

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig–Maximilians–Universität München

**Bioenergetik des Ionentransports  
in Halobacterium salinarum**

Christoph Martin Oppawsky  
aus  
München  
2003

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Dieter Oesterhelt

2. Berichterstatter : Prof. Dr. Patrik Cramer

eingereicht am : 08. 10 2003

mündliche Prüfung am : 21. 04 2004

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13(3) der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Dieter Oesterhelt betreut.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Martinsried, dem 14. Juli 2004

.....

*(Unterschrift des Kandidaten)*

## Zusammenfassung

Diese Arbeit befaßt sich mit der Bioenergetik von archealen Membranproteinen. Der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt auf dem halobakteriellen Photosyntheseprotein Bakteriorhodopsin (BR). Durch elektrophysiologische Ableitung in *Xenopus laevis* wird die elektromotorische Triebkraft (EMK) von BR, der Dreifachmutante TRI (BR-D96G/F171C/F219L) und den Einzelmutanten bestimmt. Bei den Stromableitungen zeigt sich, daß die Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit durch BR und die Mutanten in zwei unterschiedliche Klassen eingeteilt werden kann, da der Photostrom nicht linear von der Membranspannung abhängt. Die Transportaktivität von Wildtyp und BR-F171C ist über das gesamte Messfenster (-150 bis +50 mV) höher als die der übrigen Mutanten und wird mit zunehmender Hyperpolarisation der Zelle abgedämpft, so daß insgesamt ein konkaver Kurvenverlauf zu beobachten ist (Klasse I). Im Gegensatz dazu nähern sich die Leitfähigkeiten der BR-Mutanten TRI, D96G und F219L der Spannungsordinate in einem deutlich flacherem Winkel und werden mit zunehmender Hyperpolarisation der Zelle verstärkt, wodurch ein konvexer Kurvenverlauf zustande kommt (Klasse II). Es wird ein kinetisches Modell entwickelt, mit dem beide Klassen der Leitfähigkeit durch Änderung eines einzigen spannungsabhängigen Parameters beschrieben werden können. Das Modell beinhaltet zwei Zustände des Proteins, die durch einen transportassoziierten, spannungsabhängigen und einen spannungsunabhängigen Schritt (Rückkehr zum Ausgangszustand) ineinander überführt werden.

Mit Hilfe von zeitaufgelöster Spektroskopie werden die Proteine auf ihre kinetischen Eigenschaften hin untersucht. Unter Einbeziehung des Modells kann eine Korrelation mit den Ergebnissen der elektrophysiologischen Experimente hergestellt werden. Indem man das Verhältnis der geschwindigkeitsbestimmenden Zeitkonstanten aus der Spektroskopie mit dem Verhältnis der spannungsunabhängigen Zeitkonstanten zur Beschreibung der Leitfähigkeiten gleichsetzt wird die unterschiedliche Form der Strom-Spannungskurve allein durch Variation der spannungsabhängigen Zeitkonstante beschrieben. Ein weiterer Vergleich des Verhältnisses der resultierenden spannungsabhängigen Konstanten mit spektroskopischen Daten ergibt, daß der Intermediatübergang  $L \rightarrow M$  als der spannungsabhängige Schritt im Transportzyklus von Bakteriorhodopsin auftritt.

Weiterhin ist bekannt, das *Halobacterium salinarum*-Zellen, die TRI anstatt BR synthetisieren, die Fähigkeit zum phototrophen Wachstum verlieren, jedoch zeigen

Transportexperimente mit TRI, daß die Mutante etwa 60 % der Protonentransportaktivität vom Wildtyp besitzt. Diese Aussage wird in der vorliegenden Arbeit weiter untermauert durch die Bestimmung der lichtgetriebenen ATP-Syntheserate durch Wildtyp und TRI, in der die Mutante etwa 80 % der Wildtypaktivität erreicht. Eine mögliche Ursache für den Verlust der Fähigkeit zum phototrophen Wachstum könnte im Auftreten einer konformellen Änderung während des Transportzyklus von BR liegen, die bei TRI nicht beobachtet wird. Ein Vergleich der Leitfähigkeiten von Wildtyp-BR mit der Dreifachmutante TRI und den Einzelmutanten liefert Hinweise, daß die konformelle Änderung während des Transportprozesses die Funktion hat, die Strom-Spannungskurve des Proteins in einen physiologisch sinnvollen Bereich zu verschieben, um damit ein phototrophes Wachstum zu ermöglichen.

In einem weiteren Projekt wird der erste halobakterielle Kaliumkanal, PCHA2, der mit Hilfe von Homologievergleichen in den Genomdaten gefunden wurde, heterolog in *Xenopus laevis* exprimiert und funktionell untersucht. Die Experimente zeigen, daß es sich bei PCHA2 um einen einwärtsgerichtenden Kaliumkanal handelt. Bei Kompetitionsexperimenten mit Cäsiumionen im externen Medium wird eine Verstärkung der einwärtsgerichtenden Eigenschaften beobachtet, wobei die Kaliumleitfähigkeit für den Einstrom von Kalium in die Zelle nicht betroffen ist. Dies ist vermutlich auf eine Veränderung der Elektrostatik um die Porenregion zurückzuführen, die durch eine Bindung von Cäsiumionen ausgelöst wird. Experimente zum Einfluß der externen Kaliumkonzentration auf die Leitfähigkeit von PCHA2 werden offenbar durch Sekundäreffekte überdeckt, so daß aus den Ergebnissen keine konkreten Schlußfolgerungen gezogen werden können. Insgesamt kann die erfolgreiche heterologe Expression des Kanalgens als Grundstein für weitere interessante Untersuchungen an halobakteriellen Membranproteinen angesehen werden.

Für meine Eltern, Tammy, Ronja und Elias

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen einen wertvollen Beitrag geleistet.

Vielen Dank,

- Prof. Dr. Dieter Oesterhelt für die Themenstellung, das freie Arbeitsumfeld in seiner Abteilung, die Unterstützung und das Vertrauen, das mir entgegengebracht wurde.
- Dr. Jörg Tittor für die anregenden Diskussionen und Denkanstöße, die diese Arbeit entscheidend beeinflusst haben.
- den Mitstreitern im Labor, Walter, Mirjam, Benjamin, Hüseyin, Matz, Rita, Carolina, Bettina und all den Anderen, die stets für eine angenehme Arbeitsatmosphäre innerhalb der Abteilung sorgten.
- unseren Technikern, Walter und Hans, die immer schnelle Hilfe parat hatten.
- Bettina für die Kanalproteinvektoren
- Uta, Karin und Kiki, die Damen hinter der Sequenzierung und der Primersynthese.
- Dr. Utz Fischer für die Oozyten und Einweisung in die Techniken der Mikroinjektion und reversen Transkription sowie die Möglichkeit der Injektion in seinem Labor.
- Dr. Stefano Vassanelli für die Stunden gemeinsamen Oozyten-„Klubs“.
- Ingmar Schön für die letzten Oozyten.
- Dr. Ann Kathrin Werenskiold und Judith für die Hilfe mit Sf-9-Zellen.

Und besonderer Dank gilt Tammy, die in dieser anstrengenden Phase zu mir gehalten hat, zu Hause neben Kind und Arbeit „den Haushalt schmiss“ und meinen Eltern, die durch ihre Unterstützung und Liebe all dies erst ermöglicht haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>ii</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>x</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Halobacterium salinarum</i> und Bakteriorhodopsin . . . . .	1
1.1.1 <i>Halobacterium salinarum</i> . . . . .	1
1.1.2 <i>Bakteriorhodopsin</i> . . . . .	4
1.1.3 Photozyklus . . . . .	7
1.1.4 Elektrische Eigenschaften . . . . .	10
1.1.5 Eigenschaften der untersuchten Mutanten . . . . .	11
1.1.6 Zielsetzung . . . . .	14
1.2 Kaliumkanäle . . . . .	15
1.2.1 Grundlagen der Kaliumkanäle . . . . .	15
1.2.2 Zielsetzung . . . . .	18
1.3 Elektrophysiologische Konzepte . . . . .	19
1.3.1 Die Zellmembran . . . . .	19
1.3.2 Vorzeichenkonvention zu Membranströmen . . . . .	20
1.4 Elektrische Ableitung von Zellen . . . . .	21
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>23</b>
2.1 Bakteriorhodopsin in <i>Sf9</i> -Zellen . . . . .	23
2.2 Modifikation von <i>Halobacterium salinarum</i> -Zellen . . . . .	25

2.3	Bakteriorhodopsin in <i>Xenopus laevis</i> . . . . .	29
2.3.1	Extraktion der Photoströme . . . . .	29
2.3.2	Azid als wichtiger Cofaktor . . . . .	29
2.3.3	Einfluß der Lichtintensität auf den Photostrom . . .	32
2.3.4	pH-Abhängigkeit des Photostroms durch BR . . . . .	35
2.3.5	Photochemische Rückreaktion von Intermediat O nach BR . . . . .	37
2.3.6	Bestimmung der Photoströme durch BR und BR- Mutanten . . . . .	40
2.3.7	Quantifizierung der heterologen Expression . . . . .	44
2.3.8	Korrelation von BR-Photoströmen mit Expressionsra- ten . . . . .	46
2.4	Zeitaufgelöste Spektroskopie . . . . .	50
2.5	ATP-Synthese durch TRI-enhaltende Zellen . . . . .	59
2.6	Charakterisierung von PCHA2 . . . . .	63
2.6.1	Homologiebetrachtungen zu PCHA2 . . . . .	63
2.6.2	Elektrische Ableitungen von PCHA2 . . . . .	65
2.6.3	Funktion von PCHA2 . . . . .	66
2.6.4	Einfluß der Kaliumkonzentration auf PCHA2 . . . . .	67
2.6.5	PCHA2 und Cäsiumchlorid . . . . .	67
<b>3</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>71</b>
3.1	Bakteriorhodopsin in <i>Sf9</i> -Zellen . . . . .	71
3.2	Modifikation von <i>Halobacterium salinarum</i> -Zellen . . . . .	72
3.3	Bakteriorhodopsin in <i>Xenopus laevis</i> . . . . .	73
3.4	Modell der Spannungsabhängigkeit . . . . .	74
3.4.1	Beschreibung des Modells . . . . .	74
3.4.2	Simulation unter Variation bestimmter Parameter . .	77
3.5	Anwendung des Modells . . . . .	82
3.5.1	Anpassung des Modells an die experimentellen Daten	82
3.5.2	Anmerkungen . . . . .	82
3.5.3	Schlußfolgerungen aus den Modellrechnungen . . .	86
3.6	Der archaeale Kaliumkanal PCHA2 . . . . .	88

3.7	Ausblick . . . . .	90
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>91</b>
4.1	Enzyme . . . . .	91
4.1.1	DNS-Polymerase . . . . .	91
4.1.2	Restriktionsendonukleasen . . . . .	91
4.2	Nährmedien . . . . .	92
4.2.1	Nährmedien für <i>Escherichia coli</i> . . . . .	92
4.2.2	Nährmedien für <i>Halobacterium salinarum</i> . . . . .	93
4.3	Antibiotika . . . . .	94
4.4	Organismen . . . . .	94
4.5	Oligonukleotide . . . . .	95
4.6	Verwendete Vektoren . . . . .	97
4.7	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> . . . . .	98
4.8	Elektroporation von <i>E. coli</i> . . . . .	99
4.9	Isolation von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> . . . . .	99
4.10	Konzentrationsbestimmung von DNS . . . . .	100
4.11	Phenolisierung von Plasmid-DNS . . . . .	101
4.12	Gelelektrophorese von DNS-Fragmenten . . . . .	102
4.13	Restriktionsverdau . . . . .	103
4.14	Ligation von Plasmiden . . . . .	103
4.15	Sequenzierung von DNS . . . . .	103
4.15.1	Herstellung fluoreszenzmarkierter DNS-Fragmente . . . . .	104
4.15.2	Aufreinigung für die Sequenzierung . . . . .	104
4.16	Mutagenese . . . . .	105
4.16.1	Einführung von neuen Schnittstellen . . . . .	105
4.16.2	Einführung von Punktmutationen . . . . .	105
4.17	Gelelektrophorese von Proteinen . . . . .	106
4.17.1	Herstellung der Polyacrylamid-Gele . . . . .	106
4.17.2	Gellauf und Coomassie-Färbung . . . . .	108
4.17.3	Western Blot . . . . .	109
4.18	Zeitaufgelöste Spektroskopie . . . . .	111
4.19	Heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> . . . . .	111

4.19.1	<i>in-vitro</i> -Transkription . . . . .	111
4.19.2	Puffer zum Umgang mit <i>Xenopus</i> Oozyten . . . . .	113
4.19.3	Präparation der Oozyten . . . . .	115
4.19.4	Mikroinjektion von RNS in Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	116
4.19.5	Inkubation der Oozyten/Rekonstitution . . . . .	117
4.19.6	Isolation der Membranfraktion . . . . .	117
4.19.7	Defollikulation von Oozyten der <i>Xenopus laevis</i> . . .	118
4.20	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme . . . . .	118
4.20.1	Experimenteller Aufbau . . . . .	119
4.20.2	Herstellung der Elektroden . . . . .	119
4.20.3	Durchführung der Messungen . . . . .	121
4.20.4	Auswertung der Meßdaten . . . . .	122
4.21	Photophosphorylierungsraten . . . . .	122
4.22	Modifikation von <i>Halobacterium salinarum</i> -Zellen . . . . .	124
4.22.1	Puffer und Lösungen . . . . .	124
4.22.2	Zellen . . . . .	124
4.22.3	Spheroblasten . . . . .	125
4.22.4	Bestimmung der Zelldimensionen . . . . .	125
4.23	Experimente im Sf9-Baculovirus-System . . . . .	125
4.23.1	Verwendete Medien und Zellen . . . . .	126
4.23.2	Auftauen der Zellen . . . . .	126
4.23.3	Kulturrhaltung . . . . .	127
4.23.4	Produktion eines rekombinanten Virus . . . . .	127
4.23.5	Heterologe Expression . . . . .	127
4.23.6	Elektrophysiologische Ableitung . . . . .	128
4.24	Verwendete Software . . . . .	128
<b>A</b>	<b>Residuen zur zeitaufgelösten Spektroskopie</b>	<b>130</b>
<b>B</b>	<b>Pythonskripten zur Auswertung</b>	<b>134</b>
<b>C</b>	<b>Modellrechnungen</b>	<b>136</b>
C.1	Modell: kappashared . . . . .	136
C.2	Modell: kappafree . . . . .	137

C.3 Modell: kappafixed . . . . .	138
<b>D Zusätzliche Parameter</b>	<b>140</b>
D.1 Simulationsrechnungen . . . . .	140
D.2 Optimierungsrechnungen . . . . .	141
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>145</b>
<b>Index</b>	<b>153</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Energieerzeugung und -speicherung in <i>Halobacterium salinarum</i> . . . . .	3
1.2	Die Struktur von Bakteriorhodopsin. . . . .	6
1.3	Konfigurationen des Cofaktors Retinal in Bakteriorhodopsin. . . . .	8
1.4	Der Photozyklus von Bakteriorhodopsin und das IST-Modell. . . . .	9
1.5	Photozyklus der Dreifachmutante TRI D96G/F171C/F219L. . . . .	12
1.6	Orientierungswechsel der Seitenkette R82 während des Photozyklus. . . . .	13
1.7	Übersicht der verschiedenen Klassen von Kaliumkanälen nach [COETZEE et al. 1999]. . . . .	16
1.8	Der Selektivitätsfilter von KcsA. . . . .	17
1.9	Schaltplan der TEVC-Messmethode. . . . .	22
2.1	Photoströme von Bakteriorhodopsin in Sf9-Zellen. . . . .	24
2.2	Herstellung von vergrößerten <i>Halobacterium salinarum</i> -Zellen. . . . .	26
2.3	Elongation der <i>Halobacterium salinarum</i> -Zellen und Größe der Spheroblasten. . . . .	28
2.4	Extraktion des Photostroms aus einer Stromableitung. . . . .	30
2.5	Ermittlung der optimalen Azidkonzentration für TRI. . . . .	31
2.6	Einfluß der Lichtintensität auf den Photostrom. . . . .	33
2.7	Michaelis-Menten-Kinetik . . . . .	34
2.8	Strom-Spannungskennlinien von wtBR bei pH 5.5 und 6.5 . . . . .	36
2.9	pH-Abhängigkeit von TRI. . . . .	38
2.10	Experiment zur Arrestierung des Photozyklus in Intermediat O. . . . .	39

2.11 Darstellung der Originaldaten zur Ableitung des Photostroms von wtBR und TRI. . . . .	41
2.12 Darstellung der Originaldaten zur Ableitung des Photostroms von R82Q und D96G. . . . .	42
2.13 Darstellung der Originaldaten zur Ableitung des Photostroms von F171C und F219L. . . . .	43
2.14 Anwendung von <i>ImageJ</i> zur Vermessung der „Western-Blots“. . . . .	46
2.15 Quantifizierung der BR-Expression in <i>Xenopus laevis</i> . . . . .	47
2.16 Korrelation der wtBR und TRI-Experimente. . . . .	48
2.17 Korrelation der weiteren untersuchten Mutanten: R82Q, D96G, F171C und F219L. . . . .	49
2.18 Zeitabhängige Absorptionsspektroskopie von wtBR. . . . .	50
2.19 Zeitabhängige Absorptionsspektroskopie von TRI . . . . .	54
2.20 Zeitabhängige Absorptionsspektroskopie von R82Q . . . . .	56
2.21 Zeitabhängige Absorptionsspektroskopie von D96G . . . . .	56
2.22 Zeitabhängige Absorptionsspektroskopie von F171C . . . . .	57
2.23 Zeitabhängige Absorptionsspektroskopie von F219L . . . . .	58
2.24 Einfluß von Azid auf die ATP-Syntheserate der TRI-Mutante in <i>Halobacterium salinarum</i> . . . . .	60
2.25 Ermittlung der ATP-Syntheseraten für wtBR und TRI bei pH 5.5. . . . .	62
2.26 Bioinformatische Untersuchung von <i>pcha2</i> . . . . .	63
2.27 Vorhersage der Sekundärstruktur von PCHA2. . . . .	64
2.28 Nachweis der Einwärts-Gleichrichtung von PCHA2. . . . .	66
2.29 Messungen zum Einfluß der Kaliumkonzentration auf die Leitfähigkeit von PCHA2. . . . .	68
2.30 Experiment zur Inhibition von PCHA2 in <i>Xenopus laevis</i> . . . . .	69
3.1 Modell des Transports . . . . .	75
3.2 Simulation mit variablem $k$ und $\lambda$ . . . . .	79
3.3 Simulation mit variablem $\kappa$ und $N$ . . . . .	80
3.4 Auftreten eines Maximums von $U_{eff}$ mit Variation der aktiven Moleküle $N$ . . . . .	81

3.5	Gemeinsames $\lambda$ und $\kappa$ (kappashared) . . . . .	83
3.6	Berechnung mit freiem $\kappa$ (kappafree) . . . . .	84
3.7	Berechnung mit freiem $\kappa$ (kappafixed) . . . . .	85
4.1	Einführung einer Punktmutation mit nur einem mutations- spezifischen Oligonukleotid. . . . .	107
4.2	Experimenteller Aufbau der TEVC-Messungen . . . . .	120

# Tabellenverzeichnis

2.1	Klassen der Strom-Spannungs-Kennlinien. . . . .	41
2.2	Quantifizierung der Expression in <i>Xenopus</i> . . . . .	45
2.3	Zeitkonstanten des Photozyklus von wtBR . . . . .	52
2.4	Zeitkonstanten des Photozyklus von TRI . . . . .	55
2.5	Zeitkonstanten des Photozyklus von R82Q . . . . .	56
2.6	Zeitkonstanten des Photozyklus von D96G . . . . .	57
2.7	Zeitkonstanten des Photozyklus von F171C . . . . .	58
2.8	Zeitkonstanten des Photozyklus von F219L . . . . .	58
2.9	Zusammenfassung der Ergebnisse aus der spektroskopischen Untersuchung. . . . .	59
2.10	Homologe Domänen in PCHA2. . . . .	65
4.1	DNS-Polymerasen . . . . .	91
4.2	Restriktionsenzyme . . . . .	92
4.3	Antibiotika . . . . .	94
4.4	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide . . . . .	96
4.5	Vektoren . . . . .	96
4.6	Übersicht über die in dieser Arbeit erstellten Vektoren . . . . .	97
4.7	Beispiel eines Ligationsansatzes . . . . .	103
4.8	Proteingele aus Polyacrylamid . . . . .	108
4.9	<i>in-vitro</i> -Transkription . . . . .	112
4.10	Effektive Natrium-/Kaliumkonzentrationen in den modifi- zierten Kaliumpuffern . . . . .	115
4.11	Verwendete Borsilikat-Kapillaren zur Injektion/Ableitung . . . . .	121

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 *Halobacterium salinarum* und Bakteriorhodopsin

#### 1.1.1 *Halobacterium salinarum*

*Halobacterium salinarum* zählt zur Klasse der Halophilen, einer Untergruppe der Archaea [WOESE et al. 1990]. Sie sind optimal an extrem salzreiche Lebensräume (ca. 4 M) und hohe Temperaturen angepaßt (bis zu 50 °C). An diese extremen Bedingungen angepaßt verfügt *Halobacterium salinarum* über verschiedene Möglichkeiten der Energiegewinnung: aerobe und anaerobe Phosphorylierung, Fermentation von Arginin [HARTMANN et al. 1980] sowie die Photosynthese, die auf dem Protein Bakteriorhodopsin (BR) beruht [OESTERHELT et al. 1973]. Diese lichtgetriebene Ionenpumpe transportiert Protonen aus der Zelle. Die damit verbundene protomotorische Kraft treibt nach Mitchells Theorie [MITCHELL 1961] neben verschiedenen Transportvorgängen (Aufnahme von Aminosäuren [DUSCHL und WAGNER 1986] und anderen Ionenspezies [LANYI und MACDONALD 1977]), den Flagellarmotor [ALAM und OESTERHELT 1984] und die Synthese von ATP in der Zelle an [HARTMANN et al. 1977].

*Halobacterium salinarum* vermag die erzeugte Energie in Form eines Kaliumgradienten zu speichern [WAGNER et al. 1978]. Auf Belichtung der Zellen wird eine eindeutige Korrelation zwischen dem Absorptionsspektrum von BR und einem Einstrom von Kaliumionen in die Zelle beobachtet. Um einen gezielten Ausgleich der, durch die Photosynthese aus der Zelle transportierten, Protonen mit Kaliumionen zu bewerkstelligen müsste die Zellmembran äußerst selektiv für die Aufnahme von Kalium sein und einen Kaliumausstrom erschweren. Dies kann theoretisch entweder durch eine Na-K-ATPase oder einen einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanal bewerkstelligt werden. Da experimentell Inhibitoren der ATPase keinen Effekt erzielen spricht alles für einen Ionenkanal, der eine selektive Aufnahme von Kalium ermöglicht. In Folge der Photosynthese kann so ein gewaltiger Kaliumgradient über die Membran aufgebaut werden. Die Untersuchung ergibt weiterhin, daß *Halobacterium salinarum* in Hungerperioden unter langsamem Abbau des Kaliumgradienten ( $t > 24\text{h}$ ) ATP synthetisieren kann und somit über einen effizienten Langzeit-Energiespeicher verfügt (siehe Abbildung 1.1). Nach der Sequenzierung des Genoms von *Halobacterium salinarum* werden zwei mögliche Kandidatengene für Kaliumkanäle identifiziert und untersucht, worauf in Abschnitt 1.2.1 und im Ergebnisteil genauer eingegangen wird.

*Halobacterium salinarum* verfügt neben BR über drei weitere Retinalproteine. Die beiden Sensorrhodopsine (SRI und SRII) regeln die Phototaxis der Archea [SPUDICH und BOGOMOLNI 1992, OESTERHELT und MARWAN 1993]. SRI vermag sowohl eine photophobe Reaktion auf schädliches UV- und Gelblicht geringer Intensität als auch eine photophile Reaktion auf günstige Gelblichtbedingungen auszulösen [SPUDICH und BOGOMOLNI 1984]. SRI II vermittelt eine photophobe Reaktion auf Blaulicht [TAKAHASHI et al. 1985]. Die Signalübertragung erfolgt über spezialisierte Transduktionsproteine, die Htrs, und eine Che-Protein-Signalkaskade, der die Steuerung der Geißelbewegung unterliegt [RUDOLPH et al. 1995].

Beim vierten Retinalprotein handelt es sich um Halorhodopsin (HR) [SCHOBERT und LANYI 1982], eine lichtgetriebene Anionenpumpe, deren

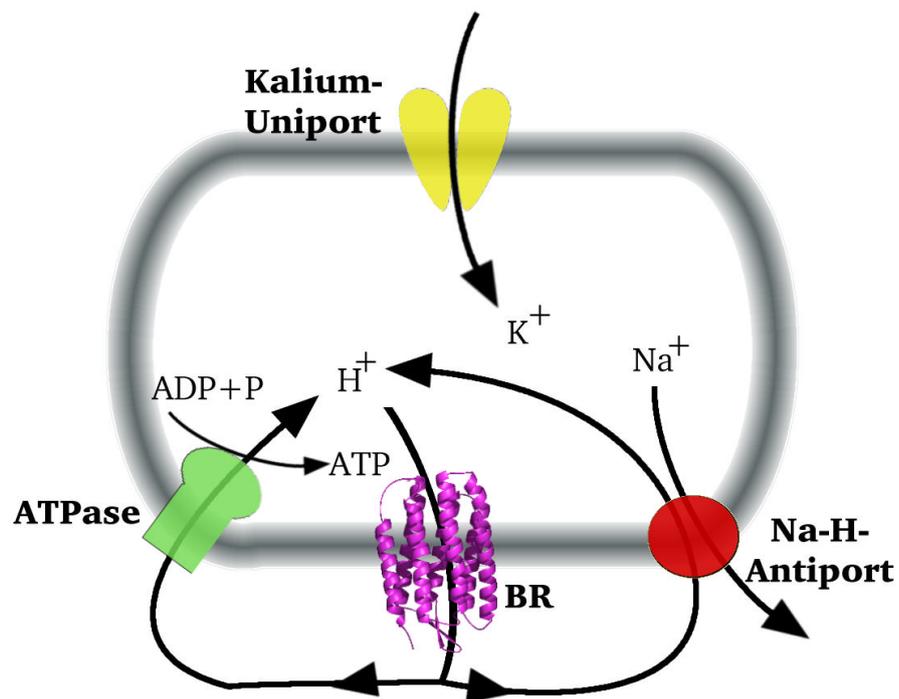


Abbildung 1.1: Energieerzeugung und -speicherung in *Halobacterium salinarum*. Dem Ladungsverlust durch den Protonenexport der Photosynthese wird durch einen selektiven Einstrom von Kaliumionen begegnet. Weiterer Ladungsausgleich ist durch einen NaH-Antiport möglich. Der entstehende chemische Kaliumgradient ist lange Zeit stabil und kann von der Zelle zur Synthese von ATP verwendet werden. Er erfüllt damit die Anforderungen eines Langzeit-Energiespeichers [WAGNER et al. 1978].

Funktion darin besteht, Chloridionen in das Cytoplasma der Zellen zu transportieren. Dies ist vor allem während des Wachstums der Archaea zur Stabilisierung des osmotischen Drucks in der Zelle notwendig [OESTERHELT 1995]. Durch aktive Aufnahme von Chlorid wird die durch das Membranpotential getriebene passive Aufnahme von Kationen ausgeglichen. Neben Halorhodopsin verfügt *Halobacterium salinarum* über ein weiteres, Membranpotential-getriebenes Kaliumtransportsystem, durch das einem osmotischen Druck auf die Zelle auch im Dunkeln entgegengewirkt werden kann [DUSCHL und WAGNER 1986].

### 1.1.2 *Bakteriorhodopsin*

Die Bildung von BR wird durch Sonnenlicht induziert, wodurch phototrophes Wachstum der Archaea ermöglicht wird. Es bilden sich in der Zellmembran dichtgepackte Bereiche von hexagonal angeordneten BR-Trimeren aus. So entsteht eine zweidimensionale, kristalline Struktur, die Purpurmembran (PM) genannt wird.

Kooperative Wechselwirkungen zwischen den Trimeren werden diskutiert [VONCK 2000]. Aktuelle Ergebnisse innerhalb der Arbeitsgruppe zeigen ein genaueres Bild. Das Molekülverhältnis BR:Lipide beträgt 1:10, womit die PM zu 95% (w/w) aus dem Retinalprotein gebildet wird. Das Trimer wird durch Wechselwirkung der Seitenkette des Tryptophan-80 mit einem S-TGA1-Molekül, ein Glycolipid, im Inneren des Verbands stabilisiert. Die Mutation W80I zerstört das Trimer und somit die Bildung kristalliner PM, wodurch die Fähigkeit der Zellen zum phototrophen Wachstum verloren geht. Da die gemessene ATP-Bildungsrate der Mutante durchaus in der Größenordnung der des Wildtys liegt scheint sich an der eigentlichen Aktivität des Moleküls nichts zu ändern. Untersuchung der Retinalisomere in Wildtyp und Mutante im licht- und dunkeladaptierten Zustand zeigt eine Zunahme von *cis*-Isomeren in W80I, deren Bindung in BR instabil ist (z.B. 9-*cis*). Die Bedeutung der PM liegt daher in der Gewährleistung einer stereoselektiven Retinalisomerisierung von 13-*cis* nach all-*trans* durch die

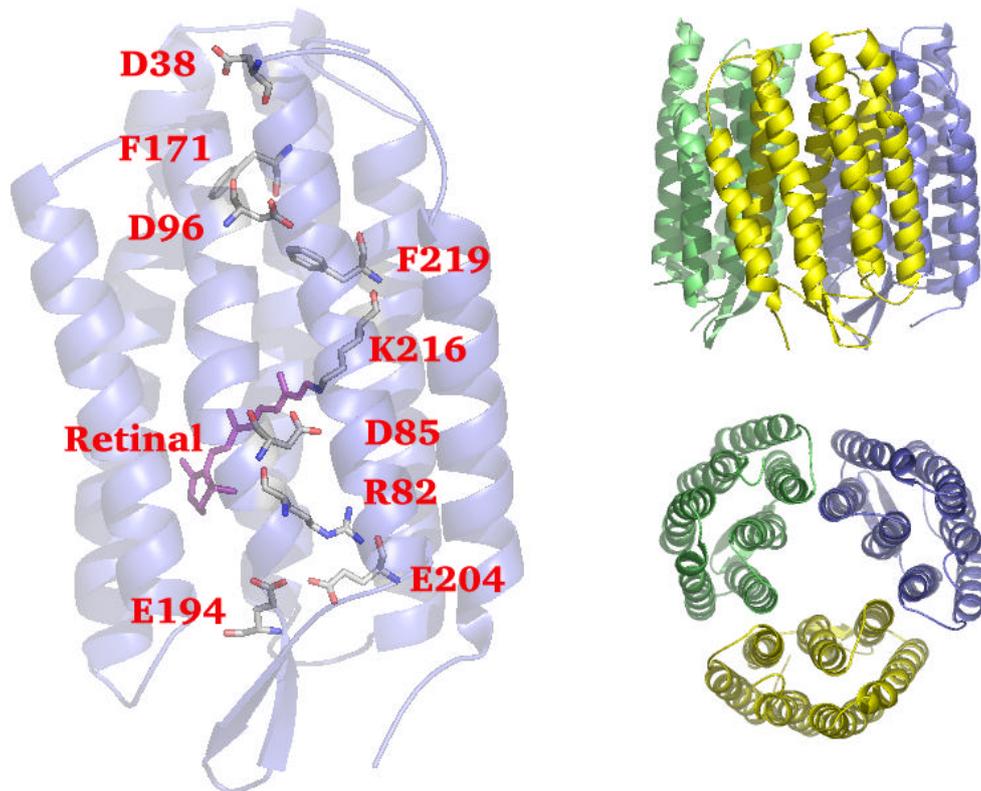
trimere Anordnung der Proteine, wodurch der Photozyklus ohne Degradation fortwährend durchlaufen werden kann [BESIR 2001].

Bakteriorhodopsin zählt zur Klasse der Retinalproteine und bildet in der nativen Form sieben Transmembran- $\alpha$ -Helices aus (siehe Abbildung 1.2). Es besteht aus einer einzigen Peptidkette, dem Bakterio-opsin, und dem Cofaktor Retinal, der kovalent als Schiff Base an Lysin 216 aus Helix G gebunden vorliegt. Als Chromophor bezeichnet man dabei den Cofaktor Retinal mit den benachbarten Aminosäureseitenketten in einem Abstand von 5 Å. Die Proteinumgebung bildet eine rigide Bindungstasche, in der das Retinal bis Kohlenstoffatom C13 in einer starren Konformation fixiert wird. Dagegen sind die Atome C13 bis C15 und das Lysin weitgehend flexibel, so daß hier bei Absorption eines Photons eine *cis/trans*-Isomerisation um die Doppelbindung C13-C14 stattfinden kann.

Die Flexibilität des Proteins nimmt nach außen hin zu. Im Vergleich zur cytoplasmatischen Seite (CP) ist die extrazelluläre Hälfte des Proteins (EC) durch ein Netz von Wasserstoffbrücken deutlich hydrophiler. Zahlreiche Untersuchungen geben ein deutliches Bild vom Pfad, auf dem das Proton das Protein passiert (einige aktuelle Übersichtsartikel [HAUPTS et al. 1999, LANYI 2000, BROWN 2001]).

An der cytoplasmatischen Oberfläche befinden sich einige saure Aminosäuren (hauptsächlich Aspartate), die eine Aufnahme des Protons aus dem Medium erleichtern. Experimente weisen auf D38 als erste Oberflächenbindestelle auf der cytoplasmatischen Seite des Proteins hin [RIESLE et al. 1996]. Die nächste Station bietet D96, das rund 10 Å von der CP-Oberfläche entfernt ist. Von dieser Aminosäure weiß man, daß sie als primärer Protonendonator für die rund 12 Å entfernte Schiff Base dient. Zwischen Protonierung und Deprotonierung der Schiff Base muss bei einem vektoriellen Transport eine Zugangsänderung von der cytoplasmatischen zur extrazellulären Seite stattfinden, wodurch diesem Schritt eine bedeutende Stellung im Transportmechanismus des Proteins zukommt (siehe Abschnitt 1.1.3).

Auf dem Weg aus der Zelle überwindet das Proton von der Schiff Base eine Entfernung von 4 Å auf den primären Protonenakzeptor D85.



*Abbildung 1.2:* Die Struktur von Bakteriorhodopsin. Links: Bändermodell mit den am Protonentransport beteiligten Seitenketten D38, D96, K216 und Retinal (Schiff-Base), D85 und die an der Protonenabgabe beteiligten Seitenketten von R82, E194, E204. Der Transport des Protons erfolgt von oben nach unten aus der Zelle heraus. Rechts: Seiten- und Aufsicht eines BR-Trimers (Struktur gemäß PDB-Eintrag 1br [ESSEN et al. 1998]).

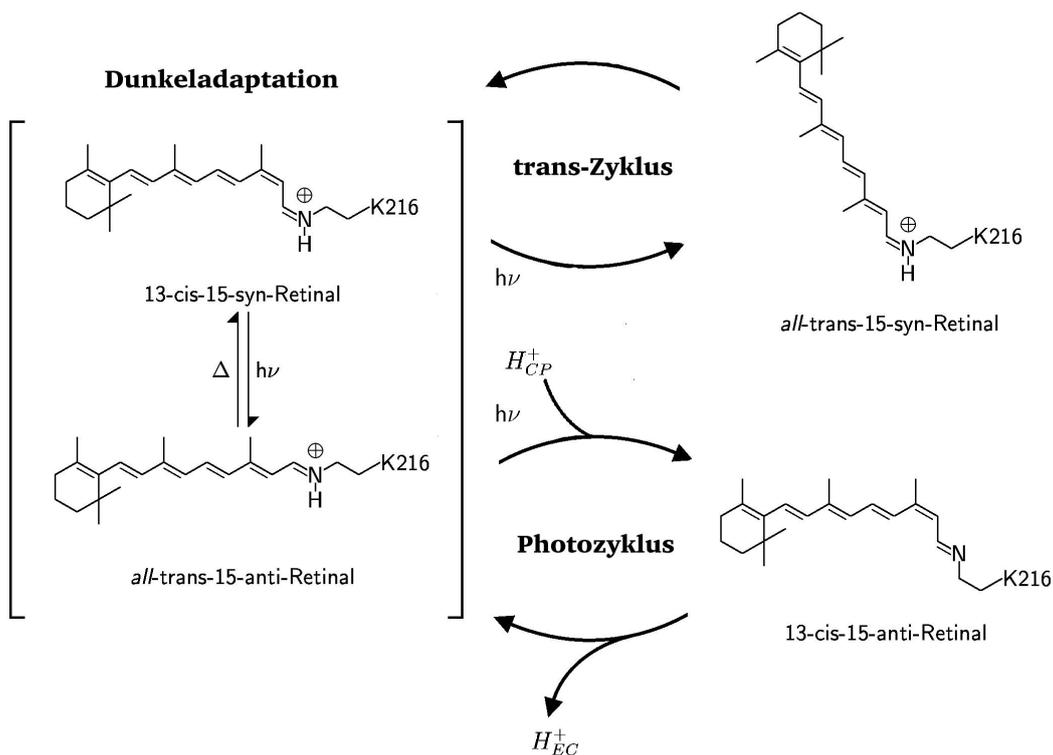
Erste Vermutungen, das in der Nähe befindliche R82 biete die finale Protonenabgangsgruppe, können aufgrund von pK-Messungen nicht gehalten werden [GOVINDJEE et al. 1996, MISRA et al. 1997]. Neuere Ergebnisse deuten auf einen komplexen Protonenabgabecuster hin, der aus den Aminosäuren R82, E194, E204 und einem Wassermolekül gebildet wird, die über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander wechselwirken [RAMMELSBERG et al. 1998].

Während des Transportvorgangs wird eine Änderung in der transmembran-helikalen Anordnung beobachtet, die nach Deprotonierung der Schiff Base zu einer Öffnung des cytoplasmatischen Halbkanals führt und bis zur Regeneration des Ausgangszustands erhalten bleibt. Obwohl mit der Öffnung des cytoplasmatischen Halbkanals die Hydratisierung im CP-Halbkanal zunimmt werden die dynamischen Parameter der Reprotonierung bei einer Auflösung von 100 ps nicht beeinflusst [FERRAND et al. 1993, LEHNERT et al. 1998].

BR durchläuft eine Hell-/Dunkeladaptation, die auf unterschiedliche Isomerisierungszustände des Chromophors zurückzuführen ist (siehe Abbildung 1.3). Im dunkeladaptierten Zustand beträgt das Isomerenverhältnis im Wildtyp 13-*cis*-15-*syn*-Retinal und all-*trans*-15-*anti*-Retinal zwischen 1:1 [DENCHER et al. 1976, MAEDA et al. 1977, TITTOR et al. 2002] und 2:1, durch Belichtung verschiebt sich das Verhältnis auf > 98% all-*trans*-15-*anti*-Retinal [DENCHER et al. 1976, SCHERRER et al. 1989, TITTOR et al. 2002]. Es ist bekannt, daß die Belichtung des *cis*-Isomeren zu einem nicht-transportierenden Kreisprozess führt.

### 1.1.3 Photozyklus

Die beobachteten Absorptionsänderungen nach photonischer Anregung des Proteins, die maßgeblich durch den Protonierungsgrad der Schiff Base und der Konformation des Chromophors beeinflusst werden, lassen sich als Kreisprozess beschreiben, der Photozyklus genannt wird.



**Abbildung 1.3:** Konfigurationen des Cofaktors Retinal in Bakteriorhodopsin. Der Cofaktor in BR nimmt im dunkeladaptierten Zustand ein thermisches Gleichgewicht ein (*all-trans*:*13-cis* = 1:1 bis 1:2). Durch Belichtung verschiebt sich das Gleichgewicht zu einem *all-trans*-Anteil > 98 %. Während Belichtung des *13-cis-15-syn*-Isomeren eine nicht-transportierende Reaktion (*trans-Zyklus*) einleitet erfolgt ausgehend vom *all-trans-15-anti*-Isomeren in einer zyklischen Reaktion ein Protonentransport aus der Zelle heraus, die als *Photozyklus* bezeichnet wird.

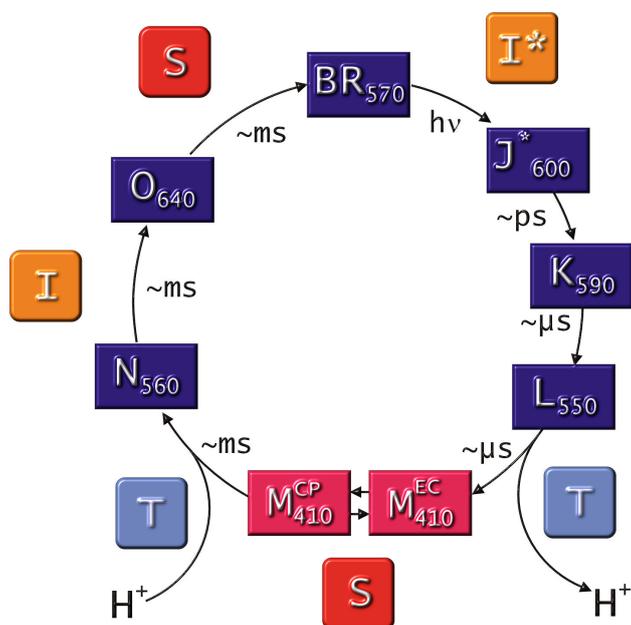


Abbildung 1.4: Der Photozyklus von Bakteriorhodopsin und das IST-Modell. Ausgehend von  $BR_{570}$  erfolgt auf photonische Anregung eine Isomerisation ( $I^*$ ) des Chromophors. Die in konformeller Spannung gespeicherte Energie treibt den zyklischen Prozess an. In Folge einer Reihe von thermischen Relaxationen wird während der Regeneration des Ausgangszustands ein Proton aus der Zelle heraus transportiert. Die Elementarschritte des IST-Modells bestehen aus Isomerisation (I), Schalter (S) und Transport (T).

Der Mechanismus kann mit Hilfe des IST-Modells<sup>1</sup> beschrieben werden [HAUPTS et al. 1997, TITTOR et al. 1997]. Es handelt sich um ein theoretisches Modell, das mit einem minimalen Satz von Elementarschritten auskommt. Da es sich um einen Kreisprozess handelt müssen die beteiligten Schritte jeweils zweimal durchlaufen werden, um zum Ausgangszustand zurückzukehren. Als Initiator dient die photonische Anregung (Symbol: \*) des Chromophors, die sich in einer ersten *Isomerisation* des Retinals von *all-trans* nach *13-cis* äußert. Als Folge der Isomerisierung wird ein Proton an der extrazellulären Seite freigesetzt. In einem nächsten Schritt, dem Schalter (*Switch*), ändert sich die Zugänglichkeit der Schiff Base von der cytoplasmatischen zur extrazellulären Seite, um das in einem zweiten Transportschritt vom Cytoplasma kommende Proton aufnehmen zu können. Als Voraussetzung für die Vektorialität der Ionenpumpe muss zwischen den beiden Transportschritten eine Änderung der Zugänglichkeit der Schiff Base stattfinden. Der Ausgangszustand des Zyklus wird durch thermische Relaxation des Cofaktors zur *all-trans*-Konformation (zweite *Isomerisation*) und erneute Zugänglichkeitsveränderung wieder hergestellt. Die Sequenz der Elementarschritte lässt sich damit durch die Folge *I\*TSTIS* beschreiben.

#### 1.1.4 Elektrische Eigenschaften

Aufgrund ihrer geringen Größe sind Halobakterien nicht zur Anwendung direkter elektrophysiologischer Messungen geeignet. Daher erfolgten erste elektrische Messungen der Photoaktivität von BR seit den späten 70er Jahren in schlecht definierten Systemen (vgl. Vesikel [RENTHAL und LANYI 1976], künstliche Membranen (*black-lipid-membranes*) [HERRMANN und RAYFIELD 1976, TITTOR et al. 1994] und künstliche Filme [LANYI und MACDONALD 1976] bezüglich der Orientierung sowie Membraninkorporation der Proteine, wodurch zum Beispiel eine Bestimmung der elektromotorischen Kraft kompromittiert wird, da die gemessene Spannung nicht vollständig über dem Protein anliegt.

---

<sup>1</sup> *IST* steht für *Isomerisation-Schalter-Transport*.

Eine Möglichkeit, diesen Problemen zu begegnen, ist die heterologe Expression in geeigneten Zellen, wie dies im Falle des BRs unter Verwendung von Oozyten des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* gezeigt wurde [NAGEL et al. 1995]. *Xenopus*-Oozyten stellen das Standardsystem zur Durchführung von elektrischen Messungen mit zwei Elektroden<sup>2</sup> dar und kommen in unzähligen funktionellen Charakterisierungen zum Einsatz. Aus den Experimenten am Max-Planck-Institut für Biophysik wird ersichtlich, daß der Photozyklus spannungsabhängig von einem transportierenden in einen nicht-transportierenden Prozeß geschaltet werden kann [NAGEL et al. 1998, SCHMIES et al. 2001].

### 1.1.5 Eigenschaften der untersuchten Mutanten

Die BR-Dreifachmutante TRI enthält die Mutationen D96G/F171C/F219L [SUBRAMANIAM und HENDERSON 1999] und sollte ursprünglich zur strukturellen Aufklärung der späten Intermediate beitragen, da die Einzelmutationen auf der cytoplasmatischen Seite des Chromophors Einflüsse auf die Reprotonierung der Schiff Base in der zweiten Hälfte des Photozyklus ausüben und bei jeder einzelnen eine Akkumulation von Intermediat N im Photozyklus zu beobachten ist [KAMIKUBO et al. 1996, SUBRAMANIAM und HENDERSON 1999, VONCK 2000]. Die Konformation des Proteins besitzt bereits im Ausgangszustand eine erhöhte Ähnlichkeit zu der offenen Form der späten Intermediate und läßt auf Belichtung die beim Wildtyp bzw. bei anderen Mutanten beobachtete größere Konformationsänderung beim Übergang in Intermediat M2 vermissen [TITTOR et al. 2002].

Im Grundzustand von TRI liegt der Chromophor in einer gemischten Konformation der *cis* und *trans*-Isomere vor. Durch Belichtung lassen sich maximal 70 % in die transportaktive *trans*-Form überführen. Im neutralen Bereich ist die Geschwindigkeit des Photozyklus von TRI genau wie bei Wildtyp durch M-Zerfall bestimmt. Bei pH 5.0 hingegen wird bei der Drei-

---

<sup>2</sup> Two Electrode Voltage Clamp, TEVC

fachmutante die Zyklusrate durch den Zerfall des O-Intermediats bestimmt (siehe Abbildung 1.5).

Eine Untersuchung der Transportaktivität des Proteins in Zellsuspension ergibt, daß die Aktivität des Proteins bei pH 5.0 und in Anwesenheit von Azid eine Protonentransportrate von  $125 \text{ H}^+ / (\text{BR} \cdot \text{min})$  aufweist und damit etwa 66 % der Transportaktivität des Wildtyps erreicht [TITTOR et al. 2002].

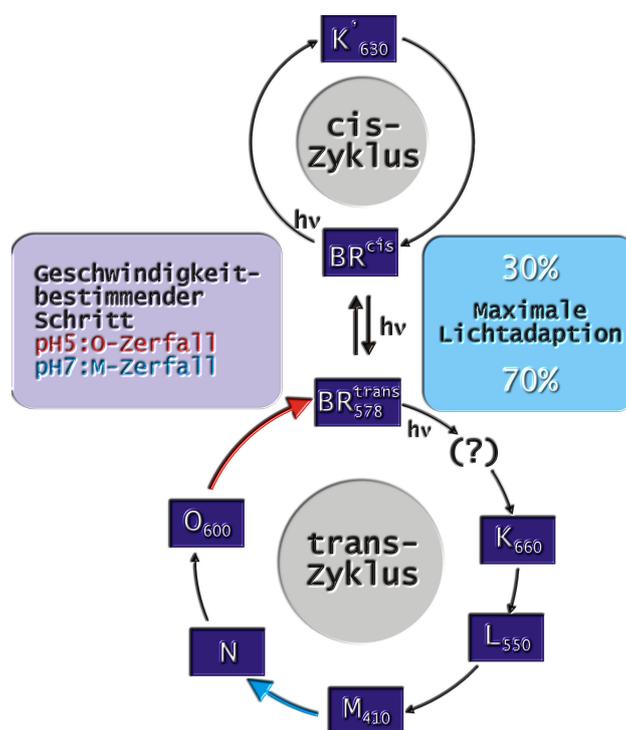


Abbildung 1.5: Photozyklus der Dreifachmutante TRI D96G/F171C/F219L. Im Ausgangszustand liegen maximal nur 70 % des Proteins in der transportaktiven *trans*-Form vor. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im *trans*-Zyklus wechselt beim Übergang von pH 7.0 auf pH 5.0 im Unterschied zu wtBR von M-Zerfall auf O-Zerfall.

Azid wird für alle D96-Mutanten benötigt. Es gilt als erwiesen, daß das  $\text{HN}_3$  im Protein die Funktion des Aspartats 96 als primärer Protonendonator für die Schiff Base rekonstituiert [TITTOR et al. 1989].

Ein Austausch der Aminosäure Arginin an Position 82 im extrazellulären Halbkanal von BR durch Glutamin (R82Q) oder Alanin (R82A) erhöht den  $pK$  von Aspartat-85 und führt zu einer verspäteten Abgabe des Protons während des Photozyklus, woraus sich eine Beteiligung der Aminosäureseitenkette 82 an der Stabilisierung der deprotonierten Schiff Base sowie an der Protonenabgabereaktion folgern läßt. Ein Vergleich der Strukturen des Ausgangszustands und des M-Intermediats [LUECKE et al. 1999] zeigt, daß die Orientierung der Argininseitenkette von der Schiff Base in Richtung extrazelluläre Seite wechselt (siehe Abbildung 1.6).

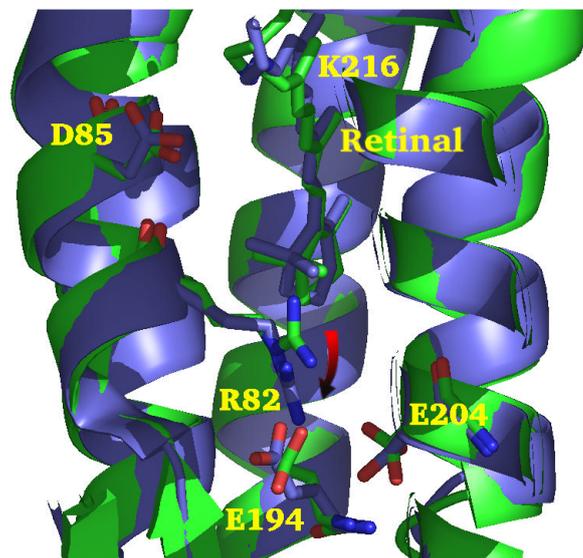


Abbildung 1.6: Orientierungswechsel der Seitenkette R82 während des Photozyklus. Ein Vergleich der Strukturen des Bakteriorhodopsin-Ausgangszustands (grün) und des M-Intermediats (blau) (PDB-Einträge: 1c8r und 1c8s nach [LUECKE et al. 1999]) zeigt die Bewegung der Seitenkette von R82 in Richtung extrazelluläre Oberfläche des Proteins. Durch die damit verbundene Absenkung des  $pK_s$  des Protonenabgabe-Clusters (R82, E194, E204, Wasser) wird die Protonenabgabe an die Umgebung vermittelt.

Dadurch wird der  $pK_s$  des Protonenabgabe-Clusters abgesenkt und das dort gebundene Proton an die Zellumgebung abgegeben. Im Gegensatz zu R82A und R82K vermag R82Q die Eigenschaften des Wildtyps in vermindertem Ausmaß nachzubilden. Die Guanidiniumgruppe von

R82 beeinflußt das ausgedehnte Wasserstoffbrückennetzwerk im extrazellulärem Halbkanal maßgeblich [HATANAKA et al. 1996]. Aus einer NMR-Studie [TANIO et al. 1999] weiß man, daß Guanidinium-chlorid den Effekt auf den pK von D85 rekonstituiert, jedoch die späte Protonenabgabe [RENTHAL et al. 1997] davon unverändert bleibt. Dies weist auf eine für den Transportprozeß wichtige Koppelung der Konformationsänderung des Proteingerüsts mit der Bewegung der Seitenkette hin.

Mit der Mutante D85T ist es gelungen, durch den Austausch des Aspartats gegen ein Threonin, das den entsprechenden Platz in Halorhodopsin einnimmt, die Protonenpumpe in eine Anionenpumpe umzuwandeln, wodurch die Ähnlichkeit der Transportmechanismen der beiden Retinalproteine weiter unterstrichen wird [SASAKI et al. 1995]. Desweiteren zeigt die Mutation die Existenz mehrerer verschiedener Transportmodi, die durch Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlängen geschaltet werden können (Chlorid in die Zelle, Protonen in die und aus der Zelle) [HAUPTS et al. 1997].

### 1.1.6 Zielsetzung

Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung der thermodynamischen Triebkraft von BR sowie der Dreifachmutante TRI. Um die Frage zu klären, in wieweit Konformationsänderungen während des Photozyklus essentiell für eine effiziente Protonentranslokation sind wird die Spannungsabhängigkeit des Transports dieser BR-Formen sowie der Einzelmutationen von TRI (D96G, F171C und F219L) durch heterologe Expression in Oozyten von *Xenopus laevis* und Anwendung der TEVC-Methode charakterisiert. Dieses Themengebiet wird abgerundet durch zeitaufgelöste Spektroskopie der Mutanten sowie durch Bestimmung der photosynthetischen ATP-Bildungsrate von Wildtyp-BR und TRI in *Halobacterium salinarum*.

Desweiteren werden Experimente mit den Mutanten R82Q und D85T vorgenommen. Da R82Q wie auch die Tripelmutante in der zweiten Hälfte der Photoreaktion verlangsamt ist wird sie herangezogen, um weitere Erkenntnisse über die Spannungsabhängigkeit des Photozyklus zu erzie-

len. Für D85T gilt es, die unterschiedlichen Transportmodi des Proteins in *Xenopus* Oozyten aufzulösen und zu charakterisieren. Zur Bewertung des Chloridtransports durch D85T wird auch die elektromotorische Triebkraft von Halorhodopsin bestimmt.

## 1.2 Kaliumkanäle

### 1.2.1 Grundlagen der Kaliumkanäle

Kaliumkanäle bilden die vielleicht größte bekannte Genfamilie der Welt und werden ubiquitär exprimiert. Eine Übersicht der verschiedenen Klassen der Kaliumkanäle nach [COETZEE et al. 1999] zeigt Abbildung 1.7. Die Einteilung der Kaliumkanäle erfolgt nach der Anzahl der Transmembranhelices (TM) der Proteine. In der Klasse der 6-TM-Proteine finden sich Vertreter der spannungsregulierten sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle. Die 4-TM-Kanäle werden als unspezifische Kaliumkanäle bezeichnet, da sie eine geringe Selektivität aufweisen. Die Einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanäle bilden die Klasse der 4-TM-Kaliumkanäle und treten in der Regel als Tetramere auf.

Während in vielen Fällen die genaue physiologische Funktion der Kaliumkanäle noch nicht bekannt ist sind die Kanalproteine häufig an der Regulation der cytosolischen  $\text{K}^+$ -Konzentration (Homeostase), des cytosolischen pH sowie der Kopplung des Energiehaushalts mit der intrazellulären Kaliumkonzentration beteiligt. Eine hochkonservierte Sequenz aller bakteriellen Kaliumkanäle beinhaltet zwei Transmembranhelices und das Motif TVGYG, das in manchen eukaryontischen Varianten auch durch das Motif GFG (z.B in Kir6.1, Kir6.2) ersetzt sein kann [SEINO 1999]. Diese Sequenz bildet den Selektivitätsfilter des Kanals, der auch als P-Region bzw. Pore des Proteins (siehe Abbildung 1.8, [DOYLE et al. 1998]) bezeichnet wird.

In Abbildung 1.8 werden zwei gegenüberliegende Moleküle des Homotetramers gezeigt. In der tetrameren Anordnung in der Zellmembran wird die Pore von allen vier Seiten eingeschlossen. Die Carbonyl-Sauerstoffatome der Poresequenz bieten eine Koordinationssphäre für je

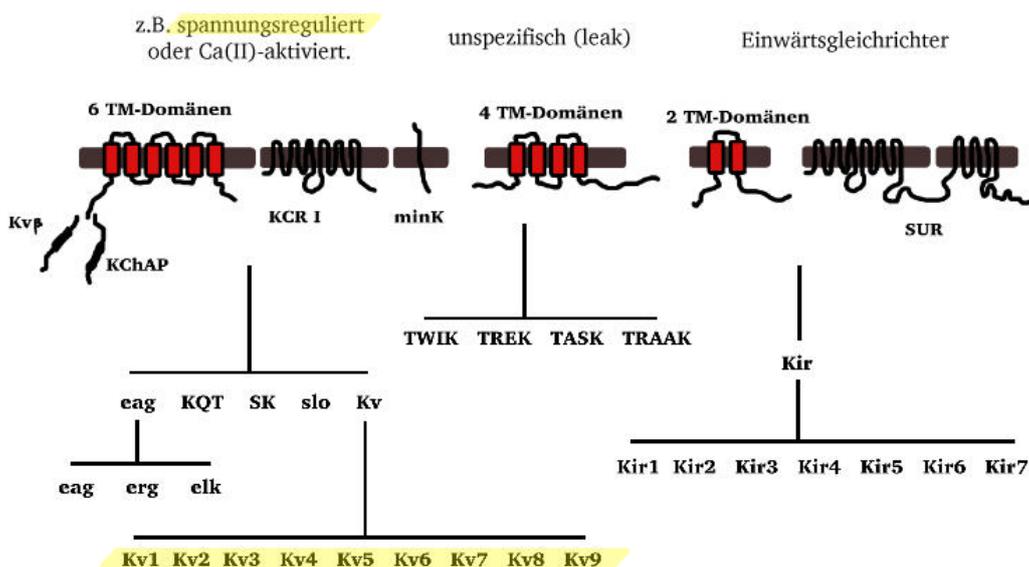
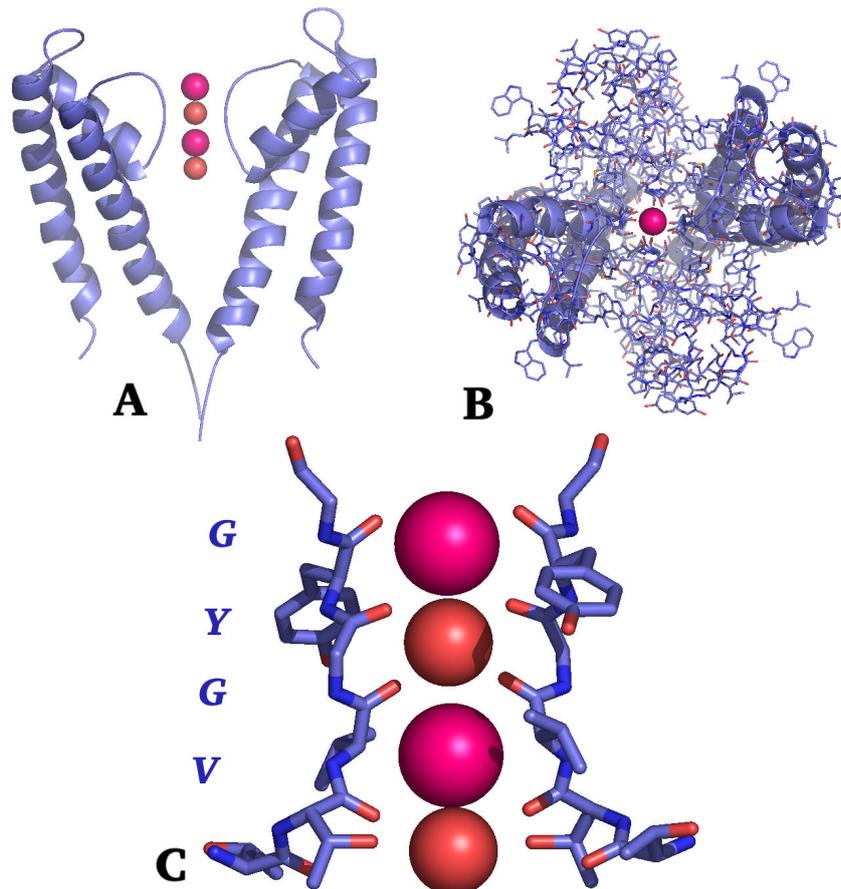


Abbildung 1.7: Übersicht der verschiedenen Klassen von Kaliumkanälen nach [COETZEE et al. 1999]. Die Einteilung der Kaliumkanäle erfolgt nach der Anzahl der gefundenen Transmembranhelices (TM). Man unterscheidet demnach 2 TM, 4 TM und 6 TM-Kaliumkanäle. Manche Kanalproteine benötigen zur Gewährleistung einer aktiven Form bzw. zur Regulation weitere heterologe Untereinheiten, die mit dem Protein interagieren (*Kv $\beta$*  beeinflusst die Spannungsabhängigkeit der *Kv*-Kanäle, *minK* spielt eine Rolle bei der Aktivierung schneller Kaliumkanäle im Herzen und bei *SUR* handelt es sich um den Sulfonyl-Harnstoff-Rezeptor, der in der Lage ist, ADP bzw. ATP zu binden und ebenfalls regulatorisch auf den Ionenkanal wirkt).

2 alternierende Wassermoleküle und Kaliumionen, die damit wie an einer Perlenkette aufgereiht werden und den Selektivitätsfilter konsekutiv passieren. Führt man sich diese Struktur vor Augen, so kann man zwei allgemeine Eigenschaften der Kaliumkanäle erklären.



*Abbildung 1.8:* Der Selektivitätsfilter von KcsA [DOYLE et al. 1998]: Röntgenstrukturanalyse (Auflösung 3.2 Å, PDB-Eintrag **1bl8**). **A** zeigt zwei einander gegenüber liegende Moleküle des Tetramers. Innerhalb der Pore befinden sich je zwei Kalium (rot)- sowie 2 Wassermoleküle (orange). Unterhalb der Pore ist der wassergefüllte Hohlraum erkennbar. **B** Aufsicht des Tetramers von der extrazellulären Seite der Membran. **C** Detailansicht der Selektivitätspore. Die Carbonylsauerstoffatome des Proteingerüsts bilden vier diskrete Positionen mit achtfacher Koordinationssphäre in der Pore.

Sie weisen trotz der sehr hohen Selektivität für Kaliumionen eine erstaunliche Durchlässigkeit auf. Die Selektivitätsreihe der Kaliumkanäle ist  $K^+ \sim Rb^+ > Cs^+ \gg Na^+, Li^+$ . Da die Permeabilität von Kaliumionen gegenüber Natriumionen mindestens um einen Faktor  $10^4$  erhöht ist, muß von einer wohldefinierten und hochenergetischen Wechselwirkung zwischen dem transportierten Ionen und der Porenregion ausgegangen werden. Ein Blick auf die KcsA-Struktur zeigt, daß die Carbonyl-Sauerstoffatome des Proteingrundgerüsts aufgrund der räumlichen Entfernung nur Kaliumionen und in geringerem Maße höhere Alkaliionen stabilisieren können, während die kleineren Natriumionen (und Lithiumionen) keinerlei Stabilisierung erfahren.

Aufgrund der geringen Entfernung zwischen den gebundenen Ionen (in der KcsA-Struktur beträgt diese 7.5 Å) werden repulsive Kräfte als treibende Kraft der Ionenleitung angenommen. Auftretende Anomalien bei Vorliegen einer Mischung von permeanten Ionen begründen die Annahme, daß ein Multiionen-Transportmechanismus vorliegt, in dem mehrere Ionen gleichzeitig und sich gegenseitig beeinflussend die Selektivitätspore passieren [HILLE und SCHWARZ 1978, BEGENISICH und DE WEER 1980, LATORRE und MILLER 1983, HILLE 1992]. Interessanterweise wurde dieser Mechanismus bereits im Jahr 1955 von Hodgkin und Keynes postuliert [HODGKIN und KEYNES 1955].

### 1.2.2 Zielsetzung

Die Sequenzierung des Genoms von *Halobacterium salinarum* und anschließende Homologiestudien weisen auf zwei putative Kaliumkanalgene, pcha1 (ORF OE3596F) und pcha2 (ORF OE1931R), in diesem Organismus hin. PCHA1 weist eine starke Homologie zu der Klasse der 6-TM-Kaliumkanäle auf (siehe Abbildung 1.7) und könnte daher spannungsreguliert sein. PCHA2 hingegen läßt sich eher in die Klasse der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle mit zwei Transmembran-Domänen einordnen. In dieser Arbeit sollen die entsprechenden offenen Leserahmen in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert werden und so in einer elektrophysi-

siologischen Untersuchung funktionell charakterisiert werden. Neben der erstmaligen funktionellen Belegung der genomischen Daten wäre hier auch das erste archaeale Kanalprotein in den Blick der Wissenschaft gerückt.

## 1.3 Elektrophysiologische Konzepte

### 1.3.1 Die Zellmembran

Zellmembranen bestehen hauptsächlich aus Lipiden und stellen deshalb grundsätzlich elektrische Isolatoren dar. Die elektrische Leitfähigkeit von Zellen wird durch Membranproteine bestimmt, insbesondere von Ionen-transportern, Ionenkanälen oder Ionenpumpen. Das Membranpotential einer Zelle bezeichnet die zwischen Cytoplasma und externem Medium vorliegende elektrische Potentialdifferenz, die durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran zustande kommt. Nach Übereinkunft wird das externe Potential gleich null gesetzt und dient damit als Referenz der Messung. Typische absolute Membranpotentiale liegen in der Größenordnung von -30 bis -90 mV, können jedoch auch höhere Werte erreichen (z.B. bei Pflanzenzellen: -150 bis -200 mV). Elektrische Ströme bezeichnen den Fluß von geladenen Teilchen pro Zeit. Daher bietet die Messung von Strömen über die Membran eine Methode, die Aktion von Membranproteinen in Echtzeit zu verfolgen und ermöglicht somit sowohl Rückschlüsse auf die Thermodynamik als auch auf die Kinetik der zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen. Die erfaßten Ströme bewegen sich meist im Bereich von Pico- bis Mikroampere. Ströme fließen nur in geschlossenen Stromkreisen. In der Elektrophysiologie verwendet man Elemente elektronischer Schaltkreise zur Beschreibung der am Transport über Membranen beteiligten Bestandteile der Zelle. Dabei liefert das Ohmsche Gesetz  $V_m = RI$  den wesentlichen Zusammenhang zwischen Membranpotential  $V_m$  (entsprechend der Spannung einer Batterie), Widerstand  $R$  der Membran (bzw. deren Leitfähigkeit  $G = \frac{1}{R}$ ) und den transportierten Ladungen/Zeiteinheit (Strom  $I = \frac{\Delta Q}{\Delta t}$ ).

### 1.3.2 Vorzeichenkonvention zu Membranströmen

Ein *Einwärtsstrom* bzw. *Auswärtsstrom* bezeichnet einfach die Flußrichtung der geladenen Teilchen über die Membran, sagt aber nichts über deren Ladung aus. Per Definition entspricht ein intrazellulär gemessener positiver Strom einem Fluß von positiver Ladung aus der Zelle bzw. negativer Ladung in die Zelle.

Ein *positives Potential* bedeutet eine positive Spannung an der Elektrodenspitze bezüglich der Erdung, die als 0 mV definiert wird. Das *Membranpotential*  $V_m$  bezeichnet die Potentialdifferenz der Zellinnenseite und der Zellaußenseite.  $V_m$  beruht daher auf einem bestimmten Polarisationsgrad der Membran. *Depolarisierende Ströme* bewirken eine *positive* Verschiebung von  $V_m$ , *hyperpolarisierende Ströme* eine *negative* Verschiebung von  $V_m$ .

Die gleichzeitige Anwendung dieser Definitionen auf *Voltage Clamp*- und *Current Clamp*-Experimente führt zu Widersprüchen: Bei Zellen, die ein Aktionspotential generieren, erfolgt Depolarisation durch einen Strom von *positiven* Natrium- oder Calciumionen in die Zelle, also durch einen *Einwärtsstrom*. In intrazellulären *Current Clamp*-Experimenten erfolgt eine Depolarisation durch einen *positiven* Strom aus der Messelektrode in das Innere der Zelle. Dieser Strom fließt dann durch die Membran in die Badlösung ab. Hier resultiert also ein *depolarisierender positiver Strom* in einem *Auswärtsstrom* durch die Membran. Daher ist es sinnvoll, die Konventionen für Ströme und Spannungen aus der Perspektive des Messinstruments zu definieren, d.h., ein Strom wird bezüglich der Flußrichtung *in* oder *aus* dem Vorverstärker definiert.

Eine Kommandospannung ist *positiv*, wenn sie das Potential der Meßspitze erhöht. Ob es sich um eine *hyperpolarisierende* oder *depolarisierende* Spannung handelt hängt dabei von der jeweiligen Meßkonfiguration ab. Bei der *Two Electrode Voltage Clamp* arbeitet man mit intrazellulären Elektroden, eine *positive* Kommandospannung erhöht das intrazelluläre Potential. Unter der Annahme, das externe Badpotential sei 0 mV, die Zelle habe ein negatives Ruhepotential  $V_{rp}$ , so wird eine *positive* Kommandospannung

das Transmembranpotential  $V_m = V_{innen} - V_{außen}$  entsprechend einer *Depolarisation* der Zelle vermindern.

## 1.4 Elektrische Ableitungen an Zellen mit zwei Elektroden

Die Technik der *Two Electrode Voltage Clamp*, bereits Ende der vierziger Jahre des letzten Jahrhunderts eingeführt [COLE und CURTIS 1939], beruht auf der Manipulation des Membranpotentials durch intrazelluläre Elektroden. Dabei wird mit Hilfe eines Rückkopplungsverstärkers die gegenwärtige *Ist*-Spannung mit einer eingestellten *Soll*-Spannung abgeglichen. In dieser Konfiguration übernimmt eine Elektrode die Aufgabe der Spannungsmessung. Entsprechend dieses Werts wird über die zweite Elektrode ein Strom in die Zelle geschickt, der die Ströme durch die Membran ausgleicht und damit quantifiziert. Für beide Elektroden dient als Gegenpol eine Referenzelektrode in der Badlösung, die den Nullwert der Messung markiert und den Stromkreis schließt.

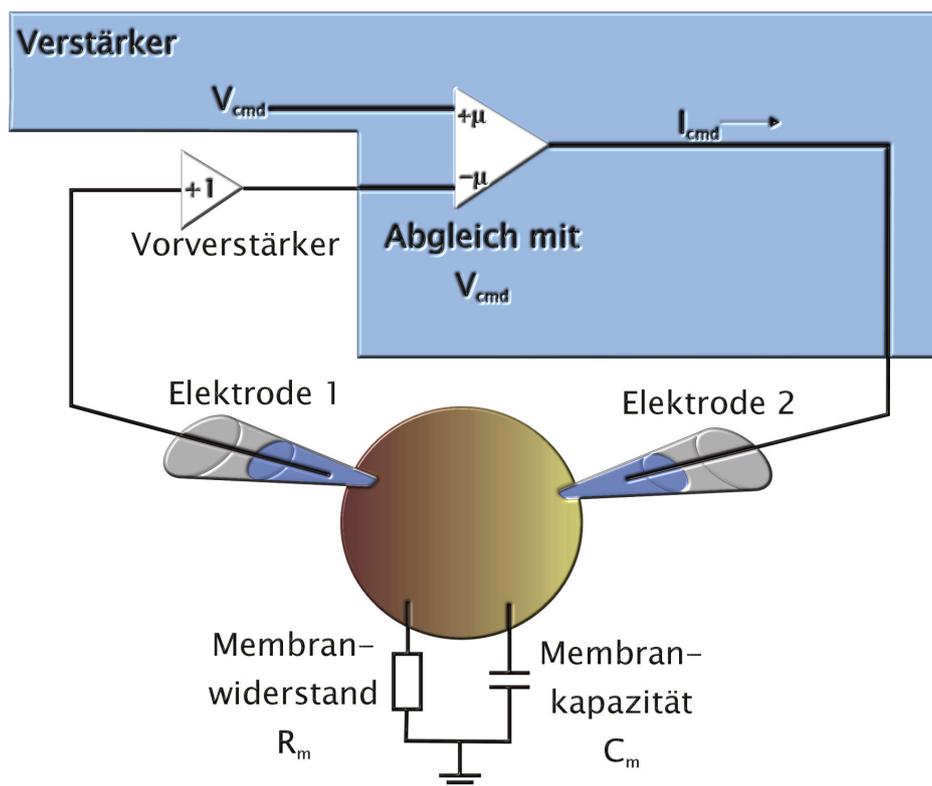


Abbildung 1.9: Schaltplan der TEVC-Messmethode. Die Spannung über die Membran wird zunächst mit Hilfe eines Vorverstärkers verstärkt und dann auf die Kommandospannung  $V_{cmd}$  abgeglichen. Der Strom, der aufgewendet werden muss, um  $V_{cmd}$  über die Membran zu halten entspricht damit den Strömen, die bei dieser Spannung über die Proteine der Membran fließen. Als Ersatzschaltbild einer Zellmembran wird meist eine Parallelschaltung des Membranwiderstands  $R_m$  und der Membrankapazität  $C_m$  eingesetzt.

# Kapitel 2

## Ergebnisse

### 2.1 Bakteriorhodopsin in *Sf9*-Zellen

Das Expressionssystem der Oozyten von *Xenopus laevis* besitzt einige Nachteile. Bei der Präparation der Oozyten handelt es sich um einen aufwendigen und langwierigen Prozeß, den jede einzelne Zelle durchlaufen muß. Durch starke qualitative Unterschiede der Oozyten unterschiedlicher Spendertiere ist es auch nicht immer möglich, erfolgreiche Messungen an die Präparation anzuschließen. Um diese Nachteile auszuschalten wurde nach der Etablierung der elektrophysiologischen Untersuchung von BR in Oozyten von *Xenopus laevis* (siehe Abschnitt 2.3) ein alternatives heterologes Expressionssystem erprobt. Als Wirtszellen dienten *Sf9*-Zellen, die mit Hilfe von Baculoviren transfiziert werden können und in anderen Labors erfolgreich zur Untersuchung von Membranproteinen eingesetzt werden. Mit einer laufenden Zellkultur wäre es erheblich einfacher, zu jedem Zeitpunkt Material für die Experimente zur Hand zu haben.

Auf die genauen Einzelheiten zur praktischen Vorgehensweise wird in Abschnitt 4.23 eingegangen. Im Prinzip benötigt man einen Transfervektor, der neben dem Gen von Interesse auch baculovirale Sequenzen besitzt, die nach Co-Transfektion in *Sf9*-Zellen mit einem linearisierten und unvollständigen Genom von Baculoviren zu infektiösen Viren rekombinieren. Diese werden in Amplifizierungsrunden vermehrt, wobei der Virustiter im

Überstand der Kultur steigt. Dieser Überstand dient zur Infektion von Insektenzellen mit dem Ziel der heterologen Expression, wobei etwas andere Bedingungen als bei der Amplifikation eingehalten werden.

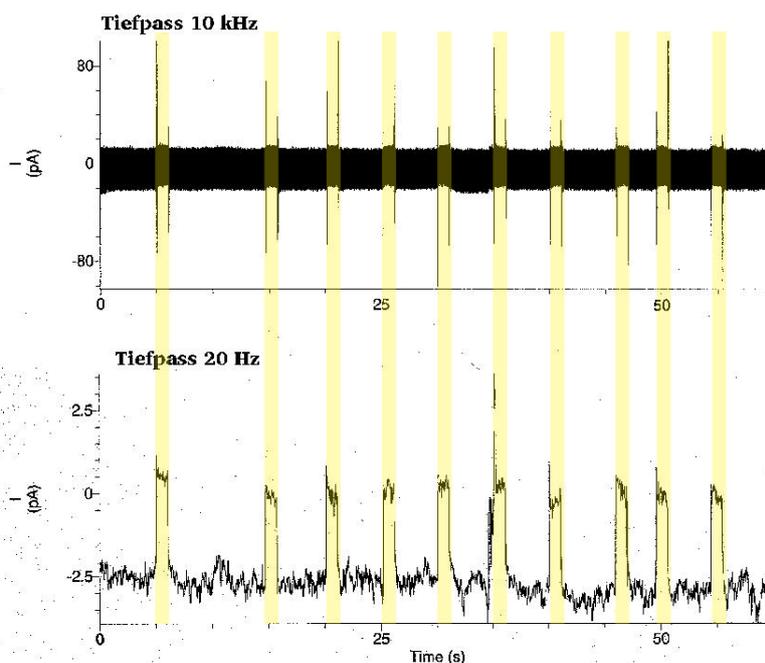


Abbildung 2.1: Photoströme von Bakteriorhodopsin in *Sf9*-Zellen. Die Belichtungsphasen werden durch gelbe Balken angezeigt. Der Photostrom wird im Gesamtzell-Modus unter Belichtung mit der Halogenlampe des Mikroskops durch ein Farbglass (OG515, Schott) gemessen und beträgt etwa 2.7 pA. Bei Messung mit 10 kHz Tiefpass-Filter ist der schlechte Signal-Rauschabstand erkennbar, der bei nachträglicher Anwendung eines Tiefpassfilters mit 20 Hz deutlich verbessert wird. Bei den unregulären sichtbaren Transienten dürfte es sich um Artefakte handeln, die bei der Digitalisierung der Daten durch einen Abgriff zu weniger Meßpunkte im Rauschen entstanden sind (*anti-Aliasing*).

Auf diese Weise ist es gelungen, geringe Photoströme durch Bakteriorhodopsin mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik nachzuweisen. Abbildung 2.1 zeigt gemessene Photoströme auf eine Sequenz von zehn Lichtpulsen konstanter Intensität, die durch gelbe Balken angezeichnet werden. Der obere Graph zeigt die Stromantwort bei einer Tiefpassfilterung mit 10 kHz mit

schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis. Nach einer Nachbearbeitung der Daten (unterer Graph) mit einem 20 Hz-Tiefpassfilter werden die Stromsignale mit einer Amplitude von 2.7 pA bei  $V_m = 0$  mV deutlich erkennbar. Damit ist es gelungen, BR heterolog in Sf9-Zellen zu exprimieren. Durch den funktionellen Nachweis wird belegt, daß das Protein in die Plasmamembran der Wirtszellen eingebaut wird und daß das System zur funktionellen Charakterisierung von BR eingesetzt werden kann.

## 2.2 Modifikation von *Halobacterium salinarum* zur direkten elektrophysiologischen Untersuchung

Bei *Halobacterium salinarum* handelt es sich um stäbchenförmige Zellen mit einer durchschnittlichen Länge von 5  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$ . Diese Dimensionen reichen bei Weitem nicht aus, um die Zellen mit der *Patch-Clamp*-Technik direkt zu untersuchen, so daß versucht wird, die Zellen artifiziell zu vergrößern.

Ein erster Versuch, S9-Zellen mit Cephalexin, einem Inhibitor der Zellteilung von *E.coli*, zu behandeln, schlägt fehl. Es kann keine Elongation der Zellen beobachtet werden, dagegen verlieren die Zellen ihre Farbe, was auf eine verminderte Bildung von BR schließen läßt. Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung ausreichend großer Protoblasten durch artifizielle Fusion von Zellmembranvesikeln in einem Trocken- und Rehydrierungsexperiment (berichtet für *E. coli*) wurde nicht ergriffen, da man hier, wie auch bei Verwendung von Vesikeln, nicht sicher davon ausgehen kann, daß die Membranen seitengleich fusionieren, wodurch eine einheitliche Orientierung der Proteine verhindert wird.

Der zweite experimentell verfolgte Ansatz basiert auf einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1987 [OESTERHELT und MARWAN 1987]. Dazu werden Zellen des Stammes R1 in Halomedium unter Zusatz von 1 % Arginin zur Erhöhung der Vitabilität und 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aphidicolin, einem Inhibitor der Zellteilung, kultiviert (siehe Abschnitt 4.22). Der maximale Effekt (Ab-

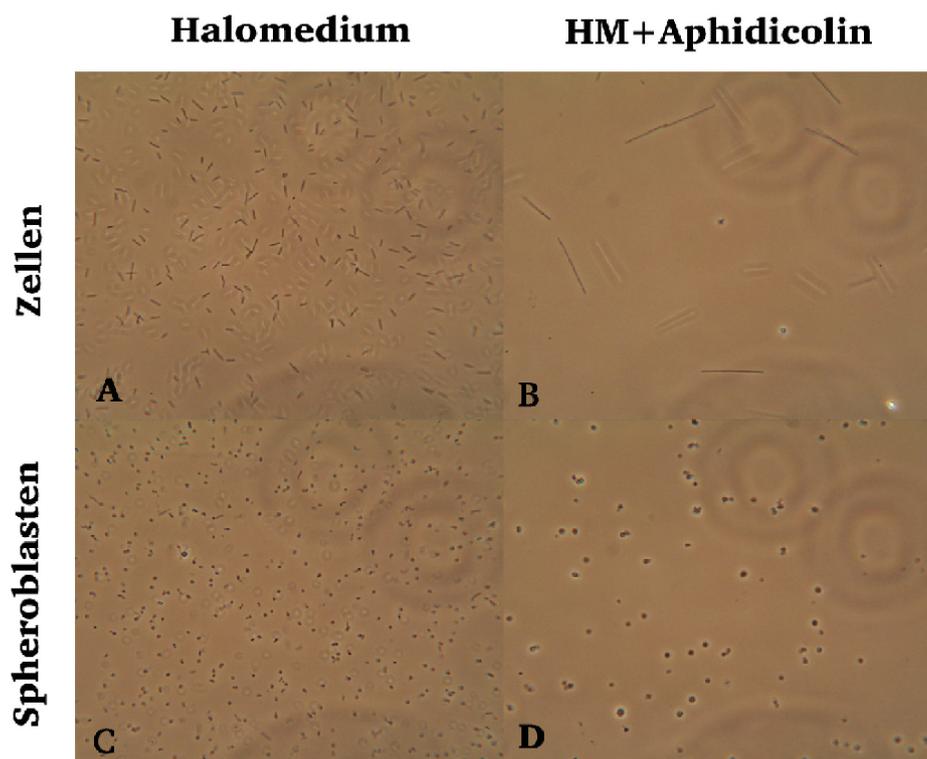


Abbildung 2.2: Herstellung von vergrößerten *Halobacterium salinarum*-Zellen. Kontrolle: 24 h- Kultur von *Halobacterium salinarum* in Halomedium vor (A) und nach (C) der Spheroblastenbildung durch Zusatz von SPH mit 0.5 M EDTA. Experiment: 24 h-Kultur von *Halobacterium salinarum* in HMA (Halomedium, 1 % Arginin, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aphidicolin) vor (B) und nach (D) Spheroblastenbildung. Die Zellen weisen in Gegenwart von Aphidicolin eine deutliche Verlängerung gegenüber der Kontrolle auf. Diese macht sich jedoch auf Grund des geringen Durchmessers der Zellen auf Spheroblastenebene nicht erheblich bemerkbar.

bildung 2.2) zeigt sich nach etwa 24 Stunden, danach ist kein weiteres Wachstum der Zellen zu beobachten. Zur Entfernung der Zellwand werden die Zellen analog der Standardmethode zur Transformation von *Halobacterium salinarum* in Spheroplasten umgewandelt. Hierbei wird die S-Schicht der Zellen durch Zugabe von EDTA gestört. Die Spheroplastierung der elongierten Zellen gelingt analog zu den Wildtyp-Zellen. Leider sind auch die resultierenden Zellvesikel aufgrund des geringen Durchmessers der Zellen noch immer zu klein. Nimmt man die Form der Zellen als Zylinder mit  $l_z = 5 \mu\text{m}$  und  $d = 1.0 \mu\text{m}$ , so kann die Elongation  $f = l/l_z$  (Gleichung 2.3) der Zellen über die Oberflächen (Gleichungen 2.1, 2.2) mit den Größen der zu erwartenden Spheroplasten nach Formel (2.4) ins Verhältnis gesetzt werden.

$$O_z = 2\pi r_z(r_z + l_z) \quad (2.1)$$

$$O_k = 4\pi r_k^2 \quad (2.2)$$

$$O_z = O_k, l_z = lf \quad (2.3)$$

$$r_k(f) = \sqrt{\frac{r_z}{2}(r_z + lf)} \quad (2.4)$$

mit

$O_z$  Oberfläche eines Zylinders zur Beschreibung der Zellform.

$O_k$  Oberfläche einer Kugel zur Beschreibung der Spheroplastenform

$f$  Elongationsfaktor

$r_k$  Radius der Kugel

$r_z$  Radius des Zylinders

$l_z$  Länge des Zylinders

Das Ergebnis der Berechnung zeigt Abbildung 2.3. Erst bei einer Verlängerung der Zellen um Faktor 20 ergibt sich mit einem Spheroplastendurchmesser von  $10 \mu\text{m}$  ein Wert, ab dem über den Einsatz der *Patch-Clamp*-Methode nachgedacht werden kann.

Zur Kontrolle werden die Fotos am Computer ausgewertet. Die gemessenen Längen und Durchmesser aus Abbildung 2.3 werden auf den Literaturwert für Wildtypzellen ( $l = 5 \mu\text{m}$ ) geeicht. Es zeigt sich, daß im Experiment der Durchmesser der Spheroblasten von elongierten Zellen  $5.3 \mu\text{m}$  beträgt, die Länge der Zellen nimmt um Faktor 5 zu. Dieser Punkt wird in Abbildung 2.3 als roter Punkt dargestellt und passt sehr genau in die theoretische Betrachtung. Damit scheint es unmöglich, auf diese Weise ausreichend große Zellen für die elektrophysiologische Untersuchung zu erhalten.

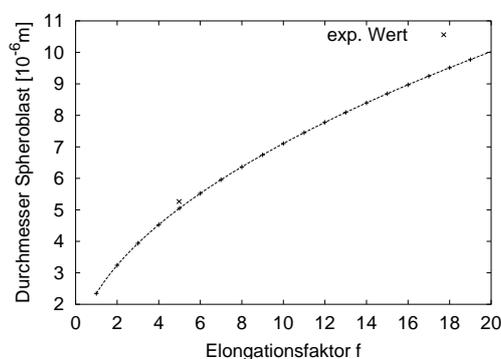


Abbildung 2.3: Elongation der *Halobacterium salinarum*-Zellen und Größe der resultierenden Spheroblasten. Die Berechnung erfolgt gemäß Gleichung (2.4). Der Elongationsfaktor  $f$  steht für das Verhältnis der längeren Zellen zu den WT-Zellen. Erst ab  $f = 20$  ist an eine direkte elektrophysiologische Untersuchung der Spheroblasten ( $r_k = 10 \mu\text{m}$ ) zu denken. Experimentell bestimmt sich die maximale Verlängerung auf  $f_{exp} = 4.98$ , entsprechend einer Länge von  $l_{exp} = 25 \mu\text{m}$ . Der Durchmesser der Spheroblasten  $d_{exp}$  beträgt damit  $5.3 \mu\text{m}$ .

## 2.3 Bakteriorhodopsin in *Xenopus laevis*

Als heterologes Expressionssystem für die elektrophysiologische Untersuchung der archaealen Membranproteine wtBR sowie den Mutanten TRI (D96G/F171C/F219L), D96G, F171C, F219L und R82Q werden Oozyten von *Xenopus laevis* verwendet. Kombiniert mit der TEVC-Methode hat man ein mächtiges Modellsystem in Händen, das in vielen Labors zur Charakterisierung von Ionenkanälen, Transportern und Ionenpumpen verwendet wird. Als Variablen dienen der pH der externen Badlösung sowie die Intensität des eingestrahlten Lichts. Ein Vergleich der BR-Mutanten mit dem Wildtyp soll durch eine Bestimmung der Expressionsrate in der Membranfraktion über die Western-Blot-Methode gewährleistet werden.

### 2.3.1 Extraktion der Photoströme aus den Rohdaten

Die Auswertung der TEVC-Daten erfolgt mit der selbst erstellten Software *analysis.py*. Damit können die Photoströme aus den Rohdaten extrahiert und direkt visuell kontrolliert werden (siehe Abbildung 2.4). Die Extraktion erfolgt durch eine bifunktionale Regressionsrechnung der Basislinie und des Stromsignals mit geteilter Steigung und unterschiedlichem Achsabstand, dessen Differenz der Stromamplitude entspricht.

Auf diese Weise können verfälschte Messungen, die meist auf starken Oszillationen bzw. einem steilen Verlauf des Hintergrundstroms bei starker Hyperpolarisation beruhen, identifiziert, individuell angepasst oder verworfen werden. Diese Hintergrundoszillationen erweisen sich vor allem bei starker Hyperpolarisation als so großes Problem, daß die Messung bei einer Membranspannung von -150 mV nicht in die Auswertung aufgenommen wird.

### 2.3.2 Azid als wichtiger Cofaktor

Aus Untersuchungen der Protonentransportaktivität in ganzen Zellen ist bekannt, daß die Mutante TRI erst im Sauren ( $\approx$  pH 5.0) und in Gegenwart von Azid eine bemerkbare Transportaktivität aufweist

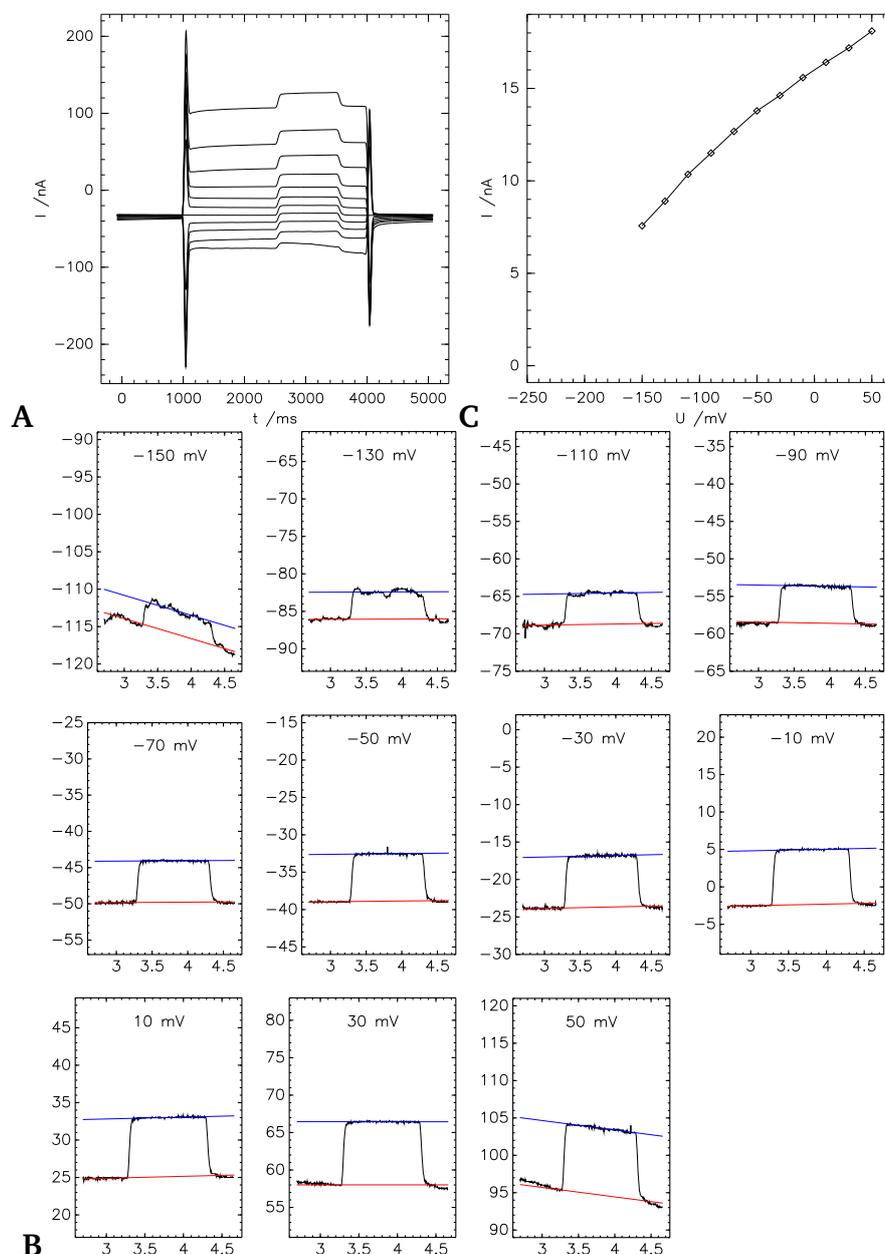


Abbildung 2.4: Extraktion des Photostroms aus einer Stromableitung. **A** Stromantwort der Zelle auf eine episodische Anregung mit den Kommandospannungen von -150 bis 50 mV (20 mV Schritte) ( $\approx 1-4$  s). Auf dieser Stromantwort aufgesetzt erscheint der Photostrom bei  $\approx 2.7-3.7$  s. **B** zeigt das Verfahren zur Extraktion des Photostroms durch das Skript *analysis.py*. Die Größe des Stroms ergibt sich aus einer Approximation der Basislinie und Photosignals mit einer linearen Regression unter Verwendung der *Levenberg-Marquardt*-Methode. Als Modell dienen zwei Funktionen einer Geraden mit gemeinsamer Steigung und unterschiedlichen Achsabständen ( $f1 = a1 + bx$ ,  $f2 = a2 + bx$ ). Die Höhe des Photostroms ergibt sich damit nach  $i = a1 - a2$ . **C** zeigt die resultierende Strom-Spannungs-Kennlinie, indem die entsprechenden Stromsprünge aus **B** gegen die angelegte Spannung aufgetragen werden.

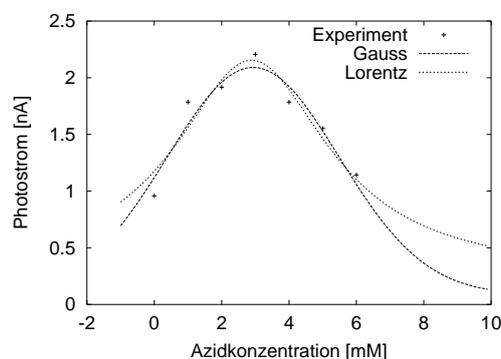


Abbildung 2.5: Ermittlung der optimalen Azidkonzentration für TRI. Die optimale Azidkonzentration von 3 mM ergibt sich aus der Auftragung der ermittelten Photoströme bei  $V_m = 0$  mV in Gegenwart von 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 mM Natriumazid. Das Maximum der Kurve ergibt sich nach Optimierungsrechnung mit Hilfe einer Gauss bzw. Lorentz-Funktion zu 2.93 ( $\chi^2=0.107$ ) respektive 2.89 mM ( $\chi^2=0.126$ ).

[TITTOR et al. 2002]. Auch im Oozytensystem kann diese Beobachtung belegt werden, da v.a. in Abwesenheit von Natriumazid nur ein marginaler Photostrom registriert wird. Der pH-Wert lässt sich im Oozytensystem nicht unter pH 5.5 einstellen, da niedrigere Werte von den Zellen mit starken Oszillationen des Membranruhepotentials bei hohen Hintergrundströmen sowie einem stark eingeschränkten verwendbaren Spannungsmessfenster quittiert werden. Da die Stromamplituden jedoch mit der Azidität des externen Mediums zunehmen wird pH 5.5 als optimaler Wert eingestuft. Die optimale Azidkonzentration für TRI wird experimentell bestimmt, indem die Photoströme bei 0 mV und unterschiedlichen Azidkonzentrationen in der Badlösung aufgezeichnet werden (siehe Abbildung 2.5). Das Optimum liegt demnach bei rund 3 mM Azid im externen Medium. Als Standardbedingungen für die TEVC-Messungen werden daher 3 mM Natriumazid und pH 5.5 gewählt.

Problematisch dabei ist jedoch die Wirkung von Azid als Zellgift, wodurch die Wirtszellen offenbar geschwächt werden - so wird das üblicherweise zitierte Oozyten-Membranpotential von -50 bis -70 mV in den Experimenten nicht erreicht. In der Regel liegt die gemessene Ruhespannung

zwischen -25 und -10 mV. Diese Tatsache wird in Kauf genommen, denn eine Schwächung der Zellen ist auch aus anderer Sicht unvermeidlich. Eine Anzahl von Ionenkanal-Inhibitoren (TEACl, Ba<sup>2+</sup>, Cs<sup>+</sup>) muß dem Badmedium zugegeben werden, da anderenfalls die Photoströme (0 bis  $\approx 20$  nA) im Hintergrundstrom der endogenen Membranproteine zu verschwinden drohen. Während die endogenen Ströme unter Standardbedingungen innerhalb einer Episode (-150 bis 50 mV) in der Regel einige  $\mu$ A erreichen können, wird dieser Bereich durch den Einsatz von Inhibitoren meist auf  $\pm 200$  nA eingeschränkt.

### 2.3.3 Einfluß der Lichtintensität auf den Photostrom

Mit der verwendeten Apparatur (siehe Abbildung 4.2) werden am Ort der untersuchten Zelle maximal  $16.3 \text{ mWcm}^{-2}$  erreicht. Durch den Einsatz von Neutralglasfiltern wird dieser Wert in auf eine Intensität von 25, 35, 50, 75 und 100 % (in  $[\text{mWcm}^{-2}]$ : 4.1, 5.7, 8.2, 12.2, 16.3) geregelt und gegen den jeweils gemessenen Photostrom aufgetragen. Abbildung 2.6 A zeigt die Strom-Spannungs-Kurven bei den oben genannten Intensitäten des anregenden Lichts. Die Meßpunkte stellen den Mittelwert von mindestens vier unterschiedlichen Bestimmungen dar und sollten daher aussagekräftig sein. Zur Bestimmung der Kenndaten der Photoreaktion werden die Photoströme bei  $V_m = 0$  mV durch lineare Regression aus den Originaldaten bestimmt und in Abbildung 2.6 B gegen die korrespondierende Lichtintensität aufgetragen. Man erkennt, daß die Anregung bei 100 % nicht mehr im linearen Bereich erfolgt. Dadurch sollten Unterschiede in der Bestrahlung, die durch Positionierung der Oozyten im Strahlengang entstehen, keine entscheidenden Auswirkungen auf die Höhe des Photostroms zeigen. Abbildung 2.6 C zeigt eine Lineweaver-Burk-Auftragung der Intensität-Strom-Beziehung nach Formel 2.5.

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_P}{I_{max}} \cdot \frac{1}{E} \quad (2.5)$$

mit

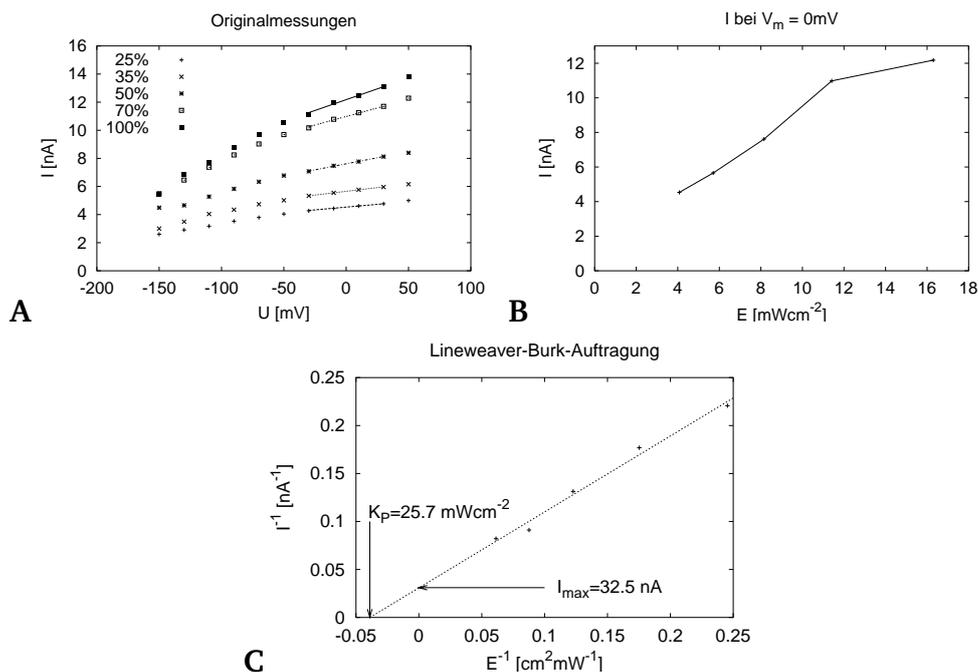


Abbildung 2.6: Einfluß der Lichtintensität ( $E$ ) auf den Photostrom. **A** Die Lichtintensität (max.  $16.3\text{ mWcm}^{-2}$ ) wird mit Neutralglasfiltern reduziert. Die dargestellten Strom-Spannungs-Kurven beruhen auf mehreren Messungen von verschiedenen Oozyten und wurden gemittelt (100%:  $N=6$ , 70%:  $N=5$ , 50%:  $N=4$ , 35%:  $N=5$ , 25%:  $N=5$ ). Bei maximaler Lichteinstrahlung befindet sich der Photostrom bereits am Anfang der Sättigung. **B** Auftragung der Photostrome gegen die unterschiedlichen Intensitäten. **C** Lineweaver-Burk-Plot zur Bestimmung der Kennwerte der Belichtung:  $K_P = 25.7\text{ mWcm}^{-2}$ ,  $I_{max} = 32.5\text{ nA}$  (Bedeutung der Variablen siehe Text).

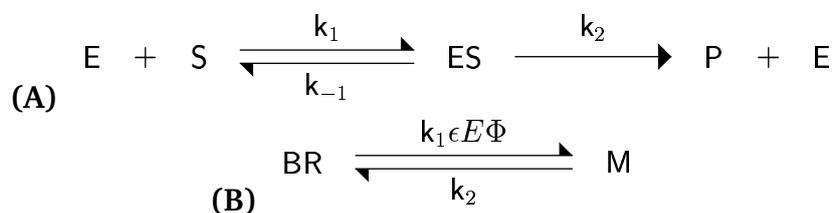
**I** Photostrom [nA]

**E** Lichtintensität [ $\text{mWcm}^{-2}$ ]

$I_{max}$  Maximaler Strom [nA], analog zu  $V_{max}$  aus Michaelis-Menten

$K_P$  Konstante der photochemischen Reaktion, analog zu  $K_M$  aus Michaelis-Menten

Dabei entspricht die Umsatzrate dem Photostrom, die Substratverfügbarkeit dem Angebot an Photonen und damit der eingesetzten Lichtintensität. Da die  $K_M$  speziell für Enzymaktivitäten definiert wurde muß die Bedeutung der Variablen in diesem Kontext näher beschrieben werden. Im der klassischen Beschreibung beschreibt die  $K_M$  die Kinetik der Bildung und des Zerfalls eines Enzym-Substrat-Komplexes nach der Reaktionsgleichung in Abbildung 2.7 A und liefert die Substratkonzentration, bei der die maximale Umsatzrate  $V_{max}/2$  beträgt.



*Abbildung 2.7:* Michaelis-Menten-Kinetik. **A** Enzym E und Substrat S stehen im Gleichgewicht mit einem Enzym-Substrat-Komplex ES, der irreversibel zu Produkt P und E zerfällt. Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  wird definiert als die Substratkonzentration, bei der die Aktivität genau die Hälfte der maximalen Enzymaktivität beträgt. **B** Anwendung der Michaelis-Menten-Kinetik auf die photochemische Reaktion von Bakteriorhodopsin. Im Kreisprozeß liegt ein Gleichgewicht zwischen BR und Intermediat M vor. In die photonische Anregung gehen Extinktionskoeffizient  $\epsilon$ , Quantenausbeute  $\phi$  und die Lichtintensität E ein.

Die  $K_M$  definiert sich als

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.6)$$

Übertragen auf die photochemische Anregung von Bakteriorhodopsin wird das entscheidende Gleichgewicht beschrieben durch Abbildung 2.7 B. Rückreaktion und Weiterreaktion vom Intermediat **M** zu **BR** kann im Kreisprozeß in einer Zeitkonstante  $k_2$  zusammengefaßt werden. Analog zur  $K_M$  kann für das Fließgleichgewicht der photochemischen Reaktion eine Konstante definiert werden, die hier als  $K_P$  bezeichnet werden soll und aus Abbildung 2.7 B nach Gleichung 2.3.3 hergeleitet werden kann.

$$\begin{aligned}\frac{d[M]}{dt} &= \epsilon\phi E \\ -\frac{d[M]}{dt} &= k_2[M] \\ K_P &= \frac{k_2}{k_1\epsilon E\phi}\end{aligned}$$

mit

$[M]$  Konzentration des Intermediats **M**

$\epsilon$  Extinktionskoeffizient von BR

$E$  Lichtintensität

$\phi$  Quantenausbeute

Die Berechnung liefert für die Lichtreaktion von BR in *Xenopus laevis* eine  $K_P$  von  $25.7 \text{ mWcm}^{-2}$ . Der maximal erreichbare Strom  $I_{max}$  beträgt 32.5 nA.

#### 2.3.4 pH-Abhängigkeit des Photostroms durch BR

Die pH-Abhängigkeit des Photostroms von wtBR und Mutanten wird im heterologen System der *Xenopus*-Oozyten in Gegenwart von 3 mM Azid untersucht. Der Wildtyp zeigt keine Änderung des Photostroms bei den pH-Werten 5.5 und pH 6.5 (vgl. Abbildung 2.8), was auch durch frühere Untersuchungen gezeigt wurde. Für die Mutante TRI wird als externe Lösung

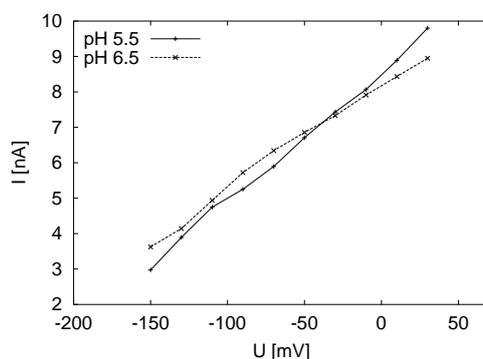


Abbildung 2.8: Strom-Spannungskennlinien von wtBR in bei pH 5.5 und 6.5. Die Transportaktivität von wtBR ist im Bereich von 5.5 bis 6.5 konstant. Als Badlösung dient modifiziertes CO-Medium (pH 5.5: 10 mM MES, pH 6.5: 10 mM MOPS) in Gegenwart von 3 mM Azid. Belichtung erfolgt nach Standardbedingungen ( $16 \text{ mWcm}^{-2}$ , OG515).

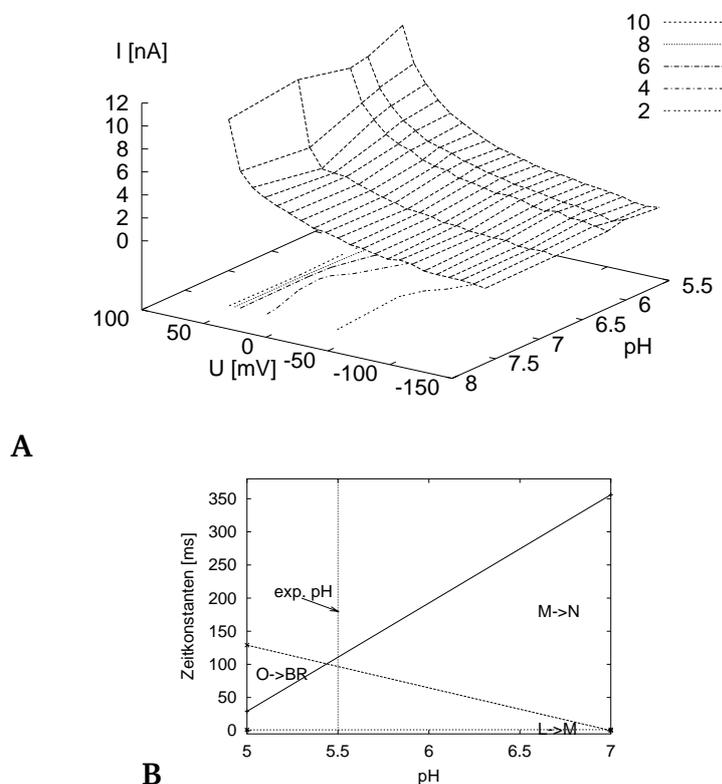
modifiziertes CO-Medium verwendet, dessen pH mit je 10 mM MES (pH 5.6, 6.0, 6.2) bzw. MOPS (pH 6.0, 7.6) eingestellt wird. Abbildung 2.9 A zeigt die Photoströme des Proteins bei einer Anregung mit grünem Licht (OG 515, Calflex 3000) in Abhängigkeit des jeweiligen pH-Werts. Die überlagerten Spuren entsprechen den Membranspannungen -150 bis 50 mV in 10 mV Sprüngen. Daraus läßt sich erkennen, daß der Photostrom unter stark hyperpolarisierenden Bedingungen praktisch unabhängig vom externen pH verläuft. Mit zunehmender Depolarisation der Membran macht sich eine Beschleunigung des Photostroms mit  $\text{pH} < 6.7$  bemerkbar, die ihr Maximum jeweils bei pH 5.6 findet. Abbildung 2.9 B zeigt das Ergebnis einer spektroskopischen Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Intermediatübergänge im Photozyklus von TRI bei  $25^\circ\text{C}$  (vgl. Abbildung 1.5). Da die Untersuchung nur die beiden pH-Werte 5.0 und 7.0 beinhaltet handelt es sich sicherlich um ein stark vereinfachtes Bild bei der Extrapolation über den pH-Bereich. Während der Übergang des Intermediats **O**  $\rightarrow$  **BR** bei pH 5.0 mit der größten Geschwindigkeitskonstante von 125 ms die Rate des Photozyklus bestimmt ist dieser Übergang bei pH 7.0 nicht mehr beobachtet. Mit dieser Annahme wird die Geschwindigkeit des Photozyklus

etwa ab pH 5.4 durch den Zerfall des Intermediats **M** mit  $\tau \approx 100$  ms übernommen (siehe auch Abschnitt 2.4).

### 2.3.5 Photochemische Rückreaktion von Intermediat **O** nach **BR**

Durch Variation der Lichtqualität, also des Spektrum des anregenden Lichts, soll festgestellt werden, ob in *Xenopus laevis* eine Arrestierung des Photozyklus im Intermediat **O** stattfindet, wodurch die Beobachtungen der spektroskopischen Experimente [TITTOR et al. 2002] bestätigt werden könnten. Die grundlegende Überlegung zum Experiment beruht auf der Tatsache, daß im Photozyklus von **BR** thermische ablaufende Reaktionen durch Bestrahlung mit Licht der passenden Wellenlänge durch eine schnelle photochemische Reaktion abgelöst werden kann. Vorausgesetzt, daß im Photozyklus von **TRI** die Rückreaktion von Intermediat **O** in den Grundzustand als geschwindigkeitsbestimmender Schritt des Zyklus auftritt, sollte es möglich sein, die Dauer der Kreisreaktion durch zusätzliche Anregung bei 640 nm im Vergleich zu wtBR deutlich zu verkürzen. Dies würde sich dann in einem Anstieg des durch **TRI** generierten Photostroms im Verhältnis zu wtBR äußern.

Die Experimente erfolgen unter Einsatz von Kanalinhhibitoren in CO-Medium (siehe Abschnitt 4.19.2) in Gegenwart von 3 mM Azid bei pH 5.5. Die Belichtung erfolgt über die standardmäßig verwendete Apparatur (siehe Abbildung 4.2). Die Dauer der Episoden wird bzgl. der einfachen Bestimmung des Photostroms verdoppelt. Während der ersten Belichtungsphase wird die Probe durch zwei Farbgläser bestrahlt. Durch Entfernen des Rotglases wird das Spektrum erweitert. Dies ist in einem deutlichen Anstieg des Photostroms zu verfolgen. Aus dem Stromsignal werden die resultierenden zwei Stromniveaus extrahiert und in einem Diagramm miteinander verglichen (siehe Abbildung 2.10). Das Diagramm zeigt das Experiment für wtBR und **TRI** sowie einer weiteren Variation der Dreifachmutante, **TRI-167** (D96G/F167C/F219L). Die Balken geben die absolut gemessenen Ströme bei einer Membranspannung von 0 mV unter den einge-



**Abbildung 2.9:** pH-Abhängigkeit des Photostroms von TRI. **A** Abhängigkeit des Photostroms von externen pH. Messpunkte bei den pH-Werten 5.6, 6.0, 6.2, 6.8, 7.4 beruhen auf dem Mittelwert aus mindestens 5 Messungen. Beim externen Medium handelt es sich um CO-Medium mit 3 mM Azid. Als Puffer dienen je 10 mM MES (pH 5.6 bis 6.2) bzw. MOPS (pH 6.0, 6.8 und 7.6). **B** Spektroskopische Untersuchung der Zeitkonstanten im Photozyklus von TRI bei den pH-Werten 5.0 und 7.0 in Gegenwart von 150 mM NaCl. Aus dieser vereinfachten Darstellung ist der Photozyklus bei  $\text{pH} < 5.4$  durch den Zerfall des Intermediats **O** bestimmt. Ab  $\text{pH} 5.4$  geht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt über auf den Zerfall des Intermediats **M**. Da die elektrophysiologischen Untersuchungen bei  $\text{pH} 5.5$  durchgeführt werden ist hier entsprechend davon auszugehen, daß der Photozyklus durch **M**-Zerfall bestimmt wird. Diese Beobachtung deckt sich mit der spektroskopischen Untersuchung in Abschnitt 2.4

stellten Lichtbedingungen an. Die Photoströme des Wildtyps sind um Faktor 6 größer als die der Dreifachmutanten. Um zu verdeutlichen, ob sich gegenüber dem Wildtyp eine Beschleunigung im Photozyklus der Mutanten zeigt, werden die Ströme jeweils auf den maximalen Wert (bei Belichtung mit dem Gelbglas OG515) geeicht und in das Diagramm übertragen. Daraus ergibt sich, daß die relativen Änderungen des gemessenen Stroms bei unterschiedlichen Rotlichtanteil im Anregungsspektrum für den Wildtyp und TRI gleich sind. Eine Beschleunigung des Photozyklus der Dreifachmutante ist nicht zu beobachten.

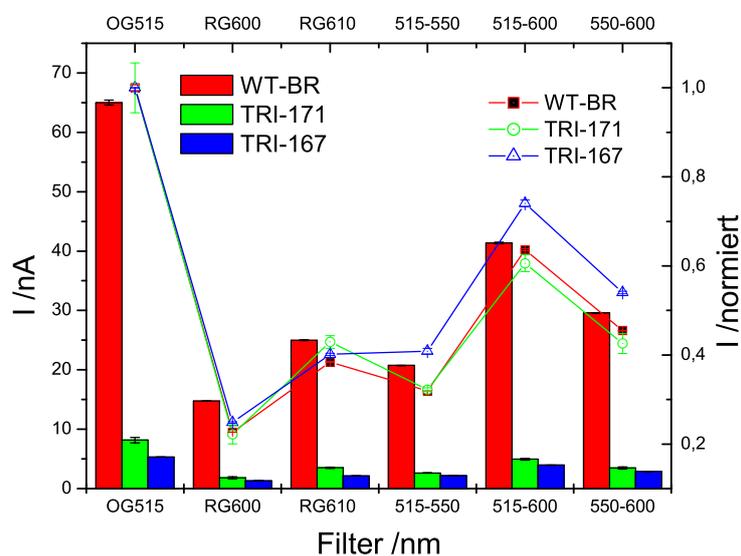


Abbildung 2.10: Experiment zur Arrestierung des Photozyklus in Intermediat **O**. Durch Belichtung der heterolog exprimierten Retinalproteine wtBR, TRI und TRI-163 unter Ausblenden bzw. Einblenden des roten Spektrums wird keine Beschleunigung durch Anregung des **O**-Intermediats beobachtet. Die Säulen im Diagramm zeigen die gemessenen Photoströme des Retinalproteins (wtBR: rot, TRI-171: grün, TRI-167: blau) bei 0 mV Membranspannung. Die Linien markieren den Photostrom bezogen auf den maximalen Wert bei einer Belichtung der Probe durch das Filterglas OG 515. Experimentelle Bedingungen: CO-Medium, 3 mM Azid, pH 5.5.

### 2.3.6 Bestimmung der Photoströme durch BR und BR-Mutanten

Zur vergleichenden Analyse der BR-Varianten erfolgen die Photostrommessungen in CO-Medium bei pH 5.5 in Gegenwart von 3 mM Azid. Eine Übersicht der experimentell bestimmten Werte zeigen Abbildungen 2.11, 2.12 und 2.13.

Man erkennt eine starke Varianz der Photoströme zwischen den einzelnen Expressionsrunden und sogar beträchtliche Schwankungen innerhalb eines Expressionsexperiments. Damit wird die Berechnung mittlerer Ströme mit einer starken Standardabweichung belastet. Bei der Betrachtung einzelner Stromkennlinien sowie der auf  $V_m = 0$  mV normierten Ströme von wtBR und der Mutante F171C zeigt sich ein Sättigungsverhalten bei depolarisierenden Membranspannungen und eine steilere Neigung bei negativem Membranpotential. Diese Beobachtung gilt nicht für die Mutanten TRI, R82Q, D96G und F219L, die eine eingegengesetzte Spannungsabhängigkeit aufweisen. Daraus ergeben sich zwei wichtige Eigenschaften von BR:

1. Die Transportaktivität von BR und seinen hier untersuchten Mutanten ist nicht-linear von der Membranspannung abhängig.
2. Die Nichtlinearität läßt sich in zwei Klassen unterteilen:
  - (a) Klasse I: Die Transportaktivität nimmt mit Hyperpolarisation ab, mit Depolarisation zu. Klare Vertreter: wtBr, F171C. Die Kurvenform wird in der Folge als konkav bezeichnet.
  - (b) Klasse II: Die Transportaktivität nimmt mit Depolarisation ab, mit Hyperpolarisation zu. Klare Vertreter: TRI, HR, D96G. Die Kurvenform wird in der Folge als konvex bezeichnet.

Das es sich bei den nichtlinearen Strom-Spannungskurven nicht um ein Artefakt handelt, das möglicherweise bei der Extraktion kleiner Ströme aus den Rohdaten entsteht, kann ausgeschlossen werden, da zum Beispiel sehr

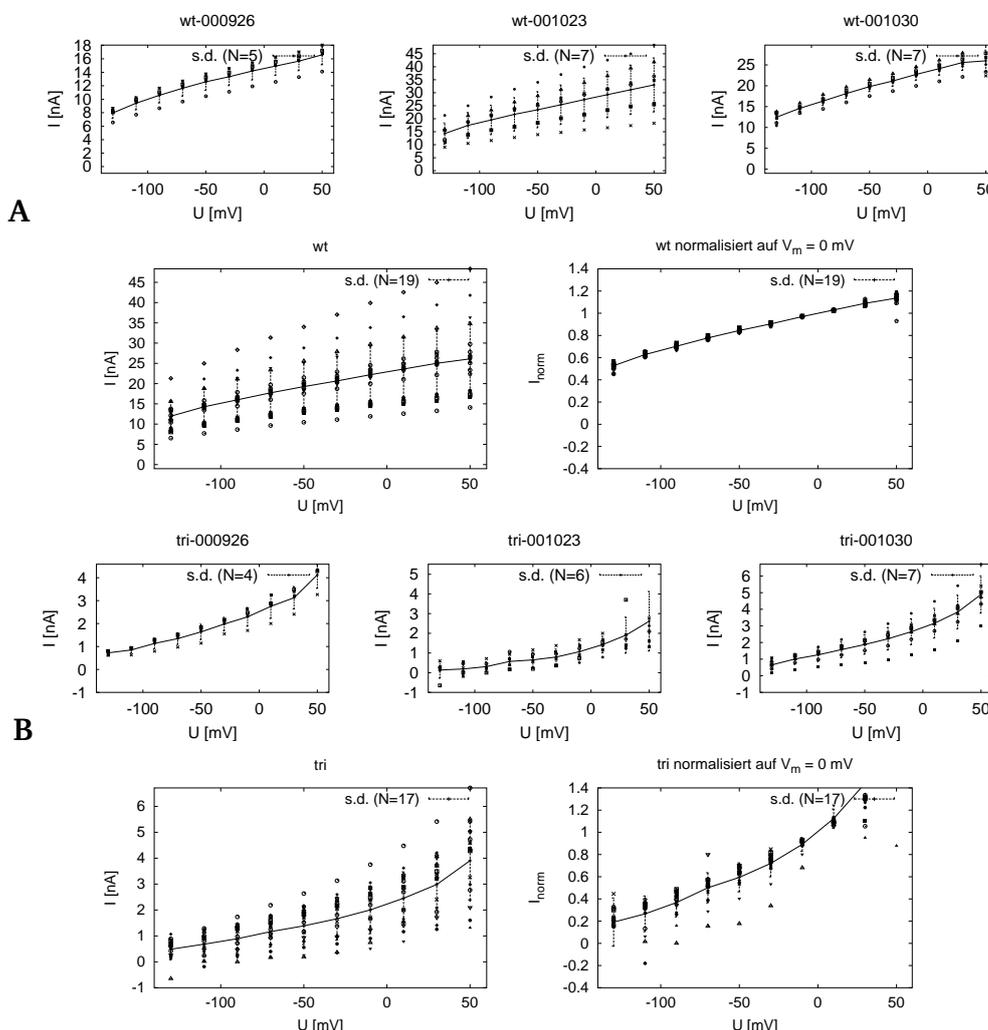


Abbildung 2.11: Darstellung der Originaldaten zur Ableitung des Photostroms von **A** wtBR und **B** TRI. Die Graphen beschreiben jeweils die Ströme einzelner Expressionsrunden mit Mittelwert und Standardabweichung. In der unteren Diagrammreihe werden der Mittelwert aller Messungen (links) und eine Normierung auf  $V_m = 0$  mV (rechts) wiedergegeben. Die Normierung auf 0 mV verdeutlicht einen nicht-linearen Verlauf der Spannungsabhängigkeit.

Klasse	Neigung der UI-Kennlinie	Vertreter
Klasse I	konkav	wt, F171C
Klasse II	konvex	R82Q, D96G, F219L, TRI

Tabelle 2.1: Klassen der Strom-Spannungs-Kennlinien.

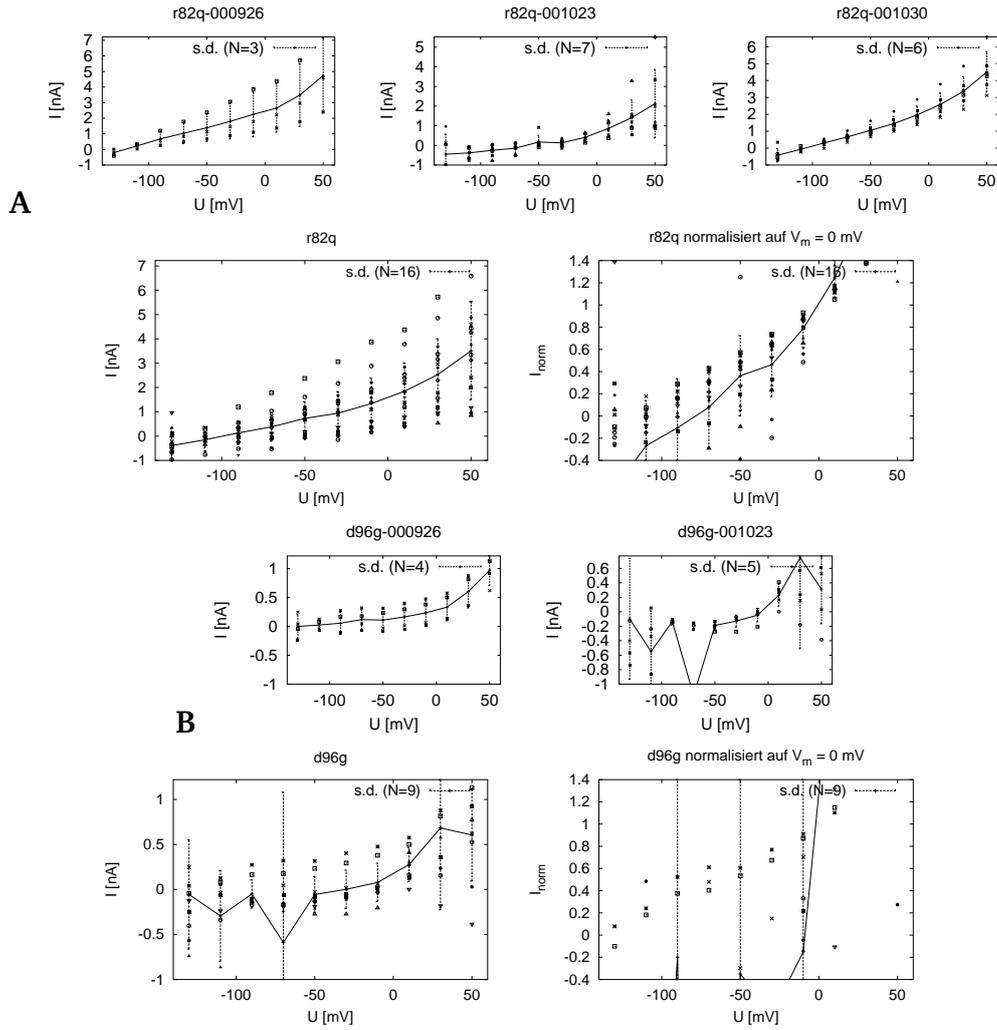


Abbildung 2.12: Darstellung der Originaldaten zur Ableitung des Photostroms von **A** R82Q und **B** D96G. Weitere Informationen siehe Legende Abb. 2.10.

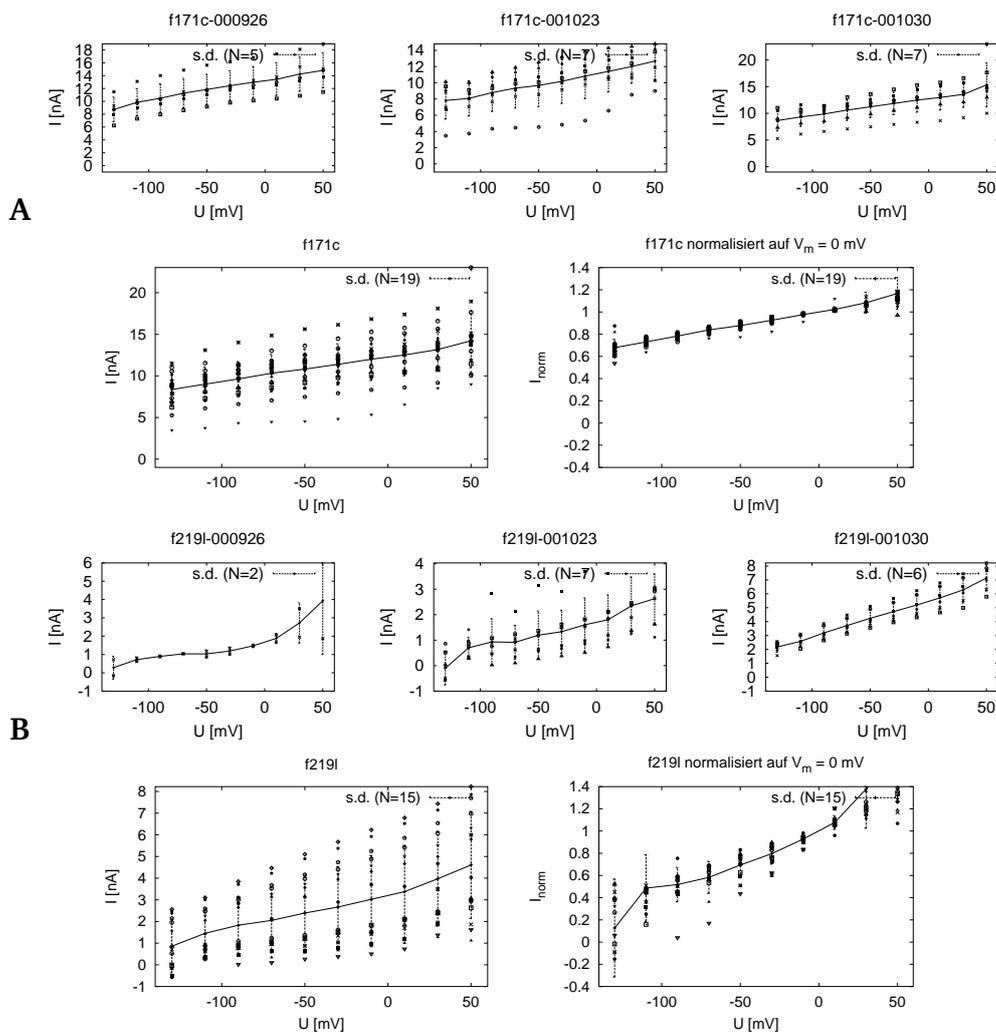


Abbildung 2.13: Darstellung der Originaldaten zur Ableitung des Photostroms von A F171C und B F219L. Weitere Informationen siehe Legende Abb. 2.10.

wohl Klasse II-Ströme für TRI gefunden werden, die eine deutlich höhere Amplitude aufweisen und dennoch einen starken Anstieg bei Depolarisation der Zelle zeigen (z.B. Abschnitt 2.3.4 und nicht gezeigte Daten).

### 2.3.7 Quantifizierung der heterologen Expression

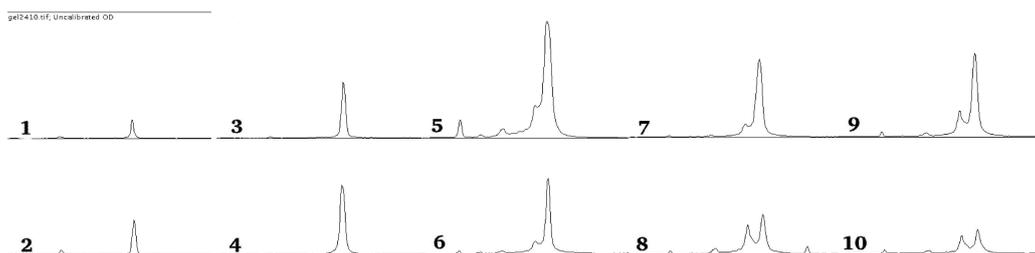
Zum Vergleich der Photoströme von wtBR und den Mutanten wird die Expression quantifiziert. Die exakte Vorgehensweise wird in Abschnitt 4.17.3 beschrieben. Nach Aufschluß der elektrisch vermessenen Zellen wird das Homogenat über fraktionierende Zentrifugation aufgetrennt. Die Membranfraktion wird elektrophoretisch aufgetrennt und das Proteinmuster nach Übertragung auf eine Membran mit einem BR-spezifischen Antikörper in Verbindung mit einer Biolumineszenzreaktion visualisiert („Western-Blot“).

Die ersten vier Spuren in einem solchen „Quantifizierungsgel“ enthalten bekannte Proteinnengen aus halobakterieller Purpormembran, woraus die Eichgerade ermittelt wird. Die weiteren Spuren enthalten die Membranfraktion der in einer Expressionsrunde erzeugten Retinalproteine. Zur Auswertung werden die Röntgenfilme nach Membranexposition digitalisiert und anschließend mit dem Computerprogramm *ImageJ* ausgewertet. Aus einem Schwärzungsprofil wird das Flächenintegral erstellt, das als Maß der Expression dient (Abbildung 2.14). Als Datengrundlage dienen die Ergebnisse von drei Expressionsrunden, die in Abschnitt 2.3.8 mit den entsprechenden Photoströmen korreliert werden.

Ein Vergleich der Expressionsraten zwischen den unterschiedlichen Experimenten zeigt hohe Abweichungen, obwohl die Bedingungen stets reproduziert werden. Dies läßt auf unterschiedliche Expressionsfähigkeiten der Oozyten unterschiedlicher Spendertiere schließen. Ein Blick in die einzelnen Experimente zeigt, daß die Expression der Proteine auch innerhalb einer Expressionsrunde auch von Oozyt zu Oozyt stark variieren. Damit werden die Meßpunkte mit einer relativ hohen Standardabweichung belastet.

<b>Experiment I</b>			
<b>Eichung</b>		<b>Probe</b>	<b>Protein/Zelle [ng]</b>
a	47.25	wtBR	2.82
b	0.30	TRI	8.02
$\chi^2$	1.56	R82Q	15.26
		D96G	8.28
		F171C	5.82
		F219L	7.15
<b>Experiment II</b>			
<b>Eichung</b>		<b>Probe</b>	<b>Protein/Zelle [ng]</b>
a	-0.25	wtBR	4.81
b	0.01	TRI	2.74
$\chi^2$	4.26E-4	R82Q	3.22
		D96G	2.22
		F171C	3.21
		F219L	1.79
<b>Experiment III</b>			
<b>Eichung</b>		<b>Probe</b>	<b>Protein/Zelle [ng]</b>
a	704.86	wtBR	13.70
b	16.62	TRI	15.03
$\chi^2$	1.36E3	R82Q	12.06
		D96G	4.24
		F171C	25.60
		F219L	9.70

*Tabelle 2.2:* Quantifizierung der Expression in *Xenopus*. Die Parameter a, b geben das Ergebnis der Eichung nach Formel  $y = a + bx$  wieder.  $\chi^2$  gibt das Maß der Güte der linearen Regression wieder und sollte möglichst klein sein.



*Abbildung 2.14:* Anwendung von *ImageJ* zur Vermessung der „Western-Blots“. Die Software bildet anhand der Schwärzung einzelner Spuren des „Western-Blots“ ein Profil für jede Spur. In der Auswertung dient das Flächenintegral der BR-Bande als Maß der Expression. Spuren: 1-4 Eichung, 5: wtBR, 6: TRI, 7: R82Q, 8: D96G, 9: F171C, 10: F219L (Experiment 2). In den Spuren 5-10 beobachtet man eine Aufspaltung der Bande, die vermutlich auf eine Degradation des Proteins zurückzuführen ist.

Mit Hilfe der Expressionsdaten wird die BR-Dichte in der Membran abgeschätzt. Im folgenden Abschnitt werden die Expressionsdaten mit den Photoströmen korreliert.

### 2.3.8 Korrelation von BR-Photoströmen mit Expressionsraten

Zur Korrelation der Expressionsdaten mit den Photoströmen werden zwei unterschiedliche Methoden angewandt und miteinander verglichen.

**Normalisiert** auf Menge BR/Zelle.

**Nicht normalisiert** auf Menge BR/Zelle.

**Methode Sets** Zunächst werden für jedes Experiment einzelne Mittelwerte mit Standardabweichung für die Stromspannungskurve ermittelt. Aus diesen wird ein Mittelwert mit Standardabweichung bestimmt. Die so erhaltenen Daten werden normalisiert auf die Masse BR/Zelle und unnormalisiert dargestellt, indem die Ströme durch die ermittelte Expressionsrate (ng BR/Zelle) geteilt werden.

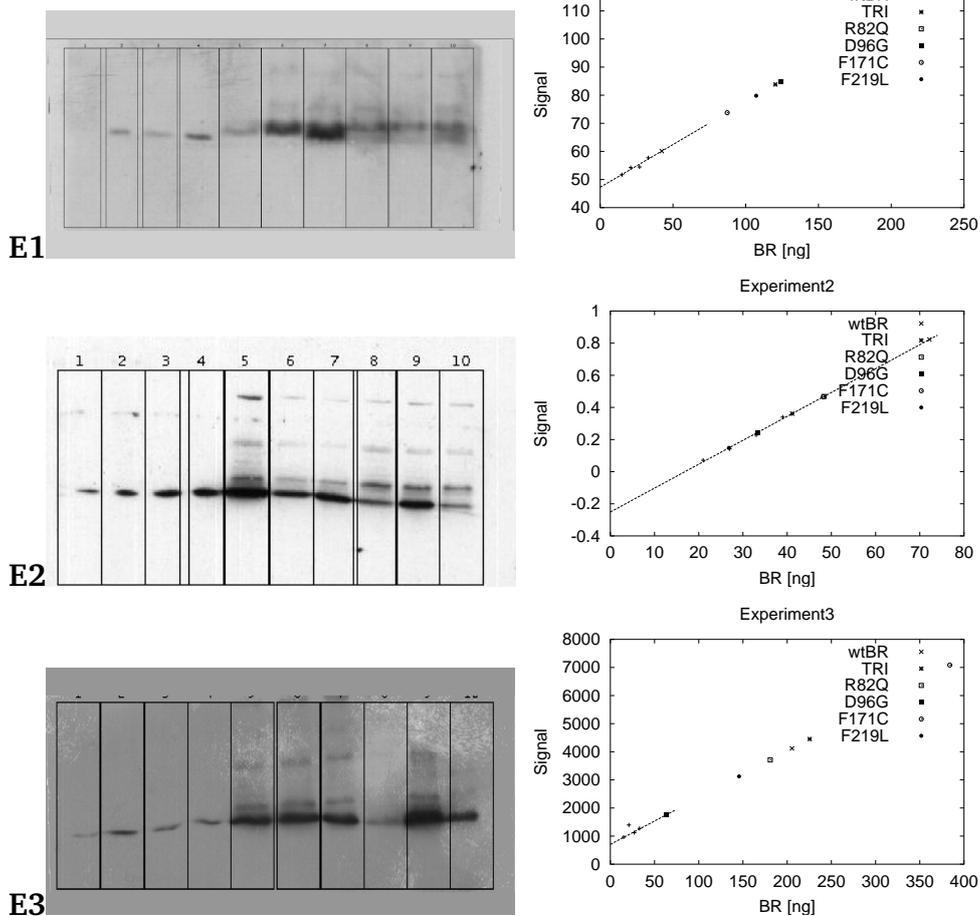


Abbildung 2.15: Quantifizierung der BR-Expression in *Xenopus laevis*. Gezeigt werden drei unabhängige Bestimmungen der BR-Konzentration in der Zellmembran (jeweils „Western-Blot“ und Auswertung). Die Messung der korrespondierenden Photoströme wird weiter unten besprochen.

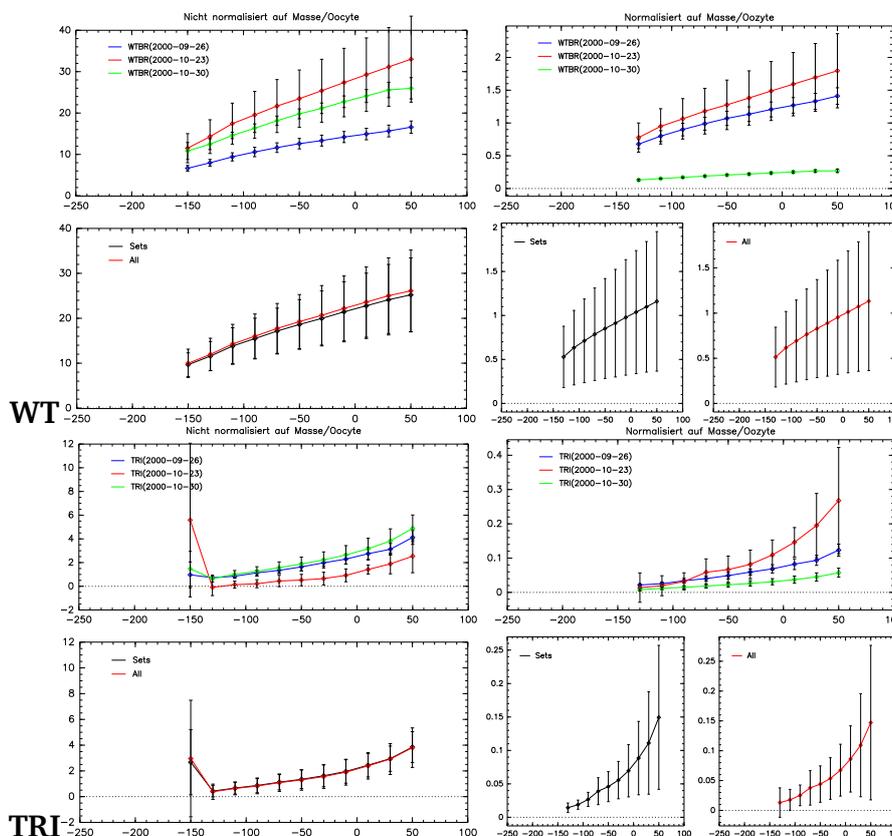


Abbildung 2.16: Korrelation der wtBR und TRI-Experimente.

**Methode All** Aus allen Quantifizierungsgelen wird ein Mittelwert gebildet, wobei die Gewichtung der Einzelexperimente in die Berechnung mit eingeht. Die Normalisierung erfolgt wie unter Methode Sets beschrieben.

In einigen Fällen lassen sich die Messungen durch Normierung auf die ermittelte Expressionsrate gut aufeinander abbilden (siehe Abbildungen 2.16, 2.17), wobei die Fehler der Methode Sets und All sich nicht erheblich unterscheiden. Leider tauchen häufig deutliche Ausreisser auf (z.B. Abbildung 2.16 A), die die gesamte Quantifizierung in Frage stellen. Wie mit den Daten verfahren werden kann wird im Diskussionsteil der Arbeit ausgiebig besprochen.

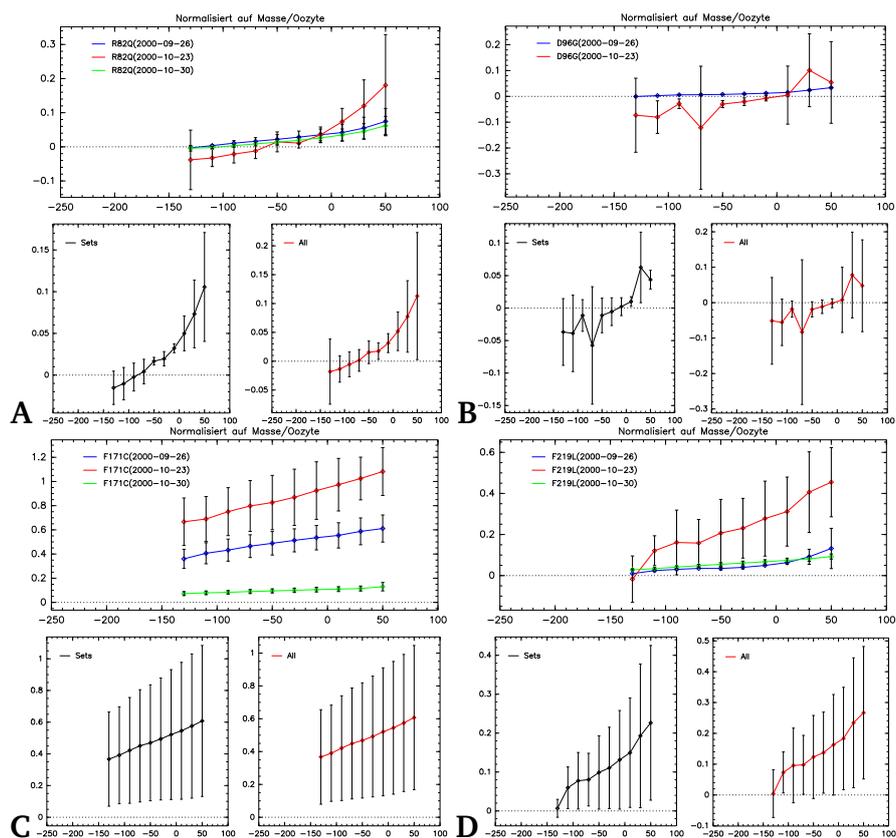
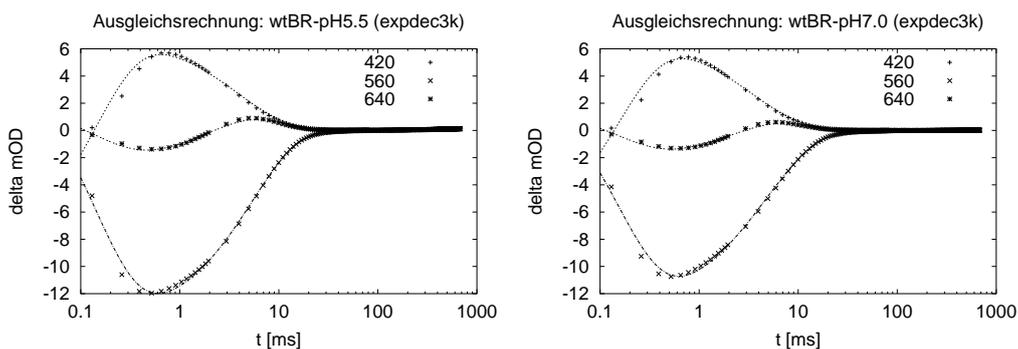


Abbildung 2.17: Korrelation der weiteren untersuchten Mutanten: A R82Q, B D96G, C F171C und D F219L. Die Berechnung erfolgt analog zu Abbildung 2.16.

## 2.4 Zeitaufgelöste Spektroskopie

Es wurden wtBR-Purpurchromophore sowie Membranfraktionen der Mutanten TRI (D96G/F171C/F219L), D96G, F171C und F219L aus *Halobacterium salinarum* mit Hilfe zeitaufgelöster Absorptionsspektroskopie untersucht. Auf diese Weise sollte ermittelt werden, ob und wie sich bei der Dreifachmutante der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Vergleich zu Wildtyp verändert. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten des Photozyklus erfolgte unter möglichst ähnlichen Bedingungen zu den elektrophysiologischen Messungen in *Xenopus laevis*. Dazu wurden die Membranfraktionen der untersuchten BR-Varianten in CO-Medium (pH 5.5, 3 mM Azid) resuspendiert.



**Abbildung 2.18:** Zeitabhängige Absorptionsspektroskopie von wtBR. Gezeigt werden die zeitlichen Verläufe der Absorptionsänderungen bei 410 nm (**M**), 560 nm (**BR**) und 640 nm (**O**) bei pH 5.5 und 7.0. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Ausgleichsrechnung nach einem exponentiellen Zerfall mit 3 Geschwindigkeitskonstanten. Experimentelle Bedingungen ähnlich zu elektrophysiologischen Messungen: CO-Medium, pH 5.5 (links) und pH 7.0 (rechts), je 3 mM Azid.

Gemessen werden Differenzspektren zwischen dem Zeitpunkt vor dem Blitz und den Absorptionen zum Zeitpunkt  $t=t_0 + \Delta t$  nach dem Blitz. Eine negative Absorption entspricht einer Abnahme einer Spezies, eine positive der Zunahme einer Spezies. Zur Auswertung der Spektren werden die zeitlichen Verläufe der Wellenlängen 420 (Intermediat **M**), 560 (Ausgangs-

zustand **BR**), und 640 nm (Intermediat **O**) gleichzeitig in einem exponentiellen Zerfall mit Hilfe der *Levenberg-Marquardt-Methode* optimiert (siehe Gleichung 2.7). Im angewendeten Modell werden die Zeitkonstanten  $t_i$  von allen Funktionen  $f_i$  als gleich und positiv gesetzt. Die Amplituden  $a_i$ ,  $b_i$  und  $c_i$  werden als variabel angenommen. Zur Einschätzung der Güte der Berechnung dienen die Residuen der Optimierung (siehe Anhang A).

$$f(a_i, b_i, c_i, k_i, t) = f(f_1, f_2, f_3) \quad (2.7)$$

$$f_1(a_i, t_i, t) = \sum_i a_i e^{-t/t_i} \quad (2.8)$$

$$f_2(b_i, t_i, t) = \sum_i b_i e^{-t/t_i}$$

$$f_3(c_i, t_i, t) = \sum_i c_i e^{-t/t_i}$$

Abbildung 2.18 zeigt den zeitlichen Verlauf nach Anregung der Probe. Tabelle 2.3 faßt die Amplituden und Zeitkonstanten für wtBR unter Anwendung der Modelle mit 3, 4 und 5 Zeitkonstanten zusammen. Zunächst werden die Zeitkonstanten aus dem Modell mit drei Zeitkonstanten zur Beschreibung verwendet. Für beide pH-Werte erkennt man nach dem Blitz einen Anstieg der Absorptionsspur bei 410 nm und einen Abfall der Absorption bei 560 nm. Der Zeitverlauf der beiden Absorptionen wird anfangs durch eine Zeitkonstante mit 0.16 ms beschrieben. Dabei handelt es sich um eine bekannte apparative Zeitkonstante, die durch die Trägheit des verwendeten Meßverstärkers hervorgerufen wird und damit die untere Grenze der Zeitauflösung der Apparatur bezeichnet, jedoch keine Informationen über die wirklichen Absorptionsänderungen birgt. Kleinere Zeitkonstanten, die bei Berechnungen mit einer höheren Anzahl an Freiheitsgraden auftreten, dürfen daher nicht beachtet werden. Der anfängliche Abfall der Absorption bei 640 ms, die im wesentlichen die Kinetik des **O**-Intermediats wiedergibt, ist auf das Ausbleichen von **BR** zurückzuführen, da bei 640 nm die Absorptionsmaxima von **BR** und **O** überlappen. Der erneute Anstieg der Absorption bei 640 nm, und damit die Bildung von **O** und **BR**, mit der Zeit-

	$\lambda$	p1	p2	p3	p4	p5	t1	t2	t3	t4	t5
wtBR-pH5.5	420	-16.50	3.04	3.78	-	-	0.15	2.70	6.09	-	-
	560	19.77	-1.82	-12.00	-	-	0.15	2.70	6.09	-	-
	640	4.59	-6.38	4.02	-	-	0.15	2.70	6.09	-	-
	420	27.50	-27.27	3.48	3.90	-	0.08	0.16	2.30	5.80	-
	560	31.42	5.83	0.18	-13.51	-	0.08	0.16	2.30	5.80	-
	640	-8.43	8.44	-6.45	3.70	-	0.08	0.16	2.30	5.80	-
	420	83.12	-82.19	-5.95	8.66	4.14	0.10	0.12	1.15	1.52	5.87
	560	38.46	-6.18	2.58	-2.30	-13.16	0.10	0.12	1.15	1.52	5.87
	640	-13.29	14.59	10.96	-16.08	3.19	0.10	0.12	1.15	1.52	5.87
wtBR-pH7.0	420	-14.90	4.33	2.35	-	-	0.16	2.75	7.10	-	-
	560	17.09	-4.46	-8.25	-	-	0.16	2.75	7.10	-	-
	640	4.01	-4.51	2.36	-	-	0.16	2.75	7.10	-	-
	420	26.73	-29.12	4.54	2.66	-	0.09	0.16	2.37	6.49	-
	560	22.41	5.61	-2.21	-10.04	-	0.09	0.16	2.37	6.49	-
	640	-8.37	8.85	-4.84	2.35	-	0.09	0.16	2.37	6.49	-
	420	66.03	-69.57	4.43	2.54	0.11	0.11	0.14	2.55	5.70	42.13
	560	30.97	-5.45	-0.62	-11.16	-0.24	0.11	0.14	2.55	5.70	42.13
	640	-21.06	21.82	-5.61	3.15	-0.01	0.11	0.14	2.55	5.70	42.13

Tabelle 2.3: Zeitkonstanten des Photozyklus von wtBR. Gezeigt werden die Amplituden (p1-p5) und Zeitkonstanten für die Optimierungsrechnung der zeitlichen Verläufe der Absorptionen 410, 560 und 640 nm mit drei, vier und fünf Zeitkonstanten bei den pH-Werten 5.5 und 7.0.

konstante von 2.7 ms erfolgt zu einem Zeitpunkt, in dem der Zerfall des Intermediats **M** bereits eingesetzt hat. Da der Zerfall des **M**-Intermediats außerdem mit der Rückkehr des Ausgangszustands **BR** bei 560 nm mit einer Zeitkonstante von 6 ms korreliert, wird ein biexponentieller Zerfall von **M** nach dem Reaktionsschema



angenommen, womit das Intermediat **N** unter den gegebenen Bedingungen spektroskopisch nicht erkannt wird. Dies deckt sich mit der Literatur. Die positive Amplitude der Absorption bei 640 nm ist erneut auf eine Überlagerung der Absorptionsmaxima von **BR** und **O** zurückzuführen, da in dieser Zeitspanne die Summe der beiden Spezies über dem Niveau des Ausgangszustands liegt.

Betrachtet man die Ergebnisse der Optimierungsrechnungen mit vier und fünf Zeitkonstanten, so wird ersichtlich, daß diese nicht für die Beschreibung des Systems notwendig sind. Nach Elimination der kleinsten Zeitkonstante und der apparativen Zeitkonstante liefert die Berechnung mit vier Exponentialfunktionen das Ergebnis des einfacheren Modells. Auch können in der zeitlichen Auflösung des Instruments Zeitkonstanten, die sich nur geringfügig unterscheiden, und damit die entsprechenden Amplituden, zusammengefaßt werden. Ein Beispiel hierfür sind  $t_3$  und  $t_4$  für wtBR bei pH 5.5, die in der Summe  $t_2$  aus der Rechnung mit drei Zeitkonstanten ergeben. Zusammenfassend für den Photozyklus von wtBR können unter den gegebenen Bedingungen folgende Aussagen getroffen werden:

- Drei Zeitkonstanten sind ausreichend zur Beschreibung der gemessenen Absorptionskurven.
- Bildung des Intermediats **O** mit  $\tau = 3$  ms findet während des Zerfalls von **M** statt.
- Der Zerfall von **M** mit  $\tau = 6$  ms korreliert mit der Rückkehr von **BR** und bestimmt damit die Dauer des Photozyklus.
- Das Intermediat **N** ist unter diesen Bedingungen nicht erkennbar.

- Bei Wechsel von pH 5.5 auf pH 7.0 ändern sich die Zeitkonstanten nicht, womit der Photozyklus im untersuchten Bereich pH-unabhängig verläuft.

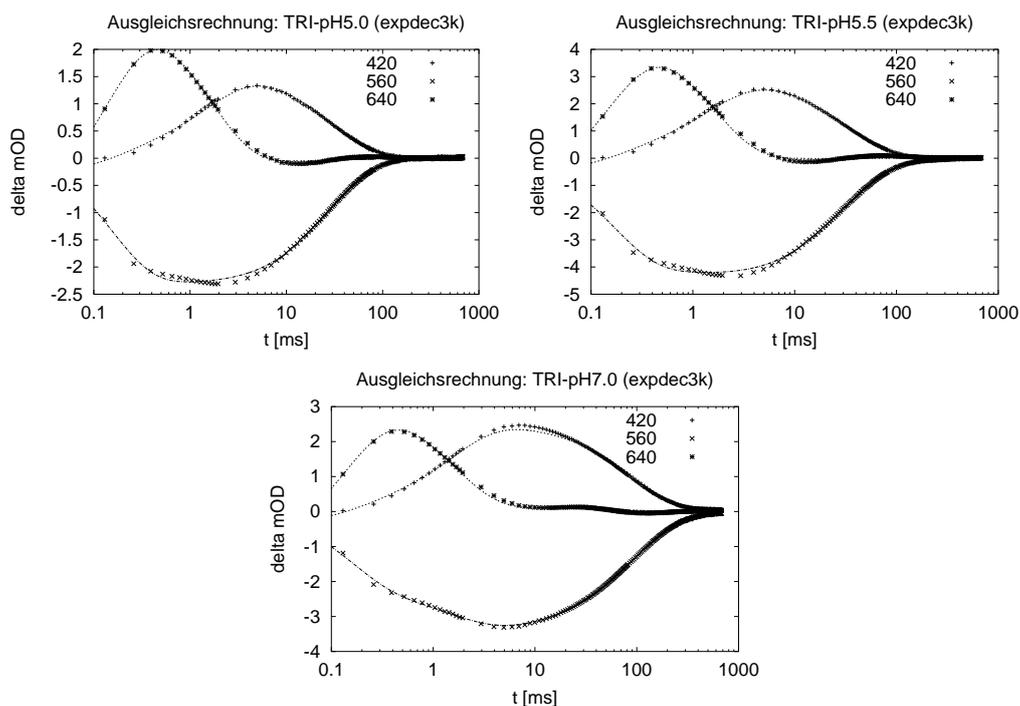


Abbildung 2.19: Zeitabhängige Absorptionsspektroskopie von TRI bei den pH-Werten 5.0, 5.5 und 7.0. Weitere Bedingungen vgl. Abbildung 2.18.

Die Messungen der Mutanten von BR werden auf analoge Weise ausgewertet, wobei die Beschränkung auf ein Modell mit drei Exponentialfunktionen keinen großen Fehler darstellt, v.a. da die zentrale Frage an die spektroskopischen Experimente die nach dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ist. Die Mutante TRI (siehe Abbildung 2.19) wird neben den pH-Werten 5.5 und 7.0 auch bei pH 5.0 vermessen, da Messungen der Mutante unter anderen Bedingungen (150 mM Kaliumchlorid, 50 mM Natriumcitrat, pH 5.0) einen Wechsel des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts von **M**- auf **O**-Zerfall zeigen [TITTOR et al. 2002]. Unter den gegebenen Bedingungen (CO-Medium: 80 mM Natriumchlorid, 3 mM Natriumazid, 20

pH	$\lambda$	p1	p2	p3	t1	t2	t3
5.0	420	-0.43	-1.63	1.65	0.15	1.67	31.22
	560	2.64	0.10	-2.41	0.15	1.67	31.22
	640	-4.17	3.01	-0.08	0.15	1.67	31.22
5.5	420	-0.78	-2.97	3.04	0.17	1.58	34.64
	560	4.40	0.44	-4.56	0.17	1.58	34.64
	640	-6.75	5.06	-0.02	0.17	1.58	34.64
7.0	420	-0.52	-2.55	2.55	0.15	1.58	99.41
	560	2.44	1.30	-3.48	0.15	1.58	99.41
	640	-4.92	3.29	0.11	0.15	1.58	99.41

Tabelle 2.4: Zeitkonstanten des Photozyklus von TRI. Optimierung erfolgt nach einem exponentiellen Zerfall mit drei Zeitkonstanten (t1, t2, t3) und den Amplituden p1, p2 und p3.

mM TEACl, 5 mM Bariumchlorid, 10 mM Cäsiumchlorid, 2 mM Calciumchlorid, 10 mM MES, pH 5.0) ist dieser Wechsel nicht zu beobachten. Auch hier ist die apparative Konstante mit 0.16 ms zu finden und wird außer Acht gelassen. Der initiale Anstieg und rasche Zerfall einer Absorption bei 640 nm ist auf eine lichtgetriebene Gleichgewichtsverschiebung zwischen dem *cis*-Zyklus und dem *trans*-Photozyklus der Mutante (vgl. Abbildung 1.5) zurückzuführen. Der Zerfall dieser Form mit rund 2 ms erfolgt pH-unabhängig. Die zweite wichtige Zeitkonstante mit etwa 30 ms bei pH 5.0 und 5.5 beschreibt den Zerfall von Intermediat **M** und die Rückbildung von **BR**. Daraus ergibt sich, daß hier der Photozyklus, wie im Wildtyp, auch im Sauren vom Zerfall des Intermediats **M** bestimmt wird. Letzterer wird beim Wechsel auf pH 7 mit einer Zeitkonstante von 100 ms deutlich verlangsamt. In Vergleich zum Wildtyp verlangsamt sich der Zerfall vom **M** um Faktor 5 im Sauren bis Faktor 16 bei pH 7.0.

Sowohl in der Größe der Zeitkonstanten als auch in dem Fehlen einer pH-Abhängigkeit weist die Mutante R82Q die Eigenschaften des Wildtyps auf.

Die Mutation D96G bewirkt eine eindeutige Verlängerung des Photozyklus. Bei pH 5.5 erfolgt der Zerfall des **M**-Intermediats zu 75 % mit einer Zeitkonstante von 20.7 ms und zu 25 % mit einer Zeitkonstante von 67.4 ms. Die Rückkehr von **BR** jedoch erfolgt zu 43 % mit 67.4 ms. Die-

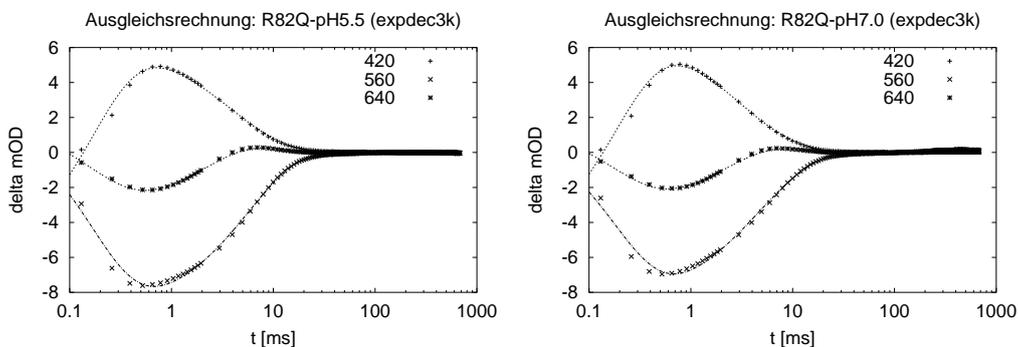


Abbildung 2.20: Zeitabhängige Absorptionsspektroskopie von R82Q. Weitere Bedingungen vgl. Abbildung 2.18.

pH	$\lambda$	p1	p2	p3	t1	t2	t3
5.5	420	-12.62	2.64	3.45	0.18	2.46	6.64
	560	11.18	-1.19	-7.76	0.18	2.46	6.64
	640	5.19	-4.73	1.50	0.18	2.46	6.64
7.0	420	-12.64	4.12	2.40	0.20	2.52	7.35
	560	9.96	-2.84	-5.57	0.20	2.52	7.35
	640	4.87	-4.32	1.19	0.20	2.52	7.35

Tabelle 2.5: Zeitkonstanten des Photozyklus von R82Q bei pH 5.5 und 7.0. Amplituden: p1, p2, p3. Zeitkonstanten: t1, t2, t3.

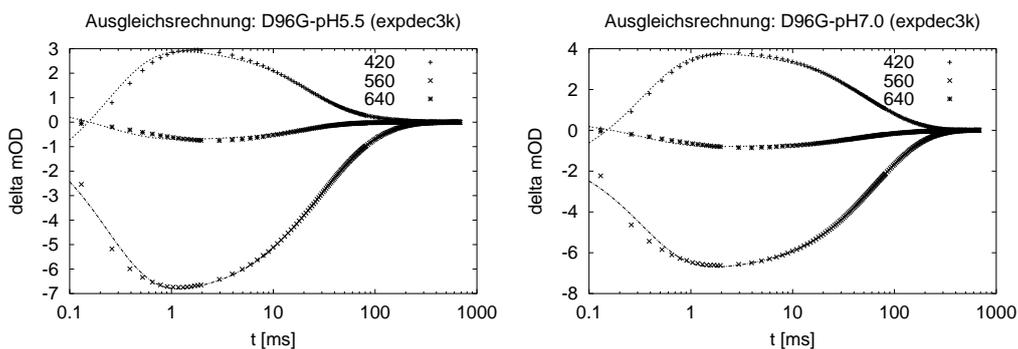


Abbildung 2.21: Zeitabhängige Absorptionsspektroskopie von D96G. Weitere Bedingungen vgl. Abbildung 2.18.

pH	$\lambda$	p1	p2	p3	t1	t2	t3
5.5	420	-5.73	2.32	0.74	0.24	20.71	67.37
	560	7.09	-4.12	-3.01	0.24	20.71	67.37
	640	1.44	-0.69	-0.06	0.24	20.71	67.37
7.0	420	-6.07	2.26	1.64	0.34	46.36	91.03
	560	5.95	-2.99	-3.92	0.34	46.36	91.03
	640	1.35	-0.53	-0.29	0.34	46.36	91.03

Tabelle 2.6: Zeitkonstanten des Photozyklus von D96GQ bei pH 5.5 und 7.0. Amplituden: p1, p2, p3. Zeitkonstanten: t1, t2, t3.

se Divergenz weist darauf hin, daß das Intermediat N im Photozyklus von D96G eine wesentliche Rolle spielt. Mit Wechsel auf pH 7 vergrößern sich die Zeitkonstanten auf 40 bzw. 90 ms, wobei der Anteil der langsameren Komponente auf 42 % steigt.

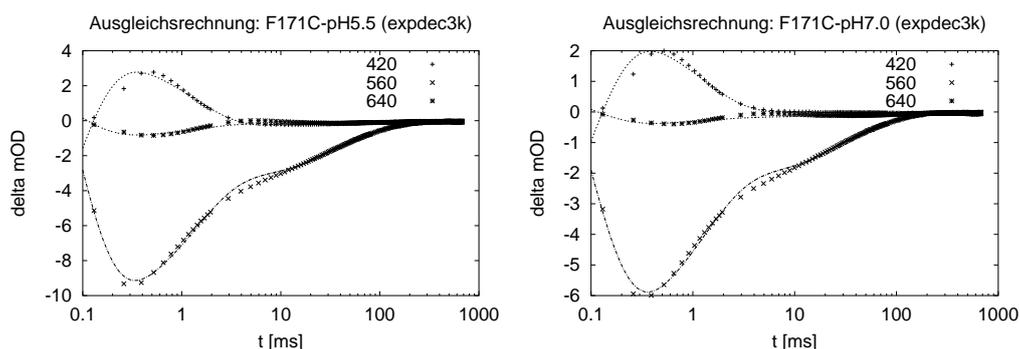


Abbildung 2.22: Zeitabhängige Absorptionsspektroskopie von F171C. Weitere Bedingungen vgl. Abbildung 2.18.

Im ersten Teil der Photoreaktion ähnelt F171C stark dem Wildtyp. Der M-Zerfall mit  $\tau = 1.5$  ms geht mit der Rückkehr des Grundzustands einher. Im zweiten Teil der Photoreaktion jedoch bleibt nach erfolgtem Zerfall von M ein erheblicher Anteil der Absorptionsspur bei 560 nm ausgebleicht, um dann mit einer Zeitkonstante von 30 ms zum Grundzustand zurückzukehren. Es handelt sich hierbei um ein typisches Beispiel, in dem der Photozyklus allein durch Zerfall des Intermediats N (hier mit einer Zeitkonstante von 50 ms) bestimmt wird, das spektral mit einem Absorptionsmaximum

pH	$\lambda$	p1	p2	p3	t1	t2	t3
5.5	420	-19.46	4.27	-0.33	0.08	1.36	50.63
	560	29.27	-7.71	-3.49	0.08	1.36	50.63
	640	4.30	-0.88	-0.18	0.08	1.36	50.63
7.0	420	-11.06	2.92	-0.01	0.09	1.26	41.99
	560	15.78	-5.28	-2.23	0.09	1.26	41.99
	640	1.62	-0.29	-0.19	0.09	1.26	41.99

Tabelle 2.7: Zeitkonstanten des Photozyklus von F171C bei pH 5.5 und 7.0. Amplituden: p1, p2, p3. Zeitkonstanten: t1, t2, t3.

bei 560 nm nicht von BR unterschieden werden kann. Eine relevante pH-Abhängigkeit ist nicht zu beobachten.

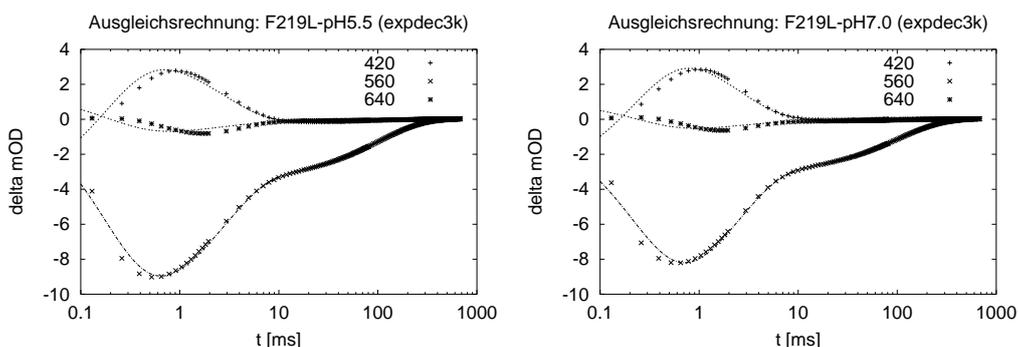


Abbildung 2.23: Zeitabhängige Absorptionsspektroskopie von F219L. Weitere Bedingungen vgl. Abbildung 2.18.

	$\lambda$	p1	p2	p3	t1	t2	t3
5.5	420	-8.15	4.12	-0.17	0.19	2.84	104.08
	560	11.70	-7.56	-3.38	0.19	2.84	104.08
	640	2.44	-0.79	-0.13	0.19	2.84	104.08
7.0	420	-7.84	4.41	0.00	0.25	2.54	104.12
	560	10.23	-7.67	-3.00	0.25	2.54	104.12
	640	1.84	-0.62	-0.13	0.25	2.54	104.12

Tabelle 2.8: Zeitkonstanten des Photozyklus von F219L bei pH 5.5 und 7.0. Amplituden: p1, p2, p3. Zeitkonstanten: t1, t2, t3.

Ebenso wie bei Mutante F171C ist der Photozyklus von F219L durch den Zerfall des Intermediats N geprägt, nur betragen hier die Zeitkonstanten 2.5 (M-Zerfall) und 100 ms (N-Zerfall), wobei keine relevante pH-Abhängigkeit beobachtet wird.

Zusammenfassend läßt sich anmerken, daß unter den experimentellen Bedingungen der Photozyklus von wtBR, TRI, R82Q und D96G durch den Zerfall von Intermediat M, bei F171C und F219L durch Zerfall des Intermediats N, bestimmt wird. pH-Abhängigkeit zeigen nur die Photozyklen von TRI, R82Q und R96G (vgl. Tabelle 2.9).

Eigenschaft	wtBR	TRI	R82Q	D96G	F171C	F219L
limitierend	M	M	M	N	N	N
pH-abhängig	-	+	+	+	-	-

Tabelle 2.9: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der spektroskopischen Untersuchung.

## 2.5 ATP-Synthese durch TRI-enthaltende Zellen

Die Mutante TRI besitzt in Grundzustand bereits eine Konformation, die den späten Intermediaten des Photozyklus gleicht. Bei wtBR und anderen bekannten Mutanten beobachtet man eine größere Konformationsänderung beim Übergang von Intermediat M nach N, die bei TRI nicht zu beobachten ist. Andererseits weiss man aus Untersuchungen der Transportaktivität des TRI-enthaltenden Mutationsstammes, daß die Mutante, dem Wildtyp vergleichbar Protonen aus den Zellen transportiert [TITTOR et al. 2002]. Da diese Messungen im Routinetest unter Zerstörung des Membranpotentials erfolgen stellt sich die Frage nach der elektrischen Triebkraft (EMK) des Prozesses, denn es ist bislang noch nicht gelungen, den TRI-Stamm rein phototroph zu kultivieren und damit die photobiologische Effizienz des mutierten BRs zu belegen. Kann also TRI auch in der Zelle eine protomotorische Kraft erzeugen, die ausreichend groß ist, um zelluläre Prozesse antreiben? Die Frage wird durch einen Vergleich des hal-

obakteriellen Stamms S9 mit dem TRI-Stamm in ihrer lichtgetriebenen Syntheserate von ATP beantwortet. Ergibt sich ein gravierender Unterschied in der ATP-Bildungsrate der beiden BR-Varianten, so kann dadurch die Wichtigkeit der ausgeprägten Konformationsänderung während des Photozyklus für den Transportmechanismus abgeschätzt werden, anderenfalls bleibt die Frage nach der Bedeutung der Konformationsänderung bestehen (vgl. Abschnitt 1.1.2).

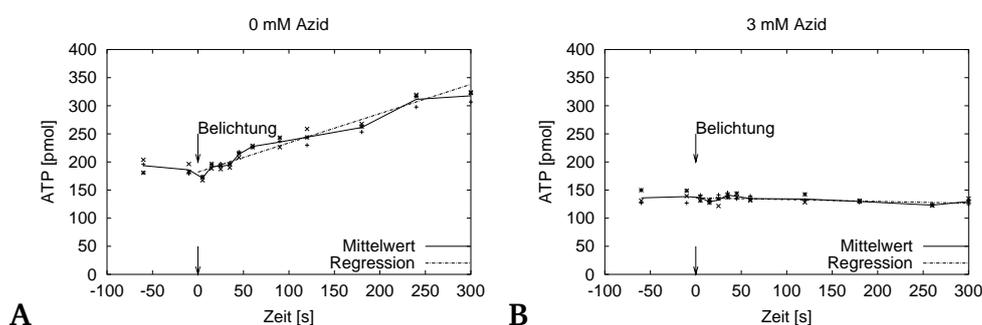


Abbildung 2.24: Einfluß von Azid auf die ATP-Syntheserate der TRI-Mutante in *Halobacterium salinarum*. Experimentelle Bedingungen: Basalsalz, pH 5.5, **A** ohne/**B** mit 3 mM Natriumazid. Belichtung erfolgt zum Zeitpunkt  $t = 0$  ms durch einen OG515-Filter (Schott) mit  $19.2 \text{ mW cm}^{-2}$ . In Gegenwart von Natriumazid ist keine ATP-Synthese erkennbar.

Zunächst wird versucht, die Gegebenheiten der elektrophysiologischen Messungen möglichst genau abzubilden. Da es sich um *in vivo*-Messungen mit Halobakterienzellen handelt erfolgen die Experimente unter Hochsalzbedingungen. Eine stationäre Kultur der Archaea wird nach Zentrifugation in Basalsalz bei pH 5.5 resuspendiert. Eine Verwendung von 3 mM Azid in der Zellsuspension verhindert die Bildung von ATP unter Belichtung und kann daher nicht eingesetzt werden (siehe Abbildung 2.24). Dies ist auf erste Sicht nicht weiter verwunderlich, da die inhibierende Wirkung von Azid auf die ATP-Synthase aus anderen Organismen bekannt ist. Unstimmigkeiten ergeben sich jedoch zu einer älteren Veröffentlichung, in der berichtet wird, die ATP-Synthetase von *Halobacterium salinarum* sei unempfindlich gegen Azid [NANBA und MUKOHATA 1987].

In den Abbildungen 2.25 A und 2.25 B wird die ATP-Bildung in S9 und einem TRI-Stamm unter unterschiedlich starken Lichtbedingungen (je 50, 70 und 100 % von  $19.2 \text{ mW cm}^{-2}$ ) bei pH 5.5 miteinander verglichen. Durch lineare Regression des Anstiegs der ATP-Konzentration innerhalb der ersten 45 s erhält man mit der Steigung der Geraden die ATP-Bildungsrate in  $10^{-3} \frac{\text{ATP}}{\text{BR}\dots}$ . Es zeigt sich, daß TRI die ATP-Bildung zu rund 85 % des Wildtyps erfüllen kann (siehe Abbildung 2.25 C).

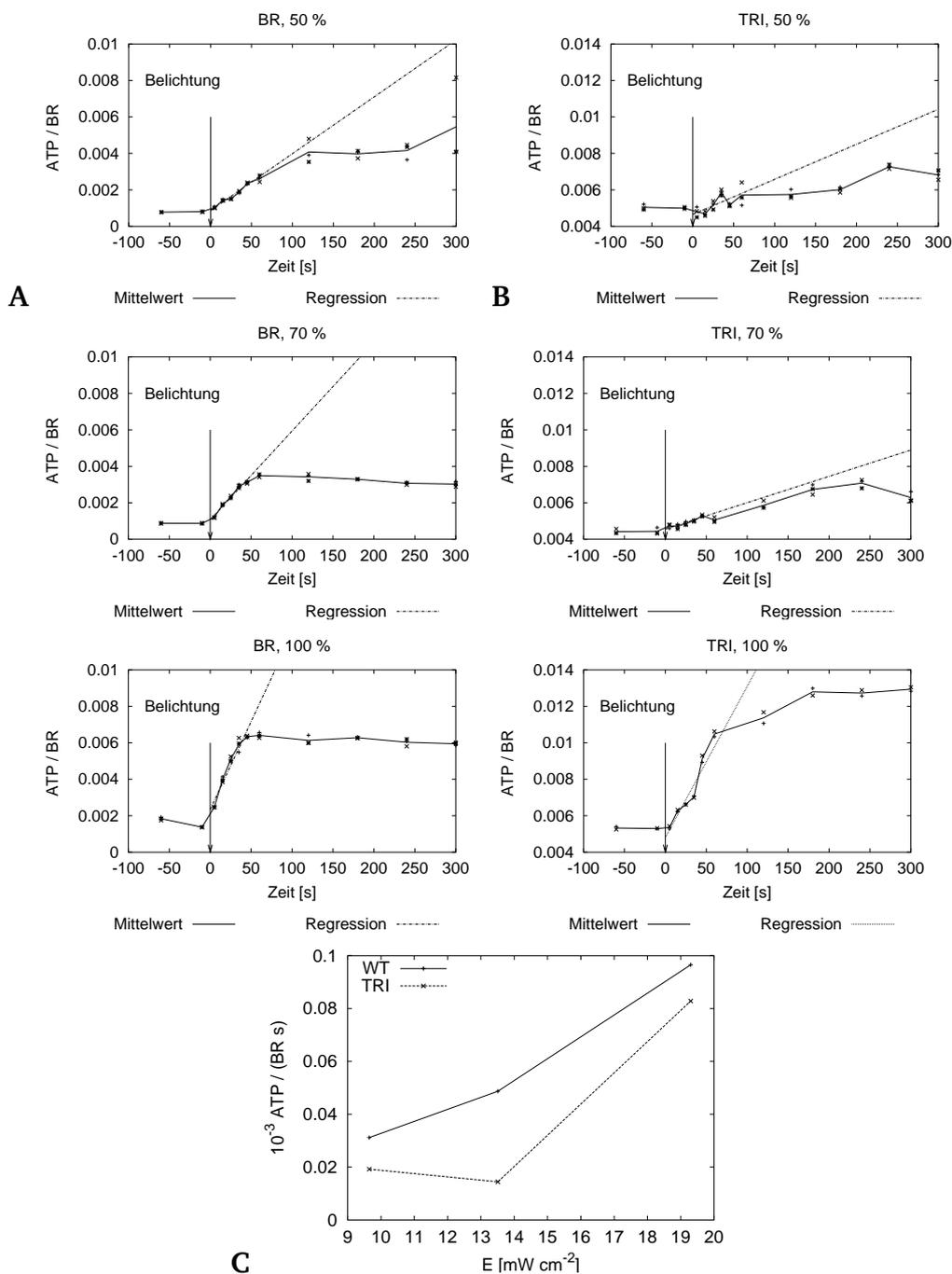


Abbildung 2.25: Ermittlung der ATP-Syntheseraten für wtBR **A** und TRI **B** in Basalsalz bei pH 5.5. **C** Auftragung der ATP-Bildungsraten von wtBR und TRI. Das Diagramm zeigt die experimentellen Ergebnisse aus **A** und **B**. Die ATP-Syntheserate wird  $[\frac{10^{-3} \text{ATP}}{\text{BRs}}]$  für die eingesetzten Lichtintensitäten 50, 70 und 100% (max.  $19.2 \text{ mW/cm}^2$ ) angegeben und liegt etwa in der gleichen Größenordnung (WT:TRI = max. 0.85).

## 2.6 Charakterisierung von PCHA2

Aufgrund von Homologiebetrachtungen werden im Genom von *Halobacterium salinarum* zwei putative Kaliumkanalgene ausgemacht (pchA1: OR3596F, pchA2: OE1931R). Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, den offenen Leserahmen von pchA2 heterolog in Oozyten von *Xenopus laevis* zu exprimieren und mit Hilfe der TEVC-Methode elektrophysiologisch zu charakterisieren. Es handelt sich um einen einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanal.

### 2.6.1 Homologiebetrachtungen zu PCHA2

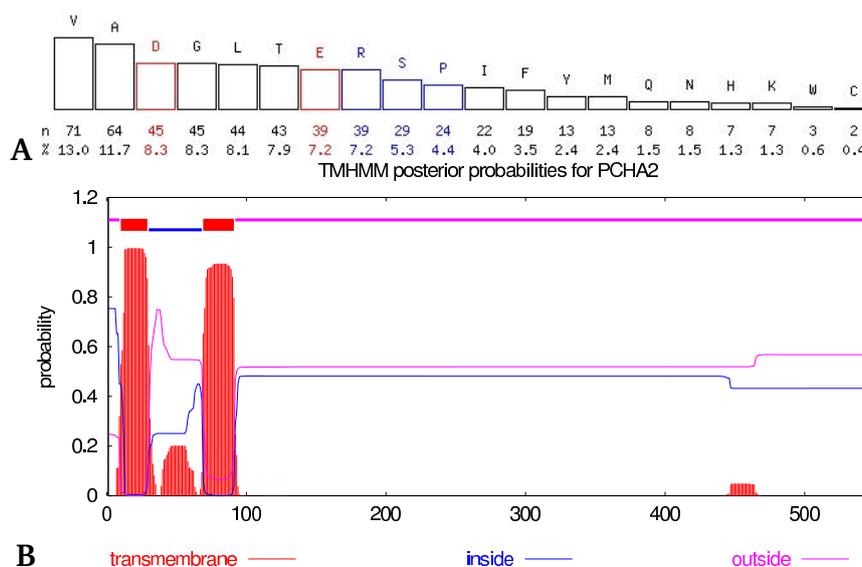


Abbildung 2.26: Bioinformatische Untersuchung von *pcha2*. **A** Aminosäurezusammensetzung von PCHA2 (OE1931R). Die Sequenz des putativen Kaliumkanals weist eine für halobakterielle Proteine typische Verteilung der Aminosäuren auf, wodurch das Vorliegen eines funktionellen Gens wahrscheinlicher wird. **B** Vorhersage der Sekundärstruktur (TMHMM). Die Vorhersage der Sekundärstruktur zeigt zwei Transmembranhelices und eine lange C-terminale Sequenz, deren Funktion unbekannt ist.

Die Aminosäuresequenz des identifizierten Leserahmens besitzt eine Länge von 1635 Basen. Aus der Aminosäurezusammensetzung ergibt sich

ein pI-Wert von 4.5 für das Protein, und auch in der Häufigkeit der verschiedenen Aminosäuren zeigt sich die Neigung halophiler Organismen, eine hohe Anzahl saurer Aminosäuren für ihre Proteine zu verwenden. Die Voraussage von Transmembranhelices für den offenen Leserahmen mit Hilfe der Software TMHMM [KROGH et al. 2001] ergibt zwei Transmembrandomänen und einen 450 Aminosäure-langen C-terminalen Rest auf der cytoplasmatischen Seite. Damit lässt sich das Kanalprotein in die Klasse der 2-TM-Kaliumkanäle einordnen, die in der Regel als Einwärtsgleichrichter wirken (siehe Abbildung 1.7). Mit Hilfe der Daten wird eine Vorhersage der Sekundärstruktur des Proteins möglich (J. Tittor, unveröffentlichtes Modell). Abbildung 2.27 zeigt beiden Transmembrandomänen, die einen kurzen  $\alpha$ -helikalen Bereich einschließen, der die typische Porensequenz TGYG der Kaliumkanäle an Position 54-57 aufweist.

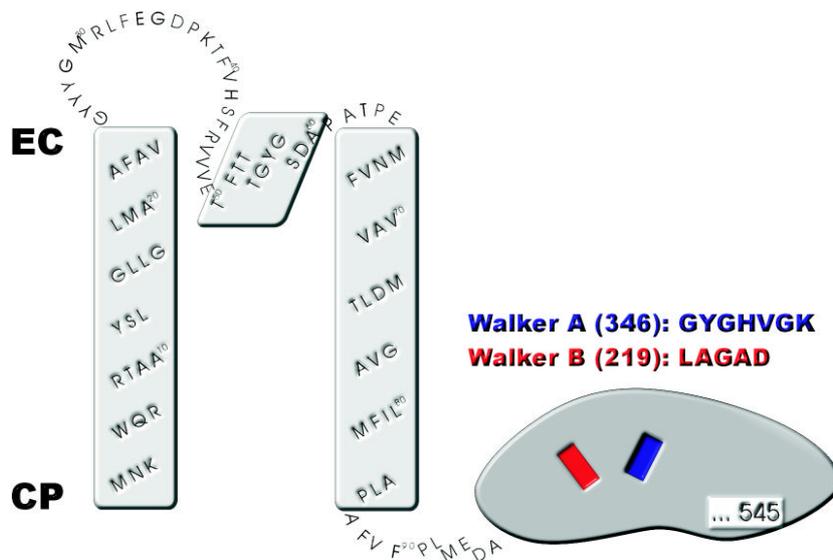


Abbildung 2.27: Vorhersage der Sekundärstruktur von PCHA2 (J Tittor, unveröffentlichtes Modell). Die beiden Transmembranhelices umgeben eine  $\alpha$ -Helix, die die Porenregion enthält. Am C-terminalen Ende befinden sich rund 450 Aminosäuren, die ein ATP-Bindemotiv enthalten.

Über die Funktion der restlichen 450 Aminosäuren liegen bislang keine Informationen vor. Eine CDART-Suche<sup>1</sup> zeigt je zwei trkA-Domänen, die in jeweils in eine TrkA-N- und eine TrkA-C-Domäne unterteilt sind (siehe Tabelle 2.10). TrkA-Domänen bieten vermutlich eine Bindestelle für NAD und einen weiteren unbekanntem Liganden, jedoch lassen sich keine weiteren konkreten Hinweise finden. Weiterhin enthält das Protein eine Nukleotid-bindende Tasche<sup>2</sup>, die anhand der Walkersequenzen A (GYGHVGGK) an Position 346 und B (LAGAD) an Position 219 ausgemacht werden kann. Daher ist es möglich, daß die Regulation des Kaliumkanals mit den Energiehaushalt der Zellen verbunden ist.

Domäne/Motiv	Region
Selektivitätsfilter	TM1 ... TGYG ... TM2 (53-56)
Walker-Motiv A	... GYGxxGK (345-351) ...
Walker-Motiv B	... LAGAD (219-223) ...
TrkA-1	... trkA-N (102-113)-40aa-trkA-C (153-328) ...
TrkA-2	... trkA-N (363-373)-1aa-trkA-C(375-542) ...

Tabelle 2.10: Homologe Domänen in PCHA2.

## 2.6.2 Elektrische Ableitungen des Kaliumkanals PCHA2 in *Xenopus laevis*

Die funktionelle Charakterisierung des Genprodukts erfolgte im heterologen Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten nach der für Bakteriorhodopsin bewährten Methode (Klonierung des offenen Leserahmens in pGEMHE, *in-vitro*-Transkription und Injektion der cRNA). Die Expression des Kanalproteins mit einer 2-3 tägigen Inkubation der Zellen etwas schneller als bei Bakteriorhodopsin. Eine fortgesetzte Inkubation führt zur Zerstörung der Zellen. Die Meßdaten wurden in OR III-Medium für uninjizierte Zellen und injizierte Zellen unter den gleichen Bedingungen aufgenommen. Der Effekt wird durch Differenzbildung der jeweiligen Stromantworten visualisiert.

<sup>1</sup> CDART: Conserved Domain Architecture Retrieval Tool. Dieser Internetdienst untersucht eine gegebene Proteinsequenz auf homologe Regionen bekannter Funktion (NCBI.)

<sup>2</sup>engl. nucleotide binding fold, NBF.

### 2.6.3 Funktion von PCHA2

Als Kriterium, nach dem PCHA2 eine Funktion zugewiesen werden kann, dient ein äquidistanter Spannungssprung vom Haltepotential  $V_H$ . Innerhalb des zugänglichen Meßfensters wird daher der zeitliche Verlauf der Stromantwort durch PCHA2 bei den Spannungen  $V_H \pm 60$  mV betrachtet. Es zeigt sich, daß die Leitfähigkeit des Kanals in Einwärtsrichtung in Kaliumpuffer um Faktor 6 höher ist als in Auswärtsrichtung ist (siehe Abbildung 2.28). Somit erfüllt das Kanalprotein PCHA2 die Anforderungen an einen einwärts-gleichrichtenden Kanal, der bevorzugt Kaliumionen in die Zelle einströmen läßt.

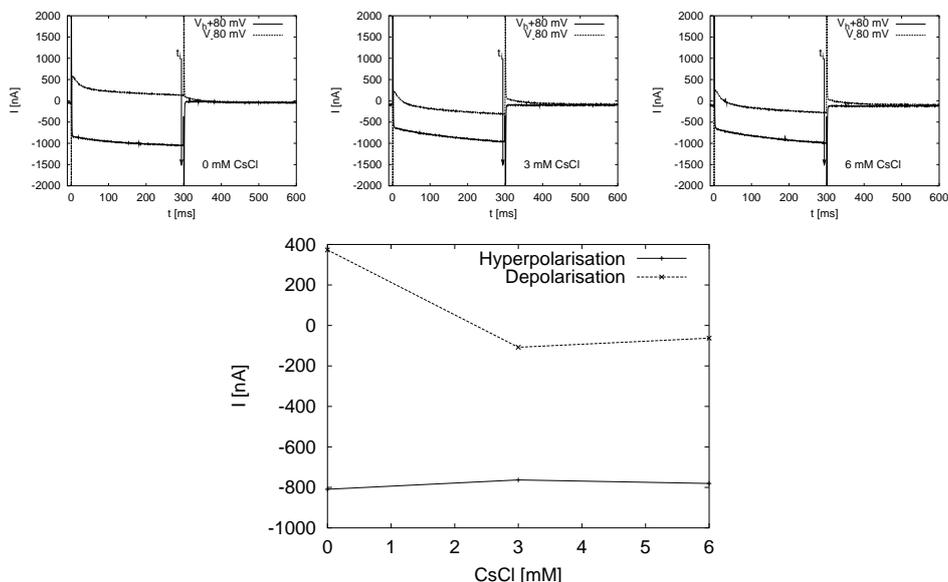


Abbildung 2.28: Nachweis der Einwärts-Gleichrichtung von PCHA2. Bei Beobachtung eines äquidistanten Spannungssprungs von  $\pm 80$  mV vom Haltepotential  $V_H = -20$  mV übertrifft der resultierende Einwärtsstrom die Größe des Auswärtsstroms um Faktor 6 und belegt eine einwärts-gleichrichtende Funktion des Kanals.

### 2.6.4 Einfluß der Kaliumkonzentration auf PCHA2

Der Einfluß der externen Kalium-Ionenkonzentration auf die Leitfähigkeit von PCHA2 wird durch Messung der Strom-Spannungs-Kurve mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen in der Badlösung bei pH 7.4 bestimmt. Dazu werden anteilig ein Natriumpuffer [CAO et al. 1992] und Kaliumpuffer (gleiche Zusammensetzung, jedoch Austausch der gesamten Natriumionen durch Kaliumionen) gemischt, wodurch externe Kaliumkonzentrationen von 2.5, 28.8, 57.5, 86.3 und 115 mM erzielt werden. Zum Austausch der Badlösung wird die Zelle mit 2-3 Volumen der neuen Lösung ausgetauscht und anschließend zur weiteren Einstellung eines Gleichgewichts weitere 5 min langsam perfundiert<sup>3</sup>.

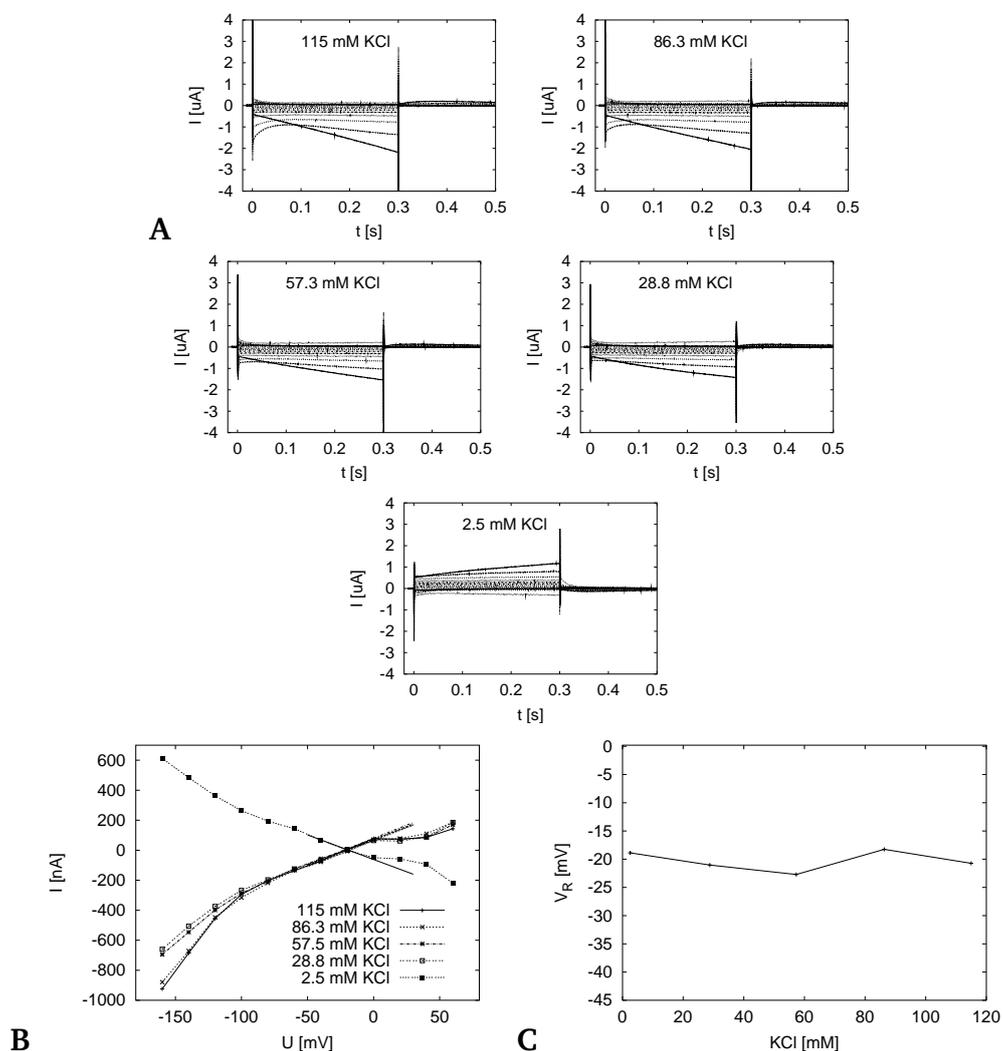
Das Ergebnis des Experiments zeigt Abbildung 2.29. Die fünf Diagramme in der oberen Hälfte geben die Differenzströme injizierter und uninjizierter Zellen auf eine episodische Anregung von -160 bis 60 mV (Spannungsschritte 20 mV). Die Strom-Spannungs-Kennlinien werden bei  $t = 54$  ms entnommen, da die Ströme am Ende der Episoden keinen stationären Strom erreicht haben und in der unteren linken Hälfte der Abbildung wiedergegeben. Man erkennt, daß die Spannungsabhängigkeit der Ströme bei externen Kaliumkonzentrationen von 115 bis 28.8 mM praktisch unverändert bleibt. Mit dem Wechsel von 28.8 auf 2.5 mM Kaliumchlorid in der Badlösung kehrt sich die Leitfähigkeit des Kanals um und der Kanal wirkt als Einwärts-Gleichrichter. Über den gesamten Konzentrationsbereich bleibt das Umkehrpotential des Kanals unverändert bei etwa -20 mV und entspricht damit dem eingestellten Haltepotential der Messung.

### 2.6.5 Einfluß von Cäsiumchlorid auf PCHA2

Auf der Suche nach einem Inhibitor des Kaliumkanals wurde der Einfluß von Cäsiumchlorid im Modellsystem der *Xenopus laevis* untersucht. Als Badlösung dient der Kaliumpuffer (siehe Abschnitt 4.19.2) mit 115 mM Ka-

---

<sup>3</sup> Diese Methode des Lösungstauschs hat sich bei Badlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten als effizient erwiesen.



**Abbildung 2.29:** Messungen zum Einfluß der Kaliumkonzentration auf die Leitfähigkeit von PCHA2. **A:**  $XmM$  zeigt die Stromantwort von PCHA2 auf die episodische Anregung der Zellen zwischen -160 und 60 mV bei verschiedenen KCl-Konzentrationen in der Badlösung ( $[mM]$  115.0, 86.3, 57.5, 28.8, 2.5) und pH 7.6. Aus den Stromkurven werden die Strom-Spannungs-Kennlinien bei  $t = 54$  ms nach Anlage der Kommandospannung entnommen. **B** Darstellung der Strom-Spannungs-Kurven von PCHA2. Mit abnehmender KCl-Konzentration im externen Medium bleibt die Leitfähigkeit des Kanals praktisch unverändert bis zu einer Umkehr der Transportrichtung beim Sprung von 28.8 auf 2.5 mM KCl im Bad. Das jeweilige Umkehrpotential wird durch lineare Approximation der Meßwerte im Spannungsbereich -80 bis -20 mV bestimmt (Geraden). **C** Verlauf des Umkehrpotentials von PCHA2. In dem Bereich der Kaliumkonzentration zwischen 2.5 und 115 mM verändert sich das Umkehrpotential von PCHA2 nicht. Es beträgt rund -20 mV.

liumchlorid und pH 7.4. Durch Zugabe diskreter Mengen einer CsCl-Lösung und erneuter Aufnahme der Strom-Spannungs-Kurve wird der Effekt durch eine Differenzauftragung bestimmt, wie in Abbildung 2.30 gezeigt.

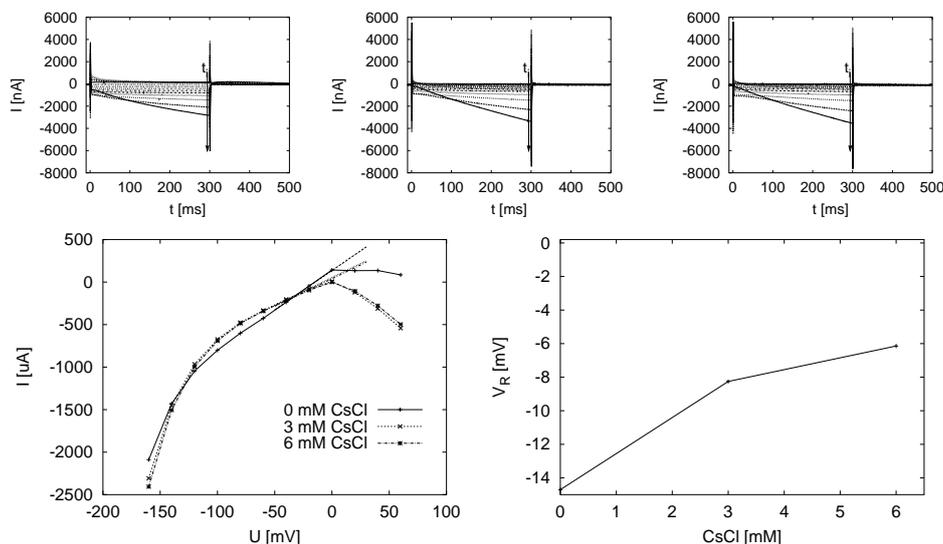


Abbildung 2.30: Experiment zur Inhibition von PCHA2 in *Xenopus laevis*. Die Diagramme A zeigen den zeitlichen Verlauf des Stroms durch den Kaliumkanal PCHA2 auf eine episodische Anregung zwischen -160 und 60 mV bei unterschiedlichen Cäsiumchlorid-Konzentrationen (0, 3, 6 mM) im Bad. Er ergibt sich aus Differenzbildung injizierter und uninjizierter Oozyten. B Ansicht der extrahierten Strom-Spannungs-Kurven. In Gegenwart von CsCl wird ein Ausstrom von Kaliumionen verhindert. Das Umkehrpotential des Kanals wird mit linearer Regression der Datenpunkte zwischen -80 und -20 mV bestimmt (rote Linien). C Verlauf des Umkehrpotentials im Einfluss der CsCl-Konzentration. Das Umkehrpotential verringert sich von -14 mV (0 mM CsCl) auf -3 mV (6 mM CsCl).

Im Experiment werden sowohl injizierte als auch uninjizierte Zellen unter den gleichen Bedingungen vermessen: episodische Anregung der Oozyten über den Spannungsbereich von -160 bis 60 mV in Kaliumchlorid-Puffer in Gegenwart von 0, 3 und 6 mM Cäsiumchlorid. Aus den beiden Stromantworten wird der Differenzstrom gebildet, der damit genau dem Anteil von PCHA2 am Gesamtmembranstrom entspricht. Die Graphen in 2.30 A zeigen die Stromantwort des Kanalproteins PCHA2 die episodische Anregung. Die Extraktion der Strom-Spannungs-Kurven erfolgt bei Zeitpunkt  $t = 54$  ms

nach Anlage der Kommandospannung, da in diesem Bereich die Membranströme eine stationäre Phase durchlaufen. Die Wahl eines späteren Zeitpunkts, der zwar größere Ströme liefern würde, erscheint nicht sinnvoll, da die Stromkurven bei stark-negativem Membranpotential unkontrolliert weiter wachsen und daher nicht vergleichbar mit den anderen Meßpunkten sein sollten. Abbildung 2.30 **B** zeigt die resultierenden Strom-Spannungskennlinien bei den unterschiedlichen CsCl-Konzentrationen. Deutlich erkennbar ist, daß in Gegenwart von Cäsiumchlorid die Eigenschaft des Kanals, Ionen aus der Zelle gelangen zu lassen, vollständig unterbunden wird. Cäsiumchlorid verstärkt also die einwärtsgerichtete Eigenschaft des Kanals erheblich. Aus den UI-Kurven wird das Umkehrpotential des Kanals bestimmt. Dazu werden die Meßpunkte im Spannungsbereich von -80 bis -40 mV linear approximiert. Den Verlauf des Umkehrpotentials zeigt Abbildung 2.30 **C**. Es wird von einem Ausgangswert von rund -14 mV auf -3 mV vermindert, wobei die maximale Auswirkung bereits bei einer geringeren Konzentration als 3 mM stattfindet. Cäsiumchlorid muß auf Grund dieser Daten als Kompetitor des Kaliumkanals angesehen werden.

Zusammenfassend ist es mit PCHA2 zum ersten Mal gelungen, mit Hilfe der in der Arbeitsgruppe gewonnenen genomischen Daten von *Halobacterium salinarum* ein Experiment von der Homologiesuche über Klonierung, heterologer Expression bis zum funktionellen Nachweis zu treiben. Wie sich bereits in den Homologiestudien anhand der Vorhersage zweier Transmembranhelices angekündigt hat erweist sich PCHA2 in den Experimenten als einwärtsgerichteter Kanal, der einen Einstrom von Kaliumionen in die Zellen ermöglicht.

# Kapitel 3

## Diskussion

### 3.1 Bakteriorhodopsin in *Sf9*-Zellen

Es ist im Rahmen der experimentellen Arbeiten gelungen, BR in *Sf9*-Zellen mit Hilfe von Baculoviren heterolog zu exprimieren und funktionell durch die *Patch-Clamp*-Technik nachzuweisen.

Als großer Vorteil der Technik ist zu werten, daß man mit einer etablierten, kontinuierlichen Zellkultur einen praktisch unerschöpflichen Nachschub an Zellen zur Verfügung hat und nicht jede einzelne Zelle für sich auf die Messungen vorbereitet werden muß, wie dies bei der Verwendung des *Xenopus*-Systems der Fall ist. Außerdem steht durch die Anwendung der unterschiedlichen Modi der *Patch Clamp*-Technik (Einzelkanalmessungen, *whole cell*, *inside-out*, *outside-out*, *giant-patch*) wesentlich mehr experimentelle Möglichkeiten zur Verfügung als mit der *Two Electrode Voltage Clamp*-Methode.

Aus experimenteller Sicht hat sich eine parallele Durchführung der Messungen an *Xenopus*-Oozyten und *Sf9*-Zellen als unpraktikabel erwiesen, da der Umbau des Meßstands von einer Konfiguration auf die Andere (*TEVC* und *Patch-Clamp*) jeweils mehrere Tage beanspruchte. Die Entscheidung für das *Xenopus*-Modell begründet sich darin, daß auf diesem Gebiet bereits Erfahrungen vorlagen (Diplomarbeit des Autors und experimentelle Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Bamberg, MPI Biophysik, Frank-

furt) und daher, selbst nach erfolgreicher Etablierung der *Sf9*-Zellkultur und ersten Erfolgen bei der Expression und der elektrophysiologischen Ableitung der Photoströme durch Bakteriorhodopsin, als das geeignetere Modellsystem angesehen wurde.

### 3.2 Modifikation der Zellen von *Halobacterium salinarum* für die *Patch Clamp*-Methode

Um dennoch die Vorteile der *Patch-Clamp*-Methode zu nutzen war versucht worden, die halobakteriellen Zellen künstlich zu vergrößern.

Die Möglichkeit des Abbaus der Zellwand von *Halobacterium salinarum* unter der Einwirkung von EDTA liefert kugelförmige Spheroblasten mit einer zugänglichen Zellmembran, in der die Membranproteine unter Beibehalt ihrer Orientierung enthalten sein sollten und die bei einer Salzkonzentration von 2 - 2.5 M handhabbar sind. Die notwendige Vergrößerung der Zellen wurde mit dem Reagenz Aphidicolin erzielt, das ein tetrazyklisches Diterpen mit antiviraler und antimitotischer Wirkung ist. Es inhibiert die Typ- $\alpha$ -Polymerase, wodurch der Zellzyklus in der G0/G1-Phase angehalten wird. Als Folge wachsen die Zellen ohne Teilung und ohne die Ausbildung von Septa auf eine Länge von etwa 25  $\mu\text{m}$ , entsprechend einer Verlängerung von Faktor 5. Ab dieser Länge ist kein weiteres Wachstum mehr zu beobachten. Die Zellen lassen sich problemlos in Spheroblasten überführen, die jedoch mit einem Durchmesser von etwa 5  $\mu\text{m}$  noch immer zu klein für die *Patch Clamp*-Methode sind. Realistisch gesehen müssten die Spheroblasten einen Mindestdurchmesser von 10  $\mu\text{m}$  aufweisen und deshalb wenigstens um den Faktor 20 verlängert werden.

Leider ist bisher keine Methode bekannt, mit der das Zellwachstum weiter angetrieben werden kann. Damit ist es bis zu diesem Zeitpunkt nicht gelungen, halobakterielle Zellen von ausreichender Größe für direkte Stromableitungen zu generieren. Es müssen also weiterhin heterologe Modellsysteme bemüht werden.

### 3.3 Bakteriorhodopsin in *Xenopus laevis*

Die Planung der Experimente zur Spannungsabhängigkeit von BR und TRI sowie den Einzelmutanten beruht auf folgenden allgemeinen Überlegungen:

- Ziel ist es, die elektromotorische Kraft von wtBR und den Mutanten zu bestimmen.
- Ein Vergleich der Wirksamkeit aller Proteine soll durch Quantifizierung der Expressionsrate ermöglicht werden.

Die Korrelation zwischen Photostrom und Expression in der Zelle erweist sich als schwierig. Wegen der teilweise starken Streuung der Photostrome innerhalb eines Expressionsexperiments schleicht sich bereits hier eine hohe Standardabweichung in die Meßwerte ein. Die Korrelation mit der über Western-Blots bestimmten Proteinmenge gelingt vermutlich als Folge ungleichmäßigen Transfers der Proteine vom Gel auf die Membran nicht immer, so daß hier ein großer systematischer Fehler hinzu kommt, der die Standardabweichungen weiter wachsen läßt. Daher können die gemessenen Expressionsraten nicht direkt miteinander verglichen werden.

Die Probleme hätten sicherlich mit einer höheren Probenzahl gemindert werden können. Das erweist sich allerdings aus technischen Gründen als nicht praktikabel. Aufgrund von Hinweisen aus der Literatur, daß sich Oozyten von verschiedenen Spenderfröschen bezüglich ihrer endogenen Ströme stark unterscheiden können [WEBER 1999]<sup>1</sup>, wurde versucht, stets alle im Fokus stehenden Proteine innerhalb eines Expressionsexperiments zu untersuchen, so daß dann die Anzahl der Proben zu groß geworden wäre.

Aus den Experimenten geht hervor, daß die Leitfähigkeiten von BR und den Mutanten in zwei Klassen eingeteilt werden können (vgl. Tabelle 2.1). Nun stellt sich die Frage, ob bei diesen Fehlergrenzen die Form der Strom-Spannungskurven überhaupt ernstgenommen werden darf. Betrachtet man die Kurven nach Eichung auf die Nullspannung (siehe Abbildungen

---

<sup>1</sup>Dies bestätigt sich bei den Experimenten.

2.11-2.13), so wird ersichtlich, daß die charakteristische Form der Strom-Spannungs-Kennlinie innerhalb einer BR-Spezies durchaus erhalten bleibt. Als weiteres Indiz soll gelten, daß aus den durchgeführten Experimenten zahlreiche Meßdaten vorliegen, in denen die Kurvenform für TRI auch bei stärkeren Stromamplituden erhalten bleibt (vgl. pH-abhängige Messung des Photostroms von TRI, Abschnitt 2.3.4). Leider fehlen für letztere Messungen die Quantifizierungsdaten, so daß sie in diesem Kontext nicht weiter besprochen werden. Dennoch belegen die Messungen, daß die Kurvenform tatsächlich die Eigenschaften des jeweiligen Proteins wiedergibt.

Ein weiteres Problem stellen die mit Hyperpolarisation der Zelle auftretenden Oszillationen der Membranströme dar. Da gerade in diesem Bereich die Ströme gegen Null gehen wird auf die Verwertung des Meßpunkts bei  $V_m = -150$  mV verzichtet, da hier bei Proteinen mit geringer Stromamplitude in den meisten Fällen keine klare Stufe im gemessenen Gesamtstrom ausgemacht werden kann. Dies ist jedoch nicht hilfreich bei der gewünschten Bestimmung der elektromotorischen Kraft (EMK) der Ionenpumpen. Da diese außerhalb des experimentell zugänglichen Meßfensters liegen muß die EMK aus den gewonnenen Daten extrapoliert werden.

Zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit von wt-BR und TRI wird ein kinetisches Modell entwickelt, das die experimentell ermittelten Daten zu beschreiben vermag.

## 3.4 Modell der Spannungsabhängigkeit

### 3.4.1 Beschreibung des Modells

#### Schema

Das Bakteriorhodopsin-Molekül liegt in zwei Zuständen vor (vgl. Abbildung 3.1),  $BR_i$  und  $BR_o$ .  $BR_i$  bezeichnet einen Zustand, bei dem sich das zu transportierende Proton gebunden auf der Innenseite der Membran befindet,  $BR_o$  bezeichnet den Zustand, bei dem das Proton auf der Membranaußenseite abgegeben wird. Insgesamt liegen  $N = N_i + N_o$  aktive Transportmo-

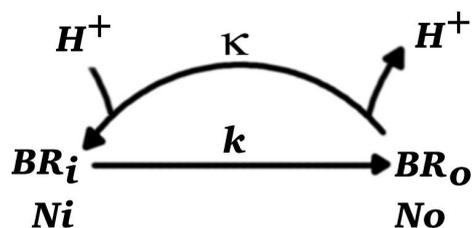


Abbildung 3.1: Modell des Transports. Insgesamt werden  $N$  aktive BR-Moleküle betrachtet, die in den zwei Zuständen  $BR_i$  (Proton liegt am Protein gebunden auf der Innenseite der Membran vor) und  $BR_o$  (Proton liegt am Protein gebunden auf der Außenseite der Membran vor) vorliegen. Die Konzentration der beiden Zustände beträgt  $N_i$  bzw.  $N_o$ . Der Transport des Protons erfolgt in einem irreversiblen und spannungsabhängigen Schritt ( $k$ ). Die Rückkehr zum Ausgangszustand  $BR_i$  erfolgt spannungsunabhängig ( $\kappa$ ). Beide Reaktionsschritte verlaufen irreversibel, da bei einer lichtgetriebenen Reaktion nicht von einer Reversibilität der Reaktion ausgegangen werden kann.

leküle vor, deren Anzahl während der Reaktion konstant bleibt. Aufgrund des hohen Energiegehalts eines anregenden Photons kann nicht von einer Mikroreversibilität des Reaktionszyklus ausgegangen werden, daher werden die Reaktionsschritte ( $k$  und  $\kappa$ ) als irreversibel angenommen.  $k$  beschreibt die lichtgetriebene, irreversible und spannungsabhängige Reaktion des Transports eines Protons aus der Zelle. Der Transportzyklus wird geschlossen durch die spannungsunabhängige Reaktion mit der Geschwindigkeitskonstante  $\kappa$ , durch die der Ausgangszustand  $BR_i$  wieder hergestellt wird. Dies ergibt sich daraus, daß bei der Rückkehr keine Ladung über die Zellmembran transportiert werden muß.

### Mathematische Beschreibung

Die mathematische Beschreibung (Gleichungen 3.1) des Modells beruht auf der Annahme, daß sich die Anzahl der aktiven Transportmoleküle  $N$  während des beobachteten Zeitraums nicht ändert. Daher kann angenommen werden, daß im Gleichgewicht keine zeitliche Veränderung von  $N_i$

und  $N_o$  stattfindet, wonach die Anteile  $N_i$  und  $N_o$  durch die Gesamtanzahl  $N$  ausgedrückt werden können. Der Strom  $i(u)$  ergibt sich als Produkt von  $N_i$  und der Geschwindigkeitskonstante  $k$ .

$$\begin{aligned}
 0 &= \frac{dN_i}{dt} = -k N_i + \kappa N_o \\
 0 &= \frac{dN_o}{dt} = k N_i - \kappa N_o \\
 N &= N_i + N_o = \text{const.} \\
 N_i &= \frac{\kappa N}{k + \kappa} \\
 i(u) &= k N_i = \frac{k \kappa N}{k + \kappa}
 \end{aligned} \tag{3.1}$$

Die spannungsabhängige Geschwindigkeitskonstante berechnet sich nach

$$k = k^0 e^{z F u \lambda / R T} = k^0 e^{0.039 u[\text{mV}] \lambda} \tag{3.2}$$

mit Faraday-Konstante  $F = N_A \cdot e_0 = 9.6875e4 \text{ C mol}^{-1}$ , Ladung  $z = 1$  und der molaren Gaskonstante  $R = 8.31451 \text{ J (K mol)}^{-1}$  bei Raumtemperatur  $T = 293 \text{ K}$ . Um die Spannung in der Einheit [mV] einsetzen zu können wurde der Faktor  $z F / R T$  entsprechend geändert. Der Photostrom wird beschrieben durch  $i(u)$ . In die spannungsabhängige Geschwindigkeitskonstante geht ein Eyring-Potential in Form des Exponentialterms aus Gleichung 3.2 ein. Dabei handelt es sich um das Energieprofil, das durch das transportierte Ion innerhalb des Proteins überwunden werden muß, um von einer Seite auf die andere zu gelangen. Beim hier eingesetzten Energieprofil ist handelt es sich um eine monoexponentielle Funktion, deren Maximum in Abhängigkeit vom Symmetriefaktor  $\lambda$  über die Dicke der Membran verschoben sein kann.

**Definition der effektiven Spannung  $U_{eff}$** 

Da aufgrund der Irreversibilität eine EMK nach dem Modell nicht erreicht werden kann wird eine *effektive Spannung* ( $U_{eff}$ ) als Kennwert definiert. Sie ergibt sich aus der linearen Extrapolation der Strom-Spannungs-Kurve durch den Wendepunkt der Kennlinie mit der Steigung im Wendepunkt und dem Schnittpunkt mit der Spannungsachse. Die Steigung im Wendepunkt beschreibt die maximale Leitfähigkeit durch das Protein. Steigung und Wendepunkt werden aus dem Modell nach Gleichungen 3.3 berechnet ( $f(x) := i(u)$ ,  $f'(x)$ : erste Ableitung  $\rightarrow$  Steigung und somit Leitfähigkeit bei Spannung  $x$ ,  $f''(x)$ : zweite Ableitung und deren Nullstelle  $x_{f''=0}$  zur analytischen Lokalisation des Wendepunkts). Zusätzliche Parameter der Berechnungen (Koordinaten des Wendepunkts, Steigung der Extrapolation und Nullstrom) werden in Anhang D.1 aufgeführt.

$$\begin{aligned}
 f(x) &= N \frac{ke^{ax}\kappa}{ke^{ax} + \kappa} \\
 f'(x) &= N \frac{ak\kappa^2 e^{ax}}{(ke^{ax} + \kappa)^2} \\
 f''(x) &= N \frac{a^2 k \kappa^2 e^{ax} (\kappa - ke^{ax})}{(ke^{ax} + \kappa)^3} \\
 x_{f''=0} &= \frac{1}{a} \ln \frac{\kappa}{k}
 \end{aligned} \tag{3.3}$$

mit der Konstante

$$a = \frac{z F \lambda}{R T}, \quad T = 293K \tag{3.4}$$

**3.4.2 Simulation unter Variation bestimmter Parameter**

Zunächst werden einige Simulationen durchgeführt, womit der Einfluß der Parameter  $\lambda$ ,  $\kappa$ ,  $N$  und der spannungsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten  $k$  auf die Strom-Spannungs-Kurve untersucht wird.

Die Simulation und deren Auswertung beruht auf Gleichungssystem (3.3) mit den Standardparametern  $\lambda = \frac{1}{2}$ ,  $k = 100$ ,  $\kappa = 30$ , so daß die resultierenden Kennlinien im Größenbereich der experimentellen Messungen liegen. Der Einfluß der Größen wird durch Variation einzelner Parameter untersucht.

**Einfluß der spannungsabhängigen Geschwindigkeitskonstante  $k$**  Die Variation der spannungsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten  $k$  führt zu einer Verschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie auf der Spannungsachse (vgl. Abbildung 3.4.2 A). Die Extrapolation führt zu parallelen Geraden, deren *effektive Spannungs*-Werte mit einer Änderung von  $k$  um Faktor 10 um jeweils 59 mV (rechnerisch: 58.59 mV) differieren.

**Einfluß des Symmetriefaktors  $\lambda$**

Variation von  $\lambda$  beeinflusst die Steigung der Kennlinie zwischen Spannungs-Achse und Sättigungsstrom (vgl. Abbildung 3.4.2 B) und damit die maximale Leitfähigkeit. Diese ist geringer bei kleinem  $\lambda$  und wächst mit  $\lambda$  stark an. Dies weist darauf hin, daß mit kleinem  $\lambda$  die Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit geringer wird.

Alle resultierenden Kennlinien schneiden sich im Nullstrom bei  $u = 0$  mV (Strom-Spannungs-Kennlinie:  $i(0) = 23.08$  nA, Extrapolation:  $i(0) = 24.03$  nA).

Der Wendepunkt aller Strom-Spannungs-Kennlinien liegt bei 15 nA und somit bei  $\kappa/2$ . Mit kleinerem  $\lambda$  bewegt sich der Spannungswert des Wendepunkts zu kleineren Werten.

**Einfluß des Sättigungsstroms  $N \cdot \kappa$**

Mit Veränderung der spannungsunabhängigen Variablen  $\kappa$  wird das Sättigungsniveau der Kennlinie,  $N \cdot \kappa$ , verändert (vgl. Abbildung 3.3 A). Dies äußert sich in einer Verlagerung des Wendepunkts der Kennlinie zu negativeren Werten mit kleinem  $\kappa$ , ebenso wird der Strom bei  $U = 0$  mV mit kleinem  $\kappa$  verringert. Dies führt ebenso zu einer geringeren Steigung im Wendepunkt.

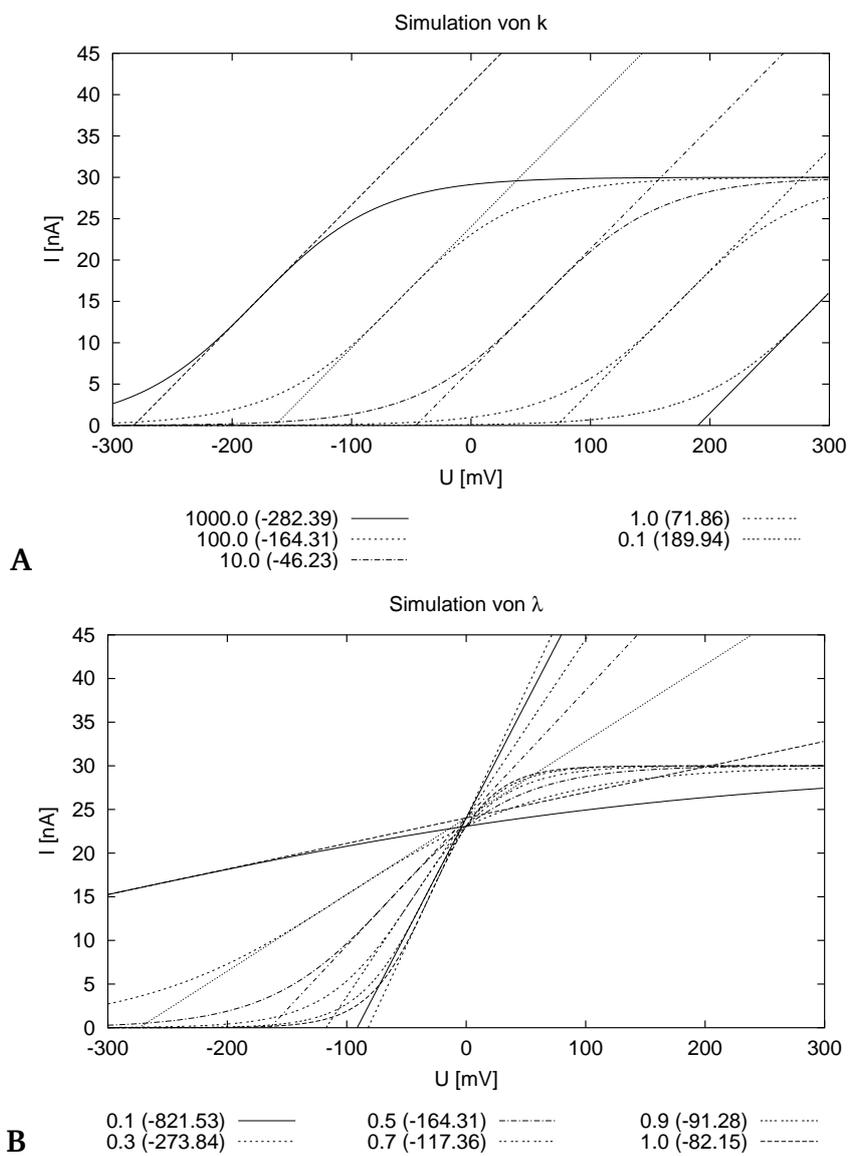


Abbildung 3.2: Simulation mit variablem  $k$  (A) und  $\lambda$  (B). Die Legende gibt jeweils den veränderten Parameter und in Klammern die resultierende *effektive Spannung* an.

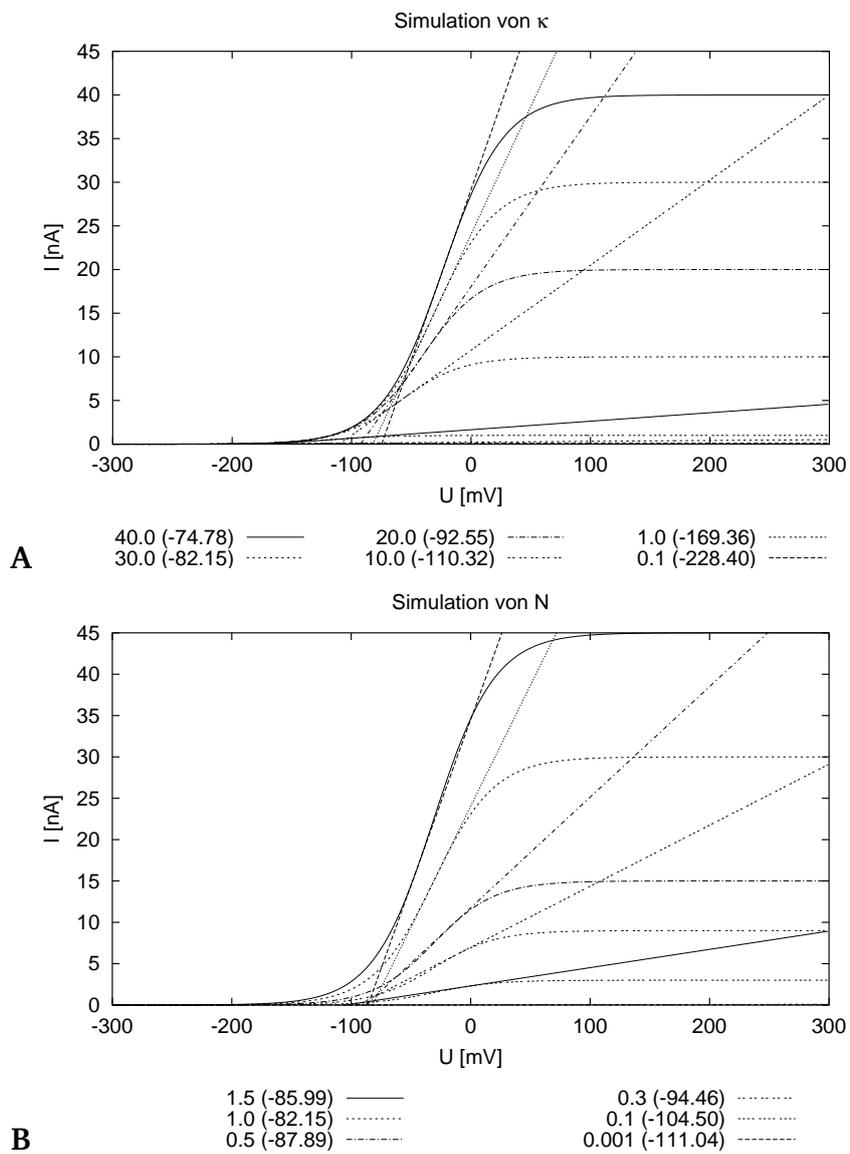


Abbildung 3.3: Simulationen mit variablem  $\kappa$  (A) und  $N$  (B). Die Legende gibt jeweils den veränderten Parameter und in Klammern die resultierende effektive Spannung an.

Da das Sättigungsniveau der Strom-Spannungs-Kennlinie neben  $\kappa$  auch durch die Anzahl der aktiven Moleküle,  $N$ , bestimmt wird, kann man aus der Simulation folgern, daß die *effektive Spannung* durch die Anzahl der aktiven Moleküle beeinflußt wird. Damit besteht ein erheblicher Unterschied zur tatsächlichen *EMK* des Proteins, die unabhängig von  $N$  ist. Die Simulation mit unterschiedlichem  $N$  zeigt, daß die *effektive Spannung* nicht gleichmäßig verläuft, sondern bei  $N = 1$  ein Maximum durchläuft (siehe Abbildungen 3.3 B und 3.4).

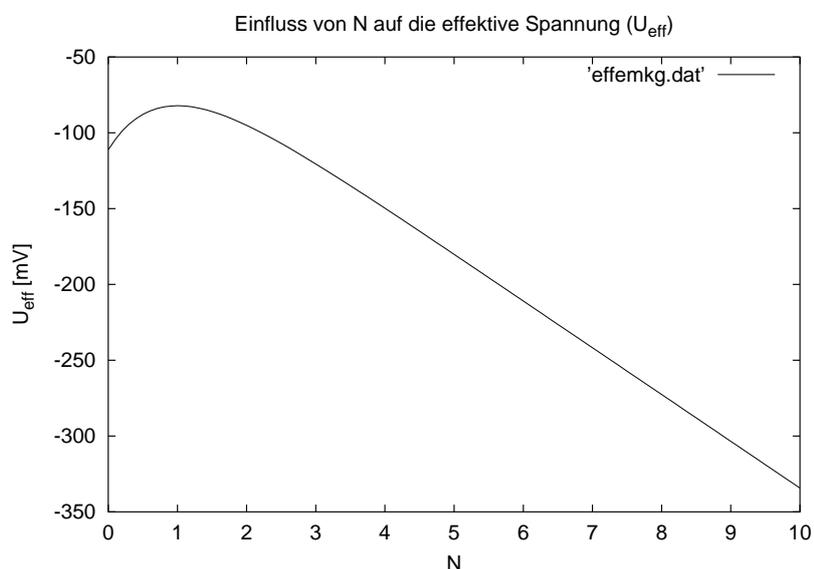


Abbildung 3.4: Auftreten eines Maximums von  $U_{eff}$  mit Variation der aktiven Moleküle  $N$ . Hier zeigt sich ein gravierender Unterschied zwischen  $U_{eff}$  und der *EMK*.

## 3.5 Anwendung des Modells

### 3.5.1 Anpassung des Modells an die experimentellen Daten

Als Datensatz dienen die auf Expression normierten Messdaten aus der elektrophysiologischen Bestimmung der Photoströme durch wtBR und TRI (Berechnungsmodell *all*, Abschnitt 2.3.8). Dabei gehen die ermittelten Standardabweichungen in die Optimierungsrechnung mit ein. Die Ströme werden in der Einheit [ $A mol^{-1}$ ] eingesetzt, da die absolute Menge an aktiven Transportmolekülen einen Einfluß auf die Geschwindigkeitskonstante  $\kappa$  ausübt. Zusätzliche Parameter der Berechnungen (Koordinaten des Wendepunkts, Steigung der Extrapolation und Nullstrom) werden in Anhang D.2 aufgeführt.

### 3.5.2 Anmerkungen

zu kappashared

Im Modell kappashared gelten für BR und TRI  $\lambda$  und  $\kappa$  als gleich, die Änderung der Spannungsabhängigkeit muß also allein durch  $N$  und die spannungsabhängige Konstante getragen werden. Das unterschiedliche Sättigungsniveau ist auf die unterschiedlichen  $N$ -Werte für BR und TRI zurückzuführen. Trotzdem verändern sich in diesem Fall die Steigungen im Wendepunkt für beide Proteine nicht.

zu kappafree

Der Fit wurde unter Berücksichtigung der Standardfehler durchgeführt. Demnach beträgt das Verhältnis  $\kappa_{BR}/\kappa_{TRI}$  1.7. Ohne Berücksichtigung der Standardfehler erhält man für  $\kappa_{TRI}$  einen sehr hohen Wert (mit einem hohen Fehler), während die übrigen Parameter keiner großen Änderung unterliegen. Hier zeigt sich, daß die Daten für TRI im gemessenen Bereich keinerlei Hinweise auf eine Sättigung enthalten.

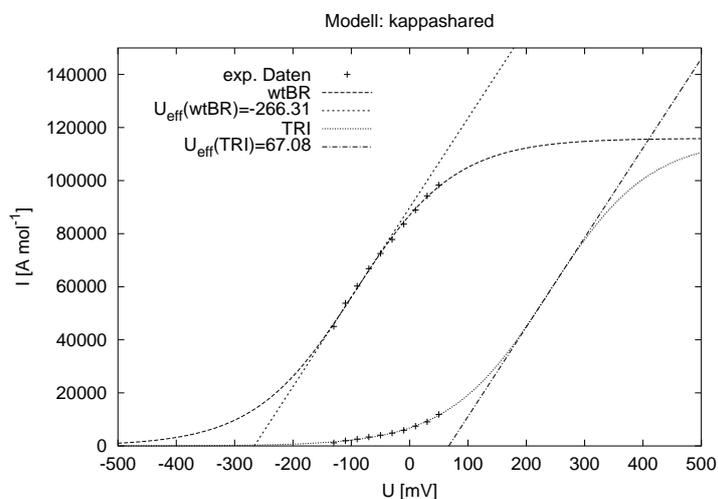


Abbildung 3.5: Gemeinsames  $\lambda$  und  $\kappa$  (kappashared)

Listing 3.1: Ergebnis nach kappashared.gp

---

```

After 30 iterations the fit converged.
final sum of squares of residuals : 0.0945038
rel. change during last iteration : 0

degrees of freedom (ndf) : 16
rms of residuals          (stdfit) = sqrt(WSSR/ndf)      : 0.0768537
variance of residuals (reduced chisquare) = WSSR/ndf : 0.00590649

Final set of parameters          Asymptotic Standard Error
=====                          =====
l                                = 0.298351          +/- 0.007201      (2.414%)
kappa                            = 115926            +/- 2975          (2.567%)
k01                              = 347807            +/- 1.9e+04       (5.463%)
k02                              = 7188.14           +/- 106.9         (1.487%)

correlation matrix of the fit parameters:

          l          kappa  k01    k02
l          1.000
kappa     -0.554   1.000
k01        0.777  -0.863   1.000
k02        0.281  -0.231   0.265   1.000
    
```

---

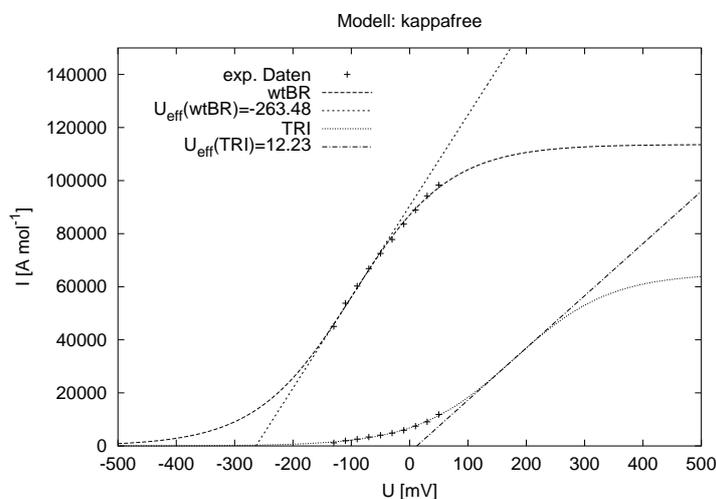


Abbildung 3.6: Berechnung mit freiem  $\kappa$  (kappafree)

Listing 3.2: Ergebnis nach kappafree.gp

---

```

After 55 iterations the fit converged.
final sum of squares of residuals : 0.0927336
rel. change during last iteration : -1.79381e-11

degrees of freedom (ndf) : 15
rms of residuals          (stdfit) = sqrt(WSSR/ndf)      : 0.0786272
variance of residuals (reduced chisquare) = WSSR/ndf : 0.00618224

Final set of parameters          Asymptotic Standard Error
=====                          =====

k01          = 371300          +/- 4.87e+04      (13.12%)
l            = 0.309885        +/- 0.02242       (7.234%)
k02          = 7601.52         +/- 772.8         (10.17%)
kappa1       = 113611          +/- 4880          (4.295%)
kappa2       = 65115.8         +/- 4.98e+04      (76.48%)

correlation matrix of the fit parameters:

          k01      l      k02      kappa1 kappa2
k01      1.000
l         0.963   1.000
k02      0.910   0.945   1.000
kappa1   -0.948  -0.873  -0.825   1.000
kappa2   -0.908  -0.942  -0.988   0.823   1.000
    
```

---

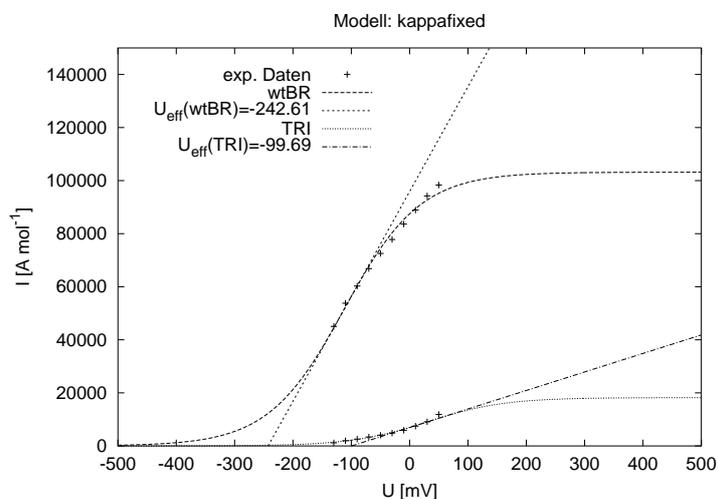


Abbildung 3.7: Berechnung mit festgelegtem  $\kappa$  (kappafixed)

Listing 3.3: Ergebnis nach kappafixed.gp

---

```

After 73 iterations the fit converged.
final sum of squares of residuals : 0.194766
rel. change during last iteration : -1.86532e-11

degrees of freedom (ndf) : 16
rms of residuals          (stdfit) = sqrt(WSSR/ndf)      : 0.110331
variance of residuals (reduced chisquare) = WSSR/ndf : 0.0121729

Final set of parameters                Asymptotic Standard Error
=====                                =====

kappa1          = 103177                +/- 3214                (3.115%)
l                = 0.392941              +/- 0.01745             (4.441%)
k01              = 574973                +/- 6.382e+04           (11.1%)
k02              = 11354.7               +/- 522.6                (4.602%)

correlation matrix of the fit parameters:

                kappa1 l          k01    k02
kappa1          1.000
l                -0.696  1.000
k01              -0.859  0.895  1.000
k02              -0.678  0.729  0.730  1.000
    
```

---

zu kappafixed

Diesem Modell liegen einige theoretische Überlegungen zugrunde. Die Zeitkonstanten der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte im Photozyklus (M-Zerfall) von wtBR und TRI ergeben sich zu 6 ms (BR) und 34 ms (TRI). Geht man davon aus, daß diese spannungsunabhängig sind, so können die experimentellen Werte zur Festlegung von  $\kappa$  dienen.

$$\begin{aligned} \frac{\kappa^{BR}}{\kappa^{TRI}} &= \frac{k_{lim}^{BR}}{k_{lim}^{TRI}} = \frac{\tau_{lim}^{TRI}}{\tau_{lim}^{BR}} \\ \kappa_{TRI} &= \frac{\tau_{lim}^{BR}}{\tau_{lim}^{TRI}} \cdot \kappa_{BR} = \frac{6}{34} \cdot \kappa_{BR} \end{aligned} \quad (3.5)$$

Aus den bereits durchgeführten Rechnungen ergibt sich  $\kappa_{BR} = 32 \text{ nA}$ . Setzt man diesen Wert als Startwert in Gleichung 3.5 ein, so erhält man  $\kappa_{TRI} = 27.23 \text{ nA}$ .

Fixierung von  $k$

Auf analoge Weise wurde versucht, die Zeitkonstanten vom M-Zerfall zur Fixierung der spannungsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten für BR und TRI einzusetzen. Mit dieser Annahme war es jedoch nicht möglich, die experimentellen Daten zu beschreiben.

### 3.5.3 Schlußfolgerungen aus den Modellrechnungen

Betrachtet man die Ergebnisse aus der Anwendung des beschriebenen Modells auf die Messungen, so fällt auf, daß die experimentellen Werte in jedem Fall gut durch das Modell wiedergegeben werden. Aus der Korrelationsmatrix der Rechnungen ergibt sich eine verhältnismäßig hohe Abhängigkeit der Parameter untereinander, was auf eine leichte Überinterpretation hinweist. Dies ist jedoch aufgrund des eingeschränkten Meßfensters nicht weiter verwunderlich. Da alle Rechnungen das Experiment in etwa gleich gut wiedergeben kann zunächst keine wirkliche Präferenz für

ein Modell festgelegt werden. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der Modelle untereinander, so lassen sich klare Tendenzen ablesen.

Der Symmetriefaktor  $\lambda$  dürfte zwischen 0.3 und 0.4 liegen und weist darauf hin, daß das Eyring-Potential nicht gleichmäßig über die Membrandicke verteilt ist. Die beste Beschreibung der experimentellen Daten wird unter der Annahme erzielt, daß die spannungsunabhängigen Geschwindigkeitskonstanten mit den Konstanten der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion, dem M-Zerfall, im Photozyklus korrelieren (Modell *kappasha-red*).

Nach jedem Modell ergibt sich ein Verhältnis der spannungsabhängigen Geschwindigkeitskonstante von BR:TRI von rund 1:48. Spektroskopische Experimente zeigen im Photozyklus die Intermediatübergänge von **L**  $\rightarrow$  **M** der beiden Bakteriorhodopsine ein vergleichbares Verhältnis auf ( $\tau_{BR,L \rightarrow M} = 50 \mu s$ ,  $\tau_{TRI,L \rightarrow M} = 1 ms \rightarrow \tau_{BR} : \tau_{TRI} = 1 : 20$ ) [TITTOR et al. 2002]. Damit wird auf Grundlage der oben beschriebenen Experimente und Berechnungen als Endergebnis gefolgert, daß als spannungsabhängiger Schritt im Transportmechanismus von Bakteriorhodopsin der Intermediatübergang von **L**  $\rightarrow$  **M** auftritt.

Vergleicht man nun die Ergebnisse aus der Modellrechnung *kappafixed* mit den bekannten Literaturwerten, so erkennt man eine weitere Übereinstimmung. Die promotorische Kraft von Bakteriorhodopsin wurde auf einen Wert von -284 mV bestimmt [MICHEL und OESTERHELT 1976], das Modell liefert mit einer hohen Übereinstimmung eine  $U_{eff}$  von -243 mV, die jedoch nur als Näherungswert für die protomotorische Kraft dienen kann.

Nach dem Modell ergibt sich, daß zur Beschreibung der Leitfähigkeiten von wtBR und TRI eine Veränderung der spannungsabhängigen Geschwindigkeitskonstante  $k$  notwendig ist. Die Simulationsrechnungen (Abschnitt 3.4.2) zeigen, daß  $k$  eine parallele Verschiebung der Strom-Spannungskurve entlang der Spannungsachse bewirkt. Betrachtet man vor diesem Hintergrund die Tatsachen, daß es bisher nicht gelungen ist, einen TRI-produzierenden *Halobacterium salinarum*-Stamm rein auf phototropher Basis wachsen zu lassen (Oesterhelt, mündliche Mitteilung) und daß der wichtigste Unterschied zwischen den beiden Proteinen im Auftreten bzw.

dem Fehlen einer Konformationsänderung während des Transportzyklus ist, so darf angenommen werden, daß die beim Wildtyp beobachtete konformelle Umlagerung dafür sorgt, die Strom-Spannungs-Kurve des Proteins in einen physiologisch sinnvollen Bereich zu verschieben, in dem das Protein eine effektivere Photosynthese betreiben kann und damit essentiell für die Funktion des Proteins ist.

### 3.6 Der archaeale Kaliumkanal PCHA2

Am Beispiel des archealen Kaliumkanals PCHA2 wird erstmalig auf der Grundlage des in der Abteilung bestimmten Genoms von *Halobacterium salinarum* ein Experiment konzipiert und durchgeführt, das auf dem Weg von der DNA-Sequenz über Genprädiktion, Homologievergleich mit den gängigen Datenbanken, Klonierung, heterologe Expression bis zur funktionellen Untersuchung zur Charakterisierung eines halobakteriellen Membranproteins beiträgt. Auch wenn in dieser Hinsicht sicherlich weitere Experimente folgen müssen, zeigen die durchgeführten Untersuchungen eine neue Richtung auf, wie die Untersuchung von *Halobacterium salinarum* ausgehend von den vorliegenden genomischen Daten gezielt vorangetrieben werden kann.

Die gewonnenen Daten weisen darauf hin, daß es sich bei PCHA2 um einen einwärtsgerichteten Kaliumkanal handelt, wodurch die bereits auf DNA-Ebene erfolgte Klassifizierung des Proteins nach Vorhersage der Sekundärstruktur mit zwei vorausgesagten Transmembranhelices bestätigt wird (vgl. Abbildung 1.7). Der sehr große C-terminale Rest weist Walker A und Walker B-Sequenzen auf, die auf eine ATP-Bindestelle im Protein schließen lassen. So läßt sich die Arbeitshypothese aufstellen, daß PCHA2 mit der Fähigkeit der ATP-Bindung durch Änderungen im Energiehaushalt der Zellen reguliert werden kann. Mit dieser Verknüpfung ist das Protein ein starker Kandidat für das bisher unbekanntes Kaliumtransportsystem, das bei der Erzeugung eines Kaliumgradienten zur Energiespeicherung für die Aufnahme von Kalium verantwortlich ist (vgl. Abschnitt 1.1.1,

[WAGNER et al. 1978]). Diese Vermutung muß durch weitere gezielte Experimente bestätigt werden.

Die Untersuchung des Einflusses von Cäsiumionen auf die Leitfähigkeit von PCHA2 zeigt, daß bereits bei einer externen Cäsiumionenkonzentration von 3 mM die einwärtsgerichtenden Eigenschaften des Ionenkanals verstärkt werden, während die Leitfähigkeit des Kanals für den Einfluss von Kaliumionen unverändert bleibt. Würden die Cäsiumionen direkt auf die Pore Einfluß nehmen sollte sich auch die Kalium-Leitfähigkeit durch den Kanal ändern. Offenbar werden jedoch nur die Verschluss-Eigenschaften (*Gating*) des Kanals verändert.

In der Literatur wird ein Experiment beschrieben, in dem ein *shaker*-Ionenkanal durch Austausch einer einzigen neutralen Aminosäure mit Aspartat in der zweiten Helix der Pore (T107D) in einen Einwärtsgerichteter umgewandelt wird [LU et al. 2001]. Diese Umwandlung kann also aufgrund der Veränderung einer einzigen Ladung erfolgen. Daher ist es möglich, daß ein im wassergefüllten Hohlraum unter der Selektivitätspore (vgl. Abbildung 1.8) sitzendes Cäsiumion die Elektrostatik derart verändern kann, daß die einwärtsgerichtenden Eigenschaften des Ionenkanals deutlich verstärkt werden.

Eine weitere Möglichkeit der Erklärung bietet die sogenannte P-Schleife (Bereich zwischen erster Helix der Pore und der Signatursequenz TGYG der Pore). Ein Vergleich der Sequenzen von einwärtsgerichtenden Kaliumkanälen mit *shaker*-Kaliumkanälen zeigt, das erstere in Vergleich zu *shaker*-Kanälen eine um etwa 8-11 Aminosäuren verlängerte P-Schleife aufweisen [LU et al. 2001], die wegen der Konstanz offenbar eine Rolle für die Funktion von einwärtsgerichtenden Kaliumkanälen spielen. Im vorliegenden PCHA2 handelt es sich dabei nach der Vorhersage der Sekundärstruktur (siehe Abbildung 2.27) um eine Verlängerung von etwa 8 Aminosäuren, die zwei negative Ladungen tragen. Hier besteht die Möglichkeit, daß durch Anlagerung von Cäsiumionen negative Ladungen neutralisiert werden. Durch die so veränderte Elektrostatik im Bereich der P-Schleife könnte ebenfalls eine Verstärkung der einwärtsgerichtenden Eigenschaften eintreten.

Schwer zu deuten sind die Experimente mit unterschiedlicher Kaliumkonzentration im externen Medium. Nach der Theorie müsste sich das Umkehrpotential des Kaliumkanals nach der Nernst-Gleichung mit unterschiedlichen Kaliumionenkonzentrationen auf der Innen- und Aussenseite der Membran verschieben, was jedoch experimentell nicht beobachtet wurde. Auch ist eine Umkehr des Stroms durch PCHA2 bei einer externen Kaliumkonzentration von 2.5 mM äußerst unwahrscheinlich. Daher muß man davon ausgehen, dass der beobachtete Strom nicht primär auf den Ionenkanal zurückzuführen ist, sondern vielmehr durch eine (oder mehrere) Sekundäreffekte zustande kommt, die in einer Gesamtzellmessung nicht auszuschließen sind. Daher erscheint es nicht sinnvoll, die gewonnenen Daten in Hinsicht auf den untersuchten Kaliumkanal hin zu diskutieren. Hier sind vielmehr weitere Folgeexperimente angebracht, um den Effekt genauer zu charakterisieren. Hierfür bietet sich die *Patch-Clamp*-Technik an, da so die Möglichkeit besteht, die Ionenverhältnisse auf beiden Seiten der Membran exakt zu kontrollieren und durch Einzelkanalmessung Sekundäreffekte weitgehend ausgeschlossen werden können.

### 3.7 Ausblick

Diese Arbeit zeigt exemplarisch, wie Membranproteine von *Halobacterium salinarum* mit Hilfe der Elektrophysiologie weiter charakterisiert werden können. Eine Anwendung des in der Arbeit entwickelten Modells zur Elektrogenizität des Protonentransports durch Bakteriorhodopsin auf weitere Transportprozesse ist denkbar und sollte gezielt anhand der weiteren Retinalproteine in *Halobacterium salinarum* bzw. mit Hilfe der genomischen Daten von *Halobacterium salinarum* überprüft werden.

Die Untersuchungen zu dem archealen Kaliumkanal PCHA2 stoßen ein neues und sehr interessantes Forschungsfeld auf, das in den kommenden Jahren weiter untersucht werden wird. Hierbei ist vor allem von Interesse, eine mögliche Verknüpfung des Kaliumkanals PCHA2 mit dem Energiehaushalt der Zelle zu untersuchen.

# Kapitel 4

## Material und Methoden

### 4.1 Enzyme

#### 4.1.1 DNS-Polymerase

Polymerase	Hersteller	Anwendung
Taq <sup>®</sup>	Amersham	Kontrollexperimente
Vent <sup>®</sup>	New England Biolabs	Einführung von Punktmutationen
Taqara-LA-Taq <sup>®</sup>	Bio Whittaker	Amplifikation von Genkonstrukten zur Klonierung

*Tabelle 4.1: DNS-Polymerasen*

#### 4.1.2 Restriktionsendonukleasen

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen werden in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Sie kommen bei der Klonierung von Genen/Genfragmenten sowie bei der Linearisierung des Expressionsvektors pGEMHE zum Einsatz.

Enzym	Verwendungszweck
<i>Bam</i> HI	Insertion der bop-Fragmente in pGemHE
<i>Eco</i> RI	Klonierung der Sf9-Konstrukte
<i>Eco</i> RIII	Klonierung der Sf9-Konstrukte
<i>Hind</i> III	Insertion der bop-Fragmente in pGemHE
<i>Pst</i> I	Linearisierung der bop-pGemHE-Konstrukte für Expression in <i>Xenopus laevis</i>
<i>Nhe</i> I	Linearisierung des pGEMHE-pcha2-Konstrukts zur <i>in-vitro</i> -Transkription.
<i>Klenow-Fragment</i>	Entfernung des 5'-Überhangs der <i>Pst</i> I-linearisierten DNS-Vorlagen für die <i>in-vitro</i> Transkription

Tabelle 4.2: Restriktionsenzyme

## 4.2 Nährmedien

Für die Herstellung der Nährmedien wird bidestilliertes Wasser verwendet. Die Sterilisierung erfolgt im Autoklaven bei 121 °C, 2 bar, über eine Dauer von 20 Minuten. Die Lagerung der Flüssigmedien erfolgt bei Raumtemperatur, Agarplatten werden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 4.2.1 Nährmedien für *Escherichia coli*

**LB-Medium** [SAMBROOK et al. 1989]

1.0 % (w/v) Bacto<sup>®</sup> -Trypton (DIFCO Labs), 0.5 % (w/v) Bacto<sup>®</sup> -Hefeextrakt (DIFCO Labs), 171 mM Natriumchlorid (Merck)

Für die Herstellung von Agarplatten werden dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g Bacto<sup>®</sup> -Agar (DIFCO Labs) zugegeben. Das heiße Medium wird unter Rühren auf eine Temperatur von etwa 60 °C abgekühlt und unter der Sterilbank auf die Platten verteilt. Nachdem die Platten Raumtemperatur erreicht haben werden sie bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

**SOB-Medium** [SAMBROOK et al. 1989]

2.0 % (w/v) Bacto<sup>®</sup> -Trypton (DIFCO Labs), 0.5 % (w/v) Bacto<sup>®</sup> - Hefeextrakt (DIFCO Labs), 10.3 mM Natriumchlorid (Merck), 2.68 mM Kaliumchlorid (Merck).

Die Lösung wird mit deionisiertem Wasser auf 990 ml aufgefüllt und autoklaviert. Dem autoklavierten Medium werden je 5 ml einer steril filtrierten Lösung von 2 M Magnesiumchlorid und 2 M Magnesiumsulfat zugegeben, da sich während der Sterilisation in Anwesenheit von Magnesium Niederschläge bilden können.

**4.2.2 Nährmedien für *Halobacterium salinarum*****Halomedium** [OESTERHELT und KRIPPAHL 1983]

250 g Natriumchlorid (Siedesalz Salta, Südsalz), 20 g Magnesiumsulfat-hexahydrat (Merck), 2 g Kaliumchlorid (Merck), 3 g tri-Natriumcitrat-dihydrat (Merck), 10 g (w/v) neutralisiertes Fleischpepton (Merck).

Das Medium wird mit deionisiertem Wasser ad 1000 ml verdünnt und autoklaviert.

Für die Herstellung von Agarplatten wird dem Medium vor dem Autoklavieren 15.0 g Bacto<sup>®</sup> -Agar pro Liter zugefügt. Das Medium wird unter Rühren auf etwa 60 °C abgekühlt und auf die Platten verteilt. Nachdem die Platten Raumtemperatur erreicht haben werden sie bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Standardkulturen von *Halobacterium salinarum* werden in den Volumina 35 ml (100 ml-Erlmeyerkolben) und 700 ml (2 l-Erlmeyerkolben) auf einem Rotationsschüttler bei 100 upm und 40 °C inkubiert. Die Inokulation erfolgt mit 1/50 Volumen einer stationären Kultur. Die Zellen erreichen in der Regel nach 5 Tagen die stationäre Phase.

**Basalsalz**

250 g Natriumchlorid, 20 g Magnesiumsulfat-hexahydrat, 3 g tri-Natriumcitrat-dihydrat, 2 g Kaliumchlorid ad 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 7.2 (NaOH).

Für die Bestimmung der ATP-Syntheserate wird das Basalsalz auf pH 5.5 (5 mM MES) und pH 7.0 (NaOH) eingestellt.

**4.3 Antibiotika**

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 4.3 zusammengestellt.

Antibiotikum	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 $\mu$ g/ml, Stammlösung 100 mg/ml in Ethanol
Gentamycin	1 mM
Penicillin-Streptomycin	5u/ml bzw. 5 $\mu$ g/ml

Tabelle 4.3: Antibiotika

**4.4 Organismen**

*E. coli* **DH5**  $\alpha$   $F'$ ,  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17( $r_k^- r_k^+$ ), phoA, supE44,  $\lambda^-$ , thi-1, gyrA96, relA1 (GIBCO BRL).

*Xenopus laevis* Bezugsquelle: H. Kähler, Hamburg.

*Halobacterium salinarum* **S9** [STOECKENIUS 1979] BR<sup>++</sup>, HR<sup>+</sup>, SRI<sup>+</sup>, SRII<sup>++</sup>, Car<sup>-</sup>, Rub<sup>+</sup>, Ret<sup>+</sup>, Vac<sup>-</sup>

*Halobacterium salinarum*-**R1** [STOECKENIUS und KUNAU 1968] BR<sup>+</sup>, HR<sup>+</sup>, SRI<sup>+</sup>, SRII<sup>++</sup>, Car<sup>+</sup>, Rub<sup>+</sup>, Ret<sup>+</sup>, Vac<sup>-</sup>

*Halobacterium salinarum* **TRI**

## 4.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden im Haus von Frau U. Schimanko unter Verwendung eines automatischen Synthesegeräts (394 DNA/RNA Synthesizer und 380B DNA/RNA Synthesizer, ABI Applied Biosystems) nach der Phosphoramidit-Methode hergestellt. Die Schmelztemperaturen  $T_m$  der Oligonukleotide berechnen sich nach

$$T_m = 4 \cdot (G + C) + 2 \cdot (A + T) \quad (4.1)$$

wobei G, C, A und T für die Anzahl der Nukleotide im jeweiligen Basenstrang steht. Die Oligonukleotide werden nach Erhalt bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Zur Klonierung neuer Restriktionsschnittstellen werden die Oligonukleotide so entworfen, daß die Schnittstelle möglichst nahe am Start- bzw. Stopcodon des Gens entsteht. Um gute Ergebnisse bei der Restriktion zu erhalten enthalten die Oligonukleotide zusätzlich einen Überhang von 3-5 Basen, wobei die Ansprüche der jeweiligen Restriktionsenzyme berücksichtigt werden (siehe Abschnitt 4.16.1).

Das Design von Oligonukleotiden für die Punktmutagenese berücksichtigt, daß das veränderte Codon in der Mitte des etwa 32 Nukleotide langen Fragments liegt, um eine gute Anbindung an die DNS des Gens während der Polymerase-Kettenreaktion zu gewährleisten (siehe Abschnitt 4.16.2).

Zur Sequenzierung von PCR-Produkten werden die Primer so konstruiert, daß ihre komplementäre DNS-Sequenz zwischen 50 und 100 Basen vor der Basensequenz von Interesse liegt, da die ersten 20-50 Basen mit der verwendeten Sequenzierungsmethode nicht exakt aufgelöst werden (Kettenabbruchmethode nach Sanger [SANGER et al. 1977], siehe Abschnitt 4.15).

Bezeichnung	Sequenz	$T_m/^\circ\text{C}$
spgr	[18-mer] 5'-TTG GGG GAC AAC ATT TTG-3'	52
spgs	[21-mer] 5'-AGA AGC TCA GAA TAA ACG CTC-3'	50
bopbam-sense	[30-mer] 5'-TAT GAA GCT TCG ATC AGT CGC TGG TCG CGG-3'	94
bophind-anti	[36-mer] 5'-CAT AGG ATC CAT AAT GTT GGA GTT ATT GCC AAC AGC-3'	102
96G←	[33-mer] 5'-AAC GAG CAA CGC GAG GCC TAA CAA CAA CAG CGG-3'	104
96G→	[33-mer] 5'-AGC GCG AAG GTC GGC CTC GGG CTC ATC CTC CTG-3'	104
219L←	[33-mer] 5'-AAC GAG CAA CGC GAG GCC TAA CAA CAA CAG CGG-3'	112
219L→	[33-mer] 5'-CCG CTG TTG TTG TTA GGC CTC GCG TTG CTC GTT-3'	112
hopbam-sense	[29-mer] 5'-CAT AGG ATC CAT AAT GTC TAT CAC GAG TGT ACC CG-3'	102
hophind-anti	[35-mer] 5'-TAT GAA GCT TCT CAG TCG TCG CTT GAC AT-3'	84
muReR82Q	[32-mer] 5'-GGT AGA TGA CCC GCC TGA TGC GAC TGA CCG AC-3'	≥ 76
muFoR82Q	[32-mer] 5'-GT CGG TCA GCA TCA GGC GGG TCA TCT ACC-3'	≥ 76

Tabelle 4.4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
pUS-MEV	Ampr, Mevr, bop, f1, ColE1 ori, pWL102, pEF191, pSK	[SCHWEIGER 1996]
pGEMHE	Ampr, ColE1-ori, 3', 5'-UTR von $\beta$ -Globin, <i>Xenopus laevis</i>	[LIMAN et al. 1992]
pAcGP67a	Ampr, ColE ori, gp67 start ATG: 4135, pH-Promotor: 3992-4092	<a href="http://www.pharming.com">www.pharming.com</a>
pHusHop	Derivat von pUS-MEV, enthält <i>hop</i> statt <i>bop</i>	[BESIR 2001]

Tabelle 4.5: Vektoren

## 4.6 Verwendete Vektoren

Die Geninserts werden, soweit nicht anders vermerkt, von vorhandenen pUSMev-Derivaten mit den entsprechenden bop-Fragmenten durch PCR erzeugt.

Name	Beschreibung
pGEMHE-bop	Insert aus pUS-Mev, PCR mit bop-bam-sense, bop-bam-anti
pGEMHE-tri	Insert aus pUS-Mev-Derivat, PCR mit bop-bam-sense, bop-bam-anti
pGEMHE-D85T	Insert aus pUS-Mev, PCR mit bop-bam-sense, bop-bam-anti
pGEMHE-R82Q	2-stufige PCR mit muReR82Q, muFoR82Q und bop-bam-sense, bop-bam-anti von pGemHE-bop
pGEMHE-D96G	Insert aus pUS-Mev-Derivat, PCR mit bop-bam-sense, bop-bam-anti
pGEMHE-F171C	Insert aus pUS-Mev-Derivat, PCR mit bop-bam-sense, bop-bam-anti
pGEMHE-F219L	2-stufige PCR ausgehend von pGEMHE-bop, Einführung der Mutation mit 219 $\leftarrow$ , 219 $\rightarrow$
pGEMHE-tri167	Insert aus pUS-Mev-Derivat, PCR mit bop-bam-sense, bop-bam-anti
pGEMHE-tri163	Insert aus pUS-Mev-Derivat, PCR mit bop-bam-sense, bop-bam-anti
pGEMHE-hop	Einfache PCR mit pHusHop, hop-bam-sense, hop-bam-anti
pGEMHE-hopD236N	Insert aus pUS-Mev-Derivat, hop-bam-sense, hop-bam-anti
pGEMHE-S115A	Insert aus pUS-Mev-Derivat, hop-bam-sense, hop-bam-anti

Tabelle 4.6: Übersicht über die in dieser Arbeit erstellten Vektoren

## 4.7 Herstellung elektrokompenter *E. coli*

**10 % Glycerin** 100 ml 86 %iges Glycerin (Riedel de Haen) wird mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml ergänzt und autoklaviert.

**SOB-Medium** [SAMBROOK et al. 1989] 2.0 % (w/v) Bacto<sup>®</sup>-Trypton (DIFCO Labs), 0.5 % (w/v) Bacto<sup>®</sup>-Hefeextrakt (DIFCO Labs), 10.3 mM Natriumchlorid (Merck), 2.68 mM Kaliumchlorid (Merck).

Die Lösung wird mit deionisiertem Wasser auf 990 ml aufgefüllt und autoklaviert. Dem autoklavierten Medium werden je 5 ml einer steril filtrierten Lösung von 2 M Magnesiumchlorid und 2 M Magnesiumsulfat zugegeben, da sich während der Sterilisation in Anwesenheit von Magnesium Niederschläge bilden können.

Aliquots von frischen Zellen werden nach Erhalt vom Hersteller aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Diese dienen zur Herstellung elektrokompenter Zellen, wobei eine Vorkultur mit 30 ml SOB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler (250 upm) inkubiert wird. Die verwendeten Medien werden frisch angesetzt. Ein Liter SOB-Medium werden mit 10 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C auf einem Schüttler bei 200 upm bis Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0.5 (ca. 4 h) inkubiert.

Die folgenden Schritte erfolgen auf Eis bzw. bei 4 °C und dienen der Entfernung von Salzen aus der Zellsuspension:

- Zentrifugation der Zellen bei 4000 upm/20 min/4 °C (Beckman GS3-Rotor)
- Waschen des Pellets mit einem Volumen 10 % sterilem Glycerin
- Zentrifugation der Zellen bei 4000 upm/20 min/4 °C (Beckman GS3-Rotor)
- Waschen des Pellets mit 1/2 Volumen 10 % sterilem Glycerin
- Zentrifugation der Zellen bei 4000 upm/20 min/4 °C (Beckman GS3-Rotor)

- Waschen des Pellets mit 1/10 Volumen 10 % sterilem Glycerin
- Zentrifugation der Zellen bei 4000 upm/20 min/4 °C (Beckman GS3-Rotor)
- Resuspension des Pellets in 500  $\mu$ l 10 % Glycerin/l Kultur und Aliquotierung in 150  $\mu$ l Volumina in 1.5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf).

Die Aliquots werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschliessend bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 4.8 Elektroporation von *E. coli*

Elektrokompetente *E. coli*-Zellen werden auf Eis aufgetaut. Je 70  $\mu$ l der Zellsuspension werden in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm, Biorad) mit 5-10  $\mu$ l eines Ligationsansatzes bzw. mit 5  $\mu$ l einer 100 fach verdünnten Vektorlösung auf Eis vereinigt. Nach einer Inkubationsdauer von 10 min auf Eis wurden die Zellen unter Verwendung eines Elektroporationsgeräts (Gene Pulser) elektroporiert (Einstellungen: 25  $\mu$ F, 1.5 kV, 800  $\Omega$ ) und sofort mit gekühltem LB-Medium auf 500 bzw. 1000  $\mu$ l ergänzt. Nach einer kurzen Inkubation (ca. 30 min) der Suspension bei 37 °C ohne Selektionsdruck werden Teile des Transformationsansatzes zur Selektion auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## 4.9 Isolation von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Die Aufreinigung der Plasmide erfolgt mit dem QIAprep-Spin Plasmid Kit (Qiagen, Düsseldorf) nach Angaben des Herstellers. Zusammensetzung der Puffer siehe dort.

**P1-Puffer** Suspensionspuffer

**P2-Puffer** Lysepuffer

**N3-Puffer** Neutralisationspuffer

Einzelkolonien werden von einer LB-Amp-Platte mit einer sterilen Impfloese gepickt und in 5 ml ampicillinhaltiges LB-Medium in einem sterilen Reagenzglas inokuliert. Bei Bedarf wird eine weitere Platte der gepickten Kolonien zur Zwischenaufbewahrung angelegt. Die Einzelklone werden über Nacht bei 37 °C mit 250 upm geschüttelt und anschließend abzentrifugiert (RT/5 min/4000 upm, Hettich-Zentrifuge). Nach Absaugen des Überstandes werden die Zellpellets mit dem Dabei wird das Zellpellet zunächst in 250 µl **P1**-Puffer resuspendiert und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 250 µl Lyse-Puffer **P2** wird der Ansatz durch vorsichtiges Schwenken vermischt, bis eine homogene, viskose Lösung entstanden ist. Durch Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer **N3** und erneutem vorsichtigem Schwenken fallen Proteine, Membranfragmente und daran gebundene genomische DNS als weißer, flockiger Niederschlag aus. Nach 10 min Zentrifugation bei 9000 upm (Tischzentrifuge, Eppendorf) wird der klare Überstand auf die Mini-Säulen aufgetragen. Diese werden in 2 ml Reaktionsgefäßen 1 min bei 9000 upm abzentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Es erfolgt ein Waschschrift mit 750 µl Puffer ethanolhaltigem Waschpuffer (**PE**) und eine weitere Zentrifugation, um letzte Reste des Waschpuffers vollständig von der Vektor-DNS zu entfernen. Anschließend werden die Säulen in sterile Eppendorfgefäße eingesetzt und die DNA mit 50 µl bidestilliertem H<sub>2</sub>O in einem weiterem Zentrifugations-schritt eluiert.

## 4.10 Konzentrationsbestimmung von DNS

Eine geeignete Verdünnung der Probe wurde an einem Spektrometer vermessen (Pharmacia, Perkin Elmer). Als Reinheitskriterium wurde das Verhältnis der Absorptionen bei 260 ( $OD_{260}$ ) und 280 nm ( $OD_{280}$ ) zu Rate gezogen, welches in einer proteinfreien Lösung bei 2 liegen sollte. Die Konzentration der Probe errechnet sich nach

Doppelsträngige DNS

$$[DNS] = 50 \cdot OD_{260} \cdot VF [\mu\text{g ml}^{-1}]$$

Einzelsträngige DNS/RNS

$$[DNS] = 44 \cdot OD_{260} \cdot VF [\mu\text{g ml}^{-1}]$$

mit dem Verdünnungsfaktor

$$VF = \frac{V_p}{V_p + V}$$

## 4.11 Phenolisierung von Plasmid-DNS

**PCA**

Phenol:Chloroform:*iso*-Amylalkohol (v/v/v) 25:24:1

**CA**

Chloroform:*iso*-Amylalkohol (v/v) 49:1

Das Volumen der DNS-Lösung wird mit sterilem bidestilliertem Wasser auf 100  $\mu\text{l}$  ergänzt und mit einem gleichen Volumen **PCA**-Lösung auf dem Vortex vermischt. Zur Phasentrennung wird die Probe in der Tischzentrifuge 30 min zentrifugiert und anschließend die wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  **CA**-Lösung wird die Probe erneut auf dem Vortex vermischt und 30 min zentrifugiert. Nach Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wird die Lösung zur Fällung der DNS mit 200  $\mu\text{l}$  (Verhältnis 1:3) eisgekühltem absolutem Ethanol vermischt und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  für 15 min inkubiert. Nach Abzentrifugation (14000 upm, 30 min, Eppendorf Tischzentrifuge) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 500  $\mu\text{l}$  eisgekühltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (14000 upm, RT, 15 min, Eppendorf Tischzentrifuge) wird der Überstand abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in bidestilliertem Wasser aufgenommen.

## 4.12 Gelelektrophorese von DNS-Fragmenten

40 ml einer meist 1 %-igen Agarose-Suspension (Seakem, Neu Zeeland) in TAE-Puffer (1 mM EDTA, 40 mM Tris-Acetat, pH 8.5) werden in einer Mikrowelle zum Sieden erhitzt und geschwenkt, bis keine Schlieren von unvollständig gelöster Agarose mehr sichtbar sind. Nachdem die Lösung auf etwa 50 °C abgekühlt ist werden der Lösung 1  $\mu$ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und kurz geschwenkt. Das Gel wird in einer Flachbett-Gelkammer (Agagel mini, Biometra, Göttingen) gegossen. Nach Aushärten des Gels wird die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen DNS-Probenpuffer gemischt. Als Größenmarker dient eine 1kb-Leiter von GIBCO BRL. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 V (etwa 4-5  $V\text{cm}^{-2}$ ). Die Ethidiumbromid-markierten DNS-Banden werden unter UV-Licht beobachtet und gegebenenfalls ausgeschnitten. Die Reinigung ausgeschnittener Banden erfolgt mit dem Gel-extraktionskit QiaQuick<sup>®</sup> von Qiagen. Zunächst wird mit Hilfe einer hohen Konzentration von chaotropem Salz die Wasserstoffbrückenbindungen des Agarosepolymers aufgeschlossen. Während einer Zentrifugation über die mitgelieferten Säulchen bindet die DNS an einer modifizierten Silikagelmatrix und kann so ethanolisch gewaschen werden. Die Elution erfolgt mit bidestilliertem Wasser.

Dazu wird das Gelfragment in einem 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit **QX2** Puffer (300  $\mu$ l Puffer/100 mg Gelsubstanz) versetzt und 10 min bei 50 °C unter gelegentlichem Schütteln aufgeschmolzen. Die klare Lösung wird dann auf Zentrifugationssäulchen aufgetragen und bei 15000 upm (Eppendorf Tischzentrifuge) 1 min zentrifugiert. Letzte Agarosereste werden in einem Waschschrift mit 500  $\mu$ l **QX2** Puffer entfernt. Es folgen zwei weitere Waschschrift mit je 500  $\mu$ l ethanolhaltigem **PE**-Reinigungspuffer. Die Säulchen werden zur Entfernung verbliebener Lösungsmittelreste 1 min trocken zentrifugiert und anschließend wird die DNS mit 30 - 50  $\mu$ l bidestilliertem Wasser eluiert.

### 4.13 Restriktionsverdau

In Restriktionsverdau werden die Reagenzien nach Angaben der Hersteller New England Biolabs in geeigneten Puffersystemen angesetzt. Pro Mikrogramm DNS werden 2 Enzymeinheiten eingesetzt, präparative Verdauungen werden mit 1.5 fachem Überschuß an Restriktionsenzym durchgeführt. Der Fortschritt der Reaktion wird durch Agarosegelanalyse von Aliquots des Ansatzes beobachtet. Die Aufreinigung der Fragmente erfolgt über präparative Gelelektrophorese und anschließende Aufreinigung mit Qiaquick<sup>®</sup> bzw. QiaEx<sup>®</sup> von Qiagen (siehe Abschnitt 4.12).

### 4.14 Ligation von Plasmiden

Die zu ligierenden, aufgereinigten DNS-Fragmente werden in jeweils zwei bis drei unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt, wobei das Insert gegenüber dem Vektorfragment in einem Überschuss von (5-20):1 vorgelegt wird.

Bezeichnung	Ansatz 1	Ansatz 2
Vektor, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.5 $\mu\text{l}$	0.5 $\mu\text{l}$
Insert, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	3.0 $\mu\text{l}$	10.0 $\mu\text{l}$
5xLigase Puffer	3.0 $\mu\text{l}$	3.0 $\mu\text{l}$
T4-Ligase	1.0 $\mu\text{l}$	1.0 $\mu\text{l}$

Tabelle 4.7: Beispiel eines Ligationsansatzes

Der Ansatz wird mit deionisiertem Wasser auf 15  $\mu\text{l}$  ergänzt. Die Ligation erfolgt bei 15-17 °C über Nacht.

### 4.15 Sequenzierung von DNS

Zur Sequenzierung der DNS wird die Kettenabbruchmethode nach Sanger [SANGER et al. 1977] verwendet. Als Farbstoffe kommen fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide des BigDye Terminator Cycle Sequen-

cing Ready Reaction Kit und ABI PRISM<sup>®</sup> dRhodamin von Perkin Elmer Applied Biosystems zur Anwendung.

#### **4.15.1 Herstellung fluoreszenzmarkierter DNS-Fragmente**

Für eine Sequenzierungsreaktion werden je ca. 0.5 - 1.0  $\mu\text{g}$  aufgereinigtes Plasmid bzw. 0.3 - 0.5  $\mu\text{g}$  eines aufgereinigten PCR-Produkts mit 10 pmol Primer eingesetzt. Weitere Reagenzien wurden durch bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Aliquots folgender Lösungen bereitgestellt.

##### **Big-Dye-Readymix**

AmpliTa<sup>®</sup>q DNA-Polymerase, dNTPs (dATP, dCTP, dITP statt dGTP und dUTP anstelle von dTTP), BigDye<sup>®</sup> Terminatoren (fluoreszenzfarbstoffmarkierte ddNTPs), rTth-Pyrophosphatase,  $\text{MgCl}_2$  und Tris/HCl-Puffer, pH 9.0

##### **d-Rhodamin-ReadyMix**

AmpliTa<sup>®</sup>q DNA-Polymerase, FS, dNTPs (dATP, dCTP, dITP statt dGTP und dTTP), (d)Rhodamin<sup>®</sup> -Terminatoren (fluoreszenzfarbstoffmarkierte ddNTPs), rTth-Pyrophosphatase,  $\text{MgCl}_2$  und Tris/HCl-Puffer, pH 9.0

Der Sequenzierungsansatz enthält 1-2  $\mu\text{l}$  DNS, 0.5  $\mu\text{l}$  Primer (20 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 6  $\mu\text{l}$  Rhodamin<sup>®</sup> -ReadyMix bzw. 4  $\mu\text{l}$  BigDye<sup>®</sup> -ReadyMix und wird mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  ergänzt. Die Reaktion durchläuft in 20 Zyklen gefahren (Denaturierung 30" @  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Hybridisierung 30", Temperatur entsprechend der errechneten Schmelztemperatur des verwendeten Primers; Verlängerung 3-4' @  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

#### **4.15.2 Aufreinigung für die Sequenzierung**

Die farbstoffmarkierten DNA-Fragmente werden über Gelfiltrationssäulen (MicroSpin<sup>®</sup> G-50 Spinocolumns, Pharmacia) aufgereinigt. Zur Vorberei-

tung der Säulchen wird zunächst das Säulenmaterial durch Vortexen resuspendiert, der Schraubdeckel um eine Vierteldrehung geöffnet und der Verschluss am Säulenende abgebrochen. Die Flüssigkeit der Säulchen wird durch einminütige Zentrifugation bei 4000 upm (Tischzentrifuge Eppendorf) in einen 1.5 ml Reaktionsgefäß entfernt und die Säule in ein steriles Reaktionsgefäß gestellt. Nun wird die Sequenzierungsprobe (ca. 20  $\mu$ l) vorsichtig auf das Säulenmaterial aufgetragen und für 1 min bei 5000 upm zentrifugiert. Der Durchlauf (ca. 50  $\mu$ l) enthält die farbstoffmarkierten DNA-Fragmente, welcher anschließend in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac<sup>®</sup>, Bachhofer, Reutlingen) eingetrocknet und zur Sequenzierung abgegeben wird.

## 4.16 Mutagenese

### 4.16.1 Einführung von neuen Schnittstellen

Die Oligonukleotide zur Einführung von neuen Schnittstellen enthalten eine komplementäre Sequenz zur Bindung an die DNA-Vorlage und eine neue Sequenz, die die genetische Information für die neue Schnittstelle enthält. Das entsprechende PCR-Produkt wird mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in den neuen Vektor ligiert. Nach Transformation des neuen Plasmids in *E. coli* und Selektion auf LB-amp-Platten wird die Sequenz des Produkts mittels Sequenzierung verifiziert.

### 4.16.2 Einführung von Punktmutationen

Punktmutationen werden auf zwei Methoden erzeugt. Bei beiden Techniken handelt es sich um zweistufige PCR-Reaktionen. Bei der klassischen Methode werden im Bereich der Mutation zwei Oligonukleotide benötigt, die zueinander revers komplementär sind und stromaufwärts wie stromabwärts von der Mutationsstelle komplementär zum Ausgangsgen sind. Mit den geeigneten Rand-Oligonukleotiden erhält man zwei Produkte, die in geringer Konzentration als DNA-Vorlage in der zweiten Stufe der PCR-

Reaktion dienen. Kombiniert mit den gleichen Rand-Oligonukleotiden aus Stufe 1 lagern sich die Produkte aus Stufe 1 im Bereich der Mutation aneinander und werden so zum Endprodukt aufgefüllt.

Eine zweite Methode spart ein Oligonukleotid ein. Dazu wird ein für ein Gen spezifisches Oligonukleotid benötigt, das einen nicht-komplementäres 3'-Ende besitzt und daher in der zweiten Stufe nicht weiter vermehrt wird (siehe Abbildung 4.1).

## 4.17 Gelelektrophorese von Proteinen

Zur Auftrennung von Proteinen wird die Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli [SAMBROOK et al. 1989] angewandt. Die gefertigten Gele bestehen aus einem Sammelgel, wodurch eine Fokussierung der Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel erreicht wird.

### 4.17.1 Herstellung der Polyacrylamid-Gele

#### Lösung A

Protogel<sup>®</sup>, ultrarein: 30 % (w/v) Acrylamid, 51.9 mM N,N'-Methylenbisacrylamid.

#### Lösung B

0.4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat, 8.0 mM EDTA, 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8

#### Lösung C

0.4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat, 8.0 mM EDTA, 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8

Die Polyacrylamid-Konzentrationen der verwendeten Trenngele betragen zwischen 11 und 13 %, welche durch eine Mischung der beiden Lösungen mit bidestilliertem Wasser eingestellt wird.

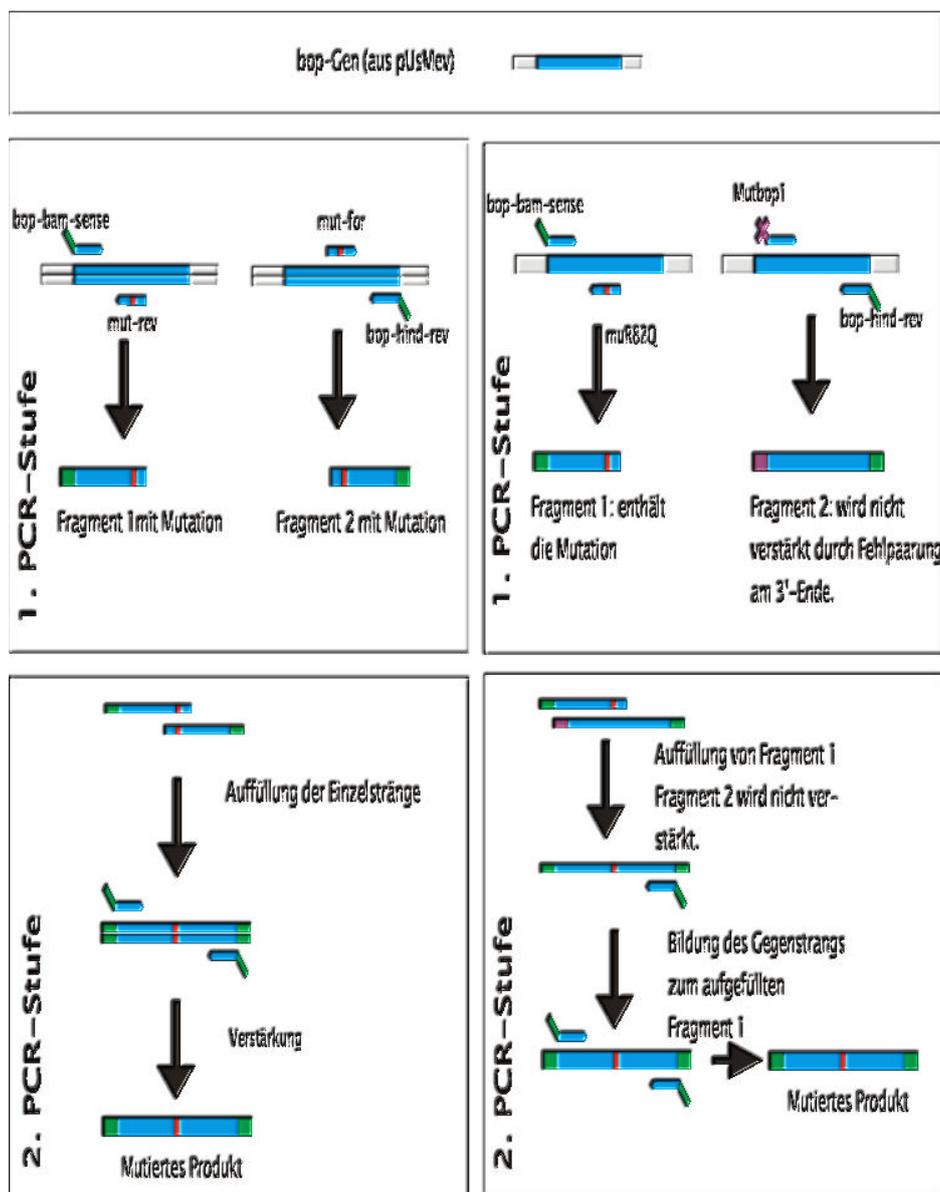


Abbildung 4.1: Einführung einer Punktmutation mit nur einem mutations-spezifischen Oligonukleotid.

<b>Trenngel</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>13 %</b>	<b>Sammelgel</b>	<b>4 %</b>
Lösung A ( % v/v)	36.7	40.0	43.3	Lösung A ( % v/v)	13.3
Lösung B ( % v/v)	25.0	25.0	35.0	Lösung C ( %v/v)	32.0
H <sub>2</sub> O ( %v/v)	38.3	35.0	31.7	H <sub>2</sub> O ( %v/v)	54.7

Tabelle 4.8: Proteingele aus Polyacrylamid

Zum Start der Polymerisation werden zu 10 ml dieser Lösung 4  $\mu$ l TEMED (1,2-Bis(dimethylamino)-ethan) und 35  $\mu$ l einer 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung in Wasser gegeben. Nach kurzem Rühren wird die Lösung in eine vorbereitete Apparatur gegossen und mit *iso*-Propanol überschichtet, um eine scharfe Kante zu erzielen.

Zur Herstellung des 4 %-igen Sammelgels werden Lösung A, Lösung C und Wasser nach Tabelle 4.8 angesetzt. Zum Start der Polymerisation werden 225  $\mu$ l einer 10 % Ammoniumpersulfat-Lösung und 45  $\mu$ l 10 % TEMED zugegeben. Nach kurzem Vermischen werden die Trenngelle mit der Lösung überschichtet und rasch die Kämme eingesetzt.

Fertig gegossene Gele werden mit Laufpuffer durchtränktem Papier umwickelt und in einer geschlossenen Plastiktüte bei 4 °C gelagert.

#### 4.17.2 Gellauf und Coomassie-Färbung

Die Gele werden in einer Gelkammer von Hoeffler Scientific Instruments (Typ SE250) gefahren. Als Laufpuffer dient ein Tris-Glycin-Puffer (0.2 % (w/v) Natriumdodecylsulfat , 250 mM Glycin, 25 mM Tris, pH 8.3). Als Größenmarker dient ein vorgefärbter Marker von Biorad (Broad Range Marker). Pro Spur werden in der Regel 3-5  $\mu$ g Protein aufgetragen, wobei die Proteinkonzentration mit dem BCA Kit ermittelt wird. Die Proteinlösung wird mit einem 5-fach konzentrierten Probenpuffer (2.3 % (w/v) Natriumdodecylsulfat, 0.5 M Tris, 0.2 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % (w/v) Glycerin) eingestellt und nach einminütigem Erhitzen in kochendem Wasser mit Hilfe einer Eppendorfpipette und speziellen, fein ausgezogenen Spitzen auf das Gel aufgetragen. Zu Beginn wird eine geringere Stromstärke

von 20 mA eingestellt, um eine gute Fokussierung im Sammelgel zu erreichen. Die Trennung erfolgt bei 40 mA.

Zur Visualisierung werden die Gele entweder mit Coomassie Blue gefärbt oder in einem Western Blot eingesetzt. Zur Coomassie-Färbung werden die Gele mindestens 30 min in einer Färbelösung (50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig, 0.01 % Coomassie Blue R-250) geschwenkt. Überschüssiger Farbstoff wird mit einer Entfärbelösung (50 % (v/v) Methanol, 10 % Essigsäure) unter Schwenken entfernt, wobei die Entfärbelösung mehrere Male gewechselt wird.

### 4.17.3 Western Blot

#### Blotting-Puffer

20 % (w/v) Methanol, 192 mM Glycin. 0.01 % (w/v) Natriumdodecylsulfat, 25 mM Tris/HCl, pH 8.6

#### TBST-Puffer

0.15 M Natriumchlorid, 0.055 % (w/v) Tween 20, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4

#### TBST-Puffer+BSA

TBST mit 5 % Rinderserumalbumin, Fraktion V, Merck

Nach dem Gellauf werden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen. Dazu wird eine Membran zunächst auf die Grösse des Gels zurechtgeschnitten und im Falle der Nubond-Membran zur Herabsetzung ihrer Hydrophobizität mit Methanol benetzt. Anschliessend wird die Membran mit einigen Lagen Filterpapier (Whatman) in Blotting-Puffer äquilibriert. In einer *Semi Dry*-Blotapparatur wird auf der Anode ein Sandwich aus folgenden Lagen aufgebaut:

- 2 Lagen in Blotting-Puffer getränktes Filterpapier
- das Polyacrylamidgel

- die Transfermembran
- 2 Lagen in Blotting-Puffer getränktes Filterpapier

Es wird darauf geachtet, dass sich keine Bläschen zwischen den Schichten, vor allem zwischen Gel und Membran bilden. Der Transfer erfolgt bei einer Stromdichte von  $1.2 \text{ mA/cm}^2$  über eine Dauer von 90 min.

Zur Detektion von Bacteriorhodopsin auf der Membran wird ein BR-spezifische Antikörper in Verbindung mit dem ECL-Immunostaining-Kit von Amersham verwendet. Dazu wird die geblottete Transfermembran zweimal in TBST-Puffer gewaschen (je ca. 5 min) und anschließend für mindestens eine Stunde in 15 ml TBST+BSA-Puffer unter Schwenken geblockt. Danach wird die Membran 3 min in TBST-Puffer gewaschen und für 15 min nochmals in die BSA-haltige Lösung gegeben. Es folgt eine einstündige Inkubation der Membran in 10 ml TBST+BSA-Puffer mit BR-spezifischem Antikörper ( $\alpha - BR$ , 1:6000, Hillebrandt). Nach zweimaligem Waschen der Membran mit TBST-Lösung (je 10 min) folgt die Zugabe des zweiten Antikörpers, Amersham). Dazu wird die Membran in TBST-BSA-Puffer mit Protein A (Promega) im Verhältnis 1:10000 für 60 min inkubiert. Nach gründlichen Waschen der Membran mit TBST-Puffer (15 min, 4x5 min) folgt die Visualisierung der Banden mit dem Biolumineszenz-System von Amersham.

Dazu werden je 2 ml der beiden Komponenten des ECL-Systems (Lumi-Reagenz und oxidierende Reagenz) in einer Plastikwanne vermischt. Anschließend wird die Membran für 1 min in der Lösung inkubiert. Überflüssige Reagenzlösung wird am Rand der Wanne abgestreift bzw. abgetropft. Vor dem Auflegen des Films wird die so vorbereitete Membran in Frischhaltefolie verpackt, wobei Luftblasen vermieden werden.

Als Röntgenfilm kommt der ECL Hyper-Film von Amersham zur Anwendung. Die Expositionsdauer beträgt zwischen 10 s und 5 min. Zur Dokumentation und Quantifizierung der Banden wird der Film in Graustufen bei 300 dpi eingescannt. Die Quantifizierung erfolgt mit der Software ImageJ, einer portablen Version des bekannten Programms NIH-Image (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

## 4.18 Zeitaufgelöste Spektroskopie

Zur Untersuchung von wtBR und den Mutanten werden BR-Membranfraktionen bzw. PM von entsprechenden *Halobacterium salinarum*-Stämmen verwendet. Die zeitaufgelösten Spektren werden in CO-Medium bei pH 5.5 und pH 7.0 aufgenommen in Gegenwart von 3 mM Natriumazid, um einen Vergleich der Daten mit den Stromableitungen zu erlauben. Bei groben Schwebeteilchen in der Suspension werden diese im Utraschallbad weiter verkleinert. Die optische Dichte der Proben beträgt rund 0.5 ODml. Die Messungen werden an einem Geräteaufbau von Dr. Uhl [UHL et al. 1984] durchgeführt. Zur Anregung dient ein Farbstofflaser mit der Wellenlänge 585 nm. Vor der Messung werden die Proben mindestens 2 min lichtadaptiert. Um ein besseres Signal-Rauschverhältnis zu erreichen werden je 10 Spektren aufsummiert. Die Daten werden in Ascii-Dateien gespeichert und mit Hilfe von Origin 6.0 (Microcal) und selbstgeschriebenen Routinen ausgewertet.

## 4.19 Heterologe Expression in *Xenopus laevis*

Zur heterologen Expression in *Xenopus laevis* werden die offenen Leserahmen in den Vektor pGEMHE kloniert und über *in-vitro*-Transkription [?] in cRNS übersetzt. Die cRNA wird in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert. Zur Expression des Proteins werden die Oozyten in ORIII-Lösung [?] über 3 (Kanal PCHA2) bzw. 4-5 Tage (Bakteriorhodopsine) im Dunkeln bei 18 °C inkubiert.

### 4.19.1 *in-vitro*-Transkription

Nachdem eine RNS-Synthese mit dem T7-Cap-Scribe-Kit (Boehringer-Mannheim) nur geringe Ausbeuten und schlechte Expression in den Oozyten von *Xenopus laevis* erzielt wird die RNS im Laufe dieser Arbeit nach einer abgeänderten Anleitung nach [SAMBROOK et al. 1989] hergestellt.

- T7-RNS-Polymerase (5000 U/ml) mit passendem Reaktionspuffer (5-fach), Promega
- Dithiothreit (DTT), Stammlösung 100 mM,
- Cap-Nukleotid ( $m^7$ -GpppG), Stammlösung 10 mM, Boehringer
- Nucleotidmix (GACU), Stammlösung je 5 mM, Boehringer
- Template-DNS, linearisiert
- 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  RNAsin, GIBCO BRL
- bidestilliertes, RNase freies Wasser

Die Template-DNS wird durch eine Restriktionsendonuklease (bop-Konstrukte: *Pst*I, pcha2-Konstrukt: *Nhe*I) linearisiert und anschliessend phenolisiert. Für die reverse Transkription werden Restriktionsenzyme bevorzugt, die einen 5'-Überhang erzeugen, da ansonsten ein Produktgemisch durch Übersetzung des Gegenstrangs eintreten kann. Da für das Konstrukt (Wirtsvektor pGEMHE) jedoch nur *Pst*I in Frage kommt wird vor der Transkription ein Verdau mit Klenow Fragment V durchgeführt.

Lösung	c/mM	V / $\mu\text{l}$	Hersteller
5xPuffer		10	Promega
DTT	100	5	Sigma
CAP-Nukleotid	10	10	GIBCO BRL
GACU	5	10	Boehringer
DNS-Vorlage	1	5	
T7-RNA-Polymerase	1000 U/ $\mu\text{l}$	2x1	Promega
RNAsin	20 U	1	Promega

Tabelle 4.9: *in-vitro*-Transkription

Die Reagenzien aus Tabelle 4.9 werden mit bidestilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  ad 50  $\mu\text{l}$  ergänzt. Der Transkriptionsansatz wird 3 Std. bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf von 1.5 Std. wird die erneut gleiche Menge frische Polymerase zugegeben. Der Verlauf der Reaktion wird im Agarosegel nach Anfärbung mit

Ethidiumbromid kontrolliert. Das Produkt wird durch Phenolisierung bzw. mit dem RNEasy-Kit vom Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschliessend in Aliquots von 2  $\mu\text{l}$  und einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 4.19.2 Puffer zum Umgang mit *Xenopus* Oozyten

##### Modifiziertes Barth-Medium (MBS, modified frog ringer)

88 mM Natriumchlorid, 1 mM Kaliumchlorid, 0.82 mM Magnesiumsulfat, 1 mM Natriumhydrogencarbonat, 0.33 mM Calciumdinitrat, 2.5 mM Natriumpyruvat, 0.41 mM Calciumchlorid, 5 mM HEPES, pH 7.5 (194 mOsm) [SCHROEDER 1995].

##### ORI

82.5 mM Natriumchlorid, 2.5 mM Kaliumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 1 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 5 mM HEPES, pH 7.4 (181 mOsm).

##### ORII

82.5 mM Natriumchlorid, 2.5 mM Kaliumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 1 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1 mM Calciumchlorid, 5 mM HEPES, pH 7.4 (184 mOsm) [GOLDIN 1992].

##### ORIII

82.5 mM Natriumchlorid, 2.5 mM Kaliumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 1 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1 mM Calciumchlorid, 50  $\text{ng ml}^{-1}$  Gentamycin, 5 mM HEPES, pH 7.4.

##### Phosphat-Stoppuffer

100 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 1  $\text{mg ml}^{-1}$  Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V, pH 6.5 [CAO et al. 1992].

##### BSA-Waschpuffer

MBS, 1  $\text{mg ml}^{-1}$  BSA [CAO et al. 1992].

**Bamberg-Puffer**

90 mM Natriumchlorid, 20 mM Tetraethyl-ammoniumchlorid (TE-ACl), 5 mM Bariumchlorid, 2 mM Calciumchlorid, 10 mM MOPS, pH 7.6 (251 mOsm) [NAGEL et al. 1995].

**CO-Medium (COM)** Bei diesen Bad-Lösungen handelt es sich um modifizierte Bamberg-Puffer. Der Unterschied besteht in einem höherem Anteil an Cäsiumchlorid, das v.a. als Inhibitor von Kaliumkanälen auftritt.

80 mM Natriumchlorid, 3 mM Natriumazid, 20 mM TEACl, 5 mM Bariumchlorid, 10 mM Cäsiumchlorid, 2 mM Calciumchlorid, 10 mM MES, pH 5.5.

Die Badlösung wird durch Austausch des Puffers auf weitere pH-Werte eingestellt: je 10 mM MES → pH 6.5, MOPS → pH 7.4 und TAPS → pH 8.5 verwendet.

**Natriumpuffer** [CAO et al. 1992]

115 mM Natriumchlorid, 2.5 mM Kaliumchlorid, 1.8 mM Calciumchlorid, 1 mM Natriumhydrogencarbonat, 10 mM HEPES, 1 mM Magnesiumchlorid, pH 7.4.

**Kaliumpuffer**

115 mM Kaliumchlorid, 2.5 mM Natriumchlorid, 1.8 mM Calciumchlorid, 1 mM Natriumhydrogencarbonat, 10 mM HEPES, 1 mM Magnesiumchlorid, pH 7.4

*Modifizierte Kaliumpuffer*

Unterschiedliche Kalium/Natrium-Verhältnisse werden durch Mischung des Kalium- bzw. Natriumpuffers in den Verhältnissen 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 und 0:100 erstellt. Die effektiven Konzentrationen werden in Tabelle 4.10 angegeben.

KCl/NaCl (v %/v %)	[NaCl] /mM	[KCl] /mM
100/0	115.0	2.5
75/25	86.3	28.8
50/50	57.5	57.5
25/75	28.8	86.3
0/100	2.5	115.0

*Tabelle 4.10:* Effektive Natrium-/Kaliumkonzentrationen in den modifizierten Kaliumpuffern

### 4.19.3 Präparation der Oozyten

Die Oozyten werden mit Hilfe einer automatischen Pipette mit einem Volumen von 1000  $\mu\text{l}$  gehandhabt. Die verwendeten Spitzen werden mit einer Schere abgeschnitten, so daß eine Öffnung von etwa 5 mm entsteht. Um eine Verletzung der Oozyten zu vermeiden wird die Schnittkante mit einer offenen Flamme abgerundet.

Zu Vereinzelung der Oozyten werden die frisch entnommenen Ovarien einem Collagenaseverdau unterzogen. Die Gesamtdauer des Verdaus beträgt in der Regel zwischen 3 und 5 Stunden. Es ist nicht gelungen, die das Rezept der Aufarbeitung dahingehend zu verfeinern, daß eine allgemeine Methode zur Aufarbeitung verwendet werden konnte. Gründe dafür sind nicht bekannt. Auf alle Fälle bestehen zwischen verschiedenen Chargen von Collagenase (auch des gleichen Herstellers) erhebliche Unterschiede in der Collagenase-Aktivität. Bei hohen Konzentrationen werden bevorzugt die Oozyten verdaut, während das Bindegewebe zwischen den Zellen nach wie vor stabil bleibt. Daher wird die Wahl einer relativ niedrigen Collagenase-Konzentration bevorzugt, da hier die Oozyten in den meisten Fällen stabil bleiben. Als praktikabel hat sich folgende Vorschrift erwiesen:

- Trennen der entfernten Ovarien in kleinere Einheiten von 10-15 Oozyten.
- Zweimaliges Waschen der Zellen in Calcium-freiem ORI-Medium. Hierzu werden die Oozyten nach jedem Waschschrift in eine Petri-

schale mit etwa 15 ml frischem Medium überführt und mindestens fünf Minuten auf einem Schwenktisch sanft (50 upm) geschwenkt.

- Zugabe von Collagenase I (Boehringer-Mannheim) bzw. Collagenase A (Sigma) zu einer Konzentration von  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  ( $0.2\text{-}0.5 \text{ U ml}^{-1}$ ).
- Inkubation auf einem Schwenktisch (100 upm), gelegentliches Testen der Oozyten und manuelle Separation bereits gelockerter Einheiten.
- Gegebenenfalls weitere Zugabe von Collagenase nach 1.5 Std.

Nach maximal 5 Std. wird begonnen, die Zellen auch manuell zu trennen. Vorher werden die Zellen dreimal in Calcium-freiem ORI-Medium gewaschen. Unter dem Lichtmikroskop werden die gewonnenen Oocyten auf Qualität untersucht. Noch zusammenhängende Zellen werden mit zu Haken ausgezogenen Pateurpipetten manuell vereinzelt. Es werden nur Oozyten für die Inkubation selektiert, die einen klaren, sauberen Rand zwischen den animalischen und vegetativen Polen aufweisen und keine Flecken aufweisen (Entwicklungsstadium V-VI).

Die Oozyten werden über Nacht in ORIII-Medium bei  $17\text{-}20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert, welches mit  $1 \text{ mM}$  Natriumpyruvat und  $20 \text{ mM}$  Gentamycin (Boehringer-Roche) versetzt wurde. Am nächsten Morgen werden abgestorbene Oozyten abgesondert, die übrigen werden für elektrophysiologische Experimente verwendet, wie unten beschrieben wird.

#### **4.19.4 Mikroinjektion von RNS in Oozyten von *Xenopus laevis***

Die Mikroinjektionsnadeln werden an einem Flaming/Brown Mikropipettenpuller, P-97 von Sutter Instruments ausgezogen. Die Glaskapillaren (Borsilikat, Aussendurchmesser  $1.0 \text{ mm}$ , Innendurchmesser  $0.5 \text{ mm}$ , Sutter Instruments) werden zu Spitzen mit etwa  $1 \text{ cm}$  Flankenlänge ausgezogen und unter dem Mikroskop (Zeiss Stemi SV9, Lichtquelle Zeiss KL-150) mit einer Schweizer Pinzette abgebrochen. Die Injektion erfolgt mit einem druckgetriebenen Mikroinjektor (PLI-100 von Medical Systems Corp), der

Flüssigkeiten sowohl ansaugen als auch abgeben kann. Nach einem Test der Injektionspipette mit RNase-freiem Wasser werden 2  $\mu$ l RNS-Lösung (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) auf einen Parafilmstreifen pipettiert und blasenfrei in die Kapillare aufgezogen. Zur Injektion werden gesunde Oozyten selektiert und in einer Petrischale in 6 ml MBS- oder ORII-Puffer vorgelegt. Das Injizieren wird erleichtert, indem die Oozyten auf einer Unterlage aus einer Schuhsohle mit etwa 3 mm tiefen Versenkungen (Walmart, USA, freundliche Gabe von Dr. U Fischer) örtlich fixiert werden.

Es werden zwischen 50 und 100 nl RNS pro Oozyte injiziert. Pro Probe werden zwischen 15 und 30 Oozyten injiziert. Nach erfolgter Injektion werden die Oozyten eine Stunde auf Eis gelagert. Nach dieser Beobachtungsphase werden defekte Oozyten entfernt. Es folgt die längere Inkubation der Oozyten.

#### 4.19.5 Inkubation der Oozyten/Rekonstitution

Das Inkubationsmedium ORIII wird mit einer 1 mM all-*trans*-Retinal auf eine Retinalendkonzentration von 1  $\mu$ M eingestellt. Die Oozyten werden anschließend bei 18-20 °C für 4-6 Tage im Dunkeln inkubiert und elektrophysiologischen Messungen sowie einer Quantifizierung der Expression unterzogen.

#### 4.19.6 Isolation der Membranfraktion

##### HOMO-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 8; 0.1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM PMSF (Stocklösung in Aceton, gelagert bei -20 °C).

##### RIPA-Puffer

200  $\mu$ l 1M TRIS/HCl, pH 7.5; 1 ml 10 % (v/v) Triton X-100; 1 ml 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat; 1 ml 10 % Desoxycholat; ad 10 ml deionisiertes und steriles Wasser.

Die Oozyten werden nach elektrophysiologischer Untersuchung bei 4 °C über Nacht in ORIII-Medium gelagert und am nächsten Tag aufgearbeitet.

10 Oozyten werden in 1 ml HOMO-Puffer mit Proteaseinhibitoren (PMSF, Aprotinin) in einem Glaspotter homogenisiert. Nach Abtrennung der Kernfraktion durch Zentrifugation (5000 upm, 10 min, 4 °C, Eppendorf Tischzentrifuge) wird der Überstand zur Pelletierung der Membranfraktion einer Ultrazentrifugation unterzogen (50000 upm, 30 min, 4 °C, Beckman TL-100-3). Das meist sichtbare Pellet wird in 10 µl RIPA-Puffer/Oozyte gelöst und in einem „Western Blot“ weiter untersucht.

#### 4.19.7 Defollikulation von Oozyten der *Xenopus laevis*

Strip-Lösung [STÜHMER 1992]

200 mM Kaliumaspartat, 20 mM Kaliumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.4 (500 mOsm).

Da die Zellen nach Entfernung der Follikularschicht äußerst fragil sind wird der Vorgang in einer mit Agarose (1 % Agarose in Strip-Lösung) beschichteten Petrischale durchgeführt. In der Folge muß auch ein Luftkontakt der Zellen vermieden werden. Daher werden die Zellen mit feuerpolierten Pasteurpipetten von einem Gefäß in das Nächste transferiert.

Zur Entfernung der Follikularschicht werden die *Xenopus* Oozyten wie unter Abschnitt 4.19.3 beschrieben separiert und anschließend 10-30 min in Strip-Lösung gebadet. Die genaue Dauer wird optisch bestimmt, da man die Ablösung der äußeren Membran mit dem Auge verfolgen kann. Diese wird dann vorsichtig unter Verwendung zweier Schweizer Pinzetten entfernt.

### 4.20 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die Übersetzung Zwei-Elektroden-Spannungsklemme des Begriffes Two-Electrode-Voltage-Clamp wird im folgenden mit TEVC abgekürzt. Die Technik bietet sich vor allem für große Zellen an, da bei diesen relativ starke

Ströme (nA - mA) auftreten können, die bei der Messung mit nur einer Elektrode Schwierigkeiten bereiten würden.

#### 4.20.1 Experimenteller Aufbau

Der experimentelle Aufbau wird in Abbildung 4.2 dargestellt. Kernstück bildet eine 3 ml-Petrischale zur Aufnahme des Oozyten im Fokus eines inversen Lichtmikroskops (Axiovert 100, Zeiss). Mit einer peristaltischen Pumpe (Minipuls 2, Gilson) erfolgt eine stetige Perfundierung der Zelle mit frischer Badlösung sowie ein Medienwechsel. Die beiden Vorverstärker (HG-A x1LU: Spannungsmessung, HG-A x10MGU: Strominjektion, Axon Instruments) werden über ein Mikromanipulationssystem (Luigs-Neumann) positioniert. Zur Stabilisierung des Badpotentials dient eine virtuelle Badklemme (VG-2Ax100, Axon Instruments), um eine Drift des Bezugspotentials zu minimieren.

Die Belichtung der Zellen erfolgt mit Licht aus einer starken Hg-Bogenlampe (HBO 300, Oriol), deren Licht über ein Linsensystem und einen Lichtleiter auf das Objekt fokussiert wird. Die Lichtqualität wird durch das Einführen von Neutralgläsern und/oder Farbgläsern modifiziert. Schädliche UV-Strahlung wird stets mit einem Calflex 3000-Wärmeglas (Balzers) ausgefiltert.

Nach einer Aufbereitung des Meßsignals (Filtern, Verstärken) in einem elektrophysiologischen Meßverstärker (Geneclamp 500), Axon Instruments werden die Daten über einen AD/DA-Wandler auf einen Computer überspielt. Hier kommt das Computerprogramm pClamp 7.0 (Axon Instruments) zum Einsatz. Mit dem Programmpaket lassen sich Experimente planen, steuern und aufzeichnen.

#### 4.20.2 Herstellung der Elektroden

Zur Herstellung der Silber-/Silberchlorid-Elektroden werden Boratglas-Kapillaren mit Hilfe eines Flaming-Brown P21-Elektrodenziehgeräts ausgezogen. Die verwendeten Kapillaren sowie das eingestellte Programm werden in Tabelle 4.11 zusammengefaßt.

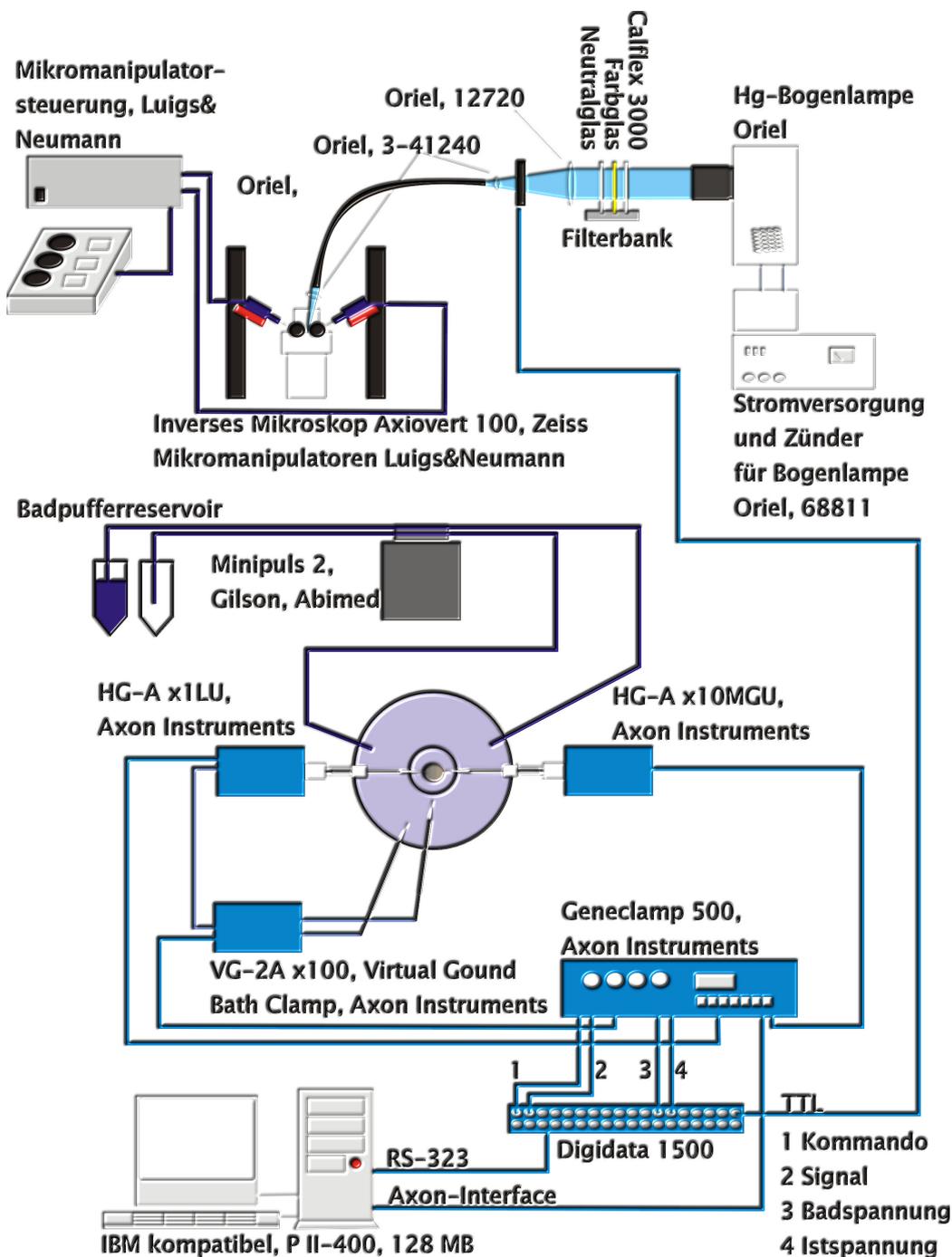


Abbildung 4.2: Experimenteller Aufbau der TEVC-Messungen

Verwendung	Parameter	Bezeichnung, Hersteller
RNA-Injektion	i.d. 0.5 mm o.d. 1.0 mm l 10 cm	BF100-50-10, Sutter Instruments Co.
TEVC-Ableitung	i.d. 0.5 mm o.d. 1.0 mm l 8 cm	GB100F-8P, Science Products GmbH
TEVC-Ableitung	i.d. 0.75 mm o.d. 1.0 mm l 10 cm	1B100F-4, World Precision Instruments, Inc.

Tabelle 4.11: Verwendete Borsilikat-Kapillaren zur Injektion/Ableitung

Ein Silberdraht wird nach Reinigung mit feinem Schleifpapier (600er Körnung) und 70 % Ethanol unter Verwendung einer Stromquelle bei 1 mA Strom in 100 mM Salzsäure chloriert innerhalb einer Stunde mit einer ausreichend dicken Silberchloridschicht überzogen. Als Elektrolyt in der Kapillare wird 3 M Kaliumchlorid bzw. Cäsiumchlorid verwendet. Der elektrische Widerstand der verwendeten Kapillaren liegt zwischen 0.5 und 1.5 M $\Omega$ .

### 4.20.3 Durchführung der Messungen

Eine Oozyte von *Xenopus laevis* wird in einer Petrischale mit einem Oozyten-Puffer perfundiert. Als Referenzelektrode dient ein chlorierter Silberdraht, welcher direkt in die Badlösung eintaucht. Um Potentialschwankungen der Referenzelektrode zu minimieren wird das Bad aktiv mit Hilfe einer Badklemme auf Nullspannung gehalten. Vor dem Anstechen der Oozyten werden die Elektroden auf die Badspannung geeicht. Die Oozyte wird dann zunächst mit der spannungsmessenden, dann mit der stromführenden Elektrode eingestochen. Da das gemessene Membranpotential der Oozyten kurz nach dem Setzen der Elektroden weiter depolarisiert wird das Messprotokoll erst nach einer Stabilisierung des Ruhepotentials eingeleitet. Die Messkammer wird während der Messungen mit frischer Pufferlösung umspült.

Die Steuerung des Meßverstärkers (Geneclamp 500, Axon Instruments) sowie die Datenerfassung erfolgt über das Softwarepaket pClamp 7.0 des gleichen Herstellers. Der verwendete Rechner Transtec 1300 ist ein Pentium<sup>®</sup> II-System mit 400 MHz und 128 MB RAM. Als Interface dient das Digital-Analogwandler Digidata 1500 von Axon Instruments. Über einen TTL-Impuls wird die Zuführung des aktivierenden Lichts bei verschiedenen Membranspannungen geregelt. Aus den rohen Meßdaten werden anschließend die Photoströme bei den zugehörigen Spannungen extrahiert.

#### 4.20.4 Auswertung der Meßdaten

Die Auswertung der Meßdaten erfolgt nach Konvertierung in ASCII-Daten mit selbstgeschriebenen Routinen in der Programmiersprache Python [VAN ROSSUM]. Das Programm *analysis.py* erlaubt die graphische Darstellung der einzelnen Episoden und Festlegung der Bereiche für die Regressionsrechnung (siehe 2.3.1). Diese nähert den Photostrom durch zwei Regressionsgeraden (Basislinie und Photostromsignal) mit geteilter Steigung an. Aus der Differenz der Achsabstände ergibt sich die Amplitude des Photostroms. Die Ergebnisse (Protein, Messung, Episode, Stromamplitude) werden in Textdateien abgelegt, die als Basis für die weitere Auswertung dienen. Die Korrelation erfolgt mit der Routine *readraw.py*, die über ein Treiberskript (*correlateall.py*) bzw. protein-spezifische Skripten (*correlate-Proteinname.py*) angesteuert wird (siehe B) und aus den jeweiligen Stromamplituden die dargestellten Mittelwerte und Graphen erzeugt.

### 4.21 Bestimmung der Photophosphorylierungsraten in *Halobacterium salinarum*

Zur Messung der lichtgetriebenen ATP-Syntheserate [Oe 1982] wurden eine 700 ml Halomedium in einem 2l-Erlmeyerkolben mit 1/50 des Volumens einer stationären Kultur angeimpft und auf einem Rotationsschüttler bei 100 upm für 4-5 Tage inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (GS3, 400 upm, 20 °C, 15 min) abgeerntet und in Basalsalz (pH 5.5)

resuspendiert. Um eine Lyse der Zellen zu vermeiden erfolgte die Resuspension auf einem Rotationsschüttler bei 60 upm und Raumtemperatur. Die optische Dichte der Suspension wurde auf OD600 5 eingestellt.

Der BR-Gehalt der Zellen wurde UV/Vis-spektroskopisch bestimmt. Dazu wurde das Pellet von 1 ml Basalsalz-Suspension in 1 ml 10 mM TRIS/HCl, pH 7.4 + DNase lysiert. Die Absorption wurde zwischen 300 und 700 nm aufgezeichnet und um die Streuung der Probe nach Gleichung 4.2 bereinigt.

$$m_{BR} = OD_{570} \cdot \epsilon_{BR} \cdot \mathbf{VF} \quad (4.2)$$

mit dem Extinktionskoeffizienten von Bacteriorhodopsin  $\epsilon_{BR} = 63000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und dem Verdünnungsfaktoren  $\mathbf{VF}$  berechnet.

Der Luciferase-Assay-Puffer wurde wie folgt vorbereitet:

1. Lyse von 100 mg Firefly-Lantern-Extract (Sigma) in 5 ml 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, pH 7.4 und Entfernung von Rückständen durch Zentrifugation.
2. Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{MgSO}_4$ -Lösung.
3. Verdünnung mit 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 M Tris/HCl, pH 7.4 im Verhältnis 1:4.

Zur Messung der Probe wurden 7 ml der Basalsalz-Suspension in einer temperierten Glasküvette (25 °C) unter stetigem Stickstoffstrom gerührt, bis sich ein stabiles ATP-Niveau in den Zellen eingestellt hat (ca. 1h). Die Belichtung erfolgte über einen Diaprojektor, ein OG515-Gelbglas (Schott) und einen Hitzeglas (Calflex-3000 , Balzers), wobei 19.2 mW  $\text{cm}^2$  am Ort der Probe erreicht wurden. Während der Belichtungsphase zum Zeitpunkt  $t_0$  wurden der Probe Aliquots zu den Zeitpunkten  $t \text{ [s]} = - 600, - 300, -5, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 120, 180, 240, 300$  entnommen und in 5 ml eisgekühlten Lysepuffer (10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 mM EDTA, pH 7.4) eingespritzt. Das Lysat wurde bis zur Messung auf Eis gehalten.

Die Proben wurden in einem Biolumineszenz-Messgerät (Biocounter M2010, Lumac) vermessen. Dazu wurden je 500  $\mu\text{l}$  des Lysats (drei-

fache Bestimmung) in einem Messröhrchen im Biocounter mit 100  $\mu$ l des Luciferase-Assay-Puffers vermischt, wobei die emittierten Photonen der Lumineszenzreaktion gezählt wurden. Eine Eichung des Nachweises wurde für jede Luciferase-Assay-Puffer-Präparation mit bekannten ATP-Konzentrationen (0-200 pmol) durchgeführt. Die ATP-Bildungsrate ergibt sich als Steigung der Regressionsgerade durch die ersten vier Messpunkte nach Belichtung der Probe.

## 4.22 Herstellung elongierter *Halobacterium salinarum*-Zellen und Spheroblastenbildung

nach [OESTERHELT und MARWAN 1987] und [CLINE et al. 1989].

### 4.22.1 Puffer und Lösungen

#### Stammlösung Aphidicolin

10 mg/ml Aphidicolin (Sigma) in DMSO

#### HMA-Medium

Halomedium (siehe 4.2.2), 1 % Arginin.

#### SPH

2 M Natriumchlorid, 25 mM Kaliumchlorid, 50 mM TRIS/HCl, pH 8.75, 15 % Saccharose, Wasser.

#### SPH-EDTA

0.5 M TitriplexIII, 2 M Natriumchlorid, 25 mM Kaliumchlorid, 50 mM TRIS/HCl, pH 8.75, 15 % Saccharose, Wasser.

### 4.22.2 Zellen

Im 35 ml Halomedium (100 ml Erlmeyerkolben) werden mit 0.5 ml einer stationären *Halobacterium salinarum*-Kultur (R1) angeimpft und 24h bei

100 upm und 37 °C geschüttelt. 2 ml dieser Vorkultur werden mit 8 ml HM bzw. HMA verdünnt. Zur Bildung von verlängerten Zellen werden 10  $\mu\text{l}$  der Aphidicolin-Stammlösung (entspricht 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in der Lösung) zugegeben und über Nacht auf dem Schüttler bei Standardbedingungen inkubiert.

### 4.22.3 Spheroblasten

Von der Übernacht-Kultur werden 2 ml entnommen und pelettiert (5000 upm, 5 min, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge). Nach Entfernen des Überstands werden die Zellen in 200  $\mu\text{l}$  SPH resuspendiert. Die Bildung der Spheroblasten wird durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  SPH-EDTA eingeleitet und unter dem Mikroskop verfolgt.

### 4.22.4 Bestimmung der Zelldimensionen

Die Zellen werden unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) bei 400-facher Vergrößerung beobachtet und mit einer Digitalkamera fotografiert. Die Größen der Zellen ergeben sich aus dem Mittelwert von jeweils sechs Zellen und werden den mit einer Linealfunktion im Grafikprogramm Gimp entnommen. Da das Mikroskop keine Kalibrationsskala besitzt werden die ermittelten Werte auf den Literaturwert der wt-Zellen (Länge = 5  $\mu\text{m}$ ) normiert. Berechnung und Visualisierung der Werte erfolgt mit Python (Skript: *riesen.py*).

## 4.23 Experimente im Sf9-Baculovirus-System

Sf9-Zellkulturen sind sehr empfindlich gegenüber Kontaminationen. Daher werden sämtliche Schritte unter Berücksichtigung der Regeln zum sterilen Arbeiten durchgeführt.

### 4.23.1 Verwendete Medien und Zellen

#### Sf-Medium

200 ml Sf900<sup>+</sup>, 0.8 ml Penicillin-Streptomycin, 0.8 ml fötales Rinderserum.

#### Transfektionsreagenzien

aus Baculogold-Transfektionskit, Pharmingen, Puffer A und B.

#### Baculogold-DNA

linearisiertes, unvollständiges Sf9-Genom aus Baculogold-Transfektionskit, Pharmingen.

#### Puffer für Patch-Clamp-Experimente

##### Elektrodenlösung

50 mM Kaliumfluorid, 70 mM Kaliumglutamat, 10 mM HEPES, 2 mM Magnesiumchlorid, 5 mM EGTA, 4 mM Magnesiumadenosintriphosphat, pH 7.2

##### Badlösung

140 mM Natriumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 2.5 mM Calciumchlorid, 5 mM Kaliumchlorid, 10 mM HEPES, pH 7.2.

### 4.23.2 Auftauen der Zellen

Sf9-Zellen werden über längere Zeit in 2 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wird das Aliquot rasch durch Schwenken in einem Wasserbad (37 °C) geschwenkt. Vor dem Öffnen wird die Oberfläche des Gefäßes mit 70 %-igem Ethanol-Wassergemisch sterilisiert. Als Waschschrift wird das Aliquot zu 10 ml Sf9-Medium in einem 50 ml-Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei 4 °C und 1000 upm (Hettich-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Pellet in 5 ml Sf9-Medium resuspendiert. Die Suspension wird in eine kleine Zellkulturflasche überführt (Dimensionen 5x3x2cm, Greiner) und nach 15 min RT liegend über Nacht bei 27 °C inkubiert.

### 4.23.3 Kulturhaltung

*Sf9*-Kulturen werden zur Erhaltung der Vitabilität alle drei Tage im Verhältnis von 1:3 mit frischem *Sf9*-Medium in eine frische Kulturflasche überimpft. Innerhalb dieses Zeitraums sollten die Zellen bereits dicht gewachsen sein, anderenfalls ist davon auszugehen, dass die Zellen kontaminiert sind. Kontaminationen lassen sich auch daran erkennen, dass ein Großteil der Zellen nicht adherend wächst und frei im Medium schwimmen.

### 4.23.4 Produktion eines rekombinanten Virus

Die Zellen einer 100 % konfluenten Zellkultur oder zweier 50 % konfluenten Zellkulturen werden auf 5 Flüssigkulturflaschen zu je 5 ml ausgesät. Nach 5 min (Zellen heften sich an die Oberfläche der Flasche an) wird 1 ml der Lösung gegen 1 ml Transfektionspuffer **B** ausgetauscht und vermischt. Der DNA-Mix wird hergestellt aus 10  $\mu\text{l}$  pAcGP67-bop und 0.5  $\mu\text{l}$  Baculogold-DNA und 5 min incubiert. Anschließend werden 1 ml Transfektionspuffer **A** hinzugegeben und gut gemischt. Der DNA-Mix wird nun unter Schwenken der Zellkultur zugetropft. Dabei bildet sich ein weißer Niederschlag. Der Transfektionsansatz wird 4 Std bei 27 °C inkubiert, anschließend wird das Medium ausgetauscht und die Zellen werden bei 27 °C für vier Tage weiterinkubiert. Bei geglückter Co-Transfektion bilden die Zellen rekombinanten Virus, der in das Medium abgegeben wird und so durch Abnahme des Überstands geerntet wird. Um den Virustiter zu erhöhen werden weitere Amplifikationsrunden durchgeführt.

### 4.23.5 Heterologe Expression

Zur Expression des Proteins werden Zellen mit der Viruslösung infiziert. Dabei ist ein zehnfacher Überschuss an Zellen gegenüber Virusmolekülen wünschenswert, da so zunächst nur ein zehntel der Zellen infiziert wird, die dann Virus freisetzen, wenn die Zellen beginnen, konfluent zu wachsen. Zur Bestimmung des optimalen Titers wird eine Testreihe durchgeführt. Dabei werden fünf Flaschen mit je 0, 5, 10, 50 und 100  $\mu\text{l}$  Viruslösung mit

etwa 900  $\mu$ l Sf9-Medium für 30-60 min unter gelegentlichem Schwenken inkubiert, wodurch eine gute Infektion erreicht wird. Zur weiteren Inkubation wird das Medium auf die üblichen 5 ml ergänzt.

#### 4.23.6 Elektrophysiologische Ableitung

Der Meßstand setzt sich zusammen aus einem inversen Lichtmikroskop (Axiovert 100, Zeiss), den Meßverstärkern Geneclamp 500 (Vorverstärker: CV-5 x100GU) und Axopatch 500 (Vorverstärker: CV 203BU) von Axon. Als Badkammer dient eine 3 ml Petrischale (Nunc) mit einer Bohrung, die durch ein Abdeckgläschen aus Quarzglas mit Silicon abgedeckt ist. Dies ist notwendig, um einen geringen Abstand der Okulars zu den Zellen zu gewährleisten. Sämtliche Lösungen werden vor der Verwendung steril autoklaviert (Bottle Top Filter, 20  $\mu$ m.), um Schwebeteilchen zu minimieren. Zur Perfundierung der Zellen dient eine peristaltische Pumpe (Minipuls 2, Gilson), die über Silikonschläuche mit dem Bad und den Vorrats- bzw. Abwassergefäßen verbunden ist. Die Elektrode wird mit den Mikromanipulatoren von Luigs und Neumann positioniert.

Die Bildung eines *Seals* wird durch Anlegen eines 10 mV - Testpulses beobachtet. Zur Bildung des *Seals* erweist es sich als hilfreich, einen leichten Überdruck an den Elektroden anzulegen, der dann bei Zellkontakt abgelassen wird. Dadurch bleiben die Ränder der Elektroden bei Eintritt in die Badlösung durch den leichten Ausstrom von Elektrodenlösung sauber und bei Ablassen des Druck in der Nähe der Zellmembran wird diese meist sofort gut abgedichtet. Zur Herstellung eines *Gigaseals* bzw. Wechsel in den *Whole Cell*-Modus wird ein leichter, stoßweiser Unterdruck an der Elektrode angelegt.

#### 4.24 Verwendete Software

Zur Fertigstellung dieser Arbeit wurden hauptsächlich Programme aus dem Open-Source-Bereich eingesetzt. An dieser Stelle sei allen Personen gedankt, die ihren Beitrag geleistet haben.

- Schriftsetzung mit  $\text{\LaTeX}$ , xemacs
- Auswertung der Daten: Python
- Optimierung der zeitaufgelösten Spektroskopie: Origin
- Abbildung 2.3.5 und Berechnung: Origin
- Sonstige Visualisierung der Ergebnisse: gnuplot, python.biggles

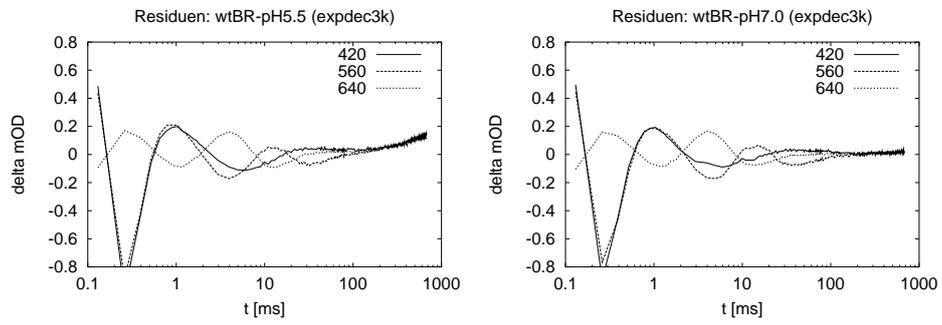
# Anhang A

## Residuen zur zeitaufgelösten Spektroskopie

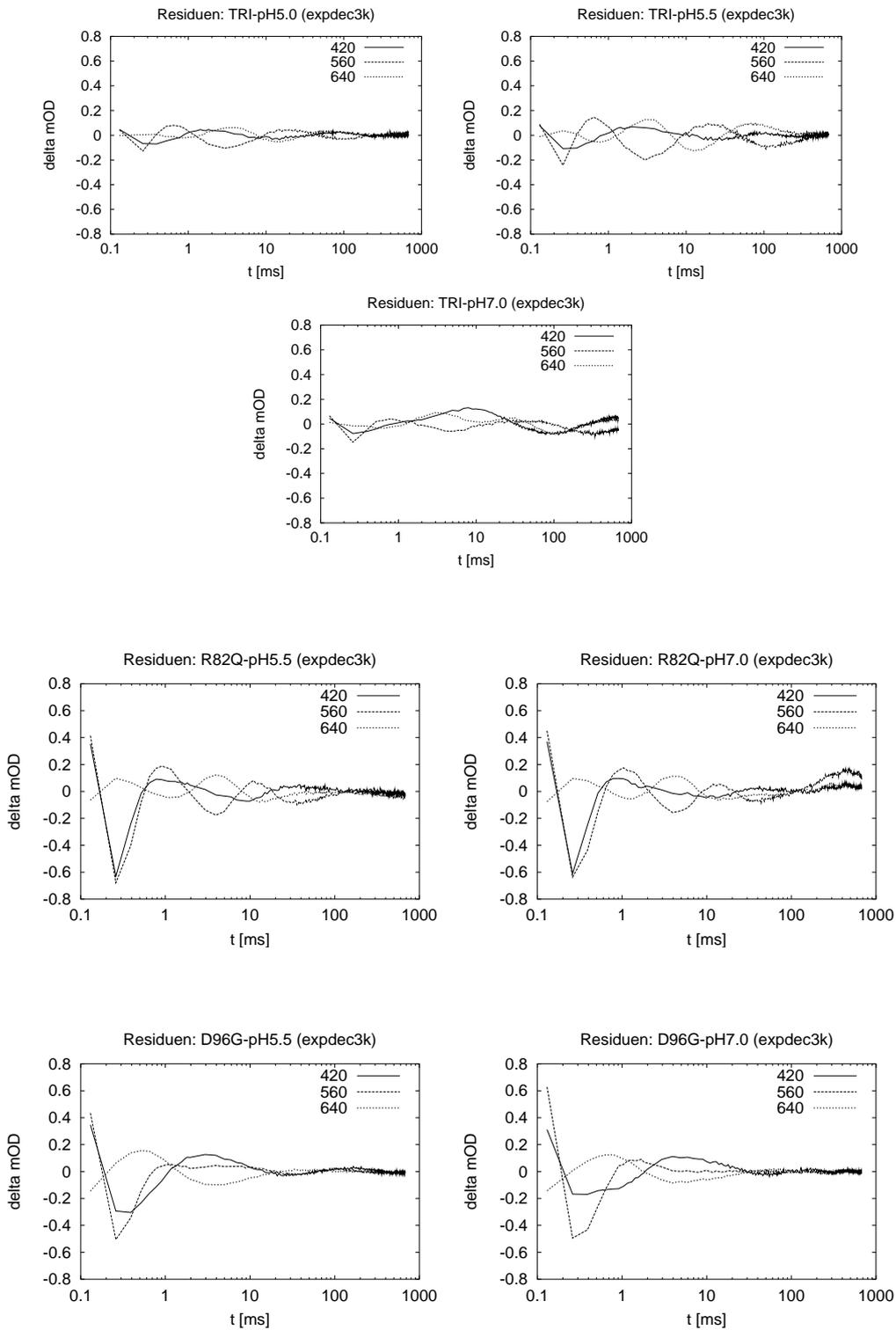
Im folgenden werden die durchgeführten Ausgleichsrechnungen zu den zeitaufgelösten spektrometrischen Experimenten aufgelistet. Als Modellfunktion wird ein exponentieller Zerfall mit geteilten Zeitkonstanten  $t_i$  ( $i=3$ : (A.1),  $i=4$ : (A.2),  $i=5$  (A.3)) und variablen Amplituden  $p_i$  für die Wellenlängen 420, 560 und 640 nm verwendet. Die besten Ergebnisse werden mit jeweils 5 Zeitkonstanten erreicht, ob jedoch die zusätzlichen Freiheitsgrade gerechtfertigt sind wird in Abschnitt 2.4 besprochen.

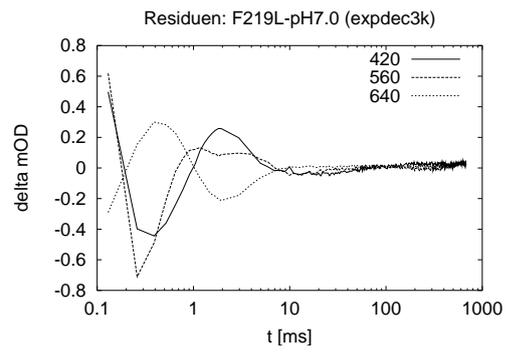
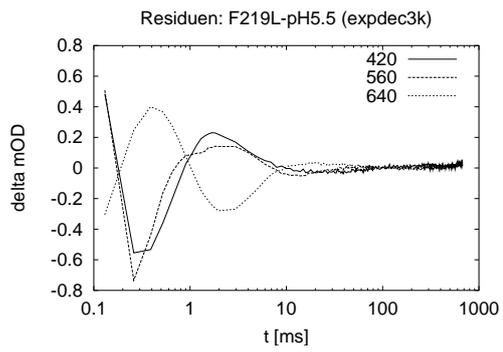
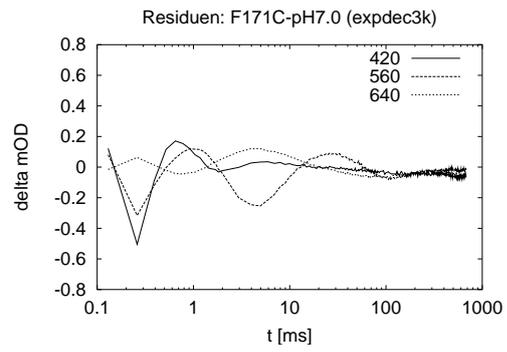
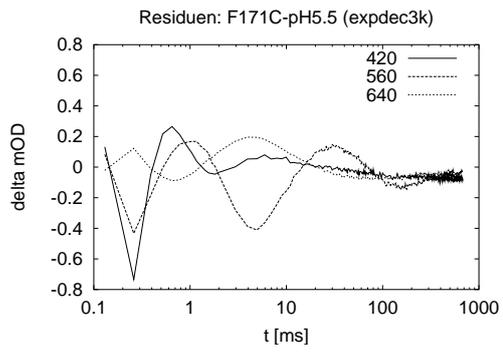
$$\begin{aligned}f_1 &= pa_1 \cdot e^{-t/t_1} + pb_1 \cdot e^{-t/t_2} + pc_1 \cdot e^{-t/t_3} & (A.1) \\f_2 &= pa_2 \cdot e^{-t/t_1} + pb_2 \cdot e^{-t/t_2} + pc_2 \cdot e^{-t/t_3} \\f_3 &= pa_3 \cdot e^{-t/t_1} + pb_3 \cdot e^{-t/t_2} + pc_3 \cdot e^{-t/t_3}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}f_1 &= pa_1 \cdot e^{-t/t_1} + pb_1 \cdot e^{-t/t_2} + pc_1 \cdot e^{-t/t_3} + pd_1 \cdot e^{-t/t_4} & (A.2) \\f_2 &= pa_2 \cdot e^{-t/t_1} + pb_2 \cdot e^{-t/t_2} + pc_2 \cdot e^{-t/t_3} + pd_2 \cdot e^{-t/t_4} \\f_3 &= pa_3 \cdot e^{-t/t_1} + pb_3 \cdot e^{-t/t_2} + pc_3 \cdot e^{-t/t_3} + pd_3 \cdot e^{-t/t_4}\end{aligned}$$



$$\begin{aligned}
 f_1 &= pa_1 \cdot e^{-t/t_1} + pb_1 \cdot e^{-t/t_2} + pc_1 \cdot e^{-t/t_3} + pd_1 \cdot e^{-t/t_4} + pe_1 \cdot e^{-t/t_5} \quad (\text{A.3}) \\
 f_2 &= pa_2 \cdot e^{-t/t_1} + pb_2 \cdot e^{-t/t_2} + pc_2 \cdot e^{-t/t_3} + pd_2 \cdot e^{-t/t_4} + pe_2 \cdot e^{-t/t_5} \\
 f_3 &= pa_3 \cdot e^{-t/t_1} + pb_3 \cdot e^{-t/t_2} + pc_3 \cdot e^{-t/t_3} + pd_3 \cdot e^{-t/t_4} + pe_3 \cdot e^{-t/t_5}
 \end{aligned}$$





# Anhang B

## Pythonskripten zur Auswertung

Aus Platzgründen werden die für diese Arbeit erstellten Programme in einer gedruckten Version in der Abteilung hinterlegt bzw. auf einer Begleit-CD angeboten.

Nach anfänglichen Interpretationsversuchen der Daten mit Excel), Origin 4.0 (Microcal) und Sigmaplot (Jandel Scientific) fällt die Wahl zur einheitlichen Datenverarbeitung auf die Anwendung von Python

<http://www.python.org>. Dabei handelt es sich um eine vielseitige, interpretierte Programmiersprache, die 1991 am *Stichting Mathematisch Centrum*, Amsterdam, Niederlande von Guido van Rossum entworfen wurde und bis heute (an anderer Stelle) weiterentwickelt wird. Es handelt sich dabei um freie Software, die sich einer stetig wachsenden Entwickler- und Anwenderschaft erfreut. Durch den modularen Aufbau kann die Basis der Programmiersprache um spezielle Funktionspakete erweitert werden, so daß, auch im Bereich der Biowissenschaften, immer schwierigere Aufgaben auf einfache Weise bewältigt werden können. Die entscheidenden Kriterien bei der Wahl von zu dieser Arbeit sind

- Übersichtliche Syntax
- Skriptfähigkeit → verschiedene Datensätze werden auf exakt die gleiche Art ausgewertet.
- Gute Dokumentation

- Freie Zugänglichkeit
- Portable Programme für unzählige Computerplattformen
- Interaktiver Interpreter zum schnellen Test einer Routine
- Vielzahl von Funktionsbibliotheken, insbesondere
  - *Numeric* Numerische Berechnungen, ähnlich MatLab (The Mathworks)  
<http://www.pfdubois.com/numpy>
  - *biggles* Visualisierung  
<http://biggles.sourceforge.net>
  - *Scientific* Statistik, Optimierungsrechnungen  
<http://starship.python.net/~hinsen/ScientificPython>
  - *Gnuplot* Visualisierung, Statistik, Optimierungsrechnungen  
<http://www.gnuplot.info>

# Anhang C

## Modellrechnungen zur Spannungsabhängigkeit

Die Simulationsrechnungen wurden mit Hilfe der Software *gnuplot* durchgeführt.

### C.1 Modell: kappashared

Konstanten:  $N1 = 1.$ ,  $N2 = 1.15$  (aus Quantifizierung),  $fu=0.039$  (Umrechnung [mV] für Gleichung,  $fu=zF/RT$ ).<sup>1</sup>

Geteilte Parameter:  $\lambda$ ,  $\kappa_{oi}$

Freie Parameter:  $k_{io}^1$ ,  $k_{io}^2$

*Listing C.1: kappashared.fnc*

---

```
##
## First test for fitting irreversible model to data of wtBR and TRI
##
## Model is based on irreversible transport cycle with
##
## k0    voltage dependent reaction constant (r.c.) for translocation
##              of proton at 0 mV
##
## kappa    voltage independent r.c. for reversion of molecule
##
## usage:
## fit u(x,y) 'all.dat' using 1:-2:2:(1) via 'kappashared.par' w/o sto
```

---

<sup>1</sup>Die Indizes 1 bzw. 2 bezeichnen wtBR bzw. TRI.

```

## fit u(x,y) 'all.dat' using 1:-2:2:3 via 'kappashared.par' w/ std.

fu = 0.039          ## conversion of [mV]
N1 = 1. ##6.022e23
N2 = 1. ##6.022e23

k1(x) = k01*exp(fu*x*1)
k2(x) = k02*exp(fu*x*1)

wt(x) = N1 * (k1(x)*kappa) / (k1(x)+kappa)
tri(x) = N2 * (k2(x)*kappa) / (k2(x)+kappa)

u(x,y) = y==1 ? tri(x) : wt(x)

```

---

## C.2 Modell: kappafree

*Listing C.2: kappafree.fnc*

---

```

##
## file: kappafree.fnc
##
## fitting irreversible model to data of wtBR and TRI
##
## Model is based on irreversible transport cycle with
##
## k01,k02          voltage dependent reaction constant (r.c.) for
##                  translocation of proton at 0 mV
##
## kappa1, kappa2  voltage independent r.c. for reversion of molecu
##
## l                assymetry factor
##
## usage:
## fit u(x,y) 'all.dat' using 1:-2:2:(1) via 'kappafree.par' w/o std.c
## fit u(x,y) 'all.dat' using 1:-2:2:3 via 'kappafree.par' w/ std.dev.
##
## driver script: kappafree.gnu
## requires:      kappafree.par (initial parameters)
##

fu = 0.039          ## conversion of [mV] = zF/RT
N1 = 1.             ## Set molecules for wt

```

```

N2 = 1.          ## Set molecules for tri

k1(x) = k01*exp(fu*x*1)
k2(x) = k02*exp(fu*x*1)

wt(x) = N1*(k1(x)*kappa1) / (k1(x)+kappa1)
tri(x) = N2*(k2(x)*kappa2) / (k2(x)+kappa2)

u(x,y) = y==1 ? tri(x) : wt(x)

```

---

### C.3 Modell: kappafixed

*Listing C.3: kappafixed.fnc*

---

```

##
## File: kappafixed.fnc
##
## Functions for fitting irreversible model to data of wtBR and TRI
##
## Model is based on irreversible transport cycle with
##
## k0    voltage dependent reaction constant (r.c.) for translocation
##              of proton at 0 mV
##
## kappa    voltage independent r.c. for reversion of molecule
##
## use: fit u(x,y) 'all.dat' using 1:-2:2:(1) via 'fit.par'

fu = 0.039          ## conversion of [mV]
N1 = 1.
N2 = 1.

kappa1 = 1e6/6.
    ## independent reaction constant

    ## kappa aus Spektroskopie: limitierender Schritt
    ## in wt=6ms, tri=34ms, eingesetzt werden k-Werte->revers

k1(x) = k01*exp(fu*x*1)
k2(x) = k02*exp(fu*x*1)

```

$$wt(x) = N1*(k1(x)*kappa1) / (k1(x)+kappa1)$$

$$tri(x) = N2*(k2(x)*kappa1*6./34.) / (k2(x)+ kappa1*6./34.)$$

$$u(x,y) = y==1 ? tri(x) : wt(x)$$

---

# Anhang D

## Zusätzliche Parameter aus den Modellrechnungen

### D.1 Simulationsrechnungen

```
k0=1000.0: [1.0, 1000.0, 30.0, 1.0]
xwende=-89.91, ywende=15.00, steigung=0.29, achse=41.30, ui(0)=29.13
k0=100.0: [1.0, 100.0, 30.0, 1.0]
xwende=-30.87, ywende=15.00, steigung=0.29, achse=24.03, ui(0)=23.08
k0=10.0: [1.0, 10.0, 30.0, 1.0]
xwende=28.17, ywende=15.00, steigung=0.29, achse=6.76, ui(0)=7.50
k0=1.0: [1.0, 1.0, 30.0, 1.0]
xwende=87.21, ywende=15.00, steigung=0.29, achse=-10.51, ui(0)=0.97
k0=0.1: [1.0, 0.10000000000000001, 30.0, 1.0]
xwende=146.25, ywende=15.00, steigung=0.29, achse=-27.78, ui(0)=0.10

param: [1.0, 100.0, 30.0, 1.0]
lambda=0.1: [1.0, 100.0, 30.0, 0.10000000000000001]
xwende=-308.71, ywende=15.00, steigung=0.03, achse=24.03, ui(0)=23.08
lambda=0.3: [1.0, 100.0, 30.0, 0.29999999999999999]
xwende=-102.90, ywende=15.00, steigung=0.09, achse=24.03, ui(0)=23.08
lambda=0.5: [1.0, 100.0, 30.0, 0.5]
xwende=-61.74, ywende=15.00, steigung=0.15, achse=24.03, ui(0)=23.08
lambda=0.7: [1.0, 100.0, 30.0, 0.69999999999999996]
xwende=-44.10, ywende=15.00, steigung=0.20, achse=24.03, ui(0)=23.08
lambda=0.9: [1.0, 100.0, 30.0, 0.90000000000000002]
xwende=-34.30, ywende=15.00, steigung=0.26, achse=24.03, ui(0)=23.08
lambda=1.0: [1.0, 100.0, 30.0, 1.0]
xwende=-30.87, ywende=15.00, steigung=0.29, achse=24.03, ui(0)=23.08
```

```

param: [1.0, 100.0, 30.0, 1.0]
kappa=40.0: [1.0, 100.0, 40.0, 1.0]
xwende=-23.49, ywende=20.00, steigung=0.39, achse=29.16, ui(0)=28.57
kappa=30.0: [1.0, 100.0, 30.0, 1.0]
xwende=-30.87, ywende=15.00, steigung=0.29, achse=24.03, ui(0)=23.08
kappa=20.0: [1.0, 100.0, 20.0, 1.0]
xwende=-41.27, ywende=10.00, steigung=0.20, achse=18.05, ui(0)=16.67
kappa=10.0: [1.0, 100.0, 10.0, 1.0]
xwende=-59.04, ywende=5.00, steigung=0.10, achse=10.76, ui(0)=9.09
kappa=1.0: [1.0, 100.0, 1.0, 1.0]
xwende=-118.08, ywende=0.50, steigung=0.01, achse=1.65, ui(0)=0.99
kappa=0.1: [1.0, 100.0, 0.10000000000000001, 1.0]
xwende=-177.12, ywende=0.05, steigung=0.00, achse=0.22, ui(0)=0.10

```

```

param: [1.0, 100.0, 30.0, 1.0]
N=2.0: [2.0, 100.0, 30.0, 1.0]
xwende=-61.74, ywende=13.85, steigung=0.42, achse=39.49, ui(0)=46.15
N=1.5: [1.5, 100.0, 30.0, 1.0]
xwende=-46.31, ywende=15.93, steigung=0.40, achse=34.51, ui(0)=34.62
N=1.0: [1.0, 100.0, 30.0, 1.0]
xwende=-30.87, ywende=15.00, steigung=0.29, achse=24.03, ui(0)=23.08
N=0.5: [0.5, 100.0, 30.0, 1.0]
xwende=-15.44, ywende=9.69, steigung=0.13, achse=11.76, ui(0)=11.54
N=0.3: [0.29999999999999999, 100.0, 30.0, 1.0]
xwende=-9.26, ywende=6.29, steigung=0.07, achse=6.98, ui(0)=6.92
N=0.1: [0.10000000000000001, 100.0, 30.0, 1.0]
xwende=-3.09, ywende=2.24, steigung=0.02, achse=2.31, ui(0)=2.31

```

## D.2 Optimierungsrechnungen

Modell: kappafree

BR : xwende=-97.99, ywende=56805.35, steigung=343.26, achse=90440.73,  
ui(0)=86992.63

TRI: xwende=177.72, ywende=32557.90, steigung=196.74, achse=-2406.33,  
ui(0)=6806.90

Modell: kappafixed

BR : xwende=-112.10, ywende=51588.28, steigung=395.29, achse=95899.55,  
ui(0)=87478.84

TRI: xwende=30.81, ywende=9103.81, steigung=69.76, achse=6954.36,  
ui(0)=6993.43

Modell: kappashared

BR :xwende=-94.42, ywende=57962.82, steigung=337.22, achse=89804.68,  
ui(0)=86946.12

TRI:xwende=238.96, ywende=57962.82, steigung=337.22, achse=-22620.46,  
ui(0)=6768.45

# Abkürzungsverzeichnis

' Minute

" Sekunde

*APS* Ammoniumperoxosulfat

*BR* Bacteriorhodopsin

*DTT* Dithiothreitol

*EDTA* Ethylendiamin-tetraessigsäure

*EGTA* Ethylenglykol-bis-( $\beta$ -Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

*h* Stunde

*HEPES* N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

*HR* Halorhodopsin

*IST* Isomerization-Switch-Transfer. Logisches Modell zur Beschreibung des Photozyklus der archealen Retinalproteine. Durch eine Kombination der Elementarschritte Isomerisation, Schalter und (Protonen-)Transfer können verschiedene Transportmodi der Proteine beschrieben werden, wobei, da es sich um einen Kreisprozess handelt, jeder Elementarschritt in einem Weiteren revertiert werden muss. Siehe [HAUPTS et al. 1997, TITTOR et al. 1997].

*MBS* Modifiziertes Barth Medium

*MES* 2-N-[Morpholino]-ethan-sulfonsäure

*min* Minute

*MOPS* 4-N-[Morpholino]-propan-propionsäure

*OD<sub>x</sub>* Optische Dichte (= Absorption) einer Probe bei x nm.

*ORF* Offener Leserahmen, open reading frame

*PMSF* Phenylmethan-sulfonyl-fluorid

*SDS* Natriumdodecylsulfat

*SR* Sensorhodopsin

*TEACl* Tetraethylammoniumchlorid

*TEMED* N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin. Ein Reagenz zum Starten der Radikalkettenreaktion zur Polymerisation des Polyacrylamidgels.

*TEVC* Two Electrode Voltage Clamp. Die Technik zur Ableitung physiologischer Spannungen und Ströme unter Verwendung von zwei intrazellulären Elektroden.

*TRI* Bacteriorhodopsin-Mutante D96G/F171C/F219L

*Tris* Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

*TTL* Transistor Transistor Logic. Ein elektrisches Signal, das unter Verwendung von zwei Transistoren auf zwei Spannungswerte (meist 0 und 5V) eingestellt werden kann und zur Steuerung angeschlossener Geräte verwendet wird.

*VF* Verdünnungsfaktor

# Literaturverzeichnis

- [ALAM und OESTERHELT 1984] ALAM, M und D. OESTERHELT (1984). *Morphology, function and isolation of halobacterial flagella*. J Mol Biol, 176(4):459–75.
- [BEGENISICH und DE WEER 1980] BEGENISICH, T und P. DE WEER (1980). *Potassium flux ratio in voltage-clamped squid giant axons*. J. Gen. Physiol., 76:83–90.
- [BESIR 2001] BESIR, H (2001). *Untersuchung der lipidvermittelten Kristallisation der Ionenpumpen Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin aus Halobacterium salinarum*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland.
- [BROWN 2001] BROWN, L S (2001). *Proton transport mechanism of bacteriorhodopsin as revealed by site-specific mutagenesis and protein sequence variability*. Biochemistry (Mosc), 66(11):1249–55.
- [CAO et al. 1992] CAO, Y, N. ANDEROVA, N. M. CRAWFORD und J. I. SCHROEDER (1992). *Expression of an outward-rectifying potassium channel from maize mRNA and complementary RNA in Xenopus oocytes*. Plant Cell, 4(8):961–9.
- [CLINE et al. 1989] CLINE, S W, W. L. LAM, R. L. CHARLEBOIS, L. C. SCHALWYK und W. F. DOOLITTLE (1989). *Transformation methods for halophilic archaeobacteria*. Can J Microbiol, 35(1):148–52.
- [COETZEE et al. 1999] COETZEE, W A, Y. AMARILLO, J. CHIU, A. CHOW, D. LAU, T. MCCORMACK, H. MORENO, M. S. NADAL, A. OZAITA, D. POUNTNEY, M. SAGANICH, E. V.-S. DE MIERA und B. RUDY (1999). *Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels*. Ann N Y Acad Sci, 868:233–85.
- [COLE und CURTIS 1939] COLE, K S und H. J. CURTIS (1939). *Electrical Impedance of the Squid Giant Axon during activity*. J. Gen. Phys., 22:649–670.

- [DENCHER et al. 1976] DENCHER, N A, C. N. RAFFERTY und W. SPERLING (1976). *13-cis and trans BR: Photochemistry and dark equilibration*. JÜL, 1374.
- [DOYLE et al. 1998] DOYLE, D A, J. M. CABRAL, R. A. PFUETZNER, A. KUO, J. M. GULBRIS, S. L. COHEN, B. T. CHAIT und R. MCKINNON (1998). *The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity*. Science, 280(5360):69–77.
- [DUSCHL und WAGNER 1986] DUSCHL, A und G. WAGNER (1986). *Primary and secondary chloride transport in Halobacterium halobium*. J Bacteriol, 168(2):548–52.
- [FERRAND et al. 1993] FERRAND, M, A. J. DIANOUX, W. PETRY und G. ZACCAI (1993). *Thermal motions and function of bacteriorhodopsin in purple membranes: effects of temperature and hydration studied by neutron scattering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 90(20):9668–72.
- [GOLDIN 1992] GOLDIN, A L (1992). *Maintenance of Xenopus laevis and oocyte injection*. In: RUDY, B und L. E. IVERSON, Hrsg.: *Ion Channels*, Bd. 207 d. Reihe *Methods in Enzymology*, Kap. 15, S. 266–278. Academic Press Inc., San Diego, USA.
- [GOVINDJEE et al. 1996] GOVINDJEE, R, S. MISRA, S. P. BALASHOV, T. G. EBREY, R. K. CROUCH und D. R. MENICK (1996). *Arginine-82 regulates the pKa of the group responsible for the light-driven proton release in bacteriorhodopsin*. Biophys J, 71(2):1011–23.
- [HARTMANN et al. 1977] HARTMANN, R, H. D. SICKINGER und D. OESTERHELT (1977). *Quantitative aspects of energy conversion in halobacteria*. FEBS Lett, 82(1):1–6.
- [HARTMANN et al. 1980] HARTMANN, R, H. D. SICKINGER und D. OESTERHELT (1980). *Anaerobic growth of halobacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 77(7):3821–5.
- [HATANAKA et al. 1996] HATANAKA, M, J. SASAKI, H. KANDORI, T. G. EBREY, R. NEEDLEMAN, J. K. LANYI und A. MAEDA (1996). *Effects of arginine-82 on the interactions of internal water molecules in bacteriorhodopsin*. Biochemistry, 35(20):6308–12.

- [HAUPTS et al. 1997] HAUPTS, U, J. TITTOR, E. BAMBERG und D. OESTERHELT (1997). *General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: the isomerization/switch/transfer (IST) model*. *Biochemistry*, 36(1):2–7.
- [HAUPTS et al. 1999] HAUPTS, U, J. TITTOR und D. OESTERHELT (1999). *Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 28:367–99.
- [HERRMANN und RAYFIELD 1976] HERRMANN, T R und G. W. RAYFIELD (1976). *A measurement of the proton pump current generated by bacteriorhodopsin in black lipid membranes*. *Biochim Biophys Acta*, 443(3):623–8.
- [HILLE 1992] HILLE, B (1992). *Ion Channels of excitable membranes*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA, 1 Aufl.
- [HILLE und SCHWARZ 1978] HILLE, B und W. SCHWARZ (1978). *Potassium channels as multi-ion single-file pores*. *J Gen Physiol*, 72(4):409–42.
- [HODGKIN und KEYNES 1955] HODGKIN, A L und R. D. KEYNES (1955). *The potassium permeability of a giant nerve fibre*. *J. Physiol.*, 128:61–88.
- [KAMIKUBO et al. 1996] KAMIKUBO, H, M. KATAOKA, G. VARO, T. OKA, F. TOKUNAGA, R. NEEDLEMAN und J. K. LANYI (1996). *Structure of the N intermediate of bacteriorhodopsin revealed by x-ray diffraction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(4):1386–90.
- [KROGH et al. 2001] KROGH, A, B. LARSSON, G. VON HEIJNE und E. L. SONNHAMMER (2001). *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes*. *J Mol Biol*, 305(3):567–80.
- [LANYI 2000] LANYI, J K (2000). *Crystallographic studies of the conformational changes that drive directional transmembrane ion movement in bacteriorhodopsin*. *Biochim Biophys Acta*, 1459(2-3):339–45.
- [LANYI und MACDONALD 1976] LANYI, J K und R. E. MACDONALD (1976). *Existence of electrogenic hydrogen ion/sodium ion antiport in Halobacterium halobium cell envelope vesicles*. *Biochemistry*, 15(21):4608–14.
- [LANYI und MACDONALD 1977] LANYI, J K und R. E. MACDONALD (1977). *Light-dependent cation gradients and electrical potential in Halobacterium halobium cell envelope vesicles*. *Fed Proc*, 36(6):1824–7.

- [LATORRE und MILLER 1983] LATORRE, R und C. MILLER (1983). *Conduction and selectivity in potassium channels*. J Membr Biol, 71:11–30.
- [LEHNERT et al. 1998] LEHNERT, U, V. REAT, M. WEIK, G. ZACCAI und C. PFISTER (1998). *Thermal motions in bacteriorhodopsin at different hydration levels studied by neutron scattering: correlation with kinetics and light-induced conformational changes*. Biophys J, 75(4):1945–52.
- [LIMAN et al. 1992] LIMAN, E R, J. TYTGAT und P. HESS (1992). *Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs*. Neuron, 9(5):861–71.
- [LU et al. 2001] LU, Z, A. M. KLEM und Y. RAMU (2001). *Ion conduction pore is conserved among potassium channels*. Nature, 413:809–813.
- [LUECKE et al. 1999] LUECKE, H, B. SCHOBERT, H. T. RICHTER, J. P. CARTAILLER und J. K. LANYI (1999). *Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution*. Science, 286(5438):255–61.
- [MAEDA et al. 1977] MAEDA, A, T. IWASA und T. YOSHIZAWA (1977). *Isomeric composition of retinal chromophore in dark-adapted bacteriorhodopsin*. J Biochem (Tokyo), 82(6):1599–604.
- [MICHEL und OESTERHELT 1976] MICHEL, H und D. OESTERHELT (1976). *Light induced changes of the pH-gradient and the membrane potential in H. halobium*. FEBS Lett, 65:175–178.
- [MISRA et al. 1997] MISRA, S, C. MARTIN, O. H. KWON, T. G. EBREY, N. CHEN, R. K. CROUCH und D. R. MENICK (1997). *Mutation of arginine 134 to lysine alters the pK(a)s of key groups involved in proton pumping by bacteriorhodopsin*. Photochem Photobiol, 66(6):774–83.
- [MITCHELL 1961] MITCHELL, P (1961). *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism*. Nature, 191:144–148.
- [NAGEL et al. 1998] NAGEL, G, B. KELETY, B. MOCKEL, G. BULDT und E. BAMBERG (1998). *Voltage dependence of proton pumping by bacteriorhodopsin is regulated by the voltage-sensitive ratio of M1 to M2*. Biophys J, 74(1):403–12.

- [NAGEL et al. 1995] NAGEL, G, B. MOCKEL, G. BULDT und E. BAMBERG (1995). *Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H<sup>+</sup> pumping*. FEBS Lett, 377(2):263–6.
- [NANBA und MUKOHATA 1987] NANBA, T und Y. MUKOHATA (1987). *A membrane-bound ATPase from Halobacterium halobium: purification and characterization..* J Biochem (Tokyo), 102(3):591–8.
- [OESTERHELT 1995] OESTERHELT, D (1995). *Structure and Function of Halorhodopsin*. Israel J Chem, 25:475–494.
- [OESTERHELT und KRIPPAHL 1983] OESTERHELT, D und G. KRIPPAHL (1983). *Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants*. Ann Microbiol (Paris), 134B(1):137–50.
- [OESTERHELT und MARWAN 1987] OESTERHELT, D und W. MARWAN (1987). *Change of membrane potential is not a component of the photophobic transduction chain in Halobacterium halobium*. J Bacteriol, 169(8):3515–20.
- [OESTERHELT und MARWAN 1993] OESTERHELT, D und W. MARWAN (1993). *Signal transduction in Halobacteria*. Elsevier Science Publishers B. V, The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria). Aufl.
- [OESTERHELT et al. 1973] OESTERHELT, D, M. MEENTZEN und L. SCHUHMAN (1973). *Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophores*. Eur J Biochem, 40(2):453–63.
- [RAMMELSBERG et al. 1998] RAMMELSBERG, R, G. HUH, M. LUBBEN und K. GERWERT (1998). *Bacteriorhodopsin's intramolecular proton-release pathway consists of a hydrogen-bonded network*. Biochemistry, 37(14):5001–9.
- [RENTHAL et al. 1997] RENTHAL, R, Y. J. CHUNG, R. ESCAMILLA, L. S. BROWN und J. K. LANYI (1997). *Guanidinium restores the chromophore but not rapid proton release in bacteriorhodopsin mutant R82Q*. Biophys J, 73(5):2711–7.
- [RENTHAL und LANYI 1976] RENTHAL, R und J. K. LANYI (1976). *Light-induced membrane potential and pH gradient in Halobacterium halobium envelope vesicles*. Biochemistry, 15(10):2136–43.

- [RIESLE et al. 1996] RIESLE, J, D. OESTERHELT, N. A. DENCHER und J. HEBERLE (1996). *D38 is an essential part of the proton translocation pathway in bacteriorhodopsin*. *Biochemistry*, 35(21):6635–43.
- [VAN ROSSUM] ROSSUM, G VAN. *www.python.org*.
- [RUDOLPH et al. 1995] RUDOLPH, J, N. TOLLIDAY, C. SCHMITT, S. C. SCHUSTER und D. OESTERHELT (1995). *Phosphorylation in halobacterial signal transduction*. *EMBO J*, 14(17):4249–57.
- [SAMBROOK et al. 1989] SAMBROOK, J, E. F. FRITSCH und T. MANIATIS (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd. Aufl.
- [SANGER et al. 1977] SANGER, F, S. NICKLEN und A. R. COULSON (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–7.
- [SASAKI et al. 1995] SASAKI, J, L. S. BROWN, Y. S. CHON, H. KANDORI, A. MAEDA, R. NEEDLEMAN und J. K. LANYI (1995). *Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump*. *Science*, 269(5220):73–5.
- [SCHERRER et al. 1989] SCHERRER, P, M. K. MATHEW, W. SPERLING und W. STOECKENIUS (1989). *Retinal isomer ratio in dark-adapted purple membrane and bacteriorhodopsin monomers*. *Biochemistry*, 28(2):829–34.
- [SCHMIES et al. 2001] SCHMIES, G, M. ENGELHARD, P. G. WOOD, G. NAGEL und E. BAMBERG (2001). *Electrophysiological characterization of specific interactions between bacterial sensory rhodopsins and their transducers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4):1555–9.
- [SCHOBERT und LANYI 1982] SCHOBERT, B und J. K. LANYI (1982). *Halorhodopsin is a light-driven chloride pump*. *J Biol Chem*, 257(17):10306–13.
- [SCHROEDER 1995] SCHROEDER, J I (1995). *Heterologous expression of higher plant transport proteins and repression of endogenous ion currents in Xenopus laevis*. *Methods Cell Biol*, 50:519–33.
- [SCHWEIGER 1996] SCHWEIGER, U (1996). *Charakterisierung der Retinalbindungs von Bakteriorhodopsin durch spezifische Mutagenese*. Doktorarbeit, Leopold-Franzens-Universität, Innsbruck, Österreich.

- [SEINO 1999] SEINO, S (1999). *ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies*. *Annu Rev Physiol*, 61:337–62.
- [SPUDICH und BOGOMOLNI 1984] SPUDICH, J L und R. A. BOGOMOLNI (1984). *Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin*. *Nature*, 312(5994):509–13.
- [SPUDICH und BOGOMOLNI 1992] SPUDICH, J L und R. A. BOGOMOLNI (1992). *Sensory rhodopsin I: receptor activation and signal relay*. *J Bioenerg Biomembr*, 24(2):193–200.
- [STOECKENIUS 1979] STOECKENIUS, W (1979). *A model for the function of bacteriorhodopsin*. *Soc Gen Physiol Ser*, 33:39–47.
- [STOECKENIUS und KUNAU 1968] STOECKENIUS, W und W. KUNAU (1968). *Further characterisation of particulate fractions from lysed cell envelopes of Halobacterium salinarum and isolation of gas vacuole membranes*. *J Cell Biol*, 38:337–357.
- [STÜHMER 1992] STÜHMER, W (1992). *Electrophysiological recordings from Xenopus laevis*. In: RUDY, B und L. E. IVERSON, Hrsg.: *Ion Channels*, Bd. 207 d. Reihe *Methods in Enzymology*, Kap. 19, S. 319–339. Academic Press Inc., San Diego, USA.
- [SUBRAMANIAM und HENDERSON 1999] SUBRAMANIAM, S und R. HENDERSON (1999). *Electron crystallography of bacteriorhodopsin with millisecond time resolution*. *J Struct Biol*, 128(1):19–25.
- [TAKAHASHI et al. 1985] TAKAHASHI, T, Y. MOCHIZUKI, N. KAMO und Y. KOBATAKE (1985). *Evidence that the long-lifetime photointermediate of s-rhodopsin is a receptor for negative phototaxis in Halobacterium halobium*. *Biochem Biophys Res Commun*, 127(1):99–105.
- [TANIO et al. 1999] TANIO, M, S. TUZI, S. YAMAGUCHI, R. KAWAMINAMI, A. NAITO, R. NEEDLEMAN, J. K. LANYI und H. SAITO (1999). *Conformational changes of bacteriorhodopsin along the proton-conduction chain as studied with <sup>13</sup>C NMR of [3-(<sup>13</sup>C)Ala-labeled protein: arg(82) may function as an information mediator*. *Biophys J*, 77(3):1577–84.

- [TITTOR et al. 1997] TITTOR, J, U. HAUPTS, C. HAUPTS, D. OESTERHELT, A. BECKER und E. BAMBERG (1997). *Chloride and proton transport in bacteriorhodopsin mutant D85T: different modes of ion translocation in a retinal protein*. J Mol Biol, 271(3):405–16.
- [TITTOR et al. 2002] TITTOR, J, S. PAULA, S. SUBRAMANIAM, J. HEBERLE, R. HENDERSON und D. OESTERHELT (2002). *Proton translocation by bacteriorhodopsin in the absence of substantial conformational changes*. J Mol Biol, 319(2):555–65.
- [TITTOR et al. 1994] TITTOR, J, U. SCHWEIGER, D. OESTERHELT und E. BAMBERG (1994). *Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N*. Biophys J, 67(4):1682–90.
- [TITTOR et al. 1989] TITTOR, J, C. SOELL, D. OESTERHELT, H. J. BUTT und E. BAMBERG (1989). *A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96—Asn is fully reactivated by azide*. EMBO J, 8(11):3477–82.
- [UHL et al. 1984] UHL, R, B. MEYER und H. DESEL (1984). *A polychromatic flash photolysis apparatus (PFPA)*. J Biochem Biophys Methods, 10:35–48.
- [VONCK 2000] VONCK, J (2000). *Structure of the bacteriorhodopsin mutant F219L N intermediate revealed by electron crystallography*. EMBO J, 19(10):2152–60.
- [WAGNER et al. 1978] WAGNER, G, R. HARTMANN und D. OESTERHELT (1978). *Potassium uniport and ATP synthesis in Halobacterium halobium*. Eur J Biochem, 89(1):169–79.
- [WEBER 1999] WEBER, W M (1999). *Ion current of Xenopus laevis: state of the art*. Biochim Biophys Acta, 1421:213–233.
- [WOESE et al. 1990] WOESE, C R, O. KANDLER und M. L. WHEELIS (1990). *Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya*. Proc Natl Acad Sci U S A, 87(12):4576–9.

# Index

- Halobacterium salinarum*
  - Eigenschaften, 1
  - Elongation, 25
  - Kaliumgradient als Energiespeicher, 2
  - Spheroblasten, 25
  - Stoffwechsel, 1
- Xenopus laevis*
  - als heterologes Expressionssystem, 10
  - Expression von archealen Retinalproteinen, 29, 74
- Antibiotika
  - Arbeitskonzentration, 95
- Aphidicolin, 25
- ATP-Bildungsrate, 60
- Ausblick, 91
- Azid
  - optimale Konzentration für Aktivität von TRI, 29
- Cephalexin, 25
- Elektrophysiologie
  - Die Zellmembran, 19
  - Konventionen, 19
  - TEVC-Methode, 21
- Heterologe Expression
  - Xenopus laevis*, 112
  - in *Xenopus laevis*, 29, 74
  - in Sf9-Zellen, 23, 72
  - Quantifizierung in *Xenopus laevis*, 44
- Kaliumkanäle
  - allgemein, 15
  - archeale, 18
  - KcsA, 15
  - Selektivität, 17
  - Struktur
    - KcsA, 15
    - Pore, 15
  - Transportprozess, 18
- Kaliumkanal
  - Halobacterium salinarum*
    - Genetik, 65
    - Messungen, 66
  - archealer, als Energiespeicher, 1
  - PCHA2
    - Cäsiumchlorid, 68
    - Diskussion, 89
    - Homologiestudie, 64
    - Kaliumkonzentration, 68
    - Sekundärstruktur, 65
    - Transmembranvorhersage, 64

Kapillaren, 120  
 Klassifizierung der Ströme durch BR, 43  
 Medien  
     Basalsalz, 95  
     Halomedium, 94  
     LB-Medium, 93  
     SOB-Medium, 94  
 Membranpotential, 19  
 Modell zur Leitfähigkeit von BR  
     Anpassung an die experimentellen  
         Daten, 83  
     Bedeutung der Parameter, 79  
     effektive Spannung, 78  
     Grundlagen, 75  
     Mathematische Beschreibung, 76  
     Schlussfolgerung, 87  
     Simulationsrechnungen, 78  
 Ohm's Gesetz, 19  
 Oligonukleotide, 96  
     Schmelztemperatur, 96  
 Oozyten  
     Follikularschicht, 119  
 Organismen  
     E. coli, 95  
 PCHA2, 66  
 Photostrom  
     Extraktion aus Rohdaten, 29  
     Korrelation mit Expressionsrate, 47  
     Lichtintensität, 32  
     Lichtqualität, 38  
     pH-Abhängigkeit, 35  
 Retinalproteine  
     Azid, 11  
 Bakteriorhodopsin  
     Bakterio-opsin, 4  
     Chromophor, 4  
     D96G, 10  
     Elektrische Eigenschaften, 10  
     F171C, 10  
     F219L, 10  
     Hell-/Dunkeladaption, 7  
     IST-Modell, 7  
     Mutanten, 10  
     Photozyklus, 7  
     Purpurmembran, 4  
     Stationen des Protonentrans-  
         ports, 5  
     Struktur, 5  
 D85T, 14  
 Halorhodopsin, 2  
 Photoströme in *Xenopus laevis*, 39  
 R82Q, 11  
 Sensorrhodopsine, 2  
 Signaltransduktion, 2  
 TRI  
     Eigenschaften, 11  
 Sf9-Zellen  
     Heterologes System für Bakterio-  
         rhodopsin, 23  
 Spheroblasten  
     Ergebnisse, 25  
     Herstellung, 125  
 Spheroblasten von *Halobacterium sali-*  
     *narum*  
     Diskussion, 73  
 TEVC  
     *Xenopus laevis*, 10

- Auswertung der Meßdaten, 29
- Elektrodenherstellung, 120
- Experimenteller Aufbau, 120
  
- Walker-Sequenzen, 65
  
- Zeitaufgelöste Spektroskopie
  - Messungen, 50
  - Methode, 112
- Zellmembran, 19
- Ziele
  - Elektromotorische Kraft von BR und Mutanten, 14
  - Kaliumkanäle in *Halobacterium salinarum*, 18
- Zwei-Elektroden-Spannungsklemme
  - siehe TEVC, 119

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Christoph Martin Oppawsky, geb. Willmeroth  
Waldfriedenstr. 29  
86161 Augsburg  
geboren am 07.07.1970 in München  
verheiratet, zwei Kinder, deutsch  
privat 0821-567 90 67  
e-mail christoph.oppawsky@t-online.de

## Schule

76 - 78 Grundschule Fasanenpark, 82008 Unterhaching  
78 - 82 Deutsche Schule Marbella, Spanien  
82 - 90 Gymnasium Unterhaching, Leistungskurse Chemie und Kunst

## Studium

Okt 90 - Sep 91 Studium Chemie Diplom, TU München  
Sep 91 Wechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität  
Feb 94 Vordiplomprüfung  
Jul 96 Diplomprüfung, Wahlfach Biochemie  
Jan - Jul 97 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried in der Abteilung Membranbiochemie, Prof. Dr. Oesterhelt. Thema: Etablierung der *Patch-Clamp*-Methode und Expression von Retinalproteinen in Oozyten von *Xenopus laevis*.  
Okt 98 - Okt 03 Dissertation am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried in der Abteilung Membranbiochemie, Prof. Dr. Oesterhelt. Thema: Bioenergetik des Ionentransports in *Halobacterium salinarum*.

## Zivildienst

Okt 97 - Okt 98 Institut für Humangenetik der LMU-München, Prof. Dr. Murken.

Martinsried, 14. Juli 2004

