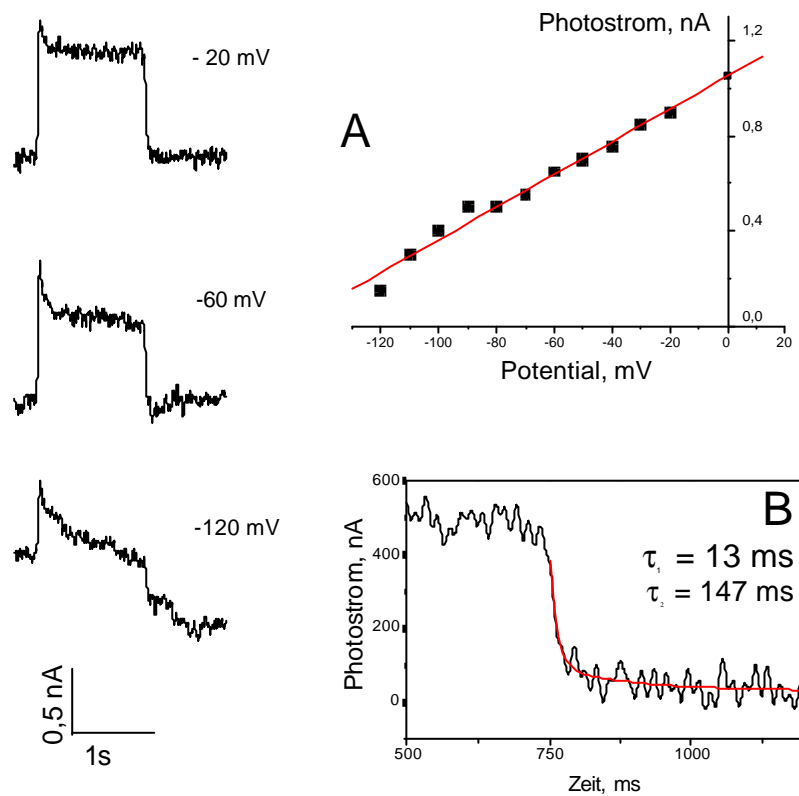


Abb. 3.40 Spannungsabhängigkeit der Photoströme von pSRII-L40T/F86D (A, Puffer d12) und exponentielle Anpassung der Relaxation (B). Als Datensatz diente der bei -40 mV aufgezeichnete Datensatz. Die Analyse nach $I = I_0 + A_1 \exp(t-t_0)/\tau_1 + A_2 \exp(t-t_0)/\tau_2$ ergibt: $I_0 = 30 \text{ nA}$, $t_0 = 751 \text{ ms}$, $A_1 = 299 \pm 16$, $\tau_1 = 13 \pm 1 \text{ ms}$, $A_2 = 66 \pm 10$, $\tau_2 = 147 \pm 23 \text{ ms}$. Alle Signale wurden mit 50 Hz gefiltert.

Die Doppelmutante pSRII-L40T/F86D liefert je nach Oocyte unter Belichtung einen stationären Photostrom von 0,6 – 1,5 nA bei –40 mV. Im Vergleich zur einfachen Mutante pSRII-F86D ist die Amplitude des Signals nicht verändert (vergl. Abb. 3.36). Dennoch gibt es mehrere Hinweise auf eine erhöhte Pumpaktivität der Doppelmutante. Erstens zeigt pSRII-L40T/F86D nur einen minimalen Azid- bzw. Imidazoleffekt (Daten nicht gezeigt), was darauf deutet, daß durch Zugabe der Protonendonatoren der ohnehin schnelle M_{400} -Zerfall nicht mehr signifikant beschleunigt werden kann. Zweitens liegt das Umkehrpotential mit –150 mV bei einem deutlich größeren negativen Wert und auch die biphasische Abklingkurve des Photostroms mit einer schnellen Phase von $\tau_1 = 13$ ms deutet auf einen beschleunigten Pumpzyklus. Daher sind die geringen Photoströme wahrscheinlich auf eine schlechtere Expression der Doppelmutante und somit auf eine kleinere Anzahl aktiver Proteine zurückzuführen. Die stark verminderte Expression in *E. coli* im Vergleich zu pSRII und pSRII-F86D unterstützt diese Annahme (Abschnitt 3.1, Iwamoto et al. (1998)).

3.5.3 Photoströme des sSRII

Sasaki et al. (2000) berichten, daß der sSRII-Photozyklus elektroneutral ist, weil die Protonaufnahme und –abgabe von derselben (extrazellulären) Seite erfolgt. Zu diesem Schluß kommen die Autoren durch eine Untersuchung der lichtinduzierten pH-Änderungen einer Suspension sSRII-haltiger Lipidvesikel oder Lipidschichten. Die geringe Zeitauflösung dieser Methode, mit der erst nach einigen Minuten pH-Änderungen registriert werden konnten, erlaubt keine Korrelation mit kinetischen Daten des sSRII Photozyklus. Daher sollte mittels Voltage-Clamp Messungen die elektrophysiologischen Eigenschaften des sSRII untersucht werden. Hierbei stellte sich heraus, daß bereits 1 -1,5 Tage nach der Mikroinjektion der sSRII kodierenden cRNA die Oocyten im Vergleich zu nicht injizierten Kontrollloocyten abstarben, was sich durch geringere Ruhepotentiale und vielfach größere Leckströme (>100 nA) beim Anlegen von niedrigen Spannungen (-40 mV) äußerte. Diese Beobachtungen deutet darauf hin, daß die injizierte cRNA für die Zellen toxisch ist, was entweder an der Sequenz oder an einer Kontamination liegen kann.

Trotz der großen Leckströme, die zu einer instabilen Grundlinie und einem erhöhten Rauschen führen, konnten an einigen Oocyten zwei Tage nach der Injektion Photoströme ermittelt werden. In Abbildung 3.40 sind exemplarisch Signale, welche bei pH 7,6 und -20 mV aufgenommen wurden, dargestellt.

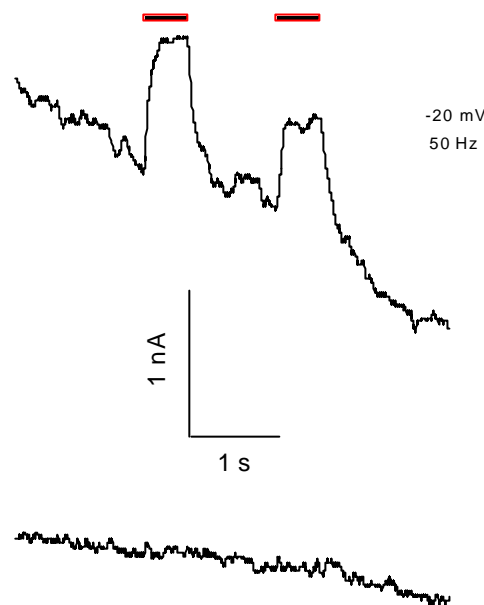


Abb. 3.41 Photostrom von sSRII bei -20 mV (Puffer d12) zwei Tage nach Injektion der Oocyten mit 15 ng sSRII-cRNA. Die untere Spur gibt die Antwort auf Belichtung einer nicht injizierten Kontrollooocyte mit ähnlichem Ruhepotential (-10 mV) und Leckstrom (12 nA). Die Signale wurden mit 50 Hz gefiltert.

Man erkennt deutlich einen positiven stationären Photostrom, der einem auswärts gerichteten Protonenstrom entspricht. Da Kontrollooocyten mit ähnlichen Zellparametern wie Ruhepotential und Leckstrom keinen Photostrom aufweisen, können die Signale dem sSRII zugeordnet werden. Eine detaillierte Charakterisierung der sSRII-Photoströme konnte allerdings wegen der hohen Leckströme nicht vorgenommen werden.

3.5.4 Photoströme des SRI

Die Fähigkeit des SRI, Protonen aus dem Zytoplasma zu pumpen, wurde bereits von verschiedenen Gruppen demonstriert (Olson et al. (1993), Bogomolni e al. (1994), Haupts et al. (1995, 1996)). Jedoch sind die bisher veröffentlichten Daten z.T. widersprüchlich und grundlegende Fragen zum Mechanismus des Protonentransportes offen. Unklar ist, ob das Pumpen auf einem 1- oder 2-Photonenprozeß basiert und wie die unterschiedlichen spektralen Spezies SRI₅₈₀ und SRI₅₅₀ beteiligt sind. Zudem wird eine Umkehrung der Transportrichtungen unter bestimmten Licht- und pH-Bedingungen diskutiert (Haupts et al. (1996)). Die Voltage-Clamp Untersuchung des SRI liefert wichtige Informationen zu diesen Fragen. In Abbildung 3.42 ist ein repräsentatives Signal des SRI dargestellt.

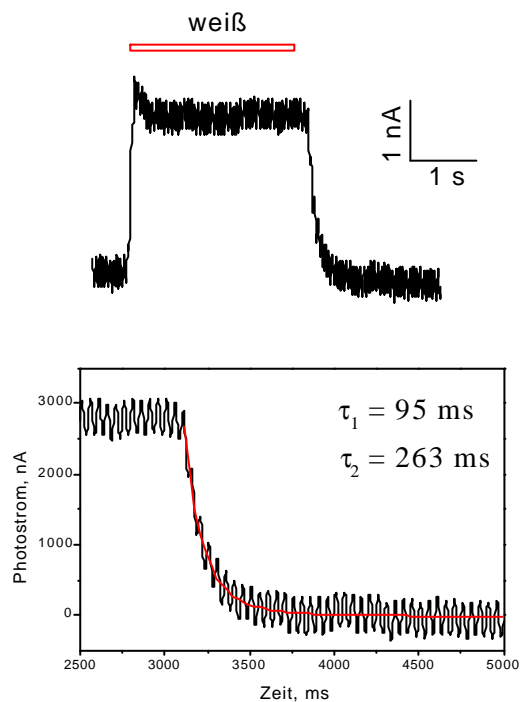


Abb. 3.42 Photostrom des SRI bei -20 mV (Puffer d12) unter ungefiltertem weißen Licht. Das Signal wurde mit 20 Hz gefiltert. Die Analyse der Relaxation nach $I = I_0 + A_1 \exp(t-t_0)/\tau_1 + A_2 \exp(t-t_0)/\tau_2$ ergibt: $I_0 = -13$ nA, $t_0 = 3117$ ms, $A_1 = 2164 \pm 479$, $\tau_1 = 95 \pm 17$ ms, $A_2 = 531 \pm 113$, $\tau_2 = 262 \pm 113$ ms.

Ungefiltertes, weißes Licht induziert ein stationäres, positives Signal von 2-4 nA, was einem auswärts gerichteten Protonenstrom entspricht. Dieser Strom fällt nach der Belichtung biexponentiell mit einer dominierenden schnellen Phase $\tau_1 = 95$ ms und einer ungenau aufgelösten langsamen Phase $\tau_2 = 263$ ms auf die Grundlinie ab. Wie in Abbildung 3.43 zu erkennen ist, besitzt der Photostrom eine starke Spannungsabhängigkeit.

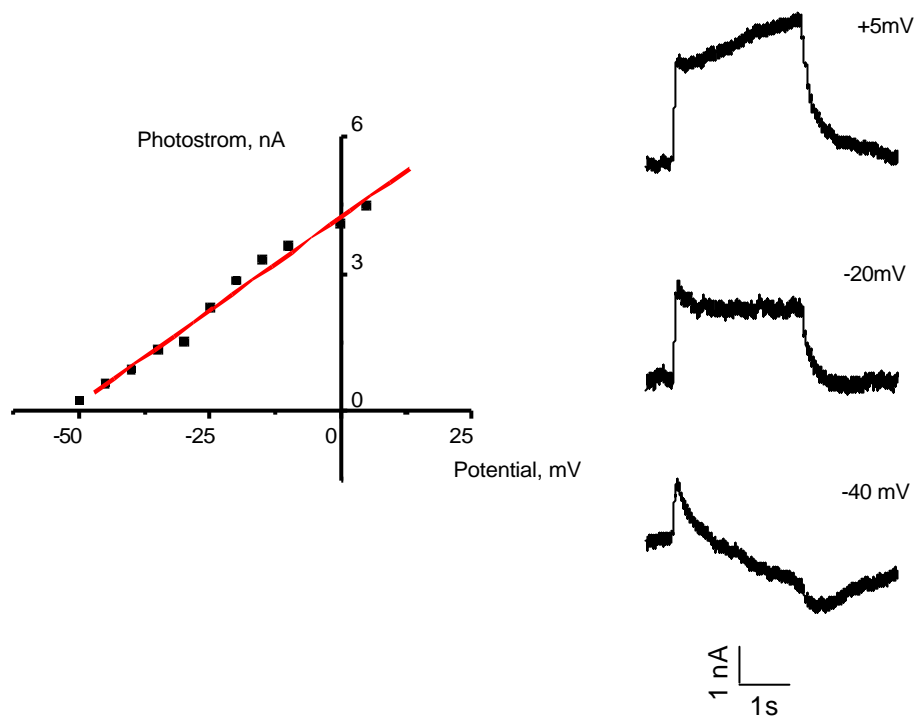


Abb. 3.43 Spannungsabhängigkeit des SRI-Photostroms (Puffer d12). Die Signale wurden mit 20 Hz gefiltert.

Bereits bei -50 mV detektiert man kein stationäres Signal mehr, ein einwärts gerichteter Transport positiver Ladungen wird aber auch bei größeren negativen Potentialen nicht registriert. Neben der ungewöhnlich starken Spannungsabhängigkeit unterscheidet sich das SRI-Signal im Vergleich zum pSR II zudem in seiner Reaktion auf Licht verschiedener Wellenlängen. Gelbes Licht (> 495 nm) generiert kein stationäres, sondern ein kaum detektierbares transientes Signal (Abb. 3.45A). Blaues Licht (380 – 420 nm) induziert nur ein schwaches stationäres Signal mit < 10 % der Amplitude, die weißes Licht verursacht. Dieses Signal wird wahrscheinlich durch die schwache Absorption des Grundzustandes SR₅₅₀/SR₅₈₀ hervorgerufen (Daten nicht gezeigt). Hieraus folgt, daß ein Pumpstrom nur in Gegenwart von blauem Licht detektiert wird, wenn gleichzeitig gelbes Licht von

SR_{550}/SR_{580} absorbiert wird. Diese Beobachtung deckt sich mit der Hypothese von Haupts et al. (1994), die einen 2-Photonen-Mechanismus für den Protonentransport formulieren. Demnach überführt gelbes Licht den Grundzustand in das langlebige S_{380-} oder M-Intermediat, welches durch die Absorption eines "blauen" Photons nicht über den thermischen, sondern über einen etwa 20fach beschleunigten, photochemisch induzierten Reaktionsweg zerfällt.

pH-Abhängigkeit der Photoströme

Um zu untersuchen, welche Spezies des Grundzustandes, SRI_{550} oder SRI_{580} , für das Pumpen verantwortlich ist, wurde die Abhängigkeit des Photostroms von der externen Protonenkonzentration bestimmt. SRI_{550} und SRI_{580} zeichnen sich durch eine deprotonierte und protonierte Asp76 mit einem $pK_a = 7,2$ aus (Rath et al. (1994)), was eine Korrelation ihrer Verteilung bei unterschiedlichem pH mit der Amplitude des Photostroms ermöglicht. In Abbildung 3.44 sind die Signale bei verschiedenem pH dargestellt.

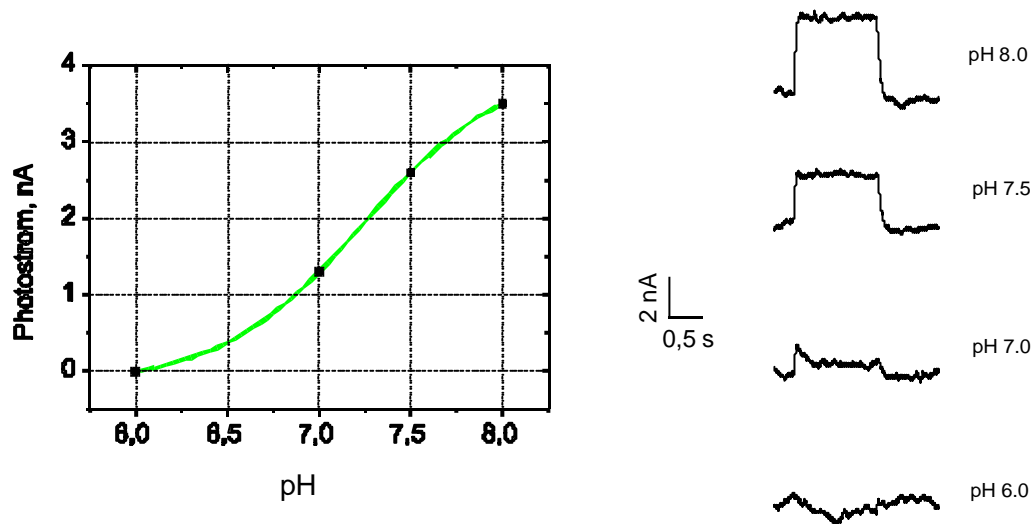


Abb. 3.44 pH-Abhängigkeit des SRI-Photostroms bei -20 m. Eine sigmoidaler Boltzmann Anpassung liefert einen pK_a von $7,2$ ($I_{\min} = -0,16 \pm 0,2$ nA, $I_{\max} = 4,0 \pm 0,3$, $pH(I_{\max}/2) = 7,2 \pm 0,1$). Alle Signale wurden mit 20 Hz gefiltert.

Man erkennt eine systematische Abnahme der Amplitude mit zunehmender Protonenkonzentration. Bei pH 6,0 wird kein Signal mehr detektiert. Die pH-Abhängigkeit der Photoströme folgt einem sigmoidalen Verlauf mit einem Wendepunkt bei pH 7,2, der exakt dem pK_a von Asp76 entspricht (Rath et al. (1994)). Die Veränderung der Amplitude des SRI-Photostromes geht demnach mit der Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichtes von Asp76 einher. Eine exklusive Beteiligung von SRI₅₅₀ am Pumpprozeß erklärt diese pH-Abhängigkeit des Photostroms.

Im Rahmen der Voltage-Clamp Untersuchungen stellte sich heraus, daß beim SRI nicht nur die spektral unterscheidbaren Spezies des Grundzustandes, sondern auch lichtabhängige Adaptationen seine photochemische Charakterisierung erschweren. Wie bereits diskutiert, induziert gelbes Licht nur ein transientes Signal von geringer Amplitude (Abb. 3.45A). Falls aber die Oocyte mit weißem oder blauem Licht vorbelichtet ist, generiert gelbes Licht einen transienten Strom mit gleicher Amplitude wie das stationäre Signal unter weißem Licht. Der transiente Strom klingt sehr langsam mit einer Halbwertszeit > 500 ms ab. Hierbei spielt es keine Rolle, ob das Signal durch einen kurzen gelben Lichtpuls (< 1 ms) oder kontinuierlicher Belichtung (gelb) induziert wird. Der transiente Strom kann bis etwa 5 min nach der Vorbelichtung beobachtet werden. Zusätzliches blaues Licht regeneriert den stationäre Photostrom unter weißem Licht (Abb. 3.45C). Ein zweite Exposition mit gelben Licht liefert nur das kaum nachweisbare Signal des nicht adaptierten SRI (Abb. 3.45B). Die in Abbildung 3.45 dargestellten Experimente belegen, daß sich unter weißem oder blauem Licht eine langlebige Spezies $S_{>500}$ akkumuliert, die im langwelligen spektralen Bereich über 500 nm absorbiert. Aufgrund der Lebensdauer von mehreren Minuten und der großen Ladungsverschiebung relativ zum stationären Strom, die durch die Fläche unter dem Signal repräsentiert wird, kann das transiente Signal nicht durch eine Anregung eines Intermediates aus dem Pumpzyklus stammen.

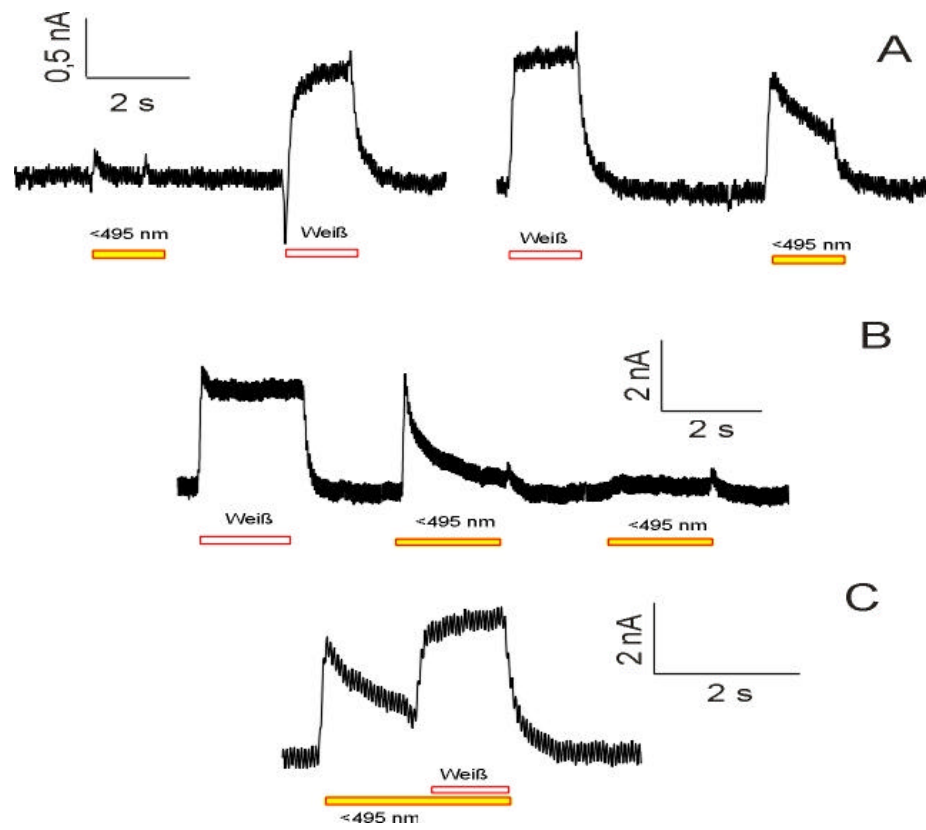


Abb. 3.45 SRI Photoströme bei verschiedenen Wellenlängen. Alle Signale wurden bei -20 mV und 20 Hz Filterung aufgenommen (Puffer d12). Bei dem Photostrom in C wurde die Oocyte vorbelichtet (weiß).

3.5.5 Photoströme der SR/Htr-Komplexe

Der Einfluß der Transducerproteine auf die elektrochemischen Eigenschaften der sensorischen Rhodopsine wird kontrovers diskutiert. Bogomolni et al. (1994) berichten, daß die Bindung des Transducers HtrI den Protonentransport des SRI inhibiert. Indessen beobachten Haupts et al. (1996) einen einwärts gerichteten Protonenstrom unter Belichtung des SRI/HtrI-Komplexes. Um zu untersuchen, ob die Transducer einen Effekt auf die Voltage-Clamp Signale der Rezeptoren haben, wurde Oocyten zusätzlich zur SRI bzw. pSRII-cRNA ebenfalls die entsprechende HtrI- bzw. pHtrII-cRNA injiziert. Hierbei wurde ein etwa 3fach molarer Überschuß der Transducer cRNA (50 ng) gegenüber der Rezeptor cRNA (15 ng) gewählt. In Abbildung 3.46 sind die Photoströme der ko-injizierten Oocyten denen der Transducer-freien Rezeptoren gegenübergestellt.

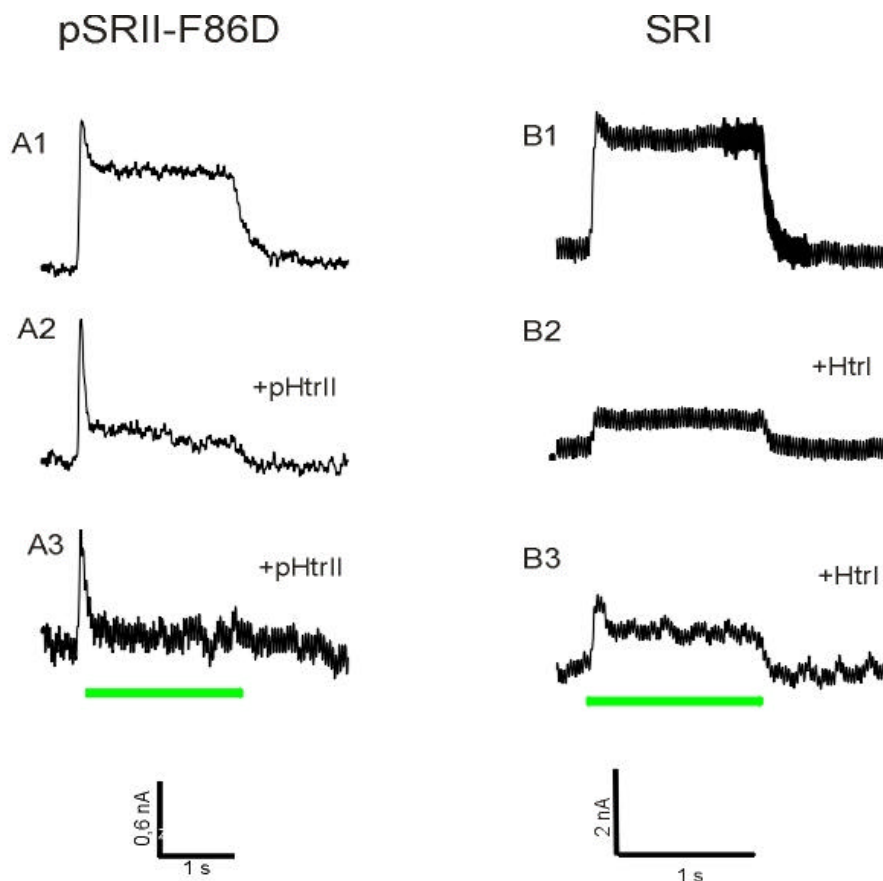


Abb. 3.46 Einfluß der Transducer auf den Photostrom von pSRII-F86D (A) und SRI (B). Hierzu wurden Oocyten einer Charge mit 15 ng Rezeptor-cRNA und ein Teil davon zusätzlich mit 50 ng Transducer-cRNA injiziert. Die Photoströme der einfach und ko-injizierten Oocyten wurden jeweils unter identischen Bedingungen ermittelt (A: -40 mV, 50 Hz-Filter, Puffer d12; B: -20 mV, 20 Hz-Filter, Puffer d12).

Man erkennt deutlich, daß der stationäre Photostrom sowohl bei pSRII-F86D als auch beim SRI durch die korrespondierenden Transducer inhibiert wird. Das transiente Signal wird beim Wildtyp pSRII (Daten nicht gezeigt) und der Mutante pSRII-F86D dagegen nicht beeinflusst. Dies gilt vermutlich auch für daß SRI, wie das in Abbildung 3.46B3 gezeigte Signal vermuten läßt. Wegen des verwendeten 20 Hz Filters ist der transiente Strom des SRI jedoch schlechter als der des pSRII aufgelöst. Der Grad der Inhibierung des stationären Photostroms variiert von Oocyte zu Oocyte. In einigen Fällen wird kein stationäres Signal mehr nachgewiesen (Abb. 3.46A3), während in anderen Fällen ein verringertes (Abb. 3.46 A2, B2, B3) oder auch unverändertes Signal registriert wird. Diese unterschiedliche Hemmung der Pumpaktivität kann durch die individuellen Abweichungen in der Translation der cRNA jeder einzelnen Oocyte erklärt werden. Denn aufgrund einer verminderten Translation der Transducer cRNA im Vergleich zur Rezeptor cRNA, ist ein Vorliegen von Htr-freiem Rezeptor auch in den ko-injizierten Oocyten möglich. Ein unterschiedliches Verhältnis von freiem, pumpenden und komplexierten, nicht pumpenden Rezeptor erklärt die variierende Inhibierung des Protonenpumpens. Aus diesem Grund ist es auch nicht möglich, durch eine Variation der molaren Verhältnisse von Rezeptor- und Transducer cRNA die Stöchiometrie der Komplexe titrimetrisch zu bestimmen. Für pSRII/HtrII konnte durch isotherme Titrationskalometrie ein 1:1 Verhältnis von pSRII und pHtrII sowie eine Bindungskonstante von etwa 100 nM bestimmt werden (Wegener (2000)). Bei vergleichbar starker Expression von pSRII und pHtrII, die anhand der Westernblot-Analyse vorausgesetzt werden kann, sollten daher die injizierten Mengen an cRNA für eine Komplexbildung richtig gewählt sein.

Um die Selektivität der SR/Htr-Wechselwirkung zu untersuchen die zur Hemmung des Pumpens führt, wurden in einem Hybridexperiment die SRI-cRNA zusammen mit der pHtrII-cRNA und umgekehrt die pSRII-F86D-cRNA mit der HtrI-cRNA injiziert. In beiden Fällen registriert man die unveränderten Signale der freien Rezeptoren, die keine Wechselwirkung mit den Transducern erkennen lassen. Weitere Informationen über die Selektivität und der strukturellen Voraussetzungen für die Interaktion der Proteine konnten durch zwei unabhängige Untersuchungen gewonnen werden. Zum einen wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese die Rolle einzelner Aminosäuren analysiert. Desweiteren wurden Transducerfragmente mit verkürztem C-Terminus konstruiert, um die minimale Wechselwirkungsdomäne zu ermitteln. Diese Untersuchungen erfolgten mit dem pSRII-F86D/pHtrII Komplex, der durch seine simplere Photochemie und bessere elektrophysiologische Charakterisierung das bevorzugte Modellsystem darstellt.

Untersuchung der SR/Htr-Komplexe durch ortsspezifische Mutagenese

Vermutlich findet die SR/Htr-Wechselwirkung über Konformationsänderungen des Rezeptors statt, die den Transducer aktivieren (Hoff und Spudich (1997), Marwan und Oesterhelt (1999)). Wegener et al. (2000), konnten mittels ESR-Spektroskopie eine Ausklappbewegung der Helix-F des pSRII nachweisen, die möglicherweise mit der Signalübertragung an das pHtrII einhergeht. Daher wurden zwei Arginine R162 und R164 aus Helix-F, deren Seitenketten vermutlich nach außen zeigen, gegen Alanin ausgetauscht (Wegener et al. (2000)). Arg164 ist in allen archaebakteriellen Rhodopsinen außer SRI konserviert, während Arg162 nur in pSRII zu finden ist.



Abb 3.47 Vermutliche Orientierung von R162 und R164. Als Grundlage diente die Röntgenstruktur des BR (2BRD.PDF), in die von PD. Dr. Hans-Jürgen Steinhoff (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) die Aminosäuresequenz des pSRII modelliert wurde.

Zusätzlich wurde die pHtrII-Mutante D85N hergestellt. Asp85 befindet sich in der zweiten transmembranen Helix und entspricht Glu56 des SRI. Glu56 ist für die physiologische Funktion von essentieller Bedeutung, denn ein Austausch mit Glutamin führt zu einer invertierten (negativen) phototaktischen Antwort des *H. salinarum* auf orangefarbenes Licht (Jung und Spudich (1996)). Um den Einfluß dieser Mutationen auf die SR/Htr-Wechselwirkung zu untersuchen, die durch die Hemmung des Pumpens charakterisiert wird, mußten zunächst die Mutationen durch PCR nach Ho et al. (1989) (vergl. Abschnitt 3.1) in die *psopII-F86D* und *phtrII* Gene eingeführt werden. Dies erfolgte mittels der Mutageneseprimer *psopIIR162(4)hin/rev* sowie *pHtrIID85Nhin/rev* und den Plasmiden

pET27bmodpsopII-F86D-His bzw. pET27bmodpHtrII-His. Die mutierten Gene wurden über NcoI/XhoI-Restriktion in den pNK4 Vektor kloniert, der als Matrize für die *in-vitro* Translation der cRNA diente. Erneut wurden neben der Injektion der cRNA von pSRII-F86D/R162(4)A bzw. pSRII-F86D Oocyten zusätzlich mit einem 2fachen molaren Überschuß von pHtrII bzw. pHtrII-D85N-cRNA appliziert. In Abbildung 3.47 sind die Photoströme von pSRII-F86D/R162/4/A und der Komplexe pSRII-F86D/R162(4)A/pHtrII bzw. pSRII-F86D/pHtrIID85N wiedergegeben.

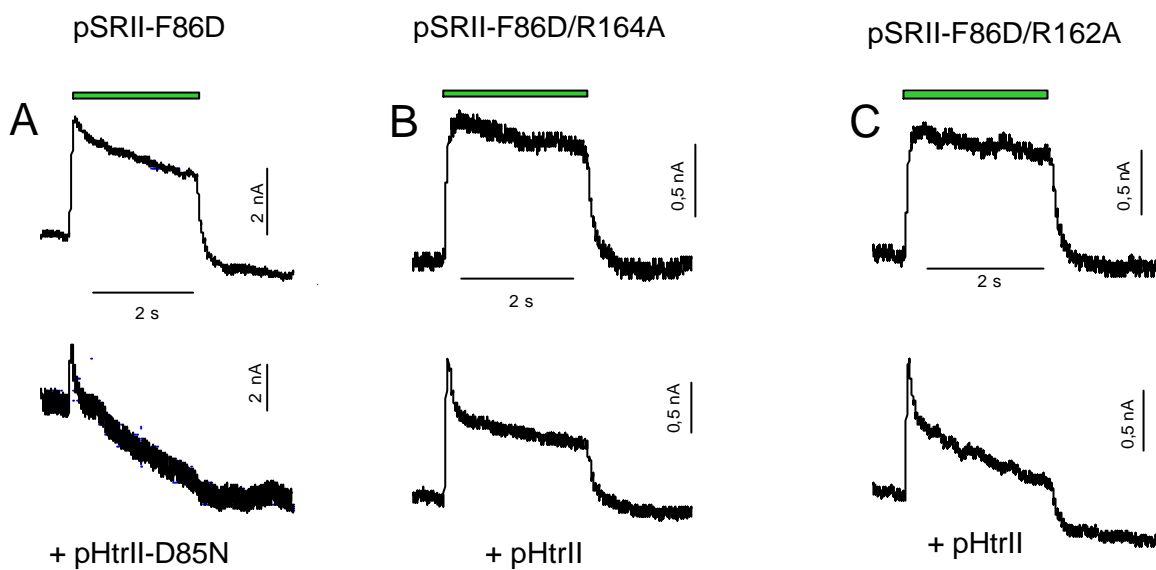


Abb. 3.48 Einfluß der ortsspezifischen Mutationen R162(4)A in Helix F des pSRII (B, C) und D85N in TM2 des pHtrII (A) auf die Inhibierung der Pumpaktivität. Unter identischen Bedingungen wurden die Photoströme der Rezeptoren und die der Oocyten, denen zusätzlich Transducer-cRNA injiziert wurde (50 ng, 3facher molarer Überschuß) ermittelt (-40 mV, 50 Hz-Filter, Puffer d12).

Die pSRII-Mutanten F86D/R162(4)A unterscheiden sich nicht in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften von denen der einfachen Mutante pSRII-F86D; in beiden Fällen wird ein auswärtsgerichteter, stationärer Photostrom beobachtet (Abb. 3.47B,C). Auch der Einfluß des Transducers ist gleich, denn man erkennt eine Hemmung des Pumpens, die aus dem geringeren Verhältnis der Amplituden des transienten zum stationären Signal ersichtlich wird. Die Mutation D85N in TM2 des pHtrII hat ebenfalls keinerlei Effekt auf die Inhibierung des Photostroms. Alle drei Mutationen haben demnach keinen signifikanten Einfluß auf die Wechselwirkung und die Bindung zwischen pSRII und pHtrII.

Untersuchung C-terminal verkürzter pHtrII-Konstrukte

Trotz der Selektivität der SR/Htr-Interaktion ist das pSRII-F86D/pHtrII-System unempfindlich gegenüber den im vorangegangenen Abschnitt untersuchten ortsspezifischen Mutationen. Um die Domäne des pHtrII zu bestimmen, die für eine Wechselwirkung mit dem pSRII notwendig ist, wurde das pHtrII durch Einführung zweier Stop-Kodons (TAA-TGA) an verschiedenen Stellen verkürzt.

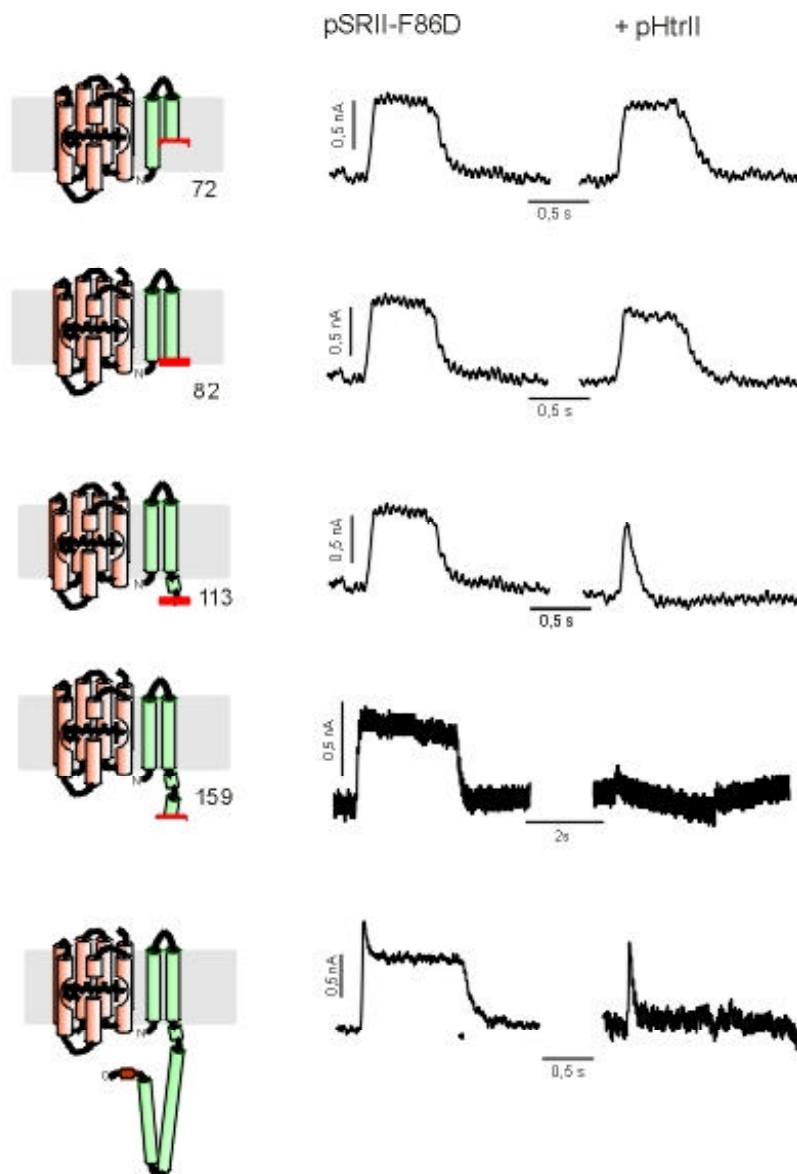


Abb. 3.49 Photoströme der pSRII-F86D/pHtrII-Komplexe mit C-terminal verkürztem Transducer. Es wurden 15 ng pSRII-F86D cRNA und 50 ng pHtrII cRNA injiziert. Unter identischen Bedingungen wurden die Photoströme der Rezeptoren und die der Oocyten, denen zusätzlich Transducer-cRNA injiziert wurde, ermittelt (-40 mV, 50 Hz-Filter, Puffer d12).

Die Synthese der verkürzten pHtrII-Konstrukte erfolgte durch PCR (Ho et al. (1989)) mittels der Mutageneseprimer pHtrII-Helix-10, pHtrII-Helix und pHtrII-Helix+10 und des Plasmides pET27bmod-pHtrII-His als DNA-Matrize. Hierdurch wird die Translation nach den ersten 72, 82 und 113 Aminosäuren abgebrochen. Zusätzlich wurde von Ansgar Wegener (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) ein DNA-Fragment erhalten, welches die ersten 159 Aminosäuren kodiert. Alle Konstrukte wurden via NcoI/XhoI-Restriktion in das Plasmid pNK4 kloniert, das als Vorlage für die *in vitro* Transkription der cRNA diente.

In Abbildung 3.49 sind die Photoströme des pSRII-F86D den Signalen der Oovytten gegenübergestellt, die mit der Transducer-cRNA ko-injiziert wurden. Das Ergebnis ist eindeutig: Alle getesteten pHtrII-Konstrukte die weniger als die ersten 113 Aminosäuren enthalten, sind nicht in der Lage den Photostrom des pSRII-F86D zu hemmen, während alle längeren pHtrII-Fragmente das Protonenpumpen inhibieren. Hierbei muß angemerkt werden, daß die Expression der beiden kurzen pHtrII-Fragmente mit 72 und 88 Aminosäuren nicht nachgewiesen ist. Dennoch zeigt die Inhibierung des stationären Signals durch die ersten 113 Aminosäuren des pHtrII, daß für eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor die beiden transmembranen Helices und eine kurze zytoplasmatische Sequenz von etwa 30 Resten ausreicht.

4. Diskussion

In der archaebakteriellen Phototaxis wird der Lichtreiz durch sensorische Rhodopsine (SR's) aufgenommen und über Transducerproteine (Htr's) an das Innere der Zelle weitergegeben. Der Mechanismus des primären Signaltransfers von den Rezeptoren auf die Transducer ist bisher nicht geklärt. Grundlage für das Verständnis des Signaltransfers ist die Kenntnis der Photozyklen der Rezeptoren und deren Beeinflussung durch die Transducer.

In dieser Arbeit sollten daher mit spektroskopischen und elektrophysiologischen Methoden die Intermediate der SR-Photozyklen kinetisch charakterisiert und die beteiligten Protonentransferreaktionen bestimmt werden. Notwendige Voraussetzung hierfür ist die präparative Darstellung und Isolierung der SR's. Um den Einfluß der Transducer auf die Rezeptoren zu analysieren, sollte das *Xenopus*-System für die Expression der SR's und SR/Htr-Komplexe etabliert werden, so daß eine elektrophysiologische Untersuchung der Proteine unter Voltage-Clamp Bedingungen möglich wird.

Durch die Analyse der SR-Photozyklen konnten für pSR_{II} und SRI Modelle ihrer thermischen Relaxation einschließlich des Protonentransportes abgeleitet werden. Hieraus ergaben sich neue Informationen über den Signalgebungsmechanismus, der durch die elektrophysiologische Charakterisierung der SR/Htr-Komplexe näher untersucht wurde. Mit diesem Ansatz konnten für pSR_{II}/pHtr_{II} die minimalen strukturellen Voraussetzungen für die Rezeptor/Transducer-Wechselwirkung bestimmt und ein Mechanismus des Signaltransfers zwischen beiden Proteinen vorgeschlagen werden.

4.1 Expression der sensorischen Rhodopsine in *E. coli*

In dieser Arbeit wurden die SR's nach heterologer Expression in *E. coli* präpariert. Gegenüber der homologen Expression verspricht dieser Ansatz einen erheblich geringeren Zeitaufwand bei der Präparation der Proteine sowie der Herstellung von Mutanten.

Die Expression von *psopII-His* sowie *psopII*-Mutanten in *E. coli* und die Reinigung der Proteine durch Ni-Affinitätschromatographie über einen C-terminalen Histidin-Tag erfolgte nach den Methoden von Shimono et al. (1997) und Hohenfeld et al. (1999) (siehe Abschnitt 3.1). Eine nennenswerte Modifikation des Protokolls von Hohenfeld et al. (1999)

ist die von 16h auf 2h verkürzte Solubilisierung der isolierten Membranen, die keinen Einfluß auf die Proteinausbeute hat. Die Präparation von pSR II bzw. pSR II-Mutanten ist hierdurch innerhalb eines Tages (etwa 13h) nach der Impfung des Medium möglich.

Vergleicht man die Präparation des Wildtyps und der Mutanten pSR II-L40T, pSR II-F86D sowie pSR II-L40T/F86D ergeben sich keine Unterschiede in der Reinheit der Proteine, jedoch weichen die Ausbeuten deutlich voneinander ab. Es werden etwa 1 mg pSR II und pSR II-L40T pro Liter Zellkultur isoliert, was in der gleichen Größenordnung liegt, wie bei Hohenfeld et al. (1999) angegeben. Die Ausbeuten an pSR II-F86D und pSR II-L40T/F86D sind 10fach bzw. 20fach geringer. Dieser Befund deckt sich mit den Beobachtungen von Iwamoto et al. (1999), die ebenfalls von einer stark verminderten Synthese dieser beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp berichten, allerdings keine quantitativen Angaben machen. Die Ursache für die schlechtere Expression der Mutanten könnte die Protonenpumpaktivität von pSR II-F86D und pSR II-L40T/F86D sein, die den Ionenhaushalt der Bakterien nachteilig beeinflusst. Allerdings stellt man bei einer Expression unter Lichtausschluß keine Veränderungen fest, so daß eine genauere Untersuchung notwendig wird, um diese Frage zu klären.

Mit dem SRI erfolgte auch erstmalig die heterologe Expression eines sensorischen Rhodopsins aus *H. salinarum* in *E. coli*. Obwohl sich SRI und SR II durch eine geringe Stabilität, besonders gegenüber niedrigen Salzkonzentrationen (< 2 mM NaCl) auszeichnen (Scharf(1992)), exprimieren die Zellen SRI in hohem Maße und inkorporieren das Pigment in die Plasmamembran. Die intensive Blaufärbung der Zellen verdeutlicht die überproportional starke SRI-Synthese. Analog zum pSR II erfolgt die Reinigung des SRI durch Ni-Affinitätschromatographie über den C-terminalen Histidin-Tag, wobei das Protein mit >95 % Reinheit und einer Ausbeute von bis zu 3 mg SRI /l Zellkultur isoliert wird. Durch den Verzicht auf die Isolation der Zellmembranen vor der Solubilisierung durch Ultrazentrifugation konnte der Zeitaufwand im Vergleich zur Reinigung des pSR II nochmals um 1-2h auf 11-12h nach Inokulation des Mediums verringert werden. Das heterolog exprimierte SRI ist in seinen photochemischen Eigenschaften (Absorptionsspektrum, Photozyklus) nicht vom homolog exprimierten Protein unterscheidbar (vergl. Abschn. 4.2.2).

Bisher war die effektivste Methode zur Präparation von SRI die homologe Expression in *H. salinarum* nach Krebs et al. (1995), die sich ebenfalls eines C-terminalen Histidin-Tags zur Proteinisolation bedient. Die Ausbeute nach Krebs et al. (1995) beträgt 1,7 mg SRI /l

Zellkultur. Im Vergleich hierzu ist die heterologe Expression in *E. coli* nicht nur bezüglich der Ausbeute (bis zu 3 mg/l Zellkultur) deutlich überlegen. Zum anderen ist der Zeitaufwand aufgrund der langsamen Zellvermehrung des *H. salinarum* wesentlich geringer - unter Expressionsbedingungen verdoppeln sich *E. coli* BL21 (DE3) -Zellen nach ca. 35-40 min im Vergleich zu ca. 8h des Expressionstammes *H. salinarum* Pho81/w (Olson und Spudich (1993)). Darüberhinaus erleichtert das *E. coli* Expressionssystem die Herstellung von SRI-Mutanten durch ortsspezifische Mutagenese, da für *H. salinarum* kein effektives Transformationssystem existiert und bedingt durch die langsame Zellvermehrung die Selektion mutierter *H. salinarum* Kolonien mindestens 1,5 Wochen erfordert (Lüttenberg (1999)). Ein weiterer Vorteil der heterologen Expression ist die Möglichkeit, auf einfache Weise Retinalanaloga in das SRI zu inkorporieren. Bisher erfolgte der Austausch des Chromophors durch eine Bleichung des isolierten Pigmentes mit Hydroxylamin unter Belichtung und einer anschließenden Rekonstitution mit dem gewünschten Chromophor (siehe z.B. Sheves et al. (1986)). Diese Methode führt immer zu Verlusten bei der Rekonstitution des Proteins. Bei der Expression in *E. coli* könnte man sehr wahrscheinlich direkt einen artifiziellen Chromophor einbauen, indem man bei der Induktion nicht den natürlichen Chromophor *all-trans* Retinal, sondern das Analogon zum Medium gibt. Im Falle des pSRII wurde diese Methode bereits demonstriert (Wegener, unveröffentlicht).

4.2 Expression der SR's und SR/Htr-Komplexe in *Xenopus*-Oocyten

Die Ergebnisse der heterologen Expression von SRI und pSRII in *E. coli* ließen erwarten, daß auch das *Xenopus*-Expressionssystem für die archaebakteriellen Rhodopsine etabliert werden kann. Hierdurch ist eine elektrophysiologische Untersuchung der Rezeptoren mit Voltage- und/oder Patch-Clamp Techniken möglich.

Die funktionelle Expression von SRI, sSRII, pSRII demonstriert die Anwendbarkeit des *Xenopus*-Systems für die sensorischen Rhodopsine (Abschnitt 3.4, 3.5). Neben den Rezeptoren konnten auch die Signalkomplexe SRI/HtrI und pSRII/pHtrII exprimiert werden. Der immunologische Nachweis des pSRII und pHtrII verdeutlicht, daß die Proteine in voller Länge synthetisiert werden und kein proteolytischer Verdau stattfindet (Abb. 3.33).

Die Stärke der Expression ist nur schwierig abzuschätzen. Im Falle des BR konnte anhand des Voltage-Clamp Signals die Zahl der Moleküle pro Oocyte auf 10^9 geschätzt werden (Nagel et al. (1995)). Hierfür ist aber die Kenntnis der Pumpfrequenz notwendig, die für keines der sensorischen Rhodopsine bekannt ist. In grober Annäherung kann diese nur zwischen 200 ms und 1,5 ms liegen, woraus sich ebenfalls eine Anzahl von 10^8 - 10^9 Rezeptormoleküle pro Oocyte berechnet. Für eine präparative Darstellung der SR oder SR/Htr-Komplexe ist das *Xenopus*-System daher denkbar ungeeignet. Um etwa 1 μ g Protein zu gewinnen, müßte man selbst bei optimistischer Schätzung über tausend Oocyten injizieren. Für die meisten biophysikalischen Untersuchungsmethoden sind weitaus größere Proteinmengen erforderlich.

Bei elektrophysiologischen Voltage- und Patch-Clamp Methoden ist man allerdings nicht auf eine Präparation der Proteine angewiesen. Ohne die Zielproteine zu reinigen, können diese empfindlichen Techniken direkt an *Xenopus*-Oocyten angewendet werden. Durch den Wegfall der meist aufwendigen Proteinpräparation eignet sich die Kombination des *Xenopus*-Expressionssystems mit elektrophysiologischen Methoden für umfangreiche Mutagenesestudien.

Im Falle der SR's und SR/Htr-Komplexe konnten mit diesem Ansatz unter Voltage-Clamp Bedingungen die Photoströme der Proteine analysiert werden (Abschnitt 3.4 u. 3.5). Wie in den folgenden Abschnitten detailliert diskutiert wird, liefern die Rezeptoren einen auswärtsgerichteten Photostrom, der durch ihre Transducer inhibiert wird. Diese Inhibierung stellt einen elektrophysiologischen Assay der Wechselwirkung zwischen den Rezeptoren und Transducern dar, mit dem der Signaltransfer zwischen beiden Proteinen untersucht werden konnte.

4.3 Photozyklen der SR's

Die präparative, heterologe sowie die analytische Expression der SR's in *E. coli* und *Xenopus*-Oocyten ermöglicht sowohl eine kinetische als auch elektrophysiologische Untersuchung der SR-Photozyklen.

Im Gegensatz zur eingehend untersuchten Protonenpumpe BR lagen bisher für die sensorischen Rhodopsine keine detaillierten Modelle ihrer thermischen Relaxation vor. Aus bisherigen Untersuchungen der SR-Photozyklen ist jedoch auffällig, daß der Turnover der SR's mit ~ 1 s im Vergleich zur Ionenpumpe BR etwa ~ 100 fach verringert ist. Diese

gemeinsame Eigenschaft der SR's ist sicherlich mit deren Rezeptorfunktion zu erklären, die für die Signalgebung einen langlebigen aktivierten Zustand benötigt. Als langlebige Spezies besitzen alle SR's das M-Intermediat, dessen Zerfall gegenüber dem BR von ~5 ms auf ~500 ms verlangsamt ist (Bogomolni et al. (1987), Scharf et al. (1992), Chizhov et al. (1998)). Hierdurch erfolgt eine kinetische Aufspaltung der SR-Photozyklen in eine schnelle Deprotonierung (~50 μ s) und einer langsamen Reprotonierung (~ 500 ms) der SB. Diesen Protonierungsreaktionen der SB wird in der Literatur eine essentielle physiologische Bedeutung zugeschrieben. Spudich et al. (1997) vermuten, daß die Auflösung der Salzbrücke zwischen der SB und ihrem Gegenion durch die Deprotonierung der SB zur Etablierung des signalgebenden Zustandes der SR's führt. Für die Deaktivierung der Signalgebung wird hingegen kein genereller Mechanismus unter den SR's postuliert. Yan et al. (1991) vermuten, daß im SRI mit der Reprotonierung der SB (M-Zerfall) das photophile Signal abgeschaltet wird, während im sSRII auch das folgende O-Intermediat physiologisch aktiv sein könnte (Yan und Spudich (1991)).

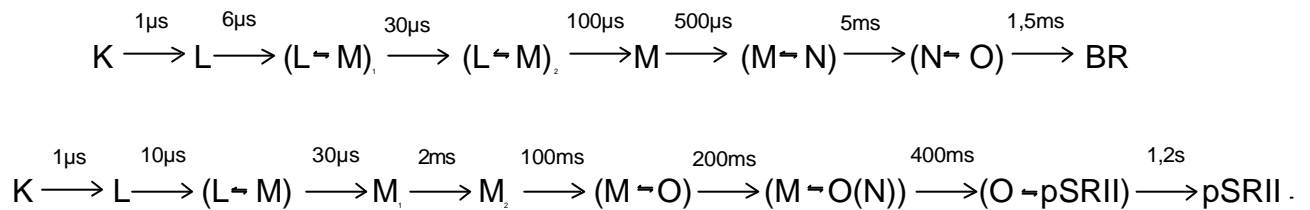
Neben den internen Protonentransfers wird die Rolle des Protonentransportes über die Plasmamembran für die Signalgebung diskutiert. Auch hier lag bisher kein einheitliches Bild vor. Während für SRI der Protonentransport nachgewiesen ist (Bogomolni et al. (1994), Haupts et al. (1995)), sind die Daten für pSRII und sSRII widersprüchlich: Iwamoto et al. (1999) vermuten, daß pSRII Protonen nach außen pumpt, Sasaki et al. (1999) postulieren hingegen einen elektroneutralen Photozyklus des sSRII. Die Kenntnis des Protonentransportes der SR's ist jedoch für die Analyse der Wechselwirkung mit ihren Transducern wichtig, denn es wird kontrovers diskutiert, ob die Htr's das Pumpen inhibieren (Bogomolni et al. (1994)) oder nur die Pumprichtung beeinflussen (Haupts et al. (1996)).

Zum besseren Verständnis der Signalgebung durch die SR's wurden in dieser Arbeit die Photozyklen von pSRII und SRI optisch mittels Laserblitz-Absorptionsspektrometrie und elektrophysiologisch unter Voltage-Clamp Bedingungen untersucht. Zudem konnte der Photozyklus des sSRII mittels Voltage-Clamp analysiert werden. Auf dieser Grundlage konnten anschließend durch die elektrophysiologische Untersuchung der SR/Htr-Komplexe die Wechselwirkung zwischen den Rezeptoren und ihren Transducern studiert werden.

pSRII und sSRII

Der Photozyklus des pSRII wurde bereits von verschiedenen Gruppen untersucht (Scharf et al. (1992), Iwamoto et al. (1992, 1999), Miyazaki et al. (1991)). Allerdings existierte bislang kein kinetisches Modell, daß alle bekannten Intermediate umfaßt. Anhand der absorptionspektrometrischen Untersuchung des pSRII konnte ein solches Modell aufgestellt werden (Abschn. 3.2.1).

Die Ergebnisse der multiexponentiellen Analyse der transienten Absorptionen verdeutlichen eine weitgehende Homologie des pSRII-Photozyklus zum BR, was bereits auf einen pumpenden Photozyklus des Rezeptors deutet. pSRII durchläuft eine analoge Sequenz der Intermediate K, L, M, N und O, wie sie erstmalig von Lozier et al. (1975) für BR formuliert wurde. Auch ein Vergleich mit dem neueren Schema nach Chizhov et al. (1996) verdeutlicht die Ähnlichkeit des pSRII- mit dem BR-Photozyklus (Halbwertszeiten bei 25 °C):



Es werden nahezu die gleichen Intermediate durchlaufen und auch die Quasigleichgewichte entsprechen einander, wenn auch die Verteilungen der spektralen Spezies z.T. voneinander abweichen. Diese können aber aufgrund des Modellcharakters der Reaktionssequenz ohnehin nur als Annäherungen verstanden werden (Chizhov et al.(1996)). Nach den Absorptionsänderungen unterscheiden sich die Photozyklen von pSRII und BR nur durch ihre Kinetik, nicht aber in ihrem Reaktionsweg.

Deutlich wird die Aufspaltung des pSRII-Photozyklus durch die ~100 fach verlangsamte Reprotonierung der SB gegenüber dem BR. Anschließend folgt der noch langsamere O-Zerfall mit $\tau \sim 1,2$ s.

Dieser Unterschied in den Photozyklen muß auf funktionell entscheidende Veränderungen in der Primärsequenz von pSRII und BR zurückzuführen sein. Viele der polaren oder geladenen Aminosäuren im zytoplasmatischen Protonenkanal, von dem aus im BR die Reprotonierung der SB erfolgt, sind im pSRII durch aliphatische Reste ausgetauscht. Insbesondere die Protonendonorggruppe der SB, Asp96 (BR), ist im pSRII nicht

konserviert. An dieser Position befindet sich Phe86 (pSRII). Gleiches beobachtet man auch für SRI und sSRII, bei denen Asp96 (BR) durch Tyr87 (SRI) bzw. Tyr84 (sSRII) ersetzt ist. Durch die Analyse von pSRII-Mutationen konnten die strukturellen Ursachen für die langsame Reprotonierung der SB identifiziert werden. Die Photozyklen von pSRII-F86D und pSRII-L40T/F86D zeigen deutlich, daß mit der gemeinsamen Einführung der Protonendonatorgruppe des BR, Asp96 (F86D), und des benachbarten Threonins T46 (L40T) der M-Zerfall im pSRII ~100fach auf das Niveau des BR beschleunigt wird (Abb. 3.15). Iwamoto et al. (1999) machen die gleiche Beobachtung.

Trotz des gleich schnellen M-Zerfalls, entspricht der Photozyklus von pSRII-L40T/F86D nicht dem des BR, denn die Kinetik des O-Zerfalls ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Da die Bildung von O mit dem M-Zerfall korrespondiert, akkumuliert O unter Belichtung. Diese Eigenschaft läßt sich für das bloße Auge sichtbar machen, indem man eine Probe der Mutante wenige Sekunden belichtet. Nach Ende der Belichtung kann man den Zerfall des O-Intermediates durch den Farbumschlag von Kirschrot (O_{540}) nach Orange (pSRII₄₉₈) innerhalb von 1-2 s verfolgen.

Für den Wildtyp und die Mutante pSRII-F86D erreicht man durch die Zugabe von externen Protonendonatoren wie Natriumazid bzw. Stickstoffwasserstoffsäure den gleichen Effekt auf den Photozyklus.

Offensichtlich wird im pSRII der Turnover des Photozyklus nicht durch die reversible Deprotonierung der SB, sondern z.B. durch die Isomerisierung des Chromophors und/oder der damit gekoppelten Konformationsänderungen des Proteins reguliert. Denkbar ist auch, daß die Deprotonierung von Asp75 im Zuge des O-Zerfalls die Geschwindigkeit der Regeneration des Grundzustandes bestimmt. In diesem Verhalten unterscheidet sich der Rezeptor grundlegend von BR, was deutlich am Photozyklus der Mutante BR-D96N zu erkennen ist. Hier ist der M-Zerfall für den Turnover geschwindigkeitsbestimmend, folglich führt eine Beschleunigung dieses Reaktionsschrittes durch Natriumazid auch zu einem schnelleren Turnover von BR-D96N (Tittor et al (1989)).

Dennoch ist auch in den untersuchten pSRII-Mutanten die Reaktionssequenz die gleiche des BR, was vermuten läßt, daß der Rezeptor nur eine langsame Version der Protonenpumpe darstellt, dessen Zeitfolge durch konformelle Strukturänderungen und nicht durch Protonentransfers bestimmt ist.

Die elektrophysiologischen BLM- und Voltage-Clamp Untersuchungen am pSRII-Wildtyps bekräftigen diese Vermutung zunächst, indem sie den auswärts gerichteten Protonentransport belegen (Abb. 3.23, 3.34). Im Einklang mit dem langsameren

Photozyklus-Turnover ist die Pumpleistung des pSRII verglichen mit dem BR stark herabgesetzt. Allerdings zeigt sich bei genauer Betrachtung der optischen und elektrophysiologischen Daten, daß im Unterschied zum BR beim pSRII keine direkte Korrelation zwischen der Amplitude des Photostroms und des Photozyklus-Turnovers besteht. Zwei Punkte verdeutlichen diese Eigenschaft des pSRII und verlangen eine alternative Erklärung für das Pumpen des Rezeptors. Erstens ist die Mutante pSRII-F86D eine effektivere Pumpe als der Wildtyp, obwohl die Photozyklen beider Pigmente nahezu identisch sind (Abb. 3.15, 3.37). Zweitens belegt die Analyse der Doppelmutante pSRII-L40T/F86D und der Einfluß externer Protonendonatoren (Natriumazid), daß bei konstantem Photozyklus-Turnover die Amplitude des stationären Photostroms mit dem M-Zerfall korreliert (Abschn. 3.5.1 u. 3.5.2). Beide Beobachtungen, die auf den ersten Blick einen Widerspruch zwischen den optischen und elektrophysiologischen Ergebnissen darstellen, lassen sich jedoch auf der Grundlage der beiden gegenwärtigen Modelle des Ionentransportes, "Local Access"- und "IST"-Modell, erklären.

Nach dem "Local Access"-Modell von Lanyi und Mitarbeitern wechselt die SB in einem schnellen $M_1 \leftrightarrow M_2$ Quasigleichgewicht zwischen den zwei Orientierungen zur extrazellulären und zytoplasmatischen Seite des Protonenkanals (Brown et al. 1998a,b). Die Protonenaufnahme der SB kann somit prinzipiell von beiden Seiten erfolgen und wird durch die verschiedene Leitfähigkeit in den Hälften des Protonenkanals bestimmt. Hierdurch steht ein elektroneutraler und ein elektrogener Photozyklus in Konkurrenz. Wenn man im Falle von pSRII-F86D eine erhöhte Leitfähigkeit der zytoplasmatischen Seite durch die Einführung von Asp86 annimmt, verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten des elektrogenen Zyklus. Die Verschiebung des Gleichgewichtes könnte spektroskopisch nicht nachweisbar sein und würde den stationären Strom von pSRII-F86D trotz des im Vergleich zum Wildtyp unveränderten Photozyklus erklären. Allerdings kann das "Local Access"-Modell nicht die Amplituden der Photoströme von pSRII und pSRII-F86D in Gegenwart von Natriumazid erklären. Unter vergleichbaren Bedingungen werden beim pSRII mit $\sim 50 \text{ nA/cm}^2$ ähnlich große Ströme über die BLM wie im Falle des BR (max. 100 nA/cm^2 , Fahr et al. (1988)) gemessen. Nimmt man für das BR einen Photozyklus von 10 ms Dauer an, wird bei gleicher Anlagerung an die BLM für das pSRII mit einem Turnover von 1-2 s einen Photostrom in der Größenordnung von etwa 1 nA/cm^2 erwartet. Ein Strom von $\sim 50 \text{ nA/cm}^2$ ist daher trotz der Unsicherheit bei der Abschätzung

die beobachteten Photoströme erklärt, wenn man einen 2-Photonen-Prozeß formuliert. Im ursprünglichen Modell werden mehrfache Absorptionen jedoch nicht diskutiert.

Das zweite Photon kann nur vom N- oder O-Intermediat absorbiert werden. Erstens muß für einen elektrogenen Zyklus zunächst das Proton mit der Bildung von M über K und L an das Medium abgegeben werden. Zweitens führt eine Anregung des M-Intermediates durch blaues Licht zu einem Quenching des stationären Photostroms, so daß nur N und O als mögliche Kandidaten verbleiben.

Das oben dargestellte Reaktionsschema wird durch mehrere experimentelle Befunde gestützt: Die in Abschnitt 3.3 demonstrierte proportionale Zunahme des Photostroms mit einem beschleunigten M-Zerfall ist direkt ableitbar. Desweiteren konnte die Akkumulation des O-Intermediates unter kontinuierlicher Belichtung nachgewiesen werden, was eine realistische Möglichkeit für die Absorption eines zweiten Photons zeigt (Abb. 3.18). In diesem Zusammenhang liefern FTIR-Messungen Hinweise darauf, daß unter Dauerbelichtung das N- und/oder O-Intermediat der Mutante pSRII-F86D stärker als beim Wildtyp akkumuliert (F. Siebert, persönliche Mitteilung).

Den wichtigsten Hinweis auf einen 2-Photonenmechanismus liefert die Analyse der Abklingkurven der stationären Photoströme (Abb. 3.39). In dieser "Off-Response" sind Informationen über den thermischen Zerfall der unter Belichtung angereicherten Intermediate enthalten, in denen sich im Falle eines 1-Photonenmechanismus der Turnover des Pumpzyklus widerspiegelt. Bei einem 2-Photonenmechanismus besteht dieser direkte Zusammenhang zwischen der Kinetik der "Off-Response" und der Pumpfrequenz nicht. Falls das Protonenpumpen im pSRII bzw. pSRII-F86D einem 1-Photonenmechanismus folgt, sollte demnach die signifikant erhöhte Pump-Frequenz bei Zugabe von Natriumazid eine beschleunigte "Off-Response" nach sich ziehen. Es wird aber lediglich eine geringe Beschleunigung der schnellen Phase von $\tau_1 = 54$ ms (pSRII-F86D) auf $\tau_1 = 32$ ms in Gegenwart von Natriumazid registriert. Diese Beschleunigung reicht nicht aus, um den erhöhten Pumpstrom zu erklären.

Der Ladungstransport des pSRII wurde ebenfalls von Iwamoto et al. (1999) untersucht. Die Autoren bedienten sich einer elektrochemischen SnO₂-Zelle die mit einer ungepufferten pSRII-Lösung gefüllt war, mit der Potentialänderungen aufgrund von lichtinduzierten pH-Änderungen detektiert werden können. Obwohl mit dieser Anordnung keine stationären Ströme gemessen werden können, vermuten die Autoren, daß pSRII ein Proton über die Membran transportiert. Allerdings beobachten Iwamoto et al. (1999) zunächst die Protonenaufnahme vom Zytoplasma mit dem M-Zerfall und erst dann die Abgabe an das

Medium im Zuge des O-Zerfall. Hier unterscheidet sich das Schema von Iwamoto et al. (1999) vom Modell in dieser Arbeit, bei dem analog zum BR zunächst die Abgabe des Protons im Zuge der M-Bildung und anschließend die Aufnahme vom Zytoplasma erfolgt. Daß Iwamoto et al. (1999) die Abgabe des Protons erst so spät in der Reaktionssequenz nachweisen, liegt wahrscheinlich an der verwendeten Meßmethode. Mit der SnO₂-Elektrode kann das Proton erst detektiert werden, wenn es die Proteinoberfläche verlassen hat. Aufgrund der Oberflächenladung des Proteins ist es denkbar, daß das bei der M-Bildung an die extrazelluläre Oberfläche transportierte Proton erst nach einer Verzögerung an das Medium abgegeben wird (Dencher et al. (1991), Cao et al. (1995)). Diese Ladungsverschiebung innerhalb des Proteins kann im Gegensatz zur BLM- und der Voltage-Clamp Technik als transienter Strom nachgewiesen werden, nicht aber mit der SnO₂-Zelle. Demnach betrachten Iwamoto et al. (1999) nicht den Transport des Protons an die Proteinoberfläche, sondern dessen Erscheinen im Medium, was die Unterschiede zum Modell in dieser Arbeit erklären würde.

Sasaki et al. (1999) untersuchten den Protonentransfer des sSRII und postulieren, daß sSRII nicht elektrogen ist. Dieser Befund stellt einen deutlichen Widerspruch zu den Photoströmen des pSRII dar. Die Autoren analysierten mit einer pH-Elektrode die lichtinduzierten Änderungen der Protonenkonzentration einer Suspension von sSRII enthaltenden Lipidvesikeln und Lipidschichten. Aufgrund eines leichten Anstiegs des pH nach einer Belichtung auf einen konstanten Wert, der mit dem Ausschalten des Lichtes wieder auf den ursprünglichen Wert zurückfällt, schließen die Autoren, daß sSRII keine Protonenpumpe ist. Nach Sasaki et al. (1999) erfolgt die Protonenaufnahme im Zuge des M-Zerfalls und Abgabe im Zuge des O-Zerfalls von der gleichen, extrazellulären Seite. Um diesen Widerspruch zu analysieren, wurde in dieser Arbeit auch sSRII in Oozyten exprimiert und die Photoströme mittels Voltage-Clamp untersucht. Der stationäre Photostrom belegt eindeutig, daß auch sSRII eine auswärts gerichtet Protonenpumpe darstellt. Dieser Befund ist unvereinbar mit dem Modell von Sasaki et al. (1999). Es gibt mehrere Hinweise, daß die von Sasaki et al. (1999) beobachtete pH-Änderung einen Artefakt darstellen, z. B. durch eine Erwärmung der Suspension unter Belichtung. Zum einen erhalten die Autoren bei einer Belichtung ihrer Probe mit 550 nm etwa 2/3 der maximalen Signalstärke, die mit 500 nm (λ_{\max} (sSRII) = 487 nm) erhalten wurde. Im UV/VIS-Spektrum sind jedoch bei 550 nm keine Absorptionen des sSRII zu erkennen (Scharf et al. (1992)). Zum anderen sind die gleichen Autoren an einer Arbeit beteiligt, die unter analogen Bedingungen eine Kontrolle mit Vesikeln aus *E. coli* Membranen zeigt, die

qualitativ den gleichen Verlauf hat, wie das Signal der sSRII enthaltenden Vesikel (Béjà et al. (2000)). Zieht man die Homologie des sSRII zum pSRII in Betracht, ist ein Protonentransport, wie ihn die Voltage-Clamp Messungen belegen, auch beim sSRII zu erwarten.

SRI

Über den Photozyklus des SRI liegen widersprüchliche Daten vor, die eine physiologische Interpretation seines Mechanismus erschweren (siehe Abschn. 3.54). Um Informationen über die in der Literatur kontrovers diskutierten Fragen bezüglich des Photozyklus und neue Hinweise auf dessen Mechanismus zu erhalten, wurde auch das SRI untersucht. Die hierbei erhaltenen Daten sind zudem für die Analyse der Wechselwirkung mit HtrI notwendig und tragen durch einen Vergleich mit den anderen SR's zum allgemeinen Verständnis der Signalgebung bei.

Was den Protonentransport betrifft, kann aufgrund der Abhängigkeit der VC-Signale von der Belichtungswellenlänge der von Haupt et al. (1995) vorgeschlagene 2-Photonenmechanismus bestätigt werden.

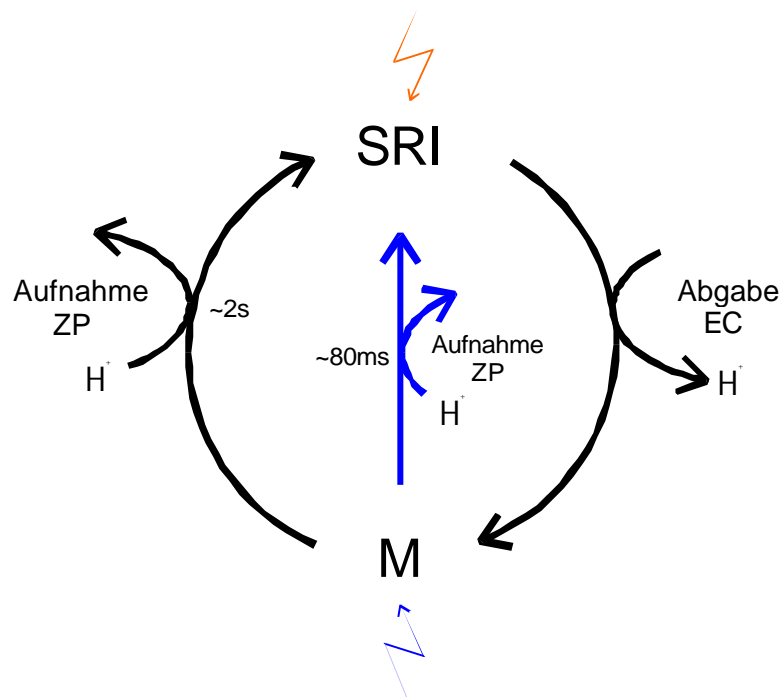


Abb. 4.2: Modell des Ladungstransport im SRI. Die schwarzen Pfeile stellen einen 1-Photonenzyklus, die blauen Pfeile einen 2-Photonenzyklus dar. ZP bedeutet Zytoplasma, und EC extrazelluläre Seite des Proteins.

Gelbes Licht (>530 nm) überführt das SRI in das langlebige M-Intermediat. Der langsame thermische M-Zerfall mit $\tau \approx 2$ s wird durch die Absorption eines zweiten, "blauen" Photons abgekürzt, denn nach Bogomolni et al. (1987) erfolgt die photochemisch induzierte Relaxation des M mit $\tau \approx 80$ ms 12fach schneller. In dieser Reaktion auf blaues Licht verhält sich SRI grundlegend anders als pSR II und BR, die beide ein Quenching des stationären Photostroms erfahren (Abb. 3.25, Ormos et al. (1978)). Eine Erklärung hierfür ist, daß im M-Intermediat die SB des SRI bereits ihre Orientierung zum Zytoplasma gewechselt hat und nach der Absorption des Photons das Proton vom Inneren der Zelle aufnimmt.

Im Unterschied zu Haupts et al. (1995, 1996) und den Ergebnissen in dieser Arbeit beobachten Bogomolini et al. (1994) auch bei Belichtung mit gelbem Licht ein Protonenpumpen aufgrund eines pH-Abfalls einer Suspension von SRI enthaltenden Lipidvesikeln. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch zu den Voltage-Clamp-Daten, sondern belegt vielmehr, daß auch der 1-Photonenzyklus elektrogen ist. Bedingt durch den langsamen Turnover, kann der daraus resultierende Strom durch die Integration des Ladungstransportes bei den pH-Messungen zwar zu einer Ansäuerung der Vesikelsuspension innerhalb von Minuten führen, aber kein BLM- oder VC-Signal hervorrufen.

Hinweise auf die Beteiligung von SRI₅₅₀ und SRI₅₈₀ am Protonentransport konnten mit der Untersuchung der Abhängigkeit der Absorptionsänderungen und des stationären Photostroms vom pH beantwortet werden. Da die Amplitude des Photostroms exakt der Titration von Asp76 mit einem $pK_a = 7.2$ folgt, ist wahrscheinlich nur SRI₅₅₀, gekennzeichnet durch eine dissoziierte Asp76, für das Pumpen verantwortlich (Abb. 3.44). Im Zusammenhang mit der verminderten Absorption des M-Intermediates bei zunehmender Protonenkonzentration, zeichnet sich die Homologie von Asp76 mit Asp85 des BR und Asp75 des pSR II deutlich ab. In allen drei Fällen ist ein stationärer Photostrom mit der Neutralisierung des Aspartat-Gegenions zur SB inhibiert. Diese Beobachtung wirft Fragen über die physiologische Funktion der Protonentranslokation auf, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.4 Physiologische Interpretation der SR-Photozyklen

Die Analyse der SR-Photozyklen läßt gemeinsame Eigenschaften der Rezeptoren erkennen und liefert neue Informationen über den Signalgebungsmechanismus. Durch die elektrophysiologischen Untersuchungen konnte demonstriert werden, daß alle drei SR's Protonen aus dem Zytoplasma nach Außen transportieren. Obwohl das Pumpen wegen der Ähnlichkeit der SR-Photozyklen zur Protonenpumpe BR nicht verwundern sollte, wurde diese Fähigkeit bislang für sSRII und pSRII angezweifelt (Sasaki et al. (1999), Sasaki und Spudich (2000)).

In Hinblick auf die Rezeptorfunktion der Pigmente stellt sich die Frage, ob der Protonentransport eine physiologische Bedeutung hat. Mit Sicherheit beteiligen sich die SR's nicht als lichtgetriebene Pumpen an der Regulierung des Ionenhaushaltes der Zelle. Zum einen ist die Pumpleistung der Rezeptoren zu schwach – BR und HR pumpen mindesten 10-20fach stärker. Hinzu kommt, daß ihre Kopienzahl in der Zelle für einen effektiven Ladungstransport zu klein ist, z.B. gibt es nur wenige hundert Moleküle SRII pro Zelle (Schegk und Oesterhelt (1988)). Zum anderen ist bei physiologischen Membranpotentialen < -120 mV kein Photostrom nachweisbar und zusätzlich inhibiert der Transducer das Pumpen seines Rezeptors (Abb. 3.38, 3.43, 3.46).

Anders sieht es für die Protonentransferreaktionen innerhalb der Proteine aus, denen wie einleitend bereits diskutiert, eine wichtige physiologische Rolle bei der Signalgebung zugeschrieben wird. Spudich und Mitarbeiter modulierten durch den Einbau artifizieller Retinalanaloga in SRI und SRII die Lebensdauer von M und korrelierten diese mit der phototaktischen Empfindlichkeit von *H. salinarum* (Yan und Spudich (1991), Yan et al. (1991)). Aktuelle ESR-Messungen am pSRII lassen hingegen vermuten, daß die Signalgebung über das M hinaus bis zur Regeneration des Grundzustandes erfolgt. Wegener et al. (2000) registrierten eine transiente Ausklappbewegung von Helix F des pSRII, bei der Helix F zeitgleich mit dem O-Zerfall zurückschnappt. Diese Ausklappbewegung könnte als Schalter für die Signalübertragung auf den Transducer dienen.

Die Untersuchung der SR-Photozyklen in dieser Arbeit lassen ebenfalls an mehreren Punkten Zweifel an der herausragenden Bedeutung von M für die Signalgebung aufkommen und deuten auf einen alternativen Signalgebungsmechanismus. Sowohl die optischen, als auch die elektrophysiologischen Daten zeigen, daß im Photozyklus von SR₅₈₀, der Spezies des SRI-Grundzustandes mit protoniertem SB-Gegenion Asp76, kein M

nachweisbar ist (Abb. 3.20, 3.44). Im Komplex mit dem Transducer HtrI hat Asp76 einen pK_a von 8,5, so daß bei physiologischem pH fast ausschließlich (> 95 %) SR₅₈₀ vorliegt (Bogomolni et al. (1994)).

Auch die Daten des pSR_{II} deuten auf einen alternativen Signalgebungsmechanismus, der ohne eine notwendige Beteiligung von M auskommt. Den wichtigsten Hinweis liefert die Abhängigkeit des Photostroms vom Membranpotential. Bei physiologisch relevanten Potentialen von <-140 mV ist neben dem stationären auch der transiente Photostrom, der die Ladungsverschiebungen im Zuge der M-Bildung repräsentiert, nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.38). In der Zelle, die Membranpotentiale bis zu -250 mV aufbauen kann, sollte daher die Bildung des M-Intermediates inhibiert sein.

Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen von Hohenfeld (1999) bestätigt. Hohenfeld untersuchte mit der Laserblitz-Spektroskopie die Absorptionsänderungen von intakten, pSR_{II} exprimierenden *E. coli* Zellen. Es konnte zwar der Zerfall und die Rückbildung des pSR_{II}-Grundzustandes anhand des Signals bei 500 nm verfolgt werden, aber es wurde wegen der Abwesenheit von Absorptionen bei 400 nm kein M nachgewiesen.

Spudich et al. (1997) diskutierten bereits die Existenz anderer paralleler Mechanismen der Signalgebung. Die Autoren stellten fest, daß die Mutation D73N im SR_{II} (entspricht pSR_{II}-D75N, SR_I-D76N und BR-D85N) zur konstitutiven Stimulation von *H. salinarum* führt, aber dennoch eine Restempfindlichkeit von ~16 % bei Belichtung erhalten ist. Die ständige Signalgebung von SR_{II}-D73N wird durch die Aufhebung der Salzbrücke zwischen der SB und Asp73 erklärt, die im Wildtyp durch die Deprotonierung der SB (M-Bildung) erreicht wird. Für die Restempfindlichkeit bei Belichtung liegt keine Erklärung vor. Ein M-Intermediat ist wahrscheinlich nicht beteiligt, weil im Photozyklus von SR_{II}-D73N analog zu pSR_{II}-D75N kein M nachweisbar ist.

Die kinetische Analyse des pSR_{II}-Photozyklus gibt Hinweise auf ein alternatives Modell der Signalgebung. Sicherlich ist die Lebensdauer des aktivierten Rezeptors ein wichtiger Faktor für die Signalübertragung und -verarbeitung. Aus den optische Daten geht hervor, daß der Turnover des pSR_{II} unempfindlich gegenüber äußeren und inneren Einflüssen ist. Deutlich wird dies am unverändert langsamen Photozyklus des pSR_{II} in Gegenwart von Natriumazid oder der Mutante pSR_{II}-L40T/F86D. Der konstante Photozyklus-Turnover könnte eine stabilisierende Funktion in der Signalkaskade bei wechselnden Umweltbedingungen sein. Demnach bestimmen die Faktoren, die den Turnover

bestimmen, auch die Lebensdauer des aktivierten Rezeptors. Z.B. könnte die Isomerisierung des Chromophors und/oder die daran gekoppelten Konformationsänderungen den Schalter für die Signalgebung darstellen. Nach dieser Hypothese übertragen bereits die frühen Intermediate K und/oder L das Signal auf den Transducer. Die Auflösung der Salzbrücke zwischen SB und Gegenion würde keine Rolle spielen. Zur weiteren Untersuchung der Signalgebung wurden die SR/Htr-Komplexe in *Xenopus*-Oocyten ko-exprimiert, um die Rezeptor/Transducer Wechselwirkung elektrophysiologisch zu analysieren.

4.5 Die Wechselwirkungen der Rezeptoren mit ihren Transducern

Auf der Grundlage der SRI- und pSRII-Photozyklen konnten durch einen Vergleich der Photoströme der SR's mit denen der SR/Htr-Komplexe die Wechselwirkungen zwischen den Rezeptoren und ihren Transducern elektrophysiologisch untersucht werden.

Die Voltage-Clamp Signale der ko-injizierten Oocyten demonstrieren die Inhibierung der stationären Photoströme des SRI und pSRII-F86D durch die Bindung der Transducer HtrI und pHtrII (Abb. 3.46). Obwohl wegen der Abwesenheit eines stationären Signals des Wildtyp-pSRII keine Wechselwirkung mit pHtrII beobachtet werden konnte, ist die Gegenwart des funktionellen pSRII/HtrII-Komplexes in der Oocytenmembran anzunehmen, denn für die Bindung mit dem pHtrII sollte die Mutation im Inneren des Protonenkanals keine Rolle spielen. Durch die funktionelle Expression der SR/Htr-Komplexe und den Effekt des Transducers auf die elektrophysiologischen Signale der Rezeptoren, steht mit der Mikroinjektion von Oocyten in Kombination mit den Voltage-Clamp Messungen ein Assay der Analyse der SR/Htr-Wechselwirkung zur Verfügung.

Zunächst stellte sich die Frage nach der Wechselwirkung, die zur Inhibierung des Rezeptorstroms durch den Transducer bei geringen negativen Membranpotentialen (-20 mV bis -40 mV) führt. Anhand des unveränderten transienten Signals des pSRII-F86D/pHtrII-Komplexes wird deutlich, daß die Deprotonierung der SB während der M₄₀₀-Bildung nicht beeinflußt ist. Daher ist die Interaktion vermutlich nicht auf der extrazellulären, sondern auf der zytoplasmatischen Seite der Proteine lokalisiert, wo die Protonenaufnahme im Zuge des M-Zerfalls stattfindet. Dieser Befund steht im Einklang

mit der Annahme von Spudich und Mitarbeitern, daß der zytoplasmatische Protonenkanals durch den Transducer blockiert wird (Spudich, (1994)). Begründet wird diese Hypothese aufgrund des Effektes von HtrI auf den M-Zerfall des SRI. Da im Gegensatz zum Transducer-freien SRI die Reprotonierung der SB im SRI/HtrI-Komplex unempfindlich gegenüber dem pH ist, leiten Spudich und Mitarbeiter eine verminderte Zugänglichkeit des zytoplasmatischen Protonenkanals in Folge der Transducer-Bindung ab (Spudich und Spudich (1993), Olson und Spudich (1993)).

Auf gleiche Weise läßt sich eine Blockierung des zytoplasmatischen Kanals des pSRII nicht erklären. Bereits im Transducer-freien Zustand ist der M-Zerfall unempfindlich gegenüber dem pH (Abb. 3.9) und man erkennt keinerlei Veränderungen durch das pHtrII (Wegener et al. 2000).

Bemerkenswert ist, daß sowohl für SRI, als auch pSRII anhand der optischen Daten kein verlangsamter Turnover in den Komplexen mit ihren Transducern festgestellt wird, der die Hemmung der Pumpaktivität erklären würde. Für SRI läßt sich die Inhibierung allerdings auf der Grundlage der spektroskopischen Daten dieser Arbeit erklären, die unabhängig vom Turnover des Pigmentes ist. Die pH-Abhängigkeit der Absorptionsänderungen deutet auf eine exklusive Beteiligung von SRI₅₅₀ am Protonentransport (Abb. 3.44). Zum selben Ergebnis führt die Analyse der SRI-Photoströme bei verschiedenen Protonenkonzentrationen (Abb. 3.20). Nach Rath et al. (1994) verschiebt das Dissoziationsgleichgewicht von Asp76 von $pK_a = 7.2$ im Transducer-freien SRI auf $pK_a = 8,5$ im SRI/HtrI Komplex. Bei neutralem pH ist demzufolge die Inhibierung des stationären Photostroms auf eine Entfernung der aktiven Spezies SRI₅₅₀, welche durch die deprotonierte Asp76 gekennzeichnet ist, durch eine Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichtes zurückzuführen. Dieser Erklärungsansatz impliziert, daß die Inhibierung des stationären Photostroms im SRI und pSRII auf zwei verschiedenen Ursachen basiert, denn eine vergleichbare Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichtes von Asp75 existiert im Falle des pSRII nicht. Es ist durchaus denkbar, daß Unterschiede in der Wechselwirkung der Rezeptoren mit ihren Transducern die photophile bzw. photophobe Antwort bestimmen. Allerdings könnte diese Diskriminierung auch alleine durch die Signalweitergabe der Transducer erfolgen.

Um die Inhibierung des stationären Photostroms durch die Htr's näher zu analysieren, wurden die strukturellen Voraussetzungen der Rezeptor/Transducer-Wechselwirkung untersucht. Die Hybridexperimente, bei denen das SRI mit dem pHtrII und umgekehrt das

pSRII mit dem HtrI exprimiert wurden, demonstrieren die Selektivität der Interaktion (Abschnitt 3.5.5). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Zhang et al. (1999), die eine spezifische Erkennung von HtrI und HtrII durch die Rezeptoren SRI und SRII nachweisen. Die Autoren stellten durch chimäre Transducer fest, daß für eine phototaktische Aktivität der Rezeptor nur die beiden transmembranen Helices seines korrespondierenden Transducers wahrnehmen muß, während der zytoplasmatische Teil austauschbar ist.

Aufgrund der Selektivität der SR/Htr-Wechselwirkung kann eine essentielle Beteiligung einzelner Aminosäuren vermutet werden. Bereits aus früheren Mutagenesestudien am SRI/HtrI-Komplex geht hervor, daß Punktmutationen im SRI und HtrI die Phototaxis von *H. salinarum* invertieren oder auslöschen und die photochemischen Eigenschaften verändern können (Perrazona et al. (1996), Jung und Spudich (1996), Jung und Spudich (1998)). Im pSRII/pHtrII-Komplex wurden daher aufgrund struktureller Daten und eines Sequenzvergleichs exponierte Reste in der vermutlichen Wechselwirkungsdomäne, d.h. in Helix F des Rezeptors (Arg 162A, 164A) und TM2 des Transducers (D85A) ausgetauscht und der Einfluß auf das VC-Signal untersucht (siehe Abschn. 3.5.5). Keine der Modifikationen hat einen signifikanten Effekt auf den Photostrom, denn in allen Fällen wurde mit der Inhibierung des Pumpens eine Wechselwirkung beider Proteine nachgewiesen. Im Falle einer veränderten Wechselwirkung hätte sich die Möglichkeit ergeben, die Auswirkung der dafür verantwortlichen Mutation auf die Phototaxis zu studieren, um auf diese Weise nach einem Zusammenhang zwischen der physiologischen Funktion und dem Ladungstransport zu suchen. Dieser Ansatz könnte erneut aufgegriffen werden, wenn bessere Strukturinformationen vorliegen, die eine gezielte Auswahl der Mutationen zulassen.

Alternativ wurde zur Ermittlung der minimalen Strukturdomäne des pHtrII für die Wechselwirkung mit pSRII-F86D der Transducer sukzessive C-terminal verkürzt und zusammen mit dem Rezeptor exprimiert. Aus den Voltage-Clamp Signalen geht hervor, daß die ersten 113 Aminosäuren des pHtrII ausreichen, um das Protonenpumpen des Rezeptors zu hemmen (Abschnitt 4.4.10). Dieses Fragment besteht aus den beiden transmembranen Helices und einem kurzen, ebenfalls helikalen Bereich im Übergang zum Zytoplasma von etwa 30 Aminosäuren (Seidel et al. (1995), Wegener et al. (2000)). Durch die Verkürzung des pHtrII und der Analyse der Photoströme des Komplex mit pSRII-F86D konnte die Wechselwirkungsdomäne des Transducers wesentlich genauer

bestimmt werden als durch die phototaktische Untersuchung chimärer HtrI/HtrII-Konstrukte von Zhang et al. (1999). Die Autoren fusionierten die ersten 60 (HtrI) und 329 bzw. 368 (HtrII) N-terminalen Reste des einen Transducers mit der restlichen Sequenz des anderen Transducers. Die N-terminalen Fragmente umfassen TM1 und TM2 von HtrI bzw. HtrII (Mouel und Koshland (1996)) und sind ausreichend für die Wahrnehmung der korrespondierenden Rezeptoren. Kürzere oder längere Fragmente wurden jedoch nicht getestet. Für das HtrI liegen weitere Daten vor, die mit den Beobachtungen von Zhang et al. (1999) nicht übereinstimmen. Durch ortsspezifische Mutagenese stellten Jung et al. (1996) fest, daß an der Wechselwirkung mit dem Transducer die die ersten 147 N-terminalen Reste und nicht nur die ersten 60 beteiligt sind. Die Photoströme der pSRII-F86D/pHtrII-Komplexe deuten darauf hin, daß auch im SRI lediglich TM1 und TM2 (M1-S60) mit SRI interagieren.

Die größte Unterstützung erfahren die elektrophysiologischen Daten aus aktuellen Strukturvoraussagen für das pHtrII. Sequenzanalysen und ESR-Messungen lassen auf ein "αα-Corner" Motiv (Efimov (1984)) beim Übergang von TM2 ins Zytoplasma schließen, das ein nahezu rechtwinkeliges Abknicken von TM2 darstellt (Wegener (2000)).

Anhand dieses Strukturmotivs läßt sich die verminderte Zugänglichkeit des zytoplasmatischen Protonenkanals und somit die Inhibierung der Protonenpumpens im pSRII-F86D/pHtrII Komplex erklären. In Abbildung 4.3 ist die vermutete Organisation des Komplexes schematisch dargestellt.

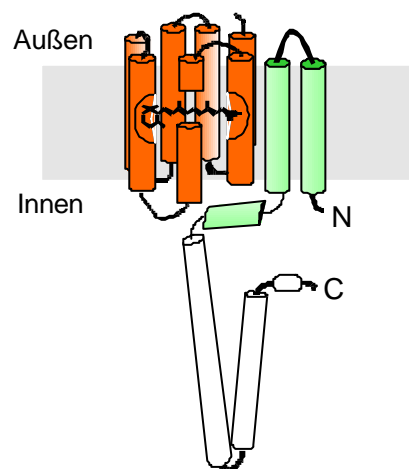


Abb. 4.3: Modell der Wechselwirkungsdomäne von pHtrII. Der grüne Bereich stellt die ersten 113 Aminosäuren dar, die für die Inhibierung der Pumpaktivität von pSRII-F86D durch eine sterische Blockade des zytoplasmatischen Protonenkanals ausreichen.

Die Protonenaufnahme vom Inneren der Zelle beim M-Zerfall wird nach diesem Modell wegen der sterischen Hinderung durch die transmembranen Helices und die kurze Helix im Übergang zum Zytoplasma blockiert. Der Kontakt der Helices innerhalb der Membran könnte das Ausklappen von Helix F des Rezeptors und damit die Öffnung des zytoplasmatischen Protonenkanals behindern. An dieser Bindung könnte die kurze Helix (Reste 82-113) des Transducers beteiligt sein oder aber die Zugänglichkeit des Protonenkanals herabsetzen. Entfernt man diese Helix, wird die Blockade gelöst und es findet ein Protonentransport statt. Ob dieses Modell der Wirklichkeit entspricht, werden hoch aufgelöste Kristallstrukturen zeigen können.

Zusammenfassend ergibt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit folgendes Bild der Signalübertragung vom Rezeptor auf den Transducer. Die elektrophysiologischen Untersuchungen deuten auf Konformationsänderungen des Rezeptors nach dessen Aktivierung hin, die durch den Transducer wahrgenommen und verarbeitet werden. Hierfür sprechen die aufgrund des Strom/Spannung-Verhaltens postulierten, großen Konformationsänderungen während des Photozyklus des Rezeptors sowie die im wesentlichen auf die transmembranen Helices beschränkte Wechselwirkungsdomäne der Transducer. Die transmembrane Wechselwirkungsdomäne des Transducers und Konformationsänderungen des Rezeptors passen zueinander, weil die Bewegung der Helix F wie beim BR und auch im Sehpigment Rhodopsin der höhere Organismen eine Seitwärtsbewegung horizontal zur Membranebene darstellt (Farrens et al. (1996), Subramaniam et al. (1993), Wegener et al. (2000)).

Diese Konformationsänderungen könnten mit weiteren Methoden, wie z.B. der Fluoreszenzmarkierung untersucht werden. Auch hierfür bietet sich das *Xenopus*-Expressionssystem an, das, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, den Zugang zu den archaebakteriellen Rezeptor/Transducer-Komplexen ermöglicht und hierdurch weitere Ansätze zur Untersuchung der Protein/Protein-Wechselwirkungen eröffnet.

5. Zusammenfassung

Die sensorischen Rhodopsine vermitteln als Photorezeptoren die archaebakterielle Phototaxis. Durch Licht stimuliert, treten die Rezeptoren in Wechselwirkung mit Transducerproteinen und aktivieren eine Signaltransduktionskaskade. In dieser Arbeit wurden die sensorischen Rhodopsine mittels Laserblitz-Spektroskopie kinetisch charakterisiert und ihre Interaktion mit den Transducern elektrophysiologisch untersucht.

SRI aus *H. salinarum* und pSRII aus *N. pharaonis* wurde in *E. coli* heterolog exprimiert und chromatographisch gereinigt. Mit dem SRI gelang erstmalig die funktionelle Expression eines halobakteriellen Photorezeptors in *E. coli*. Die Ausbeute an gereinigtem SRI beträgt bis zu 3 mg/Protein pro Liter Zellkultur.

Mittels Laserblitz-Spektroskopie wurden die Photozyklen von pSRII und SRI analysiert. Im Falle des pSRII erfolgte eine detaillierte Beschreibung des Photozyklus über einen weiten Spektral- (360-660 nm), Temperatur- (10°C – 65°C) und pH-Bereich (pH 9,0 – 5,5). Durch eine multiexponentielle Datenanalyse der spektroskopischen Daten konnten alle spektralen Intermediate des BR (K, L, M, N und O) anhand ihrer Absorptionsspektren identifiziert und deren kinetische Eigenschaften bestimmt werden. Zum ersten Mal wurde das N-Intermediat für das pSRII beschrieben. Die Datenanalyse belegt, daß der pSRII-Photozyklus analog zum BR verläuft und sich in erster Linie durch eine veränderte Kinetik unterscheidet. Beim pSRII erfolgt die Reprotonierung der SB (M-Zerfall) und die anschließende Regeneration des Grundzustandes etwa 100fach langsamer.

Durch die Untersuchung von pSRII-Mutanten konnten die strukturellen Ursachen hierfür gefunden werden. Die Mutante pSRII-L40T/F86D weist mit $\tau = 7$ ms einen BR-ähnlichen M-Zerfall auf ($\tau = 4$ ms). Da der Turnover der Mutante jedoch zum Wildtyp unverändert langsam ist (etwa 1 s), konnte abgeleitet werden, daß höchstwahrscheinlich Konformationsänderungen und nicht Protonentransferreaktionen die Kinetik des pSRII-Photozyklus bestimmen.

Mit der Analyse des SRI-Photozyklus wurde zunächst die Funktionalität des heterolog exprimierten Pigmentes gezeigt. Zudem konnte auch für das SRI erstmals ein N-Intermediat nachgewiesen werden. Die pH-Abhängigkeit der transienten Absorptionen liefert starke Hinweise, daß lediglich SR₅₅₀ ein M-Intermediat bildet, womit die Analogie des Mechanismus der M-Bildung zum BR, SRII und pSRII demonstriert werden konnte.

Mit der Expression von SRI, SRII und pSRII sowie der Komplexe SRI/HtrI und pSRII/pHtrII in Oocyten konnte das *Xenopus*-System für die archaeobakteriellen Rezeptoren und ihrer Komplexe mit den Transducern etabliert werden. Hierdurch ist die elektrophysiologische Charakterisierung der Proteine unter Voltage-Clamp-Bedingungen ermöglicht. Zur Kontrolle dieser Methode wurden die Photoströme des pSRII und pSRII-Mutanten zusätzlich mit der BLM-Technik analysiert, wobei die Ergebnisse exakt denen der VC-Messungen entsprechen.

Anhand der VC-Signale konnte nachgewiesen werden, daß alle drei Rhodopsine im Transducer-freien Zustand auswärts gerichtete Protonenpumpen darstellen. Die Korrelation der Photoströme mit den transienten Absorptionen legt einen 2-Photonen-Mechanismus für das Pumpen der Rezeptoren nahe. Konsistent mit den verlangsamten Photozyklen ist die Pumpleistung der SR's im Vergleich zum BR deutlich verringert. Unter VC-Bedingungen konnte die aus physiologischer Sicht wichtige Spannungsabhängigkeit der SR-Photoströme ermittelt werden. Die hierbei beobachtete erhöhte Empfindlichkeit der Photoströme gegenüber dem Membranpotential ist ein deutlicher Hinweis auf große Konformationsänderungen während der SR-Photozyklen. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, daß der Lichtreiz durch eine reversible Ausklappbewegung der Helix F auf den Transducer übertragen wird.

Durch die Expression der Komplexe SRI/HtrI und pSRII(F86D)/pHtrII wurde bewiesen, daß die Transducer das Protonenpumpen ihrer Rezeptoren inhibieren. Im Falle des pSRII(F86D)/pHtrII wurde dieser Effekt zum ersten Mal nachgewiesen. Aufgrund der Hemmung der Pumpaktivität durch die Transducer, steht mit dem *Xenopus*-System ein elektrophysiologischer Assay der Rezeptor/Transducer Wechselwirkung zur Verfügung. Hierdurch wurden Mutagenesestudien zur Untersuchung der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren und Domänen ermöglicht. Hybridexperimente, bei denen SRI mit pHtrII und pSRII-F86D mit HtrI ko-exprimiert wurden, belegen die Spezifität der Rezeptor/Transducer-Wechselwirkung.

Für das pHtrII konnte durch die Expression C-terminaler Fragmente die minimale Wechselwirkungsdomäne ermittelt werden. Die ersten 113 Aminosäuren, welche beide transmembranen Helices und einen etwa 30 Reste langen helikalen Übergang zum Zytoplasma umfassen, sind für eine Inhibierung der Pumpaktivität ausreichend. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß die Rezeptor/Transducer-Wechselwirkung hauptsächlich über die transmembranen Helices erfolgt.

6. Literaturverzeichnis

- Balashov, S.P., E.S. Imasheva, T.G. Ebrey, N. Chen, D.R. Menick, und R.K. Crouch (1997), Glutamate-194 to cysteine mutation inhibits fast light-induced proton release in bacteriorhodopsin, *Biochemistry* **36**:8671-8676.
- Bamberg, E., H.-J. Apell, N.A. Dencher, W. Sperling, H. Stieve, und P. Lauser. (1979). Photocurrents generated by bacteriorhodopsin on planar bilayer membranes, *Biophys.Struct.Mech.* **5**:277-292.
- Beja, O., Aravind, L. Koonin, E. V., Suzuki, M. T., Hadd, A., Nguyen, L. P. Jovanovich, S. B., Gates, C. M., Feldman, R. A., Spudich, J. L., Sudich, E. N. und E. F DeLong (2000), Bacterial Rhodopsin: Evidence for a new type of Phototrophy in the sea, *Science*, **289**: 1902-1906.
- Bieszke, J. A., Braun, E. L., Bean, L. E., Kang, S., Natvig, D. O. und K. A. Borkovich (1999), The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 8034-8039
- Birge, R.R. (1990), Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1016**: 293-327.
- Bogomolni, R.A. und J.L. Spudich (1982), Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **79**:6250-6254.
- Bogomolni, R.A. und J.L. Spudich (1987). The photochemical reactions of bacterial sensory rhodopsin-I. Flash photolysis study in the one microsecond to eight second time window. *Biophys.J.* **52**:1071-1075.
- Bogomolni, R.A., W. Stoeckenius, I. Szundi, E. Perozo, K.D. Olson, und J.L. Spudich (1994), Removal of transducer HtrI allows electrogenic proton translocation by sensory rhodopsin I, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**:10188-10192.
- Braiman, M.S. und R.A. Mathies (1982), Resonance Raman spectra of bacteriorhodopsins primary photoproduct evidence for a distorted 13 cis retinal chromophor, *Proc.Natl.Acad.Sci.* **79**:403-407.
- Braiman, M.S., T. Mogi, T. Marti, L.J. Stern, H.G. Khorana, und K.J. Rothschild (1988), Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: Light- driven proton transport involves protonation changes of aspartic acid residues 85, 96, and 212, *Biochemistry* **27**:8516-8520.
- Braun, D., N.A. Dencher, A. Fahr, M. Lindau, und M.P. Heyn (1988), Nonlinear voltage dependence of the light-driven proton pump current of bacteriorhodopsin, *Biophysical Journal* **53** (4). -622
- Brown, L.S., A.K. Dioumaev, R. Needleman, und J.K. Lanyi (1998), Connectivity of the retinal schiff base to asp(85) and asp(96) during the bacteriorhodopsin photocycle - the local-access model, *Biophys.J.* **75**:1455-1465.
- Brown, L.S., A.K. Dioumaev, R. Needleman, und J.K. Lanyi (1998), Local-access model for proton transfer in bacteriorhodopsin, *Biochemistry* **37**:3982-3993.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., und J. N. Short (1987), XL1-blue a high efficiency plasmid transforming rec-A *Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection, *Biotechniques* **5**, 376-377.
- Butt, H.-J., K. Fendler, A. Der, und E. Bamberg (1989), Temperature jump study of charge translocation during the bacteriorhodopsin photocycle, *Biophys.J.* **56**:851-859.
- Cao, Y., L.S. Brown, J. Sasaki, A. Maeda, R. Needleman, und J.K. Lanyi (1995), Relationship of proton release at the extracellular surface to deprotonation of the Schiff base in the bacteriorhodopsin photocycle, *Biophys.J.*, **68**:1518-1530.

- Chizhov, I., D.S. Chernavskii, M. Engelhard, K.H. Müller, B.V. Zubov und B. Hess (1996), Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle, *Biophys.J.*, **71**:2329-2345.
- Chizhov, I., G. Schmies, R. Seidel, J.R. Sydor, B. Lüttenberg und M. Engelhard (1998), The photophobic receptor from *Natronobacterium pharaonis* - temperature and pH dependencies of the photocycle of sensory rhodopsin II, *Biophys.J.*, **75**:999-1009.
- Dér, A., S. Száraz, R. Tóth-Boconádi, Z. Tokaji, L. Keszthelyi und W. Stoeckenius (1991), Alternative translocation of protons and halide ions by bacteriorhodopsin, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **88**:4751-4755.
- Dobler, J., Zinth, W., Kaiser, W. und D. Oesterhelt (1988), Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, **144**: 215-220.
- Dower, W. J., Miller, J.F. und Ragsdale (1988), C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Research*, **16**, 6127-6145.
- Efimov, A.V. (1984), A novel super-secondary structure of proteins and the relation between the structure and the amino acid sequence, *FEBS Lett.* **166**:33-38.
- Engelhard, M., Scharf, B. und F. Siebert (1996), Protonation changes during the photocycle of sensory rhodopsin II from *Natronobacterium pharaonis*, *FEBS Lett.*, **395**: 195-198
- Engelhard, M., K. Gerwert, B. Hess, W. Kreutz und F. Siebert (1985), Light-driven protonation changes of internal aspartic acids of bacteriorhodopsin: An investigation by static and time-resolved infrared difference spectroscopy using [4-¹³C] aspartic acid labeling purple membrane, *Biochemistry* **24**:400-407.
- Fahmy, K., Siebert, F. und T. P. Sakmar (1995), Photoactivated state of rhodopsin and how it can form, *Biophys. Chem.*, **56**: 171-181.
- Fahr, A., P. Läger und E. Bamberg (1981), Photocurrent kinetics of purple-membrane sheets bound to planar bilayer membranes, *J.Membr.Biol.*, **60**:51-62.
- Falke, J.J., R.B. Bass, S.L. Butler, S.A. Chervitz, und M.A. Danielson (1997), The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes, *Annu.Rev.Cell Dev.Bio.*, **13**:457-512.
- Farrens, D.L., C. Altenbach, K. Yang, W.L. Hubbell und H.G. Khorana (1996), Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin, *Science*, **274**:768-770.
- Ferrando-May, E., B. Brustmann und D. Oesterhelt (1993), A C-terminal truncation results in high-level expression of the functional photoreceptor sensory rhodopsin I in the archaeon *Halobacterium salinarium*, *Mol.Microbio.*, **9**:943-953.
- Fischer, U. und D. Oesterhelt. (1979), Chromophore equilibria in bacteriorhodopsin, *Biophys.J.*, **28**:211-230.
- Gerwert, K., B. Hess, J. Soppa und D. Oesterhelt (1989), Role of aspartate-96 in proton translocation by bacteriorhodopsin, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **86**:4943-4947.
- Gloor, R., Pongs, O. und G. Schmalzig (1995), A vector for the synthesis of CRNAS encoding MYC epitope-tagged proteins in *Xenopus-laevis* oocytes, *Gene*, **160**: 213-217.
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R. und G. Marbaix (1971), Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells, *Nature*, **233**: 177-182.
- Haupts, U., C. Haupts und D. Oesterhelt (1995), The photoreceptor sensory rhodopsin I as a two-photon-driven proton pump, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **92**:3834-3838.

- Haupts, U., E. Bamberg und D. Oesterhelt (1996), Different modes of proton translocation by sensory rhodopsin I, *EMBO J.*, **15**:1834-1841.
- Haupts, U., J. Tittor, E. Bamberg und D. Oesterhelt (1997), General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins - the isomerization/switch/transfer (IST) model, *Biochemistry*, **36**:2-7.
- Hildebrand, E. und N. A. Dencher (1975), Two photosystems controlling behavioural responses in *Halobacterium*; phobic response; motility, *Nature*, **257**: 46-49.
- Hirayama, J., Y. Imamoto, Y. Shichida, N. Kamo, H. Tomioka, und T. Yoshizawa (1992), Photocycle of phoborhodopsin from haloalkaliphilic bacterium (*Natronobacterium pharaonis*) studied by low-temperature spectrophotometry, *Biochemistry*, **31**:2093-2098.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., und L. R. Pease (1989), Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene*, **77**, 51-59.
- Hoff, W. D., Jung, K. H. und J. L. Spudich (1997), Molecular mechanism of photosignaling by archaeal sensory rhodopsins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26**: 223-258.
- Hohenfeld, I.P. (1998), Dissertation Universität Dortmund
- Hohenfeld, I.P., A.A. Wegener und M. Engelhard (1999), Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, *pharaonis* halorhodopsin and *pharaonis* sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*, *FEBS Letters*, **442**:198-202.
- Imamoto, Y., Shichida, Y., Hirayama, J., Tomioka, H., Kamo, N. und T. Yoshizawa (1992), Chromophor configuration of pharaonis phoborhodopsin and its isomerization on photon absorption, *Biochemistry*, **31**: 2523-2528.
- Imamoto, Y., Y. Shichida, J. Hirayama, H. Tomioka, N. Kamo und T. Yoshizawa (1992), Nanosecond laser photolysis of phoborhodopsin: From *Natronobacterium pharaonis* appearance of KL and L intermediates in the photocycle at room temperature, *Photochem.Photobiol.*, **56**:1129-1134.
- Iwamoto, M., K. Shimono, M. Sumi und N. Kamo (1999), Positioning proton-donating residues to the Schiff-base accelerates the M-decay of pharaonis phoborhodopsin expressed in *Escherichia coli*, *Biophys.Chem.*, **79**:187-192.
- Iwamoto, M., K. Shimono, M. Sumi, K. Koyama und N. Kamo (1999), Light-induced proton uptake and release of *pharaonis* phoborhodopsin detected by a photoelectrochemical cell, *Journal of Physical Chemistry B*, **103**:10311-10315.
- Jung, K.H. und J.L. Spudich (1996), Protonatable residues at the cytoplasmic end of transmembrane helix-2 in the signal transducer HtrI control photochemistry and function of sensory rhodopsin I, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **93**:6557-6561.
- Jung, K.H. und J.L. Spudich (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., E.N. Spudich, P. Dag und J.L. Spudich (1999). Transducer-binding and transducer-mutations modulate photoactive-site-deprotonation in sensory rhodopsin I, *Biochemistry.*, **38**:13270-13274.
- Kim, K. K., Yokota, K und S.H. Kim (1999), Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor, *Nature*, **400**: 787-792.
- Kimura, Y., A. Ikegami und W. Stoeckenius (1984), Salt and pH-dependent changes of the purple membrane absorption spectrum, *Photochemistry & Photobiology*, **40**:641-646.
- Kolbe, M., Besir, H., Essen, L. O. und D. Oesterhelt (2000), Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1,8 Å resolution, *Science*, **288**: 1390-1396.

- Krah, M., W. Marwan und D. Oesterhelt (1994), A cytoplasmic domain is required for the functional interaction of SRI and HtrI in archaeal signal transduction, *FEBS Letters*, **353**:301-304.
- Krebs, M.P., E.N. Spudich und J.L. Spudich (1995), Rapid high-yield purification and liposome reconstitution of polyhistidine-tagged sensory rhodopsin 1, *Protein Expression & Purification*, **6**:780-788.
- Lanyi, J.K. und G. Váró (1995), The photocycles of bacteriorhodopsin, *Isr.J.Chem.*, **35**:365-385.
- Lozier, R.H., R.A. Bogomolni und W. Stoerkenius (1975) Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*, *Biophys.*, **15**:955-962.
- Luecke, H., B. Schobert, H.T. Richter, J.P. Cartailler und J.K. Lanyi (1999), Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 Ångstrom resolution, *Science*, **286**:255-261.
- Luecke, H., B. Schobert, H.T. Richter, J.P. Cartailler und J.K. Lanyi (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Ångstrom resolution, *J.Mol.Biol.*, **291**:899-911.
- Lüttenberg (1999), Dissertation Universität Münster
- Marwan, W. und D. Oesterhelt (1990), Signal transduction in *Halobacterium halobium*. In *Biology of the Chemotactic Response Society for General Microbiology Symposium Vol. 46*. J.P. Armitage and J.M. Lackie, editors. Cambridge University Press, Cambridge. 219-239.
- Marwan, W. und D. Oesterhelt (1999), Archaeal vision and bacterial smelling: Sensory Control of the swimming behavior by two component signaling and fumarate, *ASM-News*.
- Maurer, R. Vogel, J. und S. Schneider (1987), Analysis of flash photolysis data by global fit with multi-exponential exponentials, *Photochem. Photobiol.*, **46**: 255-262.
- Metzler, D.E. und C.M. Harris (1978), Shapes of spectral bands of visual pigments, *Vision Res.*, **18**:1417-1420.
- Michel, H. und D. Oesterhelt (1980), Electrochemical proton gradient across the cell membrane of *Halobacterium halobium*: Comparison of the light-induced increase with the increase of intracellular adenine triphosphate under steady-state illumination, *Biochemistry*, **19**:4615-4619.
- Miyazaki, M., J. Hirayama, M. Hayakawa und N. Kamo (1992), Flash photolysis study on pharaonis phorbodopsin from a haloalkaliphilic bacterium (*Natronobacterium pharaonis*), *Biochim.Biophys.Acta Bio-Energetics*, **1140**:22-29.
- Moual, le H. und D. E. Koshland 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.
- Müller, K.-H. und Th. Plesser (1991), Variance reduction by simultaneous multi-exponential analysis of data sets from different experiments, *Eur.Biophys.J.*, **19**:231-240.
- Nagel, G., B. Kelety, B. Mockel, G. Buldt und E. Bamberg (1998), Voltage dependence of proton pumping by bacteriorhodopsin is regulated by the voltage-sensitive ratio of M₁ to M₂, *Biophys.J.*, **74**:403-412.
- Nagel, G., B. Möckel, G. Büldt und E. Bamberg (1995), Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping, *FEBS Letters*, **377**:263-266.
- Nagle, J.F. (1991), Solving complex photocycle kinetics. Theory and direct method, *Biophys.J.*, **59**:476-487.
- Needleman, R., M. Chang, B. Ni, G. Váró, J. Fornés, S.H. White und J.K. Lanyi (1991), Properties of Asp²¹²->Asn bacteriorhodopsin suggest that Asp²¹² and Asp⁸⁵ both participate in a counterion and proton acceptor complex near the Schiff base, *J.Biol.Chem.* **266**:11478-11484.

- Oesterhelt, D. und W. Stoeckenius (1971), Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nature - New Biology*, **233**:149-152.
- Oesterhelt, D., Tittor, J. und E. Bamberg (1992), A unifying concept for ion translocation by retinal proteins, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **24**: 181-191.
- Olson K. D. und J. L. Spudich (1993), Removal of the transducer protein from sensory rhodopsin I exposes sites of proton release and uptake during the receptor photocycle, *Biophys. J.*, **65**, 2578-2585
- Olson, K.D., P. Deval und J.L. Spudich (1992), Absorption and photochemistry of sensory rhodopsin--I: pH effects, *Photochem.Photobiol.*, **56**:1181-1187.
- Ormos, P., Z. Dancshazy und B. Karvaly (1978), Mechanism of generation and regulation of photopotential by bacteriorhodopsin in bimolecular lipid membrane, *Biochim.Biophys.Acta*, **503**:304-315.
- Ottemann, K.M., W. Xiao, Y.K. Shin und D.E.J. Koshland (1999), A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor, *Science*, **285**:1751-1754.
- Perazzona, B., E.N. Spudich und J.L. Spudich (1996), Deletion mapping of the sites on the htrI transducer for sensory rhodopsin I interaction, *J.Bacterio.*, **178**:6475-6478.
- Racker, E. und W. Stoeckenius (1974), Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light- driven proton uptake and adenosine triphosphate formation, *J.Biol.Chem.*, **249**:662-663.
- Rao, R. und D. D. Oprian (1996), Activation mutations of rhodopsin and other G protein coupled receptors, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **25**: 287-314.
- Rath, P., K.D. Olson, J.L. Spudich und K.J. Rothschild (1994), The Schiff base counterion of bacteriorhodopsin is protonated in sensory rhodopsin I: Spectroscopic and functional characterization of the mutated proteins D76N and D76A, *Biochemistry*, **33**:5600-5606.
- Richter, H.T., L.S. Brown, R. Needleman und J.K. Lanyi (1996), A linkage of the pK_a's of asp-85 and glu-204 forms part of the reprotonation switch of bacteriorhodopsin, *Biochemistry*, **35**:4054-4062.
- Rudolph, J. und D. Oesterhelt (1995), Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarium*, *EMBO J.*, **14**:667-673.
- Rudolph, J. und D. Oesterhelt (1996), Deletion analysis of the che operon in the archaeon *Halobacterium salinarium*, *J.Mol.Bio.*, **258**:548-554.
- Sasaki, J. und J.L. Spudich (1998), The transducer protein HtrII modulates the lifetimes of sensory rhodopsin II photointermediates, *Biophys.J.*, **75**:2435-2440.
- Sasaki, J. und J.L. Spudich (1999), Proton circulation during the photocycle of sensory rhodopsin II, *Biophys J.*, **77**:2145-2152.
- Sasaki, J. und J.L. Spudich (2000), Proton transport by sensory rhodopsins and its modulation by transducer-binding, *Biochim. Biophys. Act.*: 230-239
- Sass, H. J., Büldt, G., Gessenich, R. Hehn, D., Neff, D., Schlesinger, R. und J. Ber (2000), Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin, *Nature*, **406**: 649-653.
- Schagger, H. und G. von Jagow (1987), Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal.Biochem.*, **166**:368-379.
- Scharf, B. (1992), Dissertation Ruhr-Universität Dortmund

- Scharf, B. und M. Engelhard (1994), Blue halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*: Wavelength regulation by anions, *Biochemistr*, **33**:6387-6393.
- Scharf, B., B. Pevec, B. Hess und M. Engelhard (1992), Biochemical and photochemical properties of the photophobic receptors from *Halobacterium halobium* and *Natronobacterium pharaonis*, *Eur.J.Biochem.*, **206**:359-366.
- Scharf, B., M. Engelhard und F. Siebert (1992), A carboxyl group is protonated during the photocycle of the photophobic receptor psR-II from *Natronobacterium pharaonis*. In Structures and Functions of Retinal Proteins. Vol. 221. J.L. Rigaud, editor. John Libbey Eurotext Ltd., 317-320.
- Schegk, E. S. und D. Oesterhelt (1988), Isolation of a prokaryotic photoreceptor: sensory rhodopsin from halobacteria, *EMBO J.*, **7**: 2925-2933
- Seidel, R., B. Scharf, M. Gautel, K. Kleine, D. Oesterhelt und M. Engelhard (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.
- Sheves, M.; Baasov, T.; Friedman, N.; Ottolenghi, M.; Feinmann-Weinberg, R.; Rosenbach, V.; Ehrenberg, B (1984), On the Binding Site of Bacteriorhodopsin; A Study with Artificial Pigments, *Jour. Am. Chem. Soc.*, **106**: 2435-2437.
- Shimono, K., M. Iwamoto, M. Sumi und N. Kamo (1997), Functional expression of pharaonis phoborhodopsin in *Escherichia coli*, *FEBS Letters*, **420**:54-56.
- Spudich, E.N. und J.L. Spudich (1993), The photochemical reactions of sensory rhodopsin I are altered by its transducer, *J.Biol.Chem.*, **268**:16095-16097.
- Spudich, E.N., W.S. Zhang, M. Alam und J.L. Spudich (1997), Constitutive signaling by the phototaxis receptor sensory rhodopsin II from disruption of its protonated Schiff base Asp-73 interhelical salt bridge, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **94**:4960-4965.
- Spudich, J. L. und J. K. Lanyi (1996), Shuttling between two protein conformations – the common mechanism for sensory transduction and ion transport, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**: 452-457.
- Spudich, J.L. 1994. Protein-protein interaction converts a proton pump into a sensory receptor, *Cell*, **79**:747-750.
- Spudich, J.L. und R.A. Bogomolni (1984), Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin, *Nature*, **312**:509-513.
- Spudich, J.L. und R.A. Bogomolni (1988), SENSORY RHODOPSINS OF HALOBACTERIA, *Ann.Rev.Biophys.Biochem.*, **17**:193-215.
- Spudich, J.L., D.N. Zacks und R.A. Bogomolni (1995), Microbial sensory rhodopsins - photochemistry and function, *Isr.J.Chem.*, **35**:495-513.
- Studier, F.W. und B.A. Moffatt (1986), Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J.Mol.Biol.*, **189**:113-130.
- Subramaniam, S. und R. Henderson (2000), Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin, *Nature*, **406**: 653-657.
- Subramaniam, S., M. Gerstein, D. Oesterhelt und R. Henderson (1993), Electron diffraction analysis of structural changes in the photocycle of bacteriorhodopsin, *EMBO J.* **12**:1-8.
- Takahashi, T., Tomioka, H., Kamo, N. und Y. Kobatake (1985), A photosystem other than PS370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **28**: 161-164.

- Takao, K., T. Kikukawa, T. Araiso und N. Kamo (1998), Azide accelerates the decay of M-intermediate of pharaonis phoborhodopsin, *Biophys.Chem.*, **73**:145-153.
- Tittor, J., C. Soell, D. Oesterhelt, H.-J. Butt und E. Bamberg (1989), A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96-->Asn is fully reactivated by azide, *EMBO J.*, **8**:3477-3482.
- Tittor, J., U. Haupts, C. Haupts, D. Oesterhelt, A. Becker und E. Bamberg (1997), Chloride and proton transport in bacteriorhodopsin mutant D85T - different modes of ion translocation in a retinal protein, *J.Mol.Biol.*, **271**:405-416.
- Tomioka, H., T. Takahashi, N. Kamo und Y. Kobatake (1986), Flash spectrometric identification of a fourth rhodopsin-like pigment in *Halobacterium halobium*, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **139**:389-395.
- Vonck, J. (2000), Structure of the bacteriorhodopsin mutant F219L N intermediate revealed by electron crystallography, *EMBO J.*, **19**:2152-2160.
- W. Kühlbrandt (2000), Bacteriorhodopsin – the movie, *Nature*, **406**: 569-570.
- Wald, G. (1968), Molecular basis of visual excitation, *Science*, **162**:230-239.
- Wegener, A. A., Chizhov, I., Engelhard, M. und H. J. Steinhoff (2000), Time-resolved detection of transient Movement of Helix F in spin-labelled pharaonis sensory rhodopsin II, *J. Mol. Biol.*, **301**: 881-891.
- Yan, B. und J.L. Spudich (1991), Evidence that the repellent receptor form of sensory rhodopsin I is an attractant signaling state, *Photochemistry & Photobiology*, **54**:1023-1026.
- Yan, B., T. Takahashi, R. Johnson und J.L. Spudich (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.
- Zhang, X.-N. und J.L. Spudich (1998), HtrI is a dimer whose interface is sensitive to receptor photoactivation and His-166 replacements in sensory rhodopsin I, *J.Biol.Chem.*, **273**:19722-19728.
- Zhang, X.N., J. Zhu und J.L. Spudich (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.
- Zhu, J.Y., E.N. Spudich, M. Alam und J.L. Spudich (1997), Effects of substitutions D73E, D73N, D103N and V106M on signaling and pH titration of sensory rhodopsin II, *Photochemistry & Photobiology*, **66**:788-791.

7 Anhang

Absorptionsspektrometrische Analyse der Photozyklen

Für die Auswertung der absorptionsspektrometrischen Daten existieren mehrere Verfahren. Im folgenden wird die in dieser Arbeit verwendete standardisierte Methode nach Chizhov et al. (1996) dargestellt. Grundlage der Analyse ist das Lambert-Beer'sche Gesetz:

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

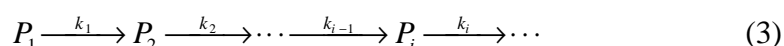
Die Absorption, der dekadische Logarithmus des Quotienten der Strahlungsintensität vor I_0 und nach I dem Passieren des absorbierenden Mediums, setzt sich additiv aus dem Produkt der Extinktionskoeffizienten ϵ_i , der Konzentrationen c_i aller absorbierenden Spezies und der Schichtdicke d zusammen. Eine Interpretation der Absorptionsänderungen wird jedoch dadurch erschwert, daß immer eine Verteilung der verschiedenen Intermediate vorliegt und daß das gemessene Signal zu keiner Zeit auf ein einziges Intermediat zurückgeführt werden kann. Es existiert daher keine direkte Methode zur Ableitung eines kinetischen Modells des Photozyklus aus den experimentellen Daten. Die Bestimmung der Anzahl der Intermediate stellt hierbei ein zentrales Problem dar (Maurer et al., 1987). Ein systematischer Ansatz ist es, die Absorptionsänderungen $\Delta A(\lambda, t)$ durch eine Summe von Exponentialfunktionen mathematisch zu beschreiben, die folgende Form besitzen:

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

Setzt man voraus, daß die Zerfälle der Intermediate einer Kinetik erster Ordnung folgen, muß die dafür notwendige Zahl der Exponentialfunktionen der Anzahl n der Intermediate entsprechen. Die multiexponentielle Analyse der Absorptionsänderungen nach der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme ist mittlerweile ein Routineverfahren. Sie liefert einen Satz von apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_i^* der einzelnen Zerfälle, aus denen sich die Halbwertszeiten ($\tau = \ln 2/k$) der Intermediate berechnen lassen, sowie deren differentielle Amplitudenspektren $b_i(\lambda)$ (Müller und Plesser, 1991). Dieser Ansatz gilt unabhängig von der Anzahl der Reaktionswege und der

korrespondierenden intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten k_i (Xie et al., 1987). Zur Berechnung der absoluten Spektren der Intermediate müssen die Halbwertszeiten den einzelnen Intermediaten zugeordnet und ein Reaktionsschema entworfen werden. Zunächst geht man von einer Sequenz irreversibler Übergänge erster Ordnung aus (Nagle, 1982). Dieses einfache Modell besitzt als einziges eine exakte mathematische Lösung. Bei seiner Gültigkeit lassen sich die Spektren der Intermediate wie folgt berechnen:

Die Kinetik der Sequenz



wird durch die Differentialgleichung (4) beschrieben:

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

Unter der Annahme, daß sich zur Zeit $t = 0$ alle Moleküle im Grundzustand befinden, lautet die exakte Lösung von (4):

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

, 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 zur Zeit t im Zustand i zu finden. Bei n Reaktionsschritten erhält man für den präexponentiellen Faktor a_j eine $n \times n$ Matrix. Eine Konsequenz der Irreversibilität der Übergänge ist, daß im Wahrscheinlichkeitswert P_i alle Informationen der vorangegangenen Reaktionsschritte, sowie des direkt folgenden enthalten sind. Wenn $\Delta\varepsilon_i$ die Differenzspektren der Intermediate i in Bezug auf den Grundzustand darstellen ($\Delta\varepsilon_i = \varepsilon_i - \varepsilon_0$), folgt aus diesen Überlegungen für die Absorptionsänderungen:

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

F_c , die „cycling fraction“ ($F_c = N_c/N_0$), ist der Anteil der Moleküle, der nach Anregung durch den Laserpuls den Zustand $i = 1$ erreicht und somit den Photozyklus durchläuft. Ordnet man die experimentell ermittelten apparenten Geschwindigkeits-konstanten k_i^* den intrinsischen k_i zu, so läßt sich die Matrix a_{ij} berechnen, und die Ableitung der Spektren der Intermediate hängt nur noch von einem unbekanntem Parameter ab, der „cycling fraction“ F_c . Der Minimalwert von F_c kann anhand der Spektren mit hinreichender Genauigkeit abgeschätzt werden. Als einziges Kriterium dient hierbei Abwesenheit von negativen Absorptionen in den absoluten Spektren der Intermediate. (Chizhov et al., 1996):

$$b_i(\mathbf{I}) = F_c \sum_{j=i}^n a_{ji} \Delta \mathbf{e}_j(\mathbf{I}). \quad (8)$$

Im direkten Gegensatz zur Wahrscheinlichkeit P_i beinhaltet die differentielle spektrale Amplitude $b(\lambda)$ das Spektrum des Intermediates i und aller weiteren Intermediate ($j = i \dots n$) bis zum Ende des Photozyklus. Daher lassen sich alle differentiellen Spektren $\Delta \mathbf{e}_i$ rekursiv aus dem Spektrum des letzten Intermediates n berechnen:

$$\Delta \mathbf{e}_i = \frac{b_i(\mathbf{I}) - \sum_{j=i+1}^n a_{ij} \Delta \mathbf{e}_j(\mathbf{I})}{a_{ii} F_c}. \quad (9)$$

Die absoluten Spektren \mathbf{e}_i ergeben sich durch Addition des experimentell leicht zugänglichen Spektrums des Grundzustandes \mathbf{e}_0 :

$$\mathbf{e}_i = \Delta \mathbf{e}_i + \mathbf{e}_0. \quad (10)$$

Ein prinzipielles Problem bei der Ableitung eines kinetischen Modells des Photozyklus aufgrund absorptionsspektrometrischer Daten ist, daß die experimentell gewonnenen Informationen zur eindeutigen Bestimmung des Systems nicht ausreichen, d.h. die Zahl der

unbekannten Größen übertrifft die Zahl der bekannten Größen. Durch die freie Wählbarkeit von Parametern, sind generell mehrere Modelle in der Lage, die Meßdaten mathematisch zu erklären. Daher ist es wichtig, sorgfältig zu überprüfen, ob ein Reaktionsschema physikalisch sinnvolle Vorhersagen zuläßt. Hierbei ist die Analyse des Photozyklus bei verschiedenen Temperaturen eine wichtige Kontrolle: Erstens sollten sich die aus dem Modell abgeleiteten Spektren der Intermediate ε_i nicht signifikant ändern, wenn im betrachteten Temperaturbereich sich weder die Struktur des Proteins noch der Reaktionsweg neu gestaltet (Nagle et al., 1995). Zweitens kann man über die Temperaturabhängigkeit leicht feststellen, ob die apparenten Geschwindigkeitskonstanten ein physikalisch realistisches Verhalten aufweisen, was gleichzeitig zur Kontrolle der Ergebnisse der multiexponentiellen Datenanalyse dient. Desweiteren können die Aktivierungsparameter der einzelnen Reaktionsschritte des Modells abgeschätzt werden. Eine lineare Regression auf Grundlage der empirischen Arrheniusgleichung (11) liefert einen Näherungswert der Aktivierungsenergie E_a .

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

R stellt die allgemeine Gaskonstante dar, A wird in Anlehnung an die kinetische Gastheorie als Häufigkeits- oder Stoßfaktor bezeichnet.

Durch eine nichtlineare Analyse basierend auf der Eyringgleichung (12) nach der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme, lassen sich die Aktivierungsenthalpie ΔH^\ddagger und -Entropie ΔS^\ddagger ebenfalls abschätzen:

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

k_b stellt die Boltzmannkonstante, h die Planckkonstante dar

Mein erster Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. M. Engelhard und Herrn Prof. Dr. E. Bamberg, die mich großzügig und mit voller Unterstützung betreut haben.

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

Besonders danken möchte ich Herrn. Dr. I. Chizhov für die intensive Unterstützung bei den kinetischen Messungen und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Seidel bin ich für die Einführung in die Molekularbiologie dankbar.

Für seine effektive Betreuung und Einweisung in die Elektrophysiologie danke ich Herrn. Prov. Doz. Dr. G. Nagel. Seiner Arbeitsgruppe bin ich für Ihre bemerkenswerte Hilfsbereitschaft dankbar.

Herrn Dr. P. G. Wood danke ich für die Bereitstellung des pNK4-Vektors und seiner Unterstützung. Barbara Legrum hat mir in seinem Labor sehr bei meiner Arbeit geholfen, wofür ich mich herzlich bedanke.

Für Ihre wunderschönen BLM-Experimente danke ich Anja Becker. Hinzu kommen viele kleine Gefälligkeiten von Ihr und Heidi Bergemann für die ich mich herzlich bedanke.

Ein generelles Dankeschön gilt der Arbeitsgruppe von Herrn Priv. Doz. M. Engelhard und der Abteilung von Herrn Prof. Dr. E. Bamberg. In beiden Gruppen herrschte eine große gegenseitige Hilfsbereitschaft und eine freundliche Atomsphäre. Hervorheben möchte ich den Erfahrungs- und Plasmidaustausch mit Ansgar Amadeus Wegener und das legendäre Westernblot-Experiment mit Peter de Vries. Sven Geibel war stets zu langen Diskussionen und gemeinsamen Experimenten bereit und hätte nach meiner Meinung eine Mitautorschaft an der jüngsten Publikation verdient.

Dem Boehringer Ingelheim Fonds danke ich für ein Stipendium, das weitaus mehr als nur eine finanzielle Unterstützung darstellt. Besonderen Dank gilt Herrn Dr. H. Fröhlich und Frau Monika Beutelspacher.

Meinen Eltern danke ich für die außertarifliche Unterstützung.

Der liebste Dank gilt der unglaublichen Ximena Ramirez-España.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Georg Schmies
Geburtsdatum und –Ort: 24.01.'72 in Gelsenkirchen

Ausbildung

06/91 Abitur, Gymnasium am Rathausplatz (Gelsenkirchen)
07/91 – 6/92 Wehrdienst in Ulmen (Rh.-Pfalz) und Barnstorf (Nieders.)
10/92 Beginn des Chemiestudiums an der Universität Dortmund
10/94 Diplomvorprüfung
11/96 Diplomhauptprüfung
01/97 – 7/97 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare
Physiologie, Dortmund:
"Chromophor/Protein – Wechselwirkungen im sensorischen
Rhodopsin II aus *Natronobacterium pharaonis*".
08/97 Diplomvergabe
01/98 Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für
molekulare Physiologie in Dortmund und Max-Planck-
Institut für Biophysik in Frankfurt.

Seit 06/98 Stipendiat des Boehringer Ingelheim Fonds.