In vivo und *in vitro* Expression von Membranproteinen am Beispiel archae- und eubakterieller Rhodopsine

Dissertation

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

vorgelegt von Dipl.-Biochem. Rolf Kalmbach
aus Bochum

Dortmund, im März 2005

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Engelhard und am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt/Main in der Abteilung biophysikalische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. Ernst Bamberg angefertigt.

1. Berichterstatter : Prof. Dr. M. Engelhard
2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Winter

Tag der Prüfung: 14.06.2005

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

Dortmund, 14.06.2005

Rolf Kalmbach

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Friedrich T., Geibel S., Kalmbach R., Chizhov I., Ataka K., Heberle J., Engelhard M.& Bamberg E. (2002)

Proteorhodopsin is a Light-driven Proton Pump with Variable Vectoriality.

J. Mol. Biol., **321**, 821-838

Huber R., Köhler T., Lenz M. O., Bamberg E., Kalmbach R., Engelhard M. & Wachtveitl J. (2005)

pH-Dependent Photoisomerization of Retinal in Proteorhodopsin.

Biochemistry, **44** (6), 1800-1806

1 Einleitung 1

2 Material und Methoden 14

2.1 Chemikalien 14

2.2 Instrumentation 14

2.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide 16

2.4 Molekularbiologische Methoden 18

2.4.1 Zellanzucht 18

2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA 18

2.4.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten 19

2.4.4 Analyse und Extraktion von DNA aus Agarosegelen 19

2.4.5 Restriktion von DNA 20

2.4.6 Phosphorylierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden 20

2.4.7 Ligation von DNA 20

2.4.8 Transformation von *E. coli* Zellen 20

2.4.9 DNA-Sequenzierung 21

2.5 Proteinchemische Methoden 22

2.5.1 Proteinexpression in *E.coli* Zellen und Proteinreinigung 22

2.5.2 Rekonstitution von Proteinen in Lipide 23

2.5.3 Immobilisierung von rekonstituiertem Protein in Polyacrylamid 23

2.5.4 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Retinalproteinen 23

2.5.5 Bestimmung des Retinal-Isomerenverhältnisses 24

2.5.6 Präparation von *E.coli* S30 Extrakten 24

2.5.7 Zellfreie Proteinexpression 25

2.5.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 28

2.5.9 Western-Transfer und Immunnachweis 29

2.5.10 Massenspektrometrische Analytik 29

2.6 Biophysikalische Methoden 30

2.6.1 Statische Absorptionsspektroskopie 30

2.6.2 Zeitaufgelöste Laserblitz-Absorptionsspektroskopie 31

2.6.3 Ladungstransportmessungen mit pH-sensitivem Farbstoff 36

2.6.4 Ladungstransportemssungen an planaren Lipid Doppelschichten 37

3 Ergebnisse 39

3.1 *In vitro* Expression von Membranproteinen in *E.coli* Extrakten 39

3.1.1 Proteolytischer Abbau zur Detektion von Membraninsertion 40

3.1.2 Optimierung des zellfreien Expressionssystems 42

3.1.3 Einfluß von Amphililen 46

3.1.4 Einfluss von Lipiden und Faltungshilfsproteinen 50

3.1.5 Einfluss von Carrierpeptiden 58

3.1.6 Zellfreie Expression von hGlyRαI^{cf}, *Np*hR^{cf}, *Np*sRII^{cf} und PR^{cf} 60

3.1.7 Funktionelle zellfreie Expression von bR^{cf} 61

3.2 *In vivo* Expression von Membranproteinen in *E. coli* Zellen 66

3.2.1 Funktionelle Expression und Reinigung von PR und Mutanten 66

3.2.2 Expression und Reinigung von hGlyRαI, ChopI und NopI 72

3.3 Untersuchung der spektoskopischen Eigenschaften von PR 76

3.3.1 Spektroskopische und chemische Eigenschaften des Chromophors 76

3.3.2 Charakterisierung des spektroskopischen Grundzustands 79

3.3.3 Kinetische Untersuchung des Photozyklus 85

3.3.4 Temperatur- und pH-Abhängigkeit des Photozyklus 91

3.4 Untersuchung der elektrogenen Eigenschaften von PR 102

3.4.1 Lichtinduzierte pH-Änderungen von PR-exprimierenden *E.coli* Zellen 102

3.4.2 Kinetik der Ladungstranslokation mit pH-sensitivem Farbstoff 102

3.4.3 Lichtinduzierte Ladungstransportmessungen an der BLM 104

4 Diskussion 113

4.1 Funktionelle *in vitro* Expression von Membranproteinen 113

4.2 *In vitro* versus *in vivo* Expression von Membranproteinen 121

4.3 Der Photozyklus von PR 126

5 Zusammenfassung 144

6 Literaturverzeichnis 146

7 Anhang 156

Abkürzungen und Symbole

$\Delta G^{\#}$	freie Energie
$\Delta H^{\#}$	Aktivierungsenthaplie
$\Delta S^{\#}$	Aktivierungsentropie
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bOm	matures Bakterioopsin
bOp	*Halobacterium salinarum* Bakterioopsin
bOp^{cf}	zellfrei dargestelltes Bakterioopsin
bp	Basenpaar
bR	*Halobacterium salinarum* Bakteriorhodopsin
bR^{cf}	zellfrei dargestelltes Bakteriorhodopsin
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propan-sulfonat
ChopI	*Chlamydomonas Rheinhardii* Kanalrhodopsin I
CMC	Kritische Mizellenkonzentration
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DCC	1,3-Dicyclohexylcarbodiimide
DDM	N-Dodecyl-β-D-maltosid
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMPC	C14:0-Dimyristoylphosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOPC	C18:1-Dioleoylphosphatidylcholin
DOPE	C18:1-Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOPS	C18:1-Dioleoylphosphatidylserin
DPPC	C16:0-Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSPC	C18:0-Distearoylphosphatidylcholin
DTT	Dithiothreitol
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
hGlyRα1	α1 Untereinheit des *humaner* Glycin Rezeptor
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
hR	*Halobacterium salinarum* Halorhodopsin
IST-Model	*Isomerisation/Switch/Translocation*-Model
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2ethansulfonsäure
HTS	Hochdurchsatzmethoden

IPTG	Isopropylthiogalactosid
kD	Kilodalton
LPC	Lysophosphatidylcholin
M_r	relative Molekülmasse
mRNA	*Messenger-RNA*
MALDI-Tof	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation detection by Time-of-Flight
Na-DOC	Natriumdesoxycholat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NopI	*Neurospora crassa* Rhodopsin I
*Np*hR	*Natronobacterium pharaonis* Halorhodopsin
*Np*sRII	*Natronobacterium pharaonis* Sensorisches Rhodopsin II
OD_x	Optische Dichte bei Wellenlänge x nm
OG	n-Octyl-β-D-glucopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PM	Purpurmembran aus *Halobacterium salinarum*
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Proteorhodopsin
ProtK	Proteinase K
Rho	visuelles Rhodopsin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SB	Schiff'sche Base
SDS	Natriumdodecylsulfat
sRI	*Halobacterium salinarum* Sensorisches Rhodopsin I
sRII	*Halobacterium salinarum* Sensorisches Rhodopsin II
SUVs	*Small Unilamellar Vesicles*
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Th.aq.	*Thermophilus Aquaticus*
T_p	Phasenübergangstemperatur
Tris	Trimethoxyaminomethan
tRNA	*Transfer-RNA*
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
VÄ	Volumenäquivalent
wt	Wildtyp
ε_x	Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge x nm
λ_x	Wellenlänge des Lichts bei Wellenlänge x nm

Für die vier Nukleotide wurde der Einbuchstabencode für die 20 natürlichen Aminosäuren der Dreibuchstaben- oder Einbuchstabencode verwendet.

1 Einleitung

Für alle Lebewesen ist der Austausch von Informationen mit der äusseren Umgebung für das Überleben und die evolutionäre Entwicklung von essentieller Bedeutung. Auf der zellulären Kommunikationsebene ist der erste Schritt der Übertragung von Signalen stets der Empfang eines Reizes durch die Zielzelle. Das Resultat ist eine hochspezifische biochemische Antwort, die den Organismus befähigt auf unterschiedliche Lebens- und Umweltbedingungen zu reagieren. Im Laufe der Evolution entwickelten Organismen hierzu komplexe Netzwerke von intrazellulären Signaltransduktionswegen an denen eine Vielzahl von Eiweismolekülen beteiligt sind. Eiweismoleküle, welche äussere Reize empfangen, werden im Allgemeinen unter dem Begriff Rezeptorproteine zusammengefasst, die das Signal an sogenannte Effektorproteine weitervermitteln. Die Reaktion der Zelle nach Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade ist vielseitig und reicht von der Steuerung von Protein- und Enzymaktivitäten bis hin zur Regulation des Zellzyklus und der Genexpression im Zellkern.
Rezeptorproteine sind in der Zelle intrazellulär und membranständig lokalisiert. Wohingegen intrazelluläre Rezeptoren von lipophilen Signalstoffen aktiviert werden, sind membranständige Rezeptoren vorwiegend für die Signalübertragung von hydrophilen Liganden über die Zellmembran zuständig.
Eine grosse Klasse von membranständigen Rezeptoren sind die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), welchen eine wichtige pharmakologische Bedeutung zukommt, da viele Krankheiten auf eine Fehlfunktion dieser Proteine zurückzuführen sind [1]. Dies kommt in der Tatsache zum Ausdruck, dass heutzutage mehr als 40 % aller klinisch eingesetzten Pharmazeutika gegen diese Proteinfamilie gerichtet sind [2] [3]. Zu den GPCRs zählen unter anderem die metabotropen Rezeptoren für Hormone und Neurotransmitter, Geschmacks- und Geruchssensoren sowie Lichtrezeptoren [4].
GPCRs besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal sieben Membran-durchspannende α-Helices und werden aus diesem Grund auch als 7-Transmembran Helix-Rezeptoren bezeichnet. Aufgrund der bislang einzigen Kristallstruktur eines GPCRs, des Lichtrezeptors Rhodopsin (Rho) [5] dient Rho als Modellsystem für die gesamte Familie der 7-Transmembran Helix Rezeptoren.
Rho ist ein Photorezeptor, welcher den komplexen Sehprozess in der Retina des Auges höherer Organismen über das G-Protein Transduzin initiiert [6]. Strukturell eng verwandte Lichtrezeptoren zum Rho, sind in allen Domänen des Lebens (Eukaria, Eubakteria und

Archaea) zu finden und können funktionell in Sensoren, Ionenpumpen und Ionenkanäle aufgeteilt werden.
Ein Beispiel für Sensoren sind in Archaebakterien (*Halobacterium salinarum*) beschrieben, die Sensorischen Rhodopsine I und II (sRI und II) vermitteln die Phototaxis der Zelle, indem sie das Lichtsignal auf ihre Effektorproteine (Htrs) übertragen und intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden iniziieren, die den Organismus befähigen auf veränderte Spektraleigenschaften der Umwelt zu reagieren [7] [8]. Daneben sind die archaebakteriellen, lichtgetriebenen Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (bR) [9] und Halorhodopsin (hR) [10] an der zellulären Energiekonversion beteiligt, indem sie Protonen oder Chloridionen entgegen den elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran pumpen (zusammengefasst in [11]). Der resultierende Protonengradient wird von der Zelle zur Darstellung von Energie in Form von ATP durch das Enzym ATP-Synthase verwendet.

In den letzten Jahren wurden weitere Rhodopsine in vielen Organismen entdeckt. So wurden z.B. in Protozoa *Chlamydomonas rheinhardii* lichtaktivierbare Ionenkanäle (Chops) beschrieben [12] [13]. Die Funktion des aus dem Schimmelpilz *Neurospora crassa* isolierten Rhodopsins NopI [14] ist weiterhin unklar. Die Entdeckung von Proteorhodopsin (PR) in unkultivierten γ-Proteobakterien in der Montery Bucht, USA eröffnete eine neue Sichtweise über die phototrophe Energiekonversion dieser Purpurbakterien neben der Photosynthesereaktion [15] [16]. Die Verbreitung des PR-Gens ist jedoch nicht auf eine einzige ozeanographische Lage limitiert. Z.B. konnten mittels Genom-weiter „Shotgun"-Sequenzierung von DNA isoliert aus nur 200 Liter Meerwasser eine ungewöhnlich hohe Vielfalt von über 782 PR-homologen Genen beschrieben werden [17] [18].
Im Vergleich dazu ist die Anzahl an putativen Genen für GPCRs in einzelnen höheren Organismen, deren Genomsequenz bekannt ist, in einer vergleichbaren Grössenordnung; z.B. der Invertebraten *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) mit bereits 211 Transkripten (1.5°% der Gesamtzahl aller Gene) [19] und *Caenorhabditis elegans* mit 284 Transkripten (1.5°%) [20] oder im humanen Genom mit 616 Transkripten (2.3°%) [21].
Die Vielzahl an putativen Genen, ausschliesslich aus der Proteinfamilie der GPCRs, zeigt deutlich die Grenzen einer auf konventionellen, proteinchemischen Techniken basierenden Expressions- und Funktionsanalyse auf, bei welcher die Darstellung und Reinigung von einzelnen Genprodukten im Vordergrund steht. Die funktionelle Charakterisierung der Genprodukte für die Entwicklung von neuen Medikamenten erfordert jedoch schnelle Expressions- und Analysemethoden.

Für die Expression von grossen Genbibliotheken sind heutzutage automatisierbare Hochdurchsatzscreening-Anlagen (HTS) kommerziell erhältlich, welche es ermöglichen eine grosse Anzahl von Genprodukte in einem miniaturisierten Format schnell darzustellen. Diese Anwendung von HTS-Methoden beschränkt sich aber insbesondere auf die Expression von löslichen Proteinen. Für assoziierte oder integrale Membranproteinen, wie im Falle der GPCRs, sind derartige Verfahren bislang nur wenig beschrieben.
Grundsätzlich können zwei Ansätze für die Expression von Proteinen unterschieden werden: die *in vivo* und die *in vitro* Proteinsynthese, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

In vivo Proteinsynthese

Die *in vivo* (zellbasierte) Expression kann homolog (Expression in gleichem Organismus) sowie heterolog (Expression in fremdem Organismus) durchgeführt werden. Da die homologe Expression zum Teil mit hohen Kultivierungsaufwendungen verbunden ist, haben sich in den letzten Jahrzehnten leichter handhabbare prokaryotische Organismen (wie *Escherichia coli*) oder eukaryotische Organismen (vorwiegend Hefen wie *Saccaromyces cerevisiae* oder *Pichia Pastoris*) für die mengenmäßige Synthese von Proteinen etabliert.
Die Formulierung von allgemeinen Expressionsparametern von Proteinen ist jedoch nur sehr eingeschränkt möglich, da sich Proteine gewöhnlich signifikant in deren physikalischen und biochemischen Eigenschaften unterscheiden [22]. Schwierigkeiten bei der funktionellen Expression ergeben sich insbesondere dann, wenn die Genprodukte in der Zelle instabil sind und entweder als unlösliche Aggregate präzipitieren oder von endogenen Proteasen abgebaut werden. Die Synthese von zytotoxischen Proteinen, zu denen auch viele integrale Membranproteine, gehören, stellt eine Limitierung der zellbasierten Expression dar [23].
Für die funktionelle Charakterisierung der Genprodukte ist es häufig notwendig diese aus Zell-Lysaten zu reinigen. Die bestehenden Methoden bezüglich der Reinigung konzentrieren sich jedoch insbesondere auf der Optimierung von Konditionen für individuelle Proteine. Obwohl allgemein anwendbare affinitätschromatographische Methoden durch die Verwendung von Reinigungs-Tags verfügbar sind, bleibt die Reinigung der Genprodukte ein limitierender Faktor bei der Funktionsanalyse.
Die Herstellung von gereinigten Proteinen ist jedoch nicht die direkte Voraussetzung für eine detaillierte biophysikalische Charakterisierung, falls eine spezifische Proteinaktivität bestimmt werden kann wie z.B. Enzymaktivität, intrinsische Absorption/ Fluoreszenz oder Ladungstransport. Eine attraktive Möglichkeit, bei der die Genprodukte nicht gereinigt

werden müssen, ist die heterologe Expression von membranständigen Proteinen in Zellkulturen (z. B. *Xenopus laevis* Oozyten) in Kombination sensitiven elektrophysiologischen „Voltage-“ oder „Patch-Clamp“-Techniken [24]. Der universelle Charakter dieser Methode wird dadurch unterstrichen, dass bereits eine Vielzahl von Ionenkanälen und -pumpen derart untersucht werden konnten, unter anderem auch viele Lichtrezeptoren [25] [13]. Mit Hilfe der *in vivo* Fluoreszenzmarkierung mittels Stopp-Kodon Suppression von artifiziell modifizierten Suppressor-tRNAs wird diese Methode auch für Proteine die nicht zu der Familie der Ionenkanäle oder –pumpen gehören anwendbar, wie am Beispiel des Neurokinin-2 GPCRs gezeigt werden konnte [26].

In vitro Proteinsynthese

Die zellfreie Proteinsynthese wurde 1964 von Holland J.J. & McCarthy B.J. [27] beschrieben und von Zubay G. [28] weiterentwickelt. Ausgehend von prokaryotischen oder eukaryotischen Zell-Lysaten, welche alle Komponenten des ribosomalen Translationsapparats besitzen, können Proteine mit einer RNA-Matrize oder im gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem mit DNA hergestellt werden. Grundsätzlich können aus jedem Organismus Extrakte für die zellfreie Synthese gewonnen werden. Kommerziell sind zellfreie Syntheseextrakte aus *E.coli*, Weizenkeimen oder Reticolozyten erhältlich.
Die Palette von Proteinen, die bereits in zellfreien Synthesesystemen erfolgreich hergestellt werden konnten ist breit und reicht durch alle Proteinklassen [29], wobei die dargestellten Mengen stark vom zu exprimierenden Protein und verwendeten Zellextrakt abhängig sind. Obwohl die Ausbeuten an exprimiertem Protein in einem zellfreien System vergleichbar sind mit der *in vivo* Expression (mg/l Kulturvolumen) führt die Limitierung in der Ansatzgrösse (ml-Volumen) zu geringen Proteinmengen. Um die Proteinausbeuten zu erhöhen wurden in den letzten Jahren spezielle Durchflussreaktoren entwickelt, in denen höhere Syntheseausbeuten erzielt werden konnten. Heutzutage findet die zellfreie Proteinsynthese insbesondere in der kostengünstigen $^{15}N/^{13}C$-Isotopenmarkierung von Proteinen für die NMR-Strukturanalyse Anwendung [30] aber auch der effizienten Inkorporation von unnatürlichen Aminosäuren mittels Suppression von Stopp-Kodons um Proteine ortspezifisch z.B. für die Funktionsanalyse zu modifizieren [31]. Die *in vitro* Expression bietet im Vergleich zur *in vivo* Expression den Vorteil, dass die chemische Umgebung der Reaktion fast beliebig modifiziert werden kann. Der Zusatz von Protein-stabilisierenden Komponenten wie Detergenzien, Lipide, Faltungshilfsproteine [32] oder Proteinaseinhibitoren, aber auch ubiquitäre Cofaktoren

kann unter kontrollierten Bedingungen und in definierten Konzentrationen erfolgen. Aus diesem Grund eröffnet sich für die Expression von Proteinen, die *in vivo* aggregieren und nicht funktionell hergestellt werden können oder zytotoxisch sind neue Alternativen. Die *in vitro* Proteinexpression ist nicht auf die Synthese einzelner Proteine beschränkt, sondern auch im Bereich der HTS-Methoden, insbesondere für lösliche Proteine, beschrieben [33] [34]. Die Verwendung von Öl/Wasser-Emulsionen [35] oder Liposomensuspensionen [36] [37] in Kombination mit der zellfreien Synthese ermöglicht eine Art zelluläre Kompartmentierung der Proteinexpression im Nanoliter-Maßstab für die Anwendung von modernen Sortierverfahren wie z.b. Fluoreszenz-aktivierter zytometrischer Sortierung (FACS). Eine besondere Herausforderung stellt die funktionelle zellfreie Synthese von Membranproteinen dar, deren komplexer Faltungsprozess neben den proteinogenen Eigenschaften zusätzlich von den Charakteristika der hydrophoben Umgebung abhängt. Die Membraninsertion von vielen integralen Membranproteinen ist zwar ein enzymatisch gesteuerter komplexer Prozess, welcher aber auch spontan verlaufen kann. Zur Untersuchung derartiger Faltungsprozesse in einem *in vitro* System eignet sich die Methode der zellfreien Expression, die im Folgenden erörtert werden sollen.

Enzymatisch katalysierte Membranproteinfaltung

Die enzymatisch katalysierte Membranproteinfaltung, als auch der Export von zytoplasmatischen Proteinen über die Membran hinweg in das Periplasma oder den Extrazellulärraum verläuft über komplexe Faltungswege (sogenannte Translokons) an denen verschiedene membranständige und –assoziierte Proteine beteiligt sind. Welchen Translokationsweg ein Protein in der Zelle erfährt wird durch spezifische N-terminale Signalsequenzen festgelegt.

Für zytoplasmatische Proteine können der SecA/B-Faltungsweg, welcher mit der Proteintranslation gekoppelt ist (cotranslational), und das Tat-Translokon „*Twin Arginine Translocon*“ (posttranslational) unterschieden werden. Ein weiterer cotranslationaler Faltungsweg ist das SRP-Translokon „*Signal Recognition Particle*“, welchem eine bedeutende Rolle bei der enzymatisch katalysierten Membranproteinfaltung zukommt (Funktion zusammengefasst in [38]).

Eine hohe Dichte von Translokons, als auch Proteine, welche die Glykosilierung und Oligomerisierung von Membranproteinen katalysieren, sind im endoplasmatischen Retikulum von eukariotischen Zellen oder zellulären Lipid-Vesikeln (Mikrosomen) enthalten. Diese aus

Pankreas oder Eileiter isolierten Mikrosomen sind erfolgreich bei der funktionellen zellfreien Synthese von Membranproteinen eingesetzt worden, wie am Beispiel des β2 adrenergen GPCR [39], des homooligomeren α7 nikotinische Acetylcholin GPCR [40], des humanen „*Shaker*"-Kalium-Kanals [41], „*Gap Junction*" Connexine [42] oder des Coronavirus M-Protein [43] gezeigt werden konnte.
Aufgrund der Vielzahl an Proteinen in der mikrosomalen Membran ist eine direkte funktionelle Analyse der Genprodukte mittels sensitiven elektrophysiologischen Detektionsmethoden, wie planaren Lipiddoppelschichten, jedoch erschwert. In diesem Fall müssen die *in vitro* synthetisierten Membranproteine, wie bei der zellbasierten Expression, zeitaufwendig solubilisiert, gereinigt und rekonstituiert werden um Funktionsanalysen durchführen zu können.

Spontane Membranproteinfaltung

Neben dem enzymkatalysierten Insertionsmechanismus über Translokons ist die spontane Faltung von integralen Membranproteinen in eine hydrophobe Umgebung bestehend aus Lipiden oder Detergenzien ein noch wenig verstandener Prozess [44] [45]. Bei dem offensichtlich die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften der hydrophoben Umgebung im Hinblick auf den Insertionsmechanismus des untersuchten Proteins optimiert sein müssen. Die zellfreie Expression von Membranproteinen in einem System mit artifiziellen Stabilisatoren und eine systematische Untersuchung der hydrophoben Umgebung auf die Membraninsertion des Proteins ist bislang jedoch nur vereinzelt beschrieben.
Vor Kurzem konnten die *E.coli* endogenen integralen Membranproteine EmrE [46] und der mechanosensitive MscL-Kanal [47] in Detergenzumgebung in einer solubilisierten Form hergestellt werden. Die Verwendung von doppelschichtenausbildenden Lipiden in der zellfreien Synthese von Membranproteinen ist vereinzelt beschrieben, wie im Falle der *E.coli* endogenen Proteine Lactose-Permease LacY [48], KcsA Kalium-Kanal [49] oder kleiner Multidrug-Transportproteine [50]. Jedoch ist ein überzeugender Funktionalitätsnachweis der zellfrei dargestellten Proteine aufgrund fehlender sensitiver Assaysysteme noch nicht erbracht.
Die heterologe zellfreie Proteinsynthese von integralen Membranproteinen in eine artifizielle Lipidumgebung ist, bis auf das 53 Aminosäure bestehende Pf3-Protein [51], noch nicht beschrieben. In diesem Zusammenhang stellt insbesondere die heterologe zellfreie Synthese

von politopen Membranproteinen, wie z.B. 7-Transmembran Helix Rezeptoren, in *E.coli* Zellextrakten eine besondere Herausforderung dar.

Bislang konzentrieren sich die Anwendungen der zellfreien Synthese von intergralen Membranproteinen ausschliesslich auf die funktionelle Expression der Genprodukte, d.h. die Optimierung der hydrophoben Umgebung durch Zugabe von Detergenzien oder Lipiden zum Reaktionsansatz. Dies wirft die Frage auf, ob es für integrale Membranproteine möglich ist, ausgehend von einer DNA-Matrize in einem gekoppelter *in vitro* Transkription/Translation System, die spontane Membraninsertion in eine artifizielle und definierte hydrophobe Umgebung sowie die direkte Funktionsanalyse zusammenzuführen (Abb. 1.1).

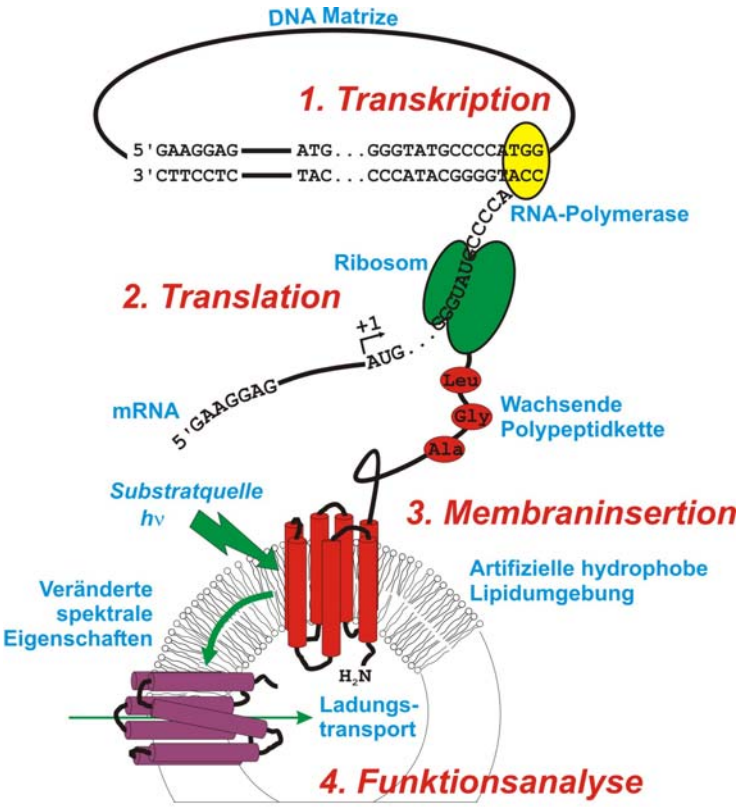


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Kombination aus *in vitro* Membranproteinsynthese in einem gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem ausgehend von einer DNA-Matrize mit der Faltung in eine definierte artifizielle hydrophobe Umgebung und direkter spektroskopischer oder elektrophysiologischer Funktionsanalyse. Hier am Beispiel eines 7-Transmembran Helix Lichtrezeptors dargestellt, der nach Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge veränderte spektrale Eigenschaften aufweist und Ladung über die Membran transportiert.

Ein derart modifiziertes System würde für sensitive spektroskopische HTS-Techniken oder elektrophysiologische Detektionsmethoden wie planare Lipiddoppelschichten oder

modifizierte Oberflächen im Chipformat [52] [53] geeignet sein und wäre unabhängig von geringen Syntheseausbeuten und aufwendiger Reinigung der Genprodukte.

Ein Vergleich von funktioneller *in vitro* Proteinsynthese kombiniert mit einer unmittelbaren Charakterisierung eines integralen Membranproteins mit der klassischen *in vivo* Expression und darauffolgenden Funktionsanalyse von gereinigtem Genprodukt wäre ein erster Schritt um die Anwendbarkeit eines solchen Systems in Bezug auf die Expressionsmethode abzuschätzen. In dieser Arbeit sollen hierzu verschiedene Rhodopsin-homologe Proteine aus Archae- und Eubakterien verwendet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll ein kürzlich entdecktes marinebakterielles Rhodopsin, das im grünen Spektralbereich absorbierende Proteorhodopsin (PR), dessen Funktion bisher nicht näher charakterisiert worden ist, eingehender untersucht werden. Hierzu werden Methoden der heterologen *in vivo* Expression verwendet.

Proteorhodopsin ist ein integrales Membranprotein, welches sieben α-helicale transmembrane Helices (A-G) besitzt und als photoaktives Pigment Vitamin A (Retinal) bindet. Eine Analyse der Primärsequenz von PR zeigt die Lage der sieben hydrophoben Sekundärstrukturelemente im Protein, die den sieben transmembranen Helices von Rhodopsinen zugeordnet werden können (Abb. 1.2).

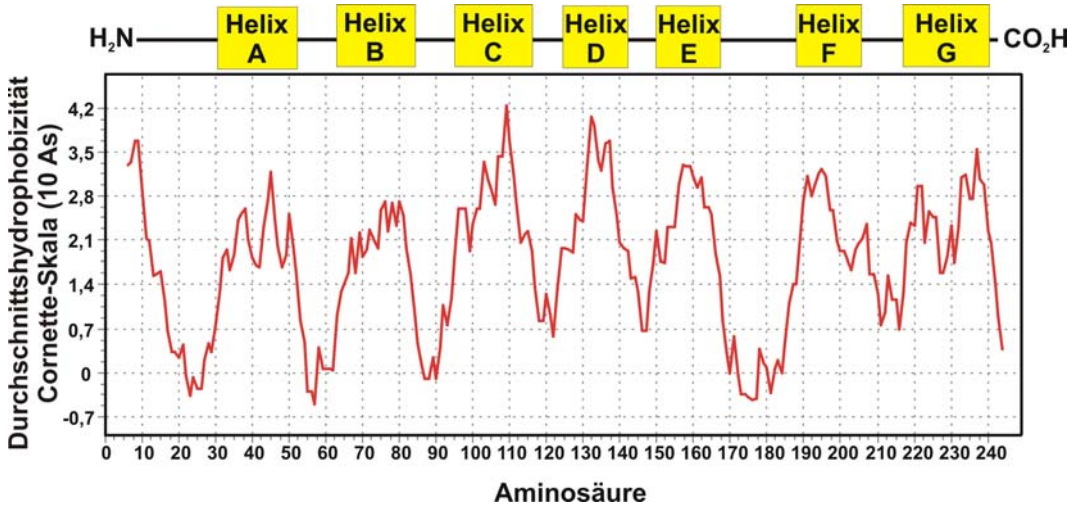


Abb. 1.2: Hydrophobizitätsdiagramm von PR (Auftragung der Durchschnittshydrophibizät von 10 Aminosäuren berechnet nach der Cornette Methode (Programm Bioedit, Ver. 7.0.5, www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html) und Zuordnung zu den charakteristischen Sekundärstrukturelementen von 7-Transmembran Helix Rezeptoren (Helix A-G).

Obwohl PR nur eine Primärsequenzholomogie von 38 % in Bezug auf das archaebakterielle bR besitzt, sind Aminosäuren, die für die Funktion essentiell sind, insbesondere in Helix C und G, hoch konserviert. Dazu gehören K231 (bR K216), an welches der Retinal-Chromophor kovalent über eine Schiff'sche Base gebunden ist, der primäre Protonenakzeptor D97 (bR D85) und -donor E108 (bR D96) sowie D227 (bR D212), R94 (bR D82) und mehrere Aminosäuren der Retinalbindungstasche (Abb. 1.3).

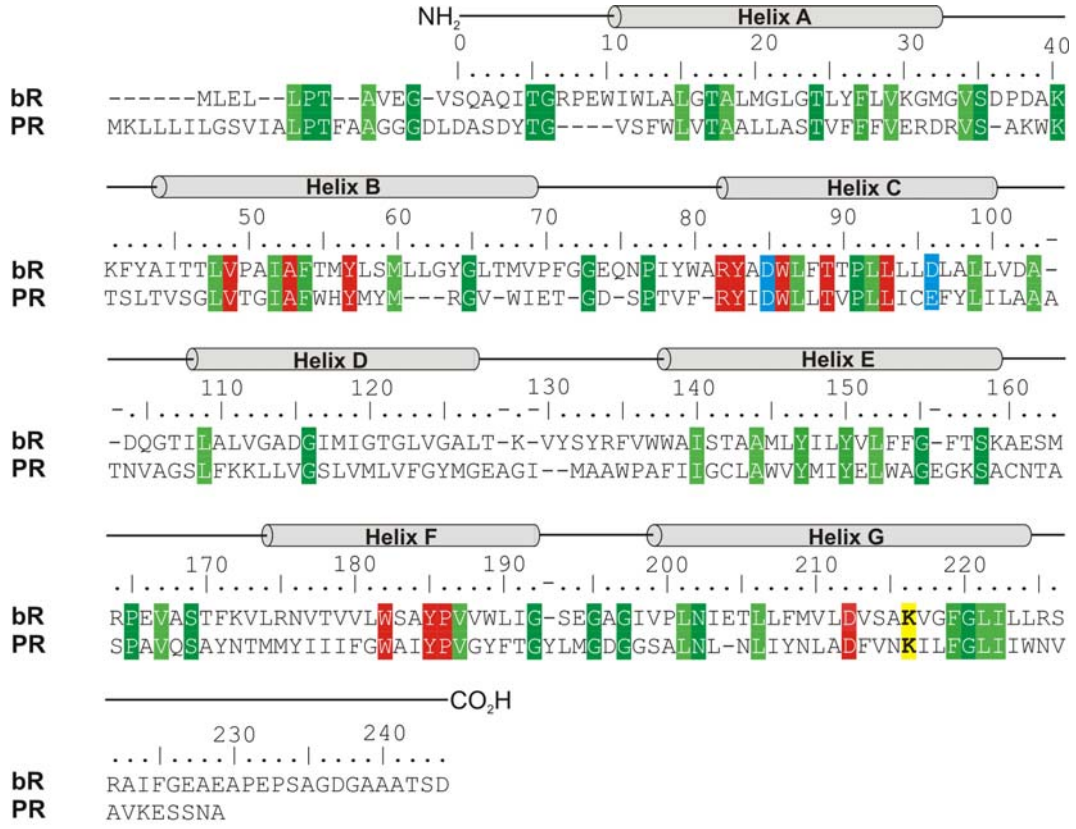


Abb. 1.3: Primär- und Sekundärsequenzvergleich von PR mit bR. Die Nummerierung der Aminosäuren ist auf die bR-Sequenz bezogen. Die konservierte Aminosäure PR K227 bzw. bR K216, an die das Retinal gebunden ist, ist in gelb unterlegt. Konservierte Aminosäuren der Retinalbindungstasche sind in rot, für die Funktion essentielle Aminosäuren in blau und weitere konservierte Aminosäuren sind in grün unterlegt.

Da die Primär- und insbesondere die Sekundärstruktur von PR hohe Ähnlichkeit mit bR besitzt, kann ausgehend vom Primärsequenzvergleich der beiden Proteine und einer bekannten Kristallstruktur von bR [54] ein dreidimensionales Modell von PR berechnet werden, welches in der folgenden Abbildung dargestellt ist (Abb. 1.4). Deutlich zu erkennen sind die sieben transmembranen α-Helices, der Retinal-Chromophor (grün) und ausgewählte konservierte Aminosäuren.

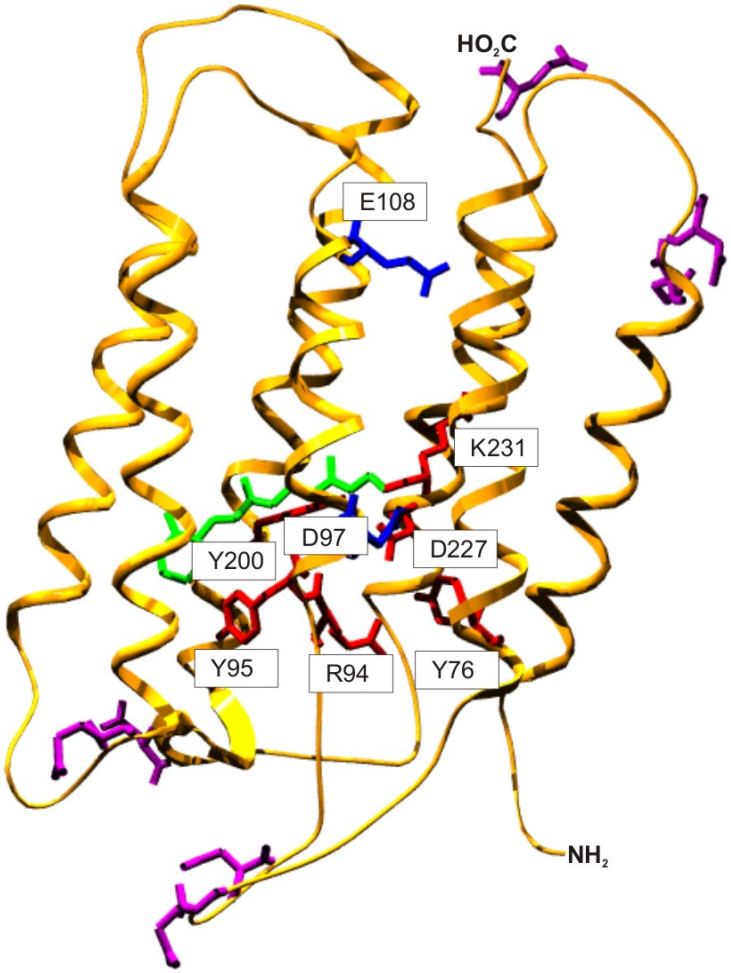


Abb. 1.4: Dreidimensionales Model von PR basierend auf der bR-Kristallstruktur 1C3W [54] optimiert mit der Molekulardynamiksimulation ICM (MolSoft L.L.C, La Jolla, CA, USA). Retinal (grün), primärer Protonenakzeptor (D97) und -donor (E109) (blau), konservierte Aminosäuren der Retinal-Bindungstasche (rot) und konservierte Aminosäuren in der Porenregion (violett).

Proteorhodopsin und die hohe Vielzahl an homologen marinebakteriellen PR-Proteinen können in zwei Subfamilien unterschieden werden die im grünen und blauen Spektralbereich absorbieren [15] [55]. Die bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima des Retinal-Chromophors im Vergleich zu freiem Retinal in Lösung sind abhängig von der Proteinumgebung. Diese sogenannte „Opsin-Verschiebung“ ist spezifisch für das jeweilige Rhodopsin und liegt in der Grössenordnung von 10^4 cm^{-1}. Bislang wurden nur wenige spektroskopische Untersuchungen von grün-absorbierendem PR veröffentlicht. Erste statische und zeitaufgelöste absorptionsspektroskopische Daten im visuellen und infraroten Spektralbereich zeigen hohe Ähnlichkeit zu archaebakteriellen Rhodopsinen [56]. PR durchläuft nach der Absorption eines Photons eine charakteristische Photoreaktion, deren

detaillierte kinetische Analyse bislang jedoch noch nicht vorliegt. Genauso sind die elektrophysiologischen Eigenschaften von PR nicht näher untersucht. Zwar konnte gezeigt werden, dass PR exprimierende *E.coli* Zellen bei Bestrahlung mit grünem Licht bei physiologischem pH Protonen nach Aussen pumpen [15], der Pumpmechanismus wurde aber nicht näher untersucht. Insbesondere eine Zuordnung der verschiedenen Photozyklusintermediate in Bezug auf den Ladungstransport wurde nicht getroffen.

Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Etablierung eines auf *E.coli* Zellysaten basierten *in vitro* Biosynthesesystems zur funktionellen Expression von integralen Membranproteinen. Die zellfreie Synthese soll in Gegenwart einer artifiziellen hydrophoben Umgebung zu einem funktionellen Protein führen. Dies soll am Beispiel der archaebakteriellen Retinalproteine bR, *Np*hR, *Np*sRII, des eubakteriellen PR und des pharmakologisch interessanten humanen GlyRα1 untersucht und optimiert werden.

Zunächst soll durch radioaktive Markierung der *in vitro* Syntheseprodukte, der Einfluss von verschiedenen Membranprotein-stabilisierenden Komponenten im zellfreien System untersucht werden. Nach Optimierung der Syntheseparameter soll die Funktionalität der zellfrei dargestellten Proteine ohne vorherige Reinigung durch selektive spektroskopische und elektrophysiologische Untersuchungen bestätigt werden. Geplant ist mit diesem Ansatz eine schnelle Expressionsmethode zu entwickeln, mit der die Funktionsanalyse von Membranproteinen unmittelbar durchgeführt werden kann.

Mit Hilfe der heterologen *in vivo* Expression sollen der humane GlyRα1 sowie das eubakterielle PR und die zwei eukaryotischen Retinalproteine NopI und ChopI in *E.coli* Zellen funktionell dargestellt und gereinigt werden. Die spektroskopischen Eigenschaften des PR sollen statisch und zeitaufgelöst analysiert werden. Dabei sollen insbesondere die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zur archaebakteriellen Ionenpumpe bR und deren strukturellen Ursachen durch ortsspezifische Mutagenese geklärt werden. Weiterhin sollen die spektroskopischen Untersuchungen durch lichtinduzierten Ladungstransportmessungen an planaren Lipiddoppelschichten ergänzt werden.

Ein Vergleich der zellfreien Proteinsynthese mit der heterologen Expression von Membranproteinen in *E.coli* Zellen soll die Möglichkeiten und Anwendbarkeit der beiden Systeme aufzeichnen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

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

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

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte mit dem Pfu-DNA Polymerase-System von Promega (Mannheim).

Ligationen wurden mit T4-DNA-Ligase von Gibco BRL (Neu Isenburg) durchgeführt. RNaseA stammte von Boehringer (Mannheim) ebenso Proteinase K.

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

Die für die Zellanzucht verwendeten Antibiotika und das *all-trans* Retinal waren von Sigma (Steinheim), Nährmedien (Caseinhydrolysat und Hefe-Extrakt) von Gibco BRL (Neu Isenburg).

Der verwendete LMW-Proteinmarker enthielt α-Lactalbumin (14.4 kD), Trypsininhibitor (20.1 kD), Carboanhydrase (30 kD), Ovalbumin (45 kD), Albumin (66 kD) und Phosphorylase b (97 kD) der Rainbow ^{14}C-Proteinmarker enthielt Lysozyme (14.3 kD), Trypsininhibitor (20.1 kD), Carboanhydrase (30 kD), Ovalbumin (45 kD), Phosphorylase b (66, 97 kD) und Myosin (220 kD) beide wurde von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen ebenso (L)-[U-^{14}C]-Leucin.

Proteinase Inhibitor Cocktail und RNase Inhibitor wurde von Roche (Penzberg) bezogen.

T7RNA-Polymerase wurde von Stratagene (La Jolla, CA, USA), *E.coli* tRNAs und (L)-Aminosäuren von Sigma (Steinheim) bezogen.

Lipide und Detergenzien waren von Sigma (Steinheim) sowie Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA).

2.2 Instrumentation

Die Fermentation der *E.coli* Bakterien erfolgte in temperierbaren Schüttlern der Firma New Brunswick (Nürtingen) unter aeroben Bedingungen. Fermentation im 30 Liter Maßstab erfolgte im Fermenter der Firma Braun Biotech GmbH (Melsungen). Die Zellen wurden an einem Ultraschallgerät der Firma Branson Ultrasonics **(**Danbury, CT, USA) oder in einem Mikrofluidizer M-110S der Firma Microfluidics (Newton, MA, USA) aufgeschlossen.
Die Elektrotransformation kompetenter *E.coli* Zellen wurden mittels eines GenePulsers der Firma Biorad (München) in Elektroporationküvetten der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) durchgeführt.
Sedimentationen erfolgte in den Zentrifugen RC28S und RC5B der Firma Sorvall (Bad Homburg) in den Rotoren SS-34, F28/36 sowie GS3 und in der Ultrazentrifuge L8-70 der Firma Beckman-Coulter (Fullerton, USA) in den Rotoren Ti70, Ti45 und SW28.
Polymerase-Kettenreaktion wurden in den Thermocyclern PCR-Express und PCR-Sprint der Firma Hybaid (Heidelberg) durchgeführt.
DNA-Sequenzierung erfolgte mit einem ABI Prism 373 DNA-Kapillarelektrophorese-Sequenzierungsgerät von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) oder wurde von der Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt.
Ni-NTA Superflow Säulenmaterial wurde von der Firma Qiagen (Hilden), Streptaktin-Makroprep Säulenmaterial von der Firma IBA (Göttingen) und DEAE Fastflow Säulenmaterial von der Firma Amersham Pharmacia Bioscience (Freiburg) bezogen.
Die präparative zellfreie Proteinexpression wurde im RTS500 Cycler von Roche (Penzberg) durchgeführt.
Polyacrylamid-Gelelektrophoresen erfolgten mit dem Mini-PROTEAN II-System der Firma Biorad (München), für radioaktive Proben wurden Einmal-Gelkassetten der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
Radioaktivität wurden auf Detektionsplatten im Phosphoimager FLA-5000 der Firma FujiFilm (Stamford, CT, USA) detektiert oder im Searle-MarkIII-Szintillationszähler der Firma Zinsser Analytik (Frankfurt) mit Ready Protein^{+} Szintillations Cocktail von Beckman-Coulter (Fullerton, USA).

2.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Bakterienstämme

XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA):

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^{q}ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

BL21(DE3) (Stratagene, La Jolla, CA, USA):

F- dcm ompT hsdS(rb-mb-) gal λ(DE3)

C41(DE3) [57]:

F- dcm ompT hsdS(rb-mb-) gal λ(DE3)

D10 [58]:

rna-10, relA1, spoT1, metB1

Plasmide

pET27b(+)	Novagen (Abingdon, UK)
pET27bmod	Klostermeier et al. [59]
pUC19	New England Biolabs (Schwalbach)
pUCBM20	Boehringer (Mannheim)
pET27bmod bom	Zur Verfügung gestellt von M. Engelhard (MPI Dortmund)
pET27bmod *Np*hop	Zur Verfügung gestellt von M. Engelhard (MPI Dortmund)
pET27bmod *Np*sopII	Zur Verfügung gestellt von M. Engelhard (MPI Dortmund)
pTLN PR	Zur Verfügung gestellt von T. Friedrich (MPI Frankfurt)
ChopI-Genkonstrukt	Zur Verfügung gestellt von P. Hegemann (Universität Regensburg)
pTLN NopI	Zur Verfügung gestellt von T. Friedrich (MPI Frankfurt)
hGlyRα1-Genkonstrukt	Zur Verfügung gestellt von E. Bamberg (MPI Frankfurt)

Oligonukleotide

Alle folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Göttingen) bezogen.

T7Promotor 5′-TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG GAA-3′

T7Terminator 5′-CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG C-3′

PR-NdeI-hin 5′-GCG AGC CAC CAT ATG AAA TTA TTA C-3′

PR-XhoI-rev 5′-CAG ATC TCT CGA GAG CAT TAG AAG-3′

PRD97N-hin 5′-TAG ATA CAT TAA TTG GTT ACT AAC AGT T-3′

PRD97N-rev 5′-AAC TGT TAG TAA CCA ATT AAT GTA TCT A-3′

PRStrepII-hin

5′-TCG AGT GGA GCC ACC CGC AGT TCG AAA AAT GAA TTC G-3′

PRStrepII-rev

5′-CAC CTC GGT GGG CGT CAA GCT TTT TAC TTA AGC GAT C-3′

NopI-NdeI-hin 5′-CAT GGT CTA CAT ATG ATC CAT CCA G-3′

NopI-NheI-rev 5′-AGA TCT CTC GCT AGC GTC CTC CTC GC-3′

NopI+PRL-PstI 5′-CCC TTG GCG CTG CAG GCC ACC-3′

ChopI-NcoI-hin 5‘-AGG ATC CAT GGC CCG TCG TCC CTG GTT G-3′

ChopI-HindIII-rev 5‘-CCA AGC TTA TAC AAA AGA ATA TGT TCA TGG ATT-3

ChopI+PRL-hin 5′-TGA TGA ACC CGC AGT CAT TTA C-3′

ChopI+PRL-rev 5′-GTA AAT GAC TGC GGG TTC ATC A-3′

ChopI+PRL-PstI-hin

5′-ATA ATG GCT CTG CAG TTT GTA TCC CA-3′

hGlyRα1-NdeI-Primer(+L)-hin

5′-CAA AGG ACC TGA CAT ATG TAC AGC T-3′

hGlyRα1-BamHI-6xHis-EcoRI-Hybrid-hin

5′-GAT CCC CAC AAC CAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA ATT CA-3′

hGlyRα1-BamHI-6xHis-EcoRI-Hybrid-rev

5′-CTC GAT GAA TTC AGT GGT GGT GGT GGT GGT GCT GGT TGT GGG-3′

hGlyRα1-PelB-EcoRV-hin

5‘-GGC TGA AGA TAT CCG CTC CGC AAC-3‘

hGlyRα1-PelB-HindIII-rev

5‘-GTA TAT CCA AAG CTT TCC AGT TGC A-3‘

2.4 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders erwähnt, wurden molekularbiologische Methoden nach Sambrook J. [60] und Ausubel F. [61] angewendet.

2.4.1 Zellanzucht

Die Anzucht der *E. coli* Zellen erfolgte in LB Medium (10 g Caseinhydrolysat, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 Liter H_2O, pH 7.2) oder 2TY Medium (16 g Caseinhydrolysat, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 Liter H_2O, pH 7.2) unter Verwendung von 10 ml Reagenzgläsern oder 25 – 5000 ml Erlenmeyerkolben bei 37°C und 160-200 rpm in einem Schüttler. Für die Anzucht größerer Mengen *E. coli* Bakterien zur Proteinpräparation wurde ein 30 Liter Fermenter benutzt.
Um Hintergrundexpression zu erniedrigen wurde Minimalmedium verwendet (0.2 g/l NH_4Cl, 2.0 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 3.25 g/l KH_2PO_4, 2.5 g/l K_2HPO_4, 1.5 g/l $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$, 2 % (w/v) Glucose Monohydrat sterilfiltriert. Zum Minimalmedium wurden Spurenelementen zugesetzt (1000x Spurenelemente-Lösung sterilfiltriert in 5 N HCl: 10 g/l $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 10 g/l $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 2.5 g/l $AlCl_3 \cdot 6\ H_2O$, 2.5 g/l $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1.75 g/l $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$, 0.5 g/l $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$, 0.5 g/l $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0.25 g/l $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 0.124 g/l H_3BO_3). Die Zellvermehrung wurde mittels Trübungsmessung bei einer Wellenlänge von 578 nm verfolgt. Zur Selektion von *E. coli* Zellen wurde dem Medium das entprechenden Antibiotikum (25 µg/ml Tetrazyklin, 50 µg/ml Kanamycin bzw. 100 µg/ml Ampicilin) zugesetzt.

2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA für analytische Restriktionen wurde nach alkalischer Lyse der *E. coli* Zellen nach Birnboim H.C. und Doly J. [62] isoliert, indem die genomische DNA durch Zentrifugation entfernt und der Überstand mit einem Volumenäquivalent Phenol versetzt und anschließend zweimal mit einem VÄ Chloroform extrahiert wurde. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 2,5 VÄ absolutes Ethanol zugesetzt und zentrifugiert (14.000 rpm, 20 min, RT, Eppendorf Tischzentrifuge). Die DNA wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser mit 10 µg/ml RNase A aufgenommen.
Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels der Anionenaustauschermaterial Qia-Tip-20, Qia-Tip-100 oder Qia-Tip-500 (Qiagen, Hilden, Germany). Abweichend von der

Arbeitsvorschrift des Herstellers wurde das Lysat vor dem Auftragen auf das Säulenmaterial mit 10 µg/ml RNAse A für 1 h bei 37°C inkubiert.

2.4.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [63] amplifiziert. In der Regel wurden 20 ng DNA-Matrize, 25 pmol Primer, 5 nmol jedes der vier dNTP's und 0.5 U Pfu-Polymerase (Promega, Madison, USA) in 50 µl Ansätzen verwendet. Die Amplifikation der DNA im Thermocycler erfolgte durch „Hot-start"-PCR in zwei Schritten. In einem ersten Schritt wurden fünf Zyklen mit (1) 15 s bei 96°C, (2) 30 s bei einer Temperatur von -5°C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Primer und (3) 60 s – 120 s (abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments) bei 72°C durchgeführt. Im zweiten Schritt wurden fünfzehn Zyklen mit (1) 15 s bei 96°C, (2) 30 s bei der Schmelztemperatur der Primer und (3) 60 s – 120 s bei 72 °C durchgeführt. Ortsspezifische Mutationen wurden mit der "Overlap-Extension"-Methode nach Ho et al. [64] eingeführt.

2.4.4 Analyse und Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierzu wurden die DNA-Proben in Probenpuffer (TBE-Puffer: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0.9 mM EDTA, pH 8.9 unter Zusatz von 10 % (w/v) Ficoll-400, 0.025 % (w/v) Bromphenolblau, 0.025 % (w/v) Xylencyanol) aufgenommen und auf Gele mit 0.7 – 1.2 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer gegeben. Durch Zugabe von 0.6 mg/l Ethidiumbromid wurden die DNA-Banden gefärbt. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte durch das Anlegen einer Spannung von 3-4.5 V/cm. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde ein Gel-Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden, Germany) verwendet, nachdem die gewünschte Bande aus dem Gel geschnitten wurde.

2.4.5 Restriktion von DNA

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

2.4.6 Phosphorylierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurde durch einstündige Inkubation bei 37°C mit 20 U T4-Polynukleotidkinase und 50 nmol ATP 5'-phosphoryliert. Die eingesetzte Menge an Oligonukleotid betrug 100 pmol in 20 µl. Zur Hybridisierung wurden je 100 pmol des 5'-phosphorylierten Oligonukleotids 10 min bei 98°C erhitzt, dann über einen Zeitraum von 1 Std. im Heizblock auf RT abgekühlt. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden über Sephadex G25-Säulenmaterial (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) nach Angaben des Herstellers entsalzt.

2.4.7 Ligation von DNA

Ligation von DNA erfolgte durch dreistündige Inkubation mit T4-DNA Ligase. Dazu wurden 100 ng geschnittenes DNA-Plasmid mit dem zweifachen molaren Überschuß an Fragment und 1 U T4-DNA Ligase in 20 µl bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Ligationsansätz 10 min bei 65 °C inaktiviert.

2.4.8 Transformation von *E. coli* Zellen

Kompetente *E. coli* Bakterien wurden durch Elektroporation mit Plasmid-DNA nach der Methode von Dower W.J. et al. [65] transformiert.
Hierzu wurden 2 ng „supercoil"-Plasmid-DNA bzw. 20 ng DNA eines Ligationsansatzes in 20 µl mit 80 µl einer 10%igen Glycerinsuspension elektrokompetenter Zellen ($OD_{578} \approx 100$) vermengt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die Transformation erfolgte mit einem GenePulser (BioRad, München, Germany) durch einen Puls von 1,5 kV, 800 Ω, 25 µF und einer Zeitkonstante von 10 ± 2 sec. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen, 1 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt und auf antibiotikahaltigen LB-Agar Platten ausplattiert.

2.4.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte auf der Basis fluoreszenzmarkierter Didesoxyterminatoren nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden 1 µg DNA mit 6 µl Big-Dye-Terminator-Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 10 pmol Sequenzierungsprimer und 2 µl DMSO in 20 µl Wasser mittels PCR amplifiziert.

Folgender PCR-Zyklus wurde 25 mal durchlaufen:

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

Anschließend wurden die Reaktionsprodukte mit Ethanol gefällt und das Pellet nach einmaligem Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol an der Luft getrocknet.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Proteinexpression in *E.coli* Zellen und Proteinreinigung

Die Expressionskultur wurde mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur (OD_{578} ~ 4-6) auf eine OD_{578} ~ 0.06 angeimpft und bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase (OD_{578} ~ 1.0) geschüttelt (160 rpm, 37°C). Die heterologe Expression von Protein erfolgte durch Zugabe von 0.1-1 mM IPTG. Bei Induktion wurden gleichzeitig essentielle Cofaktoren wie z.B. 10 µM *all-trans* Retinal in Ethanol zugegeben. Die Expressionskultur wurde nach Induktion 2.5-4 Stunden geschüttelt (160 rpm, 20-37°C, Lichtauschluss). Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Ultraschall-Behandlung oder im Mikrofluidizer. Die Membran wurde bei 100.000xg, 1 h, 4°C ultrazentrifugiert und mit 1:100 Kulturvolumen A_{mem} über Nacht bei leichtem Rühren (4°C, Lichtausschluss) solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden mittels nochmaliger Ultrazentrifugation abgetrennt. Die Reinigung von Protein erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden) oder Strepavidin-Sepharose bzw. Makroprep-Säulenmaterial (IBA, Göttingen). Für die Reinigung mittels Ni-NTA wurde das Säulenmaterial mit B_{mem} equilibriert. Nach Auftragen des Solubilitats (Flussrate ~1 ml/min) wurde mit 10 Säulenvolumina C_{mem} gewaschen und mit D_{mem} eluiert. Für die Reinigung mittels immobilisiertem Streptavidin wurde das Säulenmaterial mit B_{mem} equilibriert, die Probe aufgetragen und mit 10 Säulenvolumina B_{mem} gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 5 mM Desthiobiotin in B_{mem} (Sigma, Steinheim) eluiert.
Das überschüssige Imidazol bzw. Desthiobiotin wurde daraufin mittels DEAE-Anionenaustauschermaterial entfernt. Dazu wurde das Eluat auf 30 mM NaCl mit E_{mem} verdünnt und auf das mit F_{mem} equilibirierte Säulenmaterial aufgetragen. Es wurde mit 5 Säulenvolumina F_{mem} gewaschen und das Protein mit G_{mem} eluiert.
Puffer:

A_{mem}	300 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat pH = 8, 2% (w/v) DDM
B_{mem}	wie A_{mem}, aber 0.05% (w/v) DDM
C_{mem}	wie B_{mem} + 40 mM Imidazol
D_{mem}	wie B_{mem} + 200 mM Imidazol
E_{mem}	10 mM Tris/HCl pH = 8, 0.05% (w/v) DDM
F_{mem}	30 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH = 8, 0.1% (w/v) DDM
G_{mem}	500 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH = 8, 0.1% (w/v) DDM

2.5.2 Rekonstitution von Proteinen in Lipide

Die Rekonstitution von Detergenz-solubilisierten Proteinen erfolgte in polare Lipide der Purpurmembran aus *H.salinarum* isoliert nach einer Vorschrift von Kates et al. [66] oder SUVs bestehen aus Phospholipiden (Präparation siehe Abschn. 2.5.7). Hierzu wurde die Proteinlösung auf 1 M NaCl, 50 mM Natriumphosphat pH 8 eingestellt. Nach Zugabe von Lipiden (molares Verhältnis Lipid/Protein = 25) wurde das Detergenz mittels Detergent-Adsorber Biobeads (Boehringer, Mannheim, Germany) über Nacht unter Lichtausschluss bei leichtem Rühren entfernt. Eine homogenere Rekonstitution konnte beobachtet werden, wenn die Proteinlösung vorab auf < ½ x CMC verdünnt wurde. Das rekonstituierte Protein wurde ultrazentrifugiert (100.000xg, 4°C, 1 h) und einmal mit dem entsprechenden Puffer gewaschen.

2.5.3 Immobilisierung von rekonstituiertem Protein in Polyacrylamid

Zur Erhöhung der Proteinstabilität über einen weiten pH- und Temperaturbereich sowie zur Erniedrigung elastischer Lichtstreuung bei absorptionsspektroskopischen Untersuchungen wurde das rekonstitiuierte Protein in 16.5%igem Polyacrylamid immobilisiert. Dazu wurden 600 µl Proteinsuspension (OD_{520nm} = 5-6) mit 300 µl 49.5% (w/v) Acrylamid 3% (w/v) N',N'-Bisacrylamid, 4.5 µl 10% (w/v) APS sowie 1.5 µl N',N',N',N'-Tetramethyl-ethyldiamin versetzt und in einer Gelkammer (Schichtdicke: 1 mm) polymerisiert. Das auspolymerisierte Gel wurde daraufhin in kleine Stücke (0.5 cm x 1.5 cm) geschnitten und im entsprechenden Puffer bei 4°C gelagert

2.5.4 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Retinalproteinen

Der Extinktionskoeffiziente des Retinalchromophors in Proteorhodopsin kann mit Hilfe des bekannten Extinktionskoeffizienten von Retinaloxim 33.600 M^{-1} cm^{-1} berechnet werden [67]. Hierzu wurde solubilisiertes Proteorhodopsin in 10 mM Hepes/NaOH pH 10 mit 10 mM Hydroxylamin versetzt und eine Stunde unter moderatem Rühren mit grünem Licht bestrahlt (Wolfram-Kaltlichtlampe, 150 W, $\lambda > 480$ nm). Um die Reaktion komplett auf die Seite des Retinaloxims zu überführen wurde mit konz. H_2SO_4 auf pH ~3 eingestellt.

2.5.5 Bestimmung des Retinal-Isomerenverhältnisses von Retinalproteinen

Zur Bestimmung des Isomerenverhältnisses von dunkel- und lichtadaptiertem Proteorhodopsin wurde das Retinal nach der Methode von Scherrer et al. 1989 [99] extrahiert und mittels Normalphasen-HPLC getrennt (Säule: Prontosil 120-3-OH, Bischoff Analysentechnik, Leonberg, Germany). Laufmittel A: n-Hexan, B: EtOAc, Gradient: 80% (v/v) A 10 min, 80% A → 100% A in 2 min, 100% A 5 min, 100% A → 80% A 2 min, Flussrate 1 ml/min. Detektion bei 365 nm. Dunkeladaptation erfolgte durch Inkubation der Probe für 24 h bei RT. Die Probe wurde lichtadaptatiert durch 10-minütige Bestrahlung mit einer Kaltlichtlampe (Wolfram-Kaltlichtlampe, 150 W, $\lambda > 480$ nm).

2.5.6 Präparation von *E.coli* S30 Extrakten

Die Präparation von S30 Extrakt erfolgte in abgewandelter Form nach der Methode von Zubay G. [28].

E.coli D10 Zellen wurden auf Minimalmediumagar (0.2 g/l NH_4Cl, 2.0 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 3.25 g/l KH_2PO_4, 2.5 g/l K_2HPO_4, 1.5 g/l $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$, 2 % (w/v) Glucose Monohydrat sterilfiltriert, 1.5 g/l Agar) mit Thiamin und (L)-Methionin (je 50 µg/ml) selektiert. 10 Liter LB-Medium (vorgewärmt) wurden mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur auf eine OD_{578} ~ 0.06 angeimpfen und bis zur späten logarithmischen Phase (OD_{578} ~ 1.3) wachsen gelassen. Die Zellen wurden zentrifugiert (5.000 rpm, 4°C, JS4.3-Rotor) und zweimal in 500 ml eiskaltem S30-Puffer (10 mM 2.2 M Tris/OAc, pH 8.3, 1 mM DTT, 14 mM $Mg(OAc)_2$, 60 mM KOAc, in DEPC-behandeltes Wasser) + 0.5 ml/l β-Mercaptoethanol + 50 µg/ml PMSF) gewaschen. Danach wurde in 1.27 ml pro g Zellpellet S30-Puffer (ohne β-Mercaptoethnol und PMSF) vorsichtig resuspendiert und im Microfluidizer aufgeschlossen. Um reduzierende Bedingungen einzustellen wurde mit 1 mM DTT versetzt und zentrifugiert (30 min, 30.000xg, 16.000 rpm, SS-34, 4°C). Daraufhin wurden ~ 80% des Überstands abgenommen und nochmals zentrifugiert. Nach Abnahme von wieder etwa nur 80 % wurde mit 0.3 ml Präinkubations-Mix pro ml Überstand 80 min bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert.

Präinkubations-Mix:

	Volumen	Endkonzentration
2.2 M Tris/OAc, pH 8.2	1 ml	293 mM
1.4 M $Mg(OAc)_2$	50 µl	9.4 mM
38 mM ATP, K^+-Salz, pH 7.0	2.6 ml	0.13 mM
0.42 M Phosphoenolpyruvat, K^+-Salz, pH 7.0	1.5 ml	84 mM
0.55 M DTT	60 µl	4.4 mM
Aminoäure-Suspension (je 55 mM)	6 µl	44 µM
Pyruvat-Kinase (aus Kaninchenmuskel)	100 U	
DEPC-behandeltes H_2O	auf 7.5 ml	

Der Extrakt wurde 3x jeweils 1 Stunde gegen S30-Puffer dialysiert (4.5 kD cut-off Membran) und zentrifugiert (10 min, 4.000xg, 5.000 rpm, HB4, 4°C). Der Überstand wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

2.5.7 Zellfreie Proteinexpression

Präparation von Plasmid-DNA für die *in vitro* Transkription

Plasmid-DNA wurde im präparativen Maßstab mittels Anionenaustauschersäulen Qia-Tip 500 (Qiagen, Hilden) isoliert (siehe Abschnitt 2.4.3) und falls nötig mit dem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert (2.4.5). Der Restriktionsansatz wurde mit 1 % (w/v) SDS sowie 0.25 mg/ml Proteinase K versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde zweimal mit je einem VÄ Phenol, Chloroform extrahiert, anschliessend zweimal mit je einem VÄ Chloroform. Die DNA wurde mit 1/20 VÄ 4 M NaOAc pH 4.7 und 2.5 VÄ absolutem Ethanol 1 h bei RT gefällt mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC-behandeltes Wasser resuspendiert.

Präparation von SUVs-Liposomen

Zur Herstellung von Liposomen wurden in der Regel 1 ml 20 mg/ml Lipid in Chloroform/MeOH = 1:1 in einem 25 ml Kolben vorgegeben. Das Lösungsmittel wurde in einem leichten Argonstrom am Rotationsverdampfer entfernt. Der zurückbeibende Lipidfilm wurde unter Argon gesetzt und mit 1 ml DEPC-behandeltem Wasser hydratisiert (entpricht einer 20 mg/ml Liposomensuspension). Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde in Abständen von je 20 min geschüttelt, so dass eine trübe Suspension multilamellarer

Liposomen entsteht. Die Herstellung von „Small Unilamellar Vesicles“ (SUVs) erfolgte mittels Ultraschallbehandlung in einem Ultraschallbad bis die Liposomensuspension klar (opaleszent) erschien. Grössere Lipidfragmente wurden durch Zentrifugation (15 min, 15.000 rpm, Eppendorfzentrifuge, RT) abgetrennt.

Zellfreie Synthese im analytischen Maßstab

Die zellfreie Synthese im analytischen Maßstab (15 µl) erfolgte in sterilen Eppendorfreaktionsgefässen unter Zusatz von ^{14}C-(L)-Leucin zur quantitativen Proteinbestimmung. Um die Konzentration an störenden Abbauprodukten der zellfreien Synthese wie ADP über die Zeit gering zu halten, wird dem Reaktionsansatz Pyruvatkinase zugesetzt, welches unter Umsetzung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat das ATP aus ADP rückbildet. Ein analytischer Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten, welche bei 4°C gemischt wurden:

	Volumen
Hot-Mix	6.95 µl
T7-RNA-Polymerase (10 U/µl)	0.5 µl
E. coli S30-Extrakt	4.5 µl
weitere Zusätze	3.05 µl
Gesamt	auf 15 µl

Hot-Mix:

	Volumen
0.5 M $Mg(OAc)_2$	0.4 µl
1.5 µg/µl DNA-Matrize	0.75 µl
Proteinase-Inhibitor Cocktail (1 Tablette auf 180 µl DEPC-H_2O)	0.5 µl
LMW-Mix (ohne Leucin)	3.85 µl
(+1 µl Pyruvat Kinase, 1 µl RNase Inhibitor auf 100 µl DEPC-H_2O)	
5 mM *all-trans* Retinal in Ethanol	0.3 µl
^{14}C-(L)-Leucin	1.15 µl
(Spez. Aktivität 303 mCi/mmol, Radioaktive Konzentration 50 µCi/ml)	

LMW-Mix:

	Volumen
2.2 M Tris/OAc, pH 8.2	40 µl
38 mM ATP, K^+-Salz, pH 7.0 mit 1 M KOH	50 µl
GCU-Mix, je 88 mM GTP,CTP,UTP, Na^+-Salz, pH 7 mit 1 M KOH	15 µl
KCA-Mix (1.4 M NH_4OAc, 2.8 M KOAc, 0.38 M $Ca(OAc)_2$)	40 µl
0.42 M Phosphoenolpyruvat, K^+-Salz, pH 7 mit 6 M KOH	100 µl
Aminosäuresuspension, je 55 mM (ohne (L)-Leucin)	14.2 µl
40% (w/v) PEG8000	75 µl
0.55 M DTT	5 µl
2.7 mg/ml Folinsäure	20 µl
17.4 mg/ml *E.coli* tRNAs	17 µl
DEPC-behandeltes H_2O	auf 390 µl

Die zellfreie Synthese erfolgte durch Inkubation der Reaktionsansätze für 80 min bei 37°C unter Lichtausschluss. Danach wurde die Reaktion durch Zusatz von 50 mM EDTA pH 8.0 gestoppt.

Zellfreie Synthese im präparativen Maßstab

Die zellfreie Synthese im präparativen Maßstab erfolgte in einem RTS 500 Bioreaktor der Firma Roche (Penzberg, Germany) nach Angaben des Herstellers unter Zusatz von 0.1 µg/µl ungeschnittener Plasmid-DNA (RNase frei) und 4 mg/ml DOPC-Liposomensuspension in DEPC-behandeltem Wasser im Reaktionsmix sowie je 100 µM *all-trans* Retinal in Ethanol im Reaktions- und Vorratsmix. Um die Volumina im Reaktionsmix bei Zugabe der zusätzlichen Komponenten konstant zu halten, wurde das *E.coli* Lysat mit 0.335 ml statt 0.525 ml Rekonstitutionspuffer rehydratisiert und somit konzentrierter eingesetzt. Die Reaktion erfolgte über 24 Stunden bei 30°C und 250 rpm unter Lichtausschluss. Danach wurde die Reaktion durch Zusatz von 50 mM EDTA pH 8.0 gestoppt. Die elektrophysiologische Charakterisierung des zellfrei dargestellte Genprodukts im Reaktionsansatz erfolgte unmittelbar nach Beendigung der Reaktionszeit. Für die spektroskopischen Untersuchungen wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 4°C gelagert.

Quantitative Bestimmung radioaktiv markierten Proteins mittels Filterbindungsassay

5 µl des Reaktionansatzes wurden mit 100 µl 5% BSA und 3 ml 10% TCA, 2% Casein Hydrolysat versetzt und 15 min bei 90°C, dann 30 min bei 0°C inkubiert. Das Präzipitat wurde filtriert (Glasfaser Mikrofilter GF/C, Whatman, Maidstone, UK) und der Filter 3x mit 10 ml eiskaltem 5% TCA und anschliessend mit 10 ml Ethanol gewaschen und 2 h bei 60°C getrocknet. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität im Reaktionsansatz wurden 2.5 µl direkt auf einen Glasfaserfilter gegeben. Der Filter wurde in ein Szintillationsgefäß mit 200 µl 0.1 M KOH benetzt und mit 6 ml Szintillationflüssigkeit (Ready Protein^{+}, Beckman-Coulter, Fullerton, USA) ½ h bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte für 10 min in einem Searle-MarkIII-Flüssigszintillationsmessgerät (Zinsser Analytik, Frankfurt).

Bestimmung von Membraninsertion durch proteolytischen Abbau

Membraninstertion von ^{14}C-Leucin markiertem Protein wurde mittels SDS-PAGE von Proteinase K behandelten Reaktionsansätzen durchgeführt. Dazu wurden 6 µl des zellfreien Syntheseansatzes mit 1 mg/ml (spezifische Aktivität 2.5 U/mg) Proteinase K versetzt und 2 Std. bei 37 °C inkubiert. Proteinase K wurde durch Zusatz von 10 mM PMSF in EtOH ½ Stunde auf Eis inhibiert. Die Trennung der Proteine und Abbaubanden erfolgte mittels SDS-PAGE.

2.5.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinen wurde die denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Schägger H. und Jagow G. [68] verwendet. Hierzu wurden die Proteinproben in einem Volumenäquivalent SDS-Probenpuffer (120 mM Tris pH 8.0, 6 % (w/v) SDS, 35 % (w/v) Glycerin, 3.55 % (v/v) Monothioglycerol, 0.05 (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, 15 min geschüttelt und auf 0.75 mm bis 1 mm dicke 12%ige Acrylamidgele gegeben. Für radioaktive Proben wurden Einmalgelkassetten (2 mm Schichtdicke) verwendet . Die Trennung der Proteine erfolgte durch Anlegen einer äusseren Spannung von 120 V (Anodenpuffer: 200 mM Tris/HCl, pH 8.9; Kathodenpuffer: 100 mM Tris/HCl, 100 mM Tricin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.25. Die Detektion der Proteinbanden wurde durch Färben des Gels mit Coomassie Brilliant Blue R250 (Färbelösung: 0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol; Entfärbelösung:

10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol) erreicht. Gele mit ^{14}C-markierten Proben wurden auf Whatman-Papier getrocknet und über Nacht auf einer Phosphoimagerplatte der Firma FujiFilm (Stamford, CT, USA) detektiert. Die densitometrische Auswertung von radioaktiven Proteinbanden erfolgt mit dem Programm AIDA (Ver. 3.22.001) derselben Firma.

2.5.9 Western-Transfer und Immunnachweis

Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose (Schleiche&Schuell, Dassel) oder Porablot PVDF-Membran (Macherey-Nagel, Düren) mit einem Semidry Blotter (30 min bei 1.2 mA/cm^2) (Satorius, Göttingen) transferiert (Anodenblotpuffer: 300 mM Tris/HCl, 100 mM Tricin, pH 8.7-8.8; Kathodenblotpuffer: 30 mM Tris/HCl, 300 mM 6-Amino-n-kapronsäure, pH 8.6-8.7. Die Membran wurde mit 5 % (w/v) Trockenmilch in TBS-Puffer (5 mM Tris/HCl, 15 mM NaCl, pH 7.5) blockiert und mit den entsprechenden Antikörpern nach Angaben des Herstellers inkubiert (1. Antikörper Maus-Anti-His-IgG (Sigma, Steinheim), 2. Antikörper Ziege-Anti-Maus-IgG-POD (Boehringer, Mannheim). Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz Western-Blotting-Kit (Boehringer, Mannheim) auf Röntenfilm mit einer Belichtungszeit von 30 Sekunden bis 10 min.

2.5.10 Massenspektrometrische Analytik

Die massenspektrometrischen Analyse von Membranproteinen mittels ESI-MS oder MALDI-Tof erfolgte in einer modifizierten Form nach der Methode von Hufnagel P. et al. [69]. Dazu wurden 10 nmol Protein mittels Sephadex G25-Säulenmaterial (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) entsalzt auf 100 µl ankonzentriert (YM-50 Konzentratoren, Amicon, Bedford, MA, USA) und das Protein mit 1.9 ml einer Lösung aus 10 ml Aceton, 1 ml 25% (v/v) Ammoniak, 100 mg TCA 30 min auf Eis gefällt. Das ausgefällt Protein wurde zuerst in 1 ml eiskaltem Aceton, dann in 500 µl n-Hexan gewaschen und an der Luft getrocknet. Für die ESI-MS Messungen wurde das getrocknete Pellet in $CHCl_3$/ MeOH/ Trifluorethanol/ Wasser/ Ameisensäure = 100:75:50:35:4 (v/v) resuspendiert. Für die MALDI-Tof Analytik wurden 1 µl einer Probenverdünnung und 1 µl Matrixlösung auf einer MALDI-Tof Platte luftgetrocknet (Matrixlösungen: gesättigte Lösungen von 2,5-Dihydroxybenzoesäure, α-Cyanohydroxyzimtsäure oder Sinapinsäure in Acetonitril/ H_2O/ TFA = 100:100:0.1 (v/v)).

2.6 Biophysikalische Methoden

2.6.1 Statische Absorptionsspektroskopie

Die Untersuchung des Grundzustand von PR und Mutanten erfolgte mit einem temperierbaren UV/Vis-Spektrophotometer DU-650 der Firma Beckman-Coulter (Fullerton, USA). Rekonstituierte Proteinproben wurden in Polyacrylamid immobilisiert um die Proteinstabilität zu erhöhen und schnelle Pufferwechsel zu ermöglichen (vergleiche Abschnitt 2.5.3). Dunkeladaptation erfolgte durch Inkubation über Nacht bei RT. Lichtadaptation erfolgte durch 10-minütige Bestrahlung mit einer Kaltlichtlampe (Wolfram-Lampe, 150 W, λ>480 nm).

Die Beschreibung der statischen Absorptionsspektren vom nahen Ultraviolett- bis in den nahen Infrarotbereich (250-800 nm) erfolgte durch Gaussfunktionen, wobei bei einer Auftragung der Extinktion gegen die Wellenlänge asymmetrische Annäherungsfunktionen verwendet wurden um das Franck-Condon Prinzip zu erfüllen [70] [71].

$$A(\lambda) = \varepsilon_{max} \cdot \exp\left\{ -\frac{\ln 2}{(\ln \rho)^2} \left[\ln \frac{(1/\lambda - 1/\lambda_{max})(\rho^2 - 1)}{\Delta\nu\rho} + 1 \right]^2 \right\} \qquad (1)$$

ε_{max} stellt die maximale Extinktion, ρ der Neigungssfaktor, $\Delta\nu$ Halbwertsbandbreite und λ_{max} das Absorptionsmaximum dar.

Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm IGORPro v4.0 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, USA). Lichtstreuung im Absorptionsspektrum wurde mit einer Potenzfunktion der Form $A+B/\lambda^C$ beschrieben (A = Grenzwert für $\lambda\rightarrow\infty$, B = maximale Amplitude für $\lambda\rightarrow 0$, C = Raleighstreuungsexponent, λ = Wellenlänge). Die Bestimmung von pKs Werten erfolgte mit einer sigmoidalen Annäherungsfunktion, der die Hill-Gleichung zugrunde liegt, mit y_{min}, y_{max} = Grenzwerte, k = Gleichgewichtskonstante, n = Hill Koeffizient.

$$y(x) = y_{min} + \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + 10^{[(x-k)n]}} \qquad (2)$$

2.6.2 Zeitaufgelöste Laserblitz-Absorptionsspektroskopie

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

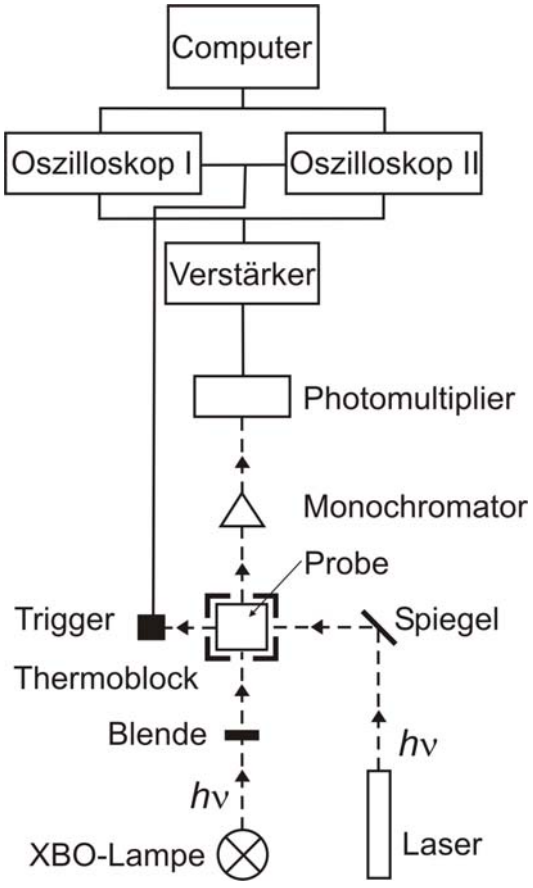


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau der Laserblitzabsorptions-Apparatur

Datenverarbeitung und Analyse

Die Analyse der absorptionsspektrokopischen Daten erfolgt nach der Methode von Chizhov I. et al. [72], deren Grundlage das Lambert-Beersche Gesetz für i=1...n absorbierende Spezies ist:

$$A = \log\frac{I}{I_0} = \sum_i \varepsilon_i \cdot c_i \cdot d \qquad (3)$$

Da sich im Falle der Photozyklusmessungen, die gemessene Absorptionsänderung immer aus den Beiträgen mehrerer Intermediate additiv zusammensetzt, ist die Daten-Interpretation entsprechend erschwert. Ein besonderes Problem stellt dabei die Bestimmung der Anzahl der beteiligten Intermediate dar [73]. Die verwendete Methode setzt damit an, die experimentell bestimmten differentiellen Absorptionsänderungen $\Delta A(\lambda,t)$ mathematisch durch eine Summe von Exponentialfunktionen der allgemeinen Form $e^{-k_i t}$ zu beschreiben.

$$\Delta A(\lambda,t) = \sum_i b_i(\lambda) \cdot e^{-k_i t} \qquad (4)$$

Die Absorptionssignale wurden in zwei einander überlappenden Zeitfenstern gespeichert, die die Kinetik des Photozyklus 100 ns nach Anregung der Probe durch den Laserpuls bis zur vollständigen Rückbildung des Grundzustandes erfassen. Die Zahl der Meßdaten wurde nach einer von Müller K.H. und Plesser T. [74] beschriebenen Methode auf eine logarithmische Zeitskala reduziert (250 Datenpunkte) und deren Standardabweichung anhand des Fehlers des Grundsignals abgeschätzt.

Zur Ermittlung der Kinetik des Photozyklus und der spektralen Charakterisierung der Intermediate wurden die experimentellen Daten wie folgt ausgewertet. Das MEXFIT-Programm [74] ermittelte mit der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme einen Satz von Exponentialfunktionen, deren Summe die Absorptionsänderungen mathematisch beschreibt. Anpassungsfunktionen mit vier bis neun Exponentialtermen wurden auf diese Weise für jede der insgesamt sechs Temperaturen berechnet. Als Kriterium für die Güte einer Anpassungsfunktion dienten die Standardabweichung des Fehlers und die Oberfläche der gewichteten Differenzen von den gemessenen und den berechneten Daten. Eine Anpassungsfunktion wurde akzeptiert, wenn diese Oberfläche keine systematischen Abweichungen zeigte und die Standardabweichung sich nicht durch Hinzufügen eines weiteren Exponentialterms signifikant verbessern ließ. Diese Datenauswertung lieferte die

apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Intermediate k_i und ihre korrespondierenden Amplitudenspektren der Exponenten.
Die Beschreibung der Absorptionsdaten ist mathematisch ausschliesslich für ein kinetisches Modell irreversibler Folgereaktionen 1. Ordnung lösbar.

$$P_1 \xrightarrow{k_1} P_2 \xrightarrow{k_2} \cdots \xrightarrow{k_{i-1}} P_i \xrightarrow{k_i} \cdots$$

Eine derartige Folgereaktion kann durch eine Differentialgleichung der Form

$$\frac{dP_i}{dt} = -k_i P_i + k_{i-1} P_{i-1} \tag{5}$$

beschrieben werden, wobei $P_i(t)$ die Wahrscheinlichkeit ist ein Molekül zur Zeit t im Zustand i zu finden. Unter der Annahme, daß sich zum Zeitpunkt t = 0 alle Moleküle im spektroskopischen Grundzustand befinden, lautet die exakte Lösung von (5):

$$P_i = \sum_{i=1}^{i} a_{ij} \cdot e^{-k_j t}, \; P_1(0) = 1; P_{i>1}(0) = 0 \tag{6}$$

, wobei

$$a_{ij} = \frac{\prod_{m=1}^{i-1} k_m}{\prod_{\substack{m=1 \\ m \neq j}}^{i} (k_m - k_j)}. \tag{7}$$

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

$$\Delta A(\lambda,t)=\sum_{i=1}^{n}\Delta b_i(\lambda)\cdot e^{-k_i^{*}t}=F_c\cdot\sum_{i=1}^{n}\Delta\varepsilon_i(\lambda)\cdot P_i(t) \qquad (8)$$

F_c, die „cycling fraction“ ($F_c = N_c/N_0$), ist der Anteil der Moleküle, der nach Anregung durch den Laserpuls den Zustand i = 1 erreicht und somit den Photozyklus durchläuft. Ordnet man die experimentell ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_i* den intrinsischen k_i zu, so läßt sich die Matrix a_{ij} berechnen, und die Ableitung der Spektren der Intermediate hängt nur noch von einem unbekannten Parameter ab, der „cycling fraction“ F_c. Der Minimalwert von F_c kann anhand der Spektren mit hinreichender Genauigkeit abgeschätzt werden. Als einziges Kriterium dient hierbei Abwesenheit von negativen Absorptionen in den absoluten Spektren der Intermediate [72]:

$$b_i(\lambda)=F_c\cdot\sum_{j=i}^{n}a_{ji}\cdot\Delta\varepsilon_j(\lambda) \qquad (9)$$

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

$$\Delta\varepsilon_i=\frac{b_i(\lambda)-\sum_{j=i+1}^{n}a_{ij}\cdot\Delta\varepsilon_j(\lambda)}{a_{ii}\cdot F_c} \qquad (10)$$

Die absoluten Spektren ε_i ergeben sich durch Addition des experimentell leicht zugänglichen Spektrums des Grundzustandes ε_0:

$$\varepsilon_i=\Delta\varepsilon_i+\varepsilon_0\ . \qquad (11)$$

Ein prinzipielles Problem bei der Ableitung eines kinetischen Modells des Photozyklus aufgrund absorptionsspektrometrischer Daten ist, daß die experimentell gewonnenen Informationen zur eindeutigen Bestimmung des Systems nicht ausreichen, d.h. die Zahl der unbekannten Größen übertrifft die Zahl der bekannten Größen. Durch die freie Wählbarkeit von Parametern, sind generell mehrere Modelle in der Lage, die Meßdaten mathematisch zu erklären. Daher ist es wichtig, sorgfältig zu überprüfen, ob ein Reaktionsschema physikalisch

sinnvolle Vorhersagen zuläßt. Hierbei ist die Analyse des Photozyklus bei verschiedenen Temperaturen eine wichtige Kontrolle: Erstens sollten sich die aus dem Modell abgeleiteten Spektren der Intermediate ε_i nicht signifikant ändern, wenn im betrachteten Temperaturbereich sich weder die Struktur des Proteins noch der Reaktionsweg neu gestaltet. Zweitens kann man über die Temperaturabhängigkeit leicht feststellen, ob die apparenten Geschwindigkeitskonstanten ein physikalisch realistisches Verhalten aufweisen, was gleichzeitig zur Kontrolle der Ergebnisse der multiexponentiellen Datenanalyse dient. Desweiteren können die Aktivierungsparameter der einzelnen Reaktionsschritte des Modells abgeschätzt werden. Eine lineare Regression auf Grundlage der empirischen Arrheniusgleichung (11) liefert einen Näherungswert der Aktivierungsenergie E_a.

$$\ln k = \ln A - (E_a / RT) \tag{11}$$

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

Durch eine nichtlineare Analyse basierend auf der Eyringgleichung (12) nach der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme, lassen sich die Aktivierungsenthalpie $\Delta H^{\#}$ und -entropie $\Delta S^{\#}$ ebenfalls abschätzen:

$$k = \frac{k_b T}{h} e^{-\Delta H^{\#}/RT} e^{\Delta S^{\#}/R} \tag{12}$$

k_b stellt die Boltzmannkonstante, h die Planckkonstante, R die Allgemeine Gaskonstante dar.

Die Bestimmung der Anzahl und Konzentration der spektroskopisch unterscheidbarer Intermediate S_i aus den absoluten Absorptionspektren ε_i erfolgt durch Anpassung der Spektren mit einer globalen Multi-Gauss-Anpassungsfunktion mit dem Program IGORPro v4.0 (Wavemetrics, Inc., Lake Oswego, USA). Hierzu werden die absoluten Spektren durch asymmetrische Gaussfunktionen (Gl. 1, Abschn. 2.6.1) für alle sechs Temperaturpunkte simultan beschrieben. In einem ersten Schritt wird die Raleighlichtstreuung und die Absorption der aromatischen Aminosäuren im nahen UV-Bereich ausgehend vom statischen Absorptionsspektrum bestimmt und von den Absolutspektren subtrahiert. Die Anzahl der notwendigen als auch hinreichenden Gaussfunktionen richtete sich danach, ob sich die

Standardabweichung der Annäherungsfunktion nach Hinzufügen einer weiteren Gausskurve signifikant verbessern lässt. Desweiteren wird angenommen, dass die erste kinetische Komponente P_1 ein einziger spektraler Zustand S_1 mit einer zusätzlichen Chromophor β-Bande darstellt. Die Annahme, dass in den beiden letzten kinetischen Zuständen P_{5-6} der Beitrag von S_1 vernachlässigbar gering ist, stellt das Kriterium einer unidirektionalen Photoreaktion erster Ordnung sicher.

Die Konzentration der spektroskopisch unterscheidbaren Intermediate S_i wird daraufhin aus den Amplituden der Gauss'schen-Annäherungsfunktionen mittels linearer Regression bestimmt. Die Bildungsethalpie $\Delta H^{\#}$ und –enthropie $\Delta S^{\#}$ der spektroskopisch unterscheidbaren Intermediate S_i der kinetischen Zustände P_i können mit Hilfe der van't Hoff Gleichung berechnet werden. Hierzu wird das Programm Origin Ver6.0 (OriginLab Corp. Northampton, MA, USA) verwendet. Es gilt für die Assoziationskonstanze K_a der beiden Spezies A und B im thermodynamischen Gleichgewicht:

$$K_a = \frac{[B]}{[A]} = \exp\left(\frac{-\Delta H^{\#}}{RT} + \frac{\Delta S^{\#}}{R}\right) \qquad (13)$$

2.6.3 Ladungstransportmessungen mit pH-sensitivem Farbstoff

Für zeitaufgelöste Ladungstransportmessungen wurde das in Lipide rekonstituierte Protein ($OD_{\lambda max}$ = 1) zum vollständigen Entfernen von Pufferlösung 3x mit 1 VÄ 100 mM NaCl gewaschen (30 min, 100.000xg, 4°C) und in 100 mM NaCl aufgenommen. Nach Zusatz von 0.5 mM Pyranin (Molecular Probes, Leiden) wurde der pH der Proteoliposomensuspension mit verdünnter NaOH bzw. HCl so eingestellt, dass die Amplituden der Absorptionsmaxima der deprotonierten und protonierten Pyraninspezies bei 400 nm und 450 nm vergleichbar sind (pH ~ 7.5). Die zeitaufgelösten Absorptionsmessungen erfolgten bei den charakteristischen Wellenlängen des verwendeten Proteins und zusätzlich bei 450 nm für den Pyranin-Farbstoff.

2.6.4 Ladungstransportmessungen an Planaren Lipid Doppelschichten

Ladungstransportvorgänge von PR und Mutanten erfolgte an einer „Black Lipid Membrane“ (BLM) Apparatur. Der schematische Aufbau der Meßapparatur sowie die Anlagerung von Proteoliposomen an die BLM ist in Abb. 2.2 schematisch dargestellt [75].

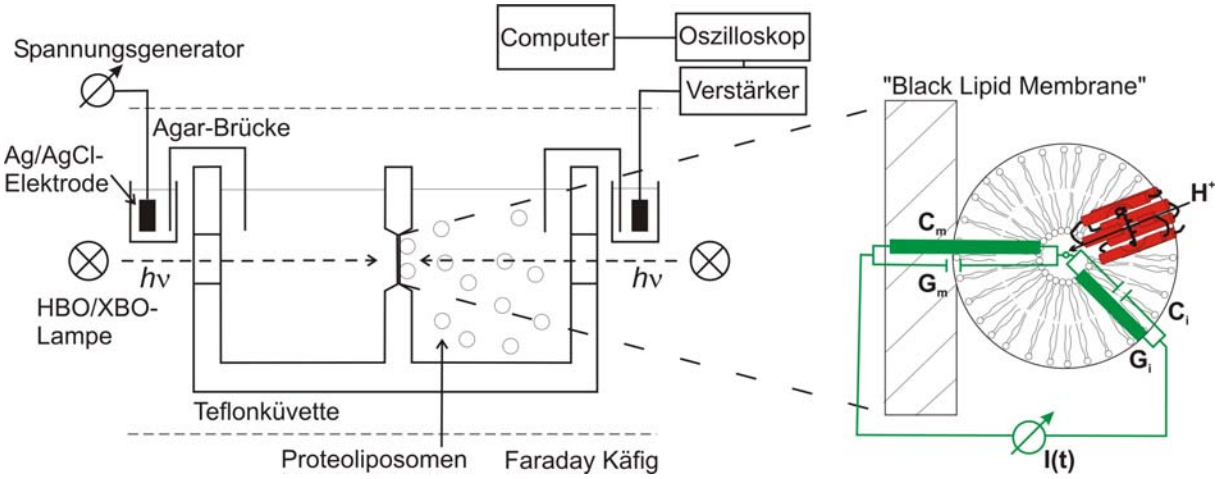


Abb 2.2: Schematische Darstellung der BLM-Apparatur. G_m und G_i stellen die Leitfähigkeiten der BLM und der Proteoliposomen dar. C_m und C_i sind deren korrespondierende Kapazitäten.

Im Falle der lichtgetriebenen Protonenpumpe bR ist die Orientierung, bei der die extrazelluläre Seite des bR zur BLM zeigt, bevorzugt. Durch die kapazitive Kopplung der proteinhaltigen Proteoliposomen mit der BLM lassen sich mit dieser Anordnung die Photoströme analysieren. Der kapazitive Strom I(t) kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{, mit} \quad I_0 = I_{p0}\frac{C_m}{C_m + C_i} \quad \text{und} \quad \tau = \frac{C_m + C_i}{G_m + G_i} \tag{15}$$

I_0 ist der Anfangsstrom, der im Falle einer Ionenpumpe exponentiell in einen stationären Photostrom I_{p0} abfällt, welcher durch die Aktivität des Proteins und der Kapazität der BLM (C_m) sowie der proteinhaltigen Membran (C_i) bestimmt wird. τ stellt die Systemzeitkonstante dar, die von C_m, C_i und deren korrespondierenden Leitfähigkeiten G_m und G_i abhängt. Bei der verwendeten Meßapparatur liegt der Wert von τ bei 0,9 – 1 sec. Stationäre Photoströme können bei dieser Anordnung nur detektiert werden, wenn die Leitfähigkeit der BLM durch

Zugabe von Entkopplern, wie dem elektroneutralen Na^+-Ionophor Monensin oder dem Protonophor 1799, von ~10^{-9} S/cm^2 auf ~10^{-6} S/cm^2 vergrößert wird.

Zur Messung von Photoströmen wird eine Teflonkammer mit UV-durchlässigen Fenstern verwendet, welche in zwei Hälften geteilt ist, die durch eine kreisrunde Öffnung (~ 1 mm Durchmesser) miteinander verbunden sind. Beide Kammerhälften sind jeweils über Agar-Salzbrücken mit einer Ag/AgCl-Elektrode verbunden, die in eine 100 mM NaCl-Lösung taucht. Eine Elektrode ist mit einem Spannungsgenerator gekoppelt, die andere ist über einen Verstärker, der die Daten an einen Rechner übermittelt, mit einem Oszilloskop verbunden,.

Zur Herstellung der BLM wurden die Öffnung beidseitig mit je 1.5 µl 1.5 % Diphytanolyphosphatidylcholin in n-Dekan benetzt und getrocknet. Beide Seiten wurden mit 1.3 ml des Messpuffers gefüllt und mit 3 µl Lipidmischung (1.5 % Diphytanoylphosphatidyl-cholin/Octadecylamin 60:1 (v/v) in n-Decan) versetzt. Die eingebrachte Lipidmischung verschliesst die Kammeröffnung filmartig. Bei erfolgreicher Ausbildung der BLM wurde die Leitfähigkeit G und die Kapazität C über das Anlegen einer Spannung von 100 mV bzw. einer Dreiecksspannung von ± 5 mV bestimmt. Leitfähigkeit G und Kapazität C der BLM lagen etwa bei G = 0,01-0,05 nS und C = 3 nF.

BLM-Messungen mit PR wurden durch Zugabe von 25 µl rekonstituiertes Protein (OD_{520} = 1-2) in eine der beiden Kammern und etwa 30 minütiges moderates Rühren durchgeführt. Nach erfolgreicher Anlagerung an der Proteoliposomen die BLM konnten die kapazitiven Photoströme durch Belichtung der Kammer mittels einer HBO-Lampe (von links) (2 W/cm^2) und einer XBO-Lampe (von rechts) ermittelt werden. Die Wellenlängenselektion erfolgte durch Filter. Zur Ermittlung der stationären Signale wurden die elektroneutralen Ionophore 1799 (2,6-Dihydroxy-1,1,1,7,7,7-hexafluoro-2,6-bis-trifluoromethylheptan-4-on, 4 µM) und Monensin (4 µM) zugesetzt, welche die Leitfähigkeit der BLM je nach Meßbedingung auf etwa G = 1 – 50 nS erhöhen.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro* Expression von Membranproteinen

Die zellfreie Synthese von Membranproteinen erfolgt in einem gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/ Translationssystem auf der Basis von T7-RNA-Polymerase und S30-Extrakten aus *E.coli* D10 Zellen mit geringer endogener RNase-Aktivität (Gesteland, 1966). Die Verwendung eines prokaryontischen *E.coli* Zellextrakts begründet sich damit, dass sich ein Teil der zu untersuchenden Proteine (bR, *Np*hR und *Np*sRII) heterolog in *E.coli* in ihrer funktionellen Form überexprimieren lassen [76] [77].

Das isolierte *E.coli* S30-Extrakt besitzt alle notwendigen Komponenten des Proteinbiosynthese-Apparates (Ribosomen, Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren). Die Verwendung eines gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/ Translationssystem bei dem die mRNA über den gesamten Inkubationszeitraum mit einer effizienten RNA-Polymerase synthetisiert wird, hat den Vorteil, dass vorhandene RNase-Aktiviät nicht der limitierenden Faktor im zellfreien Synthesesystem.

3.1.1 Proteolytischer Abbau zur Detektion von Membraninstertion

Die Detektion der Membraninsertion von politopen Membranproteinen kann durch selektiven proteolytischen Abbau mit der unspezifischen Serinproteinase Proteinase K analysiert werden. Abb. 3.1 zeigt schematisch am Beispiel eines 7-Transmembran Helixrezeptors den selektiven Abbau von Loop-Bereiche, welche sich ausserhalb der Membran befinden und somit zugänglich für Proteinasen sind. Nach Inhibierung der Proteinase durch den irreversiblen Serinproteaseinhibitor PMSF und SDS-Gelanalyse können die resultierenden Peptidbanden den Bereichen zugeordnet werden, die nicht zugänglich für proteolytischen Abbau sind. Das apparente Molekulargewicht der Abbaubanden sowie deren Anzahl ist ein Hinweis auf Membraninsertion.

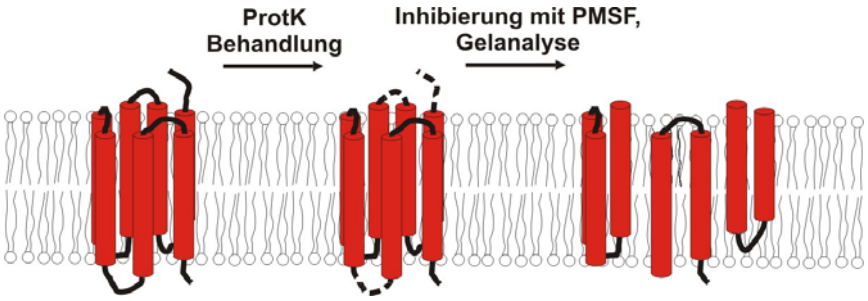


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des proteolytischen Abbauassays zur Detektion von Membraninsertion am Bespiel eines 7TM-Helix-Rezeptors. Zugängliche Bereiche von integralem Membranprotein wird durch Zugabe von Proteinase K gespalten. Nach Inhibierung von Proteinase K durch PMSF und darauffolgender SDS-PAGE des Reaktionsansatzes können die detektierten Banden membraninsertierten beziehungsweise für die Proteinase nicht zugänglichen Proteinbereichen zugeordnet werden.

Der proteolytische Abbauassay wird am Beispiel von vier gereinigten Proteinen mit Proteinase K durchgeführt darunter bR in PM-Lipiden (zur Verfügung gestellt von A. Göppner, MPI Dortmund), *Np*sRII, *Np*hR (gereinigtes Protein zur Verfügung gestellt von Dr. J. Klare, MPI Dortmund) und PR rekonstituiert in DOPC-Lipid.

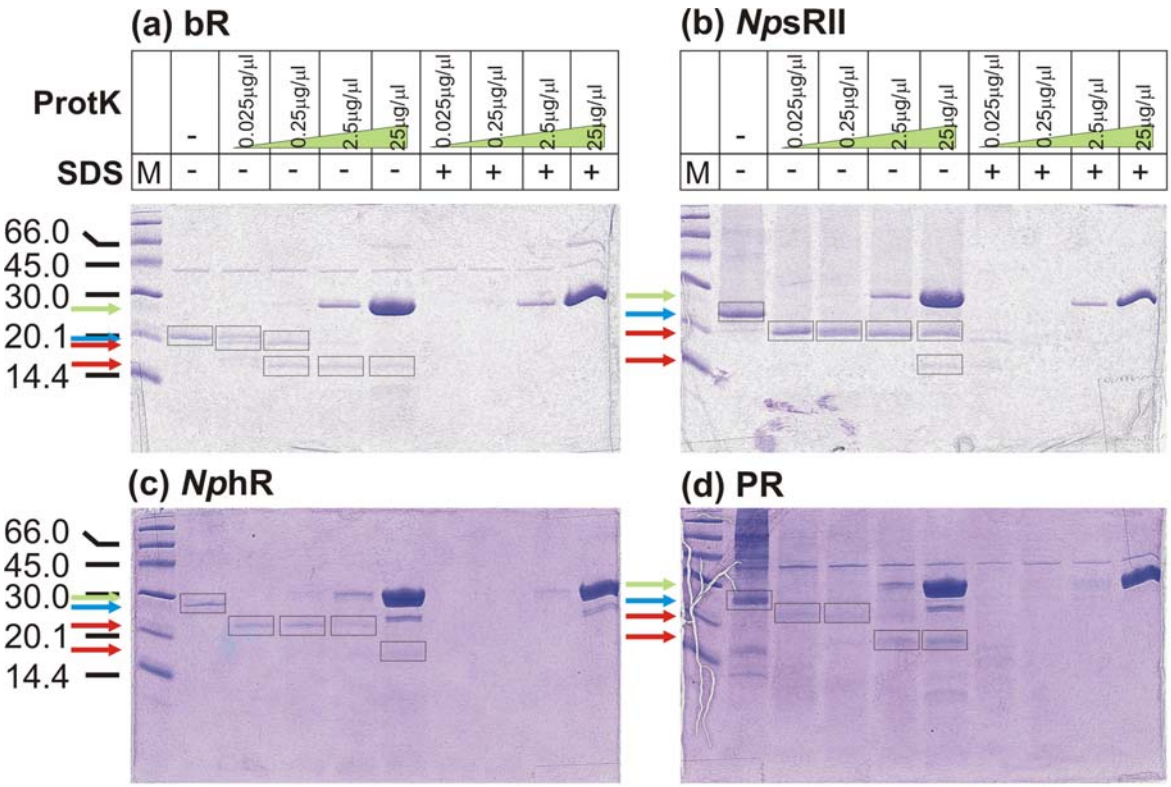


Abb. 3.2: SDS-PAGE Analyse (Coomassie gefärbt) des proteolytischen Abbaus von bR in PM (a) sowie *Nps*RII (b), *Nph*R (c), PR (d) rekonstituiert in DOPC-Lipid ohne und mit steigender Konzentration an Proteinase K (0, 0.025, 0.25, 2.5, 25 µg/µl im Reaktionsansatz). Jeweils ohne denaturierendes Detergenz und in Gegenwart von 0.1 % (w/v) SDS im Proteolyseansatz. Inkubation erfolgte für zwei Stunde bei 37°C. Die Proteinbanden für das jeweils eingesetzte Membranprotein sind durch blaue Pfeile gekennzeichnet, die jeweiligen zu detektierenden proteolytische Abbaubanden sind durch rote Pfeile hervorgehoben, zusätzlich sind die entsprechenden Banden im Gel durch Markierungen gekennzeichnet. Die eingesetzte Proteinase K (grüne Pfeile) besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 29 kD. Markerbanden sind in kD angegeben.

Die Proteolyse der Membranproteine zeigt proteinspezifische Abbaubanden mit unterschiedlichem apparenten Molekulargewichten an. Die enzymatische Spaltung in den Loop-Bereichen der verwendeten Proteine ist abhängig von der Reaktionszeit, Inkubationstemperatur, der Menge an eingesetztem Enzym sowie der relativen Zugänglichkeit der Loop-Bereiche für Proteinase K. Optimale Bedingungen für die vier untersuchten Proteine, liegen bei 2 Std., 37°C, und einer eingesetzten Proteinase K-Konzentration von 2.5 µg/µl (spezifische Aktivität 2.5 U/mg). Für bR (21 kD) kann unter diesen Bedingungen eine Abbaubande mit einem apparenten Molekulargewicht von 16 kD detektiert werde (roter Pfeil). Für *Nps*RII (24 kD), liegt die Abbaubande bei 19 kD und bei *Nph*R (28 kD) bei 22 kD. Bei höheren Konzentrationen an Proteinase K (25 µg/µl) wird das Proteolyseprodukt von

*Np*hR weiter abgebaut und es entsteht eine Bande mit apparentem Molekulargewicht von 16 kD. In diesem Fall ist im Gel deutlich eine zusätzliche, vermutlich durch Autoproteolyse entstandene, Bande von Proteinase K zu erkennen (25 kD). Im Falle von PR (27 kD) sind neben der dominanten Proteinbande bei 27 kD mehrere höhermolekulare Banden (Aggregatbanden, Verunreinigungen) zu detektieren. Bei Zusatz von niedrigen Proteinase K Konzentrationen (< 2.5 µg/µl) entsteht ein Abbauprodukt mit 22 kD, bei Proteinase K Konzentrationen von 2.5 µg/µl oder mehr ein Abbauprodukt von 17 kD. SDS-denaturiertes Protein wird hingegen schon bei geringsten Mengen von Proteinase K (< 25 ng/µl) komplett abgebaut und kann im Coomassie gefärbten Proteingel nicht nachgewiesen werden. Die Abbaubanden nach Proteolyse von Detergenz solubilisierten Proteinen in Triton X-100 für bR bzw. DDM für *Np*sRII, *Np*hR und PR ist qualitativ vergleichbar mit den Abbaubanden von rekonstituierten Proteinen und unterstreicht die generelle Anwendbarkeit des proteolytischen Assays mit Proteinase K zur Detektion der Insertion einer Polypeptidkette in eine hydrophobe Umgebung.

3.1.2 Optimierung des zellfreien Expressionssystems

Die zellfreie Synthese wird in einem ersten Schritt im Hinblick auf maximale Syntheseausbeuten der Genprodukte optimiert. Hierzu werden folgende die Parameter variiert: eingesetzte Menge an linearisierter oder nicht-linearisierter DNA-Matrize, Magnesiumionenkonzentration sowie Inkubationszeit und –temperatur.

1) Optimierung der DNA-Konzentration

Um DNA in ausreichenden Mengen für die zellfreie Synthese herzustellen, werden die entsprechenden kodierenden Sequenzen (bom, *Np*sopII, *Np*hop, PR und hGlyRα1) in „High-Copy“-Plasmide der pUC-Familie umkloniert.

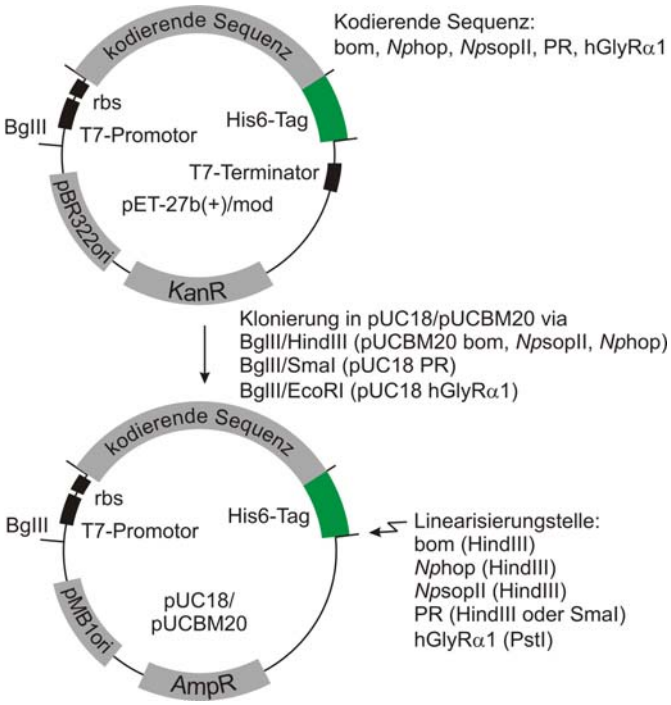


Abb. 3.3: Schematische Dartstellung der Klonierungsstrategie von bom, *Np*sopII, *Np*hop, PR und hGlyRα1 in pUC18/20 „High-Copy"-Plasmid mit rbs: Ribosomale Bindungsstelle, Kan^R und Amp^R: Gen für Kanamycin- bzw. Ampicillinresistenz. Linearisierte DNA wird durch Umsetzung von pUC-Plasmid kloniert mit den Genen bom, *Np*hop und *Np*sopII, PR mit Endonuklease HindIII und für hGlyRα1 mit PstI erzielt.

Die zellfreie Proteinsyntheserate ist stark abhängig von der Reinheit der eingesetzten DNA-Matrize, ob linearisierte oder nicht-linearisierte DNA verwendet wird und muss für jede DNA-Charge neu bestimmt werden. Dazu wird dem Syntheseansatz pUCBM20 bom DNA-Matrize von 0.2 bis 3 µg/15 µl zugesetzt und 80 min bei 37°C inkubiert. Die Syntheseansätze werden anschliessend mittels SDS-PAGE untersucht. Radioaktiv-markierte Protein werden am Phosphoimager detektiert.

Im Radiogramm des SDS-Gels (Abb. 3.4 a,b) werden zwei Hauptproduktbanden detektiert. Eine weniger intensive Bande mit apparentem Molekulargewicht von 29 kD (grüner Pfeil) und eine Hauptproduktbande mit 21 kD (roter Pfeil). Die rot markierte Hauptproduktbande ist dem erwarteten bOp^{cf} (apparentes Molekulargewicht 21 kD) zuzuordnen. Die 29 kD-Bande entspricht vermutlich ^{14}C-Leucin markierter β-Lactamase, welches auch bei Abwesenheit von T7-RNA-Polymerase im Reaktionsansatz weiterhin zu detektieren ist (vergl. Abb. 3.13). Dies war zu erwarten, da das Amp^R-Gen, welches für β-Lactamase kodiert, unter der Kontrolle des lac-Promotors liegt. Dieser wird von *E.coli* endogener RNA-Polymerase erkannt, welche im S30-Lysat noch vorhandenen zu sein scheint. Bei Zusatz von Rifampizin, einem Inhibitor der *E.coli* endogenen RNA-Polymerase, kann jedoch keine Verbesserung der zellfreien Synthese des gewünschten Genprodukts beobachtet werden. Im Gegenteil stört Rifampizin aufgrund seiner Absorption im visuellen Bereich deutlich bei den spektroskopischen Messungen.

Die Quantifizierung der radioaktiven Intensitäten der Hauptproduktbanden erfolg densitometrisch. Die normalisierten Intensitäten pro mm^2 werden gegen die eingesetzte Menge an DNA aufgetragen (c).

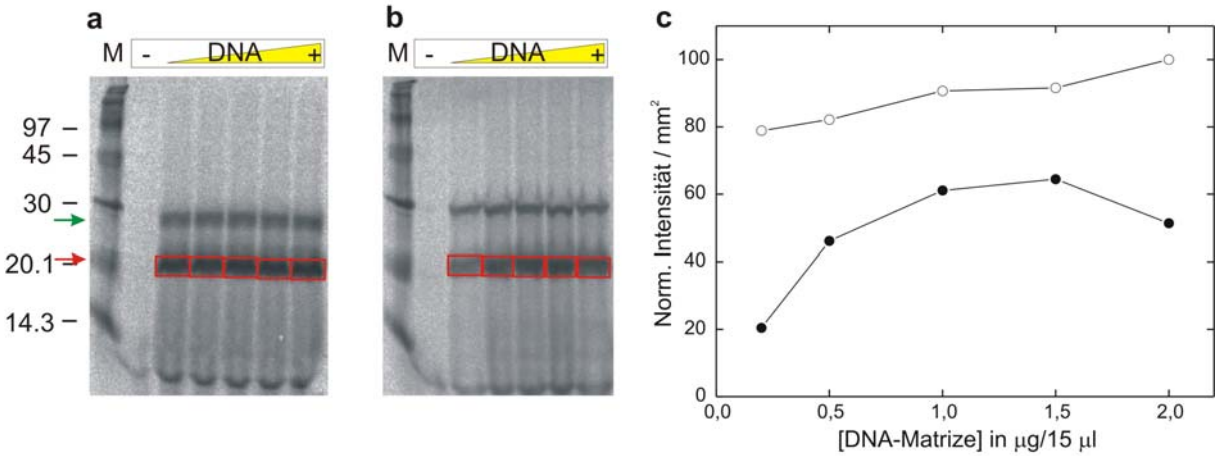


Abb. 3.4: Radiogramm der SDS-PAGE von *in vitro* Proteinsyntheseansätze in *E.coli* S30 Extrakten bei Zusatz unterschiedlicher Mengen an ungeschnittener pUCBM20 bom DNA (a) und HindIII-linearisierter DNA (b) in Gegenwart von 13.3 mM $Mg(OAc)_2$. Densitometrische Auswertung der Intensitäten der bOp^{cf} zugeordneten 21 kD-Proteinbande (rot gekennzeichnet) in Abhängigkeit der DNA-Menge 0.2, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.25, 3.0 µg/15 µl pUCBM20 bom DNA ungeschnitten (o) und HindIII-linearisiert (•). Um Bandenintensitäten aus den beiden Gelen zu Vergleichen wird nach Abzug des Hintergrunds auf die 30 kD Markerbande normiert.

Die densitometrische Auswertung der bOp^{cf} Proteinbanden zeigt, eine konzentrationsabhängige Zunahme der Intensität des Genprodukts in Gegenwart von steigenden Konzentrationen nicht-linearisierter DNA-Matrize im Reaktionsansatz. Über 1.5 µg nicht-linearisierter DNA/15 µl ist die Abhängigkeit jedoch nur gering. Für linearisierte DNA ist eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit zu detektieren, obschon die Intensitäten des Genprodukts über den gesamten Konzentrationsbereich deutlich geringer sind. DNA-Konzentrationen über 1.5 µg linearisierter DNA/15 µl führen hingegen zu einer Verringerung der Intensität des Genprodukts, vermutlich aufgrund von Verunreinigungen der DNA-Matrize. Aufgrund der höheren Syntheseausbeuten in Gegenwart von nicht-linearisierter DNA, wird diese für alle weiteren Experimente in einer Konzentration von 1.5 µg/15 µl eingesetzt.

2) Optimierung der Magnesiumkonzentration

Nach Optimierung der DNA-Konzentration wird die Magnesiumkonzentration im Syntheseansatz variiert um eine maximale Ausbeute an *in vitro* synthetisiertem Protein zu erzielen. Hierzu wird die Konzentrationen an $Mg(OAc)_2$ im zellfreien Syntheseansatz von 0-20 mM eingestellt und in Gegenwart von 1.5 µg/15 µl pUCBM20 bom DNA bei 37°C, 80 min inkubiert. Die Reaktionsansätze werden mittels SDS-Gel analysiert.

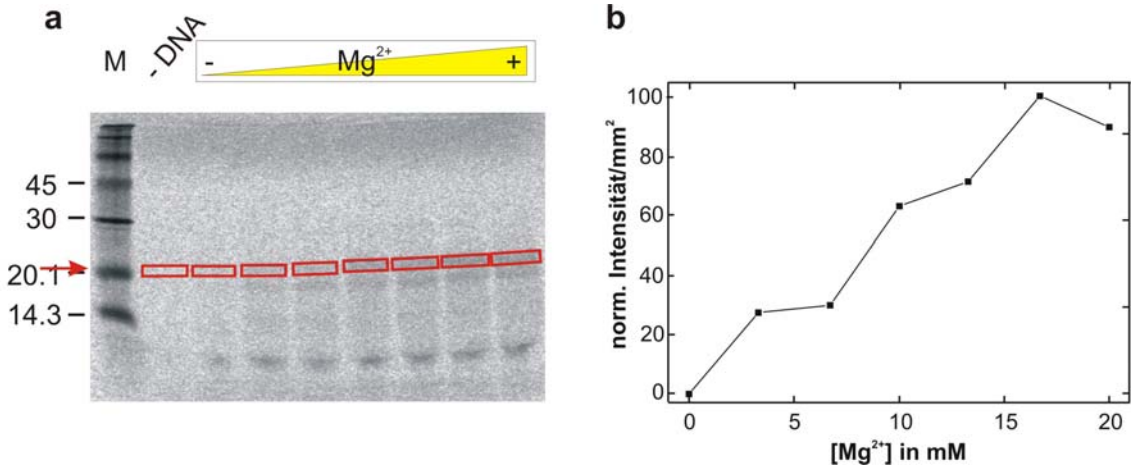


Abb. 3.5: Abhängigkeit der zellfreien Proteinsynthese von der Magnesiumionenkonzentration. Radiogramm der SDS-PAGE (a) und densitometrische Auswertung der Synthesebanden (rot gekennzeichnet) (b) von *in vitro* Proteinsyntheseansätze in *E.coli* S30 Extrakten mit 1 µg/15 µl Hind III-linearisierter pUCBM20 bom DNA bei Zusatz von 0, 3.3, 6.7, 10, 13.3, 16.7, 20 mM $Mg(OAc)_2$.

Eine maximale Syntheseausbeute wird bei Zusatz von 15 mM $Mg(OAc)_2$ und 1.5 µg/15 µl nicht-linearisierte Plasmid-DNA erzielt. Vor allem im höheren Bereich der Konzentrationen von Mg^{2+} und DNA zeigt die Syntheseausbeute nur geringe Abhängigkeiten.

3) Optimierung der Reaktionszeit und Inkubationstemperatur

Unter den Bedingungen einer optimierten Magnesiumionen und DNA-Konzentration wird auch die Auswirkungen von jeweils drei Inkubationstemperaturen (25, 31, 37°C) und Reaktionszeiten (20, 80, 160 min) bei der zellfreien Synthese untersucht.

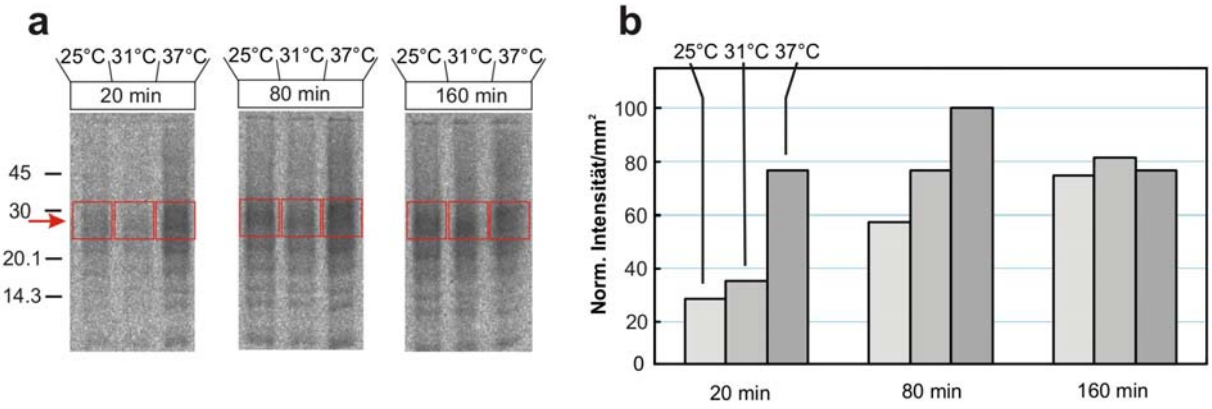


Abb. 3.6: Abhängigkeit der zellfreien Proteinsynthese von der Inkubationstemperatur und -zeit in Gegenwart von 1 µg/15 µl HindIII-linearisierter pUCBM20 *Np*hop DNA bei 25, 30 und 37°C nach 20, 80, 160 min. Radiogramm der SDS-PAGE (a) und densitometrische Auswertung (b) der Synthesebanden (rot gekennzeichnet).

Ein Vergleich der *in vitro* Proteinsynthese nach 20, 80 und 160 min zeigt ein Optimum bei 80 min und 37°C. Längere Inkubationszeiten (> 80 min) bei 37°C führen zu keiner deutlichen Verbesserung der zellfreien Synthese. Im Gegenteil ist die Proteinintensität nach 160 min und 37°C um etwa 1/3 geringer als nach 80 min. Vermutlich ist das Syntheseprodukt aufgrund von vorhandener proteolytischer Aktivität im Reaktionsansatz bei längeren Inkubationszeiten instabil. Bei niedrigeren Temperaturen (25, 30°C) läuft die zellfreie Synthese deutlich langsamer ab und zeigt geringere Proteinintensitäten. Für eine optimale Syntheseausbeute wird deshalb die zellfreie Synthese bei einer Inkubationstemperatur und –zeit von 80 min und 37°C für alle weiteren Experimente durchgeführt.

3.1.3 Einfluß von Amphililen

Zur Stabilisierung von zellfrei exprimierten Membranproteinen wird zunächst der Einfluss von Detergenzien untersucht. Stark verdünnt liegen Detergenzien als Monomere in Lösung vor, sobald jedoch eine detergenzspezifische Konzentration (CMC) überschritten wird bilden sich Detergenzmizellen aus, die in der Lage sind Membranen zu solubilisieren und darin enthaltende Proteine in Lösung zu halten. Die maximal einsetzbare Konzentration von Detergenzien im zellfreien Syntheseansatz ist abhängig von den biochemischen Eigenschaften des Amphiphils und wird mittels eines Filterbindungsassays von radioaktivmarkiertem Protein bestimmt. Hierzu werden sechs Detergenzien Triton X-100, DDM, OG, CHAPS, Na-DOC und CTAB in jeweils 8 unterschiedlichen Konzentrationen dem Syntheseansatz

zugesetzt. Die chemische Struktur der verwendeten Detergenzien sowie deren Zuordnung zu Nicht-ionischen, Zwitterionischen und negativ oder positiv ionisierten Amphiphilen ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

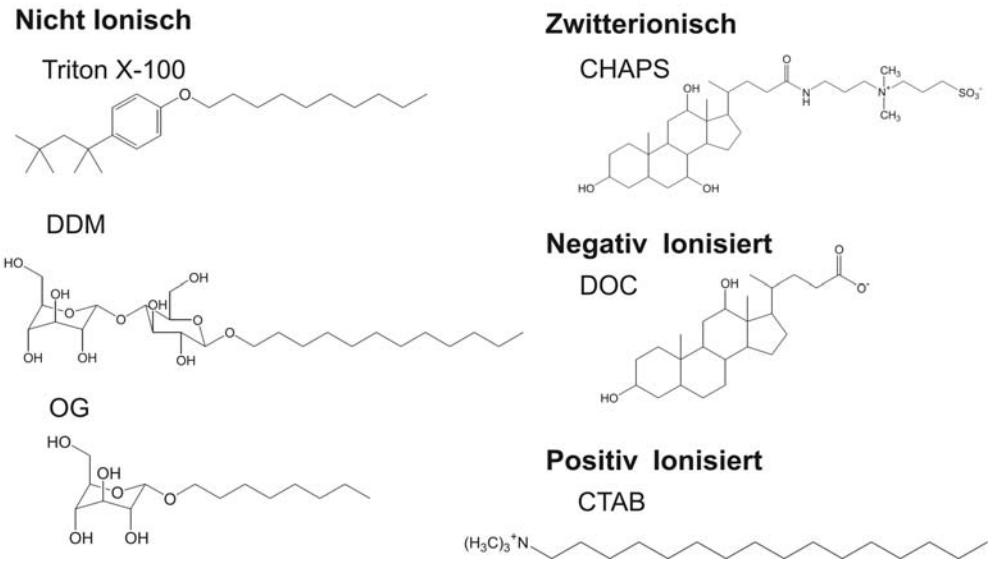
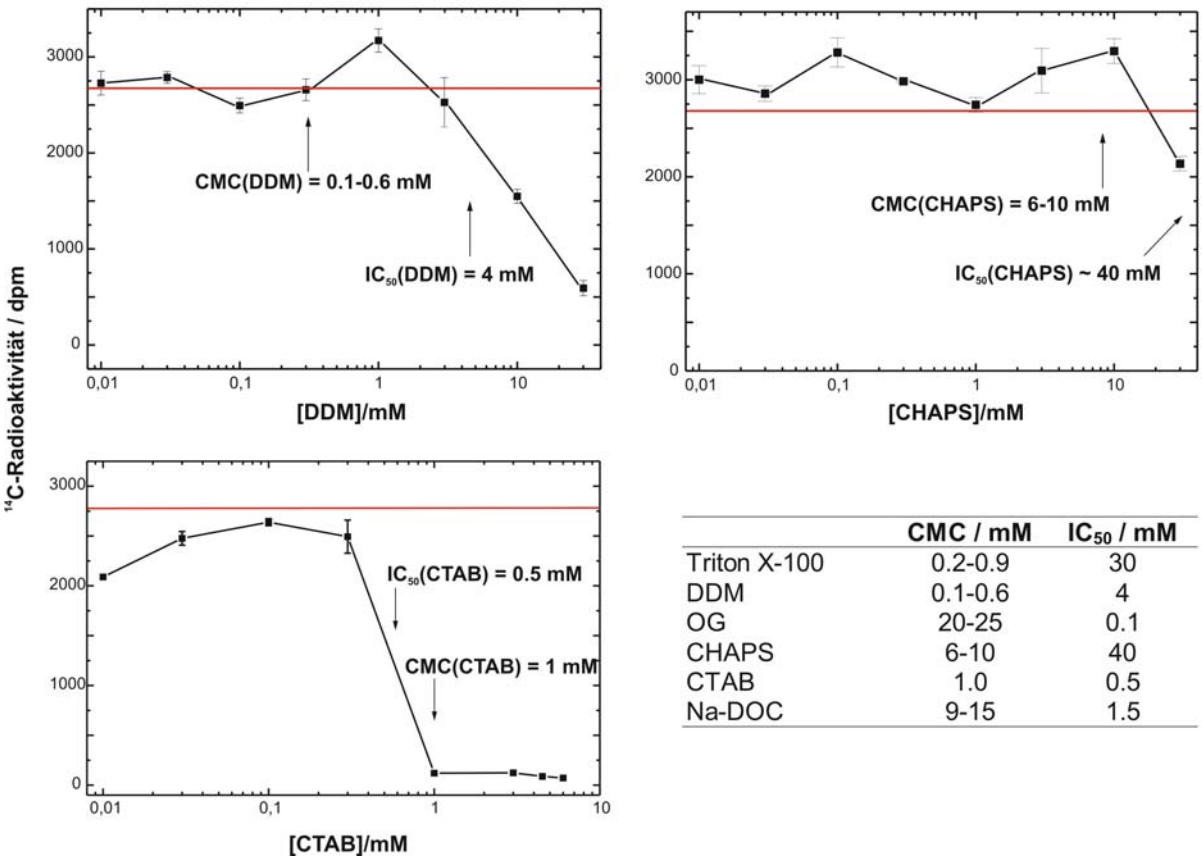


Abb. 3.7: Chemische Struktur der in der zellfreien Synthese eingesetzten Detergenzien Triton X-100, DDM, OG, CHAPS, Na-DOC und CTAB.

Die zellfreie Synthese erfolgt bei 37°C für 80 min in Gegenwart von 1.5 µg/µl pUCBM20 bom DNA und 15 mM $Mg(OAc)_2$. Die Detergenzkonzentration bei der noch die halbmaximale Syntheseausbeute (IC_{50}) erzielt werden kann ist in Abb. 3.8 zusammengefasst mit den entsprechenden kritischen Mizellenkonzentartionen (CMC) für jedes Detergenz.



	CMC / mM	IC$_{50}$ / mM
Triton X-100	0.2-0.9	30
DDM	0.1-0.6	4
OG	20-25	0.1
CHAPS	6-10	40
CTAB	1.0	0.5
Na-DOC	9-15	1.5

Abb. 3.8: Abhängigkeit der *in vitro* Proteinsynthese von der Detergenzkonzentration. Detektion von radioaktiv markiertem Protein mittels Filterbindungsassays (Dreifachbestimmung) bei Zusatz von 1 µg/15 µl pUCBM20 bom HindIII DNA. Exemplarisch für das ungeladene Detergenz DDM, zwitterionische CHAPS und positiv ionisierte CTAB. Die zellfreie Syntheseausbeute ohne Detergenz ist als rote Line gekennzeichnet. Vergleich der CMC der verwendeten Detergenzien in H_2O bei 20-25 °C (Calbiochem Biochemicals Katalog) mit dem beobachteten IC_{50}–Werten (links unten).

OG und CTAB stören die *in vitro* Synthese bereits bei sehr geringen Konzentrationen unter 1 mM, wohingegen Triton X-100 und CHAPS sogar bei Konzentrationen über 1 mM keinen inhibierenden Einfluss auf die Syntheserate zeigt. Im Gegenteil kann im Falle von CHAPS bei Konzentrationen unterhalb der CMC sogar eine höhere Syntheserate detektiert werden, was auf einen stabilisierenden Einfluss von CHAPS auf die Proteinsynthese hindeutet. Bei Verwendung von Na-DOC fiel ein farbloser Niederschlag im Reaktionsansatz aus, vermutlich durch Komplexierung von DOC mit zweiwertigen Metallkationen (Mg^{2+} bzw. Ca^{2+}). Ein Vergleich des IC_{50} - Wertes mit der CMC zeigt, daß bis auf OG, die CMC kleiner oder gleich ist als der IC_{50}.

Der stabilisierende Einfluss der sechs Detergenzien auf die funktionelle Faltung von bR wird daraufhin mittels des vorher optimierten proteolytischen Abbaus mit Proteinase K untersucht.

Dazu wird dem zellfreien Syntheseansatz die maximale Detergenzkonzentration hinzugesetzt, die noch keinen inhibierenden Einfluss auf die Syntheseausbeute zeigt. Nach Inkubation bei 37°C für 80 min wird jeweils die Hälfte des Reaktionsvolumens (7 µl) mit 2.5 µg/µl Proteinase K versetzt und nach Inhibierung der Protease mit PMSF mittels SDS-PAGE und Detektion der radioaktiven Proteinbanden am Phosphoimager analysiert.

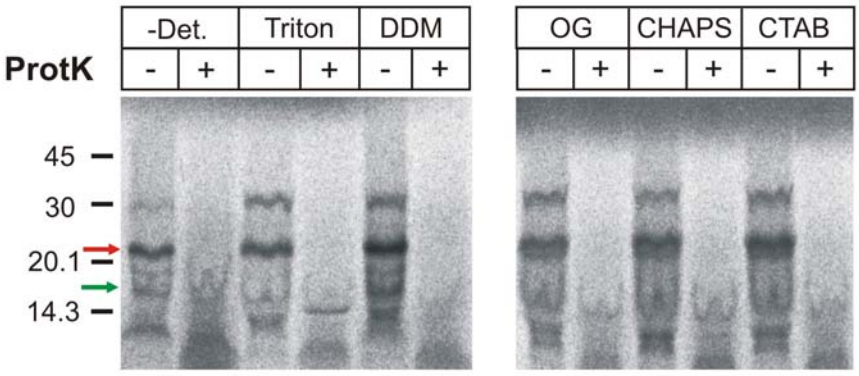


Abb. 3.9: Radiogramm der SDS-PAGE der zellfreien Expression von bR^{cf} in Gegenwart der Detergenzien [Triton X-100] = 10 mM, [DDM] = 1 mM, [OG] = 4 mM, [CHAPS] = 15 mM, [CTAB] = 0.1 mM sowie 100 µM *all-trans* Retinal. Die bR^{cf} Proteinbande (roter Pfeil) und die erwartete 16 kD Abbaubande nach Poteinase K-Behandlung (grüner Pfeil) sind gekennzeichnet.

Das Radiogramm der zellfreien Synthese von bR^{cf} in Gegenwart von Triton X-100, DDM, OG, CHAPS und CTAB zeigt bei allen Proben eine dominante Bande mit dem apparenten Molekulargewicht von 21 kD vor Proteinase K-Behandlung, die dem bR^{cf} Genprodukt zugeordent werden kann (roter Pfeil), die weitere 30 kD Proteinbande ist, wie bereits beschrieben, β-Lactamase zuzuordnen. Nach Proteolyse der Reaktionsansätze mit Proteinase K kann jedoch für keines der verwendeten Detergenzien eine Abbaubande mit einem erwarteten Molekulargewicht von 16 kD detektiert werden (grüner Pfeil). Die Verwendung der sechs Detergenzien unterhalb des IC_{50}-Wertes ist für eine Stabilisierung des synthetisierten Polypeptidkette somit nicht geeignet. Das synthetisierten bR^{cf} wird nach Proteinase K Behandlung komplett abgebaut und liegt vermutlich als falsch gefaltetes Protein im Reaktionsansatz vor.

3.1.4 Einfluss von Lipiden und Faltungshilfsproteinen

Zur Stabilisierung des zellfrei synthetisierten bR^{cf} wird der Einfluss von Lipiden im Reaktionsansatz untersucht. In einem ersten Schritt wird hierzu das Inhibitionsverhalten in Gegenwart von Phospholipiden auf die zellfreie Synthese analysiert. Exemplarisch wird eine Konzentrationsreihe von 0 bis 5 mg/ml Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) Lipid durchgeführt. Die zellfreie Syntheserate wird mittels Filterbindungsassay bestimmt und ist in Abb. 3.10 gegen die Konzentration an DOPE aufgetragen.

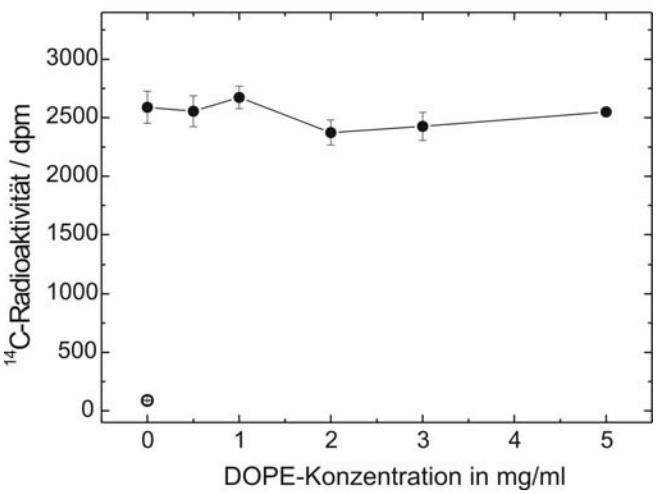


Abb. 3.10: Abhängigkeit der *in vitro* Proteinsynthese von der Lipidkonzentration bei Zusatz von 0, 0.5, 1, 2, 3, 5 mg/ml DOPE im Reaktionsansatz und 1 µg/15 µl pUCBM20 *Np*sopII HindIII (•) sowie ohne DNA (o). Detektion von radioaktiv markiertem Protein erfolgt mittels Filterbindungsassays (Dreifachbestimmung)

Die zellfreie Synthese ist bei Zusatz von DOPE bis zu 5 mg/ml unbeeinflusst. Ein inhibierender Einfluss von DOPE war auch nicht zu erwarten, da DOPE mit 70% der Trockenmasse aller Lipide den Hauptbestandteil der *E. coli* Membran ausmacht. Für alle weiteren Experimente wird eine Liposomenkonzentration im Syntheseansatz von 4 mg/ml eingesetzt, da bei der Präparation von SUVs anderer Phospholipide z.B. DSPC zu beobachten ist, das eine Lipsosmenstammkonzentration von 20 mg/ml eine homogenere Suspension ergibt.

Um ein möglichst breites Spektrum an unterschiedlichen biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von Lipiden und Lipidmischungen zu überprüfen werden folgende Parameter untersucht: Membrandicke, Acylkettenlänge, Oberflächenladung, Phasenübergangstemperatur, Membrankrümmung. Hierzu werden die folgenden Lipide oder Lipidmischungen in Form von Liposomen dem Reaktionsansatz zugesetzt.

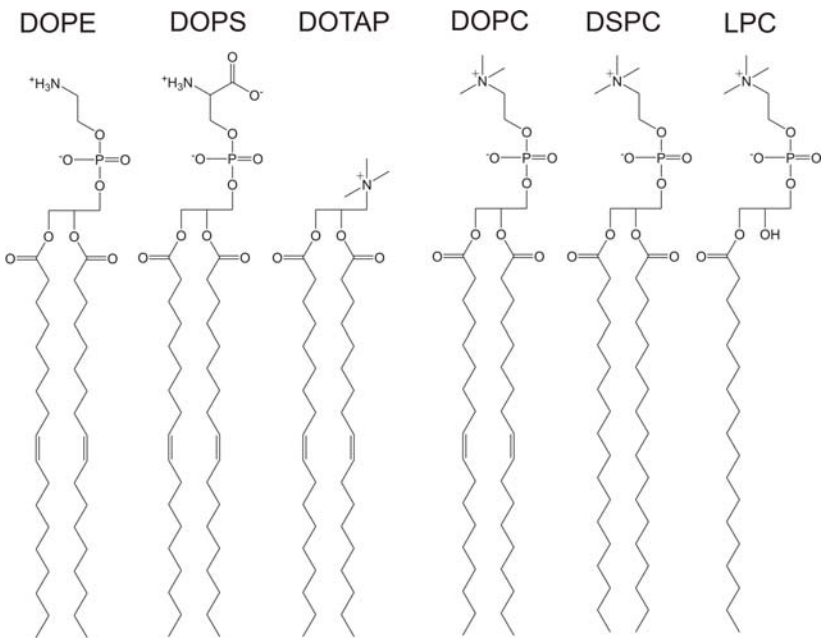


Abb. 3.11: Chemische Struktur der in der zellfreien Synthese eingesetzten natürlich vorkommenden Phospholipiden DOPE, DOPS, DOPC, DSPC und LPC und dem artifiziellen DOTAP

Zusätzlich soll der Einfluss von Faltungshilfsproteinen (Chaperonen) aus dem Archaebakterium *Thermophilus Aquaticus* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Reinstein, MPI Heidelberg) und *Escherichia coli* (Roche, Penzberg) untersucht werden.

1) Acylkettenlänge, Phasenübergangstemperatur, Membranfluidität

In einem ersten Schritt werden die Acylkettenlänge und Phasenübergangstemperatur (T_p) der Lipide variiert. Hierzu werden die Phospholipide DMPC (C14:0) und DSPC (C18:0) mit je zwei gesättigten Acylketten mit 14 x bzw. 18 x C-Atomen und das einfach ungesättige DOPC (C18:1cis9) mit zwei Acylketten mit jeweils 18 x C-Atomen eingesetzt. Eine Zusammenstellung der Phasenübergangstemperaturen verschiedener Phospholipide ist in folgender Tabelle zusammengefasst.

Lipid	Acylkette:Doppelbindungen	T_p in °C
DMPC	C14:0	23
DPPC	C16:0	41
DSPC	C18:0	55
DOPC	C18:1cis9	-20
DOPS	C18:1cis9	-11
DOPE	C18:1cis9	-16

Tab. 1: Acylkettenlänge, Anzahl der Doppelbindungen und Phasenübergangstemperatur T_p der in der zellfreien Synthese verwendeten Phospholipide [78].

Bei den optimierten Inkubationsbedingungen der zellfreien Proteinsynthese (37°C, 80 min) liegen DMPC und DOPC Phospholipide in der physiologisch relevanten fluiden Lα-Phase vor. Da T_p für den Phasenübergang Lα→Lβ von DMPC bei +23°C liegt und T_p von DOPC aufgrund einer zusätzlichen ungesättigten Doppelbindung je Acylkette bei –20°C. DSPC hingegen besitzt wegen zwei langen gesättigten Acylketten eine T_p von +55°C und existiert bei 37°C in der gelartigen Lβ-Phase. Desweiteren wird der Einfluss von Cholesterol analysiert, welches aufgrund seines grossen Steroidgerüstes die Beweglichkeit der Phospholipidacylketten verringert und somit die Energie des Phasenübergangs absenkt, gleichzeitig aber auch die Membrandicke und –fluidität erhöht.

2) Oberflächenladung

Obwohl die Primärsequenz von integralen Membranproteinen im Vergleich zu löslichen Proteinen aus weniger polaren oder geladenen Aminosäuren besteht, können ionische Wechselwirkungen zwischen den Resten dieser Aminosäuren und der Membranoberfläche eine wichtige Rolle bei der Faltung und Funktionalität spielen. Um den Einfluss von Membranoberflächenladung auf die Faltung von zellfrei synthetisiertem bR^{cf} zu untersuchen werden das anionische Lipid DOPS, eines in der Natur am häufigsten vorkommenden negativ geladenen Membranlipids, und das kationische Lipid DOTAP untersucht.

3) Membrankrümmung

Zuletzt wird der Einfluss der Monoschichten ausbildenden Lipide DOPE und Lysophosphatidylcholin (LPC) in einer Mischung mit DOPC analysiert. Sowohl DOPE als

auch LPC erniedrigen den lateralen Membrandruck, indem sie sich asymmetrisch in die Membran von Lipid Vesikeln insertieren. LPC kommt in SUVs, aufgrund seiner einzelnen hydrophoben Acylkette im Vergleich zur grossen Kopfgruppe, vorwiegend auf der äusseren Seite des Vesikel vor [79]. Im Gegensatz dazu ist DOPE, welches eine kleine Kopfgruppe im Vergleich zu den beiden grossen hydrophoben Acylketten besitzt mehr auf der Innenseite vorzufinden.

Die zellfreie Proteinsynthese von bOp^{cf} erfolgt unter den optimierten Reaktionsbedingungen bei 37°C für 80 min in Gegenwart von 4 mg/ml Liposomen präpariert aus DOPC, DMPC, DSPC sowie Lipidmischungen aus DOPC/DOPS, DOPC/DOTAP, DOPC/DOPE, DOPC/LPC und DOPC/Cholesterol. Zusätzlich wird der Einfluss von Chaperon-Mixturen aus *Th.aq.* oder *E.coli* hinzugesetzt. Nach Beendigung der Inkubation und Proteinase K-Behandlung werden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und die radioaktiv markierten Syntheseprodukte detektiert. Die Auswertung der bOp^{cf} zuzuordnenden 21 kD Synthesebande sowie vorhandener Abbaubanden nach Proteolyse erfolgt densitometrisch.

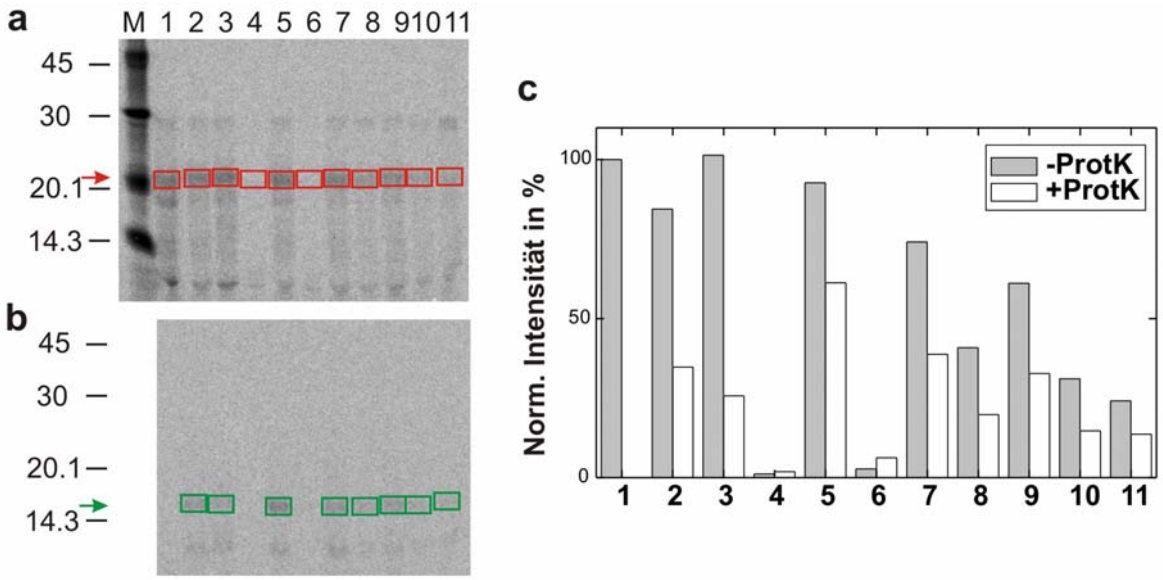


Abb. 3.12: Zellfreie Synthese von bOp^{cf} in Gegenwart verschiedener Lipide sowie Faltungshilfsproteine: (1) Negativprobe ohne Lipid, (2) DOPC, (3) DMPC, (4) DSPC, (5) DOPC/DOPS [90:10], (6) DOPC/DOTAP [90:10], (7) DOPC/DOPE [80:20], (8) DOPC/LPC [95:5] und (9) DOPC/Cholesterol [95:5], (10) DOPC mit *Th.Aq.* Chaperone, (11) DOPC mit *E.coli* Chaperone. Werte in eckingen Klammern geben die molaren Verhältnisse wieder. Radiogramm der SDS-PAGE vor (a) und nach (b) Proteinase K Behandlung Die bOp^{cf} Synthesebanden sind rot markiert, die 16 kD Abbaubanden grün markiert. Densitometrische Auswertung (c) der Synthesebanden bei 21 kD vor Proteasebehandlung (grau) und 16 kD nach Proteasebehandlung (weiss). Die gemessenen Intensitäten sind auf die 21 kD bOp^{cf} Proteinbande ohne Zusatz von Lipid zum Reaktionsansatz normiert.

Die Syntheserate (Intensität der bOp^{cf} Synthesebande bei 21 kD) (roter Pfeil) variiert in Abhängigkeit der Art des verwendeten Lipids. Hohe Bandenintensitäten vergleichbar mit der Intensität ohne Zugabe von Lipid können im Falle von DOPC, DMPC und DOPC/DOPS detektiert werden, hingegen ist die zellfreie Synthese in Gegenwart von DSPC und DOPC/DOTAP inhibiert.
Nach Proteinase K-Behandlung der Reaktionsansätze kann bei Zugabe der Lipide DOPC, DMPC sowie der Lipidmischungen DOPC/DOPS [90:10], DOPC/DOPE [80:20] und DOPC/Cholesterol [95:5] zum Reaktionsansatz eine intensive Abbaubande (> 20 %, Angabe jeweils bezogen auf die Intensität der bOp^{cf}-Synthesebande ohne Zugabe von Lipid) mit einem apparenten Molekulargewicht von 16 kD detektiert werden. Die 16 kD-Abbaubande ist ein deutlicher Hinweis auf Membraninsertion des bOp^{cf} Syntheseprodukts in die Liposomen, da sie das gleiche apparent Molekulargewicht besitzt wie die Abbaubande des gereinigten bR in PM nach Proteolyse mit Proteinase K (vergl. Abschn. 3.1.1). Desweiteren ist die Bande nicht in der Negativkontrolle (ohne Zugabe von Lipid) im Radiogramm der SDS-PAGE zu detektieren, da das Genprodukt ohne stabilisierende Lipidumgebung von Proteinase K komplett proteolysiert wird. Ein Vergleich der Intensitäten der 16 kD-Abbaubande zeigt ein Maximum bei Zusatz von DOPC/DOPS [90:10]-Liposomen (~ 60 %). In Gegenwart von DMPC, DOPC, DOPC/DOPE und DOPC/Cholesterol sind vergleichbar hohe Intensitäten zu detektieren (~ 40%). Der Zusatz von DOPC/LPC-Liposomen als auch die Expression in Gegenwart von DOPC unter Zusatz von Chaperonen aus *Th.aq.* oder *E.coli* führt zu sehr geringen Intensität der Abbaubande was darauf zurückzuführen ist, dass die Syntheserate an sich bereits deutlich verringert ist, aus diesem Grund wird auf eine eingehendere Untersuchungen dieser drei Zusätze im weiteren Verlauf verzichtet.

Um den Effekt der Phasenübergangstemperatur und der Acylkettenlänge sowie den Einfluss von DOPS, DOPE und Cholesterol detaillierter zu untersuchen, wird der Anteil der genannten Lipide ausgehend von reinen DOPC SUVs erhöht und dem zellfreien Syntheseansatz zugesetzt. Die zellfreie Synthese läuft unter den optimierten Bedingungen bei 37°C für 80 min in Gegenwart von 1.5 µg/µl pUCBM20 bom DNA ab. Die Reaktionsansätze werden mittels SDS-PAGE analysiert und die radioaktiv markierten Syntheseprodukte am Phosphoimager detektiert. In den Radiogrammen der SDS-PAGE sind die erwarteten Synthesebanden bei 21 kD (ohne Proteolyse) und 16 kD (mit Proteolyse) rot bzw. grün markiert.

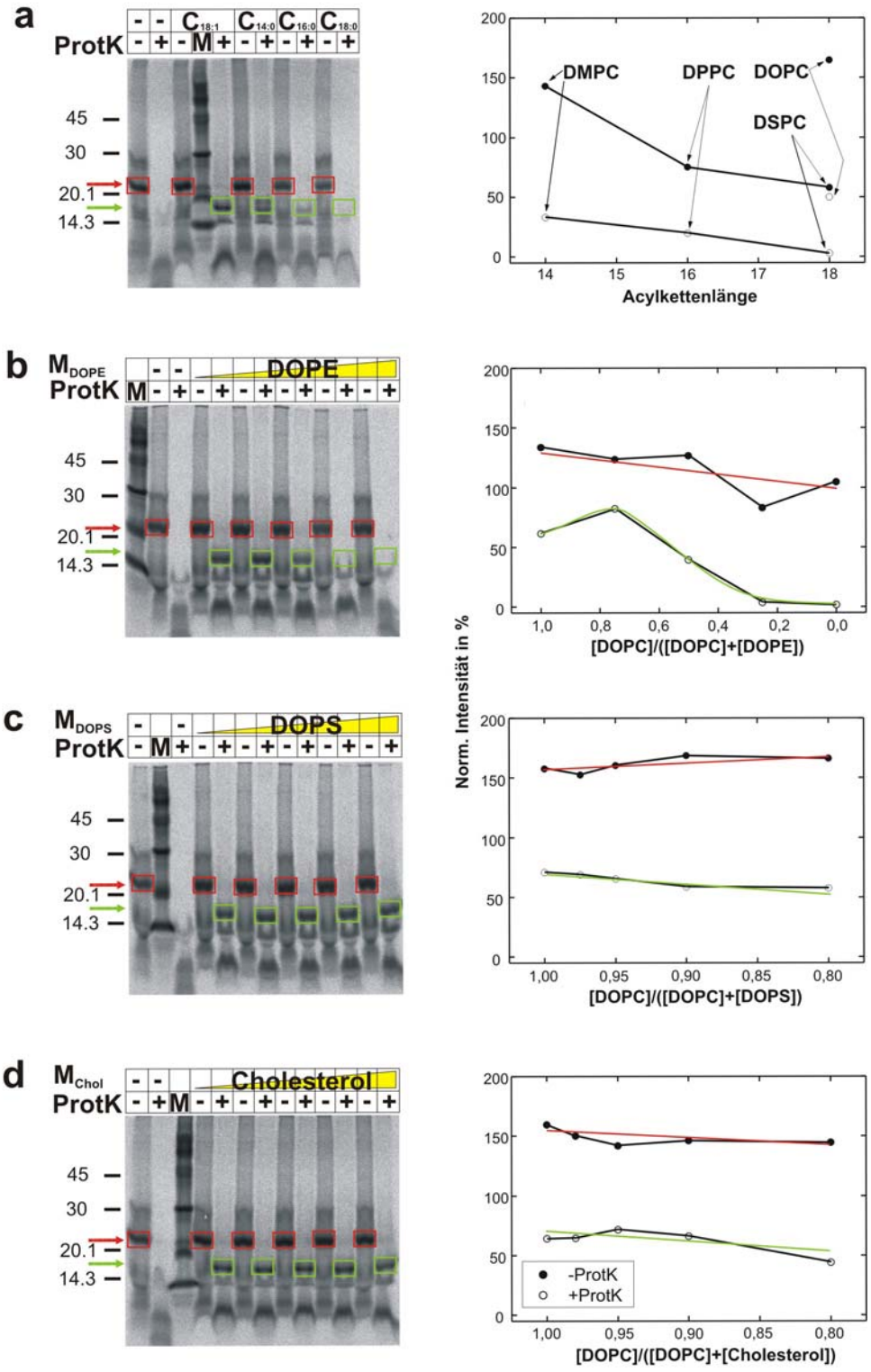


Abb. 3.13: Einfluss von Acylkettenlänge (a) sowie steigenden Konzentrationen an DOPE (b), DOPS (c) und Cholesterol (d) auf die Membraninsertion von zellfrei synthetisiertem bOp^{cf}. Die Radiogramme der SDS-PAGE sind jeweils neben den densitometrischen Auswertungen der 21 kD bOp^{cf} Proteinbande (rote Markierung) (—•—) sowie der 16 kD Abbaubande nach Proteolyse mit Proteinase K (grüne Markierung) (—o—) dargestellt. Die Messwerte sind auf die Intensität der 21 kD bOp^{cf} Proteinbande ohne Zusatz von Lipid zum Reaktionsansatz normiert.

Die densitometrischer Auswertung der bOp^{cf}-Synthesebande (21 kD, roter Pfeil) und der 16 kD-Abbaubande nach Proteinase K Behandlung (grüner Pfeil) liefert folgendes Ergebnis. Die Syntheserate (Intensität der Synthesebande von bOp^{cf}) nimmt mit zunehmender gesättigter Acylkettenlänge kontinuierlich ab Abb. 3.12a. Hingegen zeigen DMPC (C14:0) oder DOPC (C18:1), die bei der Inkubationstemperatur von 37°C beide in der fluiden Lα-Phase existieren annähernd gleich hohe Syntheserate (150 %, Angaben in Bezug auf die Intensität der bOp^{cf} Synthesebande ohne Zugabe von Lipid). Sie liegen somit überhalb der Syntheserate ohne Zugabe von Lipid. Die Membraninsertionstrate (Intensitäten der 16 kD-Abbaubande) liegt für DMPC bei 40% und bei DOPC bei 50%. Für DPPC (T_p = 41°C), welches bei 37°C als Gemisch von Lα und Lβ-Phase vorliegt, kann nur noch eine um den Faktor 2 niedrigere Syntheserate (75%) und Membraninsertion (25%) detektiert werden. Dass die Syntheserate als auch die Membraninsertionsrate abhängig ist von der Phasenübergangstemperatur des verwendeten Lipids ist noch deutlicher bei Zusatz von DSPC-Liposomen (Tp = 55°C) zu detektieren, bei welchem nur noch 50 % Syntheserate und keine Membraninsertion mehr vorhanden ist.

Der Einfluss des nicht-doppelschichten ausbildenden Lipids DOPE ist in Abb. 3.12b dargestellt. Bei grösseren Mengen (> 50 mol%) an DOPE nimmt die Intensität der Abbaubande nach Proteinase K Behandlung drastisch ab. In reiner Form liegt DOPE als inverse hexagonale Phase vor und es kann keine Membraninsertion detektiert werden, wohingegen die Syntheserate nahezu unbeeinflusst bleibt. (Abb. 3.12 c).

Der Zusatz von DOPC-Liposomen mit steigendem Anteil an Cholesterol oder DOPS (Abb. 3.12 b, d) zeigt nur eine geringe Abhängigkeit für Syntheserate und Membraninsertion. Dieses Ergebnis lässt darauf schliessen, dass die Dicke der Membran, Fluidität und Oberflächenladung weniger kritischen Parameter für die Faltung von bOp^{cf} sind.

Zusammenfassend können folgende Abhängigkeit der Syntheserate und Membraninkorporation von bOp^{cf} in Bezug auf die verwendeten Lipide detektiert werden:

Synthese, Membraninsertion	**Synthese, geringer Einfluss auf Membraninsertion**	**Synthese, keine Membraninsertion**	**Verringerte Syntheserate**
DMPC, DOPC	DOPS (< 80 mol%) Cholesterol (< 80 mol%)	DOPE	DPPC, DSPC, DOTAP, LPC, Zusatz von Chaperonen

Tab. 2: Zusammenfassung der zellfreien Synthese von bR^{cf} bei Zusatz verschiedener Stabilisatoren im Reaktionsansatz.

Da bei der zellfreien Synthese von bOp^{cf} der Zusatz von Liposomen aus DOPC sehr gute Ergebnisse im Hinblick auf Syntheserate und Membraninkorporation liefert, werden für die weiteren Experimenten DOPC SUVs in Konzentrationen von 4 mg/ml eingesetzt.

In einem weiteren Versuch wird der Einfluss von *all-trans* Retinal bei der zellfreien Synthese von bR^{cf} untersucht. Dazu wird zusätzlich 100 µM *all-trans* Retinal dem Reaktionsansatz zugesetzt und die optimierte Synthese bei 37°C, 80 min unter Lichtauschluss durchgeführt. Das Radiogramm der SDS-PAGE von vier Syntheseansätze (+/- T7-RNA-Polymerase (Spalte 1-4), + 4 mg/ml DOPC SUVs (5/6), + 100 µM *all-trans* Retinal) jeweils ohne und mit Proteinase K Behandlung ist in folgender Abbildung dargestellt.

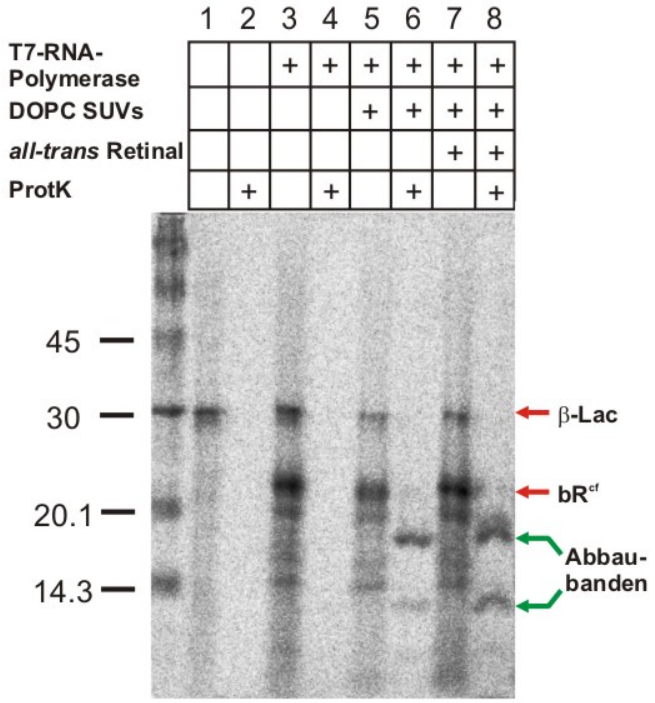


Abb. 3.14: Radiogramm der SDS-PAGE von zellfrei dargestelltem bR^{cf}. Zugabe von 0.4 U T7-RNA-Polymerase, 4 mg/ml DOPC SUVs, 100 µM *all-trans* Retinal zum Reaktionsansatz sowie Proteinease K nach Beendigung der zellfreien Synthese ist mit (+) gekennzeichnet. Die dominanten Synthesebanden bei 30 kD für β-Lactamase (β-Lac) und 21 kD bR^{cf} sind mit roten Pfeilen die Abbaubanden nach Proteinase K Behandlung (16 und 12 kD) mit grünen Pfeilen markiert.

Wie aus Abb. 3.14 hervorgeht kann kein Unterschied in den Abbaubanden von zellfrei hergestelltem bOp^{cf} ohne Retinal und bR^{cf} in Gegenwart von Retinal detektiert werden. Dies war zu erwarten, da renaturiertes bOp bereits ohne photoaktives Pigment in der Membran sieben transmembrane Helices ausbildet [80].

3.1.5 Einfluss von Carrierpeptiden

Weiterhin wird der Einfluss von artifiziellen Carrierpeptiden bei der funktionellen zellfreien Synthese von Membranproteinen untersucht. Carrierpeptide können unabhängig von einem spezifischen Rezeptor durch biologische Membranen diffundieren und gleichzeitig Peptide oder Proteine in Zellen transportieren. Der Mechanismus der Membranpenetration von Carrierpeptiden und seinen Proteinsubstraten ist bislang unklar, es konnte jedoch mittels FTIR gezeigt werden, daß das Carrierpeptid bei Attachierung an die Membran eine α-helikale Struktur einnimmt und eine Art Kanalpore um das Substratprotein bildet [81].

Carrierpeptide bestehen aus zwei Proteintransduktiondomänen, die über ein kurzes Linkerpeptid verknüpft sind. Morris et al. beschreiben ein kleines amphiphatisches Peptid (Pep-1), aufgebaut aus 21 Aminosäuren (NH_2-KETWWETWWTWESQWKKKRKV). Die N-terminale tryptophanreiche Domäne (KETWWETWWTWE) ist für die effiziente Membrantranslokation und für hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Substrat zuständig. Die C-terminale Domäne besteht hingegen aus mehreren positiv ionisierten Lysinen (KKKRKV), die zu der Kernlokalisatonssequenz von Simian Virus 40 (SV40) homolog ist und den intrazellulären Transport vermittelt, gleichzeitig aber auch das Peptid besser in wässriger Lösung hält [82].

Um den Einfluss von Pep-1 im Hinblick auf eine effizientere Membraninsertion von bR^{cf} zu untersuchen, wird ein N-terminal acetyliertes Pep-1Ac mit einer C-terminalen Cysteamingruppe verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Veldhoen, Universität Lübeck und K. Lausecker, MPI Dortmund). Die zellfreie Synthese erfolgt in Gegenwart von fünf Konzentrationen (0-0.66 mg/ml) Pep-1Ac in DEPC-behandeltem Wasser, 4 mg/ml DOPC SUVs und 100 µM *all-trans* Retinal unter den optimierten Reaktionsbedingungen. Die Syntheseansätze werden nach Proteinase K Behandlung mittels SDS-PAGE analysiert.

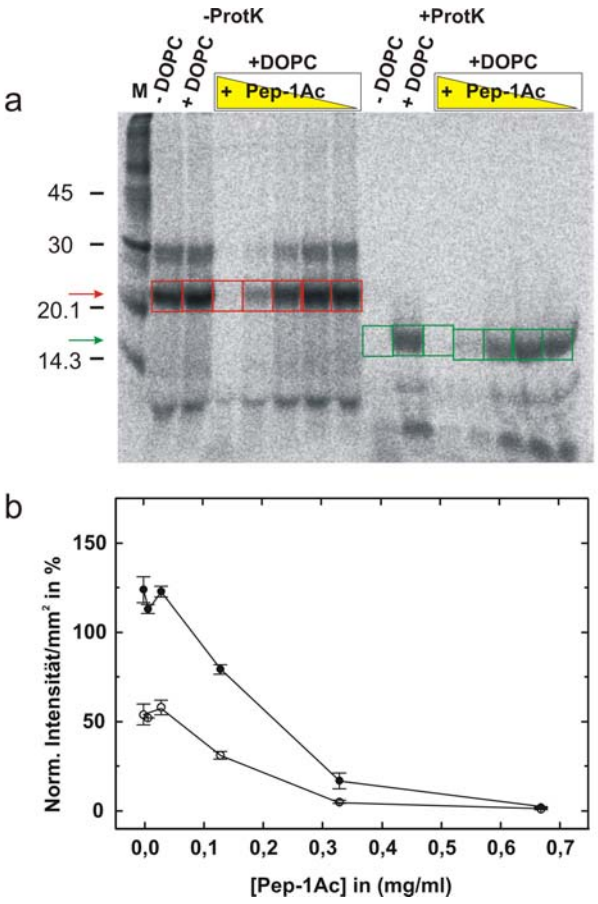


Abb. 3.16: Einfluss von Carrierpeptid Pep-1Ac auf die zellfreie Synthese von bR^{cf} in Gegenwart von 4 mg/ml DOPC SUVs, 100 µM *all-trans* Retinal und steigenden Konzentrationen an Pep-1Ac (0, 0.01, 0.03, 0.12, 0.33, 0.66 mg/ml).
Radiogramm der SDS-PAGE der zellfreien Syntheseansätze (a), densitometrische Auswertung der korresponierenden bR^{cf} Synthesebande (21 kD, rote Markierung) und 16 kD-Abbaubande (grüne Markierung) in Abhängigkeit der Konzentration an Pep-1Ac (Doppelbestimmung) (b). Die Intensitäten der Banden sind auf die Intensität der bR^{cf}-Synthesebande ohne Zugabe von Lipid normiert.

Im Radiogramm der SDS-PAGE sind deutlich die erwarteten Synthesebanden für bR^{cf} (21 kD (rote Markierung), β-Lactamase (30 kD) und die 16-kD Abbaubande (grüne Markierung) nach Proteinase K-Behandlung zu detektieren. Die densitometrische Auswertung der Banden ergibt eine konzentrationsabhängige Abnahme der Syntheserate (von bR^{cf} als auch von β-Lactamase) sowie der Membraninsertion (Intensität der 16 kD-Abbaubande) von bR^{cf} in DOPC-Liposomen mit steigender Konzentration an Pep1-Ac. Ein Grund für die Abnahme der Syntheserate könnte sein, daß die positiv geladenen Lysinreste mit der eingesetzten DNA in Wechselwirkung treten und dieser DNA-Protein-Komplex nicht mehr als Matrize für die *in vitro* Transkription dienen kann. Dieser Ansatz wird nicht weiterverfolgt.

3.1.6 Zellfreie Synthese von hGlyRα1^{cf}, PR^{cf}, *Np*hR^{cf} und *Np*sRII^{cf}

Unter Anwendung der optimierten Parameter für die zellfreie Expression von bR^{cf} soll die Anwendbarkeit des Systems auf weitere bR-homologe 7TM-Helix-Rezeptoren (PR, *Np*hR und *Np*sRII) als auch auf nicht verwandte integrale Membranproteine wie z.B. die α1-Untereinheit des humanen Glycinrezeptors (hGlyRα1) untersucht werden.

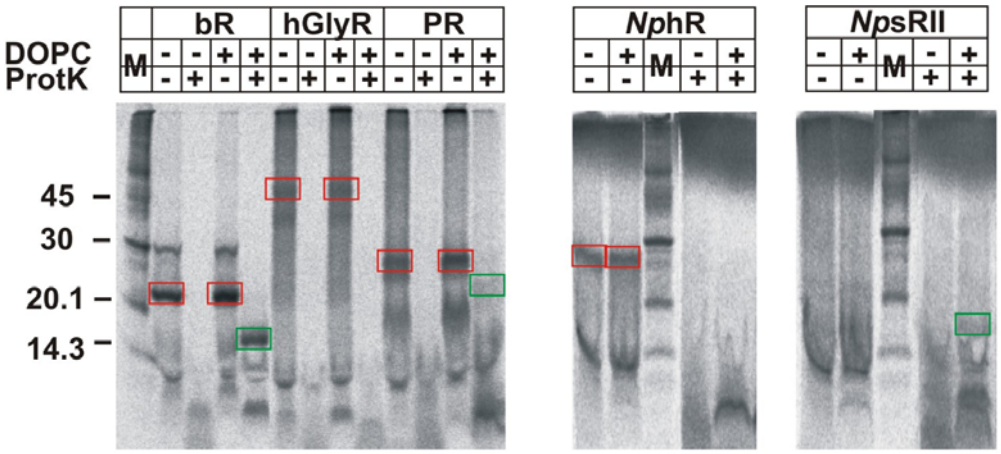


Abb. 3.17: Radiogramm der SDS-PAGE der zellfreien Expressionsansätze von bR^{cf}, hGlyRα1^{cf}, PR^{cf}, *Np*hR^{cf}, *Np*sRII^{cf} ohne Lipide und in Gegenwart von 4 mg/ml DOPC-Liposomen und 100 µM *all-trans* Retinal (ausser bei hGlyRα1^{cf}) mit und ohne Proteinase K Behandlung. Hauptproduktbanden mit höchster radioaktiver Intensität sind mit rot markiert, intensivste Abbaubanden sind grün markiert.

Bei der zellfreien Expression von PR^{cf} kann eine dominante Bande mit dem apparenten Molekulargewicht von 27 kD, die dem PR Genprodukt zugeordnet werden kann, und eine weitere schwächere Bande bei 19 kD detektiert werden. Eine Stabilisierung von PR^{cf} mit DOPC-Liposomen ist im Vergleich zu bR^{cf} jedoch verringert, obwohl PR in *E.coli* in höheren Ausbeuten funktionell exprimiert werden kann (~ 100 µg/l gereinigtes bR versus bis zu 9 mg/l PR (vergl. Abschnitt 3.2). Die proteolytische Abbaubande nach Proteinase K-Behandlung von PR^{cf} mit dem höchsten apparenten Molekulargewicht liegt bei ~ 22 kD und entspricht der Abbaubande von gereinigtem PR. Die zellfreie Expression von *Np*hR^{cf} und hGlyRα1^{cf} führt zu einem Syntheseprodukt mit einem apparenten Molekulargewicht von 29 kD für *Np*hR^{cf} und 45 kD für hGlyRα1^{cf}, diese Produkte sind jedoch bei Zusatz von DOPC-Liposomen nicht zu stabilisieren. Dementsprechend kann keine Abbaubande nach Proteinase K–Behandlung der Syntheseansätze im Radiogramm detektiert werden. Bei der zellfreien Synthese von *Np*sRII^{cf} (apparentes Molekulargewicht 24 kD) kann kein Genprodukt mit einem destinkten

Molekulargewicht im Radiogramm zugeordnet werden (lediglich höhermolekulare Aggregationsbanden (in diesem Radiogramm nicht zu erkennen). Nach Proteinase K-Behandlung entsteht eine Abbaubande bei 17 kD bei Zusatz von DOPC-Liposomen, was auf Membraninsertion hindeutet. Die Intensität der Bande ist geringer im Vergleich zur Abbaubande von bR^{cf} und vergleichbar mit der Intensität die für die Abbaubande von PR^{cf} detektiert wird. Zusammengefasst kann für die verwendeten Proteine folgende Aussage bezüglich zellfreier Synthese und Membraninsertion in DOPC-Liposomen gemacht werden:

	Zellfreie Synthese	**Membraninsertion in DOPC-Liposomen**
bR	ja	ja (50%)
PR	ja	ja (~ 5 %)
*Np*sRII	ja, als Aggregate	ja (~ 5 %)
*Np*hR	ja	nein
hGlyRα1	ja	nein

Tab. 3: Zusammenfassung über Synthese und Membraninsertion der Proteine bR, PR, *Np*sRII, *Np*hR und hGlyRα1. Die Werte in Klammern geben den Anteil an Membraninsertion des jeweiligen Proteins an (Intensität der Abbaubande), bezogen auf die Gesamtsyntheseausbeute.

3.1.7 Funktionelle zellfreie Expression von bR^{cf}

Zur Darstellung von grösseren Mengen an bR^{cf}, welche auch für die biophysikalische Charakterisierung ausreichen, wird ein Roche RTS500 Bioreaktor (Roche, Penzberg, Germany) verwendet. Dabei handelt es sich um einen Synthesereaktor mit einer Reaktionskammer (1 ml) und einer Reservoirkammer (10 ml), die über eine semipermeable Membran verbunden sind: Ein Austausch von kleinen Molekülen ist möglich, jedoch ist die Membran nicht durchlässig für höhermolekulare Moleküle oder Proteine. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass die Konzentration an Abbauprodukten, welche die Proteinsynthese inhibierenden (AMP, GMP oder Pyrophosphat) langsamer erreicht wird und die Synthesedauer auf bis zu 24 Stunden bei 30°C erhöht werden kann. Dies ermöglicht eine Anreicherung der Syntheseprodukte in der Reaktionskammer. Die zellfreie Synthese findet ohne radioaktiv-markierte Zusätze statt, um das Genprodukt eindeutig zu identifizieren wird nach Inkubationsende eine Sucrosegradient-Ultrazentrifugation (10 ml Maßstab) des Reaktionsansatzes durchgeführt. Es werden zehn Fraktionen zu einem ml isoliert und mittels

SDS-PAGE und Western-Blot Analyse untersucht. Die bR^{cf} enthaltenden Fraktionen werden vereinigt.

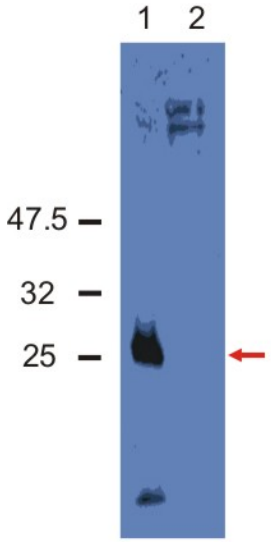


Abb. 3.18: Western-Blot Analyse mit Maus Anti-Histidin-Tag-Ig und Anti-Maus-POD-Ig von zellfrei synthetisiertem bR^{cf} nach Sucrosegradient-Ultrazentrifugation (Gradient: 30→50% Sucrose 10 ml, 60% Sucrose 1 ml, 16 h, 22.000 rpm, SW28-Rotor, 4°C). (+) mit pUCBM20 bom DNA (-) ohne DNA-Matrize.

Auf dem Western-Blot der vereinigten Sucrosegradient-Fraktionen (45-50% Sucrose) ist eine Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 25 kD (roter Pfeil) zu detekieren. Diese Bande ist ausschliesslich bei Vorhandensein von pUCBM20 bom DNA-Matrize im Syntheseansatz nachzuweisen und kann dem bR^{cf} Monomer zugeordnet werden.

Das nach Sucrosegradient-Ultrazentrifugation gereinigte bR^{cf} zeigt im statischen Absorptionsspektrum jedoch keine Absorption des als SB gebundenen Retinals bei 570 nm als auch keine Akkumulation von archetypischen bR-Photointermediaten mittels zeitaufgelöster Laserblitzabsorptionsspektroskopie (nicht abgebildet). Da sich bR^{cf} in eine artifizelle Lipidumgebung faltet, die keine proteinogenen Verunreinigungen anderer Membranproteine enthält wird auf eine Reinigung des Genprodukts und die damit verbundenen Ausbeuteverluste verzichtet. Die Anwendung von bR-spezifischen Nachweismethoden wie zeitaufgelöste Laserblitzabsorptionsspektroskopie oder Ladungstransportmessungen an planaren Lipiddoppelschichten sollte eine eindeutige Zuordnung der Signale ermöglichen. Aus diesem Grund wird der Syntheseansatz für die weitere biophysikalische Charakterisierung nach Abstoppen der Reaktion mit EDTA direkt eingesetzt.

1) Zeitaufgelöste Laserblitzabsorptionsspektroskopie

Zuerst wird der spezifische Photozyklus von bR^{cf} mittels zeitaufgelöster Laserblitzabsorptionsspektroskopie untersucht. Nach Laseranregung von bR^{cf} bei 570 nm können charakteristische transiente Absorptionänderungen bei 400 nm und 570 nm detektiert werden. Als Vergleich werden die transienten Absorptionsänderungen von *H.salinarum* „cell-envelope"-Vesikeln (zur Verfügung gestellt von A. Göpper, MPI Dortmund) aufgezeichnet. „Cell-envelope"-Vesikel enthalten neben bR jedoch noch weitere Membranproteine, diese durchlaufen zwar keine Photoreaktion, aber beeinflussen indirekt die Photozykluskinetik von bR. Darunter fällt der *H. salinarum* Na^+/H^+-Antiporter, welcher den Protonengradienten entkoppelt, den bR bei Belichtung aufbaut. Dies führt zu einer Verringerung der Membranpolarisation, die im Falle von bR in artifiziellen Liposomen stärker ausgeprägt ist. Um die transienten Absorptionsänderungen von bR^{cf} in DOPC-Liposomen und bR in „cell-envelope" Vesikeln zu vergleichen wird der Na^+/H^+-Antiporter durch Zusatz von DCC inhibiert [83].

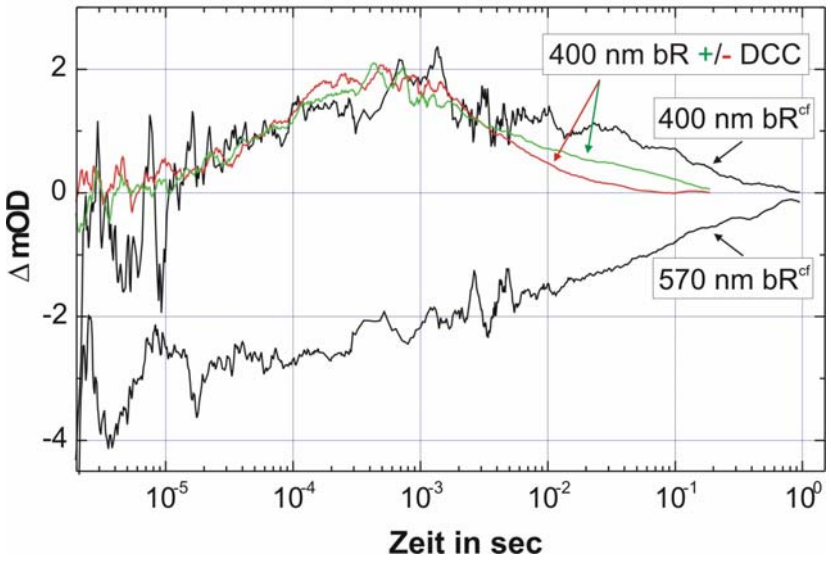


Abb. 3.19: Differentielle Absorptionsänderungen des zellfreien Syntheseansatzes von bR^{cf} mit DOPC-Liposomen bei 400 nm und 570 nm. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden 10^3 Transienten mit einer Pulsfrequenz von 1 Hz akkumuliert. Als Vergleich sind die Transienten von bR in *H.salinarum* „cell envelope"-Vesikeln $OD_{570\ nm}$ = 0.1 in 0.5 M NaCl mit 10 mM DCC (grün) und ohne DCC (rot) dargestellt (Datenakkumulation: 25 Pulse, 1 Hz). Die Polarisierung der Vesikel erfolgte durch vorherige Belichtung mit dem Laser (100 Pulse, 5 Hz). Zur besseren Darstellung sind die transienten Absorptionsänderungen der „cell envelope"-Vesikel auf die maximale Amplitude des Transienten bei 400 nm von bR^{cf} normiert.

Die transienten Absorptionsänderungen von bR^{cf} zeigen deutliche Ähnlichkeiten zu bR im Hinblick auf Bildungskinetik und Akkumulation des hypsochrom verschobenen M-Intermediates des bR Photozyklus bei 400 nm sowie der Relaxation zurück zum spektroskopischen Grundzustand (570 nm). Die Zerfallsdynamik des M-Intermediats von bR^{cf} ist gegenüber bR verlangsamt und vergleichbar mit DCC-behandelten bR „cell envelope"-Vesikel, die unter den experimentellen Bedingungen polarisiert werden. Dies lässt darauf schliessen, dass der verlangsamte M-Zerfall von bR^{cf} darauf zurückzuführen ist, dass das Protein in polarisierbaren, geschlossenen Proteoliposomen vorliegt.

Die maximale Amplitude der Absorptionsänderung für den M-Zustand von bR^{cf} liegt bei zwei mOD, woraus die Konzentration von funktionellem bR^{cf} abgeschätzt werden kann. Unter der Annahme, dass etwa 20 % der bR-Moleküle nach Laseranregung einen Photozyklus durchlaufen [72] und einem Extinktionskoeffizienten für das M-Intermediat von $\Delta\varepsilon_{412\ nm} = 23.000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ [84] liefert das Lambert-Beersche Gesetz:

$$c = \frac{E}{d \cdot \varepsilon} = \frac{0.002 \cdot 5}{0.5\ cm \cdot 23000\ M^{-1}\ cm^{-1}} = 0.87\ \mu M \approx 20 \frac{mg}{l}$$

an funktionellem bR^{cf}.

2) Lichtinduzierte Ladungstransportmessungen an planaren Lipiddoppelschichten

Eine weitere spezifische Funktionsanalyse stellen die lichtinduzierten Ladungstransport-eigenschaften von bR^{cf} an planaren Lipiddoppelschichten dar. Hierzu wird der Syntheseansatz direkt in der Messkammer der BLM-Apparatur mit Messpuffer verdünnt. Die Anlagerung der bR^{cf}-Proteoliposomen erfolgt unter unter leichtem Rühren für ½ h, wobei die Leitfähigkeit der BLM ungewöhnlich hoch ansteigt (~0.5 nS). Dies ist vermutlich auf die hohen Konzentration an hydrophoben Zusätzen wie DOPC-Lipid (4 mg/ml), Retinal (100 µM) oder Proteine aus dem Zell-Lysat im Syntheseansatz zurückzuführen.

Bei Belichtung von bR^{cf} in DOPC-Proteoliposomen an der BLM mit grünem Licht (λ>495 nm) wird ein negativer transienter Photostrom mit einer Amplitude von bis zu 2.5 pA/cm^2 und ein negativer stationärer Strom von bis zu 0.5 pA/cm^2 detektiert (Abb. 3.17 a). Der transiente Photostrom ist im Hinblick auf sein Wellenlängenabhängigkeit, Vorzeichen und seinen zeitlichen Verlauf vergleichbar mit dem von gereinigtem bR in PM oder Proteoliposomen [75]. Obwohl der transiente Strom charakteristische Eigenschaften besitzt, welche auf das Vorhandensein von funktionellem bR^{cf} hinweisen, ist dies kein Beweis dafür, insbesondere wenn die Ladungstransportmessungen mit hohen BLM-

Leckleitfähigkeiten durchgeführt werden. Dies ist bei der Messung der Fall, da bereits ohne Vorhandensein von Ionophoren ein stationärer Strom registriert wird.

Um die Funktionalität von bR^{cf} eindeutig zu bestimmen wird ein Doppelbelichtungsexperiment durchgeführt. Hierzu wird das System durch Zugabe der Ionophoren Monensin und 1799-Protonophor entkoppelt und der stationäre Photostrom bei Belichtung mit grünem Licht aufgezeichnet. Wird der stationäre Photostrom mit zusätzlichem blauem Licht verringert, ist dies ein eindeutiger Beweis für das Vorhandensein von funktionellem bR^{cf}. Unter diesen Bedingungen durchläuft bR einen verkürzten Photozyklus, über einen Zwei-Photonenmechanismus, bei dem keine Ladung nach Aussen transportiert wird. Nach Zugabe der Ionophore Monensin und 1799-Protonophor liegt der stationäre Strom bei ~1 pA/cm^2 und kann mit zusätzlichem grünem Licht zusätzlich verstärkt werden, da noch keine Sättigung des Photosignals mit der verwendeten XBO-Lampe erzielt wird (Abb. 3.17b). Wird jedoch mit zusätzlichem blauem Licht bestrahlt wird ein um 25 % niedriger Photostrom gemessen (Abb. 3.17c).

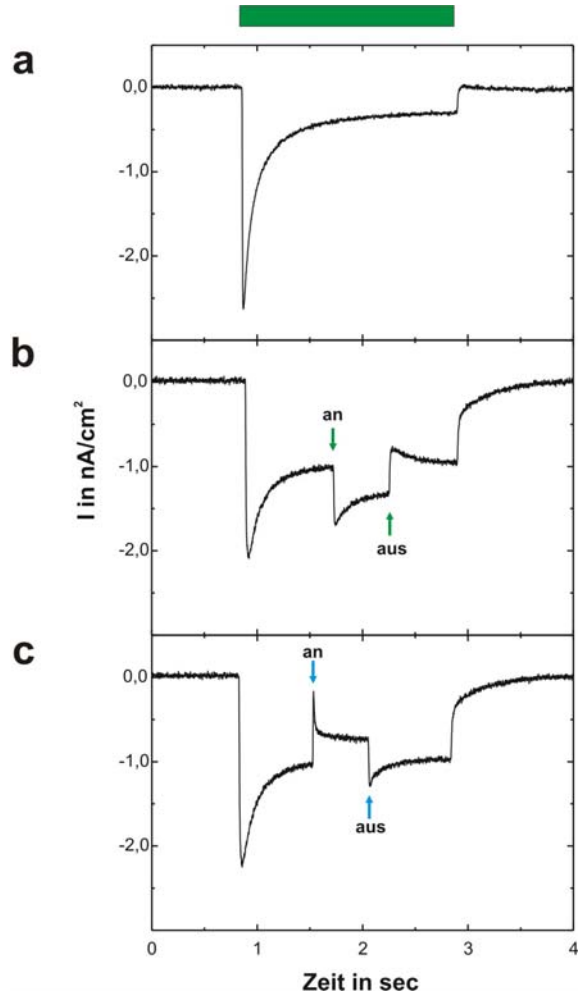


Abb. 3.20: Lichtinduzierte Photoströme von zellfrei synthetisiertem bR^{cf} in DOPC-Liposomen an planaren Lipiddoppelschichten. Der Balken zeigt die Dauer der Bestrahlung mit grünem Licht an (Osram XBO75W, $\lambda > 495$ nm). Die Pfeile markieren das an- und ausschalten von zusätzlichem grüne Licht (Osram HBO100W, $\lambda > 495$ nm) (b) bzw. zusätzlichem blauen Licht (Osram HBO100W, Schott K40 Breitbandfilter ($\lambda = 400 \pm 25$ nm) (c). Photoströme wurden in Abwesenheit (a) und in Gegenwart (b) + (c) der Ionophoren 1799 und Monensin (je 5 µM) aufgenommen.
Pufferbedingungen 100 mM NaCl, 20 mM Hepes/Tris pH 6.8.

3.2 *In vivo* Expression und Reinigung von Membranproteinen in *E. coli* Zellen

3.2.1 Funktionelle Expression und Reinigung von PR und Mutanten

Für die Darstellung von Proteorhodopsin in *E.coli* Zellen werden zwei Expressionskonstrukte kloniert, die sich hinsichtlich einer C-terminalen Affinitätsreinigungssequenz unterscheiden (His-Tag und StrepII-Tag). Unter Verwendung des pET27b(+)-Plasimds liegt das PR-Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors, welcher durch den lacI-Operator reguliert wird. Die Proteinsynthese kann in diesem Fall durch Zugabe des nicht hydrolysierbaren Allolaktose-Agonisten IPTG unter kontrollierten Bedingungen induziert werden. Hierzu werden die *E.coli* Stämme BL21(DE3) oder C41(DE3) verwendet, die das Gen für T7-RNA-Polymerase genomisch integriert haben unter Kontrolle des lacUV5-Promotors.

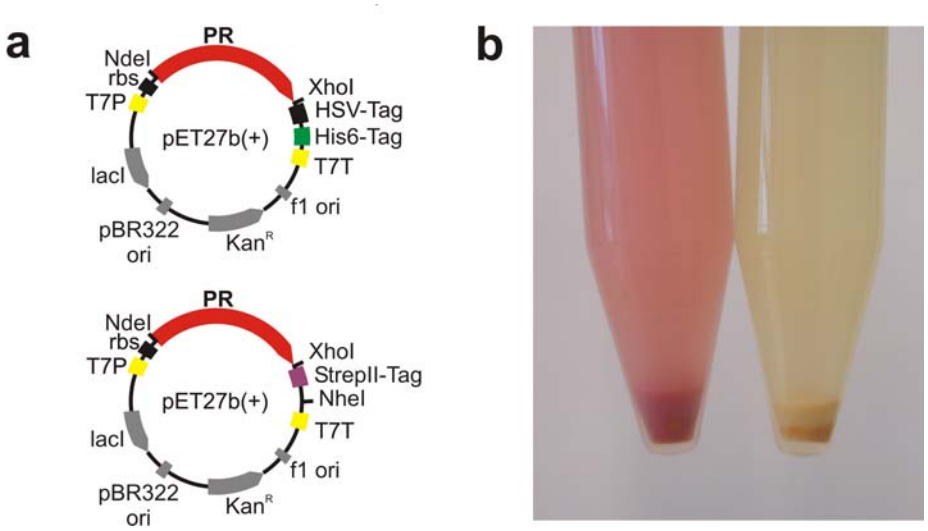


Abb. 3.21: Schematischer Aufbau der Expressionskonstrukte von PR (a) mit C-terminalem HSV- und 6x Histidin-Tag für die Reinigung mit Ni-NTA Superflow (oben) sowie C-terminalem StrepII-Tag für die Reinigung mit immobilisiertem Streptavidin (unten). LacI: Gen für Lactose Repressor, T7P: T7-Promotor, rbs: Ribosomale Bindungsstelle, HSV-Tag: Herpes Simplex Virus-Tag, T7T: T7-Terminator, ori: Replikationsursprung, Kan^R: Gen für Kanamyzin Resiszenz. Expressionskultur *E. coli* C41(DE3) Zellen mit pET27b(+)-PR-His (b) 2.5 Stunden nach Induktion mit 0.1 mM IPTG und Zugabe von 10 µM *all-trans* Retinal (links) (37°C, 160 rpm) sowie Zellen ohne Zusatz von IPTG (rechts). Expression erfolgte in M9-Minimalmedium mit 2% Glucose unter Lichtauschluss.

Die Induktion der PR-Expression erfolgt durch Zugabe von IPTG zu einer im späten exponentiellen Wachstum befindlichen Bakterienkultur. Gleichzeitig zur IPTG-Zugabe wird

der essentielle Cofaktor *all-trans* Retinal zugesetzt und 2.5 h unter Lichtauschluss bei 37°C geschüttelt. Anhand der Rotfärbung des Zellpellets ist deutlich zu erkennen, daß PR (λ_{max} = 520 nm [15]), exprimiert wird. Nach dem mechanischen Aufschluß der Zellen im Microfluidizer werden die Zelltrümmer durch einstündige Zentrifugation bei 100.000xg abgetrennt. Die Zellmembran wird daraufhin mit 2 % (w/v) DDM 12 Stunden bei 4°C gerührt und der Überstand (Solubilisat) wird nach erneuter Zentrifugation bei 100.000xg direkt auf das Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden) oder Streptavidin-Makroprep (IBA, Göttingen) Säulenmaterial gegeben. Die Abtrennung von unspezifisch gebundenen Proteinen und Verunreinigungen wie z.B. Cytochrome (λ_{max} = 410 nm) erfolgt, bei Verwendung von Ni-NTA-Affinitätssäulenmaterial, durch Waschen mit 25 mM Imidazol. Im letzten Schritt wird das gereinigte PR mit 200 mM Imidazol eluiert. Die Elution von PR-StrepII mit Strepavidin-Makroprep-Säulenmaterial erfolgte mit 5 mM Desthiobiotin. Das überschüssige Imidazol bzw. Desthiobiotin wird umgehend mittels DEAE-Anionenaustauscherchromatographie entfernt.

Die Ausbeute an gereinigtem PR-HisTag bei Expression in BL21(DE3) in LB-Medium liegt bei etwa 2-3 mg/l Kulturvolumen und unterscheidet sich bei Expression in LB oder M9-Minimalmedium (2% (w/v) Glucose) kaum. Hingegen liegen die Ausbeuten unter Verwendung von C41(DE3) Zellen bei 6 mg/l in LB-Medium und bei bis zu 9 mg/l Kulturvolumen bei M9-Minimalmedium (2% (w/v) Glucose). Miroux und Walker argumentieren in Bezug auf die erhöhten Expressionsausbeuten von Membranproteinen in C41(DE3) mit einer langsameren Expressionsrate und detektieren einen geringeren mRNA-Konzentration im Vergleich zu BL21(DE3) [57]. Neuere Publikationen deuten darauf hin, dass sich die Lipidzusammensetzung von intrazellulären Membranen im Vergleich zur *E.coli* Zytoplasmamembran günstig auf die Faltung von Membranproteinen auswirkt, wie sich am Beispiel der β-Untereinheit der F(1)F(0)-ATPase gezeigt hat [85]. Die höheren Ausbeuten von PR bei Verwendung von M9-Minimalmedium im Vergleich zu LB-Medium liegen vermutlich darin begründet, dass das verwendete Pepton oder Hefe-Hydrolysat signifikante Mengen des natürlichen lac-Induktors Laktose besitzt. Eine Konsequenz daraus ist, dass bereits vor IPTG-Induktion zytotoxische T7-RNA Polymerase synthetisiert wird bzw. das PR aufgrund des fehlenden Cofaktors *all-trans* Retinal in der Zelle präzipitiert. Desweiteren ist Glucose ein Katabolit-Repressor und führt zu einer geringeren Expression von Hausmacherenzymen, was den Expressionshintergrund erniedrigt. Die PR D97N Mutante konnte in *E.coli* BL21(DE3) nicht funktionell dargestellt werden, hingegen liefert die Expression in C41(DE3) vergleichbare Ausbeuten im Vergleich zum wt-Protein.

Die Ausbeuten von gereinigtem PR-StrepII liegen bei 1-2 mg/l Kulturvolumen bei Expression in BL21(DE3) Zellen in LB-Medium und Reinigung über Streptavidin-Makroprep Material. Dies ist eine 25 % geringere Ausbeute im Vergleich zum His-Tag Konstrukt, was vermutlich daran liegt, dass das Protein nicht komplett vom Säulenmaterial eluierte. Noch drastischer ist dieser Effekt bei Verwendung von Sepharose-Material (zur Verfügung gestellt von Dr. V. Sirnivasan, MPI Frankfurt/Main) bei dem Ausbeuten von gereinigtem PR-StrepII von ~1 mg/l Kulturvolumen erzielt werden.

Um die Synthese und Solubiliserung von PR qualitativ auszuwerten werden Expressionsproben und Proben aus den Solubilisierungsschritt mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analyse analysiert. Hierzu werden Zellen aus der Expressionskultur vor Induktion und nach 2½ h ohne und mit Induktion untersucht. Desweiteren wird die Zelltrümmerfraktion nach Solubilisierung und das Solubilisät untersucht.

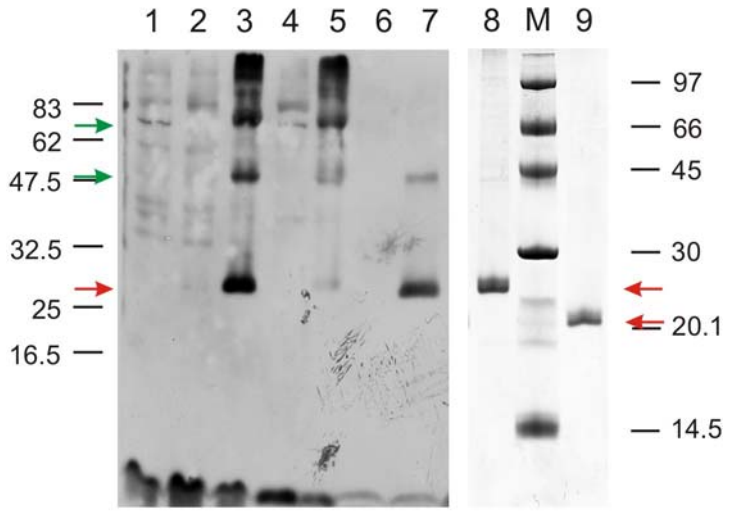


Abb. 3.22: Western-Blot Analyse der Expression und Solubilisierung von PR -His (links). Expression erfolgte in M9-Minimalmedium (2% Glucose) bei 37°C. Detektion mit Maus Anti-Histidin-Tag-Ig und Ziege Anti-Maus-POD-Ig. Induktion erfolgte mit 0.1 mM IPTG, zum Zeitpunkt der IPTG Zugabe wurde sowohl bei den induzierten Zellen als auch bei den nicht-induzierten Zellen 10 µM all-trans Retinal zugesetzt. Zellsuspension vor Induktion (1), Zellsuspension nach 2½ h ohne/mit Induktion (2)+(3). Pellet nach Solubilisierung der Membranfraktion ohne ohne/mit Induktion (4)+(5). Überstand nach Solubilisierung der Membranfraktion ohne/mit Induktion (6)+(7). SDS-PAGE Analyse des gereinigten PR-His (8) und PR-StrepII (9) (rechts). Proteinbanden mit dem erwarteten apparenten Molekulargewicht (PR-His 27 kD und PR-StrepII 21 kD) sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet, vermutliche multimere Proteinbanden mit grünen Pfeilen.

In der Western-Blot Analyse der Expression von PR ist zu erkennen, daß PR als einziges Genprodukt mit einem apparenten Molekulargewicht von 27 kD nach Induktion exprimiert

wird. Die zusätzlichen Proteinbanden bei 50 und 70 kD und höheren Molekulargewichten sind vermutlich dem PR-Dimer und Trimer sowie multimeren Aggregatzuständen zuzuordnen. Dafür spricht, dass die Proteinbanden spezifisch bei der Immundetektion mit Maus Anti-Histidin-Tag-Ig reagieren und ohne IPTG-Induktion der PR-Expression nicht nachzuweisen sind. Nach Isolierung der Membranfraktion und Solubilisierung der membranständigen Proteine können ausschliesslich das Monomer (> 90% Gesamtintensität) und das Dimer in der Immundetektion nachgewiesen werden. Die Reinheit des Proteins liegt nach Reinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie bei > 95 % (SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung). Wird die Proteinreinheit aus dem Verhältnis der spektroskopisch bestimmten Proteinkonzentrationen bei 278 nm (Absorption der aromatische Aminosäuren) und 520 nm (Absorption des Chromophors) berechnet, ergibt sich ein kleinerer Reinheitswert von 82% ± 4%. Dies ist vermutlich auf den zusätzlichen Beitrag von Raleigh-Lichtstreuung der solubilisierten Proben im nahen UV-Spektralbereich zurückzuführen. In dieser Berechnug wird ein theoretischer Extiktionkoeffizient $\varepsilon_{278\ nm}$ = 75.700 M^{-1} cm^{-1} angenommen, welcher aus der PR-Primärsequenz abgeleitet ist [86]. Der Extinktionskoeffizient des Retinalchromophors liegt bei 43.900 M^{-1} cm^{-1} (Vergl. Abb. 3.30b). Eine vergleichbare Reinheit wird für das PR StrepII-Tag mit einem apparenten Molekulargewicht von 21 kD berechnet.

Das MALDI-Tof Spektrum des gereinigten PR zeigt nach Entfernung der Salze mittels Grössenauschlusschromatographie und Detergenzien mittels Lösungsmittelextraktion [69] fünf Signale (I-V), wobei die Signale I und IV sowie II und V den (+1) und (+2)-Ionisierungszuständen der gleichen Spezies zugeordnet werden können.

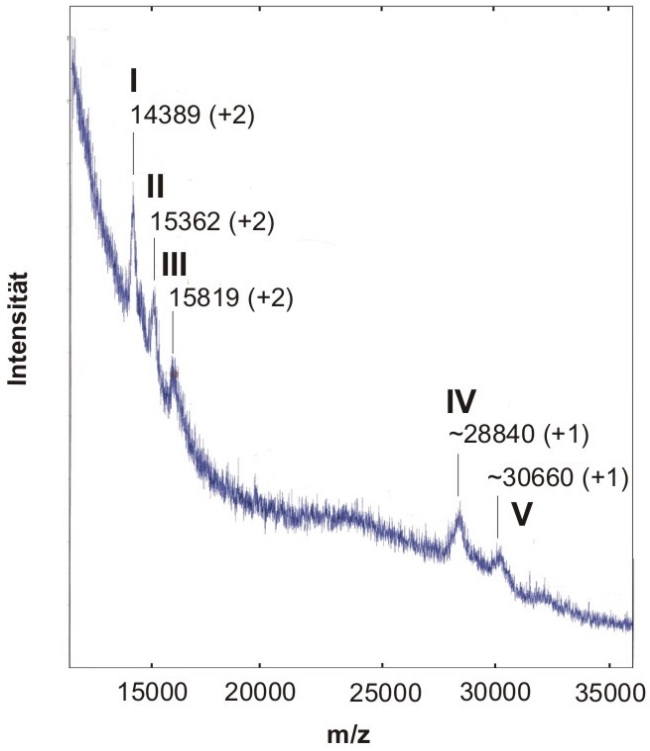


Abb. 3.23: MALDI-Tof Spektrum von gereinigtem und delipidiertem PR in α-Cyanohydroxyzimtsäure-Matrix. Messung erfolgte im positiven Ionenmodus.

Eine Zuordnung der Signale des MALDI-Tof Spektrums von PR ist in Tab. 1.4 zusammengefasst. Für die Auswertung werden die (+2)-Massensignale verwendet, da die (+1)-Massensignale neben einer schwachen Intensität eine erhebliche Signalbreite (± ~100 Dalton) aufweisen.

Signal I kann dem, um eine putative N-terminale Signalsequenz (MKLLLILGSVIALPTFA), verkürzten PR [87] zugeordnet werden, wobei die Massendifferenz +11 Dalton vermutlich aufgrund der Qualität des Spektrums zustande kommt. Die Signalsequenz am N-Terminus wird wahrscheinlich nach oder während der Insertion der Polypeptidkette von PR in die Membran von membranständigen Signalpeptidasen nicht quantitativ gespalten. Aus diesem Grund ist auch PR mit kompletter Primärsequenz (M_r = 30321 Dalton) im MALDI-Tof Spektrum zu detektieren. Es ist zu erkennen, dass die relative Molekülmasse von PR deutlich unter dem registrierten Massensignal II (30724 Dalton) liegt. Daher ist zu vermuten, dass sich

Massensignal II dem PR und ein zusätzlichen DDM-Molekül zusammensetzt, welches wahrscheinlich an die stark hydrophobe Signalsequenz von PR bindet und mittels Lösungsmittelextraktion nicht entfernt werden kann. Die Differenz von PR mit einem DDM zur theoretischen Masse beträgt –107 Dalton. Eine dritte Spezies, von der jedoch ausschliesslich das (+2) Massensignal detektiert werden kann, entspricht vermutlich PR mit zwei DDM-Molekülen.

	Spezies	M_r (Dalton)	Korrespondierendes Signal (Dalton)	Differenz (Dalton)
I	AGGGDL...SNALE-**HSVTag-HisTag**	28767	14389 (+2) → 28778	+11
II	MKLLLILGSVIALPTFA-AGGGDL... ...SNALE-**HSVTag-HisTag + 1xDDM**	30831	15362 (+2) → 30724	-107
III	MKLLLILGSVIALPTFA-AGGGDL... ...SNALE-**HSVTag-HisTag + 2xDDM**	31341	15819 (+2) → 31638	+297

Tab. 4: Zuordnung der Signale des MALDI-Tof Spektrums von gereinigtem PR. M_r (DDM) = 510 g/mol.

Zusammengefasst kann PR in ausreichender Menge in *E.coli* funktionell exprimiert und mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie in hoher Reinheit isoliert werden. PR-HisTag wird im Folgenden für alle weiteren biochemischen und biophysikalische Untersuchungen eingesetzt.

3.2.2 *In vivo* Expression von *Neurospora crassa* NopI, *Chlamydomonas Rheinhardii* ChopI und dem humanen Glycin Rezeptor αI in *E.coli* Zellen

Für die Darstellung von weiteren Rhodopsinen aus den eukariontischen Organismen *N.crassa* NopI, *C. rheinhardii* ChopI und der α1-Untereinheit des humanen Glycin Rezeptors hGlyRα1 werden die entsprechenden Gene in pET27b(+) bzw. pET27bmod Expressionsplasmide kloniert. Um die Membraninsertion der Genprodukte bei der Expression zu erhöhen wird für NopI und ChopI ein zusätzliches Leader-Fusionskonstrukt ausgehend von den ersten 18 Aminosäuren von Proteorhodopsin und einer N-terminal verkürzten Varianten von NopI und ChopI kloniert (PRL-Varianten). Um ausschliesslich den extrazellulären N-Terminus und nicht Teile von Helix I durch den PR-Leader zu ersetzten werden bei NopI die ersten 42 Aminosäuren deletiert [14]. Für die Klonierung des PR-Leader ChopI Fusionskonstrukts gehen die Meinungen über den Beginn von Helix I auseinander. Nagel et al. [13] postulieren L76 als erste Aminosäure in Helix I. Hingegen gehen Sineshchekov et al. [88] von I65 als erste Aminosäure aus. Um Helix I von ChopI nicht zu verkürzen wird der PR-Leader vor I65 kloniert. Ein ähnliches Fusionskonstrukt wird für hGlyRα1 ab Aminosäure 29 kloniert unter Verwendung des pelB-Leaders aus dem pET27b(+) Plasmid. Die Gene liegen unter der Kontrolle des T7-Promotors, welcher über lacZ reguliert wird. Die Kodonverfügbarkeit am N-Terminus ist für die ersten 20 Codons gewährleistet. Aus diesem Grund wird auf eine Expression in speziellen *E.coli* Bakterienstämmen verzichtet und die Expression in C41(DE3) Stamm durchgeführt. Für eine mögliche Affinitätsreinigung sind die Genprodukte C-terminal mit einem sechsfachen Histidin-Tag bzw. HSV-Histidin-Tag ausgestattet (Zusammengefasst in Abb. 3.24).

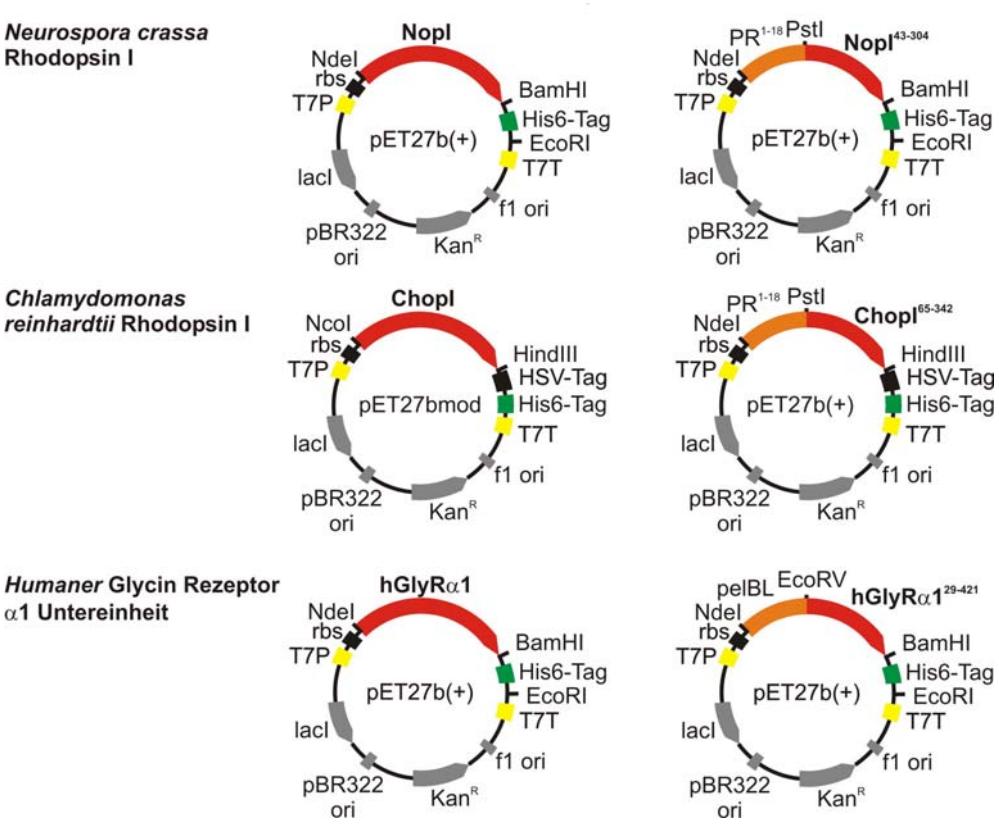


Abb. 3.25: Schematischer Aufbau der Expressionskonstrukte von NopI, ChopI und hGlyRα1 sowie den entsprechenden N-terminalen Leader-Varianten.

Die Expression der Proteine erfolgt in M9-Minimalmedium bei 37°C unter Lichtauschluss. Die Induktion der Genexpression erfolgt mit Zugabe von 0.1 mM IPTG, gleichzeitig werden bei den Retinalproteinen 10 µM *all-trans* Retinal zugegeben (Vergleiche PR-Expression Abschnitt 3.2.1). Nach Aufschluss der Zellen und Solubilisierung der Membranfraktion mit 2% (w/v) DDM werden die Expressions- und Reinigungsschritte mittels SDS-PAGE und Western-Immunnachweis analysiert.

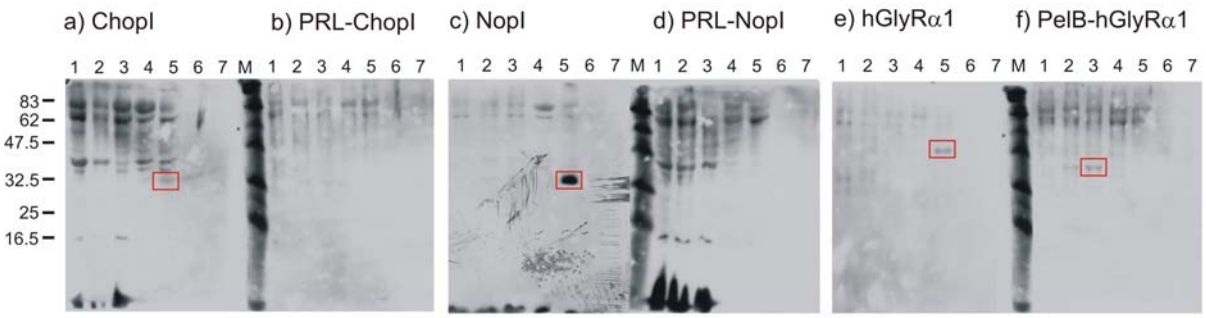


Abb. 3.26: Western-Blot Analyse mit Maus Anti-Histidin-Tag-Ig und Ziege Anti-Maus-POD-Ig der Expression von (a) ChopI, (b) PRL-ChopI, (c) NopI, (d) PRL-NopI, (e) hGlyRα1 und (f) PelB-hGlyRα1 in *E.coli* C41(DE3) Zellen in M9-Minimalmedium mit 2% Glucose bei 37 °C. Induktion mit 0.1 mM IPTG. Zugabe von 10 µM *all-trans* Retinal zum Induktionszeitpunkt. (1) Zellen vor Induktion, (2)+(3) Zellen 2½ Stunden ohne/mit Induktion, (4)+(5). Pellet nach Solubilisierung der Membranfraktion mit DDM ohne/mit Induktion, (6)+(7) Überstand nach Solubilisierung der Membranfraktion mit DDM ohne/mit Induktion. In rot gekennzeichnet sind die nach Induktion der Genexpression neu hinzukommen Proteinbanden.

In den *E.coli* Zell-Lysaten der Expression von ChopI kann keine zusätzliche Proteinbande nach Induktion mit IPTG detektiert werden. Nach Zellaufschluss, Solubilisierung der Membranfraktion und Zentrifugation ist im Pellet eine Proteinbande mit apparentem Molekulargewicht von 32 kD bei IPTG-Induktion zu detektieren (Abb. 3.26 a Spalte 5). Im Solubilisat ist diese Proteinbande nicht zu erkennen, diese Beobachtung lässt den Rückschluss zu, dass ChopI durch IPTG-Induktion exprimiert wird, jedoch nicht in die Zellmembran insertiert und aus diesem Grund nicht funktionell ist. Im Falle des PRL-ChopI Fusionskonstrukts ist keine zusätzliche Bande in den Zell-Lysaten und nach Aufschluss der Zellen in der Membranfraktion zu detektiert. In diesem Fall wird das Genprodukte entweder nur in äusserst geringen Mengen exprimiert (unter der Nachweisgrenze des Western-Immunnachweis) oder in der Zelle direkt abgebaut.

Bei der NopI Expression wird bei IPTG-Induktion eine Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 35 kD im Pellet nach Solubilisierung detektiert. Diese Proteinbande ist dem NopI Genprodukt zuzuordnen mit einem erwarteten Molekulargewicht von 36 kD. Da das exprimierte NopI nicht solubilisiert werden kann, ist es vermutlich nicht in der Membran inseriert und liegt deshalb nicht in funktioneller Form vor. Gleiches ist bei der Expression von hGlyRα1 zu beobachten, wobei in diesem Fall eine Proteinbande mit einem apparentem Molekulargewicht von 48 kD (erwartetes Molekulargewicht: 50 kD) im Pellet nach Solubilisierung zu detektieren ist. Die Leader-Fusionskonstrukte führten weder bei NopI noch

bei hGlyRα1 zu einer Membraninsertion, im Gegenteil nach Induktion kann keine neue Expressionsbande detektiert werden, was dafür spricht, dass die Proteine nicht exprimiert werden oder nach Expression in der Zelle proteolysiert werden.

Die *in vitro* Faltung der unlöslichen Proteinaggregate von NopI und hGlyRα1 stellt im Prinzip eine attraktive Möglichkeit dar, die Proteine mit Hilfe einer artifiziellen hydrophoben Umgebung (Detergenzien, Lipide) in ihre funktionelle Form zu überführen. Diese Technik ist für viele lösliche Proteine bereits erfolgreich angewendet [89], im Falle von Membranproteinen aber nur vereinzelt beschrieben, wie am Beispiel des archaebakteriellen bR [90] [91] oder der *E.coli* endogenen Proteine KcsA-Kanals [92], die „Outer membrane proteins“ OmpA und OmpF [93] [94], Laktose-Permease LacY [95], „Kalium Shaker Channel A” KscA [92] und Diacylglycerolkinase DAGK [96]. Die *in vitro* Faltung von eukaryotischen Membranproteinen, die in prokaryotischen Organismen exprimiert wurden sind in der Literatur bislang nicht beschrieben und ein Erfolg dieser Methode ist in diesem Fall schwer abzuschätzen.

Die funktionelle *in vitro* Faltung von Membranproteinen aus unlöslichen Aggregaten ist keineswegs eine etablierte Methode und muss für jedes Protein zeitaufwendig optimiert werden. Aus diesem Grund wird dieser Ansatz bei den Proteinen NopI und hGlyα1 nicht weiter verfolgt.

3.3 Untersuchung der spektoskopischen Eigenschaften von Proteorhodopsin

3.3.1 Spektroskopische und chemische Eigenschaften des Chromophors

Das UV/Vis-Absorptionsspektrum von gereinigtem PR solubilisiert in DDM-Mizellen besitzt drei Absorptionsmaxima, bei 278 nm (Absorption von aromatischen Aminosäuren), 360 nm (β-Bande) und 518 nm (α-Bande). Die Lage der intensive α-Bande, welche einem $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronischen Übergang des ausgedehnten π-Elektronensystems des Retinals entspricht, ist abhängig von der jeweiligen Proteinumgebung „Opsin-Verschiebung“ und spezifisch für jedes Retinalprotein [97]. PR in Proteoliposomen aus DOPC-Lipid zeigt, bis auf den deutlich höheren Raleighstreuungsanteil im Vergleich zu DDM-solubilisiertem PR, keine Veränderung der spektralen Eigenschaften. Hingegen ist das Absorptionsmaximum der α-Bande von PR rekonstituiert in polare PM-Lipide in den roten Spektralbereich zu 534 nm verschoben. Polare Lipide bestehen zu etwa 70 Mol % aus dem anionischen Lipid Phosphoglycerophosphat. Dies resultiert in einer hohen lokalen Azidität der Membranoberfläche von Liposomen bestehend aus polaren PM-Lipiden. Wird PR in solche Liposomen rekonstituiert, kann dies zu konformativen Veränderungen des Proteingerüsts oder veränderten Protonierungszustände von Aminosäuren auf der Proteinoberfläche führen, welche die spektralen Eigenschaften des Chromophors ändern.

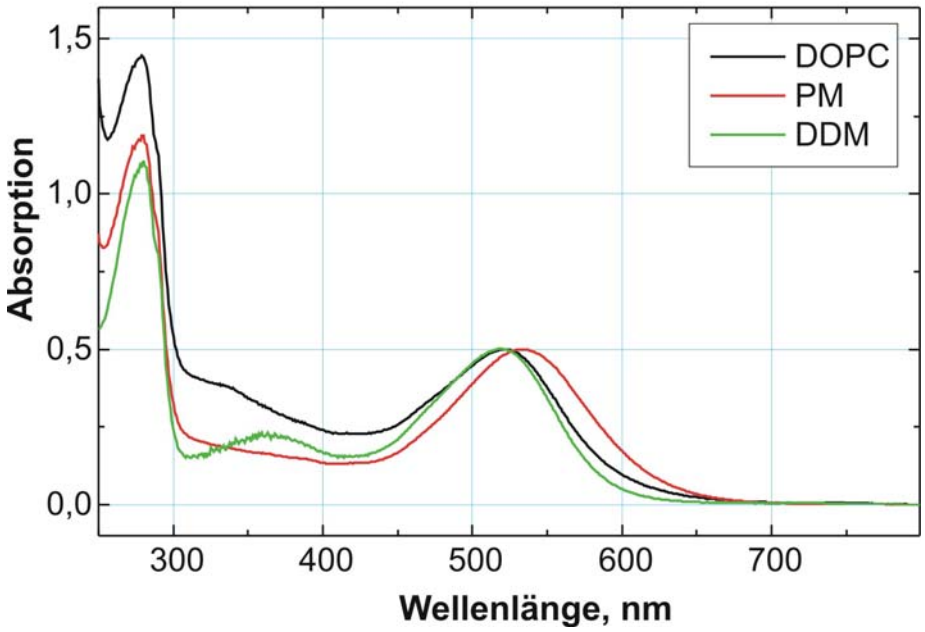


Abb. 3.27: UV/Vis-Absorptionsspektrum von PR nach Reinigung solubilisiert in 0.1% (w/v) DDM (Pufferbedingungen: 0.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0) sowie rekonstituiert in polare PM-Lipide und DOPC-Lipid (Pufferbedingungen: 100 mM NaCl, 25 mM NaPi pH 8.0)

Das UV/Vis-Absorptionsspektrum von dunkel- und lichtadaptiertem PR zeigt ein unverändertes Absorptionsmaximum bei 520 nm (bei pH 8.0) im Temperaturbereich von 0 bis 40°C. Dunkeladaptiertes PR absorbiert im Vergleich zu lichtadaptiertem jedoch weniger stark (~10% kleinerer Extinktionskoeffizient). Wird der Kinetik der Dunkeladaptation von PR aufgenommen (Abb. 3.28), kann ein monoexponentieller Verlauf mit einer Halbwertszeit von 17 min bei 20°C beobachtet werde. Dies ist eine vergleichbare Kinetik der Dunkeladaptation in Bezug auf bR (28 min bei 22°C) [98].

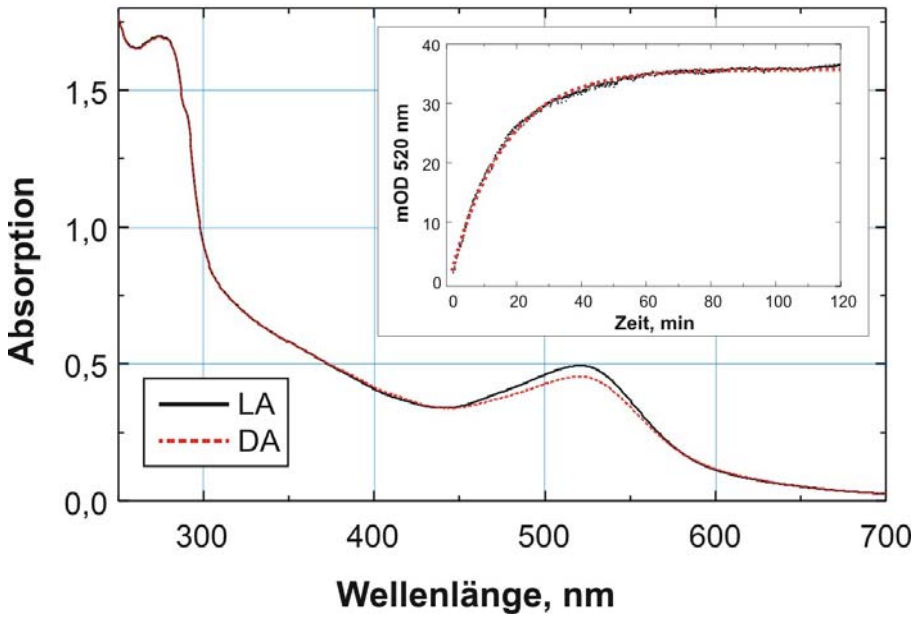
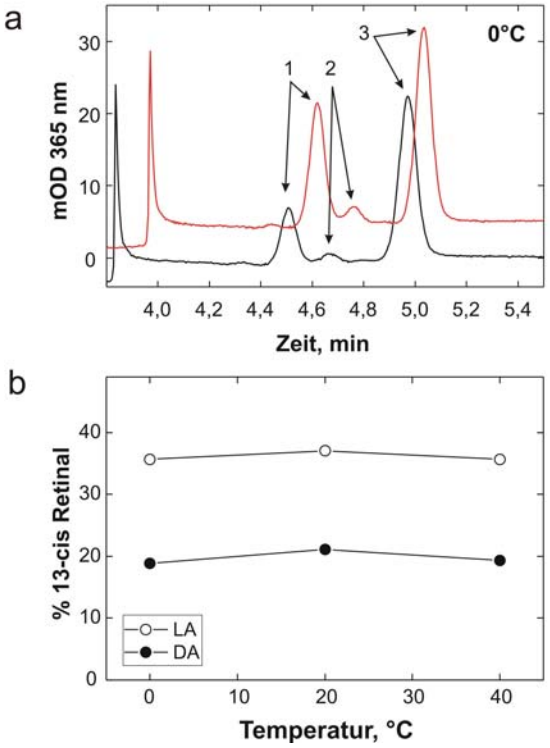


Abb. 3.28: UV/Vis-Absorptionsspektrum von licht- (——) und dunkeladaptiertem (----) PR in DOPC-Lipid bei 20°C. Kinetik der Dunkeladaptation mit monoexponentieller Annäherungsfunktion (rot) der Form: $y = y_0+A*[1-\exp(-\lambda/\tau)]$ mit y_0: OD zum Zeitpunkt t=0, A: Präexponentieller Faktor, λ: Wellenlänge, τ: Halbwertszeit) (oben links). Pufferbedingungen: 100 mM NaCl, 25 mM NaPi pH 10.0

Retinal-Extraktionsexperimente mit bR zeigen, dass der Retinal-Chromophor im spektroskopischen Grundzustand als Gemisch von zwei Isomerisierungszustände *13-cis* und *all-trans* vorliegt [99]. Die beiden Isomerisierungszustände liegen im thermodynamischen Gleichgewicht miteinander, welches durch Bestrahlung mit Licht verschoben wird. Da beide Spezies $bR^{13\text{-cis}}$ und $bR^{\text{all-trans}}$ einen Photozyklus besitzen, stellt die detaillierte Untersuchung des Gleichgewichts eine Voraussetzung für die Analyse von zeitaufgelösten Laserblitzphotolyseexperimenten dar.

Im Falle von PR sind nach Retinalextraktion im HPLC-Chromatogramm bei 365 nm Anregungswellenlänge drei Elutionsprodukte 1-3 mit den Retentionszeiten 4.5, 4.7 und 5 min zu beobachten. Da die *cis*-Isomere des Retinals im Allgemeinen eine kleinere Oberfläche besitzen, die mit der Kieselgelmatrix wechselwirkt, im Vergleich zur *all-trans* Konfiguration, eluieren diese schneller vom Säulenmaterial. In diesem Fall kann Elutionsprodukt 1 und 2 einem Retinal mit *cis*-Konfiguration und Elutionsprodukt 3 dem *all-trans* Retinal zugeordnet werden. Ein Vergleich der Retentionszeiten von Elutionsprodukt 1 und 2 mit denen von verschiedener cis-Retinalisomeren anderer Rhodopsine ergibt, dass Elutionsprodukt 1 dem *13-cis* und Elutionsprodukt 2 wahrscheinlich einem *9-cis* isomerisierten Retinal zuzuordnen ist [99].

Zur Abschätzung des Konzentrationsverhältnisses der verschiedenen Retinalisomere zueinander, werden die Flächen unter den jeweiligen Elutionspeaks integriert. Wird für die Retinalisomere ein ähnlicher maximaler Extinktionskoeffizient angenommen, ist diese Fläche proportional zur Konzentration. Hierbei werden nur die Flächen unter Elutionspeak 1 (*13-cis*) und 3 (*all-trans*) berücksichtigt, da die Bestimmung der Fläche unter Elutionspeak 2 (*9-cis*), aufgrund der geringen Konzentration dieses Isomers, zu fehlerbehaftet ist.
Bei dunkeladaptiertem PR ist ein Isomerenverhältnis von 1:5 *13-cis*/*all-trans* Retinal zu beobachten, hingegen bei lichtadaptiertem PR eines von 2:3. Dieses Verhältnis ist unabhängig von der Temperatur in einem Bereich von 0 bis 40°C (vergl. Abb. 3.29 c).



c

	DA		LA	
Temperatur	13-cis	all-trans	13-cis	all-trans
0°C	18,9	81,1	35,7	64,3
20°C	21,1	78,9	37,1	62,9
40°C	19,3	80,7	35,7	64,3

Abb. 3.29: Normalphasen HPLC-Chromatogramm der Retinalisomere von dunkeladaptiertem (schwarz) und lichtadaptiertem (rot) PR nach organischer Lösungsmittelextraktion bei 0°C (a). Temperaturabhängigkeit des Isomerenverhältnisses in Diagramm (b) und Tabellenform (c) (DA: Dunkeladaptiert, LA: Lichtadaptiert). Pufferbedingungen von PR in DOPC-Lipid: 100 mM NaCl, 25 mM NaPi pH 9.0.

3.3.2 Charakterisierung des spektroskopischen Grundzustands

Das statische UV/Vis-Absorptionsspektrum von PR ist abhängig vom pH-Wert des Probenpuffers. Für eine genaue Untersuchung dieser Abhängigkeit wird Lipid-rekonstituiertes PR in polymerisiertes Acrylamid immobilisiert um die Stabilität über einen pH-Bereich von 11.5 bis 4.0 zu gewährleisten und die Raleighstreuung zu erniedrigen. Das Absorptionsmaximum der α-Chromophorbande von dunkeladaptiertem PR verschiebt sich reversibel von 518 nm (pH 11.5) zu 536 nm (pH 4.0) bzw. von 519 nm (pH 11.5) über 545 nm (pH 6.5) nach 541 nm (pH 4.0) bei PM-Lipiden rekonstituierten Proben.

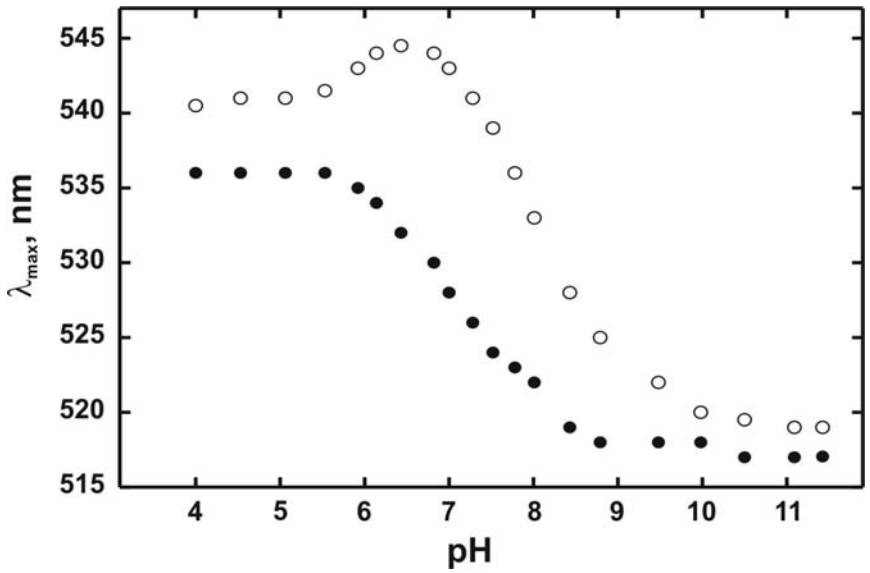


Abb. 3.30a: pH-Abhängigkeit des Absorptionsmaxiumums der α-Chromophorbande von PR in DOPC-Lipid (O) und PM-Lipiden (•).Pufferbedingungen: 100 mM NaCl, 50 mM NaPi.

Zur Abschätzung eines pKs-Wertes werden UV/Vis-Absorptionsspektren von PR in DOPC-Lipid und PM-Lipiden bei 19 unterschiedlichen pH-Werte von pH 11.5 bis 4.0 aufgenommen und global durch eine Multi-Gauss-Annäherungsfunktion beschrieben. Die Amplituden der Gaussfunktionen, welche die Absorption der α-Chromophorbande für PR bzw. im sauren pH-Bereich $PR^{violett}$ beschreiben, sind direkt proportional zur Konzentration der zu diesem pH-Wert vorliegenden Spezies. Ist der maximale Extinktionskoeffizient ε_{max} bekannt, kann die Konzentration berechnet werden. Hierzu wird ε_{max} von PR und $PR^{violett}$ durch Umsetzung des Proteins mit Hydroxylamin unter Verwendung des maximalen Extinktionskoeffizienten für Retinaloxim $\varepsilon_{360nm} = 33.600\ M^{-1}\ cm^{-1}$ [67] bestimmt. Unterschiedliche Anteile von elastischer Lichtstreuung der Proben im nahen UV-Bereich bei pH 6 und 10 werden zuerst subtrahiert und das Differenzspektrum zwischen nativer und Hydroxylamin-gebleichter Probe gebildet. Die Umsetzung von PR mit Hydroxylamin unter neutralen Bedingungen ergibt ein Absorptionsspektrum mit einer ungewöhnlichen Feinstruktur und einem Absorptionsmaximum von 380 nm. Unter sauren pH Bedingungen (pH 3) verläuft die Reaktion wie erwartet zum Retinaloxim mit einem Absorptionsmaximum von 360 nm und es kann ein Extinktionskoeffizient ε_{520} = 43.900 und ε_{540} von 44.900 $M^{-1}\ cm^{-1}$ für PR und $PR^{violett}$ ermittelt werden.

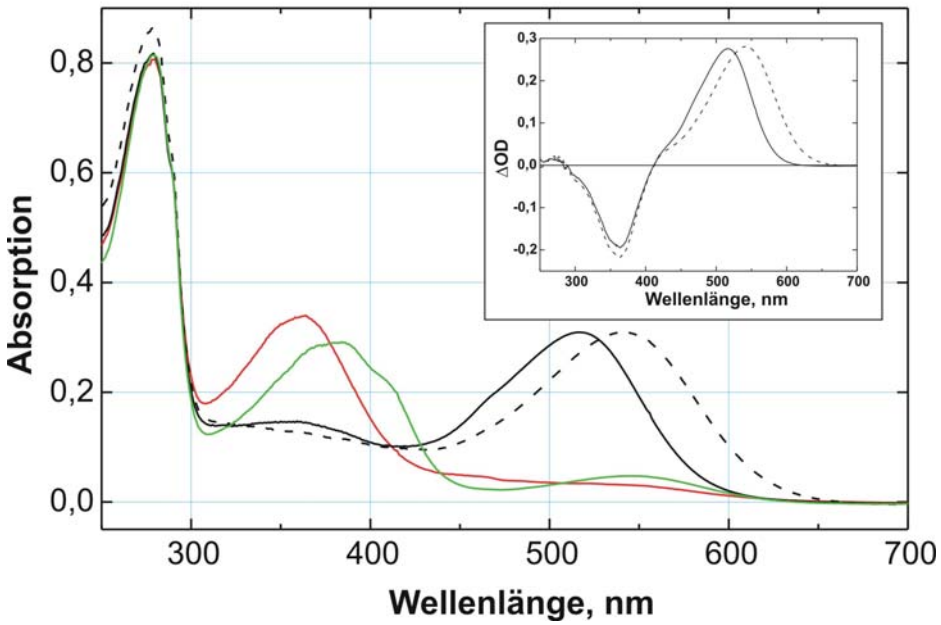


Abb. 3.30b: UV/Vis-Absorptionsspektrum und Differenzabsorptionsspektrum (oben links) von PR bei pH 6 (—), pH 10 (---) und entsprechendem Retinaloximspektrum nach Inkubation der Proben bei pH 3 (—) und pH 8 (—). Pufferbedingungen: 0.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, 0.1 % DDM.

Die Multi-Gauss-Datenanalyse der 19 UV/Vis-Absorptionsspektren des PR in DOPC-Lipid von pH 11.5 bis 4.0 ergibt, dass vier asymmetrische Gaussfunktionen S_{01}-S_{04} hinreichend sind zur Annäherung des Absorptionsspektrums über den gesamten pH-Bereich. Hierbei beschreiben S_{01} die Absorption der aromatischen Aminosäuren im nahen UV-Bereich, S_{02} die β-Chromophorbande des PR und S_{03} bzw. S_{04} die Absorption der α-Chromophorbande im alkalischen und sauren pH-Bereich. Die Parameter der Gauss'schen-Annäherungsfunktionen für das Absorptionsspektrum von DOPC-rekonstituiertem PR sind in Tab. zusammengefasst, wobei der Exponent der Raleighstreuungfunktion gleich 2.6 ± 0.1 ist.

	λ_{max} / nm	$\Delta\nu$ / cm^{-1}	ρ
S_{01}	279,1 ± 0,1	4556,5 ± 0,1	1,79 ± 0,01
S_{02}	363,4 ± 0,8	4363,9 ± 98,3	1,00 ± 0,05
S_{03}	518,4 ± 0,5	3410,0 ± 7,9	1,60 ± 0,01
S_{04}	539,2 ± 0,6	3669,1 ± 5,9	1,37 ± 0,01

Tab. 5: Parameter der Multi-Gauss-Annäherungsfunktionen (S_{01} bis S_{04}) des statische UV/-Vis Absorptionsspektrums von PR in DOPC-Lipid mit λ_{max}: Absorptionsmaximum, Δν: Halbwertsbreite, ρ: Asymmetriefaktor.

Die UV/Vis-Absorptionsspektren von PR in DOPC-Lipid bei den zwei extremen pH-Werten pH 11.5 und 4.0 sind in Abb. 3.31a mit der jeweiligen Multi-Gauss-Annäherungsfunktion dargestellt. Die relativen Konzentrationen von PR und $PR^{violett}$ werden daraufhin aus den Amplituden der Gaussfunktionen, welche die α-Chromophorbande beschreiben (S_{03} bei alkalischem pH und S_{04} bei saurem pH) und der bestimmten maximalen Extinktionskoeffizienten berechnet und gegen den pH-Wert aufgetragen (Abb. 3.31a oben). Der Titrationsverlauf wird mit einer sigmoidalen Funktion, der die Hill-Gleichung zugrunde liegt beschrieben und liefert einen pKs Wert von 7.68 ± 0.03 mit einem Hill-Koeffizienten von 0.67.

Für PM-Lipid rekonstituiertes PR ist der Titrationsverlauf des UV/Vis-Absorptionsspektrums im Vergleich zu DOPC-Lipid rekonstituiertem PR komplexer. Das Absorptionsmaximum der α-Chromophorbande liegt bei pH 6.5 am weitesten im roten Spektralbereich und wird bei weiterer Erniedrigung des pH reversibel von 545 nm nach 541 nm hypsochrom verschoben. Das bedeutet, dass mindestens zwei pH-abhängige Übergange stattfinden, die spektroskopisch im UV/Vis-Bereich zu detektieren sind. Dies erschwert die globale Datenanalyse der Absorptionsspektren mit vier Gaussfunktionen, da die Spezies, welche bei saurem pH entsteht (pH < 6.5) mit der S_{01}-Gaussfunktion angenähert wird. Das Hinzufügen einer zusätzlichen fünften Gaussfunktion, die diese Spezies beschreiben soll, führt zu einer physikalisch sinnlosen Annäherung der Absorptionsspektren über den gesamten pH-Bereich. Aus diesem Grund kann keine pKs-Wert Abschätzung der Titration von PR in PM-Lipiden durchgeführt werden. Das UV/Vis-Absorptionsspektrum von PR in PM-Lipiden ist für die zwei extremen pH-Werte pH 11.5 und 4.0 sowie pH 6.5 in Abb. 3.31b dargestellt.

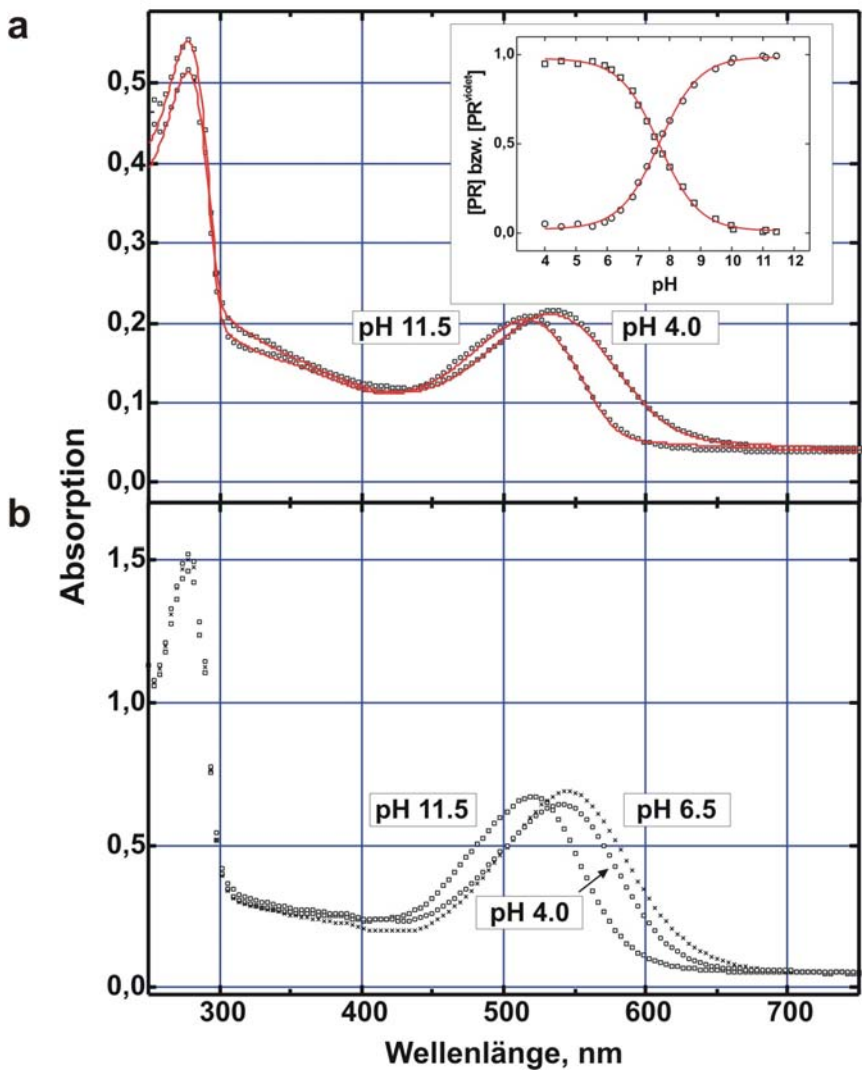


Abb. 3.31: Statisches UV/Vis-Absorptionsspektrum von PR in DOPC-Liposomen (b) und PM-Lipiden (c) bei pH 11.5 (O) und 4.0 (□) mit zugehöriger Multi-Gauss-Annäherungsfunktion (rot). Abhängigkeit des relativen Konzentration von PR (O) bzw. $PR^{violett}$ (□) in Abhängigkeit vom pH-Wert mit zugehöriger sigmoidaler Hill-Annäherungsfunktion (rot). Pufferbedingungen: 100 mM NaCl, 50 mM NaPi.

Im Falle von homologen archaebakteriellen Rhodopsinen ist die pH-abhängige bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums detailliert beschrieben und auf den Protonierungszustand einer Aminosäureseitenkette zurückzuführen, welche in der chemischen Umgebung der protonierten SB lokalisiert ist [100] [101] [102] [103]. Im Falle von bR ist diese Aminosäure bR D85 und homolog zu PR D97. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Titration einer Aminosäureseitenkette in der Nachbarschaft der protonierten SB, vermutlich PR D97, zu der bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums von PR um 690 cm^{-1} führt. Diese Wellenzahl der bathochromen

Verschiebung ist vergleichbar mit der anderer Rhodopsine rekonstituiert in Lipiden (bR-bR^{blau} 880 cm^{-1} [104], *Np*hR-*Np*hR^{blau} 670 cm^{-1} [105], *Np*sRII-*Np*sRII^{pink} 940 cm^{-1} [106]).

Im Falle von bR [107] und *Np*sRII [106] kann die bathochrom absorbierende Spezies bei Zugabe von Chloridionen wieder in ihre Ausgangsform überführt werden, da bei saurem pH eine Chloridbindungsstelle in der chemischen Umgebung der protonierten SB entsteht. Das Chloridanion ersetzt die negative Ladung der titrierten Aminosäure, wobei das Ausgangsabsorptionsspektrum wieder hergestellt wird. Eine Chloridbindung bei PR^{violett} bei saurem pH ist jedoch selbst nach Zugabe von 3 M KCl nicht zu beobachten.

Um zu Überprüfen ob die Protonierungeigenschaften von PR D97 (homolog zu bR D85) verantwortlich für die pH-abhängige Verschiebung des Absorptionsmaximums ist, wird die PR Mutante D97N, in der das Aspartat gegen ein positiv-geladenes Asparagin ausgetauscht ist, spektroskopisch untersucht.

Das UV/Vis-Absorptionsspektrum von PR D97N besitzt drei pH-unabhängige Absorptionsmaxima bei 278 nm (aromatische Aminosäuren), 390 nm (deprotonierte SB) und 550 nm (α-Chromophorbande). Die Amplituden der Absorptionsbanden bei 390 und 550 nm sind pH-abhängig. Bei pH 6.5 ist die Amplitude bei 550 nm maximal und die bei 390 nm nicht zu detektieren. Ein ähnliches Verhalten ist bei der bR D85N Mutanten zu beobachten, bei welcher im alkalischen pH-Bereich die SB deprotoniert wird und bei 390 nm absorbiert [101]. Wohingegen das Absorptionsmaximum der α-Chromophorbande von PR D97N im Vergleich zu PR (wt) bei alkalischem pH um 32 nm bathochrom verschoben ist, ist die Verschiebung in Bezug auf PR^{violett} nur noch 11 nm. Die Ähnlichkeit der beiden Absorptionsspektren von PR D97N und PR^{violett} deutet darauf hin, dass PR D97 verantwortlich für die pH-abhängige bathochrome Verschiebung ist. Zwar ist die Lage des Absorptionsmaximums der α-Chromophorbande von PR D97N und PR^{violett} nicht gleich, was aber zu erwarten war, da dies auch bei bR und der entsprechenden D85N-Mutanten beobachtet wird [101].

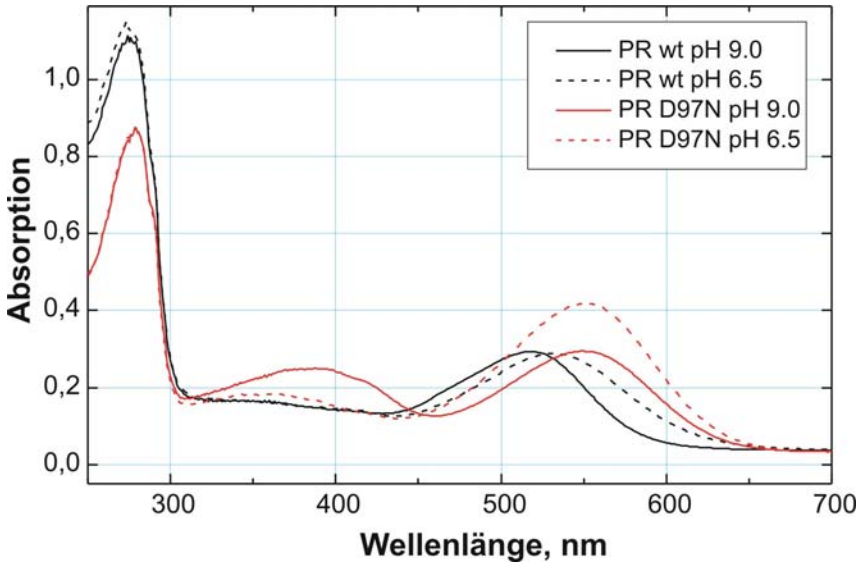


Abb. 3.32: Statisches UV/Vis-Absorptionsspektrum von solubilisiertem PR (wt) (schwarz) und PR D97N (rot) bei pH 9.0 (——) und pH 6.5 (----). Pufferbedingungen: 0.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, 0.1 % (w/v) DDM.

3.3.3 Kinetische Untersuchung der Photozyklus

Die zeitaufgelösten Absorptionsmessungen werden mit lichtadaptiertem PR rekonstituiert in DOPC-Lipid und immobilisiert in Acrylamid mit einer $OD_{520\ nm}$ = 1.0 durchgeführt. Die Anregung der Probe erfolgt bei einer Wellenlänge von 505 nm bei sechs verschiedenen pH-Werte von pH 10.0 bis pH 5.0 (Schritte zu je einer pH Einheit) im Wellenlängenbereich von 330 bis 700 nm (10 nm Schritte) und über einen Temperaturbereich von 0 bis 50 °C (10 °C Schritte). Um eine bessere Datenqualität zu erzielen werden für jede Wellenlänge 20 Transienten akkumuliert. In Abbildung 3.32 ist exemplarisch ein dreidimensionale Darstellung (Auftragung der Wellenlänge gegen die Zeit nach Laseranregung und Absorptionsänderung) eines Datensatzes bei 25 °C und pH 8.0 abgebildet, zusammen mit einem Datensatz von bR in PM unter den analogen experimentellen Bedingungen.

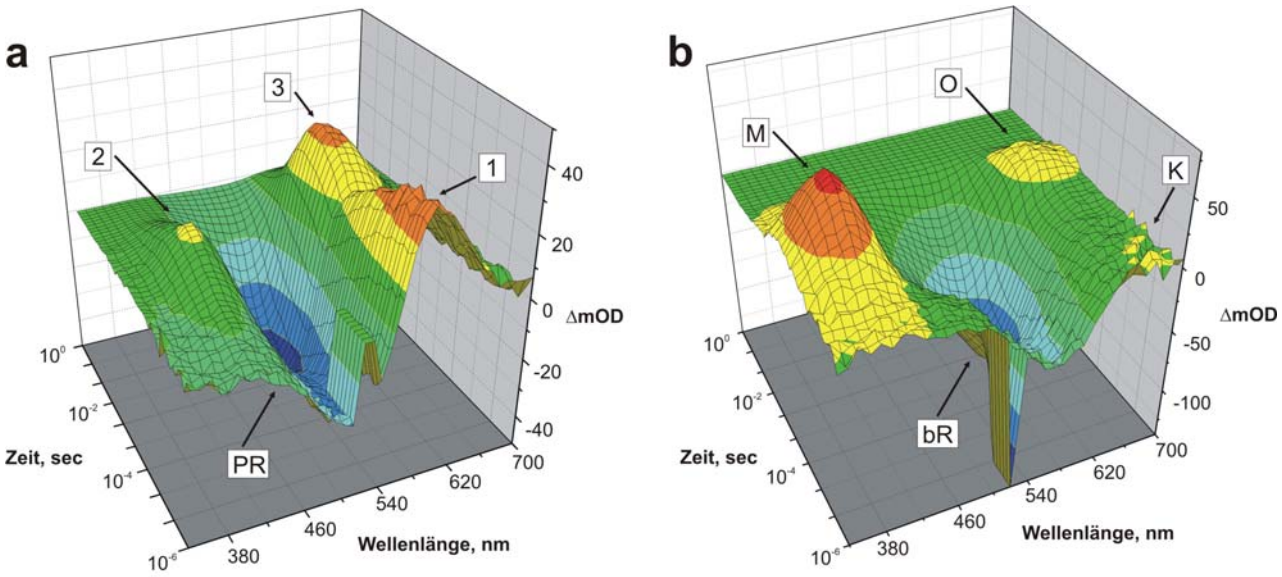


Abb. 3.33: Differentielle Absorptionsänderungen von PR in DOPC-Lipid (a) und bR in PM (b) immobilisiert in Acrylamidgel. Laseranregung erfolgte bei 505 nm für PR und 535 nm für bR. Den charakteristischen Absorptionsänderungen bei bR (400, 570, 620 nm) sind die archetypischen Photointermediate des bR Photozyklus (K, M, O) bzw. die Relaxation des spektroskopisch Grundzustands (bR) zugeordnet. Im Falle von PR sind signifikante Absorptionsänderungen bei 410, 520, 580 nm zu detektieren (Relaxation des Grundzustands PR sowie 1-3). Pufferbedingungen: 250 mM NaCl, 25 mM NaPi pH 8.0.

Das zeitaufgelöste Differenzspektrum von PR zeigt charakteristische Absorptionsänderungen bei 520 nm (Relaxation des spektroskopischen Grundzustands) sowie 410 und 580 nm. Im Vergleich zu bR sind deutliche Ähnlichkeiten der transienten Absorptionsänderungen zu erkennen. Insbesondere die Akkumulation des hypsochrom absorbierenden M-Photointermediats des bR Photozyklus bei 400 nm [108] [84] ist auch bei PR zu erkennen Abb. 3.33a (2) und lässt die Vermutung zu, dass die SB im Laufe des Photozyklus wie bei bR deprotoniert wird [109] [110]. Deutlich ausgeprägter in PR sind die transienten Amplituden der bathochrom verschobenen Absorptionsänderungen (1) und (3), die in bR den spektroskopisch unterscheidbaren Photointermediaten K und O zugeordnet werden.

Die multiexponentielle Datenanalyse der transienten Absorptionsänderungen erfolgt mit dem Programm Mexfit [74] unter Verwendung der Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Systeme. Die transienten Absorptionsänderungen werden hierbei mit Exponentialfunktionen beschrieben, deren Zahl sukzessive erhöht wird, bis sich keine signifikante Änderung der Standardabweichung der gewichteten Residuen ergibt. Unter der Annahme, dass sich der Photozyklus von PR anhand irreversibler Reaktionen erster Ordnung beschreiben lässt, ist die Anzahl der Exponentialfunktionen gleich der Anzahl kinetisch

unterscheidbarer Intermediate. Die Exponenten stellen dann die apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_i^* der einzelnen thermischen Zerfälle dar, aus denen sich die Halbwertszeiten ($\tau_i = \ln(2)/k_i^*$) der kinetischen Intermediate berechnen lassen. Die globale Datenanalyse für jeden pH-Wert ergibt eine Anzahl von sechs sowohl notwendig als auch ausreichenden Exponentialfunktionen, um die Transienten über den gesamten Temperatur und Wellenlängenbereich zu beschreiben. Chizhov et al. benutzten für die temperaturabhängige Untersuchung des bR-Photozyklus acht Exponentialfunktionen mit Halbwertszeiten von 1 µs bis 17 ms wobei die langsamste Komponete dem *13-cis* Photozyklus zugeordnet wurden [72]. Die Halbwertszeiten der kinetischen Intermediate von PR bei den zwei extremen pH-Werten 10.0 und 5.0 zeigen keine grosse Abweichung. Werden diese jedoch mit den Halbwertszeiten des bR Photozyklus verglichen, ist zu erkennen, dass die langsamste Komponente des PR Photozyklus mit 32 ms (pH 10) bzw. 35 ms (pH 5) etwa um eine Grössenordnung über der langsamste Komponente des *all-trans* Photozyklus von bR mit 3.5 µs (pH 7) liegt.

	Halbwertszeit PR (20°C) / µs pH 10	**Halbwertszeit PR (20°C) / µs pH 5**	**Halbwertszeit BR (24°C) / µs pH 7**
τ_1	2.0 (1.38)	0.9 (1.20)	0.6
τ_2	14.6 (1.33)	9.0 (1.24)	5.2
τ_3	272 (1.37)	116 (1.22)	28
τ_4	784 (1.47)	582 (1.24)	77
τ_5	4290 (1.35)	4140 (1.22)	377
τ_6	32300 (1.37)	35400 (1.24)	1170
τ_7			3460
			17300 (13 cis-Photozyklus)

Tab. 6: Vergleich der Halbwertszeiten τ_i von des PR Photozyklus bei pH 10 und 5 sowie des bR Phozotyklus bei pH 7 bei 20 °C [72]. In Klammern die jeweilige Standardabweichung der exponentiellen Annäherungsfunktion.

Wie aus Abb. 3.32 zu erkennen ist, finden deutliche transiente Absorptionsänderungen von PR bei pH 8.0, neben der Relaxation des spektroskopischen Grundzustands bei 520 nm, insbesondere bei 410 und 580 nm statt. Offensichtlich absorbieren bei diesen Wellenlängen die Intermediate des Photozyklus. Aus diesem Grund beschränkt sich die Darstellungen der Temperaturabhängigkeit der Transienten im Folgenden auf diese drei representativen Wellenlängen. Werden Absorptionsänderungen von 0 bis 50°C in einem Diagram gegen die Zeit aufgetragen, kann eine stetige Verlangsamung der Photozykluskinetik mit Erniedrigung der Temperatur beobachtet werden.

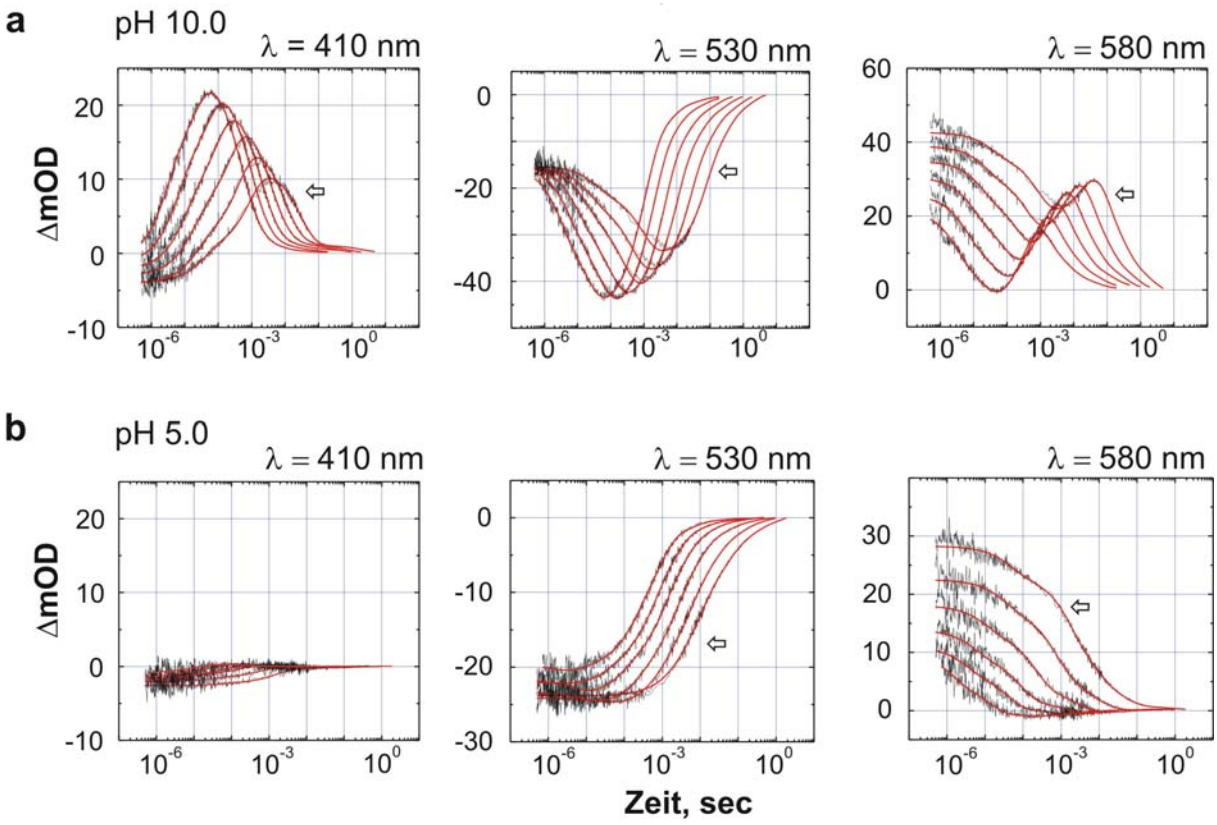


Abb. 3.34: Differentielle Absorptionsänderungen des PR in DOPC-Lipid nach Laseranregung bei 500 nm mit multiexponentieller Anpassungsfunktionen (rot) im Temperaturbereich von 0°C bis 50°C und bei den pH Werten 10 (a) und 5 (b). Die Pfeile zeigen ansteigende Temperatur an. Pufferbedingungen: 250 mM NaCl, 25 mM NaP_i.

Die transienten Absorptionsänderungen von PR bei 410 nm zeigen eine Akkumulation eines hypsochrom verschobenen M-ähnlichen Photointermediats mit einer deprotonierter SB in Analogie zur Photozykluskinetik von bR. Die Akkumulation dieses Intermediats ist bei pH 10.0 nach 500 µs maximal und zefällt danach innerhalb von 3 ms (alle Angaben bei 20°C), hingegen ist bei pH 5.0 keine Akkumulation eines Intermediats bei diese Wellenlänge zu detektieren. Im langwelligen Spektralbereich (580 nm) kann direkt nach Laseranregung ein bathochrom verschobenes Photoprodukt spektroskopisch detektiert werden, dessen Bildungsgeschwindigkeit mit der vorhandenen Messapparatur nicht aufgelöst werden kann. Die Zerfallszeit liegt im dreistelligen µs-Bereich und wird durch die Bildung eines weiteren Intermediats überlagert, welches maximal bei 8 ms akkumuliert. Die Relaxation zum spektroskopische Grundzustand von PR verläuft daraufhin innerhalb von 35 ms. Im Gegensatz zu den Photointermediaten die bei 410 und 580 nm bei pH 10.0 akkumulieren, kann bei pH 5.0 wo die violette Form von PR ($PR^{violett}$) vorliegt ausschliesslich ein schnelles bathochrom verschobene Photoprodukt bei 580 nm spektroskopisch detektiert werden. Die

Photozykluskinetik von PR^{violett} verhält sich wie die blaue Form von bR [111] bei der keine Akkumulation eines hypsochrom verschobenen M und O-Intermediats zu beobachten ist.

Im Folgenden soll die pH-Abhängigkeit der transienten Absorptionsänderungen eingehender untersucht werden. Dazu werden die Absorptionsänderungen für jede der drei representativen Wellenlängen von pH 10.0 bis 5.0 in einem Diagram gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 3.35a). Es ist eine stetige Verringerung der maximalen Amplituden der Transienten bei 410 nm (500 µs nach Laseranregung) und 580 nm (6 ms nach Laseranregung) zu beobachten. Werden die maximalen Amplituden der Transienten bei 410 und 580 nm gegen den pH aufgetragen (Abb. 3.35d) ergibt sich ein sigmoidaler Titrationsverlauf, welcher mit der Hill-Funktion beschrieben werden kann und einen vergleichbaren pKs-Wert liefert wie die pH-Titration von PR D97 im spektroskopischen Grundzustand. Dieses Ergebniss lässt den Rückschluss zu, dass die pH-Abhängigkeit der transienten Absorptionsänderungen ausschliesslich auf den Protonierungszustand von PR D97 zurückzuführen ist.

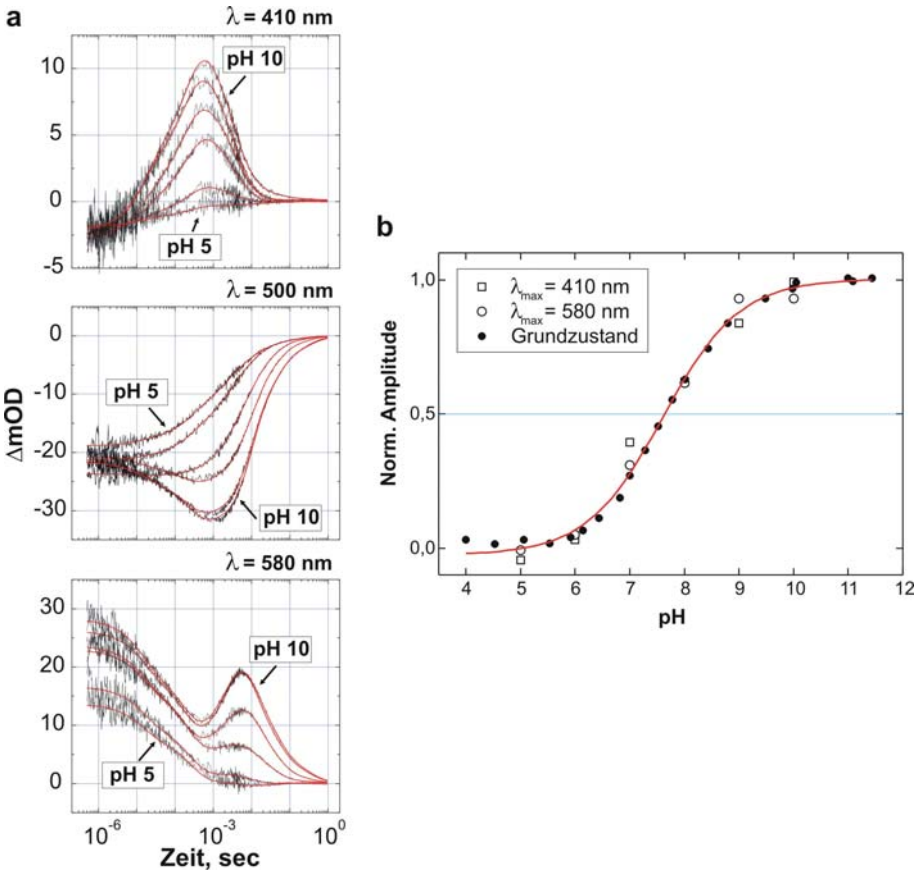


Abb. 3.35: pH-Abhängigkeit der differentiellen Absorptionsänderungen von PR bei drei representativen Wellenlängen (410, 500 und 580 nm) mit multiexponentieller Anpassungsfunktion (rot) bei 20°C von pH 10 bis pH 5 (a). Auftragung der normalisierten maximalen Amplitude der differentiellen Absorptionsänderungen bei 410 nm und 580 nm sowie des spektroskopischen Grundzustands (Absch. 3.3.2) mit sigmoidaler Anpassungsfunktion (rot) gegen den pH (b).

Ein weiterer direkter Hinweis, dass ausschliesslich der Protonierungszustand von PR D97 für die Akkumulation spektroskopisch unterscheidbarer Photointermediate im blauen und roten Spektralbereich verantwortlich ist liefern die zeitaufgelösten Absorptionsdaten der PR D97N Mutanten. In Abb. 3.36 sind die transienten Absorptionsänderungen nach Laseranregung von PR (wt) zusammen mit PR D97N bei drei representativen Wellenlängen (400, 550 und 600 nm) dargestellt.

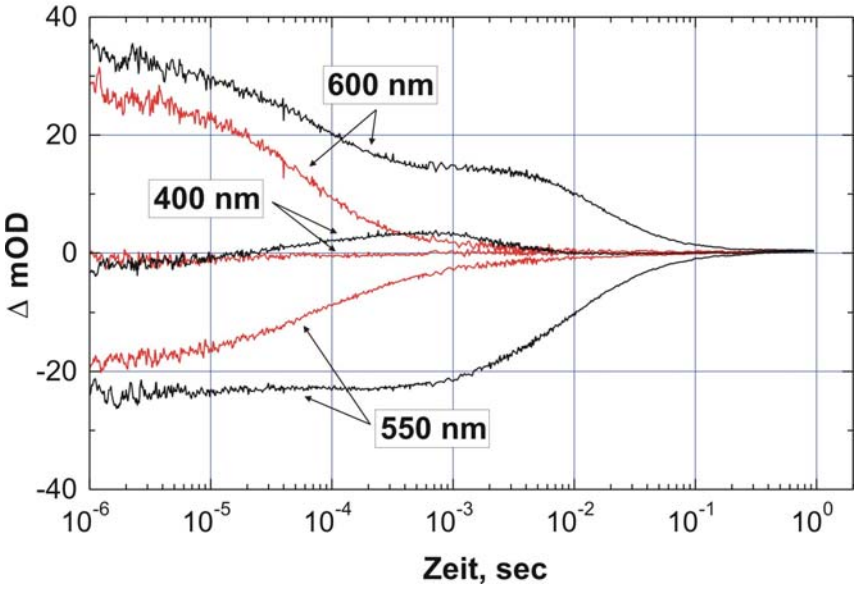


Abb. 3.36: Transiente Absorptionsänderungen von PR(wt) (schwarz) und PR(D97N)-Mutante (rot) in DOPC Lipid für drei representative Wellenlängen (400, 520 (PR (wt)) bzw. 550 (PR D97N) und 600 nm) bei 25°C (100 mM NaCl, 25 mM NaPi pH 7.5).

Die transienten Absorptionsänderungen von PR D97N bei pH 7.4 sind vergleichbar mit den Transienten der aziden Form des wt-Proteins ($PR^{violett}$). Die Mutante zeigt wie bei $PR^{violett}$ keine Akkumulation eines hypsochrom verschobenes Photointermediat bei 400 nm sowie eines bathochrom verschobenes Photoprodukt im ms-Bereich bei 600 nm. Der Photozyklus von PR D97N verhält sich wie die homologe bR D85N oder D85H Mutante, in welchen der primäre Protonenakzeptor D85 gegen eine Aminosäure ausgetauscht ist, die das Proton von der SB nicht aufnehmen kann [101] [102].

3.3.4 Temperatur- und pH-Abhängigkeit des Photozyklus

1) Temperatur und pH-Abhängigkeit der kinetischen Konstanten

Ein wichtiges Kriterium für die physikalische Relevanz der ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_i^* der sechs Exponentialfunktionen und ihrer Zuordnung zu einem kinetisch unterscheidbaren Zustand ist deren Temperaturabhängigkeit. Die von Mexfit berechneten Geschwindigkeitskonstanten zeigen sowohl für PR bei pH 10.0 als auch für die azide Spezies $PR^{violett}$ bei pH 5.0 ein nach der Eyring-Gleichung entsprechendes lineares Verhalten. Eine ähnliche Temperaturabhängigkeit der kinetischen Konstanten ist im Falle der homologen archaebakteriellen Rhodopsine bR und *Nps*RII zu beobachten [72] [106]. Aus der Steigung einer logarithmischen Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten gegen die Temperatur (Arrhenius-Auftragung) werden die Aktivierungsparameter $\Delta H^{\#}$ und $\Delta S^{\#}$ der Umwandlung zwischen den einzelnen kinetisch unterscheidbaren Zuständen P_i für die zwei extremen pH-Werte 10.0 und 5.0 bestimmt (Abb.3.35a).

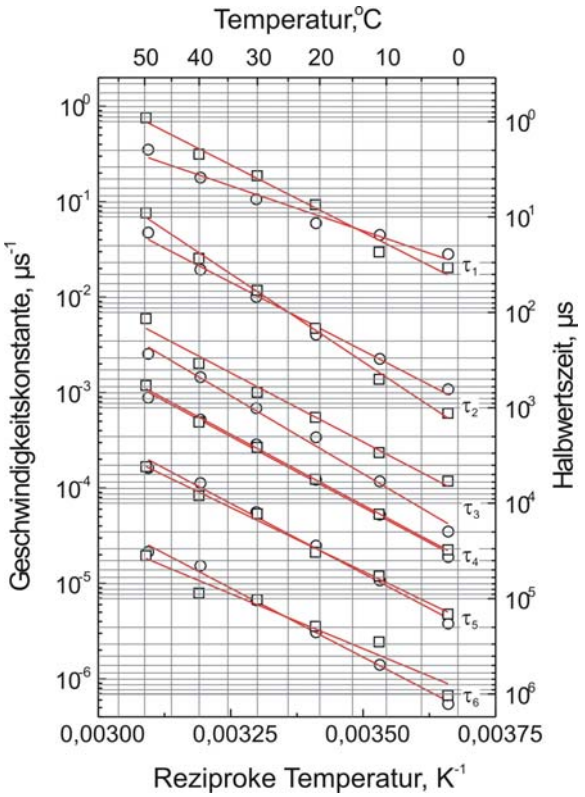


Abb. 3.37a: Arrhenius-Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten des Photozyklus von PR bei pH10 (o) und $PR^{violett}$ bei pH 5 (□) gegen die reziproke Temperatur 1/T mit zugehöriger linearer Anpassungsfunktion (rot).

Aus der Zuordnung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_i^* zu den intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten k_i geht hervor, welchen Übergang diese Aktivierungsparameter beschreiben. Die Geradengleichung der linearen Annäherungsfunktion der Arrhenius-Auftragung jeder einzelnen apparenten Geschwindigkeitskonstanten liefert die thermodynamischen Parameter der Aktivierungsenthalpie $\Delta H^{\#}$ und -entropie $\Delta S^{\#}$ der sechs Übergänge für PR bei pH 10 und $PR^{violett}$ bei pH 5. $\Delta H^{\#}$ und $\Delta S^{\#}$ sind in der folgenden Tabelle für $\tau_{1\text{-}6}$ zusammengefasst.

PR	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4	τ_5	τ_6
$\Delta H^{\#}$ (kJ/mol)	34 ± 3	52 ± 3	60 ± 3	54 ± 2	54 ± 3	53 ± 2
$\Delta S^{\#}$ (J/mol K)	-37 ± 10	5 ± 9	7 ± 10	-20 ± 7	-36 ± 5	-55 ± 7

$PR^{violett}$	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4	τ_5	τ_6
$\Delta H^{\#}$ (kJ/mol)	55 ± 3	68 ± 2	53 ± 3	55 ± 1	49 ± 2	42 ± 5
$\Delta S^{\#}$ (J/mol K)	25 ± 11	58 ± 8	-11 ± 10	-19 ± 4	- 52 ± 6	- 93 ± 16

Tab. 7: Thermodynamische Parameter der Aktivierungsenthalpie $\Delta H^{\#}$ und -entropie $\Delta S^{\#}$ der sechs Übergänge kinetisch unterscheidbarer Photointermediate für PR bei pH 10 und $PR^{violett}$ bei pH 5.

Die Werte der Aktivierungsenthalpien für PR und $PR^{violett}$ liegen bei etwa 50 kJ/mol und sind vergleichbar mit den themodynamischen Parametern für bR und *Nps*RII [72] [106]. Die Anordnung der Zeitkonstanten τ_i der Exponentialfunktionen von ~ 1 µs bis 40 ms kommt insbesondere durch den kleiner werdenden entropischen Anteil der Aktivierungsbarriere von ~ + 20 J/(mol K) auf – 100 J/(mol K) zustande.

Eine interessante Beobachtung der Datenanalyse ist, dass die Anzahl der Exponentialfunktionen von PR bei pH 10 und $PR^{violett}$ bei pH 5 als auch als die Werte der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sowie deren thermodynamische Parameter unabhängig von der H^+-Konzentration zu sein scheinen. Da dies bislang nur für die zwei extremen pH Werte 10 und 5 gezeigt wurde, werden die apparenten Geschwindigkeitskonstanten von pH 10 bis 5 in Schritten zu je einer pH-Einheit aufgetragen (Abb. 3.37b).

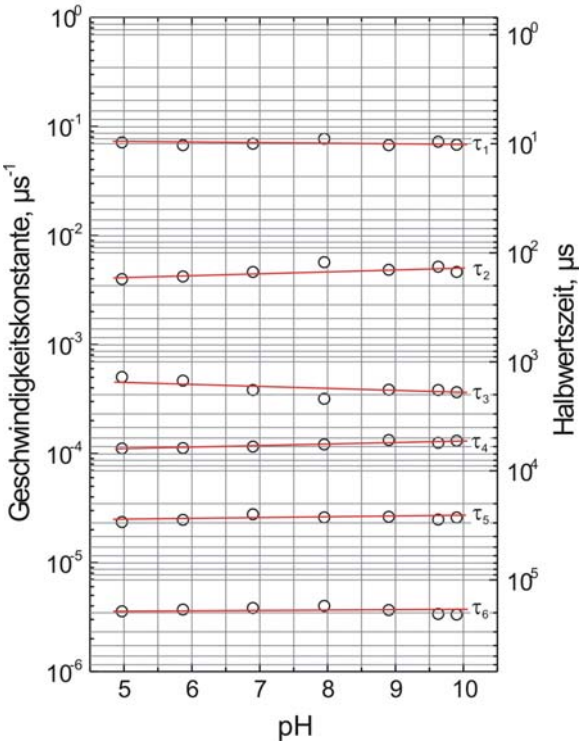


Abb. 3.37b: Logarithmische Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten des Photozyklus von PR gegen den pH-Wert von pH 10 bis 5.

Wie erwartet ist bei einer Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten gegen den pH eine Unabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten über den gesamten pH-Bereich von pH 10 bis 5 zu beobachten.

2) Temperatur und pH-Abhängigkeit der Differenzspektren und absoluten Absorptionsspektren der kinetisch unterscheidbarer Intermediate

Die transienten Absorptionsänderungen bei den verschiedenen pH-Werten (pH 5.0 und 10.0) von 330 nm bis 700 nm werden im Temperaturbereich von 0 bis 50°C hinreichend mit sechs Exponentialfunktionen beschrieben. Die Amplitudenspektren aller Exponenten (b_i) (berechnet nach Gl. 9, Abschn. 2.6.2) und die daraus abgeleiteten differentiellen Spektren (ε_i) (berechnet nach Gl. 10, Abschn. 2.6.2) sind in Abbildung 3.38 dargestellt. Am einheitlichen Verlauf der Spektren ist zu erkennen, dass die für jede Temperatur unabhängig ermittelten Exponenten korrelieren. Höhere Abweichungen der Amplitudenspektren der Exponenten sind jedoch insbesondere bei τ_1 (pH 10) zu beobachten. In diesem Fall nimmt τ_1 bei der Simulation der Datensätze, die bei höheren Temperaturen aufgenommen worden sind, Werte an, die mit der Messanordnung nicht mehr zeitlich aufgelöst werden können (< 500 ns). Aus der

Datenanalyse geht hervor, dass der Photozyklus von PR bei pH 10 und 5 jeweils sechs kinetisch unterscheidbare Intermediate durchläuft von denen das kurzlebigste Intermediat bei pH 10 nur für niedrige Temperaturen kinetisch aufgelöst werden kann.

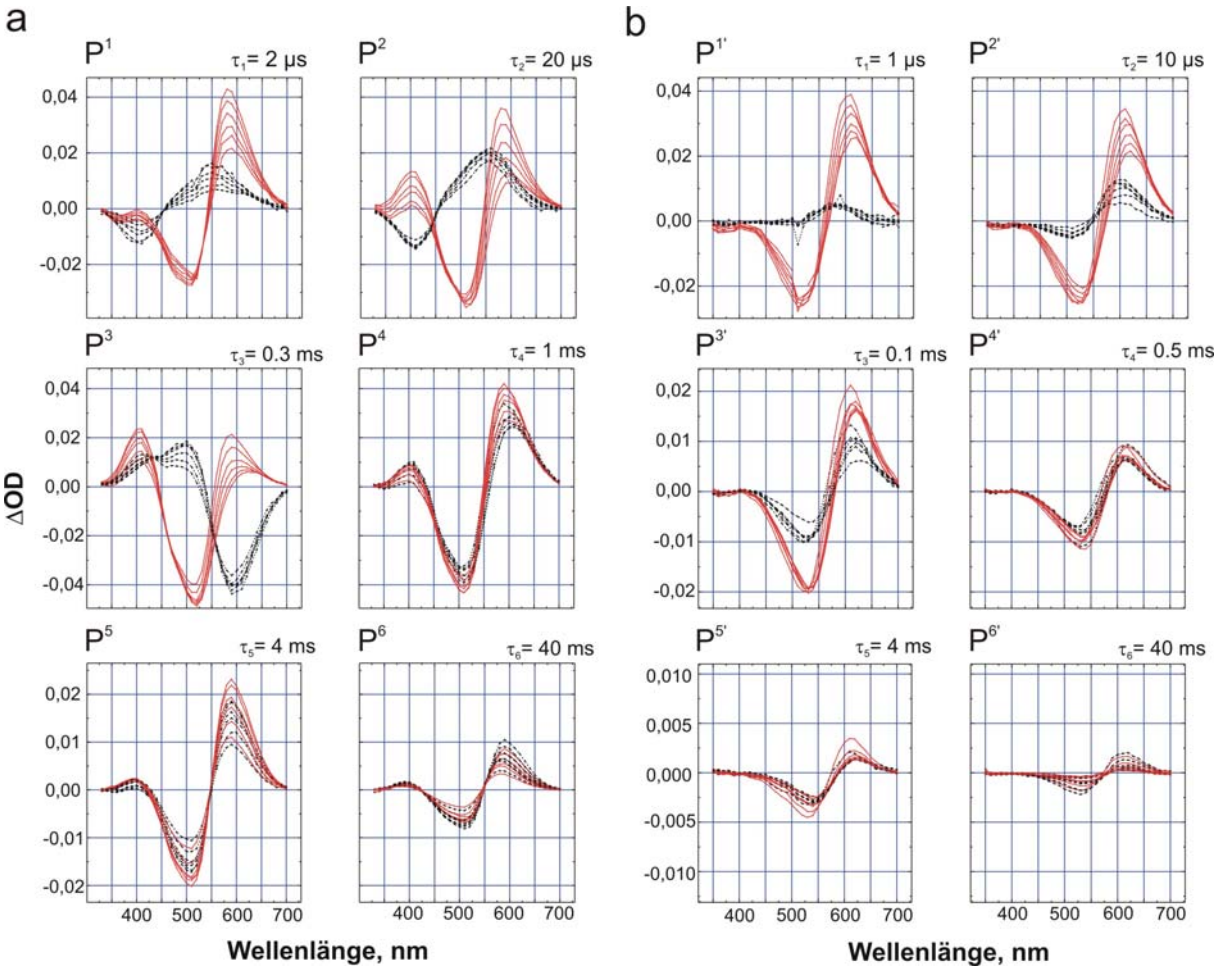


Abb. 3.38: Amplitudenspektren der Exponenten b_i (schwarz) und deren korrespondierende Differenzspektren ε_i (rot) des Photozyklus von PR im Temberaturbereich von 0-50 °C bei pH 10 (a) und pH 5 (b). Die Differenzspektren sind nach Gl. 10 Abschn. 2.6.2 berechnet. Positive Amplituden zeigen ein ansteigen und negative Amplituden ein abfallen der transienten Absorption an.

Auf Basis des Modells einer Sequenz irreversibler Folgereaktionen erster Ordnung lassen sich die Absorptionsspektren der einzelnen Intermediate (absolute Absorptionsspektren) aus den korrespondierenden Differenzspektren berechnen [112] [72]. Hierzu müssen die ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_i^* den intrinsischen Übergängen (P_i) von einem zum anderen Intermediat zugeordnet werden. Bei acht kinetisch aufgelösten Intermediaten ergeben sich selbst bei diesem einfachsten Modell insgesamt 8! = 40320 verschiedene Möglichkeiten der Zuordnung. Allerdings ergeben die meisten Kombinationen physikalisch sinnlose absolute

Absorptionsspektren, die z.B. negative Absorptionen oder unrealistische Amplituden aufweisen. Desweiteren erleichtert die Bandbreite der Werte über vier Größenordnungen und die Annahme einer systematischen Verlangsamung der Zerfälle in der Sequenz, wie sie für andere Rhodopsine beobachtet wird, eine sinnvolle Zuordnung der Geschwindigkeitskonstanten. Der einzige Parameter, der in diesem Modell unbekannt ist, stellt die Anzahl der Moleküle dar, die nach Belichtung mit der Anregungswellenlänge einen Photozyklus durchlaufen (Fraction of Cycling F_c), ein Wert für F_c von 20 % ± 5 % bei pH 10 und 15 % ± 5 % bei pH 5 liefert die besten Spektren. Grundlage bei der Bestimmung von F_c sind die Abwesenheit von negativen Absorptionen der absoluten Absorptionsspektren und vergleichbare Extinktionskoeffizienten der Intermediate in Bezug auf den spektroskopischen Grundzustand. Da die Anregungswellenlänge bei 505 nm für alle pH-Werte konstant gehalten wird, liegt F_c für PR 13 nm für $PR^{violett}$ 36 nm von Extinktionsmaximum entfernt, aus diesem Grund ist F_c für die Messungen bei pH 5 kleiner. F_c ist im Falle des PR Photozyklus nur geringfügig kleiner als F_c bei bR mit 25 % bei Laseranregung mit einer Wellenlänge von 535 nm (λ_{max} bR = 570 nm) [72].

Die aus den Differenzspektren berechneten absoluten Absorptionsspektren jedes einzelnen kinetisch unterscheidbaren Zustandes P_i sowie deren Multi-Gauss-Annäherungsfunktionen für PR (pH 10) und $PR^{violett}$ (pH 5) sind in Abb. 3.39 bzw. Abb. 3.40 für alle gemessenen Temperaturen dargestellt.

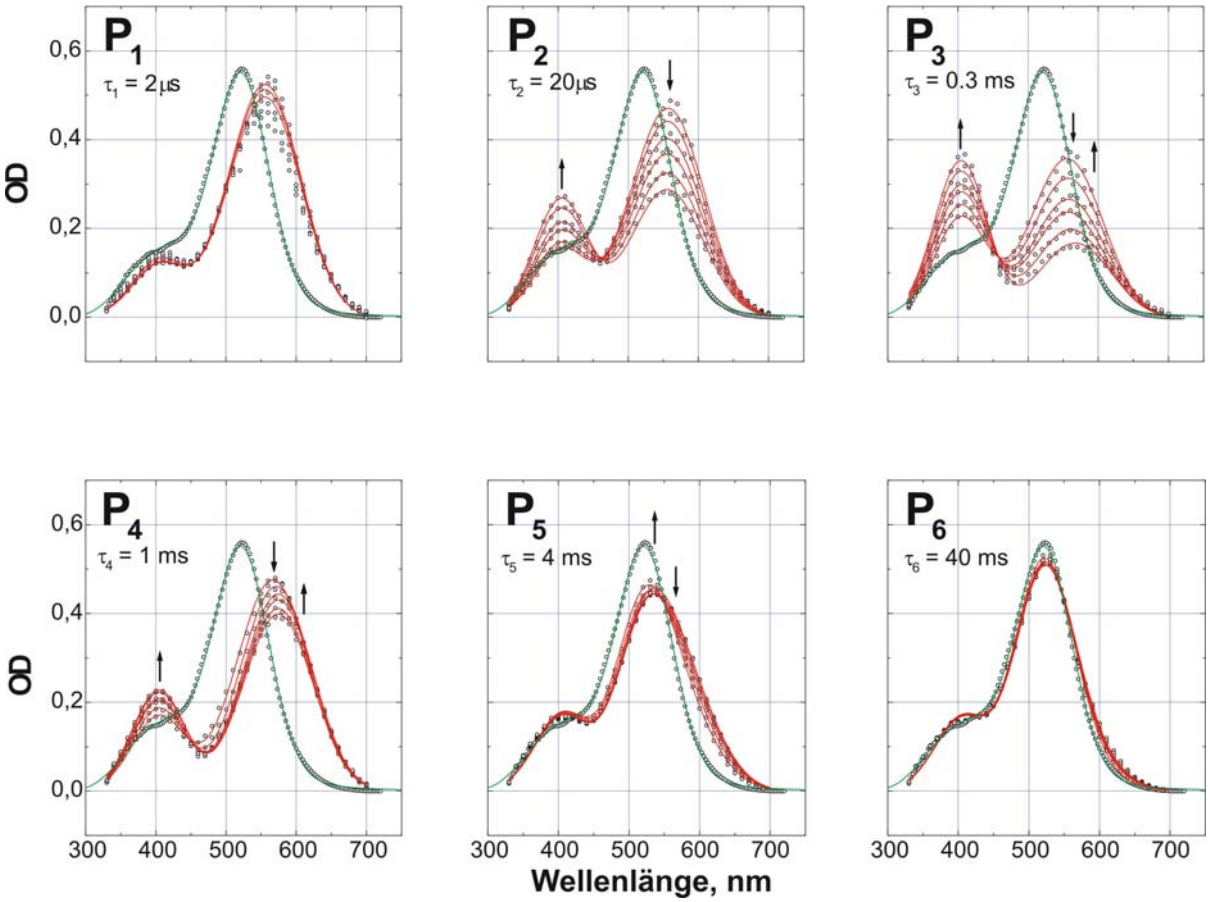


Abb. 3.39: Absolute Absorptionsspektren der kinetische unterscheidbaren Zustände P_1-P_6 des PR Photozyklus bei pH 10 im Temperaturbereich von 0 bis 50 °C (Pfeile zeigen steigende Temperatur) mit entsprechender Multi-Gauss-Annäherungsfunktion (rot). Die Spektren werden unter der Annahme einer Sequenz irreversibler Folgereaktionen berechnet. Als Vergleich ist das Absorptionsspektrum des spektroskopischen Grundzustands von PR bei pH 10 (grün) dargestellt.

Bis auf den ersten und letzten kinetischen Zustand P_1 und P_6 des PR-Photozyklus ist eine deutliche Temperaturabhängigkeit der absoluten Absorptionsspektren von $P_{2\text{-}5}$ im Bereich von 0 bis 50 °C zu beobachten. Dies deutet auf das Vorhandensein sehr schneller temperaturabhängiger Gleichgewichte zwischen spektroskopisch unterscheidbaren Intermediaten S_i hin, welche kinetisch nicht aufgelöst werden können und deshalb als Quasigleichgewichte bezeichnet werden [72].

Um die Anzahl an spektroskopisch unterscheidbaren Photointermediaten für jeden kinetischen Zustand im Photozyklus von PR und $PR^{violett}$ zu bestimmen, werden die absoluten Absorptionsspektren global durch eine Multi-Gauss-Annäherungsfunktion für alle sechs Temperaturpunkte gleichzeitig beschrieben. Vermutlich aufgrund der langen Lebensdauer des schnellsten spektroskopisch unterscheidbaren Zustands S_1, welcher selbst noch in P_3

($\tau_{1/2}$ = 0.3 ms) vorhanden ist, wird dessen Bildung im Vergleich zum Zerfall während der multiexponentiellen Datenanalyse der transienten Differenzspektren unterbewertet. Dies trifft insbesondere für die Messungen bei höheren Temperaturen zu, was zu einer geringen Quasi-Temperaturabhängigkeit des Spektrums in P_1 führt. Für eine sinnvolle globale Analyse der absoluten Absorptionsspektren werden deshalb nur die drei Datensätze mit der niedrigsten Temperatur in P_1 verwendet. Ein möglicher Einfluss eines überlagerten *13-cis*-Photozyklus von licht-adaptierten PR ist nicht auszuschließen, da der Anteil an *13-cis* Retinal in lichtadaptiertem PR bei 40 % liegt (Abschn. 3.3.1).

Für eine hinreichende Beschreibung der absoluten Absorptionsspektren von PR sind vier asymmetrische Gaussfunktionen hinreichend. Jede Gaussfunktion entspricht einem distinkten spektroskopisch unterscheidbaren Zustand S_1^{555}, S_2^{405}, S_3^{575} und S_4^{520}. Die tiefgestellten Indizies nummerieren die Intermediate fortlaufend in Abhängigkeit des Zeitpunktes ihres Entstehens. Die hochgestellten Indizes geben das Absorptionsmaximum wieder. Eine Zuordnung der vier Gaussfunktionen zu einem archetypischen spektralen Zustand auf Basis der Bildungskinetik und der Lage der relativen Absorptionsmaxima im Vergleich zum spektroskopischen Grundzustand ergibt für S_1^{555} (K-ähnlich), S_2^{405} (M-ähnlich), S_3^{575} (O-ähnlich) und S_4^{520} (Relaxation des spektroskopischen Grundzustands).

Die Multi-Gauss-Datenanalyse ergibt für P_1 ein einzelnes reines S_1^{555} Intermediat und für P_2 ein temperaturabhängiges Gleichgewicht zwischen S_1^{555} und S_2^{405}. Dieser Zustand zerfällt zu P_3 und daraufhin zu P_4, in welchen ein Beitrag von drei spektralen Intermediaten S_1^{555}, S_2^{405}, S_3^{575} zu beobachten ist. Die Relaxation zum spektroskopischen Grundzustand verläuft über P_5 und P_6, wobei in P_5 ein Gleichgewicht zwischen S_3^{575}, S_4^{520} und P_6 den reinen S_4^{520} Zustand beinhaltet.

Entsprechend der Datenanalyse für PR wird für die azide Form PR^{violett} analog vorgegangen.

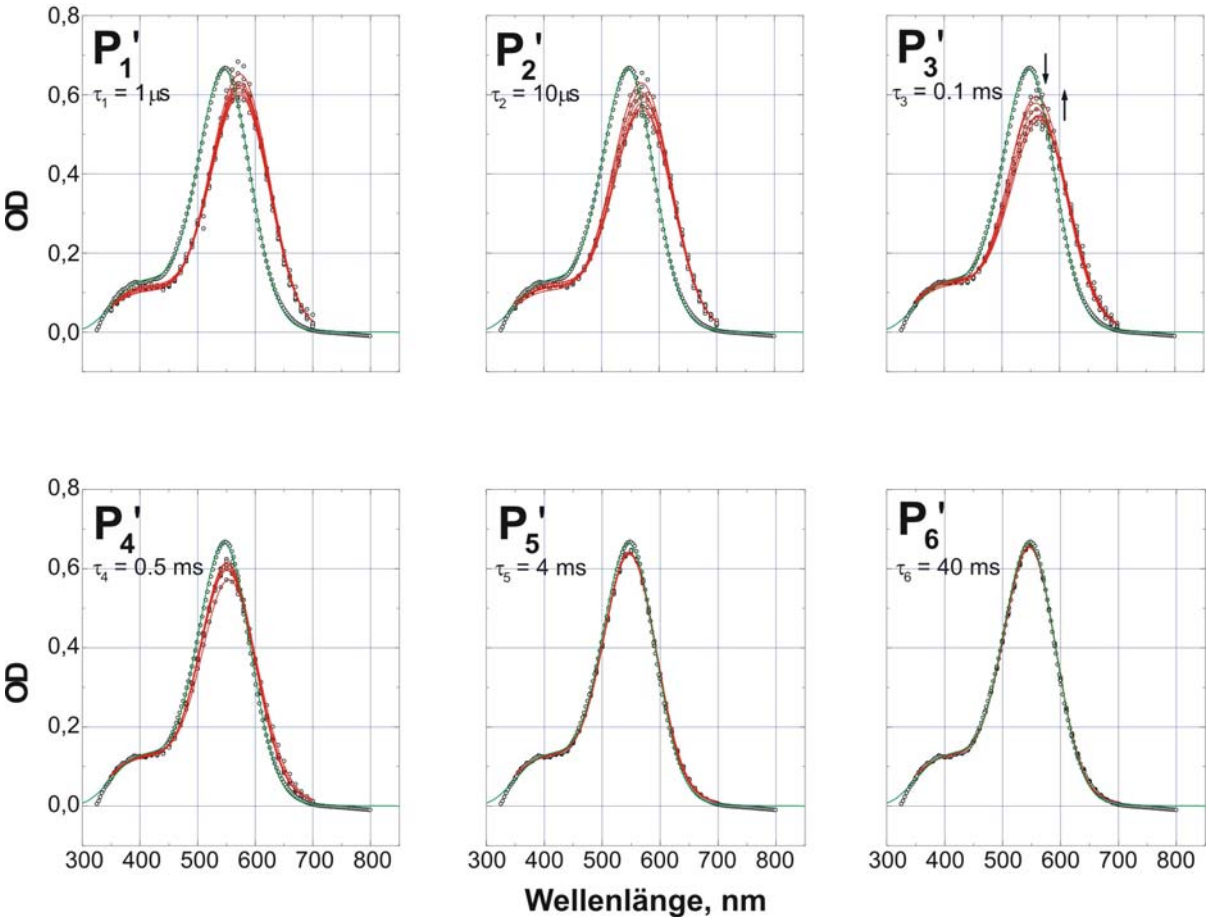
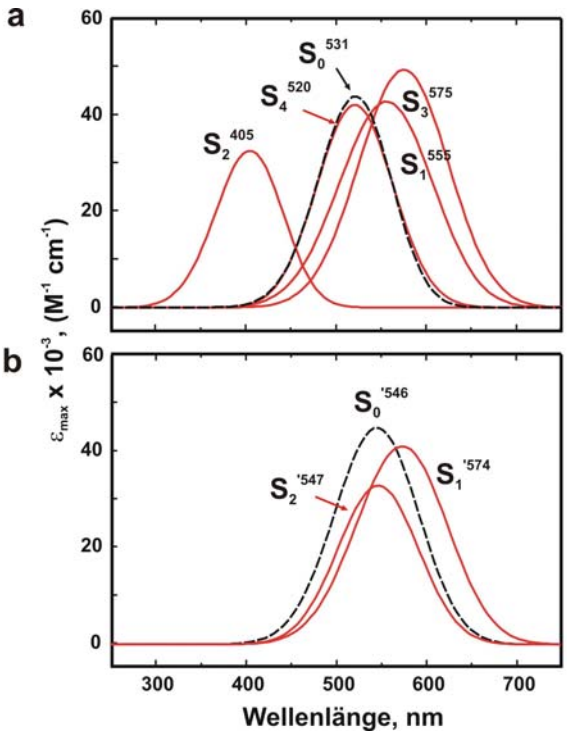


Abb. 3.40: Absolute Absorptionsspektren der kinetische unterscheidbaren Zustände P_1'-P_6' von PR^{violett} Photozyklus bei pH 5 im Temperaturbereich von 0 bis 50 °C (Pfeile zeigen steigende Temperatur) mit entsprechender Multi-Gauss-Annäherungsfunktion (rot). Die Spektren werden unter der Annahme einer Sequenz irreversibler Folgereaktionen berechnet. Als Vergleich Absorptionsspektrum des spektroskopischen Grundzustands von PR^{violett} bei pH 5 (grün).

Die absoluten Absorptionsspektren P_1'-P_6' des Photozyklus von PR^{violett} bei pH 5 sind deutlich weniger von der Temperatur abhängig als bei pH 10. Die globale Multi-Gauss-Datenanalyse der Spektren über den gemessenen Temperaturbereich zeigt einen Beitrag von nur zwei spektroskopisch unterscheidbaren Zustände S_1'^{574} (K-ähnlich) und S_2'^{547} (Relaxation des spektroskopischen Grundzustands) sowie einer zusätzlichen temperaturunabhängigen β-Bande des Retinal-Chromophors (β'). Eine Akkumulation eines hypsochrom verschobenen Photointermediats, wie dies im Falle des PR-Photozyklus bei pH 10 zu beobachten ist (Abb. 3.39), kann nicht detektiert werden. Obwohl die absoluten Absorptionsspektren der kinetischen Intermediate P'$_{1-3}$ eine geringe Temperaturabhängigkeit zeigen, ergibt die

Datenanalye nur im Falle von P_3' ein Gleichgewicht der zwei spektralen Zustände S_1'^{574} und S_2'^{547}. Die Quasi-Temperaturabhängigkeit in P_1' und P_2' ist bereits für P_1 bei pH 10 beobachtet worden und auf eine Überbewertung der Zerfallskinetik des schnellsten spektroskopischen Zustands S_1^{555} bzw. S_1'^{574} oder einen überlagerten *13-cis* Photozyklus zu erklären ist.

Aus den globalen Parametern der Gauss'schen Annäherungsfunktionen (Absorptionsmaximum, Asymmetriefaktor, Halbwertsbreite (zusammengefasst in Abb. 3.41 c) können die statischen Absorptionsspektren jedes einzelne spektroskopisch unterscheidbaren Intermediats des Photozyklus von PR und PR^{violett} berechnet werden (Abb. 3.41 a/b). Die einzelnen Extinktionskoeffizienten der Intermediate sind proportional zur Amplitude der jeweiligen Gaussfunktionen und lassen sich unter Verwendung von ε_{max} des spektroskopischen Grundzustandes rückrechnen (Absch. 3.3.2).



c

PR	$\varepsilon_{max} \times 10^{-3}$ / (M^{-1} cm^{-1})	λ_{max} / nm	ρ	Δν / cm^{-1}
S_0^{521}	43.9 ± 0.1	521.0 ± 0.3	1.26 ± 0.01	3543 ± 20
S_1^{555}	42.8 ± 0.1	555.4 ± 29.3	1.27 ± 0.04	3983 ± 124
S_2^{405}	32.6 ± 0.3	404.1 ± 0.3	1,30 ± 0,02	5463 ± 34
S_3^{575}	49.4 ± 0.1	574.6 ± 11.6	1.24 ± 0.11	3572 ± 607
S_4^{520}	42.1 ± 0.2	520.3 ± 2.5	1.20 ± 0.03	3674 ± 113

PR^{violett}	$\varepsilon_{max} \times 10^{-3}$ / (M^{-1} cm^{-1})	λ_{max} / nm	ρ	Δν / cm^{-1}
S_0'^{546}	44.9 ± 0.1	546.0 ± 0.6	1.25 ± 0.02	3719 ± 70
S_1'^{574}	41.1 ± 0.1	574.0 ± 0.2	1.26 ± 0.01	3635 ± 13
S_2'^{547}	32.9 ± 0.3	547.4 ± 0.2	1.22 ± 0.01	3524 ± 12
β' (β)	0.8 ± 0.1	401.0± 2.4	1.01 ± 0.10	6327 ± 593

Abb. 3.41: Berechnetes Absorptionsspektrum des PR Grundzustands S_0 (schwarz) und der spektroskopisch unterscheidbaren Photointermediate S_1-S_4 bei pH 10 (a) sowie S_0' und S_1'-S_2' bei pH 5 (b). Zusammenfassung der Parameter der Multi-Gauss-Annäherungsfunktionen der einzelnen spektroskopisch unterscheidbaren Photointermediate S_i für den Photozyklus von PR und PR^{violett}. ε_{max}: Extinktionskoeffizient, λ_{max}: Absorptionsmaximum, ρ: Asymmetriefaktor, Δν: Halbwertsbreite.

Die Extinktionskoeffizienten der einzelnen spektralen Zustände sind unterschiedlich im Vergleich zum spektroskopischen Grundzustand für PR S_0^{521} mit ε_{max} = 43.900 M^{-1} cm^{-1}. Das

schnellste und langsamste Photointermediat S_1^{555} und S_4^{520} besitzen einen vergleichbaren Extinktionskoeffizienten wie der Grundzustand, hingegen weisen die Photointermediate S_2^{405} mit ε_{max} = 32.600 M^{-1} cm^{-1} und S_3^{575} mit 49.400 M^{-1} cm^{-1} deutliche Unterschiede auf. Der Extinktionskoeffizient des hypsochrom verschobenen Photointermediats S_2^{405} ist ~ 25 % geringer als ε_{max} des spektroskopischen Grundzustands. Dies war zu erwarten, da ein vergleichbar geringer Extinktionskoeffizient für das hypsochrom verschobene M-Photointermediat des bR-Photozyklus beschrieben ist mit $\varepsilon_{412\ nm}$ = 23.000 M^{-1} cm^{-1} (ε_{max} bR-Grundzustand = 65.000 M^{-1} cm^{-1}) [84].

3) Temperaturabhängigkeit der Quasigleichgewichte spektroskopisch unterscheidbarer Intermediate des PR-Photozyklus

Unter den sechs kinetisch unterscheidbaren Intermediaten des Photozyklus von PR stellen, bis auf den schnellsten und langsamsten Zustand P_1 und P_6, alle weiteren Zustände eine Mischung aus zwei oder sogar drei spektroskopisch unterscheidbaren Intermediate S_i dar. Diese befinden sich in einem schnellen thermodynamischen Gleichgewicht miteinander. Die Temperaturabhängigkeit dieser schnellen quasistätionären Gleichgewichte können mit Hilfe der van't Hoff-Gleichung beschrieben werden. Die dazu benötigten relativen Konzentrationen jedes einzelnen spektroskopisch unterscheidbaren Zustandes werden aus diesem Grund aus den Amplituden der Gauss'schen Annäherungsfunktionen berechnet, wobei die temperaturunabhängige β-Bande des Retinal-Chromophors vorher subtrahiert wird.
Die Annäherung der Datenpunkte mit der van't-Hoff Gleichung wird dadurch erleichtert, dass die temperaturabhängigen Gleichgewichte für $T \rightarrow 0$ bzw. $T \rightarrow \infty$ komplett auf der Seite einer der Komponenten verschoben sind. In diesem Fall ergeben sich für die Temperaturrandwerte relative Konzentration der Komponenten von 0 bzw. 1.
Die Datenanalyse unter Anwendung der van't Hoff-Gleichung für zwei bzw. drei Komponenten im thermodynamischen Gleichgewicht liefert jedoch nur für den kinetischen Zustand P_2 ein eindeutiges Ergebnis, da in diesem Fall die spektralen Intermediate S_1^{555} und S_2^{405} im Hinblick auf ihrer Absorptionseigenschaften getrennt vorliegen.
Werden die relativen Konzentrationen der zwei spektroskopisch unterscheidbaren Zustände in P_2 gegen die Temperatur aufgetragen zeichnet sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf der relativen Konzentrationen für S_1^{555} und S_2^{405} ab, wobei die Konzentration von S_1^{555} bei steigender Temperatur zunimmt (Abb. 3.42 a). Der Kurvenverlauf wird mit der van't Hoff-Gleichung zufriedenstellend angenähert. Die daraus resultierenden thermodynamischen

Parameter der Aktivierungsenthalpie $\Delta H^{\#}$ und –entropie $\Delta S^{\#}$ (zusammengefasst in Tab. 8) dienen zur Berechnung der freien Energie $\Delta G^{\#}$ des Gleichgewichts für die zwei Temperaturen 0 und 50 °C und ist in einem Energiediagramm dargestellt (Abb. 3.42b).

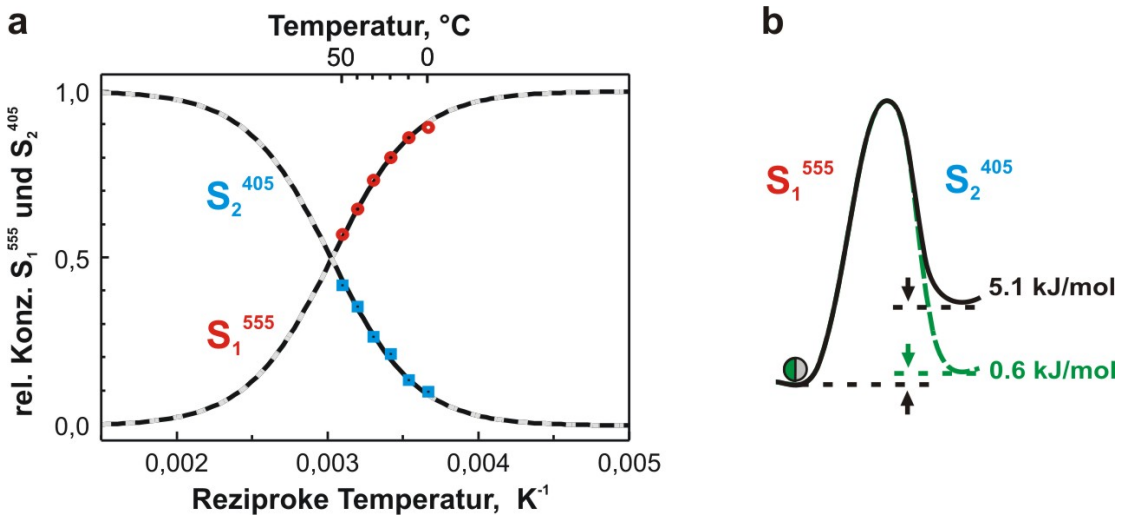


Abb. 3.42: Temperaturabhängigkeit des quasistationären Gleichgewichts der spektroskopisch unterscheidbaren Intermediate S_2^{555} und S_2^{405} im kinetischen Zustand P_2 des PR-Photozyklus bei pH 10. Die van't Hoff Annäherungsfunktion im experimentel gemessenen Temperaturbereich von 0-50°C (——) und für extrapolierten Temperaturen T→0 bzw. T→∞ (----) sind zusätzlich eingezeichnet (a). Diagramm der freien Energie $\Delta G^{\#}$ des quasistationären Gleichgewichts bei 0°C (schwarz) und 50 °C (grün) (b).

	PR (pH 10)	$\Delta H^{\#}$ in kJ/mol	$\Delta S^{\#}$ in J/(mol K)
P_2	$S_1^{555} \leftrightarrow S_2^{405}$	29.6 ± 1.5	89.6 ± 34.7

Tab. 8: Thermodynamische Parameter der Aktivierungsenthalpie $\Delta H^{\#}$ und -entropie $\Delta S^{\#}$ des quasistationären Gleichgewichts zwischen den spektroskopisch unterscheidbarer Zustände S_1^{555} und S_2^{405} im kinetischen Intermediat P_2 des PR-Photozyklus (bei pH 10).

Aus den berechneten Konzentrationen der spektralen Intermediate S^1_{555} und S^2_{405} ist es möglich eine Gleichgewichtskonstanten K abzuschätzen. Bei einer Temperatur von 0°C wird für $K = [S^2_{405}]/[S^1_{555}]$ ein Wert von 0.1 und bei 50 °C von 0.6 berechnet. In diesen Fällen sind 90 % (0°C) bzw. 60 % der Moleküle in S^1_{555}. Die Verschiebung des Gleichgewichts von S^1_{555} zu S^2_{405} bei Erhöhung der Temperatur ist mit einer Abnahme der freien Energie $\Delta G^{\#}$ von 5.1 kJ/mol auf 0.6 kJ/mol verbunden, was insbesondere auf den hohen entropischen Anteil von knapp 100 J/(mol K) zurückzuführen ist.

3.4 Untersuchung der elektrogenen Eigenschaften von Proteorhodopsin

3.4.1 Lichtinduzierte pH-Änderungen von PR-exprimierenden *E.coli* Zellen

Werden PR-exprimierenden *E.coli* Zellen mit grünem Licht belichtet (Halogen-Lampe, λ>495 nm) ist eine stationäre, biphasische Azidifizierung des extrazellulären Mediums von etwa 0.3 pH-Einheiten zu beobachten. Der pH-Wert steigt nach Abschalten der Lichtquelle innerhalb von 15 min auf den Ausgangs-pH vor Belichtung zurück (Abb. 3.43). Bei Kontrollzellen findet keine lichtinduzierte pH-Änderung des Mediums statt. Aus diesem Grund ist PR funktionell einer auswärtsgerichteten Protonenpumpe oder einwärtsgerichteten Hydoxylionenpumpe zuzuordnen. Diese Beobachtung konnte mittels „Voltage-clamp"-Experimenten an PR-exprimierenden *Xenopus laevis* Oocyten, welche in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. T. Friedrich in der Abteilung für biophysikalische Chemie von Prof. Dr. E. Bamberg am MPI für Biophysik in Frankfurt/Main durchgeführt wurden, bestätigt werden [113].

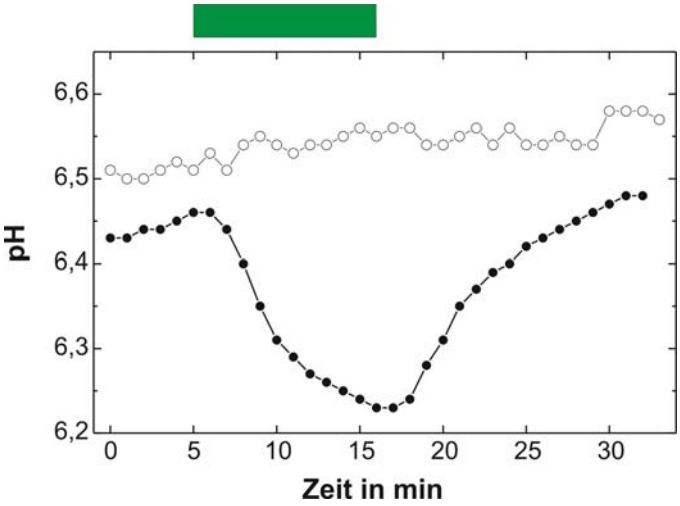


Abb. 3.43: Lichtinduzierte stationäre Azidifizierung des Mediums mit PR-exprimierenden *E.coli* BL21(DE3) Zellen (•) und Kontrollzellen (ohne IPTG-Induktion und Zugabe von *all-trans* Retinal) (o). Zellen (OD_{578} ~ 3) in 25 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$, 1 % (w/v) Glukose. Belichtung mit Halogen-Lampe, λ > 495 nm (grüner Balken) bei konstant 4°C.

3.4.2 Kinetik der Ladungstranslokation mit pH-sensitiven Farbstoffen

Um die Kinetik der Ladungstranslokation von PR in das umgebende Medium bzw. vom Medium in das Protein aufzulösen, werden die Proteine PR(wt), PR D97N und bR mit dem pH-sensitiven Farbstoff Pyranin (Molecular Probes, Leiden) mit Hilfe der zeitaufgelösten Laserblitzabsorptionsspektroskopie untersucht. Pyranin besitzt ein pH-abhängiges Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 400 nm unter sauren und 450 nm unter

alkalischen pH-Bedingungen mit einem pKs von 7.5. Die transienten Absorptionsänderungen bei einer der beiden Wellenlängen lässt einen Rückschluss auf den zeitlichen Verlauf der Ladungsaufnahme bzw. -abgabe des Proteins zu. Werden gleichzeitig die transienten Absorptionsänderungen bei representativen Wellenlängen des Photozyklus (bei denen die Intermediate akkumulieren) aufgenommen ist eine Zuordnung der Ladungsaufnahme und –abgabe zu den Photozyklusintermediaten möglich.

Hierzu werden die in PM-Lipiden rekonstituierten Proteine in einer Salzlösung mit 50 µM Pyranin versetzt und auf einen pH-Wert eingestellt, welches dem pKs von Pyranin entspricht pH 7.5). Die Kinetik der Pyraninabsorption wird bei 450 nm gemessen. In diesem Fall entspricht eine negative Absorptionsänderung bei dieser Wellenlänge einer transienten Azidifizierung des Mediums. Die Photozykluskinetik der Proteine wird bei drei Wellenlängen detektiert (PR(wt) und PR D97N: 400, 550, 600 bzw. bR(wt): 400, 550, 650 nm).

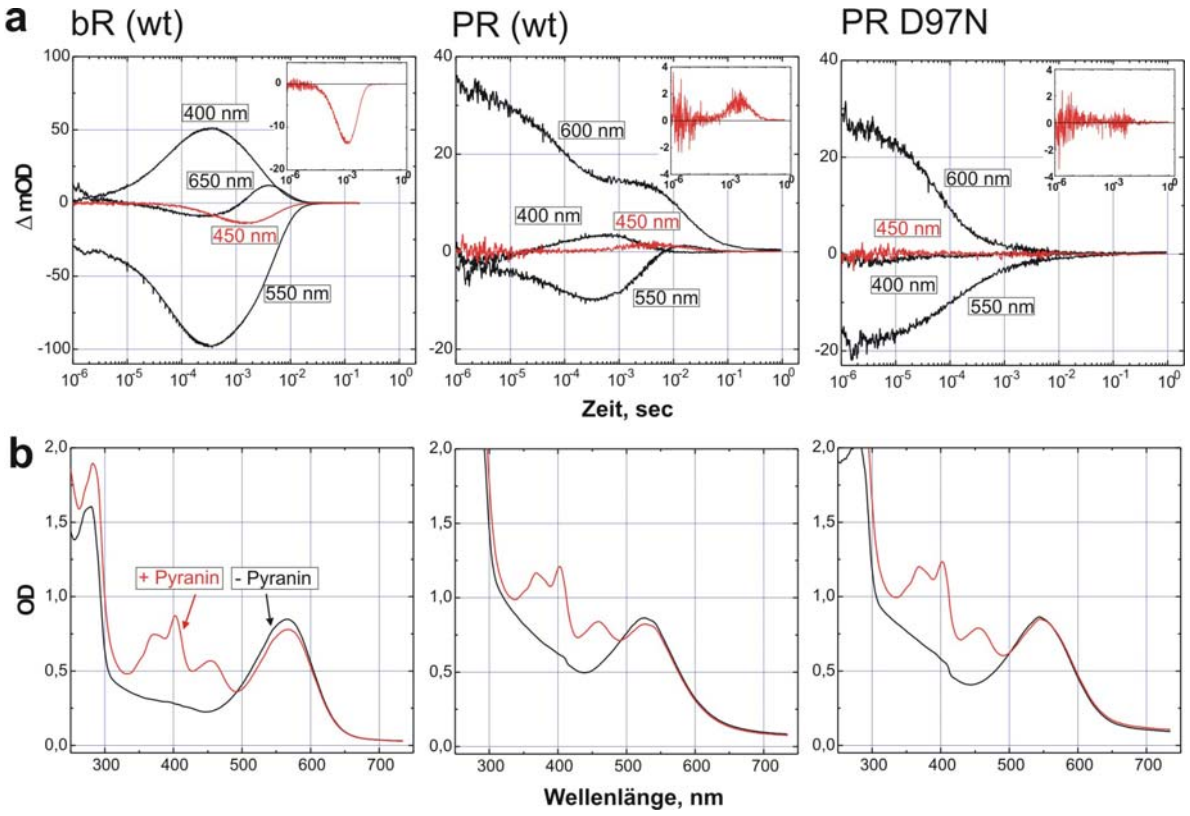


Abb. 3.44: Kinetik der Ladungsaufnahme und –abgabe von PM-Lipid rekonstituiertem bR(wt), PR(wt) und PR D97N-Mutante bei 25°C (100 mM NaCl, pH 7.5). Die transienten Absorptionsänderungen (a) sind für jedes Protein bei drei representativen Wellenlängen aufgenommen (schwarz). Zusätzlich ist die Differenz der transienten Absorptionsänderung bei 450 nm mit und ohne Pyranin dargestellt, welche in der linken oberen Ecke jedes Graphen nochmals vergrössert ist. In (b) sind die jeweiligen statischen Absorptionsspektren ohne und mit 50 µM Pyranin für jedes Protein dargestellt.

Im Falle von bR(wt) ist eine negative Amplitude der Pyranin-Absorption bei 450 nm zu detektieren, was auf eine transiente Azidifizierung des Mediums nach Laseranregung hindeutet (Abb. 3.44 a). Die Protonenabgabe ins Medium findet demnach bei bR vor der Protonenaufnahme statt [114]. Die Absorption bei 450 nm wird erst nach Akkumulation des bR M-Photointermediats (400 nm) maximal und nimmt danach ab bis der Ausgangs-pH bei Akkumulation des O-Intermediats (650 nm) erreicht ist.
Bei PR(wt) ist eine positive Amplitude der transienten Absorptionsänderungen des Pyraninfarbstoffs bei 450 nm zu beobachten. In diesem Fall ist die Protonenaufnahme aus dem Medium schneller als die Abgabe bzw. *vice versa* für Hydroxylionen. Diese transiente Alkalisierung des Mediums wird maximal mit der Akkumulation des hypsochrom verschobenen Photointermediats (400 nm) und nimmt ab während der Bildung des bathochrom absorbierenden Zustands in der ms-Zeitskala. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass der Photozyklus von PR zu einer transienten pH-Änderung des Mediums führt durch aktiven Transport von H^+ oder OH^--Ionen. Die Kinetik dieser Ladungstranslokation verläuft über eine schnelle transiente Alkalisierung und unterscheidet sich demnach deutlich in Bezug auf bR. Die PR-Mutante D97N, bei welcher der primäre Protonenakzeptor D97 gegen eine positiv-ionisierte Aminosäure ausgetauscht ist, zeigt unter diesen Bedingungen keinen transienten Protonentransport. Dies bedeutet aber nicht, dass diese Mutante keine Protonen pumpt, da mit Hilfe des Pyranin-Farbstoffs selbst bei der effizienten Protonenpumpe bR nur maximale Absorptionsveränderungen des Pyranins von wenigen mOD detektiert werden können.

3.4.3 Lichtinduzierte Ladungstransportmessungen an der BLM

Für lichtinduzierbare Ionenpumpen oder –kanäle eignen sich Ladungstransportmessungen an planaren Lipiddoppelschichten („Black Lipid Membrane“, BLM) für eine detaillierte Charakterisierung der elektrogenen Eigenschaften. BLM-Messung findet unter „Steady-state“ oder Fliessgleichgewichts-Bedingungen statt (vergl. Abschn. 2.6.4). Die Probe wird hierzu über die gesamte Messdauer mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt und der resultierende Photostrom detektiert. Im Gegensatz dazu stellen die zeitaufgelösten spektroskopischen Messungen des Photozyklus „Single-Turnover“-Experimente dar. Um die bisher gewonnen Erkenntnisse des PR-Photozyklus in Korrelation zu setzen mit Ladungstransportmessungen an planaren Lipiddoppelschichten, ist der Einfluss von grünem

Hintergrundlicht auf die Akkumulation der Photointermediate spektroskopisch zu überprüfen. Dazu werden die transienten Absorptionänderungen von lichtadaptiertes PR bei pH 10 und 6 mit und ohne grünem Hintergrundlicht verglichen.

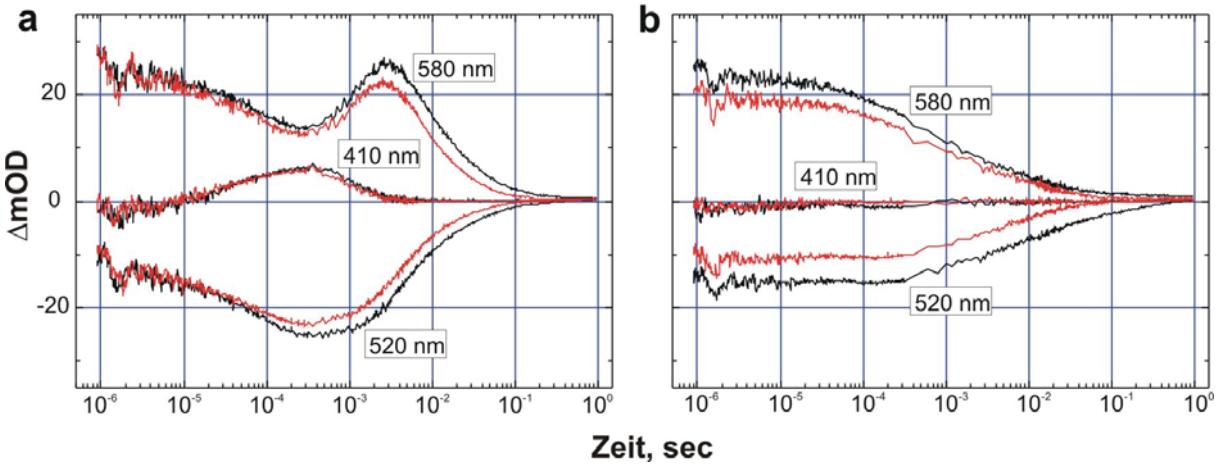


Abb. 3.45: Transiente Absorptionsänderungen von PR in PM-Lipiden bei pH 10 (a) und pH 6 (b) mit (rot) und ohne (schwarz) grünem Hintergrundlicht (Halogen-Lampe 2.0 mW/cm^2, $\lambda > 500$ nm) bei drei representativen Wellenlängen (410, 520 und 580 nm) . Pufferbedingungen: 100 mM NaCl, 25 mM NaPi.

Die transienten Absorptionsänderungen von PR bei pH 10 und 6 bei den drei repräsentativen Wellenlängen 410 nm für die Akkumulation von des M-ähnlichen Intermediats, 520 nm (Relaxation des spektroskopischen Grundzustands) und 580 nm (K-ähnliches und O-ähnliches Intermediat) mit und ohne grünem Hintergrundlicht zeigen keine grossen Unterschiede. Die Amplituden der transienten Absorptionsänderungen bei 520 und 580 nm sind bei Hintergrundbeleuchtung um etwa 1/10 kleiner, da sich weniger Moleküle im spektroskopischen Grundzustand befinden. Die Akkumulation der Photozyklusintermediate ist unabhängig von der Anwesenheit von Hintergrundbelichtung und findet auch unter Fliessgleichgewichtsbedingungen statt, aus diesem Grund ist eine Interpretation der BLM-Ladungstransportmessungen auf Basis des aufgestellten Photozyklusmodel von PR möglich.

Nach Anlagerung von PR enthaltenden Proteoliposomen an die BLM wird bei neutralem pH 7 unmittelbar mit der Belichtung mit grünem Licht ein biphasischen transienter Strom registriert, zuerst in die negative dann in die positive Richtung (Abb. 3.46). Der positive transiente Strom mit einer maximalen Amplitude von bis zu 4 nA/cm^2, klingt innerhalb von wenigen Millisekunden monoexponentiell auf die Grundlinie ab und zeigt den sehr schnellen proteininterne Ladungstransport von der SB auf den primären Protonenakzeptor D97 an, der innerhalb von 10 µs bei der maximalen Akkumulation von M abgeschlossen ist.

Die Amplitude des schnellen negativen transienten Stroms ist kleiner im Vergleich zur positiven Komponente. Berücksichtigt man neben dem Vorzeichen, dass schnelle Auftreten und Abklingen des negativen Stroms, so kann dieses Signal der Protonenaufnahme aus dem intrazellulären Raum zugeordnet werden. Dass dieser Prozess schneller als die Protonenabgabe ins extrazelluläre Medium erfolgt, im Gegensatz zum bR [114], korreliert mit den Daten die mit dem pH-sensitiven Farbstoff Pyranin spektroskopisch detektiert werden (vergl. Abschn. 3.4.6). Nach Beendigung der Belichtung wird ein kleiner positiver transienter Strom detektiert mit einer Amplitude von bis zu 1 nA/cm^2.

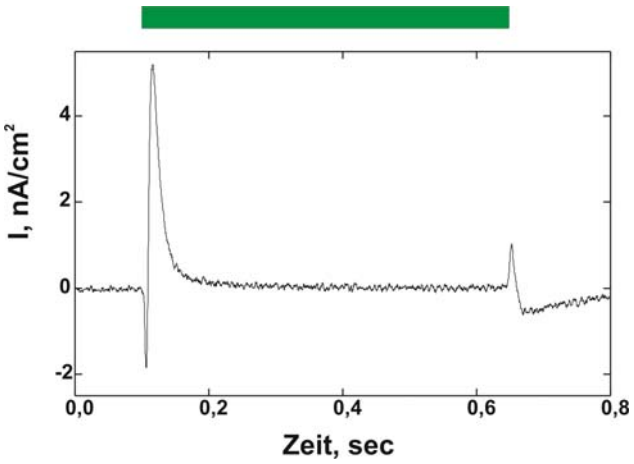


Abb. 3.46: Transienter Photostrom von PR in DOPC-Lipid bei pH 7 ohne Ionophoren. An- und abschalten der Lichtquelle ist durch grünen Balken gekennzeichent (XBO-Lampe, λ > 495 nm). Pufferbedingungen: 100 mM Na-Glukonat, 25 mM Hepes/Tris.

Die Zugabe von Ionophoren (1799-Protonophor und Monensin) zur Probe, führt zu einer Entkopplung des elektrochemischen Gradienten der BLM-Membran und der daran angelagerten Proteoliposomen. Aus diesem Grund wird unter diesen Bedingungen ausschliesslich ein aktiver Transport von Ladung beobachtet. Nach Zugabe der Entkoppler erhöht sich die Leitfähigkeit von ~10^{-9} S/cm^2 auf ~10^{-6} S/cm^2. Bei Belichtung mit weissem (λ>380 nm) oder grünem (λ>495 nm) Licht wird ein positiver, auswärtsgerichteter stationärer Photostrom von bis zu 2 nA/cm^2 detektiert (Abb. 3.47a). Die Amplitude des stationären Stroms bei neutralem (und alkalischem pH) ist positiv im Gegensatz zu bR, bei dem eine negative Amplitude detektiert wird [115]. Diese Beobachtung lässt auf eine umgekehrte

Orientierung des PR an die BLM schliessen im Vergleich zu bR. Bei pH 5 wird bei PR ausschliesslich ein negativer transienter und stationärer Photostrom detektiert (Abb. 3.47b).

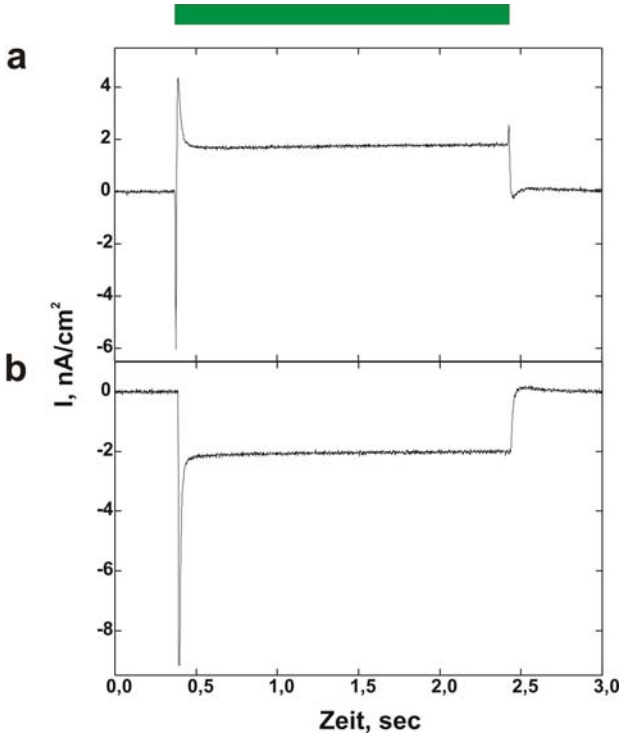


Abb. 3.47: Stationärer Photostrom von PR in DOPC-Lipid nach Zugabe von je 5 µM ethanol. Monensin und 1799-Protonophor bei pH 7.0 (a) und pH 5.0 (b). bei Belichtung mit grünem Licht (XBO-Lampe, $\lambda >$ 495 nm (grüner Balken)). Pufferbedingungen: 100 mM NaCl, 20 mM Hepes/Tris bzw. 100 mM Cholin-Chlorid oder Natrium-Glukonat, 20 mM Hepes/Tris.

Die gemessenen stationären Ströme werden von Protonen getragen, da sie auch nach Ersetzen von Cl^- durch $Glukonat^-$ bzw. Na^+ durch $Cholin^+$ im Messpuffer unbeeinflusst bleiben. Ein auswärtsgerichteter Transport von Hydroxylionen, insbesondere bei saurem pH, ist unwahrscheinlich und lässt den Schluss zu, dass PR bei neutralem pH eine auswärtsgerichtete Protonenpumpe (wie bR) und unter sauren pH-Bedingungen eine einwärtsgerichtete Protonenpumpe ist.

Die Vektorialität des lichtinduzierten Pumpstroms von PR ist neben dem pH auch abhängig von der Variation der Lichtintensität. Wird PR bei neutralem pH 7 und 100 % Lichtintensität bestrahlt, ist eine maximale positive Amplituden des stationären auswärtsgerichteten Photostroms von 3 nA/cm^2 zu beobachten. Wird daraufhin mit weniger intensivem Licht bestrahlt (1% Intensität) wird die Amplitude des Photostroms negativ mit 0.2 nA/cm^2 (Abb. 3.48a). Hingegen ist bei saurem pH 5 und Belichtung mit niedriger Lichtintensität (1%) die Amplitude des stationären einwärtsgerichteten Stroms mit negativer Amplitude im Vergleich zu hohen Lichtintensitäten von 2 auf 3.5 nA/cm^2 beinahe verdoppelt (Abb. 3.48b). Zu bemerken ist, dass das transiente Signal, dass bei Abschwächung der Lichtquelle, zu beobachten ist zeitlich nicht aufgelöst werden kann, da die Filter per Hand hinzugefügt und entfernt wurden.

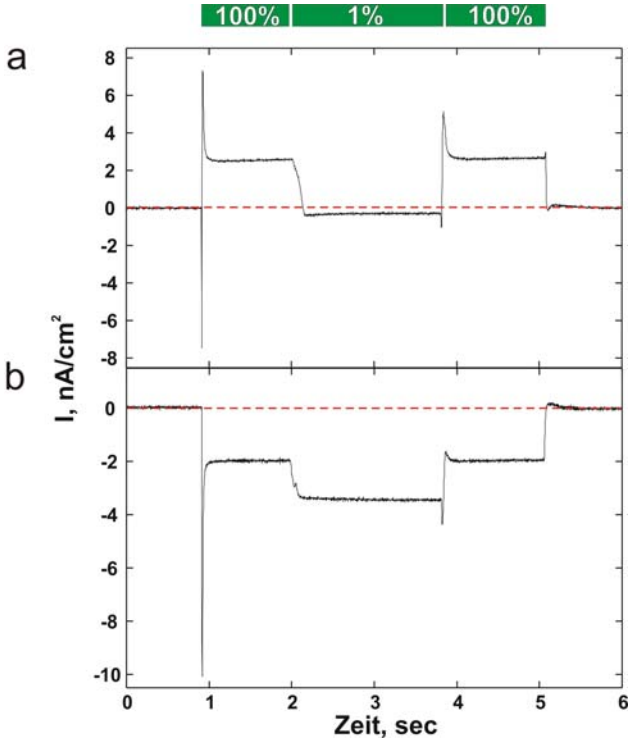


Abb. 3.48: Einfluß des stationären Photostroms von PR in DOPC-Lipid von der Lichtintensität unter Fliesgleichgewichtsbedingungen. Belichtung erfolgt mit einer XBO-Lampe (λ > 495 nm, grüner Balken) bei 100 % Lichtintensität und 1 % Lichtintensität bei pH 7 (a) und pH 5 (b). Zur Abschwächung der Lichtintensität wird ein 1 % Grauglasfilter verwendet gestrichelte rote Linie gibt den Nullwert des Stroms vor Belichtung wieder. Pufferbedingungen: 100 mM NaCl, 20 mM Hepes/Tris.

Wird die Abhängigkeit des stationären Photostroms über einen breiten Lichtintensitätsbereich bei neutralem und saurem pH aufgenommen, kann deutlich zwischen zwei konkurrierenden Pumpmechanismen unterschieden werden. Bei neutralem pH 7 nimmt die Amplitude des auswärtsgerichteten stationären Photostroms, ausgehend von einem einwärtsgerichteten, invertierten Strom, mit steigender Lichtintensität bis zu einem Maximalwert von 3 nA/cm^2 zu (Abb. 3.49a). Eine ähnliche Abhängigkeit des Photostroms kann bei saurem pH 5, bei dem PR^{violett} vorliegt, detektiert werden. Die Amplitude des invertierten einwärtsgerichteten Photostrom mit negativer Amplitude wird bei 10 % Lichtintensität maximal (2 nA/cm^2). Der Anteil des einwärtsgerichteten Stroms am Gesamtstrom nimmt aber mit steigender Lichtintensität stetig ab, schliesslich überwiegt bei 100 % Lichtintensität und pH 5 sogar der auswärtsgerichtete Strom und es kann eine positive Amplitude des stationären Stromsignals gemessen werden (Abb. 3.49b). Werden die maximalen stationären Stromamplituden gegen die Lichtintensität aufgetragen (Abb. 3.49c), ist deutlich zu erkennen, dass bei neutralem pH 7 und 100 % Lichtintensität der auswärtsgerichtete, positive Pumpstrom bereits fast in der Sättigung ist, wohingegen der konkurrierende invertierte Photostrom bei pH 5 und niedrigeren Lichtintensitäten (10 %) dominiert.

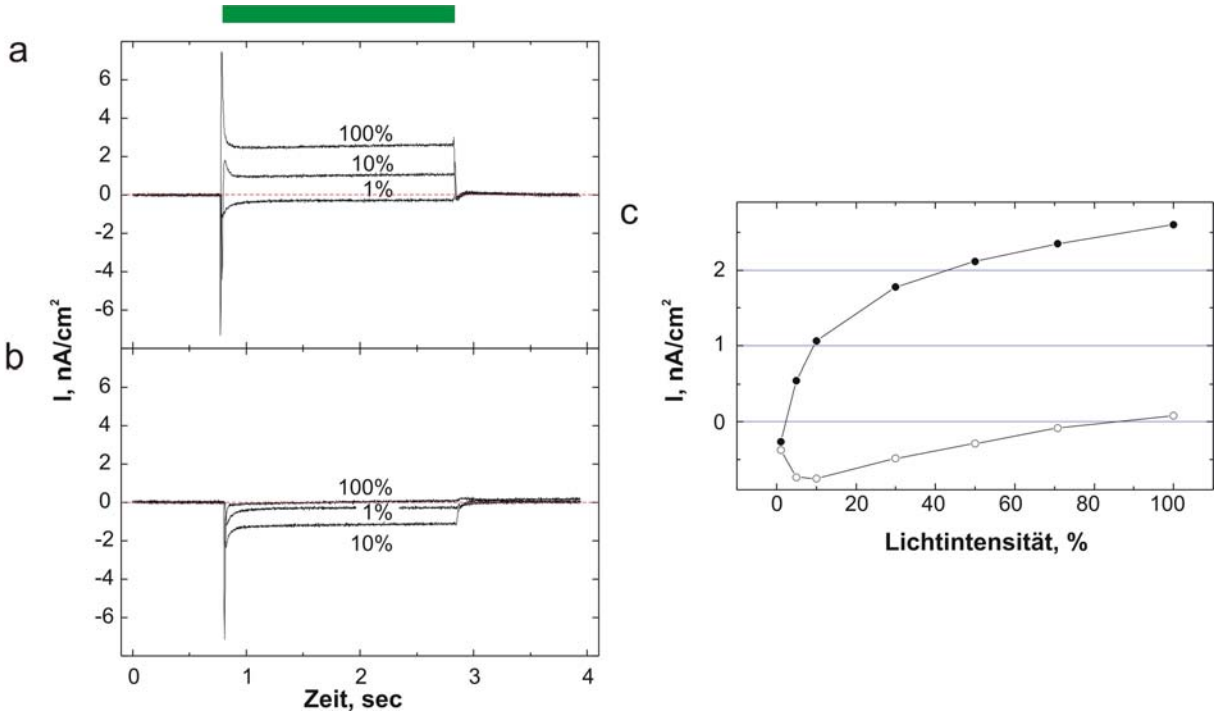


Abb. 3.49: Abhängigkeit des stationären Photostroms von PR von der Lichtintensität bei pH 7.0 (a) und pH 5.5 (b) bei drei ausgewählten Lichtintensitäten 100%, 10 % und 1%. Auftragung der Amplitude des stationären Photostrom bei pH 7.0 (•) und pH 5.5 (o) gegen die Lichtintensität von 100 % bis 1% (c). Die Messungen in (a) und (b) wurden an einer BLM gemessen, Belichtung erfolgte mit XBO-Lampe, $\lambda > 495$ nm (grüner Balken). Gestrichelte rote Linie gibt den Nullwert des Stroms vor Belichtung wieder. Pufferbedingungen: 100 mM NaCl, 20 mM Hepes/Tris.

Wie bereits anhand der zeitaufgelösten spektroskopischen Daten zu beobachten ist, verläuft der Mechanismus der Protonentranslokation von PR bei neutralem pH über eine Deprotonierung der SB und Bildung eines M-Intermediats analog zum bR. Dies ist sowohl bei „Single-Turnover"-Experimenten als auch unter Fließgleichgewichtsbedingungen zu beobachten (Abb. 3.45). Es stellt sich nun die Frage, ob sich die Akkumulation von M auch mittels BLM-Technik bestätigen lässt.

Da das M-Intermediat von PR bei 405 nm maximal absorbiert, d.h. 115 nm entfernt vom Absorptionsmaximum des spektroskopischen Grundzustands (λ_{max} (pH 7) = 520 nm), kann es mit Licht blauer Wellenlänge selektiv angeregt werden. Im Falle von bR führt dies zu einer Reisomerisierung des Chromophors und Bildung eines M-Intermediats mit *all-trans* Retinalkonfiguration, welches daraufhin in einer schnellen Reaktion zum Grundzustand zerfällt [116]. Die deprotonierte SB wird daraufhin von der extrazellulären Seite reprotoniert, was zu proteininternen Ladungsverschiebungen führt, welche in einer Änderung des transienten Photosignal zum Ausdruck kommen. Um dies für PR zu überprüfen wird das

Protein mit grünem Licht vorbelichtet, was zu einer Akkumulation von M führt, daraufhin wird mit blauem Licht bestrahlt und die transienten Photoströme über den gesamten Zeitraum aufgenommen. Obwohl auch der spektroskopische Grundzustand von PR bei Bestrahlung mit blauem Licht angeregt wird, wenngleich deutlich ineffizienter als bei Anregung mit grünem Licht, ist eine Vergrösserung der Amplitude des einwärtsgerichteten transienten Photostroms von 0.5 auf 2 nA/cm^2 zu beobachten (Abb. 3.50a angezeigt durch rote Pfeile). Die Richtung des Stroms entspricht einer Aufnahme eines Protons von Aussen in Analogie zu bR. Die Dynamik des M-Zerfalls ist unter den apparativen Bedingungen nicht hinreichend aufzulösen, jedoch ist mit Laserblitz-Photolyse-Experimenten an planaren Lipiddoppelschichten eine Abhängigkeit der Amplitude des negativen transienten Stroms von der Intervallzeit zwischen grüner Vorbelichtung und blauem Laserblitz zu messen (persönliche Mitteilung T. Friedrich, MPI für Biophysik, Frankfurt/Main).

Eine Akkumulation des M-Intermediat von PR ist auch unter Fliessgleichgewichtsbedingungen nachweisbar, da das M-Intermediat nach Absorption eines blauen Photons keinen Protontransportzyklus durchläuft. Wird PR bei pH 7 mit grünem und zusätzlichem blauen Licht bestrahlt ist eine Verringerung der Amplitude des stationären auswärtsgerichteten Signals von 1.2 auf 0.9 nA/cm^2 zu detektieren (Abb. 3.50b). Daneben deuten schnelle transiente Photoströme in die negative Richtung (bei Anschalten von blauem Licht) und in die positive Richtung (bei Ausschalten von blauem Licht) auf veränderte proteininterne Ladungstransportvorgänge bei zusätzlichem blauen Licht hin. Hingegen ist bei pH 5 nur eine kleine Vergrösserung des stationären einwärtsgerichteten Stroms um 0.2 nA/cm^2 bei Belichtung mit zusätzlichem blauen Licht zu beobachten. In diesem Fall ist der Photostrom bei Bestrahlung mit grünem Licht noch nicht in der Sättigung, wird die Probe mit zusätzliches blaues Licht bestrahlt wird der spektroskopische Grundzustand angeregt (Abb. 3.50c).

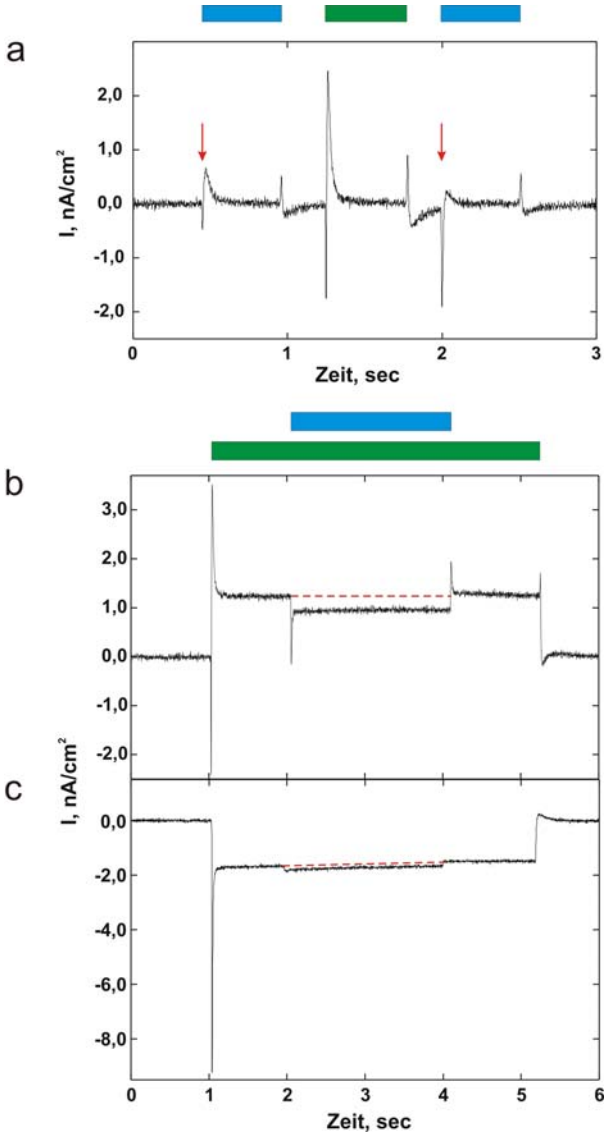


Abb. 3.50: Transienter Photostrom von PR in DOPC-Lipid bei Belichtung mit blauem Licht vor und nach Vorbelichtung mit grünem Licht bei pH 7 (a). Die vergösserten Amplituden der negativen transienten Ströme sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Stationärer Photostrom bei grünem und zusätzlichem blauem Licht bei pH 7 (b) sowie pH 5 (c). Belichtung mit XBO-Lampe, $\lambda > 495$ nm (grüner Balken), HBO-Lampe, 390 nm $< \lambda <$ 410 nm (blauer Balken). Pufferbedingungen: 100 mM NaCl, 20 mM Hepes/Tris.

Eine Akkumulation eines M-Intermediats für PR ist mittels BLM-Ladungstransportmessungen eindeutig zu identifizieren, jedoch ausschliesslich bei neutralem und nicht bei saurem pH. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da auch Spektroskopisch nur bei neutralem pH eine Akkumulation von M zu beobachten ist.

Die pH-Titrationsexperimente des spektroskopischen Grundzustands von PR (wt) zeigten, dass unter sauren Bedingungen eine bathochrom verschobene Spezies ($PR^{violett}$), bei welcher der primäre Protonenakzeptor D97 protoniert ist, gebildet wird. Die PR D97N Mutante zeigte vergleichbare stationäre und zeitaufgelöste Spektraleigenschaften wie $PR^{violett}$. Es stellt sich die Frage, ob der Protonierungszustand von D97 auch für die Vektorialität des lichtinduzierten Protonentransports zuständig ist, wäre dies der Fall sollte die D97N-Mutante ausschliesslich den einwärtsgerichteten, negative Photostrom zeigen. Mit dem pH-sensitiven Farbstoff Pyranin konnte keine transienten pH-Änderungen dieser Mutante detektiert werden,

was aber auf die relative Insensitivität dieser Methode zurückgeführt werden kann (vergl. Abschn. 3.3.6). Aus diesem Grund werden die elektrogenen Eigenschaften der PR D97N-Mutante auch mittels BLM-Technik untersucht.

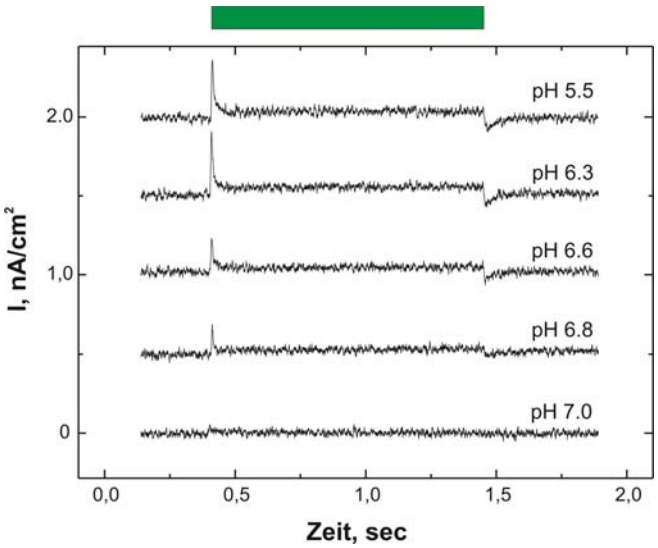


Abb. 3.51: Stationärer Photostrom von PR(D97N) in PM-Lipiden von pH 7.0 bis 5.5. Beleuchtung mit grünem Licht ist mit Balken gekennzeichnet (XBO-Lampe, $\lambda > 495$ nm). Die Leitfähigkeit der BLM betrug nach Zusatz von 5 µM Monensin und 5 µM 1799 10 bis 30 nS. Pufferbedingungen: 100 mM NaCl, 20 mM Hepes/Tris.

Die PR D97N-Mutante zeigt in Gegenwart von Ionophoren bei neutralem pH 7 keinen transienten sowie stationären Photostrom. Bei Erniedrigung des pH kann ein zunehmender transienter Strom in positiver Richtung detektiert werden, welcher proteininterne Ladungstransportverschiebungen reflektiert. Dieser Strom wird bei pH 6.3 maximal mit 0.4 nA/cm^2 und wird kleiner bei Verringerung der Lichtintensität. Desweiteren ist ein stationärer einwärtsgerichteter Strom mit einer Amplitude von 0.1 nA/cm^2 bei saurem pH zu beobachten. Dieser sehr kleine stationäre Strom ist zwar eindeutig zu identifizieren, kann jedoch auch auf Messungenauigkeiten der BLM-Apparatur zurückgeführt werden und lässt aus diesem Grund keine Interpretation zu. Diese Beobachtung entspricht dem Ergebnis des Pyranin-Experiment (Absch. 3.4.2) und lässt den Schluss zu, dass die PR D97N-Mutante keine invertierte, einwärtsgerichtete Protonenpumpe ist. Eine Erklärung dafür wäre, dass das proteininterne Ladungstranslokationsnetzwerk, durch das Einbringen dieser Mutation, gestört wird, was zu einer Inaktivierung der Pumpe führt. Aus diesem Grund ist bei dieser Mutante keine Aussage zu treffen, ob der Protonierungszustand von D97 über die Vektorialität der Protonenpumpe entscheident ist.

4 Diskussion

4.1 Funktionelle *in vitro* Expression von Membranproteinen

Die funktionelle Expression politoper Membranproteine in einem zellfreien Synthesesystem ist insbesondere abhängig von den Eigenschaften der stabilisierenden hydrophoben Umgebung. Der Faltungsmechanismus vieler integraler Membranproteine ist ein komplexer Prozess, der enzymkatalysiert aber auch spontan ablaufen kann. Beide Prozesse finden in der Regel cotranslational statt, d.h. dass sich die wachsende Polypeptidkette währenddessen sie am Ribosom synthetisiert wird in die Membran faltet. Bislang konnten integrale Membranproteine nur mit Hilfe der enzymkatalysierten Membraninsertion unter Verwendung von isolierten Mikrosomen in einem zellfreien Proteinsynthesesystem funktionell dargestellt werden. Die mikrosomale Membran besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, aus diesem Grund ist eine direkte funktionelle Charakterisierung des Genprodukts nicht möglich und es muss deshalb aufwendig gereinigt werden. Diese Einschränkung ist bei Verwendung einer artifiziellen hydrophoben Umgebung bei der *in vitro* Expression nicht zu erwarten, da diese in definierter Form ohne proteinogene Verunreinigungen eingesetzt werden kann. Dieser Ansatz setzt jedoch voraus, dass sich das Genprodukt spontan in die Membran faltet. Der Mechanismus der spontanen Faltung eines integralen Membranproteins in eine hydrophobe Umgebung verläuft über zwei Stufen und konnte für den 7-TM Helix Rezeptor Bakteriorhodopsin, die lichtgetriebene Protonenpumpe aus *H. salinarum*, detailliert untersucht werden [90] [80;117]:

$$bOp \rightleftharpoons I_1 \rightleftharpoons I_2 \overset{R}{\rightleftharpoons} I_R \rightarrow bR$$

Ausgehend von delipidiertem und SDS-denaturiertem bOp werden in einem ersten Schritt fünf unabhängige α-Helices in der Lipiddoppelschicht innerhalb von 20 sec gebildet (I_1). Daraufhin kommt es zu einer dichteren Packung der fünf transmembranen Helices, was die Helixbildung und Membaninsertion der restlichen bislang unstrukturierten Bereiche induziert. Während des geschwindigkeitsbestimmenden Übergangs von I_1 zu I_2 werden alle sieben α-Helices, innerhalb weniger Minuten, in die Membran gefalten. Die Sekundärstruktur von I_2 ist ähnlich zu der von nativem bR und stellt die Plattform für die Retinalbindung (R) dar. Dieser letzte Schritt der letztlich zur Bildung von funktionellen bR führt, geschieht vermutlich über

zwei kinetisch nicht unterscheidbare, aber pH-abhängige Faltungswege mit einer Geschwindigkeitskonstanten von 0.007 sec^{-1} ($\tau_{1/2}$ = 1.65 min) [118]. Der Einfluss der interhelicalen Loops auf die Faltung und Stabilität von bR ist vergleichsweise gering, da selbst die seperat dargestellten sieben Transmembranhelices spontan in eine hydrophobe Umgebung assemblieren und Gegenwart von *all-trans* Retinal funktionelles bR bilden [119].
bR scheint aufgrund der nicht enzymkatalysierten Membraninsertion im *in vitro* System als Modellsystem für eine funktionelle zellfreie Synthese besonders gut geeignet zu sein, desweiteren sind die spezifische und einfach zu untersuchende Photozyklusreaktion und der lichtinduzierte aktive Ladungstransport über die Membran für eine Funktionalitätsnachweis von Vorteil. Um eine Aussage über eine allgemeine Anwendbarkeit einer funktionellen zellfreien Synthese von Membranproteinen machen zu können wurde die zellfreie Synthese von fünf integralen Membranproteinen untersucht:

a) bR sowie der Blaulichtrezeptor *Np*sRII und die Chloridpumpe *Np*hR, beides bR-homologe Lichtrezeptoren aus dem Archaebakterium *Natronobacterium pharaonis.*
b) Das kürzlich entdeckte bR-homologe Retinalprotein PR aus Marinebakterien, welches in dieser Arbeit auch funktionell *in vivo* in *E.coli* dargestellt werden konnte, was ein Vergleich zwischen *in vivo* und *in vitro* Proteinsynthese zulässt.
c) Der pharmakologisch bedeutende *humane* Glycin Rezeptor α1 (hGlyRα1) als Vertreter eines integralen Membranproteins aus einem höheren Organismus.

Da die ersten drei Retinalproteine bR, *Np*sRII und *Np*hR bereits funktionell in *E.coli* Zellen dargestellt werden konnten [76] [77] wurde ein selbst hergestelltes gekoppeltes *in vitro* Transkriptions-/Translations-System basierend auf *E.coli* Zell-Lysaten und T7-RNA-Polymerase verwendet. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte der Einfluss stabilisierender Zusätze auf die Membranproteinfaltung untersucht werden. Hierzu diente ein Proteaseassay mit dem die ^{14}C-Leucin markierten zellfreien Syntheseprodukte auf Insertion in eine artifizielle hydrophobe Umgebung untersucht wurden. Ähnliche Assaysysteme wurden bereits für Membraninsertionsstudien anderer integraler Membranproteine verwendet [40;42;48;120].

Dieser Ansatz erlaubte nicht nur die Untersuchung des stabilisierenden Einflusses von sechs Detergenzien, mehrerer Lipide oder Lipidmischungen auf die zellfrei synthetisierten Membranproteine, sondern ermöglicht weiterhin die detaillierte Untersuchung struktureller

Membraneigenschaften auf die spontane Faltung eines nativen Polypeptids in eine hydrophobe Lipidumgebung.

Zur Stabilisierung der zellfrei dargestellten Proteine wurden ungeladene (DDM, OG, Triton X-100), zwitterionische (CHAPS), positiv oder negativ geladene (CTAB, DOC) Detergenzien als auch verschiedene Lipide mit verschiedenen biophysikalischen Eigenschaften direkt dem Syntheseansatz zugesetzt. Da der Zusatz von Detergenzien mit einer Inhibition der zellfreien Synthese verbunden war, wurde in einem ersten Schritt die halbmaximalen Inhibitorkonzentration für jedes Detergenz bestimmt. Mit Ausnahme des Detergenz OG, konnte eine Konzentration überhalb oder Äquivalent zur CMC des entsprechenden Amphiphils im Reaktionsansatz eingesetzt werden, welche im Reaktionsansatz solubilisierungsfähige Mizellen ausbilden.

Die zellfreie Synthese der Rhodopsine bR, *Np*hR, PR und der α1-Untereinheit des humanen Glycinrezeptor konnte mittels SDS-PAGE der radioaktiv-markierten Syntheseprodukte eindeutig gezeigt werden, ausschliesslich das *Np*sRII ist in der SDS-PAGE-Analyse nur in Form hochmolekularer Aggregate zu detektieren. Der stabilisierende Einfluß von verschiedenen Mizellen-ausbildender Detergenzien im Reaktionsansatz wurde mittels eines Proteaseassays untersucht. Hierbei konnte beobachtet werden, dass der Zusatz von Detergenzien zu keiner Stabilisierung des zellfrei dargestellten bR^{cf} führte. Hingegen konnte bei Zusatz von Doppelschichten-ausbildenden Phospholipiden in einer Konzentration von 4 mg/ml eine eingeschränkte Proteasezugänglichkeit von bR^{cf} (Membranintegration in DOPC-SUVs ~ 50 %) beobachtet werden. Die Untersuchung der weiteren archae- und eubakteriellen Retinalproteinen (*Np*sRII^{cf}, *Np*hR^{cf}, PR^{cf}) und des GPCRs hGlyRα1^{cf} auf Membraninsertion in Phospholipide war nur teilweise erfolgreich. Durch den Zusatz von DOPC-SUVs im Syntheseansatz ist nur für PR^{cf} und *Np*sRII^{cf} eine leichte Stabilisierung mit Hilfe des Proteolyseassays zu beobachten, welche im Vergleich zu bR^{cf} jedoch um eine Grössenordnung geringer ausfällt. Eine Charakterisierung von PR^{cf} oder *Np*sRII^{cf} wurde aufgrund der geringen Ausbeuten an membraninsertiertem Protein nicht durchgeführt. Die Proteine *Np*hR und hGlyRα1 konnten durch den Zusatz von DOPC-SUVs nicht stabilisiert werden, da sie sowohl ohne als auch in Gegenwart von DOPC im Proteaseassay komplett abgebaut wurden.

Im Falle der zellfreien Expression von bR^{cf} sind vermutlich die stabilisierenden Eigenschaften einer Lipiddoppelschicht eine Voraussetzung für eine funktionelle Membranproteinfaltung. Dafür spricht, dass selbst die Faltung der denaturierten, löslichen Helix C von bR nur in Gegenwart von DMPC-Liposomen mit Hilfe von kinetischen Fluoreszenzmessungen

untersucht werden kann [121]. Desweiteren ist die funktionelle zellfreie Synthese von anderen intergralen Membranproteinen bislang fast ausschliesslich in Gegenwart von Lipiden erfolgreich beschrieben z.B. für das einfach membrandurchspannende Pf3-Protein [51] oder die *E.coli* endogenen Proteine KcsA-Kanal [49] und Lactose-Permease [48].
Im Allgemeinen können fünf stabilisierenden Eigenschaften von Lipiddoppelschichten auf die Membranproteinfaltung unterschieden werden, darunter Membranüberstruktur, Dicke und Krümmung der Membran sowie Oberflächenladung und Membranpotential.

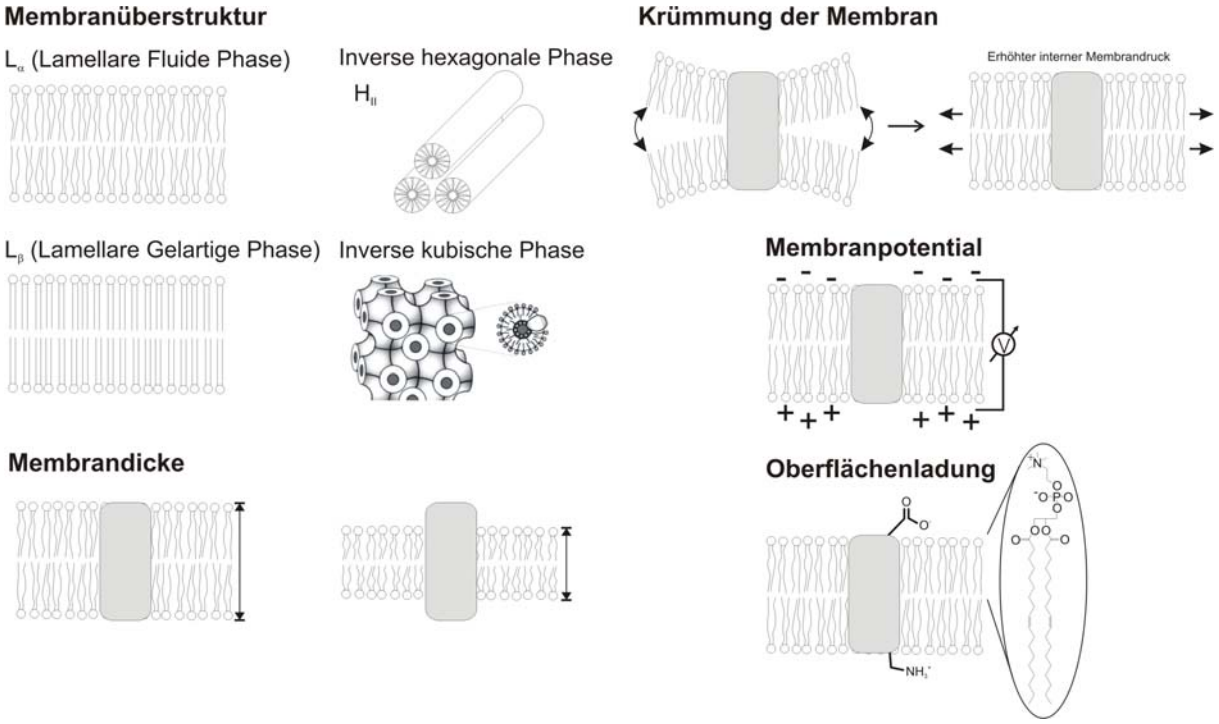


Abb.4.1: Einfluss verschiedener biophysikalischer Charakteristika der Lipiddoppelschicht, auf die Stabilität integraler Membranproteine, darunter Membranüberstruktur, Membrandicke und –krümmung, Membranpotential sowie Oberflächenladung.

In dieser Arbeit wurden der Einfluss der Membranüberstruktur, Membrandicke und –krümmung, sowie Oberflächenladung als auch der Zusatz von Faltungshilfsproteinen bei der funktionellen zellfreien Synthese von bR^{cf} detailliert untersucht.

1) Membranüberstruktur

Grundsätzlich können in Lipiddoppelmembranen drei strukturell verschiedene Phasen unterschieden werden (fluide Lα, gelartige Lβ und kristalline Lc-Phase). Welches Lipid in welcher Phase existiert ist neben den extensiven Zustandsgrössen T und p, stark abhängig von

der chemischen Struktur des Lipids. Kurze Fettsäurereste am Glycerolgerüst und insbesondere vorhandene Doppelbindungen senken die Übergangstemperatur von einer zur anderen Phase stark ab, hingegen haben verschiedene Kopfgruppen am Phosphatrest nur geringen Einfluss. Wohingegen die hochstrukturierte kristalline Lc-Phase nur bei sehr niederen Temperaturen und hohen Drücken entsteht, sind Lα und Lβ-Phase auch bei Normalbedingungen (20°C, 1 atm) stabil und unterscheiden sich in der räumlichen Anordnung und Dynamik der Fettsäurereste in der Doppelschicht.

Die zellfreie Synthese von bR^{cf} wurde in Gegenwart von drei Phosphatidylcholinlipiden mit je zwei gesättigen Acylketten C14:0 (DMPC), C16:0 (DPPC) und C18:0 (DSPC) sowie einem einfach ungesättigten C18:1 (DOPC) durchgeführt. Unter den Inkubationsbedingungen der zellfreien Synthese bei 37 °C liegen DMPC (T_p = +23°C) und DOPC (T_p = -50°C) in Lα wohingegen DSPC (T_p = +50°C) in Lβ und DPPC (T_p = 37°C) als Gemisch beider Phasen vorliegt. Die Membraninsertion von bR^{cf} nimmt mit zunehmender Phasenübergangstemperatur ab und ist deutlich reduziert in Gegenwart von Lipiden die unter den Inkubationsbedingungen in Lβ vorliegen. Für DSPC kann keine Insertion in die Membran detektiert werden, hingegen wird eine C-C-Bindung in der Lipidacylkette zur Doppelbindung oxidiert (DOPC) ist die Insertion vergleichbar hoch mit der Insertionrate in Gegenwart von DMPC. Die bevorzugte Insertion von bR^{cf} in Lipiddoppelschichten in der Lα-Phase ist auch von physiologicher Bedeutung, da die Membran von eukaryotischen und eubakteriellen Zelle zum Großteil aus einfach-ungesättigt Lipiden besteht und aus diesem Grund in der Lα-Phase vorliegt, welche eine spontane Insertion von Membranproteinen ermöglicht.

Neben der Membraninsertion ist auch die Syntheserate abhängig vom Vorhandensein von Lipiden, in Gegenwart von einfach ungesättigtem DOPC ist sie um etwa die Hälfte höher als ohne Lipid. Da der N-Terminus von bOp *in vivo* cotranslational in die Membran insertiert [122], kann sich die wachende Polypeptidkette von des zellfrei synthetisierten Proteins in Abwesenheit einer Lipiddoppelschicht nicht richtig falten, was vermutlich zur Inhibierung der in vitro Translation führt. Aus diesem Grund ist die Syntheserate bei Vorhandensein von Lipiden in der Lβ-Phase (z.B. DSPC), in welche keine Insertion von bOp^{cf} beobachtet wird, um mehr als die Hälfte niedriger als in Gegenwart von Lipiden in der Lα-Phase (z.B. DOPC). Phospholipide in der Lα-Phase können deshalb als Faltungshelfer aufgefasst werden, welche die Aggregation der wachsenden Polypeptidkette von bOp^{cf} am Ribosom unterbinden und die vorzeitige Translationstermination verhindern.

2) Krümmung der Membran und Übergang von fluider zu hexagonaler Phase

Nicht alle Lipide bilden intrinsisch Doppelschichten. Ein Beispiel hierfür sind Lipide mit Phosphatidylethanolamin als Kopfgruppe (z.B. DOPE), welche Überstrukturen mit negativ gekrümmten Monoschichten ausbilden wobei die Kopfgruppe des Lipids ins Innere des Zentrums zeigt (inverse hexagonale Phase H_{II}). Eine weitere Gruppe von Monoschichten ausbildenden Lipide sind Lysophospholipide (z.B. Lysophosphatidylcholin, LPC), die nur ein Fettsäurerest am Glycerolgerüst tragen, welche positiv gekrümmte inverse hexagonale Phasen ausbilden. Die Funktion von Membranproteinen kann in Gegenwart Monoschichten ausbildender Lipide verändert werden z.B. ist die Photoreaktion von Rho abhängig von der Konzentration an ungesättigtem Phosphatidylethanolamin-Lipiden [123]. Ähnliches gilt für die Aktivität des Gramicidin A Kanals der bei Zugabe von Lysophospholipiden stimuliert werden kann [124]. Aber auch lösliche Proteine wie Citrate-Synthase, α-Glucosidase oder „Horseradish"-Peroxidase können ausgehend von einer Harnstoff-denaturierter Form unter Zusatz von Lysophosphatidylethanolamin [125] oder Phosphatidylethanolamin [126] funktionel rückgefaltet werden.

In Mischungen von DOPE oder LPC mit anderen Phospholipiden, wie z.B. DOPC, welches eine Doppelschicht ausbildet, ist eine Erhöhung der Acylkettenkollisionen und des internen Membrandrucks beschrieben. Dies führt dazu, dass die Aktivierungsenergie der Proteininsertion in die Membran zunimmt. Aus diesem Grund kann die Insertion gehindert sein, obwohl die Stabilität von bereits inserierten Proteinen erhöht ist, da der interne Membrandruck stabilisierend auf das Helixbündel wirkt, wie am Beispiel des Oligomerisierungszustands des Alamethicin-Kanals gezeigt werden konnte [127].
Die zellfreie Synthese von bR^{cf} wurde in Gegenwart von DOPC/LPE (95:5) bzw. fünf verschiedenen molaren Verhältnissen an DOPC/DOPE-Lipiden durchgeführt und zeigte im Falle des LPC zwar eine Verbesserung der Membraninsertion, aber eine um 50% erniedrigte Syntheserate, dieser Ansatz wurde deswegen nicht weitergeführt. Bei Zusatz von DOPC/DOPE-Lioposmen zum Syntheseansatz konnte beobachtet werden, dass zunehmende Konzentrationen an DOPE zu einer Erniedrigung der Membraninsertion von bR^{cf} führen und sogar bei Zusatz von reinem DOPE gar keine Stabilisierung von bR^{cf} detektiert werden kann. Eine erhöhte negative Krümmung über die Lipiddoppelschicht hindert die Insertion von transmembranen Helices aus der wässrigen Phase in die Membran. Zu einem vergleichbaren

Ergebnis kommen kinetische Faltungsstudien von SDS-denatuiertem bR in PC/PE Doppelschichten [128].

3) Membrandicke

Die Acylkettenlänge sowie der Sättigungsgrad der Fettsäurereste von Phospholipiden bestimmen die Dicke der Lipiddoppelschicht und haben direkten Einfluss auf die Faltung, Oligomerisierung oder Aktivität von integralen Membranproteinen, wie am Beispiel von Rho [129], bR [97] [130] und vieler anderer Membranproteine gezeigt werden konnte (Übersichtsartikel [131]). Der Einfluss der Dicke der Doppelschicht auf die Insertion von bR^{cf} für zwei in der fluiden Lα-Phase befindlichen Lipide DMPC (Membrandicke 26.2 Å)[a] und DOPC (Membrandicke: 27.1 Å)[a] [([a]): angeschätzte Werte des Carbonyl-/Carbonyl-Abstands bei 30°C aus [132]] wurde daraufhin untersucht. Die Verwendung von DOPC-Liposomen zeigte hierbei eine 10% höhere Intensitäten der proteolytischen Abbaubanden im Vergleich zu DMPC. Strukturelle Daten zeigen, dass bR in einer Lipidumgebung eine hydrophobe Dicke von 35 Å besitzt [54]. Aus diesem Grund wird bR^{cf} durch die dickere DOPC-Membran im Vergleich zu DMPC zusätzlich stabilisiert.
Die Dicke der Membran ist neben der chemischen Struktur der Fettsäurereste mitunter stark abhängig von der Cholesterolkonzentration. Cholesterol insertiert aufgrund seines hydrophoben Charakters leicht in Membranen und schränkt die Bewegungsfreiheit der Acylketten in der fluiden Lα-Phase ein. Die Einschränkung der Acylkettenbeweglichkeit, hat zur direkten Folge, dass die Dicke der Membran zunimmt bei 50 mol% Cholesterol in DMPC mehr als 2 Å [133]. Desweiteren wird die Wärmeenergie des Phasenübergangs abgesenkt, wohingegen die Phasenübergangstemperatur T_p unberührt bleibt. Daher wäre eine Stabilisierung bR^{cf} in Gegenwart von DOPC-Liposomen mit steigenden Konzentrationen an Cholesterol und einer damit verbundenen zusätzlichen Erhöhung der Membrandicke zu erwarten. Der Einfluss von bis zu 20 mol% Cholesterol auf DOPC-Liposomen hat jedoch nur geringen Einfluss auf die Stabilität von bR^{cf} und legt nahe, dass die optimale Dicke der Membran in der Grössenordnung von DOPC-Lipiddoppelschichten liegt.

4) Oberflächenladung

Neben der Dicke der Lipiddoppelschicht spielen elektrostatischen Wechselwirkungen der Oberfläche mit Membranproteinen eine wichtige Rolle z.B. katalysiert das anionische Phosphatidylserin die Membraninsertion und Faltung des Lactose-Transporters LacY [95] oder Phosphatidylglycerol die Faltung des Kalium-Kanals KscA [49]. Die Faltung von bR^{cf} wird jedoch durch Zusatz von bis zu 20 mol% des anioninischen Lipids DOPS sowie bis zu 5 mol% des artifiziellen kationischen Lipids DOTAP zu DOPC-Liposomen nicht katalysiert. Dies lässt den Rückschluss zu, dass elektrostatische Wechselwirkungen der Polypeptidkette von bR^{cf} und der Membranoberfläche nicht bestimmend für die Membraninsertion des Proteins sind.

5) Einfluss von Faltungshilfsproteinen und Carrierpeptiden

Zuletzt sollte der Einfluss von Faltungshilfsproteine (Chaperone) GroEL und GroES aus *E.coli* und *Th.aq.* bei der funktionellen zellfreien Synthese von bR^{cf} untersucht werden. Z.B. führte der Zusatz von GroEL und GroES bei der *in vitro* Synthese einer mitochondrialen Aspartataminotransferase in einem Reticoluzytenlysat zu einer verbesserten Expressionsausbeute [32]. Im Falle der *in vitro* Synthese von bR^{cf} kann jedoch für Chaperone aus beiden Organismen nur geringere Syntheseausbeuten detektiert werden. Die enzymkatalysierte Faltung ist ein energiegetriebener Prozess und benötigt ATP, was dazu führt, dass die kritische Konzentration an verbrauchten Metaboliten wie AMP und freiem Phosphat schneller erreicht ist. Dies führt zu einem vorzeitigen Abbruch der zellfreien Proteinsynthese und zu einer niedrigeren Ausbeute des gewünschten Genprodukts.
Der Zusatz von Carrierpeptiden zum Reaktionsansatz, welche in Zellkulturexperimenten erfolgreich für Transfektionsstudien in eukariotische Zellen eingesetzt wurden, führte zu einer konzentrationsabhängigen Inhibierung der Transkription/Translation. Carrierpeptide bestehen aus zwei Domänen einer hydrophoben membraninserierenden Domäne und einer geladenen Polylysin-reichen Domäne. Letztere bindet über ionische Wechselwirkungen DNA, RNA oder anionische Polypeptide. Vermutlich komplexiert die eingesetzte DNA-Matrize mit der Polylysin-reichen Domäne des Carrierpeptids und ist für die RNA-Polymerase nicht mehr zugänglich.

Eine optimale Stabilisierung von zellfrei synthetisiertem bR^{cf} konnte ausschliesslich in Gegenwart einer Lipiddoppelschicht detektiert werden, wobei die Verwendung von SUVs bestehen aus DOPC die höchste Stabilisierungseffizienz zeigte. Die Membraninsertion der Polypeptidkette von bR^{cf} ist direkt abhängig von der Phasenübergangstemperatur der verwendeten Lipide, nur für die unter den Inkubationsbedingungen in der fluiden Lα-Phase vorliegen Lipide (DOPC, DMPC) war eine Membraninsertion möglich. Eine Erhöhung der Membrankrümmung führt zu einer verringerten Stabilisierung von bR^{cf}. Sowohl Oberflächenladung als auch der Zusatz von Cholesterol haben nur einen geringen Effekt auf die Membraninsertion.

4.2 *In vitro* versus *in vivo* Expression von Membranproteinen

Bakteriorhodopsin konnte in dieser Arbeit in einem zellfreien gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem bestehend aus *E.coli* S30 Lysat und T7-RNA-Polymerase in einem RTS500 Biosynthesesystem der Firma Roche (Penzberg, Germany) unter Zusatz von DOPC-Liposomen funktionell dargestellt werden. Die Ausbeute an bR^{cf} kann mit Hilfe der zeitaufgelösten Laserblitzabsorptionsspektroskopie abgeschätzt werden, aus der maximalen Amplitude der transienten Absorptionsänderungen bei 400 nm (M-Intermediat) und beträgt 20 µg/ml Reaktionsvolumen (d.h. 20 mg/l falls eine lineare Extrapolation der Ausbeute in Bezug auf das Reaktionsvolumen angenommen wird). Dies ist zwar eine deutlich geringere Proteinausbeute im Vergleich zur zellfreien Synthese von löslichen Proteinen in *E.coli* basierten Lysaten von bis zu 400 µg/ml [134] oder einem *in vitro* Expressionssystemen aus gereinigten Komponenten von bis zu 160 µg/ml [135]. Die spektroskopisch bestimmte Proteinausbeute an funktionellem bR^{cf} liegt aber um den Faktor 50 über der Ausbeute von gereinigtem bR, dass *in vivo* in *E.coli* funktionell exprimiert wurde (84 µg/l Kulturvolumen) [77]. Für diesen Unterschied in der Expressionsausbeute können mehrere Gründe verantwortlich sein:

a) bR ist bei Expression in *E.coli* Zellen nach Solubilisierung der Membran instabil und denaturiert während der Aufarbeitung, was zu einer geringeren Ausbeute an gereinigtem Protein führt [77].

b) Der Zusatz von Liposomen bestehend aus z.B. Nicht-Doppelschichten ausbildender Lipide wie DOPE im zellfreien Syntheseansatz führt zu einer Verringerung der Membraninsertion von bR^{cf}, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Eine geringere Ausbeute von *in vivo* in *E.coli* Zellen funktionell exprimiertem bR könnte demnach auf eine ungünstige Lipidzusammensetzung der *E.coli* Membran für die bR-Faltung zurückzuführen sein, welche zu etwa 70 % der Trockenmasse aller Lipide aus DOPE besteht.

c) Das verwendeten *bom*-Genkonstrukt besitzt eine ungünstige tRNA-Verfügbarkeit für die Expression in *E.coli* Zellen. Die CUA-Codons, welche für die zwei aufeinanderfolgenden Aminosäuren Leu-13 und Leu-19 kodieren sind in *E.coli* nur in äussert geringen Mengen vorhanden (< 0.5%). Dies kann zu einem frühzeitigen Kettenabbruch der *in vivo* Expression in BL21(DE3) Zellen führen und zu einer geringeren funktionellen Ausbeute an bR. Im zellfreien Synthesesystem ist die Konzentration an tRNAs nicht limitierend bei der Expression, da sie im

Überschuss eingesetzt werden. Ein vorzeitiger Kettenabbruch der Translation *in vitro* ist demnach nicht zu erwarten.

Die Expressionsausbeute an funktionellem bR^{cf} ist vergleichbar mit der Ausbeute von weiteren gereinigten bR-homologen Retinalproteinen, welche ebenfalls funktionell in *E.coli* exprimierbar sind, wie *Np*sRII (1 mg/l), *Np*hR (0.6 mg/l) [77] oder PR (bis zu 9 mg/l Kulturvolumen) (diese Arbeit). Die zellfreie Proteinausbeute liegt jedoch deutlich (Faktor 5 geringer) unter der Ausbeute an bR isoliert aus *H.salinarum* Kulturen (24 mg/l Kulturvolumen) [136]. Zellfrei dargestelltes bOp^{cf} in einem auf Weizenkeimen-basierenden *in vitro* Synthesesystem konnte in vergleichsweise hohen Ausbeuten (24 µg/ml) in Bezug auf homolog exprimiertes bR isoliert werden [137]. Jedoch musste das unlöslich dargestellte Protein aufwendig gereinigt und renaturiert werden um Funktionalitätsstudien durchzuführen.
In dieser Arbeit sollte das zellfrei synthetisierte bR^{cf} für die funktionellen Studien nicht gereinigt werden, obwohl die Konzentration an bR^{cf} im Reaktionsansatz im Vergleich zu der anderer löslicher Proteine im S30-Extrakt sehr gering ist. Jedoch ist bR^{cf} im Syntheseansatz das einzige integrale Membranprotein in einer definierten hydrophoben Lipidumgebung. Eine direkte Funktionalitätsstudie mittels spezifischer spektroskopischer (Photozyklusreaktion) und elektrophysiologischer Methoden (Ladungstransport an planaren Lipiddoppelschichten) sollte aus diesem Grund eindeutig dem zellfreien bR^{cf}-Syntheseprodukt zugeordnet werden können.

Das zellfrei hergestellte bR^{cf} besitzt einen Photozyklus der hohe Ähnlichkeit mit dem von nativem bR in „cell envelope“-Vesikeln aufweist. Es können charakteristische transiente Absorptionsänderungen bei 400 nm (M-Intermediat) und 570 nm (Grundzustand) detektiert werden. Das M-Intermediat von bR^{cf} akkumuliert bei 1 ms und zerfällt daraufhin zurück zum Grundzustand, jedoch mit einer um den Faktor 10 langsameren Zerfallskinetik im Vergleich zu bR. Dies ist nicht verwunderlich, die Akkumulation von 10^3 Laserblitzexperimenten bei bR^{cf} in DOPC-SUVs zu einer Ausbildung eines Membranpotentials $\Delta\Psi$ über die Proteoliposomen führt. Für bR ist eine Abhängigkeit des M-Zerfalls vom Membranpotential $\Delta\Psi$ beschrieben [138]. Bei andauernder Hintergrundbeleuchtung, die $\Delta\Psi$ generiert, wird ein verlangsamter M-Zerfall in Vesikel-Präparationen aus *H. salinarum* detektiert [139]. Die Verlangsamung des M-Zerfalls von bR^{cf} spricht für das Vorhandensein von intakten bR^{cf}-Proteoliposomen im zellfreien Syntheseansatz.
Die Verwendung einer definierten artifiziellen hydrophoben Umgebung bestehend aus DOPC-Liposomen ermöglichte auch eine bR^{cf}-spezifische Zuordnung lichtinduzierter Ladungstransportmessungen an planaren Lipiddoppelschichten. bR^{cf} zeigt bei Anlagerung an

eine planare Lipiddoppelschicht negative stationäre Photoströme von bis zu 1 nA/cm^2 für 400 ng bR^{cf}, entspricht 2.5 nA/(cm^2·µg), (20 µl des Reaktionsansatzes mit 20 µg/ml spektroskopisch bestimmter bR^{cf}-Ausbeute) was vergleichbar ist mit der entsprechenden Mengen an bR in PM, bei dem Signale in der Größenordnung bis zu 100 nA/cm^2, entspricht 1 nA/(cm^2·µg) gemessen werden unter Verwendung von 100 µg bR [75]. Ein negativer stationärer Photostrom ist auch bei gereinigtem bR in PM oder Proteoliposomen zu detektierten, dies lässt im Falle von bR^{cf} auf einen in die Vesikel gerichteten Protontransport schließen, wonach der N-Terminus von bR^{cf} nach Innen orientiert ist. Im Gegensatz zu rekonstituierten Proteinen oder ultraschallbehandelten Membranen, bei welchen eine nahezu gleichmäßige Verteilung der Proteinorientierungen vorliegt ist im Falle von bR^{cf} ausschliesslich eine Orientierung in der Liposomenmembran anzunehmen, da die zellfreie Synthese nur ausserhalb der Vesikel stattfindet und ein Wechsel der Orientierung (in Analogie zum Flip-Flop Mechanismus bei Lipiden), bei Membranproteinen nicht stattfindet.

Der Einfluss von Ionophoren in BLM-Messungen von bR^{cf} ist gering, da schon vor Zugabe von Entkopplern eine ungewöhnlich hohe Leitfähigkeit der Membran zu beobachten ist. Vermutlich stören, die im Vergleich zur Konzentration an bR^{cf}, im Überschuss vorliegenden Komponenten des zellfreien Synthesesystems die Messung. Eine weitere Erklärung ist, dass die DOPC-Proteoliposomen nicht nur an die BLM attachieren, sondern mit dieser zum Teil fusionieren. Dies konnte im Falle von monomerem bR rekonstituiert in eine Mischung aus Phosphatidylserin/Phosphatidylcholin-Vesikeln gezeigt werden, wo stationäre Photoströme von bis zu 140 pA/cm^2 ohne das Vorhandensein von Ionophoren zu beobachten sind [140].
Mittels Doppelbelichtungsexperimenten von bR^{cf} mit grünem und zusätzlichem blauen Licht ist eine eine deutliche Verringerung des stationären Photostroms um 25 % zu beobachten. Unter diesen Bedingungen wird das akkumulierte blau-absorbierende M-Intermediat durch die Absorption eines blauen Photons angeregt und zerfällt über eine Reisomerisierung des Retinal zur *all-trans* Form zurück zum Grundzustand, wobei kein Proton nach Aussen gepumpt wird und der Photostrom in diesem Fall verringert wird [116].

Die archaebakterielle lichtgetriebene Protonenpumpe bR konnte eine Ausbeute von 20 µg/ml funktionellem Protein in Gegenwart von DOPC-SUVs dargestellt werden. bR^{cf} zeigt einen Photozyklus mit hohe Ähnlichkeit zu dem von nativem bR in „cell envelope"-Vesikeln und pumpt Protonen vergleichbar mit monomerem bR in Proteoliposomen. Eine vorherige Reinigung des Proteins aus dem zellfreien Syntheseansatz für die spektroskopische und elektrophysiologische Charakterisierung ist nicht notwendig, da selektive Nachweismethoden wie Photozyklusreaktion und lichtinduzierter Ladungstransport eine eindeutige Zuordnung der Signale zum funktionellen Protein ermöglichten. Die funktionellen zellfreien Synthese von Membranproteinen mit der direkten Funktionsanalyse ist aus diesem Grund erheblich schneller und automatisierbarer im Vergleich zu zellulären Expressionsmethoden verbunden mit der klassischen Proteinreinigung. Obwohl die Funktionalität des zellfrei dargestellten Genprodukts ausschliesslich im Falle des archaebakteriellen bR bestätigt wurde, konnten auch für zwei der vier weiteren untersuchten Proteine (PR und *Np*sRII) Hinweise für eine funktionelle zellfreie Proteinsynthese gefunden werden. Diese Beobachtung unterstreicht die Möglichkeit einer allgemeinen Anwendung von zellfreier Expression von integralen Membranproteinen gekoppelt mit der direkten Funktionsanalyse im HTS-Format und eröffnet eine Alternative zu konventionellen proteinchemischen Techniken.

4.3 Der Photozyklus von Proteorhodopsin

Proteorhodopsin das eubakterielle Homolog zu bR konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit funktionell exprimiert und in reiner Form aus *E.coli* BL21(DE3) Zellen isoliert werden. Hierzu wurde das PR-Gen mit N-terminaler Signalsequenz (Pre-PR) und C-terminalem HSV- und Histidin-Tag kloniert für die Immundetektion und affinitätschromatographische Reinigung. Die heterologe Expression des Genkonstrukts führte zu zwei Hauptprodukten, dem Pre-PR mit voller Länge und einem um die N-terminal Signalsequenz verkürzten PR, welche nach Reinigung in einem Verhältnis von ~1:1 vorliegen. Die Darstellung von PR in *E.coli* Zellen führt zu vergleichbaren Produkten wie die homologe Expression von bR, welches *in vivo* cotranslational prozessiert wird. Hierbei wird die N-terminale Signalsequenz bei der Insertion in die Zellmembran gespalten. In Präparationen von PM koexistieren jedoch zwei unterschiedliche mature bR als auch das Pre-bR mit Signalsequenz [141]. Obwohl die Funktion dieser verschiedenen Spezies nicht beeinflusst ist, lässt diese Beobachtung auf einen komplexeren Membraninsertionsmechanismus von bR und PR bei der *in vivo* Expression schliessen.

Das statische Absorptionsspektrum von PR ist abhängig vom pH-Wert und verschiebt sich in DOPC-Lipid rekonstituierter Proben reversibel von 519 nm bei alkalischem pH zu 539 nm bei saurem pH. Der pKs-Wert dieses rot→violett Übergangs liegt ungewöhnlich hoch bei 7.7 (Asparaginsäure in Lösung besitzt einen pKs von 4.4). Er ist deutlich höher als der purpur→blau Übergang von bR mit einem pKs von 2.5 [142], der auf den Protonierungszustand von bR D85 zurückzuführen ist [103].

Die homologe Aminosäure zu bR D85 ist in PR D97. Um zu überprüfen ob PR D97 die einzige Aminosäure ist, die für den rot→violett Übergang verantwortlich ist, wurde die Mutante PR D97N hergestellt, in der die Asparaginsäure gegen ein positiv-ionisiertes Asparagin ausgetauscht ist. Das Absorptionsmaximum von PR D97N ist bathochrom verschoben mit einem Absorptionsmaximum von 550 nm und ist unabhängig vom pH, entsprechend der homologen bR-Mutante D85N [101]. Dieses Ergebniss deutet darauf hin, dass der Protonierungszustand von PR D97 alleine für die rot→violett Verschiebung des spektroskopischen Grundzustands verantwortlich ist.

Ähnlich hohe pKs-Werte für die pH-Titration des spektroskopischen Grundzustands konnten für die sensorischen Rhodopsine sRI (pKs = 7.4) [143] und *Np*sRII (pKs = 5.6) [106] (zusammengefasst in Tab. 9) beobachtet werden.

	Aminosäure	pK_s
PR	Asp-97 $rot^{518nm} \rightarrow violett^{536nm}$	7.7 diese Arbeit 7.1 [144]
bR	Asp-85 $purpur^{568nm} \rightarrow blau^{605nm}$	2.2 [145] 2.5 [146]
sRI	Asp-76 $violett^{550nm} \rightarrow purpur^{590nm}$	7.4 [143]
*Np*sRII	Asp-75 $orange^{500nm} \rightarrow pink^{525nm}$	5.6 [106]

Tab. 9: Vergleich der pKs-Werte der pH-abhängigen Spektralverschiebung des spektroskopischen Grundzustands verschiedener Rhodopsine mit verantwortlichen Aminosäuren.

Es stellt sich die Frage, warum der pKs der pH-Abhängigen Spektralverschiebung des spektroskopischen Grundzustands von PR vergleichbar ist mit dem pKs von sensorischen Rhodopsinen, wie sRI oder *Np*sRII, aber im Vergleich zum bR um etwa 5 pH-Einheiten höher liegt. In bR wird D85 durch das Asparaginanion R82 stabilisiert, eine Mutation von bR R82 zu einer nicht positiv-ionisierten Aminosäure erhöht den pKs von D85 von 2.5 auf 7 [147] [148] [149]. Eine Substitution von bR R82 in PR wäre eine Erklärung für den hohen pKs von PR D97. Dies ist jedoch nicht der Fall, da die homologe Aminosäure zu bR R82 in PR auch ein Arginin R94 ist, zusätzlich ist die dritte homologe Aminosäure, die in bR (bR D212) das Gegenion zur SB stabilisiert PR D227 konserviert. Aus diesem Grund kann für PR in Analogie zum bR ein delokalisiertes Gegenion zur SB angenommen werden, in dem ein zentrales Wassermolekül, über Wasserstoffbrücken mit den polaren Aminosäuren PR D97, D227 und R94 komplexiert ist [150] [151].

Detaillierte strukturelle Informationen des Gegenions zur SB, die eine Erklärung für den hohen pKs der pH-abhängigen Spektralverschiebung liefern könnten, liegen mit den zwei Kristallstrukturen von bR [54] und *Np*sRII [152] vor. In Abb. 4.2 sind diese zwei Kristallstrukturen mit dem Modell für die PR-Struktur (erstellt mit der Molekulardynamiksimulation ICM) übereinandergelegt. Die Aminosäuren, die das Gegenion bilden sind zusammen mit dem konservierten Lysin, welches das Retinal gebunden hat, hervorgehoben. Es ist deutlich zu erkennen, dass PR D97 im Vergleich zu bR D85 aus Helix C in Richtung der Membrandoppelschicht herausgedreht ist, ähnliches gilt für *Np*sRII D75. Der Abstand des N-Atoms der SB zum γ-C der Seitenkette von PR D97 ist auf 4.8 Å vergrößert (bR D85 4.4 Å), wobei eine erniedrigte Zugänglichkeit dieser Aminosäure gegenüber dem Protonenkanal angenommen werden kann. Dies wäre eine Erklärung für den

hohen pKs von PR D97 sowie *Nps*RII D75 im Vergleich zum bR. Die weiteren Aminosäuren des PR Gegenions D212 und R82 verhalten sich umgekehrt und weisen einen geringeren Abstand zur SB auf im Vergleich zum bR. Dies lässt den Rückschluss zu, dass eine unterschiedliche Geometrie der Ladungen der Aminosäurereste, welche das Gegenion zur SB bilden, einen direkten Einfluss auf den pKs des primären Protonenakzeptors von Retinalproteinen hat. Mit Hilfe der spektroskopischen Daten wird dies bestätigt werden, da die Energie der purpur→blau Verschiebung in bR mit 880 cm^{-1} um ¼ höher und die der orange→pink Verschiebung in *Nps*RII mit 940 cm^{-1} um ⅓ höher ist als die rot→violett Verschiebung bei PR mit 660 cm^{-1}.

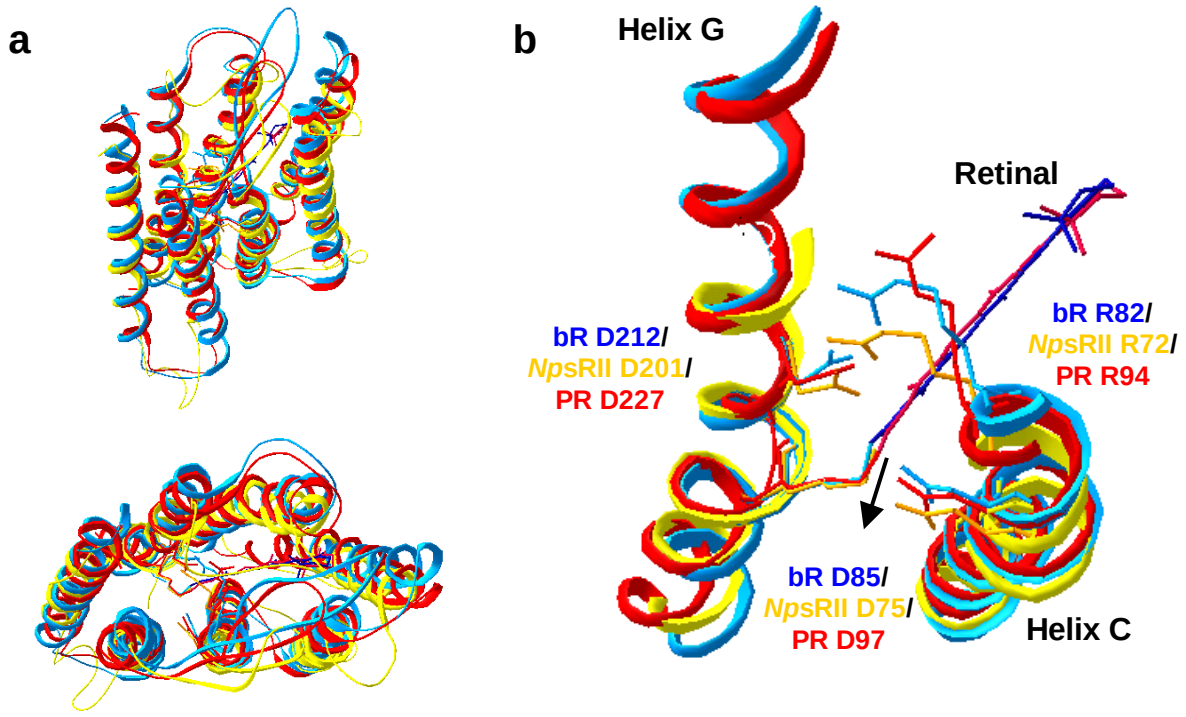


Abb. 4.2: Tertiärstrukturvergleich von bR 1C3W [54] (blau), *Nps*RII 1JGJ [152] (rot) und PR-Strukturmodell (ICM-Molekulardynamiksimulation auf Basis der bR 1C3W-Struktur) (gelb) (a). Zum besseren Vergleich wurden die Strukturen auf das konservierte retinalbindende Lysin fixiert. Der Retinalchromophor ist in der jeweiligen Farbe des Proteins dargestellt. Vergrößerung von Helix C und G und der chemischen Umgebung der SB (b). Bei den Aminosäuren, die das Gegenion zur SB stabilisieren bR D85/R82/D212 (blau), *Nps*RII D75/R72/D201 (rot) und PR D97/R94/D227 (gelb) sind die Seitenketten hervorgehoben. Verschiebung der Seitenkette von bR D85, *Nps*RII D75 und PR D97 aus Helix C in Richtung der Lipiddoppelschicht angezeigt durch Pfeil.

Die azide Spezies von PR ($PR^{violett}$) lässt sich selbst bei hohen Chlorid-Konzentrationen (> 3 M) nicht in ihren spekroskopischen Ausgangszustand überführt, wie dies für die aziden

Spezies von bR (bR^{blue}) [107] oder *Np*sRII (*Np*$sRII^{pink}$) [106] beobachtet wird. Sind Chloridionen vorhanden werden diese gebunden, wobei die zusätzliche negative Ladung in der chemischen Umgebung der protonierten SB zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums unter sauren Bedingungen führt [153]. Im Gegensatz zu diesen Proteinen entsteht bei $PR^{violett}$ keine Chloridbindungstelle oder die Zugänglichkeit von Chloridionen aus dem umgebenden Medium zu einer gebildeten Bindungsstelle im Proteininneren ist drastisch gehindert.
Eine reversible Deprotonierung der SB bei PR(wt) ist bis pH 11.5 nicht zu beobachten. Hingegen kann bei der PR D97N-Mutante mit zunehmendem pH eine hypsochrom verschobene Absorptionsbande (λ_{max} = 390 nm) (bR D85N λ_{max} = 405 nm) [101] detektiert, die der Spezies mit deprotonierter SB zugeordnet werden kann. Der pKs der SB-Deprotonierung von PR D97N liegt bei 10.3 [56] und spricht für eine erhöhte Zugänglichkeit der SB für Protonen aus dem Medium im Vergleich zum PR (wt) Protein.

Die Retinalkonfiguration von PR im spektroskopischen Grundzustand ist eine Mischung aus *all-trans*, *13-cis* und zu geringen Teilen vermutlich *9-cis* Retinal. Das thermodynamische Gleichgewicht zwischen diesen Isomeren ist abhängig von der Anwesenheit einer Hintergrundbeleuchtung. Das Retinalisomerenverhältnis von dunkeladaptiertem PR liegt bei 1:5 *13-cis/all-trans*-Retinal, bei lichtadaptiertem PR ist ein Verhältnis von 2:3 zu beobachten. Dieses Ergebnis entspricht dem *13-cis/all-trans* Retinalverhältnis von sRII mit 1:4 bei dunkel- und 1:1 bei lichtadaptierten Proben [154]. Das Isomerenverhältnisses von PR ist nicht abhängig von der Temperatur zwischen 0 und 40°C, in Analogie zu bR, bei dem eine exponentielle Temperaturabhängigkeit erst über 40 °C zu detektieren ist. Hingegen besitzt bR ein umgekehrtes Verhältnis von 66-67 % *13 cis* und 23-24 % *all-trans* Retinal in dunkel- und mehr als 98.5 % *all-trans Retinal* in lichtadaptierten Proben [99].
Sowohl licht- als auch dunkeladaptiertes PR besitzt ein Absorptionsmaximum bei 520 nm (für DOPC-Lipid rekonstituierte Proben bei pH 8), wobei lichtadaptiertes PR einen etwa 10 % kleineren Extinktionkoeffizienten aufweist. Diese Beobachtung ist unterschiedlich im Vergleich zu bR, bei welchem das Absorptionsmaximum von lichtadaptiertem Protein um 10 nm von 568 nm (Lichtadaptiert) nach 558 nm (Dunkeladaptiert) verschoben ist und dunkeladaptieres bR einen deutlich geringeren molaren Extinktionskoeffizienten aufweist [97]. PR verhält sich, wie die bR D96E Mutanten [100] und ein Primärsequenzvergleich von bR und PR zeigt, dass die homologe Aminosäure zu bR D96 ein E108 ist. Vermutlich ist der längere Carbonsäurerest des Glutamats an Position 96 in bR D96E bzw. an Position 108 in PR

mitverantwortlich für die Lage des Gleichgewichts der Retinalisomere im spektroskopischen Grundzustand.

Der molare Exinktionkoeffizient der α-Bande des Retinalchromophors von PR liegt bei 44.000 M^{-1} cm^{-1} und ist vergleichbar mit ε_{max} von hR [155] und 30 % kleiner als ε_{max} von bR [84]. Eine Zusammenfassung der molaren Extinktionskoeffizienten verschiedener Rhodopsine ist in Tab. 10 zum Vergleich aufgelistet.

Protein (λ_{max})	**λ_{max} in M^{-1} cm^{-1}**	**Literatur**
PR (518 nm)	44.000	diese Arbeit
bR (570 nm)	63.000	[84]
hR (588 nm)	48.000	[155]
sRI (587 nm)	54.000	[156]
sRII (488 nm)	48.000	[154]
*Np*sRII (500 nm)	38.500	[106]

Tab. 10: Molare Extinktionskoeffizienten der α-Bande des Retinalchromophors verschiedener Rhodopsine bei neutralem pH.

PR durchläuft nach Absorption eines Photons eine charakteristische Photoreaktion an deren Ende wieder der spektrosktropische Grundzustand besetzt wird. Dieser Photozyklus konnte erstmals von Lozier et al. im Falle des archaebakteriellen bR anhand von irreversiblen Folgereaktionen beschrieben werden [84]. Zur Unterscheidung der einzelnen spektralen Photointermediate wurde die Nomenklatur K, L, M, N und O anhand ihrer Bildungskinetik eingeführt. Spätere Untersuchungen zeigten, dass der Photozyklus in seiner thermischen Relaxation nicht nur fünf, sondern mindestens sechs kinetisch unterscheidbare Intermediate K, L, M_1, M_2, N, O durchläuft. Weil aber nur die fünf spektralen Spezies bekannt sind, mußte das einfache Modell von Lozier et al. im Laufe der Zeit durch die Einführung von zusätzlichen Parallel-, Verzweigungs- und Gleichgewichtsreaktionen modifiziert werden (zusammengefaßt in [157]). Hingegen postuliert Chizhov et al. schnelle Quasigleichgewichte zwischen den spektralen Photointermediaten auf der Basis des sequenziellen Reaktionsschemas [72].

Der Photozyklus von PR besteht aus sechs kinetisch unterscheidbaren Intermediaten P^1-P^6, deren Anordnung unter der Annahme einer systematischen Verlangsamung der Zerfälle in der Sequenz, wie sie auch bei anderen Rhodopsinen postuliert wurde, ein vernünftiges Modell ergibt [158]. Spektroskopisch werden vier unterschiedliche Chromophorzustände S^1-S^4

beobachtet, welche auf Basis ihrer Bildungskinetik und der Lage des Absorptionsmaximums den archetypischen Photointermediaten K, M, O und dem Vorläufer des spektroskopischen Grundzustands PR' zugeordnet werden können.
Im Folgenden werden die spektroskopischen und thermodynamischen Eigenschaften der einzelnen kinetisch unterscheidbaren Photointermediate diskutiert.

Der kinetische Zustand P^1 (K-Intermediat)

Die schnellste kinetisch unterscheidbare Zustand P^1 ($\tau_{1/2}$ = 2 µs) entspricht einer einzigen spektroskopischen Komponente, mit einem bathochrom verschobenen Absorptionsmaximum bei 555 nm (S_1^{555}) und besitzt aus diesem Grund eine hohe Ähnlichkeit mit dem K-Intermediat des bR Photozyklus. Mittels FTIR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass während der Lebenszeit von S_1^{555} der *13-cis* isomerisierte Retinal-Chromophor stark verdreht ist [113]. Dies war zu erwarten, da auch das K-Intermediat im bR Photozyklus einen stark verdrehten Retinalchromophor aufweist. [159] [160].

Der kinetische Zustand P^2 (K/M-Quasigleichgewicht)

Der darauffolgende kinetische Zustand P^2 ($\tau_{1/2}$ = 20 µs) beschreibt eine Mischung von zwei spektroskopisch unterscheidbaren Zuständen S^1_{555} (K-ähnlich) und S^2_{405}, welche in einem sehr schnellen thermodynamischen Gleichgewicht miteinander stehen. Das Absorptionsmaximum von S^2_{405} ist stark zu kurzen Wellenlängen verschoben, vergleichbar mit dem M_1-Intermediat im bR Photozyklus, während dessen Lebensdauer die SB deprotoniert vorliegt. Neben dem S^1_{555} (K-ähnlichen) und S^2_{405} (M-ähnlichen) Photointermediaten ist keine Akkumulation eines L-ähnlichen Zustands zu detektieren, wie dies im Falle des Photozyklus von bR beobachtet wird.
Die Abwesenheit eines akkumulierten L-Intermediats im PR-Photozyklus kann mehrere Gründe haben. In PR ist der pKs des primären Protonenakzeptors PR D97 bereits im spektroskopischen Grundzustand sehr hoch (pKs = 7.7). Aus diesem Grund es wäre denkbar, dass es keiner starken Erniedrigung des pKs des Protons an der SB durch grössere strukturelle Änderungen des Proteingerüstes bedarf, um die Übertragung dieses Protons auf PR D97 energetisch zu begünstigen.
Strukturelle Informationen der Photozyklusreaktion von bR zeigten, dass mit der Bildung des K-Intermediates eine Reorganisation des proteininternen Wassernetzwerks einhergeht, wobei

Wasserstoffbrücken gebrochen werden, welche insbesondere Helix C im spektroskopischen Grundzustand stabilisieren [54]. Dies führt zu einer drastischen Deformation von Helix C in Richtung der SB bei Übergang von K zu L [161] und zu einer Affinitätserhöhung des SB-Protons zum primären Protonenakzeptor bR D85 wobei der pKs der SB von initial pKs > 13 auf pKs < 5 in M_1 sinkt [162] [163]. Im Falle von PR könnten kleinere Veränderungen der Proteinstruktur wie z.B. Bewegung einer Aminosäureseitenkette ausreichend sein, um den Protonentransfer von der SB auf PR D97 energetisch zu begünstigen, wobei keine Akkumulation eines L-ähnlichen Intermediats stattfindet.

Eine weitere Erklärung für die Abwesenheit eines akkumulierten L-Intermediats im PR Photozyklus wäre, dass die strukturellen Änderungen von Helix C, die in bR zum L-Intermediat führen, langsamer sind als die Bildung von M. In L wird die deformierte Helix C vorwiegend über elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert. Wird das Proton von der SB auf bR D85 übertragen, werden diese Wechselwirkungen gebrochen und Helix C bewegt sich weg von der deprotonierten SB. Da der Protonentransfer an sich eine sehr schnelle Reaktion darstellt, wäre in diesem Fall für PR die Reorientierung von Helix C schneller als deren Deformation, wobei kein L-ähnliches Intermediat akkumuliert.

Das quasistationäre Gleichgewicht zwischen S^1_{555} (K) und S^2_{405} (M) ist temperaturabhängig, wobei der Anteil an S^2_{405} (M) mit steigenden Temperaturen zunimmt. Die Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung von S^2_{405} ist mit einer Abnahme der freien Energie $\Delta G^{\#}$ um 5 kJ/mol verbunden, was in der Grössenordnung einer schwachen Wasserstoffbrücke (4 bis 30 kJ/mol) liegt. Dies war zu erwarten, da durch die Deprotonierung der SB und der Übertragung des Protons auf PR D97 bei der Bildung von S^2_{405} ionische Wechselwirkungen im Proteininneren von PR gebrochen werden, was zu zusätzlichen Konformationsfreiheitsgraden der betroffenen Aminosäureresten führt. Aus diesem Grund ist vermutlich der hohe entropische Anteil in P^2 mit knapp 100 J/(mol K) für die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen S^1_{555} und S^2_{405} in Richtung S^2_{405} und die damit verbundene Abnahme der freien Energie bei höheren Temperaturen verantwortlich. Ein ähnliches Verhalten wurde für das L/M-Gleichgewicht im kinetischen Photozyklusmodel von bR [72] beobachtet. Dies lässt die Vermutung zu, dass die höhere entropische Stabilisierung des M-Intermediats im Photozyklus von bR und PR, was als eine Art Auflockerung der Proteinstruktur in Bezug auf den spektroskopischen Grundzustand interpretiert werden kann [164], die treibende Kraft ist, welche zur Deprotonierung der SB führt. Die Aktivierungsenergie des L→M-Übergangs in bR liegt bei 56 kJ/mol [165], dies ist der gleiche Wert, der für die Aktivierungsenergie des Übergangs von P^1 (K-Intermediat) zu P^2 (K/M-

Quasigleichgewicht) im PR-Photozyklus berechnet wird mit 56.3 ± 2.8 kJ/mol. In diesem Fall entspricht die Auflösung der Wasserstoffbrücke bei Deprotonierung der SB in PR mit 5 kJ/mol etwa 10% der gesamten Aktivierungsenergie bei Bildung von M.

Die kinetischen Zustände P^3 und P^4 (K/M/O-Tripelgleichgewicht)

P^2 zerfällt zu den kinetischen Zustände P^3 ($\tau_{1/2}$ =0.3 ms) und daraufhin zu P^4 ($\tau_{1/2}$ =1 ms), welche ein komplexeres Verhalten beschreiben. Die globale Datenanalyse der absoluten Absorptionsspektren von P^3 und P^4 zeigt einen Beitrag von jeweils drei spektroskopisch unterscheidbaren Zuständen S^1_{555}, S^2_{405} und S^3_{575}. Das Absorptionsmaximum von S^3_{575} ist stark bathochrom verschoben (λ_{max} = 575 nm) und besitzt aus diesem Grund hohe Ähnlichkeit mit dem O-Intermediat von bR (λ_{max} = 630 nm). Im Photozyklus von bR ist das Retinal beim Übergang von N (λ_{max} = 560 nm) nach O-Intermediat bereits zur *all-trans* Form reisomerisiert [166]. Im PR-Photozyklus ist jedoch noch in der ms-Zeitskala eine *13-cis* Retinalkonfiguration zu detektieren, in welcher S^3_{575} bereits akkumuliert ist. Insbesondere die ausgeprägte positive C=C-Streckschwingung bei 1552 cm^{-1} im FTIR-Differenzspektrum von PR 1 ms nach Laseranregung [113] ist charakteristisch für eine Akkumulation eines N-ähnlichen Intermediats wie im Falle des bR Photozyklus [167]. Ein ähnliches Verhalten zeigen die bR-Mutanten L93A/M/T/S in denen die Reisomerisierung des Retinal über die Akkumulation des bathochrom verschobenen O-Intermediats hinaus verzögert ist, aufgrund eines direkten Einflusses von L93 auf die 13-Methyl Gruppe des Chromophors [168] [169]. Trotzdem wird bei diesen Mutanten von einem O-Intermediat gesprochen, obwohl die Retinalkonfiguration noch *13-cis* ist, eine Zuordnung von S^3_{575} zum archetypisches O-Photointermediat auf Basis der visuellen Spektroskopie ist deshalb vorzuziehen, wohingegen Varo et al. statt eines O ein N-Intermediates postulieren. [170]. In thermodynamischer Hinsicht ist das O-Intermediat von bR entropisch stabilisiert, was in der Beobachtung zum Ausdruck kommt, dass das Gleichgewicht zwischen bR N und O mit steigender Temperatur auf die Seite von O verschoben ist [171]. Ähnliches gilt auch für die Temperaturabhängigkeit von S^3_{575} in P^3 und P^4. Mit steigender Temperatur sinkt die Konzentration an S^1_{555} (K-ähnlich) währenddessen der Anteil an S^2_{405} (M-ähnlich) und S^3_{575} (O-ähnlich) steigt. Aus den absoluten Absorptionsspektren des kinetischen Zustand P^3 kann ein Verhältnis von S^1_{555}:S^2_{405}:S^3_{575} = 5:5:1 (20 °C) abgeschätzt werden, hingegen ist in P^4 das Verhältnis S^1_{555}:S^2_{405}:S^3_{575} = 1:3:7 (20°C) , d.h. deutlich in Richtung $S_3{}^{575}$ verschoben. Eine Unterscheidung von P^3 und P^4 ist in diesem Fall ausschliesslich in Bezug auf Besetzung und

Temperaturabhängigkeit der quasistationären Gleichgewichte dieser spektralen Zustände möglich.

Grundsätzlich kann eine derartige Abhängigkeit mit einem linearen Reaktionsschema oder einem Reaktionsschema, in dem alle drei Komponenten im thermodynamischen Gleichgewicht miteinander stehen (Tripelgleichgewicht) beschrieben werden. Da Tripelgleichgewichte zwischen spektroskopisch unterscheidbaren Intermediaten bereits für den Photozyklus von anderen Rhodopsinen beobachtet wurden [106], werden die quasistationären Gleichgewichte in Form eines Tripelgleichgewichts in P^3 und P^4 für ein kinetischen Photozyklusmodel dargestellt. Eine genauere Datenanalyse der Temperaturabhängigkeit der spektroskopisch unterscheidbarer Intermediate in P^3 und P^4, wie dies für das Gleichgewicht in P_2 durchgeführt wurde, ist für diese zwei kinetischen Zustände aufgrund der Komplexität des Tripelgleichgewichts nicht eindeutig möglich. Insbesondere die Extrapolation der relativen Konzentrationen der spektralen Zustände zu höheren (> 50°C) und niedrigeren (< 0°C) Temperaturen ist auf Basis der gemessenen Datensätzen mit hohen Fehlern behaftet. Auf eine Abschätzung von thermodynamischen Parametern wird aus diesem Grund verzichtet.

Da die kinetischen Zustände P^3 und P^4 spektroskopisch nicht zu unterscheiden sind verhalten sie sich wie das Gleichgewicht zwischen M_1 und M_2 des bR-Photozyklus. Wohingegen in M_1 der pKs der SB noch < 5 ist, liegt er in M_2 wieder bei > 13, was die Reprotonierungsreaktion vom primären Protonenakzeptor bR D96 begünstigt. Der Übergang von M_1 zu M_2 wird aus diesem Grund auch als „Switch“ (Änderung der Zugänglichkeit der SB) auf Basis des IST-Models bezeichnet [172]. Eine Änderung der Zugänglichkeit der SB ist aus diesem Grund auch für den Übergang der kinetischen Zustände P^3 zu P^4 anzunehmen.

Die kinetischen Zustände P^5 und P^6 (O/PR’-Quasigleichgewicht)

Der kinetisch unterscheidbare Zustand P^5 ($\tau_{1/2}$ = 4 ms) beschreibt ein temperaturabhängiges Gleichgewicht zwischen dem S^3_{575} (O-ähnlich) und einem Vorläufer des PR Grundzustandes S^4_{520}, der in P^6 ($\tau_{1/2}$ = 40 ms) in reiner Form vorliegt. Entsprechende Vorläufer des spektroskopischen Grundzustands sind bereits für die Photozyklen weitere Retinalproteine beschrieben worden (*Np*hR (Chizhov et al. 2001 [184]) und *Np*sRII (Chizhov et al. 1998 [106])).

Zusammengefasst kann ein kinetisches Photozyklusmodel von PR aufgestellt werden, in dem ausgehend vom spektroskopischen Grundzustand P^0 nach Absorption eines Photons das Protein über die sechs kinetisch unterscheidbaren Intermediate P^1 bis P^6 zurück zum spektroskopischen Grundzustand P^0 relaxiert. Hierbei durchläuft PR jedoch nur vier spektroskopisch unterscheidbare Zustände S^1_{555}, S^2_{405}, S^3_{575} und S^4_{520}, welche eine hohe Ähnlichkeit zu den archetypischen Photointermediaten K, M und O sowie einem Vorläufer des spektroskopischen Grundzustands PR' aufweisen. Beim Übergang der kinetischen Zustände $P_3 \rightarrow P_4$ sowie $P_6 \rightarrow P_0$ ist keine Änderung der spektroskopischen Eigenschaften zu beobachten, aus diesem Grund werden diese Übergänge als „silent transitions" des Photozyklus von PR bezeichnet. Solche „silent transitions", welche auch für den Photozyklus von bR beschrieben sind [72], sind nur kinetisch aufzulösen und reflektieren die Dynamik des Proteinrückgrads oder Änderungen von Protonierungszustände von Gruppen, welche die chemischen Umgebung der SB nicht beeinflussen.

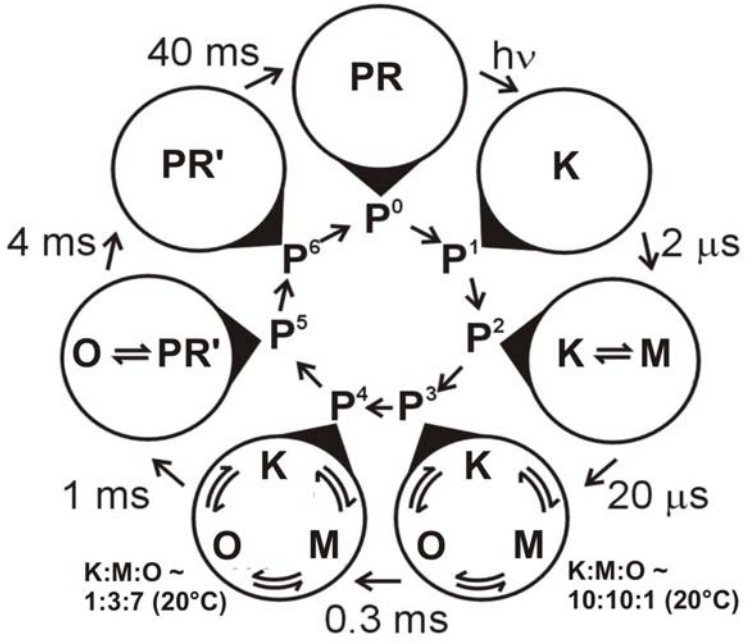


Abb. 4.3: Kinetisches Photozyklusmodel von PR.

Der Photozyklus von $PR^{violett}$, der bei saurem pH zu beobachten ist, wird auch durch sechs kinetischen Zustände P'_{1-6} beschrieben, welche deutlich weniger von der Temperatur abhängig sind. Ausgehend von einem reinen bathochrom verschobenen Photointermediat mit einem Absorptionsmaximum von 574 nm ($S_1'^{574}$, K-ähnlich) in P_1' relaxiert das Protein über ein Gleichgewicht zwischen $S_1'^{574}$ und einem Vorläufer des $PR^{violett}$ Grundzustands ($S_2'^{547}$, PR') in P_3' und P_4' innerhalb von 40 ms zum spektroskopischen Grundzustand. Da nur zwei spektroskopisch unterscheidbare Zustände (K, PR') beobachtet werden können, der Photozyklus von $PR^{violett}$ aber sechs kinetisch unterscheidbare Intermediate aufweist sind die restlichen vier kinetischen Übergänge zwischen $P'_1 \rightarrow P'_2$, $P'_3 \rightarrow P'_4$, $P'_5 \rightarrow P'_6$ und $P'_6 \rightarrow P'_0$ spektroskopisch nicht zu differenzieren.
Ein kinetisches Photozyklusmodel ist in folgender Abbildung zusammenfasst.

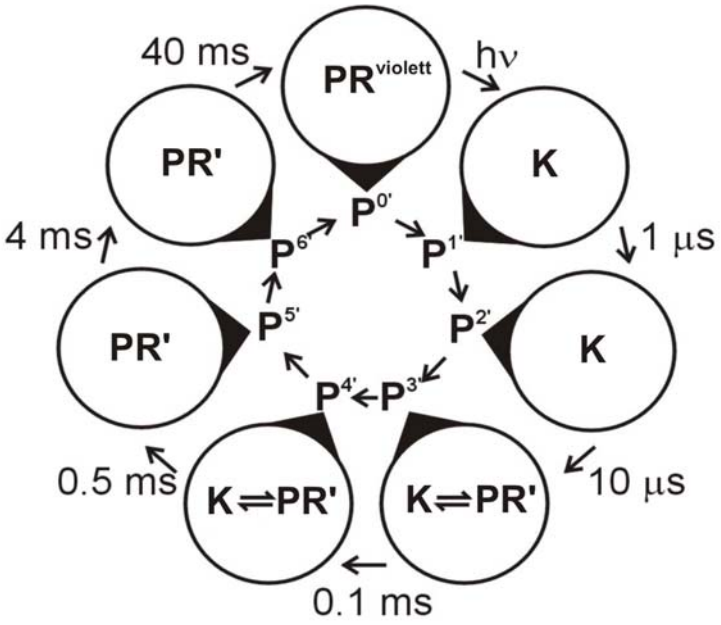


Abb. 4.4: Kinetisches Photozyklusmodel von $PR^{violett}$.

Sowohl die Anzahl als auch die Werte der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Übergänge zwischen den kinetischen Zuständen P_i und P_{i+1} sind pH-unabhängig; dies ist unerwartet, da sowohl der spektroskopische Grundzustand als auch die transienten Absorptionsänderungen und demnach auch die daraus resultierenden absoluten Absorptionsspektren eine deutliche pH-Wert Abhängigkeit aufweisen. Der spektroskopische Grundzustand sowie die absoluten Absorptionsspektren der Photozyklusintermediate sind von der chemischen Umgebung der SB abhängig. Aus diesem Grund deutet eine pH-Unabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Zerfälle kinetisch unterscheidbarer Zustände darauf hin, dass die Proteindynamik des Photozyklus von PR und $PR^{violett}$ nach Absorption eines Photons vergleichbar ist. Diese Beobachtung kann auf der Basis des IST-Models [172] beschrieben werden, wonach die Retinal-Isomerisierung von *all-trans* zu *13-cis* zwei kinetisch unabhängige Prozesse induziert:

1) Strukturelle Änderungen des Proteingerüst:
   Die Änderung der Zugänglichkeit des Mediums zur SB („Switch“), wobei *all-trans* Retinal die Zugänglichkeit der SB zur zytoplasmatischen Seite (CP) und *13-cis* Retinal zur extrazellulären Seite (EC) begünstigt.
2) Änderungen der chemischen Umgebung der SB:
   Insbesondere die Translokation des Protons von der protonierten SB (SBH^+) auf einen Protonenakzeptor bzw. vom Protonendonor auf die deprotonierte SB.

Nach dem IST-Model sind für beide Prozesse, die während des Photozyklus zweimal durchlaufen werden, seperate Geschwindigkeitskonstanten zu definieren, deren Werte bestimmen welche Reaktion (Switch oder Translokation) schneller abläuft. Im Gegensatz zum IST-Model postuliert das „Local Access“-Model, dass die Swich-Reaktion und Translokation voneinanander abhängig sind [173].
Der Photozyklus von PR als auch der von $PR^{violett}$ wird mit sechs kinetisch unterscheidbaren Intermediaten beschrieben, jedoch ist die Anzahl der spektroskopischen Intermediate deutlich vom pH-Wert abhängig. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Änderungen des Proteingerüsts, welche zur Deprotonierung der SB führen, egal ob diese während der thermischen Relaxation des Photozyklus deprotoniert wird oder nicht, schneller und unabhängig voneinander ablaufen als die Veränderung der chemischen Umgebung der SB.
Aus diesem Grund eignet sich das IST-Model, im Gegensatz zum „Local Access“-Model, für die Beschreibung des Photozyklus von PR und $PR^{violett}$ besser.

Vermutlich beruhen der/die geschwindigkeitsbestimmende(n) Schritt(e) der Photozyklen beider Spezies entweder auf Proteinkonformationsänderungen oder auf Protonierungsänderungen von Gruppen, welche sich nicht in der chemischen Umgebung des Chromophors befinden. In beiden Fällen sind diese Änderungen nur kinetisch und nicht spektroskopisch detektierbar. Protonierungs-/Deprotonierungsreaktionen sind in der Regel sehr schnelle Reaktionen. Aus diesem Grund sind Proteinkonformationsänderungen, welche sowohl im Photozyklus von PR als auch $PR^{violett}$ auftreten geschwindigkeitsbestimmend. Ein Beispiel hierfür sind Proteinkonformationsänderungen, welche zur Reisomerisierung des Chromophors von *13-cis* zu *all-trans* Konfiguration führen. In der Tat konnte mittels FTIR-Spektroskopie von PR gezeigt werden, dass selbst in der ms-Zeitskala, d.h. kurz vor Relaxation zum spektroskopischen Grundzustand die Retinalkonfiguration noch *13-cis* Isomerisierung aufweist [113].
Die pH-Unabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten ist nicht auf den Photozyklus von PR beschränkt, auch im Falle des *Nps*RII-Photozyklus sind die kinetischen Konstanten nicht vom pH abhängig, obwohl die Titration des spektroskopischen Grundzustand im beobachteten pH-Bereich eine bathochrome Verschiebung aufweist [106]. Im Falle des bR-Photozyklus ist eine derartige Datenanalyse der Geschwindigkeitskonstanten erschwert, da unter den pH-Bedingungen des purpur→blau Übergangs (pKs = 2.5) irreversible Proteindenaturierung auftritt. Erste Ergebnisse deuten jedoch auf eine ähnliche pH-Unabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten hin (pers. Mitteilung I. Chizhov, Medizinische Hochschule Hannover).

Einhergehend mit der Photozyklusreaktion von PR wird eine Ladung über die Membran aktiv transportiert. Der Photostrom von PR ist ein nach Aussen gerichteter Protonenstrom, der bei PR exprimierenden *E.coli* während Belichtung mit grünem Licht zu einer Azidifizierung des umgebenden Mediums führt. Zur weiteren Charakterisierung des Photostroms von PR wurde das rekonstituierte Protein an planaren Lipiddoppelschichten untersucht. Nach Belichtung der Membran pumpt PR Protonen in Proteoliposomen. Der lichtinduzierte transiente Strom zeigt ein biphasische Verhalten mit einer sehr schnellen negativen Komponente, die die intrazelluläre Protonenaufnahme als auch proteininterne Ladungsverschiebungen wiederspiegelt und einer langsameren positiven Amplitude, für die Abgabe des Protons ins extrazelluläre Medium. *Vice versa* in bR, bei dem die Protonenabgabe schneller ist als die Aufnahme und somit kein biphasischer transienter Strom zu detektieren ist.

Der stationäre Photostrom von PR ist in seiner Amplitude vergleichbar mit Photoströmen von bR und kann mit zusätzlichem blauen Licht verringert werden. Dieser Blaulichteffekt ist für bR detailliert beschrieben und bestätigt die Akkumulation eines photoaktiven blau-absorbierenden Intermediats (M-Intermediat) [116]. In M ist das Retinal in *13-cis* Konfiguration und kann durch Absorption eines blauen Photons zur *all-trans* Form reisomerisieren. Während dieser sehr schnellen Photoreaktion ändert sich die Zugänglichkeit der deprotonierten SB nicht. Unter diesen Umständen kann $M^{all\text{-}trans}$ nur von Aussen und nicht vom primären Protonendonor bR D96 bzw. PR E108 reprotoniert werden, wobei kein Nettostrom stattfindet.

Währenddessen PR bei neutralem und alkalischem pH Protonen von Innen nach Aussen pumpt, ist bei saurem pH eine Umkehrung des Protonenstroms an planaren Lipiddoppelschichten zu beobachten.

Eine Inversion des Photostroms von Retinalproteinen ist nicht ungewöhnlich, z.B. pumpt die blaue Spezies von bR, die unter sauren Bedingungen vorliegt (pH < 2.5) Halogenidionen (Chlorid- oder Bromidionen) nach Aussen wobei ein inverser Ladungstransport gemessen wird [174]. Unter diesen Bedingungen ist der primäre Protonenakzeptor bR D85 protoniert, was den Rückschluss zulässt, dass der Protonierungszustand des primären Protonenakzeptor direkten Einfluss auf die Vektorialität und Art (Protonen oder Halogenidionen) des Photostroms besitzt. Diese Aussage wird dadurch unterstützt, dass bR-Mutanten bei denen der primäre Protonenakzeptor mutiert ist (D85N, D85T sowie D85,96N) sogar in einem physiologischen pH Bereich von pH 5.5-8 Protonen nach Innen [175] und bei saurem pH Chloridionen [176] [177] pumpen. Dieser inverse Pumpvorgang verläuft über einen 2-Photonen-Prozess. Bei Absorption eines grünen Photons wird das Proton der SB unter Bildung eines *13-cis* M-Intermediats auf die cytoplasmatische Seite transportieren. Nach Absorption eines zweiten blauen Photons reisomerisiert der Chromophor zur *all-trans* Form und relaxiert zum Grundzustand, wobei die deprotonierte SB von der extrazellulären Seite reprotoniert wird. Konsequenterweise führt die Anregung mit weissem Licht ($\lambda > 360$ nm) zu einem inversen Protonentransport. Der aktive inverse Transport von Ladung über einen 2 Photonen-Prozess ist neben bR auch für weitere Retinalproteine beschrieben hR [178] und sRI [143] (Zusammengefasst in [172]).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter sauren pH-Bedingungen eine violett absorbierende Spezies $PR^{violett}$ vorliegt, bei welcher der primäre Protonenakzeptor PR D97 protoniert ist. Die Inversion des Protonenstroms von $PR^{violett}$ ist deshalb direkt auf den

Protonierungszustand von PR D97 zurückzuführen, vergleichbar mit der aziden Spezies von Bakteriorhodopsin (bR^{blue}).

Im Photozyklus von $PR^{violett}$ kann keine Akkumulation eines M-ähnlichen Intermediats detektiert werden, deswegen findet keine Verringerung des inversen, einwärtsgerichtete Photostrom mit zusätzlichem blauen Licht statt. Es stellt sich die Frage wie die Protonentranslokation von $PR^{violett}$ ohne spektroskopische Hinweise auf ein M-ähnliches Intermediat mit deprotonierter SB stattfinden kann. Ohne Zweifel verläuft eine Protonentranslokation in Retinalproteinen über eine Deprotonierung der SB. Falls jedoch die Reprotonierung der SB vom primären Protonendonor E108 unter sauren Bedingungen ein schnellerer Prozess ist im Vergleich zur Deprotonierung, könnte sie weder bei „single-turnover“ Experimenten (Laserblitzphotolyse) als auch bei „steady-state“-Messungen (BLM) detektiert werden. In der Tat ist z.B. die Reprotonierung des primären Protonendonors PR E108 bei saurem pH so schnell, dass die Deprotonierung dieser Aminosäure nicht mittels zeitaufgelöster FTIR-Spektroskopie detektiert werden kann. Eine ähnliche pH-abhängige Kinetik konnte für den primären Protonendonor D96 im Photozyklus von bR beobachtet werden [179].

Ein unterschiedliches Verhältnis der kinetischen Konstanten für die Protonierungs- und Deprotonierungreaktion der SB von PR und $PR^{violett}$ ist nicht unwahrscheinlich, da die Protonentransferreaktionen nicht mit Veränderung der Zugänglichkeit der SB gekoppelt ist (IST-Model).

Im Falle von PR induziert die Retinal-Isomerisierung (I*) zuerst die Translokation des Protons auf die EC-Seite des Proteins (T), danach wird die Zugänglichkeit der SB in Richtung des CP erhöht (S1) woraufhin die deprotonierte SB reprotoniert wird. Nach Reisomerisierung des Retinals (I) relaxiert PR zurück zum spektroskopischen Grundzustand (S2).

In $PR^{violett}$ ist die Erhöhung der Zugänglichkeit zur CP-Proteinseite (S1) nach Retinal-Isomerisierung schneller als der Transfer des Protons weg von der SB. Um einen vektoriellen Transport in Richtung CP-Seite zu gewährleisten induziert die Reisomerisierung des Retinals eine höherer Zugänglichkeit der SB zur EC-Seite (S2) bevor im letzten Schritt die SB reprotoniert wird.

Die auswärtsgerichtete Pumprichtung von PR kann durch die Absorption eines zweiten grünen Photons verstärkt werden, wahrscheinlich durch die Beschleunigung des $O^{13\text{-}cis}$–Zerfalls zum spektroskopischen Grundzustand. Diese Interpretation unterstützt die Aussage, dass die Konformationsänderungen, welche zur Reisomerisierung des Retinals führen im PR-Photozyklus den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen. In diesem Fall wird durch

die Absorption eines zweiten Photons der Transportzyklus beschleunigt, indem ein vorgelagertes Gleichgewicht auf die Seite des Produkts verschoben wird. Am Wahrscheinlichsten hierfür ist ein M_{EC}-M_{CP}-Gleichgewicht, bei dem sich die Zugänglichkeit der SB zur extrazellulären (EC) und cytoplasmatischen (CP) Seite ändert („Switch"-Reaktion).

Hingegen kann der inverse Photostrom von $PR^{violett}$ nicht durch Absorption eines zweiten Photons verstärkt werden.

Zusammengefasst kann für PR und $PR^{violett}$ folgendes Translokationsmodel auf der Grundlage des IST-Hypothese aufgestellt werden.

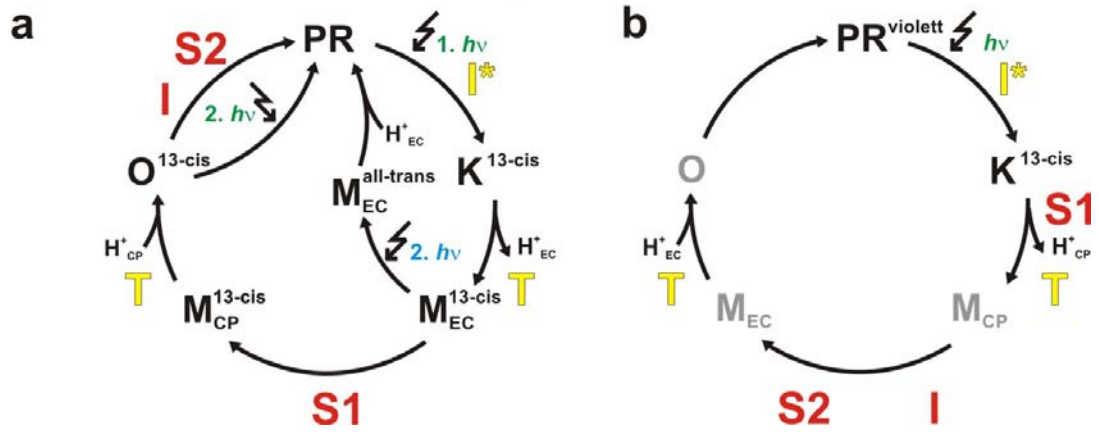


Abb. 4.5: Photozyklusmodel der Protonentranslokation von PR (a) und $PR^{violett}$ (b) auf Basis der IST-Hypothese [172] mit (I*) Isomerisierung, (I) Reisomerisierung, (T) Translokation, S1/S2 Switchreaktion. Die photoaktiven Intermediate $M^{13\text{-}cis}{}_{EC}$ und $O^{13\text{-}cis}$ des PR-Photozyklus relaxieren durch die Absorption eines zweiten Photons blauer bzw. grüner Wellenlänge zum spektroskopischen Grundzustand zurück, wobei das *13-cis* Retinal zur *all-trans* Form reisomerisiert. Die spektroskopisch nicht detektierbaren Photointermediate M und O des $PR^{violett}$-Photozyklus sind grau unterlegt. EC: Extrazellulär, CP: Cytoplasmatisch.

Die zeitliche Abfolge der Translokation des Protons in den Extrazellulärraum bzw. die Aufnahme aus dem Intrazellulärraum von PR unterscheidet sich von der Transportkinetik von bR bei physiologischem pH. Wohingegen bei bR zusammen mit dem Übergang von L→M ein Proton über zwei auf der extrazellulären Oberfläche lokalisierten Glutaminsäuren des Protonenabgabekomplex E204 [180] [181] und E194 [182] in den Extrazellulärraum abgegeben wird, kann bei PR, wo kein L-ähnliches Photointermediat akkumuliert, die Protonenabgabe ins Medium erst im letzten Schritt des Photozyklus bei Übergang von M zu O detektiert werden. Da die Aminosäuren des Protonenabgabekomplexes in PR anhand des Primärsequenzvergleichs nicht konserviert sind, ist die Protonenaufnahme von PR schneller

als die Abgabe, was zu einer transienten Alkalisierung des Mediums führt. Dementsprechend zeigt bR mit mutiertem Protonenabgabekomplex E194Q und E204Q [183] [182] eine mit PR vergleichbare Abfolge der Protonentranslokation.

Im Photozyklus von bR ist die Reprotonierung der SB durch den primären Protonendonor bR D96 (M→N) und die darauffolgende Reprotonierung dieses Restes (N→O) spektroskopisch unterscheidbar ist, hingegen konnte im Rahmen dieser Arbeit für PR ein direkter Übergang von M nach O detektiert werden. In diesem Fall sind die Protonierungsreaktionen des primären Prototonendonor PR E108 im visuellen Spektralbereich nur kinetisch und nicht spektroskopisch unterscheidbar. Eine Differenzierung der Protonierungszustände von PR E108 ist jedoch mittels FTIR-Spektroskopie möglich und bestätigt eine Akkumulation von deprotoniertem PR E108 in der ms-Zeitskala [113] wie im Falle von bR D96 [110]. Im letzten Schritt der Protonentranslokation von PR wird das Proton von PR D97 in den Extrazellulärraum abgegeben und der Retinalchromophor reisomerisiert zurück zur *all-trans* Form.

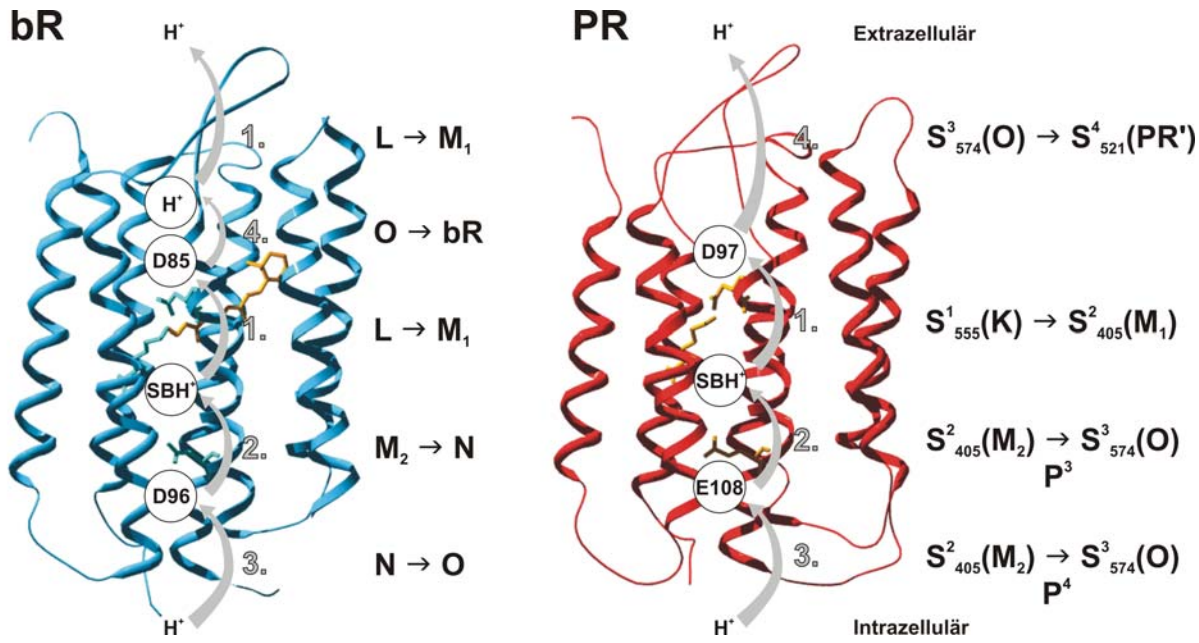


Abb. 4.6: Model der Protonentranslokation von bR (links) (modifiziert nach [184]) und PR (rechts).

PR ist eine auswärts- und einwärtsgerichtete lichtgetriebene Protonenpumpe. Der Protonierungszustand von D97 ist verantwortlich für dieses bifunktionelle Verhalten. PR D97 dient als primärer Akzeptor des Protons von der SB unter neutralen und alkalischen Bedingungen. Unter sauren Bedingungen ist D97 protoniert (pKs 7.68) was zu einer charakteristischen bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximum führt ($PR^{violett}$)

unter diesen Bedingungen pumpt das Protein Protonen nach Innen. Im Falle von PR kann der Effekt des Protonierungszustandes des primären Protonenakzeptors auf die Vektorialität des Protonentransports unter weniger extremen und mehr physiologischen Bedingungen (Meerwasser besitzt einen pH-Wert von etwa 8) untersucht werde. Die Lichtintensitätsabhängigkeit der Protonenpumpe deutet darauf hin, dass der Pumpzyklus von $PR^{violett}$ ein Ein-Photonen-Prozess ist. Bei neutralem und alkalischem pH hingegen führt die aufeinanderfolgende Absorption von zwei Photonen zu einer Beschleunigung des auswärtsgerichteten Protonentransports.

Die Wechselzahl („katalytischer „Turnover“) des Photozyklus von PR liegt bei 40 ms und ist um eine Grössenordnung höher im Vergleich zu der Protonenpumpe bR mit 3.5 ms [72], aber vergleichbar mit dem Wert, welcher für die Chloridpumpe *Np*hR mit 20 ms [185] beobachtet wird. Beide Proteine, sowohl bR als auch Np*hR*, sind in der Zelle für die effiziente lichtgetriebene Energiekonversion verantwortlich und besitzen aus diesem Grund eine schnellen katalytischen „Turnover“. Da die Wechselzahl des PR-Photozyklus um mehr als eine Grössenordnung geringer ist als bei dem photophoben sensorischen Rhodopsin *Np*sRII mit 1.2 sec [106] kann angenommen werden, dass es sich bei PR auch um eine Energielieferanten in der Zelle handelt, der den Protonengradienten für die ATP-Synthese von phototrophen Marinebakterien erzeugt und aufrechterhält. Es ist deshalb zu vermuten, dass die beobachtete pH-abhängige Inversion der Pumprichtung und der Zwei-Photonen-Prozess eine breitere Regulation des Membranpotentials ermöglicht. Der pH-abhängige vektorielle Protonentransport von PR könnte demnach einen physiologisch bedeutenden Mechanismus zur Membranpotentialregulation phototropher Marinebakterien darstellen, welcher neben der Photosynthesereaktion ein global signifikanter mikrobiologischer Prozess ist [15] [16].

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine generelle Vorgehensweise zur funktionellen *in vitro* Expression von integralen Membranproteinen in eine artifizielle hydrophobe Umgebung beschrieben. Hierzu wurden fünf Membranproteine: die archaebakteriellen 7-TM-Helix Rezeptoren bR, *Np*hR und *Np*sRII, das eubakterielle PR und der GPCR hGlyRα1, untersucht.
Die zellfreie Biosynthese der Membranproteine erfolgte unter vorher optimierten Reaktionsbedingungen in einem gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem bestehen aus *E.coli* Zell-Lysaten und T7-RNA-Polymerase. Die Analyse der ^{14}C-Leucin markierten Syntheseprodukte mittels SDS-PAGE zeigte, daß alle untersuchten Proteine zellfrei exprimiert werden konnten. Die Insertion der Proteine in eine artifizielle hydrophobe Umgebung bestehen aus unterschiedlichen Detergenzien oder Lipiden wurde mittels eines proteolytischen Abbauassays von Protease-zugänglichen Loop-Bereichen untersucht.
Hierbei konnte gezeigt werden, daß bR, und zu einem geringeren Anteil *Np*sRII und PR in SUVs bestehend aus Phospholipiden, die unter den Reaktionsbedingungen der Lα-Phase vorliegen, insertiert. Für *Np*hR und hGlyRα1 führte der Zusatz von Phospholipiden zu keiner Stabilisierung der Proteine.
Die Funktionalitätsanalyse des zellfrei dargestellten bR (bR^{cf}) erfolgte direkt mit den Reaktionsansätzen mittels zeitaufgelöster Laserblitzabsorptionsspektroskopie und Ladungstransportmessungen an planaren Lipiddoppelschichten. bR^{cf} besitzt einen Photozyklus, welcher eine hohe Ähnlichkeit zum Photozyklus von nativem bR in „cell envelope"-Vesikeln aus *H.salinarum* aufweist. Die Ausbeute von bR^{cf} konnte spektroskopisch auf 20 µg/ml Reaktionsvolumen abgeschätzt werden. Dies ist vergleichbar mit der Ausbeute, die bei der Isolierung von bR aus der Purpurmembran von *H.salinarum* erzielt wird. Der Photozyklus von bR^{cf} zeigt ein verlangsamten Zerfall des M-Intermediats in Bezug zu bR in der Purpurmembran, aber vergleichbar mit polarisierten „cell envelope vesicles" aus *H.salinarum*. Nach Belichtung pumpt bR^{cf} aktiv Protonen in Liposomen mit einer Amplitude von bis zu 1 nA/cm^2.
Es konnte gezeigt werden, daß die funktionelle *in vitro* Expression von Membranproteinen gekoppelt mit der sensitiven Laserblitzphotolyse und BLM-Technik eine geeignete Methode darstellt die Genprodukte direkt zu charakterisieren. Dieser Ansatz zeigt eine Alternative zu quantitativ-orientierten zellulären Expressions- und Reinigungsmethoden auf.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte das eubakterielle PR unter Anwendung der heterologen *in vivo* Expression in *E.coli* Zellen funktionel dargestellt und in reiner Form in einer Ausbeute von bis zu 9 mg/l isoliert werden. PR besitzt eine pH-abhängige Spektralverschiebung ($PR \rightarrow PR^{violett}$) mit einem ungewöhnlich hohen pKs von 7.6, was auf den Protonierungszustand des primären Protonenakzeptors D97 zurückgeführt werden kann. Nach Belichtung durchläuft sowohl PR als auch $PR^{violett}$ einen Photozyklus, wobei Protonen aktiv gepumpt werden. Der hohe pKs-Wert der $PR \rightarrow PR^{violett}$ Titration ermöglichte die detaillierte kinetische und thermodynamische Analyse beider Photozyklusreaktionen unter weniger extremen Bedingungen und erlaubte die Aufstellung eines kinetischen Photozyklusmodel für beide Spezies. Der Photozyklus von PR besitzt hohe Ähnlichkeiten zu dem anderer Retinalproteine. Die thermische Relaxation verläuft über die Akkumulation archetypischer Photointermediate darunter die spektroskopisch unterscheidbaren K-, M- und O-Intermediate. Im Photozyklus von $PR^{violett}$ kann keine Akkumulation eines M-Intermediats beobachtet werden, da die deprotonierte SB vermutlich in einem sehr schnellen Prozess reprotoniert wird. In kinetischer Hinsicht ist die thermische Relaxation beider Photozyklen jedoch miteinander vergleichbar, wobei die strukturellen Änderungen des Proteinrückrats, welche zur Reisomerisierung des Retinals von *13-cis* zu *all-trans* führen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Photozyklus von PR darstellen.

Zusammengefasst lässt dies den Rückschluss zu, dass die Proteindynamik unabhängig von der chemischen Umgebung der SB ist. Diese Beobachtung bestätigt die IST-Hypothese für Retinalproteine, welche postuliert, dass die Retinalisomerisierung kinetisch unabhängige Prozesse induziert.

Mittels lichtinduzierten Ladungstransportmessungen an planaren Lipiddoppelschichten konnte gezeigt werde, dass PR Protonen über einen Zwei-Photonen-Mechanismus gegen den elektrochemischen H^+-Gradienten nach Aussen pumpt, wohingegen $PR^{violett}$ nach Absorption von nur einem Photon Protonen in die entgegengesetzte Richtung nach Innen pumpt. Auf Basis der IST-Hypothese konnte ein Photozyklusmodel der Protonentranslokation aufgestellt werden, welches mit dem anderer Retinalproteine vergleichbar ist.

6 Literaturverzeichnis

[1] Spiegel,A.M. (1996) Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annual Review of Physiology*, **58,** 143-170.

[2] Milligan,G. & Rees,S. (1999) *Trends in Pharmacological Sciences*, **20,** 118-124.

[3] Marchese,A., George,S.R., Kolakowski,L.F., Lynch,K.R., & O'Dowd,B.F. (1999) *Trends in Pharmacological Sciences*, **20,** 370-375.

[4] Strader,C.D., Fong,T.M., Tota,M.R., Underwood,D., & Dixon,R.A. (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, **63,** 101-132.

[5] Palczewski,K., Van Hooser,P., Garwin,G.G., Chen,J., Liou,G.I., & Saari,J.C. (2000) Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science*, **289,** 739-745.

[6] Menon,S.T., Han,M., & Sakmar,T.P. (2001) Rhodopsin: Structural Basis of Molecular Physiology. *Physiol. Rev.*, **81,** 1659-1688.

[7] Takahashi,T., Tomioka,H., Kamo,N., & Kobatake,Y. (1985) A photosystem other than PS370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium*. *FEMS Microbiology Letters*, **28,** 161-164.

[8] Spudich,J.L. & Bogomolni,R.A. (1988) Sensory Rhodopsins of Halobacteria. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **17,** 193-215.

[9] Oesterhelt,D. & Stoeckenius,W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature - New Biology*, **233,** 149-152.

[10] Matsuno-Yagi,A. & Mukohata,Y. (1980) ATP synthesis linked to light-dependent proton uptake in a red mutant strain of Halobacterium lacking bacteriorhodopsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **199,** 297-303.

[11] Stoeckenius,W. (1985) The rhodopsin-like pigments of halobacteria: light-energy and signal transducers in an archaebacterium. *TIBS*, 483-486.

[12] Hegemann,P. (1997) Vision in Microalgae. *Planta*, **203,** 265-274.

[13] Nagel,G., Ollig,D., Fuhrmann,M., Kateriya,S., Musti,A.M., Bamberg,E., & Hegemann,P. (2002) Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae. *Science*, **296,** 2395-2398.

[14] Bieszke,J.A., Braun,E.L., Bean,L.E., Kang,S., Natvig,D.O., & Borkovich,K.A. (1999) The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archeal rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96,** 8034-8039.

[15] Beja,O., Aravind,L., Koonin,E.V., Suzuki,M.T., Hadd,A., Nguyen,L.T., Jovanovich,S.B., Gates,C.M., Feldman,R.A., Spudich,J.L., Spudich,E.M., & DeLong,E.F. (2000) Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. *Science*, **289,** 1902-1906.

[16] Beja,O., Spudich,E.M., Spudich,J.L., Leclerc,M., & DeLong,E.F. (2001) Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature*, **411,** 786-789.

[17] Sabehi,G., Massana,R., Bielawski,J.P., Rosenberg,M., DeLong,E.F., & Beja,O. (2003) Novel Proteorhodopsin variants from the Mediterranean and Red Seas. *Environm. Microbiol.*, **5,** 842-849.

[18] Venter,J.C., Remington,K., Heidelberg,J.F., Halpern,A.L., Rusch,D., Eisen,J.A., Wu,D., Paulsen,I., Nelson,K.E., Nelson,W., Fouts,D.E., Levy,S., Knap,A.H., Lomas,M.W., Nealson,K., White,O., Peterson,J., Hoffmann,J., Parsons,R., Baden-Tillson,H., Pfannkoch,C., Rogers,Y.H., & Smith,H.O. (2004) Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, **304,** 66-74.

[19] Adams,M.D., Celniker,S.E., Holt,R.A., Evans,C.A., Gocayne,J.D., Amanatides,P.G., Scherer,S.E., Li,P.W., Hoskins,R.A., Galle,R.F., George,R.A., Lewis,S.E., Richards Stephen, Ashburner,M., Henderson,S.N., Sutton,G.G., Wortman,J.R., Yandell,M.D., Zhang,Q., Chen,L.X., Brandon,R.C., Rogers,Y.-H.C., Blazej,R.G.,

Champe,M., Pfeiffer,B.D., Wan,K.H., Doyle,C., Baxter,E.G., Helt,G., Nelson,C.R., Miklos,G.L.G., Abril,J.F., Agbayani,A., An,H.-J., Andrews-Pfannkoch,C., Baldwin,D., Ballew,R.M., Basu,A., Baxendale,J., Bayraktaroglu,L., Beasly,E.M., Beeson,K.Y., Benos,P.V., Berman,B.P., Bhandari,D., Bolshakov,S., Borkova,D., Botchan,M.R., Bouck,J., Brokstein,P., Brottier,P., Burtis,K.C., Busam,D.A., Butler,H., Cadieu,E., Center,A., Chandra,I., Cherry,J.M., Cawley,S., Dahlke,C., Davenport,L.B., Davies,P., de Pablos,B., Delcher,A., Deng,Z., Mays,A.D., Dew,I., Dietz,S.M., Dodson,K., Doup,L.E., Downes,M., Dugan-Rocha,S., Dunkov,B.C., Dunn,P., Durbin,K.J., Evangelista,C.C., Ferraz,C., Ferriera,S., Fleischmann,W., Fosler,C., Gabrielian,A.E., Garg,N.S., Gelbart,W.M., Glasser,K., Glodek,A., Gong,F., Gorrell,J.H., Gu,Z., Guan,P., Harris,M., Harris,N.L., Harvey,D., Heiman,T.J., Hernandez,J.R., Houck,J., Hostin,D., Houston,K.A., Howland,T.J., Wei,M.-H., Ibegwam,C., Jalali,M., Kalush,F., Karpen,G.H., Ke,Z., Kennison,J.A., Ketchum,K.A., Kimmel,B.E., Kodira,C.D., Kraft,C., Kravitz,S., Kulp,D., Lai,Z., Lasko,P., Lei,Y., Levitzky,A.A., Li,J., Li,T., Liang,Y., Lin,X., Liu,X., Mattei,B., McIntosh,T.C., McLeod,M.P., McPherson,D., Merkulov,G., Milshina,N.V., Mobarry,C., Morris,J., Moshrefi,A., Mount,S.M., Moy,M., Murphy,B., Murphy,L., Muzny,D.M., Nelson,D.L., Nelson,D.R., Nelson,K.A., Nixon,K., Nusskern,D.R., Pacleb,J.M., Palazzolo,M., Pittman,G.S., Pan,S., Pollard,J., Puri,V., Reese,M.G., Reinert,K., Remington,K., Saunders,R.D.C., Scheeler,F., Shen,H., Shue,B.C., Siden-Kiamos,I., Simpson,M., Skupski,M.P., Smith,T., Spier,E., Spradling,A.C., Stapleton,M., Strong,R., Sun,E., Svirskas,R., Tector,C., Turner,R., Venter,E., Wang,A.H., Wang,X., Wang,Z.-Y., Wassarman,D.A., Weinstock,G.M., Weissenbach,J., Williams,S.M., Woodage,T., Worley,K.C., Wu,D., Yang,S., Yao,Q.A., Ye,J., Yeh,R.-F., Zaveri,J.S., Zhan,M., Zhang,G., Zhao,Q., Zheng,L., Zheng,X.H., Zhong,F.N., Zhong,W., Zhou,X., Zhu,S., Zhu,X., Smith,H.O., Gibbs,R.A., Myers,E.W., Rubin,G.M., & Venter,J.C. (2000) The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287,** 2185-2195.

[20] C.elegans Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode C.elegans: a platform for investigating biology. *Science*, **282,** 2012-2018.

[21] Venter,J.C., Adams,M.D., Myers,E.W., Li,P.W., Mural,R.J., Sutton,G.G., Smith,H.O., Yandell,M., Evans,C.A., Holt,R.A., Gocayne,J.D., Amanatides,P., Ballew,R.M., Huson,D.H., Wortman,J.R., Zhang,Q., Kodira,C.D., Zheng,X.H., Chen,L., Skupski,M., Subramanian,G., Thomas,P.D., Zhang,J., Gabor Miklos,G.L., Nelson,C., Broder,S., Clark,A.G., Nadeau,J., McKusick,V.A., Zinder,N., Levine,A.J., Roberts,R.J., Simon,M., Slayman,C., Hunkapiller,M., Bolanos,R., Delcher,A., Dew,I., Fasulo,D., Flanigan,M., Florea,L., Halpern,A., Hannenhalli,S., Kravitz,S., Levy,S., Mobarry,C., Reinert,K., Remington,K., Abu-Threideh,J., Beasley,E., Biddick,K., Bonazzi,V., Brandon,R., Cargill,M., Chandramouliswaran,I., Charlab,R., Chaturvedi,K., Deng,Z., Francesco,V.D., Dunn,P., Eilbeck,K., Evangelista,C., Gabrielian,A.E., Gan,W., Ge,W., Gong,F., Gu,Z., Guan,P., Heiman,T.J., Higgins,M.E., Ji,R.R., Ke,Z., Ketchum,K.A., Lai,Z., Lei,Y., Li,Z., Li,J., Liang,Y., Lin,X., Lu,F., Merkulov,G.V., Milshina,N., Moore,H.M., Naik,A.K., Narayan,V.A., Neelam,B., Nusskern,D., Rusch,D.B., Salzberg,S., Shao,W., Shue,B., Sun,J., Wang,Z.Y., Wang,A., Wang,X., Wang,J., Wei,M.H., Wides,R., Xiao,C., Yan,C., Yao,A., Ye,J., Zhan,M., Zhang,W., Zhang,H., Zhao,Q., Zheng,L., Zhong,F., Zhong,W., Zhu,S.C., Zhao,S., Gilbert,D., Baumhueter,S., Spier,G., Carter,C., Cravchik,A., Woodage,T., Ali,F., An,H., Awe,A., Baldwin,D., Baden,H., Barnstead,M., Barrow,I., Beeson,K., Busam,D., Carver,A., Center,A., Cheng,M.L., Curry,L., Danaher,S., Davenport,L., Desilets,R., Dietz,S., Dodson,K., Doup,L., Ferriera,S., Garg,N., Gluecksmann,A., Hart,B., Haynes,J., Haynes,C., Heiner,C., Hladun,S., Hostin,D., Houck,J., Howland,T., Ibegwam,C., Johnson,J., Kalush,F., Kline,L., Koduru,S., Love,A., Mann,F., May,D., McCawley,S., McIntosh,T., McMullen,I., Moy,M., Moy,L., Murphy,B., Nelson,K., Pfannkoch,C., Pratts,E., Puri,V., Qureshi,H., Reardon,M., Rodriguez,R., Rogers,Y.H., Romblad,D., Ruhfel,B., Scott,R., Sitter,C., Smallwood,M., Stewart,E., Strong,R., Suh,E., Thomas,R., Tint,N.N., Tse,S., Vech,C., Wang,G., Wetter,J., Williams,S., Williams,M., Windsor,S., Winn-Deen,E., Wolfe,K., Zaveri,J., Zaveri,K., Abril,J.F., Guigo,R., Campbell,M.J., Sjolander,K.V., Karlak,B., Kejariwal,A., Mi,H., Lazareva,B., Hatton,T., Narechania,A., Diemer,K., Muruganujan,A., Guo,N., Sato,S., Bafna,V., Istrail,S., Lippert,R., Schwartz,R., Walenz,B., Yooseph,S., Allen,D., Basu,A., Baxendale,J., Blick,L., Caminha,M., Carnes-Stine,J., Caulk,P., Chiang,Y.H., Coyne,M., Dahlke,C., Mays,A.D., Dombroski,M., Donnelly,M., Ely,D., Esparham,S., Fosler,C., Gire,H., Glanowski,S., Glasser,K., Glodek,A., Gorokhov,M., Graham,K., Gropman,B., Harris,M., Heil,J., Henderson,S., Hoover,J., Jennings,D., Jordan,C., Jordan,J., Kasha,J., Kagan,L., Kraft,C., Levitsky,A., Lewis,M., Liu,X., Lopez,J., Ma,D., Majoros,W., McDaniel,J., Murphy,S., Newman,M., Nguyen,T., Nguyen,N., & Nodell,M. (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science*, **291,** 1304-1351.

[22] Braun,P., Hu,Y., Shen,B., Halleck,A., Koundinya,M., Harlow,E., & LaBaer,J. (2002) Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. *PNAS*, **99,** 2654-2659.

[23] Grisshammer,R. & Tate,C.G. (1995) Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q. Rev. Biophys.*, **28,** 315-422.

[24] Hamill,O.P., Marty,A., Neher,E., Sakmann,B., & Sigworth,F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch.*, **391,** 85-100.

[25] Nagel,G., Möckel,B., Büldt,G., & Bamberg,E. (1995) Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H^+ pumping. *FEBS Letters*, **377,** 263-266.

[26] Turcatti,G., Nemeth,K., Edgerton,M.D., Meseth,U., Talabot,F., Peitsch,M., Knowles,J., Vogel,H., & Chollet,A. (1996) Probing the Structure and Function of the Tachykinin Neurokinin-2 Receptor through Biosynthetic Incorporation of Fluorescent Amino Acids at Specific Sites. *J. Biol. Chem.*, **271,** 19991-19998.

[27] Holland,J.J. & McCarthy,B.J. (1964) Stimulation of protein synthesis in vitro by denatured DNA. *PNAS*, **52,** 1554-1561.

[28] Zubay,G. (1973) In Vitro Synthesis of Protein in microbial Systems. *Annu. Rev. Genet.*, **7,** 267-287.

[29] Nakano,H. & Yamane,T. (1998) Cell-Free Protein Synthesis Systems. *Biotechnology Advances*, **16,** 367-384.

[30] Kigawa,T., Yabuki,T., Yoshida,Y., Tsutsui,M., Ito,Y., Shibata,T., & Yokoyama,S. (1999) Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins. *FEBS Letters*, **442,** 15-19.

[31] Noren,C.J., Anthony-Cahill,S., Griffith,M.C., & Schultz,P.G. (1989) A General Method for Site-Specific Incorporation of Unnatural Amino Acids into proteins. *Science*, **244,** 182-188.

[32] Mattingly,J.R., Yanez,A.J., & Martinez-Carrion,M. (2000) The folding of nascent mitochondrial aspartate aminotransferase synthesized in a cell-free extract can be assisted by GroEL and GroES. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **382,** 113-122.

[33] Angenendt,P., Nyarsik,L., Szaflarski,W., Glokler,J., Nierhaus,K.H., Lehrach,H., Cahill,D.J., & Lueking,A. (2004) Cell-free protein expression and functional assay in nanowell chip format. *Anal. Chem.*, **76,** 1844-1849.

[34] Coleman,M.A., Lao,V.H., Segelke,B.W., & Beernink,P.T. (2004) High-throughput, fluorescence-based screening for soluble protein expression. *J. Proteome Res.*, **3,** 1024-1032.

[35] Bernath,K., Hai,M., Mastrobattista,E., Griffiths,A.D., Magdassi,S., & Tawfik,D.S. (2004) In vitro compartimentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting. *Analytical Biochemistry*, **325,** 151-157.

[36] Oberholzer,T., Nierhaus,K.H., & Luisi,P.L. (1999) Protein Expression in Liposomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **261,** 238-241.

[37] Noireaux,V. & Libchaber,A. (2004) A vesicle bioreactor as a step toward artificial cell assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A*, **101,** 17669-17674.

[38] Pallen,M.J., Chaudhuri,R.R., & Henderson,I.R. (2003) Genomic analysis of secretion systems. *Current Opinion in Microbiology*, **6,** 519-527.

[39] Koblika,B.K. (1990) The role of cytosolic and membrane factors in processing of the human beta-2 adrenergic receptor following translocation and glycosylation in a cell-free system. *J. Biol. Chem.*, **265,** 7610-7618.

[40] Lyford,L.K. & Rosenberg,R.L. (1999) Cell-free Expression and Functional Reconstitution of Homo-oligomeric alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors into Planar Lipid Bilayers. *J. Biol. Chem.*, **274,** 25675-25681.

[41] Rosenberg,R.L. & East,J.E. (1992) Cell-free expression of functional Shaker potassium channel. *Nature*, **360,** 166-169.

[42] Falk,M.M., Kumar,N.M., & Gilula,N.B. (1994) Membrane Insertion of Gap Junction Connexins - Polytopic Channel-Forming Membrane-Proteins. *Journal of Cell Biology*, **127,** 343-354.

[43] Locker,J.K., Rose,J.K., Horzinek,M.C., & Rottier,P.J. (1992) Membrane assembly of the triple-spanning coronavirus M protein. Individual transmembrane domains show preferred orientation. *J. Biol. Chem.*, **267,** 21911-21918.

[44] White,S.H. & Wimley,W.C. (1999) Membrane Protein Folding and Stability: Physical Principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28,** 319-365.

[45] Popot,J.-L. & Engelman Donald M. (2000) Helical Membrane Protein Folding, Stabilty, and Evolution. *Annu. Rev. Biochem.*, **69,** 881-922.

[46] Elbaz,Y., Steiner-Mordoch,S., Danieli,T., & Schuldiner,S. (2004) In vitro synthesis of fully functional EmrE, a multidrug transporter, and study of its oligomeric state. *PNAS*, **101,** 1519.

[47] Berrier,C., Park,K.H., Abes,S., Bibonne,A., Betton,J.M., & Ghazi,A. (2004) Cell-free synthesis of a functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent. *Biochemistry*, **43,** 12585-12591.

[48] Nagamori,S., Vazquez-Ibar,J.L., Weinglass,A.B., & Kaback,H.R. (2003) In Vitro Synthesis of Lactose Permease to Probe the Mechanism of Membrane Insertion and Folding. *J. Biol. Chem.*, **278,** 14820-14826.

[49] van Dalen,A., Hegger,S., Killian,J.A., & de Kruijff,B. (2002) Influence of lipids on membrane assembly and stability of the potassium channel KcsA. *FEBS Lett.*, **525,** 33-38.

[50] Klammt,C., Lohr,F., Schafer,B., Haase,W., Dotsch,V., Rüterjans,H., Glaubitz,C., & Bernhard,F. (2004) High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur J Biochem*, **271,** 586-580.

[51] Ridder,A., van de Hoef,W., Stam,J., Kuhn,A., de Kruijff,B., & Killian,J.A. (2002) Importace of Hydrophobic Matching for Spontaneous Insertion of a Single-Spanning Membrane Protein. *Biochemistry*, **41,** 4946-4952.

[52] Schmidt,C., Mayer,M., & Vogel,H. (2000) A Chip-Based Biosensor for the Functional Analysis of Single Ion Channels. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39,** 3137-3140.

[53] Steinem,C., Janshoff,A., Höhn,F., Sieber,M., & Galla,H.-J. (1997) Proton translocation across bacteriorhodopsin containing solid supported lipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, **89,** 141-152.

[54] Luecke,H., Schobert,B., Richter,H.-T., Cartailler,J.-P., & Lanyi,J.K. (1999) Structure of Bacteriorhodopsin at 1.55 A resolution. *J. Mol. Biol.*, **291,** 899-911.

[55] Man,D.L., Wang,W.W., Sabehi,G., Aravind,L., Post,A.F., Massana,R., Spudich,E.N., Spudich,J.L., & Beja,O. (2003) Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. *Embo Journal*, **22,** 1725-1731.

[56] Dioumaev,A.K., Brown,L.S., Shih,J., Spudich,E.N., Spudich,J.L., & Lanyi,J.K. (2002) Proton Transfers in the Photochemical Reaction Cycle of Proteorhodopsin. *Biochemistry*, **41,** 5348-5358.

[57] Miroux,B. & Walker,J.E. (1996) Over-production of Proteins in Escherichia coli: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *J. Mol. Biol.*, **260,** 289-298.

[58] Gesteland,R.F. (1966) Isolation and characterization of ribonuclease I mutants of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.*, **16,** 67-84.

[59] Klostermeier,D., Seidel,R.P., & Reinstein,J. (1998) Functional Properties of the Molecular Chaperone DnaK from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.*, **279,** 841-853.

[60] Sambrook,J., Maniatis,T., & Fritsch,E.F. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harb. Lab. Press.

[61] Ausubel,F.M. (1987) *Current protocols in molecular biology*. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience New York.

[62] Birnboim,H.C. & Doly,J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **7,** 1513-1523.

[63] Mullis,K.B. & Faloona,F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155,** 335-350.

[64] 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.

[65] Dower,W.J., Miller,J.F., & Ragsdale,C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, **16,** 6127-6145.

[66] Kates,M. (1982) *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids*. American Elsevier Publishing Co. New York.

[67] Scharf,B.E. Vergleichende Untersuchungen des sensorischen Rhodopsins II in *Halobacterium halobium* und *Natronobacterium pharaonis* und Charakterisierung des Halocyanins, des ersten blauen Kupferproteins aus Archaebakterien. 1992. Ruhr-Universität Bochum, Germany.

[68] Schägger,H. & Jagow,G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, **166,** 368-379.

[69] Hufnagel,P., Schweiger,U., Eckerskorn,C., & Oesterhelt,D. (1996) Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Genetically and Chemically Modified Bacteriorhodopsins. *Analytical Biochemistry*, **243,** 46-54.

[70] Metzler,D.E. & Harris,C.M. (1978) Shapes of spectral bands of visual pigments. *Vision Res.*, **18,** 1417-1420.

[71] Birge,R.R. & Zhang,C.-F. (1990) Two-photon double resonance spectroscopy of bacteriorhodopsin. assignment of the electronic and dipolar properties of the low-lying $^1A_g^{*-}$-like and $^1B_u^{*+}$-like π,π^* states. *J. Chem. Phys.*, **92,** 7178-7195.

[72] 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.

[73] Maurer,R., Vogel,J., & Schneider,S. (1987) Analysis of flash photolysis data by global fit with multi-exponential exponentials. *Photochemistry and Photobiology*, **46,** 255-262.

[74] Müller,K.H. & Plesser,Th. (1991) Variance reduction by simultaneous multi-exponential analysis of data sets from different experiments. *Eur. Biophys. J.*, **19,** 231-240.

[75] Bamberg,E., Apell,H.-J., Dencher,N.A., Sperling,W., Stieve,H., & Läuger,P. (1979) Photocurrents generated by bacteriorhodopsin on planar bilayer membranes. *Biophys. Struct. Mech.*, **5,** 277-292.

[76] Shimono,K., Iwamoto,M., Sumi,M., & Kamo,N. (1997) Functional expression of *pharaonis* phoborhodopsin in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, **420,** 54-56.

[77] Hohenfeld,I.P., Wegener,A.A., & Engelhard,M. (1999) Purification of Histidine tagged bacteriorhodopsin, *pharaonis* halorhodopsin and *pharaonis* sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, **442,** 198-202.

[78] John,R.S. (1982) *Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins*, Lipid-Protein Interactions edn. New York.

[79] Kumar,V.V., Malewicz,B., & Baumann,W.J. (1989) Lysophosphatidylcholine stabilizes small unilamellar phosphatidylcholine vesicles. Phosphorus-31 NMR evidence for the "wedge" effect. *Biophys. J.*, **55,** 789-792.

[80] Booth,P.J. (2000) Unravelling the folding of bacteriorhodopsin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1460,** 4-14.

[81] Deshayes,S., Heitz,A., Morris,M.C., Charnet,P., Divita,G., & Heitz,F. (2004) Insight into the Mechanism of Internalization of the Cell-Penetrating Carrier Peptide Pep-1 through Conformational Analysis. *Biochemistry*, **43,** 1449-1457.

[82] Morris,M.C., Depollier,J., Mery,J., Heitz,F., & Divita,G. (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *nature biotechnology*, **19,** 1173-1176.

[83] Murakami,N. & Konishi,T. (1985) DCCD-Sensitive, Na+-Dependent H+Influx Process Coupled to Membrane Potential Formation in Membrane Vesicles of Halobacterium halobium. *J. Biochem.*, **98,** 897-907.

[84] Lozier,R.H., Bogomolni,R.A., & Stoeckenius,W. (1975) Bacteriorhodopsin: A Light-Driven Proton Pump in *Halobacterium Halobium*. *Biophys. J.*, **15,** 955-962.

[85] Arechaga,I., Miroux,B., Karrasch,S., Huijbregs,R., de Kruijff,B., Runswick,M.J., & Walker,J.A. (2000) Characterisation of new intracellular membranes in Escherichia coli accompanying large scale over-production of the b subunit of F(1)F(o) ATP synthase. *FEBS Lett.*, **482,** 215-219.

[86] Gill,S.C. & von Hippel,P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182,** 319-326.

[87] Nielsen,H., Engelbrecht,J., Brunak,S., & von Heijne,G. (1997) Identification of prokaryotic and eucaryotic signal peptides and prediction of their cleavage site. *Protein Engineering*, **10,** 1-6.

[88] Sineshchekov,O.A., Jung,K.H., & Spudich,J.L. (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in Chlamydomonas reinhardtii. *PNAS*, **99,** 8689-8694.

[89] Middelberg,A.P. (1999) Preparative protein refolding. *Trends in Biotechnology*, **20,** 437-443.

[90] Huang,K.-S., Bayley,H., Liao,M.-J., London,E., & Khorana,H.G. (1981) Refolding of an Integral Membrane Protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. *J. Biol. Chem.*, **256,** 3802-3809.

[91] Braiman,M.S., Stern,L.J., Chao,B.H., & Khorana,H.G. (1987) Structure-Function Studies on Bacteriorhodopsin IV. Purification and Renaturation of Bacterio-Opsin Polypeptide Expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **262,** 9271-9276.

[92] Valiyaveetil,F.I., MacKinnon,R., & Muir,T.W. (2002) Semisynthesis and folding of the potassium channel KcsA. *Journal of the American Chemical Society*, **124,** 9113-9120.

[93] Surrey,T. & Jähnig,F. (1992) Refolding and oriented insertion of a membrane protein into a lipid bilayer. *PNAS*, **89,** 7457-7461.

[94] Surrey,T., Schmid,A., & Jähnig,F. (1996) Folding and Membrane Insertion of the Trimeric β-Barrel Protein OmpF. *Biochemistry*, **35,** 2288.

[95] Bogdanov,M., Umeda,M., & Dowhan,W. (1999) Phospholipid-assisted Refolding of an Integral Membrane Protein. *J. Biol. Chem.*, **274,** 12339-12345.

[96] Sanders,C.R., Czerski,L., Vinogradova,O., Badola,P., Song,D., & Smith,S.O. (1996) Escherichia Coli diacylglycerol kinase is an alpha-helical polytopic membrane protein and can spontaniously insert into preformed lipid vesicles. *Biochemistry*, **35,** 8610-8618.

[97] Dencher,N.A., Kohl,K.-D., & Heyn,M.P. (1983) Photochemical Cycle and Light-Dark Adaption of Monomeric and Aggregated Bacteriorhodopsin in Various Lipid Environments. *Biochemistry*, **22,** 1323-1334.

[98] Gonzales-Manas,J.M., Goni,F.M., Tribout M., & Paredes S. (1990) Kinetics of Purple Membrane Dark-Adaptation in the Presence of Triton X-100. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **282,** 239-243.

[99] Scherrer,P., Mathew,M.K., Sperling,W., & Stoeckenius,W. (1989) Retinal Isomer Ratio in Dark-Adapted Purple Membrane and Bacteriorhodopsin Monomers. *Biochemistry*, **28,** 829-834.

[100] Mogi,T., Stern,L.J., Marti,T., Chao,B.H., & Khorana,H.G. (1988) Aspartic acid substitutions affect proton translocation by bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85,** 4148-4152.

[101] Otto,H., Marti,T., Holz,M., Mogi,T., Stern,L.J., Engel,F., Khorana,H.G., & Heyn,M.P. (1990) Substitution of amino acids Asp-85, Asp-212, 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.

[102] Subramaniam,S., Greenhalgh,D.A., & Khorana,H.G. (1992) Aspartic acid 85 in bacteriorhodopsin functions both as proton acceptor and negative counterion to the Schiff base. *J. Biol. Chem.*, **267,** 25730-25733.

[103] Metz,G., Siebert,F., & Engelhard,M. (1992) Asp-85 is the only internal aspartic acid that gets protonated in the M intermediate and the purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin. *FEBS Letters*, **303,** 237-241.

[104] Kimura,Y., Ikegami,A., & Stoeckenius,W. (1984) Salt and pH-dependent changes of the purple emebrane absorption spectrum. *Photochemistry and Photobiology*, **40,** 641-646.

[105] Scharf,B.E. & Engelhard,M. (1994) Blue Halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*: Wavelength Regulation by Anions. *Biochemistry*, **33,** 6387-6393.

[106] Chizhov,I., Schmies,G., Seidel,R.P., Sydor,J.R., Lüttenberg,B., & Engelhard,M. (1998) The Photophobic Receptor from *Natronobacterium pharaonis*: Temperature and pH Dependencies of the Photocycle of Sensory Rhodopsin II. *Biophys. J.*, **75,** 999-1009.

[107] Dér,A., Toth-Boconadi,R., & Keszthelyi,L. (1989) Bacteriorhodopsin as a possible chloride pump. *FEBS Lett.*, **259,** 24-26.

[108] Oesterhelt,D. & Hess,B. (1973) Reversible Photolysis of the Purple Complex in the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem.*, **37,** 316-326.

[109] Braiman,M.S., Mogi,T., Marti,T., Stern,L.J., Khorana,H.G., & 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.

[110] 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.

[111] Mowery,P., Lozier,R.H., Chae,Q., Tseng,Y.W., Taylor,M., & Stoeckenius,W. (1979) Effect of acid pH on the absorption spectra and photoreactions of bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, **18,** 4100-4107.

[112] Nagle,J.F. (1991) Solving complex photocycle kinetics. Theory and direct method. *Biophys. J.*, **59,** 476-487.

[113] Friedrich,T., Geibel,S., Kalmbach,R., Chizhov,I., Ataka,K., Heberle,J., Engelhard,M., & Bamberg,E. (2002) Proteorhodopsin is a Light-driven Proton Pump with Variable Vectoriality. *J. Mol. Biol.*, **321,** 821-838.

[114] Grzeski,S. & Dencher,N.A. (1986) Time-course and stoichiometry of light-induced proton release and uptake during the photocycle of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*, **208,** 337-342.

[115] Fahr,A., Läuger,P., & Bamberg,E. (1981) Photocurrent kinetics of purple-membrane sheets bound to planar bilayer membranes. *J. Membrane. Biol.*, **60,** 51-62.

[116] 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 Letters*, **96,** 59-63.

[117] Engelman,D.M., Adair,B.D., Hunt J.F., Kahn,T.W., & Popot,J.-L. (1990) Bacteriorhodopsin Folding in Membranes: A Two-Stage Process. In *Current Topics in Membranes and Transport, Volume 36* pp. 71-78. Academic Press, Inc..

[118] Lu,H. & Booth,P.J. (2000) The Final Stages of Folding of the Membrane Protein Bacteriorhodopsin Occur by Kinetically Indistinguishable Parallel Folding Paths that are Mediated by pH. *J. Mol. Biol.*, **299,** 233-243.

[119] Marti,T. (1998) Refolding of Bacteriorhodopsin from Expressed Polypeptide Fragments. *J. Biol. Chem.*, **273,** 9312-9322.

[120] Chavez,R.A. & Hall,Z.W. (1992) Expression of fusion proteins of the nicotinic acetylcholine receptor from mammalian muscle identifies the membrane-spanning regions in the alpha and delta subunits. *J. Cell Biol.*, **116,** 385-393.

[121] Hunt,J.F., Rothschild,K.J., & Engelman,D.M. (1997) Spontaneous, pH-dependent membrane insertion of a transbilayer alpha-helix. *Biochemistry*, **36,** 15177-15192.

[122] Dale,H. & Krebs,M.P. (1999) Membrane Insertion Kinetics of a Protein Domain In Vivo. The Bacterioopsin N-Terminus inserts co-translationally. *J. Biol. Chem.*, **274,** 22693-22698.

[123] Brown,M.F. (1994) Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer. *Chem. Phys. Lipids*, **73,** 159-180.

[124] Lundbaek,J.A. & Andersen,O.S. (1994) Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *J. Gen. Physiol.*, **104,** 645-673.

[125] Kern,R., Joseleau-Petit,D., Chattopadhyay,M.K., & Richarme,G. (2001) Chaperone-like Properties of Lysophospholipids*1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **289,** 1268-1274.

[126] Debnath,D., Bhattacharya,S., & Chakrabarti,A. (2003) Phospholipid assisted folding of a denatured heme protein: effect of phosphatidylethanolamine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **301,** 979-984.

[127] Lewis,J.R. & Calfiso,D.S. (1999) Correlation between the free energy of a channel-forming voltage-gated peptide and the spontaneous curvature of bilayer lipids. *Biochemistry*, **38,** 5932-5938.

[128] Curran,A.R., Templer,R.H., & Booth,P.J. (1999) Modulation of folding and assembly of the membrane protein bacteriorhodopsin by intermolecular forces within the lipid bilayer. *Biochemistry*, **38,** 9328-9336.

[129] Wiedmann,T.S., Pates,R.D., Beach,J.M., Salmon,A., & Brown,M.F. (1988) Lipid-protein interactions mediate the photochemical function of rhodopsin. *Biochemistry*, **27,** 6469-6474.

[130] Watts,A., Sternberg,B., Ulrich,A.S., Whiteway,C.A., Seifert,G., Sami,M., Fisher,P., Heyn,M.P., & Wallat,I. (1995) Bacteriorhodopsin: the effect of bilayer thickness on 2D-array formation, and the structural re-alignment of retinal through the photocycle. *Biophysical Chemistry*, **56,** 41-46.

[131] Lee,A.G. (2003) Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1612,** 1-40.

[132] Nagle,J.F. & Tristram-Nagle,S. (2000) Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, **1469,** 159-195.

[133] Sankaram,M.B. & Thompson,T.E. (1990) Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state 2H nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry*, **29,** 10676-10684.

[134] Kim,D.-M., Kigawa,T., Choi,C.-Y., & Yokohama,S. (1996) A highly efficient cell-free protein synthesis system from Escherichia coli. *Eur J Biochem*, **239,** 886.

[135] Shimizu,Y., Inoue,A., Tomari,Y., Suzuki,T., Yokogawa,T., Nishikawa,K., & Ueda,T. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components. *nature biotechnology*, **19,** 751-755.

[136] Oesterhelt,D. & Stoeckenius,W. (1974) *Methods in Enzymology*, **31,** 667.

[137] Sonar,S., Patel,N., Fischer,W., & Rothschild,K.J. (1993) Cell-Free Synthesis, Functional Refolding, and Spectroscopic Characterization of Bacteriorhodopsin, an Integral Membrane Protein. *Biochemistry*, **32,** 13777-13781.

[138] Quintanilha,A.T. (1980) Control of photocycle in bacteriorhodopsin by electrochemical gradients. *FEBS Lett.*, **117,** 8-12.

[139] Groma,G.I., Helgerson,S.L., Wolber,P.K., Beece,D., Dancshazy,Z., Keszthelyi,L., & Stoeckenius,W. (1984) Coupling between the bacteriorhodopsin photocycle and the protomotive force in Halobacterium Halobium Cell Envelope Vesicles. *Biophys. J.*, **45,** 985-992.

[140] Bamberg,E., Dencher,N.A., Fahr,A., & Heyn,M.P. (1981) Transmembraneous incorporation of photoelectrically active bacteriorhodopsin in planar lipid bilayers. *PNAS*, **78,** 7502-7506.

[141] Wölfer,U., Dencher,N.A., Büldt,G., & Wrede,P. (1988) Bacteriorhodopsin precursor is processed in two steps. *Eur. J. Biochem.*, **174,** 51-57.

[142] Balashov,S.P., Govindjee,R., Kono,M., Imasheva,E.S., Lukashev,E.P., Ebrey,T.G., Crouch,R.K., Menick,D.R., & Feng,Y. (1993) *Biochemistry*, **32,** 10331-10343.

[143] 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.

[144] Lakatos,M., Lanyi,J.K., Szakacs,J., & Varo,G. (2003) The photochemical reaction cycle of proteorhodopsin at low pH. *Biophys. J.*, **84,** 3252-3256.

[145] Chang,C.H., Jonas,R., Govindjee,R., & Ebrey,T.G. (1988) Regeneration of blue and purple membranes from deionized bleached membrane of halobacterium halobium. *Photochemistry and Photobiology*, **47,** 261-265.

[146] Balashov,S.P., Govindjee,R., Kono,M., Imasheva,E.S., Lukashev,E.P., Ebrey,T.G., Crouch,R.K., Menick,D.R., & Feng,Y. (1993) *Biochemistry*, **32,** 10331-10343.

[147] Subramaniam,S., Marti,T., & Khorana,H.G. (1990) Protonation state of Asp (Glu)-85 regulates the purple-to-blue transition in bacteriorhodopsin mutants Arg-82----Ala and Asp-85----Glu: the blue form is inactive in proton translocation. *PNAS*, **87,** 1013-1017.

[148] Thorgeirsson,T.E., Milder,S.J., Miercke,L.J.W., & Betlach,M.C. (1991) Effects of Asp-96----Asn, Asp-85----Asn, and Arg-82----Gln single-site substitutions on the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, **30,** 9133-9142.

[149] Brown,L.S., Bonet,L., Needleman,R., & Lanyi,J.K. (1993) Estimated acid dissociation constants of the Schiff base, Asp-85, and Arg-82 during the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.*, **65,** 124-130.

[150] de Groot,H.J.M., Smith,S.O., Courtin,J., van den Berg,E., & Winkel,C. (1990) Solidstate 13C and 15N NMR study of the low pH forms of bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, **29,** 6873-6883.

[151] Needleman,R., Chang,M., Ni,B., Varo,G., Fornes,J., White,S.H., & Lanyi,J.K. (1991) Properties of Asp212----Asn bacteriorhodopsin suggest that Asp212 and Asp85 both participate in a counterion and proton acceptor complex near the Schiff base. *J. Biol. Chem.*, **266,** 11478-11484.

[152] Luecke,H., Schobert,B., Lanyi,J.K., Spudich,E.N., & Spudich,J.L. (2001) Crystal Structure of Sensory Rhodopsin II at 2.4 A: Insights into Color Tuning and Transducer Interaction. *Science*, **293,** 1499-1503.

[153] Fischer,U. & Oesterhelt,D. (1979) Chromophore Equilibria in Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, **28,** 211-230.

[154] Scharf,B., Hess,B., & Engelhard,M. (1992) Chromophore of sensory rhodopsin II from Halobacterium halobium. *Biochemistry*, **31,** 12486-12492.

[155] Lanyi,J.K. & Weber,H.J. (1980) Spectrophotometric identification of the pigment associated with light- driven primary sodium translocation in Halobacterium halobium. *J. Biol. Chem.*, **255,** 243-250.

[156] Spudich,J.L. & Bogomolni,R.A. (1984) Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature*, **312,** 509-513.

[157] Lanyi,J.K. & Varo,G. (1995) The Photocycles of Bacteriorhodopsin. *Isreal Journal of Chemistry*, **35,** 365-385.

[158] 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.

[159] Weidlich,O. & Siebert,F. (1993) Time-Resolved Step-Scan Ft-Ir Investigations of the Transition from Kl to l in the Bacteriorhodopsin Photocycle - Identification of Chromophore Twists by Assigning Hydrogen-Out-Of-Plane (Hoop) Bending Vibrations. *Applied Spectroscopy*, **47,** 1394-1400.

[160] Braiman,M.S. & Mathies,R.A. (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.

[161] Royant,A., Edman,K., Ursby,T., Pebay-Peyroula,E., Landau,E.M., & Neutze,R. (2000) Helix deformation is coupled to vectorial proton transport in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Nature*, **406,** 645-648.

[162] Druckmann,S., Ottolenghi,M., Pande,A., Pande,J., & Callender,R.H. (1982) Acid-Base Equilibrium of the Schiff Base in Bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, **21,** 4953-4959.

[163] Sheves,M., Albeck,A., Friedman,N., & Ottolenghi,M. (1986) Controlling the pKa of the bacteriorhodopsin shiff base by using artificial retinal analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A*, **83,** 3262-3266.

[164] Ludmann,K., Gergely,C., & Varo,G. (1998) Kinetic and Thermodynamic Study of the Bacteriorhodopsin Photocycle over a Wide pH Range. *Biophys. J.*, **75,** 3110-3119.

[165] Balashov,S.P., Govindjee,R., Kono,M., Imasheva,E.S., Lukashev,E.P., Ebrey,T.G., Crouch,R.K., Menick,D.R., & Feng,Y. (1993) Effect of the arginine-82 to alanine mutation in bacteriorhodopsin on dark adaptation, proton release, and the photochemical cycle. *Biochemistry*, **32,** 10331-10343.

[166] Smith,S.O., Pardoen,J.A., Mulder,P.P.J., Curry,B., Lugtenburg,J., & Mathies,R.A. (1983) Chromophore Structure in Bacteriorhodopsin's O_{640} Photointermediate. *Biochemistry*, **22,** 6141-6148.

[167] Zscherp,C. & Heberle,J. (1997) Infrared Difference Spectra of the Intermediates L, M, N and O of the Bacteriorhodopsin Photoreaction Obtained by Time-resolved Attenuated Total Reflection Spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, **101,** 10542-10547.

[168] Delaney,J.K., Schweiger,U., & Subramaniam,S. (1995) Molecular mechanism of protein-retinal coupling in bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92,** 11120-11124.

[169] Kandori,H., Yamazaki,Y., Hatanaka,M., Needleman,R., Brown,L.S., Richter,H.-T., Lanyi,J.K., & Maeda,A. (1997) Time-Resolved Fourier Transform Infrared Study of Structural Changes in the Last Steps of the Photocycles of Glu-204 and Leu-93 Mutants of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, **36,** 5134-5141.

[170] Varo,G., Brown,L.S., Lakatos,M., & Lanyi,J.K. (2003) Characterization of the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin. *Biophys. J.*, **84,** 1202-1207.

[171] Chizhov,I., Engelhard,M., Chernavskii,D.S., Zubov,B.V., & Hess,B. (1992) Temperature and pH sensitivity of the O640 intermediate of the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.*, **61,** 1001-1006.

[172] Haupts,U., Tittor,J., Bamberg,E., & Oesterhelt,D. (1997) General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins - the isomerization/switch/transfer (IST) model. *Biochemistry*, **36,** 2-7.

[173] Brown,L.S., Dioumaev,A.K., Needleman,R., & Lanyi,J.K. (1998) Connectivity of the Retinal Schiff Base to Asp85 and Asp96 during the Bacteriorhodopsin Photocycle: The Local-Access Model. *Biophys. J.*, **75,** 1455-1465.

[174] Dér,A., Szaraz,S., Toth-Boconadi,R., Tokaji,Z., & Keszthelyi,L. (1991) Alternative Translocation of Protons and Halide Ions by Bacteriorhodopsin. *PNAS*, **88,** 4751-4755.

[175] Tittor,J., Oesterhelt,D., & Bamberg,E. (1995) Bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T and D85,96N as proton pumps. *Biophysical Chemistry*, **56,** 153-157.

[176] Tittor,J., Haupts,U., Haupts,C., Oesterhelt,D., Becker,A., & Bamberg,E. (1997) Chloride and Proton Transport in Bacteriorhodopsin Mutant D85T: Different Modes of Ion Translocation in a Retinal Protein. *J. Mol. Biol.*, **271,** 405-416.

[177] Ganea,C., Tittor,J., Bamberg,E., & Oesterhelt,D. (1998) Chloride- and pH-dependent proton transport by BR mutant D85N. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1368,** 84-96.

[178] Bamberg,E., Tittor,J., & Oesterhelt,D. (1993) Light-driven proton or chlorid pumping by halorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A*, **90,** 639-643.

[179] Zscherp,C., Schlesinger,R., Tittor,J., Oesterhelt,D., & Heberle,J. (1999) *In situ* determination of transient pK_a changes of internal amino acids of bacteriorhodopsin by using time-resolved attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96,** 5498-5503.

[180] Brown,L.S., Sasaki,J., Kandori,H., Maeda,A., Needleman,R., & Lanyi,J.K. (1995) Glutamic Acid 204 is the Terminal Proton Release Group at the Extracellular Surface of Bacteriorhodopsin. *J. Biol. Chem.*, **270,** 27122-27126.

[181] Richter,H.-T., Brown,L.S., Needleman,R., & Lanyi,J.K. (1996) A linkage of the pK_a's of Asp-85 and Glu-204 forms part of the reprotonation switch of bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, **35,** 4054-4062.

[182] 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 bacterorhodopsin: participation of Glu-194 in the release of protons to the extracellular surface. *Biochemistry*, **37,** 2496-2506.

[183] 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.

[184] Schäfer,G., Engelhard,M., & Müller,V. (1999) Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63,** 570-620.

[185] Chizhov,I. & Engelhard,M. (2001) Temperature and Halide Dependence of the Photocycle of Halorhodopsin from Natronobacterium pharaonis. *Biophys. J.*, **81,** 1600-1612.

7 Anhang

Nukleotidsequenzen der verwendeten Gene

pET27b(+) PR-HSV-His via NdeI/XhoI

```
1    catatgaaat tattactgat attaggtagt gttattgcac ttcctacatt
51   tgctgcaggt ggtggtgacc ttgatgctag tgattacact ggtgtttctt
101  tttggttagt tactgctgct ttattagcat ctactgtatt tttctttgtt
151  gaaagagata gagtttctgc aaaatggaaa acatcattaa ctgtatctgg
201  tcttgttact ggtattgctt tctggcatta catgtacatg agaggggtat
251  ggattgaaac tggtgattcg ccaactgtat ttagatacat tgattggtta
301  ctaacagttc ctctattaat atgtgaattc tacttaattc ttgccgctgc
351  aactaatgtt gctggatcat tatttaagaa attactagtt ggttctcttg
401  ttatgcttgt gtttggttac atgggtgaag caggaatcat ggctgcatgg
451  cctgcattca ttattgggtg tttagcttgg gtatacatga tttatgaatt
501  atgggctgga gaaggaaaat ctgcatgtaa tactgcaagt cctgctgtgc
551  aatcagctta caacacaatg atgtatatta tcatctttgg ttgggcgatt
601  tatcctgtag gttatttcac aggttacctg atgggtgacg gtggatcagc
651  tcttaactta aaccttatct ataaccttgc tgactttgtt aacaagattc
701  tatttggttt aattatatgg aatgttgctg ttaaagaatc ttctaatgct
751  ctcgagatca aacgggctag ccagccagaa ctcgccccgg aagaccccga
801  ggatgtcgag caccaccacc accaccactg a
```

pET27b(+) PR-StrepII via NdeI/NheI

```
1    catatgaaat tattactgat attaggtagt gttattgcac ttcctacatt
51   tgctgcaggt ggtggtgacc ttgatgctag tgattacact ggtgtttctt
101  tttggttagt tactgctgct ttattagcat ctactgtatt tttctttgtt
151  gaaagagata gagtttctgc aaaatggaaa acatcattaa ctgtatctgg
201  tcttgttact ggtattgctt tctggcatta catgtacatg agaggggtat
251  ggattgaaac tggtgattcg ccaactgtat ttagatacat tgattggtta
301  ctaacagttc ctctattaat atgtgaattc tacttaattc ttgccgctgc
351  aactaatgtt gctggatcat tatttaagaa attactagtt ggttctcttg
401  ttatgcttgt gtttggttac atgggtgaag caggaatcat ggctgcatgg
451  cctgcattca ttattgggtg tttagcttgg gtatacatga tttatgaatt
501  atgggctgga gaaggaaaat ctgcatgtaa tactgcaagt cctgctgtgc
551  aatcagctta caacacaatg atgtatatta tcatctttgg ttgggcgatt
601  tatcctgtag gttatttcac aggttacctg atgggtgacg gtggatcagc
651  tcttaactta aaccttatct ataaccttgc tgactttgtt aacaagattc
701  tatttggttt aattatatgg aatgttgctg ttaaagaatc ttctaatgct
751  ctcgagatca aacgggctag ccagccagaa ctcgccccgg aagaccccga
801  ggatgtcgag tggagccacc cgcagttcga aaaatgaatt cg
```

pET27bmod ChopI-His via NcoI/HindIII

```
1    ccatggcccg tcgtcctggt tgttagctct tgcattggca gtcgctcttg
51   cagccggtag tgccggcgcc agtaccggta gtgatgctac cgtacctgtg
101  gctacacaag acggccctga ttacgtcttt caccgtgccc atgaacgtat
151  gttatttcag acatcctaca ccttagaaaa taatggctct gtaatttgta
201  tcccaaacaa tggccaatgt ttctgccttg cctggcttaa atcaaacggt
251  acgaacgcag aaaaattagc cgccaacatt ttacaatgga tcactttcgc
301  cctttcagca ttgtgcttga tgttttacgg ctaccagacc tggaaatcta
351  cttgtggttg ggaggaaatc tatgtagcca cgattgagat gattaaattc
401  atcattgaat attttcatga gtttgatgaa cctgcagtca tttactcttc
451  caacggcaac aagacggttt ggcttcgtta cgccgaatgg ttacttactt
501  gcccagtgat tttaatccac ttgtccaatt taaccggctt ggcaaacgac
551  tataataaac gtactatggg ccttttagtt tcagatattg gtactatcgt
601  ctggggtaca acagctgctt tgtccaaggg ttatgtgcgt gtgatcttct
651  ttttaatggg cttgtgttat ggtatttata ctttttttcaa cgccgcaaag
701  gtttacattg aagcatatca cacggttccc aagggtattt gccgtgattt
751  ggtgcgttat ttagcctggt tgtatttttg ctcttgggct atgttccctg
801  ttctttttttt gcttggccca gagggcttcg gtcacattaa tcagtttaat
851  tctgccattg cacatgcaat cttagacttg gcatcaaaaa atgcatggtc
901  aatgatgggt catttttttac gtgttaaaat ccatgaacat attcttttgt
951  ataagcttgc ggccgcactc gagatcaaac gggctagcca gccagaactc
1001 gccccggaag accccgagga tgtcgagcac caccaccacc accactga
```

pET27b(+) PRLeader-ChopI-His via NdeI/PstI/XhoI

```
1    catatgaaat tattactgat attaggtagt gttattgcac ttcctacatt
51   tgctgcagtt tgtatcccaa acaatggcca atgtttctgc cttgcctggc
101  ttaaatcaaa cggtacgaac gcagaaaaat tagccgccaa cattttacaa
151  tggatcactt tcgcccttc agcattgtgc ttgatgtttt acggctacca
201  gacctggaaa tctacttgtg gttgggagga aatctatgta gccacgattg
251  agatgattaa attcatcatt gaatattttc atgagtttga tgaacccgca
301  gtcatttact cttccaacgg caacaagacg gtttggcttc gttacgccga
351  atggttactt acttgcccag tgattttaat ccacttgtcc aatttaaccg
401  gcttggcaaa cgactataat aaacgtacta tgggcctttt agtttcagat
451  attggtacta tcgtctgggg tacaacagct gctttgtcca agggttatgt
501  gcgtgtgatc ttctttttaa tgggcttgtg ttatggtatt tatacttttt
551  tcaacgccgc aaaggtttac attgaagcat atcacacggt tcccaagggt
601  atttgccgtg atttggtgcg ttatttagcc tggttgtatt tttgctcttg
651  ggctatgttc cctgttcttt ttttgcttgg cccagagggc ttcggtcaca
701  ttaatcagtt taattctgcc attgcacatg caatcttaga cttggcatca
751  aaaaatgcat ggtcaatgat gggtcatttt ttacgtgtta aaatccatga
801  acatattctt ttgtataagc ttgcggccgc actcgagatc aaacgggcta
851  gccagccaga actcgccccg gaagaccccg aggatgtcga gcaccaccac
901  caccaccact ga
```

pET27bmod NopI-His via NdeI/EcoRI

```
1    catatgatcc atccagagca agtcgccgac atgcttcggc ccaccacatc
51   caccacatcc agccatgtgc cgggaccagt cccgaccgtg gtccctaccc
101  caacagagta tcaaaccctt ggcgaaacag gccaccgcac tctatgggtg
151  accttcgccc tcatggtgct ctcgtcgggc atctttgccc tcctgtcgtg
201  gaacgtgccg acctcaaagc gtctgttcca cgtcatcaca acgctcatca
251  ccgtcgttgc ctcgctctcg tacttcgcca tggccacggg ccacgccacc
301  accttcaact gtgacaccgc ttgggaccac cataagcacg tgcccgacac
351  ctcacaccag gtgtgtcgcc aggtgttctg gggccgctac gtcgactggg
401  ccttgaccac gccgctgttg ctgctggagc tgtgcctgct ggccggcgtt
451  gatggcgctc acacgctgat ggcgattgtg gcggacgtga ttatggtgct
501  gtgcggcctg ttcgcggcgc tgggagaggg aggaaatacg gcgcagaagt
551  ggggatggta caccattgga tgtttctcgt acctcttcgt catctggcat
601  gtggcgcttc atggcagcag gactgttaca gccaagggac gtggtgtctc
651  gaggctattt accggtttgg ctgtgtttgc gctgttgctg tggactgcgt
701  atcccattat ttggggaatc gccggtggtg ctcgcagaac gaatgtcgat
751  accgagatct tgatttacac cgttctcgac ttgctcgcca agcccgtctt
801  tggtttctgg ttgttgttga gccatcgggc tatgcccgag accaatattg
851  acctccctgg ctactggtct catggccttg ctactgaggg tagaatccgc
901  atcggcgagg aggatcccca caaccagcac caccaccacc accactga
```

pET27bmod PR-Leader-NopI-His via NdeI/PstI/NheI

```
1    catatgaaat tattactgat attaggtagt gttattgcac ttcctacatt
51   tgctgcaggc caccgcactc tatgggtgac cttcgccctc atggtgctct
101  cgtcgggcat ctttgccctc ctgtcgtgga acgtgccgac ctcaaagcgt
151  ctgttccacg tcatcacaac gctcatcacc gtcgttgcct cgctctcgta
201  cttcgccatg gccacgggcc acgccaccac cttcaactgt gacaccgctt
251  gggaccacca taagcacgtg cccgacacct cacaccaggt gtgtcgccag
301  gtgttctggg gccgctacgt cgactgggcc ttgaccacgc cgctgttgct
351  gctggagctg tgcctgctgg ccggcgttga tggcgctcac acgctgatgg
401  cgattgtggc ggacgtgatt atggtgctgt gcggcctgtt cgcggcgctg
451  ggagagggag gaaatacggc gcagaagtgg ggatggtaca ccattggatg
501  tttctcgtac ctcttcgtca tctggcatgt ggcgcttcat ggcagcagga
551  ctgttacagc caagggacgt ggtgtctcga ggctatttac cggtttggct
601  gtgtttgcgc tgttgctgtg gactgcgtat cccattattt ggggaatcgc
651  cggtggtgct cgcagaacga atgtcgatac cgagatcttg atttacaccg
701  ttctcgactt gctcgccaag cccgtctttg gtttctggtt gttgttgagc
751  catcgggcta tgcccgagac caatattgac ctccctggct actggtctca
801  tggccttgct actgagggta gaatccgcat cggcgaggag gatccccaca
851  accagcacca ccaccaccac cactga
```

pET27b(+) bom-His via NcoI/HindIII

```
1    catggcccag atcaccggac gtccggagtg gatctggcta gcgctcggta
51   cggcgctaat gggactcggg acgctctatt tcctcgtgaa agggatgggc
101  gtctcggacc cagatgcaaa gaaattctac gccatcacga cgctcgtccc
151  agccatcgcg ttcacgatgt acctctcgat gctgctgggg tatggcctca
201  caatggtacc gttcggtggg gagcagaacc ccatctactg ggcgcggtac
251  gctgactggc tgttcaccac gccgctgttg ttgttagacc tcgcgttgct
301  cgttgacgcg gatcagggaa cgatccttgc gctcgtcggt gccgacggca
351  tcatgatcgg gaccggcctg gtcggcgcac tgacgaaggt ctactcgtac
401  cgcttcgtgt ggtgggcgat cagcaccgca gcgatgctgt acatcctgta
451  cgtgctgttc ttcgggttca cctcgaaggc cgaaagcatg cgccccgagg
501  tcgcatccac gttcaaagta ctgcgtaacg ttaccgttgt gttgtggtcc
551  gcgtatcccg tcgtgtggct gatcggcagc gaaggtgcgg gaatcgtgcc
601  gctgaacatc gagacgctgc tgttcatggt gcttgacgtg agcgcgaagg
651  tcggcttcgg gctcatcctc ctgcgcagtc gtgcgatctt cggcgaagcc
701  gaagcgccgg agccgtccgc cggcgacggc gcggccgcga ccagcggatc
751  ccaccaccac caccaccact aataaagctt gcggccgcac tcgagatcaa
801  acgggctagc cagccagaac tcgccccgga agaccccgag gatgtcgagc
851  accaccacca ccaccactga
```

pET27b(+) *Np*hop-His via NcoI/HindIII

```
1    catggctgag acattgccac cggtaacgga atcggctgtt gcgctacagg
51   cggaggtgac ccagagggag ctgttcgagt tcgttctcaa cgacccctc
101  ctcgccagtt cgctgtatat taatatcgca ctggcagggc tgtcgatact
151  gcttttcgtg ttcatgacgc gcggactcga cgacccacgg gcgaaactca
201  tcgccgtttc gacgattttg gtgccggtgg tctctatcgc gagctacacc
251  ggccttgcat cggggctcac catcagcgtc ctcgagatgc cagccggcca
301  cttcgccgag gggtcctcgg tgatgctcgg cggcgaagag gtagacggcg
351  tcgtgacgat gtggggccgc tatctgacgt gggcctttc gacaccgatg
401  atactgctgg cgcttgggct gcttgctggc tctaacgcca cgaagctctt
451  taccgccatc accttcgaca tcgcgatgtg tgtcaccggc ctcgcagccg
501  cgctgacgac ctcttcgcac ctgatgcggt ggttctggta cgccatcagt
551  tgtgcgtgtt tcctcgtcgt cctctacatc ctgctcgtcg agtgggcaca
601  ggacgccaag gctgccggta ctgcggatat gttcaatacg ctgaagctgc
651  tgaccgttgt catgtggctc ggctacccca tcgtgtgggc actcggcgtt
701  gagggcatcg ccgttcttcc ggtcggagtc acgtcgtggg gatacagctt
751  cctcgacatc gtcgcgaagt acatcttcgc gttcctgctg ctcaactacc
801  tcacgtcgaa cgagagcgtc gtctccggct cgatactcga cgtgccgtcc
851  gcgtcgggca ctcccgctga cgacggatcc caccaccacc accaccacta
901  ataagcttgc ggccgcactc gagatcaaac gggctagcca gccagaactc
951  gccccggaag accccgagga tgtcgagcac caccaccacc accactga
```

pET27b(+) *Nps*opII-His via NcoI/HindIII

```
1    catggtggga cttacgaccc tcttttggct cggcgcaatc ggcatgctcg
51   tcggcacgct cgcgttcgcg tgggccggcc gtgacgccgg aagcggcgag
101  cgacggtact acgtgacgct tgtcggcatc agtggtatcg cagcagtcgc
151  ctacgtcgtc atggcgctgg gcgtcggctg ggttcccgtg gccgaacgga
201  ctgtttttgc cccccggtac attgactgga ttctcacaac cccgctcatc
251  gtctacttcc tcgggctgct tgcggggctt gatagtcggg agttcggcat
301  cgtcatcacg ctcaacaccg tggtcatgct cgccggcttc gccggggcga
351  tggtgcccgg tatcgagcgc tacgcgctgt tcggcatggg ggcggtcgca
401  ttcctcggac tggtctacta cctcgtcggg ccgatgaccg aaagtgccag
451  ccagcggtcc tccggaatca agtcgctgta cgtccgcctc cgaaacctga
501  cggtcatcct ctgggcgatt tatccgttca tctggctgct tggaccgccg
551  ggcgtggcgc tgctgacacc gactgtcgac gtggcgctta tcgtctacct
601  tgacctcgtc acgaaggtcg gattcggctt catcgcactc gatgctgcgg
651  cgacacttcg ggccgaacac ggcgaatcgc tcgctggcgt cgatactgac
701  gcgcctgcgg tcgccgacga gaattcgcac caccaccacc accaccacta
751  ataaagcttg cggccgcact cgagatcaaa cgggctagcc agccagaact
801  cgccccggaa gaccccgagg atgtcgagca ccaccaccac caccactga
```

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Engelhard und Herrn Prof. Dr. Ernst Bamberg für die hochinterressante Aufgabenstellung und die großzügige Betreuung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Roland Winter danke ich für die Betreuung seitens der Universität Dortmund sowie Herrn Prof. Dr. Roger S. Goody für die Aufnahme in seine Abteilung am MPI.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Igor Chizhov für die intensive Unterstützung bei den spektroskopischen Messungen und vielen hilfreichen Diskussionen, die den Erfolg dieser Arbeit ermöglichten.

Herrn Dr. Ralf P. Seidel danke ich für die Einführung in die Molekularbiologie und die Anwendung der zellfreien Synthese.

Bei Herrn Dr. Thomas Friedrich möchte ich mich für die Bereitstellung des Proteorhodopsin-Gens und die effektive Zusammenarbeit bei den Ladungstransportmessungen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Axel Scheidig sei gedankt für die Hilfe bei der Molekulardynamiksimulation der Proteorhodopsin-Struktur.

Frau Miria Schumacher und Frau Annika Göppner danke ich für die grosse Unterstützung bei der Klonierung von diversen Genkonstrukten und der Präparation von Proteinen und Lipiden, sowie Frau Anke Reulen, Marion Hülseweh und Karin Vogel-Bachmayr sei gedankt für unzählige hilfreiche praktische Tipps. Für die Hilfe bei den BLM-Experimenten danke ich Frau Anja Becker, Eva Grabsch und Verena Pintschovius. Bei Frau Heidi Bergemann möchte ich mich herzlich für die organisatorische Hilfe bedanke, so dass ich in Frankfurt immer ein Dach über dem Kopf hatte.

Ein generelles Dankeschön geht an die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Engelhard und der Abteilung von Herrn Prof. Dr. E. Bamberg sowie allen Laborkolleginnen und-kollegen für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Mein liebster Dank gilt der unglaublichen Diana Olschewski, die mir die Kraft für Alles gab.

Lebenslauf

Name:	Rolf Kalmbach
Geboren:	10.09.1974 in Villingen im Schwarzwald (Baden-Württemberg)
Eltern:	Roswinda und Walter Kalmbach
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

08/81-06/85	Schroten-Grundschule, Tuttlingen
08/85-06/86	Friedrich-Schiller-Hauptschule, Tuttlingen
08/86-06/88	Hermann-Hesse-Realschule, Tuttlingen
08/88-06/92	Otto-Hahn-Gymnasium, Tuttlingen
08/92-06/95	Wirtschaftsgymnasium, Tuttlingen
06/95	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
07/95-11/96	Ableistung des Bundeswehrdienstes
10/96	Aufnahme des Hochschulstudiums der Biochemie, Ruhr-Universität-Bochum
04/00-09/00	Anfertigung der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie mit dem Thema „Protein Engineering am Beispiel einer Fluoreszenzmarkierung des *Np*HtrII Signaltransducers“
10/00	Beginn der Dissertation am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in der Abteilung von Prof. Dr. Roger S. Goody unter der Anleitung von Prof. Dr. Martin Engelhard
seit 03/04	Wissenschaftlicher Angestellter der DIREVO Biotech AG, Köln