

**Untersuchungen zur Struktur-Funktionsbeziehung an  
archaebakteriellen Proteinen der oxidativen Phosphorylierung  
und Signaltransduktion**

**Dissertation**

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

vorgelegt von Dipl.-Chem. Astrid M. Dörner  
aus Köln

Dortmund, Mai 2001

*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. Dr. M. Engelhard angefertigt.

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. M. Engelhard
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Kreiser

Tag der Prüfung: 12. Juli 2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Aufbau der Elektronentransportkette des <i>N. pharaonis</i>	3
1.2	Cytochrom $ba_3$ aus <i>N. pharaonis</i>	5
1.3	Photophosphorylierung	9
1.4	Phototaxis in <i>H. salinarum</i>	13
1.5	Sensorisches Rhodopsin I aus <i>H. salinarum</i>	15
1.5	Ziel der Arbeit	18
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Chemikalien	20
2.2	Instrumentation	21
2.3	Bakterienstämme und Plasmide	22
2.4	Oligonukleotide	22
2.5	Puffer, Lösungen und Medien	25
2.6	Molekularbiologische Methoden	27
2.6.1	Agarosegelelektrophorese von DNA	27
2.6.2	Isolierung chromosomaler DNA	27
2.6.3	Isolierung von Gesamt-RNA	27
2.6.4	Isolierung von Plasmid-DNA	28
2.6.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
2.6.6	Restriktion von DNA	28
2.6.7	Ligation von DNA	28
2.6.8	Polymerase-Kettenreaktion	29
2.6.9	Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion	30
2.6.10	Herstellung nicht-radioaktiv markierter DNA-Sonden	31
2.6.11	Southern-Transfer	31
2.6.12	Hybridisierung filtergebundener DNA und Detektion	32
2.6.13	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	32
2.6.14	Transformation von <i>H. salinarum</i>	32
2.6.15	DNA-Sequenzierung	33
2.7	Proteinchemische Methoden	34
2.7.1	Zellanzucht	34
2.7.2	Proteinsynthese in <i>E. coli</i>	34
2.7.3	Präparation der Membranproteine SRI und Htrl	35
2.7.4	Kopplung mit Spinproben	36
2.7.5	Isolierung und Verarbeitung polarer Lipide aus <i>H. salinarum</i>	36
2.7.6	Rekonstitution der Membranproteine in die Lipid-Doppelschicht	37
2.7.7	Reinigung des Cytochrom $ba_3$ synthetisiert in <i>H. salinarum</i> MPK40	37
2.8	Analytische Methoden	38
2.8.1	SDS-Gelelektrophorese	38
2.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentrationen	39

2.8.3	Präparation von Polyklonalen Antikörpern	39
2.8.4	Immunologische Nachweis nach Western Transfer	39
2.8.5	pH-Titration des SRIwt-His und SRI-link-tHtrl-His	40
2.9	Biophysikalische Methoden	40
2.9.1	Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie (ESR)	40
2.9.2	Laser-Blitzlicht-Absorptionsspektroskopie	51
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
3.1	Heterologe Expression des Cytochrom $ba_3$ in <i>H. salinarum</i>	57
3.1.1	Klonierungsstrategie des Cytochrom $ba_3$ für die Transformation von <i>H. salinarum</i>	57
3.1.2	Konstruktion der Expressionsvektoren	59
3.1.3	Transformation von <i>H. salinarum</i> MPK40	61
3.1.4	Genetische Charakterisierung der Transformanden	62
3.1.5	Synthese des Cytochrom $ba_3$ durch heterologe Expression in <i>H. salinarum</i>	65
3.1.6	Reinigung der Proteinkomplexe	66
3.1.7	Immunologischer Nachweis des Cytochrom $ba_3$	67
3.1.8	RT-PCR Analyse der Transformanden	69
3.2	Synthese und Charakterisierung des SRI und Htrl	72
3.2.1	Klonierung des SRI und tHtrl für die Syntehse in <i>E. coli</i>	72
3.2.2	Präparation des SRI und tHtrl	75
3.2.3	Klonierung und Präparation des SRI-link-tHtrl-His Komplexes	83
3.2.4	Rekonstitution von SRI in PM-Lipide und Präparation des tHtrl-His	87
3.2.5	pH-Titration des SRI	89
3.2.6	Untersuchung des Photozyklus des SRI	94
3.2.7	ESR-Messungen der SRI-Mutanten	109
3.2.8	Leistungssättigungsmessungen	121
3.2.9	Lichtinduzierte ESR-Differenzspektroskopie	122
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>130</b>
4.1	Heterologe Expression der Cytochrom Oxidase $ba_3$ aus <i>N. pharaonis</i>	131
4.2	Untersuchung des SRI und der Wechselwirkung mit dem Transducer Htrl	133
4.2.1	Charakterisierung des SRIwt-His	133
4.2.2	Photozyklus des SRIwt-His	137
4.2.3	Topographie des SRI im zytoplasmatischen Bereich der Helices F und G	144
4.2.4	Expression des SRI im Komplex mit dem verkürzten Transducer tHtrl	147
4.2.5	Identifizierung der Wechselwirkung des SRI mit Htrl	150
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>154</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>157</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>169</b>

## Abkürzungen

Abb	Abbildung
bp	Basenpaar
CrOx	Kaliumtrioxalatochromat (III), $K_3[Cr(C_2O_4)_3] \cdot H_2O$
DM	N-Dodecylmaltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspin-Resonanz
<i>H. salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
Htr	halobakterielles Transducer Protein
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilo-Dalton
MES	2-Morpholinethansulfonsäure
MCP	„methyl-accepting chemotaxis protein“
MTSSL	(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat
mRNA	messenger-RNA
<i>N. pharaonis</i>	<i>Natronobacterium pharaonis</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (“open reading frame“)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pHtrII	<i>pharaonis</i> Transducer des sensorischen Rhodopsin II
pSRII	<i>pharaonis</i> Sensor-Rhodopsin II
rbs	ribosomale Bindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRI	Sensor-Rhodopsin I aus <i>H. salinarum</i>
SRII	Sensor-Rhodopsin II aus <i>H. salinarum</i>
tHtrI	verkürzter („truncated“) halobakterieller Transducer I
TM	transmembrane Helix
Upm	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
wt	Wildtyp
II	Zugänglichkeitsparameter
$\lambda$	Wellenlänge
$\tau_{1/2}$	Halbwertszeit

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

## 1. Einleitung

François Jacob gab in seinem Buch „*The Logic of Life*“ die wohl kürzeste und prägnanteste Definition für Leben: „*Life is the flow of energy, matter and information*“.

Alle lebende Organismen benötigen Energie für eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen. Im Laufe der Evolution haben sich, entsprechend den zur Verfügung stehenden unterschiedlichen Energiequellen, verschiedene Mechanismen der Energiegewinnung differenziert. Die Effizienz dieser Prozesse ist hierbei entscheidend für die Überlebensfähigkeit einer Spezies. Der Ursprung zellulären Lebens ist eng verknüpft mit der Entstehung von Mechanismen zur Weiterleitung der Energie zwischen exergonischen und endergonischen Prozessen und der Entwicklung von transienten und langlebigen Energiespeichern. Das Adenosintriphosphat (ATP) wird hierbei als universeller Energieträger in Form chemischer Energie von allen Lebewesen verwandt.

Zur Synthese des ATP dienen neben der Substratkettenphosphorylierung die oxidative Phosphorylierung, welche eng mit den Elektronentransportketten verknüpft ist, und die lichtgetriebene Photophosphorylierung. Die anaerobe ATP-Synthese, wie beispielsweise der Glucoseabbau während der Gärung, ist wahrscheinlich die phylogenetisch älteste Form, da sie auch unter den sauerstoffarmen Bedingungen der Uratmosphäre möglich war. Erst durch die Entwicklung der Photosynthese änderten sich Bedingungen auf der Erde und Sauerstoff reicherte sich in der Atmosphäre an (Blankenship, 1992; Knoll, 1992). Dies ermöglichte die Entstehung der aeroben Respiration, in der als Endakzeptor der Elektronentransportkette Sauerstoff fungiert.

Die durch die Atmungskette vermittelte Oxidation energiereicher Verbindungen durch Sauerstoff freiwerdende Energie wird in Form eines elektrochemischen Gradienten gespeichert. Gemäß der chemiosmotischen Hypothese von Mitchell (1961) setzt sich dieser Gradient ( $\Delta m_H^+$ ) bzw. die protonenmotorische Kraft ( $p$ ) aus dem Membranpotential ( $\psi$ ) und einem pH-Gradienten zwischen dem äußeren und inneren Milieu zusammen:

$$\Delta p = \Delta m_H^+ / F = \Delta \psi - \frac{RT}{F} \Delta pH$$

F: Faraday-Konstante; R: Gaskonstante;  $\Delta pH$ : Differenz der H<sup>+</sup>-Konzentration innen und außen

Die Elektronentransportkette vermittelt hierbei nicht nur die Ladungstrennung über die Membran, sondern transportiert aktiv Protonen. Im Zuge der Photophosphorylierung tragen lichtgetriebene Ionenpumpen wie z.B. das Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* analog zum Aufbau des elektrochemischen Gradienten bei.

Aerob lebende Organismen finden sich in allen drei Reichen, den Eubakterien, Eukaryonten und Archaea. Die Klassifizierung der *Archaea* als eine eigene Domäne basiert vornehmlich auf molekularen Untersuchungen der Homologie ribosomaler 16S RNA, die deutliche Unterschiede zu denen der Eukaryonten und Eubakterien zeigen (Woese, 1987). Die Archaeen sind zytologisch den Prokaryonten zuzuordnen, weisen jedoch einige Strukturmerkmale auf, die sie von den Eubakterien unterscheiden. So besitzen Archäebakterien Zellwandlipide in Form von Glycerinethern, die vermutlich eine Adaptation an extreme Standortfaktoren darstellen (Woese, 1987).

Die Archaeen werden in drei Gruppen eingeteilt, basierend auf phänotypischen Eigenschaften. Allen Vertretern ist jedoch die Besiedelung extremer ökologischer Nischen gemein. Neben der Gruppe der chemolithotrophen methanogenen Bakterien, die zur Energiegewinnung Kohlenmonoxid zu Methan reduzieren (Balch et al.; 1979), sind die schwefelabhängigen, thermophilen bzw. thermoacidophilen und die halophilen Bakterien bekannt (Stetter, 1985; Tindall & Trüper, 1986). Letztere sind z.B. im Toten Meer oder in Salinen mit einem Salzgehalt von 1,5 – 4,5 M NaCl als Wachstumsoptimum zu finden. In der Gruppe der halophilen Archaeen ist besonders die Familie der *Halobacteriaceae*, zu denen auch das *Halobakterium salinarum* zählt, eingehend untersucht (Übersicht: Skulachev, 1993).

Das *Halobakterium salinarum* besitzt z.B. als Adaptation an den zum Teil niedrigen Sauerstoffgehalt in seinem natürlichen Habitat zwei lichtgetriebene Ionenpumpen in seiner Zellmembran, die zur Energiekonversion durch Photophosphorylierung beitragen. Das Bakteriorhodopsin (BR) pumpt hierbei Protonen in den extrazellulären Raum, deren Rückstrom durch die ATP-Synthase zur ATP-Synthese verwendet wird (Oesterhelt & Stoeckenius, 1973). Die zweite Ionenpumpe, das Halorhodopsin (HR), pumpt Chloridionen inwärts (Mukohata et al., 1981). Zwei sensorische Rhodopsine (SRI und SRII) vermitteln hierbei die lichtgesteuerte Schwimmbewegung des Bakteriums (Phototaxis) für eine optimale Belichtung in einem Wellenlängenbereich von 500 – 600 nm (Bogomolni & Spudich, 1982; Takahashi, 1985). Hierauf wird im zweiten Teil dieser Arbeit näher eingegangen.

Ein weiterer Vertreter der Familie der *Halobacteriaceae*, das haloalkaliphile *Natronobakterium pharaonis* wirft bezüglich seiner bioenergetischen Situation hinsichtlich der Allgemeingültigkeit der Mitchell-Hypothese zahlreiche Fragen auf. Das Wachstumsoptimum dieses Vertreters der *Halobacteriaceae*, der erstmals 1982 aus dem Wadi Natrun in Ägypten isoliert wurde (Soliman & Trüper, 1982), liegt bei 45°C, 3,5 M NaCl und pH 8.5 – 9.0. Das Zytosol ist hingegen um 1.7 pH Einheiten saurer als das umgebende Milieu. Der daraus resultierende inverse pH-Gradient führt gemäß der Mitchell-Hypothese zu einem niedrigeren elektrochemischen Potential.

Es wird vermutet, daß diese bioenergetisch ungünstige Situation durch eine hohe Dichte an Redoxkomponenten der Elektronentransportkette in der Zellmembran ähnlich wie in alkaliphilen Bakterien kompensiert wird (Lewis et al., 1980). Die Untersuchung einer Redoxkomponente, dem Cytochrom  $ba_3$ , der Atmungskette des *Natronobakterium pharaonis* ist Teil dieser Arbeit. Im folgenden soll zunächst der Aufbau der Elektronentransportkette vorgestellt und anschließend die speziellen Eigenschaften dieser Komponente erläutert werden.

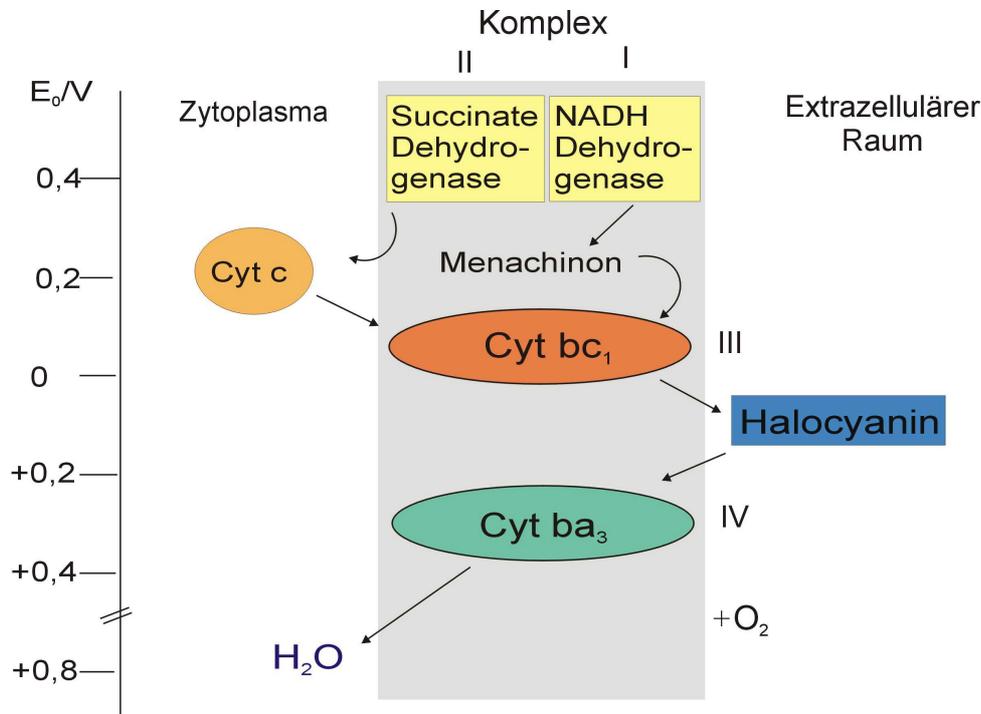
### 1.1 Aufbau der Elektronentransportkette des *N. pharaonis*

Basierend auf Untersuchungen der Elektronentransportkette aus Mitochondrien und Purpurbakterien lassen sich vier Proteinkomplexe als ubiquitäre Bestandteile der Atmungskette identifizieren. Eine charakteristische Eigenschaft dieser transmembranen Proteine ist die Komplexierung prosthetischer Gruppen wie Flavine, Eisen-Schwefel-Zentren, Häm-Gruppen sowie Kupferatomen. Sie vermitteln die Übertragung der aus Oxidationsprozessen freiwerdenden Elektronen an den terminalen Akzeptor Sauerstoff.

Diese Reduktionsäquivalente werden in den Komplexen I und II, der NADH- und der Succinat-Dehydrogenase, durch die Umsetzung von NADH und  $FDH_2$  generiert. Über frei in der Membran diffundierende Chinone (Ubichinon im Falle der Mitochondrien) werden die Elektronen auf den Komplex III, dem sogenannten Cytochrom  $bc_1$  Komplex, übertragen. Das reduzierte Cytochrom  $bc_1$  wird dann durch ein meist lösliches Cytochrom c reoxidiert, welches schließlich die Reduktionsäquivalente an die terminale Oxidase, dem Komplex IV, abgibt. Hier wird als finaler Schritt in der aeroben Respirationskette Sauerstoff unter Bildung von Wasser reduziert (Stryer, 1991). In Abweichung zu diesem klassischen Konzept existieren in Archaeen sogenannte Superkomplexe, eine Fusion der membranständigen Proteinkomplexe mit den mobilen Elektronenüberträgern, in zum Teil ungewöhnlicher Zusammensetzung (Lübben, 1995).

Das alkaliphile *Natronobakterium pharaonis* als Vertreter der Familie der *Halobacteriaceae* wird als strikter Aerobier beschrieben. B. Scharf gelang es erstmals mehrere Proteine der Elektronentransportkette zu reinigen und zu charakterisieren (Scharf, 1992). Zusammen mit detaillierten Untersuchungen der Bioenergetik dieses Organismus wurden von R. Wittenberg (1995; Scharf et al., 1997) die Redoxpotentiale der an der Elektronentransportkette beteiligten Komponenten bestimmt.

Auf der Basis dieser biochemischen Daten konnte von Wittenberg folgendes Schema der Elektronentransportkette in *N. pharaonis* entwickelt werden:



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der postulierten Sequenz des Elektronentransfers in der Atmungskette von *Natronobakterium pharaonis* (Wittenberg, 1995)

Die Analyse der bioenergetischen Parameter ergab ein sehr negatives Membranpotential von  $-280$  mV. Hierdurch ist das alkaliphile *N. pharaonis*, trotz des aus einem neutralen Cytoplasma resultierenden inversen pH-Gradienten, zur ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung befähigt.

Analog zur mitochondrialen Atmungskette dient dem *Natronobakterium pharaonis* eine NADH- und SDH-Dehydrogenase als primärer Elektronenakzeptor. Von hieraus werden die Elektronen vermutlich auf ein Menachinon, vornehmlich in Archaeen zu finden, oder ein lösliches Cytochrom c übertragen (s. Abb.1). Das sich anschließende Cytochrom  $bc_1$ , Komplex III, konnte bisher nur partiell proteinchemisch gereinigt werden (Souquet, 1993; Henrich, 1995). Versuche zur Ermittlung der Protein- bzw. DNA-Sequenz schlugen bisher fehl. Somit fehlt letztendlich der gesicherte Nachweis des erstmals in Archaeen gefundenen Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes (Scharf et al., 1997; Übersicht: Lübben, 1995). Im Unterschied zur mitochondrialen Elektronentransportkette werden im folgenden die Reduktionsäquivalente vermutlich nicht auf ein Cytochrom c, sondern auf ein kleines blaues Kupferprotein, das Halocyanin, transferiert (Scharf et al., 1993). Die Sequenz des Halocyanins (berechnete Masse 15456 Da) sowie seine Verankerung über eine Lipidmodifikation in der Membran konnten von Mattar et al. (1994) ermittelt werden.

Seine Funktion als Elektronenüberträger auf die terminale Oxidase Cytochrom  $ba_3$  konnte bislang nur basierend auf dem positiven Redoxpotential von +223 mV (pH 7.0; Brischwein et al., 1993) vermutet werden.

Das Cytochrom  $ba_3$ , Komplex IV, reduziert im letzten Schritt der Atmungskette Sauerstoff unter Bildung von Wasser. Aufgrund seiner Reaktivität gegenüber Kohlenmonoxid (CO) konnte das Cytochrom  $ba_3$  im Zusammenhang mit einer Analyse der prosthetischen Gruppen als terminale Cytochrom c Oxidase eingeordnet werden (Scharf et al., 1996). S. Mattar (1996) gelang es die DNA-Sequenz zu ermitteln und nachzuweisen, daß es sich um einen Multienzymkomplex bestehend aus vier Untereinheiten handelt. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für diese Arbeit und werden im folgenden näher beschrieben.

## 1.2 Cytochrom $ba_3$ aus *N. pharaonis*

Cytochrom  $ba_3$  aus *Natronobacterium pharaonis* ist zu der heterologen Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidase zu zählen (Garcia-Horsman et al. 1994). Alle vier Untereinheiten des Proteinkomplexes werden in einem Operon kodiert und die einzelnen Gene in Form einer polycistronischen RNA mit überlappenden Start- und Stop-Codons transkribiert (S. Mattar, 1996). Die Zuordnung erfolgte anhand von Sequenzhomologien zu bekannten Cytochrom Oxidase, wie der mitochondrialen Oxidase und der Cytochrom  $aa_3$  Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*. Die aminoternale Sequenz der Untereinheiten I, II und III konnte über Edman-Abbau des partiell gereinigten Komplexes verifiziert werden (S. Mattar, 1996). Es ergeben sich rechnerisch folgende Molekulargewichte: 63,8 kDa Untereinheit I (UEI), 18,6 kDa UEII, 8,6 kDa UEIII und 5,9 kDa UEIV. Durch spektroskopische Untersuchungen konnten zwei prosthetische Gruppen der Cytochrom Oxidase identifiziert werden, ein sechsfach koordiniertes „low-spin“ Häm b und ein fünffach koordiniertes „high-spin“ Häm  $a_3$ . Auffällig war hierbei, daß das Häm a teilweise reduziert vorlag und auch elektrochemisch nicht oxidiert werden konnte. Als eine mögliche Erklärung wird eine Ligandierung mit einem Chloridion diskutiert (Mattar et al., 1997). Ob dies auch für den funktionellen Komplex in der Membran zutrifft, ist bislang ungeklärt.

In der Sequenzanalyse der Untereinheit I, die allgemein zu der am stärksten konservierten Komponente der Atmungskette zählt, konnten alle sechs konservierten Histidine als Liganden der Häm-Gruppen und des Kupfer( $Cu_B$ )-Zentrums identifiziert werden. Das sechsfach koordinierte „low-spin“ Häm b wird hierbei durch zwei Histidine ligandiert und das fünffach koordinierte „high-spin“ Häm  $a_3$  durch ein Histidin. Letzteres bildet zusammen mit dem  $Cu_B$  das binukleare Zentrum und besitzt die Fähigkeit Sauerstoff zu binden, welches durch den Index 3 angezeigt wird.

Die Zuordnung der Liganden erfolgte auf der Basis der Kristallstruktur der Cytochrom Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* (Iwata et al., 1995). Die Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte and Doolittle (GCG, 1982) der Aminosäuresequenz der Untereinheit I des Cytochrom  $ba_3$  ergab 13 potentielle transmembrane Helices. Der Aufbau aus mindestens 12 transmembranen Bereichen dieser Untereinheit ist als konserviertes Strukturmerkmal für Cytochrom Oxidasen beschrieben (Übersicht: Calhoun et al., 1994).

Analog zur Untereinheit I zeigt auch Untereinheit II eine hohe Sequenzidentität mit der  $ba_3$ -Cytochrom Oxidase aus *Thermus thermophilus* (Keighly et al., 1995) und dem SoxABCD, einer Chinol Oxidase, aus *S. acidocaldarius* (Lübber et al., 1992). Beide Organismen zählen ebenfalls zu den Archaeen. Im Sequenzvergleich zu Oxidasen aus allen drei Reichen lassen sich auch in der Untereinheit II aus *N. pharaonis* die fünf hochkonservierten Aminosäuren (2 Cysteine, 2 Histidine und 1 Methionin), die als Liganden für das  $Cu_A$ -Zentrum dienen, identifizieren. In spektroskopischen Analysen konnte am Beispiel der Cytochrom c Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* gezeigt werden, daß es sich bei dem  $Cu_A$ -Zentrum um ein binukleares Zentrum aus zwei Kupferatomen in einem „mixed-valence“-Zustand ( $Cu^{1.5} - Cu^{1.5}$ ) handelt (Blackburn et al., 1994; von Wachenfeld et al., 1994). Das  $Cu_A$ -Zentrum ist in der C-terminalen periplasmatischen bzw. extrazellulären Domäne der Untereinheit II lokalisiert und repräsentiert den primären Akzeptor der Elektronen, die vom Redoxpartner einem Cytochrom c bzw. hier dem Halocyanin übertragen werden (Hill, 1994). Dieses Strukturmerkmal fehlt in den vergleichbaren Chinol-Oxidasen, die direkt mit Chinol wechselwirken ohne ein Cytochrom c als Vermittler, und ist somit indikativ für Cytochrom c Oxidasen (Übersicht: Trumpower & Gennis, 1994).

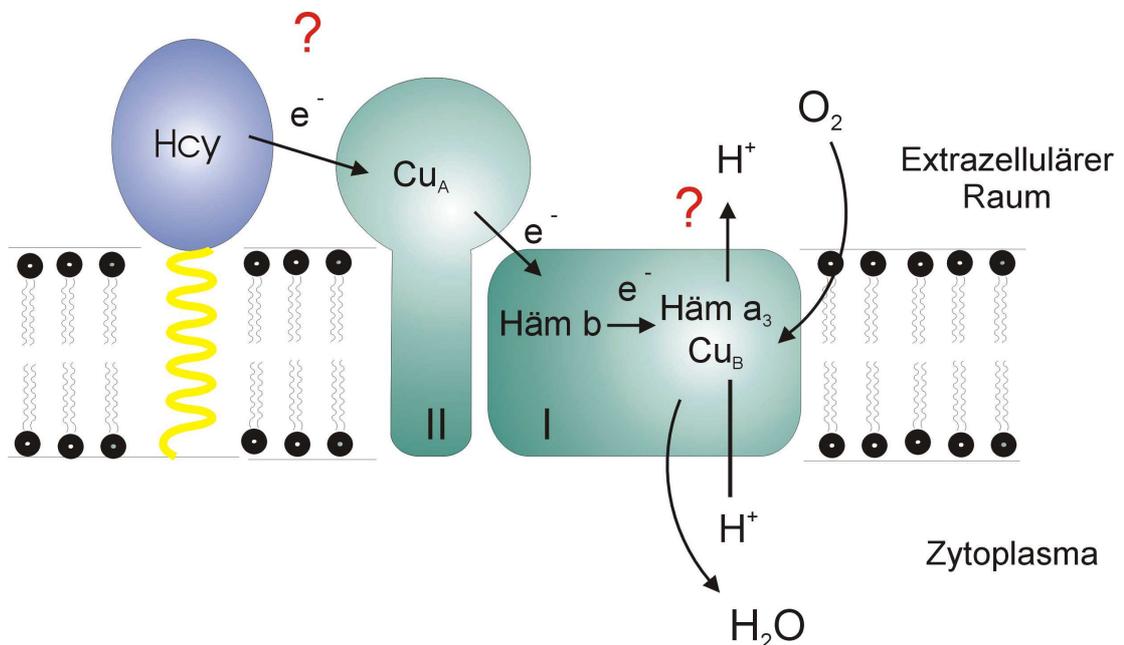
Die Untereinheiten III und IV zeigen hingegen keine Homologien zu bekannten Sequenzen. Es werden weiterhin keine Aminosäuren für eine Ligandierung von prostethischen Gruppen gefunden. Ob beide Proteine zusammen möglicherweise eine typische Untereinheit III mitochondrialer und eubakterieller Oxidasen ersetzen, ist ebenso wie deren Funktion unklar. Eine „chaperonartige“ Funktion der Untereinheiten III bei der Faltung und Komplexierung der Proteine des Komplexes wird diskutiert (Lübber, persönliche Mitteilung).

Für die Redox-Funktion der Cytochrom Oxidase in der Atmungskette ist jedoch der „Kernkomplex“ bestehend aus den beiden größten Untereinheiten I und II ausreichend, wie für das Cytochrom  $aa_3$  aus *P. denitrificans* gezeigt wurde (Hendler et al., 1991).

Die Funktion der Cytochrom c Oxidasen im letzten Schritt der aeroben Respiration ist die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Allgemein läßt sich folgende Reaktionsgleichung aufstellen:



Die Cytochrom Oxidase trägt somit zum Aufbau der protonenmotorischen Kraft nicht nur durch Ladungstrennung über die Membran und damit verbunden dem Verbrauch zweier „chemischer“ Protonen auf der cytoplasmatischen Seite pro gebildeten Molekül  $H_2O$  bei, sondern auch durch aktives Pumpen von zwei weiteren „elektrogenen“ Protonen in die äußere Matrix. Diese Protonentranslokation ist eine typische Fähigkeit der Cytochrom Oxidasen. Die Bestimmung der Kristallstrukturen des Cytochrom  $aa_3$  aus *P. denitrificans* und der mitochondrialen Oxidase aus Rinderherz (Iwata et al., 1995; Tsukihara et al., 1996) trug maßgeblich zur Klärung des Mechanismus der Kopplung von Elektronentransfer und Protonentransport bei. Der Fluß der Elektronen erfolgt vom  $Cu_A$ -Zentrum in Untereinheit II, dem primären Elektronenakzeptor, über das „low-spin“ Häm zum binuklearen Zentrum in Untereinheit I (Scott, 1995).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Untereinheiten des Cytochrom  $ba_3$  aus *N. pharaonis*. Eingezeichnet sind der postulierte Transfer der Elektronen über die prostetischen Gruppen und die damit verbundenen Protonentranslokationen.

Iwata et al. gelang 1995 erstmals am Beispiel der Cytochrom Oxidase aus *P. denitrificans* die Lokalisierung der Strukturen für die Weiterleitung der im Laufe der Reaktion verbrauchten bzw. gepumpten Protonen. Demzufolge werden zwei getrennte Kanäle in Untereinheit I, der D-Kanal und der K-Kanal, für den Transport der gepumpten (vektoriellen) bzw. verbrauchten (skalaren) Protonen postuliert (vgl. auch Thomas et al., 1994).

Der D-Kanal ist nach einem konservierten Asp 124 (Numerierung nach Cytochrom  $aa_3$  aus *P. denitrificans*) an der Eintrittsstelle für den Transport der vektoriellen Protonen benannt. Desweiteren sind eine Glutaminsäure (274), lokalisiert am Ende des Protonen-

aufnahmeweges, und ein Histidin (325), dem von Wikström et al. (1994) eine Schalterfunktion im sogenannten Histidinzyklus zugeschrieben wird, konserviert und werden als essentiell für eine Pumpfunktion diskutiert. (Übersicht: Mills & Ferguson-Miller, 1998)

Der K-Kanal ist nach einem konservierten Lysin (354) benannt und dient dem Transport der skalaren Protonen. In beiden Fällen werden die Protonen von der cytoplasmatischen Seite zum binuklearen Zentrum bzw. zu dem benachbarten Histidin transferiert (Tsukihara et al., 1995; Ostermeier et al., 1997).

Ein Vergleich der Sequenz der Untereinheit I des Cytochrom  $ba_3$  aus *N. pharaonis* zeigt, daß die essentiellen Aminosäuren im K-Kanal respektive das Lysin auch hier konserviert sind bzw. Abweichungen durch ein funktionell komplementäres Netzwerk ausgeglichen werden. Im Bereich des D-Kanals sind jedoch eine Reihe essentieller Aminosäuren gegen funktionell vermutlich inaktive ausgetauscht, so daß hier wahrscheinlich keine Protonen aktiv gepumpt werden können. Ein vergleichbarer Austausch wird ebenfalls für die  $ba_3$ -Cytochrom Oxidase aus *Th. thermophilus* und dem SoxB-Komplex aus *S. acidocaldarius* beobachtet (Keightly et al., 1995; Lübben et al., 1992). Für beide Proteinkomplexe wurde analog ein Verlust der Protonenpumpaktivität postuliert. Kannt et al. (1998) konnten jedoch für das Cytochrom  $ba_3$  aus *Th. thermophilus* zeigen, daß im rekonstituierten Zustand Protonen im substöchiometrischen Maßstab ( $0,5 \text{ H}^+ / \text{e}^-$ ) gepumpt werden. Bisher konnten die essentiellen Aminosäuren dieses alternativen Protonentransportweges bzw. -mechanismus nicht identifiziert werden.

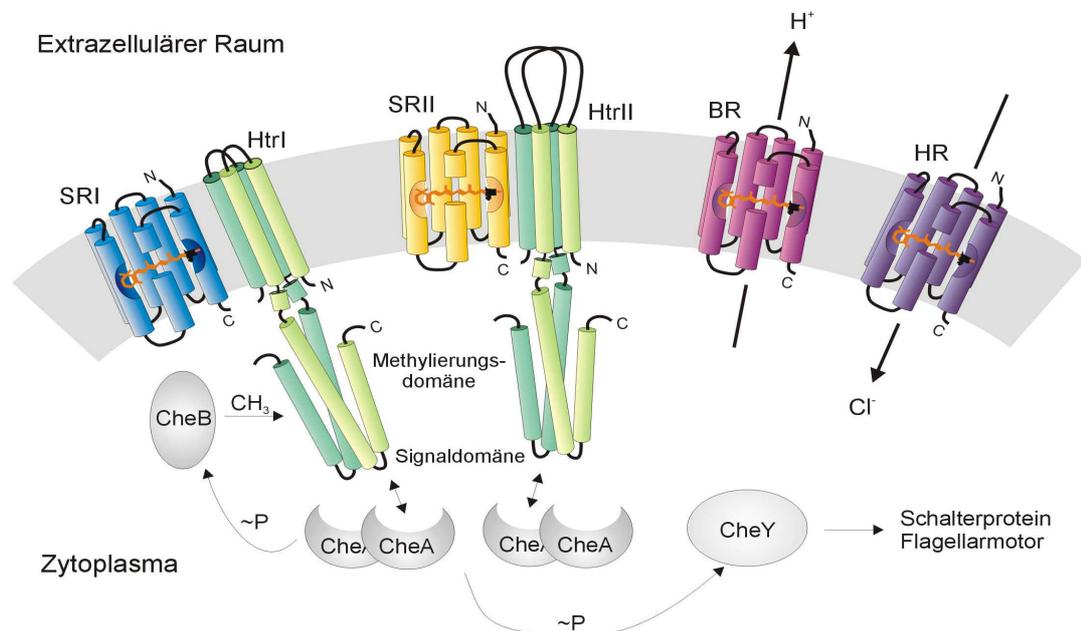
Alle hier dargestellten Erkenntnisse bezüglich der Cytochrom oxidase aus *N. pharaonis* beruhen lediglich auf Sequenzstudien. Trotz Modifikation des Reinigungsverfahrens (Mattar, 1996) ist es bisher nicht gelungen den vollständigen und funktionellen Komplex aus dem nativen Organismus zu isolieren.

Durch eine heterologe Expression mit einer anschließenden Reinigung durch Affinitätschromatographie sollte es möglich sein den funktionellen Komplex zu isolieren. Insbesondere in Bezug auf eine möglicherweise fehlende Protonenpumpaktivität böte dieses Verfahren die Möglichkeit für Mutationsstudien. Am funktionellen Komplex könnte der Nachweis erbracht werden, daß das Halocyanin hier anstelle des sonst üblichen Cytochrom c als Elektronendonator fungiert. Eine kinetische Charakterisierung der verschiedenen Redoxprozesse würde sich anschließen.

### 1.3 Photophosphorylierung

In der Photophosphorylierung wird die universell verfügbare Energie, das Sonnenlicht, zur Erzeugung der protonenmotorischen Kraft und damit zur Synthese von ATP genutzt. Die wohl bekannteste Form stellt die Photosynthese in Pflanzen dar. In den Photosystemen I und II wird das Licht von Chlorophyllmolekülen absorbiert und in einem komplexen Reaktionssystem unter Beteiligung einer Vielzahl von Proteinen letztendlich in Form eines transmembranen Protonengradienten gespeichert. Der Aufbau der Photosysteme zeigt in vieler Hinsicht eine hohe Ähnlichkeit zur Elektronentransportkette in Mitochondrien (Stryer, 1991).

In Halobakterien findet sich ein sehr viel einfacher strukturiertes System zur lichtgetriebenen Energiekonversion. Am Beispiel des *Halobakterium salinarum* soll dies im folgenden erläutert werden. In der Membran dieses Archaeobakteriums sind 4 Retinalproteine lokalisiert, die beiden Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) sowie zwei sensorische Rhodopsine (SRI und SRII) im Komplex mit den entsprechenden halobakteriellen Transducer Proteinen (HtrI und HtrII) (Abb. 3) (Übersicht: Oesterhelt, 1998). Die Bezeichnung dieser Proteine begründet sich in der großen Ähnlichkeit zu Rhodopsinen aus Vertebraten.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Funktion der vier Rhodopsine aus *H. salinarum*.

Die beiden Ionenpumpen BR und HR dienen zur Energiekonversion von Licht in einem Protonen bzw. Chloridionengradienten. Die sensorischen Rhodopsine SRI und SRII fungieren als Photorezeptoren und dirigieren das Bakterium hin zu optimalen Lichtbedingungen. Der Lichtreiz wird hierbei von den SR's auf die Htr-Proteine, als Homodimer gebunden, übertragen und das Signal über die zytoplasmatische Domäne an die zwei Komponenten Signalkaskade bestehend den Histidinkinasen CheA und CheY weitergeleitet. Der Phosphoregulator CheY transferiert dann die Information auf den Flagellarmotor. Über die Methylierungsdomäne der Htr's wird in Interaktion mit der Kinase CheB die Adaptation reguliert. (Abb. in Anlehnung an Spudich, 1998)

Das BR ( $\lambda_{\max}$ : 570 nm) pumpt, durch Licht aktiviert, Protonen vom Zytoplasma in den extrazellulären Raum. Das HR ( $\lambda_{\max}$ : 578 nm) stellt hingegen eine einwärts gerichtete Chlorid-Ionenpumpe dar. Beide Ionenpumpen tragen somit unter Lichteinfall zum Aufbau des elektrochemischen Gradienten bei und befähigen das *Halobacterium salinarum* zur ATP-Synthese. Die beiden sensorischen Rhodopsine dienen als Photorezeptoren und steuern die lichtgetriebene Schwimmbewegung des Bakteriums (Phototaxis). Dieser Mechanismus kann als primitiver Sehprozeß verstanden werden. Licht als Energiequelle zu nutzen, stellt das Bakterium vor die Aufgabe die optimalen Lichtbedingungen für die Ionenpumpen zu suchen (Licht der Wellenlänge >500 nm) jedoch UV-Licht zu meiden, da es photoinduzierte Schäden an der DNA verursachen kann.

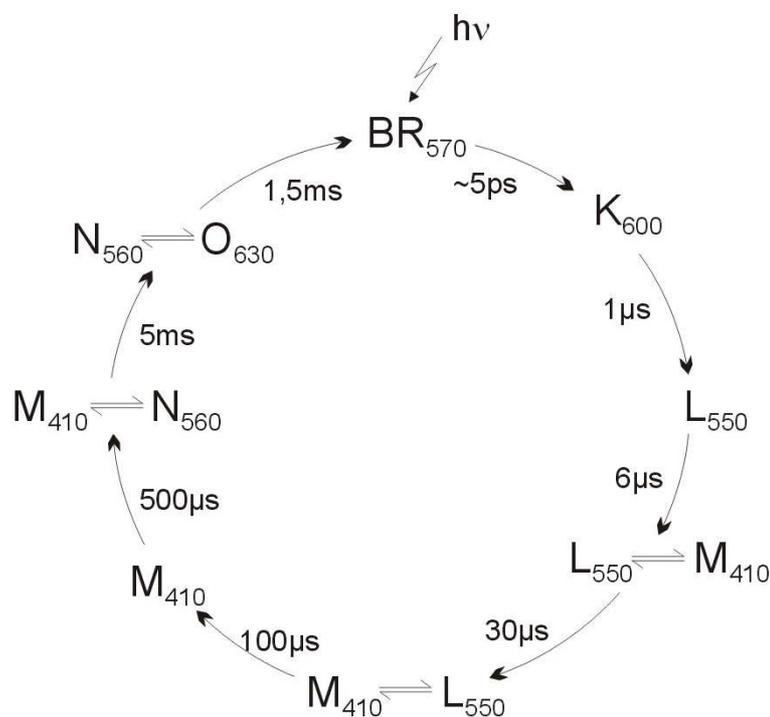
Alle vier Rhodopsine weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf und sind in einer Art Bündel bestehend aus 7 transmembranen Helices aufgebaut. Als Chromophor ist *all-trans*-Retinal in einer weitgehend konservierten Bindungstasche an einen Lysin-Rest über eine protonierte Schiff'sche Base in Helix G (IIV) gebunden (Henderson et al., 1990). Nach Lichtinduktion durchlaufen die Rhodopsine einen Reaktionszyklus mit sequentiell über Absorptionsspektroskopie differenzierbaren Intermediaten (Photozyklus). Rhodopsine sind als photoaktive Pigmente in allen drei Reichen vertreten. Sie dienen als einfaches Modell für 7-Helix-Rezeptoren, die in vielen sensorischen und hormonellen Signalkaskaden eine Schlüsselrolle spielen.

BR steht seit seiner Entdeckung 1970 durch Oesterhelt und Stoeckenius im Zentrum intensiver Forschung. Die einzelnen Schritte der sequentiellen Photozyklusreaktion bestehend aus Isomerisierungsreaktionen des Retinals und Protonentransferschritten sind nunmehr gut verstanden. Ein Vergleich der Photozyklen der anderen Pigmente mit dem des BR zeigt, daß das für BR aufgestellte Schema mit einigen Variationen Allgemeingültigkeit besitzt. Während des Photozyklus durchlaufen die Rhodopsine distinkte Photointermediate mit unterschiedlichen Absorptionseigenschaften. Die Laser-Blitzlicht-Spektroskopie erwies sich als geeignete Methode zur spektralen und kinetischen Charakterisierung der einzelnen Reaktionsschritte. Mit dieser Methode konnten Lozier et al. (1975) erstmals ein Modell des BR-Photozyklus aufstellen. Demnach durchläuft das BR in einer Sequenz irreversibler Folgereaktionen die anhand ihrer Absorptionsspektren charakterisierten Intermediate K, L, M, N und O, bevor es in den Grundzustand zurückkehrt.

Spätere Untersuchungen zeigen, daß BR in seiner thermischen Relaxation nicht nur diese fünf spektralen Spezies sondern mindestens sieben Intermediate zeigt. Das von Lozier et al. entwickelte Modell wurde daher durch die Einführung von Parallel-, Verzweigungs- und Gleichgewichtsreaktionen modifiziert (Übersicht: Lanyi & Varo, 1995).

Chizov et al. (1996) postulierten schnelle Quasigleichgewichte zwischen den spektralen Intermediaten und kehrten damit formal zu dem simplen sequentiellen Reaktionsschema zurück (Abb. 4).

Mutationsstudien und biophysikalische Untersuchungen ermöglichten eine Zuordnung der Protonentransferschritte zu den entsprechenden Photointermediaten („Black-Lipid-Membrane“-Experimente: Bamberg, 1979; FTIR-Experimente: Engelhard et al., 1985; Gerwert et al., 1989; Untersuchung an *Xenopus* Oocyten: Nagel et al., 1995, 1998). Aktuelle hochauflösende Kristallstrukturen des BR und seiner Intermediate verifizieren diese Erkenntnisse (Luecke et al., 1999; Submarian & Henderson, 2000).



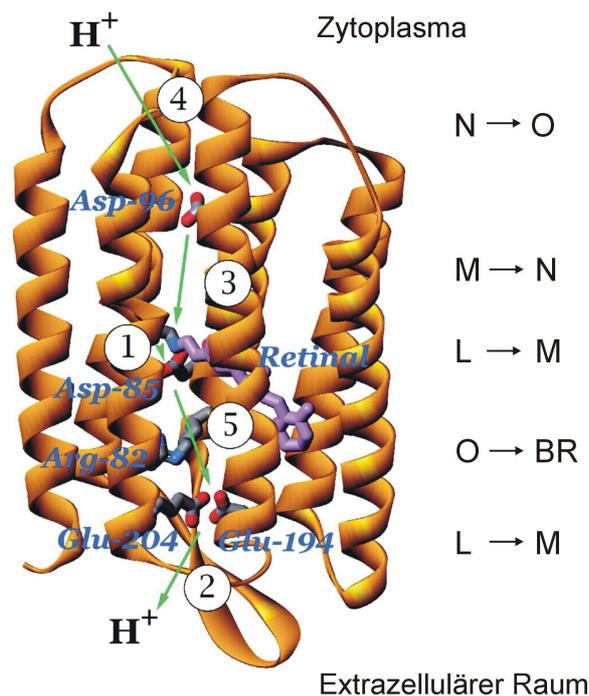
**Abb. 4:** Schema des BR-Photozyklus auf der Basis sequentieller irreversibler Folgereaktionen. K, L, M, N und O repräsentieren die spektroskopisch definierten Intermediate, die Absorptionsmaxima sind als Indices angegeben. Die Quasigleichgewichte zwischen M-L, M-N und O sind eingezeichnet. Die Zerfallsraten der Intermediate wurden bei 20°C ermittelt.

Im initialen Reaktionsschritt des Photozyklus induziert die Absorption eines Photons die Isomerisierung der *all-trans*-Konfiguration zu *13-cis* des Retinals (K) innerhalb weniger Picosekunden (Dobler et al., 1988). Innerhalb einer Mikrosekunde ändert sich daraufhin die Konformation des Proteins (K→L Übergang) (Braiman & Mathies, 1982), wodurch die Protonenaffinitäten verschiedener Aminosäurereste modifiziert werden. Beim Übergang zum M-Intermediat gibt die Schiffbase (SB) ihr Proton an das Aspartat 85 (Asp85), lokalisiert im extrazellulären Protonenkanal, ab (Butt et al., 1988; Braiman et al., 1989).

Dieser Reaktionsschritt ist durch die Änderung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes an die Abgabe eines Protons von der Glutaminsäure 204 an das Medium gekoppelt (Richter et al., 1994; Balashov et al., 1997).

Die Schiffbase reorientiert sich nun im späten M-Zustand und ist anschließend vom zytoplasmatischen Kanal zugänglich. Durch ESR-Untersuchungen und Kristallstrukturen der Intermediate konnte diese Vermutung bestätigt werden (Luecke et al., 1999; Submarian & Henderson, 2000; Steinhoff et al., 1994; Rink et al. 1997, 2000). So wurde eine Auswärtsbewegung der Helix F um 3,5 Å nachgewiesen, die zur Öffnung des zytoplasmatischen Teils des Protonenkanals führt.

Im nächsten Schritt des Photozyklus wird ein Proton vom Asp96 auf die Schiffbase übertragen (M→N) (Butt et al., 1989) und schließlich reisomerisiert das Retinal zur *all-trans* Konfiguration (N→O). Das BR relaxiert unter Konformationsänderung in den Grundzustand (O→BR), wobei Asp96 und Asp85 ihren ursprünglichen Protonierungszustand regenerieren (Dioumaev et al., 1998). Im Verlauf dieses Reaktionszyklus wird ein Proton vom Zytoplasma in den extrazellulären Raum gepumpt.



**Abb. 5:** Strukturmodell des BR und schematische Abfolge der Protonentransferschritte.

Der Retinalchromophor ist in lila eingezeichnet. Die funktionell wichtigen Aminosäuren sind mit ihrer Position in der Aminosäurekette angegeben. Die Pfeile markieren die einzelnen Protonentransferschritte und die Numerierung entspricht der sequentiellen Abfolge im Photozyklus. Nebenstehend ist die Bezeichnung der jeweiligen Übergänge der Intermediate angegeben. (1) Deprotonierung der Schiffbase, Protonierung des Asp85 (L→M); (2) Protonenabgabe ans extrazelluläre Milieu (L→M); (3) Reprotonierung der Schiff-Base, Deprotonierung von Asp96 (M→N); (4) Reprotonierung von Asp96 ausgehend vom Zytoplasma (N→O); (5) Deprotonierung von Asp85, Reprotonierung der in der Protonenabgabe involvierten Aminosäuren. Modifiziert nach Luecke et al. (1999).

Die sensorischen Rhodopsine durchlaufen in ihren Photozyklen prinzipiell dasselbe Reaktionsschema, jedoch sind die verschiedenen Intermediate weit weniger untersucht (Bogomolni et al., 1987; Scharf et al., 1992). Insgesamt ist ihr Photozyklus im Vergleich zu dem des BR ca. 100-fach verlangsamt. Mutationstudien am BR zeigten, daß die Carboxylgruppen der Aminosäuren Glu194, Glu204 und Asp96 essentiell sind, jedoch ein Austausch gegen nicht funktionelle Aminosäuren nicht zum vollständigen Verlust der Protonenpumpaktivität führt (Brown et al., 1996; Otto et al., 1990). Lediglich ein Austausch der Aminosäure Asp85 und des für die Bindung des Retinals verantwortlichen Lysin 216 inhibieren die Protonentransferreaktion (Otto et al., 1990; Sasaki et al., 2000). Ein Sequenzvergleich des SRI mit dem BR zeigt, daß die Aminosäuren Lysin (hier Lys205) und Asparaginsäure (hier Asp76) konserviert sind (Blanck et al., 1989). Die dem Asp96 komplementäre Aminosäure ist gegen ein neutrales Leucin (Leu84) ausgetauscht und wurde lange als Ursache für den stark verlangsamteten Zerfall des M-Intermediates diskutiert.

Fraglich ist somit ob das SRI Protonen pumpt und was es in seiner Funktion als Photosensor im Unterschied zu BR auszeichnet.

#### 1.4 Phototaxis in *H. salinarum*

Die phototaktische Aktivität des *Halobakterium salinarum* wird durch die beiden Photorezeptoren SRI und SRII bestimmt. Das SRI ( $\lambda_{\max}$ : 587 nm) vermittelt die photoattraktive Antwort auf Licht der Wellenlänge  $> 520$  nm (Bogomolni & Spudich, 1982) und gleichzeitig die photophobe Antwort auf Licht der Wellenlänge  $< 500$  nm. In einem zwei Photonenprozeß vermittelt das langlebige M-Intermediat des SRI ( $S_{373}$ ,  $\lambda_{\max}$ : 373 nm) in Gegenwart von orange-farbenen Hintergrundlicht auf Blau-Licht bzw. UV-Licht die photophobe Antwort (Spudich & Bogomolni, 1984). Die Bifunktionalität dieses Rezeptors in Bezug auf die Phototaxis ist einmalig unter den sensorischen Rhodopsinen.

Das SRII triggert die photophobe Antwort vornehmlich unter aeroben Bedingungen, unter denen BR und SRI nur schwach exprimiert werden und BR keine maßgebliche Rolle für die Energiekonversion spielt (Takahashi et al., 1990). Das HtrII fungiert zusätzlich über eine extrazelluläre Domäne als Chemorezeptor für Serin (Hou et al., 1998).

Unter stationären Bedingungen schaltet der Flagellarmotor des *H. salinarum* spontan alle 20 - 30 Sekunden zwischen einer Drehbewegung im Uhrzeigersinn und entgegen dem Uhrzeigersinn um und das Bakterium zeigt eine zufällige ungeordnete Schwimmbewegung (Marwan et al., 1991).

Ein attraktiver Reiz (z.B. orange-farbenes Licht) verringert die Schaltfrequenz des Flagellarmotors, welches zu einer Bewegung in Richtung des Lichtreizes führt. Analog

verkürzt ein abstoßender Reiz (z.B. Blaulicht) die Zeit zwischen zwei Schaltvorgängen und das Bakterium entfernt sich aus dem Bereich. Unter konstanten Lichtbedingungen findet Adaptation an den Reiz statt und das Bakterium kehrt zur ungeordneten Schwimmbewegung zurück (Marwan et al., 1995). Ändert sich jedoch die Reizstärke führt dies wiederum zur Deadaptation (Hildebrand & Dencher, 1975; Spudich & Stoeckenius, 1979).

Nach Absorption eines Photons durchlaufen die sensorischen Rhodopsine einen dem BR analogen Photozyklus, wobei der Zerfall der M-Intermediate stark verlangsamt ist. Als signalgebender Zustand dient daher vermutlich das M-Intermediat. Im Verlauf des Photozyklus wird das Signal an den komplexierten Transducer Htr weitergegeben (Spudich & Spudich, 1989; Yao & Spudich, 1992).

Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion vom SRI zum HtrI für das photophile bzw. photophobe Signal ist noch unklar. Es wird jedoch eine Bewegung einer Helix im Verlauf des Photozyklus analog zum BR als Trigger vermutet. Für den photophoben Rezeptor pSRII aus *N. pharaonis* konnte dieser Mechanismus von Wegener et al. (2000) nachgewiesen werden. Die Signalweiterleitung im Zytoplasma ist hingegen gut untersucht und erfolgt analog zur Chemotaxis in *E. coli* (Rudolph & Oesterhelt, 1995, 1996).

Die Htr-Proteine zeigen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu den Chemorezeptoren (MCP's) der Eubakterien wie z.B. dem Aspartatrezeptor (Tar) oder dem Serinrezeptor (Tsr) (Yao & Spudich, 1992; Übersicht eubakterielle Chemotaxis: Falke, 1997). Sie setzen sich aus zwei transmembranen Helices und einer ausgedehnten zytoplasmatischen Domäne zusammen. Insbesondere der zytoplasmatische Teil zeigt eine hohe Sequenzidentität zu den verwandten Chemorezeptoren in den als Methylierungsdomäne und Signaldomäne identifizierten Bereichen (Yao & Spudich, 1992; Yao et al., 1994).

Der Signaltransfer erfolgt über eine Wechselwirkung der Signaldomäne des Htr mit einer autokatalytischen Histidinkinase CheA (Yao et al., 1994; Rudolph & Oesterhelt, 1995). Diese phosphoryliert anschließend das Regulatorprotein CheY, welches dann an das Schalterprotein des Flagellarmotors binden kann und so die Schaltfrequenz kontrolliert (Rudolph et al., 1995). Die Adaptation an einen kontinuierlichen Reiz wird durch die Kinase CheB über Methylierung und Demethylierung der Methylierungsdomäne des Htr's geregelt (Marwan et al., 1995). Eine dem CheR aus *E. coli* homologe Histidinkinase, die ebenfalls in den Adaptionsmechanismus involviert ist, konnte bisher in *H. salinarum* nicht nachgewiesen werden (Rudolph & Oesterhelt, 1996). Eine Deletion der einzelnen Proteine führt zu einem vollständigen Verlust der phototaktischen und chemotaktischen Fähigkeit (Rudolph & Oesterhelt, 1996).

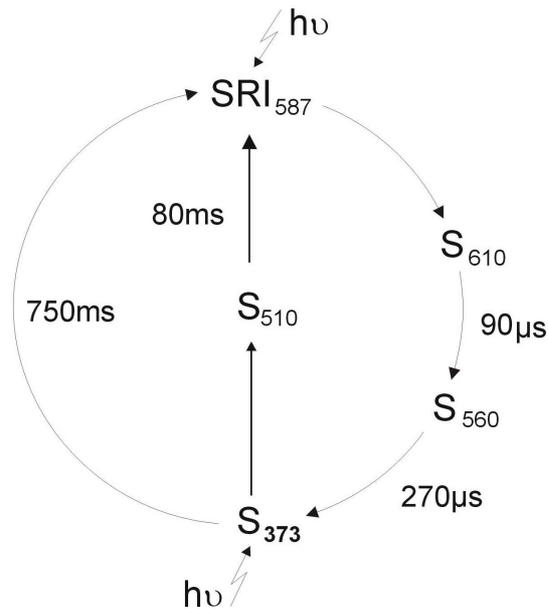
## 1.5 Sensorisches Rhodopsin I aus *H. salinarum*

Der Rezeptor-Transducer-Komplex ist insbesondere bezüglich seiner Bifunktionalität, der Steuerung der photophilen und photophoben Taxis, von besonderem Interesse. Zahlreiche biochemische und biophysikalische Untersuchungen wurden in den letzten Jahren an transducer-freien SRI und im Komplex mit Htrl durchgeführt um eine mögliche Protonenpumpaktivität nachzuweisen und die Wechselwirkung mit dem Transducer zu charakterisieren (Übersicht: Sasaki & Spudich, 2000). Der Mechanismus des Signaltransfers vom SRI auf das Htrl ist jedoch noch ungeklärt. Erschwerend ist hierbei, daß bisher von keinem sensorischen Rhodopsin eine Kristallstruktur erhältlich ist.

Das SRI durchläuft nach Absorption eines Photons einen dem BR-analogen Photozyklus (Bogomolni & Spudich, 1987). Es konnten die einzelnen Intermediate K, L und M identifiziert werden und Schmies et al. (2000) wiesen in neuesten Untersuchungen ebenfalls ein N-Intermediat nach. Das langlebige M-Intermediat  $S_{373}$  wird als signalgebender Zustand für die photophile Reaktion diskutiert (Yan & Spudich, 1991; Yan et al., 1991). Das Retinal befindet sich hier in der *13-cis*-Konfiguration und die Schiffbase ist deprotoniert (Haupts et al., 1994).

Zusätzlich vermittelt dieses M-Intermediat durch Absorption eines zweiten Photons (Wellenlänge < 500 nm) die photophobe Antwort. Durch Isomerisierung des Retinals von der *13-cis*-Konfiguration in die *all-trans* Form bildet sich zunächst das Intermediat  $S_{510}^b$  ( $\lambda_{max}$ : 510 nm). Das SRI relaxiert anschließend unter Reprotonierung der SB in den Grundzustand (Spudich & Bogomolni, 1994). Dieser Reaktionsweg wird als sogenannte Kurzschlußreaktion („short-cut“) bezeichnet und ist auch für das M-Intermediat des BR bekannt (Dancshazy et al., 1978).

Die Relaxation in den Grundzustand erfolgt auf diesem Reaktionsweg deutlich schneller ( $t = 80$  ms) als der rein thermisch-determinierte Zerfall des M-Intermediates im Ein-Photonenprozeß ( $t = 750$  ms) (Bogomolni et al., 1987).



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des Photozyklus des SRI

Die beiden geschwängelten Pfeile repräsentieren lichtinduzierte und die restlichen thermische Übergänge. Die Absorptionsmaxima der Intermediate sind jeweils als Indices angegeben. Die Halbwertszeiten der thermischen Übergänge sind eingezeichnet. Das SRI durchläuft nach Absorption eines Photons die Intermediate  $S_{610}$ ,  $S_{560}$  und  $S_{373}$  (entsprechen K, L, M). Das M-Intermediat  $S_{373}$  kann nun thermisch in den Grundzustand relaxieren (photophile Antwort) oder durch Absorption eines zweiten Photons über den alternativen Reaktionsweg unter Bildung von  $S_{510}^0$  in den Grundzustand zurückkehren (photophobe Antwort). (Bogomolni et al. 1987; Spudich & Bogomolni, 1984)

Die Eigenschaften des SRI werden hierbei stark durch die Wechselwirkung mit dem Transducer beeinflusst. So zeigt die Kinetik des Photozyklus nur für das Transducer-freie SRI eine starke pH-Abhängigkeit im Bereich von pH 5.0 – 8.5 (Olson et al., 1992; Spudich & Spudich, 1993).

Elektrophysiologische Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Protonenpumpaktivität des SRI lieferten zum Teil widersprüchliche Aussagen (Bogomolni et al. 1994; Haupts et al., 1995, 1996). Schmies et al. (2000) konnten jedoch eine Protonenpumpaktivität in einem Zwei-Photonenprozeß für das Transducer-freie SRI bestätigen. Das SRI wurde hierfür in *Xenopus* Oocyten funktionell exprimiert und ein kontinuierlicher Strom unter Belichtung mit Hilfe der Voltage-Clamp Technik nachgewiesen. Durch Vergleich mit den Ergebnissen für BR (Nagel et al., 1995, 1998) ergab sich jedoch eine wesentlich geringere Effektivität des Protonentransportes. Für das SRI im Komplex mit dem HtrI wurde hingegen kein Protonentransfer über die Membran beobachtet (Schmies et al., 2000).

Phylogenetisch stammt das SRI somit vermutlich von der Ionenpumpe BR ab, hat aber im Laufe der Evolution die Fähigkeit Protonen zu transportieren verloren, da dieser Mechanismus für die photosensorische Aktivität nicht benötigt wurde.

In pH-Titrationsstudien wurde nachgewiesen, daß die Bindung des HtrI zu einer Verschiebung des  $pK_a$ -Wertes der Asparaginsäure 76 (analog dem Asp85 in BR) von 7.4 für das freie SRI zu 8.5 im Komplex führt (Bogomolni et al., 1994). Eine Deprotonierung des Asp76 resultiert in einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 587 nm auf 552 nm.

Eine Mutagenese der Asparaginsäure (D) 76 zu Asparagin (N) bestätigte diese Ergebnisse, das SRID76N zeigte ein pH-unabhängiges Absorptionsmaximum von 587 nm. Bei pH 6.0 liegen diese beiden Spezies bezogen auf das freie SRI im Gleichgewicht nebeneinander vor, im SRI-HtrI Komplex ist das Asp76 hingegen vollständig protoniert (Rath et al., 1996). Das SRI<sub>587</sub> zeigt keine Protonenpumpaktivität, so daß der beobachtete Protonentransfer des Transducer-freien SRI auf die SRI<sub>552</sub>-Spezies zurückzuführen ist (Bogomolni et al., 1994; Haupts et al., 1995).

Im BR ist das komplementäre Asp85 deprotoniert und fungiert als primärer Protonenakzeptor und stabilisierendes Gegenion der Schiffbase. Die Mutante BRD85N weist ein zum Wildtyp bathochrom verschobenes Absorptionsmaximum (570 nm → 590 nm) auf und zeigt keinen Photozyklus (Dunach et al., 1990). Im Gegensatz dazu durchläuft die Mutante SRID76N einen zum Wildtyp nahezu unveränderten Photozyklus unter Bildung eines M-Intermediates (Rath et al., 1994). Als alternativer Protonenakzeptor wird das Histidin 166 im zytoplasmatischen Kanal diskutiert, welches unter den sensorischen Rhodopsinen konserviert ist (Zhang & Spudich, 1998; Ihara et al., 1999).

Als minimale Domäne die das HtrI zu einer Wechselwirkung mit dem SRI befähigt, nachweisbar durch die pH-Sensitivität des Photozyklus, dienen die N-terminalen 147 Aminosäuren des HtrI (Krah et al., 1994; Perazzona et al., 1996). Dieser im Vergleich zur vollständigen Sequenz von 536 Aminosäuren relativ kurze Bereich wird durch die beiden transmembranen Helices und einer kurzen zytoplasmatischen helikalen Struktur repräsentiert (Yao & Spudich, 1992).

Die Spezifität dieser Wechselwirkung konnte in Versuchen mit Chimären des HtrI und HtrII nachgewiesen werden (Zhang et al., 1999). Experimente zur Quervernetzung des HtrI und SRI legen nahe, daß das HtrI als Homodimer ähnlich den Chemorezeptoren im Komplex gebunden ist (Zhang & Spudich, 1998). Ob es sich hierbei um eine echte 1 : 2 (SRI : HtrI) Stöchiometrie handelt oder möglicherweise eine 2 : 2 Stöchiometrie vorliegt, wie im Rezeptor-Transducer-Komplex pSRII-pHtrII aus *Natronobacterium pharaonis*, (Wegener et al., 2000) ist noch unbewiesen.

Der Mechanismus des Signaltransfers zwischen dem SRI und dem HtrI bleibt jedoch unklar. Eine Protonentransferreaktion als Trigger scheidet vermutlich aus, vielmehr wird eine Auswärtsbewegung der Helix F oder G im Verlauf des Photozyklus vergleichbar der im BR als signalgebender Zustand vermutet. Für den verwandten photophoben Rezeptor

pSRII aus *N. pharaonis* konnte diese Bewegung der Helix F in ESR-Experimenten nachgewiesen werden (Wegener et al., 2000).

Ob dieser Mechanismus auch im Falle des SRI-Htrl Komplexes Bestand hat, ist zu beweisen. Strukturelle Unterschiede bezüglich der photophilen bzw. photophoben Antwort sind hier von besonderem Interesse.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehung an archaebakteriellen Proteinen der oxidativen Phosphorylierung und Signaltransduktion.

Im ersten Teil soll das Cytochrom  $ba_3$  aus *Natronobacterium pharaonis* heterolog in *Halobacterium salinarum* exprimiert und synthetisiert werden. Als Grundlage dient das von Lüttenberg et al. (1998) für das pSRII etablierte Expressionssystem in *H. salinarum*. Die Synthese des Cytochrom  $ba_3$  soll unter der Kontrolle des Promotors des Bakterioopsins mit Hilfe des Expressionsvektors pBL7 erfolgen. Es sollen neben dem Kernkomplex bestehend aus den Untereinheiten I und II auch die Gene aller Untereinheiten (I-IV) kloniert und exprimiert werden. Durch die Modifikation der terminalen Sequenzen soll im folgenden eine Optimierung des Reinigungsverfahren über Affinitätschromatographie erfolgen, um den Komplex in funktioneller Form zu isolieren. Eine kinetische Charakterisierung der Wechselwirkung mit dem Halocyanin bzw. Sauerstoff wird angestrebt. Ob das Cytochrom  $ba_3$  zum aktiven Protonentransport befähigt ist, soll über „Black-Lipid-Membrane“-Messungen analog zur Cytochrom Oxidase aus *Thermus thermophilus* erbracht werden. Im weiteren sollen Mutationsstudien der Aminosäuren im Bereich des D-Kanals, der für den vektoriellen Protonentransfer verantwortlich ist, Aufschluß über einen möglicherweise alternativen Protonentransportweg liefern. Im Fall eines fehlenden vektoriellen Protonentransfers soll durch Austausch der inaktiven gegen funktionale Aminosäurereste diese Funktion regeneriert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll der Mechanismus des Signaltransfers des sensorischen Rhodopsin I auf seinen Transducer Htrl untersucht werden. Auf der Basis der von Schmies et al. (2000) entwickelten Methode zur Expression des SRI in *E. coli* sollen Cystein-Mutanten des SRI synthetisiert und anschließend durch ESR-Spektroskopie charakterisiert werden. Durch ESR-Experimente sollen die ausgewählten Helix-Bereiche des SRI strukturell charakterisiert und mögliche strukturelle Änderungen unter Belichtung untersucht werden.

Die Kinetik einer möglichen Konformationsänderung soll anschließend durch zeitaufgelöste ESR-Spektroskopie erfolgen. Diese Experimente sollen sowohl mit dem Transducer freien SRI als auch im Komplex mit dem Htrl durchgeführt werden.

Hierfür soll zunächst eine geeignete Expressionsstrategie für den Rezeptor-Transducer-Komplex in *E. coli* entwickelt werden.

Durch zeitaufgelöste Laser-Blitzlicht-Spektroskopie sollen die Photozyklen des SRI mit und ohne Transducer sowie der Cysteinmutanten kinetisch analysiert werden.

In pH-Titrationsversuchen sollen zusätzlich die pH-abhängigen Gleichgewichte der verschiedenen Spezies des Transducer-freien SRI-Wildtyps ermittelt werden. Darauf aufbauend soll eine neue Strategie zur Separation der einzelnen Photozyklus-Kinetiken der verschiedenen Spezies entwickelt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität oder molekularbiologische Reagenzien und stammten von den Firmen Sigma (Steinheim), Aldrich (Heidenheim), Baker (Groß-Gerau), Merck (Darmstadt), Gerbu (Gaiberg), GIBCO BRL (Eggenstein), Serva (Heidelberg), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), Bio-Rad (München).

N-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid wurde von der Firma Calbiochem (Schwalbach am Taunus) bezogen. Die Reagenzien für die Polymerase Kettenreaktion wurden von Pharmacia (Freiburg) und Boehringer (Mannheim) erhalten, für die DNA-Sequenzierung von Applied-Biosystems (Weiterstadt).

Es wurden DNA-modifizierende Enzyme von Boehringer, Pharmacia und New England Biolabs (Schwalbach) eingesetzt. Die RNase A stammte von Boehringer. Die nicht-radioaktive Markierung und Detektion von Nukleinsäuren erfolgte mit einem PCR-DIG DNA Markierungsmix sowie mit einem DIG-Detektionskit der Firma Boehringer. Für die Immobilisierung von Nukleinsäuren wurden Nylon Membranen vom Typ Biotodyne A der Firma Pall (Dreieich) verwendet.

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden Kits der Firma Qiagen (Hilden) verwendet.

Antibiotika sowie *all-trans*-Retinal stammten von Sigma, das Caseinhydrolysat (Pepton 140) sowie der Hefe-Extrakt von GIBCO BRL.

Für die Reinigung der Histidin-Tag Proteine wurde Ni<sup>2+</sup>-NTA Superflow von Qiagen benutzt.

Der 1 kb DNA-Molekulargewichtsmarker sowie die T4-DNA-Ligase stammten von GIBCO BRL. Es handelt sich um 12 Wiederholungen eines 1018 bp DNA-Fragmentes und zusätzlich DNA-Fragmente der Größen 1636, 517/506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134 und 75 bp.

Der verwendete Protein-Molekulargewichtsmarker (Pharmacia) setzte sich zusammen aus: Phosphorylase b (94 kDa), Rinderserum-Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20.1 kDa) und  $\alpha$ -Laktalbumin (14.4 kDa).

Der Spinlabel (1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat (MTSSL) stammte von Toronto Research Chemicals (TRC, Toronto).

## 2.2 Instrumentation

Die Inkubation der *E. coli* Zellen erfolgte in einem Schüttler der Firma New Brunswick (Nürtingen). Die Fermenter für die Zellanzucht im Maßstab von 10 L bzw. 30 L stammten von der Firma Biotech International (Melsungen).

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen wurde durch Elektroporation mit einem GenePulser der Firma BioRad (München) in Elektroporationsküvetten der Firma Invitrogen (Leek) durchgeführt. Für die Sedimentation und andere Zentrifugationsschritte wurden die Zentrifugen RC28S und RC3BPlus der Firma Sorvall (Bad Homburg) mit den Rotoren SS-34, F-28/36 und H6000A sowie die Zentrifugen J2-HC der Firma Beckman mit dem Rotor JS-4.3 verwendet.

Der Aufschluß der Zellen erfolgte mit dem Microfluidizer M-110S der Firma Microfluidics Corporation (Newton, USA).

Polymerase-Kettenreaktionen erfolgten mit dem PCR-Express System von Hybaid (Heidelberg) mit Deckelheizung und in-tube Temperatur-Kontrolle. DNA Sequenzierungen wurden mit dem Sequenzierungsgerät 373 von Applied Biosystems durchgeführt.

Die Polyacrylamidgelelektrophoresen erfolgten mit dem Mini-ProteanII-System der Firma BioRad. Der Elektrotransfer auf Membranen wurde mit dem Fastblot-Gerät der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt.

Proteinlösungen wurden mit Vivaspin der Ausschlußgrößen 10 kDa und 30 kDa der Firma der Firma Vivascience (Lincoln, UK) und mit Nanoseps der Firma Pall Filtron (Dreieich) ankonzentriert.

Für die UV/Vis Absorptionsmessungen wurden die Spektrophotometer Lambda 9 UV/Vis/NIR der Firma Perkin Elmer (Überlingen) und DU 650 der Firma Beckmann (Palo Alto, USA) benutzt.

Für die pH-Messungen wurde das Labor pH-Meter 766 und die pH Elektrode Typ SE 101 der Firma Knick (Berlin) benutzt.

Die Beschallung aufgeschlossener Zellen erfolgte mit einem Ultraschall-Stab Branson Sonifier 250 der Firma Heinrich (Schwäbisch Gemünd) und die rekonstituierten Proteine mit einem Bad Labson 200 von der Firma Bender und Hobein (Ismaning).

### 2.3 Bakterienstämme und Plasmide

*E. coli* XL1 –Blue F' Tn 10 *proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lac<sup>g</sup> Δ (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nal<sup>r</sup>) thi hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 lac* (Bullock et al., 1987)

*E. coli* BL21(DE3) F' *opmT [lon] hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3)* (Studier & Moffat, 1986)

*Natronobakterium pharaonis* SP1/28 hR<sup>+</sup>, sR-II<sup>+</sup>, Car<sup>(+)</sup> (Bivin & Stoeckenius, 1986)

*Halobakterium salinarum* MPK40 bR<sup>-</sup>, sR-I<sup>+</sup>, sR-II<sup>+</sup> (Krebs et al., 1991; 1993)

Es wurden die Vektoren	pUC BM20	Boehringer (Ingelheim)
	pET-27b <sup>+</sup>	Novagen (Abingdon)
	pET27bmod	Klostermeier et al., 1998
	pBL7 <sup>Nov</sup>	Lüttenberg et al., 1998
	pUCBL <sup>Mev</sup>	zur Verfügung gestellt von B. Lüttenberg
	pET27bmod <i>sop/His</i>	zur Verfügung gestellt von G. Schmies
	pET27b <sup>+</sup> <i>thtrl</i> pET27bmod <i>thtrl-His</i>	zur Verfügung gestellt von A. Wegener

### 2.4 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von den Firmen Novagen bzw. Pharmacia bezogen:

T7prom Primer 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

T7term Primer 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'

Die unten aufgeführten Oligonukleotide wurden auf einem Beckman Oligo 1000 synthetisiert und nach NAP-10 Gelfiltration (Pharmacia) ohne weitere Reinigung verwendet. Die mit \* gekennzeichneten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Göttingen) bezogen. Der Synthesemaßstab betrug 0,01 µmol.

Zur Einführung der Cysteinmutation in SRI-His nach der Methode von Ho et al. (1989) wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Mutation	Orientierung	5' Sequenz 3'	$T_m / T_{mred}$ (°C)
P154C	hin	GTG CCC GAC GTG TGT GAG CAG ATC GG	86 / 68
	rev	CCG ATC TGC TCA CAC ACG TCG GGC AC	
E155C	hin	CGA CGT GCC CTG TCA GAT CGG GCT GT	86 / 67
	rev	CAG CCC GAT CTG ACA GGG CAC GTC G	
Q156C	hin	ACG TGC CCG AGT GTA TCG GGC TGT	78 / 67.5
	rev	ACA GCC CGA TAC ACT CGG GCA CGT	
I157C	hin	TGC CCG AGC AGT GTG GGC TGT TCA AC	84 / 66
	rev	GTT GAA CAG CCC ACA CTG CTC GGG CA	
G158C	hin	CGA GCA GAT CTG TCT GTT CAA CCT G	76 / 65
	rev	CAG GTT GAA CAG ACA GAT CTG CTC G	
L159C	hin	GAG CAG ATC GGG TGT TTC AAC CTG C	78 / 67
	rev	GCA GGT TGA AAC ACC CGA TCT GCT C	
F160C	hin	CAG ATC GGG CTG TGT AAC CTG CTG AA	80 / 68
	rev	TTC AGC AGG TTA CAC AGC CCG ATC TG	
N161C	hin	TCG GGC TGT TCT GTC TGC TGA AAA ACC A	84 / 68
	rev	TGG TTT TTC AGC AGA CAG AAC AGC CCG A	
Y210C	hin	TGC CGT ACG TGT GTT TCT TCT ACG	72 / 68
	rev	CGT AGA AGA AAC ACA CGT ACG GCA	
F211C	hin	TGC CGT ACG TGT ATT GTT TCT ACG C	74 / 68.5
	rev	GCG TAG AAA CAA TAC ACG TAC GGC A	
F212C	hin	GTG TAT TTC TGT TAC GCG CGG CGT	74 / 62
	rev	ACG CCG CGC GTA ACA GAA ATA CAC	
Y213C	hin	GTG TAT TTC TTC TGT GCG CGG CGT	74 / 62
	rev	ACA CCG CGC ACA GAA GAA ATA CAC	

Die Schmelztemperatur der Oligonukleotide wurde mit 4°C pro Base GC bzw. 2°C pro Base AT berechnet. Die reduzierte Schmelztemperatur mit Berücksichtigung der Basenfehlpaarung wurde anhand folgender Formel ermittelt (Suggs et al., 1981):

$$T_{mred} = T_m - \left( \frac{100 \cdot \text{Anzahl Fehlpaarungen}}{\text{Gesamtzahl Basen}} \cdot 1.5^\circ\text{C} \right)$$

Für die Einführung des Peptid-Linkers zur Synthese des Komplexes SRI-link-tHtrl-His als Fusionsprotein wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Bezeichnung		5' Sequenz 3'	T <sub>m</sub> / T <sub>mred</sub> (°C)
link	hin	CG AGC AAC GGC GCG AGC GCG	72 / 60
	rev	GC GCC GTT GCT CGC GCT CGC	72 / 60
Peptidsequenz		A S A S N G A S A	

Oligonukleotide für die Klonierung und Sequenzierung des Cytochrom ba<sub>3</sub>

Bezeichnung	Orientierung	5' Sequenz 3'	T <sub>m</sub> / T <sub>mred</sub> (°C)
ba <sub>3</sub> I (NcoI)	hin	GGG GGT GGT GCC ATG GCC ATC CAC	82 / 63
ba <sub>3</sub> II (HindIII)	rev	CCC GAC TAA GCT TCA TCA GTG TGT CAC	82 / 54
ba <sub>3</sub> II (BamHI)	rev	TGA CCC CGA TCA GGG ATC CAC CCC GA	86 / 63
ba <sub>3</sub> IV (NcoI)	hin	AAT CCC CGT CCA TGG GTA CGG ACG T	80 / 68
ba <sub>3</sub> II+IV (HpaI)	rev	CAC CAG GGT CAG CAA AGC CTG G	72
ba <sub>3</sub> I+III (PstI)	hin	AGA CAG CCG CTG ACA CCG TCG T	72
ba <sub>3</sub> III (BamHI)	rev	TGG CGG CGG GAT CCG TCG CCG CTG	86 / 61
ba <sub>3</sub> III (HindIII)	rev	AGC GCC TTG GCA AGC TTA TCA GTC GCC GCT	96 / 61
His2	hin	GAT CCC CAC CAC CAC CAC CAC CAC TAA TA	*
	rev	GG GTG GTG GTG GTG GTG GTG ATT ATT CGA	*
Sphcox	hin	AGC ATG GTG CCC GAC AGC G	64
Sph3C	rev	TGT GCG TTG AGT TCG CCG AG	64
StreptII N	hin	CAT GGC TAG ATG GAG CCA CCC GCA GTT CGA AAA AGA GCT	*
	rev	CT TTT TCG AAC TGC GGG TGG CTC CAG CTA GC	*
SacI-HpaI	hin	TAT AAT CCC CGG AGC TCG GTACGG ACG T	88 / 67
bopprom	hin	GGG TGG ATC CGT GAA GTC CG	68
bopprom	rev	CAC TGC TGT TGG CAA TAA CTC CA	68
BR	hin	GTT GGA GTT ATT GCC AAC AGC AGT	70
BR	rev	AGA CCG AGT GGG GGA CTC ATC G	72

\*Die komplementären Oligonukleotide His2 und StreptII N wurden zur Einführung eines Histidin-Tags bzw. Streptavidin-Tags zunächst hybridisiert und mit dem entsprechend restringierten Vektor ligiert, daher wird hier keine Schmelztemperatur angegeben.

## 2.5 Puffer, Lösungen und Medien

### LB-Medium

10 g Pepton (140)-Hydrolysat  
 5 g Hefe Extrakt  
 10 g Natriumchlorid  
 ad 1 L pH 7.2

### 2TY-Medium

15 g Pepton(140)-Hydrolysat  
 10 g Hefe Extrakt  
 10 g Natriumchlorid  
 ad 1 L pH 7.2

### Komplexmedium für *H. salinarum*

Lösung I:

250 g NaCl  
 20 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
 3 g Na-Citrat  
 50 mL Tris (1M, pH 7.4)  
 ad 900 mL H<sub>2</sub>O

Lösung II:

1,5 g Hefeextrakt  
 2,5 g Bacto-Trypton  
 ad 200 mL H<sub>2</sub>O

### Vollmedium

3,5 M NaCl  
 80 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
 26 mM KCl  
 0,3 % Na-Citrat x 2 H<sub>2</sub>O  
 1 % (w/v) Bacto-Trypton  
 pH 7.0-7.2

### Casalomedium für Agarplatten

Aufgrund der höheren Transparenz wurde für die Selektionsplatten das Bacto-Trypton im Vollmedium durch NZ-Amine A ersetzt. Zusätzlich wurden 1,5 % (w/v) Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

### Basalsalzpuffer

3,5 M NaCl  
 80 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
 26 mM KCl  
 0,3 % (w/v) Na-Citrat  
 2 mM HEPES  
 pH 6.4 (ohne titrieren)

20 x SSC („saline sodium citrate“) Puffer

3 M NaCl  
0,3 M Na-Citrat (pH 7.0)

Alkalischer Transferpuffer:

0,6 M NaCl  
0,4 M NaOH

SDS-Probenpuffer

200 mM SDS  
35 % (v/v) Glycerin  
3,5 % (v/v) Monothioglycerin  
120 mM Tris (pH:8.0)  
0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Agarosegel-Probenpuffer

25 % (w/v) Ficoll 400  
3 x TBE-Puffer  
0,025 % (w/v) Bromphenolblau  
0,025 % (w/v) Xylencyanol

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl (pH 8.0)  
1 mM EDTA

TBE (Tris-EDTA-Borat)-Puffer

89 mM Trisbase  
0,9 mM EDTA  
89 mM Borsäure  
pH 8.4

**Gewinnung von Mevinolin aus Mevinacor Tabletten:**

Die Tabletten für die Extraktion von Mevinolin (Lovastatin) wurden von der Firma MSD Sharp Dohme GmbH (München) bezogen. 10 Tabletten wurden gemörsert und in 20 mL EtOH aufgenommen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 7000 x g wurde der Überstand mit einem 0,45 µm Filter steril filtriert und die Lösung bei -20°C gelagert. Die Mevinolinkonzentration betrug ca. 10 mg/mL.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht anders erwähnt, wurden molekulargenetische Methoden nach Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1987) angewendet.

### 2.6.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in Agarosegelen von 0,8 – 1,5% Agarosegehalt in Flachbettkammern durchgeführt. Es wurde TBE-Puffer mit 60 ng/mL Ethidiumbromid für die Agarosegele und als Kammerpuffer verwendet.

### 2.6.2 Isolierung chromosomaler DNA

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *H. salinarum* wurde nach der Methode von Ng et al. (1995) durchgeführt. Die Anzucht von *H. salinarum* erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben in einer 30 mL Kultur bis zu einer optischen Dichte von 1,5 bei 578 nm. 15 mL der Zellkultur wurde durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 8000 x g) sedimentiert und in 400 µL Basalsalzpuffer resuspendiert und durch Zugabe von 4 mL H<sub>2</sub>O lysiert. Nach 5 min vorsichtigem Schwenken bei RT wurde ein Proteinase K Verdau (40 µL/mL Endkonzentration, 0,5 % SDS) für 3h bei 37°C durchgeführt.

Anschließend wurde ein Volumenäquivalent Roti-Phenol zugegeben und 1 h bei RT geschwenkt. Zur Trennung der Phasen wurde 15 min bei 8000 x g zentrifugiert und die phenolische Phase abgenommen und verworfen. Nach der zweiten Extraktion mit Phenol schlossen sich zwei Extraktionen mit Chloroform an. Um Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen wurde dann zweimal gegen 2 L TE-Puffer bei RT dialysiert. Dem Dialysat wurden 20 µg/mL RNase A zugegeben und die Lösung für 2 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde erneut gegen 2 L TE-Puffer dialysiert. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde anhand der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (Verhältnis 1,8 : 1) und gelelektrophoretisch bestimmt.

### 2.6.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus *H. salinarum* erfolgte nach der Guanidiniumthiocyanat-Methode (Chomczynski & Sacchi, 1987) mit Hilfe des RNeasy-Kits der Firma Qiagen.

Die erhaltene RNA wurde mit DNase I (RNase frei) unter Zugabe von 10 mM MgCl<sub>2</sub> für 1 h bei 37°C behandelt und nochmals mittels des RNeasy-Kits nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

#### **2.6.4 Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Präparation der Plasmid-DNA wurde nach dem Verfahren der alkalischen Lyse von Birnboim & Doly (1979) durchgeführt.

Die präparative Isolierung von Plasmiden erfolgte unter Verwendung der Ionenaustauschersäulen A20 bzw. A100 der Firma Qiagen. Das vom Hersteller angegebene Verfahren wurde leicht modifiziert, indem direkt vor der säulenchromatographischen Reinigung ein RNase A Verdau (20 µg/mL) für 30 min bei 37°C durchgeführt wurde. Für die Isolierung von Plasmiden, die nur in niedriger Kopienzahl in der Zelle vorliegen, wurden 15 mL Kultur für die Reinigung über A20 Säulen eingesetzt.

Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde durch UV-Spektrophotometrie bestimmt.

#### **2.6.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Gelextraktionskit der Firma Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion der interessierenden Banden erfolgte unter UV-Licht der Wellenlänge 360 nm.

#### **2.6.6 Restriktion von DNA**

Die Restriktion von Plasmid-DNA für Klonierungen und PCR-Ansätze wurde in 10-15 µL Gesamtvolumen in den vom Hersteller für die jeweiligen Endonukleasen empfohlenen Puffern durchgeführt. Der Verdau erfolgte jeweils bei 37°C für 1½ h.

Für die Southern-Blot-Analyse wurden je 10 µg genomischer DNA mit je ca. 30 Einheiten des Restriktionsenzym SalI in den vom Hersteller angegebenen Puffer für 4 h bei 37°C restringiert. Nach Fällung mit 2,5 Volumenäquivalenten Ethanol und anschließendem Waschen mit 70 %igem EtOH wurden die Reaktionsansätze in 30 µL H<sub>2</sub>O aufgenommen und nach Zugabe von 1 Volumenäquivalent Agarosegelpuffer auf ein 0.8 %iges Agarosegel (14 x 32 cm<sup>2</sup>) aufgetragen.

#### **2.6.7 Ligation von DNA**

Üblicherweise wurden 50 µg des restringierten Plasmids und ein 2 - 2,5 molarer Überschuß des DNA-Fragmentes eingesetzt. Die Ligation erfolgte unter Zugabe einer Einheit Ligase in 20 µL Ansätzen in dem entsprechenden Puffer für mindestens 3 h bei RT. Vor der Transformation wurde der Reaktionsansatz auf 50 µL mit H<sub>2</sub>O verdünnt und die Ligase für 10 min bei 65°C inaktiviert.

### 2.6.8 Polymerase-Kettenreaktion (Mullis & Faloona, 1987)

Die Herstellung der SRI-Cysteinmutanten mit je einem Basentripletttausch erfolgte mittels PCR nach der Overlap-Extension-Methode von Ho et al. (1989). Im ersten Amplifikationsschritt werden hierbei mit je einem Primer, der außerhalb der interessierenden Sequenz liegt, und einem Primer, der die Mutation enthält zwei DNA-Fragmente strangaufwärts bzw. strangabwärts amplifiziert.

In einer zweiten PCR dienen dann die beiden gereinigten DNA-Fragmente nach Hybridisieren als Matrize. Es wird mit den beiden äußeren Primern amplifiziert und man erhält die Sequenz des SRI mit der einzelnen ortsspezifischen Mutation.

Die PCR wurde jeweils in 50 µL-Reaktionsansätzen durchgeführt:

10-20 ng	DNA-Matrize
20 pmol	je Primer hin und rev
10 pmol	je dNTP
1,5 Einheiten	Expand <sup>TM</sup> High-Fidelity-Polymerase (Boehringer Mannheim)
5 µL	10x Polymerasepuffer

Die Polymerase wurde nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 95°C für 3 min und anschließendem Abkühlen der Ansätze auf Eis zugegeben. Als äußere Primer wurden die Sequenzierungsprimer T7prom bzw. T7term verwendet, welche in der Promotorregion bzw. im Terminatorbereich der T7 RNA Polymerase auf den verwendeten Plasmiden hybridisieren. Die inneren Mutagenese-Primer sind unter 2.4 Oligonukleotide aufgeführt, wobei ihre Bezeichnung die gegen Cystein ausgetauschten Aminosäuren und die jeweilige Position angibt. Als Standardbedingungen für die Reaktionszyklen wurden die folgenden Temperaturschritte verwendet:

Denaturierung:	15 s bei 95°C
Hybridisierung:	30 s bei $T_m - 5^\circ\text{C}$ (~ 55°C)
Elongation:	45 s bei 72°C
	15 Zyklen
Inaktivierung:	3 min bei 72°C

Die Schmelztemperatur der Primer für den Hybridisierungsschritt berechnet sich nach der Formel von Suggs *et al.* (1981). In den Fällen, in denen die Schmelztemperatur der Primer ohne Berücksichtigung der Basenfehlpaarung deutlich höher liegt, wurde die Hybridisierungstemperatur nach 5 Zyklen um 5°C erhöht und die Reaktion für weitere 15 Zyklen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch getrennt und nach anschließender Gelelektion in den NcoI/HindIII restringierten Vektor pet27bmod kloniert.

Für die Konstruktion der Cytochrom  $ba_3$  Expressionsvektoren wurden die entsprechenden Untereinheiten mit den unter 2.4 aufgeführten Oligonukleotiden aus den Vektoren pSM-2.7PstI bzw. pSM-3.3SalI amplifiziert. Die durch die Einführung neuer Schnittstellen resultierende Basenfehlpaarung wurde analog zu oben bei der Wahl der Hybridisierungstemperatur berücksichtigt. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und die Reaktionszyklen entsprachen den oben angegebenen. Die einzelnen Klonierungsschritte der PCR-Produkte nach Reinigung über Agarosegelelektrophorese sind im Anhang detailliert dargestellt.

Eine Analyse der erhaltenen MPK40 Transformanten erfolgte zunächst über PCR. Hierfür wurden Einzelkolonien 2 Tage in 6 mL Selektionsmedium angezogen und die Zellen anschließend sedimentiert. Durch Resuspendieren in dest.  $H_2O$  wurden die Zellen lysiert und jeweils ein Aliquot (2 – 4  $\mu L$ ) für eine PCR verwendet. Die Reaktionszyklen und Temperaturen entsprachen den oben genannten Standardbedingungen.

### 2.6.9 Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion

Die RT-PCR diente dem Nachweis der Transkription der genomisch insertierten Sequenz des Cytochrom  $ba_3$  und wurde nach der Methode von Kawasaki et al. (1988) durchgeführt.

Der Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese enthielt folgende Komponenten:

2,5 $\mu g$	Gesamt-RNA der <i>H. salinarum</i> Transformanten
1 pmol	revers-orientierter Primer (Sph3Crev bzw. BRrev)
20 nmol	je dNTP
20 Einheiten	RNase-Inhibitor
40 Einheiten	Moloney-Murine-Leukämie Virus Reverse Transkriptase
ad 20 $\mu L$	$H_2O$

RNA und Primer wurden zunächst zusammen 7 min bei 90°C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe der restlichen Komponenten erfolgte die cDNA-Synthese für 80 min bei 37°C. Zur Terminierung wurde der Reaktionsansatz 10 min auf 94°C erhitzt. Für die anschließende PCR wurden 10  $\mu L$  des RT-Ansatzes verwendet.

Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 50  $\mu L$  durchgeführt:

10 $\mu L$	RT-Reaktionsansatz
2 Einheiten	Taq-Polymerase
10 pmol	je Primer
1 $\mu L$	10x PCR-Puffer

Die PCR wurde für 25 Reaktionszyklen bei folgenden Temperaturen durchgeführt:

Denaturierung:           96°C  10 s  
Hybridisierung:         60°C  30 s  
Elongation:               72°C  45 s

Der PCR war ein Denaturierungsschritt bei 90°C für 2 min vorgelagert.

Zur Kontrolle wurde die cDNA-Synthese ohne Zugabe von reverser Transkriptase durchgeführt, um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA nachzuweisen, welche bei der nachfolgenden PCR ebenfalls ein positives Signal erzeugen würde.

Als Positivkontrolle diente der Nachweis der mRNA des validen Bacterioopsins, welches im verwendeten Stamm genomisch kodiert ist.

#### **2.6.10 Herstellung nicht-radioaktiv markierter DNA-Sonden**

Die nicht-radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte unter Verwendung eines PCR DIG DNA Markierungsmixes (Boehringer Mannheim), der anstelle der dNTP's in einem üblichen PCR-Ansatz verwendet wurde. Als Matrize diente der zur Transformation von *H. salinarum* verwendete Vektor. Die Produkte wurden nach der PCR über Agarosegelelektrophorese wie beschrieben getrennt und isoliert. Die isolierte Sonde wurde in 1 mL TE-Puffer bei -20°C gelagert. Nach Denaturierung der Sonde bei 95°C für 10 min wurden 100 µL des Ansatzes zu 1 mL Hybridisierungslösung gegeben.

Hybridisierungslösung:    5 x SSC  
                                  1 % Blockierungsreagenz  
                                  0,1% N-Lauroylsarcosinat  
                                  0,02 % SDS

#### **2.6.11 Southern Transfer (nach Southern, 1975)**

Der Transfer der DNA auf Nylon-Membran erfolgte im Kapillarblotverfahren nach Southern (1975) unter alkalischen Bedingungen für 4 - 14h (Alkalischer Transferpuffer, 2.5). Für einen Blot wurden jeweils 4 - 5 µg restingierte genomische DNA der *H salinarum* Transformanden eingesetzt.

Vor dem Transfer wurde das Agarosegel 5 min mit 0,1 M HCl behandelt. Die Fixierung der transferierten DNA erfolgte nach Neutralisierung durch Trocknen für 2 h bei 80°C im Vakuumofen. Anschließend wurde die Lage der Markerbanden im UV-Auflicht bei 254 nm markiert.

### 2.6.12 Hybridisierung filtergebundener DNA und Detektion

Die Hybridisierung mit DNA-Sonden wurde in Hybridisierungsbeuteln mit jeweils 3 mL Hybridisierungslösung pro 100 cm<sup>2</sup> Blotfläche durchgeführt. Der Southernblot wurde zunächst in Hybridisierungslösung ohne Sonde für 2 h bei 65°C präinkubiert. Die Hybridisierung erfolgte dann mit frischer Lösung mit der zuvor denaturierten DNA-Sonde für 16 h bei 65°C.

Die Membran wurde anschließend zweimal mit einem großen Volumen Waschpuffer (2 x SSC, 0,1 % SDS) für je 15 min bei RT gewaschen, gefolgt von zwei Waschschritten unter stringenten Bedingungen mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 65°C für je 30 min. Der Nachweis der mit den spezifischen DIG-DNA Sonden hybridisierten DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des DIG-Luminiszenz Detektions Kits der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim) nach den Angaben des Herstellers. Die Expositionsdauer der Fuji Röntgenfilme (RX) betrug 15 min – 3 h.

DIG-Hybridisierungslösung:	5 x	SSC
	1 %	Blockierungsreagenz
	0,1 %	N-Laurylsarcosinat
	0,02 %	SDS

### 2.6.13 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die Transformation von *E. coli* erfolgte durch Elektroporation nach der Methode von Dower et al. (1988). Es wurden 80 µL kompetente Zellen mit einer OD<sub>578nm</sub> von 100-150 mit 20 µL des Ligationsansatzes bzw. 1 ng supercoil-DNA gemischt und durch Elektroporation in einem Gene Pulser (BioRad, München) mit 1,5 kV, 800 Ω, 25 µF und Zeitkonstanten von 5 - 15 ms transformiert. Die Zellen wurden anschließend sofort in 1 mL LB-Medium aufgenommen und nach Inkubation für 1 h bei 37°C und 200 Upm in verschiedenen Verdünnungen auf Selektionsplatten ausplattiert.

### 2.6.14 Transformation von *H. salinarum*

Eine Einzelkolonie des zu transformierenden *H. salinarum*-Stammes MPK40 wurde in 5 mL Komplexmedium bis zur stationären Phase bei 37°C und 200 Upm angezogen. Mit 2 mL der Vorkultur wurden anschließend 35 mL Komplexmedium angeimpft. Bei einer OD<sub>578</sub> von 1 – 1,5 wurden jeweils 2 mL der Zellkultur zum Animpfen einer neuen Schüttelkultur (50 mL) verwendet. Ausgehend von dieser Kultur wurden die Zellen ca. 4 - 5 mal in 50 mL Kulturen bis zu einer OD 1,0 angezogen. Durch dieses Verfahren wurde eine optimale Generationszeit von 6 - 8h erzielt. Bei einer OD<sub>578</sub> von 0,9 – 1,3

wurden nun für jeden Transformationsansatz je 2 mL der Kultur durch Zentrifugation für 5 min bei 1300 x g bei RT geerntet. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 200 mL Späroplastenlösung resuspendiert und anschließend 10 µL einer 0.5 M EDTA-Lösung (pH 8.0) zugegeben. Die ansonsten stäbchenförmigen Zellen nehmen hierbei eine kugelartige Form ein, welches unter einem Mikroskop beobachtet werden konnte.

Dem Reaktionsansatz wurden dann 3 - 5 µg der zu transformierenden DNA in Sphäroplastenlösung zugesetzt und die Zellsuspension 30 min bei RT inkubiert. Nun wurden 240 µL PEG-Lösung zugegeben und die Lösung vorsichtig durchmischt, wobei auf eine zügige Vermischung zu achten ist.

Nach 20 minütiger Inkubation bei RT wurde mikroskopisch überprüft, ob die Zellen intakt waren. Bei einer partiellen Lyse der Zellen sind diese perlschnurartig an der freigesetzten genomischen DNA aufgereiht. Ansätze, bei denen mehr als ~50 % der Zellen lysiert waren, wurden verworfen.

Nach Zugabe von 1,5 mL Sphäroplasten-Puffer wurde der Reaktionsansatz vorsichtig gemischt und die Zellen 5 min bei 1300 x g bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 2 mL Vollmedium resuspendiert und die Kultur ü. N. bei 37°C und 200 Upm geschüttelt. Je 200 µL des Transformationsansatzes wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und ü. N. bei 40°C getrocknet. Anschließend wurden die Platten in Plastiktüten verpackt um ein vollständiges Austrocknen zu verhindern und weitere 10 - 30 Tage bei 40°C inkubiert bis Plaques erkennbar wurden.

### 2.6.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des PRISM Ready Reaction Big DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach den Angaben des Herstellers. Es wurden 25 PCR-Zyklen mit folgenden Reaktionsschritten durchgeführt:

Denaturierung:	96°C	10 s
Hybridisierung:	55°C	5 s
Elongation:	60°C	4 min

Zum Reaktionsansatz wurden anschließend 2 µL einer 5 %igen Dextranblau-Lösung in H<sub>2</sub>O und 10 µL einer 3,5 molaren Na-Acetat Lösung (pH 5.5) zugegeben und mit H<sub>2</sub>O auf 50 µL aufgefüllt. Die DNA wurde mit 200 µL EtOH gefällt und sofort durch Zentrifugation (15 min, 14000 Upm, RT) in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Das Sediment wurde einmal mit 75 %igem EtOH gewaschen und dann bei RT getrocknet. Die Auftrennung und Auswertung der markierten DNA-Fragmente erfolgte durch denaturierende

Polyacrylamidgelelektrophorese mittels eines automatisierten Sequenzanalysegerätes (Applied Biosystems, Weiterstadt)

## 2.7 Proteinchemische Methoden

### 2.7.1 Zellanzucht

*Escherichia coli* wurden aerob in LB-Medium für die Expression ansonsten in 2TY-Medium angezogen. Zur Selektion wurden die Antibiotika Kanamycin (50 µg/mL) und Ampicillin (100 µg/mL) verwendet. Für die Proteinsynthese wurde ein Volumenverhältnis Kultur zu Kolben von 2 : 5 gewählt. Die Anzucht der Zellen erfolgte in Erlenmeyerkolben mit Schikane bei 37°C und 200 Upm im Rundschüttler.

Zur Synthese von Proteinen im größeren Maßstab wurden die Zellen in einem 10 L bzw. 30 L Fermenter Biostat C (Braun Biotech GmbH, Melsungen) unter Kontrolle der Sauerstoffsättigung und des pH-Wertes kultiviert.

*H. salinarum* MPK40 wurden bei 37°C und 200 Upm in Vollmedium angezogen. Die transformierten Zellen wurden mit Mevinolin selektiert. Es wurde ein Verhältnis von 1 : 5 von Kultur- zum Kolbenvolumen gewählt. Für die Proteinsynthese wurden die Zellen bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert.

### 2.7.2 Proteinsynthese in *E. coli*

Die Synthese der SRI-Cysteinmutanten und des verkürzten Transducers Htrl erfolgte durch Transformanden des *E. coli* Stammes BL21 (DE3). Es wurden die Expressionsplasmide pet27b und pet27bmod (Novagen) verwendet, in denen das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle des T7 Promotors steht.

Die Kulturen wurden mit einer Vorkultur angeimpft, so daß sich rechnerisch eine optische Dichte von 0,05 – 0,06 ergab. Die Induktion erfolgte bei einer Zelldichte von  $\sim 1.2 \times 10^8$ , welche einer optischen Dichte von 0,6 bei 578 nm entspricht, durch IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM. Bei der Synthese der Mutanten des sensorischen Rhodopsin I wurden gleichzeitig 10 µM *all-trans*-Retinal in ethanolischer Lösung zugesetzt. Nach Inkubation für 3 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 x g sedimentiert und nach Waschen mit Puffer RI (500 mM NaCl, 50 mM Mes pH 6.0) als Sediment bei –80°C eingefroren. Es konnten durchschnittlich 1 g Zellsediment pro Liter Kultur erhalten werden.

### 2.7.3 Präparation der Membranproteine SRI und tHtrl

Das *E. coli* Zellsediment aus 4 L Kultur wurde in 30 mL Puffer R1 resuspendiert und mit Hilfe eines Microfluidizers (Microfluidics, Newton, Ma., USA) mechanisch aufgeschlossen. Zum Zellysat wurde 1 mg DNase I zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde bei  $100.000 \times g$  und  $4^{\circ}C$  für 1 h zentrifugiert.

Der Überstand enthält alle zytoplasmatischen und periplasmatischen Komponenten und wurde hier verworfen. Im Sediment sind die Membran und andere schwerlösliche Komponenten wie Inclusionbodies angereichert. Um die Membran zu solubilisieren, wurde das Sediment in 20 mL Puffer S2 homogenisiert und 2 - 3 h bei  $4^{\circ}C$  langsam gerührt. Die ungelösten Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei  $100.000 \times g$  ( $4^{\circ}C$ , 45 min) abgetrennt. Der Überstand enthält die solubilisierten Membranproteine.

Das Solubilisat wurde im folgenden im Gravitationsfluß auf eine zuvor in Puffer W3 äquilibrierte Säule ( $\varnothing$  3 cm) mit Nickel-NTA-Agarose (Typ Superflow) aufgetragen. Die Menge des verwendeten Säulenmaterials wurde an die unterschiedliche Proteinausbeute der verschiedenen Cysteinmutanten angepasst (1 - 2 mL/L Zellkultur).

Um unspezifisch gebundene Proteine abzutrennen, folgten Waschschrte mit 5 - 10 Säulenvolumina mit den Puffern W4 und W5 bis im Eluat nahezu keine Absorption mehr bei 260 nm und 280 nm zu detektieren war.

Anschließend wurde mit Puffer E6 eluiert (ca. 2 - 3 Säulenvolumina) und das Eluat sofort mit 1 M NaOH auf pH 6.0 titriert.

Die Proteinlösung wurde mittels VIVASPIN (30 kDa) bei 4500 Upm und  $10^{\circ}C$  auf 1 - 2 mL ankonzentriert und danach je nach weiterer Verwendung sofort mit dem ESR-Spinlabel versetzt bzw. in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}C$  gelagert.

#### Puffer:

- R1: 500 mM NaCl, 50 mM Mes pH 6.0
- S2: 4 M NaCl, 50 mM Mes pH 6.0, 2% DM
- W3: 4 M NaCl, 50 mM Mes pH 6.0, 0,05% DM
- W4: W3 + 30 mM Imidazol
- W5: W3, pH 5.5
- E6: 4 M NaCl, 50 mM Mes pH 4.0, 0,05% DM

Die Reinigung des verkürzten Htrl mit Histidin-Tag erfolgte analog zu der des SRI, jedoch unter Verwendung der unten aufgeführten Puffer. Das farblose HtrlHis wurde im letzten Schritt durch Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 300 mM im Puffer (E6\*) von der Säulenmatrix eluiert.

Das Imidazol wurde durch Dialyse des Eluates gegen 2 x 2 L 500 mM NaCl, 50 mM NaPi pH 6.5 in einer Dialysemembran (Porengröße 12 - 14 kDa) entfernt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektroskopisch wie unter 2.8.2 beschrieben. Über SDS-Gelelektrophorese wurde zusätzlich die Reinheit der Proben überprüft.

Puffer:

R1\*: 500 mM NaCl, 50 mM Mes pH 6.0

S2\*: 500 mM NaCl, 50 mM Mes pH 6.0, 2% DM

W3\*: 500 mM NaCl, 50 mM Mes pH 6.0, 0,5% DM

W4\*: W3\* + 20 mM Imidazol

E6\*: 500 mM NaCl, 50 mM Mes, 300 mM Imidazol, pH 6.0, 0,5% DM

Die Reinigung der SRI-HtrI Komplexe erfolgte unter den für das SRI gewählten Bedingungen. Dies gilt sowohl für den über den Peptidlinker verbundenen Komplex SRI-link-HtrIHis als auch für die Koexpressionen (*sopl* + *htrI*His, *sopl*His + *htrI*) und die nach getrennter Synthese vereinigten Membranfraktionen.

#### **2.7.4 Kopplung mit Spinproben**

Zur Kopplung des Spinlabels wurden 1 - 2 mL der konzentrierten Proteinlösung der Cysteinmutanten des SRI mit 1/100 Volumenäquivalent einer 100 mM Lösung des (1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat Spinlabels (MTSSL) in DMSO versetzt und ü. N. bei 4°C im Dunkeln leicht geschwenkt. Überschüssiger Label wurde dann durch eine weitere Ni-Affinitätschromatographie abgetrennt. Die Volumina der Waschschriffe wurden auf 2 - 3 Säulenvolumina verringert.

Waschpuffer W4 wurde hierbei ausgelassen. Für die ESR-Messungen wurden je 20 - 50 nmol der solubilisierten Proteine auf etwa 400 - 500 µM ankonzentriert. Je 800 µg - 1 mg der gelabelten SRI-Mutanten wurden wie unten beschrieben in polaren Lipiden rekonstituiert.

#### **2.7.5 Isolierung und Verarbeitung polarer Lipide aus *H. salinarum***

Zur Isolierung von Lipiden aus ganzen Zellen wurde eine nach Kates *et al.* (1982) modifizierte Methode verwendet mit dem Unterschied, daß nur die gereinigte Purpurchromatophorenmembran verwendet wurde.

### 2.7.6 Rekonstitution der Membranproteine in die Lipid-Doppelschicht

Die Rekonstitution der Membranproteine erfolgte in Anlehnung an das von Holloway (1973) und Rigaud *et al.* (1997) beschriebene Verfahren. Die solubilisierten, gereinigten Proteine wurden in einem molaren Verhältnis von 1 : 25 mit Lipiden, suspendiert in Puffer S1 (4 M NaCl, 50 mM Mes pH 6.0), gemischt. Nach leichtem Schwenken wurden Detergenzadsorber-Beads (Boehringer Mannheim) ebenfalls in Puffer S1 suspendiert zugegeben. Der DM-Gehalt der konzentrierten Lösungen schwankt je nach Elutionsvolumen zwischen 0,5 - 1%. Die Bindungskapazität der Detergenzadsorber-Beads beträgt nach Herstellerangaben 100 mg DM / 1 g Beads.

Unter den gewählten Bedingungen mußten jedoch bis zu der dreifachen Menge Adsorber-Beads verwendet werden. Die Reaktionsansätze wurden ü.N. bei 4°C unter Lichtausschluß geschwenkt. Die erfolgreiche Rekonstitution kann man anhand der starken Eintrübung des Ansatzes erkennen. Die Membranen wurden nach Abtrennen des Adsorbermaterials in einer Tischzentrifuge bei 14.000 Upm und 4°C sedimentiert und nach zweimaligem Waschen mit Puffer S2 in diesem in ca. 50 µL resuspendiert.

### 2.7.7 Reinigung des Cytochrom $ba_3$ synthetisiert in *H. salinarum* MPK40

Die Zellen der Transformanten des Stammes *H. salinarum* MPK40 wurden durch Zentrifugation bei 5000 x g sedimentiert und in Basalsalzpuffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend unter Zugabe von DNaseI in eine Dialysemembran mit einer Porengröße von 12-14 kDa überführt und gegen 2 x 5 L destilliertes H<sub>2</sub>O dialysiert. Die Zellen nehmen aufgrund der hohen Salzkonzentration in ihrem Zytoplasma soviel Wasser auf, daß sie durch den osmotischen Druck platzen. Das Dialysat wurde 15 min bei 5000 x g zentrifugiert um Zelltrümmer abzutrennen. Zur Isolierung der Membran wurde anschließend 1 h bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert.

Ein Aliquot des Überstandes bestehend aus dem Zytoplasma wurde für die Analyse über SDS-Gelelektrophorese abgenommen und der Rest verworfen. Das Sediment bestehend aus Membranfragmenten und zum Teil Resten der genomischen DNA wurde in Puffer CR1 gewaschen und erneut durch Zentrifugation sedimentiert. Die Membran wurde dann in Puffer CS2 (300 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, und 1,5 % DM) zunächst homogenisiert und durch Rühren über Nacht bei 4°C schließlich solubilisiert. Durch Zentrifugation bei 100.000 x g wurden nicht solubilierte Komponenten sedimentiert. Meist wurde ein farbloses glasiges Sediment erhalten, welches zum größten Teil aus nicht verdauter genomischer DNA bestand. Der Überstand enthält die solubilisierten Membrankomponenten und ist deutlich orange-rot gefärbt.

Das Solubilisat der Cytochrom  $ba_3$  Komplexe mit Histidin-Tag wurde im folgenden im Gravitationsfluß auf eine in Puffer CW3 äquilibrierte Säule ( $\varnothing$  3 cm) mit Nickel-NTA-Agarose aufgetragen. Es wurden durchschnittlich 500  $\mu$ L bis 1 mL Ni-Agarosematerial für ein Kulturvolumen von 2 L verwendet. Die Säule zunächst mit 3 Säulenvolumina Äquilibriumspuffer CS2 gewaschen und anschließend mit ebenfalls 3 Säulenvolumina Puffer CW3. Da nicht bekannt war, bei welcher Imidazolkonzentration der Cytochrom  $ba_3$  Komplex von der Säule gewaschen wird, wurde in 2 Schritten eluiert. Zunächst wurde wieder mit 3 Säulenvolumina des Puffers CE5 gewaschen und schließlich mit Puffer CE6. Diese beiden Eluate wurden ebenso wie die Waschfraktionen in Aliquots gesammelt und spektroskopisch untersucht. Die UV-Vis Spektren wurden im Bereich von 250 bis 600 nm aufgenommen.

#### Puffer:

CR1: 300 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0

CS2: 300 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1,5 % DM

CW3: 300 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 0,1 % DM

CW4: CW3 + 20 mM Imidazol

CE5: CW3 + 100 mM Imidazol

CE6 CW3 + 200 mM Imidazol

Die Membransolubilisate der Cytochrom  $ba_3$  Komplexe ohne Histidin-Tag wurden ebenso wie der Komplex mit N-terminalem Streptavidin-Tag zunächst nicht weiter gereinigt. Es wurden jeweils Aliquots für eine Analyse über SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Transfer und immunologischem Nachweis verwendet. Die Sedimente, die nach der Zentrifugation der solubilisierten Membranen erhalten wurden, wurden in Puffer CR1 resuspendiert und ebenfalls Aliquots für eine Analyse über SDS-Gelelektrophorese wie oben verwendet.

## **2.8 Analytische Methoden**

### **2.8.1 SDS-Gelelektrophorese**

Die analytische SDS-Gelelektrophorese wurde in 0,7 mm Flachgelen nach der Methode von Schägger und von Jagow (1987) durchgeführt. Es wurden hier Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 12 % und 3 % Vernetzungsgrad verwendet. Die Proben wurden nach Zugabe des Probenpuffers ohne weitere Vorbehandlung auf die Gele aufgetragen. Nur die Expressionskontrollen wurden zuvor mit Ultraschall behandelt um die genomische DNA zu scheren. Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie.

### 2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte im Falle der Cysteinmutanten des SRI über die Absorption des Chromophors Retinal bei 580 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 54000 \cdot \text{L}/(\text{mol cm})$  (Spudich & Bogomolni, 1984). Manche Mutanten wiesen ein leicht hypsochrom verschobenes Absorptionsmaximum auf, hier wurde jedoch zum Abschätzen der Konzentration mit dem gleichen Extinktionskoeffizienten gerechnet. Ein Vergleich zur Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm liefert eine Aussage über die Reinheit der Probe. Für stark angereichertes SRI wird idealerweise ein Verhältnis von  $A_{280}/A_{580} = 1,65$  erreicht (Krebs et al., 1995).

Eine Konzentrationsbestimmung des verkürzten Transducers Htrl über die Absorption bei 280 nm oder mit Hilfe der üblichen Farbassays ist nicht möglich, da nur eine aromatische Aminosäure im Protein enthalten ist. Daher erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Methode von Ehresmann et al. (1973) über die Absorption bei 228,5 nm und

234,5 nm mittels folgender Formel: 
$$\frac{A_{228,5} - A_{234,5}}{3,14} = x \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)$$

### 2.8.3 Präparation von Polyklonalen Antikörpern

Für die Produktion von Cytochrom  $\text{ba}_3$ -Antikörpern werden 100  $\mu\text{L}$  einer Lösung von 1 mg/mL gereinigtem nativem Cytochrom  $\text{ba}_3$  intrakutan als Deposit einem Kaninchen der Rasse Neuseeland injiziert. Das Antiserum gewinnt man durch Koagulation des Blutes mit anschließender Zentrifugation bei 10.000 x g aus dem Überstand. Nach 4-6 Wochen wird zur Titerbestimmung das Antigen in Aliquots von 20  $\mu\text{g}$  auf Microtiter-ELISA-Platten (NUNC) gebunden und mit mehreren Verdünnungen des Antiserums inkubiert.

Die Detektion erfolgt über einen an alkalische Phosphatase gekoppelten zweiten Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen IgG[H+L] der Firma Johnson Immunochemicals) durch Farbreaktion (Boehringer Screening Kit).

### 2.8.4 Immunologische Nachweise nach Western Transfer

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach dem Semi-dry Verfahren mit dem Puffersystem von Schagger und von Jagow auf Nitrocellulose-Membran elektrotransferiert. Der Blot wurde anschließend in einer 5%igen Lösung von Trockenmilch in TBS-Puffer ü.N. bei 4°C gelagert, um freie Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Die Reaktion mit dem primären Antikörper (Anti-Cytochrom  $\text{ba}_3$  aus Kaninchen) erfolgte durch Inkubation des Blots in 5 mL der Antikörperverdünnung 1 : 5000 in TBS unter leichtem Schwenken in einem Plastikbeutel bei RT für 1 h.

Nach zwei Waschschritten à 30 min in 100 mL TBS-Puffer + Tween (TBS-T) wurde der sekundäre Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper IgG [H+L] konjugiert mit Peroxidase; Johnson Immunochemicals) in einer Verdünnung von 1 : 2000 zugegeben. Nach 1 h folgten wieder zwei Waschschrritte in TBS-T. Die Detektion erfolgte nach Beträufeln des Blots mit 1,5 - 3 mL Chemoluminiszenz-Substrat (Boehringer), je nach Größe des Blots, durch Auflegen von Röntgenfilmen. Die Expositionsdauer wurde abgeschätzt, so daß am Ort des größten Signals eine vollständige Schwärzung erreicht wurde.

TBS: 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0 (HCl)

TBS-T: TBS + 0,05% Tween

### **2.8.5 pH-Titration des SRIwt-His und SRI-link-tHtrl-His**

Die pH-Titrations des SRIwt-His bzw. SRI-link-tHtrl-His wurden mit Proben rekonstituiert in PM-Lipiden durchgeführt. Die Proteinproben wurden durch mehrmalige Sedimentation und anschließend Resuspendieren in eine 1 M NaCl-Lösung umgepuffert. Es wurden Suspensionen mit einer  $OD_{587}$  von ~ 0,5 verwendet, die ü.N. bei 4°C im Dunkeln adaptiert wurden. Die pH-Titrations erfolgten im Dunklen bei 25°C in einer Probenküvette mit Rührer in einem Beckman-Photometer (Palo Alto, USA) mit einer festinstallierten pH-Elektrode. Es wurden jeweils 5, 10 bzw. 20 µl einer 10 mM NaOH bzw. HCl-Lösung zugegeben und solange gerührt bis ein konstanter pH-Wert erreicht war. Ausgehend von pH 6.0 wurden die Proben zunächst schrittweise auf pH 3.5 bzw. 3.0 titriert und anschließend auf ~ pH 9.0. Abschließend wurde die Probe wiederum auf pH 6.0 eingestellt.

Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgte jeweils ohne Rühren. Die Rayleighstreuung wurde ebenso wie der Verdünnungsfaktor rechnerisch eliminiert (vgl. 3.2.4).

## **2.9 Biophysikalische Methoden**

### **2.9.1 Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie (ESR)**

#### **Theoretische Grundlagen**

Die Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR) ist eine Absorptionsspektroskopie bei der durch die Aufnahme von Energie in Form von Mikrowellenstrahlung ( $\lambda = 3\text{cm}$ ) durch paramagnetische Moleküle Übergänge zwischen verschiedenen Energieniveaus der Elektronenspins induziert werden.

Der Gesamtdrehimpuls  $\mathbf{J}$  eines Elektrons setzt sich aus dem Bahndrehimpuls  $\mathbf{L}$  und dem Eigendrehimpuls  $\mathbf{S}$  zusammen:

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

Der Betrag der Drehimpulsvektoren wird durch die Impulsquantenzahlen dargestellt:

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

Die bewegte Ladung des Elektrons erzeugt ein magnetisches Moment  $\mu_J$ , welches sich aus den Anteilen der magnetischen Momente aus dem Bahnumlauf  $\mu_L$  und der Eigenrotation  $\mu_S$  zusammen setzen:

$$\mathbf{m}_J = \mathbf{m}_L + \mathbf{m}_S \quad (3)$$

Der Bahndrehimpuls kann für organische Radikale vernachlässigt werden, d.h. man betrachtet „bahnlose“ freie Elektronen. Der Gesamtdrehimpuls ist somit gleich dem Eigendrehimpuls und für den Betrag des magnetischen Momentes resultiert folgende Gleichung:

$$|\mathbf{m}_J| = |\mathbf{m}_S| = -g \cdot \mu_B \cdot |S| \quad (4)$$

mit  $\mu_B$  = Bohrsches Magneton und  $g$  = Landé-Faktor

Der Landé-Faktor hängt von den jeweiligen Impulsquantenzahlen ab und vereinfacht sich hier durch die Beschränkung auf den Eigendrehimpuls auf einen Wert von  $g \approx 2$ .

Wird ein Radikal mit einem als frei zu betrachtenden Elektron in ein zeitlich konstantes homogenes Magnetfeld mit der magnetischen Flußdichte  $\mathbf{B}_0$  gebracht, ergeben sich aus der Wechselwirkung des magnetischen Moment des Elektrons zwei Orientierungen des Eigendrehimpulsvektors (Spin), parallel und antiparallel zur Magnetfeldrichtung im quantenmechanisch erlaubten Winkel.

Die Projektion des Elektronenspins  $\mathbf{S}$  auf die  $\mathbf{B}_0$ -Achse bezeichnet man als magnetische Quantenzahl  $m_S$ , die durch die Spin-Quantenzahl gegeben ist durch:

$$m_S = S, S-1, S-2, \dots, -S$$

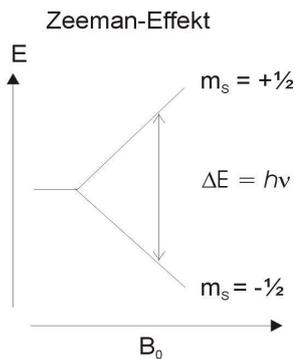
Es ergeben sich somit  $2S+1$  Einstellmöglichkeiten im Magnetfeld, d.h. für ein Elektron mit  $S = 1/2$  resultieren zwei Orientierungsmöglichkeiten mit  $m_S = \pm 1/2$ .

Für die Energie eines magnetischen Dipols im Magnetfeld gilt:

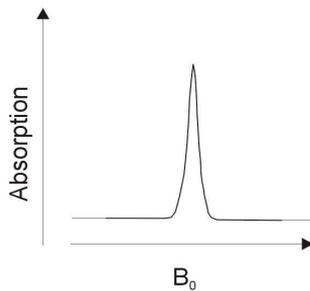
$$E = -\mathbf{m}_S \cdot \mathbf{B}_0 \cdot \cos \mathbf{d} \quad (5)$$

mit  $\cos \mathbf{d} = \frac{m_s}{|S|}$  und Gleichung 5 für  $\mathbf{m}_s$  folgt:  $E = g \cdot \mathbf{m}_B \cdot B_0 \cdot m_s$  (6)

Ein ungepaartes Elektron kann daher im äußeren Magnetfeld zwei Energiezustände entsprechend  $m_s \pm \frac{1}{2}$  einnehmen, deren Differenz  $\Delta E = g \mu_B B_0$  beträgt und somit von der Stärke des Magnetfeldes abhängt. Diese Aufspaltung entarteter Energiezustände durch ein äußeres Magnetfeld wird als Zeeman-Effekt bezeichnet.



Resonanz-Bedingung:  
 $\Delta E = h\nu = g \mu_B B_0$



Führt man dem System diese Energie durch elektromagnetische Strahlung zu, findet ein Absorptionsprozeß statt und die Elektronen werden auf das energetisch höhere Niveau angeregt. Für den Resonanzfall gilt:

$$\Delta E = h \cdot \mathbf{n} = g \mathbf{m}_B B_0 \quad (7)$$

D.h. im Resonanzfall entspricht durch Variation des  $B_0$ -Feldes die eingestrahlte Frequenz der elektromagnetischen Strahlung

der sogenannte Larmorfrequenz  $\mathbf{n}_L = \frac{g \mathbf{m}_B B_0}{h}$

und der Elektronenspin kann zwischen den beiden Einstellungsmöglichkeiten wechseln.

Die magnetischen Dipolübergänge können hierbei in beide Richtungen erfolgen, d.h. es findet sowohl Absorption als auch Emission von Strahlung statt.

Die Zahl der Absorptions- und der Emissionsprozesse hängt jedoch von der Besetzungszahl der Zeeman-Niveaus ab.

Die Besetzungszahlen des oberen ( $n_+$ ) bzw. unteren ( $n_-$ ) Energieniveaus sind durch die Boltzmannverteilung gegeben. Für Messungen bei Raumtemperatur ist  $n_- > n_+$  und es wird eine Absorption beobachtet.

$$n_+ = n_- \cdot e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (8)$$

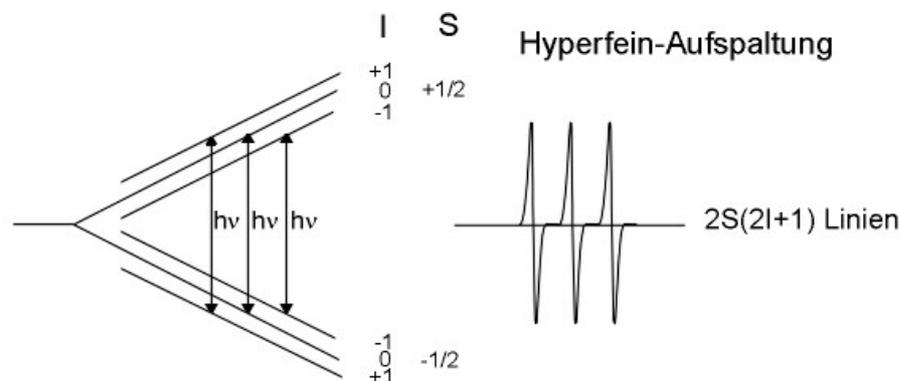
Durch Relaxation der Spins wird nach Absorption die ursprüngliche Besetzungverteilung der Energieniveaus wiederhergestellt. Man unterscheidet hier zwei Relaxationsmechanismen. Zum einen die Spin-Gitter-Relaxation, hier wird die bei Relaxation freiwerdende Energie des Spinsystems durch seine Umgebung, dem Gitter, aufgenommen. Die Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$  ist in Festkörpern aufgrund der besseren Kopplung mit der Umgebung kürzer als in Flüssigkeiten. Die Spin-Spin-Relaxation bezeichnet den Spinaustausch paramagnetischer Nachbarmoleküle über magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Der Spinaustausch beeinflusst somit die Lebensdauer eines Spinzustandes, aber nicht das Besetzungsverhältnis.

Die Relaxationszeit ist in Lösungen fast ausschließlich durch die Spin-Spin-Relaxationszeit  $T_2$  bestimmt. Die Linienbreite der Resonanzlinie ist hierbei proportional zu  $1/T_2$ . Die Absorptionslinie im ESR-Spektrum wird durch die Wechselwirkung der Elektronen mit den magnetischen Momenten der benachbarten Atomkerne, der sogenannten Hyperfeinwechselwirkung, aufgespalten.

Die Kerne erzeugen ein lokales  $B_{lok}$ -Feld das sich mit dem äußeren  $B_0$ -Feld überlagert und zu einem effektiven Feld  $B_{eff} = B_0 + B_{lok}$  addiert. Ein Kern mit einem Kernspin  $I$  kann  $(2I+1)$  Einstellungen zum externen Magnetfeld annehmen, die als Kernspinquantenzahl  $m_I$  charakterisiert sind. Das  $B_{lok}$ -Feld kann somit ebenfalls drei Werte annehmen und die Absorptionslinie wird in  $2S(2I+1)$  Linien, gemäß den Auswahlregeln  $\Delta m_S = 1$  und  $\Delta m_I = 0$ , aufgespalten. Die jeweilige Resonanz wird bei einem Resonanzfeld von

$$B_{res} = B_{res}^0 - a m_I \quad (9)$$

beobachtet, mit  $B_{res}^0$  als Resonanzstelle ohne Elektron-Kern-Wechselwirkung,  $a$  als Abstand der Hyperfeinlinien, die Hyperfeinkopplungskonstante, und  $m_I$  als magnetisches Moment des Kerns.



**Abb. 7:** Hyperfeinaufspaltung der Zeeman-Niveaus durch Wechselwirkung mit dem Kernspin am Beispiel des Stickstoffs ( $I = 1$ ). Das resultierende Spektrum des freien Spinlabels zeigt drei Hyperfeinlinien gemäß  $(2I+1) = 3$ .

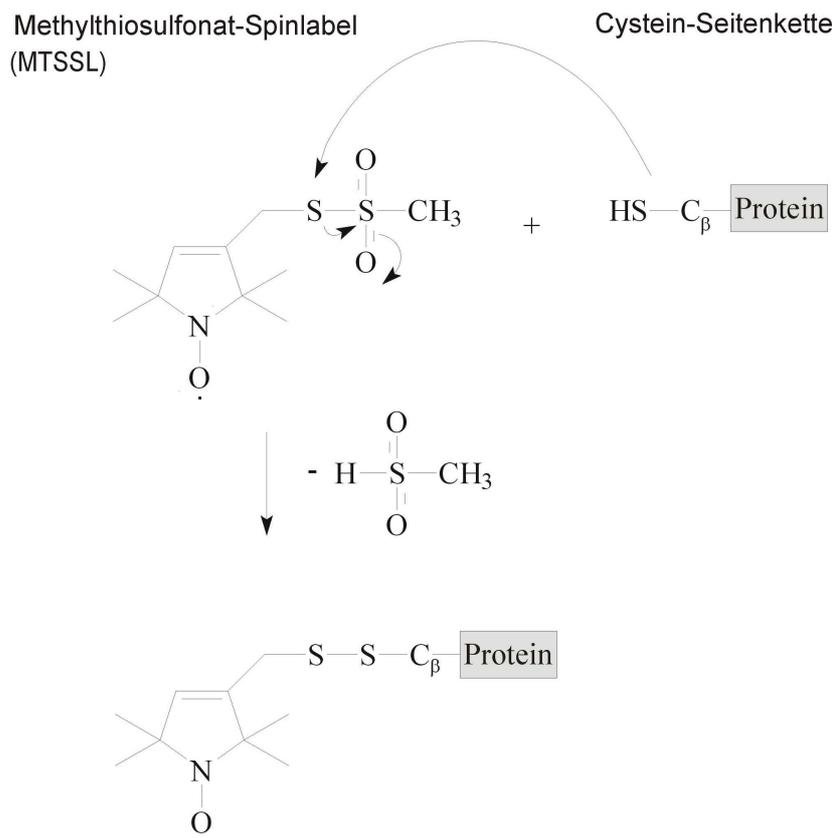
## Spinsonden

Für die ESR-Spektroskopie werden paramagnetische Moleküle wie bestimmte Übergangsmetalle und Radikale verwendet. Zur Untersuchung von Proteinen, die üblicherweise keine paramagnetischen Eigenschaften besitzen, werden stabile organische Nitroxidradikale, sogenannte Spinsonden, kovalent an eine Aminosäure des Proteins gebunden und so in das System eingeführt.

Die Kopplung des Spinlabels erfolgt nach ortsspezifischer Mutagenese des Proteins, wobei eine Aminosäure an gewünschter Position z. B. gegen ein Cystein ausgetauscht

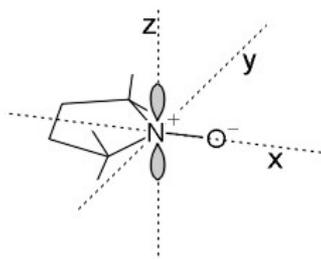
wird. Der Spinlabel wird anschließend über einen Linker kovalent im Falle des MTS-Spinlabels über eine Disulfid-Brücke an die reaktive SH-Gruppe des Cysteins gebunden. Dieses Verfahren wird als „site directed spin labelling“ (SDSL) bezeichnet (Hubbell & Altenbach, 1994).

In der folgenden Abbildung ist schematisch die Reaktion des in dieser Arbeit verwendeten MTS-Spinlabels (1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methan-thiosulfonat dargestellt.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung der Kopplungsreaktion des MTS-Spinlabels an die Cysteinseitenkette eines Proteins

Das ESR-Spektrum des MTS-Spinlabels wird durch die Lokalisierung des Elektrons im  $\pi_z$ -Hybridorbital zwischen Stickstoff und Sauerstoff der Nitroxidgruppe bestimmt. Durch die Wechselwirkung mit dem Kernspin des Stickstoffs ( $I = 1$ ) werden die Zeeman-Niveaus wie beschrieben in drei weitere Niveaus aufgespalten und man erhält drei Resonanzlinien.



Die Lokalisierung des freien Elektrons im  $\pi_z$ -Hybridorbital bedingt im Falle des MTS-Spinlabels eine anisotrope Wechselwirkung mit dem Kernspin des Stickstoffs. Diese Anisotropie beeinflusst je nach Mobilität des Labels die Spektrenform. Im vollständig immobilisierten Grenzfall, z.B. einem polykristallinen Pulver, liegt eine statistische Verteilung aller

Orientierungen des  $\pi_z$ -Orbitals vor. Das resultierende Spektrum ist eine Superposition der gewichteten Einzelspektren der Nitroxidlabel. Die Hyperfeinaufspaltungen sind hier größer und die Linien stark verbreitert (vgl. Abb. 9, unten).

Im Gegensatz hierzu zeigt der Spinlabel in Lösung ein isotropes Spektrum mit drei schmalen charakteristischen Linien (Abb. 9, oben) mit geringerem Abstand zueinander.

In Lösung kann sich der Spinlabel schnell und willkürlich um seine Achse orientieren, d.h. er zeigt eine nahezu isotrope Rotationsdiffusionsbewegung.

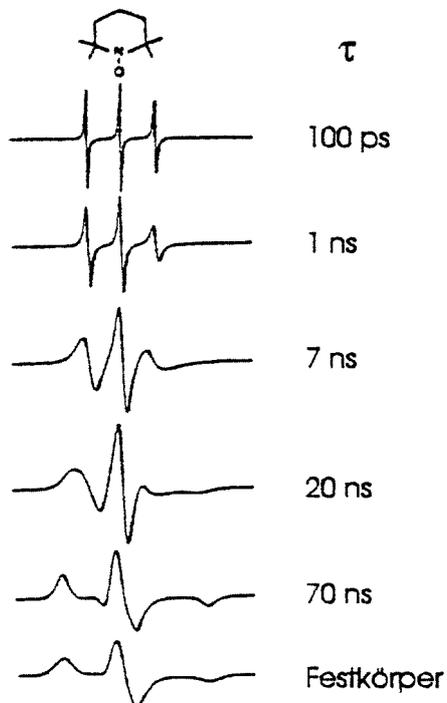
Die Rotationskorrelationszeit  $\tau_R$  hängt gemäß dem Stokesschen Gesetz von der

Viskosität  $\eta$  in Lösung und dem Radius  $r$  des Moleküls ab: 
$$t_R = \frac{4p \cdot h \cdot r^3}{3 \cdot k \cdot T} \quad (10)$$

$k$  : Boltzmann-Konstante ;  $T$  : Temperatur

Ist die Rotationskorrelationszeit klein gegenüber der Zeit für den Absorptionsprozeß mittelt sich die Anisotropie heraus und das Spektrum wird unabhängig von der Orientierung zu  $B_0$ .

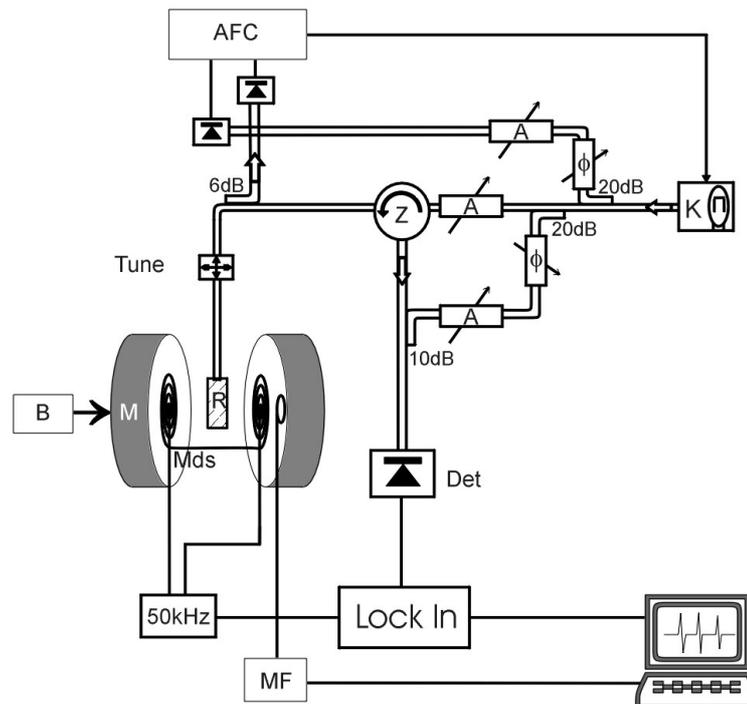
Für den in dieser Arbeit verwendeten MTS-Spinlabel beobachtet man auch nach Kopplung an ein Protein ein isotropes Spektrum. Die Bindungsrotation um die  $C_\beta$ -S-S-C-Bindung ist ausreichend schnell für eine Mittelung der Anisotropie (Altenbach et al., 1989). Die Spektrenform des an ein Protein gekoppelten Labels wird daher nur durch Wechselwirkungen mit Sekundär- und Tertiärstrukturen auf seine Mobilität beeinflusst.



**Abb. 9:** Spektrenänderung bei abnehmender Rotationsdiffusion des Spinlabels  
 $\tau = 100$  ps entspricht dem Spinlabel in Lösung (isotropes Spektrum)

## Meßaufbau für ESR-Spektroskopie

Die Messungen werden an selbstgebauten (PD Dr. H.J. Steinhoff/Ruhr-Universität Bochum) X-Band-Spektrometern durchgeführt. Im folgenden soll zunächst näher auf die Meßtechnik eingegangen werden.



**Abb. 10:** Schematischer Aufbau eines ESR-Spektrometers:

**A** Abschwächer zur Leistungsregulierung, **AFC** Schaltung zur automatischen Frequenzkontrolle des Klystron **B** Netzteil zur  $B_0$ -Feld Regelung, **K** Klystron (Mikrowellensender),

**Det** Detektordiode mit Mikrowellenvorverstärker, hier wird die im Resonanzfall auftreffende Mikrowellenstrahlung in ein elektrisches Signal umgewandelt,

**M** Elektromagnet für das  $B_0$ -Feld, **Mds** Modulationsspulen, **50kHz** Modulationsfrequenz-Generator, die Modulation des statischen Magnetfeld ist mit einem phasenempfindlichen Verstärkersystem **Lock In** zur rauscharmen Signalaufzeichnung gekoppelt.

**MF** Magnetfeldmesser,  $f$  Phasenschieber, **R** Resonator, hier bildet sich eine stehende elektromagnetische Welle aus, die Probe befindet sich an der Position des max. magnetischen Feldes, **Tune** Slide-Screw-Tuner zur Abstimmung des Resonators, **Z** Zirkulator, **P** Einweg-Hohleiter zur verlustfreien Weiterleitung der Mikrowelle.

Die zur Messung notwendige Mikrowellenstrahlung wird in den verwendeten Aufbauten durch ein Reflexklystron (Thomson-Varian) erzeugt. Im X-Band liegt die Frequenz bei etwa 9,8 - 10 GHz entsprechend einer Wellenlänge von ca. 3 cm.

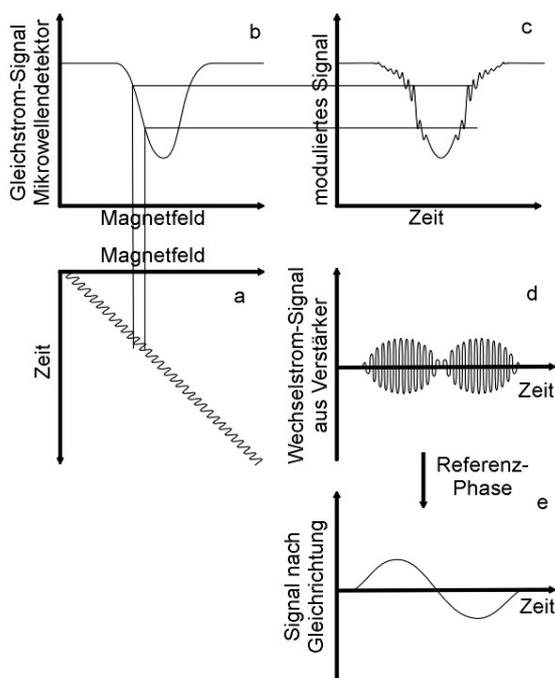
Nach geeigneter Anpassung an ein Hohlleitersystem passiert die Mikrowelle einen Einwegleiter, der ein Zurücklaufen der Welle in das Klystron verhindert.

Im ESR-Experiment wird bei einer konstanten Mikrowellenfrequenz gearbeitet. Um Driften zu verhindern, ist eine automatische Frequenzkontrolle (AFC) notwendig. Dazu wird ein Teil der Welle direkt nach dem Klystron als Referenz ausgekoppelt (20 dB-Koppler) und zu einem Teil der aus dem Resonator reflektierten Welle in Bezug gesetzt.

Die im Verstärkersystem der AFC verarbeiteten Signale dienen zur Nachregelung der Reflektorspannung des Klystrons. Im folgenden wird von der Anregungswelle ein weiterer Teil ausgekoppelt, der an der Nachweisdiode eine Vorspannung erzeugt, die sich über einen Abschwächer in der Intensität und über einen Phasenschieber in der Phasenlage einstellen läßt.

Mit dem sich anschließenden sogenannten Hauptabschwächer wird die Mikrowellenleistung eingestellt, die in den Resonatorzweig gelangt. Sie liegt mit Ausnahme der Sättigungsmessungen bei etwa 1 mW. Durch den Zirkulator besteht ausschließlich eine elektrische Kopplung zwischen den in Pfeilrichtung benachbarten Eingängen der Mikrowellenbrücke.

Vor der eigentlichen Messung muß der Resonator so an das Hohlleitersystem angepaßt werden, daß die eingestrahlte Energie durch Dämpfung vollständig verbraucht wird und daher keine Reflexion auftritt.



Die Abstimmung erfolgt durch Variation der Reflektorspannung am Klystron sowie der Einkopplung der Mikrowelle in den Resonator. Im Falle einer resonanzbedingten Absorption durch die im Resonator positionierte Probe kommt es zu einer Verstimmung des Resonators, und ein der Absorption proportionaler Anteil der Mikrowelle wird reflektiert. Diese gelangt über den Zirkulator in den Nachweiszweig der Mikrowellenbrücke und erzeugt an der Detektordiode ein elektrisches Signal. Zur weiteren Verbesserung des Signal/Rausch Verhältnisses wird der Diode ein X-Band Mikrowellenverstärker vorgeschaltet.

**Abb. 11:** Durch Magnetfeldmodulation erzeugtes Meßsignal.

Die geringe Signalamplitude der im Resonanzfall auftretenden Leistungsänderungen macht für die Aufzeichnung eine Verstärkung des Meßsignals notwendig. Dazu verwendet man das Verfahren der Feldmodulation. Dabei wird dem  $B_0$ -Feld ein um drei Größenordnungen kleineres Wechselfeld (Abb. 11a) überlagert, dessen Modulationsfrequenz etwa 50 kHz beträgt. Das modulierte Mikrowellensignal (Abb. 11b,c) kann von einer Detektordiode im rauscharmen Wechselspannungsbetrieb umgewandelt werden.

Die Signalspannung mit der Modulation als Trägerfrequenz läßt sich dann besonders rauscharm und frei von Drift über einen Wechselspannungsverstärker verarbeiten (Abb. 11d). Das resultierende Signal wird dann phasenempfindlich gleichgerichtet und weist die Form der ersten Ableitung der ursprünglichen Resonanzlinie auf.

Bei der Wahl der Wechselfeldamplitude muß darauf geachtet werden, daß diese nicht die halbe Linienbreite übersteigt, da es sonst zu artifiziellen Linienverbreiterungen kommen kann. Bei den durchgeführten Experimenten liegt sie bei 1,5 - 2 Gauss. Die Datenaufnahme erfolgt über eine AD-Karte mit einem Rechner. Dieser dient auch zur zeitsynchronen Magnetfeldsteuerung.

### **Lichtinduzierte ESR-Messungen**

Für photoinduzierte Messungen wurden eine Halogenlampe mit einem Kaltglasfilter und einem Filter mit einem cut-off bei 520 nm verwendet.

Für die Aufnahme der Differenzspektren wurde die Probe zunächst wie für die CW-Messungen abgestimmt und anschließend jeweils abwechselnd ein Spektrum ohne und mit Belichtung mit einem Meßpunktabstand von 0,5 Gauss und einer Zeitkonstante von 100 ms aufgenommen. Zwischen den Spektren wurde jeweils 1 min gewartet, um die Probe auf die jeweiligen Meßbedingungen zu äquilibrieren.

Zur Aufnahme der zeitaufgelösten Spektren an einer spezifischen Position des B-Feldes wurde vor die Halogenlampe eine Blende montiert, die über eine schnelle DA/AD-Karte mit einem Rechner getriggert wurde, so daß sich eine Belichtungszeit von 100 ms ergab. Die Datenaufnahme erfolgte bei einer Zeitauflösung von 100 ms am Nachweis-Lock-In und einem zeitlichen Abstand von 1 ms zwischen den Messpunkten für die Dauer von 8 s. Vor der jeweiligen Photoinduktion wurde das Signal für 2 s zur Basislinienbestimmung aufgenommen. Zwischen der Aufnahme der einzelnen Kinetiken lag jeweils eine Sekunde Wartezeit. Es wurden für jede Messung 5000 Transienten gemittelt.

### **Leistungssättigungsmessungen**

#### **Theoretische Grundlagen**

Detailliertere Informationen über die Umgebung des Nitroxidspinlabels und damit der Aminosäureseitenkette erhält man aus der Bestimmung der Zugänglichkeit gegenüber frei diffundierenden paramagnetischen Molekülen. Die Kollisionshäufigkeit des Nitroxidspinlabels mit diesen Molekülen beeinflusst hierbei die Spinrelaxationszeit.

Die unterschiedliche spezifische Verteilung der paramagnetischen Zusätze in den verschiedenen Milieus, der wäßrigen Umgebung, der Membran und dem Proteininneren, und die damit verbundene unterschiedliche Kollisionsfrequenz gibt somit Aufschluß über

die Orientierung des Spinlabels. In einer regulären Struktur wie z. B. einer Helix mit anisotroper Umgebung spiegelt der Zugänglichkeitsparameter  $\Pi$  des Spinlabels die Periodizität in Abhängigkeit von der Sequenz wieder.

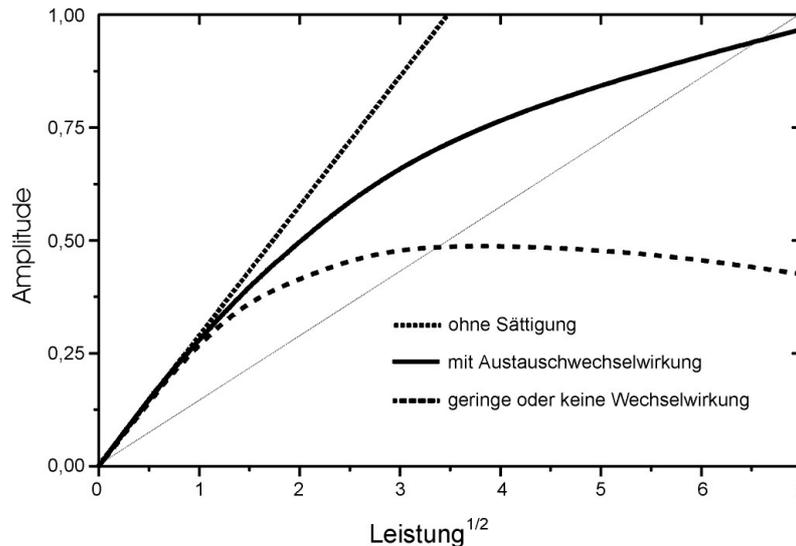
Somit bietet diese Methode gerade für Membranproteine, die anderen strukturaufklärenden Methoden wie der Kristallisation schwer zugänglich sind, die Möglichkeit, die lokale Topographie zu bestimmen.

Molekularer Sauerstoff und Chromoxalat sind hierbei gerade für Membranproteine häufig verwendete paramagnetische Reagenzien. Sauerstoff zeichnet sich durch seine hohe Löslichkeit und Diffusionsfähigkeit in Lipiddoppelschichten aus, wohingegen seine Konzentration im Proteininneren sehr gering ist. Chromoxalat ist dagegen nur im wässrigen Milieu löslich und aufgrund seiner Ladung weder in der Membran noch im Proteininneren gegenwärtig.

Zur Bestimmung der Kollisionsfrequenz mit den unterschiedlichen paramagnetischen Molekülen wird das Verfahren der Leistungssättigung bei statischen ESR-Messungen verwendet. Die Leistungssättigungskurven ergeben sich aus der Abhängigkeit der Signalamplitude der ersten Ableitung der Mittelfeldlinie als Funktion der eingestrahlteten Mikrowellenleistung ( $P$ ). Wie auf Seite 43 beschrieben werden durch die Absorption von Mikrowellenstrahlung Übergänge zwischen den Zeeman-Niveaus induziert. Das ursprüngliche Besetzungsverhältnis wird anschließend durch Relaxationsprozesse wiederhergestellt. Sättigung wird dann erreicht, wenn bei hinreichend hoher Leistung die Absorptionsübergänge die Relaxationsübergänge übertreffen.

Die Kollisionsfrequenz mit paramagnetischen Molekülen erhöht nun die Relaxationsrate des Spins des Nitroxidlabels, so daß erst bei höherer Mikrowellenleistung die Sättigung erreicht wird.

Als Maß für das Sättigungsverhalten wird die Mikrowellenleistung  $P_{1/2}$  verwendet, hier hat die gemessene Amplitude die Hälfte des Wertes ohne Sättigung erreicht. Wie erläutert ändert sich dieser Wert in Gegenwart relaxierender paramagnetischer Moleküle.



**Abb. 12:** Sättigungsverhalten des ESR-Signals in Abhängigkeit von der Mikrowellenleistung  $P$  in Gegenwart und Abwesenheit von Austauschwechselwirkungen mit paramagnetischen Molekülen. Der Schnittpunkt der Hilfslinie mit der Sättigungskurve mit Sättigung entspricht dem halben Wert der Mikrowellenleistung der Kurve ohne Sättigung. Hier entspricht dies einem Wert von  $\sqrt{P} = 3,5$ .

Um die Mikrowellenleistung  $P_{1/2}$  zu berechnen, werden die Amplituden der Mittelfeldlinie in Abhängigkeit von der Mikrowellenleistung aufgenommen und der Verlauf durch Gleichung (1) gemäß der Methode von Altenbach et al. (1994) mit einem Programm von Schweika (1997) mathematisch angepaßt.

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

- $A'(B)$  : Amplitude der 1. Ableitung der Mittelfeldlinie  
(abhängig von der Stärke des magnetischen Feldes)  
 $I$  : Skalierungsfaktor  
 $\varepsilon$  : Faktor der Homogenität der Sättigung der Resonanzlinie (homogen 1,5; inhomogen 0,5)  
 $P$  : Mikrowellenleistung  
 $P_{1/2}$  : Leistung bei der die Amplitude der 1. Ableitung die Hälfte des Wertes ohne Sättigung beträgt

Es werden dann zunächst die  $\Delta P_{1/2}$  Werte aus den Differenzen der gemessenen  $P_{1/2}$  Mikrowellenleistungen in Gegenwart und Abwesenheit relaxierender Substanzen ermittelt. Der Einfluß unterschiedlicher Mobilitäten der Spinlabels wird durch Division durch die Mittelfeldlinienbreite eliminiert.

Nach abschließender Normierung mit Hilfe des Referenzradikals Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) (Farahbaksh et al., 1992) erhält man den dimensionslosen Zugänglichkeitsparameter  $\Pi$ .

### Experimentelle Durchführung

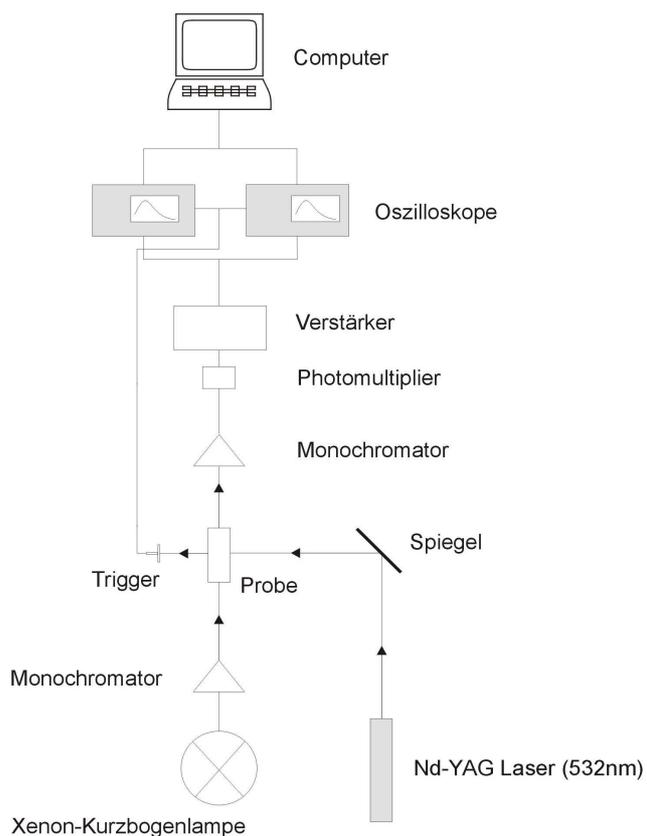
Für Leistungssättigungs-Experimente wurden die Proben in eine gaspermeable Kunststoffkapillare aus Polymethylpenten, TPX, (Jagmar Ltd., Kraków, Polen) gefüllt. Durch Umspülen mit Sauerstoff bzw. Stickstoff für ca. 15 min wurden die Proben auf die gewünschten Meßbedingungen eingestellt. Messungen mit 50 mM Chromoxalat (CROX) wurden in Gegenwart von Stickstoff durchgeführt. Der spektrale Bereich um die Mittelfeld-Linien wurde daraufhin bei 10 verschiedenen Mikrowellenleistungen im Bereich von 0,5 bis 60 mW gemessen. Aus der maximalen Amplitude konnten dann unter Verwendung des Programms „sattdata“ (Schweika, 1997) die Datenpunkte der Sättigungskurve ermittelt werden. Die Analyse der Daten wurde mit dem Programm „satfit“ (Schweika, 1997) durchgeführt, das eine Anpassungsfunktion analog zur Methode von Altenbach et al. (1994) erzeugt und daraus den Sättigungsparameter  $P_{1/2}$  gewinnt. Die Normierung erfolgte auf einen DPPH-Standard mit einer Linienbreite von 2,2 Gauss,  $P_{1/2} = 42$  mW aus Schweika (1997).

### 2.9.2 Laser-Blitzlicht Absorptionsspektrometrie

#### Experimentelle Durchführung

Die transienten Absorptionsmessungen wurden mit der in Abb 13 gezeigten rechnergesteuerten Meßanordnung aufgenommen (Chizhov *et al.*, 1996).

Mit einem Laserpuls (Nd-YAG-Laser, Wellenlängenbereich 410 - 800 nm, 10 ns Pulsdauer, 2 mJ/cm<sup>2</sup>, ILTI40E, UDSSR) wird die Probe angeregt. Weißes Licht einer Xenon-Kurzbogenlampe (Osram XBO 75 W/2, 75 Watt) wird durch einen Gittermonochromator (Firma Oriel Corp., Modell 7240) in der Wellenlänge selektiert und über ein Linsensystem auf die Probe im rechten Winkel zum Laserpuls fokussiert. Das monochromatische Licht trifft anschließend auf die Probenküvette (Quarz, Schichtdicke 0,5 cm) und wird nach einem zweiten Monochromator (MDR4-LOMO, UDSSR), der zur Eliminierung von Laserartefakten dient, 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 (50 ns – 1,5 ms und 0,4 ms – 10 s) gespeichert und zur Datenverarbeitung an einen Rechner weitergeleitet. Zur Verbesserung des Signal zu Rausch Verhältnisses wurden jeweils 10 Signale pro Wellenlänge gemittelt.

Über ein automatisiertes Steuerprogramm wird der Wellenlängenbereich von 360 - 660 nm in Schritten von 10 nm durchschritten und die transienten Absorptionsveränderungen gemessen.

**Abb 13:** Schematischer Aufbau der Laserblitzlicht-Absorptionsapparatur

Die transienten Absorptionsänderungen des SRIwtHis, SRID76N-His und des Komplexes SRIwt-link-tHtrlHis wurden im Wellenlängenbereich von 350 bis 650 nm in 10 nm Schritten für zwei Anregungswellenlängen (600 nm und 500 nm) aufgenommen.

Die Abhängigkeit des Photozyklus von der Anregungswellenlänge wurde für das SRIwtHis und für den Komplex SRI-link-tHtrlHis im Bereich von 410 nm bis 600 nm ermittelt. Es wurden hierbei drei Wellenlängen für die Absorption (580 nm: Grundzustand, 530 nm: Grundzustand deprotonierte Asp76 und 400 nm: M-Intermediat) aufgenommen. Für die Messungen wurden in DM solubilisierte Proteinproben (Puffer: 4 M NaCl, 50 mM Mes; pH 4,5 – 6,5) mit einer  $OD_{580}$  von  $\sim 0,5$  ( $d = 0,5$  cm) verwendet.

Für die Mutanten wurden die Kinetiken des Photozyklus bei drei indikativen Wellenlängen aufgenommen. Die Konzentrationen der verwendeten Proteinlösungen (in DM; 4 M NaCl, 50 mM Mes, pH 6.0) variierten hierbei stark. Die jeweiligen Absorptionen im Grundzustand lagen zwischen 0,2 und 1,0 bei 580 nm bzw. 560 nm und bis zu 2,0 bei 280 nm in Abhängigkeit von der Stabilität der Mutante.

Alle Messungen wurden bei 30°C durchgeführt.

## Datenverarbeitung

Die Zahl der Meßdaten wurde zunächst auf eine logarithmische Zeitskala reduziert (250 Datenpunkte) und deren Standardabweichung anhand des Fehlers des Grundsignals abgeschätzt. Die experimentellen Daten wurden anschließend nach dem Verfahren der globalen multiexponentiellen Analyse mit Hilfe des MEXFIT-Programms (Müller & Plesser, 1991) ausgewertet. Hierbei wird nach der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme ein Satz von Exponentialfunktionen ermittelt, deren Summe die Absorptionsänderungen mathematisch beschreibt. Es wird hierbei angenommen, daß unabhängig von der Wellenlänge, die für die Anregung bzw. für die Beobachtung des Photozyklus verwendet wird, dieselben Intermediate in derselben zeitlichen Abfolge durchlaufen werden. Damit läßt sich die Bedingung einführen, daß bei allen Wellenlängen identische Exponentialfunktionen auftreten und lediglich die Amplituden variieren.

Als Kriterium für die Güte der erhaltenen Anpassungsfunktionen dienen die Standardabweichungen des geschätzten Fehlers und die Oberfläche der gewichteten Differenzen der gemessenen und 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 wurde unter Annahme, daß der Photozyklus dem kinetischen Modell irreversibler Folgereaktionen erster Ordnung genügt, die absoluten Spektren der Intermediate ermittelt.

## Theoretische Grundlagen des Photozyklus-Modells

Die Auswertung der absorptionsspektrometrischen Daten wurde nach der standardisierten Methode nach Chizov et al. (1996) durchgeführt. Grundlage der Analyse ist das Lambert-Beer'sche Gesetz:

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

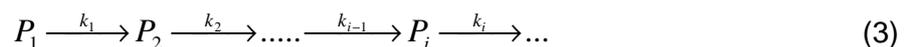
Die Absorption ist demnach als der negative dekadische Logarithmus des Quotienten der Strahlungsintensität vor ( $I_0$ ) und nach Passieren ( $I$ ) des absorbierenden Mediums definiert. Sie setzt sich aus der Summe der Produkte der Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_i$ , der Konzentration  $c_i$  aller absorbierenden Komponenten und der Schichtdicke  $d$  der Küvette zusammen.

Die Interpretation der Absorptionsänderungen wird dadurch erschwert, daß zu keiner Zeit nur ein einziges Intermediat vorliegt, sondern vielmehr eine Verteilung zwischen den verschiedenen Intermediaten. Die Bestimmung der Anzahl der Intermediate stellt hierbei ein zentrales Problem dar (Maurer et al., 1987).

Durch einen systematischen Ansatz können die Absorptionsänderungen  $\Delta A(\lambda, t)$  durch eine Summe von Exponentialfunktionen mathematisch beschrieben werden:

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

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 liefert einen Satz von apparenten Geschwindigkeitskonstanten  $k_i^*$  der einzelnen Zerfälle. Aus diesen lassen sich die Halbwertszeiten ( $\tau = \ln 2/k$ ) der Intermediate sowie deren differentielle Amplitudenspektren  $b_i(\lambda)$  berechnen (Müller und Plessner, 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; 1991).



Dieses Modell besitzt als einziges eine exakte mathematische Lösung. Bei seiner Gültigkeit lassen sich 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):

$$P_i = \sum_{j=1}^i a_{ij} \cdot e^{-k_j t} \quad (5)$$

mit  $P_1(0) = 1; P_{i>1}(0) = 0$  und 
$$a_{ij} = \frac{\prod_{m=1}^{i-1} k_m}{\prod_{\substack{m=1 \\ m \neq j}}^i (k_m - k_j)}$$
 (6)

$P_i(t)$  ist die Wahrscheinlichkeit mit der ein Molekül zur Zeit  $t$  im Zustand  $i$  zu finden ist. Bei  $n$  Reaktionsschritten erhält man für den präexponentiellen Faktor  $a_{ij}$  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. Damit nehmen die Elemente auf der Diagonalen der Matrix den Wert Null an. Für die Relaxation ergeben sich damit  $n$  exponentielle Komponenten.

Die Differenzspektren  $\Delta\varepsilon_i$  der Intermediate  $P_i$  sind gegeben durch  $\Delta\varepsilon_i = \varepsilon_i - \varepsilon_0$ , mit  $\varepsilon_i$  als Absolutspektrum des Zustandes  $P_i$  und  $\varepsilon_0$  als Absolutspektrum des Grundzustandes. Somit folgt aus Gleichung (2) für die Absorptionsänderungen:

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

Die „cycling fraction“  $F_c$  (mit  $F_c = N_c/N_0$ ) 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 Geschwindigkeitskonstanten  $k_i^*$  den intrinsischen  $k_i$  zu, 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 für  $F_c$  kann anhand der Spektren mit hinreichender Genauigkeit abgeschätzt werden. Als einziges Kriterium dient hierbei die Abwesenheit von negativen Absorptionen in den absoluten Spektren der Intermediate (Chizov et al., 1996).

Aus der Kombination der Gleichungen (5) und (7) folgt für die differentiellen spektralen Amplituden  $b_i(\lambda)$ :

$$b_i(\mathbf{I}) = F_c \sum_{j=1}^n a_{ji} \Delta \mathbf{e}_j(\mathbf{I}) \quad (8)$$

Die einzelnen differentiellen spektralen Amplituden  $b_i(\lambda)$  beinhalten jeweils das Spektrum des Intermediates  $P_i$  sowie aller weiteren Intermediate ( $j = i \dots n$ ) bis zum Ende des Photozyklus. Daher lassen sich alle differentiellen Spektren  $\Delta\varepsilon_i(\lambda)$  rekursiv aus den Amplitudenspektren  $b_i(\lambda)$  beginnend mit dem des letzten Intermediates  $P_n$  berechnen:

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

Ein Übergang zwischen zwei spektroskopisch identischen Zuständen ( $\Delta\varepsilon_i = \Delta\varepsilon_{i+1}$ ) kann prinzipiell in einer Amplitude ungleich Null resultieren. Dies würde physikalisch bedeuten, daß dieser spektral unsichtbare Übergang ein mögliches Quasigleichgewicht der Zustände nicht verändert, sondern als geschwindigkeits-bestimmender Schritt fungiert.

Die absoluten Spektren  $\varepsilon_i$  der einzelnen Intermediate ergeben aus der Addition des experimentell leicht zugänglichen Spektrums des Grundzustandes und den einzelnen differentiellen Spektren  $\Delta\varepsilon_i(\lambda)$ :

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

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 unbekanntes 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.

### Abhängigkeit des Photozyklus von der Anregungswellenlänge

Die multixponentielle globale Datenanalyse wurde hier erstmals für die Auswertung von Aktionsspektren transientser Absorptionen angewendet.

Mit dem MEXFIT-Programm wurde jeder Datensatz nach der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme analysiert (Müller & Plessner, 1991; Chizov et al., 1996). Die Datenpunkte wurden hierbei von 1  $\mu$ s bis 20 s nach dem Laserpuls unabhängig für alle drei Absorptionswellenlängen durch eine Summe von Exponentialtermen simuliert.

Das Aktionsspektrum einer spezifischen transienten Absorption entspricht hierbei

ebenfalls der allgemeinen Formel (Gleichung 7):  $\Delta A(\mathbf{I}, t) = \sum_i b_i(\mathbf{I}) e^{-k_i^* t}$ .

Die Variable  $\lambda$  ist allerdings durch die variable Wellenlänge des Aktivierungslichtes besetzt. Die Amplitudenspektren  $b_i(\lambda)$  sind hierbei nicht mit denen der Photozyklusuntersuchungen unter Variation der Absorptionswellenlänge gleichzusetzen.

Sie repräsentieren vielmehr die Amplitude eines Intermediate, festgelegt durch die Auswahl der Wellenlänge der Beobachtung (Absorption), in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge, d.h. mit variierendem Beitrag der verschiedenen Grundzustände.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Heterologe Expression des Cytochrom $ba_3$ in *H. salinarum*

Die Klonierung und Analyse der Transkriptionseinheit der Cytochrom c Oxidase aus *N. pharaonis* durch Mattar (1996) lieferte den Nachweis, daß es sich um einen Enzymkomplex bestehend aus 4 Untereinheiten handelt. Im Sequenzvergleich zu anderen Häm-Kupfer Oxidasen zeigt sich, daß einige hochkonservierte Aminosäuren fehlen, welche als essentiell für den vektoriellen Protonentransport diskutiert werden. Die Charakterisierung der elektrochemischen Elektronentransportkette durch Wittenberg (1995) deutet im weiteren daraufhin, daß als Redoxpartner hier anstelle des üblichen Cytochrom c das Halocyanin, ein kleines über eine Lipidmodifikation in der Membran verankertes blaues Kupferprotein, dient.

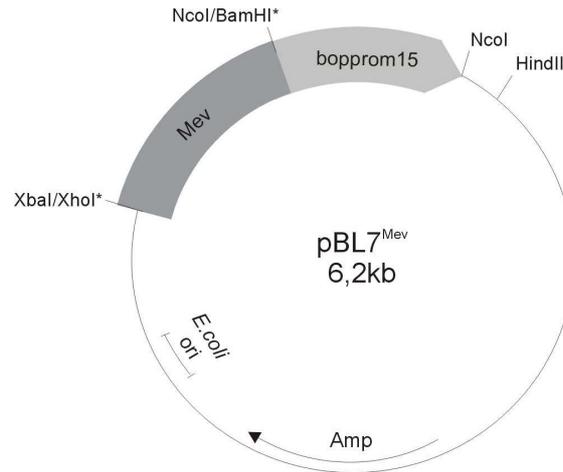
Eine heterologe Expression und Synthese des Cytochrom  $ba_3$  in *H. salinarum* auf der Basis der bekannten Daten soll daher die Möglichkeit für Mutationsstudien im Hinblick auf den aktiven Protonentransport eröffnen. Desweiteren könnten nach einer Reinigung des funktionellen Enzyms, die kinetischen Daten der Wechselwirkung mit dem potentiellen Redoxpartner Halocyanin und mit Sauerstoff ermittelt werden.

##### 3.1.1 Klonierungsstrategie des Cytochrom $ba_3$ für die Transformation von *H. salinarum*

Auf der Grundlage der erfolgreichen Expression von Bakteriorhodopsin-Mutanten und der heterologen Expression des pSR11 aus *N. pharaonis* (Lüttenberg et al., 1998) in *H. salinarum* wurde der von Lüttenberg konstruierte Expressionsvektor pBL7<sup>Novo</sup> verwendet. Das zu exprimierende Gen wird hierbei unter die Kontrolle des natürlichen Promotors des Bakterioopsins (*bop*) gestellt. Der *bop*-Promotor ist der stärkste Promotor der 4 Retinalproteine aus *H. salinarum* und wird in der späten logarithmischen Phase durch Lichteinfall und O<sub>2</sub>-Mangel induziert (Yang und DasSarma, 1990; Shand und Betlach, 1991). Die Verwendung des zur genomischen Sequenz homologen *bop*-Promotors ermöglicht eine ortsspezifische genomische Insertion des verwendeten Expressionsvektors durch homologe Rekombination (Mankin et al., 1992).

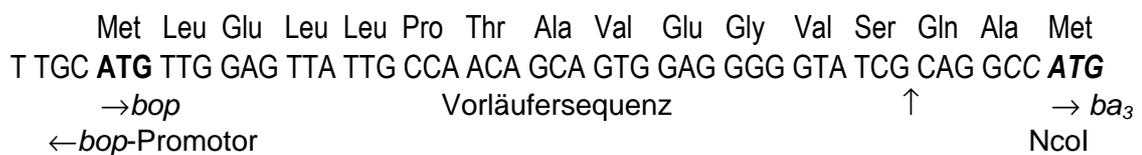
Die Sequenz des genomisch kodierten Bakterioopsins des für die Transformation verwendeten Stammes *H. salinarum* MPK40 ist von Krebs et al. (1993) beschrieben. Durch die Insertion eines synthetischen Oligonukleotids ist das Gen inaktiviert. Die Verwendung des Stammes MPK40 bedingte weiterhin den Austausch der Novobiocin-Resistenz auf dem Expressionsvektor gegen die Mevinolin-Resistenzkassette.

In der folgenden Abbildung ist die resultierende physikalische Karte des für die Klonierung des Cytochrom  $ba_3$  verwendeten Expressionsvektors pBL7<sup>Mev</sup> dargestellt.



**Abb. 14:** Physikalische Karte des Expressionsvektors pBL7<sup>Mev</sup>

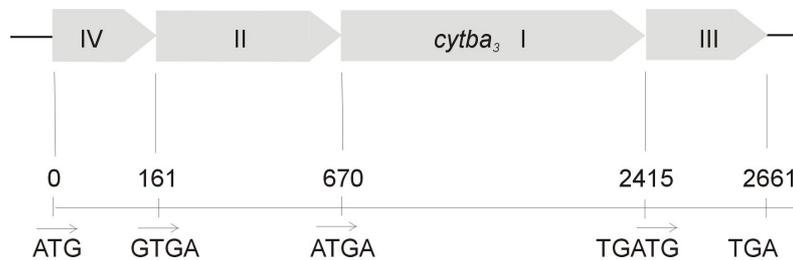
Im nativen System wird BR zunächst als ein Vorläuferprotein synthetisiert, welches erst kurz vor dem Einbau in die Membran posttranslational modifiziert wird, indem die ersten 13 Aminosäuren enzymatisch abgespalten werden (Dunn et al., 1981; Seehra und Khorana, 1984). Diese Vorläufersequenz erhöht nach Xu et al. (1995) die Stabilität der mRNA und ermöglicht damit einen hohen Transkriptionslevel, so daß dieser Bereich für die Klonierung des Cytochrom  $ba_3$  analog zum pSRII (Lüttenberg et al., 1998) beibehalten wurde. Nach Ergebnissen von Heymann et al. (1993) und Ferrando et al. (1993) ist davon auszugehen, daß das resultierende Fusionsprotein ebenfalls posttranslational gespalten wird. Die Vorläufersequenz und die daraus resultierende Aminosäuresequenz ist in Abbildung 15 dargestellt. Für die Synthese des Cytochrom  $ba_3$  wurden verschiedene Klonierungs- und Synthesestrategien verfolgt, wobei die kodierende Sequenz jeweils 2 Aminosäuren stromabwärts der BR-Vorläufersequenz mit einem Methionin beginnt.



**Abb. 15:** Sequenz des N-terminalen Fusionspeptids

Die Sequenz des *bop*-Promotors zusammen mit der Vorläufersequenz ergibt die im Expressionsvektor pBL7<sup>Mev</sup> als *bopprom15* bezeichnete Region. Die posttranslationale Spaltung erfolgt wie markiert nach dem Serin. Das zu exprimierende Gen der Cytochrome Oxidase wird über die Schnittstelle NcoI angefügt.

Im nativen System *N. pharaonis* liegt das Cytochrom  $ba_3$  Operon als Transkriptionseinheit vor. Die einzelnen Leserahmen der 4 Untereinheiten des Enzymkomplexes der Cytochrom Oxidase überlappen direkt mit ihren jeweiligen Start und Stopcodons.



**Abb. 16:** Genomische Organisation des Cytochrom  $ba_3$

Durch Northern Blot und RT-PCR konnte Mattar (1996) zeigen, daß das  $ba_3$ -Operon in Form einer polycistronischen mRNA transkribiert wird. Potentielle ribosomale Bindestellen (*rbs*) ergaben sich im Vergleich mit der 3'-OH Sequenz der 16S rRNA des verwandten *Natronobacterium magadii* (Lodwick et al., 1991) und sind zusammen mit der vollständigen Sequenz des Cytochrom  $ba_3$  in der Dissertation von S. Mattar (1998) dargestellt.

### 3.1.2 Konstruktion der Expressionvektoren

Aus Untersuchungen der Cytochrom Oxidase  $aa_3$  aus *Paracoccus denitrificans* geht hervor, daß der funktionelle Kernkomplex lediglich aus den Untereinheiten I und II besteht. Hender et al. (1991) zeigten, daß der Verlust der beiden kleineren Untereinheiten III und IV die Enzymaktivität nicht beeinträchtigt. Für die Klonierung in den Expressionsvektor wurden eine NcoI-Schnittstelle an der Position des Startcodons des Gens *cytba<sub>3</sub>-II* mittels PCR wie unter 2.6.8 beschrieben eingeführt. Die ribosomale Bindestelle (*rbs*) des Gens *cytba<sub>3</sub>-II* wird somit eliminiert, da das Cytochrom jedoch als Fusionsprotein mit der Vorläufersequenz des BR synthetisiert werden soll, wird sie durch die *rbs* des Bakterioopsins komplementiert.

Für eine Synthese des Cytochrom  $ba_3$  mit Histidin-Tag wurde das Stopcodon des Gens *cytba<sub>3</sub>-I* eliminiert und eine BamHI Schnittstelle eingeführt. Das durch PCR erhaltene DNA-Fragment des Cytochrom  $ba_3$ -Gens, welches die Untereinheiten I und II kodiert, wurde anschließend in den Vektor pet27bmod über die Schnittstellen NcoI/BamHI subkloniert. Die Sequenz des Histidin-Tags wurde mit Hilfe der Oligonukleotide *His2* über BamHI/HindIII eingeführt und die Expressionkassette anschließend über NcoI und HindIII in den Expressionvektor umkloniert.

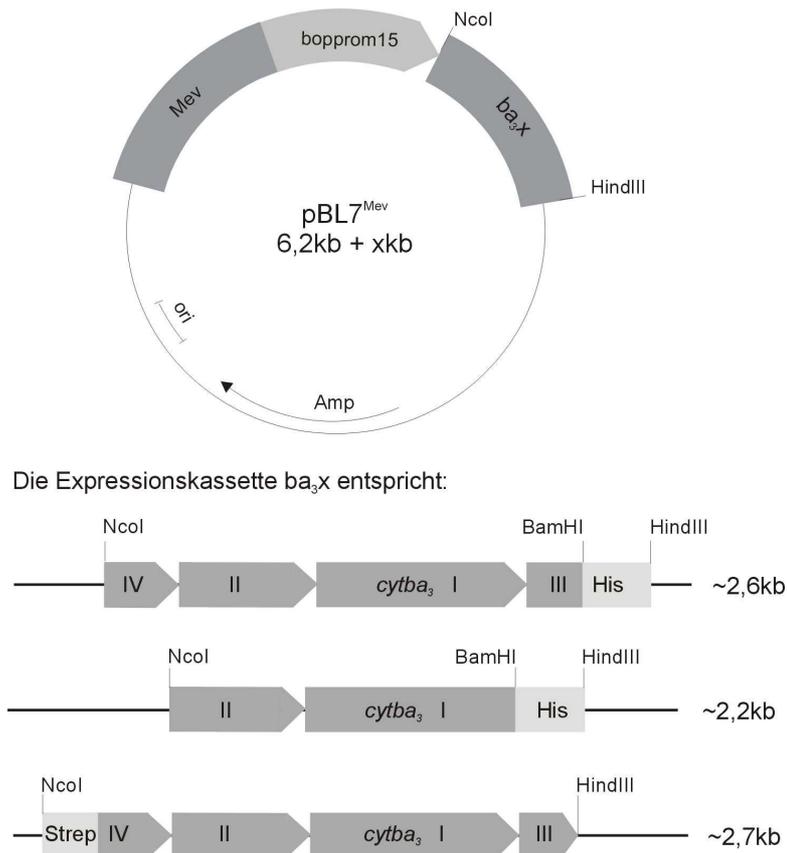
Die sechs angefügten Histidine ermöglichen im folgenden eine leichte und schnelle Reinigung des Proteinkomplexes über Nickel-Affinitätschromatographie. Zur Kontrolle sollte der Cytochrom  $ba_3$  Kernkomplex (I+II) ohne Histidin-Tag synthetisiert und über eine Antikörperreaktion nachgewiesen werden. Hierfür wurde an der Position des Stopcodons des *cytba<sub>3</sub>-I* eine HindIII Schnittstelle eingeführt. Alle Modifikationen wurden durch PCR mit den im Material und Methoden Teil aufgeführten Oligos wie beschrieben vorgenommen und die Sequenzen über DNA-Sequenzierung verifiziert.

Analog wurde der Gesamtkomplex der Cytochrom Oxidase bestehend aus allen 4 Untereinheiten kloniert. Untersuchungen des Cytochrom  $aa_3$  aus *Paracoccus denitrificans* lassen vermuten, daß der Untereinheit III eine „Chaperone-artige“ Funktion bei der Faltung der einzelnen Proteine des Komplexes und bei der Formierung des Gesamtkomplexes zukommt (persönliche Mitteilung M. Lübben).

Das Gen des Cytochrom  $ba_3$  wurde in seiner nativen polycistronischen Anordnung kloniert. Für eine leichtere Aufreinigung wurden wiederum sechs Histidine angefügt, hier bedingt durch die genomische Anordnung an der Untereinheit III. Die Klonierung erfolgte analog zu dem oben erläuterten Verfahren über Insertion der benötigten Schnittstellen durch PCR.

Rumbley et al. (1997) zeigten jedoch, daß diese Modifikation der Untereinheit III im Falle der Cytochrome Oxidase  $bo_3$  aus *E. coli* zu einem inaktiven und potentiell instabilen Komplex führt. Zur Kontrolle wurde daher zum einen der Gesamtkomplex ohne Modifikation kloniert, das Genprodukt sollte später über eine Antikörperreaktion nachgewiesen werden, zum anderen wurde mittels synthetischer Oligonukleotide N-terminal ein Streptavidin-Tag an die Untereinheit IV angefügt, welcher anstelle des Histidin-Tags eine leichtere Reinigung des Komplexes über die entsprechende Affinitätssäule ermöglichen sollte.

Die genauen Schemata aller Klonierungen sind im Anhang aufgeführt.



**Abb. 17:** Schematische Darstellung der verschiedenen Expressionsvektoren. Die Untereinheiten I bzw. III der Komplexe ohne Histidin-Tag enthalten in Abänderung zu denen mit Tag C-terminal ein Stopcodon und die Restriktionsschnittstelle HindIII.

### 3.1.3 Transformation von *H. salinarum* MPK40

Zunächst wurde der Stamm *H. salinarum* MPK40 mit den Expressionsvektoren  $pBL7^{Mev}ba_3I-IIHis$  und  $pBL7^{Mev}ba_3I-II$  über Späroplastenbildung mit Hilfe von EDTA und PEG600 wie beschrieben transformiert. Die Transformationseffizienz differierte stark zwischen verschiedenen Ansätzen, da auch ausgehend von der gleichen Kultur die Zellen jeweils unterschiedlich stark lysierten. Daher kann hier kein Richtwert angegeben werden. Analog wurden die Expressionsvektoren  $pBL7^{Mev}ba_3I-IVHis$  bzw.  $pBL7^{Mev}ba_3I-IV$  und  $pBL7^{Mev}ba_3I-IVStrep$  transformiert.

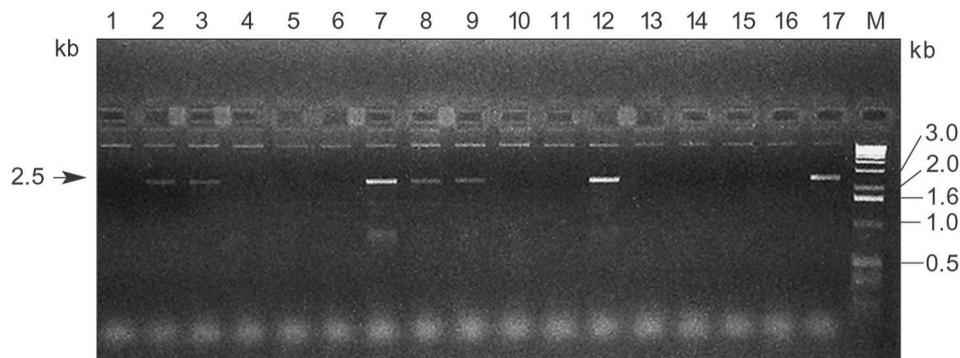
Die erhaltenen Kolonien wurden mittels PCR analysiert, um mögliche Transformanden von spontan-resistenten Klonen zu unterscheiden. Hierfür wurden einzelne Kolonien in 6 mL Selektionsmedium 2 Tage kultiviert, jeweils ein Aliquot sedimentiert und für eine PCR (s. 2.6.8) eingesetzt.

Mit den beiden  $ba_3$ -spezifischen Primern *boppromhin* und *Sph3crev* sollte für das Konstrukt  $ba_3I+II$  ein 2,3 kb großes Fragment der genomisch insertierten Sequenz des Cytochrom  $ba_3$  amplifiziert werden können.

Für die Transformanden des Gesamtkomplex  $ba_3$ I-IV wurde ein 2,5 kb großes PCR-Produkt erwartet. Zur Kontrolle diente genomische DNA des MPK40-Wildtyps (wt). Mit den Primer *boppromhin* und *boppromrev* konnte unter gleichen Bedingungen das erwartete Amplifikat des *bop*-Promotors in der Größe von 350 bp erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Die Primer *boppromhin* und *Sph3crev* ergaben ebenfalls ein prominentes PCR-Produkt jedoch in einer Größe von 1,6 kb, welches leicht von dem Amplifikat positiver Transformanden unterschieden werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Weitere Untersuchungen ergaben, daß dieses PCR-Produkt alleine mittels des Primers *Sph3crev* amplifiziert werden konnte und daher auf unspezifische Hybridisierung zurückzuführen ist.

Exemplarisch ist hier ein Agarosegel der PCR-Produkte der Analyse einer Transformation mit  $pBL7^{Mev}ba_3$ I-IV His und  $pBL7^{Mev}ba_3$ I-IV Strep gezeigt.



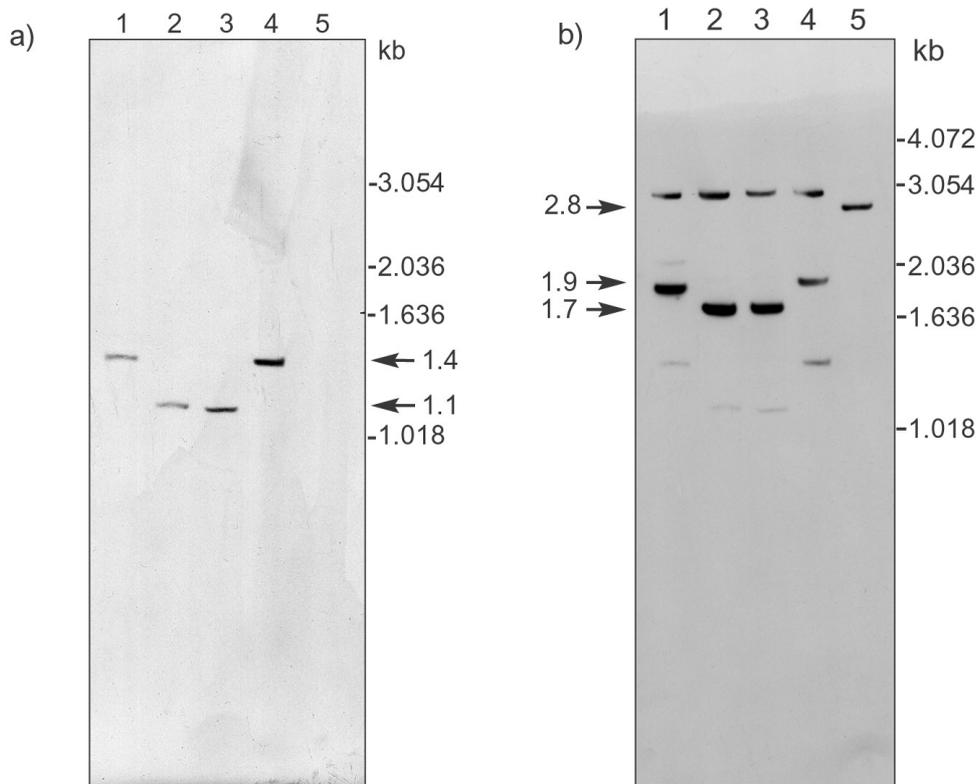
**Abb. 18:** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktionsansätze  
 (1-10) Kolonien der Transformation mit  $pBL7^{Mev}ba_3$ I-IVHis und  
 (11-17)  $pBL7^{Mev}ba_3$ I-IVStrep  
 (M) 1kb-DNA-Marker

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze in Abb. 18 zeigt, daß für die Klone in den Spuren 2,3,7,8,9,12,17 DNA-Fragmente in der erwarteten Größe von 2,5 kb erhalten wurden. Die mit Hilfe der PCR ermittelten Transformanden wurden über Southern-Blot Analyse genauer genetisch charakterisiert.

### 3.1.4 Genetische Charakterisierung der Transformanden

Aus den nach der PCR-Analyse positiven Transformanden wurde die Gesamt-DNA isoliert und mit *SalI* restringiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Ergebnisse der Southern-Blot-Analyse der mit den Plasmiden  $pBL7^{Mev}ba_3$  I-II, - $ba_3$ I-II His, - $ba_3$ I-IVHis und - $ba_3$ I-IVStrep transformierten Klone mit den Sonden *bopprom* (350 bp) und *Cytba<sub>3</sub>* (353 bp) sind in Abb. 19 dargestellt. Die Sonde *bopprom* wurde wie unter 2.6.11 beschrieben

mittels einer PCR mit DIG-markierten Nukleotiden des Vektors pBL7<sup>Mev</sup>ba<sub>3</sub>I-IVHis mit den Primern *boppromhin* und *boppromrev* generiert. Die Synthese der Sonde *Cytba<sub>3</sub>* erfolgte analog mit den Primern *Sphcoxhin* und *Sph3crev*. Die Analyse der pBL7<sup>Mev</sup>ba<sub>3</sub>I-IV transformierten Klone wurde analog durchgeführt und ist hier nicht gezeigt.



**Abb. 19:** Southern-Blot Analyse der mit SalI restringierten genomischen DNA der Transformanten des Stammes *H. salinarum* MPK40.

- (1) MPK40/ba<sub>3</sub>I-IVHis,                      (2) MPK40/ba<sub>3</sub>I-IIHis,  
 (3) MPK40/ba<sub>3</sub>I-II,                        (4) MPK40/ba<sub>3</sub>I-IVStrep,  
 (5) MPK40 Wildtyp

a) Sonde *Cytba<sub>3</sub>* (25ng/µL), Expositionszeit des Films 20 min

b) Sonde *bopprom* (25ng/µL), Expositionszeit des Films 35 min

stringente Waschbedingungen: 65°C, 0,1 x SSC, 0,1 % SDS

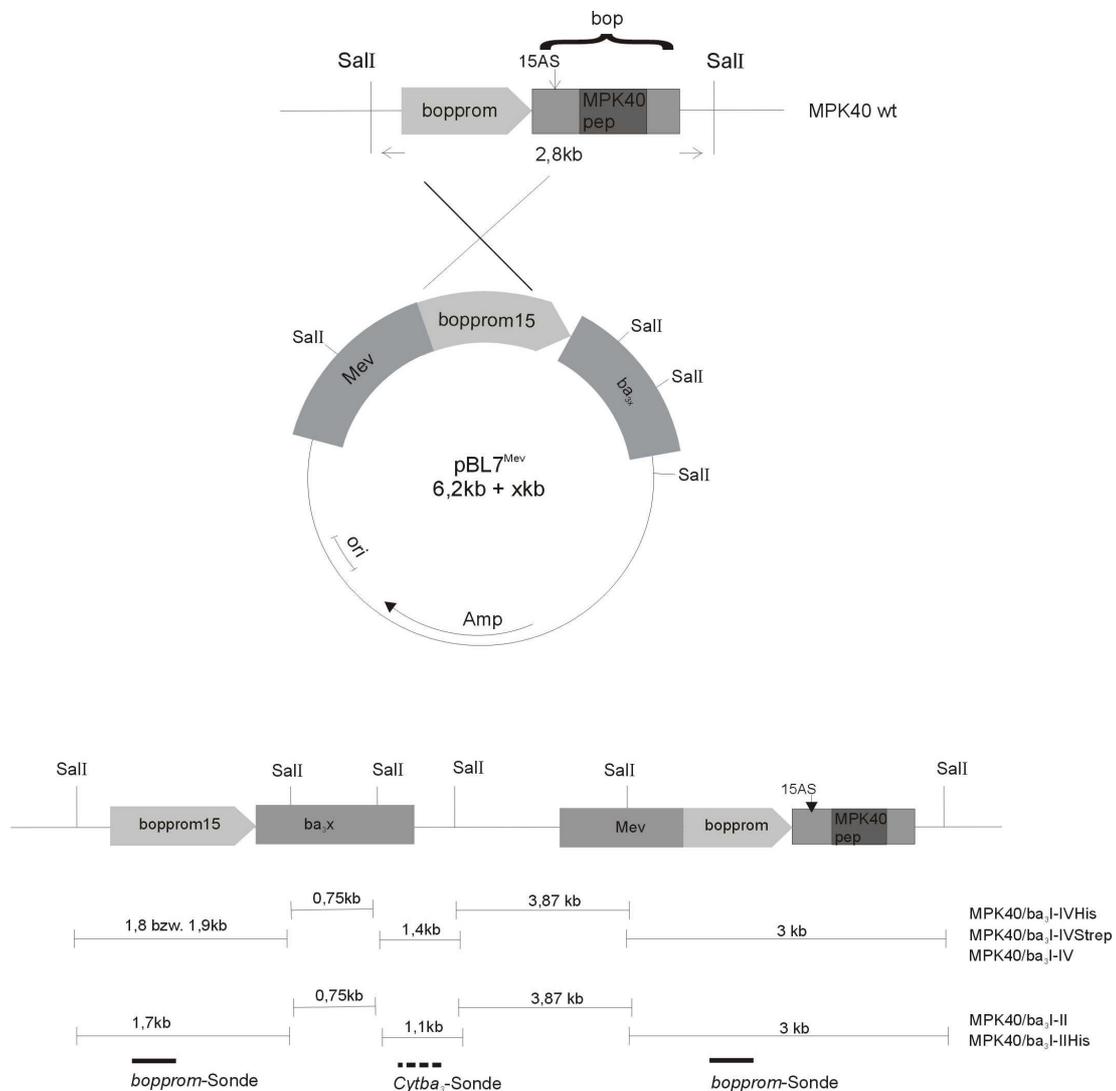
Die hybridisierenden Banden sind mit Pfeilen und der korrespondierende Größe des DNA-Fragmentes gekennzeichnet.

Zunächst wurde der Southern-Blot mit der für das Cytochrom ba<sub>3</sub> spezifischen Sonde *Cytba<sub>3</sub>* hybridisiert (a). Der Wildtyp MPK40 zeigt hierbei wie erwartet kein Signal und für die Transformanten in den Spuren 1,2,3 und 4 ergibt sich jeweils eine positive Bande in der Größe von 1,1 kb bzw. 1,15 kb für die Konstrukte ba<sub>3</sub>I-II bzw. ba<sub>3</sub>I-IIHis und für die Transformanten MPK40/ba<sub>3</sub>I-IVHis und MPK40/ba<sub>3</sub>I-IVStrep je eine Bande in der Größe von 1,4 kb.

Derselbe Blot wurde nach Entfernen der *Cytba<sub>3</sub>* Sonde anschließend mit der Sonde *bopprom* hybridisiert (b). Hier ergibt sich für den Wildtyp MPK40 ein positives Signal für den genomisch kodierten *bop*-Promotor in einer Größe von 2,8 kb. Die Transformanten

zeigen jeweils zwei hybridisierende Banden, einmal für den bereits im Wildtyp vorhandenen *bop*-Promotor in der Größe von 3 kb und desweiteren für den durch die genomische Insertion des Plasmids eingeführten in einer Größe von 1,9 kb bzw. 1,8 kb für die Transformanden MPK40/ba<sub>3</sub>I-IVStrep bzw. MPK40/ba<sub>3</sub>I-IVHis, sowie für die beiden Transformanden MPK40/ba<sub>3</sub>I-II mit und ohne Histidin-Tag in einer Größe von 1,7 kb. Die schwachen Signale bei 1,1 kb und 1,4 kb sind auf eine unvollständige Entfernung der *Cytba<sub>3</sub>*-Sonde zurückzuführen.

Die Auswertung der Ergebnisse der Southern-Blots in Kombination mit den bekannten Schnittstellen lassen jeweils auf eine ortsspezifische Rekombination des gesamten Expressionsvektors pBL7ba<sub>3</sub>x schließen und es ergibt sich somit folgende genomische Organisation der Transformanden:

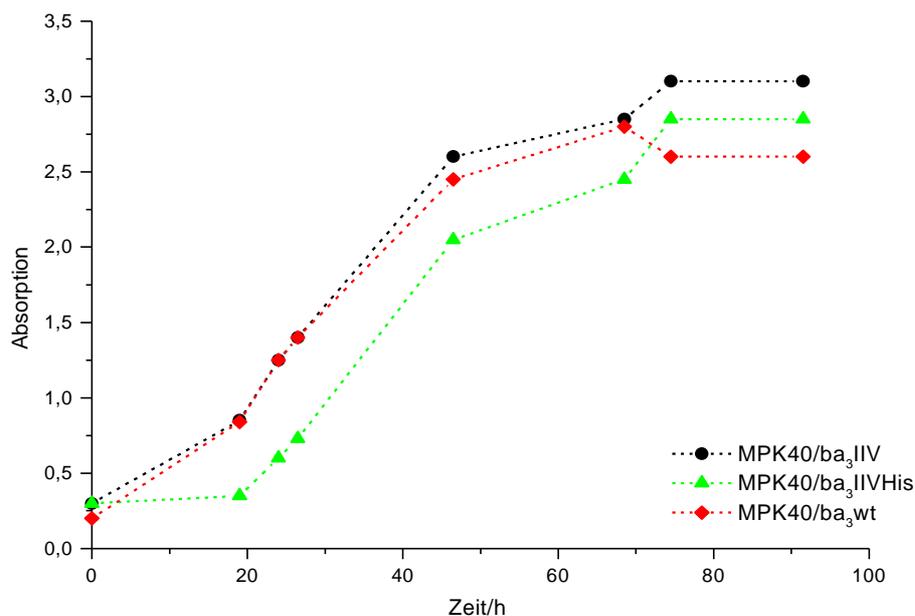


**Abb. 20:** Ortspezifische homologe Rekombination („Cross-over-event“) der Expressionsvektoren *pBL7<sup>Mev</sup>ba<sub>3</sub>-x* in den *bop*-Locus von *H. salinarum* MPK40 und die daraus resultierende genomische Organisation der Transformanden.

Die Transformanten wurden im folgenden für die Synthese des Cytochrom  $ba_3$  gemäß der klonierten unterschiedlichen Untereinheitenzusammensetzung in größerem Maßstab angezogen.

### 3.1.5 Synthese des Cytochrom $ba_3$ durch heterologe Expression in *H. salinarum* MPK40

Zur Synthese des Cytochrom  $ba_3$  wurde jeweils eine Einzelkolonie der Transformanten des *H. salinarum* Stammes MPK40 unter Selektionsdruck angezogen. Ausgehend von einer 5 mL Kultur wurden die Zellen in Komplexmedium durch mehrmaliges Überimpfen in bis zu 2 - 4 L kultiviert. Der Zeitpunkt der Ernte wurde anhand der Wachstumskurven bestimmt. Um eine Induktion des *bop*-Promotors zu gewährleisten, wurden die Kulturen in der stationären Phase und damit unter Sauerstoffmangel mit Belichtung bis zu 24 h geschüttelt. In Abb. 21 sind exemplarisch die Wachstumskurven der Transformanten MPK40/ $ba_3$ I-IVHis und MPK40/ $ba_3$ I-IV sowie die des Wildtyps gezeigt.



**Abb. 21:** Wachstumskurven vom MPK40wt, MPK40/ $ba_3$ I-IVHis, MPK40/ $ba_3$ I-IV in 2 L Kulturvolumen

Nach Ernte der Zellen und Isolierung der Membran wurde zunächst ein Absorptionsspektrum der in Dodecylmaltosid (DM) solubilisierten Membran aufgenommen. Da für die Expression kein Cytochrom-defizienter Stamm verwendet wurde, zeigte das Membransolubilisat des Wildtyps *H. salinarum* MPK40 bereits eine Absorption in dem für Cytochrome typischen Bereich von 400 – 430 nm (Soret-Bande). Auch im Vergleich mit den Absorptionsspektren der Solubilisate der Transformanten konnte so keine für das Cytochrom  $ba_3$  typischen Bande identifiziert werden.

Die Cytochrom  $ba_3$ -Komplexe mit Histidin bzw. Streptavidin-Tag sollten daher zunächst über die entsprechenden Affinitätssäulen angereichert werden. Gleichzeitig wurde ein immunologischer Nachweis der Cytochrome Oxidase mit Cytochrome  $ba_3$  spezifischen Antikörper aus Kaninchen angestrebt.

### 3.1.6 Reinigung der Proteinkomplexe

Die Membransolubilisate des Cytochrom  $ba_3$  Komplexes bestehend aus den Untereinheiten I und II sowie des Gesamtkomplexes (Untereinheiten I-IV), beide mit angefügtem Histidin-Tag, sollten durch eine Affinitätschromatographie über das Nickel-NTA-Material der Firma Qiagen angereichert werden.

Die Bindung der Proteine an die Nickel-Matrix erfolgte hierbei durch Schwenken der Membransolubilisate mit der Gelmatrix für 3 h bei 4°C. Dies garantiert gerade für kleine Proteinmengen eine höhere Bindungswahrscheinlichkeit im Gegensatz zum normalen Verfahren, indem die Probe im Durchflußverfahren an das äquilibrierte Säulenmaterial gebunden wird. Das Nickel-Matrix wurde anschließend in eine Säule überführt und zunächst mit dem Äquilibrierungspuffer und unter Zusatz geringer Imidazolkonzentration (s. 2.7.7) zum Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren. Eine Verfärbung des Säulenmaterials in der für das native Cytochrom  $ba_3$  typischen grünlich-braunen Farbe konnte nicht beobachtet werden. Trotzdem wurde das potentiell gebundene Cytochrom  $ba_3$  mit 200 mM Imidazol eluiert. Es wurden die Absorptionsspektren aller Fraktionen aufgenommen, jedoch zeigten weder die Waschfraktionen noch das Eluat eine für die Cytochrom c Oxidase typische Absorptionsbande bei 413 nm (Soret-Bande). Das Eluat zeigte zudem nicht einmal die für Proteine mit aromatischen Aminosäuren typische Absorptionsbande bei 280 nm. Die Analyse des Eluates über SDS-Gelelektrophorese bestätigte, daß diese Fraktion kein Protein enthält. Folglich ist ein Verlust der prostetischen Gruppen, des Häm a und b, oder ein Zerfall des Komplexes während der Reinigung auszuschließen.

Von einer Reinigung der Komplexe ohne Tag mittels herkömmlicher Chromatographiemethoden wie Anionenaustauschchromatographie wurde abgesehen. Da kein Cytochromdefizienter Stamm für die Synthese verwendet wurde, wäre eine Trennung des Cytochrom  $ba_3$  von den intrinsischen Cytochromen, speziell der Cytochrom Oxidase  $aa_3$  aus *H. salinarum*, schwierig und zeitaufwendig. Die Membransolubilisate dieser Transformanten und die des MPK40/ $ba_3$ I-IV Strep wurden zunächst nur für den immunologischen Nachweis verwendet um auszuschließen, daß das Anfügen des Histidin-Tags an die Untereinheit I bzw. III nicht zu Problemen bei der Synthese oder der Komplexbildung und Insertion in die Membran führt.

### 3.1.7 Immunologischer Nachweis des Cytochrom $ba_3$

Für den Nachweis selbst kleinster Mengen eines spezifischen Proteins bietet sich aufgrund der hohen Empfindlichkeit ein immunologischer Nachweis, ein Western-Blot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers an.

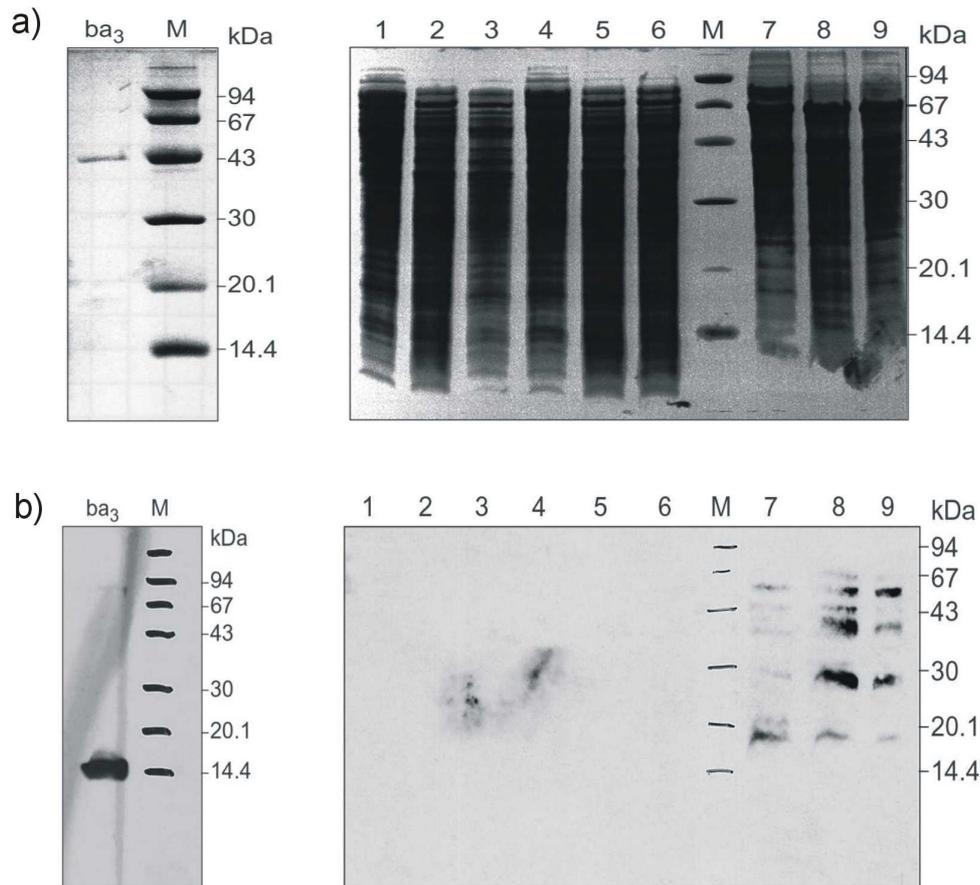
Für die Immunisierung der Kaninchen wurde das native aus *N. pharaonis* isolierte und gereinigte Cytochrom  $ba_3$  verwendet. Wie die meisten archaebakteriellen Proteine weist die Cytochrom Oxidase eine hohe Anzahl geladener Aminosäuren auf und sollte daher ein großes antigenes Potential besitzen, welches die Bildung polyklonaler Antikörper erleichtert. Für die Herstellung des Antiserums wurde hier das Cytochrom  $ba_3$  in DM solubilisiert ohne weiteren Zusatz als Antigen appliziert.

Nach der primären Immunisierung der Kaninchen nach den üblichen Methoden wurde der Titer der Blutseren der verschiedenen Immunisierungsstufen in einem ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay) wie unter 2.8.3 beschrieben überprüft. Als sekundärer Antikörper wurde der aus Ziege gegen Kaninchen verwendet, an dem die alkalische Phosphatase gekoppelt ist, welche dann eine Farbreaktion katalysiert. Selbst bei einer hohen Verdünnung von  $2^{21}$  des primären Antikörpers konnte hier eine Farbreaktion im Sättigungsbereich der Intensität erreicht werden. Der Antikörper besitzt somit eine hohe Affinität zum verwendeten Antigen dem Cytochrom  $ba_3$ , so daß das Serum noch in einer Verdünnung von 1 : 5000 eine hinreichende Empfindlichkeit für den Nachweis der antigenen Proteine im Western-Blot besitzen sollte.

Für den Nachweis, daß der Cytochrom  $ba_3$  Komplex jeweils in der durch die Klonierung bedingten Zusammensetzung von den Transformanden synthetisiert wurde, wurden jeweils 10-15  $\mu$ L des Gesamtzellaufschlusses ( $V = 50$  mL) bzw. je 10  $\mu$ L des isolierten Zytoplasma und der Membranfraktion auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen (Abb.22).

Zur Kontrolle wurden die gleichen Mengen der Fraktionen des Wildtyps MPK40 und 2  $\mu$ g des nativen gereinigten Cytochrom  $ba_3$  auf das Gel aufgetragen. Anschließend an die Elektrophorese des SDS-Gels wurde im Semi-Dry Verfahren für 20 min geblottet ( $5$  mA/cm<sup>2</sup>). Der Western-Blot wurde wie unter 2.8.4 beschrieben entwickelt. Der primäre Antikörper (Anti-Cytochrom  $ba_3$  aus Kaninchen) wurde hierbei in einer Verdünnung von 1 : 5000 verwendet und der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen aus Ziege) in einer Verdünnung von 1 : 2000. Nach Inkubation des Blots mit der Chemilumineszenzlösung für eine Minute wurde die Luminiszenzreaktion der an die antigenen Proteine gebundenen Antikörper durch Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

In der folgenden Abbildung ist stellvertretend ein SDS-Gel mit dem entsprechenden Westernblot der Transformanden MPK40/ $ba_3$ I-IV und MPK40/ $ba_3$ I-IVHis im Vergleich mit dem Wildtyp MPK40 und dem nativen Cytochrom  $ba_3$  gezeigt.



**Abb. 22:** a) SDS-Gel der Fraktionen b) entsprechender Westernblot des SDS-Gels  
Gesamtzellaufschluß: Zytosol: Membransolubilisat:  
(1) (4) (7) Transformante  $ba_3$ I-IVHis  
(2) (5) (8) Transformante  $ba_3$ I-IV  
(3) (6) (9) Wildtyp MPK40  
( $ba_3$ ) Cytochrom  $ba_3$  nativ (1min belichtet)  
(M) Proteinmarker  
Belichtungszeit 30 s, Cytochrom  $ba_3$  nativ 1 min

Im rechten Gel sind der Gesamtzellaufschluß, das Zytoplasma und die Membranfraktionen des Wildtyps MPK40 und der Transformanden MPK40/ $ba_3$ I-IV sowie MPK40/ $ba_3$ I-IVHis aufgetragen. Im Ausschnitt des linken Gels ist das Bandenmuster des nativen gereinigten Cytochrom  $ba_3$  gezeigt. Für das native Cytochrom  $ba_3$  ist hier nur eine Bande in der Größe von 40 kDa für die Untereinheit I erkennbar. Die Untereinheit II (apparentes Molekulargewicht 28 kDa im SDS-Gel) ist aufgrund schlechterer Anfärbbarkeit (Mattar 1996) hier nicht erkennbar, da nur 2  $\mu$ g Cytochrom  $ba_3$  aufgetragen wurden.

Die beiden kleinen Untereinheiten in einer berechneten Größe von 8,6 kDa (III) und 5,9 kDa (IV) sind hier ebenfalls nicht erkennbar, da sie während der herkömmlichen Reinigung stark abgereichert werden.

Im Westernblot zeigt sich, daß gerade eine dieser kleinen Untereinheiten bzw. beide den antigenen Charakter des Cytochrom  $ba_3$  zu bestimmen scheinen. Eine genauere

Zuordnung konnte hier nicht getroffen werden. Der Westernblot zeigt für die verschiedenen Fraktionen der Transformanden keine prominente Bande. In den Spuren 7 - 9 sind die Membransolubilisate aufgetragen. Das Bandenmuster der Transformanden zeigt hierbei keine Abweichung zu dem des Wildtyps, so daß die Signale einer Kreuzreaktion mit den Proteinen des *Halobacterium salinarum* zuzuordnen sind. Dies läßt sich darauf zurückführen, daß das für die Immunisierung verwendete Cytochrom  $ba_3$  bedingt durch die Reinigung aus dem nativen Organismus möglicherweise noch andere Proteine unterhalb der Nachweisgrenze im SDS-Gel enthielt, welche nun zu dieser Kreuzreaktion führen können. Desweiteren ist auch eine Kreuzreaktion mit der Cytochrom Oxidase aus *H. salinarum* MPK40 möglich, hier aber durch das von Blot zu Blot unterschiedliche Bandenmuster nicht identifizierbar. In den Spuren der Gesamtzellaufschlüsse sind hingegen keine Signale sichtbar, da hier eine geringere Menge der Membranproteine im Vergleich zu den Solubilisaten aufgetragen wurde. Die diffusen Signale in den Spuren 3 und 4 sind auf unspezifische Wechselwirkungen mit der Blotmembran zurückzuführen.

Letztendlich zeigt sich im Vergleich aller Transformanden mit dem nativen Cytochrom  $ba_3$  keine Bande in der für das Cytochrom typischen Größe. Von einer Überprüfung der Transformanden MPK40/I-II(His) mit dem hier verwendeten Antikörper wurde aufgrund der fehlenden antigenen Untereinheiten III und IV abgesehen.

Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze von 0,01 µg (mittels Dot-Blot ermittelt) ergibt sich somit eine Synthesemenge des Cytochrom  $ba_3$  in den Transformanden von weniger als 5 µg/L, d.h. es wird praktisch kein Cytochrom  $ba_3$  synthetisiert. Auch eine Modulation der Kulturbedingungen zur Optimierung der Synthese wie die Variation der Schüttelgeschwindigkeit, des Lichteinfalls sowie des Zeitpunktes der Ernte führten nicht zum Erfolg.

Damit blieb letztendlich nur nachzuweisen, ob die fehlende Synthese an der Aktivierung des *bop*-Promotors und damit der Synthese der mRNA scheitert oder das synthetisierte Protein durch die proteolytische Aktivität des verwendeten Stammes abgebaut wird.

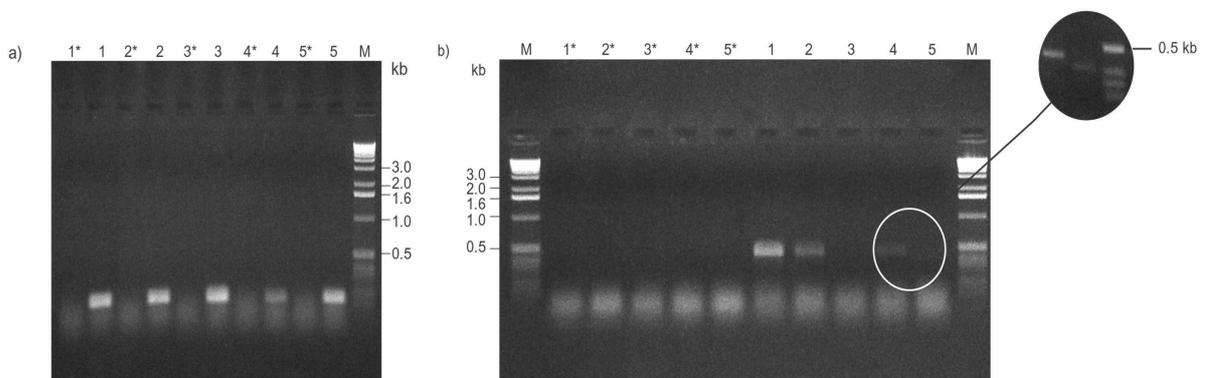
### 3.1.8 RT-PCR Analyse der Transformanden

Für die Synthese des Cytochrom  $ba_3$  Komplexes in unterschiedlicher Zusammensetzung wurde der aus *H. salinarum* stammende *bop*-Promotor vor das zu exprimierende Gen kloniert. Die Induktion des Promotors erfolgt in der stationären Wachstumsphase einer Kultur, d.h. in semiaeroben Atmosphäre, unter Lichteinfall. Um den Nachweis zu erbringen, daß unter den gewählten Kulturbedingungen (s. 2.7.1) die messenger-RNA des Cytochrom  $ba_3$  in den Transformanden synthetisiert wurde, wurde eine reverse

Transkription (RT) auf der Basis isolierter Gesamtzell-RNA mit anschließender PCR durchgeführt.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, zunächst eine cDNA-Synthese mit einem revers orientierten („antisense“) Primer durchzuführen. Die auf der Basis der mRNA synthetisierten cDNA kann in einer nachfolgenden PCR dem in Leserichtung orientierten („sense“) Primer nur dann als Matrize dienen, wenn beide Primer eine identische mRNA erkennen. Um Fehlinterpretationen durch Verunreinigungen mit genomischer DNA in der Gesamtzell-RNA trotz DNaseI Verdau zu vermeiden, wurde als Kontrolle jeweils eine RT-Reaktion ohne Reverse Transkriptase durchgeführt. Kann in der anschließenden PCR ein Produkt amplifiziert werden, ist dieses eindeutig auf eine Verunreinigung durch genomische DNA zurückzuführen.

Wie von Stephan Mattar (1996) gezeigt wurde, wird das Gen der Cytochrom Oxidase bestehend aus den 4 Untereinheiten als polycistronisches Transkript abgelesen. Sollte es möglich sein mit den Primern *Sph3crev* und *Sphcoxin*, beide lokalisiert auf der Untereinheit I, ein Amplifikat in der PCR zu erhalten, dient dies als Nachweis für Transkription des gesamten Komplexes. Zur Kontrolle wurde eine RT-PCR mit der Gesamtzell-RNA des Wildtyps MPK40 mit den oben genannten Primern durchgeführt, um Produkte durch Hybridisierung der Primer an anderer Stelle zu unterscheiden. Desweiteren wurde als Positivkontrolle für die Aktivierung des *bop*-Promotors eine RT-PCR der Gesamtzell-RNA der Transformanten und des Wildtyps mit den Primern *BR hin* und *BRrev* durchgeführt, mit denen die mRNA des inaktiven genomisch kodierten Bakterioopsin nachgewiesen werden kann. Dies dient außerdem zum Nachweis einer ausreichenden Qualität der isolierten RNA. In der folgenden Abbildung sind die gelelektrophoretischen Auftrennungen der PCR-Ansätze gezeigt.



**Abb. 23:** RT-PCR mit den Primern a) *BRrev* (RT), *BRrev* + *BRhin* (PCR)

b) *Sph3crev* (RT), *Sph3crev* + *Sphcoxin* (PCR)

(1) MPK40/*ba*<sub>3</sub>I-IIHis (2) MPK40/*ba*<sub>3</sub>I-IVHis

(3) MPK40/*ba*<sub>3</sub>I-IIHis (4) MPK40/*ba*<sub>3</sub>I-IVStrep

(5) MPK40 Wildtyp

Die mit \* gekennzeichneten Ansätze wurden zur Kontrolle ohne Reverse Transkriptase in der RT Reaktion durchgeführt.

---

Für alle Transformanden (MPK40/ba<sub>3</sub>I-II, ba<sub>3</sub>I-IIHis, ba<sub>3</sub>I-IVHis, ba<sub>3</sub>I-IVStrep) wurde je eine Bande in der erwarteten Größe von 460 bp mit den Cytochrom ba<sub>3</sub> spezifischen Primern (b) erhalten. Im PCR-Ansatz der Wildtyp MPK40 RNA, welche mit dem Primer *Sph3crev* in die cDNA übersetzt wurde, zeigt sich nur eine schwache Bande in einer Größe von nur 390 bp (vgl. vergrößerter Ausschnitt in Abb. 23), die deutlich von dem Signal der Transformanden zu unterscheiden ist. Die RT-PCR Ansätze ohne Reverse Transkriptase zeigten keine Bande, so daß ein falsches positives Signal durch eine Verunreinigung mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte.

Die RT-PCR mit den Bakterioopsin spezifischen Primern (a) zeigt für die Transformanden und den Wildtyp eine schwache Bande im Bereich von 200 bp (berechnete Größe: 185 bp) und liegt im unteren Trennbereich des verwendeten 1,5 %igen Agarosegels. Trotzdem ist ein Unterschied zu der noch diffuseren Bande in den Ansätzen ohne Reverse Transkriptase erkennbar, die durch die im Ansatz enthaltene RNA (~250 ng) und den Primern hervorgerufen wurde.

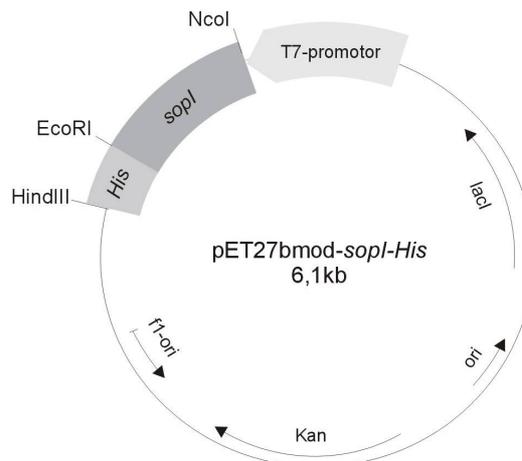
Somit konnte nachgewiesen werden, daß der verwendete *bop*-Promotor unter den angegebenen Bedingungen aktiviert wird und die nachfolgende Genabfolge kodierend für das Cytochrom ba<sub>3</sub> unabhängig von der Untereinheitenzusammensetzung transkribiert wird. Über die Stabilität des mRNA Transkriptes kann hier jedoch keine Aussage gemacht werden.

## 3.2 Synthese und Charakterisierung des SRI und Htrl

### 3.2.1 Klonierung des SRI und tHtrl für die Synthese in *E. coli*

Für die Synthese der im folgenden verwendeten Proteine wurde der Expressionsvektor pet27bmod verwendet. Dieser leitet sich von den pET-Vektoren des von Studier und Moffat (1986) entwickelten Expressionssystem ab. Das interessierende Gen wird hierbei im Expressionsvektor unter die Kontrolle des aus dem Bakteriophagen T7 stammenden Promotors, des sogenannten T7 Promotors, gestellt. Dieser Promotor wird durch die T7-RNA-Polymerase induziert, welche in dem verwendeten Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) (Grodberg & Dunn, 1988) chromosomal kodiert ist. Die Induktion des T7-RNA-Polymerase Gens unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors erfolgt gezielt durch Zugabe von Isopropylthiogalactosid (IPTG) zum Kulturmedium. Dieses Expressionssystem ermöglicht es das Zielgen selektiv in hoher Rate zu exprimieren und somit große Mengen Protein zu synthetisieren.

Als Expressionsvektor für das *sopI* wurde das Plasmid pET27bmod-*sopI*-His (Schmies et al. 2000) verwendet.



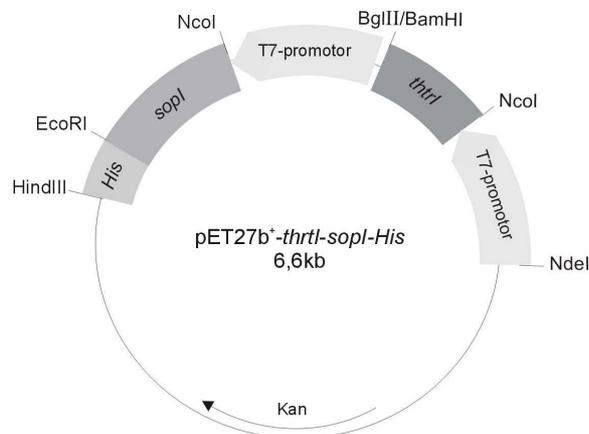
**Abb. 24:** Physikalische Karte des Expressionvektors pET27bmod-*sopI*-His

Durch die Fusion mit einem Histidin-Tag und die Einführung der Schnittstellen NcoI und EcoRI ergibt sich folgende zum nativen SRI N-terminal und C-terminal modifizierte Peptidsequenz:

SRI-His:  $^1$ MDAV.....TAADE $^{240}$ NSHHHHHHH

Für die Untersuchung der Wechselwirkung des Rezeptors SRI mit seinem Transducer HtrI sollten die beiden Gene *sopl* und *htrl* koexprimiert werden. Hierfür wurde eine verkürzte Form des *htrl* im folgenden *thtrl* genannt gewählt. Wie Perazzona et al. (1996) zeigten, sind die ersten 147 Aminosäuren des HtrI, bestehend aus den beiden transmembranen Helices (TM1 + TM2) und einem kurzen zytoplasmatischen Bereich, ausreichend für eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor SRI. Am Beispiel des sensorischen Rhodopsins II (pSRII) aus *Natronobacterium pharaonis* konnte A. Wegener (2000) zeigen, daß eine Koexpression mit dem Transducer *phtrII* möglicherweise bereits in der Wirtszelle zur Bildung des stabilen Rezeptor-Transducerkomplexes führt. Dies ermöglichte anschließend die Reinigung des pSRII im Komplex mit dem pHtrII durch Affinitätschromatographie über nur einen Histidin-Tag an einer Komponente in stöchiometrischer Zusammensetzung.

Für die Synthese des SRI-His-tHtrI Komplexes wurde das Gen des SRI-His in den Expressionsvektor pET27b<sup>+</sup>-*thtrl* (zur Verfügung gestellt von A. Wegener; physikalische Karte im Anhang) kloniert. Hierfür wurde der Vektor pET27bmod-*sopl*-His mit den Restriktionsenzymen BglII/HindIII geschnitten. Das gelelektrophoretisch gereinigte DNA-Fragment des *sopl*-His mit dem vorgeschalteten T7 Promotor in einer Größe von 740 bp wurde anschließend mit dem BamHI/HindIII geschnittenen Vektor pET27b<sup>+</sup>-*thtrl* ligiert. Es resultiert der Expressionsvektor pET27b<sup>+</sup>-*thtrl*-*sopl*-His:

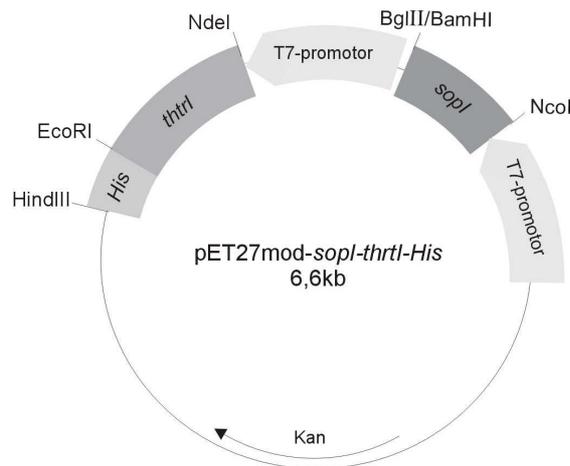


**Abb. 25:** Physikalische Karte des Expressionsvektors *pet27b<sup>+</sup>-thtrl-sopl-His*. Zur Vereinfachung sind weitere Steuerungsregionen weggelassen.

Die terminalen Proteinsequenzen des verkürzten tHtrI sind:

tHtr:                   <sup>1</sup>MTIAWAR.....EREAREL<sup>147</sup>

Die Synthese und Reinigungsstrategie des Komplexes wurde zusätzlich variiert, indem der Histidin-Tag an den verkürzten Transducer tHtrl anstelle des SRI angefügt wurde. Eine Reinigung über den Histidin-Tag des tHtrl bietet den Vorteil, daß kein nicht-komplexiertes SRI angereichert wird, welches besonders für anschließenden Photozyklusmessungen essentiell ist. Der Expressionsvektor *pet27bmod-sopl-thtrl-His* wurde analog zu dem oben erläuterten Verfahren ausgehend von den Vektoren *pET27bmod-htrl-His* (zur Verfügung gestellt von A. Wegener; Klonierungsschema und schematische Karte im Anhang) und *pET27bmod-sopl* (s. unten) konstruiert.



**Abb. 26:** Physikalische Karte des Expressionsvektors *pet27b<sup>+</sup>-sopl-thtri-His*. Zur Vereinfachung sind weitere Steuerungsregionen weggelassen.

Der Vektor *pET27bmod-htrl-His* wurde zusätzlich für eine separate Expression des *thtr-His* mit anschließender Reinigung verwendet.

Durch die eingeführten Modifikationen ergeben sich folgende terminale Peptidsequenzen:

tHtrl-His: <sup>1</sup>MTIAWAR.....EAREL<sup>147</sup>NSHHHHHH<sup>156</sup>

Für die unabhängige Synthese des SRI mit anschließender Reinigung im Komplex mit dem tHtrl-His wurde das *sopl* ohne Histidin-Tag in den Vektor *pET27bmod* kloniert.

Über eine PCR mit den Primern *T7prom* und *srlwt(-his)* wurde das SRI-Gen ausgehend von dem Vektor *pET27bmod-sopl-His* modifiziert. Durch die Einführung zweier Stopkodons am C-Terminus der für das SRI kodierenden Sequenz und einer BamHI-Schnittstelle stromabwärts wurde die Sequenz des Histidin-Tags elementiert. Das DNA-Fragment des *sopl* wurde anschließend mit dem NcoI/BamHI restringierten Vektor *pET27bmod* ligiert. Die terminale Proteinsequenzen entsprechen denen des SRI-Wildtyps:

SRI: <sup>1</sup>MDAV.....EATAAD<sup>239</sup>

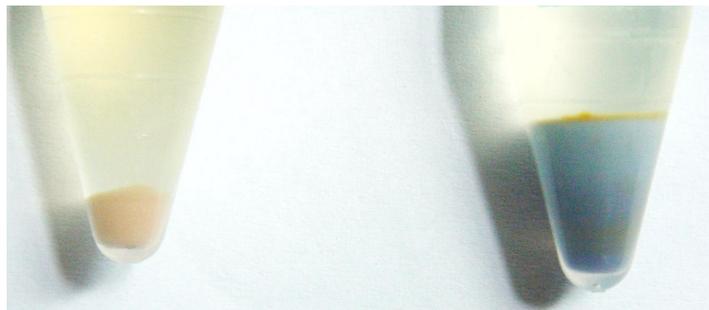
### 3.2.2 Präparation des SRI und tHtrl

#### Präparation des SRI-His

Die sensorischen Rhodopsine SRI und SRII sind im Vergleich zu den beiden Ionenpumpen, Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin, aus *H. salinarum* sehr empfindlich gegenüber externen Bedingungen, wie Salzkonzentration und pH-Wert.

Shimono et al. (1997) gelang es erstmalig ein sensorisches Rhodopsin, das pSRII, in *E. coli* funktionell zu exprimieren. Die Synthese und Reinigung des pSRII konnte anschließend von Hohenfeld et al. (1999) optimiert werden. Auf der Basis dieser Untersuchungen entwickelten Schmies et al. (2000) die heterologe Expression des SRI in *E. coli* und dessen Reinigung. Zur Stabilisierung des Proteins enthielten alle verwendeten Puffer 4 M NaCl. Die Reinigung erfolgte in einem Schritt über Nickel-Affinitätschromatographie über einen angefügten Histidin-Tag. Diese Chromatographie-Methode bietet den Vorteil, daß sie gegenüber hohen Salzkonzentrationen unempfindlich ist. Das von Schmies et al. (2000) entwickelte Verfahren wurde hier leicht modifiziert übernommen.

Die Expression des *sopl* erfolgte durch Induktion der Zellen mit IPTG unter Zugabe von 10 mM *all-trans*-Retinal zum Kulturmedium (2.7.2). Nach Inkubation für 3 h wurden die Zellen geerntet. Das erhaltene Zellsediment zeigte bereits die für das SRI charakteristische Blaufärbung und deutet daraufhin, daß das SRI in hohen Ausbeuten synthetisiert wurde. In Abbildung 27 ist ein Foto der geernteten Zellen mit und ohne Induktion gezeigt.

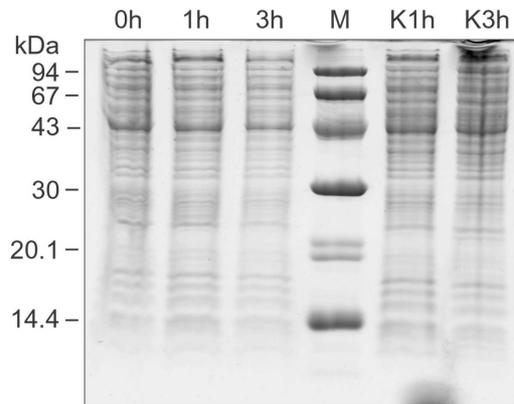


**Abb. 27:** Foto der Zellsedimente der mit pET27bmod-*sopl*-His transformierten *E. coli* BL21 (DE3) 3 h nach Induktion unter Zugabe von *all-trans*-Retinal (rechts) und der Kontrollkultur ohne Induktion (links).

Für eine Kontrolle der Expression wurden jeweils 0,1 OD<sub>578</sub> der Zellsuspension unmittelbar vor Induktion, 1 h und 3 h nach Induktion sowie eine nichtinduzierte Kontrollkultur in den gleichen Zeitabständen auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen (Abb.28).

Es läßt sich jedoch auch in der Spur der Zellsuspension 3 h nach Induktion keine prominente Bande erkennen, obwohl ca. 200 ng SRIwt-His (Menge basierend auf der Kalkulation der gereinigten Proteinmenge) im Auftrag enthalten waren.

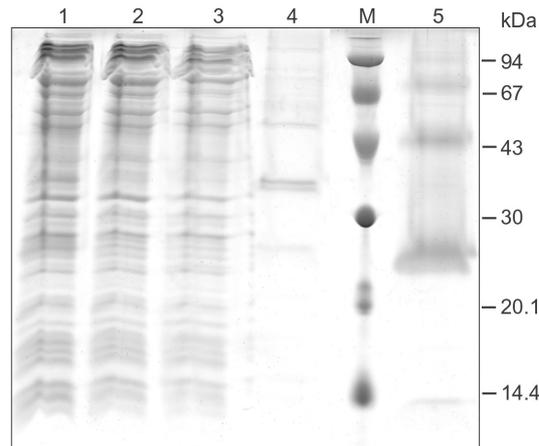
Krebs et al. (1995) beobachteten dies analog für die Expression von SRIwt-His in *H. salinarum*.



**Abb. 28:** SDS-Gel der Expressionskontrollen der mit pET27bmod-*sopl-His* transformierten *E. coli* BL21(DE3). Es sind jeweils 0,1 OD<sub>578</sub> der Kulturen aufgetragen. 0 h, 1 h und 3 h nach Induktion mit IPTG und Zusatz von *all-trans*-Retinal K 1 h, K 3 h Kontrolle ohne Induktion, gleiche Kulturzeit

Die Zellen wurden mit dem Microfluidizer mechanisch aufgeschlossen und die genomische DNA zunächst durch Zugabe von DNaseI 10 min verdaut. Zusätzlich wurde die Lösung unter Kühlung kurz mit Ultraschall mit einem Microtip behandelt, um Reste genomischer DNA zu zerstören. Der Zellaufschluß wurde dann sofort bei 100.000 x g zentrifugiert. Der Überstand bestehend aus dem Zytoplasma wurde verworfen und das Sediment aus Membran und Zelltrümmern in Puffer mit 2 % DM für 2 h bei 4°C solubilisiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 100.000 x g wurde das Solubilisat auf eine äquilibrierte Ni-NTA-Säule im Dunkeln bei 4°C aufgebracht. Alle weiteren Waschschrte wurden wie unter 2.7.3 beschrieben im Dunkeln bei 4°C durchgeführt. Die Elution erfolgte durch Absenken des pH-Wertes auf pH 4.0 und das Eluat wurde im Anschluß direkt auf pH 6.0 mit 1 N NaOH titriert.

Im Vergleich zu Präparationen bei RT und unter Lichteinfluß konnte so die Ausbeute an SRI um ca. 1/3 gesteigert werden. Es wurden bis zu 2 mg Protein pro L Zellkultur erhalten. In Abbildung 29 ist eine SDS-Gel mit den verschiedenen Fraktionen der Präparation wiedergegeben.

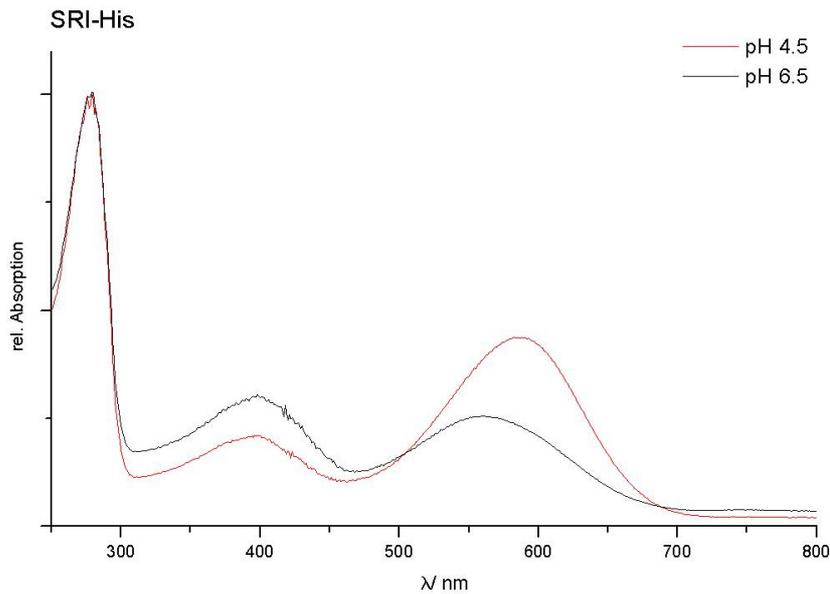


**Abb. 29:** 12% S+J SDS-Gel der Präparation des SRI

(1) Membransolubilisat	(2) Durchbruch
(3) Waschfraktion 1 (Puffer R1)	(4) Waschfraktion 2 (Puffer W2)
(5) Eluat	(M) Proteinmarker

In der Spur des Eluates zeigen sich drei prominente Banden. Die Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von 26 kDa entspricht dem monomeren SRIwt-His mit einer berechneten Größe von 25,3 kDa. Die beiden Banden bei höherem Molekulargewicht (~50 kDa, 70 kDa bzw. 95 kDa) sind möglicherweise auf eine Dimerisierung bzw. Oligomerisierung des SRI zurückzuführen, die durch das SDS nicht aufgelöst wird. Ein analoges Verhalten wurde von Krebs et al. (1995) für das homolog in *H. salinarum* exprimierte SRIwt-His beobachtet. Die hohe Hintergrundfärbung bzw. das Verschmieren der Banden wird durch den hohen Gehalt an Detergenz, bedingt durch die Reinigung verursacht. Die schwache Bande bei 14 kDa wird möglicherweise durch ein Abbauprodukt oder Verunreinigungen durch ein Fremdprotein verursacht.

Die Reinheit des isolierten SRI wurde daher zusätzlich durch UV-Vis-Spektroskopie ermittelt. In Abbildung 30 ist das Absorptionsspektrum des Eluates bei pH 4.0 und pH 6.5 gezeigt. Das Verhältnis der Absorption des Chromophors bei 580 nm zu der des Proteinrückgrates, speziell der aromatischen Aminosäuren, bei 280 nm ist ein Maß für die Reinheit des SRI und beträgt im Idealfall 1 : 1,6 (580 nm : 280 nm; pH 5.0) (Krebs et al., 1995). Somit konnte hier eine Anreicherung des SRI-His von  $\geq 95\%$  erreicht werden.



**Abb. 30:** Absorptionsspektrum des SRI-His aus *E. coli* bei pH 4.5 und pH 6.5.

Das Absorptionsmaximum des Chromophors *all-trans*-Retinal im SRI ist 590 nm bei pH 4.5; 580 nm bei pH 6.0 und 560 nm bei pH 6.5.

Die pH-abhängige Höhe der Absorption bei 400 nm konnte bisher nicht eindeutig zugeordnet werden. Die starke hypsochrome Verschiebung ähnlich wie im M-Intermediat des Photozyklus des SRI (vgl. 2.3.5) läßt vermuten, daß eine deprotonierte Schiff-Base (SB) jedoch mit Retinal in *all-trans*-Konfiguration vorliegt (Krebs et al., 1993).

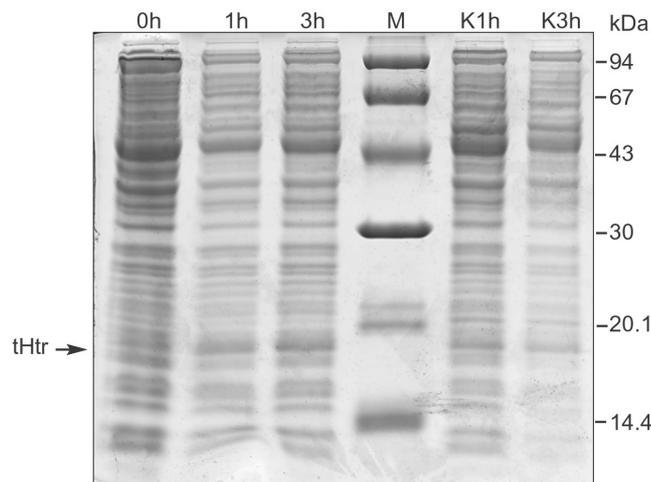
Der Einfluß des pH-Wertes auf die Absorption des Chromophors über Protonierungsgleichgewichte der Schiff-Base und benachbarter Aminosäuren wird unter 2.3.4 näher erläutert.

### Koexpression und Reinigung des SRI und tHtrl

Die Koexpression des *sopl-His* mit dem verkürzten Transducer *thtr* erfolgte in Transformanten des Stammes *E. coli* BL21(DE3) unter den gleichen Bedingungen wie für das *sopl* beschrieben. Nach Induktion mit 1 mM IPTG und Zugabe von 10 µM *all-trans*-Retinal wurde die Kultur weitere 3 h inkubiert. Im Vergleich zu einer nicht induzierten Kontrollkultur, die bis zu einer  $OD_{578} \geq 5$  wuchs, konnte für die induzierte Kultur lediglich eine Verdopplung der Zelldichte ( $OD_{578} \sim 1,2 - 1,4$ ) beobachtet werden.

Analog erfolgte die Koexpression beider Proteine für die Fusion des Histidin-Tags an den verkürzten Transducer. Zur Kontrolle der Synthese wurden jeweils 1 mL Aliquots der induzierten und der nichtinduzierten Kultur abgenommen und das Zellsediment in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Durch Ultraschall wurden die Zellen lysiert und die genomische DNA geschert. Anschließend wurden Aliquots der Zelllysate, jeweils 0,1  $OD_{578}$  entsprechend, auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Das Coomassie gefärbte SDS-Gel der Kontrollen der Expression des *sopl-His* zusammen mit dem *thtrl* ist in Abbildung 31 gezeigt.



**Abb. 31:** SDS-Gel der Expressionskontrollen der Koexpression von *sopl-His* mit *thtrl*, jeweils 0,1 OD<sub>578</sub> der Kultur aufgetragen, Färbung mit Coomassie 0 h, 1 h und 3 h nach Induktion; Kontrolle nach 1 h und 3 h, ohne Induktion (M) Proteinmarker  
→ prominente Bande nach Induktion in der für das tHtrHis erwarteten Größe

Im Vergleich zu den Spuren der Kontrollkultur und der Spur vor Induktion zeigt sich in der 3 h nach Induktion deutlich eine prominente Bande in der Größe von ~18 kDa. Korrespondierend hierzu wurde für das verkürzte Htrl eine Größe von 15,83 kDa berechnet, so daß diese Bande dem tHtrl zugeordnet werden kann.

Die Zellen wurden wie beschrieben (2.7.2) geerntet. Auffällig war hierbei, daß das Zellsediment für beide Expressionskonstrukte keine Blaufärbung sondern vielmehr eine orange-rote Farbe aufwies. Die Zellen der Kontrollkultur zeigen hingegen unter Zugabe von *all-trans*-Retinal jedoch ohne Induktion eine gelbliche Farbe.

Der Aufschluß der Zellen und die Isolierung der Membran wurde für beide Synthesevariationen analog zur Präparation des SRI durchgeführt.

Die Membran wurde in Puffer mit 2 % DM für 2 h solubilisiert und das Solubilisat anschließend durch Zentrifugation für 1 h bei 100.000 x g isoliert.

Das Sediment war deutlich größer als bei der Präparation des SRI-His und wies eine gräulich-orange Farbe auf.

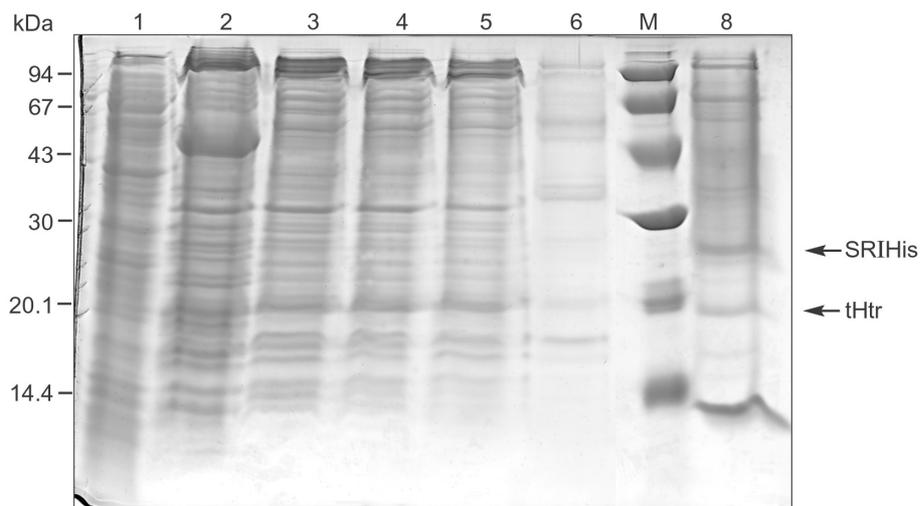
Es lies sich daher vermuten, daß es nicht nur aus Resten genomischer DNA oder nicht-solubilierten Membrankomponenten bestand sondern auch aus Proteinaggregaten sogenannten „inclusion-bodies“. Eine Analyse des Sedimentes über SDS-Gelelektrophorese zeigte keine prominenten Banden in den für die beiden Proteine korrespondierenden Größen, sondern über den gesamten Trennbereich verteilte Banden.

Eine Anreicherung der Proteinkomponente mit Histidin-Tag aus diesem Sediment über Nickel-Agarose unter denaturierenden Bedingungen (7.5 M Harnstoff) konnte nicht erreicht werden. Bedingt durch die proteolytische Aktivität des verwendeten Stammes wurden die Ziel-Proteine vermutlich vor Aggregation unterschiedlich stark abgebaut. Die Präparation der Membransolubilisate erfolgte identisch zu der des SRI-His über Nickel-NTA Agarose.

Im Vergleich zur Präparation des SRI-His zeigte sich für die Expression des *sopl-His* zusammen mit dem *thtrl* jedoch nur eine sehr dünne Bande mit schwacher Blaufärbung auf der Säulenmatrix. Das UV-Vis-Spektrum des Eluates zeigte nur eine sehr kleine Bande bei 580 nm, charakteristisch für die Absorption des SRI, hingegen eine hohe Absorption bei 413 nm, die für Cytochrome typische Soretbande, und bei 280 nm für die aromatischen Aminosäuren des Proteins. Alle Waschfraktionen zeigten keine Absorption bei 580 nm, so daß eine frühzeitige Elution des SRI-His-tHtrl Komplexes ausgeschlossen werden konnte.

Für die Reinigung des Komplexes über den an das *thtrl* fusionierten Histidin-Tag wurde keine Verfärbung der Säulenmatrix beobachtet. Das UV-Vis Spektrum des Eluates zeigte lediglich eine schwache Absorption bei 280 nm. Das SRI konnte im Durchbruch der Nickelsäule aufgrund der leichten Blaufärbung vermutet werden.

Eine Überprüfung der verschiedenen Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese ergab für das Eluat des SRI-His-tHtrl Komplexes je eine schwache Bande in der Größe des SRI-His und des ko-gereinigten tHtrl. In den Spuren für den Durchbruch der Säule und den Waschfraktionen konnte eine Bande in der Größe des tHtrl ermittelt werden.



**Abb. 32:** SDS-Gel der Fraktionen der Präparation des SRI-His im Komplex mit dem tHtrl  
 (1) Zytosol (2) Sediment nach Solubilisierung  
 (3) Membransolubilisat (4) Durchbruch  
 (5) Waschfraktion, ohne Imidazol (6) Waschfraktion, 20 mM Imidazol  
 (7) Waschfraktion, pH 5.5 (8) Eluat, pH 4.0  
 (M) Proteinmarker

In der Spur des Eluates wurden ca. 1/10 des Gesamtvolumens aufgetragen. Es wird somit deutlich, daß die Syntheserate des SRI bei der Koexpression mit tHtrl sehr gering ist. Desweiteren sind noch zahlreiche Banden von Fremdproteinen zu erkennen. Werden die Waschschrte analog zur Reinigung des SRI durchgeführt, bis der Durchfluß keine Absorption mehr bei 280 nm zeigt, ist das tHtrl im Verhältnis zum SRI stark abgereichert. Trotzdem wurden auch dann Banden von Fremdproteinen im SDS-Gel beobachtet.

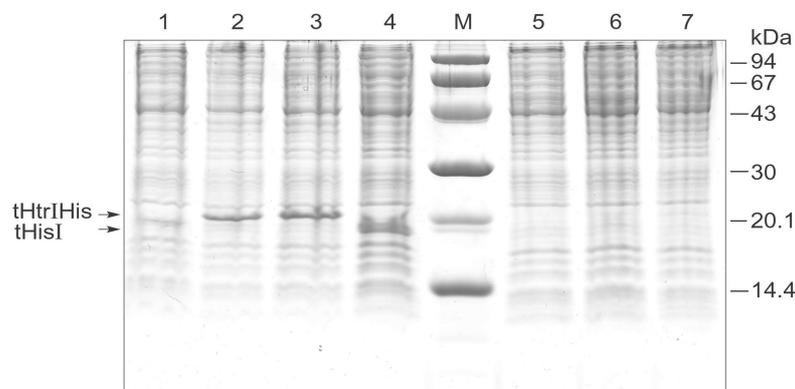
Das SDS-Gel der Fraktionen der Reinigung des SRI-tHtrl-His Komplexes zeigte ein analoges Bild. Das Eluat zeigte eine schwache Bande in der korrespondierenden Größe des tHtrl-His und eine im Vergleich deutlich schwächere Bande für das SRI. Zudem wurden Banden von Fremdproteinen verteilt über den gesamten Trennbereich erhalten. Der Komplex konnte auch hier nicht bis zur Homogenität gereinigt werden.

Es läßt sich daraus schließen, daß die Koexpression bzw. die gemeinsame Synthese des SRI mit dem tHtrl, unabhängig davon an welcher Komponente der Histidin-Tag angefügt wurde, wesentlich geringer ist als für die Expression des SRIwt-His.

### Separate Expression und Koreinigung des Rezeptor-Transducer Komplexes

Da eine Koexpression des *sopl* mit dem *thtrl* nicht möglich scheint, wurde eine getrennte Synthese beider Proteine mit anschließender Reinigung als Komplex angestrebt.

Es wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt, zum einen wurde das SRI mit Histidin-Tag synthetisiert und mit dem verkürzten Transducer ohne Affinitätstag für die Reinigung kombiniert, zum anderen sollte die Reinigung umgekehrt über das tHtrl mit Histidin-Tag zusammen mit dem SRI erfolgen. Die Expressionskontrollen des tHtrl mit und ohne Histidin-Tag zeigten bereits 1 h nach Induktion je eine prominente Bande in der erwarteten Größe in annähernd gleicher Intensität.



**Abb. 33:** SDS-PAGE der Expressionskontrollen des *htrl-His*  
 (1) Htrl-His vor Induktion mit IPTG  
 (2),(3) Htrl-His 1 h und 2 h nach Induktion  
 (4) Htrl zum Vergleich 3 h nach Induktion  
 (M) Proteinmarker  
 (5),(6),(7) Kontrolle Htrl-His ohne Induktion nach 1 h, 2 h und 3 h

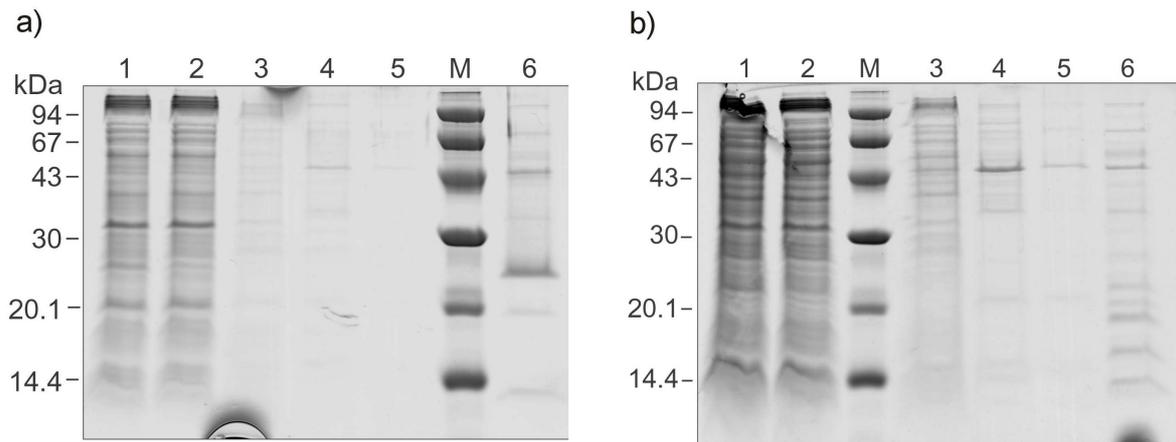
Die Syntheseraten des SRI mit und ohne Histidin-Tag konnten aus den oben genannten Gründen nur abgeschätzt werden. Ein Vergleich der Intensität der Blaufärbung der Zellsedimente deutete auf eine etwas geringe Syntheserate für das SRI ohne Histidin-Tag hin. Trotzdem wurden zunächst ohne Berücksichtigung der absoluten Proteinemengen je 2 L der Expressionkulturen kombiniert.

Die Proteine wurden einzeln synthetisiert und nach Aufschluß und Solubilisierung der Membran zunächst das Protein mit Histidin-Tag SRI bzw. tHtrl an die Ni-NTA-Matrix gebunden. Es wurden hierbei die für die Reinigung des SRI-His verwendeten Puffer benutzt. Anschließend sollte der Wechselwirkungspartner im Durchflußverfahren an das bereits an der Säule adsorbierte Protein binden. Dies schlug in beiden Fällen fehl. Sowohl das SRI als auch das tHtrl passierten die beladene Säule ohne zu binden.

Daraufhin wurde das Verfahren modifiziert, indem bereits die Zellsedimente der jeweiligen Expressionsansätze kombiniert wurden und der Zellaufschluß und die Solubilisierung gemeinsam erfolgte. Durch die längere Inkubationszeit sollte sich hierbei idealerweise der Komplex bereits während der Solubilisierung bilden. Allerdings konnte auch hier wiederum nur das Protein mit Histidin-Tag über die Säule isoliert werden.

Die Salzkonzentration in den verwendeten Puffern wurde auf 1M NaCl gesenkt, da vermutet wurde, daß die hohe Ionenkonzentration eine Dimerisierung der Proteine über die hydrophobe Interaktionsfläche favorisiert, die normalerweise durch den Wechselwirkungspartner besetzt ist. Der Komplex konnte jedoch nur in substöchiometrischer Zusammensetzung isoliert werden, wobei das Protein ohne Affinitäts-Tag stark abgereichert war. Problematisch war hierbei zusätzlich die geringe Stabilität des SRI in Puffern mit weniger als 4M NaCl, so daß dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde. Die SDS-Gele der Fraktionen der Präparation beider Varianten, d.h. SRI bzw. tHtrl mit Histidin-Tag, sind in Abbildung 34 wiedergegeben.

Letztendlich blieb festzustellen, daß der Rezeptor unter den verwendeten Pufferbedingungen keinen stabilen Komplex mit seinem Transducer ausbildet. In einer persönlichen Mitteilung bestätigte diese Beobachtung J. Jung auch für den nativ aus *H. salinarum* isolierten SRI-His Htrl Komplex (4 M NaCl in allen Puffern).



**Abb. 34:** SDS-Gele der Präparation des SRI-His + tHtrl (a) und des tHtrl-His + SRI (b)

(1) solubilisierte kombinierte Membranfraktion/Auftrag auf die Nickelsäule  
 (2) Durchbruch (3) Waschfraktion 1  
 (4) Waschfraktion 2 (5) Waschfraktion 3  
 (6) Eluat (M) Proteinmarker

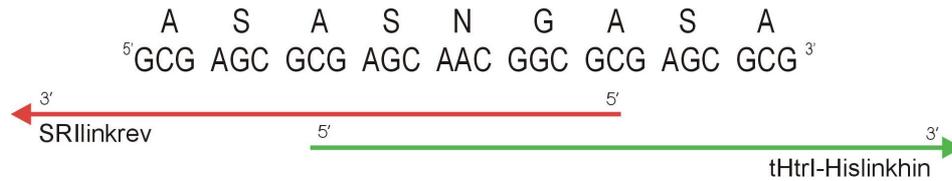
### 3.2.3 Klonierung und Präparation des SRI-link-tHtrl-His Komplexes

Um die oben erläuterten Schwierigkeiten bei Isolierung und Reinigung des SRI im Komplex mit seinem Transducer Htrl zu umgehen, wurde das SRI C-terminal über einen Peptidlinker mit dem N-Terminus des tHtrl-His verbunden.

Eine Fusion des SRI mit dem Transducer tHtrl ermöglicht die Reinigung im stabilen Komplex und garantiert zudem eine 1 : 1 Stöchiometrie beider Komponenten. Im Gegensatz zu bakteriellen Chemorezeptoren, in denen ein Homodimer den funktionalen Komplex bildet, konnte A. Wegener zeigen, daß das sensorische Rhodopsin II (pSRII) aus *N. pharaonis* im Komplex mit seinem Transducer eine 2 : 2 Stöchiometrie aufweist. Ob eine Dimerisierung für die Funktion essentiell ist, wurde aber bisher nicht gezeigt.

Für den verwandten archaebakteriellen Rezeptor-Transducer Komplex pSRII-pHtrl konnten J. Jung und J.L. Spudich (persönliche Mitteilung) zeigen, daß eine Fusion dieser beiden Proteine über einen Peptidlinker einen funktionalen Komplex ergibt.

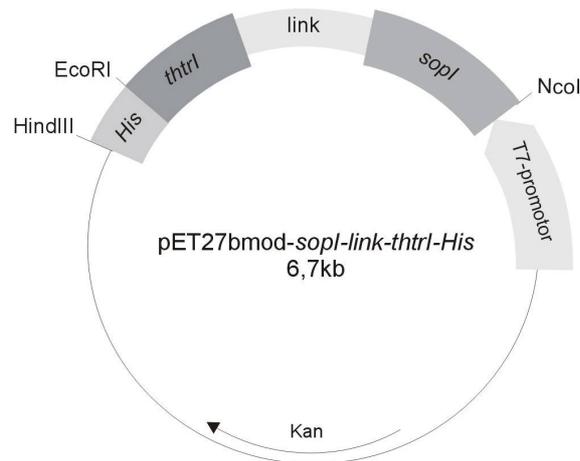
Die Peptidsequenz des Linkers wurde daher für die Synthese des SRI-link-tHtrl-His Komplexes übernommen und ist in der folgenden Abbildung zusammen mit der abgeleiteten DNA-Sequenz wiedergegeben.



**Abb. 35:** Peptidsequenz des Linkers und die davon unter Berücksichtigung des Kodon Verwendung in *E. coli* abgeleitete DNA-Sequenz. In grün und rot ist die Lage der für die Klonierung verwendeten Oligonukleotide markiert. Die überhängenden Enden sind jeweils kompatibel zum SRI bzw. tHtrl-His. Die sich anschließenden Proteinsequenzen des SRI bzw. tHtrl-His entsprechen denen unter 3.2.1 angegebenen. Die vollständige DNA-Sequenz ist im Anhang gezeigt.

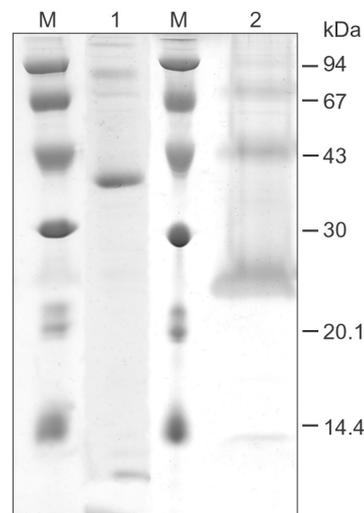
Die Insertion des Linkers erfolgte über PCR nach dem Verfahren von Ho et al. (1989), welches ebenfalls zur Darstellung der Cysteinmutanten verwendet wurde und unter 3.2.6 ausführlich erläutert wird. Die beiden Primer *SRlinkrev* und *tHtrl-Hislinkhin* zur Einführung des Linkers wurden hierbei so konzipiert, daß sich eine überlappende Sequenz aus 13 Basen ergibt. Stromabwärts hiervon befindet sich entsprechend die zum *sopI* bzw. *thtrl-His* kompatible Sequenz in einer Länge, daß sich trotz der nicht kompatiblen Sequenz am 5'-Ende eine Schmelztemperatur von 60°C für die erste PCR ergab.

Zunächst wurde das *sopI*-Gen im Vektor pET27bmod-*sopI* mit Hilfe der Primer *T7prom* und *SRlinkrev* amplifiziert. Die PCR für das *thtrl-His* aus dem Vektor pET27b-*thtrl-His* wurde analog mit den Primern *T7term* und *tHtrl-Hislinkhin* durchgeführt. In einer zweiten PCR wurden nun die beiden gereinigten Amplifikate kombiniert und in einem vorgelagerten Schritt aufgeschmolzen und anschließend durch Abkühlen hybridisiert. Die PCR wurde anschließend mit den Primern *T7prom* und *T7term* wie beschrieben durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das Amplifikat in einer Größe von 1,5 kb isoliert. Nach Restriktion mit NcoI/HindIII wurde der Reaktionsansatz wiederum über ein Agarosegel aufgetrennt und das DNA-Fragment *sopI-link-thtrl-His* in einer Größe von 1,2 kb eluiert. Durch Ligation mit dem NcoI/HindIII restringierten Vektor pET27bmod ergibt sich folgender Expressionsvektor pET27bmod-*sopI-link-thtrl-His*:



**Abb. 36:** Physikalische Karte des Expressionsvektors pET27bmod-sopI-link-thtrI-His

Die DNA-Sequenz des klonierten Gens wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Die Expression erfolgte wie beschrieben in *E. coli* BL21(DE3) (vgl. 2.7.2). Auf einem SDS-Gel der Expressionkontrollen war im Vergleich zur Kontrollkultur keine prominente Bande nach Induktion analog zum SRI-His zu erkennen. Das Zellsediment zeigte jedoch eine deutliche Blaufärbung. Die Reinigung des SRI-link-tHtrI-His Komplexes erfolgte identisch zu der des SRI-His. In der folgenden Abbildung ist ein SDS-Gel des gereinigten Komplexes im Vergleich zum SRI-His gezeigt.



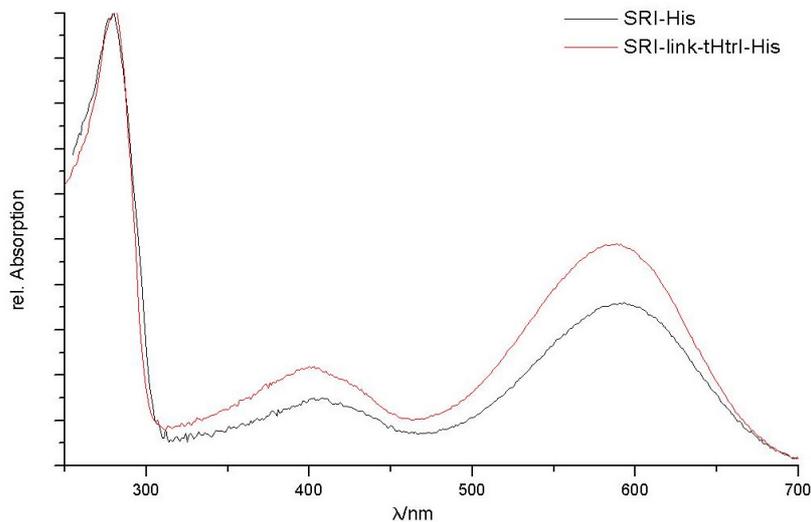
**Abb. 37:** 12% SDS-Gel des gereinigten SRI-linktHtrI-His im Vergleich zum SRI-His

In der Spur für den Komplex SRI-link-tHtrI-His zeigen sich zwei prominente Banden. Die Bande entsprechend einer Größe von 43 kDa korrespondiert gut mit der für den Komplex berechneten Größe von 43,2 kDa. Die zweite Bande bei wesentlich höherem Molekulargewicht von ca. 94 kDa ist möglicherweise dem Dimer des Komplexes zu zuordnen.

Für das auf  $\geq 95$  % angereicherte SRI-His (Kalkulation über die Absorptionsbanden bei 280 nm und 580 nm) zeigen sich im SDS-Gel wie oben erläutert drei charakteristische

Banden. Das Signal bei einem apparenten Molekulargewicht von 26 kDa ist dem monomeren SRI-His zuzuordnen (berechneter Wert: 25,3 kDa).

Das Absorptionsspektrum des gereinigten SRI-link-tHtrl-His (Abb.38) zeigt ein nahezu identisches Bandenmuster im Vergleich zu dem des SRI-His.



**Abb. 38:** Absorptionsspektrum des solubilisierten SRI-link-tHtrl-His bei pH 6.0 ( $\lambda_{\max}$ : 587 nm). Zum Vergleich ist das Spektrum des SR-His bei pH 6.0 gezeigt ( $\lambda_{\max}$ : 590 nm). Puffer: 4 M NaCl, 50 mM Mes

Die charakteristische Absorptionsbande des Chromophors liegt auch im Komplex des SRI mit seinem Transducer bei  $\sim 590$  nm (pH 4.0). Bei pH 6.0 ist diese Bande im Vergleich zum SRIwt-His leicht hypsochrom zu 580 nm verschoben. Ebenso wie für das SRI-His zeigt sich hier eine Absorptionsbande bei 400 nm, die vermutlich der deprotonierten Schiffbase zuzuordnen ist. Analog zum separaten Rezeptor nimmt die Intensität dieser Bande bei längerer Lagerung im Dunkeln bei 4°C ab, verschwindet jedoch nie ganz. Das Verhältnis der Absorptionsbande bei 280 nm zu der bei 580 nm beträgt hier 1 : 2. Dieses Verhältnis dient wie erwähnt als Maß für die Reinheit und beträgt für den separaten Rezeptor idealerweise 1 : 1,6 (pH 5.0). Dieses Verhältnis konnte für das SRI-link-tHtrl-His nicht erreicht werden, obwohl die Bindung des Transducers zumindest auf die Absorptionsbande bei 280 nm keinen Einfluß haben sollte, da das tHtrl-His nur eine aromatische Aminosäure besitzt.

Ob möglicherweise die Fusion der beiden Proteine einen Einfluß auf die Bindung des Chromophors *all-trans*-Retinal hat ist unklar, so daß ein partieller Verlust des Chromophors bei der Präparation nicht ausgeschlossen werden kann, wodurch sich das Absorptionsverhältnis verschlechtert. Die Überprüfung der Funktionalität des Rezeptor-Transducer-Komplexes erfolgte wie unter 3.2.4 beschrieben über die pH-Abhängigkeit des Photozyklus.

### 3.2.4 Rekonstitution von SRI in Purpurmembran-Lipide und Präparation des tHtrl-His

Für Untersuchungen des SRI in seiner „natürlichen“ Umgebung wurde das Protein in Purpurmembran-Lipide rekonstituiert. Diese Lipide werden aus *H. salinarum* aus der sogenannten Purpurmembran (PM), welche aus Bakteriorhodopsin-Clustern mit Lipiden besteht, isoliert. Die Überführung des Proteins aus Detergenz-Micellen in PM-Lipide, Rekonstitution genannt, ermöglicht es, den Zustand des Proteins in seiner nativen Umgebung zu imitieren. Sowohl SRI als auch der Komplex SRI-link-tHtrl-His wurden hierfür mit PM-Lipiden in einem molaren Verhältnis von 1 : 20 bzw. 1 : 30 (Protein : Lipide) zusammen mit Biobeads wie beschrieben (2.7.6) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Abfiltrieren der Biobeads lassen sich die Proteine rekonstituiert in den Membranfragmenten durch Zentrifugation sedimentieren. Nach erfolgreicher Rekonstitution ist der Überstand klar und farblos, wohingegen das Membransediment die für das SRI typische Blaufärbung aufweist. Die so präparierten Proben wurden unter anderem für Photozyklusexperimente verwendet. Wie die Versuche zur gemeinsamen Reinigung des verkürzten Transducers mit dem SRI gezeigt haben, bilden die solubilisierten Proteine keinen stabilen Komplex aus. Um jedoch einen Vergleich zu dem über den Peptidlinker verbundenen SRI-tHtrl-His Komplex zu haben, sollte das SRI-His zusammen mit dem Transducer tHtrl-His rekonstituiert werden. Möglicherweise ist die Bildung des Komplexes in der hydrophoben Umgebung der Lipide wahrscheinlicher. Hierfür wurde das *thtrl-His* zunächst wie oben beschrieben ausgehend vom Vektor pET27b<sup>+</sup>-*thtrl-His* exprimiert. In Abänderung zur Expression des *sopl-His* wurde kein *all-trans*-Retinal bei der Induktion zugesetzt.

Die Reinigung des tHtrl-His erfolgte über eine Nickel-NTA-Säule mit den im Methoden-Teil aufgelisteten Puffern. In Abänderung zur Präparation des SRI-His wurde in allen Puffern 0,5% DM verwendet, da das tHtrl-His sonst, wie in Vorversuchen gezeigt werden konnte, ausfällt. Die Elution unspezifisch an die Säulenmatrix gebundener Proteine erfolgte hier durch den Zusatz von Imidazol zu den Puffern.

Das tHtrl-His wurde anschließend mit 200 mM Imidazol bei pH 6.0 eluiert. Die Konzentration des Proteins erfolgte mit VIVA-Spin-Filtereinheiten mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa. Es mußte hierbei beachtet werden, daß das tHtrl-His nicht zu stark ankonzentriert wurde, da es sonst als unlöslicher Niederschlag ausfiel.

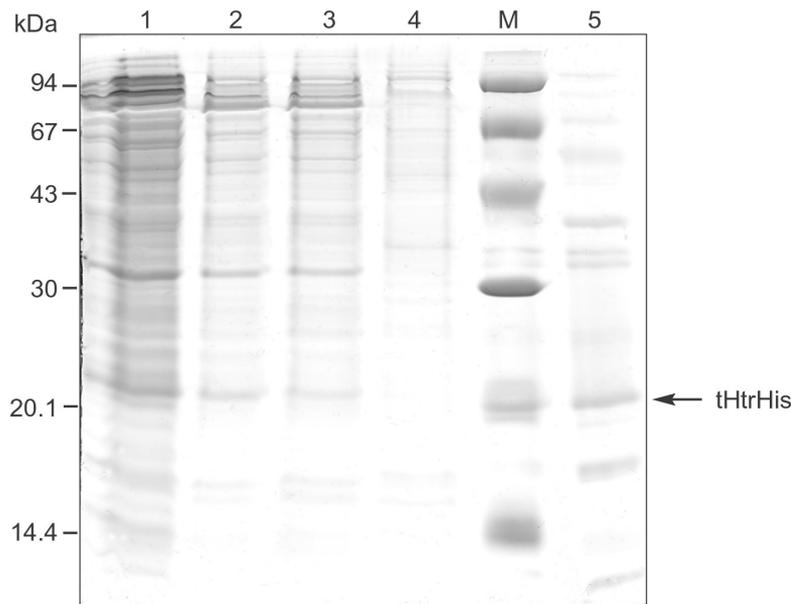
Die Konzentration wurde, da nur eine aromatischer Aminosäuren enthalten ist, über die Absorption bei 228,5 nm und 234,5 nm mit Hilfe folgender Formel (Ehresmann et al.,

1973) abgeschätzt:

$$\frac{A_{228,5} - A_{234,5}}{3,14} = x \left( \frac{mg}{ml} \right)$$

Die so ermittelte Proteinmenge stellt insofern nur eine grobe Schätzung dar, da hier ein für alle Proteine typischer Absorptionsbereich gewählt wurde, so daß ein Beitrag durch andere Proteine nicht ermittelt noch ausgeschlossen werden kann. Es konnten 1-2 mg tHtrl-His pro Liter kultivierter Zellen isoliert werden.

In der folgenden Abbildung ist ein SDS-Gel der Fraktionen der Reinigung des tHtrl-His abgebildet.



**Abb. 39:** SDS-Gel der Fraktionen der Präparation des tHtrl-His

- |                           |                     |
|---------------------------|---------------------|
| (1) Solubilisat tHtrl-His | (2) Durchbruch      |
| (3) Waschfraktion 1       | (4) Waschfraktion 2 |
| (5) Eluat                 | (M) Proteinmarker   |

In den Spuren des Solubilisates, des Durchbruchs und der Waschfraktion 1 zeigt sich eine prominente Bande bei 20 kDa, die ebenfalls im Eluat erkennbar ist. Sie entspricht der in den Expressionkontrollen nach Induktion erscheinenden Bande. Im Eluat sind neben der Bande des tHtrl-His Banden verunreinigender Proteine bzw. von proteolytischen Spaltprodukten des tHtrl-His zu erkennen.

Aufgrund der Größe könnte die Bande bei 40 kDa möglicherweise auf eine Dimerisierung des tHtrl-His zurückzuführen sein. Das Protein konnte in einer anschließenden DEAE-Chromatographie weiter angereichert werden.

Auffällig war weiterhin, daß das Sediment nach Solubilisierung der Membran noch größere Mengen des verkürzten Transducers enthält (nicht gezeigt). Möglicherweise handelt es sich hierbei um „inclusion-bodies“, so daß die tatsächlich synthetisierte Menge tHtrl-His deutlich über der isolierten liegt. Trotzdem wurde von einer Aufarbeitung unter denaturierenden Bedingungen abgesehen, da die Reinheit und die isolierte Menge tHtrl-His ausreichend war für eine Rekonstitution mit dem SRI-His.

Die beiden gereinigten Proteine wurden im Verhältnis 1 : 2 gemischt (SRI-His : tHtrl-His). Das tHtrl-His wurde im Überschuß eingesetzt, da die Konzentrationsbestimmung wie oben erläutert nur ungenau war und gewährleistet werden sollte, daß sich kein freies SRI-His in der Membran befindet.

Der Proteinkomplex wurde im molaren Verhältnis 1 : 30 (Proteinkomplex : Lipiden) mit PM-Lipiden versetzt und unter Zugabe von Biobeads über Nacht bei 4°C vorsichtig geschüttelt. Die Membranfragmente mit dem Rezeptor-Transducerkomplex wurden sedimentiert. Die Analyse des Überstandes über SDS-Gelelektrophorese zeigte keine Banden in für das SRI-His bzw. das tHtrl-His typischen Größe. Die Membransuspension des SRI-His voraussichtlich im Komplex mit dem verkürzten Transducer wurde für pH-Titrationsversuche und Photozyklusexperimente verwendet. Die Ergebnisse zeigten jedoch, daß in der Membran kein funktioneller Komplex gebildet wurde.

#### 3.2.4 pH-Titration des SRI

Das Absorptionsspektrum des in *E. coli* synthetisierten SRIwt-His zeigt im Grundzustand zwei für den Chromophor Retinal typische breite Absorptionsbanden bei 587 nm und bei 400 nm (pH 6.0). Hierbei ist sowohl für das Transducer-freie SRI als auch im Komplex mit dem Htrl eine pH-Abhängigkeit der Lage der Absorptionsmaxima zu beobachten. Bei höheren pH-Werten (> 6.5) erfährt das Absorptionsmaximum bei 587 nm eine hypsochrome Verschiebung auf 550 nm und die Absorption bei 400 nm nimmt zu.

Hingegen bleibt bei niedrigeren pH-Werten (< 5.5) das Absorptionsmaximum bei 587 nm erhalten und es zeigt sich lediglich eine Abnahme der Absorption bei 400 nm (s. Seite 79, Abb.30). Krebs et al. (1995) erhielten für das im nativen Organismus *H. salinarum* exprimierten SRI-His analoge Ergebnisse.

Wie von Rath et al. (1996) gezeigt werden konnte, ist die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 587 nm auf 550 nm auf die Deprotonierung der Asparaginsäure 76 zurückzuführen. Der pK<sub>a</sub>-Wert des Asp76 ist weiterhin abhängig davon, ob der Transducer Htrl gebunden ist oder nicht. Für das freie SRI wurden pK<sub>a</sub>-Werte zwischen 6.5 und 7.2 erhalten (Krebs et al., 1995; Bogomolni et al., 1994) wohingegen im Komplex ein pK<sub>a</sub>-Wert von 8.5 ermittelt wurde (Bogomolni et al., 1995). Die 400 nm-Bande im Grundspektrum des SRI konnte jedoch bisher keiner Spezies eindeutig zugeordnet werden.

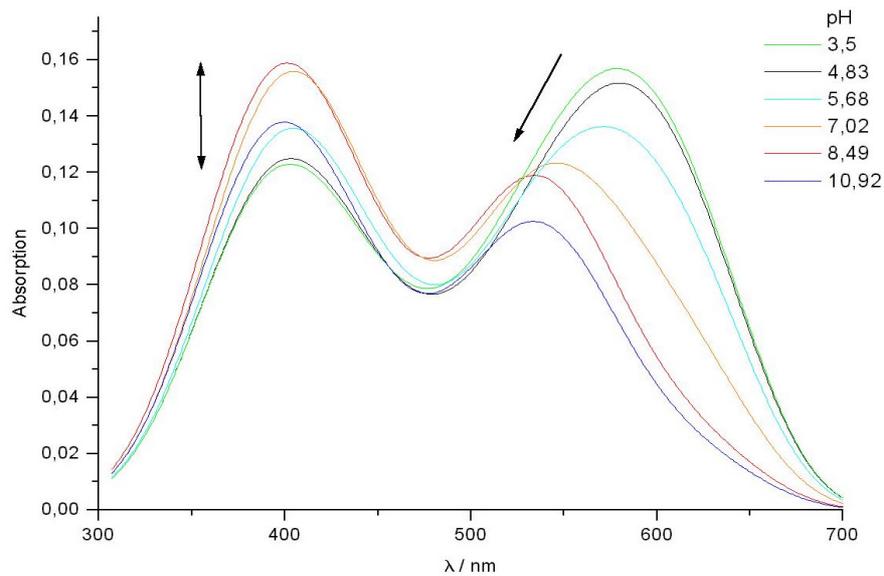
Die pH-Titrationsanalyse des in *E. coli* synthetisierten SRI-wt-His sollte in Kombination mit den Photozyklusdaten als Kontrolle der Funktionalität des Proteins dienen. Mit Hilfe eines multiexponentiellen globalen Fits sollten hierbei die Gleichgewichte zwischen den verschiedenen Spezies bestimmt und die pK<sub>a</sub>-Werte ermittelt werden.

Die Analyse des fusionierten Komplexes SRI-link-Htrl-His erfolgte analog. Ein Vergleich mit den  $pK_a$ -Werten des freien SRI sollte im weiteren einen ersten Anhaltspunkt für einen funktionale Komplexierung des SRI und Htrl liefern.

### **pH-Titration des SRIwt-His**

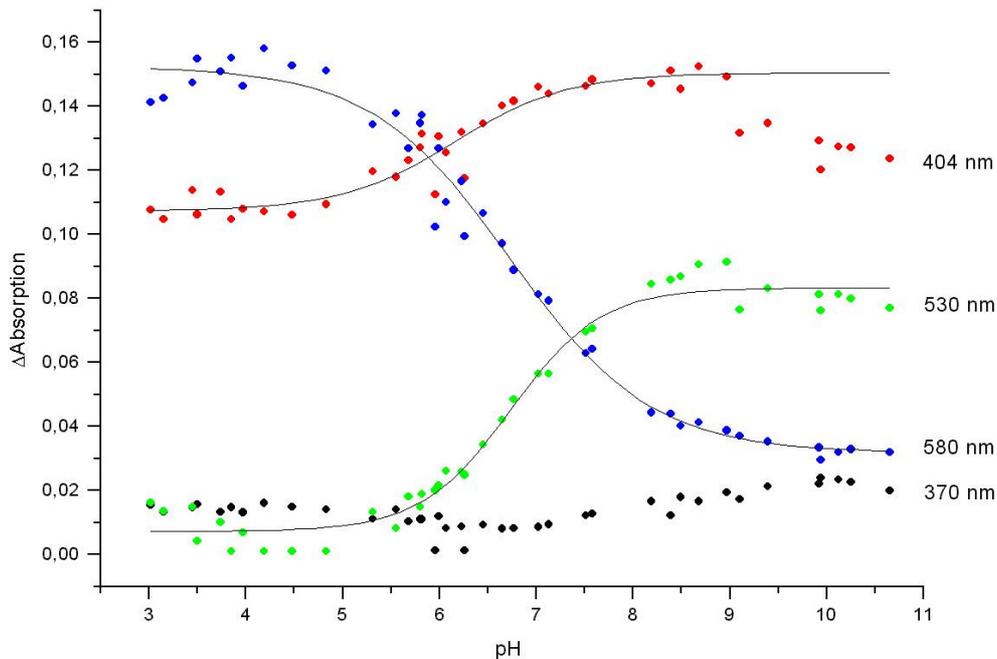
Für die pH-Titration des SR-wt-His wurde zunächst eine Probe des gereinigten in DM solubilisierten SRI verwendet. Die Probe wurde hierfür in 1M NaCl (pH 6.0) umgepuffert, da die verwendete pH-Elektrode den hohen Salzgehalt von 4M NaCl nicht toleriert und die bei der Reinigung verwendete Puffersubstanz „Mes“ die Messergebnisse verfälschen würde. Nach der Adaption an Dunkelbedingungen (über Nacht bei 4°C) wurde die Probe in einer Küvette in das umgebaute Spektrometer überführt. Die unter 2.8.5 beschriebene Meßanordnung erlaubt die Titration der Probe im Spektrophotometer ohne die Küvette zu entfernen. Nach Einstellen des gewünschten pH-Wertes mit 10 – 20  $\mu$ L einer 5 – 10 mM NaOH- bzw. HCl-Lösung wurde jeweils ein Absorptionsspektrum von 800 – 250 nm aufgenommen. Zur Überprüfung der Reversibilität des beobachteten Prozesses wurde die Probe ausgehend von pH 6.0 schrittweise auf den oberen bzw. unteren pH-Grenzwert titriert und analog wieder auf pH 6.0 eingestellt. Das solubilierte SRIwt-His zeigte hierbei eine zu geringe Stabilität, da bei höheren pH-Werten (> 8.0) die Bleichung beobachtet wurde.

Es wurde daher das in PM-Lipide rekonstituierte gereinigte SRIwt-His verwendet. Dies bot insofern den Vorteil, daß die gewünschten Pufferbedingungen durch Sedimentation und Resuspendierung leichter einzustellen waren. Die ermittelten Rohdaten wurden anschließend mit Hilfe einer von Björn Klink entwickelten Programmroutine bearbeitet. Die bedingt durch die Verwendung einer Suspension erhöhte Rayleigh-Streuung wurde subtrahiert. Hierfür wurde zunächst eine Funktion zur Beschreibung der Wellenlängenbereiche von 275 nm bis 306 nm und von 701 nm bis 760 nm gefunden und diese dann von den restlichen Daten abgezogen. Anschließend wurde die durch die Zugabe von NaOH bzw. HCl erhaltene Verdünnung der Probe eliminiert (Normierung auf 280 nm) und die Daten auf den interessierenden Absorptionsbereich von 350 bis 700 nm reduziert. In Abbildung 39 sind exemplarisch einige der resultierenden Spektren gezeigt. Der pH-induzierte Trend der Verschiebung bzw. Intensitätsänderung der Absorptionsmaxima sind durch Pfeile verdeutlicht.



**Abb. 39:** Absorptionsspektren des SRIwt-His im pH-Bereich von 3.5 bis 10.65. Spektrenzahl zur besseren Übersicht reduziert. Die eingezeichneten Pfeile verdeutlichen die Veränderungen der Absorptionsmaxima bei 580 nm bzw. 400 nm von pH 3.5 bis 10.65. Rohdaten bearbeitet: Verdünnungsfaktor eliminiert, Rayleighstreuung subtrahiert.

Anschließend wurden die Absorptionsmaxima in einem globalen Fit von Gaussfunktionen ermittelt. In Abbildung 40 sind die resultierenden pH-Titrationskurven bei den ermittelten Absorptionsmaxima von 580 nm, 530 nm, 404 nm und 370 nm gezeigt.



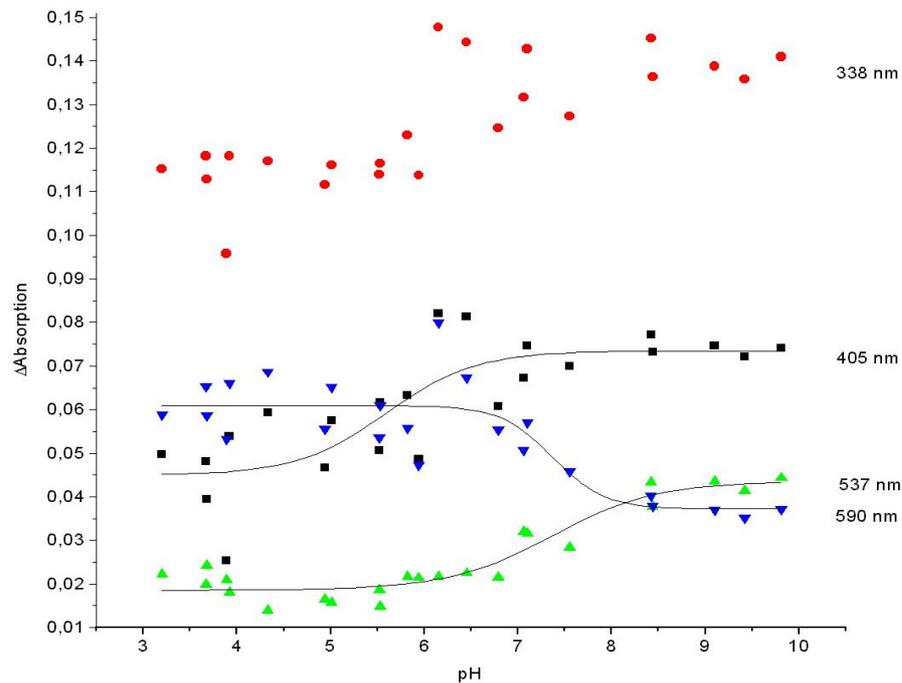
**Abb. 40:** pH-Titrationskurven des SRIwt-His (rekonstituiert in PM-Lipide, 1 M NaCl) Die Datenpunkte der Absorptionsmaxima wurden mit Hilfe von Boltzmannfunktionen gefittet. Die Absorptionsmaxima bei 537 nm und 590 nm wurden unter der Voraussetzung eines gemeinsamen Wendepunktes gefittet. Die Werte für 404 nm wurden unabhängig gefittet. Die Absorption bei 370 nm (M-Intermediat) kann im Rahmen der Meßgenauigkeit als konstant angesehen werden.

Die Daten der Absorptionsmaxima bei 530 nm und 580 nm wurden mit Hilfe einer Boltzmann Funktion multiexponentiell gefittet, wobei der Wendepunkt  $x_0$  für beide Kurve als identisch vorausgesetzt wurde. Beide Kurven werden im interessierenden pH-Bereich von 5.0 bis 9.0 gut durch die Fit-Funktionen beschrieben. Es ergibt sich ein gemeinsamer Wendepunkt bzw.  $pK_a$ -Wert von 6.74. Die Datenpunkte für das Absorptionsmaximum bei 404 nm wurden unabhängig davon ebenfalls mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion gefittet. Die systematische Abweichung der Absorptionswerte im pH-Bereich von 9 – 11 konnte auf eine unzureichende Äquilibrierung zurückgeführt werden. Es resultiert ein  $pK_a$ -Wert von 6.16. Das Absorptionsmaximum bei 370 nm ist im Rahmen der Meßgenauigkeit als konstant anzusehen.

### **pH-Titration des SRI-link-tHtrl-His**

Die pH-Titration des SRI-link-tHtrl-His erfolgte analog zu der des freien SRI rekonstituiert in PM-Lipide im pH-Bereich von 3.0 bis 10.0.

Die Auswertung der Daten wurde wie oben beschrieben vorgenommen. Die Qualität der erhaltenen Daten ist hier geringer, da das SRI-link-tHtrl-His im basischen pH-Bereich zum Teil bleichte. Verdeutlicht wird dies durch die stärkere Streuung der Daten für die Absorption bei 338 nm, die dem freien Retinal entspricht. Aus der multiexponentiellen globalen Datenanalyse konnten hier nur durch Festsetzen der Absorption bei 590 nm sinnvolle Absorptionsmaxima erhalten werden. Die resultierenden Titrationskurven sind in der folgenden Abbildung gezeigt:



**Abb. 41:** pH-Titrationskurve SRI-link-tHtrl-His, rekonstituiert in PM-Lipide, 1 M NaCl. Die Datenpunkte für die Absorptionsmaxima bei 537 nm und 590 nm wurden mit Boltzmann Funktionen gefittet unter der Voraussetzung eines gemeinsamen Wendepunktes. Die Werte für 405 nm wurden unabhängig gefittet. Die starke Streuung der Datenpunkte für 338 nm (freies Retinal) sind auf die partielle Bleichung des SRI-link-tHtrl-His bei pH > 7.5 zurückzuführen. Bei Titration zurück auf pH 6.0 wurden daher höhere Werte erhalten.

Analog zum oben beschriebenen Verfahren für das SRI wurden Boltzmannfunktionen zur Beschreibung des Kurvenverlaufs gefittet. Aufgrund der starken Streuung für die Absorptionsmaxima bei 405 nm und 590 nm ist der erhaltene Fit weniger zuverlässig. Die Daten des Absorptionsmaximum bei 530 nm werden hingegen gut beschrieben.

Aus den Kurven der Absorptionsmaxima von 530 nm und 590 nm ergibt sich ein  $pK_a$ -Wert von 7,36. Für das Absorptionsmaximum bei 404 nm erhält man einen  $pK_a$ -Wert von 6,03, der gut mit dem für das freie SRI ermittelten Wert übereinstimmt. Die Ergebnisse der pH-Titrations des SRIwt-His und SRI-link-tHtrl-His sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 1:**  $pK_a$ -Werte der Absorptionsmaxima des SRwt-His und SRI-link-tHtrl-His

	370 / 338 nm	404 nm	537 nm und 580 / 590 nm
SRIwt-His	(-)	6,16	6,74
SRI-link-tHtrl-His	(-)	6,03	7,36

### 3.2.6 Untersuchung des Photozyklus des SRI

Der Photozyklus des SRI wurde in der Transducer-freien Form und im Komplex als SRI-link-tHtrl-His untersucht. Die exakte Beschreibung dieses ersten Prozesses der Reizaufnahme ist zum Verständnis der sich anschließenden Signalweiterleitung und –verarbeitung essentiell.

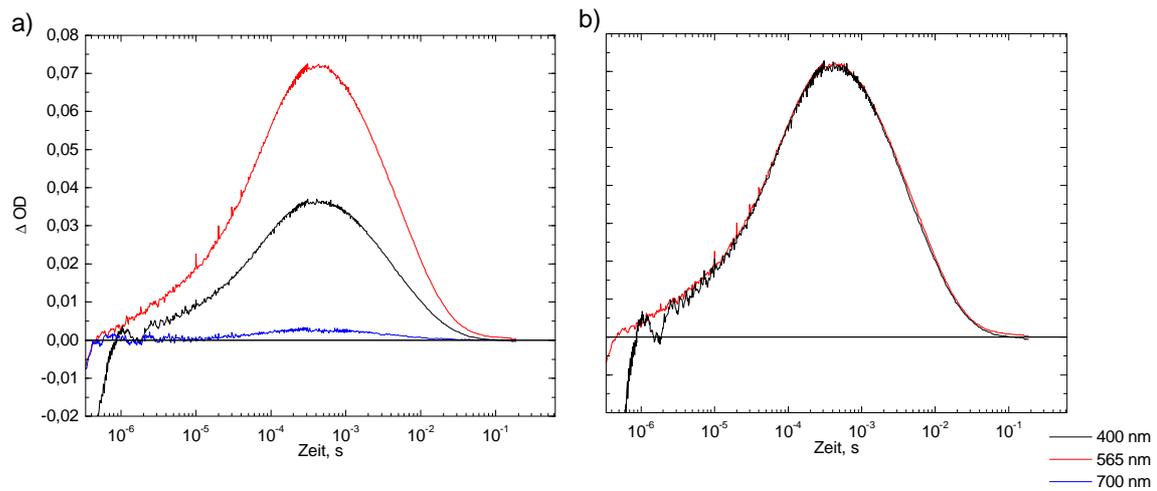
Durch die Variation der Wellenlänge des Anregungslichtes sollte hier zunächst die für die verschiedenen Spezies des Grundzustandes des SRIwt-His spezifische Anregungswellenlänge ermittelt werden. Im folgenden sollten nach gezielter Anregung nur einer Spezies erstmals die charakteristischen Kinetiken des einzelnen Photozyklen ermittelt werden. Die Mutante SRID76N kann als Modell des SRI<sub>587</sub> verstanden werden. Ihre Photozyklusdaten sollten daher die Ergebnisse verifizieren.

Spudich & Spudich (1993) konnten zeigen, daß die Bindung des Htrl den Photozyklus des SRI moduliert. Im Gegensatz zum Transducer-freien SRI zeigt das SRI im Komplex mit Htrl eine pH-unabhängige Kinetik. Ein Vergleich der ermittelten Daten für das Fusionsprotein SRI-link-tHtrl-His mit denen des SRIwt-His sollte daher den Nachweis erbringen, daß sich das SRI hier im funktionellen Komplex mit dem tHtrl befindet.

#### Abhängigkeit des Photozyklus von der Anregungswellenlinie

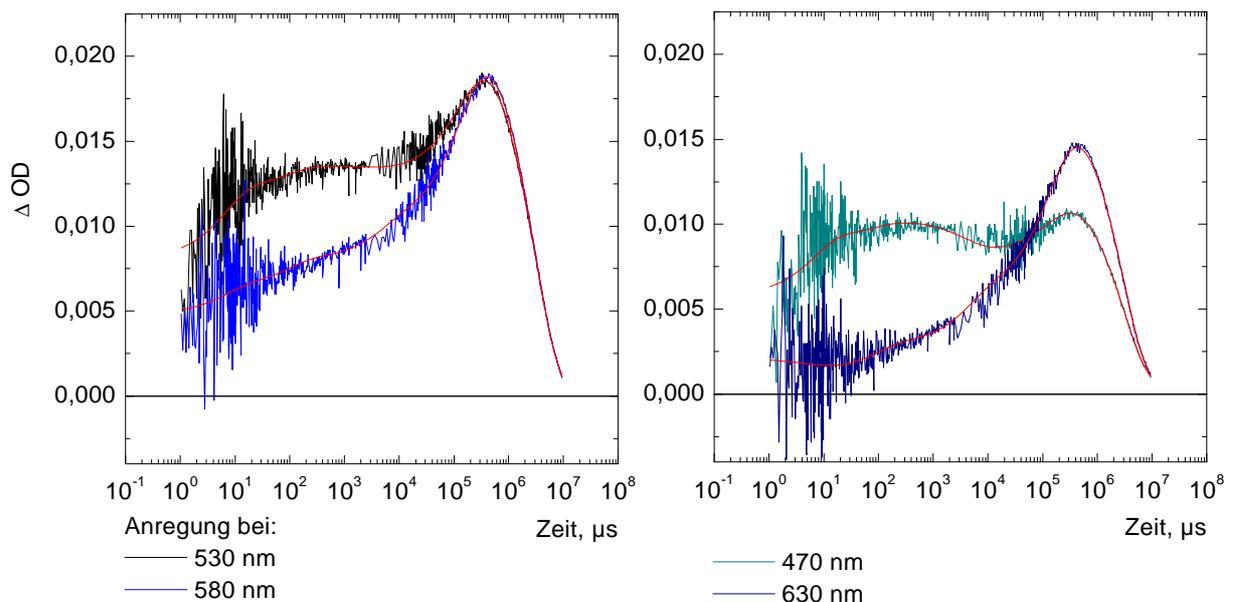
Eine Analyse des gereinigten und in PM-Lipide rekonstituierten SRIwt-His lieferte keine vernünftigen Daten. Der Photozyklus war hier im Vergleich zu Literaturdaten für das homolog exprimierte SRI bis zu 100fach verlangsamt. Erste Untersuchungen des heterolog exprimierten SRIwt-His in der *E. coli* Membran, lediglich angereichert über einen Succhrose-Gradienten, ergaben einen identischen Photozyklus zu der des in DM solubilisierten SRIwt-His und zeigten gute Übereinstimmungen mit den Literaturdaten. Aufgrund der leichten Handhabung wurde daher im folgenden das in DM solubilierte SRIwt-His verwendet.

Voraussetzung für Analyse des Aktionsspektrums im Hinblick auf die sich anschließenden Photozykusexperimente ist, daß die Variation des Anregungslichtes keinen Einfluß auf die Kinetik des untersuchten Intermediates hat. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde ein Aktionsspektrum des BR aufgenommen, da wesentlich detailliertere Informationen über den Photozyklus vorliegen. In Abbildung 42 sind exemplarisch die transiente Absorption bei 400 nm nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 410 nm, 565 nm und 700 nm gezeigt. Im rechten Teil der Abbildung (b) wurde die Absorption der Transienten normiert und man erkennt deutlich, daß die Kinetik der Bildung und des Zerfalls identisch ist. Bei unterschiedlicher Anregung variiert somit lediglich die Amplitude.



**Abb. 42:** Transiente Absorption des BR bei 400 nm nach Anregung bei 410 nm, 565 nm und 700 nm. (b) Amplituden normiert, die Spur für 700 nm ist aufgrund des schlechten Signal zu Rauschverhältnisses nicht gezeigt. Sie ist jedoch ebenfalls deckungsgleich mit den dargestellten.

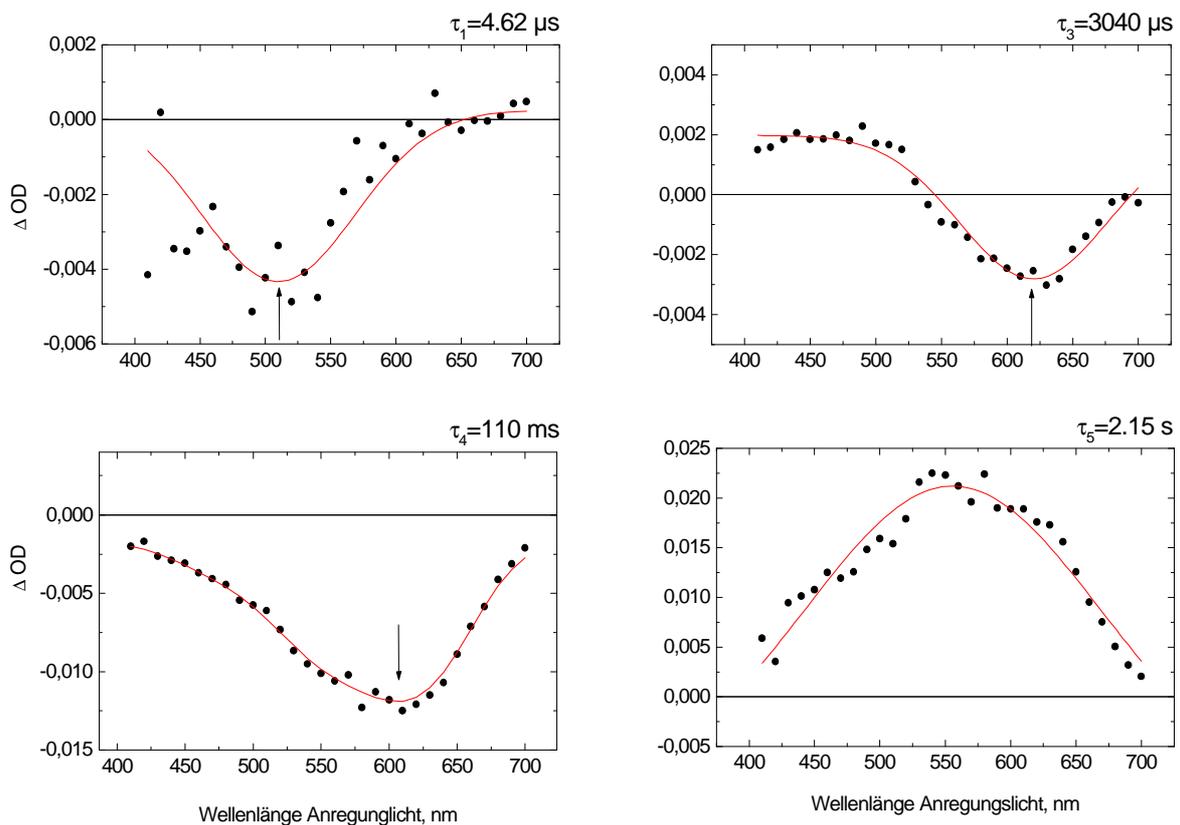
Zur Aufnahme des Aktionsspektrums des SRIwt-His wurde die Wellenlänge des Anregungslichtes im Bereich von 410 – 700 nm (10 nm Schrittweite) variiert. Die Absorptionsänderungen des SRI wurden bei 530 und 580 nm, den für die beiden Spezies des Grundzustandes indikativen Wellenlängen, aufgenommen, sowie bei 400 nm, dem Absorptionsmaximum des M-Intermediates. Zur Anregung wurde als Lichtquelle ein im angegebenen Bereich durchstimmbarer Nd-Yag-Laser verwendet. In Abbildung 43 ist exemplarisch der Datensatz für die Absorptionsänderung des SRI bei 400 nm dargestellt.



**Abb. 43:** Transiente Absorption des SRI bei 400 nm in Abhängigkeit der Wellenlänge des Anregungslichtes und von der Zeit bei 30°C und pH 6.0 (4 M NaCl, 50 mM Mes). Die drei Anregungswellenlängen, die zu einem lokalen Maximum in der transienten Absorption bei 400 nm zuzuordnen sind, sind markiert.

Die multiexponentielle globale Datenanalyse wurde von Chizov et al. (1996) zur Beschreibung der Photozyklusdaten entwickelt (vgl. Abschnitt 2.9.2). Diese Methode wurde hier erstmals für die Analyse von Aktionsspektren transienter Absorptionen angewendet. Die Datensätze konnten für alle drei Absorptionswellenlängen durch vier Exponentialfunktionen beschrieben werden. Aus den Exponenten resultieren die vier angegebenen Halbwertszeiten gemäß:  $\left( t_i = \frac{\ln 2}{k_i} \right)$ .

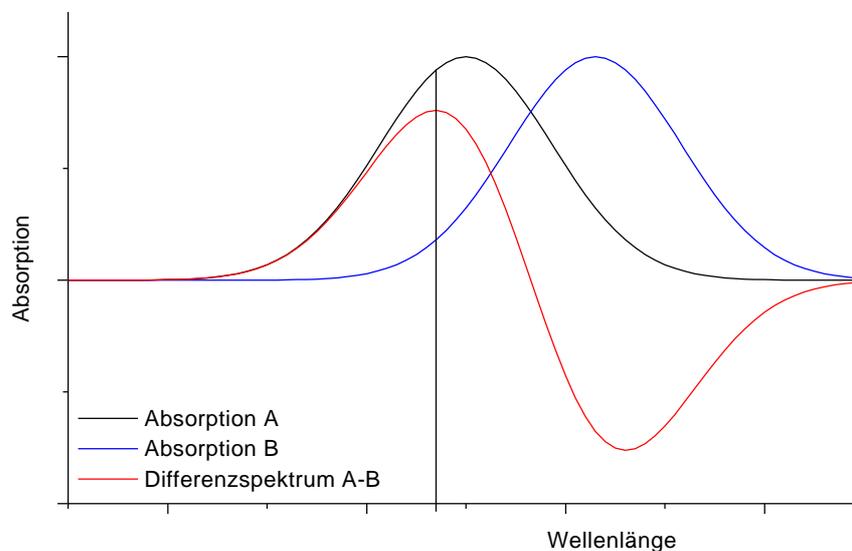
In Abbildung 44 ist die differentielle Absorptionsänderung des SRIwt-His bei 400 nm nach Anregung bei 410 – 700 nm gezeigt. Die Photonendichte, maßgeblich für eine vergleichbare Anregung bei unterschiedlicher Wellenlänge, konnte im Vergleich zur Varianz der Amplituden als konstant betrachtet werden. Betrachtet man die Absorptionsänderung des M-Intermediates (400 nm) ergeben sich für seine Bildung drei Halbwertszeiten von 4,62  $\mu$ s, 3,04 ms und 110 ms jedoch nur eine für dessen Zerfall.



**Abb. 44:** Differentielle Absorptionsänderung des SRIwt-His bei 400 nm im Bereich der Anregungswellenlänge von 410 – 700 nm (in DM, 4 M NaCl, 50 mM Mes, pH 6.0). Eine negative Amplitude ist hierbei als Bildung des M-Intermediates und eine positive Amplitude als Zerfall des M-Intermediates zu interpretieren. Zur Veranschaulichung wurden Gauss-Funktionen an die jeweiligen Datensätze angepasst. Die berechneten Halbwertszeiten sind über den entsprechenden Diagrammen angegeben. Mit einem Pfeil sind jeweils die Anregungswellenlängen gekennzeichnet, die der maximalen Bildung des M-Intermediates für die spezifischen Halbwertszeiten zuzuordnen sind.

Die Bildung des M-Intermediates mit einer Halbwertszeit von  $4,62 \mu\text{s}$  ist auf eine Anregung durch Licht im Bereich von  $\sim 510 \text{ nm}$  zurückzuführen. Mit einer Halbwertszeit von  $3$  bzw.  $110 \text{ ms}$  wird das M-Intermediat nach Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\sim 620 \text{ nm}$  bzw.  $\sim 610 \text{ nm}$  beobachtet. Im Rahmen der Genauigkeit der ermittelten Anpassungskurven sind die beiden letzten Anregungswellenlängen als identisch zu betrachten.

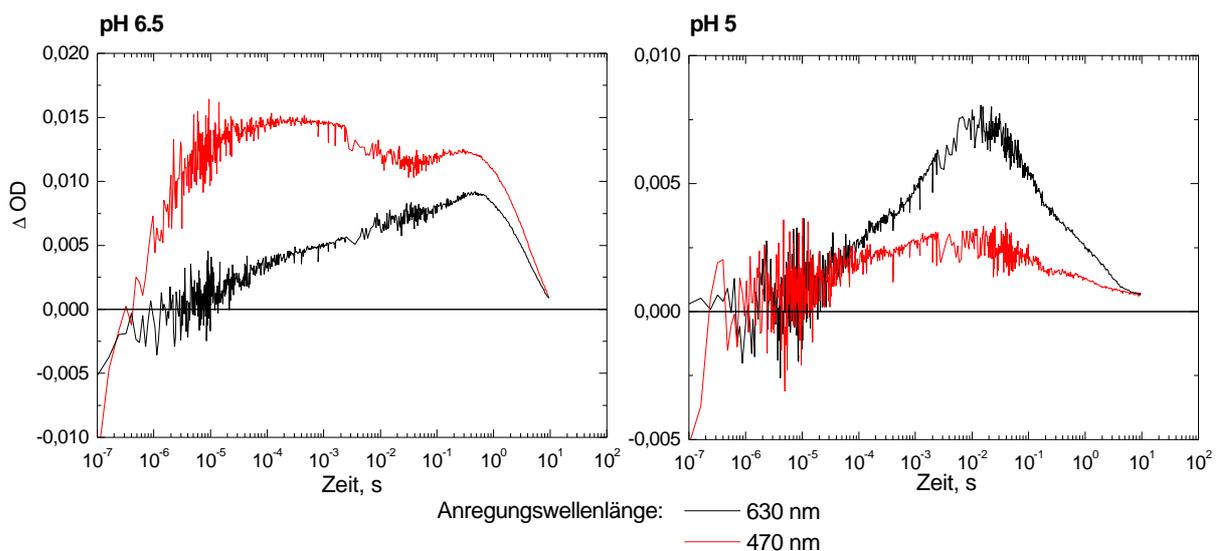
Es ergeben sich somit zwei unterschiedliche Anregungswellenlängen die zur Bildung eines M-Intermediat führen mit deutlich verschiedenen Halbwertszeiten. Vergleicht man die ermittelten Anregungswellenlängen mit den Absorptionsmaxima der beiden Grundzustände, so daß die kinetisch schnellere Bildung des M-Intermediates dem Grundzustand absorbierend bei  $530 \text{ nm}$  zuzuordnen ist und entsprechend die langsamere Kinetik der  $580 \text{ nm}$ -Spezies. Die Abweichung der Wellenlängen maximaler Anregung von den Absorptionsmaxima der beiden SRI-Grundzustände ergibt sich aus der Überlappung der Absorptionsbanden. Die maximale Anregung der einzelnen Spezies wird daher erst bei einer niedrigeren bzw. höheren Wellenlänge als dem Absorptionsmaximum erreicht. In Abbildung 45 ist dieses Phänomen schematisch für zwei Absorptionsbanden verdeutlicht.



**Abb. 45:** Schematische Darstellung zweier überlappender Absorptionsbanden und der daraus für die maximale Anregung resultierenden Wellenlängen. In schwarz (A) und blau (B) sind die absoluten Absorptionsbanden von zwei Absorptionsmaxima dargestellt. Die Differenzkurve in rot (A - B) zeigt hierbei das verschobene Maximum, indem maximale Anregung der Bande A beobachtet wird.

Das M-Intermediat zeigt jedoch mit einer Halbwertszeit von 110 ms noch eine signifikante Anregung bei 510 nm. Für die anschließenden Photozyklus-Experimente wurden daher die Anregungswellenlängen 470 nm und 630 nm gewählt, da hier noch eine ausreichende Anregung der jeweiligen Spezies des Grundzustandes (im folgenden als  $\text{SRI}_{530}$  bzw.  $\text{SRI}_{580}$  bezeichnet) mit minimalem Beitrag des jeweils anderen Grundzustandes erreicht wird. Dies sollte für eine Separierung der spezifischen Photozykluskinetiken ausreichend sein. Die ermittelten Halbwertszeiten sollten hierbei entsprechend erhalten bleiben.

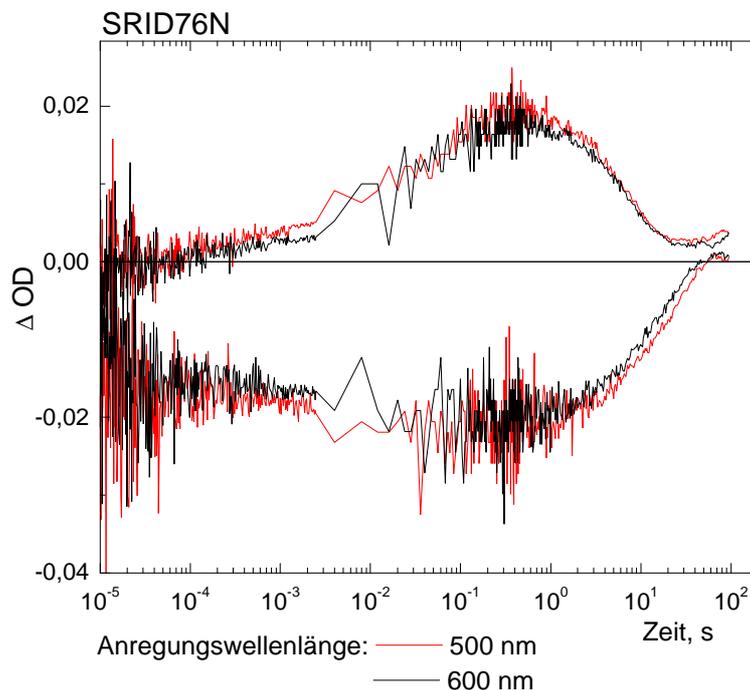
Die Zuordnung der Halbwertszeiten zu  $\text{SRI}_{530}$  bzw.  $\text{SRI}_{580}$  wurden in zwei weiteren Experimenten überprüft. Analog zu dem oben beschriebenen Verfahren wurden die Aktionsspektren des SRIwt-His bei pH 6.5 und pH 5.0 aufgenommen. Wie den pH-Titrationen zu entnehmen ist, liegt bei pH 5.0 hauptsächlich  $\text{SRI}_{580}$  vor. Bei pH 6.5 ist hingegen das Gleichgewicht zur 530 nm-Spezies mit deprotonierter Asparaginsäure 76 verschoben. Exemplarisch sind in der folgenden Abbildung die optischen Transienten bei 400 nm für pH 5.0 und 6.5 nach Anregung bei 630 nm bzw. 470 nm dargestellt.



**Abb. 46:** Transiente Absorption des SRIwt-His bei 400 nm für pH 6.5 und pH 5 nach Anregung mit Licht der Wellenlängen 630 nm und 470 nm.

Im Vergleich der Transienten zeigt sich bei pH 6.5 ein deutlich ausgeprägteres Maximum im Bereich der schnellen Kinetik nach Anregung bei 470 nm. Entsprechend ist bei pH 5.0 unabhängig von der Anregungswellenlänge nur die langsame Bildung des M-Intermediates zu beobachten. Für die Anregung bei 470 nm ist die Amplitude aufgrund des Abstandes zum Absorptionsmaximum von 580 nm entsprechend kleiner. Dies verifiziert die getroffene Zuordnung der langsamen Bildung des M-Intermediates zur 580 nm-Spezies und der schnellen Bildung zur 530 nm-Spezies des Grundzustandes.

Als Modell für den Grundzustand des SRI mit protonierter Asparaginsäure ( $\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$ ) dient die Mutante SRID76N (Rath et al., 1994). Die Untersuchung ihres Photozyklus sollte daher die oben dargestellten Ergebnisse bestätigen. Die Mutagenese des SRI erfolgte nach dem Verfahren von Ho et al. und ist im Kapitel 3.2.7 für die Synthese der Cysteinmutanten näher beschrieben. Das Absorptionsspektrum des SRID76N zeigt wie erwartet ein pH-unabhängiges (pH 5.0 - 7.0) Absorptionsmaximum bei 587 nm. Aufgrund der geringeren Stabilität dieser Mutante wurden die optischen Transienten bei 380 nm und 580 nm für nur zwei Anregungswellenlängen (500 nm und 600 nm) ermittelt (Abb. 47).



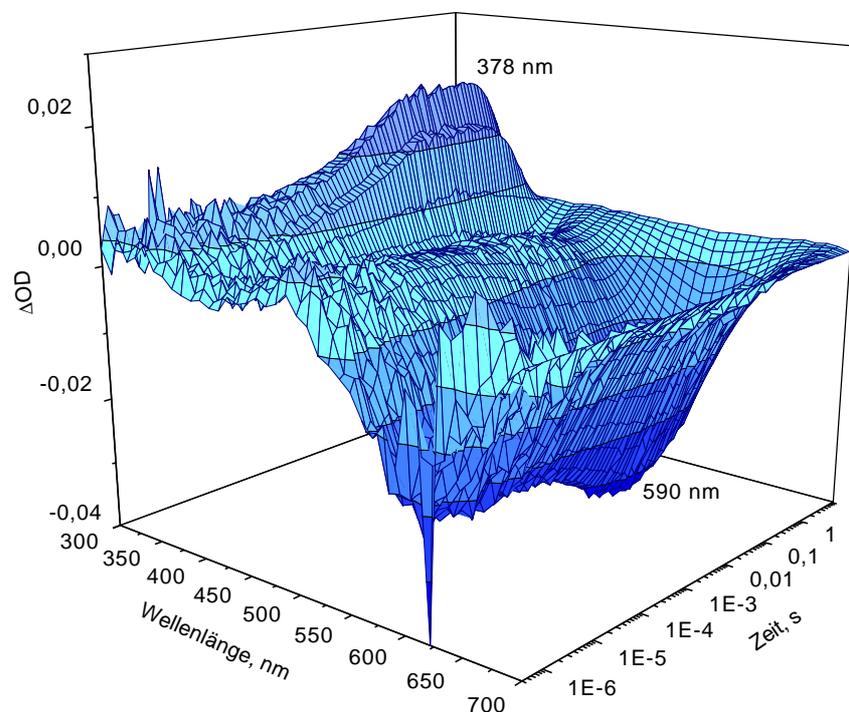
**Abb. 47:** Optische Transienten der Mutante SRID76N bei 380 nm (positive Amplituden) und 580 nm (negative Amplituden) nach Anregung bei 500 nm bzw. 600 nm.

Die optischen Transienten zeigen für beide Anregungswellenlängen (500 nm bzw. 600 nm) einen identischen zeitlichen Verlauf. Die Bildung des M-Intermediates der Mutante SRID76N folgt im Gegensatz zu der des Wildtyps nach Anregung bei 470 nm (Abb. 43) einer singulären Kinetik.

Im Rahmen der Meßgenauigkeit entspricht sie der langsamen Kinetik der Bildung des M-Intermediates im Wildtyp nach Anregung bei 630 nm. Der Zerfall des M-Intermediates bzw. die Rückbildung des Grundzustandes des SRID76N ist ebenfalls etwas langsamer als im Wildtyp. Obwohl der Photozyklus des SRID76N im Vergleich zu Wildtyp insgesamt verlangsamt ist, bestätigen die Beobachtungen die entsprechende Zuordnung der Halbwertszeiten der Bildung des M-Intermediates zu den verschiedenen Spezies des Grundzustandes für das SRIwt-His.

### Photozyklus des SRIwt-His

Zur Bestimmung der Kinetik des Photozyklus von SRIwt-His wurden die Absorptionsänderungen im Wellenlängenbereich von 310 nm bis 710 nm in 10 nm Schritten nach Anregung durch Licht der Wellenlängen 630 nm und 470 nm aufgenommen. Die Wahl der Wellenlängen des Anregungslichtes wurde basierend auf den oben erläuterten Untersuchungen so getroffen, daß es möglich sein sollte die beiden Spezies des Grundzustandes ( $\lambda_{\text{max}}$ : 530 nm und 580 nm) einzeln anzuregen und somit die spezifischen Photozyklen kinetisch zu charakterisieren. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 30°C. In Abbildung 48 sind die transienten Absorptionen des SRIwt-His nach Anregung bei 630 nm exemplarisch dargestellt.

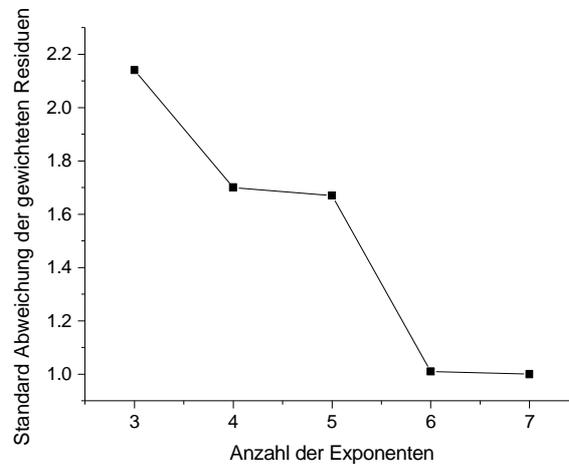


**Abb. 48:** Transiente Absorptionen des im DM solubilisierten SRIwt-His (pH 6,0; 4 M NaCl, 50 mM Mes) bei 30°C nach Anregung durch Licht der Wellenlänge 630 nm.

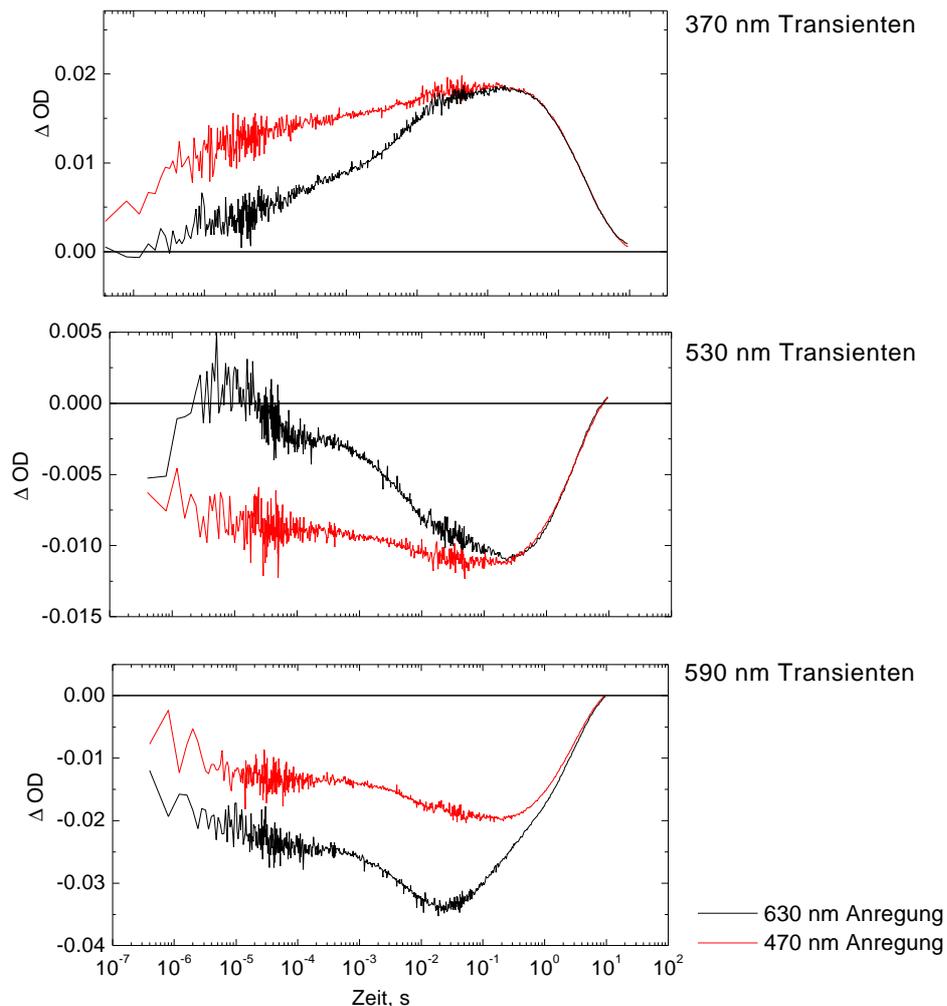
Die beiden Datensätze für die Anregung bei 630 nm und 470 nm wurden mit Hilfe des MEXFIT-Programmes nach der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme analysiert. Die Datenpunkte wurden hierbei von 1  $\mu$ s bis 20 s nach dem Laserpuls für beide Datensätze unabhängig voneinander durch eine Summe von Exponentialtermen beschrieben. Unter der Annahme, daß sich der Photozyklus des SRI durch eine Sequenz irreversibler Reaktionen 1. Ordnung beschreiben läßt, entspricht die Zahl der Exponentialfunktionen der Anzahl der Intermediate.

Die minimale Anzahl der Exponentialfunktionen, die zur Simulation der experimentellen Daten genügt, wurde ermittelt, indem ihre Zahl sukzessive erhöht wurde, bis keine Verringerung der Standardabweichung der gewichteten Residuen mehr beobachtet

werden konnte (Abb.49). Zur Simulation der Absorptionsänderungen waren für beide Anregungswellenlängen jeweils sechs Exponentialfunktionen ausreichend. Die Ergebnisse der Datenanalyse sind in Abbildung 50 wiedergegeben.

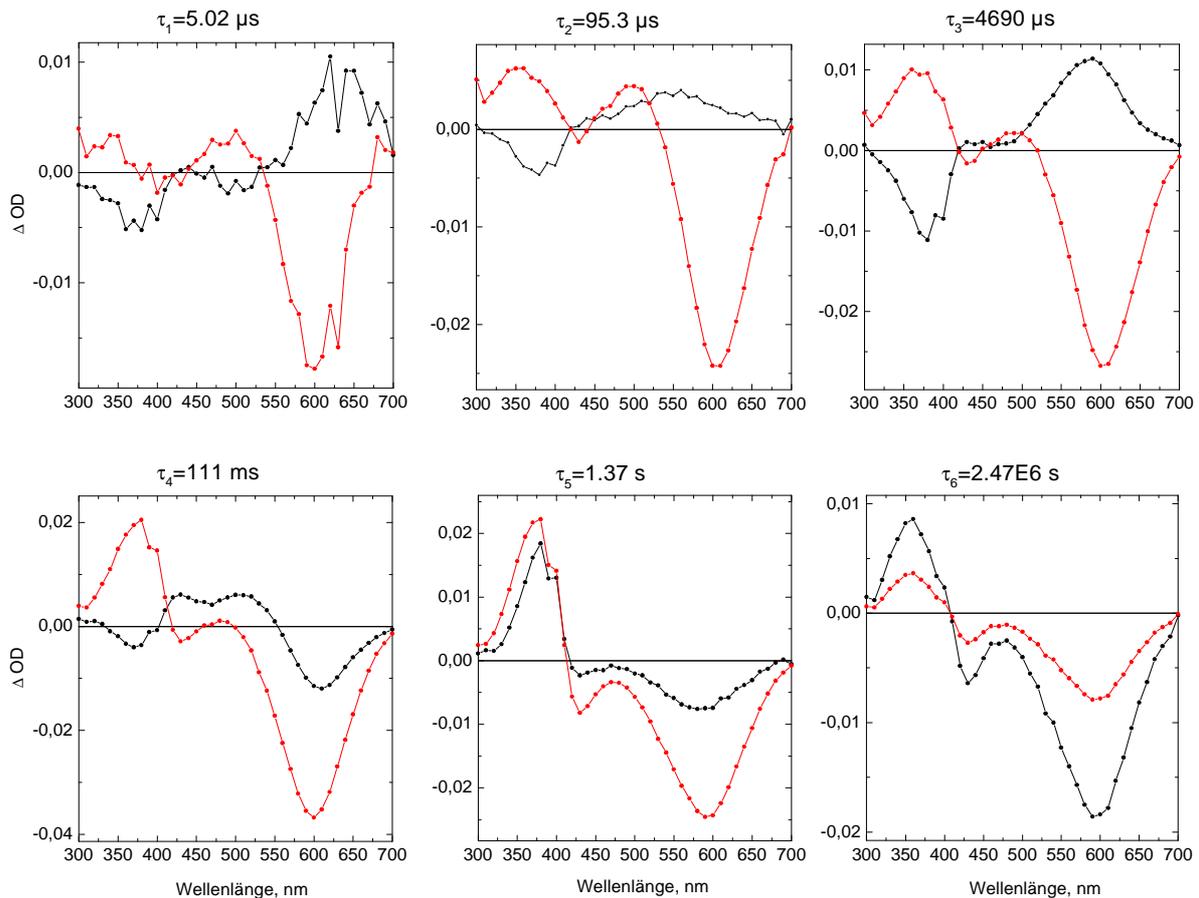


**Abb. 49:** Standardabweichung der gewichteten Residuen in Abhängigkeit von der Anzahl der Exponenten bzw. Exponentialfunktionen.



**Abb. 50:** Differentielle Absorptionsänderungen des SRIwt-His nach Anregung bei 470 nm bzw. 630 nm. Es sind exemplarisch die drei indikativen Wellenlängen 400 nm, 530 nm und 580 nm dargestellt.

Die Exponenten der Funktionen stellen die apparenten Geschwindigkeitskonstanten  $k_i^*$  der einzelnen thermischen Zerfälle dar, aus ihnen wurden die Halbwertszeiten berechnet. Die Amplitudenspektren  $b_i(\lambda)$  der einzelnen Exponenten wurden, wie in Abschnitt 2.9.2 beschrieben, ermittelt und die differentiellen Spektren  $\Delta\varepsilon_i(\lambda)$  der Intermediate hieraus abgeleitet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 dargestellt.



**Abb. 51:** Amplitudenspektren  $b_i(\lambda)$  (in schwarz) der Exponenten und die daraus resultierenden Differenzspektren  $\Delta\varepsilon_i(\lambda)$  (in rot) für das SRIwt-His (630 nm Anregung). Die berechneten Halbwertszeiten sind angegeben.

Aus der Datenanalyse geht hervor, daß der Photozyklus des SRI mindestens sechs kinetisch unterscheidbare Intermediate durchläuft. Mögliche Intermediate mit einer Halbwertszeit von  $\tau < 1\mu\text{s}$  konnten hierbei durch die gewählten Meßparameter nicht aufgelöst werden.

Analog zu den oben dargestellten Untersuchungen wurde der Photozyklus des SRIwt-His bei pH 4.5 nach Anregung bei 560 nm aufgenommen und analysiert. Dem pH-Titrationsexperiment ist zu entnehmen, daß bei pH 4.5 nahezu ausschließlich  $\text{SRI}_{580}$  im Grundzustand vorliegt. So kann hier unabhängig von der Anregungswellenlänge von 560 nm selektiv der Photozyklus des  $\text{SRI}_{580}$  beobachtet werden.

Von Spudich & Spudich (1993) ist eine geringe pH-Abhängigkeit des M-Zerfalls für das freie SRI dokumentiert, so daß hier vermutlich für alle Halbwertszeiten leicht abweichende Werte im Vergleich zu denen pH 6.0 zu beobachten sein werden.

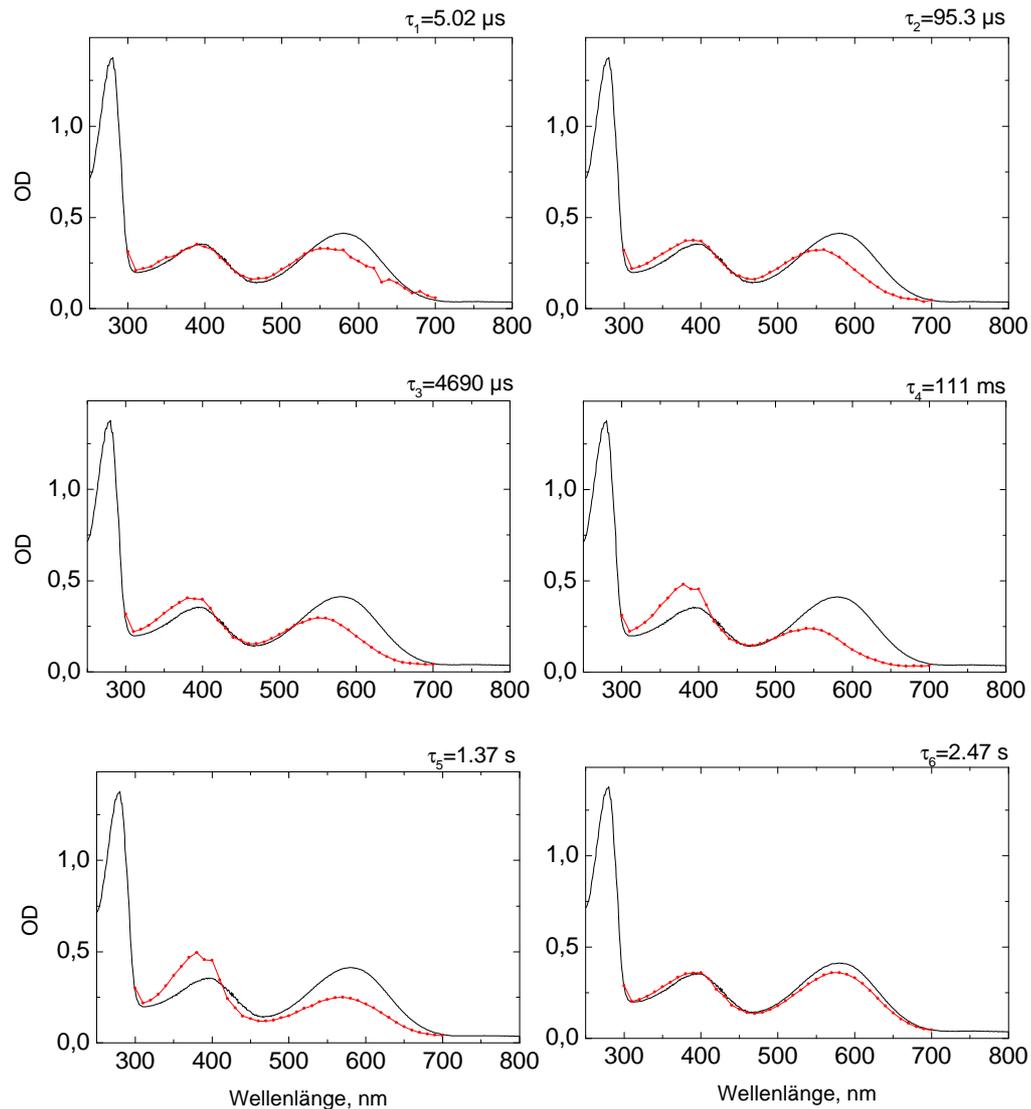
Die Daten wurden entsprechend dem zuvor erläuterten Verfahren ausgewertet. Man erhält für den Photozyklus des SRI<sub>580</sub> bei pH 4.5 analog zu den oben dargestellten Ergebnissen sechs kinetisch unterscheidbare Intermediate. Die ermittelten Halbwertszeiten sind im folgenden Abschnitt mit den Ergebnissen der anderen Messungen zusammengefasst.

Im folgenden wurden die absoluten Spektren der Intermediate für alle Messungen nach Gleichung (10) (Abschnitt 2.9.2) aus den Amplitudenspektren berechnet.

### **Absolute Spektren der Intermediate**

Aus den apparenten Geschwindigkeitskonstanten  $k_i^*$  lassen sich basierend auf dem Modell sequentieller irreversibler Folgereaktionen 1. Ordnung die Absorptionsspektren der einzelnen Intermediate wie unter 2.9.2 (Gleichung 9 + 10) beschrieben berechnen. Die für die Berechnung notwendige „Cycling Fraction“  $F_c$ , der Anteil der Moleküle, der nach Belichtung den Photozyklus durchläuft, wurde für beide Anregungswellenlängen unabhängig voneinander iterativ bestimmt.

Sie beträgt für die Anregung des SRI bei 630 nm 14 % und für die bei 470 nm im Vergleich nur 8 %. Der niedrige Anteil der angeregten Moleküle bedingt sich aus der Wahl der Anregungswellenlänge, die 50 bzw. 60 nm neben dem Absorptionsmaximum liegt. Für die Anregung bei 470 nm ist die „Cycling Fraction“ zusätzlich kleiner, da bei pH 6.0 der Grundzustand durch die 580 nm-Spezies dominiert ist. Die berechneten Absorptionsspektren der Intermediate für die Anregung bei 630 nm sind in der folgenden Abbildung gezeigt. Alle ermittelten Absorptionsmaxima der Intermediate mit ihren korrespondierenden Halbwertszeiten sind in der anschließenden Tabelle aufgelistet.



**Abb.52:** Absolute Spektren der Intermediate des Photozyklus des SRIwt-His nach Anregung bei 630 nm (30°C). In schwarz ist jeweils das Absorptionsspektrum des Grundzustandes wiedergegeben. Die berechneten Punkte der Intermediatspektren sind durch Linien verbunden und in rot dargestellt.

Obwohl für die Anregung bei 630 nm sechs Übergänge ( $P_1$  bis  $P_6$ ) kinetisch aufgelöst wurden, sind in den Spektren nur zwei spektral distinkte Banden nachzuweisen. Die Nomenklatur der einzelnen Intermediate erfolgt in Anlehnung an die für den BR-Photozyklus mit K, L, M, N und O (Lozier et al., 1975). Die Bildung des K-Intermediates, dessen Absorptionsmaximum von Bogomolni et al. (1987) mit 610 nm angegeben wird, konnte hier zeitlich nicht aufgelöst werden. Im ersten Intermediatspektrum ( $P_1$ ) ist das K-Intermediat nur durch ein sehr kleines lokales Maximum bei 610 nm erkennbar. Mit einer Halbwertszeit von 5  $\mu\text{s}$  wird dann das L-Intermediat ( $P_2$ ) mit einem Absorptionsmaximum von 560 nm gebildet. Mit einer Halbwertszeit von  $\tau_2 = 95 \mu\text{s}$  geht  $L_{560}$  dann in ein schnelles  $L_{560} \leftrightarrow M_{373}$  Quasigleichgewicht über ( $P_3$ ).

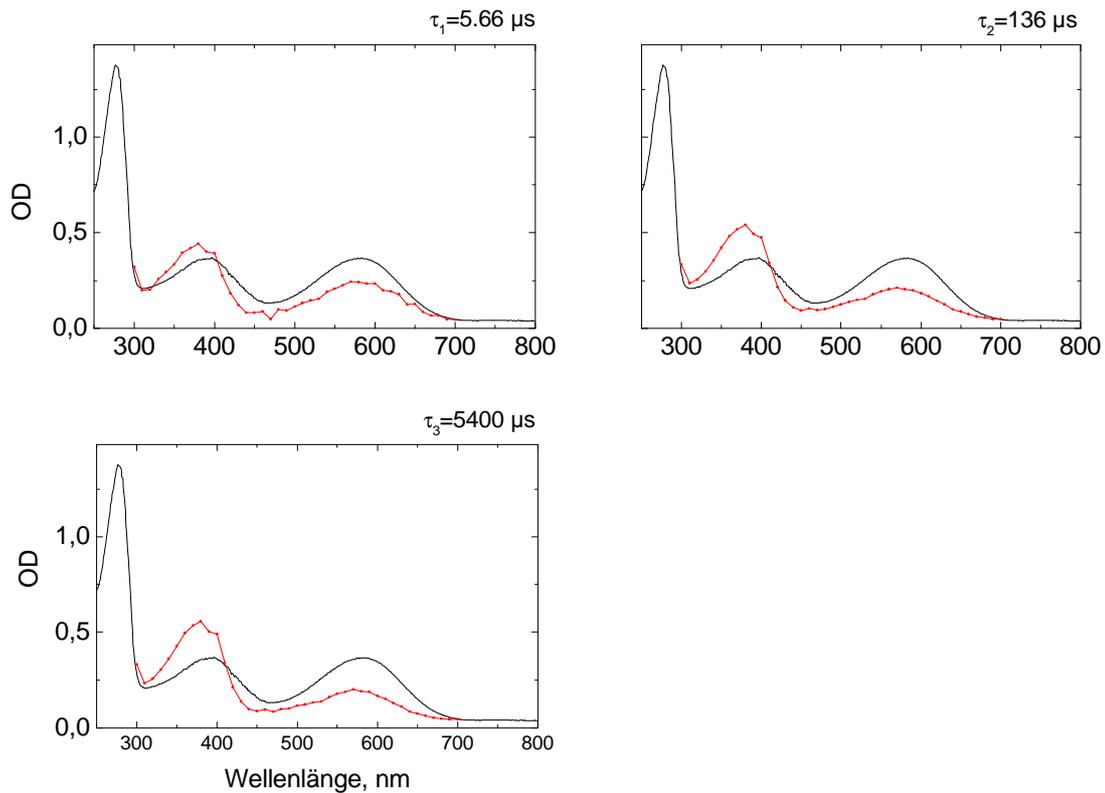
Das Auftreten mehrerer Absorptionsbanden in den berechneten Spektren der kinetisch aufgelösten Intermediate wurde von Chizov et al. (1996) bereits bei der Analyse des BR-Photozyklus beobachtet. Als Erklärung wurde von den Autoren schnelle Quasigleichgewichte zwischen zwei spektral unterscheidbaren Intermediaten postuliert, die kinetisch nicht aufgelöst werden können. Die Bildung von  $M_{373}$  erfolgt anschließend mit  $\tau_3 = 4,69$  ms (P4).

Zusätzlich sind hier im Intermediatspektrum die Absorptionsbanden des Grundzustandes  $SRI_{530}$  und  $SRI_{400}$  zu erkennen. Die Intermediatspektren berechnen sich aus der Summe des Grundspektrums und der einzelnen differentiellen Spektren. Da die Absorption von  $SRI_{550}$  und  $SRI_{400}$  im Verlauf des Photozyklus nahezu unverändert ist, ergibt sich somit ihr Beitrag in jedem Intermediatspektrum.

Mit einer Halbwertszeit von 111 ms geht  $M_{373}$  in ein Quasigleichgewicht mit  $N_{560}$  (P<sub>5</sub>) über und zerfällt schließlich in den Grundzustand mit  $\tau_5 = 1,3$  s (P<sub>6</sub>). Insgesamt wird die Zuordnung durch die in allen Spektren sichtbare Bande des Grundzustandes  $SRI_{530}$  erschwert. Ein dem O-Intermediat im BR-Photozyklus analoges Intermediat fehlt im Photozyklus des SRI und ist auch in der Literatur bisher nicht dokumentiert.

In Abbildung 53 sind zum Vergleich drei der sechs Intermediatspektren des SRI nach Anregung bei 470 nm gezeigt, in denen signifikante Unterschiede zu den oben dargestellten zu erkennen sind. Die ermittelten Halbwertszeiten der Intermediate des SRI nach Anregung bei 470 nm sind im Rahmen der Meßgenauigkeit identisch mit denen für die Anregung bei 630 nm. Dies bedingt sich vor allem darin, daß auch bei einer Anregung bei 470 nm ein geringer Anteil der 580 nm Spezies des Grundzustandes angeregt wird und den Photozyklus durchläuft.

Die absoluten Intermediatspektren resultieren daher aus einer Überlagerung der Photozyklen der beiden Grundzustände des SRI. Im Vergleich mit den oben dargestellten Photozyklusdaten der 580 nm Spezies läßt sich jedoch eine Zuordnung treffen.



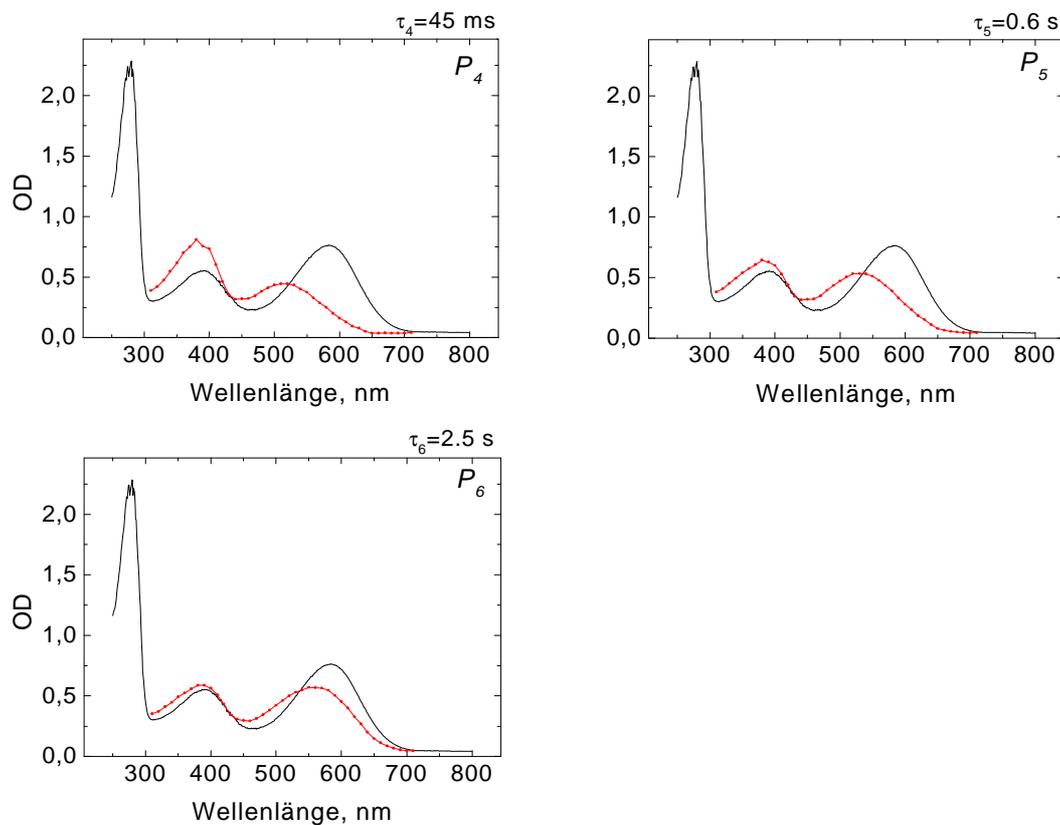
**Abb.53:** Absolute Spektren der Intermediate des Photozyklus des SRIwt-His nach Anregung bei 470 nm (30°C) bei drei indikativen Halbwertszeiten (insgesamt sechs). In schwarz ist jeweils das Absorptionsspektrum des Grundzustandes wiedergegeben. Die berechneten Punkte der Intermediatspektren sind durch Linien verbunden und in rot dargestellt.

Für die Anregung des SRI bei 470 nm ist in  $P_1$  bereits ein geringer Anteil des M-Intermediates ( $\lambda_{\max} = 373$  nm) zu erkennen. Die Bildung des  $K_{610}$ - und  $L_{560}$ -Intermediates ist somit für die 530 nm Spezies deutlich schneller und konnte hier kinetisch nicht aufgelöst werden. Mit einer Halbwertszeit von 5  $\mu$ s wird  $M_{373}$  gebildet und ist eindeutig  $SRI_{530}$  zuzuordnen ( $P_2$ ).  $M_{373}$  wird mit  $\tau_2 = 136$   $\mu$ s in einem spektral unsichtbaren Übergang in ein weiteres  $M_{373}$  ( $P_3$ ) umgewandelt. Dieser Übergang entspricht vermutlich dem Orientierungswechsel des M-Intermediates von der extrazellulären zur zytoplasmatischen Seite des Protonenkanals, der als molekularer Schalter von Oesterhelt et al. (1992) für das BR postuliert wurde.

In  $P_4$  ist mit  $\tau_3 = 5,4$  ms eine Abnahme der Absorptionsbande bei 580 nm und eine geringe Zunahme von  $M_{373}$  zu beobachten. Dieser Übergang ist vermutlich dem L-M-Quasigleichgewicht des  $SRI_{580}$  zuzuordnen. Die Bildung von  $M_{373}$  ( $P_5$ ) ist eindeutig auf  $SRI_{580}$  zurückzuführen, da die Halbwertszeit von 111 ms identisch ist mit der für den Photozyklus des  $SRI_{580}$  ermittelten. Das M-Intermediat beider Spezies des Grundzustandes zerfällt anschließend mit einer Halbwertszeit von 1,3 ms ( $P_6$ ).

Der Photozyklus des SRI bei pH 4.5 ist insgesamt beschleunigt. Es konnten ebenfalls sechs Intermediatspektren berechnet werden, deren Halbwertszeiten eng mit den oben angegebenen korrelieren. Die ersten drei absoluten Intermediatspektren sind nahezu identisch mit denen für das SRI<sub>580</sub> nach Anregung bei 630 nm.

In Abbildung 54 sind die letzten drei Intermediatspektren gezeigt. Neben der Bildung von M<sub>373</sub> mit  $\tau_3 = 1,6$  ms ist in P<sub>4</sub> eine zweite Bande bei 510 nm zu erkennen. Mit einer Halbwertszeit von  $\tau_4 = 45$  ms geht M<sub>373</sub> anschließend in ein M<sub>373</sub>  $\leftrightarrow$  X ( $\lambda_{\max}$  530 nm) Gleichgewicht über und zerfällt schließlich mit  $\tau_5 = 0.6$  s. P<sub>6</sub> wird bereits von den typischen Absorptionsbanden des Grundzustandes dominiert, der hier jedoch noch nicht vollständig zurückgebildet ist.



**Abb. 54:** Absolute Spektren der Intermediate des Photozyklus des SRIwt-His nach Anregung bei 560 nm (pH 4.5; 30°C) bei drei indikativen Halbwertszeiten (insgesamt sechs). In schwarz ist jeweils das Absorptionsspektrum des Grundzustandes wiedergegeben. Die berechneten Punkte der Intermediatspektren sind durch Linien verbunden und in rot dargestellt.

Es zeigt sich jedoch deutlich, daß, entgegen den Beobachtungen von Schmies et al. (2000), das SRI einen Photozyklus bei pH 4.5 unter Bildung eines M-Intermediates durchläuft. Aus allen Messungen geht eindeutig hervor, daß SRI<sub>580</sub> ebenso wie SRI<sub>530</sub> einen Photozyklus durchlaufen. Die Halbwertszeiten der einzelnen Intermediate sind bis zur Bildung des M-Intermediates unterschiedlich, wohingegen der Zerfall von M<sub>373</sub> kinetisch identisch ist.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Untersuchungen zusammengefasst:

**Tabelle 2:** Vergleich der Halbwertszeiten der Photozyklusintermediate des SRI<sub>580</sub> (pH 6.0 und pH 4.5) sowie des SRI<sub>530</sub> (pH 6.0) bei 30°C

	SRI <sub>580</sub> (pH 6.0)	SRI <sub>580</sub> (pH 4.5)	Intermediat	SRI <sub>530</sub> (pH 6.0)	Intermediat
$\tau_1$	5 $\mu$ s	2,3 $\mu$ s	K <sub>610</sub> Zerfall	6 $\mu$ s	M <sub>373</sub> Bildung
$\tau_2$	95 $\mu$ s	57 $\mu$ s	L <sub>560</sub> $\leftrightarrow$ M <sub>373</sub>	140 $\mu$ s	
$\tau_3$	5 ms	1,6 ms	M <sub>373</sub> Bildung	5,5 ms	M <sub>373</sub> Bildung (SRI <sub>580</sub> )
$\tau_4$	111 ms	(45 ms)	M <sub>373</sub> $\leftrightarrow$ N <sub>560</sub>	110 ms	
$\tau_5$	1,4 s	(0,6 s)	M <sub>373</sub> /N <sub>560</sub> Zerfall	1,3 s	M <sub>373</sub> Zerfall
$\tau_6$	2,5 s	2,6 s		2,7 s	

Die Daten für SRI<sub>580</sub> bei 4.5, die in Klammern gesetzt wurden, sind nicht eindeutig einem Intermediat-Übergang zuzuordnen.

### Photozyklus des SRI-link-tHtrl-His

Die Untersuchung des Photozyklus des SRI-link-tHtrl-His erfolgte analog zu der des Transducer-freien-SRI. Es wurden die optischen Transienten des SRI-link-tHtrl-His im Bereich von 370 bis 700 nm nach Anregung bei 630 nm bzw. 470 nm bei pH 6.0 aufgenommen. Zusätzlich wurden die Photozyklusdaten bei pH 4.5 nach Anregung bei 560 nm ermittelt. Spudich & Spudich (1993) dokumentierten für das SRI im funktionellen Komplex mit seinem Transducer im Gegensatz zum freien SRI einen pH-unabhängigen Zerfall des M-Intermediates. Ein Vergleich der hier für das SRI-link-tHtrl-His bestimmten Halbwertszeiten des M<sub>373</sub>-Zerfalls bei pH 4.5 und 6.0 untereinander und mit den oben dargestellten Werten für das SRI sollte daher den Nachweis liefern, daß im Fusionsprotein des SRI mit dem tHtrl ein funktioneller Rezeptor-Transducer-Komplex vorliegt.

Die berechneten absoluten Spektren der Intermediate des SRI-link-tHtrl-His und die ermittelten Halbwertszeiten sind für alle Messungen identisch mit denen für das SRIwt-His. Nach Anregung bei 470 nm zeigt sich hier ebenfalls eine schnelle Komponente der Bildung von M<sub>373</sub>, welche wie oben erläutert der 530 nm-Spezies des Grundzustandes zuzuordnen ist.

Im funktionellen Komplex sollte jedoch bei pH 6.0 ausschließlich SRI<sub>580</sub> vorliegen. Im Vergleich der Halbwertszeiten bei pH 6.0 und pH 4.5 zeigt sich zudem für das SRI-link-tHtrl-His analog zum SRIwt-His eine Beschleunigung des Photozyklus bei pH 4.5. Es ist daher zu vermuten, daß mit dem Fusionsprotein SRI-link-tHtrl-His kein funktioneller Komplex dargestellt wurde.

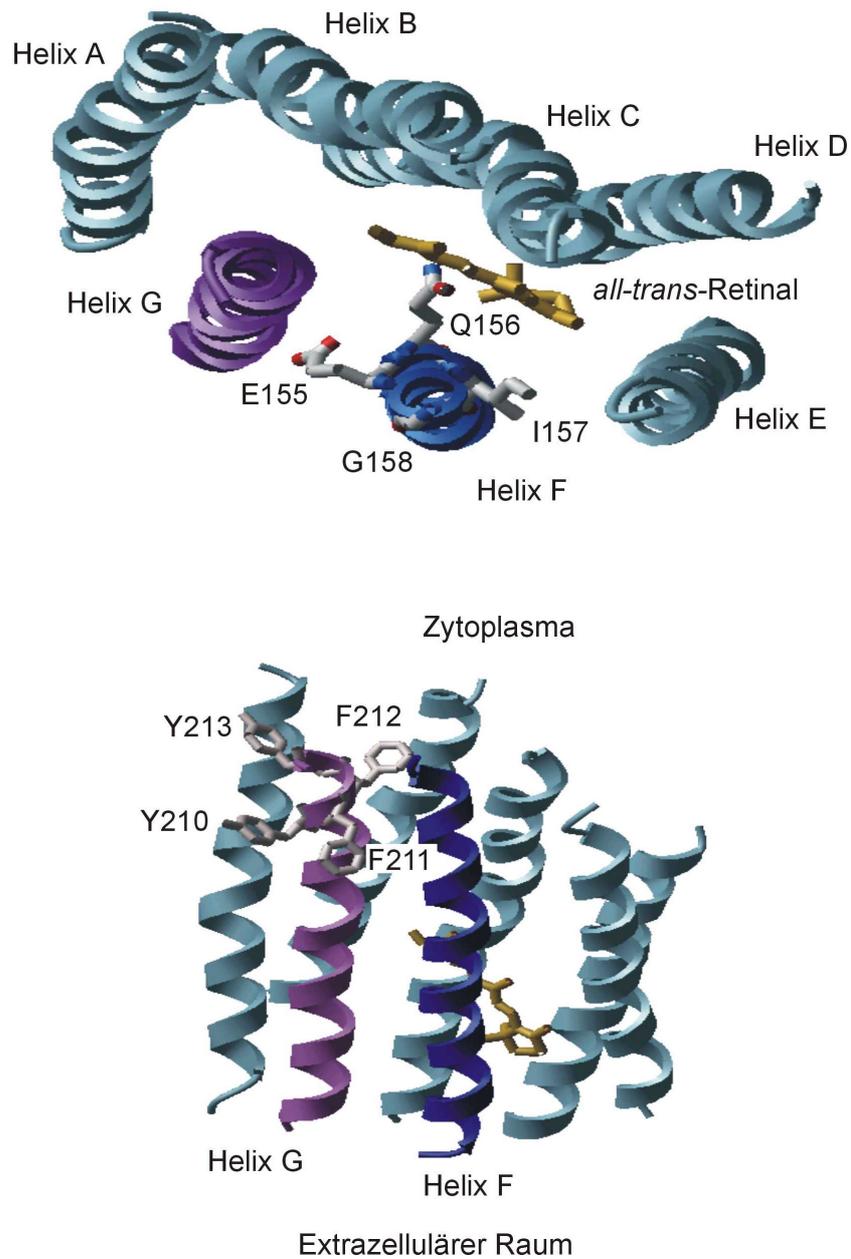
### 3.2.7 ESR-Messungen der SRI-Mutanten

#### Auswahl der SRI-His-Cysteinmutanten zur Spinmarkierung

Die Auswahl der Positionen im SRI für eine Spinmarkierung erfolgte in Analogie zu ESR-Experimenten an BR und pSRII. Für Bakteriorhodopsin (BR) und dem sensorischen Rhodopsin II aus *N. pharaonis* (pSRII) konnte in ESR-Untersuchungen gezeigt werden, daß während der Photozyklen konformationelle Änderungen im Bereich der Helix F und G stattfinden (Rink et al., 2000; Wegener et al., 2000). Durch Spinmarkierung der Helix F im zytoplasmatischen Bereich konnte für BR eine Relativbewegung der Helix F zur Helix G nachgewiesen werden. Die Positionen 170 und 166 in der Kontaktfläche der Helix F zu G zeigten hierbei eine transiente Immobilisierung nach Photoinduktion. Die Mobilität der Seitenketten 171 und 167 nimmt hingegen zu.

Für die ESR-Untersuchungen des pSRII wurden die Positionen homolog zum BR spinmarkiert und es zeigte sich hier ebenfalls eine Auswärtsbewegung der Helix F. Desweiteren konnte für das pSRII gezeigt werden, daß die Wechselwirkung im Komplex mit seinem Transducer pHtrl im Bereich der Helices F und G erfolgt.

Als Anhaltspunkt für die Auswahl der Positionen der Spinmarkierung im SRI diene zum einen das von Lin et al. (1997) ermittelte Modell des SRI auf der Basis der Kristallstruktur des BR. Zusammen mit einem Sequenzvergleich mit dem pSRII wurden so die homologen Positionen im Bereich der Helix F und G ermittelt.



**Abb. 55:** Darstellung des Strukturmodells der SRI (Lin et al., 1997). Die vermutliche Orientierung der für die Mutation ausgewählten Aminosäureseitenketten in Helix F und G sind eingezeichnet. (a) Sicht von der zytoplasmatische Seite (eingezeichnet sind 155-158) (b) Sicht parallel zur Membran (eingezeichnet sind 210-213).

Für die Helix G wurden die Aminosäuren Y210, F211, F212, und Y213 ausgesucht, welche eine komplette Helixwindung repräsentieren. Dies erlaubt eine Messung in jede Richtung senkrecht zur Helixachse. Im Bereich der Helix F wurden zunächst die Aminosäuren Q, I, G und L (Positionen 156 – 159) für eine Spinmarkierung ausgewählt.

Da sich die Synthese der entsprechenden Cysteinmutanten als sehr schwierig erwies, wie im folgenden erläutert wird, wurden zusätzlich die Positionen P154, E155 und F160 und N161 mutiert um hier ebenfalls eine Messung in jede Richtung senkrecht zur Helix zu ermöglichen.

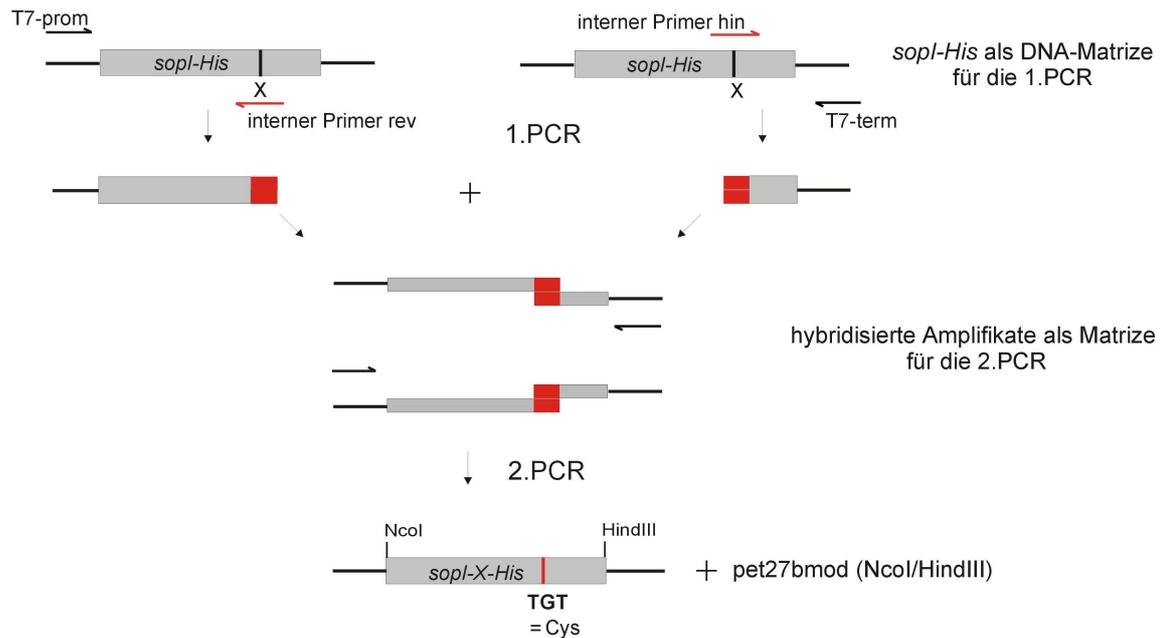
Zunächst sollten durch CW-ESR-Messungen und Zugänglichkeitsmessungen die Orientierung der Aminosäureseitenketten an den ausgewählten Positionen ermittelt und mit den Daten des Modells verglichen werden. Im Anschluß daran sollten nach Auswahl geeigneter Mutanten durch zeitaufgelöste ESR-Spektroskopie die strukturellen Änderungen während des Photozyklus kinetisch analysiert werden.

Da das SRI in der Zelle vornehmlich die photophile Antwort triggert, ist insbesondere ein Vergleich mit dem photophoben Rezeptor pSRII hinsichtlich der Unterschiede der strukturellen Änderungen der verschiedenen phototaktischen Antworten von Interesse.

### **Mutagenese des SRI-His**

Der Austausch der ausgewählten Aminosäuren gegen ein Cystein erfolgte durch die „Overlap-Extension“-Methode nach Ho et al. (1989) indem das entsprechende Codon in der DNA-Sequenz des Gens gegen das für eine Cystein codierende Basentriplett TGT ersetzt wurde.

Bei dieser Methode werden zunächst durch PCR mit den beiden komplementären internen Primern, die die Mutation enthalten, in Kombination mit den flankierenden Primern unabhängig voneinander zwei Fragmente des Gens amplifiziert. In einer zweiten PCR werden die beiden DNA-Fragmente über den homologen überlappenden Bereich hybridisiert und das gesamte Gen mit der eingeführten Mutation mit Hilfe der flankierenden Primer amplifiziert.



**Abb. 56:** Schematische Darstellung der „Overlap-Extension“-Methode von Ho et al. (1989) zur ortsspezifischen Mutagenese des *sopI-His*.

Für die Mutagenese des SRI-His wurden die unter 2.6.8 aufgeführten internen Primer verwendet, deren Bezeichnung die Position der ausgetauschten Aminosäure beinhalten. Als flankierende Primer wurden, begründet in der Amplifikation aus dem Vektor pET27bmod, der T7-Promotor und –Terminator Primer verwendet. Das Amplifikat wurde anschließend über die Schnittstellen NcoI/HindIII in den Vektor pET27bmod kloniert.

Der Expressionsvektor wurde zunächst in *E.coli* XL1-Blue transformiert und die Transformanten durch Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA mit NcoI/EcoRI selektiert. Für den Expressionsvektor erhält man im Gegensatz zum religierten Vektor ein 750bp langes DNA-Fragment des SRI-Gens.

Die Überprüfung der DNA-Sequenz des *sopI* insbesondere hinsichtlich der ortsspezifischen Mutation erfolgte durch Sequenzierung der DNA. Für die Synthese der Cysteinmutanten des SRI-His wurden die so erstellten Expressionsvektoren jeweils in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert.

Die Mutagenese des SRI im Komplex SRI-link-tHtrIHis erfolgte analog zum oben dargestellten Verfahren unter Verwendung des Vektors pET27bmod-*sopI-link-thtrI-His* als Matrize.

### Reinigung und Spinmarkierung der SRI-Cysteinmutanten

Die Synthese und Reinigung der Cysteinmutanten erfolgte nach dem für das SRIwt-His unter 3.2.1 beschriebenen Verfahren. Es zeigte sich jedoch, daß die Stabilität der SRI-His-Mutanten durch den Austausch einer Aminosäure gegen Cystein abhängig von der Position stark reduziert war.

Besonders problematisch erwiesen sich die Mutanten der Helix G, hier konnte nur SRI-F211C-His isoliert werden. Für die Cysteinmutanten an den Positionen 159, 160, 161, 210, 212 und 213 konnte kein farbiges Protein isoliert werden. Die Eluate der Nickel-Säulen zeigten hier im UV-Vis-Spektrum zum Teil nur eine geringe Absorption bei 280 nm und auch die SDS-Gele zeigten jeweils Banden verteilt über den gesamten Trennbereich neben einer schwachen Bande in der für das SRI korrespondierenden Größe. Diese Mutanten wurden daraufhin verworfen, da der Verlust des Chromophors daraufhin deutet, daß die Mutanten strukturelle Änderungen im Vergleich zum SRI-Wildtyp aufweisen.

Die Mutanten E155C und I157C der Helix F zeigten ein zum Wildtyp hypsochrom verschobenes Absorptionsmaximum nach der Reaktion mit dem Label und eine höhere Absorption bei 400 nm als der Wildtyp. Unter Belichtung erwiesen sie sich als wesentlicher labiler als andere Mutanten. Sie wurden aber dennoch wie unten beschrieben für die ESR-Messungen verwendet.

Die Mutanten G158C und F211C zeigten ein zum SRI-Wildtyp analoges Verhalten. Der Austausch der Aminosäuren P154 und Q156 hatte keinen Einfluß auf das Absorptionsmaximum des Chromophors, jedoch wiesen die Mutanten eine geringere Expressionsrate und eine verminderte Stabilität besonders unter Lichteinfluß auf.

Die Mutanten 156-159 wurden zusätzlich noch als Fusionsprotein mit dem verkürzten Transducer synthetisiert. Überraschender Weise konnte die Mutante SRI-G158C-link-tHtrl-His im Gegensatz zum freien SRI-His-G158C nur in sehr geringen Ausbeuten erhalten werden. Während der Reaktion mit dem Label bleichte sie ebenso wie die Mutante SRI-159-link-tHtrl-His komplett, d.h. der Chromophor ging verloren. Diese Mutanten wurden daher nicht weiter untersucht. Die Mutanten SRI-Q156C-link-tHtrl-His, SRI-I157C-link-tHtrl-His und SRI-F211C-link-tHtrl-His verhielten sich analog zu denen ohne Transducer.

In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Mutanten mit den Beobachtungen bei der Präparation sowie ihre Absorptionsmaxima zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Stabilität und Absorptionsmaxima der Cysteinmutanten des SRI-His

Position der Mutation	Expressionsrate	Stabilität	Absorptionsmaximum
P154C	0,4 mg/L	geringere Stabilität bei Belichtung	575-580 nm
E155C	0,4 mg/L	bleicht z. T. beim labeln	560-570 nm
Q156C	0,4 mg/L	geringere Stabilität bei Belichtung	575-580 nm
Q156C-link-tHtrlHis	0,65 mg/L	vgl. 156	580-590 nm
I157C	0,5 mg/L	instabil unter Belichtung; bleicht z.T. beim labeln	560 nm
I157C-link-tHtrlHis	0,6 mg/L	bleicht z. T. beim labeln	560-570 nm
G158C	1 mg/L, analog zum SRI-His		580 nm
G158C-link-tHtrlHis	0,06 mg/L	wenig Protein isolierbar, bleicht beim labeln komplett	575 nm
L159C	nicht ermittelbar	kein farbiges Protein isolierbar	(-)
L159C-link-tHtrlHis	0,14 mg/L	wenig Protein isolierbar, bleicht komplett beim labeln	575 nm
F160C	nicht ermittelbar	kein farbiges Protein isolierbar	(-)
Position der Mutation	Expressionsrate	Stabilität	Absorptionsmaximum
N161C	nicht ermittelbar	kein farbiges Protein isolierbar	(-)
Y210C	nicht ermittelbar	kein farbiges Protein isolierbar	(-)
F211C	1-2 mg/L analog zum SRI-His		580-585 nm
F211C-link-tHtrlHis	0,6 mg/mL	instabil unter Belichtung	566 nm
F212C	nicht ermittelbar	kein farbiges Protein isolierbar	(-)
Y213C	nicht ermittelbar	kein farbiges Protein isolierbar	(-)

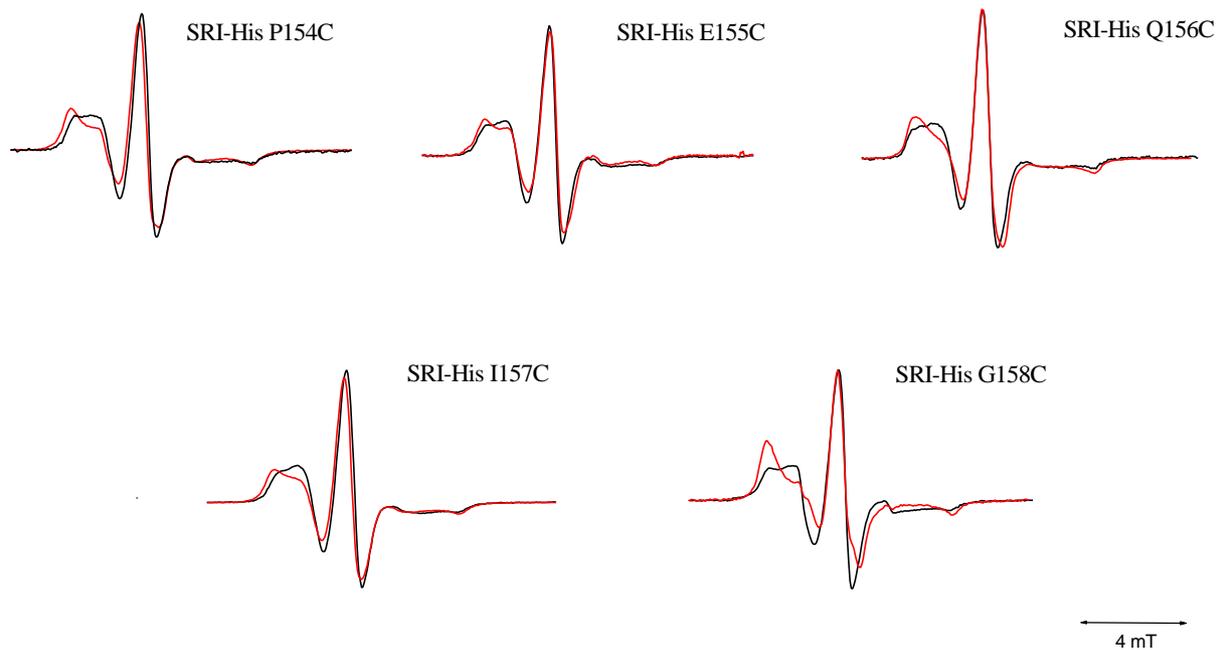
Die gereinigten SRI-Mutanten wurden auf ca. 1-2 mL ankonzentriert und mit 10 mM DTT versetzt um das Cystein, welches möglicherweise während der Präparation durch Luftsauerstoff oxidiert wurde, zu reduzieren. Das Reduktionsmittel wurde anschließend durch Dialyse gegen Puffer (4 M NaCl, 50 mM Mes, pH 6.0) entfernt und mit dem Spinlabel MTSL (100 mM in DMSO) in einem Volumenverhältnis von 1:100 über Nacht inkubiert. Überschüssiger Spinlabel wurde dann durch eine Rechromatographie über eine Nickel-Säule wie beschrieben (2.7.4) entfernt. Für die ESR-Messungen wurden die gelabelten Mutanten als Solubilisat auf eine Konzentration von 5 mg/mL eingeeengt. Zusätzlich wurde ein Teil der Solubilisate für die Rekonstitution in PM-Lipide wie oben beschrieben verwendet.

Der Markierungsgrad der Proben, der sich aus dem Verhältnis der Konzentration des Spinlabels, dem ESR-Spektrum entnommen, zur Konzentration des Proteins, mit Hilfe der Chromophorabsorption bestimmt, konnte nicht exakt ermittelt werden. Es wurden zum Teil Markierungsgrade von über 100 % berechnet. Dies ist entweder auf Verunreinigungen durch Fremdproteine zurückzuführen oder auch auf eine ungenaue Konzentrationsbestimmung des Proteins über die Chromophorabsorption, da ein Anteil der jeweiligen SRI-Mutante während der Reinigung und der Reaktion mit dem Spinlabel den Chromophor verloren hatte und somit nicht berücksichtigt wurde.

### **ESR-Spektren**

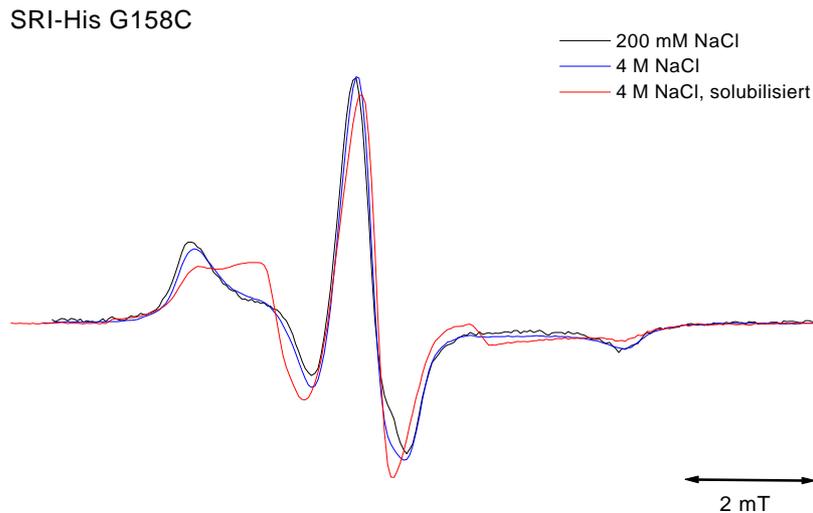
Die Gestalt der ESR-Spektren wird durch die Beweglichkeit des Spinlabels, hier der Nitroxidseitenkette, und damit seine Orientierung im umgebenden Raum bestimmt.

Durch die Bindung an ein Protein kann der Spinlabel in sterische Interaktion zu benachbarten Aminosäureseitenketten treten, was zu einer Einschränkung der Beweglichkeit führt. Die Wechselwirkung mit anderen Spins, Kernspins und Elektronenspins, bedingt wie erläutert eine Hyperfein-Aufspaltung, die in Abhängigkeit von der Mobilität des Spinlabels mehr oder weniger stark ausgemittelt wird. Dies äußert sich z.B. in der Breite der Mittelfeldlinie. In der folgenden Abbildung sind die ESR-Spektren der solubilisierten und in PM-Lipiden rekonstituierten SRI-Mutanten wiedergegeben.



**Abb.57:** ESR-Spektren der spinmarkierten SRI-His-Mutanten der Helix F  
 Alle Spektren wurden im Bereich von 340 bis 353 mT aufgenommen und auf die Absorption der Mittelfeldlinie normiert.  
 schwarz: in DM solubilisierte Proben  
 rot: in PM-Lipide rekonstituierte Proben

Betrachtet man die ESR-Spektren der solubilisierten Helix F Mutanten, zeigt sich, daß die Spektrenform für alle sehr ähnlich ist. Neben einer mobilen Komponente ist jeweils auch ein Anteil stark immobilisierten Spinlabels nachzuweisen, welches bei der Mutante G158C besonders deutlich wird. Die Spektren der rekonstituierten Proben weisen alle unabhängig von der Position des Cysteins im Protein auf eine starke Immobilisierung des Spinlabels hin. Im Vergleich zu den Spektren der solubilisierten Proben läßt sich daher auf eine starke Zunahme der intra- und intermolekularen Wechselwirkungen aufgrund der Rekonstitution schließen. Um auszuschließen, daß die Immobilisierung des Spinlabels in den rekonstituierten Proben auf einen hohen lateralen Membrandruck bedingt durch die hohe Salzkonzentration im verwendeten Puffer zurückzuführen ist, wurden die rekonstituierten Mutanten in Puffer mit nur 200 mM NaCl überführt. Im Gegensatz zu den solubilisierten SRI-Mutanten tolerieren die Proben in PM-Lipiden eine geringere Salzkonzentration. In Abbildung 58 sind exemplarisch die Spektren des SRI-G158C in Puffer mit 4 M NaCl und 200 mM NaCl gezeigt.

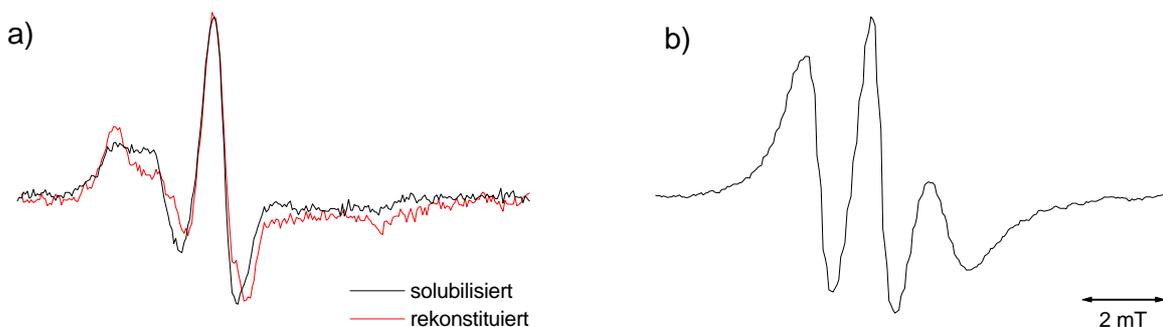


**Abb. 58:** ESR-Spektren der in PM-Lipiden rekonstituierten Mutante SRI-G158C  
 blau: 4 M NaCl, 50 mM Mes pH 6.0  
 schwarz: 200 mM NaCl, 50 mM Mes pH 6.0  
 rot: 4 M NaCl, 50 mM Mes pH 6.0, solubilisiert

Im Vergleich der beiden ESR-Spektren der rekonstituierten Probe zeigt sich nur eine geringe Abnahme der Immobilisierung bei Verringerung der Salzkonzentration. Das Spektrum der solubilisierten Probe unterscheidet sich hiervon deutlich. Somit konnte der Einfluß der Salzkonzentration als Ursache für die veränderte Beweglichkeit des Spinlabels nach Rekonstitution der Mutanten ausgeschlossen werden.

Von den Mutanten der Helix G lies sich wie erläutert nur die Mutante F211C in nennenswerten Ausbeuten ohne Verlust des Chromophors synthetisieren. In nachfolgenden Reaktion mit dem Label, erwies sich jedoch die Position 211 als wenig zugänglich, so daß nur einer geringer Labelgrad erzielt werden konnte. Dies spiegelt sich in dem schlechten Signal/Rauschverhältnis der ermittelten ESR-Spektren der solubilisierten und rekonstituierten Probe wieder, die in Abbildung 59 (a) gezeigt sind.

#### SRI-His F211C

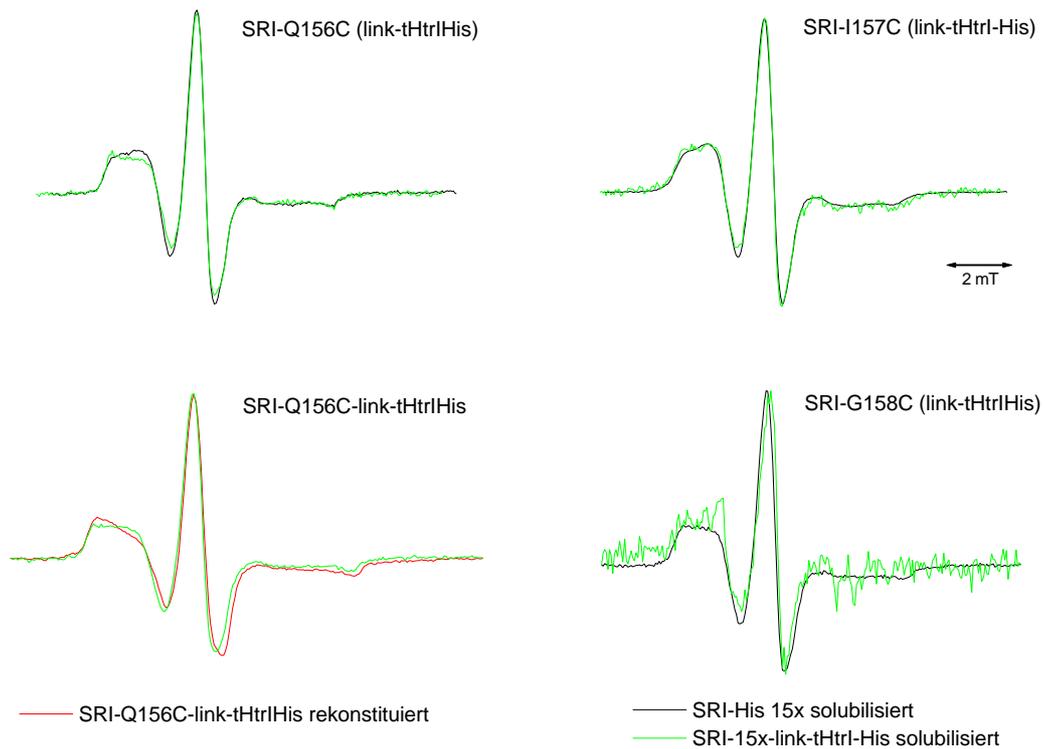


**Abb. 59:** ESR-Spektren der solubilisierten und rekonstituierten Mutante SRI-His F211C (a)  
 In Teil (b) ist ein Spektrum der solubilisierten Probe einer anderen Präparation mit starker Linienverbreiterung gezeigt, die auf Dipol-Dipolwechselwirkungen durch Dimerisierung zurückzuführen ist.

In rechten Teil der Abbildung (b) ist ein Spektrum der solubilisierten Mutante F211C einer anderen Präparation gezeigt, welches sich durch eine Überlagerung mit einer sehr breiten spektralen Komponente auszeichnet. Diese Spektralform ist indikativ für eine Dipol-Dipolwechselwirkung zweier Spinlabel und wird bei Raumtemperaturspektren nur bei einem Interspinabstand unterhalb von 15 Å beobachtet (Miick & Millhauser, 1992; Mchaourab et al., 1997). Da nur ein Cystein eingeführt wurde, liegt möglicherweise eine Dimerisierung des SRI vor, wodurch die Spinlabel an Position 211 zweier benachbarter SRI in direktem Kontakt stehen. Es läßt sich deshalb vermuten, daß die Aminosäureseitenkette an dieser Position nach außen deutet, auf der dem Protonenkanal abgewandten Seite der Helix. Diese Beobachtung konnte jedoch nur für eine stark ankonzentrierte Probe mit relativ hohem Labelgrad gemacht werden. In ESR-Untersuchungen an pSRII wurde von A. Wegener (2000) für die homologe Position 211 auf Helix G ebenfalls eine Dipol-Dipolwechselwirkung ermittelt.

Die ESR-Spektren der solubilisierten SRI-link-tHtrl-His Mutanten Q156, I157 und G158 zeigen im Vergleich zu denen des freien SRI kaum Abweichungen (Abb. 60). Das Spektrum der Mutante G158 im Komplex mit dem verkürzten Transducer ist hier unter Vorbehalt abgebildet, da diese Mutante, wie erwähnt, nur in geringen Ausbeuten synthetisiert werden konnte und während der Labelreaktion den Chromophor verliert. Das schlechte Signal/Rauschverhältnis des Spektrums bedingt sich zusätzlich aus einem geringen Labelgrad, der auf eine schlechtere Zugänglichkeit dieser Position im Fusionsprotein als in der freien SRI-Mutante schließen läßt.

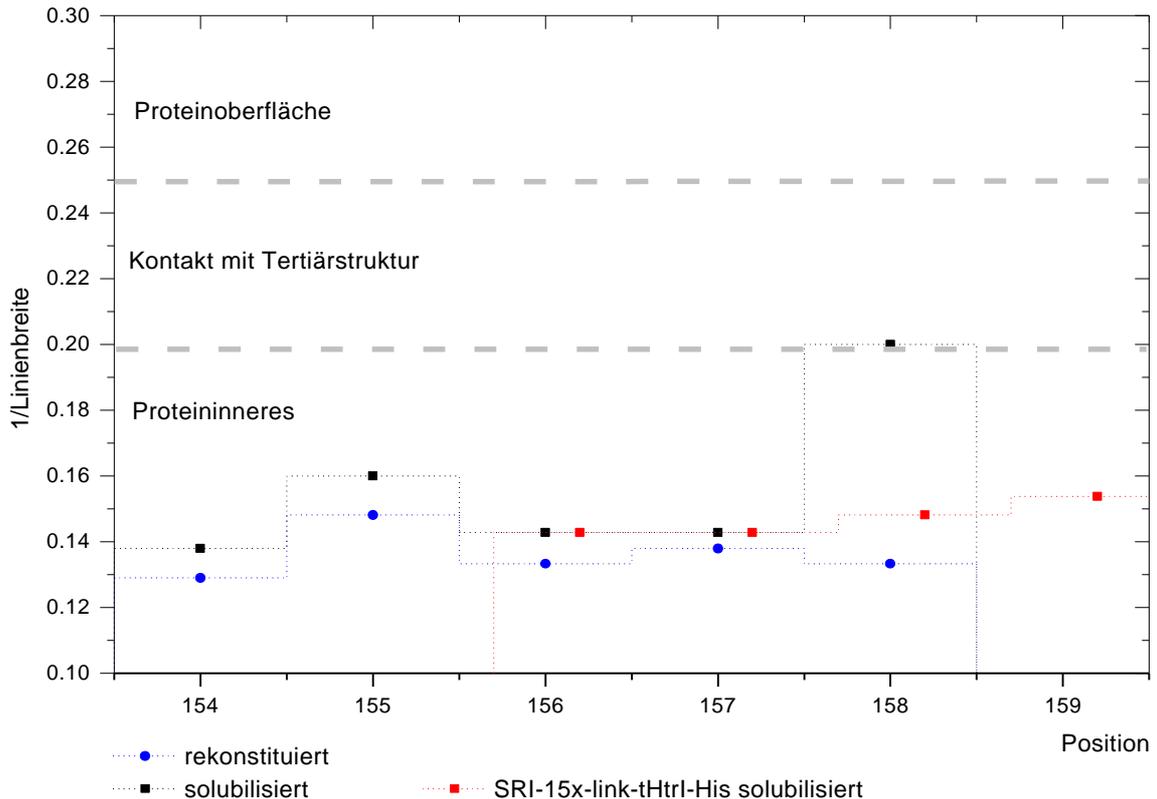
Die Mutante SRI-Q156C-link-tHtrlHis ließ sich als einzige der Helix F Mutanten in ausreichendem Maßstab herstellen und konnte daher auch rekonstituiert in PM-Lipiden gemessen werden (Abb. unten links). Im Gegensatz zu den SRI-Mutanten ohne Transducer zeigt sich hier nur eine geringe Immobilisierung nach Rekonstitution.



**Abb. 60:** Vergleich der ESR-Spektren der SRI-Mutanten Q156C, I157C und G158C ohne Transducer und als Fusionsprotein SRI-15x-link-tHtrlHis. In der Abbildung unten links sind die ESR-Spektren der Mutante SRI-Q156C-link-tHtrlHis im solubilierten und rekonstituierten Zustand gezeigt.

Die Linienbreite der Mittelfeldlinie spiegelt wie erläutert die Mobilität des Spinlabels wieder und ist daher ein Maß für die Proteinumgebung. In Korrelation mit empirischen Daten läßt sich so eine Aussage über die Orientierung des Spinlabels und damit der ursprünglichen Aminosäureseitenkette treffen. Es wird hierbei zwischen einer Orientierung ins Proteininnere, Kontakt zu Tertiärstrukuren und der Proteinoberfläche bzw. Loop-Regionen unterschieden (Hubbel et al., 1996).

Trägt man die inverse Linienbreite gegen die Position der Cysteinmutation auf, erhält man hier für das SRI ein Abbild der ausgewählten Helixwindung mit der Orientierung der einzelnen Aminosäureseitenketten (Abb. 61).



**Abb.61:** Auftragung der inversen Linienbreite gegen die Aminosäureposition auf Helix F des SRI. In schwarz sind die Werte der Spektren der solubilierten Proben und in blau die der rekonstituierten Proben dargestellt. Zusätzlich sind die Werte der Spektren der solubilierten Mutanten fusioniert mit dem verkürzten Transducer in rot eingezeichnet.

Es lässt sich hier leider nicht die für eine Helix typische periodische Änderung der inversen Linienbreite und damit der Mobilität des Spinlabels beobachten. Bis auf die Position 158 zeigen alle Mutanten eine starke Immobilität der Spinlabel, welche daher ins Proteininnere zu deuten scheinen. Nach Rekonstitution der Proben scheint sich dieser Effekt wie oben bereits erläutert noch zu verstärken. Lediglich die Spinlabel an Position 154 und 158 weisen im Vergleich zu den anderen Positionen eine höhere Mobilität auf, die für die Position 158 im Bereich für einen Kontakt zur Tertiärstruktur liegt. Im Vergleich hierzu ist die Mobilität des Spinlabel an dieser Position im Komplex SRI-link-tHtrl-His stark reduziert.

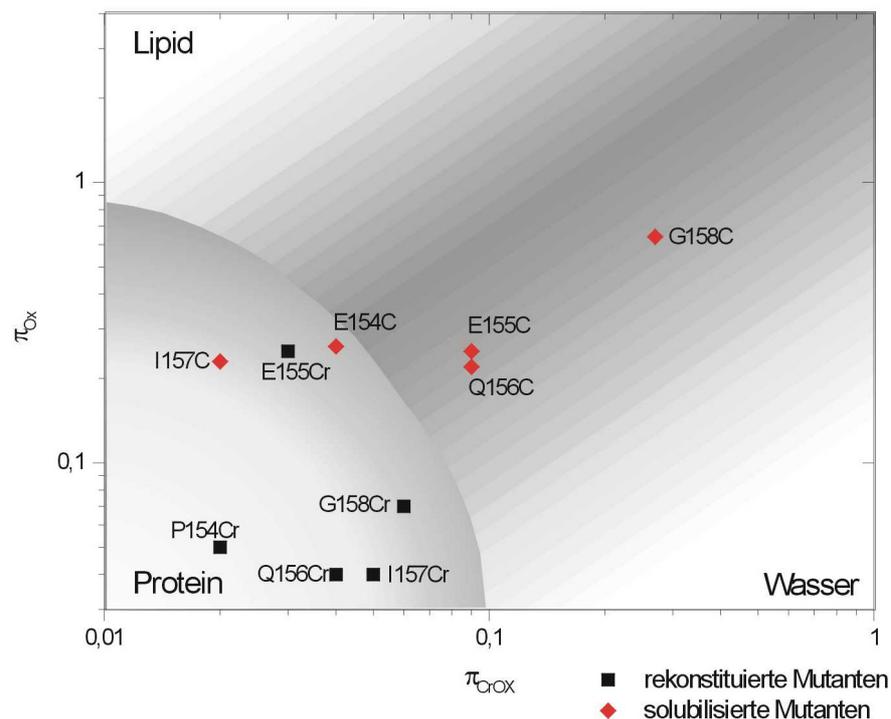
Die Spinlabel an den Positionen 156 und 157 zeigen dagegen im Fusionsprotein keine veränderte Mobilität. Um genauere Aussagen zur Orientierung der Aminosäureseitenketten zu erhalten, wurden im folgenden, wie unter 2.9.1 beschrieben, Zugänglichkeitsmessungen an den solubilierten Mutanten durchgeführt. Da die Synthese und Reinigung der Mutanten der Helix G bis auf die an Position 211 scheiterten, kann hier keine Orientierung der Aminosäureseitenketten der Helix G angegeben werden. Die inverse Linienbreite der Mutante SRIF211 liegt mit 0,14 in dergleichen Größenordnung wie die der Mutanten der Helix F.

### 3.2.8 Leistungssättigungsmessungen

#### Messungen der Zugänglichkeit der SRI-His-Mutanten

Die Bestimmung der Zugänglichkeitsparameter  $\Pi_{O_2}$  und  $\Pi_{CrOX}$  der solubilisierten SRI-His-Mutanten erfolgte durch Aufnahme des ESR-Spektrums im Bereich der Mittelfeldlinie in einer gasdurchlässigen Kapillare, die mit Sauerstoff bzw. Stickstoff umspült wurde. Für die Bestimmung der Zugänglichkeit gegenüber Chromoxalat wurden den Proben 50 mM Chromoxalat zugesetzt und die Messungen in Gegenwart von Stickstoff durchgeführt. Die Messung der Leistungssättigungskurven ohne relaxierende Moleküle erfolgte nach Äquilibration mit Stickstoff.

Nach Auswertung mit den unter 2.9.1 beschriebenen Programmen wurden die für jede Mutante erhaltenen Zugänglichkeitsparameter für Sauerstoff gegen die für Chromoxalat aufgetragen (Abb. 62). Aus Literaturdaten (Greenhalgh et al., 1991; Farahbaksh et al., 1992; Pfeiffer et al., 1999) ergeben sich die eingezeichneten Grenzen zwischen der wässrigen Phase, der Lipidphase und dem Protein als Umgebung des Spins. Diese Grenzen sind empirisch ermittelt und die Übergänge fließend.



**Abb. 62:** Zugänglichkeitsdiagramm der logarithmischen Auftragung von  $\Pi_{O_2}$  gegen  $\Pi_{CrOX}$  der SRI-Mutanten. Das Diagramm ist in die drei Bereiche der Lokalisierung des Spinlabels unterteilt, die wässrige Phase, die Lipid-Phase und das Protein. Die empirischen Grenzen sind unter der Voraussetzung eines identischen Verteilungskoeffizienten von Sauerstoff in Detergenz wie in der Lipid-Phase gezeichnet und als fließend zu betrachten.

Auffällig ist zunächst, daß alle rekonstituierten Mutanten sowohl für Sauerstoff als auch für Chromoxalat eine geringe Zugänglichkeit besitzen. Unabhängig von der Position scheinen alle Spinlabel ins Protein zu deuten. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der beobachteten Mobilität der einzelnen Spinlabel in den ESR-Spektren.

Die Zugänglichkeitsparameter der solubilisierten Mutanten geben hingegen ein differenzierteres Verhalten wieder. Während die Seitenkette der Mutante 158 deutlich ins wäßrige Milieu zeigt, befinden sich die Spinlabel der Mutanten 155 und 156 zwar in einer wäßrigen Umgebung, jedoch in deutlicher Nähe des Übergangsbereiches zum Protein bzw. der Lipidschicht. Hingegen deuten die Zugänglichkeitsparameter der Mutante SRI-I157C auf eine Orientierung der Seitenkette im Proteininneren hin. Der Spinlabel an Position 154 befindet sich im Übergangsbereich aller drei Phasen.

### 3.2.9 Lichtinduzierte ESR-Differenzspektren

Die Linienform eines ESR-Spektrums wird wie erläutert durch die Dynamik des Spinlabels geprägt. Konformationsänderungen in einem Protein können damit bei geeigneter Positionierung des Spinlabels über die Änderung der Umgebung und folglich der Mobilität verfolgt werden. Für Bakteriorhodopsin und pSRII konnten über ESR-Messungen Konformationsänderungen während des Photozyklus nachgewiesen werden (Rink et al., 2000; A. Wegener et al., 2000).

Das SRI durchläuft wie beschrieben nach Lichtinduktion einen Photozyklus und es sollte daher möglich sein, eine Konformationsänderung über ESR-Spektroskopie nachzuweisen. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Bifunktionalität des SRI-Rezeptors, der sowohl die photophile als auch die photophobe Antwort triggert.

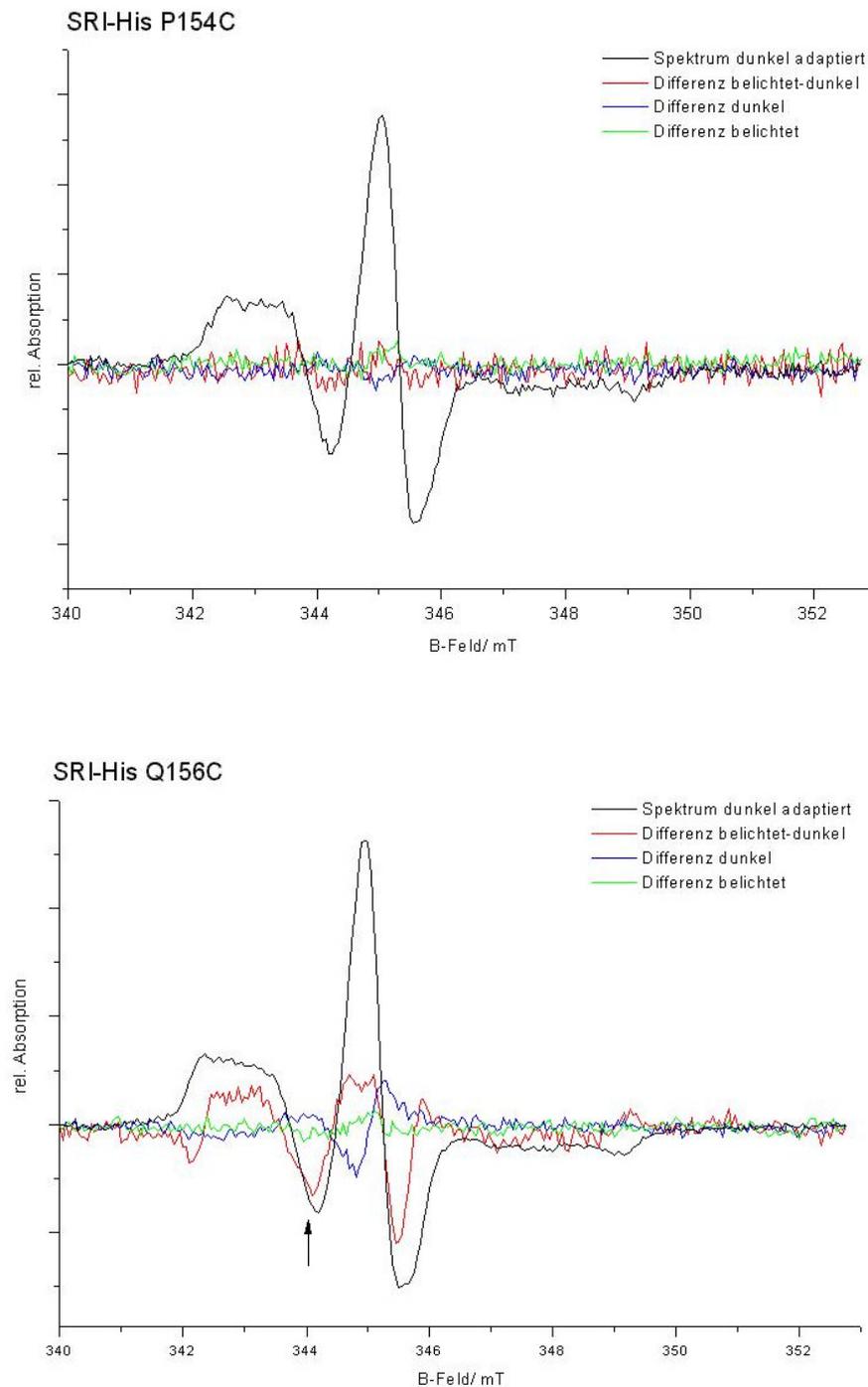
Um zunächst die geeignete Position des Spinlabels, d.h. die geeignete SRI-Mutante, zu ermitteln wurden die ESR-Spektren der Mutanten im dunkel-adaptierten Zustand und unter Dauerbelichtung aufgenommen. Für die Belichtung wurde eine Halogenlampe mit einem Filter verwendet ( $\lambda \geq 520$  nm), so daß das SRI im M-Zustand des Photozyklus akkumuliert werden sollte. Zusätzlich wurde ein Kaltglasfilter verwendet um eine Erwärmung der Probe zu vermeiden.

Aus den berechneten Differenzspektren wurden dann bei entsprechenden Mutanten die spektralen Änderungen durch die photochemische Anregung der Probe und deren genaue Position im B-Feld ersichtlich. In einem zweiten Schritt erfolgte durch zeitaufgelöste ESR-Spektroskopie an den spezifischen B-Feld Positionen die kinetische Analyse der Konformationsänderung.

Um mögliche Fehler durch eine Erwärmung der Probe bei Belichtung und einer daraus resultierenden Drift des B-Feldes im Laufe der Messungen auszuschließen, wurde abwechselnd ein Spektrum unter Belichtung bzw. ohne Belichtung aufgenommen.

Zusätzlich wurden die Differenzspektren zwischen den einzelnen Spektren im dunkeladaptierten Zustand der Probe und der belichteten Probe gebildet. Für ein besseres Signal-Rauschverhältnis wurden jeweils 5 Spektren der unbelichteten und der belichteten Probe vor Differenzbildung addiert.

In der folgenden Abbildung sind die Differenzspektren der SRI-Mutanten P154 und Q156 stellvertretend dargestellt:



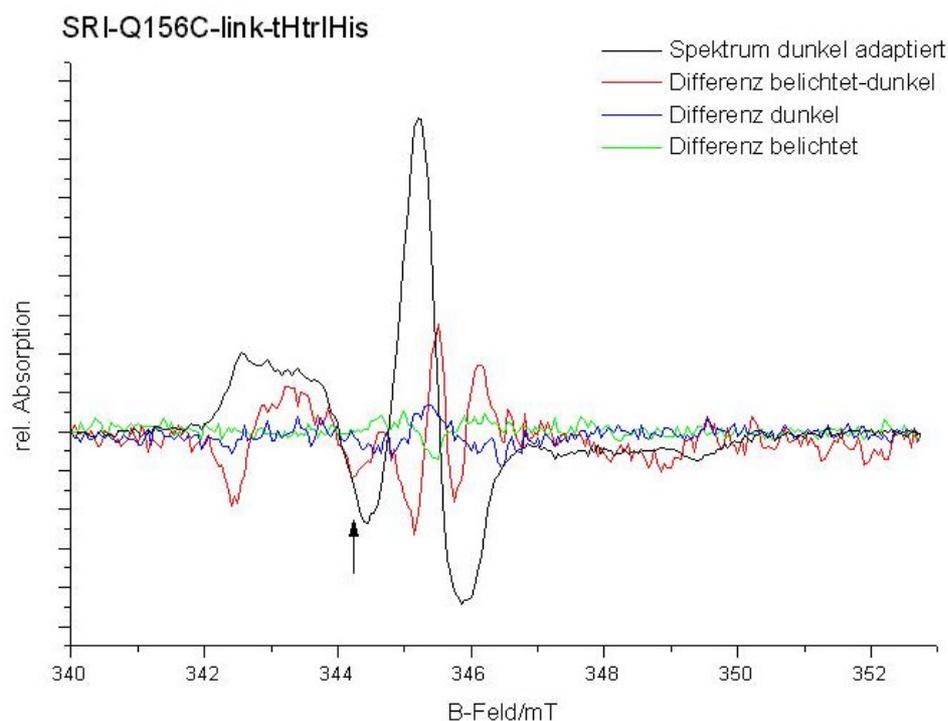
**Abb.63:** Differenzspektren der belichteten und der dunkel adaptierten SRI-Mutanten P154 und Q156

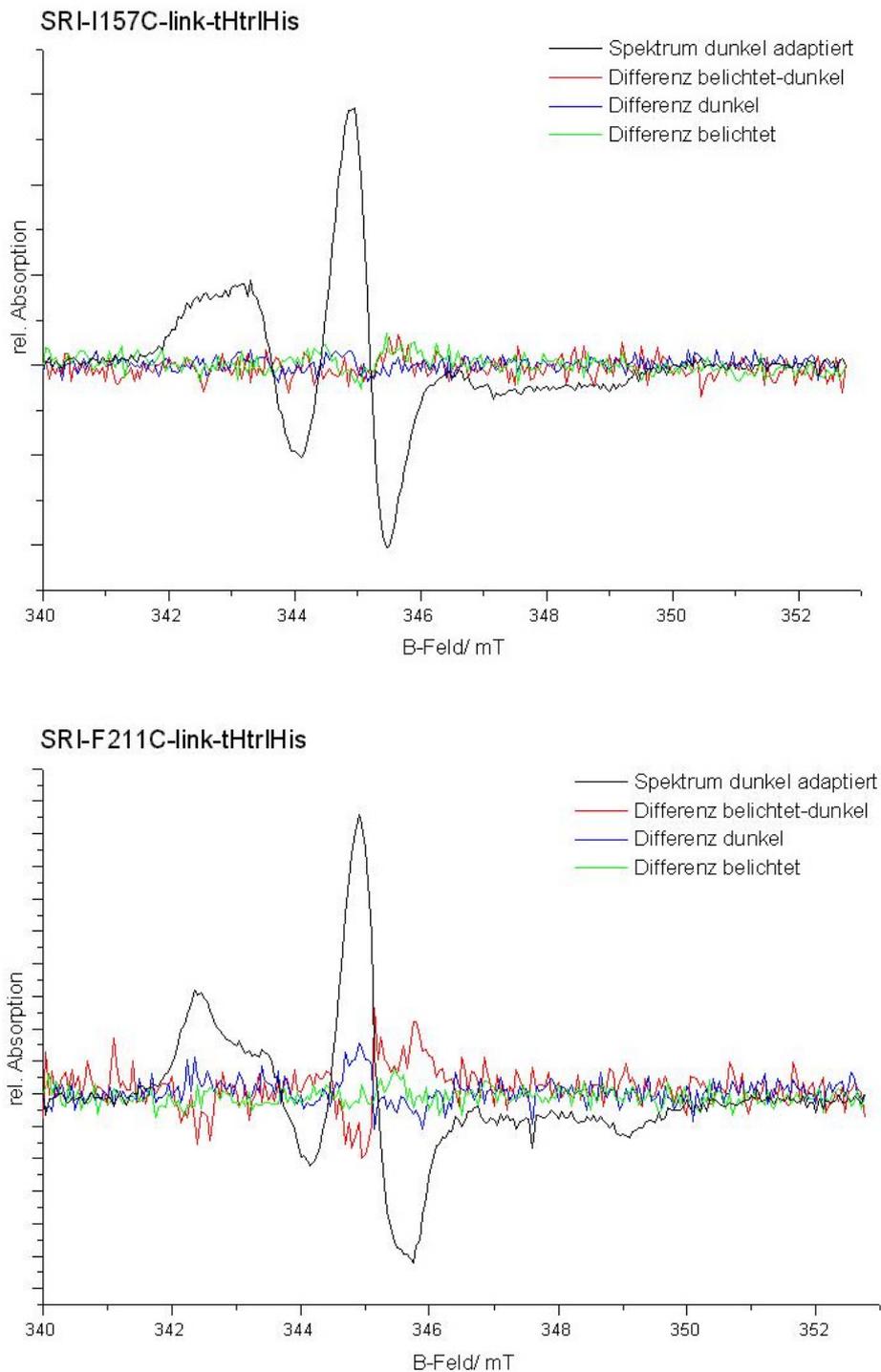
Lediglich für die Mutante SRI-His-Q156C konnten im Differenzspektrum Signale erhalten werden. Die Mutanten E155, I157 und G158 zeigten ein dem dargestellten Differenzspektrum der Mutante P154 analoges Bild. Die Aufnahme der Spektren der Mutanten E155 und I157 erwies sich zusätzlich als problematisch, da diese zum SRI-Wildtyp verschobene Absorptionsmaxima zeigten und unter Belichtung bleichten.

Für die Mutante Q156 zeigt sich im Differenzspektrum, daß unter Belichtung neben einer Verschmälerung der Mittelfeldlinie die Hyperfeinaufspaltung abnimmt. Im Differenzspektrum ergeben sich somit die Mittelfeldlinie flankierende negative Signale und im Bereich starker bzw. schwacher Hyperfeinwechselwirkung wird dies durch negative bzw. positive Signale verdeutlicht. Das Signal für die Differenz zwischen den dunkeladaptierten Spektren im Bereich der Mittelfeldlinie ist möglicherweise auf unvollständige Relaxation des Systems nach Belichtung bzw. Erwärmung zurückzuführen. Diese Beobachtung konnte zum Teil auch für andere Mutanten gemacht werden, die ansonsten kein Signal im Differenzspektrum zeigten. Der für die anschließende zeitaufgelöste ESR-Spektroskopie ausgewählte B-Feld Wert ist im Spektrum durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Das Differenzspektrum der Helix G Mutante 211 zeigte durch das schlechte Signal-Rausch Verhältnis ein sehr ambivalentes Verhalten, so daß keine eindeutige Aussage über eine Änderung der Mobilität des Spinlabels durch Belichtung zu treffen ist.

In der folgenden Abbildung sind die Differenzspektren der Mutanten 156, 157 und 211 als Fusionsprotein mit dem verkürzten Transducer tHtrl dargestellt:





**Abb. 64:** Differenzspektren der SRI-link-tHtrIHis Mutanten I157, Q156 und F211.

Analog zu den Differenzspektren der Transducer-freien Mutanten zeigt sich auch hier nur für die Mutante SRI-Q156C-link-tHtrIHis eine Änderung der Mobilität des Spinlabels nach Belichtung. Die Signale sind hier jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Die Differenzen zwischen den Spektren im dunkel-adaptierten bzw. belichteten Zustand zeigen hier stärkere Signale im Bereich der Mittelfeldlinie, so daß andere störende Effekte hier stärker

zum tragen kommen und daher die Verlässlichkeit des eigentlichen Differenzspektrums im Bereich der Mittelfeldlinie reduziert wird. Für die Aufnahme der zeitaufgelösten ESR-Spektren wurde daher auch hier aufgrund der geringeren Fehlerwahrscheinlichkeit der Bereich der Hyperfeinwechselwirkung favorisiert.

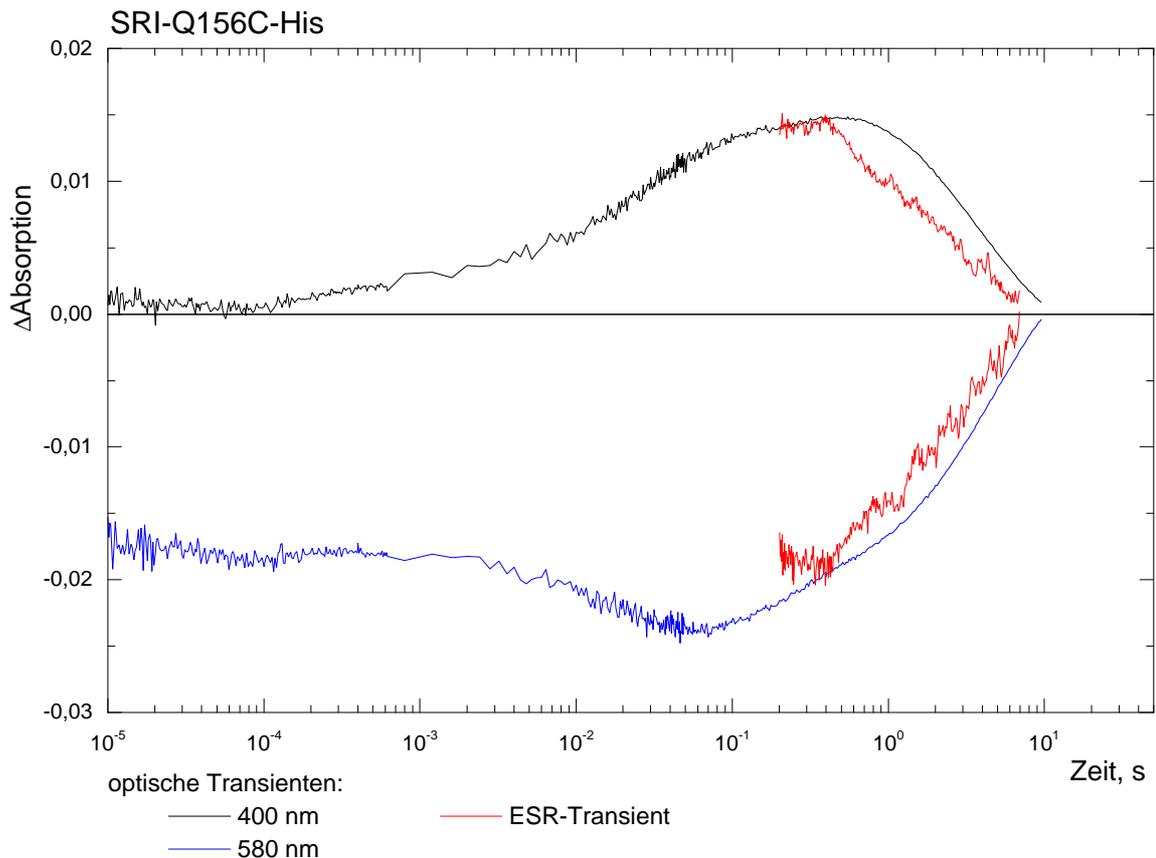
### **Zeitaufgelöste ESR-Spektren**

Zur kinetischen Analyse der für die SRI-Mutante Q156C beobachteten Konformationsänderung sollte die Änderung des ESR-Signals an den im Differenzspektrum indikativen Positionen des Magnetfeldes (344,04 mT, lokales Minimum zwischen der Niedrigfeld- und Mittelfeldlinie) zeitlich aufgelöst werden.

Der für die Aufnahme von transienten Absorptionsänderungen übliche Meßaufbau (Wegener et al., 2000; Rink et al., 2000) unter Verwendung einer Xenon-Blitzlichtlampe für die Photoinduktion, die Lichtpulse mit einer Energie von ca. 80 J bei einer Pulsdauer von 30  $\mu$ s erzeugt, lieferte hier nur schwache Signale mit schlechtem Signal zu Rauschverhältnis. Das Verfahren wurde daher insofern modifiziert, daß eine Halogenlampe mit einem 520 nm Filter für die Belichtung verwendet wurde. Die Belichtungsdauer wurde auf 100 ms verlängert und über eine Blende geschaltet. Dies bewirkt eine Akkumulation des Photointermediats  $M_{373}$  analog zu den Messungen der Differenzspektren. Die Datenaufnahme erfolgte bei einer Zeitauflösung von 100 ms für die Dauer von 8 s. Die einzelnen Messungen setzten sich jeweils aus der Aufnahme der Basislinie für 2 s vor Photoinduktion, der Belichtung und der Aufnahme für weitere 6 s zusammen. Es wurden jeweils 5000 bis 6000 Transienten gemittelt.

In den folgenden Abbildungen sind die ESR-Transienten der SRI-Mutante Q156C mit und ohne fusioniertem Transducer zusammen mit den optischen Transienten des Photocyclus bei 580 nm und 400 nm gezeigt.

Die Transienten zeigen an der ausgewählten Position im B-Feld (341 mT) im Bereich starker Hyperfeinwechselwirkung eine sprunghafte Reduktion des Signals direkt nach Belichtung und zeitlich aufgelöst die anschließende Rückbildung des Grundzustandes. Dies entspricht einer Mobilisierung des Spinlabels nach Belichtung und der Rückbildung der partiellen Immobilisierung im Grundzustand. Die Ausbildung dieser Mobilisierung konnte hierbei durch die gewählten Messbedingungen (100 ms Belichtung und eine Zeitkonstante von 100 ms am Lock-In) zeitlich nicht aufgelöst werden. Der Verlauf des Transienten im Bereich bis 200 ms ist daher nicht abgebildet. Für den besseren Vergleich mit den optischen Daten ist der ESR-Transient in Abbildung 65 gespiegelt und auf die Amplituden der optischen Transienten bei 400nm bzw. 580 nm normiert.



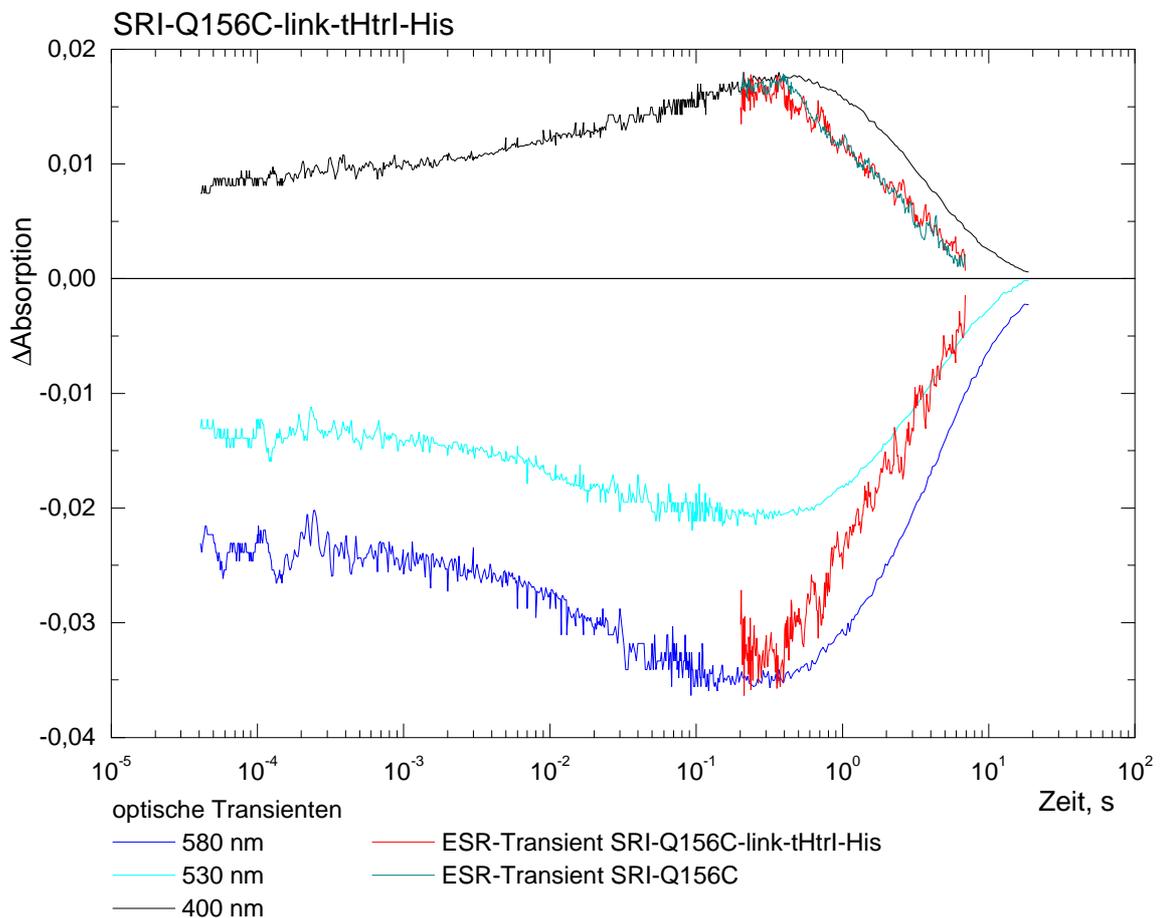
**Abb.65:** Vergleich der transienten optischen Absorptionen des Photozyklus nach Anregung bei 630 nm für zwei indikativen Wellenlängen (580 nm Grundzustand; 400 nm M-Intermediat) mit den ESR-Transienten für die Mutante SRI-HisQ156C. In **schwarz** und **blau** sind die optischen Transienten bei 22°C +/- 0,1°C dargestellt und in **rot** der ESR-Transient (22°C +/- 1°C) (6000 Additionen) normiert auf die maximale Amplitude der jeweiligen optischen Transienten bei 400 nm bzw. 580 nm. Zeitauflösung: ESR: 100 ms; Photozyklus: 1 µs.

Die in Abbildung 65 dargestellten Absorptionsänderungen sind indikativ für den Grundzustand (580 nm) und das spektrale Intermediat M ( $\lambda_{\text{max}}$ : 373 nm, deprotonierte Schiff-Base). In einer Vergleichsmessung konnte gezeigt werden, daß sich die optischen Daten der Mutante SRIQ156C für den Zerfall des M-Intermediates und die Rückbildung des Grundzustandes identisch sind mit denen des Wildtyps. Für die Bildung des M-Intermediates wurde lediglich eine geringfügig langsamere Kinetik beobachtet.

Die vollständige Ausbildung des M-Intermediates korrespondiert hier gut mit der nach Photoinduktion voll ausgebildeten Mobilitätsänderung und damit der zu zuordnenden Konformationsänderung. Mit einer Halbwertszeit von 1,2 s für den ESR-Transienten und 3,1 s für den optischen Transienten ist die Relaxation dieser Konformationsänderung, im Rahmen der Meßgenauigkeit, deutlich schneller als der Zerfall des M-Intermediates. Eine partielle Erwärmung der Probe als Ursache hierfür konnte durch eine Kontrollmessung

ausgeschlossen werden. Der Verlauf der Transienten konnte in Messungen der Mutante einer anderen Präparation reproduziert werden.

Die Messungen der optischen Transienten und des ESR-Transienten dieser Mutante im fusionierten Komplex SRI-Q156C-link-tHtrl-His wurden analog zu denen des Transducer-freien SRI-Mutante durchgeführt. Zum einen zeigt sich in Abbildung 66 das die ESR-Transienten der Mutante mit und ohne Transducer identisch sind, desweiteren ist auch hier die Relaxation der transienten Mobilisierung des Spinlabels schneller als der Zerfall des M-Intermediates, obwohl die optischen Daten bei einer leicht höheren Temperatur aufgenommen wurden. Die beobachtete Rückbildung der Konformationsänderung ist somit deutlich schneller als durch eine Temperaturerhöhung zu erklären wäre.



**Abb. 66:** Vergleich der optischen Transienten des Photozyklus bei 400 nm und 580 nm (25°C) mit dem ESR-Transienten des Komplexes SRI-Q156C-link-tHtrlHis (5000 Additionen) bei 22°C. Zum Vergleich wurde der ESR-Transient des freien SRIQ156C-His in grün eingezeichnet. Die Normierung erfolgte wie in Abbildung 65 angegeben.

---

Zusätzlich wurde für die Mutante SRI-Q156C der ESR-Transient bei einer Magnetfeldstärke von 343,0 bzw. 343,26 mT, im Bereich der Niedrigfeldlinie, aufgenommen. Hier zeigt sich, wie erwartet, nach Photoinduktion die transiente Mobilisierung durch einen sprunghaften Anstieg des Signals, welche mit der gleichen Geschwindigkeit zurückgebildet wird wie für den Transienten an der Position 344,1 mT beobachtet wurde. Dies verifiziert das oben dargestellte Ergebnis und schließt einen Meßfehler aus.

## 4. Diskussion

Archaeobakterien entwickelten im Laufe der Evolution spezielle Mechanismen um in extremen Umweltbedingungen zu überleben. Die Energiekonversion ist hierbei von besonderer Bedeutung. Die Cytochrom  $ba_3$  Oxidase, aus der Elektronentransportkette des haloalkaliphilen *Natronobacterium pharaonis*, zeichnet sich dadurch aus, daß als Elektronendonator im Unterschied zur mitochondrialen Elektronentransportkette wahrscheinlich das Halocyanin fungiert. Zusätzlich deutet der Sequenzvergleich mit anderen Oxidasen daraufhin, daß der für Cytochrom Oxidasen typische aktive Protonentransport über die Membran nicht vorhanden ist.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die heterologe Expression des Cytochrom  $ba_3$  in *H. salinarum* entwickelt werden, um den Multienzymkomplex in funktionaler Form in ausreichenden Mengen zu synthetisieren. Dieses Expressionssystem sollte im weiteren die Synthese von Mutanten zur Analyse der für eine Protonentranslokation essentiellen Aminosäuren ermöglichen. Am funktionellen Protein sollte abschließend eine kinetische Charakterisierung der Redoxreaktion mit Halocyanin bzw. Sauerstoff erfolgen.

Zur Photophosphorylierung unter sauerstoffarmen Bedingungen dienen im *Halobacterium salinarum* die beiden lichtgetriebenen Ionenpumpen BR und HR. Essentiell für die Energiegewinnung sind hierbei optimale Lichtbedingungen. Die Schwimmbewegung des Bakteriums wird hierfür durch zwei Photorezeptoren, das SRI und SRII, in der Membran gesteuert. Die Lichtrezeption durch die sensorischen Rhodopsine im Komplex mit ihren Transducern kann hierbei als primitiver Sehprozeß verstanden werden. Der Mechanismus des Signaltransfers von den Rezeptoren auf die Transducer ist bisher nicht geklärt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Interaktion des SRI mit HtrI für die photophile Signalweiterleitung identifiziert werden. Das SRI sollte hierfür in Transducer-freier Form und im Komplex mit HtrI nach der von Schmies et al. (2000) entwickelten Methode in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Die Analyse der Photozyklusdaten sollte im weiteren den Einfluß des Transducers auf den Rezeptor näher charakterisieren und die Funktionalität des isolierten Komplexes bestätigen.

Mittels ESR-Spektroskopie sollte anschließend eine mögliche strukturelle Änderung im SRI als Mechanismus des Signaltransfers nachgewiesen und kinetisch charakterisiert werden. Hierfür sollten in *E. coli* zuvor entsprechende Cysteinmutanten des SRI synthetisiert werden.

Für das Transducer-freie SRI sollten zusätzlich durch pH-Titrationsversuche die Gleichgewichte zwischen den verschiedenen Spezies des Grundzustandes analysiert werden. Auf der Basis dieser Daten sollte eine Strategie zur Separation der spezifischen Kinetiken der Photozyklen entwickelt werden und daraus anschließend ein kinetisches Modell abgeleitet werden.

#### 4.1 Heterologe Expression der Cytochrom Oxidase $ba_3$ aus *N. pharaonis*

In dieser Arbeit sollte Cytochrom  $ba_3$  aus *N. pharaonis* heterolog in *H. salinarum* exprimiert werden. Das *E. coli*-Expressionsystem scheidet hier für die Synthese aus, da *E. coli* den Kofaktor Häm  $a_5$  nicht synthetisieren kann. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß der Einbau des nur um eine Isoprenoid-Einheit kürzeren Häm  $o$  aus *E. coli* anstelle des Häm  $a_5$  nicht erfolgt. Die Bindung des Kofaktors ist damit wie von Lübbers (1995) beschrieben äußerst spezifisch. Das halophile Archaeobakterium *H. salinarum* bietet sich aufgrund seiner ähnlichen Biosynthese daher als Expressionssystem an.

Das Cytochrom  $ba_3$  besteht aus vier Untereinheiten, die als Transkriptionseinheit in einem Operon mit überlappenden Start und Stopkodons organisiert sind. Am Beispiel der Cytochrom Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* konnten Hendler et al. (1991) zeigen, daß als funktioneller Kernkomplex nur die Untereinheiten I und II dienen. Für das Cytochrom  $ba_3$  wurden daher zum einen die Untereinheiten I und II in ihrer genomischen Anordnung mit und ohne der Sequenz für einen C-terminalen Histidin-Tag als Expressionskassette kloniert. Analog erfolgte die Klonierung des gesamten Gens in seiner nativen polycistronischen Struktur wiederum optional mit Affinitäts-Tag.

Als Expressionvektor diente der von Lüttenberg (1998) entwickelte Vektor pBL7<sup>Novo</sup>. Das zu exprimierende Gen steht hierin unter der Kontrolle des nativen *bop*-Promotors aus *H. salinarum* und wird als Fusionsprotein mit der N-terminalen Vorläufersequenz des BR synthetisiert. Von Xu et al. (1995) konnte für BR gezeigt werden, daß diese Vorläufersequenz die Stabilität der mRNA erhöht und damit zu höheren Proteinausbeuten führt. Diese Sequenz wird vor der Insertion in die Membran enzymatisch abgespalten (Dunn et al., 1981; Seehra & Khorana, 1984).

Lüttenberg et al. (1998) konnte für die heterologe Expression des pSRII ebenfalls die posttranslationale Modifikation nachweisen. Das Gen der Novobiocin-Resistenz wurde im Expressionsvektor hier gegen die Mevinolin-Resistenzkassette ausgetauscht, da für die Expression der *H. salinarum* Stamm MPK40 verwendet wurde.

Die Transformation erfolgte nach dem von Lüttenberg et al. (1998) beschriebenen Verfahren und es konnten für alle Expressionskonstrukte positive Transformanden erhalten werden. Die genetische Charakterisierung der Transformanden durch Southern-Blot Analyse bestätigte die genomische Insertion des Expressionsvektors über homologe Rekombination an der Position des *bop*-Locus.

In der anschließenden Expression und Reinigung der Cytochrom  $ba_3$ -Varianten mit Affinitäts-Tag konnte jedoch in keinem Fall das Protein isoliert werden. Auch eine Modifikation der Expressionsbedingungen hinsichtlich der Pufferbedingungen des Mediums oder dem Zeitpunkt der Ernte führte nicht zum Erfolg.

Durch einen immunologischen Nachweis mit einem Cytochrom  $ba_3$ -spezifischen Antikörper sollte daher zunächst ermittelt werden, ob der Proteinkomplex überhaupt synthetisiert wird. Die Untersuchung der verschiedenen Fraktionen des Zelllysates sollten zusätzlich Aufschluß über die Lokalisierung des Proteins geben. Falls die Insertion in die Membran der inhibierende Faktor wäre bzw. eine frühzeitige Aggregation, müßte sich für das Sediment ein positives Signal ergeben. Sollte die Komplexbildung inhibiert sein, müßte sich analog für das Zytoplasma bzw. das Sediment je nach Löslichkeit der Proteinkomponente ein Signal zeigen.

Um auszuschließen, daß möglicherweise die Modifikation durch einen Affinitätstag die Synthese inhibiert oder zu einer proteolytischen Degradation des Proteinkomplexes führt, diene als Kontrolle die Expression der Cytochrom- $ba_3$ -Varianten ohne Modifikation.

Trotz hoher Empfindlichkeit des verwendeten Antikörpers konnte jedoch für keine der Transformanden, unabhängig von der untersuchten Fraktion, das Protein nachgewiesen werden. Als Kontrolle diene das aus dem nativen Organismus isolierte Cytochrom  $ba_3$ , welches auch für die Herstellung der Antikörper verwendet wurde. Die Analyse der Antikörperreaktion zeigte hier, daß lediglich eine der beiden kleineren Untereinheiten III oder IV ein positives Signal ergibt. Ein immunologischer Nachweis des Kernkomplexes ist somit nicht möglich. Da jedoch der Kernkomplex mit Histidin-Tag nicht isoliert werden konnte und der immunologische Nachweis der anderen Cytochrom  $ba_3$ -Varianten negativ war, ist eine Synthese des Kernkomplexes ohne Affinitäts-Tag mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls auszuschließen.

Für keine der Expressionsvarianten konnte somit die Synthese des Proteins erreicht werden. Um nachzuweisen, daß unter den gewählten Expressionsbedingungen der *bop*-Promotor induziert wird und damit die Transkription erfolgt, wurde die Gesamtzell-RNA der Transformanden mittels RT-PCR analysiert. Als Kontrolle diene der Nachweis des genomisch kodierten BR im Wildtyp und den Transformanden, welches ebenfalls unter der Kontrolle des *bop*-promotors steht und damit analog transkribiert werden sollte. In allen Expressionsvariationen konnte die mRNA der genomisch insertierten Sequenz des Cytochrom  $ba_3$  und des inaktiven BR nachgewiesen werden. Analog gelang der Nachweis der mRNA des BR im Wildtyp. Der *bop*-Promotor wird somit unter den gewählten Expressionsbedingungen induziert und das Cytochrom  $ba_3$  unabhängig von der Zusammensetzung der Untereinheiten transkribiert.

Das dennoch kein Protein nachgewiesen werden konnte, ist möglicherweise auf eine geringe Stabilität des mRNA-Transkriptes zurückzuführen, über die hier keine Aussage getroffen werden konnte. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die proteolytische Degradation des nasziven Proteins, da hier kein Protease-defizienter Stamm für die Expression verwendet werden konnte. Da das *H. salinarum* ein eher unübliches Expressionssystem darstellt, steht ein solcher Stamm nicht zur Verfügung.

Möglicherweise wird die Expression zusätzlich durch die Biosynthese der Kofaktoren, des Häm a und b, sowie der Verfügbarkeit von Kupfer limitiert, so daß für den Organismus einen Abbau des Proteins favorisiert wird. Fraglich ist im weiteren, ob die Fusion der Untereinheit IV bzw. II mit der Vorläufersequenz des BR möglicherweise die Faltung des Proteins oder die Komplexbildung inhibiert.

Durch die polycistronische Organisation der Untereinheiten wurden für die Expression die internen ribosomalen Bindungsstellen aus *N. pharaonis* beibehalten. Ob diese durch *H. salinarum* erkannt werden, ist ebenfalls unklar.

Eine Synthese des Cytochrom  $ba_3$  in *H. salinarum* könnte unter Modifikation der genannten Faktoren erfolgreich sein.

## **4.2 Untersuchung des SRI und der Wechselwirkung mit dem Transducer HtrI**

### **4.2.1 Charakterisierung des SRIwt-His**

In dieser Arbeit wurde das von Schmies et al. (2000) entwickelte Verfahren für die Synthese und Reinigung des SRI nach Expression in *E. coli* in modifizierter Form verwendet. Die heterologe Synthese in *E. coli* bietet zwei Vorteile, zum einen sind in relativ kurzer Zeit größere Mengen Protein zu synthetisieren, da *E. coli* eine kürzere Generationszeit von ca. 25 min im Vergleich zu 6 – 8 h für *H. salinarum* hat. Desweiteren wird die Herstellung von Mutanten dadurch erleichtert, daß für *E. coli* etablierte Methoden zur Transformation zur Verfügung stehen, wohingegen die Transformation von *H. salinarum* langwierig und wesentlich unzuverlässiger ist.

Die Modifikation des Reinigungsverfahrens bestand darin, daß die Membran mit dem enthaltenen SRI vor Solubilisierung durch Zentrifugation isoliert wurde und die anschließende Säulenchromatographie bei 4°C im Dunkeln durchgeführt wurde. Die von Schmies et al. ermittelte Ausbeute von 3 mg/l verringerte sich dadurch auf 2 mg/L, jedoch konnte so das SRI in hoher Reinheit und vor allem in höherer Stabilität erhalten werden.

Insbesondere die Cysteinmutanten des SRI, welche für die nachfolgenden ESR-Untersuchungen synthetisiert wurden, waren unter Lichteinfluß und bei Raumtemperatur

wesentlich instabiler. Das SRI zeigte weiterhin bezüglich der Position der singulär eingeführten Cysteinmutation in Helix F bzw. G deutliche Unterschiede in der Syntheserate und Stabilität. Die analogen Cysteinmutanten des pSRII waren hingegen bis auf die Position 160, welches hier der Position 159 entspricht, in ähnlichen Ausbeuten wie der Wildtyp zu isolieren (Wegener, 2000). Das SRI ist somit nicht nur wesentlich empfindlicher gegenüber externen Bedingungen wie Salzkonzentration und pH-Wert als das pSRII, sondern auch gegenüber Mutationen im zytoplasmatischen Bereich der Helix F oder G. Möglicherweise induziert der Austausch an einzelnen Positionen eine strukturelle Änderung, die zum Verlust des Chromophors führt bzw. eine korrekte Faltung des Proteins inhibiert. Dies deutet daraufhin, daß die Konformation im zytoplasmatischen Bereich der Helix F bzw. G einen starken Einfluß auf die Funktionalität des Proteins hat.

Durch SDS-Gelelektrophorese und UV/Vis Absorptionsspektrometrie wurde nachgewiesen, daß das SRIwt-His bis zur Homogenität gereinigt werden konnte.

Es zeigte sich hierbei, daß das SRI auch unter den denaturierenden Bedingungen des SDS in monomerer, dimerer und trimerer Form vorliegt. Die Ergebnisse der ESR-Untersuchungen des SRI-F211 deuten im weiteren auf eine Dimerisierung über eine Interaktion im Bereich der Helix G hin. Möglicherweise wird diese Interaktionsfläche im nativen Rezeptor-Transducer-Komplex von HtrI besetzt.

Im Absorptionsspektrum des gereinigten SRIwt-His sind, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Krebs et al. (1995) für das homolog exprimierte Protein, drei Absorptionsbanden bei 280 nm, 400 nm und 587 nm erkennbar. Für das SRIwt-His konnte ein ideales Verhältnis von 1 : 1,6 der Absorption des Chromophors bei 587 nm zur Absorptionsbande bei 280 nm erreicht werden. Die Cysteinmutanten zeigten, bis auf die Mutante G158 und F211, eine wesentlich höhere Absorption bei 280 nm, was auf einen partiellen Verlust des Chromophors im Verlauf der Reinigung zurückzuführen ist. Die Mutante I157 zeigte zudem ein zum Wildtyp abweichendes hypsochrom verschobenes Absorptionsmaximum bei 560 nm, dessen Extinktionskoeffizient somit nicht mit dem des Wildtyps übereinstimmen muß.

Die Absorption bei 400 nm schwankte je nach Präparation, verschwand jedoch auch bei längerer Lagerung im Dunkeln bei 4°C nie vollständig. Das zum M-Intermediat des Photozyklus ähnliche Absorptionsmaximum läßt vermuten, daß in dieser Spezies die Schiff-Base in deprotonierter Form vorliegt, jedoch mit Retinal in *all-trans*-Konfiguration statt *13-cis*. Krebs et al. (1995) vermuten in Analogie zu BR (Lozier et al. 1992), daß ein Gleichgewicht im Dunklen zwischen dieser Spezies (SRI<sub>400</sub>) und einer Spezies des Grundzustandes mit deprotonierter Asparaginsäure 76 (SRI<sub>550</sub>) vorliegt.

Diese zweite Form des Grundzustandes wird im Absorptionsspektrum erst bei Titration auf pH 6.5 sichtbar.

Durch pH-Titrationsexperimente konnten in dieser Arbeit die Absorptionsmaxima der einzelnen Spezies des Grundzustandes und die Protonierungsgleichgewichte zwischen ihnen identifiziert werden. Mit Hilfe eines globalen Fits ist es hier erstmals gelungen die absoluten Absorptionsmaxima der einzelnen Spezies eindeutig zu bestimmen. Der pH-induzierte Übergang des SRI<sub>587</sub> in SRI<sub>530</sub> kann hierbei auf die Deprotonierung der Asparaginsäure 76 zurückgeführt werden (Bogomolni et al. 1994). Abweichend zu bisherigen Veröffentlichungen wurde hier für das SRI mit deprotoniertem Asp76 ein Absorptionsmaximum von 530 nm statt 550 nm ermittelt (Bogomolni et al., 1994; Haupts et al., 1995; Krebs et al., 1995). Dies läßt sich dadurch erklären, daß in bisherigen Untersuchungen das Maximum direkt aus dem Absorptionsspektrum abgelesen wurde. Selbst bei pH-Werten > 8.5 ist jedoch ein geringer Beitrag des SRI<sub>580</sub> im Spektrum vorhanden, so daß die beobachtete Absorptionsbande bei 550 nm aus einer Überlappung der Absorptionen bei 580 nm und 530 nm resultiert. Diese Problematik konnte durch die hier verwendete Analysemerhode aufgelöst werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Krebs et al. (1995) wurde für das Protonierungsgleichgewicht ein  $pK_a$ -Wert von 6.7 ermittelt. Die Diskrepanz zu den Angaben von Bogomolni et al. (1994), die einen  $pK_a$ -Wert von 7,2 bestimmten, ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß in diesen Untersuchungen Membranvesikel des SRI verwendet wurden und sich ein Membranpotential ausbilden konnte. In dieser Arbeit wurde dagegen SRIwt-His rekonstituiert in PM-Lipide verwendet, welches als Suspension keine Vesikel ausbilden.

Für die Absorptionsbande bei 404 nm wurde von Krebs et al. (1995) der gleichen  $pK_a$ -Wert von 6,5 wie für SRI<sub>550</sub> beobachtet. Der in dieser Arbeit ermittelte  $pK_a$ -Wert von 6,2 kann unter Berücksichtigung der starken Streuung der Meßpunkte dieser Absorptionsbande vermutlich ebenfalls als identisch mit dem des SRI<sub>530</sub> angesehen werden. Hieraus resultiert, daß das SRI<sub>530</sub> sowohl im Gleichgewicht mit SRI<sub>587</sub> als auch mit SRI<sub>400</sub> steht. Chemisch kann das Gleichgewicht zwischen SRI<sub>530</sub> und SRI<sub>400</sub> so verstanden werden, daß das Proton von der protonierten Schiff-Base mit Retinal in *all-trans* Konfiguration in einer Gleichgewichtsreaktion auf die deprotonierte Asparaginsäure 76 übertragen wird. Diese Reaktion ist dabei unabhängig vom lichtinduzierten Photozyklus.

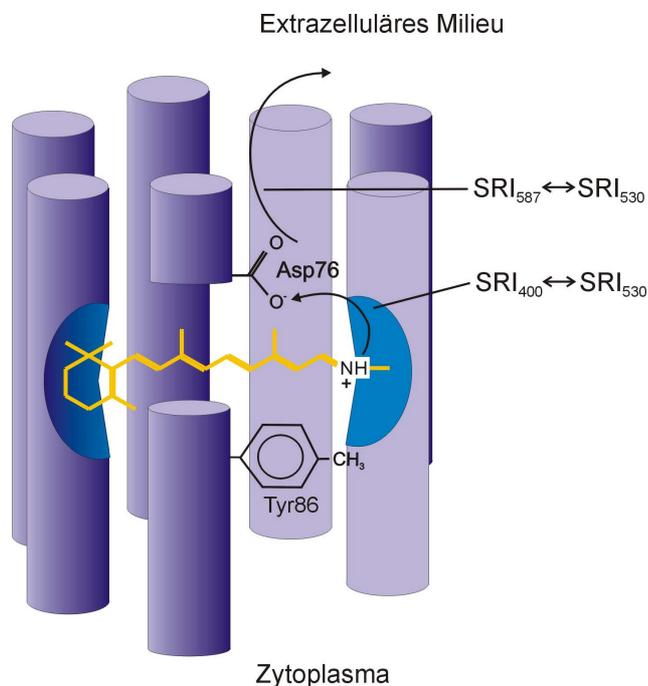
Diese Ergebnisse werden durch die Untersuchungen der Mutante SRID76N von Rath et al. (1996) gestützt. Das Absorptionsmaximum von 587 nm steht hier ebenfalls in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit der Absorptionsbande bei 400 nm. Der  $pK_a$ -Wert betrug jedoch 7,6 und liegt damit deutlich höher als für das SRIwt-His. Diese Abweichung läßt sich dadurch erklären, daß in der Mutante SRID76N die Aminosäure in Position 76 nicht als Akzeptor für das Proton der Schiff-Base fungieren kann.

Die alternative Akzeptorgruppe bedingt somit den höheren  $pK_a$ -Wert. Eine Absorptionsbande bei 530 nm bzw. 550 nm wurde wie erwartet nicht beobachtet, da hier die neutrale Aminosäure Asparagin an Position 76 eingeführt wurde.

Aus den Ergebnissen lassen sich für das Transducer-freie SRIwt-His somit drei Spezies formulieren die in Abhängigkeit vom pH-Wert miteinander im Gleichgewicht stehen. Bei pH-Werten  $\leq 6.0$  wird hierbei das Absorptionsverhalten des SRI durch  $SRI_{587}$  dominiert.



In der folgenden Abbildung sind diese Protonierungsgleichgewichte schematisch dargestellt.



**Abb. 67:** Schematische Darstellung der Protonierungsgleichgewichte zwischen der Asparaginsäure 76 und der Schiff-Base im extrazellulären Protonenkanal.

Im Komplex mit dem Transducers erhöht sich der  $pK_a$ -Wert des Asp76 im SRI auf 8,5 und  $SRI_{400}$  wird nicht mehr beobachtet (Bogomolni et al., 1994). Daraus folgt, daß das SRI im Komplex bei pH 6,0, im Gegensatz zum freien SRI, nahezu ausschließlich als  $SRI_{587}$  vorliegt.

Das  $SRI_{587}$  des Transducer-freien SRI entspricht somit eher dem physiologischen Zustand im Rezeptor-Transducer-Komplex. In den folgenden Untersuchungen wurde daher der Schwerpunkt auf die Charakterisierung dieser Spezies gelegt.

### 4.2.3 Photozyklus des SRIwt-His

SRI vermittelt sowohl die photophile, in einem 1-Photonenprozeß, als auch die photophobe Reaktion, nach Absorption eines zweiten Photons, in *H. salinarum*. Die Kinetik der einzelnen thermischen Relaxationsschritte des SRI sind im Gegensatz zu dem des BR allerdings weit weniger untersucht. Allen sensorischen Rhodopsinen gemein ist die Bildung eines langlebigen M-Intermediates. Das langlebige M-Intermediat des SRI wird hierbei als signalgebender Zustand der photophilen Antwort diskutiert. Darüber hinaus fungiert es als photophober Rezeptor (Yao et al., 1991). Nach Absorption eines zweiten Photons im Wellenlängenbereich von UV/Blauvlicht durchläuft das SRI einen alternativen Reaktionsweg. In einer neueren Arbeit von Swartz et al. (2000) wurde die photophobe Reaktion kinetisch detailliert charakterisiert und es konnten neue Intermediate in ihrem Verlauf identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden die Photozyklen der verschiedenen Spezies des Transducerfreien SRI, SRI<sub>530</sub> und SRI<sub>587</sub>, detailliert kinetisch charakterisiert. Besonderes Augenmerk lag hierbei, wie oben erläutert, auf der Analyse der Intermediate des SRI<sub>587</sub>. Die erhaltenen Daten sollen im folgenden mit denen für das SRI im Komplex mit HtrI ermittelten verglichen werden. Die Photozyklusdaten wurden im weiteren mit den kinetischen Daten der zeitaufgelösten ESR-Spektroskopie verglichen. Eine mögliche Konformationsänderung als Trigger sollte hierbei kinetisch spezifiziert werden und somit der signalgebende Zustand identifiziert werden.

Für die Messungen wurde das SRIwt-His in solubilisierter Form verwendet. Vorversuche mit dem in PM-Lipiden rekonstituierten SRI zeigten, daß die Kinetik der Bildung und des Zerfalls des M-Intermediates hier im Vergleich zu Literaturdaten bis zu 10-fach verlangsamt waren. In den ESR-Experimenten wurde analog eine Immobilisierung des Spinlabels unabhängig von der Position nach Rekonstitution des SRI beobachtet. Die Ergebnisse der Zugänglichkeitsmessungen gegenüber paramagnetischen Molekülen ergaben im weiteren für alle Positionen im rekonstituierten SRI eine Orientierung innerhalb des Proteins an. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß das SRI nach Rekonstitution zumindest als Dimer vorliegt.

Die Ergebnisse der ESR-Experimente an SRIF211C deuteten im weiteren daraufhin, daß das SRI selbst im solubilierten Zustand partiell dimerisiert oder möglicherweise sogar oligomerisiert vorliegt. Die Analyse des gereinigten SRIwt-His über SDS-Gelelektrophorese bestätigen diese Ergebnisse. Durch die Rekonstitution in PM-Lipide wird dieser Effekt möglicherweise verstärkt.

Die Photozyklusdaten des solubilierten SRIwt-His zeigten in Vorversuchen jedoch eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen kinetischen Daten.

Die Analyse des Photozyklus des freien SRI wird durch die Tatsache erschwert, daß im Grundzustand bei pH 6.0 drei Spezies miteinander im Gleichgewicht stehen, welche potentiell alle einen kinetisch spezifischen Photozyklus durchlaufen können.

Die erste Aufgabe bestand somit darin, eine Methode zu entwickeln die Photozyklen getrennt voneinander zu analysieren. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima der verschiedenen Spezies lag eine spezifische Anregung durch Variation der Wellenlänge des verwendeten Laser-Blitzlichtes nahe. Um diese spezifischen Wellenlängen zu ermitteln, wurde zunächst ein Aktionsspektrum des SRIwt-His aufgenommen, d.h. die Wellenlänge des Anregungslichtes wurde im Bereich von 410 nm bis 700 nm variiert und das Absorptionsverhalten des Transienten des M-Intermediates bei 370 nm beobachtet.

In Versuchen an BR konnte hier gezeigt werden, daß die Variation der Wellenlänge des Anregungslichtes keinen Einfluß auf die Kinetik des M-Intermediates hat und lediglich zu einer Varianz der Amplitude führt.

Für die spezifische Anregung des SRI<sub>587</sub> konnte in dieser Arbeit die Wellenlänge 630 nm bestimmt werden. SRI<sub>530</sub> wird bei dieser Wellenlänge nicht mehr angeregt. Die ausgewählte Wellenlänge von 470 nm für das SRI<sub>530</sub> stellte hingegen einen Kompromiß dar, zwischen einer maximalen Anregung des SRI<sub>530</sub> und einem minimalen Beitrag des SRI<sub>587</sub>.

Durch multiexponentielle globale Datenanalyse konnten vier spezifische Halbwertszeiten für die Bildung und den Zerfall des M-Intermediates ermittelt werden. Die Bildung von M<sub>373</sub> mit einer Halbwertszeit von ~5 µs konnte auf die Anregung des SRI<sub>530</sub> zurückgeführt werden, wohingegen SRI<sub>587</sub> eine bis zu 1000-fach langsamere Kinetik zeigt. Der Zerfall von M<sub>373</sub> scheint jedoch für beide Spezies kinetisch gleich zu sein.

Die Zuordnung der spezifischen Halbwertszeiten wurde anhand von zwei Kontrollen verifiziert. Als Modell für den Grundzustand SRI<sub>587</sub> diente SRID76N. Die protonierte Form des Asp76 in SRI<sub>587</sub> wird durch den Austausch gegen ein Asparagin imitiert. Wie Rath et al. (1994) zeigten, ist die Funktion hiervon unbeeinflusst, SRID76N im Komplex mit HtrI ist in der Phototaxis analog zum Wildtyp aktiv. Das Absorptionsspektrum des SRID76N ist wie oben erläutert identisch mit dem SRIwt-His bei pH 6.0. Für die Bildung des M-Intermediates wurde hier, wie erwartet, nur eine Halbwertszeit von 5 ms ermittelt. Sie entspricht in der Größenordnung der für das SRI<sub>587</sub> bestimmten.

Die Analyse der kinetischen Daten des M-Intermediates des SRIwt-His bei pH 6.5 bzw. 5.0 zeigten in Analogie zu dem im pH-Titrations-Experiment ermittelten Gleichgewicht eine Abhängigkeit der Amplitude mit der spezifischen Kinetik je nach Anregungswellenlänge. Bei pH 6.5 ist das Gleichgewicht zu SRI<sub>530</sub> verschoben und die Amplitude des M-Intermediates im Bereich der kürzeren Halbwertszeit ist folglich für die

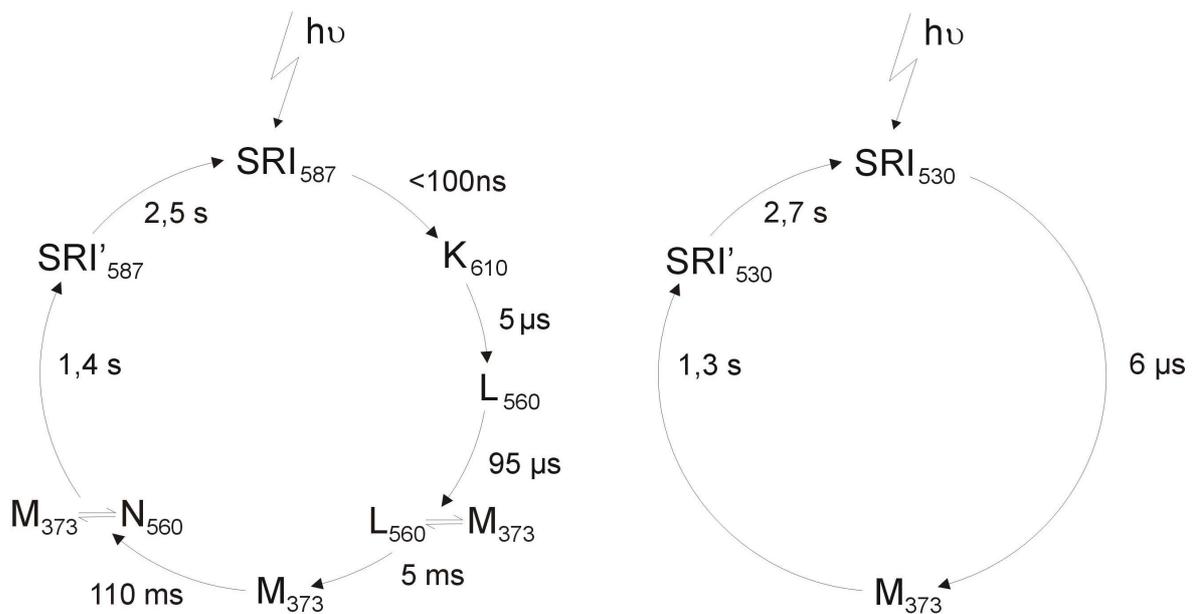
Anregung bei 470 nm im Vergleich zu 630 nm deutlich höher. Im Gegensatz dazu liegt bei pH 5.0 fast ausschließlich SRI<sub>587</sub> vor und es wird lediglich die langsame Bildung von M<sub>373</sub> beobachtet.

Diese Ergebnisse unterstützen die oben erläuterte Zuordnung der spezifischen Kinetiken der Bildung des M-Intermediates zu den einzelnen Spezies des Grundzustandes. Bogomolni et al. (1994) beobachteten analog eine kinetisch biphasische Bildung des M-Intermediates nach Anregung bei 560 nm und einen kinetisch monophasischen Zerfall des M-Intermediates. Die Autoren postulierten allerdings, daß SRI<sub>587</sub> nur in einer Nebenreaktion ein M-Intermediat bildet. Gestützt wird diese These durch die Beobachtung, daß bei pH < 6.0 die Bildung des M-Intermediates abnimmt (Spudich & Spudich, 1993; Schmies et al., 2000).

Als Erklärung hierfür wurde von Spudich & Spudich (1993) ein möglicherweise beschleunigter Zerfall von M<sub>373</sub> postuliert, so daß dieses Intermediat nicht akkumuliert wird. Dies widerspricht dem hier beobachteten Verhalten und soll im folgenden näher diskutiert werden.

Zur separaten Analyse der beiden kinetisch unterschiedlichen Photozyklen des SRI<sub>530</sub> und SRI<sub>587</sub> wurden die Absorptionsänderungen im Bereich von 310 nm bis 700 nm nach spezifischer Anregung aufgenommen. Die sehr unterschiedlichen Zeitfenster bezüglich der Bildung des M-Intermediates erleichterten zusätzlich eine spezifische Zuordnung selbst bei partieller Anregung der jeweils anderen Spezies.

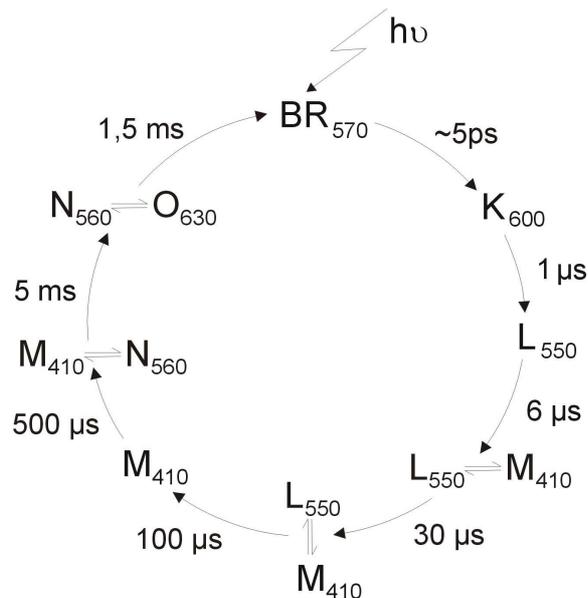
Anhand der absorptionsspektroskopischen Untersuchungen des SRI ist es hier erstmals gelungen die Photozyklen der beiden Spezies des Grundzustandes für das Transducerfreie SRI getrennt voneinander zu analysieren und eine eindeutige Zuordnung der Halbwertszeiten der Intermediate zu treffen. Für das SRI<sub>580</sub> konnten die einzelnen Intermediate, die im Verlauf der thermischen Relaxation auftreten, genau charakterisiert werden. Die Analyse des Photozyklus des SRI<sub>530</sub> beschränkt sich zunächst auf die Bildung und den Zerfall des M-Intermediates. Die Charakterisierung dieses Photozyklus wurde dadurch erschwert, daß der Beitrag des SRI<sub>580</sub> auch durch die Anregung bei 470 nm nicht vollständig eliminiert werden konnte. Aus der Datenanalyse resultierten für beide Anregungswellenlängen sechs Halbwertszeiten. Aus den berechneten Intermediatspektren lassen sich unter Berücksichtigung der getroffenen Überlegungen folgende kinetische Modelle der Photozyklen des SRI herleiten.



**Abb. 68:** Modell der Photozyklen des SRI<sub>580</sub> und SRI<sub>530</sub> (Halbwertszeiten bei 30°C)

Für das SRI<sub>587</sub> konnten durch die Anregung bei 630 nm die kinetischen Daten des Photozyklus selektiv ermittelt werden. Ein Beitrag des SRI<sub>530</sub> konnte ausgeschlossen werden, da in allen Intermediatspektren die Absorptionsbande bei 530 nm nahezu unverändert erkennbar war. Zusätzlich konnte die Bildung des M-Intermediates mit einer Halbwertszeit von 6 μs für das SRI<sub>530</sub> hier nicht beobachtet werden.

Es wurden vielmehr zwei Halbwertszeiten von 5 ms bzw. 111 ms ermittelt, die bereits im Aktionsspektrum für das SRI<sub>587</sub> beobachtet wurden. Im Photozyklus des pSRII wird für die Bildung des M-Intermediates eine Halbwertszeit von 30 μs beobachtet. Eine vergleichbare Halbwertszeit von 2 ms ergibt sich dabei für den Übergang zum  $M_1 \leftrightarrow M_2$  Quasigleichgewicht (Schmies et al., 1998). In Analogie zum Photozyklus des BR (Lozier et al., 1975) wurden weiterhin die Intermediate K<sub>610</sub>, L<sub>560</sub> und N<sub>560</sub> im Photozyklus des SRI<sub>587</sub> kinetisch charakterisiert. In Abbildung 69 ist zum Vergleich schematisch der Photozyklus des BR nach Chizov et al. (1996) dargestellt. Die Halbwertszeiten sind hier für 25°C angegeben.



**Abb. 69:** Modell des Photozyklus des BR (Chizov et al., 1996). Die Halbwertszeiten sind für 25°C angegeben.

Im Vergleich wird deutlich, daß SRI<sub>587</sub> die gleichen Intermediate und ähnliche Quasigleichgewichte im Photozyklus durchläuft wie BR und pSRII, abgesehen von einem bisher nicht detektierten O-Intermediat. Für das SRI<sub>587</sub> konnte nur ein Quasigleichgewicht zwischen L<sub>560</sub> und M<sub>373</sub> kinetisch identifiziert werden. Ein spektral unsichtbarer Übergang zu einem zweiten Quasigleichgewicht könnte möglicherweise bei einer höheren Datenaufösung beobachtet werden, es besteht jedoch aus dem Reaktionsablauf keine Notwendigkeit. Die Bildung von L<sub>560</sub> entspricht mit Halbwertszeit von 5  $\mu\text{s}$  gut der Kinetik des BR bzw. pSRII mit 1  $\mu\text{s}$ . Der Übergang zum L<sub>560</sub>  $\leftrightarrow$  M<sub>373</sub> Gleichgewicht ist mit 95  $\mu\text{s}$  im Vergleich zu 6  $\mu\text{s}$  für BR bereits etwas langsamer. Die Kinetik der Bildung und des Zerfall des M-Intermediates unterscheiden sich hier deutlich. Der Photozyklus des SRI<sub>587</sub> unterscheidet sich somit nur in seiner Kinetik und nicht im Reaktionsweg von dem des BR.

Die Analyse des Photozyklus des SRI<sub>530</sub> nach Anregung bei 470 nm lieferte ein weniger detailliertes Bild. Die Auswertung der Daten wurde dadurch erschwert, daß hier auch SRI<sub>587</sub> zum Teil angeregt wurde. Für das SRI<sub>530</sub> wurde jedoch eindeutig die Bildung des M-Intermediates mit einer Halbwertszeit von 5  $\mu\text{s}$  beobachtet und ist damit deutlich schneller als für das SRI<sub>587</sub>. Alle Intermediatspektren zeigen analog zu den oben erläuterten Ergebnissen eine schwache Absorptionsbande bei 580 nm, die dem SRI<sub>587</sub> im Grundzustand zugeordnet werden kann. Ein mögliches K<sub>610</sub> und L<sub>560</sub>-Intermediat des SRI<sub>530</sub> analog zum Photozyklus des SRI<sub>587</sub> konnte nicht detektiert werden, sind jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhanden. Diese Intermediate konnten vermutlich zeitlich nicht aufgelöst werden (Zeitaufösung: 10 ns, Laserartefakt im Bereich bis  $\sim 100\text{ns}$ ).

Bemerkenswert ist, daß für den Zerfall des M-Intermediates für beide Spezies des Grundzustandes eine identische Halbwertszeit von  $\sim 1,4$  s ermittelt wurde. Analog ist auch die vollständige Rückbildung des Grundzustandes mit  $\sim 2,5 - 2,7$  s für SRI<sub>530</sub> und SRI<sub>587</sub> identisch. Für diese Halbwertszeit ist den Intermediatspektren kein spezifisches Intermediat zuzuordnen, so daß hier zur Veranschaulichung ein SRI' in den Photozyklus eingeführt wurde. Die Spektren des SRI'<sub>587</sub> bzw. SRI'<sub>530</sub> werden nur zu einem geringen Anteil durch das Intermediatspektrum des  $M_{373} \leftrightarrow N_{560}$  Gleichgewichtes charakterisiert und hauptsächlich bereits durch das Spektrum des jeweiligen Grundzustand dominiert. Diese Intermediate lassen sich somit als partiell noch nicht völlig relaxierten angeregten Grundzustand verstehen.

Aus den Ergebnissen läßt sich schließen, daß die Bildung von  $M_{373}$  kinetisch durch die Abgabe des Protons von der Schiff-Base an die jeweilige Akzeptorgruppe determiniert wird. Im SRI<sub>530</sub> steht hierfür das deprotonierte Asp76 analog zum Asp85 in BR zur Verfügung. Die Bildung des M-Intermediates ist mit  $\sim 5$   $\mu$ s sogar schneller als im Photozyklus des BR mit  $\sim 100$   $\mu$ s oder des pSRII mit  $\sim 30$   $\mu$ s. Im SRI<sub>587</sub> übernimmt vermutlich das Histidin 166 im zytoplasmatischen Kanal diese Funktion (Sasaki et al., 2000). Für den Reaktionsablauf läßt sich daraus schließen, daß die Reorientierung der Schiff-Base für diese Spezies schneller ist als deren Deprotonierung. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der elektrophysiologischen Experimente resultiert daraus kein Protonentransport über die Membran.

Für den Zerfall des M-Intermediates ist jedoch die Reprotonierung der Schiff-Base der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Im BR fungiert das Asp96 als Protonendonatorgruppe. Die homologe Position ist im SRI jedoch gegen eine neutrale Aminosäure dem Tyr87 ausgetauscht. Hierdurch läßt sich der mit einer Halbwertszeit von 1 – 2 s kinetisch deutlich langsamere Zerfall des M-Intermediates im Vergleich zu 6 ms im BR erklären. Die Reprotonierung der Schiff-Base erfolgt daher für beide Spezies des Grundzustandes durch einen alternativen Mechanismus, der bislang unklar ist. Vermutlich dient für beide Spezies die gleiche Aminosäure als Protonendonator, wodurch sich die identische Halbwertszeit der M-Intermediate erklären würde.

Die Untersuchung des Photozyklus bei pH 4.5 bestätigten die oben genannten Ergebnisse. Als Anregungswellenlänge konnte hier 560 nm gewählt werden, da bei diesem pH-Wert das SRI nahezu ausschließlich als SRI<sub>587</sub> vorliegt.

Für die Bildung des M-Intermediates ist eine Halbwertszeit von  $\sim 50$  ms im Vergleich zu 110 ms bei pH 6.0 für das SRI<sub>587</sub> zu finden. Die Halbwertszeiten der Bildung des  $K_{610}$ - und  $L_{560}$ -Intermediates sind ebenfalls im Vergleich etwas kleiner jedoch in der gleichen Größenordnung. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Schmies et al. (2000) wurde hier somit für das SRI<sub>587</sub> bei pH 4.5 ein  $M_{373}$  beobachtet.

Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse ist, daß Schmies et al. für die Anregung des Photozyklus bei pH 5.5 und pH 4.0 Licht der Wellenlänge 532 nm verwendeten. Bei dieser Anregungswellenlänge wird nur ein vergleichsweise geringer Anteil SRI<sub>587</sub> angeregt. Da sich mit abnehmenden pH-Wert das Gleichgewicht von SRI<sub>530</sub> zu SRI<sub>587</sub> verschiebt, nimmt daher die Amplitude des M-Intermediates ab. Analog wurde auch eine geringere Amplitude des Transienten bei 580 nm beobachtet. Es besteht somit kein Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit.

Die geringfügige Beschleunigung einzelner Übergänge im Photozyklus bei pH 4.5 ist auf die erhöhte Protonenkonzentration auch im Protonenkanal zurückzuführen. Dies ermöglicht vermutlich den schnelleren Protonentransfer in geschwindigkeitslimitierenden Schritten. Hierauf läßt sich vermutlich auch das im Verlauf des M-Zerfalls beobachtete Quasigleichgewicht zwischen M<sub>373</sub> und einem Intermediat mit einem Absorptionsmaximum von 510 nm bzw. 530 nm zurückführen. Bei pH 6.0 ist im Vergleich ein Gleichgewicht zwischen M<sub>373</sub> und N<sub>560</sub> zu beobachten.

Möglicherweise erfolgt daher die Reprotonierung der Schiff-Base bei pH 4.0 auf einem alternativen Reaktionsweg. Die ermittelte Halbwertszeit dieses Prozesses ist jedoch analog zu denen früherer Intermediate nur um den Faktor ~2 im Vergleich zu pH 6.0 beschleunigt. Die vollständige Rückbildung des Grundzustandes scheint jedoch unabhängig von der externen Protonenkonzentration zu sein. Die berechneten Halbwertszeiten entsprechen in ihrer Größenordnung denen des SRI<sub>587</sub> bei pH 6.0, so daß die Ergebnisse somit bestätigt wurden.

Eine Gegenüberstellung mit den bereits bekannten Daten für SRI, homolog in *H. salinarum* bzw. heterolog in *E. coli* exprimiert, ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

**Tabelle 4:** Vergleich der Halbwertszeiten für die Bildung und den Zerfall des M-Intermediates des SRI mit publizierten Daten

	T/°C	pH	M <sub>373</sub> -Bildung	M <sub>373</sub> -Zerfall
diese Arbeit* SRI <sub>587</sub> SRI <sub>530</sub>	30	6.0	5 ms	1,4 s
		6.0	6 µs	1,3 s
Olson et al.(1993)	?	5.5	n.b.	214 ms; 1,26 s
Haupts et al. (1996)	20	5.5	400 µs; 20 ms	500 ms
		6.8	400 µs; 21 ms	1.3 s
Jung et al. (1999)	18	6.0	11 µs; 17 ms	n.b.
Schmies et al. (2000)*	20	6.0	7 ms; (100 ms)	2,2 s

n.b.: nicht bestimmt; \* in *E. coli* exprimiert

Im Vergleich zeigt sich, daß die hier ermittelten Daten, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Temperatur und Pufferbedingungen, gut mit den bereits publizierten Ergebnissen korrespondieren. Die Bildung des M-Intermediates des SRI<sub>530</sub> korreliert mit der von den Autoren beobachteten schnellen Phase der Kinetik und entsprechend die langsamere Phase mit der hier für das SRI<sub>587</sub> bestimmten Halbwertszeit. Die von Schmies et al. (2000) angegebene Halbwertszeit von 100 ms ist hierbei auf eine andere Zuordnung zurückzuführen. Sie entspricht vielmehr dem hier ermittelten Übergang des M<sub>373</sub> in das Quasigleichgewicht  $M_{373} \leftrightarrow N_{560}$ . Olson et al. (1993) konnten als einzige einen biphasischen Zerfall des M-Intermediates beobachten. Die ermittelte kürzere Halbwertszeit ist vermutlich analog zu Schmies et al. dem Übergang des M-Intermediates in das  $M_{373} \leftrightarrow N_{560}$  Gleichgewicht zuzuordnen.

Im weiteren läßt sich hieraus schließen, daß das in *E. coli* exprimierte SRIwt-His keine Abweichungen in seiner Funktion zu dem homolog in *H. salinarum* exprimierten zeigt.

#### 4.2.3 Topographie des SRI im zytoplasmatischen Bereich der Helices F und G

Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie konnte für ausgewählte Positionen der Helices F des SRI ihre Orientierung relativ zu ihrer molekularen Umgebung ermittelt werden. Eine entsprechende Analyse der Helix G schlug fehl, da die ausgewählten Cysteinmutanten bis auf die Position 211 nicht in funktionaler Form exprimiert bzw. isoliert werden konnten.

Die Mobilität des Spinlabels und seine Zugänglichkeit gegenüber paramagnetischen Molekülen in Abhängigkeit von der Position gibt hierbei Auskunft über die relative Orientierung der ursprünglichen Aminosäureseitenkette.

In den Spektren aller Mutanten der Helix F des solubilisierten SRI sind zwei Populationen des Spinlabels zu erkennen, neben einer mobilen Komponente wird jeweils auch ein Anteil stark immobilisierten Spinlabels beobachtet. Von Pfeiffer et al. (1999) konnten für die BR-Mutanten F156R1 und A168R1 ähnliche spektrale Eigenschaften ermittelt werden. Als Erklärung wird von den Autoren vorgeschlagen, daß die Nitroxid-Seitenkette in zwei favorisierten Konformationen vorliegt, so daß eine Orientierung ins Protein bzw. nach außenweisend resultiert. Dieses Verhalten wird vornehmlich für Spinlabel, die in einer Helix-Helix-Kontaktfläche positioniert sind, beobachtet. Die Beweglichkeit des Spinlabels in den SRI-Mutanten ist insgesamt jedoch deutlich geringer als in den vergleichbaren Region im BR (Pfeiffer et al., 1999) und auch des pSRII (Wegener et al., 2000).

Die Spinlabel der in PM-Lipide rekonstituierten SRI-Mutanten zeigen wie bereits oben erläutert eine starke Immobilisierung, welche nicht auf einen erhöhten Membrandruck durch die relativ hohe Salzkonzentration von 4 M NaCl zurückgeführt werden konnte. Vielmehr kann hierfür eine Aggregation des Proteins im Verlauf der Rekonstitution

vermutet werden. Die Messungen der Zugänglichkeit ergeben im Einklang damit für alle Positionen eine Lokalisierung innerhalb des Proteins.

Für die weitere Analyse werden daher nur die Spektren der solubilisierten SRI-Mutanten herangezogen. Die „Lipidphase“ in den Zugänglichkeitsmessungen wird daher durch das elektronisch neutrale Detergenz DM repräsentiert. Ob der Sauerstoff als paramagnetisches Quencher-molekül eine ähnlich hohe Löslichkeit in der Detergenzphase wie in der Lipidphase besitzt, kann jedoch nur vermutet werden.

Die einzelnen CW-Spektren zeigen lediglich graduelle Unterschiede in der Mobilität des Labels für die einzelnen Positionen, daher ist eine Aussage hinsichtlich der Orientierung auf dieser Basis schwierig. Für die Position 158 wird jedoch im Vergleich der inversen Linienbreiten aller Mutanten eine deutlich höhere Mobilität ermittelt, so daß eine Lokalisierung der Seitenkette nach außen wahrscheinlich ist. In den Zugänglichkeitsmessungen konnte im Einklang dazu eine Orientierung im Bereich der Grenzfläche Wasser/Lipid bestimmt werden. Auf der Basis der Zugänglichkeit kann unter Berücksichtigung des SRI-Modells von Lin et al. (1997) eine Lokalisierung der Aminosäure G158 auf der vom Protein abweisenden Seite der Helix angenommen werden. Eine partielle Dimerisierung, wie sie bereits für das SRIwt-His im solubilisierten Zustand beobachtet wurde, könnte an dieser Position zu einem Helix-Helix-Kontakt führen, der sich in einer Immobilisierung des Spinlabels äußerte und damit die Linienbreite beeinflusst. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Messungen widersprechen sich somit nicht.

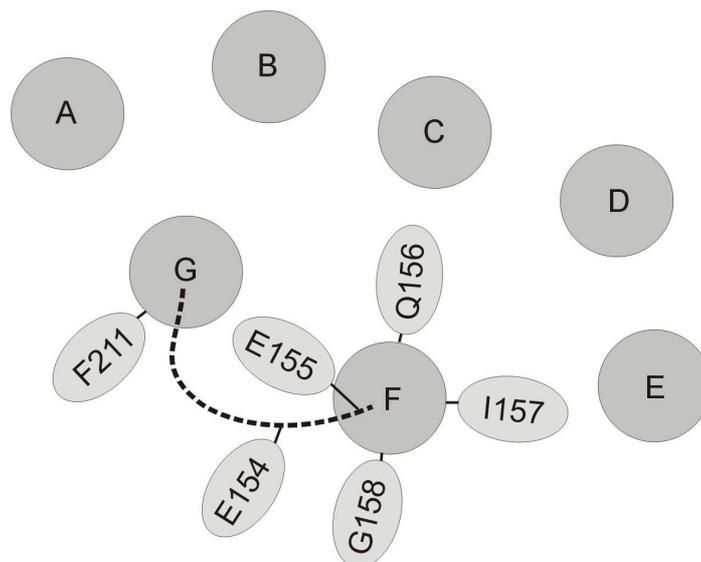
Für die Mutante I157 konnte auf der Basis der Zugänglichkeitsparameter eindeutig eine Lokalisierung innerhalb des Proteins bestimmt werden. Folgt man der Helixwindung läßt sich auf eine Orientierung in Richtung der Helix E schließen.

Die Bestimmung der Zugänglichkeit liefert für die Mutanten E155 und Q156 eine weniger eindeutige Orientierung in die wäßrige Phase. Im Zugänglichkeitsdiagramm ist ihre Position noch im Bereich der Grenzfläche zur Lipidphase und Proteininneren. Für die Position 156 kann daher unter Bezug auf die Positionen 158 und 157 eine Lokalisierung ins Proteininnere bzw. in den zytoplasmatischen Bereich des Protonenkanals vermutet werden. Das Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen unter Einbezug koordinierten Wassers im Protonenkanal rechtfertigt die hier bestimmten Zugänglichkeitsparameter.

Im Einklang mit den Ergebnissen ist die Aminosäure 155 auf Helix F schon im Übergang zu einer Loop-Struktur auf der Proteinoberfläche lokalisiert. Analoges gilt für die Position 154. Hier wird für den Spinlabel eine Orientierung in der Grenzfläche aller drei Phasen ermittelt.

Von den Mutanten der Helix G konnte wie bereits erläutert nur SRIF211C isoliert und markiert werden. Die beobachtete dipolare Wechselwirkung zweier benachbarter Spins läßt sich nur mit einer Dimerisierung des Proteins im Bereich der Helix G erklären. Für die Position 211 läßt sich folglich eine Orientierung auf der Außenseite der Helix annehmen. Die Mutanten Y210, F212 und Y213 konnten nicht in funktionaler Form synthetisiert werden, obwohl sterisch durchaus anspruchsvollere Aminosäuren gegen ein Cystein ausgetauscht wurden. Im Gegensatz zum pSRII ist das SRI somit in diesem Bereich empfindlicher gegenüber Mutationen. Auffallend ist, daß in diesem Bereich der Helix überdurchschnittlich viele aromatische Aminosäuren zu finden sind (Position 208 + 210 – 213). Möglicherweise stört daher der Austausch gegen eine Cystein eine Wechselwirkung der  $\pi$ -Systeme und destabilisiert damit die Struktur.

Insgesamt sind die hier ermittelten experimentellen Daten in guter Übereinstimmung mit dem von Lin et al. (1997) entwickelten Strukturmodell des SRI auf der Basis von Sequenzhomologien zum BR (vgl. Abb. 55).



**Abb. 70:** Schematische Darstellung der Seitenkettenorientierung an den untersuchten Positionen der Helices F und G des SRI. Als Basis dienten die Daten der Zugänglichkeitsmessungen und die Expressionsanalyse. Der Loop zwischen den Helices F und G ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die Aminosäuren Y210, F212 und Y213 der Helix G, sowie L159, F160 und N161 der Helix F konnten nicht exprimiert werden. Es läßt sich aber eine Orientierung zu den benachbarten Helices bzw. in den Protonenkanal aus dem Verlauf der Helixwindung vermuten

#### 4.2.4 Expression des SRI im Komplex mit dem verkürzten Transducer tHtrI

Für die Untersuchung des SRI im funktionalen Komplex mit seinem Transducer HtrI sollte zunächst eine Expressionstrategie entwickelt werden. Am Beispiel des pSRII konnte A. Wegener (2000) zeigen, daß eine Koexpression mit einer verkürzten Variante des pHtrII in *E. coli* möglich ist und der Komplex anschließend durch Reinigung über nur einen Histidin-Tag in funktionaler Form erhalten werden kann.

In Anlehnung an diese Daten wurde daher zunächst die Koexpression des SRI mit einem verkürzten HtrI, bestehend aus den ersten 147 Aminosäuren, angestrebt. Der C-Terminus, der die Signalweiterleitung im Zytoplasma vermittelt, war in dieser Arbeit nicht Gegenstand der Untersuchungen.

Perazzona et al. (1994) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, daß die N-terminalen 147 Aminosäuren des HtrI, welche die beiden transmembranen Helices und einem kurzen zytoplasmatischen Bereich repräsentieren, ausreichend sind für eine funktionale Komplexierung des SRI. Als Kontrolle diente hierfür die Modulation des Photozyklus in Form des pH-unabhängigen M-Zerfalls.

Für die Koexpression wurden zwei Varianten des Rezeptor-Transducer-Komplexes kloniert, in denen jeweils der Histidin-Tag an eine der beiden Komponenten angefügt wurde. In beiden Fällen wurde eine im Vergleich zum SRIwt-His geringe Syntheserate in Bezug auf das SRI beobachtet. Die Expression des tHtrI bzw. tHtrI-His war hingegen im SDS-Gel deutlich erkennbar.

Der Komplex wurde in der anschließenden Reinigung nur in geringen Ausbeuten und unter Abreicherung einer Komponente erhalten. Möglicherweise inhibiert die von Perazzona et al. (1996) beschriebene „Chaperon-artige“ Funktion des HtrI in Bezug auf die Faltung des SRI die Insertion in die *E. coli* Membran.

Auch die separate Expression beider Komponenten mit einer anschließenden Reinigung des Komplexes über einen Histidin-Tag schlug fehl. Auch hier wurde die Abreicherung jeweils einer Komponente beobachtet. Im Gegensatz zum pSRII scheint daher das SRI einen weit weniger stabilen Komplex mit seinem Transducer zu bilden. Eine andere Erklärungsmöglichkeit begründet sich in der für das gereinigte SRIwt-His beobachteten Dimerisierung bzw. Oligomerisierung. Möglicherweise interagiert das SRI bereits in der *E. coli*-Membran mit einem zweiten SRI-Molekül, so daß die Wechselwirkungsdomäne für die Bindung des Transducers bereits besetzt ist.

Das SRI wurde daher über einen Peptidlinker mit dem tHtrI fusioniert. Diese Expressionsstrategie bietet den Vorteil, daß eine feste Stöchiometrie von 1:1 vorgegeben wird. Für das pSRII zeigten Wegener et al. (2000) in ESR-Experimenten, daß im Komplex mit tpHtrII in einem Verhältnis von 2 : 2 vorliegt. Ob die Dimerisierung jedoch für die Funktion essentiell ist, wurde bisher nicht gezeigt. Der Photozyklus des pSRII-tpHtrII zeigt

zumindest keine Unterschiede zwischen der monomeren und dimeren Form. Darüber hinaus besteht auch für das Fusionsprotein SRI-link-tHtrl-His die Möglichkeit der Dimerisierung.

In Phototaxis-Experimenten an pSR11 konnten Spudich et al. (unveröffentlichte Daten) weiterhin zeigen, daß eine Fusion des Rezeptors mit seinem Transducer über einen Peptidlinker zu einem funktionalen Komplex führen. Die Aminosäuresequenz des Linkers wurde hierbei analog zu diesen Experimenten gewählt. Das SRI-link-tHtrl-His konnte erfolgreich exprimiert und gereinigt werden. Die Expressionsrate war hierbei mit der des SRIwt-His vergleichbar. Im Absorptionsspektrum des Komplexes zeigte ein identisches Bandenmuster zu dem des SRIwt-His.

Die Funktionalität des Komplexes wurde anschließend überprüft, indem zunächst der  $pK_a$ -Wert des Asp76 ermittelt wurde und im folgenden der Photozyklus bei verschiedenen pH-Werten bestimmt wurde. Wie oben bereits erläutert, verschiebt sich der  $pK_a$ -Wert des Asp76 im SRI durch die Bindung des Htrl zu höheren Werten.

Entsprechend wurde für das SRI-link-tHtrl-His ein  $pK_a$ -Wert von 7,4 im Vergleich zu 6,7 für das freie SRI ermittelt. Von Bogomolni et al. (1994) wurde für das SRI im nativen Komplex mit Htrl hingegen ein  $pK_a$ -Wert von 8,5 ermittelt, allerdings bestimmten sie auch einen leicht höheren Wert von 7,2 für das freie SRI. Wie oben erläutert ergibt sich jedoch eine gute Übereinstimmung des  $pK_a$ -Wertes des freien SRI mit den Daten von Krebs et al. (1995). Berücksichtigt man daher die relative Erhöhung des  $pK_a$ -Wertes deutet das Ergebnis somit daraufhin, daß das Fusionsprotein den funktionalen Komplex repräsentiert.

Analog zu den Ergebnissen für das freie SRI wurde hier ebenfalls eine Absorptionsbande bei 404 nm identifiziert. In den Literaturdaten für den nativen Komplex wurde im Vergleich dazu diese Bande nicht beschrieben (Bogomolni et al., 1994). Im Rahmen der geringeren Datenqualität wurde ein identischer  $pK_a$ -Wert von 6,03 im Vergleich zum freien SRI ermittelt. Die Protonierungsgrad der Schiff-Base im Gleichgewicht mit der deprotonierten Asparaginsäure 76 scheint somit nicht beeinflusst zu werden. Aufgrund der geringeren Datenqualität läßt sich jedoch nur vermuten, ob hier möglicherweise ein Gemisch des funktionalen Komplexes und inaktiven Fusionsprotein erhalten wurde.

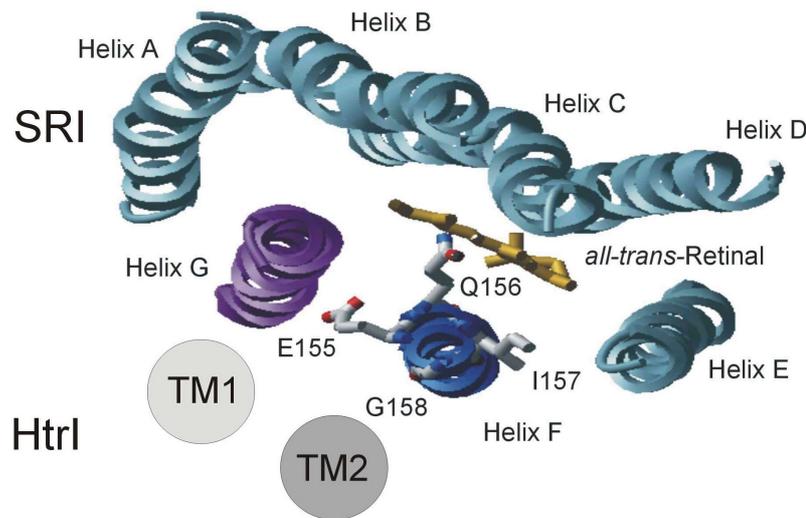
Die Photozyklusdaten des SRI-link-tHtrl-His widersprechen jedoch dieser Schlußfolgerung und es konnte hier wahrscheinlich kein funktionaler Komplex erhalten werden. Die ermittelten Halbwertszeiten waren identisch mit denen des freien SRI und zeigten ebenfalls eine starke pH-Abhängigkeit. In der Literatur ist hingegen dokumentiert, daß die Bindung des Htrl zu einer Beschleunigung des SRI-Photozyklus führt und die kinetischen Daten im Bereich von pH 5.0 bis 7.5 konstant sind (Spudich et al., 1993; Jung et al., 1999).

Im Gegensatz zur pH-Titration wurden die Daten anhand des solubilisierten Proteins analog zum SRIwt-His ermittelt. Möglicherweise bildet sich erst in der Membran ein stabiler Komplex aus. Die Kinetik des Photozyklus war jedoch für das rekonstituierte Protein analog zu der des freien SRI im Vergleich zu Daten des nativen SRI stark verlangsamt. Vermutlich erfolgt im Verlauf der Rekonstitution hier ebenfalls eine Aggregation, die zu einer Behinderung der Konformationsänderung und damit einer Verlangsamung des Photozyklus führt.

Für eine Komplexierung des SRI durch das tHtrl im Fusionsprotein sprechen jedoch die im Vergleich zum freien SRI unterschiedlichen Expressionraten der Cysteinmutanten, die für anschließende ESR-Experimente synthetisiert wurden. Die Mutante SRIG158C konnte für das freie SRI in einer ähnlichen Ausbeute wie der Wildtyp erhalten werden, hingegen konnte die Mutante im Fusionsprotein nur in geringer Ausbeute isoliert werden und erwies sich als relativ instabil. In Übereinstimmung mit dem Modell des SRI von Lin et al. (1997), ist die Aminosäure 158 im zytoplasmatischen Bereich der Helix F lokalisiert und zeigt vom Protein weg in die Membran. Aus dem veränderten Expressionsverhalten der Mutante des Fusionsproteins lässt sich daher einen Kontakt des Transducers in diesem Bereich ableiten.

Für die Dimerisierung des SRI konnte anhand der Mutante F211C bereits eine Interaktion im zytoplasmatischen Bereich der Helix G vermutet werden. In Analogie zu den oben erläuterten Beobachtungen ist die Expressionrate dieser Mutante im Fusionsprotein deutlich kleiner und es konnten nur geringe Labelgrade in der Kopplungsreaktion mit dem Spinlabel erreicht werden.

A. Wegener (2000) konnte in ESR-Experimenten eine Interaktion des pSRII mit pHtrII in identischen Helix-Bereichen nachweisen. Für das SRI lässt sich daraus eine analoge Orientierung zum Htrl im Fusionsprotein und damit wahrscheinlich auch im nativen Komplex ableiten. In der folgenden Abbildung ist eine mögliche Anordnung der beiden Proteine zueinander schematisch dargestellt.



**Abb. 71:** Schematische Darstellung der möglichen Anordnung der transmembranen Helices im Komplex SRI-Htrl aus der Sicht vom Zytoplasma. Für das Htrl sind hier nur die beiden transmembranen Helices (TM1 + 2) dargestellt.

Die einer nativen Komplexierung des SRI durch das tHtrl im Fusionsprotein widersprechenden Photozyklusdaten lassen sich eventuell dadurch erklären, daß die Länge des verwendeten Peptidlinkers zu kurz ist, woraufhin die Eintauchtiefe der Helices des tHtrl in die Membran im Vergleich zum nativen Protein verändert wurde. Es würde damit zwar eine Komplexierung über die entsprechende Interaktionsfläche des SRI stattfinden, eine Wechselwirkung für die Funktion essentieller Aminosäuren wäre jedoch inhibiert.

Zur Klärung einer Funktionalität des Fusionsprotein könnten elektrophysiologische Untersuchungen an Oozyten dienen, wie sie von Schmies et al. (2001) bereits am nativen Komplex durchgeführt wurden. In diesen Experimenten konnten die Autoren zeigen, daß die Protonenpumpaktivität des freien SRI durch die Komplexierung des Htrl inhibiert wird.

#### 4.2.5 Identifizierung der Wechselwirkung des SRI mit Htrl

Die Untersuchung des Mechanismus der Signalweiterleitung vom SRI an seinen Transducer Htrl erfolgte durch ESR-Differenzspektroskopie. Aus entsprechenden Experimenten an BR und pSRII wurde hier ebenfalls eine Konformationsänderung in Form eines Abknickens einer Helix im zytoplasmatischen Bereich der Helix F oder G vermutet (Rink et al. 2000; Wegener et al., 2000). Von besonderem Interesse ist hierbei ein möglicher Unterschied in der Weiterleitung des photophilen Signals im Vergleich zum photophoben Signaltransfer im pSRII.

In den lichtinduzierten ESR-Differenzspektren konnte anhand der Mutante SRIQ156C eine Zunahme der Mobilität des Spinlabels ermittelt werden. Diese Beobachtung wurde ebenfalls für die identische Mutation im Fusionsprotein festgestellt. In einem Kontrollversuch konnte darüber hinaus durch Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\geq 630$  nm sichergestellt werden, daß diese Mobilitätsänderung auch im Photozyklus der Spezies SRI<sub>587</sub> erfolgt. Den ESR-Untersuchungen bezüglich der Orientierung der einzelnen Aminosäuren konnte, in Zusammenhang mit dem von Lin et al. (1997) berechneten Modell des SRI, entnommen werden, daß die Glutaminsäure 156 im zytoplasmatischen Kanal des SRI lokalisiert ist. Folglich ist eine Mobilitätszunahme des Spinlabels an dieser Position durch eine Öffnung des Kanals zu erklären. Als mögliche Erklärung dient hierfür eine zum BR und pSRII analoge Auswärtsbewegung der Helix F in diesem Bereich im Verlauf des Photozyklus (Submarian et al., 1993; Rink et al., 2000; Wegener et al., 2000). Spudich & Lanyi (1996) schlugen als Modell für die unterschiedliche Signaltransduktion im SRI ein Gleichgewicht zwischen zwei Konformationen im Grundzustand vor. Die entspannte („relaxed“) Konformation wird vornehmlich im Verlauf der photophilen Signalantwort gebildet und auch das M-Intermediat liegt in dieser Konformation vor. Im Vergleich hierzu wurde für die Mutante BRD85N/D96N, die ähnliche Eigenschaften wie das SRI zeigt, diese Konformation, im Unterschied zum Wildtyp, auch mit protonierter Schiff-Base angenommen. Die angespannte („constrained“) Konformation wird dagegen im Verlauf der photophoben Reaktion gebildet. Im Gegensatz dazu konnte hier eindeutig nachgewiesen werden, daß im Zuge der photophilen Signaltransduktion analog zur photophoben Signalweiterleitung im pSRII die Öffnung des Protonenkanals beobachtet werden kann.

Es ist somit wahrscheinlich, daß das SRI das Signal der photophilen Reaktion in Form eines sterischen Triggers auf das HtrI überträgt. Das langlebige M-Intermediat des SRI wird hierbei als signalgebender Zustand der photophilen Antwort diskutiert. Im M-Intermediat ist das Retinal in *13-cis*-Konfiguration über die deprotonierte Schiff-Base gebunden (Haupts et al. 1994). Yan et al. (1991) vermuteten, daß die 13-Methylgruppe des Retinals als sterischer Trigger fungiert und nach Photoaktivierung eine Konformationsänderung induziert. Mit dem Zerfall des M-Intermediates und der Reprotonierung der Schiff-Base soll anschließend das photophile Signal abgeschaltet werden.

Durch zeitaufgelöste ESR-Spektroskopie ist es im folgenden gelungen das M-Intermediat als signalgebenden Zustand zu identifizieren. Im Vergleich mit den optischen Transienten des Photozyklus bei 380 nm (M-Intermediat) und 580 nm (Grundzustand) zeigt sich, daß diese Konformationsänderung zeitgleich mit der Bildung des M-Intermediates vollständig ausgeprägt ist. Analoges beobachteten Wegener et al. (2000) an pSRII.

Die Ausbildung der Konformationsänderung im SRI konnte hier aufgrund der gewählten Meßparameter kinetisch nicht aufgelöst werden. Die Rückbildung der Konformationsänderung ist dagegen kinetisch schneller als der Zerfall des M-Intermediates bzw. die Rückbildung des Grundzustandes.

Eine partielle Erwärmung der Probe aufgrund der Belichtung konnte hierfür als Ursache ausgeschlossen werden. Der Vergleich des Photozyklus der Mutante SRIQ156C mit denen des Wildtyps ergab für den M-Zerfall identische kinetische Daten. Die Bildung des M-Intermediates zeigte für die Mutante lediglich eine geringfügig langsamere Kinetik im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutation hat somit keinen Einfluß auf die Kinetik des M-Zerfalls.

Vergleicht man die Halbwertszeit des ESR-Transienten mit denen der Intermediate des Photozyklus zeigt sich, daß die Rückbildung der Konformationsänderung ca. viermal schneller ist als der Zerfall des Quasigleichgewichtes zwischen  $M_{373}$  und  $N_{560}$  jedoch deutlich langsamer als dessen Bildung. Vermutlich ist die strukturelle Änderung mit einem bisher nicht identifizierten spektral unsichtbaren Intermediatübergang kinetisch gekoppelt. Im BR beobachteten Rink et al. (1997) für die Konformationsänderung im E-F-Loop ein ähnliches Verhalten. Die strukturelle Änderung erfolgte im M-Intermediat und wurde von den Autoren dem  $M_1$ - $M_2$  Übergang im Photozyklus des BR zugeordnet. Die Rückbildung der strukturellen Komponente erfolgte jedoch eindeutig zeitgleich mit dem Zerfall des N-Intermediates. Abweichend von diesen Ergebnissen konnte von Wegener et al. (2000) für das pSRII die Rückbewegung der Helix mit dem Zerfall des O-Intermediates kinetisch verknüpft werden. Sie geht damit vermutlich mit der Reisoomerisierung des Chromophors einher. Dies kann für das SRI wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

Die Interpretation der Daten auf physiologischer Ebene ergibt, daß die Konformationsänderung in Helix F mit der Deprotonierung der Schiff-Base gekoppelt ist. Im Photozyklus des SRI konnte bislang kein  $M_1$ - $M_2$  Übergang identifiziert werden, welcher im BR mit dem sogenannten "Switch", der Änderung der Zugänglichkeit vom extrazellulären zum zytoplasmatischen Kanal, in Verbindung gebracht wird. Da jedoch für das SRI im nativen Komplex mit HtrI kein Protonentransport beobachtet werden kann (Olson et al., 1992; Bogomolni et al., 1994; Schmies et al., 2000), wird vermutet, daß die Änderung der Zugänglichkeit kinetisch schneller ist als die Deprotonierung der Schiff-Base.

Die Rückbildung der strukturellen Änderung läßt sich vermutlich analog an die Reprotonierung der Schiff-Base und ihres Protonendonors koppeln. Im Vergleich zum BR kann hier keine eindeutige Zuordnung des Prozesses zur Reprotonierung des Protonendonors getroffen werden. In Übereinstimmung hiermit konnte im Photozyklus des

---

SRI kein kinetisch isoliertes N-Intermediat sondern nur das  $M_{373} \leftrightarrow N_{560}$  Gleichgewicht identifiziert werden.

Für die Mutante SRIQ156C im Fusionsprotein wurde ein identischer ESR-Transient im Vergleich zu dem des freien SRI erhalten. Da die Funktionalität des Fusionsproteins nicht eindeutig gezeigt werden konnte, ist dies nur als vorläufiges Ergebnis zu werten. Für das pSRII konnte A. Wegener eindeutig zeigen, daß die Auswärtsbewegung der Helix F auch im Komplex mit dem Transducer vollständig erhalten bleibt.

Durch eine geeignete Meßanordnung sollte es möglich sein, durch zeitaufgelöste ESR-Spektroskopie die Bildung der Konformationsänderung kinetisch zu charakterisieren. Im Vergleich mit den Photozyklusdaten könnte anschließend geklärt werden, ob die Änderung der Zugänglichkeit oder die Deprotonierung der Schiff-Base der Auslöser ist.

Die Konformationsänderung könnte durch geeignete Mutanten des SRI bzw. HtrI genauer charakterisiert werden. Hierdurch könnte im weiteren geklärt werden, ob auch in Helix G strukturelle Änderungen analog zum BR auftreten. In pSRII wurden im Unterschied dazu eine Entkopplung der beiden Helices beobachtet (A. Wegener, 2000).

Von besonderem Interesse ist hierbei die Identifizierung einer möglichen Helixbewegung im Verlauf des photophoben Signaltransfers. Ob evetuell andere Helixbereiche beteiligt sind oder nur kinetische Unterschiede bestehen, wäre hierbei zu klären. Die Analyse der Bifunktionalität des SRI ist im Hinblick auf ein allgemeingültiges Verständnis des Signaltransfers von großer Bedeutung.

## 5. Zusammenfassung

Für eine detaillierte Charakterisierung der Reaktivität des Cytochrom  $ba_3$  sollte in dieser Arbeit durch heterologe Expression in *H. salinarum* der Enzymkomplex in funktionaler Form isoliert werden. Die Entwicklung eines geeigneten Expressions- und Reinigungsverfahrens sollte im weiteren das Studium von geeigneten Mutanten ermöglichen. Für die Synthese wurde der von Lüttenberg (1998) konstruierte Expressionsvektor pBL7 verwendet, in dem das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle des *bop*-Promotors aus *H. salinarum* steht.

Durch genomische Insertion über den homologen genomisch kodierten *bop*-Promotor konnten stabile Transformanten für alle Expressionvarianten des Cytochrom  $ba_3$  erhalten werden. Das Cytochrom  $ba_3$  konnte hier jedoch trotz Variation in der Untereinheitenzusammensetzung und der Fusion verschiedener Affinitäts-Tags nicht synthetisiert werden. Durch Western-Blot Analyse konnte weiterhin gezeigt werden, daß selbst für das Cytochrom  $ba_3$  in nativer Zusammensetzung der Untereinheiten ohne Affinitäts-Tag keine Proteinsynthese in *H. salinarum* stattfindet. In abschließenden RT-PCR-Experimenten konnten die Transkription der Sequenz des Cytochrom  $ba_3$  nachgewiesen werden. Unter den gewählten Expressionbedingungen wird somit eindeutig der *bop*-Promotor induziert. Für die fehlende Proteinsynthese bieten sich mehrere Erklärungsmodelle an. Einerseits könnte die Sequenz der internen ribosomalen Bindungsstellen aus *N. pharaonis* hier nicht erkannt werden, andererseits läßt sich vermuten, daß die Biosynthese der Häm-Kofaktoren die Synthese limitiert und somit zu einer proteolytischen Degradation des Proteinkomplexes führt.

In dieser Arbeit konnte der Mechanismus des Signaltransfers vom SRI an das HtrI in ESR-Experimenten aufgeklärt und kinetisch analysiert werden. Für das Transducer-freie SRI konnten zusätzlich erstmals die einzelnen Photozyklen der verschiedenen Spezies des Grundzustandes getrennt voneinander kinetisch detailliert charakterisiert werden.

Das SRI wurde nach der von Schmies et al. (2000) entwickelten Methode in *E. coli* exprimiert und bis zur Homogenität über Affinitätschromatographie gereinigt. Durch eine Modifikation der Reinigungsbedingungen konnte hierbei die Stabilität des Proteins deutlich erhöht werden. Die Charakterisierung des SRIwt-His zeigte weiterhin, daß keine Unterschiede zu dem homolog in *H. salinarum* exprimierten Protein bestehen.

In pH-Titrationsversuchen konnten mittels multiexponentieller globaler Datenanalyse die absoluten Absorptionsmaxima der drei Grundzustände des SRIwt-His mit 400 nm, 530 nm und 580 nm ermittelt werden. Das Gleichgewicht zwischen SRI<sub>587</sub> und SRI<sub>530</sub> konnte anhand des  $pK_a$ -Wertes dem Protonierungsgleichgewicht der Asparaginsäure 76

zugeordnet werden. SRI<sub>400</sub> steht vermutlich im Gleichgewicht mit SRI<sub>530</sub> und ist durch die Deprotonierung der Schiff-Base mit Retinal in *all-trans* Konfiguration charakterisiert.

Durch die Variation der Wellenlänge des Anregungslichtes in der Laserblitzlicht-Spektroskopie gelang hier erstmals eine Separierung der spezifischen Photozyklen des SRI<sub>587</sub> und SRI<sub>530</sub>. Die Analyse des Aktionsspektrums des Transducer-freien SRI zeigte, daß die Bildung des M-Intermediates für das SRI<sub>530</sub> mit 5 µs bis zu 100mal schneller ist als die des SRI<sub>587</sub>. Das SRI<sub>400</sub> konnte im Gegensatz dazu nicht angeregt werden. Es kann daher angenommen werden, daß diese Spezies keinen Photozyklus durchläuft.

Anhand der spektroskopischen Daten wurden nach spezifischer Anregung die spektralen Intermediate (K,L,M und N) im Photozyklus des SRI<sub>587</sub> identifiziert und kinetisch charakterisiert. Entgegen früheren Vermutungen konnte im weiteren eindeutig gezeigt werden, daß SRI<sub>587</sub> auch bei pH 4.5 ein M-Intermediat bildet. Der Photozyklus des SRI<sub>587</sub> unterscheidet sich somit von dem des BR lediglich durch das fehlende O-Intermediat und einer deutlich langsameren Kinetik.

Für das SRI<sub>530</sub> wurde analog zur Analyse des Aktionsspektrums eine im Vergleich zum SRI<sub>587</sub> kinetisch schnellere Bildung des M-Intermediates nachgewiesen werden. Die Intermediate K und L wurden zeitlich nicht aufgelöst. Die Kinetik der Bildung von M<sub>373</sub> ist somit von der Protonierung des Asp76 abhängig.

Für den Zerfall des M-Intermediates wurde jedoch für beide Spezies eine identische Kinetik ermittelt, die ca. 300fach langsamer ist als im BR. Physiologisch kann dies durch den Austausch der homologen Position des Asp96 im BR durch ein Thr85 im SRI erklärt werden, so daß die Reprotonierung der Schiff-Base im SRI durch eine alternative Aminosäure im zytoplasmatischen Kanal erfolgt.

Zur Untersuchung der Wechselwirkung des SRI im Komplex mit HtrI wurde eine verkürzte Variante des Transducers mit dem SRI in *E. coli* koexprimiert. Die Synthese des SRI wurde jedoch hierbei stark inhibiert. Die Experimente in Hinsicht auf eine gemeinsame Reinigung bzw. Bildung des Komplexes nach Isolierung der einzelnen Proteine lassen vermuten, daß das SRI bereits in der Membran zumindest dimerisiert und so eine Komplexierung des Transducers inhibiert ist. Als Interaktionsfläche für das HtrI konnten in weiteren Experimenten die Helices F und G identifiziert werden.

Die Expression des über einen Peptid-Linker fusionierten Rezeptor-Transducer-Komplexes war hingegen erfolgreich. Die Analyse bezüglich der Funktionalität des isolierten Fusionsproteins lieferten jedoch widersprüchliche Daten. Die pH-Titrationsversuche deuteten ebenso wie die ESR-Experimente auf eine Komplexierung des SRI durch das tHtrI auch im solubiliserten Zustand hin.

Im Gegensatz dazu lassen die Photozyklusdaten vermuten, daß kein funktionaler Komplex erhalten wurde. Eine Klärung könnten diesbezüglich die elektrophysiologische Untersuchungen liefern.

Zur Identifizierung des Mechanismus der Signaltransduktion vom Rezeptor auf den Transducer wurden spinmarkierte Cysteinmutanten des SRI im Bereich der Helix F und G positionsspezifisch mittels ESR-Spektroskopie untersucht. Die Charakterisierung der Orientierung der einzelnen Spinlabel der Mutanten und damit der ursprünglichen Aminosäuren bestätigten im zytoplasmatischen Bereich der Helix F das von Lin et al. (1997) berechnete Modell des SRI.

Durch ESR-Differenzspektroskopie konnte im weiteren eine Auswärtsbewegung der Helix F zeitgleich mit der Bildung des M-Intermediates identifiziert werden. Das photophile Signal wird somit im SRI durch eine Konformationsänderung an den Transducer weitergeleitet. Die Rückbildung dieser strukturellen Änderung entspricht kinetisch einem bisher nicht identifizierten Übergang im Photozyklus.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adler, J. (1975) Chemotaxis in bacteria. *Annu.Rev.Biochem.*, **44**, 341-356.
- Altenbach, C., Greenhalgh, D.A., Khorana, H.G., Hubbell, W.L. (1994) A collision gradient method to determine the immersion depth of nitroxides in lipid bilayers: Application to spin-labeled mutants of bacteriorhodopsin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **91**, 1667-1671.
- Altenbach, C., Flitsch, S.L., Khorana, H.G., Hubbell, W.L. (1989) Structural studies on transmembrane proteins. Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants at unique cysteines. *Biochemistry*, **28**, 7806-7812.
- Ausubel, F.M. (1987) Current protocols in molecular biology. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience New York.
- Balashov, S.P., Imasheva, E.S., Ebrey, T.G., Chen, N., Menick, D.R., Crouch, R.K. (1997) Glutamate-194 to cysteine mutation inhibits fast light-induced proton release in bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, **36**, 8671-8676.
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., Wolfe, R.S. (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol.Rev.*, **43**, 260-296.
- Bamberg, E., Apell, H.-J., Dencher, N.A., Sperling, H., Stieve, H., Lauger, P. (1979) Photocurrents generated by bacteriorhodopsin on planar bilayer membranes. *Biophysical & Structural Mechanisms*, 277-292.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Bivin, D.B., Stoeckenius, W. (1986) Photoactive retinal pigments in haloalkaliphilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 2167-2177.
- Blackburn, N.J., Barr, M.E., Woodruff, W.H., Van der Oost, J., De Vries, S. (1994) Metal-metal bonding in biology: EXAFS evidence for a 2.5 Å copper-copper bond in the Cu<sub>A</sub> center of cytochrome oxidase. *Biochemistry*, **33**, 10401-10407.
- Blanck, A., Oesterhelt, D., Ferrando, E., Schegk, E.S., Lottspeich, F. (1989) Primary structure of the sensory rhodopsin I, a prokaryotic photoreceptor. *EMBO J.*, **8**, 3963-3971.
- Blankenship, R.E. (1992), *Photosynthesis Research* **33**, 91-111.
- Bogomolni, R.A. Spudich, J.L. (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **79**, 6250-6254.
- Bogomolni, R.A., Spudich, J.L. (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., Stoeckenius, W., Szundi, I., Perozo, E., Olson, K.D., Spudich, J.L. (1994) Removal of transducer HtrI allows electrogenic proton translocation by sensory rhodopsin I. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **91**, 10188-10192.

- Braiman, M.S., Mathies, R. (1982) Resonance Raman spectra of bacteriorhodopsin's primary photoproduct: evidence for a distorted 13-cis retinal chromophore. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **79**, 403-407.
- Braiman, M.S., Mogi, T., Marti, L.J., Stern, H.G., Khorana, Rothschild, K.J. (1988) Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: Light-driven proton transport involves protonation changes of aspartic acid residues 85, 96 and 212, *Biochemistry*, **27**, 8516-8520.
- Brischwein, M., Scharf, B., Engelhard, M., Mäntele, W. (1993) Analysis of the redox reaction of an archaeobacterial copper protein, halocyanin, by electrochemistry and FTIR difference spectroscopy, *Biochemistry*, **32**, 13710-13727.
- Brown, L.S., Dioumaev, A.K., Needleman, R., Lanyi, J.K. (1998) Local-access model for proton transfer in bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, **37**, 3982-3993.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.N. (1987) XL1-blue a high efficiency plasmid transforming rec-A *Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *Biotechniques*, **5**, 376-377.
- Butt, H.J., Fendler, K., Bamberg, E., Tittor, J., Oesterhelt, D. (1989) Aspartic acids 96 and 85 play a central role in the function of bacteriorhodopsin as a proton pump. *EMBO J.*, **8**, 1657-1663.
- Calhoun, M.W., Thomas, J.W., Gennis, R.B. (1994) The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends. Biochem. Sci.*, **19**, 325-330.
- Chizhov, I., Chernavskii, D.S., Engelhard, M., Mueller, K.H., Zubov, B.V., Hess, B. (1996) Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys.J.*, **71**, 2329-2345.
- Chizov, I., Schmies, G., Seidel, R., Sydor, J.R., Lüttenberg, B., Engelhard, M. (1998) The photophobic receptor from *Natronobacterium pharaonis*: Temperature and pH dependencies of the photocycle of sensory rhodopsin II. *Biophys. J.*, **75**, 999-1009.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.
- Dancshazy, Z., Drachev, L.A., Ormos, P., Nagy, K., Skulachev, V.P. (1978) Kinetics of the blue light-induced inhibition of photoelectric activity of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*, **96**, 59-63.
- Dioumaev, A.K., Richter, H.T., Brown, L.S., Tanio, M., Tuzi, S., Saito, H., Kimura, Y., Needleman, R., Lanyi, J.K. (1998) Existence of a proton transfer chain in bacteriorhodopsin: participation of Glu-194 in the release of protons to the extracellular surface. *Biochemistry*, **37**, 2496-2506.
- Dobler, J., Zinth, W., Kaiser, W., Oesterhelt, D. (1988) Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy. *Chemical Physical Letters*, **144**, 215-220.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145.
- Dunach, M., Marti, T., Khorana, H.G., Rothschild, K.J. (1990) UV-visible spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: substitution of Arg-82, Asp-85, Tyr-185, and Asp-212 results in abnormal light-dark adaptation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **87**, 9873-9877.

- Dunn, R., McCoy, J., Simsek, M. Majumdar, A., Chang, S.H., Rajbhandary, U.L., Khorana, H.G. (1981) The bacteriopsin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **78**, 6744-6748.
- Ehresmann, B, Imbault, P, Well, JH (1973) Spectroscopic determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal.Biochem.*, **54**, 454
- Engelhard, M., Gerwert, K., Hess, B., Kreutz, W., Siebert, F. (1985) Light-driven protonation changes of internal aspartic acids of bacteriorhodopsin: an investigation by static and time-resolved infrared difference spectroscopy using [4-<sup>13</sup>C]aspartic acid labeled purple membrane. *Biochemistry*, **24**, 400-407.
- Farahbakhsh, Z.T., Altenbach, C. Hubbell, W.L. (1992) Spin labeled cysteins as sensors for protein-lipid interaction and conformation in rhodopsin. *Photochem. Photobiol.*, **56**, 1019-1033.
- Ferrando, E., Schweiger, U., Oesterhelt, D. (1993) Homologous bacterio-opsin-encoding gene expression via site-specific vector integration. *Gene*, **125**, 41-47.
- Ferrando-May, E., Krah, M., Marwan, W., Oesterhelt, D. (1993) The methyl-accepting transducer protein HtrI is functionally associated with the photoreceptor sensory rhodopsin I in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J.*, **12**, 2999-3005.
- Garcia-Horsman, J.A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., Gennis, R.B. (1994) The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J. Bacteriol.*, **176**, 5587-5600.
- Gerwert, K., Hess, B., Soppa, J., Oesterhelt, D. (1989) Role of aspartate-96 in proton translocation by bacteriorhodopsin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **86**, 4943-4947.
- Greenhalgh, D.A., Altenbach C., Hubbell, WL., Khorana, HG. (1991) Locations of Arg-82, Asp-85, and Asp-96 in helix C of bacteriorhodopsin relative to the aqueous boundaries. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **88**, 8626-8630.
- Haupts, U., Einfeld, W., Stockburger, M., Oesterhelt, D. (1994) Sensory rhodopsin I photocycle intermediate SRI380 contains 13-cis retinal bound via an unprotonated Schiff base. *FEBS Lett.*, **356**, 25-29.
- Haupts, U., Haupts, C., Oesterhelt, D. (1995) The photoreceptor sensory rhodopsin I as a two-photon-driven proton pump. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **92**, 3834-3838.
- Haupts, U., Bamberg, E., Oesterhelt, D. (1996) Different modes of proton translocation by sensory rhodopsin I. *EMBO J.*, **15**, 1834-1841.
- Henderson, R., Schertler, G.F. (1990) The structure of bacteriorhodopsin and its relevance to the visual opsins and other seven-helix G-protein coupled receptors. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, **326**, 379-389.
- Hendler, R.W., Parhasaradhi, B., Reynafarje, B., Ludwig, B. (1991) Comparison of energy-transducing capabilities of the two- and three-subunit cytochromes aa<sub>3</sub> from *Paracoccus denitrificans* and the 13-subunit beef heart enzyme. *Biophys. J.*, **60**, 415-423.
- Henrich, H.J. (1995) Charaktersierung von Cytochrom bc aus *N. pharaonis*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

- Heymann, J.A., Havelka, W.A., Oesterhelt, D. (1993) Homologous overexpression of a light-driven anion pump in an archaebacterium. *Mol. Microbiol.*, **7**, 623-630.
- Hildebrand, E., Dencher, N. (1975) Two photosystems controlling behavioural responses of *Halobacterium halobium*. *Nature*, **257**, 46-48.
- Hill, B.C. (1994) Modeling the sequence of electron transfer reactions in the single turnover of reduced, mammalian cytochrome c oxidase with oxygen. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2419-2425.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59.
- Hohenfeld, I.P., Wegener, A.A., Engelhard, M. (1999) Purification of histidine-tagged bacteriorhodopsin, *pharaonis* halorhodopsin and *pharaonis* sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **442**, 198-202.
- Holloway, P.W. (1973) A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal. Biochem.*, **53**, 304-308.
- Hou, S., Brooun, A., Yu, H.S., Freitas, T., Alam, M. (1998) Sensory rhodopsin II transducer HtrII is also responsible for serine chemotaxis in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *J. Bacteriol.*, **180**, 1600-1602.
- Hubbell, W.L., Altenbach, C. (1994) Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 566-573.
- Hubbell, W.L., Mchaourab, H.S., Altenbach, C., Lietzow, M.A. (1996) Watching proteins move using site-directed spin labeling. *Structure*, **4**, 779-783.
- Ihara, K., Umemura, T., Katagiri, I., Kitajima-Ihara, T., Sugiyama, Y., Kimura, Y., Mukohata, Y. (1999) Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation. *J. Mol. Biol.*, **285**, 163-174.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, **376**, 660-669.
- Jung, K.H., Spudich, J.L. (1998) Suppressor mutation analysis of the sensory rhodopsin I-transducer complex: insights into the color-sensing mechanism. *J. Bacteriol.*, **180**, 2033-2042.
- Jung, K.H., Spudich, E.N., Dag P., Spudich J.L. (1999) Transducer-binding and transducer-mutations modulate photoactive-site-deprotonation in sensory rhodopsin I. *Biochemistry*, **38**, 13270-13274.
- Kannt, A., Soulimane, T., Buse, G., Becker, A., Bamberg, E., Michel, H. (1998) Electrical current generation and proton pumping catalyzed by the ba<sub>3</sub>-type cytochrome oxidase from *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.*, **434**, 17-22.
- Kates, M., Kushawa, S.C., Sprott, D. (1982) *Meth. Enzymol.*, **88**, 98-111.

- Keightley, J.A., Zimmermann, B.H., Mather, M.W., Springer, P., Pastuszyn, A., Lawrence, D.M., Fee, J.A., (1995) Molecular genetic and protein chemical characterization of the cytochrome  $ba_3$  from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biol. Chem.*, **270**, 20345-20358.
- Klostermeier, D., Seidel, R., Reinstein, J. (1998) Functional properties of the molecular chaperone Dnak from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.*, **279**, 841-853.
- Knoll, A.H. (1992) The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science*, **256**, 622-627.
- Krah, M., Marwan, W., Verméglio, A., Oesterhelt, D. (1994) Phototaxis of *Halobacterium salinarium* requires a signalling complex of sensory rhodopsin I and its methyl-accepting transducer HtrI. *EMBO J.*, **13**, 2150-2155.
- Krebs, M.P., Hauss, T., Heyn, M.P., RajBhandary, U.L., Khorana, H.G. (1991) Expression of the bacterioopsin gene in *Halobacterium halobium* using a multicopy plasmid. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **88**, 859-863.
- Krebs, M.P., Mollaaghababa, R., Khorana, H.G. (1993) Gene replacement in *Halobacterium halobium* and expression of the bacteriorhodopsin mutants. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **90**, 1987-1991.
- Krebs, M.P., Spudich, E.N., Spudich, J.L. (1995) Rapid high-yield purification and liposome reconstitution of polyhistidine-tagged sensory rhodopsin I. *Protein Expression & Purification*, **6**, 780-788.
- Kuhlbrandt, W. (2000) Bacteriorhodopsin-the movie. *Nature*, **406**, 569-570.
- Lanyi, J.K., Varo, G. (1995) The photocycle of bacteriorhodopsin. *Israel Journal of Chemistry*, 365-385.
- Larsson, S., Kallebring, B., Wittung, P., Malmstrom, B.G. (1995) The CuA center of cytochrome-c oxidase: electronic structure and spectra of models compared to the properties of CuA domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **92**, 7167-7171.
- Le Moual, H., Koshland, D.E., Jr. (1996) Molecular evolution of the C-terminal cytoplasmic domain of a superfamily of bacterial receptors involved in taxis. *J.Mol.Biol.*, **261**, 568-585.
- Lewis, R.J., Belkina, S., Krulwich, T.A. (1980) Alkalophiles have much higher cytochrome contents than conventional bacteria and than their own non-alkalophilic mutant derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 857-863.
- Lin, S.L., Yan, B. (1997) Three-dimensional model of sensory rhodopsin I reveals important restraints between the protein and the chromophore. *Protein Engineering*, **10**, 197-206.
- Lodwick, D., Ross, H.N.M., Walker, J.A., Almond, J.W., Grant, W.D. (1991) Nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA gene from haloalkaliphilic Archaeon (Archaeobacterium), *Natronobacterium magadii*, and the phylogeny of halobacteria. *System. Appl. Microbiol.*, **14**, 352-357.
- Lozier, R.H., Bogomolni, R.A., Stoerkenius, W. (1975) Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*. *Biophys.J.*, **15**, 955-962.

- Lozier, R.H., Xie, A., Hofrichter, J., Clore, G.M. (1992) Reversible steps in the bacteriorhodopsin photocycle. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **89**,3610-3614.
- Lübben, M., Kolmerer, B., Saraste, M. (1992) An archaeobacterial terminal oxidase combines core structures of two mitochondrial respiratory complexes. *EMBO J.*, **11**, 805-812.
- Lübben, M. (1995) Cytochromes of archaeal electron transfer chains. *Biochim. Biophys. Acta. Bio-Energetics*, **1229**, 1-22.
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J.P., Lanyi, J.K. (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J.Mol.Biol.*, **291**, 899-911.
- Luecke, H. (2000) Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *Biochim.Biophys.Acta*, **1460**, 133-156.
- Lüttenberg, B., Wolff, E.K., Engelhard, M. (1998) Heterologous coexpression of the blue light receptor pSRII and its transducer pHtrII from *Natronobacterium pharaonis* in the *Halobacterium salinarium* strain Pho81/w restores negative phototaxis. *FEBS Lett.*, **426**, 117-120.
- Mankin, A.S., Zyrianova, I.M., Kagramanova, V.K., Garrett, R.A. (1992) Introducing mutations into the single-copy chromosomal 23S rRNA gene of the archaeon *Halobacterium halobium* by using a rRNA operon-based transformation system. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **89**, 6535-6539.
- Marwan, W., Alam, M., Oesterhelt, D. (1991) Rotation and switching of the flagellar motor assembly in *Halobacterium halobium*. *J.Bacteriol.*, **173**, 1971-1977.
- Marwan, W., Bibikov, S.I., Montrone, M., Oesterhelt, D. (1995) Mechanism of photosensory adaptation in *Halobacterium salinarium*. *J.Mol.Biol.*, **246**, 493-499.
- Mattar, S., Scharf, B., Kent, S.B.H., Rodewald, K., Oesterhelt, D., Engelhard, M. (1994) The primary structure of halocyanin, an archaeal blue copper protein, predicts a lipid anchor for membrane fixation. *Biol. Chem.*, **269**, 14939-14945.
- Mattar, S. (1996) Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung zweier Komplexe der Atmungskette von *N. pharaonis*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.
- Mattar, S., Engelhard, M. (1997) Cytochrome ba<sub>3</sub> from *N. pharaonis*, an archaeal four-subunit cytochrome-c-type oxidase. *Eur. J. Biochem.*, **52**, 332-341.
- Maurer, R., Vogel, J. Schneider, S. (1987) Analysis of flash photolysis data by global fit with multiexponential exponentials. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 255-262.
- Mchaourab, H.S., Oh, K.J., Fang, C.J., Hubbell, W.L. (1997) Conformation of T4 lysozyme in solution. Hinge-bending motion and the substrate-induced conformational transition studied by site-directed spin labeling. *Biochemistry*, **36**, 307-316.
- Miick, S.M., Millhauser, G.L. (1992) Rotational diffusion and intramolecular collisions of a spin labeled alpha-helical peptide determined by electron spin echo spectroscopy. *Biophys. J.* , **63**, 917-925.

- Mitchel, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, **191**, 144-148.
- Müller, K.-H., Plesser, Th. (1991) Variance reduction by simultaneous multiexponential analysis of data sets from different experiments. *Eur. Biophys. J.*, **19**, 231-240.
- Mukohata, Y., Kaji, Y. (1981) Light-induced ATP synthesis dependent on halorhodopsin-pH regulation. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **208**, 615-617.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed reaction. *Meth. Enzymol.*, **377**, 263-266.
- Nagel, G., Mockel, B., Buldt, G., Bamberg, E. (1995) Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H<sup>+</sup> pumping. *FEBS Lett.*, **377**, 263-266.
- Nagel, G., Kelety, B., Mockel, B., Buldt, G., Bamberg, E. (1998) Voltage dependence of proton pumping by bacteriorhodopsin is regulated by the voltage-sensitive ratio of M1 to M2. *Biophys.J.*, **74**, 403-412.
- Nagle, J.F. (1991) Solving complex photocycle kinetics. Theory and direct method. *Biophys. J.*, **19**, 231-240.
- Ng, W.L., Yang, C.F., Halladay, J.T., Arora, P., DasSarma, S. (1995) Isolation of genomic and plasmid DNAs from *Halobacterium halobium*. *Archaea: A laboratory manual-Halophiles*. DasSarma, S. (Ed.), Cold spring Harb. Lab. Press, New York.
- Oesterhelt, D., Stoeckenius, W. (1973) Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **70**, 2853-2857.
- Oesterhelt, D. (1998) The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **8**, 489-500.
- Olson, K.D., Deval, P., Spudich, J.L. (1992) Absorption and photochemistry of sensory rhodopsin--I: pH effects. *Photochemistry & Photobiology*, **56**, 1181-1187.
- Olson, K.D., Spudich, J.L. (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.
- Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U., Michel, H. (1997) Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10547-10553.
- Otto, H., Marti, T., Holz, M., Mogi, T., Stern, J., Engel, F., Khorana, H.G., Heyn, M.P. (1990) Substitution of amino acids Asp-85, Asp212 and Arg 82 in bacteriorhodopsin affects the proton release phase of the pump and the pK of the schiff base. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1018-1022.
- Perazzona, B., Spudich, E.N., Spudich, J.L. (1996) Deletion mapping of the sites on the HtrI transducer for sensory rhodopsin I interaction. *J. Bact.*, **178**, 6475-6478.

- Pfeiffer, M., Rink, T., Gerwert, K., Oesterhelt, D., Steinhoff, H.J. (1999) Site-directed spin-labeling reveals the orientation of the amino acid side-chains in the E-F loop of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.*, **287**,163-71.
- Rath, P., Olson, K.D., Spudich, J.L., Rothschild, K.J. (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.
- Rath, P., Spudich, E., Neal, D.D., Spudich, J.L., Rothschild, K.J. (1996) Asp76 is the Schiff base counterion and proton acceptor in the proton-translocating form of sensory rhodopsin I. *Biochemistry*, **35**, 6690-6696.
- Richter, H.T., Brown, L.S., Needleman, R., Lanyi, J.K. (1996) A linkage of the pK<sub>a</sub>'s of asp-85 and glu-204 forms part of the reprotonation switch of bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, **35**, 5600-5606.
- Rigaud, J.L., Mosser, G., Lacapere, J.J., Olofsson, A., Levy, D., Ranck, J.L. (1997) Bio-beads: A efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. *J. Struc. Biol.*, **118**, 226-235.
- Rink, T., Riesle, J., Oesterhelt, D., Gerwert, K., Steinhoff, H.-J. (1999) Spin-labeling studies of the conformational changes in the vicinity of D36, D38, T46 and E161 of bacteriorhodopsin during photocycle. *Biophys. J.*, **73**, 983-993.
- Rink, T., Pfeiffer, M., Oesterhelt, D., Gerwert, K., Steinhoff, H.J. (2000) Unraveling photoexcited conformational changes of bacteriorhodopsin by time resolved electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biophys.J.*, **78**, 1519-1530.
- Rudolph, J., Oesterhelt, D. (1995) Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J.*, **14**, 667-673.
- Rudolph, J., Tolliday, N., Schmitt, C., Schuster, S.C., Oesterhelt, D. (1995) Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *EMBO J.*, **14** , 4249-4257.
- Rudolph, J., Nordmann, B., Storch, K.F., Gruenberg, H., Rodewald, K., Oesterhelt, D. (1996) A family of halobacterial transducer proteins. *FEMS Microbiol.Lett.*, **139**, 161-168.
- Rumbley, J.N., Furlong Nickels, E., Gennis, R.B. (1997) One-step purification of histidine-tagged cytochrome bo<sub>3</sub> from *Escherichia coli* and demonstration that associated quinone is not required for the structural integrity of the oxidase. *Biochim.Biophys.Acta*, **1340**, 131-142.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harb. Lab. Press.
- Sasaki, J., Spudich, J.L. (2000) Proton transport by sensory rhodopsins and its modulation by transducer- binding. *Biochim.Biophys.Acta*, **1460**, 230-239.
- Schägger, H., von Jagow, G. (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., Engelhard, M. (1993) Halocyanin, an archaeobacterial blue copper protein (typel) from *N. pharaonis*. *Biochemistry* **32**, 12894-12900.
- Scharf, B., Wittenberg, B., Engelhard, M. (1997) Electron transfer proteins from the haloalkaliphilic archaeon *N. pharaonis*: Possible components of the respiratory chain include cytochrome bc and a terminal oxidase cytochrome ba<sub>3</sub>. *Biochemistry* **36**, 4471-4479.
- Schmies, G., Chizhov, I., Engelhard, M. (2000) Functional expression of His-tagged sensory rhodopsin I in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **466**, 67-69.
- Schmies, G., Engelhard, M., Wood, P.G., Nagel, G., and Bamberg, E. (2001) Electrophysiological characterization of specific interactions between bacterial sensory rhodopsins and their transducers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, 1555-1559.
- Schweika (1997) Bestimmung intramolekularer Abstände in mehrfach spinmarkierten Proteinen mittels ESR-Spektroskopie bei Raumtemperatur. Diplomarbeit, Ruhr-Universität-Bochum.
- Scott, R.A. (1995) Functional significance of cytochrome c oxidase structure. *Structure*, **3**, 981-986.
- Seehra, J.S., Khorana, H.G. (1984) Bacteriorhodopsin precursor. Characterization and its intergration into the purple membrane. *J. Biol. Chem.*, **259**, 4187-4193.
- Shand, R.F., Betlach, M.C. (1991) Expression of the bop gene cluster of *Halobacterium halobium* is induced by low oxygen tension and by light. *J. Bacteriol.*, **173**, 4692-4699.
- Shimono, K., Iwamoto, M., Sumi, M., Kamo, N. (1997) Functional expression of pharaonis phoborhodopsin in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **420**, 54-56.
- Skulachev, V.P. (1993) Interrelations of bioenergetic and sensory functions of the retinal proteins. *Q.Rev.Biophys.*, **26**, 177-199.
- Soliman, G.S.H., Trüper, H.G. (1982) *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C*, **3**, 318-329.
- Souquet, M. (1993) Untersuchungen zur Isolierung des Cytochrom c-Gens aus *N. pharaonis*, Diplomarbeit Universität Aachen.
- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA-fragments seperated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.
- Spudich, J.L., Stoeckenius, W. (1979) Photosensory and chemosensory behaviour of *Halobacterium halobium*. *Photobiochemistry*, **1**, 43-53.
- Spudich, E.N., Takahashi, T., Spudich, J.L. (1989) Sensory rhodopsins I and II modulate a methylation/demethylation system in *Halobacterium halobium* phototaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7746-7750.
- Spudich, J.L., Bogomolni, R.A. (1984) Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature*, **312**, 509-513.
- Spudich, E.N., Spudich, J.L. (1993) The photochemical reactions of sensory rhodopsin I are altered by its transducer. *J. Biol. Chem.*, **268**, 16095-16097.

- Spudich, J.L. (1998) Variations on a molecular switch-transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins, *Mol. Microbiol.*, **28**, 1051-1058.
- Steinhoff, H.-J., Mollaaghababa, R., Altenbach, C., Hideg, K., Krebs, M., Khorana, H.G., Hubbell, W.L. (1994) Time-resolved detection of structural changes during the photocycle of the spin-labeled bacteriorhodopsin. *Science*, **266**, 105-107.
- Steinhoff, H.J., Radzwill, N., Thevis, W., Lenz, V., Brandenburg, D., Antson, A., Dodson, G., Wollmer, A. (1997) Determination of interspin distances between spin labels attached to insulin: comparison of electron paramagnetic resonance data with the X-ray structure. *Biophys.J.*, **73**, 3287-3298.
- Stetter, K.O.(1985) Extrem thermophile Bakterien, *Naturwissenschaften*, **72**, 291-301.
- Studier, F.W., Moffat, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Stryer, L. (1991) Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Subramaniam, S., Gerstein, M., Oesterhelt, D., Henderson, R. (1993) Electron diffraction analysis of structural changes in the photocycle of bacteriorhodopsin. *EMBO J.*, **12**, 1-8.
- Subramaniam, S., Henderson, R. (2000) Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin. *Nature*, **406**, 653-657.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H., Itakura, K. (1981) Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: Isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **78**, 6613-6617.
- Swartz, T.E., Szundi, I., Spudich, J.L., Bogomolni, R.A. (2000) New photointermediates in the two photon signaling pathway of sensory rhodopsin-I. *Biochemistry*, **39**, 15101-15109.
- Takahashi, T., Yan, B., Mazur, P., Derguini, F., Nakanishi, K., Spudich, J.L. (1990) Color regulation in the archaeobacterial phototaxis receptor phoborhodopsin (sensory rhodopsin II). *Biochemistry*, **29**, 8467-8474.
- Thomas, J.W., Calhoun, M.W., Lemieux, L.J., Puustinen, A., Wikström, M., Alben, J.O., Gennis, R.B. (1994) *Biochemistry*, **33**, 13013-13021.
- Tindall, B.J., Trüper, H.G. (1986) Ecophysiology of the aerobic halophilic archaeobacteria. *System. Appl. Microbiol.* **7**, 202-212.
- Trumpower, BL., Gennis, RB. (1994) Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Ann. Rev. Biochem.*, **63**, 675-716.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, **269**, 1069-1074.

- Varo, G., Brown, L.S., Sasaki, J., Kandori, H., Maeda, A., Needleman, R., Lanyi, J.K. (1995) Light-driven chloride ion transport by halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*. 1. The photochemical cycle. *Biochemistry*, **34**, 14490-14499.
- von Wachenfeldt, C., de Vries, S., van der Oost, J. (1994) The CuA site of the *caa*<sub>3</sub>-type oxidase of *Bacillus subtilis* is a mixed-valence binuclear copper centre. *FEBS Lett.*, **340**, 109-13.
- Wegener, A.A., Chizhov, I., Engelhard, M., Steinhoff, H.J. (2000) Time-resolved detection of transient movement of helix F in spin-labelled pharaonis sensory rhodopsin II. *J.Mol.Biol.*, **301**, 881-891.
- Wegener, A.A. (2000) Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaebakteriellen Lichtrezeptors pSRII mit seinem Transducerprotein pHtrII. Dissertation, Universität Dortmund.
- Wikström, M., Bogachev, A., Finel, M. Morgan, J.E., Puustinen, A., Raitio, M., Verkhovskaya, M., Verkovsky, M.I. (1994) Mechanism of protontranslocation by the respiratory oxidases. The histidine cycle. *Biochim. Biophys. Acta*, **1187**, 106-111.
- Wittenberg, R. (1995) Charakterisierung der Elektronentransportkette und Untersuchungen zur Bioenergetik in *Natronobacterium pharaonis*, Dissertation Ruhr-Universität Bochum.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol.Rev.*, **51**, 221-271.
- Xie, A.H., Nagle, J.F., Lozier, R.H. (1987) Flash spectroscopy of purple membrane. *Biophys. J.*, **51**, 627-635.
- Xu, Z., Moffett, D.B., Peters, T.R., Smith, L.D., Perry, B.P., Whitmer, J., Stokke, S.A., Teintze, M. (1995) The role of the leader sequence coding region in expression and assembly of bacteriorhodopsin. *J. Biol. Chem.*, **270**, 24858-24863.
- Yan, B., Spudich, J.L. (1991) Evidence that the repellent receptor form of sensory rhodopsin I is an attractant signaling state. *Photochem. Photobiol.*, **54**, 1023-1026.
- Yan, B., Takahashi, T., Johnson, R., Spudich, J.L. (1991) Identification of signaling states of a sensory receptor by modulation of lifetimes of stimulus-induced conformations: the case of sensory rhodopsin II. *Biochemistry*, **30**, 10686-10692.
- Yan, B., Nakanishi, K., Spudich, J.L. (1991) Mechanism of activation of sensory rhodopsin I: evidence for a steric trigger. *Proc Natl.Acad.Sci. USA*, **88**, 9412-9416.
- Yang, C.F., DasSarma, S. (1990) Transcriptional induction of purple membrane and gas vesicle synthesis in the archaebacterium *Halobacterium halobium* is blocked by DNA gyrase inhibitor. *J. Bacteriol.*, **172**, 4118-4121.
- Yao, V.J., Spudich, J.L. (1991) Evidence that the repellent receptor form of sensory rhodopsin is an attractant signaling state. *Photochem. Photobiol.*, **54**, 1023-1026.
- Yao, V.J., Spudich, J.L. (1992) Primary structure of an archaebacterial transducer, a methyl-accepting protein associated with sensory rhodopsin I. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **89**, 11915-11919.

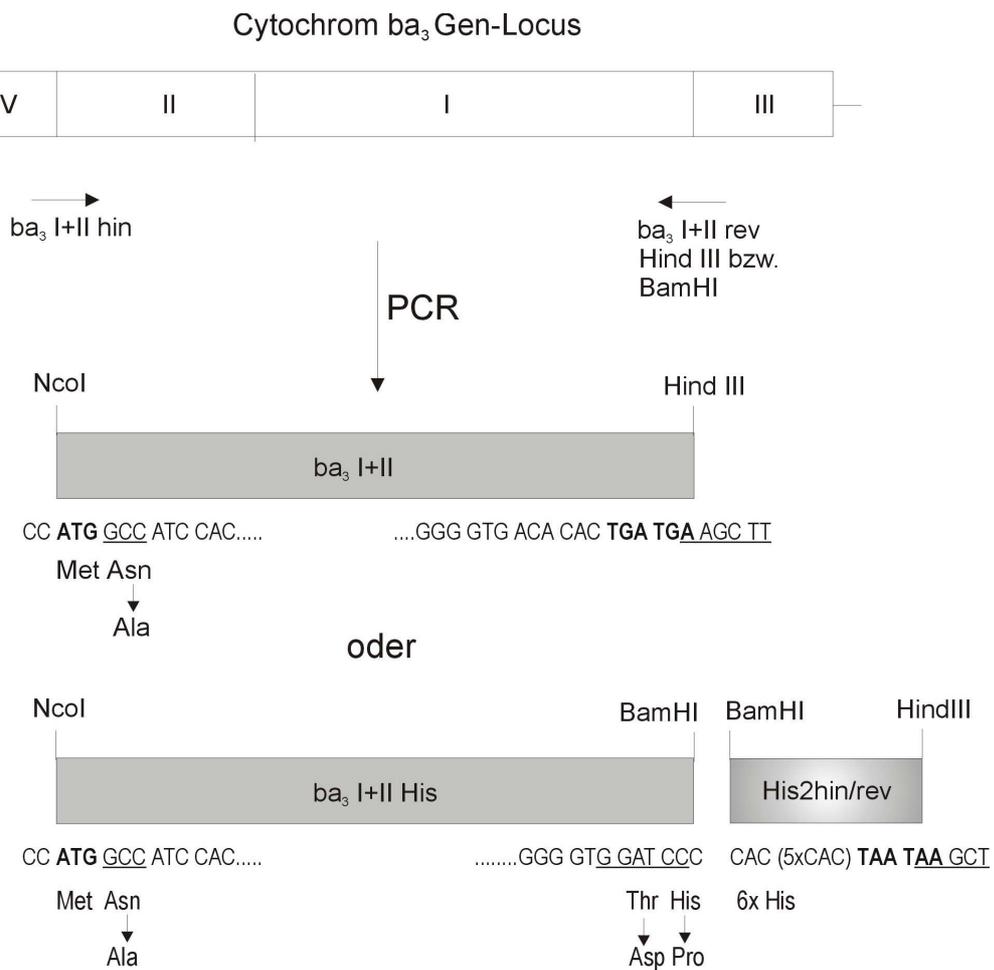
- Yao, V.J., Spudich, E.N., Spudich, J.L. (1994) Identification of distinct domains for signaling and receptor interaction of the sensory rhodopsin I transducer, HtrI. *J.Bacteriol.*, **176**, 6931-6935.
- Zhang, X.N., Spudich, J.L. (1998) HtrI is a dimer whose interface is sensitive to receptor photoactivation and His-166 replacements in sensory rhodopsin I. *J.Biol.Chem.*, **273**, 19722-19728.
- Zhang, X.N., Zhu, J., Spudich, J.L. (1999) The specificity of interaction of archaeal transducers with their cognate sensory rhodopsins is determined by their transmembrane helices. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **96**, 857-862.

## 7. Anhang

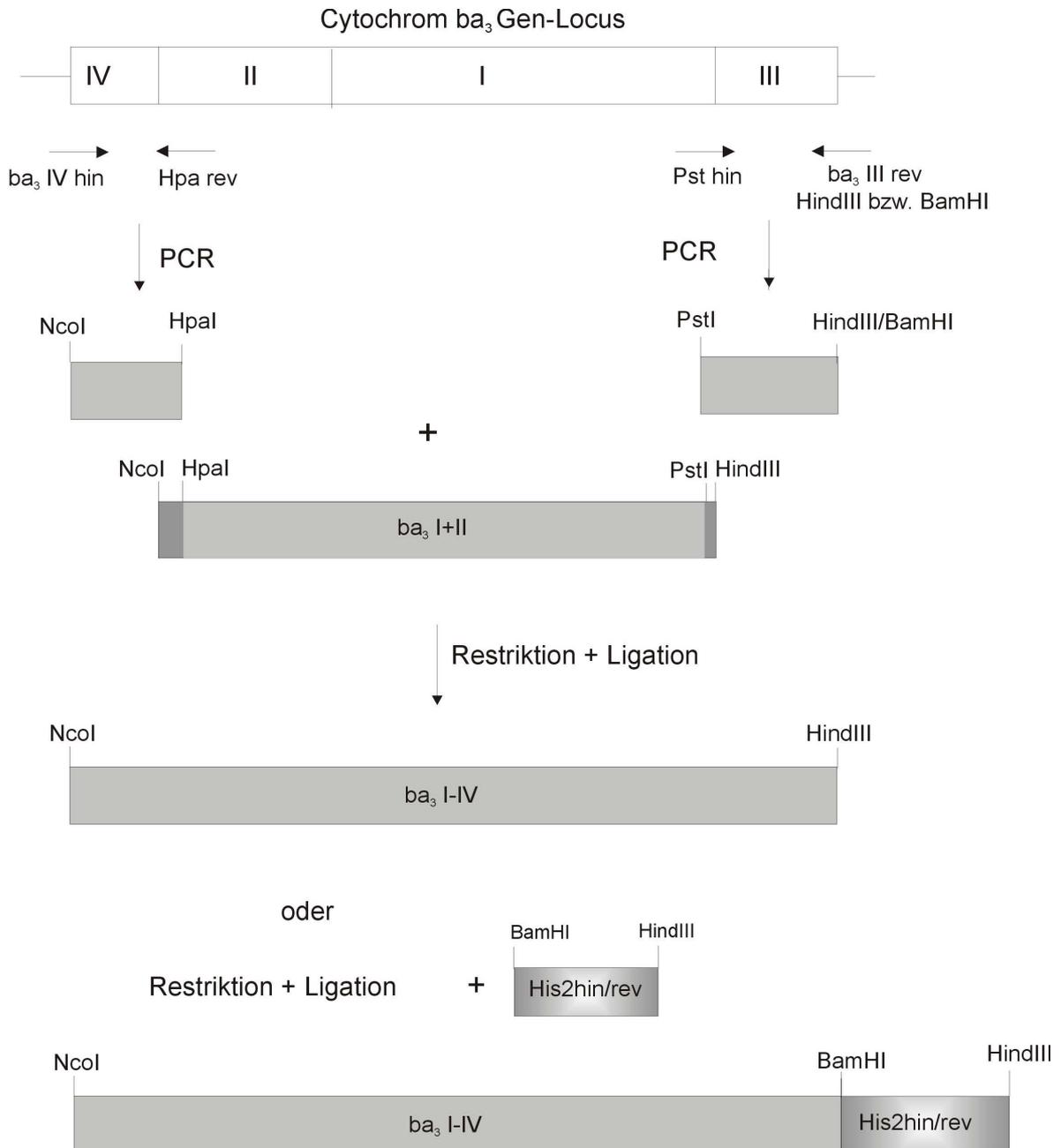
### Nukleinsäuresequenz des *bop*-Promotors

<sup>1</sup> GGATCCGTGAAGTCCGCCACGACCGCGTCACGACAGGAGCCGACCAGCGACACCCAGAAG  
*BamHI*  
<sup>61</sup> GTGCGAACGGTTGAGTGCCGCAACGATCACGAGTTTTTCGTGCGCTTCGAGTGGTAACAC  
<sup>121</sup> GCGTGCACGCATCGACTTCACCGCGGGTGTTTCGACGCCAGCCGGCCGTTGAACCAGCAG  
<sup>181</sup> GCAGCGGGCATTACAGCCGCTGTGGCCAAATGGTGGGGGCGCTATTTTGGTATGGTTT  
<sup>241</sup> GGAATCCGCGTGTCCGGCTCCGTGTCTGACGGTTCATCGGTTCTAAATTCGGTCACGAGCG  
<sup>301</sup> TACCATACTGATTGGGTCGTAGAGTTACACACATATCCTCGTTAGGTACTGTTGC**ATG**<sup>360</sup>  
*bop* →

### Klonierung der Expressionskassette für die Untereinheiten I und II des Cytochrom *ba*<sub>3</sub> optional mit Histidin-Tag.

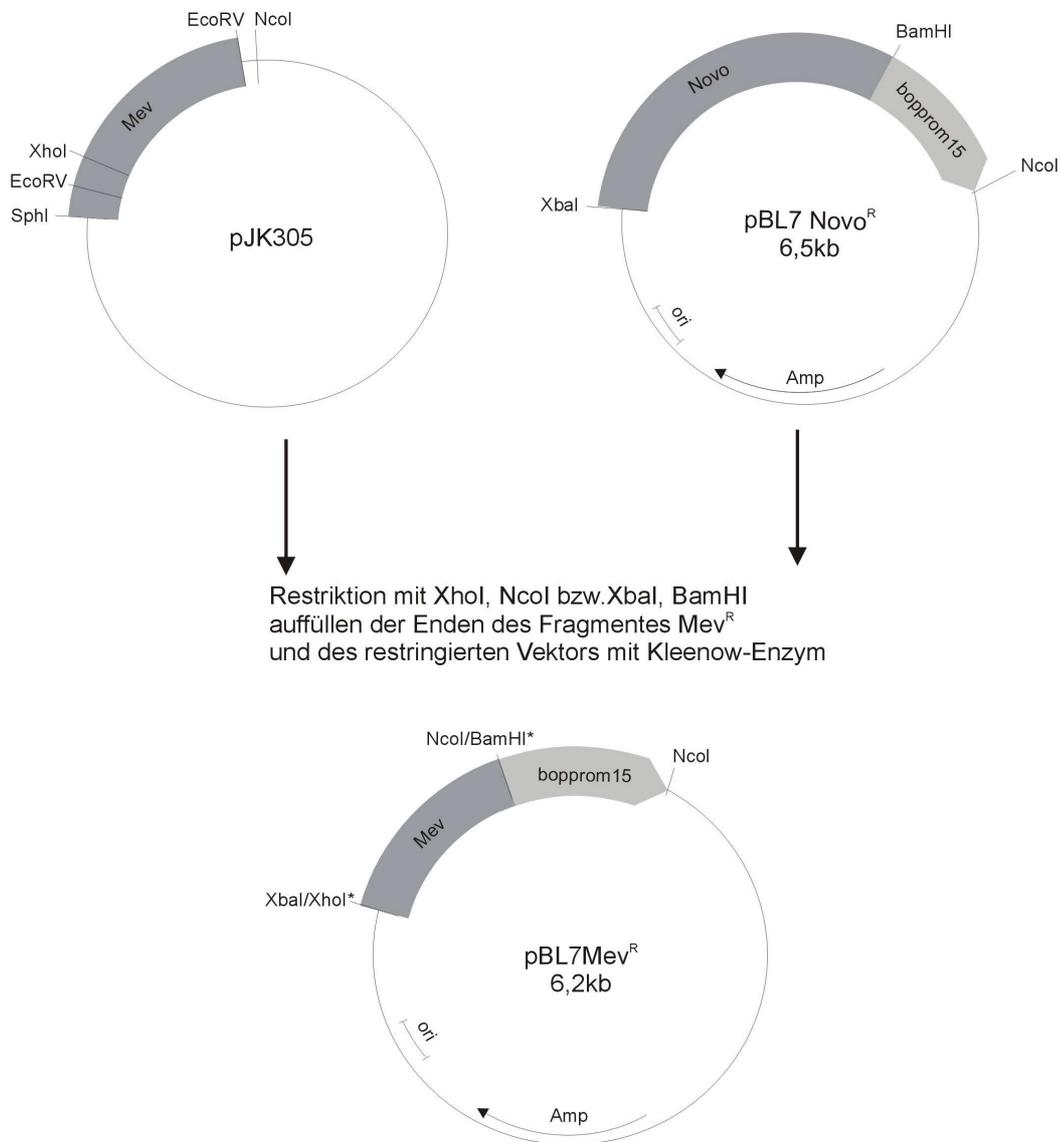


**Klonierungsschema für den Gesamtkomplex des Cytochrom  $ba_3$  bestehend aus vier Untereinheiten optional mit C-terminalem Histidin-Tag.**



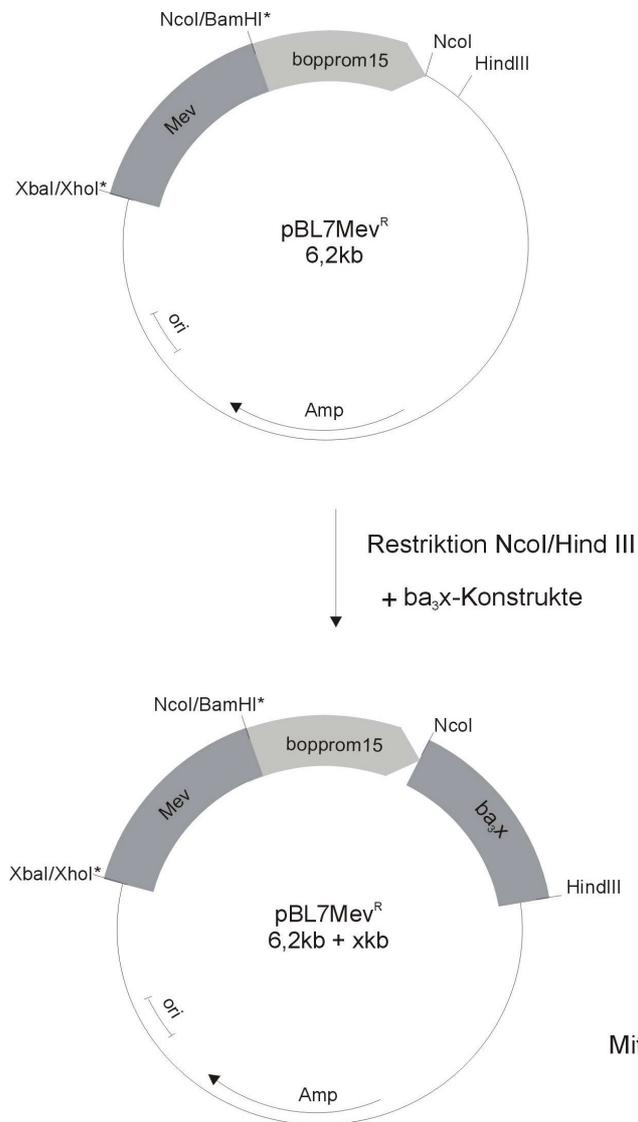


### Klonierungsschema für den Austausch der Mevinolin- gegen die Novobiocin-Resistenz im Expressionsvektor pBL7<sup>Novo</sup>



*ori*: Replikationsursprung, Amp<sup>R</sup>: Ampicillin-Resistenzgen, *bopprom15*: *bop*-Promotor-Bereich incl. Vorläufersequenz (15 Basentriplets des *bop*-kodierenden Bereichs), *Novo*: Novobiocin-Resistenzgen aus *H. volcanii*, *Mev*: Mevinolin-Resistenzgen aus *H. volcanii*.

### Klonierungsschema der Expressionsvektoren des Cytochrom $ba_3$ in unterschiedlicher Zusammensetzung der Untereinheiten



**Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenz des SRI-link-tHtrl-His***NcoI*

<sup>1</sup> ATGGACGCCGTCGCAACCCGCCTACCTCGGCGGGCGGTCGCGCTCATCGTCCGGTGTGGCG <sup>60</sup>  
 M D A V A T A Y L G G A V A L I V G V A

→ SRI

<sup>61</sup> TTCGTCTGGTTGCTGTACCGGTCGTTGGATGGCTCCCCGCATCAGTCGGCGCTCGCGCCG <sup>120</sup>  
 F V W L L Y R S L D G S P H Q S A L A P

<sup>121</sup> CTGGCCATCATTCCCCTGTTTCGCGGGCCTGTCCTACGTGGGGATGGCGTACGACATCGGA <sup>180</sup>  
 L A I I P V F A G L S Y V G M A Y D I G

<sup>181</sup> ACGGTGATCGTAAACGGGAACCAGATCGTCGGGCTGCGGTACATCGACTGGCTCGTGACC <sup>240</sup>  
 T V I V N G N Q I V G L R Y I D W L V T

<sup>241</sup> ACGCCGATCCTCGTGGGGTACGTCCGGCTACGCCGCGGGGGCGTCCCCTCGCAGCATCATC <sup>300</sup>  
 T P I L V G Y V G Y A A G A S R R S I I

<sup>301</sup> GGTGTGATGGTGGCGGACGCGCTCATGATCGCGGTGGGCGGGGGCGGTGGTGACTION <sup>360</sup>  
 G V M V A D A L M I A V G A G A V V T D

<sup>361</sup> GGCACGCTCAAGTGGGCGCTGTTTCGGCGTGTCTCGATCTTCCACCTGTCGCTGTTCCGG <sup>420</sup>  
 G T L K W A L F G V S S I F H L S L F A

<sup>421</sup> TACCTGTACGTGATCTTTCCGCGGGTCTGTGCCGACGTGCCCGAGCAGATCGGGCTGTTCC <sup>480</sup>  
 Y L Y V I F P R V V P D V P E Q I G L F

<sup>481</sup> AACCTGCTGAAAAACCACATCGGGCTGCTGTGGTTGGCGTACCCGCTGGTGTGGCTGTTC <sup>540</sup>  
 N L L K N H I G L L W L A Y P L V W L F

<sup>541</sup> GGCCCGCCGGCATCGGGGAGGCAACGGCTGCCGGCGTCGCGCTCACGTACGTGTTCTTG <sup>600</sup>  
 G P A G I G E A T A A G V A L T Y V F L

<sup>601</sup> GACGTGCTCGCGAAGGTGCCGTACGTGTATTTCTTCTACGCGCGGCGTCGCGTGTTCATG <sup>660</sup>  
 D V L A K V P Y V Y F F Y A R R R V F M

<sup>661</sup> CACTCGGAGTCGCCCGGGCTCCCAGCAGGCGACCGTCGAGGCGACGGCGGGAC**GCG** <sup>720</sup>  
 H S E S P P A P E Q A T V E A T A A D A  
 [.....

<sup>721</sup> **AGCGCGAGCAACGGCGGAGCGCG**ATGACAATCGCATGGGCGCGCCGTCGATACGGCGTT <sup>780</sup>  
 S A S N G A S A M T I A W A R R R Y G V  
 .....Peptid-Linker..... ]→ tHtrl-His

<sup>781</sup> AAACCTCGGGCTGGGGTATATCGCCACCGCCGGCCTCCTGGTCCGGGTCGGCGTCACCACA <sup>840</sup>  
 K L G L G Y I A T A G L L V G V G V T T

<sup>841</sup> AACGACGTCCCCTCGACCATTGTCCCGGAATCGCCGGGTTACTCACGCTCGGATCGATC <sup>900</sup>  
 N D V P S T I V A G I A G L L T L G S I -

<sup>901</sup> AACGCCCGGAGACCGTCGCCAGCATCAAGGAGATCGCCGCACAGACCGAGCGGTCGCC <sup>960</sup>  
 N A A E T V A S I K E I A A Q T E R V A

<sup>961</sup> AACGGGAACCTCGAACAGGAGGTGACCTCCACCCGAACGGACGAGTTCGGATCGCTTGCC <sup>1020</sup>  
 N G N L E Q E V T S T R T D E F G S L A

<sup>1021</sup> GACTCCATCGAACAGATGCGCCAGTCGCTTCGTGGCCGACTGAACGAGATGGAGCGCACC <sup>1080</sup>  
 D S I E Q M R Q S L R G R L N E M E R T

1081 CGCGCCGACCTCGAAGAGACGCAGGCCGAGGCCGAGACGGCCCGCGAGGAGGCCGAGCAA 1140  
 R A D L E E T Q A E A E T A R E E A E Q

*EcoRI*

1141 GCCAAGCAGGAAGCCAGGCCGCGGAGCGCGAGGCCCGCGAGCTGAATTTCGCACCACCAC 1200  
 A K Q E A Q A A E R E A R E L N S H H H

*HindIII*

1201 CACCACCACCACTAATAAGCTT 1222  
 H H H H *Stopp*

Eingezeichnet sind die durch PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen, fett hervorgehoben sind der insertierte Peptid-Linker und der angefügte Histidin-Tag.

### Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenz des tHtrl-His

*NdeI*

<sup>1</sup> ATGACAATCGCATGGGCGCGCCGTCGATACGGCGTTAAACTCGGGCTGGGGTATATCGCC 60  
 M T I A W A R R R Y G V K L G L G Y I A  
 → tHtrl-His

<sup>61</sup> ACCGCCGGCCTCCTGGTCGGGGTCGGCGTCACCACAAACGACGTCCCCTCGACCATTGTC 120  
 T A G L L V G V G V T T N D V P S T I V

<sup>121</sup> GCCGGAATCGCCGGGTTACTCACGCTCGGATCGATCAACGCCCGGAGACCGTCCGCCAGC 180  
 A G I A G L L T L G S I N A A E T V A S

<sup>181</sup> ATCAAGGAGATCGCCGCACAGACCGAGCGCGTCGCCAACGGGAACCTCGAACAGGAGGTG 240  
 I K E I A A Q T E R V A N G N L E Q E V

<sup>241</sup> ACCTCCACCCGAACGGACGAGTTCGGATCGCTTGCCGACTCCATCGAACAGATGCGCCAG 300  
 T S T R T D E F G S L A D S I E Q M R Q

<sup>301</sup> TCGCTTCGTGGCCGACTGAACGAGATGGAGCGCACCCGCGCCGACCTCGAAGAGACGCAG 360  
 S L R G R L N E M E R T R A D L E E T Q

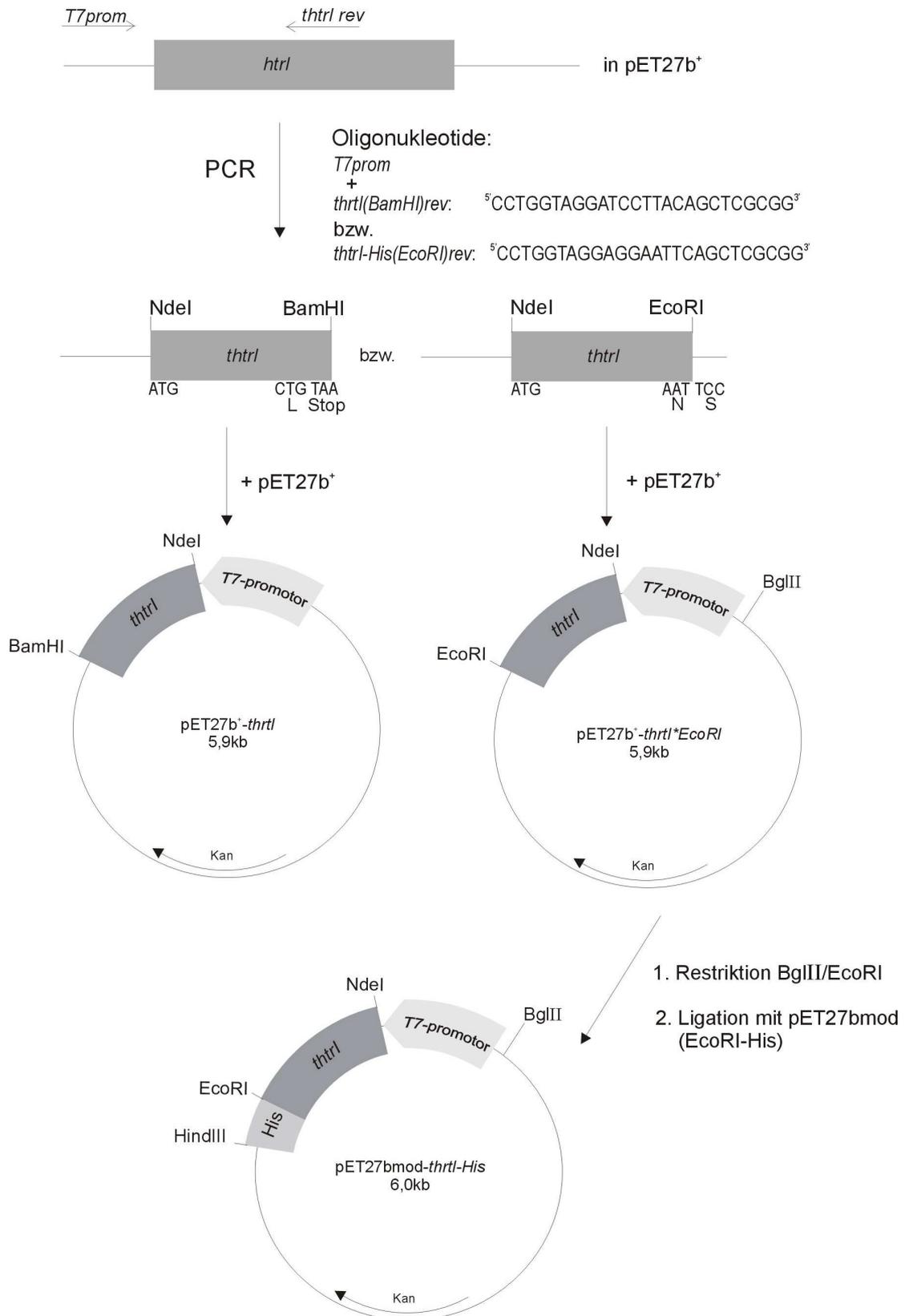
<sup>361</sup> GCCGAGGCCGAGACGGCCCGCGAGGAGGCCGAGCAAGCCAAGCAGGAAGCCCAGGCCGCG 420  
 A E A E T A R E E A E Q A K Q E A Q A A

*EcoRI* *HindIII*

<sup>421</sup> GAGCGCGAGGCCCGCGAGCTGAATTTCGCACCACCACCACCACCACCACTAATAAGCTT 478  
 E R E A R E L N S H H H H H H H *Stopp*

Die durch PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen, das Startcodon und die beiden Stoppcodons sind eingezeichnet. Der angefügte Histidin-Tag ist fett hervorgehoben.

### Klonierungsschema des thrl-His in den Vektor pET27bmod.



## Ein herzliches Dankeschön....

....an Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Engelhard für die interessante Themenstellung und seine Unterstützung während der gesamten Zeit.

....an Herrn Prof. Dr. R. S. Goody für die Aufnahme in seine Abteilung am MPI-Dortmund.

....an Herrn Prof. Dr. W. Kreiser für die freundliche Übernahme des Korreferates.

....an Herrn Priv.-Doz. Dr. H.-J. Steinhoff für die Einführung in die ESR-Spektroskopie und seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei der Interpretation der Daten. Seiner Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrer Mitte. Mein spezieller Dank gilt hierbei Nicoll Radzwill, die mir bei meinen ersten Schritten im unbekanntem Terrain der ESR-Spektroskopie tatkräftig zur Seite stand und stets für Diskussionen offen war.

....an Herrn Dr. I. Chizov für die intensive Unterstützung bei den kinetischen Messungen. Seine Begeisterungsfähigkeit bei der Interpretation der Daten haben mich in langen Diskussionen mit dem „Photozyklus-Virus“ infiziert. Herrn Dipl.-Chem. Björn Klink, dem zweiten Bewohner der „MIR“, danke ich für die rechenintensive Auswertung der pH-Titrationsdaten.

....an Herrn Dr. R. P. Seidel für die Einführung in die Geheimnisse der Molekularbiologie. Marion Hülseweh gilt hierbei mein Dank für die kleinen praktischen Tricks und ihre geduldige Organisation des Laboralltags.

....an Frau Schlieker und Frau Wehmeier für die Durchführung der Fermenterläufe.

....an Frau Claudia Pieczka, die mich tatkräftig bei der Erstellung der zahlreichen Abbildungen in dieser Arbeit unterstützt hat.

....an Matthias Kolleck, der die arbeitsintensive Präparation des nativen Cytochrom  $ba_3$  durchgeführt hat. Frau Anke Reulen danke ich in dem Zusammenhang für die Isolierung der Lipide und die intensive Suche nach Tipp-Fehlern in dieser Arbeit.

....an Miria Schumacher für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor in der Endphase dieser Arbeit.

....an Georg Schmies und Ansgar A. Wegener, die mir den Einstieg in das Themengebiet der sensorischen Rhodopsine erleichtert haben und mich stets unterstützt und aufgebaut haben.

Für kurzweilige Stunden im Büro danke ich dem Engelborg-Kollektiv, Ansgar, Anke, Christian, Georg, Johann und der assimilierten Susanne, sowie dem Nachwuchs Silke, Britta und Rolf.

Meinem Freund Jörg danke ich für seine Geduld und mentale Unterstützung besonders in der heißen Phase des Zusammenschreibens.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die stets an mich geglaubt und mir mein Studium ermöglicht haben.

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name: Astrid Martina Dörner  
geboren: 18.04.1972 in Köln

### **Ausbildung:**

08.1982-05.1991 Besuch des Freiherr-vom-Stein Gymnasiums in Rösrath  
05.1991 Abschluß: Abitur, Note: 2.1

10.1991-11.1996 Studium der Chemie an der Universität Dortmund  
Abschluß: Diplom-Chemikerin, Note: Sehr gut

10.1993 Ablegung der mündlichen Diplomvorprüfungen  
02.1996 Ablegung der mündlichen Diplomprüfungen

03.-11.1996 Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von  
PD Dr. M. Engelhard am Max-Planck-Institut für molekulare  
Physiologie in Dortmund, Abt. Physikalische Biochemie  
„Synthese und Reinigung von synthetischer Suppressor tRNA<sub>UCA</sub>“  
Note: 1.0

01.1997 Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare  
Physiologie in Dortmund, Abt. Physikalische Biochemie,  
Betreuer: Priv.-Doz. Dr. M. Engelhard,  
Prof. Dr. W. Kreiser (Universität Dortmund)