

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilian-Universität München



Charakterisierung elektrogener Transportvorgänge an Membranproteinen halophiler Archaeen

Florian Wimmer

aus Simbach am Inn

2009

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 12.02.2009



Florian Wimmer

Dissertation eingereicht am 12.02.2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt
2. Gutachter: Prof. Dr. Haralabos Zorbas

Mündliche Prüfung am 24.07.2009



Diese Arbeit wurde in der Abteilung für Membranbiochemie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Wimmer F, Oberwinkler T, Bisle B, Tittor J and Oesterhelt D (2008)
Identification of the arginine/ornithine antiporter ArcD from Halobacterium salinarum.
FEBS Letters 582: 3771–3775

für Bettina

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Entstehung des Lebens	3
2.2 Lipidmembranen	3
2.3 Funktionalisierung von Lipidmembranen	4
2.4 Halophile Archaeen	5
2.5 Retinalproteine	6
2.6 Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher	7
2.7 Systeme zur Charakterisierung von Transportvorgängen	8
2.8 Nachweis, Expression, Solubilisierung und Isolierung von Membranproteinen	9
2.9 Quantifizierung von Transportvorgängen	10
2.10 Detektion der Membranpotentialänderung durch kapazitive Kopplung	11
2.11 Ziele dieser Arbeit	13
3 Ergebnisse	14
3.1 Physikalische Betrachtung der elektrischen Messung elektrogener Transports	14
3.1.1 Das physikalische Modell eines BR-Proteoliposoms	14
3.1.2 Das physikalische Modell des Sensors	17
3.1.3 Das physikalische Modell eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors	19
3.1.4 Mathematische Beschreibung des Signals	21
3.1.5 Zusammenfassung	22
3.2 Methodvalidierung der elektrischen Messung elektrogener Transports	23
3.2.1 Kapazität und Widerstand der Sensoroberfläche bei der Sensorpräparation	23
3.2.2 Das lichtinduzierte Signal eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors	24
3.2.3 Adsorption von Proteoliposomen an die Sensoroberfläche	25
3.2.4 Optimierung der Menge der adsorbierten Proteoliposomen	26
3.2.5 Stabilität der Proteoliposomenbeschichtung eines Sensors	27
3.2.6 Einfluss der Lichtintensität auf den initialen lichtinduzierten Stromfluss	28
3.2.7 Einfluss von Azid auf die Transportaktivität von BR-D96N-Proteoliposomen	30
3.2.8 Zusammenfassung	33
3.3 Abschätzung der fehlenden Größen des physikalischen Modells	34
3.3.1 Die kapazitive Kopplung	34
3.3.2 Der Widerstand zwischen Proteoliposomen und Sensoroberfläche	35
3.3.3 Der Widerstand der Proteoliposomenmembran	36
3.3.4 Die von Bacteriorhodopsin transportierte Ladung	37
3.4 Kontrolle und Optimierung des mathematischen Modells	38
3.4.1 Vergleich zwischen Modell und Messung	38
3.4.2 Optimierung der abgeschätzten Werte	39
3.4.3 Test des Modells	40
3.4.4 Zusammenfassung	42
3.5 Funktionsnachweis von Halorhodopsin und Acerhodopsin	45
3.5.1 In vivo Expression und Isolierung von Halorhodopsin (<i>N. pharaonis</i>)	45
3.5.2 Zellfreie Expression von Haloopsin (<i>N. pharaonis</i>)	47
3.5.3 In vivo Expression und Isolierung von Acerhodopsin (<i>A. acetabulum</i>)	48
3.5.4 Zellfreie Expression und Isolierung von Aceopsin (<i>A. acetabulum</i>)	51
3.5.5 Aktivitätsnachweis von rekonstituiertem Halorhodopsin und Acerhodopsin	53
3.5.6 Zusammenfassung	54
3.6 Versuch der Identifikation eines Na ⁺ /H ⁺ -Austauschers halophiler Archaeen	55
3.6.1 Bioinformatische Analyse des Genoms von <i>H. salinarum</i> und <i>N. pharaonis</i>	55
3.6.1.1 Auswahl und Beurteilung der Na ⁺ /H ⁺ -Austauscherhomologen	55

3.6.1.2 Die evolutionären Beziehungen zu experimentell bestätigten Na ⁺ /H ⁺ -Austauschern	56
3.6.1.3 Die genetische Umgebung der identifizierten Na ⁺ /H ⁺ -Austauscherhomologen	57
3.6.1.4 Zusammenfassung	58
3.6.2 Expression und Isolierung der identifizierten Homologen	59
3.6.2.1 Homologe Expression in <i>H. salinarum</i>	59
3.6.2.2 Heterologe Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) / BL21(DE3)Rosetta	62
3.6.3 Nachweis von Na ⁺ /H ⁺ -Austauscheraktivität der bioinformatisch identifizierten Homologen	71
3.6.3.1 Elektrische Detektion des Na ⁺ /H ⁺ -Austauschs über die Membran von Proteoliposomen	71
3.6.3.2 Das Wachstum der Deletionsstämme von <i>H. salinarum</i>	75
3.6.3.3 Charakterisierung des lichtinduzierten Protonentransports der Deletionsstämme	76
3.6.3.4 Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation	82
3.6.3.5 Nachweis von Na ⁺ /H ⁺ -Austauscheraktivität der komplementierten EP432-Stämme	87
3.6.3.6 Zusammenfassung	89
3.7 Identifikation von OE5204R als Arginin/Ornithin-Austauscher	90
3.7.1 Vergleich des Wachstums zwischen TOM und TOMΔ _{oe5204R}	90
3.7.2 Vergleich der Arginin-Aufnahme in TOM- und TOMΔ _{oe5204R} -Zellvesikeln	91
3.7.3 Rekombination von TOMΔ _{oe5204R} mit <i>oe5204R</i> -HIS	92
3.7.4 Nachweis der Arginin-Aufnahme in TOMΔ _{oe5204R} - <i>oe5204R</i> -HIS-Zellvesikel	93
3.7.5 Homologe Expression in <i>H. salinarum</i> und Isolierung	94
3.7.6 Untersuchung der elektrogenen Reaktion von OE5204R-HIS-Proteoliposomen	95
3.7.7 Zusammenfassung	96
4 Diskussion	97
4.1 Das mathematische Modell der elektrischen Messung elektrogenen Transports	97
4.1.1 Bacteriorhodopsin als Stromquelle	97
4.1.2 Unterbestimmtheit des Gleichungssystems	97
4.2 Methodvalidierung der elektrischen Messung elektrogenen Transports	98
4.3 Expression und Isolierung von Membranproteinen	99
4.4 Isolierung und Funktionsnachweis von Halorhodopsin und Acerhodopsin	100
4.5 Versuch der Identifikation eines Na ⁺ /H ⁺ -Austauschers halophiler Archaeen	101
4.5.1 Bioinformatische Analyse des Genoms von <i>H. salinarum</i> und <i>N. pharaonis</i>	101
4.5.2 Nachweis von elektrogenem Na ⁺ /H ⁺ -Austausch über die Membran von Proteoliposomen	102
4.5.3 Das Wachstum der Deletionsstämme von <i>H. salinarum</i>	103
4.5.4 Charakterisierung des lichtinduzierten Protonentransports der Deletionsstämme	103
4.5.5 Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation	104
4.5.6 Nachweis von Na ⁺ /H ⁺ -Austauscheraktivität der komplementierten EP432-Stämme	104
4.6 Beurteilung des Detektionssystems SURFE ² R One	105
4.7 Identifikation von OE5204R als Arginin/Ornithin-Austauscher	108
5 Material und Methoden	109
5.1 Geräte	109
5.2 Chemikalien	112
5.3 Software, Datenbanken	114
5.4 Stämme	115
5.5 Mikrobiologische Methoden	116
5.5.1 Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	116
5.5.2 Kultivierung und Stammhaltung von <i>H. salinarum</i>	117
5.5.3 Bestimmung der relativen Zelldichte	117
5.6 Molekularbiologische Methoden	118
5.6.1 Präparation genomischer DNS aus <i>H. salinarum</i> und <i>N. pharaonis</i>	118
5.6.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	118
5.6.3 Amplifikation von DNS-Fragmenten	118
5.6.4 Sequenzierung von DNS	119
5.6.5 Konzentrationsbestimmung von DNS	119

5.6.6 Restriktion von DNS	119
5.6.7 Gelelektrophorese von DNS-Fragmenten	120
5.6.8 Detektion von DNS-Fragmenten im Gel durch Ethidiumbromid	120
5.6.9 Isolierung von DNS-Fragmenten aus dem Gel	121
5.6.10 Ligation von DNS-Fragmenten	121
5.6.11 Transformation von E. coli Zellen	121
5.6.12 Transformation von H. salinarum Zellen	122
5.6.13 Deletion von H. salinarum-Genen	123
5.6.14 Southern Blot	123
5.7 Oligonukleotide	127
5.8 Plasmide	128
5.8.1 pET-Expressionsplasmide	128
5.8.2 pBAD-Expressionsplasmide	129
5.8.3 pBPH-M-Expressionsplasmid	131
5.8.4 pMKK100-Deletionsplasmid	132
5.9 Biochemische Methoden	133
5.9.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	133
5.9.2 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	133
5.9.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese	137
5.9.4 Proteinfärbung im Gel	141
5.9.5 Western Blot	142
5.9.6 Präparation von Vesikel aus H. salinarum-Zellen durch Extrusion	144
5.9.7 Präparation von Vesikel aus H. salinarum-Zellen durch Einfrieren und Auftauen	145
5.9.8 Präparation von Vesikel aus E. coli Zellen durch Extrusion	146
5.9.9 Analytische Isolierung der Zellmembranen von E. coli	147
5.9.10 Präparative Isolierung der Zellmembranen von E. coli	147
5.9.11 Analytische Isolierung der Zellmembranen von H. salinarum	147
5.9.12 Präparative Isolierung der Zellmembranen von H. salinarum	148
5.9.13 Solubilisierung der Membranen	148
5.9.14 Solubilisierung von Bacteriorhodopsin	149
5.9.15 NiNTA-Chromatographie	149
5.9.16 Proteinexpression mit einem zellfreien E. coli-System	150
5.9.17 Lipidextraktion aus H. salinarum-Zellen	151
5.9.18 Herstellung von Liposomen	152
5.9.19 Rekonstitution von solubilisiertem Membranprotein in Liposomen	153
5.10 Biophysikalische Methoden	154
5.10.1 Nachweis der Arginin/Ornithin-Austauscheraktivität von H. sal. Zellvesikeln	154
5.10.2 Nachweis der lichtgetriebenen Na ⁺ -Extrusion aus H. sal. Zellvesikeln	154
5.10.3 Nachweis der Na ⁺ /H ⁺ -Austauscheraktivität von E. coli Zellvesikeln	156
5.10.4 Messung des lichtinduzierten Protonentransports an H. salinarum Zellvesikel	158
5.10.5 Die Sensorpräparation zur elektrischen Detektion elektrogenen Transports	159
5.11 Informatische Methoden	160
5.11.1 Korrektur von UV-VIS-Spektren streuender Bacteriorhodopsin-Proben	160
5.11.2 Quantifizierung von Proteinbanden auf Coomassie gefärbten Gelen	166
Literaturverzeichnis	167
Abkürzungsverzeichnis	173
Danksagung	174
Lebenslauf	175

In dieser Arbeit beschriebene Experimente

Bacteriorhodopsin

Das lichtinduzierte Signal eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors	Seite 24
Adsorption von Proteoliposomen an die Sensoroberfläche	Seite 25
Optimierung der Menge der adsorbierten Proteoliposomen	Seite 26
Stabilität der Proteoliposomenbeschichtung eines Sensors	Seite 27
Einfluss der Lichtintensität auf den initialen lichtinduzierten Stromfluss	Seite 28
Einfluss von Azid auf die Transportaktivität von BR-D96N-Proteoliposomen	Seite 30

Halorhodopsin (*Natronomonas pharaonis*)

In vivo Expression und Isolierung von Halorhodopsin (<i>N. pharaonis</i>)	Seite 45
Zellfreie Expression von Haloopsin (<i>N. pharaonis</i>)	Seite 47
Aktivitätsnachweis von rekonstituiertem Halorhodopsin und Acerhodopsin,	Seite 53
Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation	Seite 82

Acerhodopsin (*Acetabularia acetabulum*)

In vivo Expression und Isolierung von Acerhodopsin (<i>A. acetabulum</i>)	Seite 48
Zellfreie Expression und Isolierung von Aceopsin (<i>A. acetabulum</i>)	Seite 51
Aktivitätsnachweis von rekonstituiertem Halorhodopsin und Acerhodopsin	Seite 53

OE1653R (*Halobacterium salinarum*)

Das Wachstum der Deletionsstämme von <i>H. salinarum</i>	Seite 75
Charakterisierung des lichtinduzierten Protonentransports der Deletionsstämme	Seite 76
Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation	Seite 82
Nachweis von Na ⁺ /H ⁺ -Austauscheraktivität der komplementierten EP432-Stämme	Seite 87

OE3782R (*Halobacterium salinarum*)

Das Wachstum der Deletionsstämme von <i>H. salinarum</i>	Seite 75
Charakterisierung des lichtinduzierten Protonentransports der Deletionsstämme	Seite 76
Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation	Seite 82

OE3889R (*Halobacterium salinarum*)

Homologe Expression in <i>H. salinarum</i>	Seite 59
Das Wachstum der Deletionsstämme von <i>H. salinarum</i>	Seite 75
Charakterisierung des lichtinduzierten Protonentransports der Deletionsstämme	Seite 76
Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation	Seite 82

OE3960F (*Halobacterium salinarum*)

Das Wachstum der Deletionsstämme von <i>H. salinarum</i>	Seite 75
Charakterisierung des lichtinduzierten Protonentransports der Deletionsstämme	Seite 76
Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation	Seite 82
Nachweis von Na ⁺ /H ⁺ -Austauscheraktivität der komplementierten EP432-Stämme	Seite 87

OE3961R (Halobacterium salinarum)

Das Wachstum der Deletionsstämme von H. salinarum	Seite 75
Charakterisierung des lichtinduzierten Protonentransports der Deletionsstämme	Seite 76
Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation	Seite 82
Nachweis von Na ⁺ /H ⁺ -Austauscheraktivität der komplementierten EP432-Stämme	Seite 87

OE5204R (Halobacterium salinarum)

Das Wachstum der Deletionsstämme von H. salinarum	Seite 75
Vergleich des Wachstums zwischen TOM und TOMΔoe5204R	Seite 90
Vergleich der Arginin-Aufnahme in TOM- und TOMΔoe5204R-Zellvesikeln	Seite 91
Rekombination von TOMΔoe5204R mit oe5204R-HIS	Seite 92
Nachweis der Arginin-Aufnahme in TOMΔoe5204R-oe5204R-HIS-Zellvesikel	Seite 93
Homologe Expression in H. salinarum und Isolierung	Seite 94
Untersuchung der elektrogenen Reaktion von OE5204R-HIS-Proteoliposomen	Seite 95

NP1576A (Natronomonas pharaonis)

Heterologe Expression in E. coli BL21(DE3) / BL21(DE3)Rosetta	Seite 62
Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation	Seite 82

NP1832A (Natronomonas pharaonis)

Heterologe Expression in E. coli BL21(DE3) / BL21(DE3)Rosetta	Seite 62
Elektrische Detektion des Na ⁺ /H ⁺ -Austauschs über die Membran von Proteoliposomen	Seite 71
Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation	Seite 82
Nachweis von Na ⁺ /H ⁺ -Austauscheraktivität der komplementierten EP432-Stämme	Seite 87

NP4702A (Natronomonas pharaonis)

Heterologe Expression in E. coli BL21(DE3) / BL21(DE3)Rosetta	Seite 62
Elektrische Detektion des Na ⁺ /H ⁺ -Austauschs über die Membran von Proteoliposomen	Seite 71
Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation	Seite 82
Nachweis von Na ⁺ /H ⁺ -Austauscheraktivität der komplementierten EP432-Stämme	Seite 87

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der elektrische Nachweis elektrogener Transportvorgänge über die Membran immobilisierter Proteoliposomen etabliert.

Ausgehend von der physikalischen Betrachtung dieser Methode wurde ein mathematisches Modell entwickelt. Soweit möglich wurden die physikalischen Größen dieses Modells aus der angenommenen Geometrie der Sensoroberfläche berechnet. War dies nicht möglich, wurden sie durch Vergleich mit einer Referenzmessung bestimmt. Die Glaubwürdigkeit dieses Modells wurde durch Vergleich der ermittelten physikalischen Größen mit Literaturwerten und der Darstellung der azidabhängigen Signale eines mit BR-D96N-Proteoliposomen beschichteten Sensors belegt.

Die experimentelle Validierung dieser Methode wurde mit Bacteriorhodopsin-Proteoliposomen durchgeführt. Es wurde die Eignung des aus *H. salinarum* isolierten Lipids gezeigt, die zur Sensorbeschichtung optimale Menge an Proteoliposomen ermittelt und die Stabilität der Bindung an die Oberfläche geprüft. Der Zusammenhang zwischen gemessenem Signal und Transportaktivität des Proteins konnte durch Bestimmung zweier, in der Literatur dokumentierter, Größen nachgewiesen werden. Sowohl die Lichtintensität, die bei Bacteriorhodopsin zur halbmaximalen Aktivität führt, als auch die Azidkonzentration, die bei der D96N-Mutante von Bacteriorhodopsin zur halbmaximalen Aktivität führt, waren mit den Literaturwerten vergleichbar.

Diese Methode wurde erfolgreich zum Funktionsnachweis der Retinalproteine Halorhodopsin von *Natronomonas pharaonis* und Acerhodopsin von *Acetabularia acetabulum* eingesetzt. Die für Halorhodopsin etablierte heterologe Expression in *E. coli* und Isolierung durch Metallaffinitätschromatographie wurde für Acerhodopsin übernommen und optimiert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifikation eines Na^+/H^+ -Austauschers halophiler Archaeen. Als Vertreter dieser Familie dienten *Halobacterium salinarum* und *Natronomonas pharaonis*. Aus den vorliegenden sequenzierten Genomen dieser Organismen wurden die offenen Leserahmen ausgewählt, die nach dem heutigen Wissensstand am wahrscheinlichsten für einen Na^+/H^+ -Austauscher kodieren. Das Selektionskriterium war eine möglichst hohe Homologie zu Sequenzen experimentell bestätigter Na^+/H^+ -Austauscher aus allen drei Domänen des Lebens.

Die zu Na^+/H^+ -Austauschern homologen offenen Leserahmen von *N. pharaonis* wurden in *E. coli* exprimiert, isoliert und in Liposomen rekonstituiert. Der elektrische Nachweis eines elektrogenen Na^+/H^+ -Austauschs konnte nicht erbracht werden.

Im Falle der identifizierten Na^+/H^+ -Austauscherhomologen von *H. salinarum* standen Deletionsmutanten zur Verfügung. Ein Na^+ -sensitiver Phänotyp konnte nicht identifiziert werden. Für Zellvesikel des oe1653R-Deletionsstamms von *H. salinarum* konnte im Vergleich zur Kontrolle und zu allen anderen Deletionsstämmen ein signifikant erhöhter Nettoexport von Protonen durch Bacteriorhodopsin beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf die mögliche Funktion von OE1653R als Na^+/H^+ -Austauscher.

Zur Rekonstruktion eines Na^+ -resistenten Phänotyps von *E. coli* wurde EP432 mit den identifizierten Na^+/H^+ -Austauscherhomologen von *H. salinarum* und *N. pharaonis* komplementiert. EP432 ist eine Na^+ -sensitive Deletionsmutante von *E. coli* [51], die nach dem heutigen Wissensstand über keine Möglichkeit zum Na^+/H^+ -Austausch verfügt. Als Expressionssystem diente der Arabinose induzierbare Vektor pBAD. Da sich dieser Stamm mit dem gewählten Expressionssystem in jedem Fall an hohe Na^+ -Konzentrationen adaptierte, war die Identifikation

eines rekonstruierten Na⁺-resistenten Phänotyps nicht möglich. Der Nachweis von Na⁺-induziertem H⁺-Export aus Zellvesikeln dieser komplementierten Stämme mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange war ebenfalls nicht möglich.

Die Analyse der genetischen Umgebung der offenen Leserahmen ergab für oe5204R von *H. salinarum* eine direkte Nachbarschaft zum Gencluster des Arginin-Deaminase-Stoffwechselwegs (ADI-Pathway). Daraus wurde die mögliche Funktion als Arginin/Ornithin-Austauscher abgeleitet. Diese Vermutung konnte durch Wachstumsexperimente und Aufnahmeexperimente von Arginin in Zellvesikel bestätigt werden. Außerdem wurde die elektrogene Bindung von Arginin am isolierten und in Liposomen rekonstituierten Protein nachgewiesen.

2 Einleitung

2.1 Entstehung des Lebens

Es wird heute angenommen, dass Verbindungen, die die Fähigkeit besitzen ihr eigenes Entstehen durch katalytische Aktivität zu begünstigen, den Ausgangspunkt des Lebens auf unserer Erde darstellen. Das Auftreten solcher Reaktionen war vermutlich sehr selten und nur unter besonderen Bedingungen möglich. Folgt man dieser Hypothese, erscheint es wahrscheinlich, dass erst eine Abgrenzung gegenüber der Umwelt einem solchen chemischen System ermöglichte, den Bereich, in dem eine selbständige Reproduktion stattfinden konnte, zu erweitern und schließlich als Leben im biologischen Sinn unseren Planeten zu erobern. Die Zelle als kleinste zur selbständigen Reproduktion befähigte Einheit war geboren.

Der Vorteil der geringeren Abhängigkeit von den Umweltbedingungen wurde jedoch mit dem Nachteil erkauft, dass sowohl der Zugang zu Edukten als auch die Freisetzung von nicht verwertbaren Stoffwechselprodukten erschwert wurde. Die Evolution löste dieses Problem durch Transportsysteme, die selektiv die Aufnahme und Abgabe bestimmter Substanzen ermöglichen, die Abgrenzung gegenüber der Umwelt darüber hinaus jedoch nicht beeinträchtigen.

Bei allen uns heute bekannten Lebensformen sind die Prinzipien der zellulären Kompartimentierung und des selektiven Transports vorhanden und werden durch die Zellmembran realisiert.

2.2 Lipidmembranen

Das Grundgerüst einer biologischen Membran besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit einer Dicke von 4 nm, deren Struktur durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den lipophilen Kohlenwasserstoffketten und der energetisch günstigen Minimierung der Kontaktfläche zu den umgebenden Wassermolekülen stabilisiert wird. Diese Kräfte bewirken, dass kleinere Störungen der Membranstruktur selbständig heilen. Lipidmoleküle sind in der Membranebene frei beweglich, eine Lipidmembran kann deshalb auch als zweidimensionale Flüssigkeit betrachtet werden. Die Viskosität einer Membran ist temperaturabhängig und kann von einer Zelle langfristig durch die Änderung der Lipidzusammensetzung reguliert werden.

In der Natur entstehen Membranen nie de novo sondern werden immer durch Teilung vorhandener Membranstrukturen erzeugt. Wachstum erfolgt durch Integration neu synthetisierter Lipidmoleküle. Membranen dienen der Abgrenzung der Zelle gegenüber der Umwelt (Zellmembran) und der Kompartimentierung innerhalb der Zelle (Mitochondrien, Chloroplasten, Vakuolen, endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Lysosomen und Zellkern). Sie besitzen keine Formbeständigkeit und werden durch extrazelluläre (Zellwand) oder intrazelluläre Strukturen (Cytoskelett) gestützt.

Eine Membran trennt zwei wässrige leitfähige Kompartimente und kann durch ihre Fähigkeit zur Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten und einer elektrischen Potentialdifferenz als Energiespeicher dienen. Sie bildet physikalisch betrachtet einen Kondensator, der durch elektrogene Transportvorgänge auf- oder entladen wird. Da sowohl die Konzentrationsgradienten als auch die Potentialdifferenz an jedem Punkt der Membran gleich sind, erfüllt die Membran gleichzeitig die Funktion als perfektes Energieverteilungssystem, weil diesem Speicher an jedem Punkt der

Membran Energie hinzugefügt oder entnommen werden kann. Verluste entstehen durch passive Diffusion von Ionen durch die Membran, die vom Membranpotential begünstigt wird. Eine Potentialdifferenz übt durch die elektrostatische Anziehung Druck auf eine Membran aus. Bei unphysiologisch hohen Werten jenseits 300 mV führt das zum Zusammenbruch der Membranstruktur und einem damit verbundenen Anstieg der Leitfähigkeit.

2.3 Funktionalisierung von Lipidmembranen

Biologische Membranen sind durch Membranproteine funktionalisiert, der Proteinanteil liegt zwischen 20 - 80 %. Assoziierte Membranproteine sind entweder durch ionische Wechselwirkungen mit den polaren Kopfgruppen der Lipidmoleküle oder durch einen lipophilen Anker mit der Membran verbunden. Sie haben Zugang zu einem der beiden Kompartimente. Integrale Membranproteine durchdringen die Membran vollständig und stehen mit beiden Kompartimenten in Kontakt. Membranproteine, die mit dem lipophilen Kern einer Membran in Verbindung stehen, besitzen amphiphilen Charakter, da sie sowohl lipophile als auch hydrophile Bereiche in einem Molekül vereinigen. Membranproteine dienen der Zelladhäsion, dem Informations- oder Stofftransport und vermitteln membrangebundene katalytische Aktivität.

Kleine Moleküle wie Aminosäuren, Zucker oder anorganische Ionen werden selektiv durch integrale Membranproteine transportiert. Die Sekretion von Proteinen erfolgt durch Proteinkomplexe, die sowohl aus integralen als auch aus assoziierten Membranproteinen bestehen. Die Struktur der Membran bleibt bei diesen beiden Transportwegen erhalten. Der Transport großer Aggregate erfolgt durch Abschnürung von Membranteilen bzw. Fusion von Vesikeln mit der Membran und wird als Exo- bzw. Endocytose bezeichnet.

Der Transport kleiner Moleküle kann passiv oder aktiv erfolgen. Der passive Transport, der durch den Konzentrationsgradienten der zu transportierenden Substanz getrieben wird, erfolgt durch Kanäle und Permeasen. Bei geladenen Substraten wird er vom Membranpotential beeinflusst. Der aktive Transport, bei dem zusätzliche Energie aufgewendet wird, erfolgt durch Symporter, Austauscher, ATPasen und Retinalpumpen und wird vom Konzentrationsgradienten eines Cosubstrats, dem Membranpotential, ATP oder Licht getrieben. Diese Art des Transports ermöglicht es der Zelle Substanzen entgegen eines Konzentrationsgradienten zu transportieren. Führt ein Transportvorgang zu einer Nettoladungsverschiebung, wird er als elektrogen bezeichnet. Erfolgt die Ladungsverschiebung entgegen dem Membranpotential, muss für den Transportvorgang zusätzlich Energie aufgewendet werden. Im entgegengesetzten Fall wird der Transportvorgang begünstigt.

Um der Zelle das Wachstum zu ermöglichen, werden organische Verbindungen wie Aminosäuren oder Zucker und anorganische Verbindungen wie z.B. Phosphat importiert. Diese werden sowohl als Ausgangsprodukte zur Synthese neuer Zellbestandteile als auch durch Degradation zur Gewinnung von Energie eingesetzt. Toxische Substanzen wie z.B. Schwermetalle werden aus der Zelle exportiert. Die ionischen Verhältnisse und der pH-Wert des Zytosols werden durch regulierte Transportvorgänge über die Zellmembran, soweit möglich, im optimalen Bereich gehalten. Der Protonenexport durch die Atmungskette oder Bacteriorhodopsin erzeugt das Membranpotential und stellt den ersten Schritt in der membrangebundenen Energieverteilung dar. Die im Protonengradienten gespeicherte Energie treibt sekundäre Transportvorgänge und wird zur Synthese von ATP eingesetzt.

2.4 Halophile Archaeen

Die Archaeen sind einzellige Organismen ohne Zellorganellen. Sie werden heute neben den Bakterien und den Eukaryoten als dritte Domäne des Lebens angesehen [60]. Ähnlichkeiten mit den Bakterien bestehen in Bezug auf Morphologie, Stoffwechselvielfalt und der Möglichkeit zur polycistronischen Organisation von Genen. Der Aufbau des Transkriptions- und Translationsapparats ist jedoch eher mit dem der Eukaryoten vergleichbar.

Alleinstellungsmerkmale sind die Zellwand aus S-Layer-Proteinen, der Aufbau der Zellmembran aus Etherlipiden mit Isoprenoidseitenketten und das Fehlen eines Fettsäuresynthesewegs.

Die meisten der bis jetzt charakterisierten Archaeen besiedeln Lebensräume mit außergewöhnlichen Lebensbedingungen wie extremem pH-Wert, hoher Temperatur oder hoher Salzkonzentration. Entsprechend den Eigenschaften ihres Lebensraums werden sie in die Untergruppen der acidophilen, alkaliphilen, thermophilen und halophilen Archaeen eingeordnet. Die halophilen Archaeen werden wiederum auf Grund der für optimales Wachstum notwendigen Salzkonzentration in gering halophile (0,2 - 0,85 M NaCl), moderat halophile (0,85 - 3,4 M NaCl) und extrem halophile (3,4 - 5,1 M NaCl) unterteilt [82].

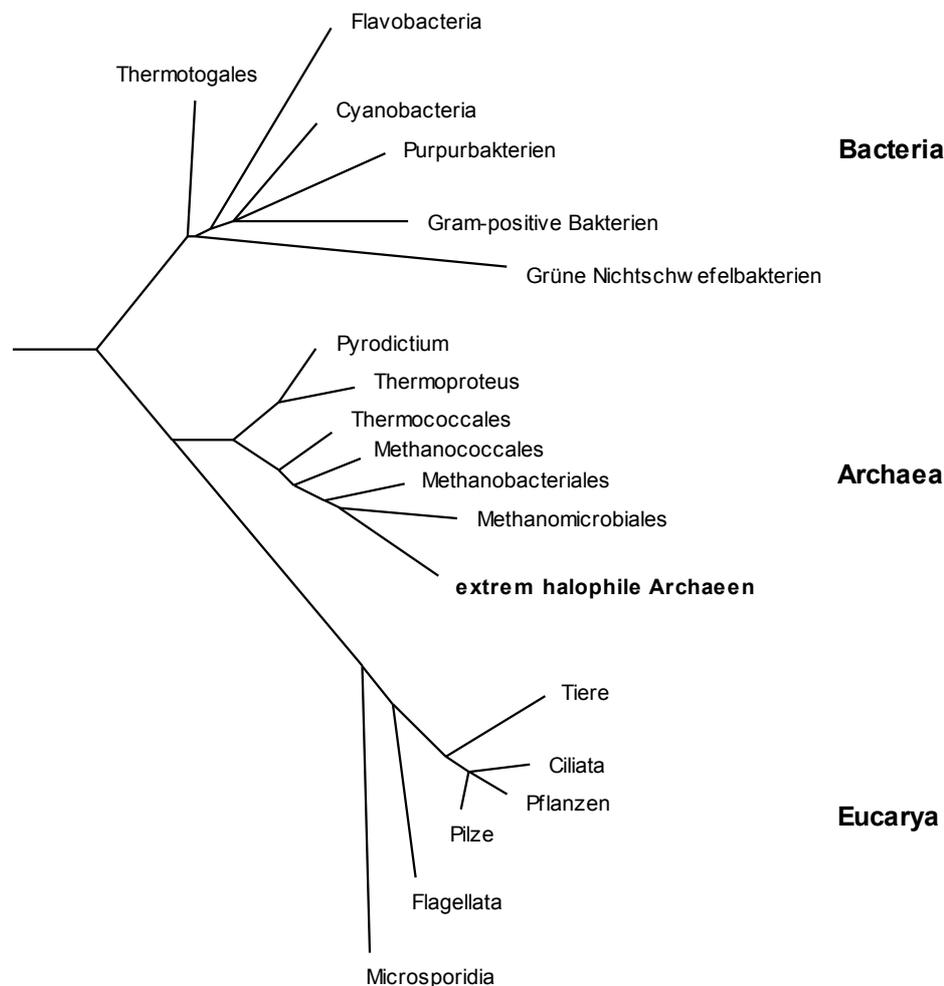


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum des Lebens, berechnet aus den Homologien der ribosomalen RNS, gezeichnet nach Woese et al. [60].

Biologische Membranen sind permeabel für Wasser. Hohe Salzkonzentrationen sind daher für nicht angepasste Organismen tödlich, weil sie osmotisch Wasser an das umgebende Medium verlieren.

Halophile Archaeen verhindern dies, in dem sie die intrazelluläre Salzkonzentration der Umgebung anpassen [61]. Das Problem wurde damit in die Zelle verlagert und musste durch eine Anpassung des gesamten Proteoms gelöst werden. Bei Salzkonzentrationen jenseits 3,4 M liegt Wasser fast vollständig in ionisch gebundener Form vor. Dies beeinträchtigt die Löslichkeit von Proteinen und die meistens an freies Wasser gebundene Funktion von Enzymen. Als eine wesentliche Anpassung an die hohe Salzkonzentration wird die saure Aminosäurezusammensetzung der Proteine angesehen [63]. Dadurch erhöht sich die Löslichkeit und der Zugang zu freiem Wasser wird erleichtert.

2.5 Retinalproteine

Retinalproteine sind aus 7 α -helikalen Transmembrandomänen, dem Opsin, und einem Retinal, das über eine Schiffische Base an ein hoch konserviertes Lysin der 7. Helix gebunden ist, aufgebaut. Ein Opsin mit gebundenem Retinal wird als Rhodopsin bezeichnet. Diese Proteinfamilie lässt sich in zwei Gruppen unterteilen. Sensorische Retinalproteine befähigen einen Organismus zur Phototaxis. Retinaltransporter ermöglichen, getrieben durch Licht, eine aktive elektrogene Verlagerung von Ionen über die Zellmembran.

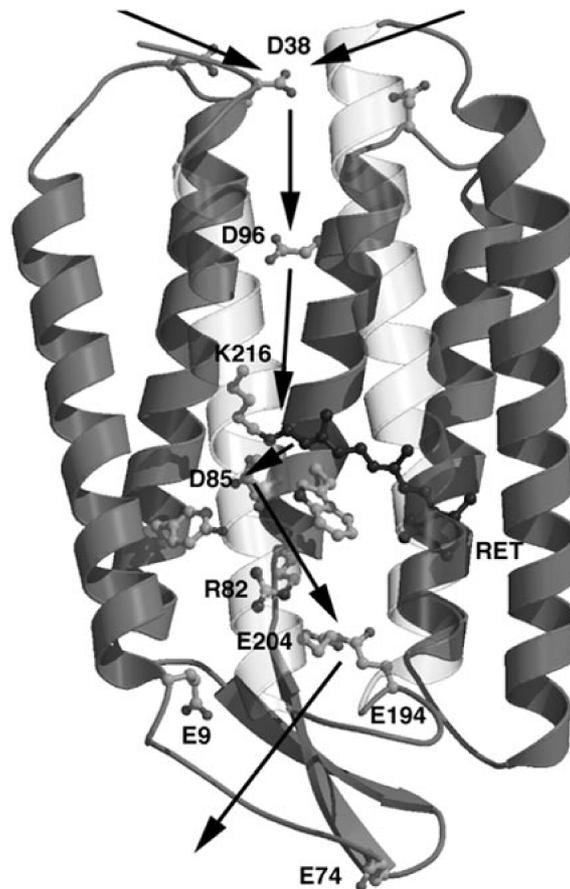


Abbildung 2: Modell der Struktur von Bacteriorhodopsin mit den für den Protonentransfer bedeutenden Aminosäuren. Der angenommene Weg eines Protons durch das Protein wird durch die Pfeile beschrieben. Entnommen aus [90].

Das am besten charakterisierte Mitglied dieser Untergruppe ist die Protonenpumpe Bacteriorhodopsin (BR) des halophilen Archaeons *Halobacterium salinarum*. Am Anfang eines Transportzyklus ist die Schiffische Base protoniert. Nach Absorption eines Photons wechselt das gebundene Retinal von der all-trans zur 13-cis-Konfiguration. Die Schiffische Base wird deprotoniert und das Proton gelangt über die Asparaginsäure D85 und die Glutaminsäure E204 in den extrazellulären Raum. Nach spontaner Reiseromerisation des Retinals in die all-trans-Konfiguration wird die Schiffische Base über D38 und D96 aus dem intrazellulären Raum reprotoniert und der Ausgangszustand ist wieder hergestellt.

Der durch Bacteriorhodopsin erzeugte Protonengradient dient *H. salinarum* als Energiequelle für verschiedene Transportprozesse und ermöglicht über die Synthese von ATP phototrophes Wachstum. Zusätzlich verfügt dieser Organismus über Halorhodopsin (HR), einen lichtgetriebenen Chloridtransporter, und zwei Sensorrhodopsine. *Natronomonas pharaonis*, das zweite in dieser Arbeit behandelte halophile Archeon, verfügt über Halorhodopsin (pHR) und ein Sensorrhodopsin [85]. Mit Acerhodopsin wurde in der Alge *Acetabularia acetabulum* erstmals ein Retinaltransporter in einem eukaryotischen Organismus nachgewiesen, der über das Photosystem I und II verfügt [87].

Retinalproteine wurden in allen Domänen des Lebens nachgewiesen. Man nimmt an, dass neben dem in höheren Organismen üblichen Weg der Photosynthese über das Photosystem I und II, Retinalproteine einen bedeutenden Beitrag zur Biomasseproduktion auf unserem Planeten leisten [70].

2.6 Na⁺/H⁺-Austauscher

Eine niedrige Na-Konzentration und ein definierter pH-Wert sind sowohl für den Energiehaushalt der Zelle als auch für die Funktion aller Zellbestandteile von großer Bedeutung. Aus diesem Grund besitzt jede Zelle Transportmechanismen für diese Ionen. Eine entscheidende Rolle übernehmen dabei Na⁺/H⁺-Austauscher, deren Aufgabe es ist, getrieben vom Protonengradienten, Na⁺ aus der Zelle zu transportieren. Der Na⁺-Konzentrationsgradient dient als Energiespeicher und als treibende Kraft für den Import vieler Aminosäuren durch Symport. Die Existenz von Na⁺/H⁺-Austauschern wurde in den Zellmembranen aller bekannten Lebensformen und in den Membranen vieler Zellorganellen nachgewiesen. Über die reine Transportfunktion hinaus können sie auch die Aufgabe der pH-Regulation innerhalb der Zelle übernehmen.

Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität einer Zellmembran wurde erstmals 1974 von West und Mitchell am Beispiel von *E. coli* beschrieben [88]. Für den primären Na⁺/H⁺-Austauscher von *E. coli* wurde gezeigt, dass er bei pH < 7,0 inaktiv ist [79]. Zwischen pH 7,0 und pH 8,5 nimmt seine Aktivität um 3 Größenordnungen zu. Diese pH-abhängige Regulation ist auch bei gereinigtem und in Liposomen rekonstituiertem Protein nachweisbar, was bedeutet, dass der pH-Sensor im Protein realisiert ist und ohne externe Komponenten auskommt. Dieser Na⁺/H⁺-Austauscher ist bis jetzt der einzige, dessen Struktur aufgeklärt werden konnte [80]. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sind jedoch nur bedingt übertragbar, da die Familie der prokaryotischen Na⁺/H⁺-Austauscher sehr heterogen ist [81].

Alle bis jetzt identifizierten Na⁺/H⁺-Austauscher stammen aus den Domänen der Bakterien und der Eukaryoten. Die einzige Ausnahme stellt ein Na⁺/H⁺-Austauscher des hyperthermophilen Archaeons *Methanococcus jannaschii* dar [59]. Für extrem halophile Archaeen wurde zwar am Beispiel von *H. salinarum* die Existenz eines elektrogenen Na⁺/H⁺-Austauschersystems nachgewiesen [34], die Identifikation und Charakterisierung eines Na⁺/H⁺-Austauschers ist aber bis jetzt noch nicht

gelingen. Dies ist von besonderem Interesse, um zu klären, wie die Evolution die durch hohe Salzkonzentration bedingten Probleme bei einem für den Energiehaushalt und für alle Zellfunktionen essentiellen Transportvorgang gelöst hat.

2.7 Systeme zur Charakterisierung von Transportvorgängen

Transportvorgänge können an ganzen Zellen, Membranvesikeln oder am isolierten Protein nach Rekonstitution in eine Membran untersucht werden.

Meistens ist die Zelle des Ursprungsorganismus das am einfachsten zugängliche System zur Charakterisierung eines Transportvorgangs. Ein großer Vorteil ist, dass durch die homologe Expression die Funktion eines Proteins sichergestellt ist. Durch die Komplexität der Zelle ergeben sich jedoch einige Probleme. Es muss sichergestellt sein, dass unter den experimentellen Bedingungen das Transportsystem exprimiert wird und aktiv ist. Existiert mehr als ein Transportsystem für ein Substrat, ist eine Differenzierung nicht möglich. Der Transport ist möglicherweise von Faktoren abhängig, die vom Stoffwechsel der lebenden Zelle beeinflusst werden und messtechnisch nur schwer zugänglich sind, wie z.B. dem Membranpotential oder der intrazellulären Konzentration eines Cosubstrats. Außerdem ist es nicht möglich einen Transportvorgang einem Transportprotein zuzuweisen.

Dieses Problem kann gelöst werden, wenn die Möglichkeit besteht, einen offenen Leserahmen im Genom des Organismus zu deletieren und das Transportsystem dadurch zu deaktivieren. Darüber hinaus ermöglicht der Phänotyp einer Deletionsmutante weitere Erkenntnisse über den Transportvorgang.

Ist ein anderer Organismus verfügbar, bei dem der zu untersuchende Transportmechanismus ausgeschaltet wurde und dies nachweisbar ist, kann durch heterologe Rekombination die Identität eines Transporters gezeigt werden, sofern dadurch ein dem Wildtyp entsprechender Phänotyp entsteht.

Die Probleme, die durch die Komplexität ganzer Zellen entstehen, können bis zu einem gewissen Grad reduziert werden, in dem man auf Zellvesikel ausweicht. Zellvesikel sind Zellmembransphären, die durch Extrusion oder Beschallen von ganzen Zellen erzeugt werden. Sie bilden geschlossene Kompartimente, besitzen alle Transportfunktionen der Zelle, beinhalten aber kein Zytoplasma und können dadurch weder ein elektrisches Membranpotential noch Ionengradienten aufbauen. Außerdem wird die Degradation eines Substrats durch den Stoffwechsel der Zelle verhindert.

An isolierten solubilisierten Transportproteinen kann ausschließlich Substratbindung bestimmt werden, da nur ein Kompartiment zur Verfügung steht. Eine Ausnahme stellen optische Untersuchungsmethoden an Retinalproteinen dar. Um Transportvorgänge zu untersuchen, muss das Transportprotein wieder in ein planares oder vesikuläres Membransystem (Liposomen) rekonstituiert werden, das den Transport von einem Kompartiment in ein zweites ermöglicht. Ein solches Messsystem weist im Vergleich zu ganzen Zellen oder Zellvesikeln die geringste Komplexität und damit die höchste Sicherheit in Bezug auf die Interpretation der Ergebnisse auf. Die Voraussetzung ist jedoch immer die funktionelle Expression des Proteins, die Isolierung einer ausreichenden Menge mit ausreichender Reinheit und die erfolgreiche Rekonstitution.

2.8 Nachweis, Expression, Solubilisierung und Isolierung von Membranproteinen

Werden Untersuchungen am unmodifizierten Protein durchgeführt, ist dessen Nachweis und Quantifizierung problematisch. Steht ein spezifischer Antikörper zur Verfügung, ist er durch SDS-PAGE / Westernblot möglich. Alternativ dazu existiert die sehr zeitaufwendige Möglichkeit, die gesamte Proteinfraction durch 2D-Gelelektrophorese aufzutrennen und das Protein durch Massenspektroskopie zu identifizieren, was jedoch, besonders im Fall von Membranproteinen, nicht unbedingt gelingen muss. Dieses Problem kann umgangen werden, indem das zu untersuchende Protein auf DNA-Ebene mit einem Peptid fusioniert wird für das Antikörper verfügbar sind wie z.B. HIS-Tag oder Flag-Tag. Eine solche Modifikation stellt die Funktionalität des Proteins in Frage. Werden Untersuchungen am isolierten Protein beabsichtigt, kann durch eine Proteaseschnittstelle dieser Tag nachträglich abgespalten werden.

Die Expression eines Proteins im Ursprungsorganismus ist der sicherste Weg funktionelles Protein zu erhalten. In vielen Fällen ist die homologe Expression aber nicht möglich, z.B. weil der Organismus nicht kultivierbar ist, oder ungeeignet, weil der Expressionslevel zu gering ist oder keine Transformationsmethode existiert und damit eine Modifikation des Proteins nicht möglich ist. Unter diesen Voraussetzungen muss auf ein heterologes Expressionssystem wie z.B. E. coli oder S. cerevisiae zurückgegriffen werden. Die Probleme dieses Vorgehens liegen darin, dass eine heterologe Expression nicht immer möglich und die Funktionalität eines Proteins prinzipiell unsicher ist. Wird z.B. die richtige Faltung eines Proteins im Ursprungsorganismus durch einen Faltungshelfer sichergestellt, der im Expressionsorganismus nicht existiert, ist eine funktionelle heterologe Expression unwahrscheinlich. Eine vom Ursprungsorganismus abweichende Zusammensetzung des Zytosols oder des umgebenden Mediums kann die Funktionalität ebenfalls beeinträchtigen.

Die Reinigung von Membranproteinen ist nach Isolierung und Solubilisierung der Zellmembranen möglich. Die Membranstruktur wird durch einen großen Überschuss von Detergens aufgebrochen, die Membranproteine dadurch im Idealfall vereinzelt und vom Lipid befreit. Das Detergens lagert sich dabei an lipophile Proteinbereiche an und simuliert die Membran. Es wurde in vielen Fällen gezeigt, dass die native Faltung und damit die Aktivität auch im solubilierten Zustand erhalten bleibt, was aber nicht garantiert ist. Geeignet sind Detergentien mit niedriger Micellbildungskonzentration wie Dodecylmaltosid (DDM) oder Octylglycosid (OG), Detergentien mit hoher Micellbildungskonzentration wie Natriumdodecylsulfat (SDS) führen zur Denaturierung des Proteins. Zur Reinigung eines solubilierten Membranproteins können alle chromatographischen Methoden verwendet werden, die auch zur Reinigung löslicher Proteine eingesetzt werden. Das Membranprotein muss aber immer durch eine Mindestkonzentration eines geeigneten Detergens in Lösung gehalten werden. Probleme ergeben sich bei Konzentrations- und Dialysesritten, da Detergentien mit niedriger Micellbildungskonzentration meistens große Micellen bilden und dadurch mit dem Membranprotein aufkonzentriert werden und schwer dialysierbar sind. Eine Quantifizierung von Detergentien ist mit vertretbarem Aufwand meistens nicht möglich. Bei der Rekonstitution ist die Detergenskonzentration aber von großer Bedeutung.

Unter der Rekonstitution versteht man im vorliegenden Fall die Integration von solubiliertem Membranprotein in eine Lipidmembran. Es wurde in vielen Fällen gezeigt, dass eine funktionelle Rekonstitution durch Mischen von solubiliertem Membranprotein mit Liposomen und anschließender Detergensanreicherung möglich ist. Da ab der Micellbildungskonzentration des Detergens die Gefahr besteht, dass, entsprechend der Solubilisierung, die Struktur einer Lipidmembran zerstört wird, sollte der Eintrag von Detergens in einen Rekonstitutionsansatz immer möglichst gering gehalten werden. Es existieren aber auch Beispiele, die zeigen, dass eine Rekonstitution erst ab einer definierten Detergenskonzentration möglich ist, was auf eine

Destabilisierung der Liposomen zurückgeführt wurde [83]. Die Abreicherung des Detergens kann durch Verdünnung, chromatographische Methoden, Dialyse oder Adsorption an eine lipophile feste Phase erfolgen.

2.9 Quantifizierung von Transportvorgängen

Der direkte Weg, einen Transportvorgang zu verfolgen, ist die zeitabhängige Quantifizierung eines Substrats innerhalb eines Kompartiments unter der Voraussetzung, dass keine Degradation erfolgt. Die Trennung vom umgebenden Medium kann durch Filtration oder Pelletierung erfolgen, wobei durch die mechanische Belastung die Integrität der Kompartimentierung gefährdet ist. Die Quantifizierung organischer Verbindungen ist prinzipiell durch chromatographische Methoden (HPLC oder GC nach Derivatisierung) möglich, aber meist mit einem unverhältnismäßigen Zeitaufwand verbunden, da zur Darstellung einer Transportkinetik die Analyse einer großen Anzahl von Proben erforderlich ist. Der Einsatz radioaktiv markierter Derivate (^3H , ^{14}C), deren selektiver Nachweis durch einen Szintillationszähler möglich ist, vereinfacht solche Messreihen erheblich. Für anorganische Substrate ist dieses Vorgehen oft nicht möglich, da entweder kein geeignetes Isotop existiert (K^+) oder der Umgang mit diesen Isotopen mit hohem Risiko für den Experimentator verbunden ist ($^{22}\text{Na}^+$, $^{36}\text{Cl}^-$). Alternative Quantifizierungsmethoden sind in diesem Fall die Flammenabsorptionspektroskopie oder der Einsatz von ionenselektiven Elektroden.

In seltenen Fällen besteht die Möglichkeit, ein Substrat indirekt durch Fluoreszenzreporter zu quantifizieren. Ein Beispiel dafür ist die semiquantitative Bestimmung der Protonenkonzentration in Zellvesikeln durch Acridinorange.

Handelt es sich um einen elektrogenen Transportvorgang besteht die Möglichkeit, diesen durch den Konzentrationsgradienten eines Substrats bzw. Licht zu treiben und die daraus resultierende Änderung des Membranpotentials nachzuweisen. Dies kann durch membranpotentialabhängige Fluoreszenzfarbstoffe, Tetraphenylphosphonium, Patch-Clamp-Technik oder durch Adsorption von Zellvesikeln oder Proteoliposomen an eine leitfähige Oberfläche und Detektion des durch kapazitive Kopplung induzierten Stroms erfolgen.

2.10 Detektion der Membranpotentialänderung durch kapazitive Kopplung

Ein elektrogener Transportvorgang über die Lipiddoppelschicht eines Proteoliposoms führt zu einer Änderung des Membranpotentials. Die Ableitung dieses elektrischen Signal ist durch kapazitive Kopplung an eine leitende Oberfläche als Stromfluss zugänglich und kann zur Quantifizierung des Transports verwendet werden, wie von Seifert et al. in [30] gezeigt wurde.

Diese Methode soll am Beispiel des durch Licht getriebenen Protonentransports über die Membran von Bacteriorhodopsin-Proteoliposomen erklärt werden.

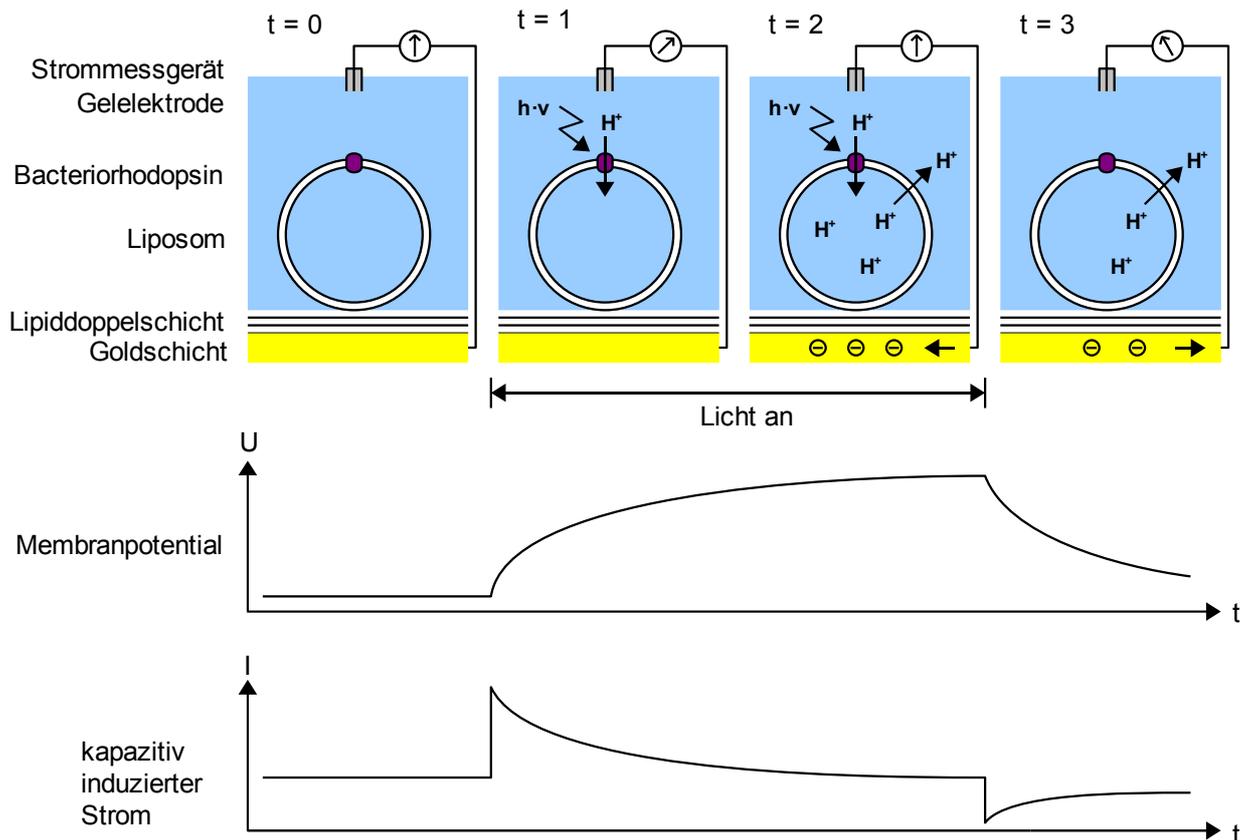


Abbildung 3: Modellvorstellung zur Signalentstehung beim Nachweis elektrogenen Transports über die Membran von BR-Proteoliposomen nach Adsorption an eine leitfähige Oberfläche.

$t = 0$: Ein BR-Proteoliposom ist an einer mit Lipid beschichteten Goldoberfläche immobilisiert. Im Ruhezustand ohne Licht ist das Membranpotential konstant Null.

$t = 1$: Durch Belichtung wird BR aktiv und pumpt Protonen in das Liposom.

$t = 2$: Die positive Ladung des Liposoms führt durch kapazitive Kopplung zu einem Fluss negativer Ladung durch die Gelelektrode und das Strommessgerät in die Goldschicht. Getrieben durch das elektrische Potential und den Konzentrationsgradienten diffundieren Protonen durch die Membran zurück in das umgebende Medium, der Nettotransport geht gegen Null.

$t = 3$: Das Licht als treibende Kraft des Protonenimports wird ausgeschaltet, das Membranpotential nimmt durch Diffusion der Protonen aus dem Liposom ab. Die negativen Ladungen in der Goldschicht wandern durch das Strommessgerät und die Gelelektrode zurück in das umgebende Medium, die Stromrichtung kehrt sich damit um.

Ein elektrogener Transport kann auch durch einen Konzentrationsgradienten eines Substrats, der durch einen Pufferwechsel erzeugt wird, getrieben werden.

Der Aufbau eines Detektionssystems zum elektrischen Nachweis von elektrogenem Transport soll am Beispiel des Geräts SURFE²R One der Firma longate gezeigt werden.

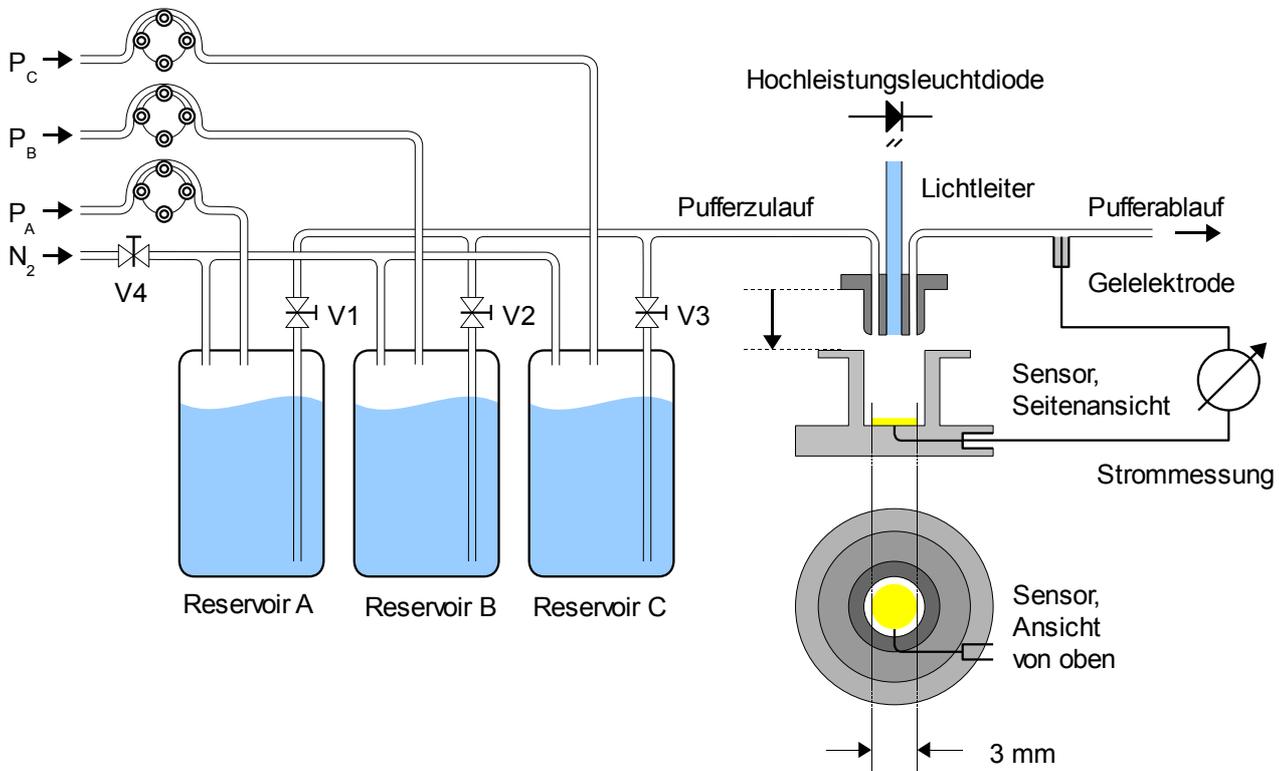


Abbildung 4: Technischer Aufbau des Detektionssystems SURFE²R One der Firma longate.

Die drei Pufferreservoirs des Geräts werden von Außen mit Schlauchpumpen befüllt. Der Transport zum Sensor erfolgt durch definierten Stickstoff-Überdruck und wird von den computergesteuerten Ventilen V1 – V3 gesteuert. Durch eine Hochleistungsleuchtdiode kann die Oberfläche des Sensors belichtet werden.

Die Messwertaufnahme erfolgt mit einem Ampermeter, das den Stromfluss zwischen Goldoberfläche und dem Puffer registriert und über einen A/D-Wandler mit dem Computer verbunden ist.

Die Goldoberfläche des Sensors wird mit einem Lipid-Bilayer beschichtet. Durch Octadecylamin wird die Oberflächenladung zum Positiven verschoben, wodurch eine spontane Adsorption von negativ geladenen Liposomen ermöglicht wird.

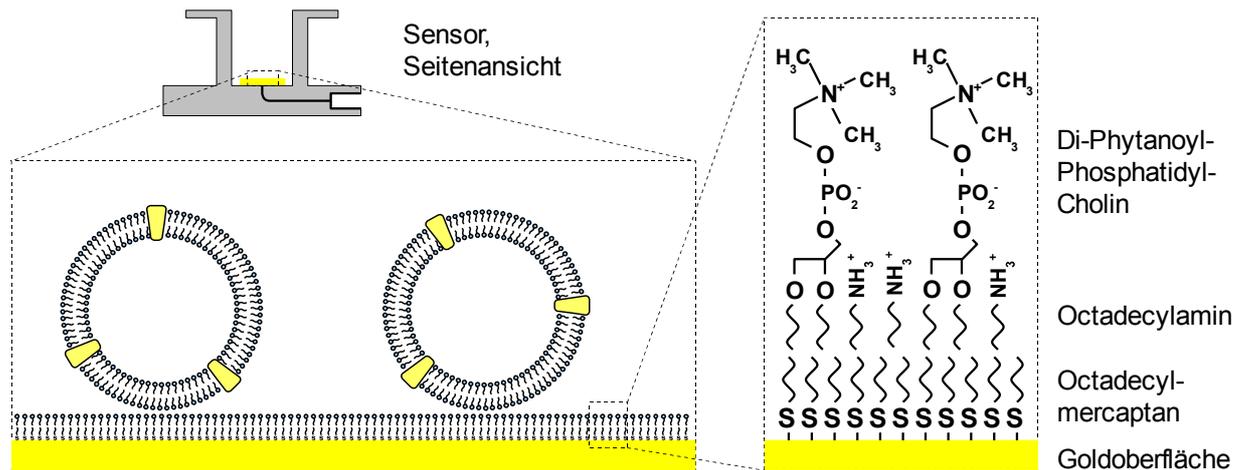


Abbildung 5: Aufbau der Oberfläche eines Sensors des Detektionssystems SURFE²R One.

2.11 Ziele dieser Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit waren die Etablierung der elektrischen Messung von elektrogenen Transportvorgängen mit dem Detektionssystem SURFE²R One der Firma Iongate und die Anwendung dieser Methode zum Funktionsnachweis von Retinalproteinen und zur Identifikation eines Na⁺/H⁺-Austauschers halophiler Archaeen.

Zuerst sollten die theoretischen Grundlagen der elektrischen Messung von elektrogenen Transportvorgängen ausgearbeitet und daraus ein physikalisches Modell erstellt werden. Für die praktische Validierung dieser Methode waren Messungen lichtgetriebener Transportvorgänge an Bacteriorhodopsin vorgesehen. Die Glaubwürdigkeit dieser Methode sollte durch Vergleich der Ergebnisse der Validierungsexperimente mit dem physikalischen Modell und mit veröffentlichten Ergebnissen anderer Experimente bestätigt werden.

Als erste Anwendung dieser Methode war der Funktionsnachweis der heterolog exprimierten Retinalproteine Halorhodopsin von *Natronomonas pharaonis* [7] und Acerhodopsin von *Acetabularia acetabulum* [87] geplant. Darüber hinaus war der Einsatz zur Identifikation eines Na⁺/H⁺-Austauschers halophiler Archaeen beabsichtigt. Als Vertreter wurden *H. salinarum* oder *N. pharaonis* ausgewählt, da deren sequenzierte Genome vorliegen [62], [85]. Nach Identifikation der, zu bestätigten Na⁺/H⁺-Austauschern anderer Organismen homologen, offenen Leserahmen war vorgesehen, die kodierte Proteine sowohl homolog als auch heterolog in *E. coli* zu exprimieren und über Affinitätschromatographie in der für die elektrischen Messungen nötigen Reinheit zu isolieren. Die Methode der elektrischen Transportmessung erschien für diese Fragestellung als besonders geeignet, da für *H. salinarum* gezeigt wurde, dass der Na⁺/H⁺-Austausch elektrogen erfolgt [34]. Außerdem kann dadurch der Einsatz radioaktiver Substanzen auf Kontrollexperimente reduziert werden, was in diesem Fall von großer Bedeutung ist, da als radioaktives Isotop von Natrium nur der β^+ -Strahler ²²Na zur Verfügung steht.

Der Funktionsnachweis der identifizierten offenen Leserahmen als Na⁺/H⁺-Austauscher sollte außerdem durch die Charakterisierung der Deletionsstämme von *H. salinarum* und der komplementierten Stämme von EP432, einer *E. coli* Mutante ohne Fähigkeit zum Na⁺/H⁺-Austausch, ergänzt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Physikalische Betrachtung der elektrischen Messung elektrogenen Transports

Zum Nachweis eines elektrogenen Transports über die Membran von Proteoliposomen mit dem Detektionssystem SURFE²R One wird die Änderung des Membranpotentials ausgewertet. Als Signal wird der durch kapazitive Kopplung an eine leitfähige Oberfläche induzierte Stromfluss gemessen. Im Folgenden werden die physikalischen Zusammenhänge hergeleitet und daraus ein mathematisches Modell entwickelt.

3.1.1 Das physikalische Modell eines BR-Proteoliposoms

Die Berechnungen gehen von Proteoliposomen mit folgender Geometrie aus:

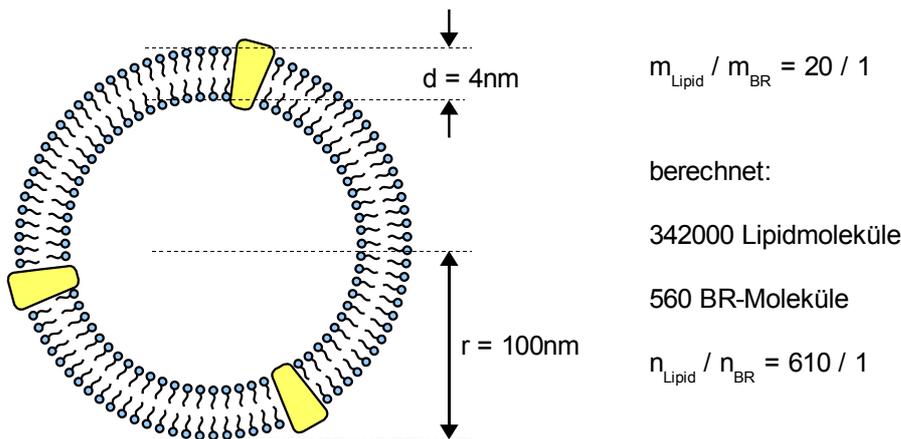


Abbildung 6: Nicht maßstabsgetreue Darstellung des Querschnitts eines Proteoliposoms. Die Anzahl der Lipid- und BR-Moleküle wurde aus dem eingesetzten Mengenverhältnis von BR zu Lipid und der angenommenen Geometrie berechnet.

Das Lipidvolumen berechnet sich aus der Oberfläche der Kugel (A_{Membran}) und der Dicke der Membran (d):

$$V_{\text{Lipid}} = A_{\text{Membran}} \cdot d = 4 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot d = 5,02 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^3$$

Bei einer angenommenen Dichte des Lipids von $1,0 \text{ g/cm}^3$ ergibt sich daraus das Gewicht:

$$m_{\text{Lipid}} = V_{\text{Lipid}} \cdot \rho = 5,02 \cdot 10^{-16} \text{ g}$$

Die Anzahl der Lipidmoleküle in einem Proteoliposom wird aus dem Gewicht des Lipids, dem Molekulargewicht des Lipids (PGP-Me: 884 g/mol) und der Avogadrokonstante N_A berechnet:

$$n_{\text{Lipid}} = m_{\text{Lipid}} / M_{\text{Lipid}} \cdot N_A = 342000$$

Das Verhältnis der Anzahl der Lipidmoleküle zur Anzahl der BR-Moleküle berechnet sich aus den eingesetzten Mengen und den Molekulargewichten ($M_{BR} = 27000 \text{ g/mol}$).

$$n_{Lipid} / n_{BR} = (m_{Lipid} / M_{Lipid}) / (m_{BR} / M_{BR}) = 610 / 1$$

Die Anzahl der BR-Moleküle in einem Proteoliposom berechnet sich aus der Anzahl der Lipidmoleküle und dem Verhältnis von Lipid- zu BR-Molekülen:

$$n_{BR} = n_{Lipid} / (n_{Lipid} / n_{BR}) = 560$$

Betrachtet man ein Proteoliposom als Kugelkondensator ($r = 100 \text{ nm}$) mit der Lipidmembran ($d = 4 \text{ nm}$, [73]) als Dielektrikum ($\epsilon_r = 2$, [71], [72]), beträgt die berechnete Kapazität:

$$C_{PI} = 4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot 1 / [1/(r-d) - 1/r] = 5,3 \cdot 10^{-16} \text{ F} \quad (\cong 0,42 \text{ } \mu\text{F/cm}^2)$$

Im Ersatzschaltbild eines BR-Proteoliposoms wird BR als Stromquelle I_{BR} dargestellt. Die Membran des Proteoliposoms wird durch ihre Kapazität C_{PI} und ihren Widerstand R_{PI} beschrieben. Das elektrische Potential des umgebenden Mediums liegt an Punkt B an, das elektrische Potential des vom Proteoliposom eingeschlossenen Mediums an Punkt A.

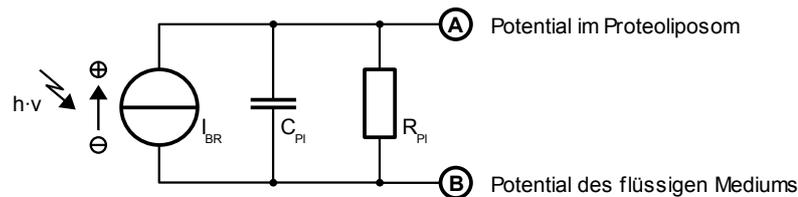


Abbildung 7: Ersatzschaltbild eines BR-Proteoliposoms.

Der Innenwiderstand R_{PI} ist weder durch Berechnungen noch durch Messungen direkt zugänglich. Er wird später in Kapitel 3.3.3 durch Vergleich des mathematischen Modells mit einer Messung hergeleitet.

Der elektrogene Nettotransport über die Membran eines Proteoliposoms ist begrenzt durch das maximale erreichbare Membranpotential. Von Geibel et al. wurde in [77] gezeigt, dass der Nettotransport von Protonen durch BR über die Membran von Oocyten näherungsweise linear vom Membranpotential abhängig ist und bei einer Gegenspannung von 250 mV gegen Null geht. Für diese Obergrenze gibt es zwei mögliche Erklärungen:

- Durch das zunehmende Membranpotential kommt der Transport zum Erliegen, da die durch die Absorption des Photons zur Verfügung stehende Energie nicht mehr ausreichend ist, um das elektrische Feld zu überwinden.
Die Energie eines Photons mit einer Wellenlänge von 562 nm (λ) errechnet sich aus der Lichtgeschwindigkeit (c) und dem Planckschen Wirkungsquantum (h):

$$E = c / \lambda \cdot h = 2,2 \text{ eV}$$

Mit der Energie, die durch die Absorption eines Photons der Wellenlänge 562 nm gewonnen wird, kann eine Elementarladung maximal eine Potentialdifferenz von 2,2 V überwinden. Unter der Annahme, dass der Transportprozess verlustbehaftet ist, kann das durch BR

maximal erreichbare Membranpotential von 250 mV dadurch erklärt werden. Übertragen auf das Ersatzschaltbild bedeutet das, dass BR keine ideale Stromquelle darstellt, da die Anzahl der transportierten Ladungen mit steigender Gegenspannung abnimmt.

- Ab einem bestimmten Membranpotential wird durch die elektrostatischen Kräfte die Membran destabilisiert, was zu einer erhöhten Leitfähigkeit führt. Für das Potential, ab dem dieser Effekt eintritt, findet man in der Literatur Werte zwischen 100 und 1000 mV [71]. Das durch BR maximal erreichbare Membranpotential von 250 mV kann also auch durch diesen Effekt erklärt werden. Übertragen auf das Ersatzschaltbild bedeutet das, dass die Membran keinen linearen Widerstand darstellt, da der Widerstand mit steigendem Membranpotential abnimmt.

Wodurch die Obergrenze des Membranpotentials von 250 mV begründet ist, kann nicht entschieden werden. Vermutlich spielen beide Effekte eine Rolle. Für die weitere Signalabschätzung wird angenommen, dass nur die vom Membranpotential abhängige Verlangsamung der Transportgeschwindigkeit von Bacteriorhodopsin entscheidend ist.

Die Anzahl der transportierten Elementarladungen (n_{EI}), die zum Erreichen des maximalen Membranpotentials von 250 mV (U_{MP}) nötig sind, wird von der Kapazität der Membran (C_{PI}) bestimmt:

$$n_{EI} = C_{PI} \cdot U_{MP} / e = 827 \quad (\cong 1,5 \text{ H}^+/\text{BR})$$

Wird der Widerstand der Membran als sehr hoch angenommen, transportiert jedes in einem Proteoliposom enthaltene BR-Molekül statistisch 1,5 Protonen, bis dieses Potential erreicht ist.

Die Anzahl der Puffermoleküle (n_{Pu}), die im Volumen des Proteoliposoms eingeschlossen sind, beträgt bei einer Konzentration (c_{Pu}) von 50 mM:

$$n_{Pu} = 4 / 3 \cdot \pi \cdot r^3 \cdot 1000 \text{ l/m}^3 \cdot c_{Pu} \cdot N_A = 126000$$

Der Protonierungsgrad des Puffers ändert sich demnach um $n_{EI} / n_{Pu} = 0,66 \%$. Obwohl ein Protonentransport stattfindet ist also keine nennenswerte pH-Änderung im Proteoliposom zu erwarten.

3.1.2 Das physikalische Modell des Sensors

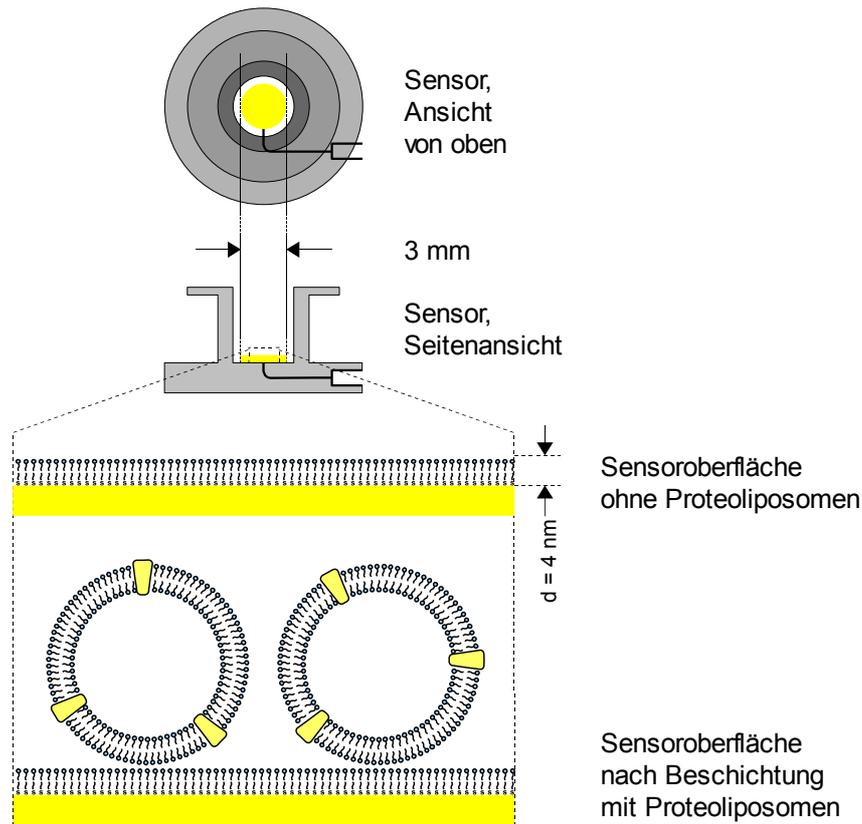


Abbildung 8: Der Aufbau eines im SURFE²R One Detektionssystem eingesetzten Sensors.

Die Kapazität der mit einem Lipid-Bilayer beschichteten Oberfläche (C_{Sensor}) berechnet sich aus der Oberfläche der Goldschicht ($A_{\text{Sensor}} = 7,07 \text{ mm}^2$), der Dicke des Bilayers ($d_{\text{BL}} = 4 \text{ nm}$, [73]) und der Dielektrizitätskonstante des Lipids ($\epsilon_r = 2$, [71], [72]). Als absoluten Wert für einen Sensor ergibt sich eine Kapazität von:

$$C_{\text{Sensor}} = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot A_{\text{Sensor}} / d_{\text{BL}} = 31 \text{ nF} \quad (\cong 0,44 \text{ } \mu\text{F}/\text{cm}^2)$$

Dieser berechnete Wert stimmt mit den Ergebnissen der Messungen, die zwischen 200 und 400 nF/cm² lagen, überein und bestätigt, dass sich durch die beschriebene Behandlung auf der Sensoroberfläche ein Lipid-Bilayer bildet.

Im Ersatzschaltbild der mit einem Lipid-Bilayer beschichteten Oberfläche wird die Lipidschicht durch ihre Kapazität C_{Sensor} und ihren Widerstand R_{Sensor} dargestellt. Das elektrische Potential des flüssigen Mediums auf der Sensoroberfläche liegt an Punkt C, das elektrische Potential der Goldschicht an Punkt D.

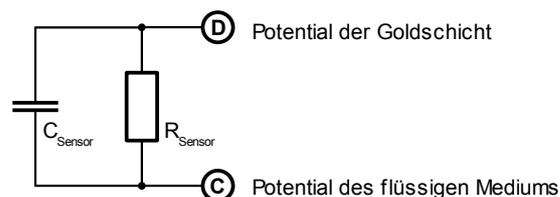


Abbildung 9: Ersatzschaltbild eines mit einem Lipid-Bilayer beschichteten Sensors.

Der Widerstand R_{Sensor} ist durch direkte Messungen zugänglich und wurde mit durchschnittlich $14 \text{ M}\Omega/\text{cm}^2$ (entspricht $200 \text{ M}\Omega$ auf die Oberfläche des Sensors umgerechnet) bestimmt.

Die Messung des über die Oberfläche kapazitiv induzierten Stroms erfolgt über eine mit dem flüssigen Medium in Verbindung stehenden Elektrode, deren Eigenschaften als ideal angenommen werden (kein Innenwiderstand, keine Polarisierung) und der Goldoberfläche. Das Strommessgerät besitzt einen Innenwiderstand R_{Mess} und mit der Zuleitung die Kapazität C_{Mess} . Das Potential des flüssigen Mediums wird als Massepotential definiert.

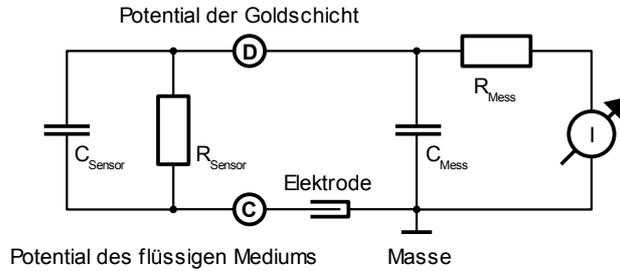


Abbildung 10: Ersatzschaltbild eines mit einem Lipid-Bilayer beschichteten Sensors und dem Strommessgerät.

Der Innenwiderstand des Strommessgeräts (DLPCA-200, Femto-Messtechnik) wird vom Hersteller mit $10 \text{ k}\Omega$ angegeben, die Kapazität mit 5 pF [69]. Die Zuleitungskapazitäten sind nicht bekannt.

3.1.3 Das physikalische Modell eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors

Die Vervollständigung mit dem Ersatzschaltbild des Proteoliposoms erfolgt durch Aufspaltung der Kapazität und des Widerstands der Membran des Proteoliposoms in einen Teil, der sich durch Kopplung an das flüssige Medium ergibt ($C_{PI/A}$, $R_{PI/A}$) und einen zweiten Teil, der sich durch Kopplung an die Goldschicht ergibt ($C_{PI/B}$, $R_{PI/B}$).

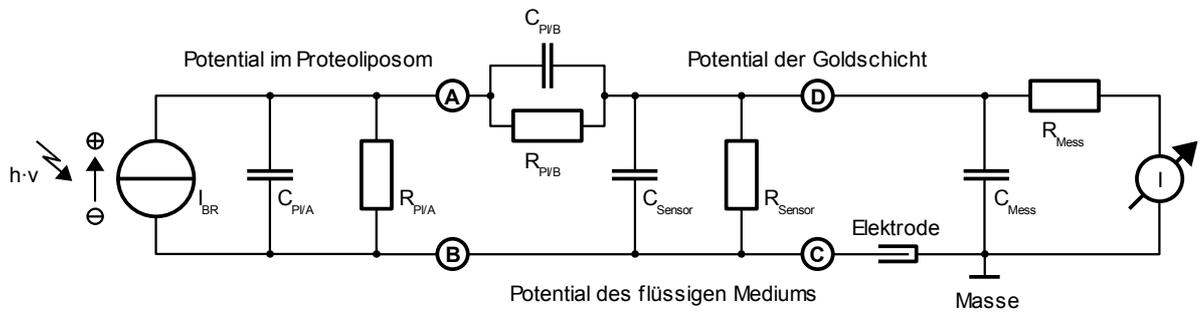


Abbildung 11: Ersatzschaltbild eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors.

Die Kapazität $C_{PI/B}$, mit der das Potential eines Proteoliposoms an die Oberfläche gekoppelt ist, und die Widerstandskomponente $R_{PI/B}$ sind durch Messung nicht zugänglich. Eine direkte Berechnung ist ebenfalls nicht möglich, da über die geometrischen Gegebenheiten nach Bindung des Proteoliposoms an die Oberfläche nichts bekannt ist. Da ein Proteoliposom, das an der Oberfläche adsorbiert ist, mindestens zur Hälfte mit dem flüssigen Medium umgeben ist und die kapazitive Kopplung an die Goldschicht über die doppelte Membrandicke erfolgt, muss das Verhältnis zwischen $C_{PI/A}$ und $C_{PI/B}$ mindestens bei 4 : 1 liegen.

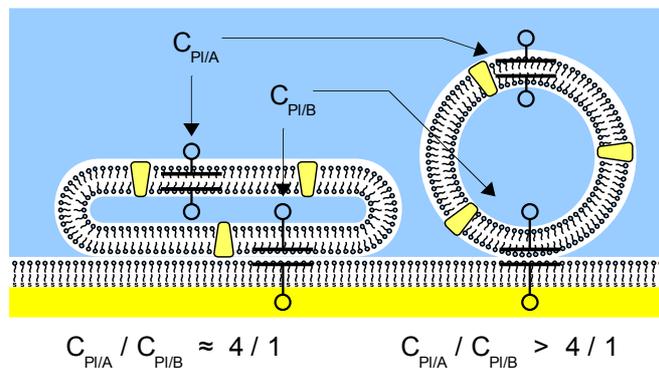


Abbildung 12: Darstellung der kapazitiven Kopplung an die Goldoberfläche eines Sensors in Abhängigkeit von der Geometrie des Proteoliposoms

Die Kapazität der Kopplung an die Oberfläche berechnet sich aus der Kapazität eines Proteoliposoms ($C_{PI} = 5,3 \cdot 10^{-16}$ F) und dem zuvor geometrisch begründeten Verhältnis zwischen $C_{PI/A} / C_{PI/B} > 4 / 1$ mit maximal $1,1 \cdot 10^{-16}$ F.

Vergleicht man den Widerstand des Sensors mit dem Innenwiderstand des Strommessgeräts, findet man ein Verhältnis von $85 \text{ M}\Omega / 10 \text{ k}\Omega = 8500 : 1$. Der Einfluss der Leckströme durch den Bilayer auf der Goldoberfläche kann also vernachlässigt werden. Da bei einer Strommessung das Potential

zwischen den beiden Messpunkten immer Null ist (der Innenwiderstand des Messgeräts wird als vernachlässigbar angenommen), haben auch die Kapazitäten der Sensoroberfläche und des Strommessgeräts keinen Einfluss auf die Messung. Das Ersatzschaltbild vereinfacht sich dadurch erheblich:

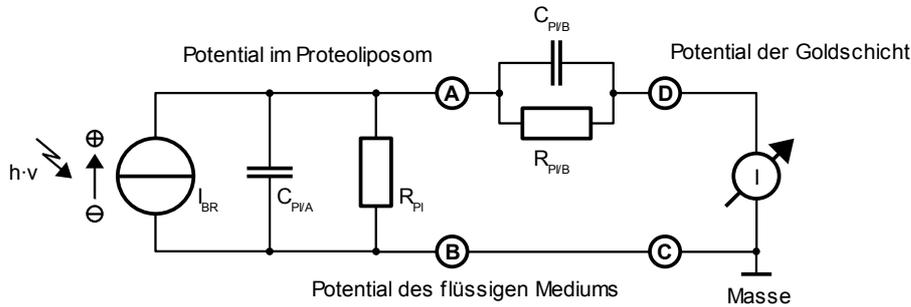


Abbildung 13: Vereinfachtes Ersatzschaltbild eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors.

Aus diesem Ersatzschaltbild lassen sich folgende Punkte ableiten:

Der induzierte Strom ist über die Kapazität (C_{PVB}) von der Potentialänderung der Proteoliposomenmembran abhängig.

Der induzierte Strom ist außerdem über den Widerstand (R_{PVB}) vom absoluten Potential der Proteoliposomenmembran abhängig.

Eine lineare Abhängigkeit zwischen Potentialänderung der Proteoliposomenmembran und dem induzierten Strom gilt nur für $R_{PVB} \rightarrow \infty$.

Im ersten Punkt steckt das große Problem, das eine absolute Quantifizierung der Membranpotentialänderung unmöglich macht: Die Kapazität der Kopplung an die Oberfläche ist, abgesehen von einer grob geschätzten Obergrenze ($C_{PVA} / C_{PVB} > 4 / 1$), unbekannt. Eine Abschätzung des zu erwartenden Signals eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors ist aus diesem Grund nicht möglich, da es direkt von diesem Verhältnis abhängig ist.

Die Anzahl der in einer Monoschicht adsorbierten Proteoliposomen berechnet sich aus der Sensoroberfläche A_{Sensor} ($7,07 \text{ mm}^2$), der von einem Proteoliposom abgedeckten Fläche A_{PL} und der aus der dichtesten zweidimensionalen Kugelpackung abgeleiteten Abdeckung f von 89 %:

$$n_{\text{PL}} = A_{\text{Sensor}} / A_{\text{PL}} \cdot f = 2,0 \cdot 10^8$$

Die theoretische Anzahl Proteoliposomen in einem, auf den Sensor gegebenen Volumen von $10 \mu\text{l}$ mit einer Lipidkonzentration von 2 mg/ml , berechnet sich aus der Menge des enthaltenen Lipids, dem Molekulargewicht, der Avogadrokonstante N_A und der Anzahl der Lipidmoleküle pro Liposom:

$$n_{\text{PL}} = m / M_{\text{Lipid}} \cdot N_A / n_{\text{Lipid}} = 4,0 \cdot 10^{10}$$

Vergleicht man die berechnete Anzahl der Proteoliposomen in einer Monoschicht auf dem Sensor mit der berechneten Anzahl der eingesetzten Proteoliposomen, ergibt sich daraus, dass ein Anteil von 0,5 % adsorbiert werden kann.

3.1.4 Mathematische Beschreibung des Signals

Aus der vorhergehenden Betrachtung lässt sich folgende mathematische Beschreibung der physikalischen Vorgänge herleiten:

Die Ladung eines belichteten BR-Proteoliposoms zum Zeitpunkt t beträgt:

$$Q(t) = Q(t-\Delta t) + H^*/BR/s \cdot \Delta t \cdot (U_{\max} - U_{MP}(t-\Delta t)) / U_{\max} \cdot e \cdot n_{BR} - I_{MP}(t-\Delta t) \cdot \Delta t$$

Die Ladung eines unbelichteten BR-Proteoliposoms zum Zeitpunkt t beträgt:

$$Q(t) = Q(t-\Delta t) - I_{MP}(t-\Delta t) \cdot \Delta t$$

Das Membranpotential des Proteoliposoms (U_{MP}) beträgt zum Zeitpunkt t :

$$U_{MP}(t) = Q(t) / C_{p/A}$$

Der Strom durch die Membran des Proteoliposoms zum Zeitpunkt t beträgt:

$$I_{MP}(t) = U_{MP}(t) / R_{p/A}$$

Dabei ist:

- $Q(t-\Delta t)$ die Ladung des Proteoliposoms zum Zeitpunkt der vorhergehenden Berechnung.
- $H^*/BR/s$ die maximale Transportgeschwindigkeit eines BR-Moleküls.
- $H^*/BR/s \cdot \Delta t$ die maximale Anzahl von Protonen, die von einem BR-Molekül in der Zeit Δt transportiert werden.
- $(U_{\max} - U_{MP}(t-\Delta t)) / U_{\max}$ die vom Membranpotential zum Zeitpunkt t linear abhängige Hemmung des Protonentransports.

Dieser Term

- ist 1 wenn das Membranpotential U_{MP} 0 mV beträgt,
- ist 0 wenn das Membranpotential $U_{MP} = U_{\max}$ ist.
- U_{\max} ist das Membranpotential, bei dem der Protonentransport von BR gegen Null geht.
- e die Ladung eines Protons (Elementarladung).
- n_{BR} die Anzahl der BR-Moleküle in einem BR-Proteoliposom.
- Δt die Zeitauflösung, mit der gerechnet wird.
- $C_{p/A}$ die Kapazität der Membran eines Proteoliposoms.
- $R_{p/A}$ der Widerstand der Membran eines Proteoliposoms.

Der induzierte Strom I_{Sensor} zum Zeitpunkt t beträgt:

$$I_{\text{Sensor}}(t) = (U_{\text{MP}}(t) - U_{\text{MP}}(t-\Delta t)) / \Delta t \cdot C_{\text{PI/B}} \cdot n_{\text{PI}} + U_{\text{MP}}(t) / R_{\text{PI/B}} \cdot n_{\text{PI}}$$

Dabei ist:

- $(U_{\text{MP}}(t) - U_{\text{MP}}(t-\Delta t)) / \Delta t$ die Änderung des Membranpotentials pro Zeiteinheit.

3.1.5 Zusammenfassung

Aus der angenommenen Geometrie der Oberfläche eines mit Proteoliposomen beschichteten Sensors wurde folgendes physikalisches Modell abgeleitet:

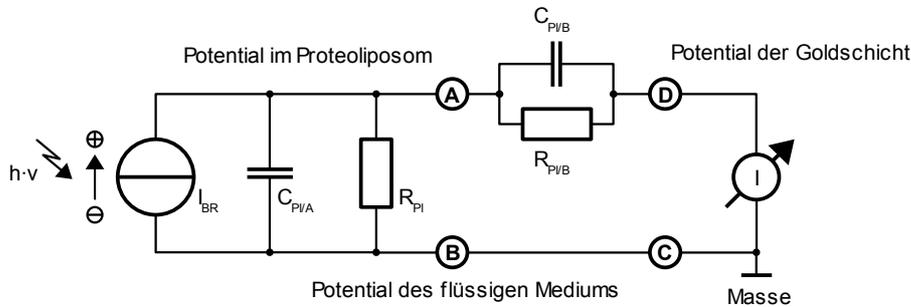


Abbildung 14: Vereinfachtes Ersatzschaltbild eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors.

Die physikalischen Gesetzmäßigkeiten dieses Modells wurden in ein mathematisches Modell übertragen und können zur Beschreibung einer gemessenen Stromkurve eingesetzt werden.

3.2 Methodenvalidierung der elektrischen Messung elektrogenen Transports

Das Ziel der folgenden Experimente war es, mit Bacteriorhodopsin-Proteoliposomen die Beschichtung des im Detektionssystem SURFE²R One der Firma Iongate verwendeten Sensorsystems zu optimieren, die Eignung für Pufferwechsellmessungen nachzuweisen und das Messsignal zu verifizieren.

3.2.1 Kapazität und Widerstand der Sensoroberfläche bei der Sensorpräparation

Die Oberfläche eines Sensors wird mit einem Monolayer aus Octadecylmercaptan und einem zweiten Monolayer aus Di-Phytanoyl-Phosphatidyl-Cholin und Octadecylamin beschichtet. An dieser Doppelschicht werden die Liposomen adsorbiert. Die an einem Sensor gemessenen Kapazitäts- und Widerstandswerte liefern Informationen über die Beschichtungsqualität.

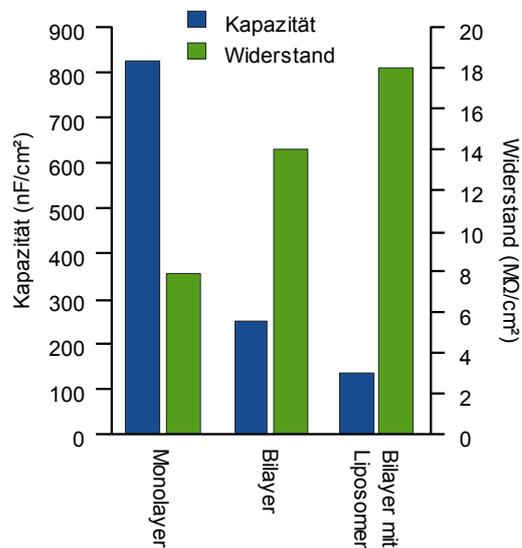


Abbildung 15: Kapazität und Widerstand eines Sensors mit verschiedenen Oberflächenbeschichtungen. Der Widerstand und die Kapazität der Oberfläche eines Sensors des Detektionssystems SURFE²R One wurde nach den angegebenen Beschichtungsschritten mit diesem Gerät bestimmt. Pufferzusammensetzung: 1 M NaCl, 50 mM Tris / HCl, pH 7,5

Abhängig von der Dicke der Beschichtung nimmt die Kapazität von 820 auf 140 nF/cm² ab. Der Widerstand nimmt mit zunehmender Schichtdicke von 7,9 auf 18 MΩ/cm² zu. Höhere Widerstände als 27 MΩ/cm² konnten meistens auf eine fehlerhafte Kontaktierung des Sensors zurückgeführt werden, niedrigere Widerstände als 9 MΩ/cm² auf eine fehlerhafte Beschichtung des Sensors oder eine Flüssigkeitsbrücke zwischen den Kontakten. Die von Iongate eingesetzte Oberflächenchemie erwies sich als äußerst robust, mit BR-Proteoliposomen beschichtete Sensoren waren zu mehr als 90 % funktionstüchtig.

3.2.2 Das lichtinduzierte Signal eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors

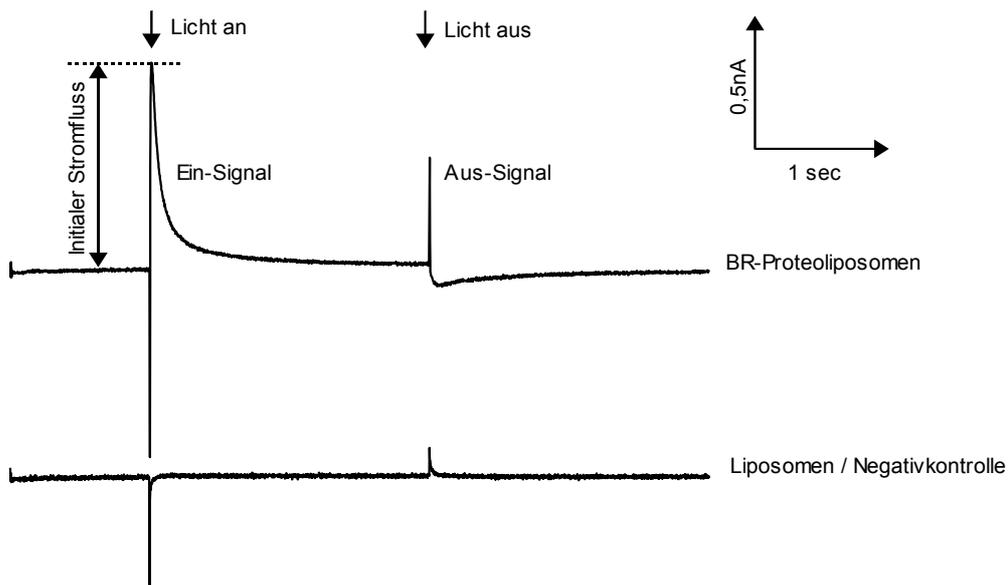


Abbildung 16: Vergleich des lichtinduzierten Stromflusses zwischen einem mit BR-Proteoliposomen- und einem mit Liposomen beschichteten Sensor.

Zwei Sensoren des Detektionssystems SURFE²R One wurden mit BR-Proteoliposomen bzw. Liposomen aus Gesamtlipidextrakt von *H. salinarum* (Halolipid) beschichtet. Die Oberfläche wurde für zwei Sekunden belichtet und der induzierte Stromfluss aufgezeichnet. Die Lichtintensität betrug $4,5 \text{ mW/cm}^2$ bei einer Wellenlänge von $530 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$. Pufferzusammensetzung: 300 mM NaCl , 50 mM Tris/HCl , $\text{pH } 7,5$. In dieser Abbildung ist der gemessene Strom gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt wird das Mittel aus 100 Messungen.

Bei Belichtung eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors ist zwischen Sensoroberfläche und flüssigem Medium ein Strom messbar (Ein-Signal). Der Signalverlauf stellt die kapazitive Ableitung des durch den Protonentransport steigenden Membranpotentials der adsorbierten Proteoliposomen dar. Der gemessene Strom korreliert mit der Änderung des Membranpotentials. Die Stromstärke nimmt ausgehend vom initialen Wert zu Beginn der Belichtung rasch ab und geht gegen Null, was bedeutet, dass sich zwischen aktivem Transport von Protonen in die Proteoliposomen und der passiven Diffusion aus den Proteoliposomen ein Gleichgewicht eingestellt hat. Nach dem Ende der Belichtung nimmt das Membranpotential durch passive Diffusion der Protonen aus den Proteoliposomen heraus wieder ab. Dies führt zu einem Strom mit umgekehrten Vorzeichen (Aus-Signal), der mit dem Erreichen einer ausgeglichenen Protonenkonzentration auf beiden Seiten der Proteoliposomenmembran wieder gegen Null geht.

Aus der maximalen Amplitude des Ein-Signals wird die relative initiale Transportaktivität abgeleitet.

Am Anfang und am Ende der Belichtung wurden sowohl mit Proteoliposomen als auch mit Liposomen ein Stromfluss mit einer Zeitkonstante von $< 1 \text{ ms}$ gemessen. Diese Artefakte wurden auf photoaktive Verunreinigungen des Lipids zurückgeführt und bei der Auswertung der Messungen nicht berücksichtigt.

3.2.3 Adsorption von Proteoliposomen an die Sensoroberfläche

Als unter Hochsalz verwendbare Lipide kamen zur Herstellung der Proteoliposomen ein Lipidgesamtextrakt aus *H. salinarum* (Halolipid) oder Asolektin in Frage. Um deren Eignung zu vergleichen, wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ Minuten 10 μl BR-Proteoliposomen in das Sensorreservoir gegeben und die Adsorption über einen Zeitraum von 200 Minuten durch die Messung des initialen lichtinduzierten Stromflusses verfolgt.

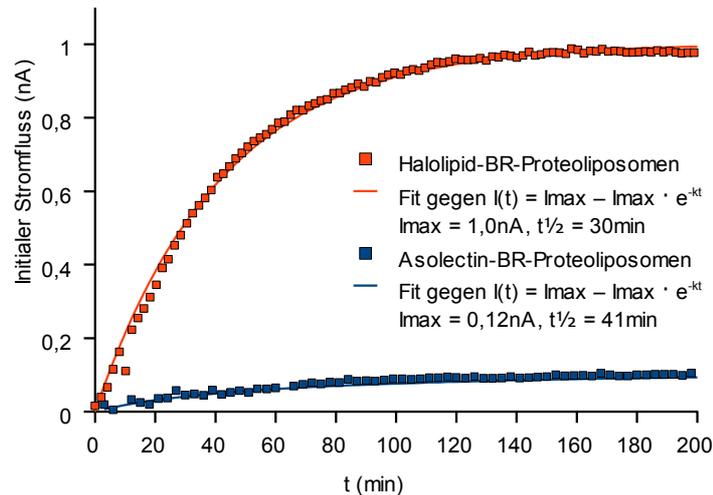


Abbildung 17: Vergleich der zeitabhängigen Adsorption von BR-Proteoliposomen an die Oberfläche eines Sensors.

10 μl BR-Asolektin/Halolipid-Proteoliposomen ($c_{\text{Lipid}} = 1 \text{ mg/ml}$, $c_{\text{BR}} = 0,05 \text{ mg/ml}$) wurden in das mit 30 μl Puffer (1 M NaCl, 50 mM Tris / HCl, pH 7,5) gefüllte Reservoir auf der Oberfläche eines Sensors des Detektionssystems SURFE²R One gegeben. Ab diesem Zeitpunkt wurde im Abstand von 3 Minuten die Oberfläche für 2 Sekunden belichtet und der induzierte Stromfluss aufgezeichnet. Die Lichtintensität betrug 4,5 mW/cm^2 bei einer Wellenlänge von 530 $\text{nm} \pm 50 \text{ nm}$.

In dieser Abbildung ist der initiale lichtinduzierte Strom jeder einzelnen Messung gegen die Adsorptionszeit dargestellt.

Die Adsorption lässt sich mit einer Kinetik erster Ordnung beschreiben. Die Halbwertszeit dieser Reaktion liegt für Halolipid-Proteoliposomen bei 30 Minuten, für Asolectin-Proteoliposomen bei 41 Minuten. Das maximale Signal von Halolipid-Proteoliposomen lag bei dieser Messung bei 1 nA und damit um den Faktor 8 über dem von Asolectin-Proteoliposomen. Die Adsorption ist bei Raumtemperatur nach 2 Stunden abgeschlossen.

Alle folgenden Messungen wurden mit Halolipid-Proteoliposomen durchgeführt.

3.2.4 Optimierung der Menge der adsorbierten Proteoliposomen

Um die optimale Menge Proteoliposomen zur Beschichtung eines Sensors zu bestimmen, wurden über einen Zeitraum von 12 Stunden 0 - 40 μl BR-Proteoliposomen (Lipidkonzentration 2 mg/ml, Proteinkonzentration 0,1 mg/ml) an die Oberfläche verschiedener Sensoren adsorbiert und der initiale lichtinduzierte Stromfluss bestimmt.

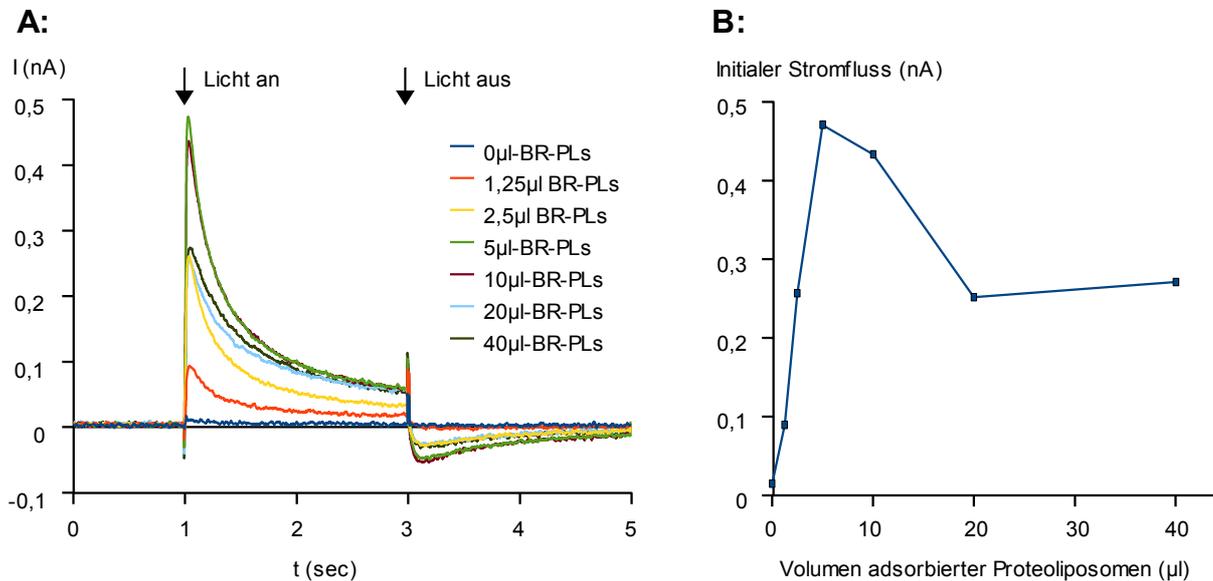


Abbildung 18: Durch Licht induzierter Stromfluss, gemessen an Sensoren, die mit verschiedenen Mengen BR-Proteoliposomen beschichtet wurden.

0 - 40 μl BR-Halolipid-Proteoliposomen ($c_{\text{Lipid}} = 2 \text{ mg/ml}$, $c_{\text{BR}} = 0,1 \text{ mg/ml}$) wurden in das mit 30 μl Puffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris / HCl, pH 7,5) gefüllte Reservoir auf der Oberfläche eines Sensors des Detektionssystems SURFE²R One gegeben und für 16 Stunden bei 4°C adsorbiert. Die Oberfläche jedes Sensors wurde für 2 Sekunden belichtet und der induzierte Stromfluss aufgezeichnet. Die Lichtintensität betrug 4,5 mW/cm² bei einer Wellenlänge von 530 nm \pm 50 nm.

A: In dieser Abbildung ist der gemessene Strom gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt wird das 20 ms-tiefpassgefilterte Mittel aus 10 Messungen.

B: In dieser Abbildung ist der initiale lichtinduzierte Stromfluss gegen die adsorbierte Menge Proteoliposomen aufgetragen.

Das maximale Signal wird durch Adsorption von 5 - 10 μl BR-Proteoliposomen der angegebenen Zusammensetzung erzielt.

3.2.5 Stabilität der Proteoliposomenbeschichtung eines Sensors

Zur Messung von Na^+/H^+ -Austauscheraktivität wird durch eine schnelle Änderung der Na^+ -Konzentration auf dem Sensor ein Konzentrationsgradient zwischen dem Inneren der Proteoliposomen und dem umgebenden Medium erzeugt. Bei einem solchen Pufferwechsel wird die Oberfläche des Sensors durch die Strömung der Flüssigkeit mechanisch belastet. Um die ausreichende Stabilität der Sensorbeschichtung für diese Messungen nachzuweisen, wurde an einem frisch mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensor 30 mal das lichtinduzierte Signal nach einem Pufferwechsel gemessen und aus dem Signal auf die Integrität der Sensorbeschichtung geschlossen.

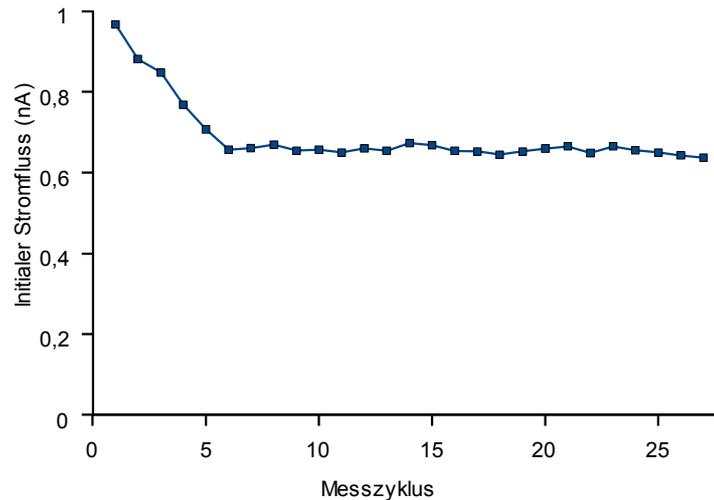


Abbildung 19: Stresstest eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors.

An die Oberfläche eines Sensors wurden 10 μl BR-Halolipid-Proteoliposomen ($c_{\text{Lipid}} = 2 \text{ mg/ml}$, $c_{\text{BR}} = 0,1 \text{ mg/ml}$) für 16 Stunden adsorbiert. Die Oberfläche wurde für 2 Sekunden belichtet und der induzierte Stromfluss aufgezeichnet. Die Lichtintensität betrug $4,5 \text{ mW/cm}^2$ bei einer Wellenlänge von $530 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$.

Anschließend wurde die Sensoroberfläche für 2 Sekunden mit einem Druck von 100 mbar gespült (Puffer 1 M NaCl, 50 mM Tris / HCl, pH 7,5). Dieser Messzyklus wurde 30 mal wiederholt.

In dieser Abbildung ist der initiale lichtinduzierte Stromfluss gegen die Nummer des Messzyklus aufgetragen.

Das Signal eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors nimmt im Laufe der ersten sechs Pufferwechsel auf 65 % des ursprünglichen Werts ab. Von diesem Zeitpunkt an bleibt das Signal stabil.

Die Sensorbeschichtung ist für Pufferwechselfmessungen geeignet.

3.2.6 Einfluss der Lichtintensität auf den initialen lichtinduzierten Stromfluss

Um den Zusammenhang zwischen der lichtabhängigen Aktivität von Bacteriorhodopsin und dem gemessenen Signal nachzuweisen, wurde an einem mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensor der initiale lichtinduzierte Stromfluss bei Lichtintensitäten zwischen 0 und 4,5 mW/cm² gemessen. Die absolute Lichtintensität am Sensor wurde bei einem Diodenstrom von 320 mA gemessen und für alle anderen Messpunkte aus der Stromstärke berechnet.

Bei der zur Belichtung der Sensoroberfläche eingesetzten Hochleistungsleuchtdiode besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Strom und Lichtintensität. Dadurch wird über die gemessene Stromstärke ein Rückschluss auf die relative Lichtintensität auf der Sensoroberfläche möglich.

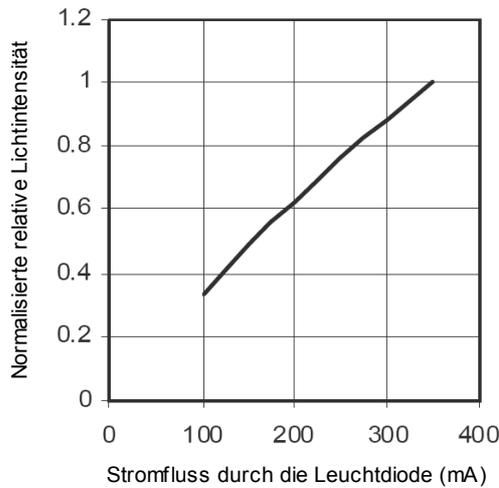


Abbildung 20: Strom-/ Lichtintensität-Kennlinie der im SURFE²R One-Detektionssystem eingesetzten Leuchtdiode Luxeon Star R2HG. Quelle: Datenblatt des Herstellers [58].

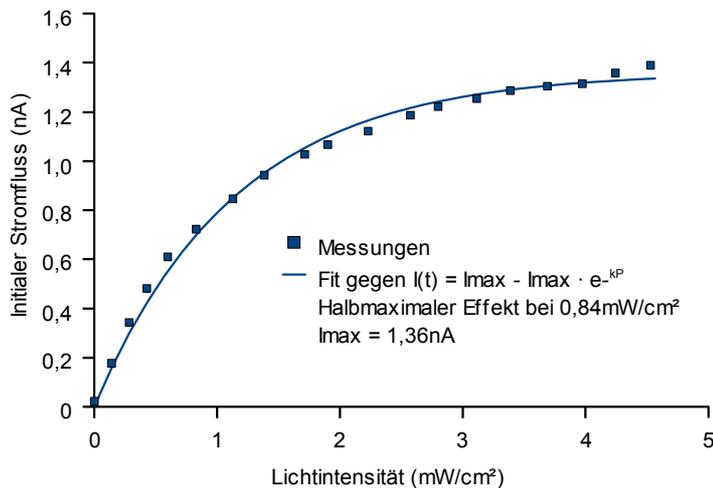


Abbildung 21: Die Abhängigkeit des initialen lichtinduzierten Stromflusses von der Lichtintensität. Ein Sensor des Detektionssystems SURFE²R One wurden mit BR-Halolipid-Proteoliposomen beschichtet. Die Oberfläche wurde für zwei Sekunden mit unterschiedlichen Intensitäten belichtet und der induzierte Stromfluss aufgezeichnet. Die Lichtintensität, berechnet aus dem Strom durch die Leuchtdiode, betrug 0 – 4,5 mW/cm² bei einer Wellenlänge von 530 nm ±50 nm. Pufferzusammensetzung: 1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5. In dieser Abbildung ist der initiale lichtinduzierte Stromfluss gegen die Lichtintensität aufgetragen. Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen kann mit einer Kinetik erster Ordnung beschrieben werden.

Der Zusammenhang zwischen lichtinduziertem initialem Stromfluss und Lichtintensität lässt sich durch eine Kinetik erster Ordnung beschreiben. Messungen mit der maximalen Lichtintensität von $4,5 \text{ mW/cm}^2$ liegen knapp unter der Sättigung. Die Lichtintensität, bei der das halbmaximale Signal messbar ist, liegt bei $0,84 \text{ mW/cm}^2$. In der Literatur wird für Messungen an PM-Fragmenten die für den halbmaximalen Effekt nötige Lichtintensität mit 5 mW/cm^2 angegeben [65]. Der Unterschied zwischen dem bei dieser Messung bestimmten Wert und der Literaturangabe kann durch eine ungleichmäßige Belichtung der Sensoroberfläche erklärt werden. Außerdem wirkt die Goldoberfläche des Sensors als Spiegel, was zu einer Verdopplung der effektiven Lichtintensität führt.

Das Ergebnis dieses Experiments ist, dass vom gemessenen Signal auf die Transportaktivität eines Proteins geschlossen werden kann.

3.2.7 Einfluss von Azid auf die Transportaktivität von BR-D96N-Proteoliposomen

In der D96N-Mutante von Bacteriorhodopsin wurde die als cytosolischer Protonendonator wirkende Carboxylgruppe der Asparaginsäure D96 gegen die Amidgruppe des Asparagins ausgetauscht [57]. Diese Mutation bewirkt, dass sich die Reprotonierungszeit der Schiffsbasis auf 500 ms bei pH 7,0 [56] erhöht.

Von Tittor et al. wurde in [56] gezeigt, dass sich die Reprotonierungszeit durch Azid bis auf 1 ms reduzieren ließ und BR-D96N dadurch die dem BR-Wildtyp entsprechende Transportaktivität wiedererlangte.

Um die Theorie der Signalentstehung bei der indirekten Messung der Membranpotentialänderung von adsorbierten Proteoliposomen durch kapazitive Kopplung weiter abzusichern, wurden BR-D96N-Proteoliposomen bezüglich dieser gut dokumentierten Eigenschaft untersucht.

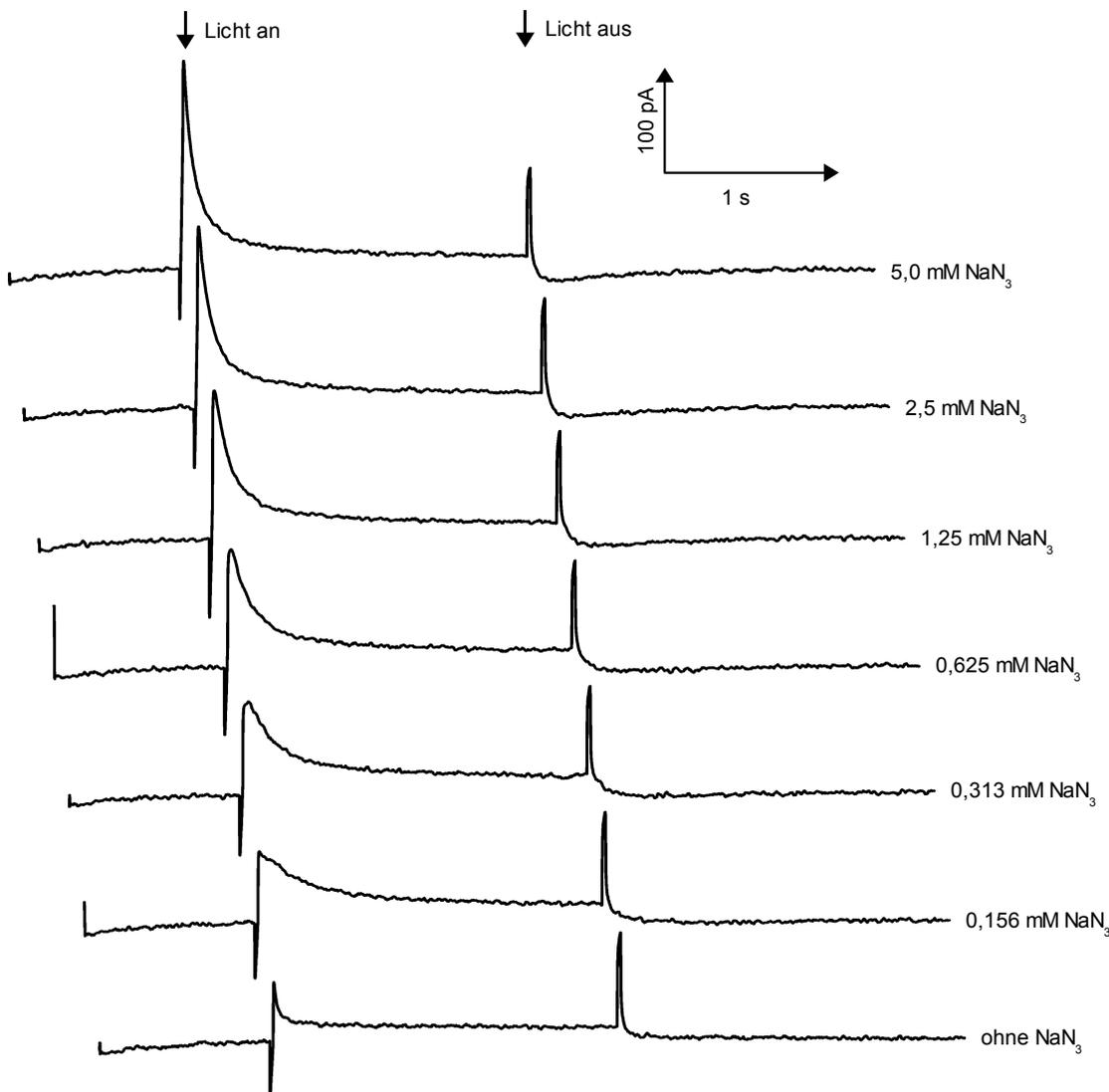


Abbildung 22: Die lichtinduzierten Ströme eines mit BR-D96N-Proteoliposomen beschichteten Sensor in Anwesenheit verschiedener Mengen Azid.

Ein Sensor des Detektionssystems SURFE²R One wurde mit BR-D96N-Halolipid-Proteoliposomen beschichtet. Die Oberfläche wurde für 2 Sekunden belichtet und der induzierte Stromfluss aufgezeichnet. Die Lichtintensität betrug 4,5 mW/cm² bei einer Wellenlänge von 530 nm ± 50 nm. Pufferzusammensetzung: 1 M NaCl, 50 mM MES, 0 - 5 mM NaN₃, pH 6,0.

In dieser Abbildung ist der gemessene Strom gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt wird das 20 ms-tiefpassgefilterte Mittel aus 20 Messungen.

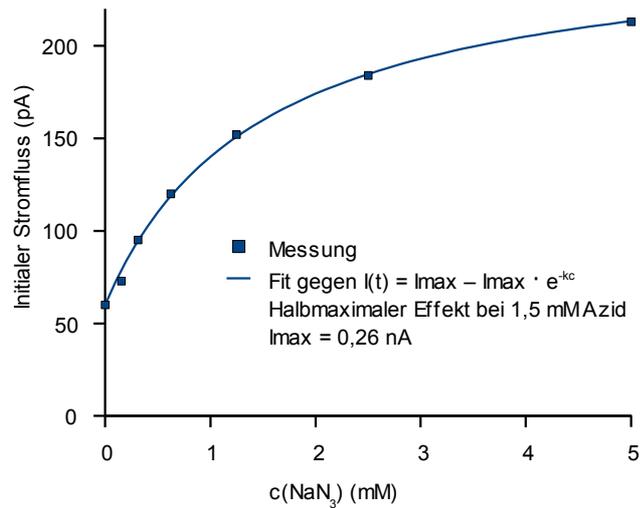


Abbildung 23: Der an einem mit BR-D96N-Proteoliposomen beschichteten Sensor gemessene lichtinduzierte Strom in Anwesenheit verschiedener Mengen Azid. In dieser Abbildung ist der initiale lichtinduzierte Strom der vorhergehenden Abbildung gegen die Azidkonzentration im Puffer aufgetragen. Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen kann mit einer Kinetik erster Ordnung beschrieben werden.

Die durch Azid bedingte Zunahme des initialen Stromflusses lässt sich durch eine Kinetik erster Ordnung darstellen. Die mit 1,5 mM bestimmte Konzentration, bei der Azid unter diesen Messbedingungen halbmaximal wirkt, ist mit dem in der Literatur beschriebenen Wert von 3 - 4 mM [56], gemessen in 100 mM NaCl, 10 mM MOPS, pH 6,4, vergleichbar.

Dieses Experiment bestätigt ebenfalls, dass vom gemessenen Stromfluss, auf die Transportaktivität eines Proteins geschlossen werden kann.

Das Kontrollexperiment an einem mit BR-Wildtyp-Proteoliposomen beschichteten Sensor zeigt keinen positiven Einfluss von Azid auf die Transportaktivität. Der geringfügig niedrigere initiale Stromfluss kann auf die durch Azid bedingte erhöhte Protonenpermeabilität der Proteoliposomenmembran zurückgeführt werden.

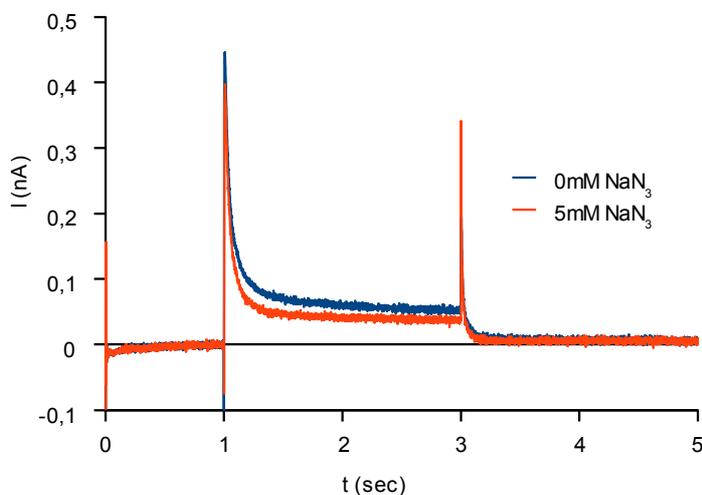


Abbildung 24: Einfluss von Azid auf das Signal eines mit BR-Halolipid-Proteoliposomen beschichteten Sensors.

Ein Sensor des Detektionssystems SURFE²R One wurden mit BR-Halolipid-Proteoliposomen beschichtet. Die Oberfläche wurde für zwei Sekunden belichtet und der induzierte Stromfluss mit 5 mM NaN_3 bzw. ohne NaN_3 im Puffer aufgezeichnet. Die Lichtintensität betrug $4,5 \text{ mW/cm}^2$ bei einer Wellenlänge von $530 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$. Pufferzusammensetzung: 1 M NaCl, 50 mM MES, pH 6,0.

In dieser Abbildung ist der gemessene Strom gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt wird das Mittel aus 10 Messungen.

3.2.8 Zusammenfassung

Die Validierung der Messung elektrogenen Transports über die Membran von Proteoliposomen mit dem Detektionssystem SURFE²R One führte zu folgenden Ergebnissen:

- Diese Messanordnung ist geeignet, um den elektrogenen Protonentransport durch Bacteriorhodopsin nachzuweisen.
- Durch Beschichtung eines Sensors mit Proteoliposomen, die durch die Rekonstitution von BR in Halolipid-Liposomen hergestellt wurden, wurde im Vergleich zur Rekonstitution in Asolektin-Liposomen ein um den Faktor 8 stärkeres Signal gemessen.
- Die Adsorption von Proteoliposomen an einen Sensor ist bei Raumtemperatur nach zwei Stunden abgeschlossen.
- Die optimale Menge Proteoliposomen mit einer Lipidkonzentration von 2 mg/ml und einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml zur Beschichtung eines Sensors mit 7 mm² Oberfläche beträgt 5 - 10 µl.
- Die Sensorbeschichtung ist für Pufferwechselfmessungen geeignet.
- Die bestimmte Lichtintensität, die bei Bacteriorhodopsin zur halbmaximalen Aktivität führt und die bestimmte Azidkonzentration, die bei BR-D96N zur halbmaximalen Aktivitätssteigerung führt, sind mit den Literaturwerten vergleichbar. Damit ist der Zusammenhang zwischen Transportaktivität und gemessenem Signal nachgewiesen.

3.3 Abschätzung der fehlenden Größen des physikalischen Modells

Da aus der angenommenen Geometrie der Oberflächenbeschichtung eines Sensors die Werte für den Widerstand der Membranen ($R_{PI/A}$ und $R_{PI/B}$) und die Kopplungskapazität ($C_{PI/B}$) nicht bzw. nur unzureichend hergeleitet werden können, werden im Folgenden diese Größen aus einer Referenzmessung an einem mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensor abgeleitet.

3.3.1 Die kapazitive Kopplung

Um die Kapazität, mit der die Proteoliposomen an die Sensoroberfläche gekoppelt sind ($C_{PI/B}$), näherungsweise zu bestimmen, ist der Wert der maximalen Membranpotentialänderung von BR-Proteoliposomen, die durch Belichtung des Sensors erzielbar ist, erforderlich. Da dieser Wert weder messtechnisch noch rechnerisch zugänglich ist, werden 250 mV angenommen [77].

Über die lichtinduzierte Ladungsverschiebung, die sich durch Integration des gemessenen Stroms über die Zeit berechnet, kann dann die Kapazität $C_{PI/B}$ bestimmt werden.

Die maximal verschiebbare Ladung wurde mit 150 pC bestimmt.

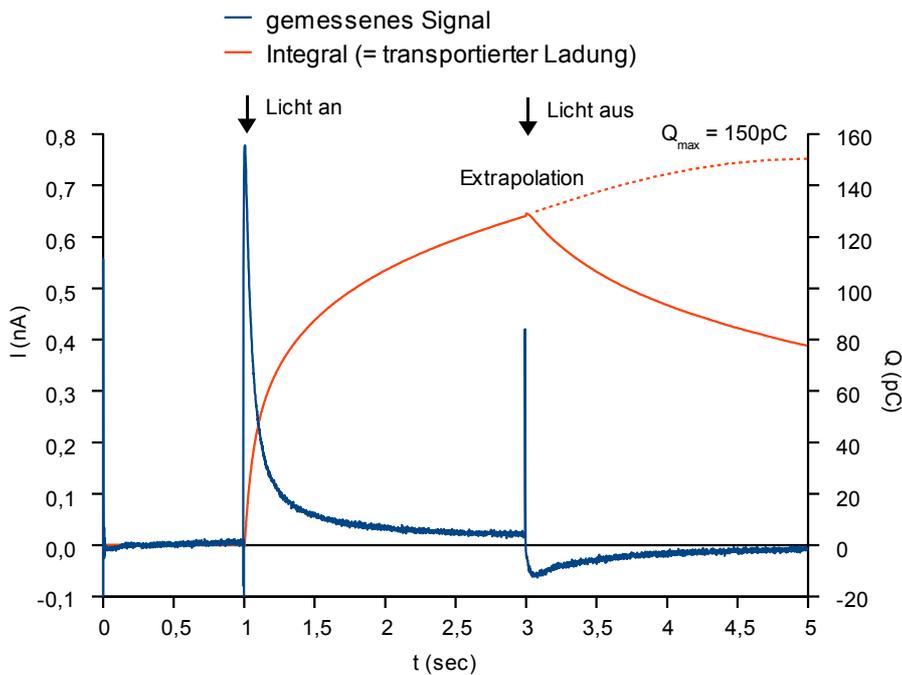


Abbildung 25: Bestimmung der maximal verschiebbaren Ladung durch Integration des gemessenen lichtinduzierten Signals eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors über die Zeit und Extrapolation ($t \rightarrow \infty$)

Die aus der Membranpotentialänderung von 250 mV und der maximal verschiebbaren Ladung von 150 pC berechnete Kapazität der Kopplung an die Oberfläche beträgt:

$$n_{PL} \cdot C_{PI/B} = Q / U = 6,0 \cdot 10^{-10} \text{ nF}$$

$$C_{PI/B} = 3,0 \cdot 10^{-18} \text{ F}$$

3.3.2 Der Widerstand zwischen Proteoliposomen und Sensoroberfläche

Unter der Annahme, dass bei $t = 3$ Sekunden keine Änderung des Potentials der Proteoliposomenmembran mehr stattfindet, ist der zu diesem Zeitpunkt gemessene Strom ($I_{\text{stationär}}$) von der Widerstandskomponente $R_{\text{PI/B}}$ und vom absoluten elektrischen Potential an der Proteoliposomenmembran abhängig, das entsprechend [77] mit 250 mV angenommen wird.

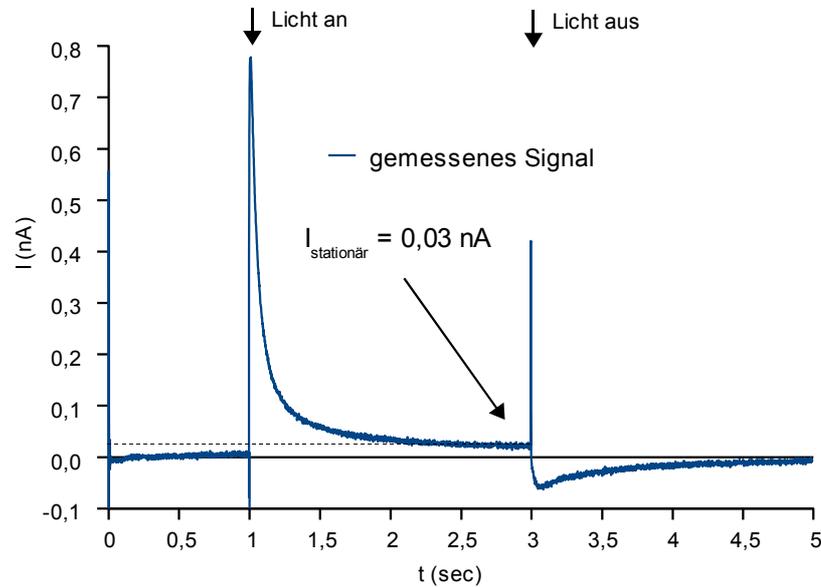


Abbildung 26: Bestimmung des stationären lichtinduzierten Stroms eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors.

Der Widerstand $R_{\text{PI/B}}$ beträgt:

$$n_{\text{PI}} \cdot R_{\text{PI/B}} = U_{\text{MP}} / I_{\text{stationär}} = 8,3 \cdot 10^9 \Omega$$

$$R_{\text{PI/B}} = 1,7 \cdot 10^{18} \Omega$$

3.3.3 Der Widerstand der Proteoliposomenmembran

Der Widerstand der Proteoliposomenmembran $R_{PI/A}$ ist bis jetzt noch unbekannt. Da alle anderen Größen, mit Ausnahme der von Bacteriorhodopsin transportierten Ladung, im vereinfachten Ersatzschaltbild bekannt sind, lässt sich $R_{PI/A}$ aus dem negativen induzierten Strom, der nach dem Ausschalten des Lichts gemessen wird, und einem angenommenen Membranpotential von 250 mV [77] abschätzen.

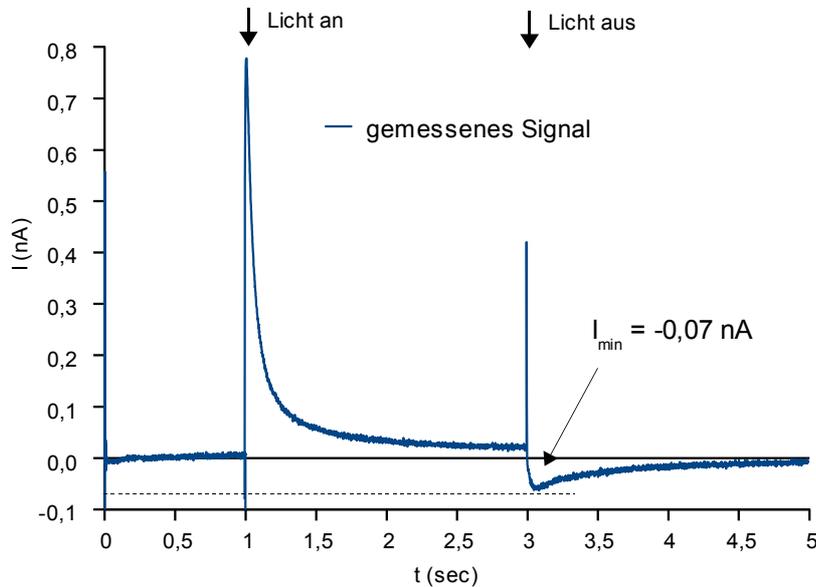


Abbildung 27: Bestimmung des nach der Belichtung induzierten negativen Stroms eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors.

Aus dem gemessenen initialen Strom nach dem Ausschalten des Lichts ($I_{\min} = -0,07 \text{ nA}$) und der Kapazität, mit der die Proteoliposomen an die Oberfläche gekoppelt sind ($n_{PL} \cdot C_{PI/B} = 0,60 \text{ nF}$), lässt sich die Potentialänderung pro Zeiteinheit an der Proteoliposomenmembran berechnen:

$$U = Q / C$$

$$U / t = Q / (n_{PL} \cdot C_{PI/B} \cdot t) = I_{\min} / (n_{PL} \cdot C_{PI/B}) = -0,12 \text{ V/s}$$

Über die Kapazität der Proteoliposomen (C_{PI}) kann dadurch der Strom durch die Proteoliposomenmembran berechnet werden:

$$I_{PI} = C_{PI} \cdot (U / t) = 6,2 \cdot 10^{-17} \text{ A}$$

Und daraus wiederum, unter der Annahme, dass zu diesem Zeitpunkt ein Membranpotential von 250 mV (U_{Mp}) anliegt, der Widerstand der Proteoliposomenmembran.

$$R_{PI/A} = U_{Mp} / I_{PI} = 4,0 \cdot 10^{15} \Omega$$

3.3.4 Die von Bacteriorhodopsin transportierte Ladung

Der für ein konstantes, maximal angenommenes, Membranpotential von 250 mV berechnete Strom durch die Membran eines Proteoliposoms ($I_{PI} = 6,2 \cdot 10^{-17}$ A) stellt den Ladungstransport dar, der nötig ist, um das Membranpotential konstant zu halten. Die Anzahl der Elementarladungen (n_{EI}), die pro Proteoliposom und pro Sekunde transportiert werden ist bei maximalem Membranpotential:

$$n_{EI} = I_{PI} / e = 386 /s$$

Umgerechnet auf die Anzahl von 560 BR-Molekülen pro Proteoliposom ergibt sich daraus ein Transport von 41 $H^+/BR/min$ bei maximalem Membranpotential.

Unter der Annahme, dass bei einem Membranpotential von 0 mV kein passiver Ladungstransport durch die Membran des Proteoliposoms stattfindet, lässt sich der Ladungstransport von Bacteriorhodopsin aus dem initialen lichtinduzierten Strom der Messung berechnen.

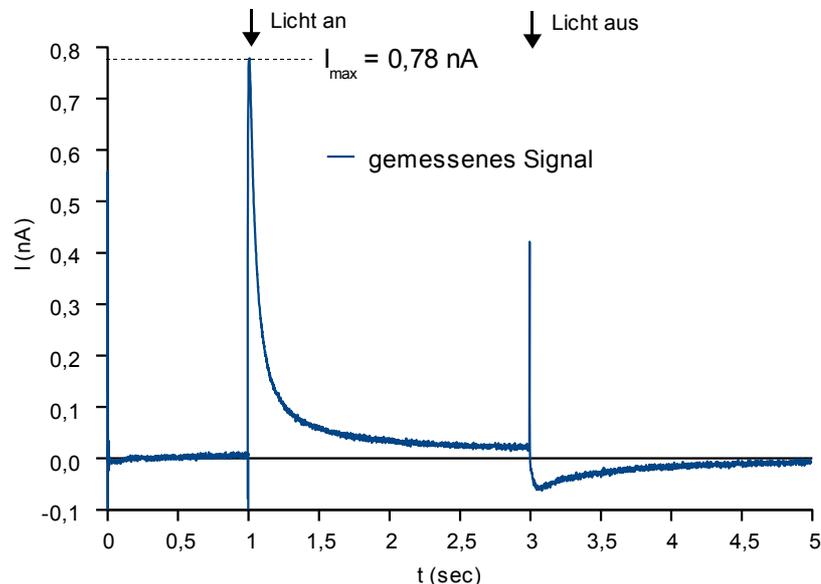


Abbildung 28: Bestimmung des initialen lichtinduzierten Stroms eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors.

Das Potential der Proteoliposomenmembran ändert sich in diesem Fall mit:

$$U / t = Q / (n_{PL} \cdot C_{PI/B} \cdot t) = I_{max} / (n_{PL} \cdot C_{PI/B}) = 1,3 \text{ V/s}$$

Der für diese Potentialänderung nötige Strom beträgt:

$$I_{PI} = C_{PI} \cdot (U / t) = 6,9 \cdot 10^{-16} \text{ A}$$

Die Anzahl der Elementarladungen (n_{EI}), die pro Proteoliposom und pro Sekunde transportiert werden ist bei minimalem Membranpotential:

$$n_{EI} = I_{PI} / e = 4300 /s$$

Umgerechnet auf die Anzahl von 560 BR-Molekülen pro Proteoliposom ergibt sich daraus ein Transport von 460 $H^+/BR/min$ bei einem Membranpotential von 0 mV.

3.4 Kontrolle und Optimierung des mathematischen Modells

3.4.1 Vergleich zwischen Modell und Messung

Um die Glaubwürdigkeit des aus der physikalischen Betrachtung abgeleiteten mathematischen Modells in Verbindung mit den abgeschätzten Werten darzustellen, wurde das Signal der mit Bacteriorhodopsin-Proteoliposomen durchgeführten Referenzmessung mit dem berechneten Signalverlauf verglichen.

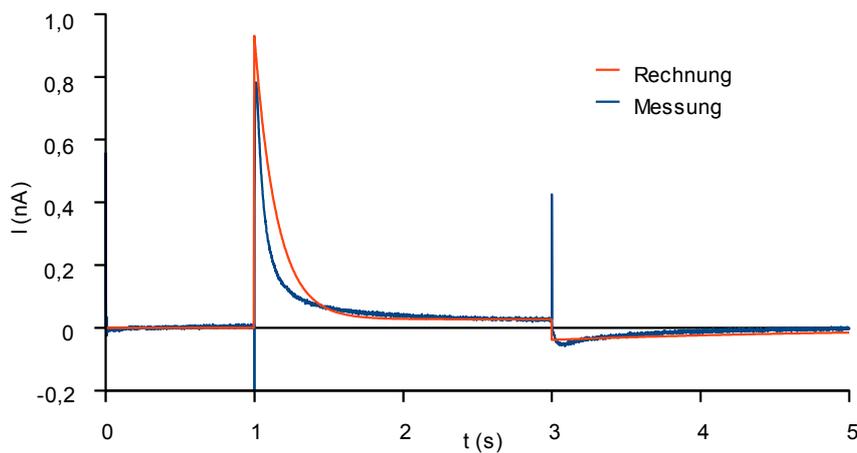


Abbildung 29: Vergleich zwischen der Messung an einem mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensor und dem mathematischen Modell. Zur Berechnung des Signalverlaufs wurden die aus der angenommenen Geometrie und dem Vergleich mit dieser Messung ermittelten Werte verwendet:

$C_{PI/A} = 5,3 \cdot 10^{-16} \text{ F}$, $C_{PI/B} = 3,0 \cdot 10^{-18} \text{ F}$, $R_{PI/A} = 4,0 \cdot 10^{15} \text{ } \Omega$, $R_{PI/B} = 1,7 \cdot 10^{18} \text{ } \Omega$, $n_{BR} = 560$, $n_{PI} = 2,0 \cdot 10^8$,
 $H^+/BR/\text{min} = 460$ bei $U_{MP} = 0 \text{ mV}$, $U_{\text{max}} = 250 \text{ mV}$, $\Delta t = 1 \text{ ms}$

Das mathematische Modell stellt das gemessene Signal weitgehend korrekt dar.

3.4.2 Optimierung der abgeschätzten Werte

Durch Bestimmung des Fehlers zwischen Messung und Rechnung und sukzessiver Approximation können jetzt die folgenden, durch Vergleich mit der Messung abgeschätzten Werte, weiter optimiert werden.

- $R_{PI/A}$, der Widerstand der Proteoliposomenmembran
- $C_{PI/B}$, die Kapazität der Kopplung an die Sensoroberfläche
- $R_{PI/B}$, der Widerstand zwischen Proteoliposom und Sensoroberfläche
- $H^+/BR/s$, die maximale Transportgeschwindigkeit eines BR-Moleküls

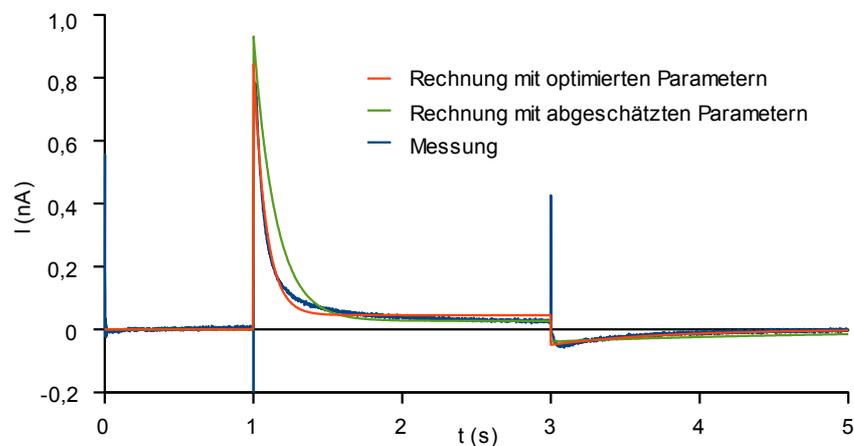


Abbildung 30: Vergleich zwischen der Messung an einem mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensor und dem mathematischen Modell mit abgeschätzten und optimierten Parametern:

$C_{PI/A} = 5,3 \cdot 10^{-16}$ F, $C_{PI/B} = 1,6 \cdot 10^{-18}$ F, $R_{PI/A} = 1,4 \cdot 10^{15}$ Ω , $R_{PI/B} = 0,98 \cdot 10^{18}$ Ω , $n_{BR} = 560$, $n_{PI} = 2,0 \cdot 10^8$, $H^+/BR/min = 780$ bei $U_{MP} = 0$ mV, $U_{max} = 250$ mV, $\Delta t = 1$ ms

	original	optimiert	Methode der Bestimmung
$C_{PI/A}$	$5,3 \cdot 10^{-16}$ F		berechnet aus der angenommenen Geometrie
$R_{PI/A}$	$4 \cdot 10^{15}$ Ω	$1,42 \cdot 10^{15}$ Ω	bestimmt durch Vergleich mit der Messung
$C_{PI/B}$	$3,8 \cdot 10^{-18}$ F	$1,6 \cdot 10^{-18}$ F	bestimmt durch Vergleich mit der Messung
$R_{PI/B}$	$1,3 \cdot 10^{18}$ Ω	$0,98 \cdot 10^{18}$ Ω	bestimmt durch Vergleich mit der Messung
n_{BR}	560		berechnet aus der angenommenen Geometrie
n_{PI}	$2 \cdot 10^8$		berechnet aus der angenommenen Geometrie
$H^+/BR/min$ (bei $U_{MP} = 0$ mV)	480	780	bestimmt durch Vergleich mit der Messung
U_{max}	250 mV		membranpotentialabhängiger H^+ -Transport durch BR über Oocytenmembran, Geibel et al. [77]
Δt	1 ms		

Tabelle 1: Die Werte der Größen, die der Berechnung des zeitabhängigen lichtinduzierten Stromflusses zugrunde liegen, vor und nach der Optimierung

Durch sukzessive Approximation der Größen $R_{PI/A}$, $C_{PI/B}$, $R_{PI/B}$ und $H^+/BR/s$ konnte die Wiedergabe der Referenzmessung weiter verbessert werden.

3.4.3 Test des Modells

Zum Test dieses Modells wurden die azidabhängigen Signale eines mit BR-D96N-Proteoliposomen beschichteten Sensors dargestellt. Es sollte mit dem mathematischen Modell möglich sein, alle Signale mit einer Variablen ($H^+/BR/min$) zu beschreiben.

Im ersten Schritt wurden die Parameter $R_{PI/A}$, $C_{PI/B}$, $R_{PI/B}$ und $H^+/BR/min$ für die Messung mit 5 mM Azid ermittelt. In den folgenden Schritten wurden $R_{PI/A}$, $C_{PI/B}$ und $R_{PI/B}$ als konstant angenommen und die Funktion nur durch Änderung des Parameters $H^+/BR/min$ an die Messungen bei 0 - 2,5 mM Azid angepasst.

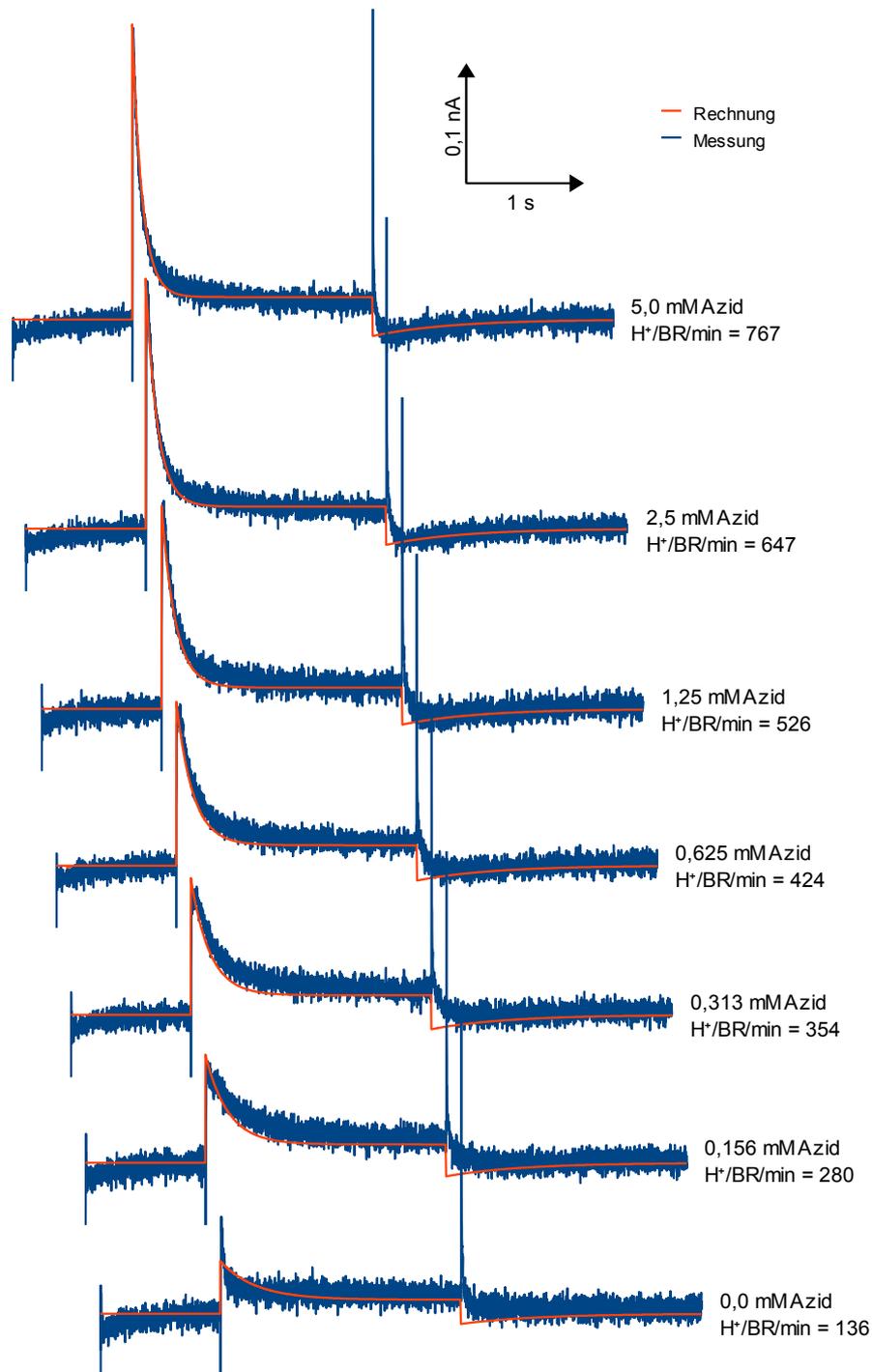


Abbildung 31: Signale eines mir BR-D96N-Proteoliposomen beschichteten Sensors. Vergleich zwischen Messung und mathematischem Modell. Die Berechnung wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: $C_{PI/A} = 5,3 \cdot 10^{-16}$ F, $C_{PI/B} = 0,49 \cdot 10^{-18}$ F, $R_{PI/A} = 1,2 \cdot 10^{15}$ Ω , $R_{PI/B} = 2,4 \cdot 10^{18}$ Ω , $n_{BR} = 560$, $n_{PI} = 2,0 \cdot 10^8$, $H^+/BR/min = 136-767$ bei $U_{MP} = 0$ mV, $U_{max} = 250$ mV, $\Delta t = 1$ ms

Das Ergebnis dieses Tests ist, dass sich alle bei verschiedenen Azidkonzentrationen an einem mit BR-D96N-Proteoliposomen beschichteten Sensor durchgeführten Messungen durch das mathematische Modell mit $H^+/BR/min$ als einziger Variablen brauchbar darstellen lassen.

Daraus lässt sich ableiten, dass das physikalische Modell einen mit Proteoliposomen beschichteten Sensor unter den gegebenen Bedingungen weitgehend korrekt beschreibt.

3.4.4 Zusammenfassung

Aus der Geometrie der Proteoliposomen und des Sensors lässt sich folgendes vereinfachte Ersatzschaltbild ableiten:

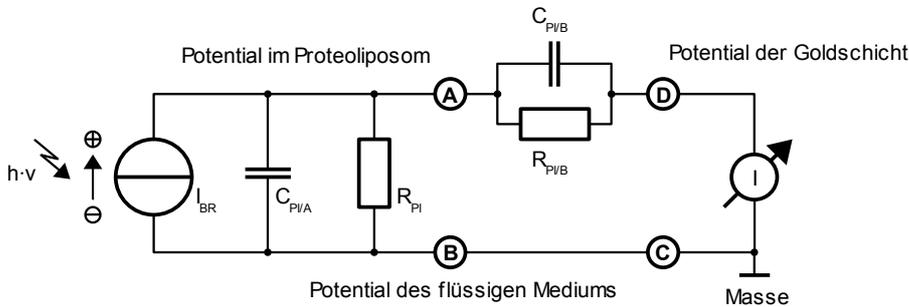


Abbildung 32: Vereinfachtes Ersatzschaltbild eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors.

Aus der angenommenen Sensorgeometrie wurden folgende Größen abgeleitet:

- Die Anzahl der BR-Moleküle in einem Proteoliposom $n_{BR} = 560$
- Die Kapazität eines Proteoliposoms $C_{Pi/A} = 5,3 \cdot 10^{-16} \text{ F}$
- Die Anzahl der Proteoliposomen auf dem Sensor $n_{pi} = 2 \cdot 10^8$

Wie in [77] gezeigt, wurde die Transportgeschwindigkeit von Bacteriorhodopsin als linear membranpotentialabhängig und das Membranpotential, bei dem der Transport zum erliegen kommt, mit $U_{max} = 250 \text{ mV}$ festgelegt.

Durch Fit des vom vereinfachten Ersatzschaltbild abgeleiteten mathematischen Modells gegen eine Messung, die an einem mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensor durchgeführt wurde, wurden folgende Größen bestimmt:

- Der Widerstand der Proteoliposomenmembran $R_{Pi/A} = 1,42 \cdot 10^{15} \Omega$ ($\cong 1,8 \text{ M}\Omega/\text{cm}^2$)
Für die planare Membran auf der Goldoberfläche wurde ein Widerstand von $6 \text{ M}\Omega/\text{cm}^2$ gemessen. Da man bei Proteoliposomen von einer Membran ohne Störstellen ausgehen kann, wäre im Vergleich zu einer Membran auf einer Oberfläche ein höherer Wert zu erwarten gewesen. Man muss jedoch beachten, dass dieser Wert für hohes Membranpotential bestimmt wurde. Unter diesen Bedingungen ist nach [71] mit einer Destabilisierung der Membran und dadurch mit einer Abnahme des Widerstands zu rechnen. In der Literatur werden für den Widerstand einer Membran $1 - 100 \text{ M}\Omega/\text{cm}^2$ angegeben [72].
- Die Kapazität der Kopplung an die Oberfläche $C_{Pi/B} = 0,49 \cdot 10^{-18} \text{ F}$
Das Verhältnis zwischen der kapazitiven Kopplung an das umgebende Medium und der kapazitiven Kopplung an die Oberfläche des Sensors beträgt demnach:

$$C_{Pi/A} / C_{Pi/B} = 5,3 \cdot 10^{-16} \text{ F} / 0,49 \cdot 10^{-18} \text{ F} = 1000 / 1$$

Es liegt damit deutlich über dem aus den geometrischen Bedingungen der Adsorption der Proteoliposomen an die Oberfläche abgeleiteten Verhältnis von 4 / 1. Unter der Annahme, dass die Oberfläche des Sensors vollständig mit einer Monoschicht Proteoliposomen abgedeckt ist, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die Oberfläche der Proteoliposomen im adsorbierten Zustand zum größten Teil von flüssigem Medium bedeckt ist, was mit der Beibehaltung der kugelförmigen Gestalt erklärt werden kann.

Das Verhältnis dieser beiden Kapazitäten zueinander entspricht dem Verhältnis der Ladungsverschiebung über die Proteoliposomenmembran zur Ladungsverschiebung an der Sensoroberfläche.

- Die Widerstandskomponente der Kopplung an die Oberfläche $R_{P/B} = 0,98 \cdot 10^{18} \Omega$
Ein Literaturwert wurde für diese Größe nicht gefunden.
Normiert auf die Kapazität der Kopplung an die Oberfläche $C_{P/B}$ beträgt der Widerstand $0,47 \Omega/F$. Der Wert der Proteoliposomenmembran liegt bei vergleichbaren $0,75 \Omega/F$.
- Die Transportgeschwindigkeit von Bacteriorhodopsin wurde für ein Membranpotential von 0 mV mit $780 H^+/BR/min$ bestimmt. Zum Vergleich: An Zellvesikeln von *H. salinarum* wurde die maximale Transportgeschwindigkeit von Bacteriorhodopsin mit $23 H^+/BR/min$ bestimmt. Der Literaturwert für Zellvesikel beträgt $70 H^+/BR/min$ [33], für ganze Zellen $270 H^+/BR/min$ [55]. Eine mögliche Erklärung für die hohe initiale Transportgeschwindigkeit ist, dass Proteoliposomen, die mit isoliertem Bacteriorhodopsin hergestellt wurden, im Gegensatz zu Zellvesikeln oder Zellen, keine weiteren Transportproteine beinhalten, die die Protonenleitfähigkeit der Membran erhöhen können. Eine andere mögliche Erklärung liegt in der unterschiedlichen Zeitauflösung der eingesetzten Detektionssysteme. Die initiale Transportgeschwindigkeit von Zellvesikeln wurde mit der pH-Elektrode bestimmt, deren maximale, durch den Messverstärker begrenzte, Zeitauflösung bei ca. 1 Hz lag. Das Detektionssystem SUFE²R One nimmt elektrische Signale mit einer Abtastrate von 1 kHz auf und ist dadurch in der Lage, die initiale Aktivität in einem kleineren Zeitfenster aufzulösen. Die Hemmung des Transports durch das sich aufbauende Membranpotential hat aus diesem Grund einen geringeren Einfluss.
- Die Halbwertszeit der passiven Diffusion der Protonen durch die Proteoliposomenmembran ($t_{1/2P}$) wird durch deren Kapazität ($C_{P/A}$) und deren Innenwiderstand ($R_{P/A}$) bestimmt:

$$t_{1/2P} = C_{P/A} \cdot R_{P/A} \cdot \ln(2) = 0,5 \text{ s}$$

Dieser Wert scheint im Vergleich mit publizierten Werten von ca. 30 Sekunden für Liposomen aus *E. coli*-Lipiden [75] sehr klein. Der Unterschied kann darauf zurückgeführt werden, dass die Protonendiffusion im Falle der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen durch das Membranpotential beschleunigt wurde. Im Fall der in der Literatur beschriebenen Messung entsteht durch die Protonendiffusion ein hemmendes Membranpotential, das in Anwesenheit von K^+ durch Valinomycin entkoppelt wurde.

Für eine weitgehende Korrektheit des physikalischen Modells sprechen:

- Ein Messsignal, das an einem mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensor gemessen wurde, kann mit dem mathematischen Modell dargestellt werden.
- Alle für das physikalische Modell bestimmten Kapazitäten und Widerstände sind, soweit möglich, mit Literaturwerten vergleichbar.

- Bei verschiedenen Azidkonzentrationen an einem BR-D96N-Sensor gemessene Signale können durch das mathematische Modell mit der maximalen Transportgeschwindigkeit von Bacteriorhodopsin ($H^+/BR/\text{min}$) als einziger Variablen brauchbar dargestellt werden.

3.5 Funktionsnachweis von Halorhodopsin und Acerhodopsin

Von Hohenfeld et al. wurde gezeigt [7], dass eine heterologe Expression des Halorhodopsins von *Natronomonas pharaonis* (pHR) in *E. coli* möglich ist. Der Funktionsnachweis wurde über spektroskopische Methoden erbracht.

Acerhodopsin wurde nach Expression in Oocyten durch Patch-Clamp-Technik charakterisiert [87]. Eine Expression und Isolierung im präparativen Maßstab war bis jetzt nicht möglich.

Das Ziel war die für pHR etablierte Expression auf Acerhodopsin zu übertragen und die Funktion beider Proteine durch die elektrische Detektion des elektrogenen Transports zu bestätigen.

3.5.1 In vivo Expression und Isolierung von Halorhodopsin (*N. pharaonis*)

Der offene Leserahmen von pHR wurde um einen C-terminalen HIS-Tag erweitert. Als Expressionsvektor wurde pET27bMod, als Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) eingesetzt. Die Expression erfolgte in 1l LB-Medium bei 37°C und 220UpM. Bei einer Zelldichte von $OD_{600nm} = 0,7$ wurde mit 0,5 mM IPTG induziert und gleichzeitig 10 μ M all-trans Retinal zugegeben.

Die Membranpräparation und -solubilisierung sowie die Metallaffinitätschromatographie wird in Material und Methoden beschrieben. Nach dem Auftragen des Solubilisats wurde die NiNTA-Säule (HiTrap Chelating, Amersham) mit einer Imidazolkonzentration von 80 mM gewaschen, die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten auf 250 mM Imidazol.

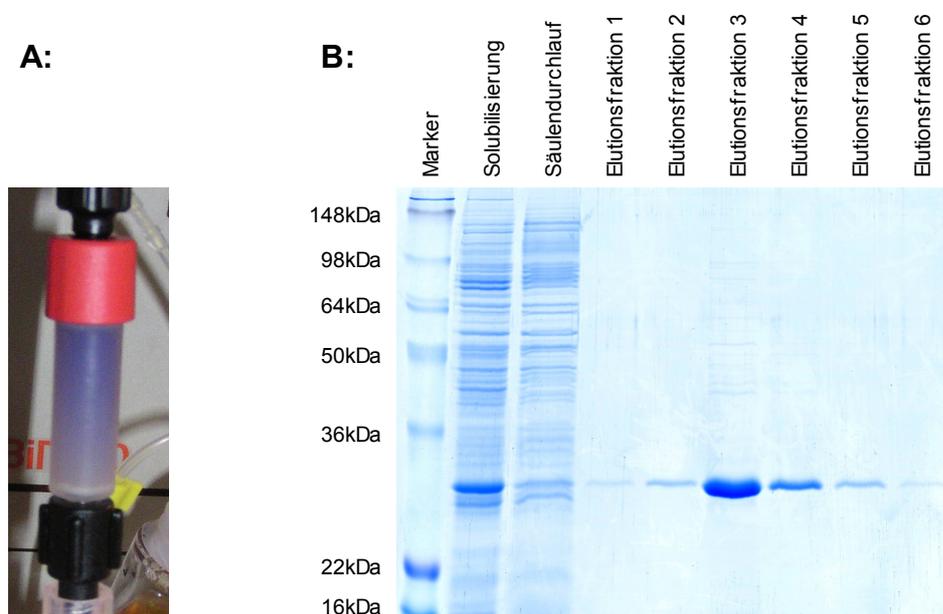


Abbildung 33: Das Ergebnis der Isolierung von pHR-HIS.

A: NiNTA-Säule mit gebundenem pHR-HIS

B: Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (Lämmli 10 %). Von der Solubilisierung und dem Säulendurchlauf wurden je 10 μ g Protein, von den Elutionsfraktionen ein Volumen, das bei Elutionsfraktion 3 5 μ g Protein entsprach, aufgetragen. Diese Abbildung zeigt die unspezifische Proteindetektion durch Coomassiefärbung im Gel.

Nach dem Auftragen des Solubilisats war das blau-violette Protein deutlich auf der Säule zu erkennen. pHR-HIS läuft entsprechend seinem berechneten Molekulargewicht in einem 10 % Lämmli Gel bei 32 kDa. In Elutionsfraktion 3 sind minimale Verunreinigungen zu erkennen. Das Protein konnte mit einer Reinheit von > 90 % bei einer Ausbeute von 1,2 mg pro Liter Kultur isoliert werden.

Im UV-VIS-Spektrum von Elutionsfraktion 3 beträgt das Verhältnis der unspezifischen Proteinabsorption bei 280 nm zur spezifischen Retinalabsorption bei 580 nm 1,64 : 1. Die Absorption im VIS-Bereich beweist die Bindung von Retinal und ist damit ein starkes Indiz für die richtige Faltung dieses Proteins.

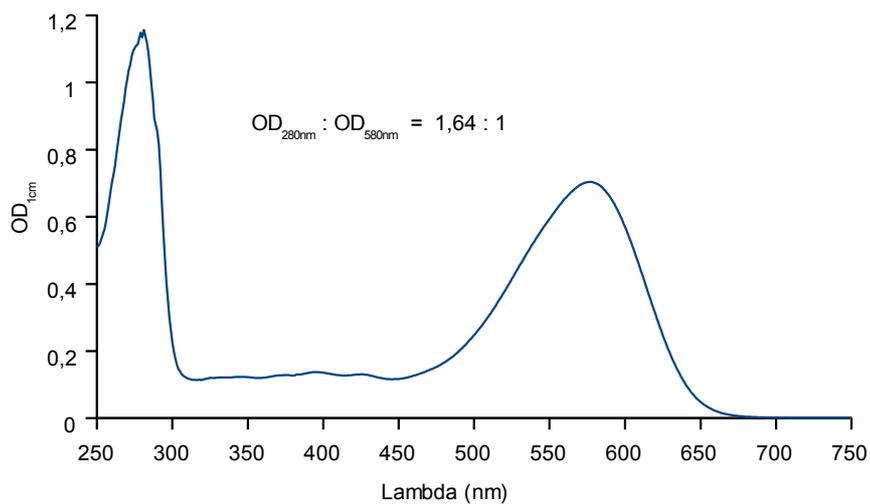


Abbildung 34: UV-VIS-Spektrum von Elutionsfraktion 3 der pHR-HIS-Isolierung.

3.5.2 Zellfreie Expression von Haloopsin (N. pharaonis)

Zellfreie Expression im analytischen Maßstab

Die zellfreie Expression erfolgte in einem Volumen von 50 μ l mit dem Rapid Translation System RTS 100, E. coli HY Kit (Roche) mit den vom Hersteller empfohlenen Standardbedingungen ohne Zusatz von Lipid oder Detergens. Als Vektor wurde das auch zur in vivo Expression verwendete pET27bMod-Plasmid eingesetzt.

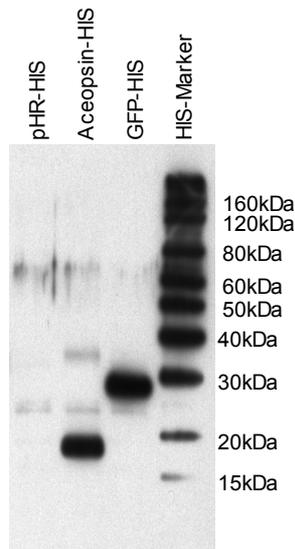


Abbildung 35: Expressionstest von Haloopsin und Aceopsin im zellfreien E. coli Expressionssystem. Je 1 μ g der Expressionsansätze wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPage-MES 4 - 12 % Gradientengel) und durch Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Als Positivkontrolle wurde GFP-HIS mit einem im Expressionskits enthaltenen Plasmid exprimiert. Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

Eine Detektion von zellfrei exprimiertem Halorhodopsin durch Westernblot war nicht möglich.

3.5.3 In vivo Expression und Isolierung von Acerhodopsin (*A. acetabulum*)

Der offene Leserahmen von Aceopsin wurde um einen C-terminalen HIS-Tag erweitert. Als Expressionsvektor wurde pET27bMod, als Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)Rosetta eingesetzt. Vorhergehende Versuche hatten ergeben, dass eine Expression mit BL21(DE3) zwar möglich ist, aber nur zu einer Proteinausbeute von 20 µg/l Kultur führt. Die Expression erfolgte in 1l LB-Medium bei 30°C und 220 UpM. Bei einer Zelldichte von $OD_{600nm} = 0,7$ wurde induziert und gleichzeitig 10 µM all-trans Retinal zugegeben.

Optimierung der Expression

Um für die Induktion der Expression die IPTG-Konzentration zu bestimmen, die zur maximalen Expression von Acerhodopsin-HIS führt, wurden fünf 1 l-Kulturen des Expressionsstamms bei $OD_{600nm} = 0,7$ mit IPTG-Konzentrationen von 0 - 1 mM induziert. Die isolierten Membranen wurden durch SDS-PAGE / Coomassiefärbung und SDS-PAGE / Westernblot analysiert, wie in Material und Methoden beschrieben.

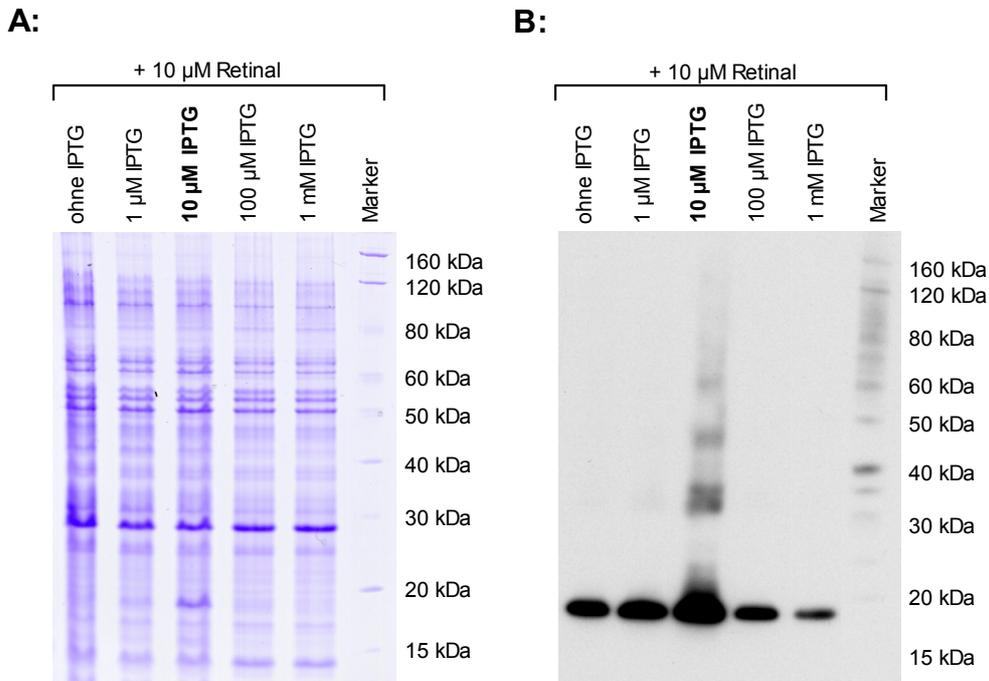


Abbildung 36: Vergleich des Gehalts von Acerhodopsin-HIS in den Membranfraktionen nach Induktion mit verschiedenen Konzentrationen IPTG.

A: Je 10 µg Membranprotein wurde durch SDS-PAGE (NuPage-MES 4 - 12 % Gradientengel) aufgetrennt. Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der unspezifischen Proteindetektion durch Coomassiefärbung.

B: Je 1 µg Membranprotein wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPage-MES 4 - 12 % Gradientengel) und durch Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

Acerhodopsin-HIS, berechnetes Molekulargewicht 27 kDa, läuft auf einem NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel bei 19 kDa. Die maximale Expression dieses Proteins wurde durch Induktion mit 10 µM IPTG bei gleichzeitiger Zugabe von 10 µM all-trans Retinal erreicht. Die Bande von Acerhodopsin-HIS ist auf dem durch Coomassie gefärbten Gel (Spur '10 µM IPTG' bei 19 kDa) identifizierbar.

Da das Expressionsmaximum sehr scharf ist und durch die gewählten IPTG-Konzentrationen nur unzureichend genau bestimmt werden konnte, wurde das Experiment mit zehn 1 l-Kulturen des Expressionsstamms und IPTG-Konzentrationen von 1 - 100 μM wiederholt.

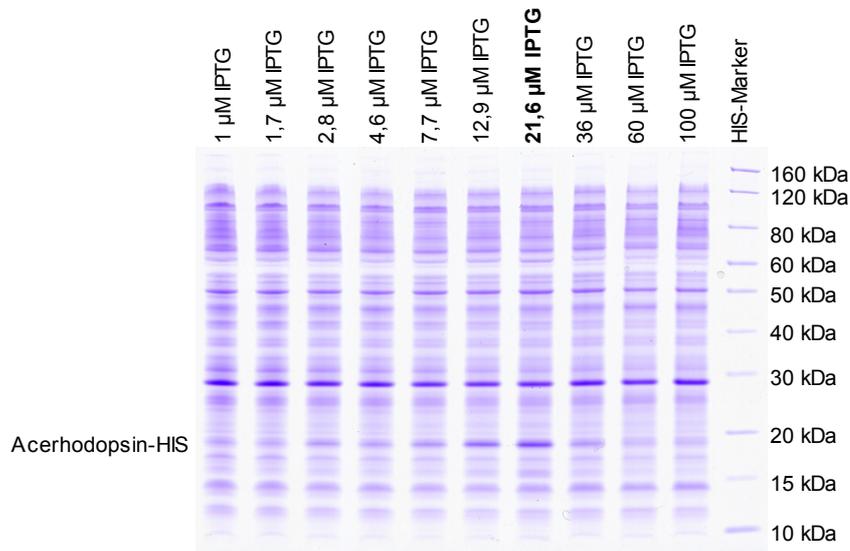


Abbildung 37: Vergleich des Gehalts von Acerhodopsin-HIS in den Membranfraktionen mit verschiedenen Konzentrationen IPTG induzierter Kulturen.

Je 10 μg Membranprotein wurde durch SDS-PAGE (NuPage-MES 4 - 12 % Gradientengel) aufgetrennt. Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der unspezifischen Proteindetektion durch Coomassiefärbung. Die Identifizierung der Banden erfolgte durch Vergleich der Höhe auf dem Gel mit der auf dem Westernblot des ersten Expressionstests.

Die maximale Expression von Acerhodopsin wurde durch Induktion mit 21,6 μM IPTG bei gleichzeitiger Zugabe von 10 μM all-trans Retinal erreicht.

Isolierung

Die Membranpräparation und -solubilisierung sowie die Metallaffinitätschromatographie wird in Material und Methoden beschrieben. Zur Isolierung wurde in diesem Fall eine CuNTA-Säule (HiTrap Chelating, Amersham) eingesetzt, die nach dem Auftragen des Solubilisats mit einer Imidazolkonzentration von 150 mM gewaschen wurde. Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten auf 250 mM Imidazol. In allen Chromatographiepuffern war 1 M Harnstoff enthalten, da dadurch eine deutlich verbesserte Bindung an die Säule erreicht werden konnte (Optimierung J. Tittor).

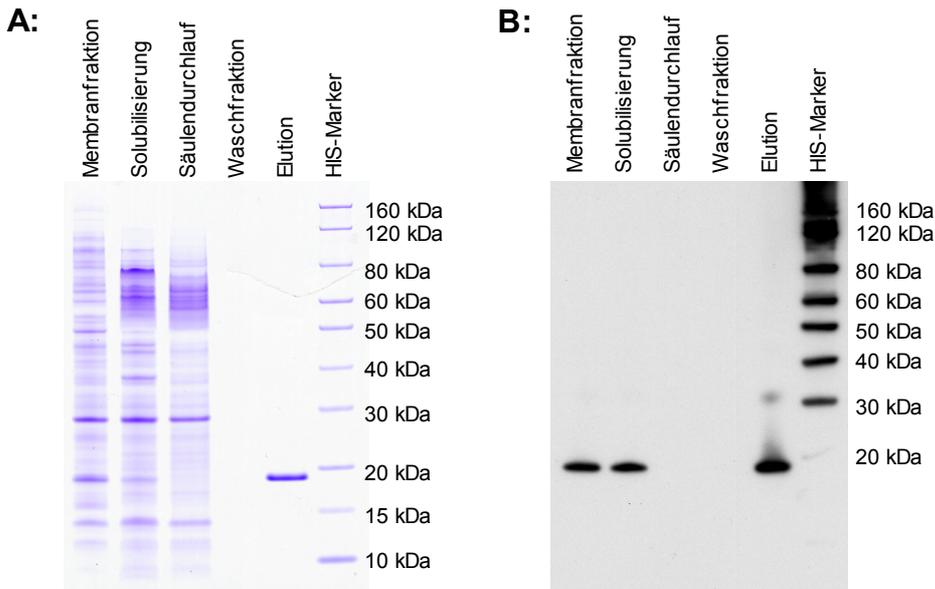


Abbildung 38: Das Ergebnis der Isolierung von Acerhodopsin-HIS.

A: Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel). Von der Membranfraktion, der Solubilisierung und dem Säulendurchlauf wurden je 10 µg Protein, von der Waschfraktion und der Elutionsfraktion ein Volumen, das bei der Elutionsfraktion 2 µg Protein entsprach, aufgetragen. Diese Abbildung zeigt die unspezifische Proteindetektion durch Coomassiefärbung im Gel.

B: Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel) und durch Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Von der Membranfraktion, der Solubilisierung und dem Säulendurchlauf wurden je 1 µg Protein, von der Waschfraktion und der Elutionsfraktion ein Volumen, das bei der Elutionsfraktion 0,02 µg Protein entsprach, aufgetragen. Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

In der Elutionsfraktion sind keine Verunreinigungen zu erkennen. Acerhodopsin-HIS konnte mit einer Reinheit von > 90 % bei einer Ausbeute von 500 µg pro Liter Kultur isoliert werden. Im UV-VIS-Spektrum der Elutionsfraktion beträgt das Verhältnis der unspezifischen Proteinabsorption bei 280 nm zur spezifischen Retinalabsorption bei 520 nm 1,43 : 1. Die Absorption im VIS-Bereich beweist die Bindung von Retinal und ist damit ein starkes Indiz für die richtige Faltung dieses Proteins.

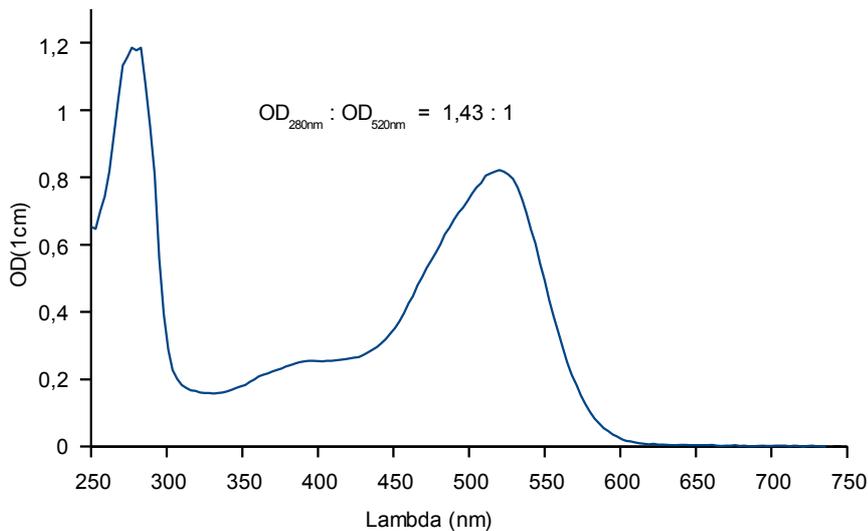


Abbildung 39: Das UV-VIS-Spektrum von isoliertem Acerhodopsin-HIS.

3.5.4 Zellfreie Expression und Isolierung von Aceopsin (*A. acetabulum*)

Zellfreie Expression im analytischen Maßstab

Die zellfreie Expression erfolgte in einem Volumen von 50 μ l mit dem Rapid Translation System RTS 100, *E. coli* HY Kit (Roche) mit den vom Hersteller empfohlenen Standardbedingungen ohne Zusatz von Lipid oder Detergens. Als Vektor wurde das auch zur *in vivo* Expression verwendete pET27bMod-Plasmid eingesetzt.

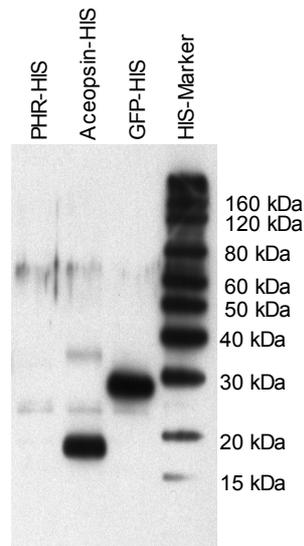


Abbildung 40: Expressionstest von Haloopsin und Aceopsin im zellfreien *E. coli* Expressionssystem. Je 1 μ g der Expressionsansätze wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPage-MES 4 - 12 % Gradientengel) und durch Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Als Positivkontrolle wurde GFP-HIS mit einem im Expressionskits enthaltenen Plasmid exprimiert. Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

Eine Detektion von zellfrei exprimiertem Acerhodopsin durch Westernblot ist möglich. Der Expressionslevel ist mit dem der Positivkontrolle GFP vergleichbar.

Zellfreie Expression im präparativen Maßstab

Aceopsin wurde in einem Volumen von 1 ml exprimiert. Die Solubilisierung erfolgte nach Beendigung der Expression durch Zugabe von 100 μ l 10 % DDM in H_2O . Zur Umwandlung des Opsins in das Rhodopsin wurden außerdem 0,5 μ l 10 mM all-trans-Retinal in Ethanol hinzugefügt. Zur Solubilisierung des Proteins wurde diese Mischung anschließend für vier Stunden bei Raumtemperatur kräftig geschüttelt und 16 Stunden bei 4°C geschwenkt.

Isolierung

Die Metallaffinitätschromatographie wird in Material und Methoden beschrieben. Die NiNTA-Säule (HiTrap Chelating, Amersham) wurde nach dem Auftragen des Solubilisats mit einer Imidazolkonzentration von 50 mM gewaschen, die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten auf 250 mM Imidazol. Die Chromatographiepuffer enthielten keinen Harnstoff.

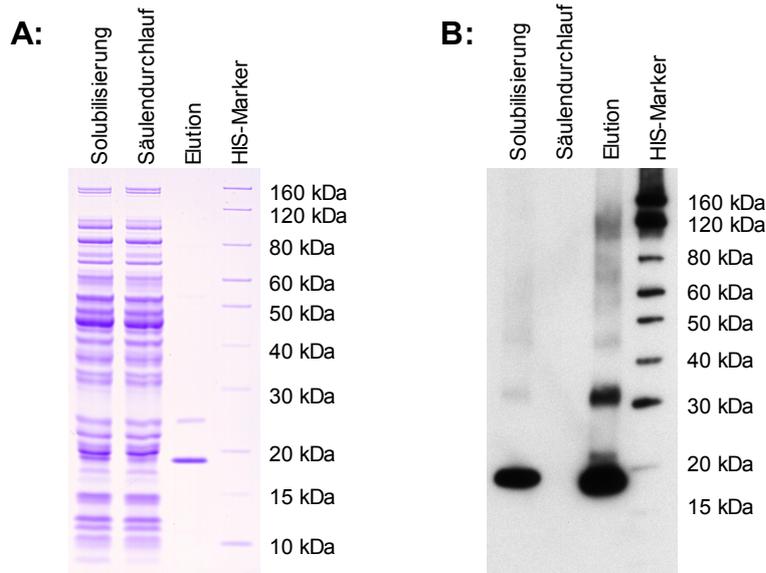


Abbildung 41: Das Ergebnis der Isolierung von Acerhodopsin-HIS aus 1ml zellfreiem Expressionsansatz. **A:** Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel). Von der Solubilisierung und dem Säulendurchlauf wurden je 10 µg Protein, von der Elutionsfraktion 2 µg Protein aufgetragen. Diese Abbildung zeigt die unspezifische Proteindetektion durch Coomassiefärbung im Gel. **B:** Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel) und durch Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Von der Solubilisierung und dem Säulendurchlauf wurden je 1 µg Protein, von der Elutionsfraktion 0,02 µg Protein aufgetragen. Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

Die Coomassiefärbung der Elutionsfraktion zeigt bei 25 kDa eine Verunreinigung. Acerhodopsin-HIS konnte mit einer Reinheit von ca. 70 % bei einer Ausbeute von 78 µg aus 1 ml zellfreiem Expressionsansatz isoliert werden.

Im UV-VIS-Spektrum der Elutionsfraktion beträgt das Verhältnis der unspezifischen Proteinabsorption bei 280 nm zur spezifischen Retinalabsorption bei 520 nm 2,68 : 1. Die Absorption im VIS-Bereich beweist die Bindung von Retinal und ist damit ein starkes Indiz für die richtige Faltung dieses Proteins. Bei der Isolierung von Acerhodopsin-HIS aus Zellmembranen lag das Verhältnis von $OD_{280nm} : OD_{520nm}$ bei 1,43 : 1. Die deutlich bessere Reinheit ist auf das optimierte Reinigungsverfahren mit 1 M Harnstoff in den Chromatographiepuffern und die Verwendung einer Cu-NTA-Säule anstatt einer Ni-NTA-Säule zurückzuführen.

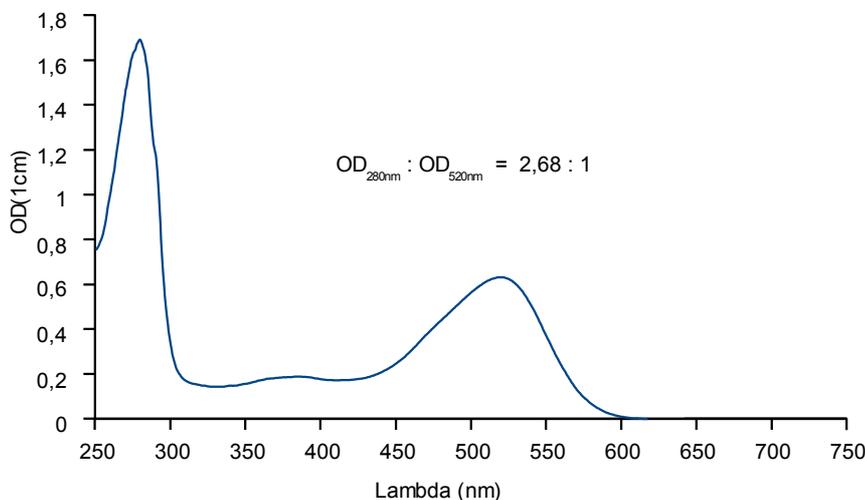


Abbildung 42: Acerhodopsin-HIS zellfrei, UV-VIS-Spektrum der Elutionsfraktion.

3.5.5 Aktivitätsnachweis von rekonstituiertem Halorhodopsin und Acerhodopsin

Um die Aktivität von heterolog exprimiertem Halorhodopsin und Acerhodopsin nachzuweisen, wurden diese Proteine in Liposomen aus Halolipid rekonstituiert und die durch den lichtgetriebenen elektrogenen Transport bedingte Änderung des Membranpotentials detektiert.

An die Oberfläche eines Sensors des Detektionssystems SURFE²R One wurden 10 µl Proteoliposomen bzw. Liposomen adsorbiert und das lichtinduzierte elektrische Signal gemessen.

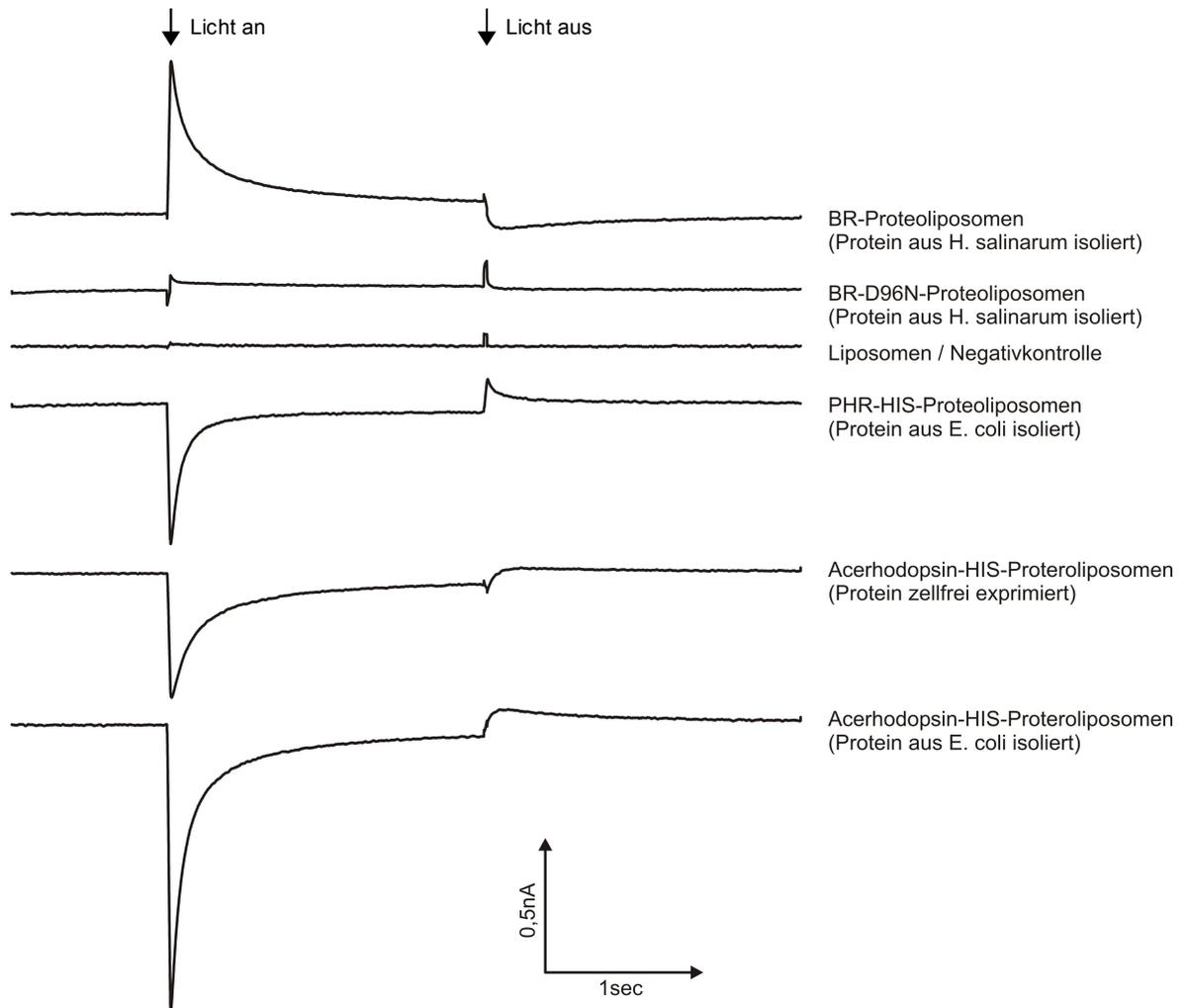


Abbildung 43: Aktivitätsnachweis von BR-, BR-D96N-, pHR-HIS- und Acerhodopsin-HIS-Proteoliposomen. Sensoren des Detektionssystems SURFE²R One wurden mit 10 µl Halolipid-Proteoliposomen mit dem angegebenen Retinalprotein beschichtet ($c_{\text{Lipid}} = 2 \text{ mg/ml}$, $c_{\text{Protein}} = 0,1 \text{ mg/ml}$). Die Oberfläche wurde für 2 Sekunden belichtet und der induzierte Stromfluss aufgezeichnet. Die Lichtintensität betrug $4,5 \text{ mW/cm}^2$ bei einer Wellenlänge von $530 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$.

Pufferzusammensetzung:

BR, Acerhodopsin-HIS, Liposomen: 300 mM NaCl, 25 mM MES, 25 mM BisTris, pH 6,0

BR-D96N: 1 M NaCl, 50 mM MES, pH 6,0

pHR: 300 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

In dieser Abbildung ist der gemessene Strom gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt wird das Mittel aus mindestens 30 Messungen.

Sowohl an Halorhodopsin- als auch an Acerhodopsin-Proteoliposomen konnte lichtinduzierte elektrogene Transportaktivität nachgewiesen werden.

Eine positive Ladung auf der Oberfläche eines Sensors führt zu einem positiven Stromfluss (Quelle

longate). Aus der Orientierung des initialen lichtinduzierten Stromflusses lässt sich damit die Transportrichtung ableiten.

BR und BR-D96N pumpen Protonen in das Liposom. Dies wurde auch von Happe et al. in [66] gezeigt und gilt für eine Rekonstitution in Liposomen aus sauren Lipiden bei einem pH von $> 2,75$. Halorhodopsin von *H. pharaonis* pumpt Chlorid in das Liposom. Das bedeutet, dass dieses Protein durch Rekonstitution bei neutralem pH wie BR entgegen seiner physiologischen Orientierung [67] in ein Liposom integriert wird.

Von Acerhodopsin werden Protonen aus dem Liposom gepumpt. Da über die Richtung des Transports in *Acetabularia* nichts bekannt ist, kann die Orientierung in der Membran nicht bestimmt werden.

3.5.6 Zusammenfassung

- Halorhodopsin und Acerhodopsin konnten in *E. coli* exprimiert und in präparativ verwertbaren Mengen mit hoher Reinheit isoliert werden.
- Acerhodopsin konnte auch zellfrei exprimiert und isoliert werden.
- Die UV-VIS-Spektren beweisen die Bindung von Retinal und sind damit ein starkes Indiz für die richtige Faltung dieser Proteine.
- Nach Rekonstitution in Liposomen und Adsorption an eine leitfähige Oberfläche konnten signifikante lichtinduzierte Ströme gemessen werden, die auf elektrogene Transportaktivität und damit auf die Funktion der Proteine schließen lassen.

3.6 Versuch der Identifikation eines Na⁺/H⁺-Austauschers halophiler Archaeen

3.6.1 Bioinformatische Analyse des Genoms von *H. salinarum* und *N. pharaonis*

Das Ziel der bioinformatischen Analyse war die Identifikation der offenen Leserahmen im Genom von *H. salinarum* und *N. pharaonis*, die nach dem aktuellen Wissenstand am wahrscheinlichsten für einen Na⁺/H⁺-Austauscher kodieren.

3.6.1.1 Auswahl und Beurteilung der Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen

Die Grundlage der Auswahl bildeten die im Genom von *Halobacterium salinarum* und *Natronomonas pharaonis* als Na⁺/H⁺-Austauscherhomologe annotierten offenen Leserahmen (www.halolex.mpg.de) [62]. Zusätzlich wurden oe3889R und np1576A als nächste Verwandte zum experimentell identifizierten Na⁺/H⁺-Austauscher von *Methanococcus jannaschii* [50] mit aufgenommen.

Als Maß der Wahrscheinlichkeit für Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität eines Kandidaten wurde die Homologie zu Motiven, die aus den Proteinsequenzen der bis jetzt experimentell bestätigten Na⁺/H⁺-Austauscher bestimmt wurden, mit der Datenbank Pfam [46] berechnet.

Na⁺/H⁺-Austauscherhomologie der Kandidaten von *H. salinarum*:

ORF	E-Wert	
OE3961R	4,20E-105	↑ Zunehmende Homologie zu bekannten Na ⁺ /H ⁺ -Austauschermotiven.
OE3782R	2,80E-101	
OE5204R	2,00E-87	
OE3960F	7,10E-86	
OE1653R	1,80E-59	
OE3889R	2,60E-31	

Na⁺/H⁺-Austauscherhomologie der Kandidaten von *N. pharaonis*:

ORF	E-Wert	
NP4702A	1,60E-72	↑ Zunehmende Homologie zu bekannten Na ⁺ /H ⁺ -Austauschermotiven.
NP1832A	5,20E-69	
NP1576A	6,80E-28	

Tabelle 2: Die berechnete Homologie der potentiellen Na⁺/H⁺-Austauscher zu bekannten Na⁺/H⁺-Austauschermotiven.

Die DNS-Sequenz der offenen Leserahmen wurde in die Proteinsequenz übersetzt und der E-Wert der Homologie zu bekannten Motiven identifizierter Na⁺/H⁺-Austauscher durch Abfrage der Datenbank Pfam [46] ermittelt.

Der E-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine zufällige Sequenz dieselbe Homologie zu den Vergleichsmotiven aufweist. Je niedriger dieser Wert ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich nicht um eine zufällige Ähnlichkeit handelt.

3.6.1.2 Die evolutionären Beziehungen zu experimentell bestätigten Na⁺/H⁺-Austauschern

Um eine mögliche Zugehörigkeit zu Na⁺/H⁺-Austauscherfamilien, die über die Grenze der halophilen Archaeen hinausgeht, aufzudecken, wurden aus den Proteinsequenzen der Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen von *H. salinarum* und *N. pharaonis* und folgender experimentell bestätigter Na⁺/H⁺-Austauscher aus allen drei Domänen des Lebens [48] mit ClustalW [47] die Verwandtschaftsverhältnisse berechnet.

Name	Accession number	Spezies	Referenz
Sod2	Q99173	Zygosaccharomyces rouxii	Watanabe et al. 1995
Nha1	NP_013239	Saccharomyces cerevisiae	Banuelos et al. 1998
Sod2	CAB69632	Schizosaccharomyces pombe	Hahnenberger et al. 1996
Nhe5	Q14940	Homo sapiens	Szabó et al. 2000
Nhe3	P26433	Rattus norvegicus	Orlowski 1993
Nhe	AAL95715	Rattus norvegicus	Sangan et al. 2002
Nhe1	P26431	Rattus norvegicus	Orlowski 1993
Nhe2	P48763	Rattus norvegicus	Yu et al. 1993
Nhx1	NP_010744	Saccharomyces cerevisiae	Nass et al. 1997
Nhe7	Q96T83	Homo sapiens	Numata, Orlowski 2001
Nhx1	AAD16946	Arabidopsis thaliana	Venema et al. 2002
NhaP	BAB69459	Aphanothecha halophytica	Waditee et al. 2001
NhaS1	BAA17925	Synechocystis sp.	Inaba et al. 2001
NhaP	NP_252576	Pseudomonas aeruginosa	Utsugi et al. 1998
YvgP	NP_391222	Bacillus subtilis	Fujisawa et al. 2005
NhaG	BAA89487	Bacillus subtilis	Gouda et al. 2001
NhaP1	Q60362	Methanococcus jannaschii	Hellmer et al. 2002
NhaA	P13738	Escherichia coli	Karpel et al. 1988
NhaB	POAFA7	Escherichia coli	Pinner et al. 1993

Tabelle 3: Experimentell bestätigte Na⁺/H⁺-Austauscher, deren Sequenz zur Analyse der Familienzugehörigkeit eingesetzt wurden.

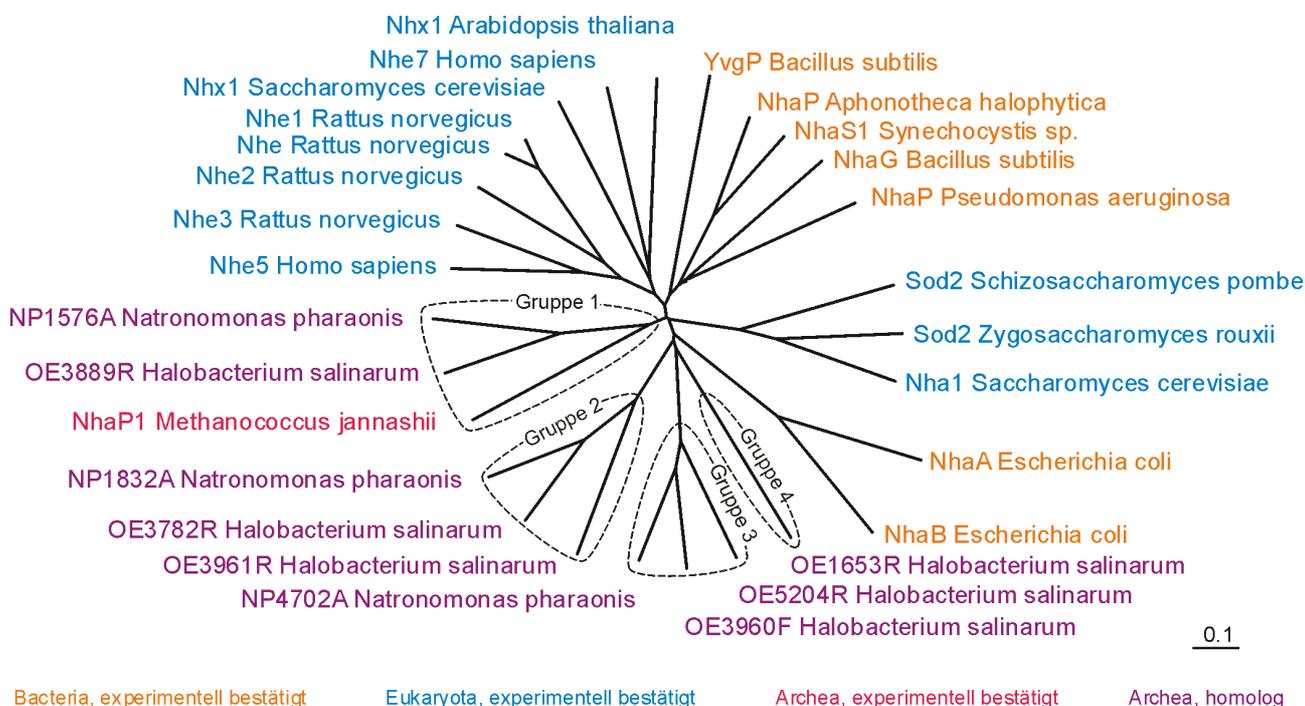


Abbildung 44: Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen experimentell bestätigten Na⁺/H⁺-Austauschern aus allen drei Domänen des Lebens und den potentiellen Na⁺/H⁺-Austauschern von *H. salinarum* und *N. pharaonis*. Der phylogenetische Baum wurde aus den Homologien der Proteinsequenzen mit ClustalW [47] berechnet.

Der phylogenetische Baum spiegelt die Einteilung in die drei Domänen des Lebens wieder. Eine darüber hinausgehende Einteilung in konservierte Sequenzfamilien ist nicht möglich. Hinweise auf horizontalen Gentransfer wurden nicht gefunden, der Stammbaum wird in diesem Fall als gültiges Modell angesehen.

Beim Vergleich zwischen *H. salinarum* und *N. pharaonis* sind folgende Verwandtschaftsverhältnisse erkennbar:

- Gruppe 1: OE3889R, NP1576A
- Gruppe 2: OE3782R, OE3961R, NP1832A
- Gruppe 3: OE3960F, OE5204R, NP4702A
- Gruppe 4: OE1653R

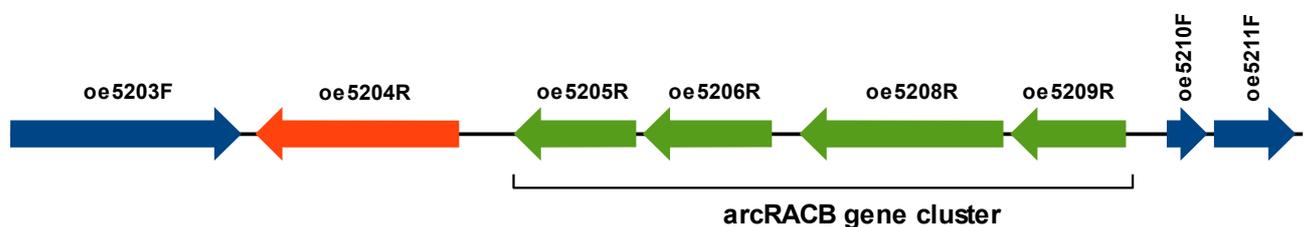
Die größte Homologie zum Na⁺/H⁺-Austauscher von *Methanococcus jannaschii* NhaP1, bis jetzt der einzige experimentell bestätigte archaeale Na⁺/H⁺-Austauscher [50], zeigt die Gruppe 1.

3.6.1.3 Die genetische Umgebung der identifizierten Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen

Mit einer Ausnahme (NhaP1, *Methanococcus jannaschii*) stammen alle bis jetzt experimentell bestätigten Na⁺/H⁺-Austauscher aus der Domäne der Bakterien und der Eukaryoten und weisen damit die größtmögliche evolutionäre Distanz zu Na⁺/H⁺-Austauschern der extrem halophilen Archaeen auf. Dadurch wird eine Abgrenzung gegenüber Transportern mit anderen Substraten erschwert.

Für das Flagellen-System [49] und den ADI-Pathway [52] wurde gezeigt, dass die offenen Leserahmen der zugehörigen Proteine im Genom von *H. salinarum* in Genclustern organisiert sind. Darauf stützte sich die Hoffnung, durch Analyse der genetischen Umgebung der Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen als zweite Analysemöglichkeit weitere Hinweise auf das Substrat der Transporter zu erhalten. Ein direkter Hinweis auf einen Na⁺/H⁺-Austauscher war durch dieses Vorgehen nicht zu erwarten, da dieser Stoffwechselweg keine weiteren Funktionen beinhaltet. Im Fall von Aminosäure- oder Zuckertransportern besteht jedoch die Möglichkeit Gencluster zu identifizieren, die einen Hinweis auf einen solchen Stoffwechselweg liefern.

Im Fall von oe5204R ist dies gelungen:



Code	Gen	Annotation
oe5203F	argS	arginine-tRNA ligase
oe5204R	arcD	antiporter (homolog to Na ⁺ /H ⁺ antiporter)
oe5205R	arcB	ornithine carbamoyltransferase
oe5206R	arcC	carbamate kinase
oe5208R	arcA	arginine deiminase
oe5209R	arcR	transcription regulator arcR
oe5210F	-	hypothetical protein
oe5211F	-	conserved hypothetical protein

Abbildung 45: Die genetische Umgebung von oe5204R. Quelle: www.halolex.mpg.de [62].

oe5204R liegt zwischen der Arginin-tRNS-Ligase und dem arcRACB gene cluster. Diese ORFs kodieren für Proteine des Arginin-Deaminase-Stoffwechselwegs (ADI-Pathway) [52], der durch Umsetzung von Arginin zu Ornithin zur Gewinnung von ATP dient. Daraus entstand die Annahme, dass es sich bei OE5204R nicht um einen Na⁺/H⁺-Austauscher sondern um den von Storch et al. in [33] charakterisierten Arginin/Ornithin-Austauscher handelt, was in dieser Arbeit bestätigt wurde (siehe Kapitel 3.7).

Für alle anderen Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen war es nicht möglich durch die Analyse der genetischen Umgebung einen Hinweis auf das Substrat des Transporters abzuleiten.

3.6.1.4 Zusammenfassung

- Für weitere Untersuchungen auf Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität wurden aus den Genomen von *H. salinarum* und *N. pharaonis* folgende offene Leserahmen ausgewählt:
 - *H. salinarum*: oe3961R, oe3782R, oe5204R, oe3960F, oe1653R, oe3889R
 - *N. pharaonis*: np4702A, np1832A, np1576A
- Die Homologie zu Motiven, die aus der Sequenz experimentell bestätigter Na⁺/H⁺-Austauscher abgeleitet wurden, nimmt in der angegebenen Reihenfolge ab.
- Über die Archaeen hinausgehende Sequenzfamilien mit experimentell bestätigten Na⁺/H⁺-Austauschern aus den Domänen der Bacteria oder Eukarya wurden nicht gefunden.
- Die genetische Umgebung von oe5204R gibt einen Hinweis auf die mögliche Funktion als Arginin/Ornithin-Austauscher.

3.6.2 Expression und Isolierung der identifizierten Homologen

Um Messungen am isolierten Protein zu ermöglichen wurde versucht die als Na⁺/H⁺-Austauscherhomologe identifizierten ORFs mit 6x Histidin-Tag zu exprimieren und durch Metallaffinitätschromatographie zu reinigen.

Die Angaben zur Position eines Proteins auf dem Gel beziehen sich auf den Vergleich mit dem BenchMark HIS-tagged Protein Marker von Invitrogen.

3.6.2.1 Homologe Expression in *H. salinarum*

Alle als Na⁺/H⁺-Austauscherhomologe identifizierten ORFs von *H. salinarum* wurden mit C-terminalem HIS-Tag in das Expressionsplasmid pBPH-M kloniert und in TOM transformiert. Die Expression erfolgte in 1l Komplexmedium, das mit 35 ml Vorkultur angeimpft und in einem 2 l-Erlenmeyerkolben bei 37°C und 110 UpM geschüttelt wurde. Die Zellen wurden in der stationären Phase nach ca. 5 Tagen geerntet.

ORF	Plasmid	Stamm	Expression nachweisbar	Ausbeute der Isolierung	Reinheit
oe1653R-HIS	pBPH-M	TOM	nein		
oe3782R-HIS	pBPH-M	TOM	nein		
oe3889R-HIS	pBPH-M	TOM	ja	250 µg/l Kultur	> 90%
oe3960F-HIS	pBPH-M	TOM	nein		
oe3961R-HIS	pBPH-M	TOM	nein		
oe5204R-HIS	pBPH-M	TOM	ja	200 µg/l Kultur	20%

Tabelle 4: Die Ergebnisse der Expression der Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen in *H. salinarum* und der Isolierung.

Proteinexpression konnte nur im Fall von OE3889R-HIS und OE5204R-HIS (siehe Kapitel 3.7.5) nachgewiesen werden.

OE3889R-HIS

Expression

Nach Transformation des Expressionsplasmids in *H. salinarum* standen mehrere positive Klone zur Verfügung. Um die Expression zu vergleichen wurden die Membranen aus je einem Liter Kultur isoliert, davon je 10 µg Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran durch Westernblot wurde der Histidin-Tag von OE3889R-HIS immunologisch detektiert, wie in Material und Methoden beschrieben.

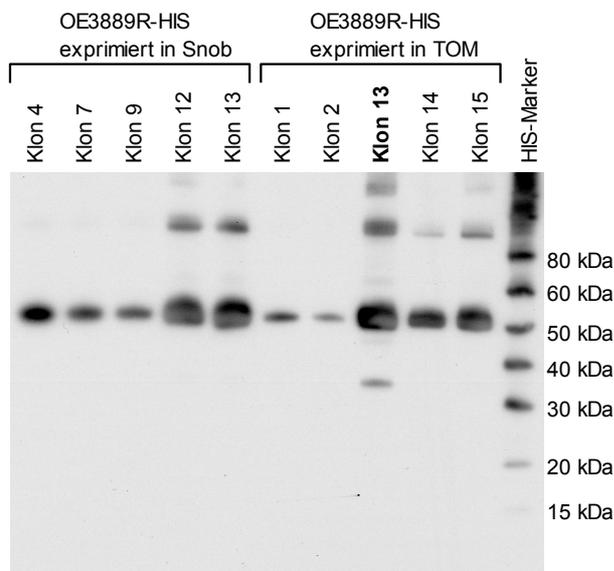


Abbildung 46: Vergleich des Gehalts von OE3889R-HIS in den Membranfraktionen der Kulturen verschiedener Klone.

Je 10 µg Membranprotein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPage-MES 4 - 12 % Gradientengel) und durch Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen.

Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

Der Vergleich der Signale des Westernblots zeigt erhebliche Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Klonen. Klon 13 weist den höchsten Expressionslevel auf und wurde deshalb zur präparativen Proteinexpression ausgewählt. Die unterschiedlich starke Expression des Proteins kann mit einer möglichen Integration von mehr als einem Plasmid in die genomische DNA und/oder der Integration an verschiedenen Positionen des Plasmids bzw. der genomischen DNA erklärt werden. OE3889R-HIS, berechnetes Molekulargewicht 66 kDa, läuft auf einem NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel bei 52 kDa. Auf den Spuren der stark exprimierenden Klone sind außerdem noch Banden bei ca. 100 kDa und 150 kDa vorhanden, die dem Dimer bzw. Trimer zugeordnet werden können. Die Bande bei 35 kDa in der Spur von Klon 13 ist vermutlich ein Degradationsprodukt.

Isolierung

Die Membranpräparation und -solubilisierung sowie die Metallaffinitätschromatographie wird in Material und Methoden beschrieben. Nach Auftragen des Solubilisats wurde die NiNTA-Säule (HiTrap Chelating, Amersham) mit einer Imidazolkonzentration von 80 mM gewaschen, die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten auf 250 mM Imidazol.

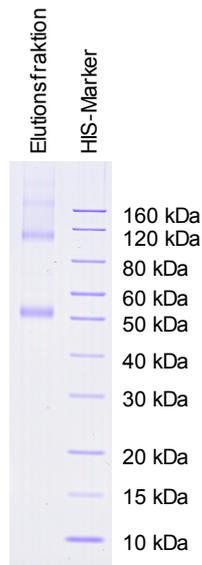


Abbildung 47: Das Ergebnis der Isolierung von OE3889R-HIS aus *H. salinarum*. 2 µg Protein der Elutionsfraktion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPage-MES 4 - 12 % Gradientengel). Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der unspezifischen Proteindetektion durch Coomassiefärbung.

Nach der Auftrennung der Elutionsfraktion sind drei Banden erkennbar, die in ihrer Höhe auf dem Gel mit den Signalen des Westernblots übereinstimmen und deshalb als Monomer, Dimer und Trimer interpretiert werden. OE3889R-HIS konnte mit einer Reinheit von > 90 % bei einer Ausbeute von 250 µg pro Liter Kultur isoliert werden.

3.6.2.2 Heterologe Expression in E. coli BL21(DE3) / BL21(DE3)Rosetta

Die homologe Expression der potentiellen Na⁺/H⁺-Austauscher von *H. salinarum* war in den meisten Fällen erfolglos. Eine funktionelle heterologe Expression vergleichbarer Membranproteine von *H. salinarum* in *E. coli* wurde bis jetzt in der Literatur nicht beschrieben, daher wurde dieser Weg als wenig erfolgversprechend eingestuft. Ein Grund dafür liegt im sauren pK des Proteoms von *H. salinarum*. In der Membranproteinfraktion beträgt das Verhältnis von sauren zu basischen Aminosäuren 4,3 : 1, in der löslichen Proteinfraktion 2,8 : 1. Bei *E. coli* als Beispiel für einen nicht halophilen Organismus liegt das Verhältnis in der löslichen Proteinfraktion bei 1 : 1 [63], für die Membranproteinfraktion ist dieses Verhältnis unbekannt. Baxter stellte in [64] einen Zusammenhang zwischen dem mit abnehmender Salzkonzentration einhergehenden Aktivitätsverlust von Enzymen halophiler Organismen und deren saurer Aminosäurezusammensetzung her. Er postulierte, dass eine native Faltung nur bei Abschirmung der negativ geladenen Gruppen durch die hohe Ionenstärke möglich ist. Bei sinkender Ionenstärke stört die steigende elektrostatische Abstoßung der sauren Gruppen die Faltung und damit die Aktivität der Enzyme.

Hohenfeld et al. zeigte in [7] durch die funktionelle heterologe Expression des Halorhodopsins von *N. pharaonis*, einem ebenfalls extrem halophilen Archaeon, dass diese Hypothese keine grundsätzliche Gültigkeit besitzt. Dem entsprechend wurde versucht, die Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen von *N. pharaonis* zu exprimieren.

Die Expression erfolgte in 1 l LB-Medium, das mit 50 ml Vorkultur angeimpft und in einem 2 l-Erlenmeyerkolben bei 23°C und 200 UpM geschüttelt wurde. Induziert wurde bei OD_{600nm} = 0,7 mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen. Die Zellen wurden 16 h nach der Induktion geerntet.

ORF	Plasmid	Stamm	Expression nachweisbar	Ausbeute der Isolierung	Reinheit
np1576A-HIS	pET27bMod	BL21(DE3)Rosetta	ja	0,8 mg/l Kultur	30%
np1832A-HIS	pET27bMod	BL21(DE3)	ja	0,12 mg/l Kultur	30%
np1832A-HIS	pET27bMod	BL21(DE3)Rosetta	ja		
np4702A-HIS	pET27bMod	BL21(DE3)	nein		
np4702A-HIS	pET27bMod	BL21(DE3)Rosetta	ja	0,5 mg/l Kultur	70%

Tabelle 5: Die Ergebnisse der heterologen Proteinexpression der Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen von *N. pharaonis* in *E. coli* und der Isolierung.

NP1576A-HIS

Optimierung der Expression

Um für die Induktion der Expression die IPTG-Konzentration zu bestimmen, die zur maximalen Expression von NP1576A-HIS führt, wurden fünf 1l-Kulturen bei $OD_{600nm} = 0,7$ mit IPTG-Konzentrationen von 0 - 1 mM induziert. Von den isolierten Membranen wurden je 1 μg Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran durch Westernblot wurde der Histidin-Tag von NP1576A-HIS immunologisch detektiert, wie in Material und Methoden beschrieben.

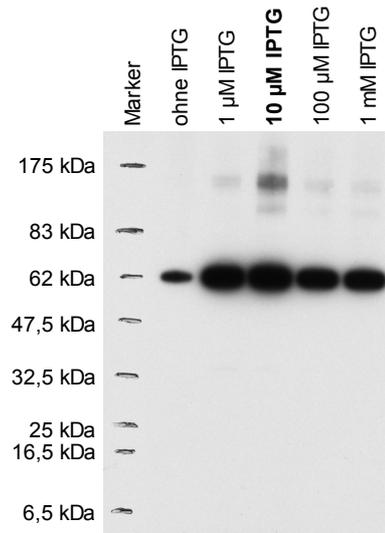


Abbildung 48: Vergleich des Gehalts von NP1576A-HIS in den Membranfraktionen mit verschiedenen Konzentrationen IPTG induzierter Kulturen. Je 1 μg Membranprotein wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPage-MES 4 - 12 % Gradientengel) und durch Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

NP1576A-HIS, berechnetes Molekulargewicht 65 kDa, läuft auf einem NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel bei 62 kDa. Die Bande bei ca. 150 kDa kann als Multimer interpretiert werden. Proteindegradation ist nicht zu erkennen. Die maximale Expression von NP1576A-HIS in BL21(DE3)Rosetta wurde durch Induktion mit 10 μM IPTG erreicht.

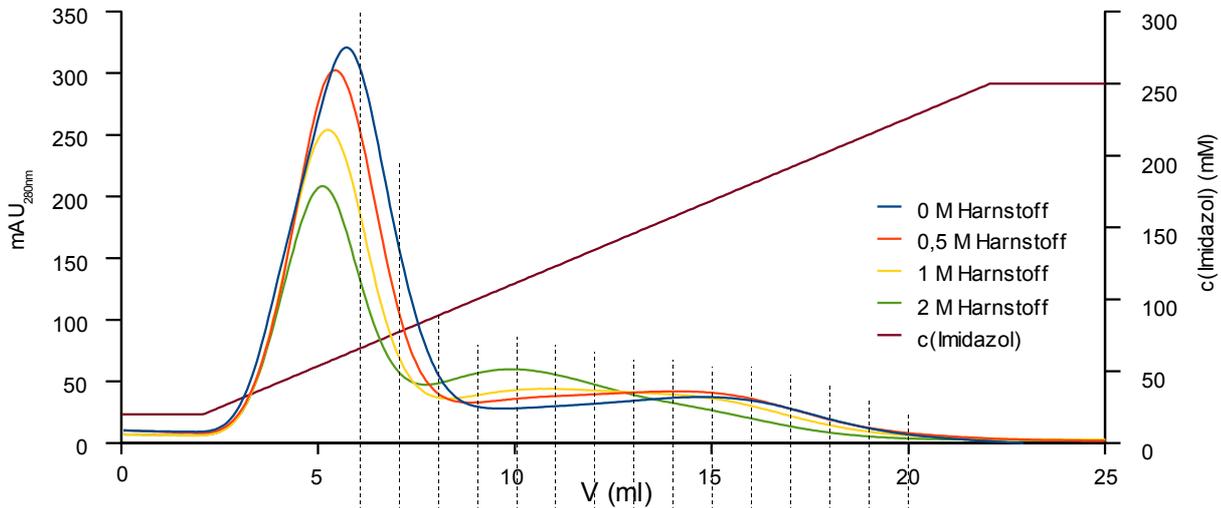
Optimierung der Isolierung

Von Acerhodopsin-HIS war bekannt, dass sich die Bindung dieses Proteins an eine NiNTA-Säule und damit die Reinheit des isolierten Proteins durch Zusatz von 1 M Harnstoff zu den Chromatographiepuffern deutlich verbessern lässt (Quelle J. Tittor). Erklärt werden kann dies durch eine teilweise Entfaltung des Proteins und einer dadurch bedingten besseren Zugänglichkeit des C-terminalen Histidin-Tags.

Um zu testen, ob der Zusatz von Harnstoff auch im Fall von NP1576A-HIS zu einer Verbesserung der Bindung des Proteins an die Säule führt, wurden vier NiNTA-Reinigungen mit gleicher Menge solubilisierter Membranfraktion mit Zusatz von 0 M, 0,5 M, 1 M und 2 M Harnstoff zu den Chromatographiepuffern durchgeführt und die Ergebnisse dieser Isolierungen verglichen.

Solubilisierte Membranen mit NP1576A-HIS wurden in vier Aliquots zu je 27 mg Protein geteilt und zwei Stunden gegen 500 ml Puffer A (500 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 20 mM Imidazol, 0,1 % DDM, 0 - 2 M Harnstoff, pH 7,9 / HCl) dialysiert. Vor dem Auftragen des Dialysats wurde die Säule mit 5 ml Puffer B (500 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 250 mM Imidazol, 0,1 % DDM, 0 - 2 M Harnstoff, pH 7,9 / HCl) und 10 ml Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftragen wurde die Säule mit 10ml Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen steigenden Imidazolgradienten ($\Delta c = 11,5\text{mM/ml}$).

Chromatogramme:



Ausschnitte aus den Gelen:

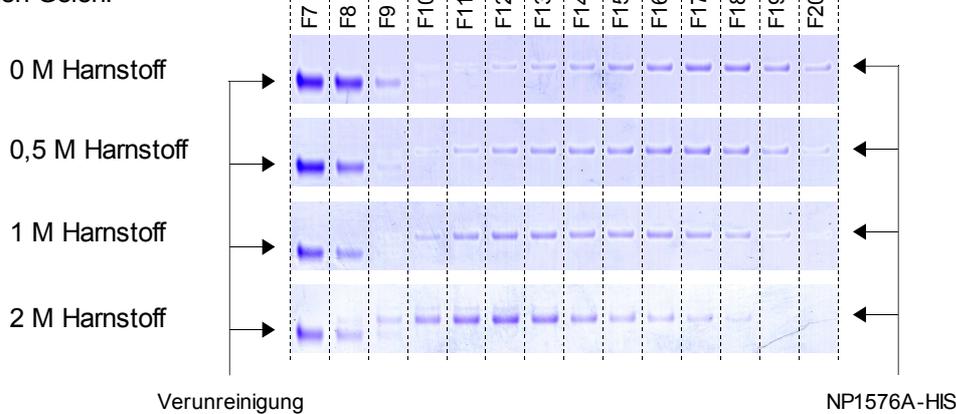


Abbildung 49: Der Vergleich der Elution von NP1576A-HIS mit 0 M, 0,5 M, 1 M und 2 M Harnstoff in den Chromatographiepuffern.

Die Chromatogramme zeigen die relative Absorption des Eluats bei 280 nm. Je 10 μl der Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE (NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel) aufgetrennt. Hier werden die relevanten Ausschnitte aus den mit Coomassie gefärbten Gelen gezeigt. Die Proteinbande wurde durch Westernblot identifiziert (siehe folgende Abbildung).

Der Vergleich dieser vier Gradientenelutionen von NP1576A-HIS mit 0 M, 0,5 M, 1 M und 2 M Harnstoff in den Chromatographiepuffern unter sonst gleichen Bedingungen zeigte, dass das Protein bei steigender Harnstoffkonzentration schlechter an die Säule (HiTrap Chelating, Amersham) bindet, da es bei niedrigerer Imidazolkonzentration eluiert wird.

Für weitere Reinigungen wurde kein Harnstoff zugesetzt.

Degradation

In der Membran ist NP1576A-HIS stabil. Nach der Reinigung im solubilisierten Zustand in 500 mM NaCl entsteht ein Abbauprodukt, das auf dem Gel bei 33 kDa läuft und durch den Westernblot als C-terminaler Teil dieses Proteins identifiziert wird. Weder EDTA noch PMSF oder kommerzielle Proteaseinhibitormischungen hatten einen Einfluss auf diese Degradation.

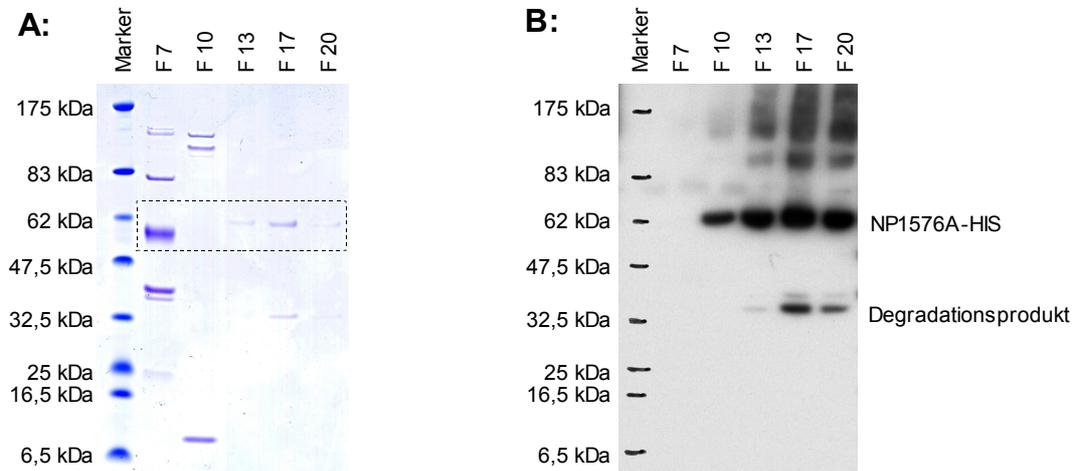


Abbildung 50: Elutionsfraktionen der vorhergehenden NP1576A-HIS-Isolierung ohne Harnstoff.

A: Je 10 µl der Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE (NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel) aufgetrennt. Diese Abbildung zeigt die unspezifische Proteindetektion durch Coomassiefärbung im Gel. Eingezeichnet ist der Ausschnitt, der in der vorhergehenden Abbildung verwendet wurde.

B: Je 1 µl der Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE (NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel) aufgetrennt. Das Protein wurde durch Westernblot vom Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

Isolierung

Die Membranpräparation und -solubilisierung sowie die Metallaffinitätschromatographie wird in Material und Methoden beschrieben. Zur präparativen Reinigung wurde die NiNTA-Säule (HiTrap Chelating, Amersham) nach dem Auftragen des Solubilisats mit einer Imidazolkonzentration von 80 mM gewaschen, die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten auf 250 mM Imidazol.

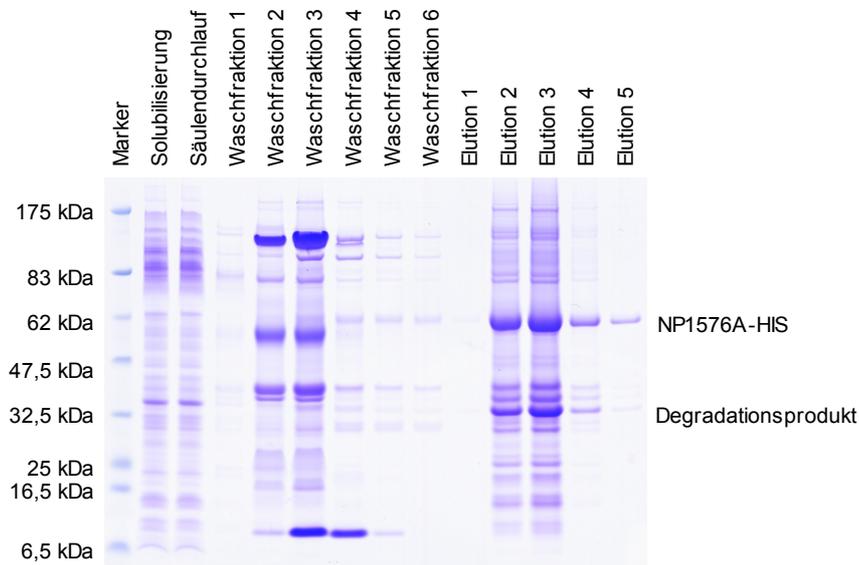


Abbildung 51: Das Ergebnis der Isolierung von NP1576A-HIS.

Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel). Von der Solubilisierung und dem Säulendurchlauf wurden je 10 µg Protein, von den Waschraktionen und den Elutionsfraktionen ein Volumen, das bei Elutionsfraktion 3 5 µg Protein entsprach, aufgetragen. Diese Abbildung zeigt die unspezifische Proteindetektion durch Coomassiefärbung im Gel. Die Identifizierung der Banden erfolgte durch Vergleich der Höhe auf dem Gel mit der auf dem Westernblot der vorhergehend beschriebenen Isolierung.

Die Elutionsfraktionen waren stark verunreinigt. NP1576A-HIS konnte mit einer Reinheit von ca. 30 % bei einer Ausbeute von 0,8 mg pro Liter Kultur isoliert werden.

Im Vergleich zur analytischen Isolierung, die durchgeführt wurde, um den Einfluss von Harnstoff zu untersuchen, sind die Elutionsfraktionen der präparativen Isolierung deutlich stärker verunreinigt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es durch die zum Waschen der Säule gewählte Imidazolkonzentration von 80 mM nicht möglich war, unspezifisch gebundene Proteine in ausreichendem Maß von der Säule zu eluieren. Außerdem ist auf dem Gel der präparativen Reinigung wesentlich mehr Protein aufgetragen, wodurch Verunreinigungen besser erkennbar sind.

NP1832A-HIS

Optimierung der Expression

Um für die Induktion der Expression die IPTG-Konzentration zu bestimmen, die zur maximalen Expression von NP1832A-HIS führt, wurden sechs 1l-Kulturen bei $OD_{600nm} = 0,7$ mit IPTG-Konzentrationen von 0 - 1 mM induziert. Von den isolierten Membranen wurden je 1 μ g Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran durch Westernblot wurde der Histidin-Tag von NP1832A-HIS immunologisch detektiert, wie in Material und Methoden beschrieben.

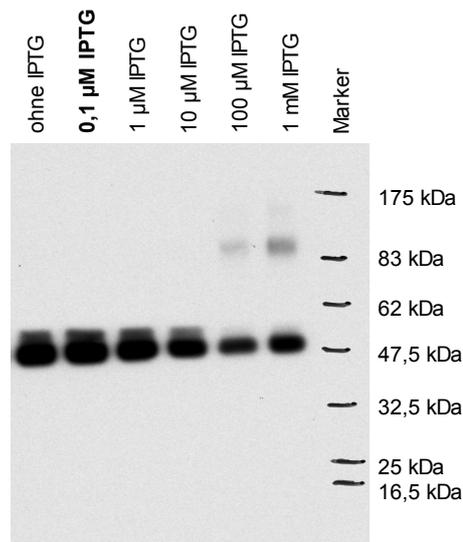


Abbildung 52: Vergleich des Gehalts von NP1832A-HIS in den Membranfraktionen mit verschiedenen Konzentrationen IPTG induzierter Kulturen.

Je 1 μ g Membranprotein wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPage-MES 4 - 12 % Gradientengel) und durch Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen.

Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

NP1832A-HIS, berechnetes Molekulargewicht 61 kDa, läuft auf einem NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel bei 49 kDa. Die Bande bei ca. 100 kDa kann als Dimer interpretiert werden. Proteindegradation ist nicht zu erkennen. Die maximale Expression von NP1832A-HIS in BL21(DE3) wurde durch Induktion mit 0,1 μ M IPTG erreicht.

Isolierung

Die Membranpräparation und -solubilisierung sowie die Metallaffinitätschromatographie wird in Material und Methoden beschrieben. Zur Isolierung dieses Proteins wurde das NiNTA-Material Superflow (Qiagen) in einer selbst gepackten Säule verwendet. Die NiNTA-Säule wurde nach dem Auftragen des Solubilisats mit einer Imidazolkonzentration von 30 mM gewaschen, die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten auf 250 mM Imidazol.

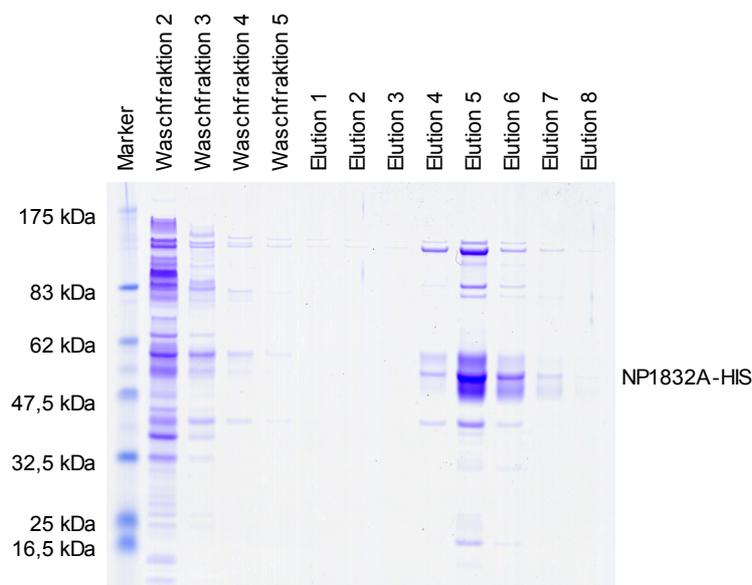


Abbildung 53: Das Ergebnis der Isolierung von NP1832A-HIS.

Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel). Von der Solubilisierung und dem Säulendurchlauf wurden je 10 µg Protein, von den Waschfraktionen und den Elutionsfraktionen ein Volumen, das bei Elutionsfraktion 5 5 µg Protein entsprach, aufgetragen. Diese Abbildung zeigt die unspezifische Proteindetektion durch Coomassiefärbung im Gel. Die Identifizierung der Banden erfolgte durch Vergleich der Höhe auf dem Gel mit der auf dem Westernblot des Expressionstests.

NP1832A-HIS, berechnetes Molekulargewicht 61 kDa, läuft auf einem NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel bei 49 kDa. Die Elutionsfraktionen sind stark verunreinigt. Dieses Protein konnte mit einer Reinheit von ca. 30 % bei einer Ausbeute von 120 µg pro Liter Kultur isoliert werden.

NP4702A-HIS

Optimierung der Expression

Um für die Induktion der Expression die IPTG-Konzentration zu bestimmen, die zur maximalen Expression von NP4702A-HIS führt, wurden fünf 1 l-Kulturen bei $OD_{600nm} = 0,7$ mit IPTG-Konzentrationen von 0 - 1 mM induziert. Von den isolierten Membranen wurden je 1 µg Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran durch Westernblot wurde der Histidin-Tag von NP4702A-HIS immunologisch detektiert, wie in Material und Methoden beschrieben.

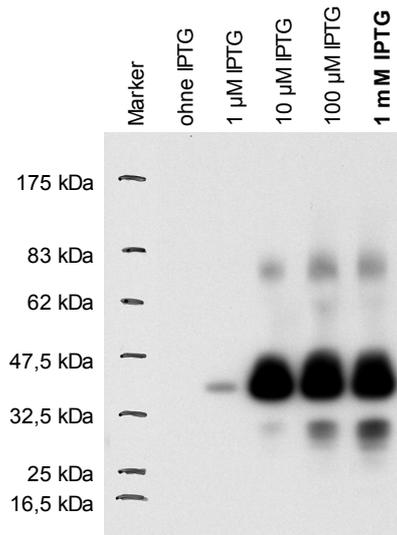


Abbildung 54: Vergleich des Gehalts von NP4702A-HIS in den Membranfraktionen mit verschiedenen Konzentrationen IPTG induzierter Kulturen. Je 1 µg Membranprotein wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPage-MES 4 - 12 % Gradientengel) und durch Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

NP4702A-HIS, berechnetes Molekulargewicht 50 kDa, läuft auf einem NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel bei 40 kDa. Die Banden bei 80 kDa können als Dimer interpretiert werden, die Banden bei 30 kDa deuten auf Degradation hin. Die maximale Expression dieses Proteins wurde durch Induktion mit 1 mM IPTG erreicht. Mit BL21(DE3) konnte unter dieser Bedingung keine Expression gezeigt werden.

Isolierung

Die Membranpräparation und -solubilisierung sowie die Metallaffinitätschromatographie wird in Material und Methoden beschrieben. Zur Isolierung dieses Proteins wurde das NiNTA-Material Superflow (Qiagen) in einer selbst gepackten Säule verwendet. Die NiNTA-Säule wurde nach dem Auftragen des Solubilisats mit einer Imidazolkonzentration von 70 mM gewaschen, die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten auf 250 mM Imidazol.

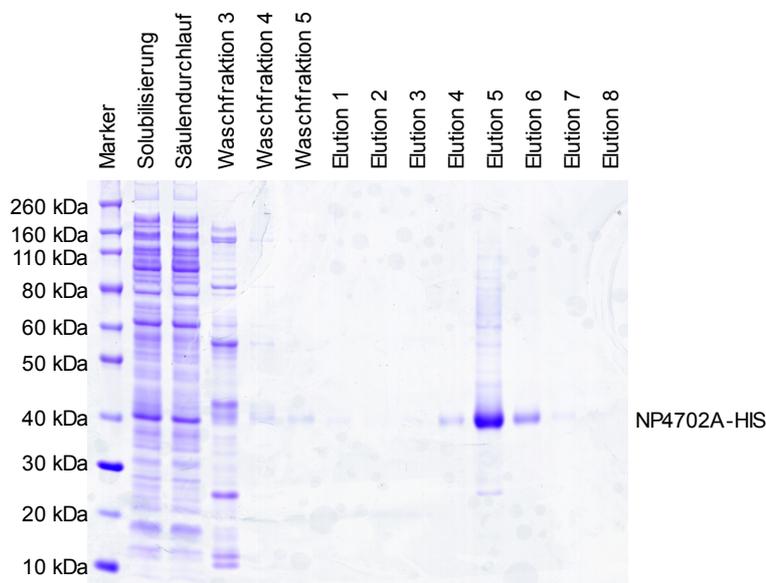


Abbildung 55: Das Ergebnis der Isolierung von NP4702A-HIS.

Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel). Von der Solubilisierung und dem Säulendurchlauf wurden je 10 µg Protein, von den Waschfraktionen und den Elutionsfraktionen ein Volumen, das bei Elutionsfraktion 5 5 µg Protein entsprach, aufgetragen. Diese Abbildung zeigt die unspezifische Proteindetektion durch Coomassiefärbung im Gel. Die Identifizierung der Banden erfolgte durch Vergleich der Höhe auf dem Gel mit der auf dem Westernblot des Expressionstests.

Die Hauptfraktion der Elution ist leicht verunreinigt. NP4702A-HIS konnte mit einer Reinheit von ca. 70 % bei einer Ausbeute von 500 µg pro Liter Kultur isoliert werden.

3.6.3 Nachweis von Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität der bioinformatisch identifizierten Homologen

Das Ziel der im Folgenden beschriebenen Experimente war, den experimentellen Nachweis der Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität für einen oder mehrere der bioinformatisch identifizierten Homologen zu erbringen.

3.6.3.1 Elektrische Detektion des Na⁺/H⁺-Austauschs über die Membran von Proteoliposomen

Zum Nachweis der Aktivität der heterolog in *E. coli* exprimierten Proteine wurde die elektrogene Reaktion von Proteoliposomen der identifizierten Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen auf eine schnelle Änderung der Natriumkonzentration im umgebenden Medium durch Pufferwechsel mit dem Detektionssystem SURFE²R One (Iongate) untersucht.

Versuchsbedingungen

Die Herstellung der Proteoliposomen und die Sensorpräparation erfolgte entsprechend den Validierungsexperimenten mit Bacteriorhodopsin.

Als Kriterien für ein auf Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität zurückzuführendes Signal wurden festgelegt:

- Signalthöhe > 150 pA
- Signifikanter Unterschied des induzierten Stroms zwischen Na⁺ und K⁺
- Signifikanter Unterschied des induzierten Stroms zu BR-Proteoliposomen als Kontrolle

Gemessen wurde in zwei verschiedenen Puffersystemen:

Puffersystem 1:

- nicht aktivierend: 300 mM KCl, 25 mM Hepes, pH 7,5
- aktivierend: 300 mM KCl, 50 mM NaCl, 25 mM Hepes, pH 7,5
- akt. Kontrolle: 300 mM KCl, 50 mM KCl, 25 mM Hepes, pH 7,5

Puffersystem 2:

- nicht aktivierend: 300 mM CholinCl, 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7,5
- aktivierend: 250 mM CholinCl, 50 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7,5
- akt. Kontrolle: 250 mM CholinCl, 50 mM KCl, 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7,5

Als Variationen wurden getestet:

- pH +/- 1
- Verdopplung der Ionenstärke

Ergebnisse der Messungen

Stellvertretend für alle Messungen werden hier die elektrischen Reaktionen von Sensoren, beschichtet mit NP1832A-HIS-, NP4702A-HIS- und BR-Proteoliposomen, auf einen 50 mM Na⁺-Sprung mit 300 mM KCl gezeigt:

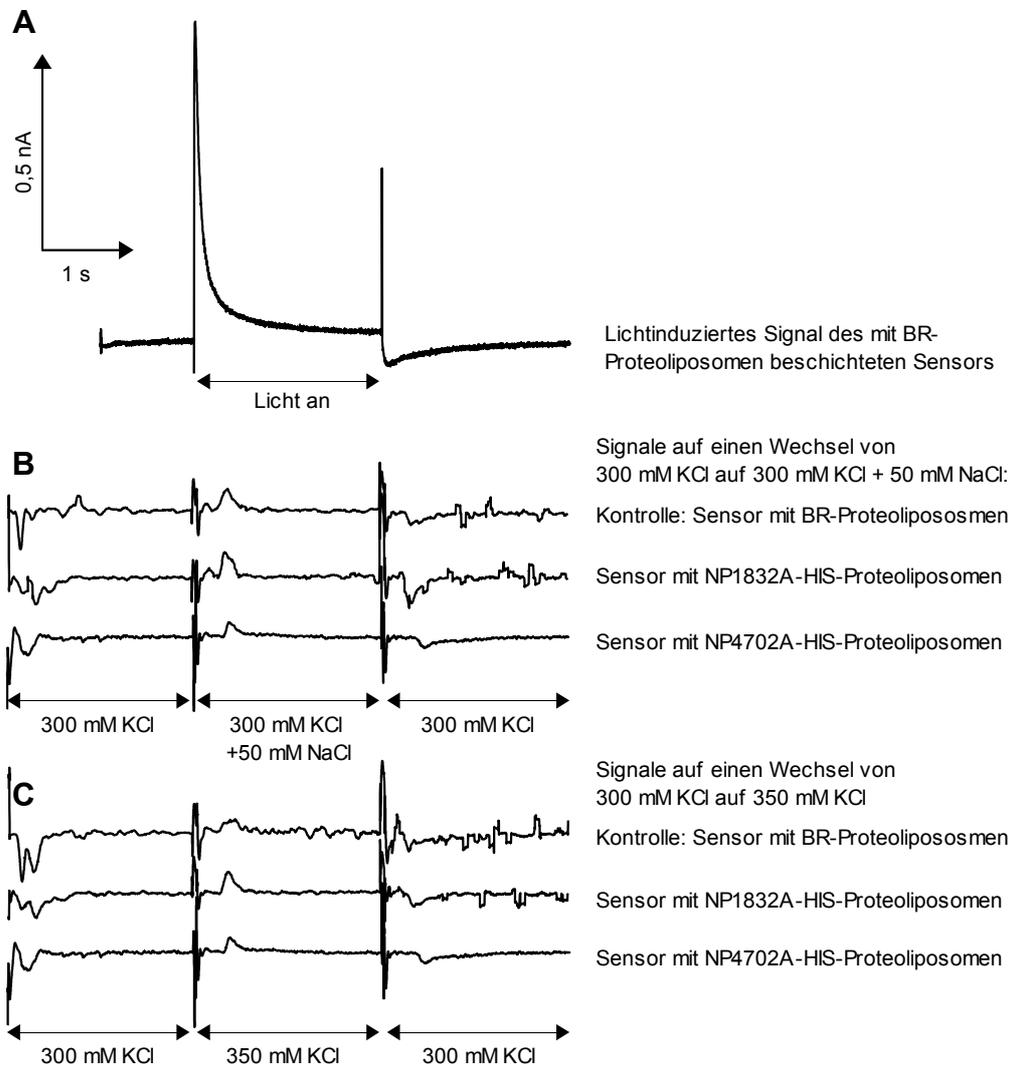


Abbildung 56: Elektrische Reaktion eines mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensors auf Licht im Vergleich zur elektrischen Reaktion von Sensoren mit NP1832A-HIS-, NP4702A-HIS- und BR-Proteoliposomenbeschichtung auf einen Pufferwechsel von 300 mM KCl auf 300 mM KCl + 50 mM NaCl bzw. 350 mM KCl.

A: Ein Sensor des Detektionssystems SURFE²R One wurde mit BR-Halolipid-Proteoliposomen beschichtet. Die Oberfläche wurde für 2 Sekunden belichtet und der induzierte Stromfluss aufgezeichnet.

Pufferzusammensetzung: 1 M NaCl, 50 mM MES, pH 6,0

B: Sensoren des Detektionssystems SURFE²R One wurden mit BR-, NP1832A-HIS- bzw. NP4702A-HIS-Halolipid-Proteoliposomen beschichtet und die durch zwei sekundigen Austausch des Puffers von 300 mM KCl auf 300 mM KCl + 50 mM NaCl induzierte Stromkurve aufgezeichnet. Pufferzusammensetzung: Die angegebene Konzentration KCl / NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

C: An den in **B** verwendeten Sensoren wurde die durch zwei sekundigen Austausch des Puffers von 300 mM KCl auf 350 mM KCl induzierte Stromkurve aufgezeichnet. Pufferzusammensetzung: Die angegebene Konzentration KCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

In dieser Abbildung ist der gemessene Strom gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt ist das 20ms-tiefpassgefilterte Mittel aus 5 Messungen.

Bei der Messung des induzierten Stroms, der durch lichtgetriebenen elektrogenen Transport über die Membran von Proteoliposomen entsteht, ist der Effekt sofort mit dem Einschalten des Lichtes messbar. Da der Puffer auf der Sensoroberfläche ruht, sind die aufgezeichneten Stromkurven, abgesehen von den Stromspitzen zu Beginn und am Ende der Belichtung, frei von Artefakten. Wird der elektrogene Transport durch einen Pufferwechsel herbeigeführt, entstehen beim Umschalten des Ventils Stromspitzen, die durch schnelle Druckänderungen im Flüssigkeitssystem erklärt werden können. Da sich dieses Ventil einige Zentimeter vor der Sensoroberfläche befindet, tritt der Effekt des Pufferwechsels im Gegensatz zu lichtinduzierten Messungen erst ca. 250 ms nach dem Umschalten auf, wenn die Front des neuen Puffers die Sensoroberfläche erreicht hat.

Der Wechsel der Pufferzusammensetzung von 300 mM KCl auf 300 mM KCl + 50 mM NaCl bewirkt bei den mit NP1832A-HIS- und NP4702A-HIS-Proteoliposomen beschichteten Sensoren einen Stromfluss von ca. 50 pA. Dasselbe Signal ist bei der Negativkontrolle, dem mit BR-Proteoliposomen beschichteten Sensor, messbar. Als weitere Kontrolle wurde der Pufferwechsel von 300 mM KCl auf 350 mM KCl betrachtet. Der an den mit NP1832A-HIS- und NP4702A-HIS-Proteoliposomen beschichteten Sensoren induzierte Stromfluss entspricht der Reaktion auf den Pufferwechsel von 300 mM KCl auf 300 mM KCl + 50 mM NaCl.

Bei den Messungen mit NP1832A-HIS- und NP4702A-HIS-Proteoliposomen konnte unter keiner der getesteten Bedingungen ein auf Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität zurückzuführendes Signal gemessen werden.

Mögliche Erklärungen für dieses Ergebnis:

- Eine funktionelle heterologe Expression dieser Proteine in *E. coli* ist nicht möglich.
- Es handelt sich nicht um Na⁺/H⁺-Austauscher.
- Der Na⁺/H⁺-Austausch erfolgt elektrisch neutral.
- Eine funktionelle Rekonstitution in Liposomen ist mit der gewählten Methode nicht möglich.
- Die Proteine sind unter den gewählten Messbedingungen oder auf Grund des HIS-Tags nicht aktiv.

Zum Vergleich die elektrische Reaktion eines Sensors mit *E. coli* NhaA-Proteoliposomen, entnommen aus [68]:

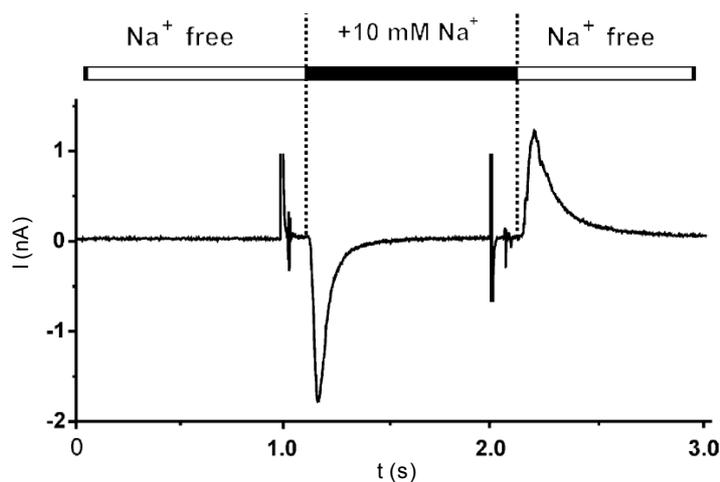


Abbildung 57: Der von NhaA-Proteoliposomen induzierte Stromfluss.

Ein Konzentrationssprung von 10 mM Na⁺ wurde an einer Oberfläche mit adsorbierten NhaA-Proteoliposomen durchgeführt. Der Pufferwechsel erfolgte in drei aufeinander folgenden Schritten im Abstand von einer Sekunde bei einer Flussrate von 1 ml/s. Der Sensor wurde mit 20 µl NhaA-Proteoliposomen beschichtet (Lipidkonzentration 5 mg/ml, $C_{\text{Lipid}} : C_{\text{Protein}} = 3,3 : 1$). Der Puffer enthielt 290 mM KCl, 1 mM DTT, 25 mM Tris, 25 mM Mops, 25 mM HEPES, pH 8,0. Zusätzlich enthielt die nicht aktivierende Lösung 10 mM KCl, die aktivierende Lösung 10 mM NaCl. Diese Abbildung wurde aus [68] entnommen.

Zusammenfassung

Es ist mit diesen Messungen nicht gelungen den Aktivitätsnachweis für die untersuchten Proteine NP1832A-HIS und NP4702A-HIS zu erbringen.

3.6.3.2 Das Wachstum der Deletionsstämme von *H. salinarum*

Für *E. coli* wurde an der $\Delta nhaA\Delta nhaB$ Mutante EP432 [51] gezeigt, dass der Verlust der Fähigkeit Na⁺ gegen H⁺ auszutauschen zu einer hohen Sensitivität gegenüber Na⁺ führt und in unmodifiziertem LB-Medium mit 150 mM NaCl kein Wachstum mehr möglich ist (siehe Kapitel 3.6.3.4). Unter der Annahme, dass nur ein Na⁺/H⁺-Austauscher existiert und das Wachstum von *H. salinarum* ebenfalls von der Fähigkeit abhängig ist, Na⁺ zu exportieren und im Ausgleich dazu K⁺ im Cytosol zu akkumulieren, wurde erwartet, dass die Deletion des Na⁺/H⁺-Austauschers letal ist oder der Deletionsstamm zumindest einen Na⁺-sensitiven Phänotyp zeigt.

Die Deletion aller bioinformatisch identifizierter ORFs war unter den gewählten Bedingungen nicht letal. Das Wachstum der Deletionsstämme in Komplexmedium mit 4 M NaCl ist mit dem der Kontrollen (TOM, Snob) vergleichbar.

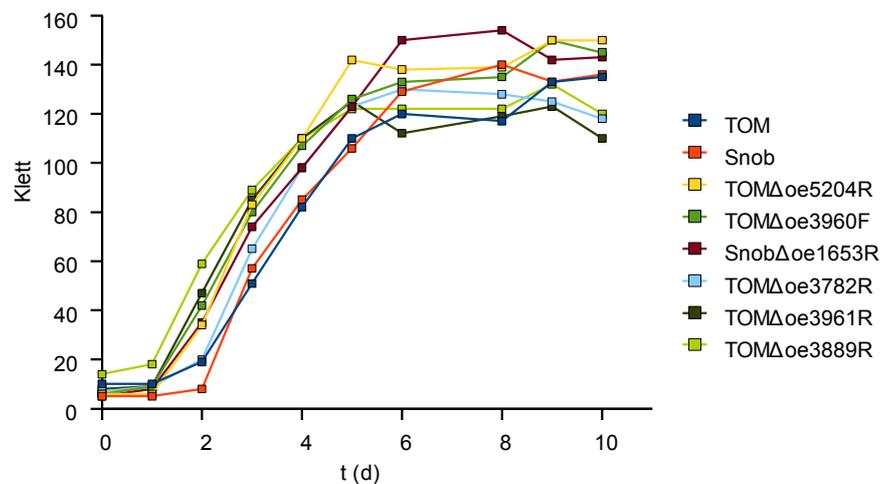


Abbildung 58: Das Wachstum der Deletionsstämme unter aeroben Bedingungen im Vergleich zu den Kontrollen (TOM / Snob).

35 ml Komplexmedium wurden mit 1 ml einer ausgewachsenen Vorkultur angeimpft und in einem luftdurchlässig verschlossenen Klettkolben bei 40°C und 110 UpM geschüttelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde als Maß für die Zelldichte die Lichtstreuung mit einem Klettphotometer bestimmt. Dargestellt ist die Lichtstreuung der Kulturen gegen die Wachstumszeit.

Für dieses Ergebnis gibt es folgende mögliche Erklärungen:

- Es existiert mehr als ein Na⁺/H⁺-Austauscher.
- *H. salinarum* ist gegenüber hohen Na⁺-Konzentrationen im Cytosol resistent.
- Unter den ausgewählten Homologen befindet sich kein Na⁺/H⁺-Austauscher.

Dieses Experiment konnte nur mit den Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen von *H. salinarum* durchgeführt werden, da für *N. pharaonis* bis jetzt noch keine Transformationsmethode existiert und dadurch keine Deletionsmutanten hergestellt werden können.

3.6.3.3 Charakterisierung des lichtinduzierten Protonentransports der Deletionsstämme

Bacteriorhodopsin transportiert, getrieben von Licht, Protonen aus der Zelle [54]. Bei der Messung des durch Licht induzierten H⁺-Transports von *H. salinarum*- Zellvesikeln stellten Lanyi und McDonald in [34] fest, dass bei pH < 7,0 Protonen wie erwartet exportiert, bei pH > 7,0 jedoch initial in die Zellvesikel aufgenommen wurden. Die Transportrichtung kehrte sich nach ca. 15 Minuten, abhängig vom relativen Anteil von BR zum Na⁺/H⁺-Austauscher, wieder um (hier nicht gezeigt). Dieses Phänomen wird als alkalisches Überschießen bezeichnet.

Lanyi und McDonald führten diese Beobachtung auf einen durch das elektrische Membranpotential getriebenen sekundären Transportvorgang zurück und leiteten u.a. daraus die Existenz eines bei > pH7,0 aktiven elektrogenen Na⁺/H⁺-Austauschs mit einer Stöchiometrie von H⁺ / Na⁺ > 1 ab.

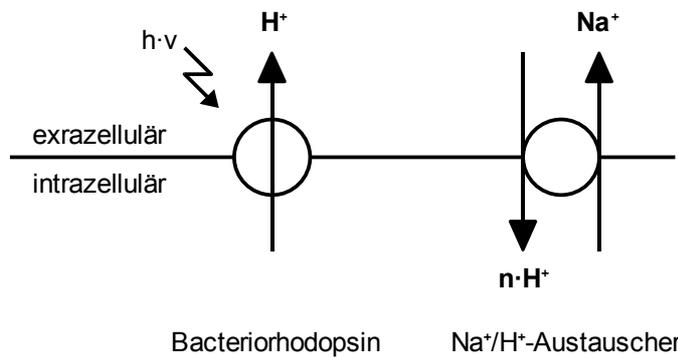
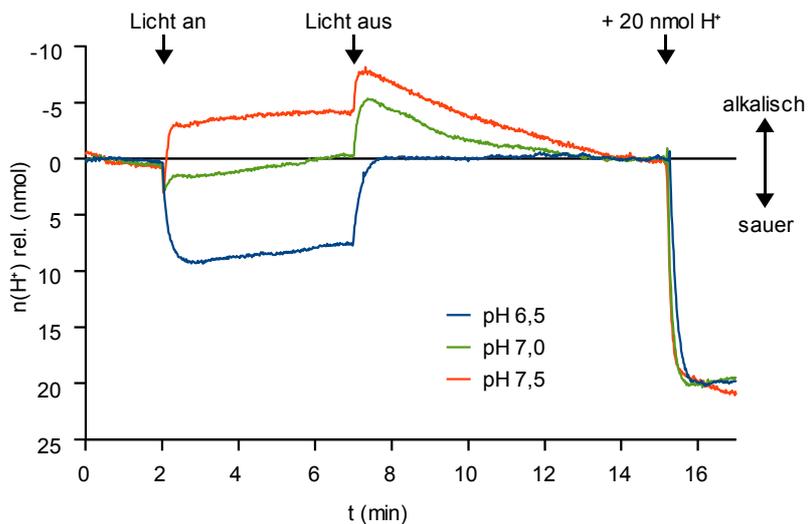


Abbildung 59: Modellvorstellung des durch Bacteriorhodopsin lichtgetriebenen Na⁺-Exports aus der Zelle

Der lichtgetriebene Transport eines Protons führt sowohl zu einem elektrischen Potential als auch zu einem Protonengradienten über die Membran der Zelle. Beides dient dem Na⁺/H⁺-Austausch als Energiequelle. Für den angenommenen Fall einer Stöchiometrie des Na⁺/H⁺-Austauschs von $Na^+/H^+ = \frac{1}{2}$ entsteht ein elektrisch neutrales Transportsystem, das ausschließlich entgegengesetzte Na⁺- und H⁺-Gradienten, aber kein Membranpotential aufbaut. Aus der Kombination eines einfach elektrogenen Transports eines Protons nach außen mit einem, im angenommenen Fall einfach elektrogenen, Transport von zwei Protonen nach innen und einem Na⁺ nach außen, ergibt sich in der Summe ein Protonenimport.

Entsprechend dieser Interpretation wurden Zellvesikel aller Deletionsstämme auf die Nachweisbarkeit einer initialen lichtinduzierten Alkalinisierung hin untersucht. Die Messungen wurden bei pH 6,5, pH 7,0 und pH 7,5 durchgeführt, da beim Na⁺/H⁺-Austauscher von *M. jannaschii* das Aktivitätsmaximum bei pH 6,5 gefunden wurde [50].



Bei der Darstellung aller hier gezeigten Messungen wurden zur Korrektur der Drift die Funktion zu den Zeitpunkten $t=1 \text{ min}$ und $t=14 \text{ min}$ auf 0 normiert.

Abbildung 60: Durch Licht induzierter Protonentransport über die Membran von Zellvesikeln von *H. salinarum* (TOM komplementiert mit BR) bei pH 6,5, pH 7,0 und pH 7,5. In einer gerührten und auf 20°C thermostatisierten Küvette wurde der pH-Wert von 7 ml Zellvesikelsuspension mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml in 4 M NaCl gemessen. Zwischen $t = 2 \text{ min}$ und $t = 7 \text{ min}$ wurde die Küvette mit einer Lichtintensität von 80 mW/cm² und einem Wellenlängenbereich von 515 - 740 nm belichtet. Bei $t = 15 \text{ min}$ wurden zur Normierung der Messungen 20 nmol HCl zugegeben. Dargestellt ist die Menge der transportierten Protonen gegen die Zeit. Positive Werte stehen für einen Transport aus den Vesikeln, negative für einen Transport in die Vesikel.

An Zellvesikeln des Wildtyps (Positivkontrolle) konnte die initiale lichtinduzierte Alkalinisierung bei $\text{pH} > 7,0$ gezeigt werden. In vielen Fällen wurde beim Beginn der Belichtung eine verstärkte Ansäuerung und nach dem Ende der Belichtung eine verstärkte Alkalinisierung beobachtet. Diese Effekte entziehen sich einer Interpretation.

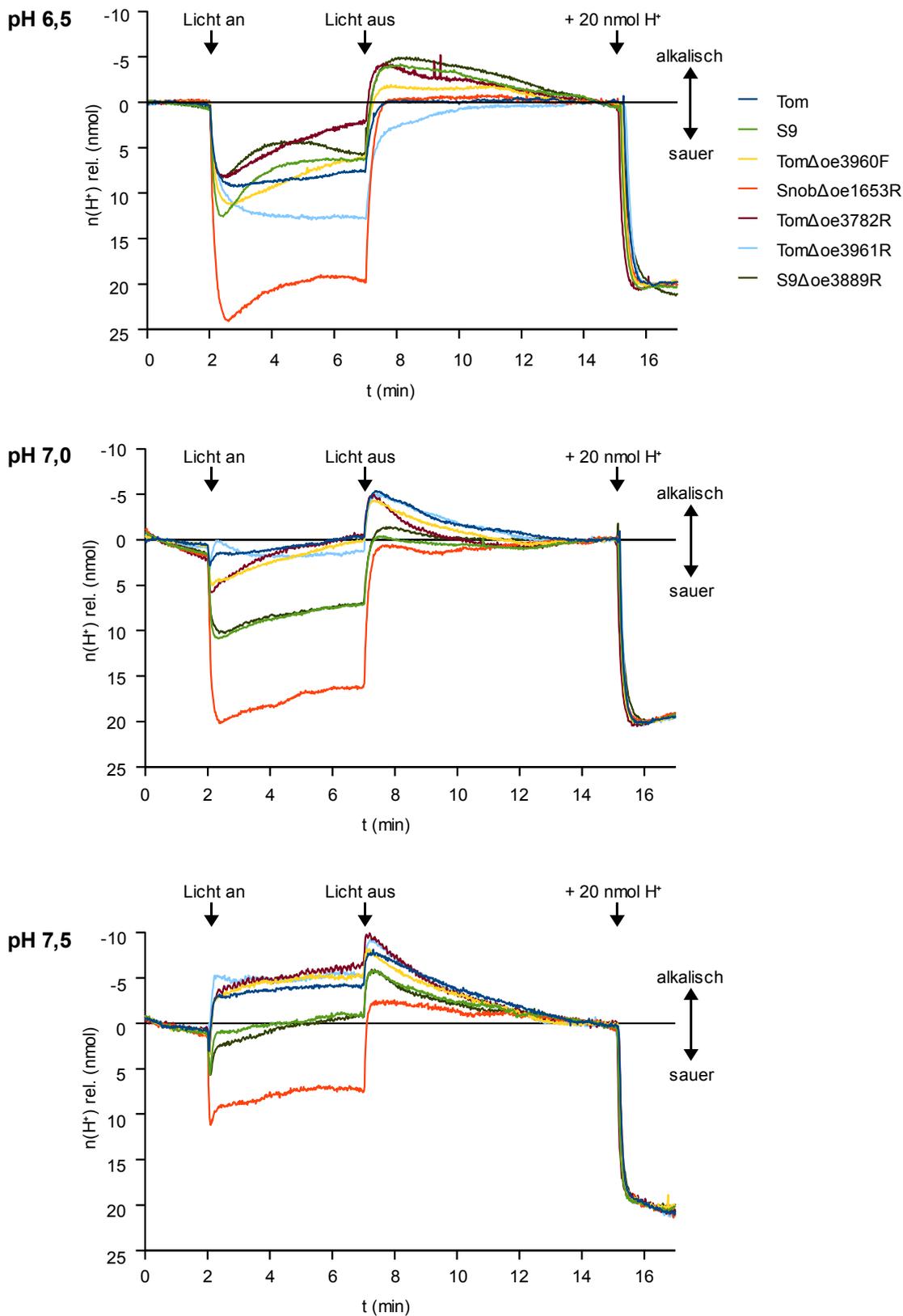


Abbildung 61: Durch Licht induzierter Protonentransport über die Membran von *H. salinarum* Zellvesikel bei pH 6,5, pH 7,0 und pH 7,5. Alle TOM und Snob-Stämme wurden mit Bacteriorhodopsin komplementiert, bei den S9-Stämmen wird Bacteriorhodopsin nativ exprimiert.

In einer gerührten und auf 20°C thermostatisierten Küvette wurde der pH-Wert von 7 ml Zellvesikelsuspension mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml in 4 M NaCl gemessen. Zwischen $t = 2$ min und $t = 7$ min wurde die Küvette mit einer Lichtintensität von 80 mW/cm² und einem Wellenlängenbereich von 515 - 740 nm belichtet. Bei $t = 15$ min wurden zur Normierung der Messungen 20 nmol HCl zugegeben. Dargestellt ist die Menge der transportierten Protonen gegen die Zeit. Positive Werte stehen für einen Transport aus den Vesikeln, negative für einen Transport in die Vesikel.

Das durchgeführte Experiment zeigt, dass mit Zellvesikeln des oe1653R-Deletionsstamms unter allen getesteten Bedingungen eine stärkere Ansäuerung des umgebenden Mediums messbar ist. Eine Alkalinisierung bei pH 7,5 ist nicht mehr messbar. Mit den Vesikeln des S9-Stamms ist eine initiale Alkalinisierung vorhanden, aber nur mit einer Lichtintensität von 40 mW/cm² deutlich erkennbar (hier nicht gezeigt). Die Bacteriorhodopsinkonzentration der verwendeten Vesikelchargen lag zwischen 4,3 - 7,8 nmol/mg Gesamtprotein und damit innerhalb des Faktors von 1,8. Ein wesentlicher Einfluss auf das Messergebnis ist damit unwahrscheinlich.

Das Ergebnis dieses Experiments kann als Hinweis gedeutet werden, dass es sich bei OE1653R um einen Na⁺/H⁺-Austauscher handelt.

Bestimmung der BR-Konzentration

Um die Vergleichbarkeit der Messungen darzustellen, wurde die relative BR-Konzentration aller Vesikelchargen bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Fit des UV-VIS-Spektrums einer Vesikelsuspension mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml gegen die Streukurve und ein BR-Referenzspektrum.

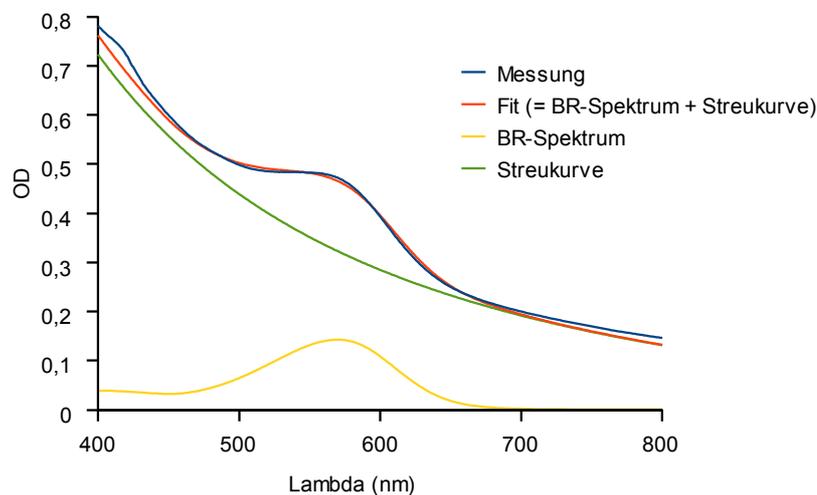


Abbildung 62: Korrektur eines VIS-Spektrums einer streuenden Bacteriorhodopsinprobe am Beispiel von *H. salinarum*-Zellvesikeln (TOM komplementiert mit Bacteriorhodopsin).

Das gemessene Spektrum wurde wie in Material und Methoden beschrieben bestmöglich durch die Überlagerung eines BR-Referenzspektrums mit der Streukurve wiedergegeben. Über die Absorption bei 578 nm des angepassten BR-Spektrums wurde dann die BR-Konzentration berechnet.

Dargestellt ist die gemessene Absorption der Probe und das durch Fit an das Spektrum der Probe angepasste Spektrum des Bacteriorhodopsins und der Streuung sowie deren Überlagerung.

Vesikelcharge	OD-BR(568nm)	c(BR) (nmol/mg)
Tom	0,14	4,4
TomΔoe3960F	0,14	4,3
SnobΔoe1653R	0,22	7,1
TomΔoe3782R	0,16	5,2
TomΔoe3961R	0,16	5,0
S9	0,25	7,8
S9Δoe3889R	0,24	7,5

Tabelle 6: Die korrigierten BR-Absorptionen und die daraus berechneten BR-Konzentrationen der verwendeten Vesikelchargen der Deletionsstämme. Alle TOM und Snob-Stämme wurden mit Bacteriorhodopsin komplementiert, bei den S9-Stämmen wird Bacteriorhodopsin nativ exprimiert.

Die relative BR-Konzentration der Vesikelchargen lag zwischen 4,4 und 7,8 nmol pro mg Gesamtprotein, die gemessenen pH-Spuren sollten demnach weitgehend vergleichbar sein. Lanyi und McDonald bestimmten in [34] die BR-Konzentration der verwendeten Vesikelcharge mit 2,5 nmol pro mg Gesamtprotein.

Bestimmung des maximalen H⁺-Transports von TOM-Vesikel

Um die Dichtigkeit der Vesikel sicherzustellen wurde die initiale Transportaktivität der Zellvesikel (TOM komplementiert mit Bacteriorhodopsin) bei verschiedenen Lichtintensitäten gemessen, daraus die maximale Transportaktivität bestimmt und mit dem Literaturwert verglichen.

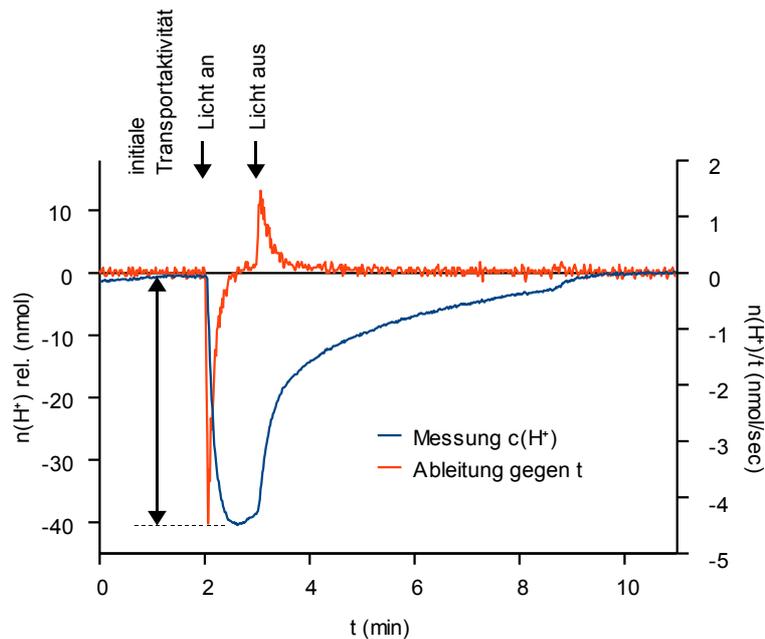


Abbildung 63: Bestimmung des initialen H⁺-Transports von *H. salinarum*-Zellvesikel (TOM komplementiert mit Bacteriorhodopsin) in 4 M NaCl bei pH 6,0 mit 200 μM TPP⁺.

In einer gerührten und auf 20°C thermostatisierten Küvette wurde der pH-Wert von 7 ml Zellvesikelsuspension mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml in 4 M NaCl gemessen. Zwischen $t = 2$ min und $t = 7$ min wurde die Küvette mit einer Lichtintensität von 80 mW/cm² und einem Wellenlängenbereich von 515 - 740 nm belichtet.

In dieser Abbildung wird das Beispiel der Messung bei einer Lichtintensität von 80 mW/cm² gezeigt. Die Kurve "Messung" stellt die Menge der transportierten Protonen gegen die Zeit dar. Positive Werte stehen für einen Transport aus den Vesikel, negative für einen Transport in die Vesikel. Durch Ableitung dieser Funktion erhält man die pro Zeiteinheit transportierte Menge Protonen.

Unter den gewählten Bedingungen wurde ein maximaler Protonentransport von 5,9 nmol/sec bestimmt. Umgerechnet auf die vorhandene Menge BR ergibt sich daraus eine maximale Transportaktivität von 23 H⁺/BR/Minute. Der in [33] angegebene Literaturwert für Zellvesikel liegt bei 70 H⁺/BR/Minute.

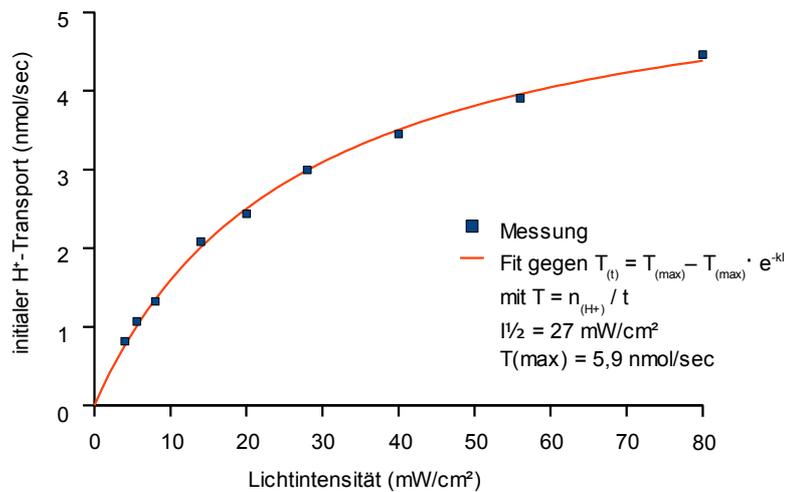


Abbildung 64: Bestimmung des maximalen H⁺-Transports von *H. salinarum*-Zellvesikel (TOM komplementiert mit Bacteriorhodopsin) in 4M NaCl bei pH 6,0 mit 200 μM TPP⁺. Die bei den angegebenen Lichtintensitäten bestimmten initialen Transportaktivitäten wurden mit einer Kinetik erster Ordnung dargestellt und so die theoretisch mögliche maximale Transportaktivität bestimmt.

Die Integrität der Vesikel wurde durch dieses Experiment bestätigt.

3.6.3.4 Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation

Um eine Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität der identifizierten Homologen von *H. salinarum* und *N. pharaonis* zu zeigen wurde EP432, eine $\Delta nhaA\Delta nhaB$ Mutante von *E. coli* TA15 [51], mit den entsprechenden offenen Leserahmen komplementiert.

Dieser Stamm zeigt eine hohe Sensitivität gegenüber Na⁺, da ein aktiver Transport von Na⁺ aus dem Cytosol auf Grund der Deletion beider Na⁺/H⁺-Austauscher nicht mehr möglich ist. Die Resistenz von EP432 gegenüber Na⁺ kann durch Komplementation mit einem Na⁺/H⁺-Austauscher wieder hergestellt werden. Dies stellt eine Standardmethode zum Nachweis der Aktivität potentieller Na⁺/H⁺-Austauscher dar, die u.a. von Strausak et al. zur Identifikation des Na⁺/H⁺-Austauschers von *Enterococcus hirae* in [53] eingesetzt wurde.

EP432 muss in LBK-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 88 mM KCl, pH 7,5) kultiviert werden. Je weiter die Zusammensetzung des Mediums und damit die Natriumkonzentration zu der von LB-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 170 mM NaCl, pH 7,2) verschoben wird, desto stärker nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit und die Zelldichte in der stationären Phase ab. In reinem LB-Medium ist kein Wachstum nachweisbar. Auch durch längere Wachstumszeit ändert sich an diesem Ergebnis nichts mehr. Das Wachstum von DH5 α als Kontrolle mit *NhaA* und *NhaB* ist unabhängig von der Natriumkonzentration im Medium.

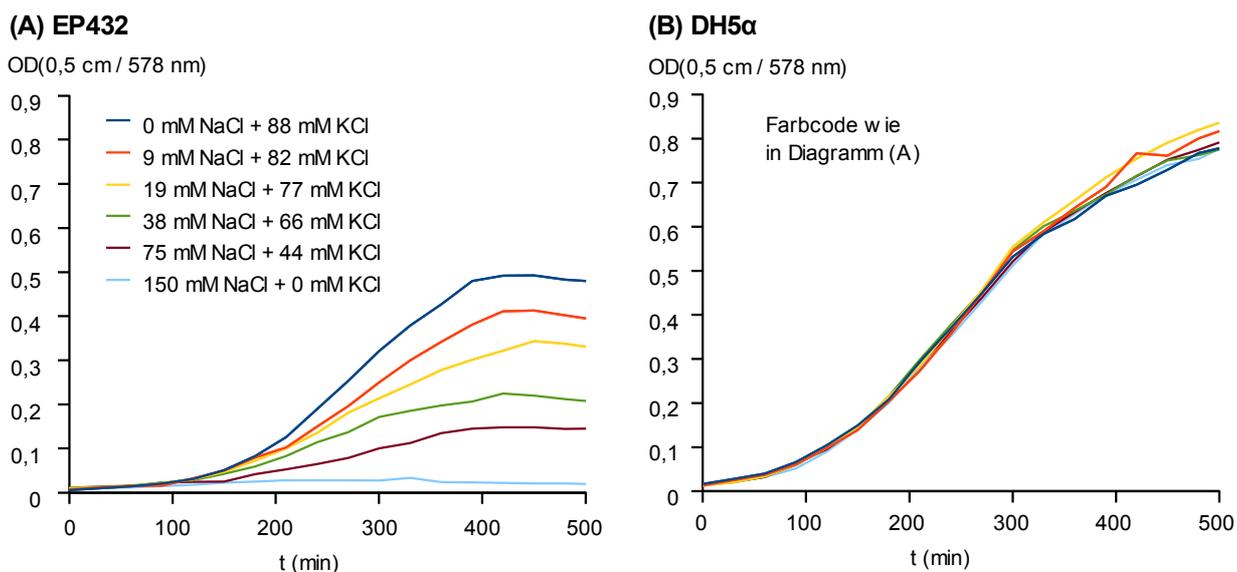


Abbildung 65: Wachstum von EP432- und DH5 α -Kulturen bei verschiedenen NaCl- zu KCl-Konzentrationen im Medium.

In einer 96er-Mikrotiterplatte wurden je 200 μ l Medium mit dem angegebenen Verhältnis von NaCl zu KCl mit 5 μ l einer auf OD_{600nm} = 1,0 eingestellten Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 220 UpM geschüttelt. Im Abstand von 30 Minuten wurde in einem Photometer für Mikrotiterplatten die OD_{578nm} als Maß für die Zelldichte bestimmt.

A: Vorkultur EP432 in LBK

B: Vorkultur DH5 α in LBK

Dargestellt ist die Lichtstreuung der Kulturen gegen die Wachstumszeit.

Zur Komplementation mit den potentiellen Na⁺/H⁺-Austauschern von *H. salinarum* und *N. pharaonis* wurden die entsprechenden offenen Leserahmen in das Arabinose-induzierbare pBAD-Plasmid [8] kloniert und in EP432 transformiert. Als Negativkontrolle wurde das Halorhodopsin von *N. pharaonis* (pHR) gewählt. Bei diesem Protein handelt es sich um einen lichtgetriebenen Chloridtransporter, der unter diesen Versuchsbedingungen jedoch nicht funktionell vorliegt, da kein Retinal verfügbar ist.

100 Klett·ml einer ausgewachsenen LBK-Kultur (nicht adaptiert) wurden in 50 ml LB-Ampicillin-Medium mit 0,002 % Arabinose überimpft, bei 37°C und 220 UpM geschüttelt und die Wachstumskurve gemessen.

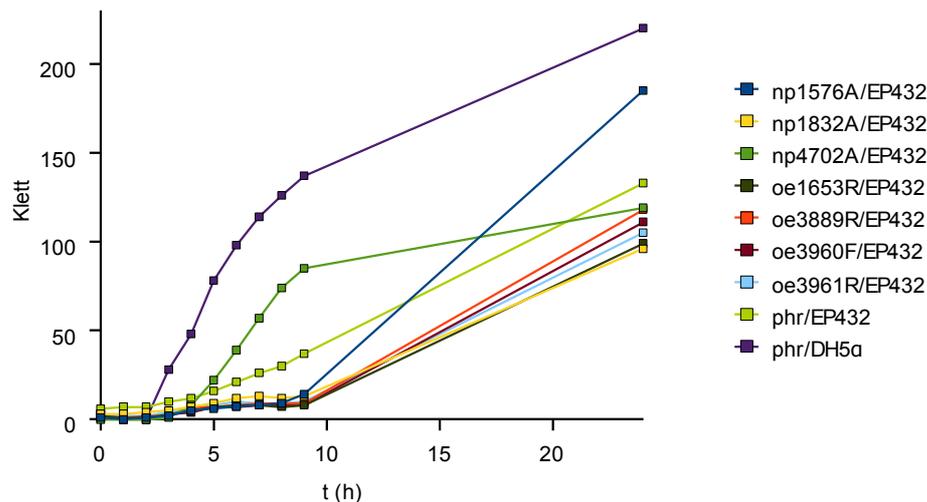


Abbildung 66: Wachstum der komplementierten EP432-Stämme in LB-Medium nach Überimpfen aus LBK-Vorkulturen (nicht adaptiert).

Je 50 ml LB-Ampicillin-Medium mit 0,002 % Arabinose wurden mit 100 Klett·ml (0,5-1,0 ml) einer ausgewachsenen LBK-Ampicillin-Vorkultur mit 0,002 % Arabinose angeimpft und bei 37°C und 220 UpM in einem 100 ml-Klettkolben geschüttelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde als Maß für die Zelldichte die Lichtstreuung mit einem Klettphotometer bestimmt.

Dargestellt ist die Lichtstreuung der Kulturen gegen die Wachstumszeit.

Für alle Stämme, einschließlich der pHR-Negativkontrolle, konnte nach unterschiedlich langer lag-Phase Wachstum gezeigt werden.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde das Experiment mit den nach 24 Stunden Wachstum in LB-Medium adaptierten Kulturen wiederholt. 100 Klett·ml wurden in 50 ml LB-Ampicillin-Medium mit 0,002 % Arabinose überimpft und wieder bei 37°C und 220 UpM geschüttelt.

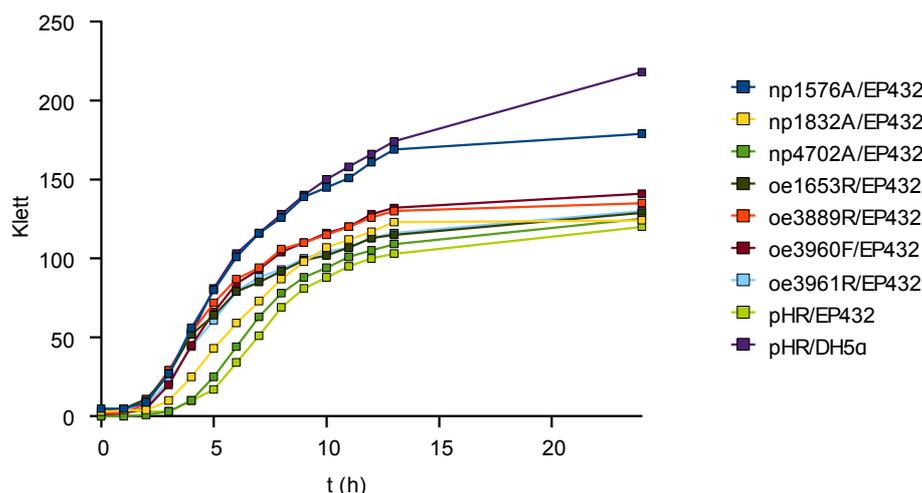


Abbildung 67: Wachstum der komplementierten EP432-Stämme in LB-Medium nach Überimpfen aus LB-Vorkulturen (adaptiert).

Je 50 ml LB-Ampicillin-Medium mit 0,002 % Arabinose wurden mit 100 Klett-ml (0,5-1,0 ml) einer ausgewachsenen LBK-Ampicillin-Vorkultur mit 0,002 % Arabinose angeimpft und bei 37°C und 220 UpM in einem 100 ml-Klettkolben geschüttelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde als Maß für die Zelldichte die Lichtstreuung mit einem Klettphotometer bestimmt.

Dargestellt ist die Lichtstreuung der Kulturen gegen die Wachstumszeit.

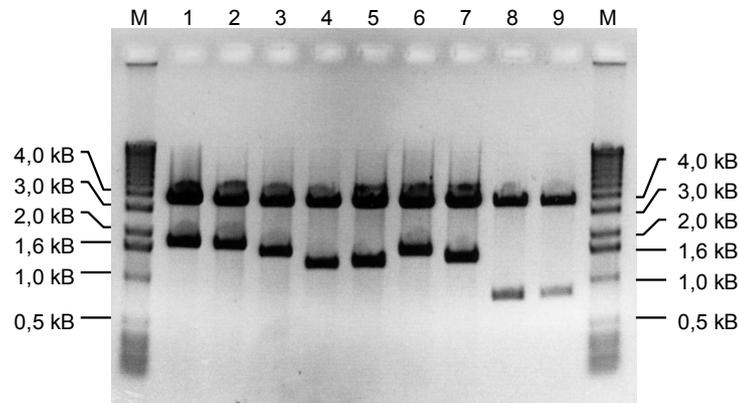
Für alle Stämme konnte ohne lag-Phase Wachstum gezeigt werden. Die etwas höhere Zelldichte in der stationären Phase des mit np1576A-HIS komplementierten EP432-Stamms konnte in folgenden Experimenten nicht reproduziert werden.

Das Ergebnis des Experiments ist, dass sich EP432 nach Transformation mit einem pBAD-Plamid, unabhängig von Funktion und Expression des zur Rekombination verwendeten ORFs, an eine Na⁺-Konzentration von 170 mM im Medium adaptiert.

Eine Aussage über die Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität der zur Komplementierung eingesetzten offenen Leserahmen kann deshalb nicht getroffen werden.

Identitätskontrolle der Stämme

Um eine Verunreinigung auszuschließen wurde nach den Wachstumsversuchen die Identität der Stämme durch Kontrollspaltung der isolierten Plasmide nachgewiesen.



Spur	Plasmid	Stamm	Verdau	Insert
1	np1576A-HIS-pBAD	EP432	NcoI/HindIII	1866 kB
2	oe3889R-HIS-pBAD	EP432	NcoI/HindIII	1866 kB
3	np1832A-HIS-pBAD	EP432	NcoI/HindIII	1707 kB
4	np4702A-HIS-pBAD	EP432	NcoI/HindIII	1437 kB
5	oe3960F-HIS-pBAD	EP432	XhoI/HindIII	1476 kB
6	oe3961R-HIS-pBAD	EP432	XhoI/HindIII	1749 kB
7	oe1653R-HIS-pBAD	EP432	XhoI/HindIII	1566 kB
8	phr-HIS-pBAD	EP432	NcoI/HindIII	876 kB
9	phr-HIS-pBAD	DH5α	NcoI/HindIII	876 kB

Abbildung 68: Identitätskontrolle der in den Wachstumsversuchen verwendeten Kulturen.

Aus 5 ml Kultur wurde das Plasmid isoliert und durch geeignete Restriktionsenzyme der zur Rekombination eingesetzte offene Leserahmen ausgeschnitten. Die DNS-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Gel durch Ethidiumbromid gefärbt. Dargestellt ist das invertierte Abbild der Fluoreszenz des gefärbten Gels.

Expressionsnachweis

Der Nachweis der Expression konnte nur für NP1832A-HIS und pHR-HIS erbracht werden. Der Expressionslevel der anderen Proteine liegt unter der Nachweisgrenze des Westernblots.

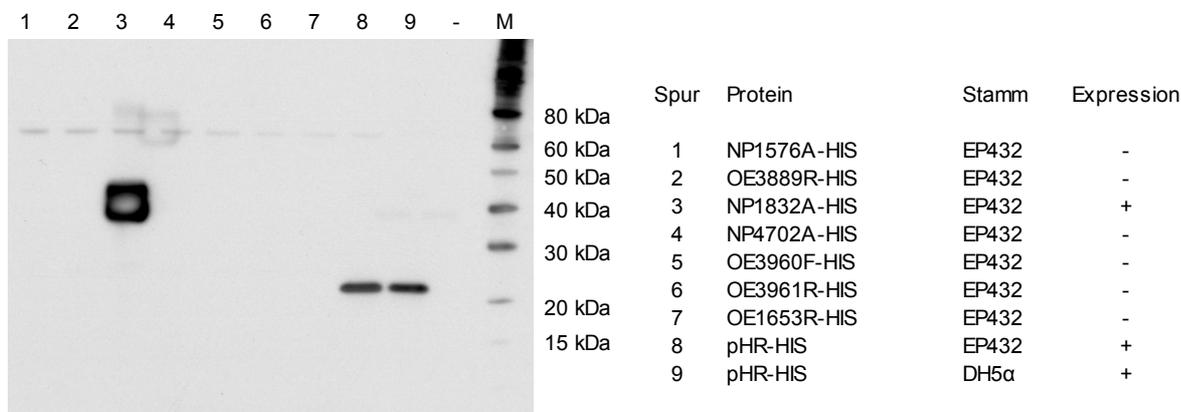


Abbildung 69: Nachweis des exprimierten Proteins in den Membranfraktionen der rekombinierten EP432-Stämme.

Aus je 45 ml Kultur wurden nach dem Wachstumsversuch die Membranen isoliert, wie in Material und Methoden beschrieben. Je 1 µg Membranprotein wurde durch SDS-PAGE (NuPAGE-MES) aufgetrennt und durch Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen.

Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

Die Expression der Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen durch Translation mit einer T7-Polymerase hätte vermutlich mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu nachweisbarem Protein geführt. Mit EP432 als Expressionsstamm musste aber ein Expressionssystem verwendet werden, das auf die native RNS-Polymerase von *E. coli* zurückgreift, da dieser Stamm, im Gegensatz zu speziellen Expressionsstämmen wie z.B. BL21(DE3), über keine T7-Polymerase verfügt.

3.6.3.5 Nachweis von Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität der komplementierten EP432-Stämme

Zum biophysikalischen Nachweis von Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität wurde die Na⁺-induzierte pH-Änderung in energetisierten Zellvesikeln der komplementierten EP432-Stämme nach Rosen [25] indirekt über Acridinorange fluoreszenz verfolgt.

Zur Komplementation mit den potentiellen Na⁺/H⁺-Austauschern von *H. salinarum* und *N. pharaonis* wurden die entsprechenden offenen Leserahmen in das Arabinose-induzierbare pBAD-Plasmid [8] kloniert und in EP432 transformiert. Die komplementierten EP432-Stämme wurden in LBK-Ampicillin-Medium mit 0,002 % Arabinose bis zur stationären Phase geschüttelt. Es erfolgte keine Adaptation an Na⁺. Die Herstellung der Zellvesikel wird in Material und Methoden beschrieben.

Der Nachweis der Expression konnte nur für NP1832A-HIS erbracht werden. Der Expressionslevel der anderen Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen liegt unter der Nachweisgrenze des Westernblots.

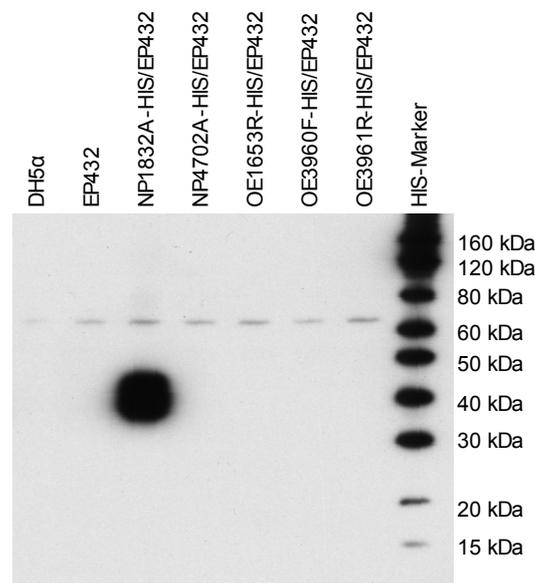
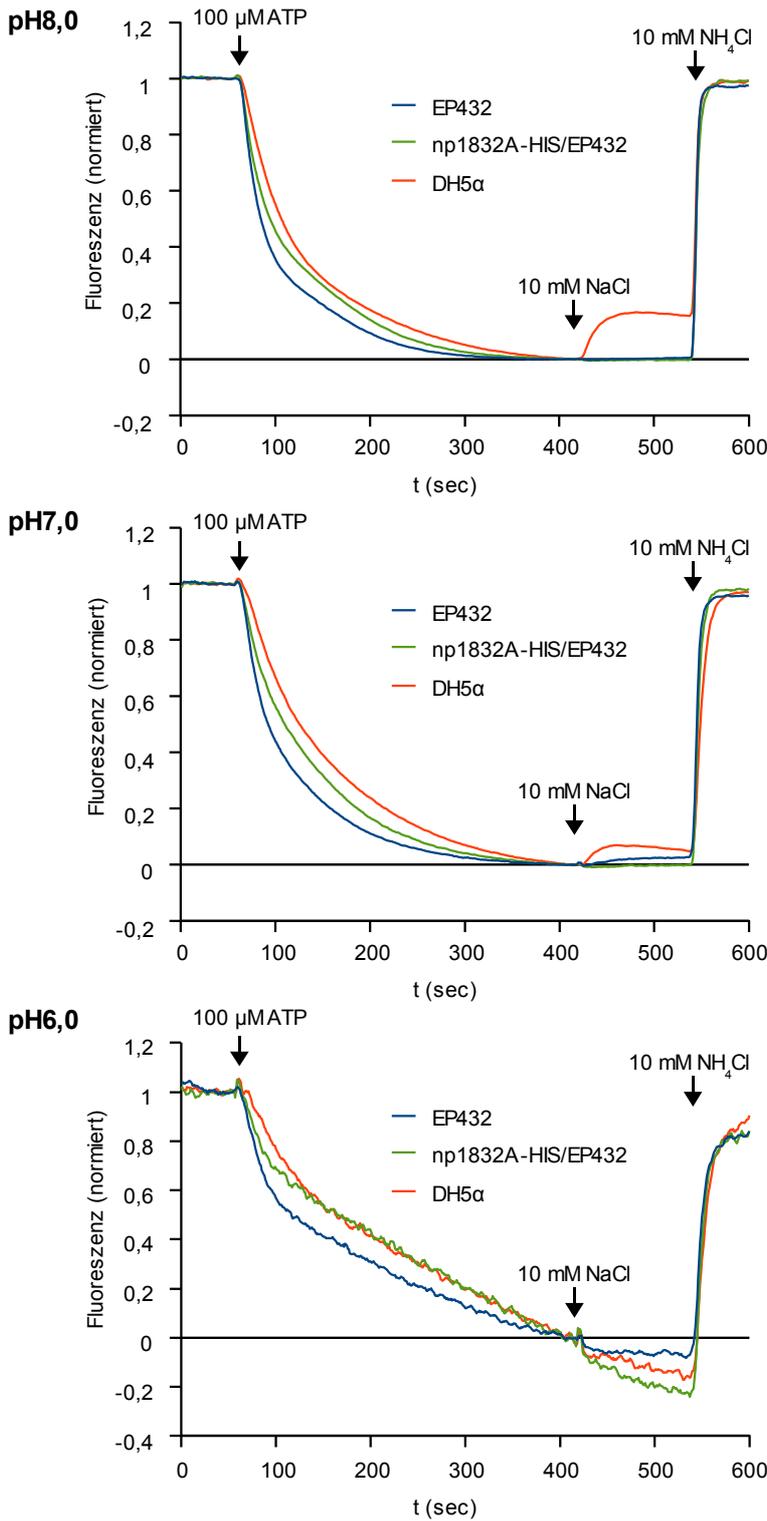


Abbildung 70: Nachweis des exprimierten Proteins in den Zellvesikeln der rekombinierten EP432-Stämme. Aus je 2 l Kultur wurden Zellvesikel hergestellt, wie in Material und Methoden beschrieben. Je 1 µg Protein wurde durch SDS-PAGE (NuPAGE-MES) aufgetrennt und durch Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen.

Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

Die Zellvesikel wurden bei pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0 auf Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität untersucht. Im folgenden wird nur die Messung an Zellvesikeln des mit NP1832A-HIS komplementierten Stamms gezeigt. Die Messungen an Vesikeln der Stämme, bei denen der Expressionsnachweis nicht erbracht werden konnte, wurden trotzdem durchgeführt, da auch Proteinmengen, die auf dem Westernblot nicht erkennbar sind, zu einem Effekt führen könnten. Das Ergebnis entsprach aber in jedem Fall der Negativkontrolle.



Bei der Darstellung aller hier gezeigten Messungen wurde die Funktion für $t = 30$ s auf 1 und für $t = 400$ s auf 0 normiert.

Abbildung 71: Durch Na⁺ induzierte Abgabe von Acridinorange aus energetisierten, seitenverkehrten Zellvesikeln der rekombinierten EP432-Stämme bei pH 8,0, pH 7,0 und pH 6,0. In einer Fluoreszenzküvette wurden Zellvesikel entsprechend 100 μg Protein, 2 μM Acridinorange und 4 mM KCl in 2 ml Messpuffer vorgelegt. Bei $t = 60$ s wurde als Energiequelle für den Protonentransport 100 μM ATP zugegeben. Das im unprotonierten Zustand membrangängige Acridinorange wird durch sauren pH-Wert in den Vesikeln protoniert und sammelt sich dort in hohen Konzentrationen an, was zur Fluoreszenzlöschung führt. Bei $t = 420$ s wurden 10 mM NaCl zugegeben. Existiert ein funktioneller Na⁺/H⁺-Austauscher in der Membran der Vesikel, bewirkt dies einen aktiven Import von Na⁺ in die Vesikel, der an einen H⁺-Export gekoppelt ist. Dadurch steigt der pH-Wert in den Vesikeln, nicht mehr protoniertes Acridinorange kann die Vesikel verlassen und die Fluoreszenz nimmt wieder zu. Bei $t = 540$ s wird durch Zugabe von 10 mM NH₄Cl der Protonengradient abgebaut, Acridinorange entweicht vollständig aus den Vesikeln, die ursprüngliche Fluoreszenz ist wieder hergestellt. Abgebildet ist die normierte Fluoreszenz gegen die Zeit.

Ein Fluoreszenzanstieg als Reaktion auf Zugabe von 10 mM NaCl kann nur an DH5 α -Zellvesikeln bei pH 7,0 und pH 8,0 gezeigt werden. Bei pH 6,0 ist eine Positivkontrolle durch diese Vesikel nicht möglich. An EP432-Vesikeln als Negativkontrolle und Vesikeln der rekombinierten Stämme ist unter keiner der getesteten Bedingungen ein durch Na⁺ induzierter Fluoreszenzanstieg erkennbar.

Das Ergebnis des Experiments ist, dass bei keinem der rekombinierten Stämme Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität nachweisbar ist, was jedoch keine Aussagekraft besitzt, da mit Ausnahme von NP1832A-HIS keine Expression nachweisbar ist und auch in diesem Fall auf Grund der heterologen Expression die Funktionalität nicht sichergestellt ist.

3.6.3.6 Zusammenfassung

- Alle Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen sind deletierbar, das Wachstum der Deletionsstämme ist unter den getesteten Bedingungen nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.
- Lichtinduzierter H⁺-Transport führt bei Vesikeln des oe1653R-Deletionsstamms im Vergleich zu allen anderen Stämmen unabhängig vom pH-Wert immer zu einer stärkeren Ansäuerung des umgebenden Mediums. Eine initiale Alkalinisierung bei pH > 7,0 ist an diesen Vesikeln nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis deutet auf die Funktion als Na⁺/H⁺-Austauscher hin.
- Die Komplementation von EP432 führte zu keinem Ergebnis, da sich nach Transformation mit einem pBAD-Plasmid die komplementierten Stämme in jedem Fall an 170 mM NaCl adaptierten.
- Durch indirekten Nachweis einer Na⁺-induzierten pH-Änderung an energetisierten Zellvesikeln der komplementierten EP432-Stämme mit Acridinorange konnte keine Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität nachgewiesen werden.

3.7 Identifikation von OE5204R als Arginin/Ornithin-Austauscher

Die bioinformatische Analyse lieferte den ersten Hinweis, dass es sich bei OE5204R um den Arginin/Ornithin-Austauscher von *H. salinarum* handeln könnte. Das Ziel der folgenden Experimente war der Nachweis dieser Funktion.

3.7.1 Vergleich des Wachstums zwischen TOM und TOM Δ oe5204R

Der Arginin/Ornithin-Austauscher von *H. salinarum* importiert Arginin und exportiert Ornithin bei fermentativem Wachstum unter anaeroben Bedingungen über den Arginin-Deaminase-Stoffwechselweg [33]. Das Wachstum des Deletionsstamms sollte demnach unter anaeroben Bedingungen mit Arginin als Energiequelle gegenüber dem Wildtyp beeinträchtigt sein, unter aeroben Bedingungen nicht.

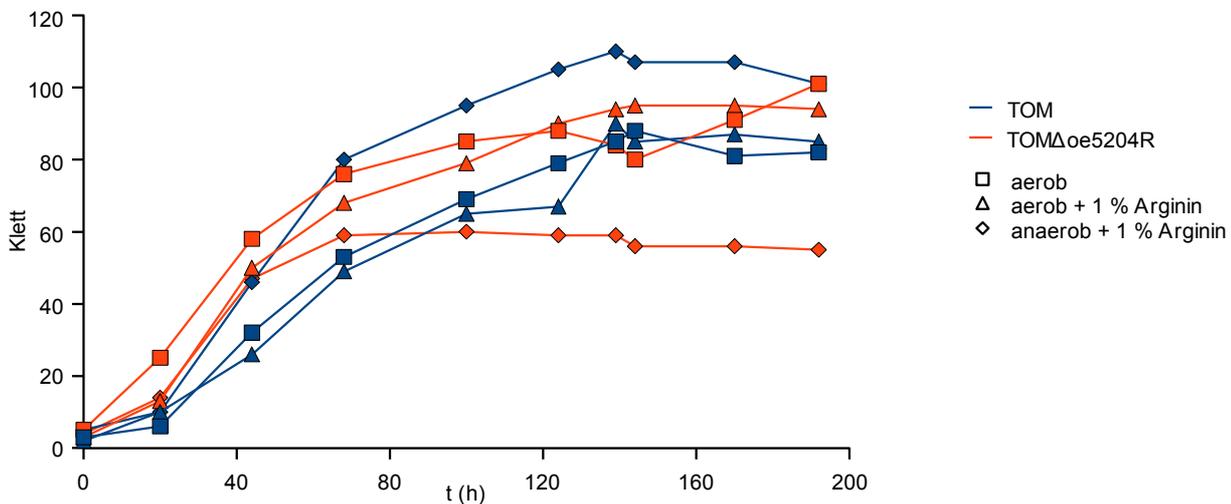


Abbildung 72: Vergleich des Wachstums von TOM und TOM Δ oe5204R aerob, aerob mit 1 % Arginin und anaerob mit 1 % Arginin.

35 ml Komplexmedium wurden mit 1 ml der ausgewachsenen Vorkultur angeimpft und in einem 100 ml KlettKolben bei 40°C und 110 UpM geschüttelt. Für aerobe Bedingungen wurde der Kolben luftdurchlässig, für anaerobe Bedingungen luftdicht verschlossen.

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde als Maß für die Zelldichte die Lichtstreuung mit einem Klettphotometer bestimmt. Dargestellt ist die Lichtstreuung der Kulturen gegen die Wachstumszeit.

Vergleicht man das fermentative Wachstum unter anaeroben Bedingungen in Komplexmedium mit 1 % Arginin als zusätzlicher Energiequelle, erreicht der Deletionsstamm in der stationären Phase nur 70 % der Zelldichte im Vergleich zu TOM.

Mit diesem Versuch konnte das erwartete Verhalten von TOM Δ oe5204R bestätigt werden. Damit erhärtet sich der Verdacht, dass dieser offene Leserahmen für einen Arginin/Ornithin-Austauscher kodiert.

3.7.2 Vergleich der Arginin-Aufnahme in TOM- und TOM Δ oe5204R-Zellvesikeln

Zur eindeutigen Identifikation von OE5204R als Arginin-Ornithin-Austauscher wurde, wie von Storch et al. in [33] beschrieben, die durch einen Ornithin-Konzentrationsgradienten getriebene Aufnahme von Arginin in TOM- und TOM Δ oe5204R-Zellvesikel verglichen.

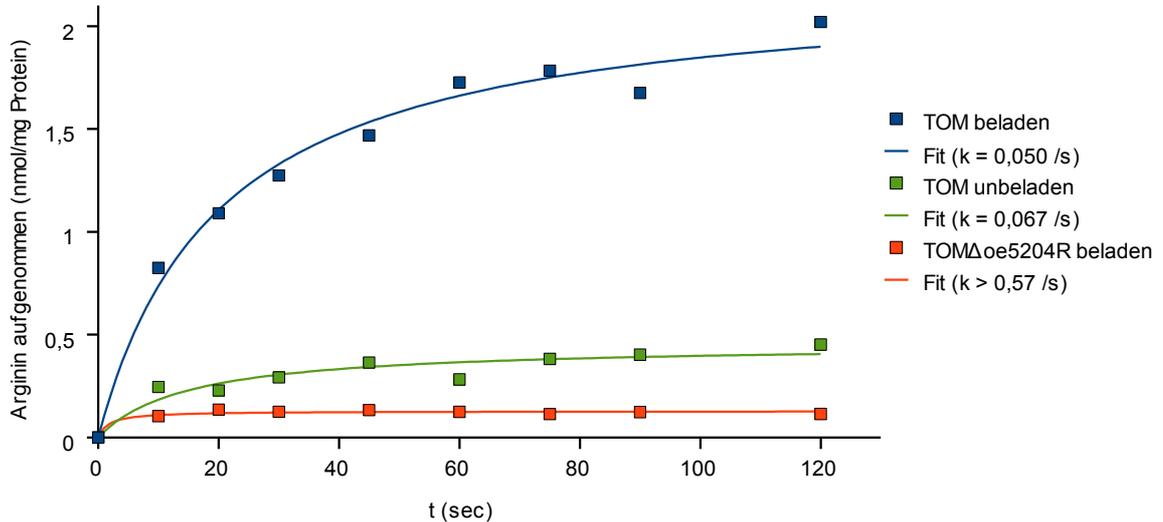


Abbildung 73: Zeitabhängige Aufnahme von Arginin in Zellvesikel von TOM und TOM Δ oe5204R.

40 μ l der Zellvesikel in Basalsalz mit einer Proteinkonzentration von 3 mg/ml wurden in 360 μ l Basalsalz mit 12,5 μ M 1 H-Arginin und 0,5 μ Ci 3 H-Arginin verdünnt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der gesamte Ansatz mit 1 ml Basalsalz verdünnt, durch einen Nitrocellulosefilter mit einem Porendurchmesser von 450 nm gesaugt und zwei mal mit je 1 ml Basalsalz gewaschen. Die Radioaktivität wurde nach dem Auflösen der Filter in Szintilationsflüssigkeit mit einem Szintilationszähler bestimmt. Das Beladen erfolgte durch Inkubation der Vesikel mit 1 mM Ornithin für mindestens 48 Stunden. Kurz vor der Messung wurden die Vesikel 1:10 mit Basalsalz verdünnt, pelletiert und in Basalsalz resuspendiert. Die Messungen wurden bei 0°C durchgeführt.

Dargestellt ist die aus der gemessenen Radioaktivität berechnete Menge aufgenommenen Arginins gegen die Zeit.

Mit 1 mM Ornithin beladene TOM-Vesikel nehmen nach Verdünnung in Basalsalz-Hepes mit 12,5 μ M Arginin und 0,5 μ Ci 3 H-Arginin 2 nmol Arginin pro mg Gesamtprotein auf. Bei unbeladenen TOM-Vesikeln reduziert sich die aufgenommene Argininmenge auf 0,4 nmol/mg Gesamtprotein. Bei beladenen Vesikeln des Deletionsstamms liegt die Aufnahme mit 0,12 nmol/mg Gesamtprotein noch darunter.

Unter den gewählten Bedingungen beträgt die Geschwindigkeitskonstante des Transports in Zellvesikel mit Arginin/Ornithin-Austauscher bei 0,050 /s, in Zellvesikel ohne Arginin/Ornithin-Austauscher bei > 0,57 /s. Der Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten deutet darauf hin, dass die beim Deletionsstamm gemessenen Argininmengen nicht auf einen Transportvorgang in die Vesikel, sondern auf unspezifisch an Filter und Vesikel gebundenes und durch Waschen nicht entferntes 3 H-Arginin zurückzuführen sind und damit den Hintergrund der Messung darstellen.

Da in [33] gezeigt wurde, dass der Arginin/Ornithin-Austausch perfekt symmetrisch ist, wurde auf den Nachweis des Transports in umgekehrte Richtung verzichtet. Die Restaktivität der unbeladenen Vesikel deutet auf die Fähigkeit zum Arginin-Uniport hin.

Mit diesem Experiment gelang die Identifikation von OE5204R als Arginin-Ornithin-Austauscher.

3.7.3 Rekombination von TOM Δ oe5204R mit oe5204R-HIS

Um zu zeigen, dass der Verlust der Arginin/Ornithin-Austauscheraktivität von TOM Δ oe5204R-Zellvesikeln auf das Fehlen von OE5204R zurückzuführen ist und kein Klonierungsartefakt darstellt wurde der Deletionsstamm TOM Δ oe5204R durch Transformation mit dem Plasmid pBPHM-oe5204R-HIS komplementiert und die Funktionalität von OE5204R-HIS nachgewiesen.

Vergleich der Expression von OE5204R und OE5204R-HIS

Durch 2D-Gelelektrophorese (Blue-native / SDS-PAGE) wurde die Expression von OE5204R und OE5204R-HIS in der Membranfraktion des jeweiligen Stamms nachgewiesen und die Expressionslevel als Anhaltspunkt für den folgenden Aktivitätsnachweis grob verglichen.

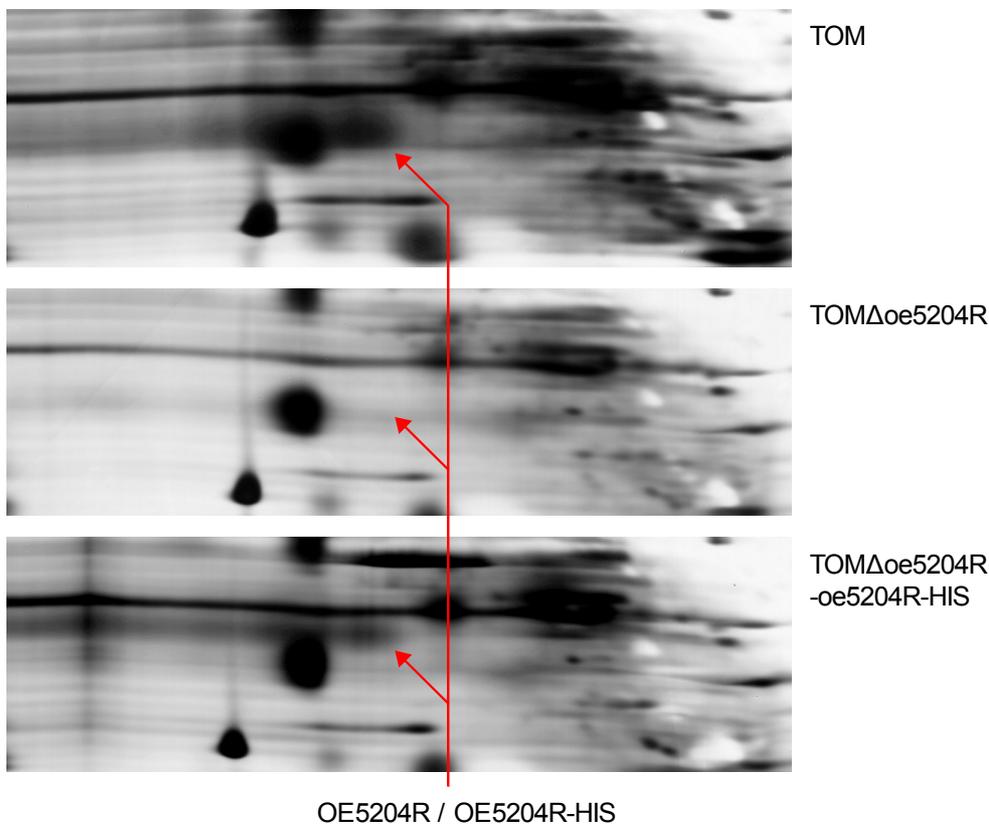


Abbildung 74: Vergleich der Menge von OE5204R bzw. OE5204R-HIS in den Membranfraktionen des Wildtyps, des Deletionsstamms und des komplementierten Deletionsstamms. 200 μ g Protein der jeweiligen Membranfraktion wurden in der ersten Dimension durch Blue Native Gelelektrophorese und in der zweiten Dimension durch Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteindetektion erfolgte durch Silberfärbung. Die Identifizierung von OE5204R/OE5204R-HIS auf den 2D-Gelen erfolgte durch Vergleich mit dem Gel des Deletionsstamms und Massenspektrometrie. Die Identität von OE5204R-HIS wurde zusätzlich durch Westernblot nachgewiesen. Diese Abbildung zeigt die relevanten Ausschnitte aus den 2D-Gelen.

Die Expression von OE5204R-HIS im komplementierten Deletionsstamm liegt ca. um den Faktor 5 unter der von OE5204R in TOM.

3.7.4 Nachweis der Arginin-Aufnahme in TOM Δ oe5204R-oe5204R-HIS-Zellvesikel

Um die Aktivität von OE5204R-HIS zu bestätigen, wurde die durch Ornithin getriebene Arginin-Aufnahme in Vesikel des mit oe5204R komplementierten Deletionsstamms mit der Aufnahme in Vesikel des Deletionsstamms unter den selben Bedingungen wie im vorhergehenden Experiment verglichen.

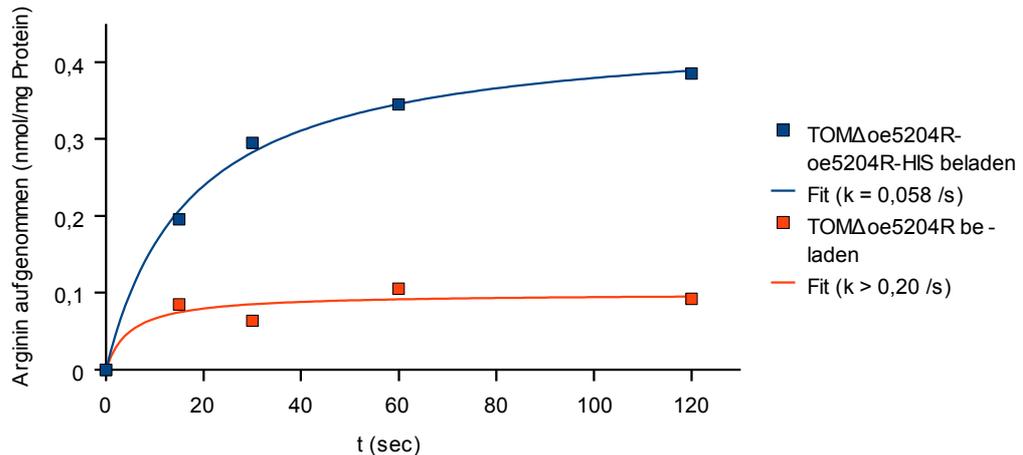


Abbildung 75: Zeitabhängige Aufnahme von Arginin in Zellvesikel des Deletionsstamms und des mit oe5204R-HIS komplementierten Deletionsstamms.

40 μ l der Zellvesikel in Basalsalz mit einer Proteinkonzentration von 3 mg/ml wurden in 360 μ l Basalsalz mit 12,5 μ M 1 H-Arginin und 0,5 μ Ci 3 H-Arginin verdünnt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der gesamte Ansatz mit 1 ml Basalsalz verdünnt, durch einen Nitrocellulosefilter mit einem Porendurchmesser von 450 nm gesaugt und zwei mal mit je 1 ml Basalsalz gewaschen. Die Radioaktivität wurde nach dem Auflösen der Filter in Szintillationsflüssigkeit mit einem Szintillationszähler bestimmt. Das Beladen erfolgte durch Inkubation der Vesikel mit 1 mM Ornithin für mindestens 48 Stunden. Kurz vor der Messung wurden die Vesikel 1:10 mit Basalsalz verdünnt, abzentrifugiert und in Basalsalz resuspendiert. Die Messungen wurden bei 0°C durchgeführt.

Dargestellt ist die aus der gemessenen Radioaktivität berechnete Menge aufgenommenen Arginins gegen die Zeit.

An Zellvesikeln des komplementierten Stamms konnte wieder eine Argininaufnahme nachgewiesen werden. Die Geschwindigkeitskonstante des Transports von 0,058 /s ist mit der an TOM-Vesikeln bestimmten von 0,050 /s vergleichbar, die aufgenommene Argininmenge liegt jedoch um den Faktor 5 darunter. Dieser Wert korreliert sehr gut mit dem Verhältnis der Expressionslevel von OE5204R zu OE5204R-HIS, das durch 2D-Elektrophorese bestimmt wurde.

3.7.5 Homologe Expression in *H. salinarum* und Isolierung

Der offene Leserahmen von oe5204R wurde um einen C-terminalen HIS-Tag erweitert. Als Expressionsvektor wurde pBPH-M, als Expressionsstamm TOM (*H. salinarum*) eingesetzt. Nach Transformation des Expressionsplasmids stand nur ein positiver Klon zur Verfügung. Ein Vergleich der Expression verschiedener Klone war aus diesem Grund nicht möglich.

Die Expression erfolgte in 1 l Komplexmedium, das mit 35 ml Vorkultur angeimpft und in einem 2 l-Erlenmeyerkolben bei 37°C und 110 UpM geschüttelt wurde. Die Zellen wurden in der stationären Phase nach ca. 5 Tagen geerntet.

Die Membranpräparation und -solubilisierung sowie die Metallaffinitätschromatographie wird in Material und Methoden beschrieben. Nach Auftragen des Solubilisats wurde die NiNTA-Säule (HiTrap Chelating, Amersham) mit einer Imidazolkonzentration von 50 mM gewaschen, die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten auf 250 mM Imidazol. Die Chromatographiepuffer enthielten 1 M Harnstoff.

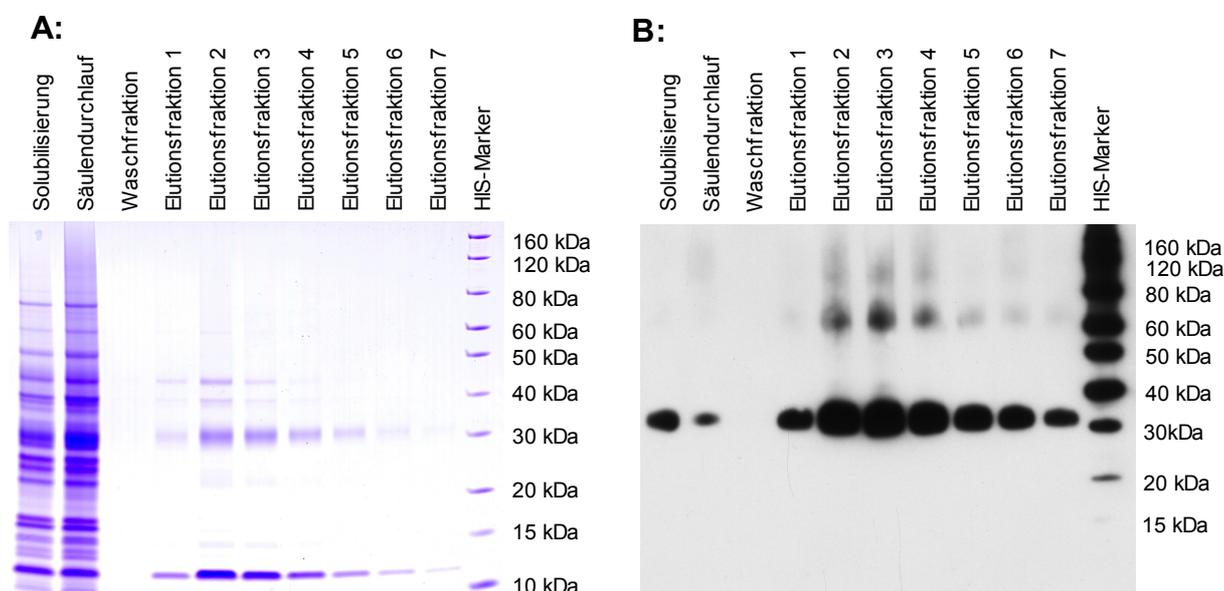


Abbildung 76: Das Ergebnis der Isolierung von OE5204R-HIS.

A: Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel). Von der Solubilisierung und dem Säulendurchlauf wurden je 10 µg Protein, von der Waschfraktion und den Elutionsfraktionen ein Volumen, das bei Elutionsfraktion 2 2 µg Protein entsprach, aufgetragen. Diese Abbildung zeigt die unspezifische Proteindetektion durch Coomassiefärbung im Gel.

B: Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel). Von der Solubilisierung und dem Säulendurchlauf wurden je 1 µg Protein, von der Waschfraktion und den Elutionsfraktionen ein Volumen, das bei Elutionsfraktion 2 0,02 µg Protein entsprach, aufgetragen. Das Protein wurde durch Westernblot vom Gel auf eine PVDF-Membran übertragen.

Diese Abbildung zeigt das Ergebnis der immunologischen Detektion des Histidin-Tags.

Der Westernblot zeigt, dass OE5204R-HIS, berechnetes Molekulargewicht 51 kDa, auf einem NuPAGE-MES 4 - 12 % Gradientengel bei 32 kDa läuft. Außerdem sind noch Banden bei ca. 65 kDa und 100 kDa vorhanden, die dem Dimer bzw. Trimer zugeordnet werden können. Degradationsprodukte sind nicht zu erkennen. Durch Coomassiefärbung eines entsprechenden Gels wird deutlich, dass die Elutionsfraktionen stark verunreinigt sind. OE5204R-HIS konnte mit einer Reinheit von ca. 20 % bei einer Ausbeute von 200 µg pro Liter Kultur isoliert werden.

3.7.6 Untersuchung der elektrogenen Reaktion von OE5204R-HIS-Proteoliposomen

Als zusätzlicher Aktivitätsnachweis wurde die durch Substratbindung induzierte elektrogene Reaktion von adsorbierten OE5204R-HIS-Proteoliposomen ausgewertet.

OE5204R-HIS wurde homolog in *H. salinarum* exprimiert und durch NiNTA-Chromatographie gereinigt. Die Liposomen wurden aus Gesamtlipidextrakt von *H. salinarum* durch Extrusion mit einem Polycarbonatfilter (Porendurchmesser 200 nm) hergestellt. Die Rekonstitution des isolierten Proteins in die Liposomen ($m_{\text{Lipid}} / m_{\text{Protein}} = 10 : 1$) erfolgte durch Detergenzentzug mit Polystyroladsorber (Biobeads).

Ein Sensor für das Detektionssystem SURFE²R One (Iongate) wurde mit OE5204R-HIS-Proteoliposomen beschichtet und der durch den Austausch der im Puffer enthaltenen Aminosäure hervorgerufene Stromfluss gemessen.

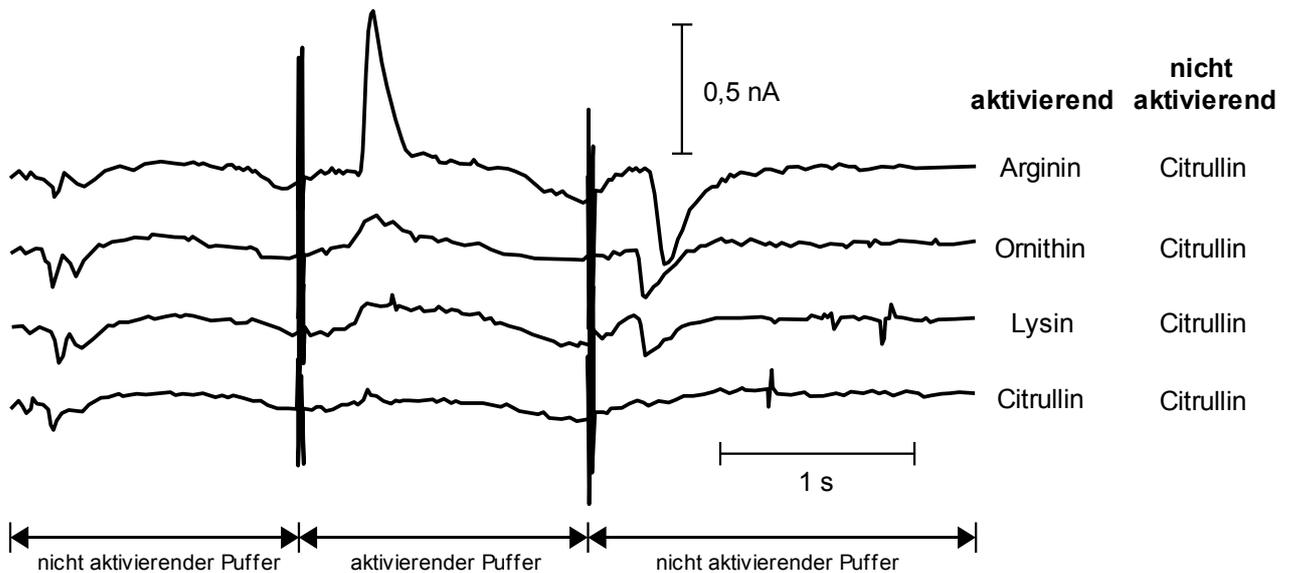


Abbildung 77: Der von adsorbierten OE5204R-HIS-Proteoliposomen induzierte Stromfluss.

Ein Konzentrationsprung von 10 mM einer Aminosäure wurde an einem Sensor mit adsorbierten OE5204R-HIS-Proteoliposomen durchgeführt. Der Pufferwechsel erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Schritten im Abstand von 1,5 Sekunden bei einem Druck von 100 mbar. Der Sensor wurde mit 20 μl OE5204R-HIS-Proteoliposomen beschichtet (Lipidkonzentration 1 mg/ml, $m_{\text{Lipid}} : m_{\text{Protein}} = 10 : 1$). Pufferzusammensetzung: 1 M NaCl, 10 mM MgCl_2 , 50 mM Tris, pH 7,5. Zusätzlich enthielt der nicht aktivierende Puffer 10 mM Citrullin, der aktivierende Puffer 10 mM Arginin, Ornithin, Lysin oder Citrullin.

Dargestellt ist der als Reaktion auf den Austausch der angegebenen Aminosäuren gemessene Stromfluss.

Als nicht aktivierende Aminosäure wurde in allen Fällen Citrullin eingesetzt. Beim Wechsel gegen Arginin war ein Stromfluss von 0,5 nA messbar. Der Effekt von Ornithin und Lysin lag um den Faktor 5 unter dem bei Arginin gemessenen Wert.

Arginin führt an einem mit OE5204R-HIS-Proteoliposomen beschichteten Sensor im Vergleich zu den anderen getesteten Aminosäuren zu einem signifikanten elektrischen Signal. Der Effekt von Ornithin liegt auf dem Niveau der Negativkontrolle Lysin. Aus diesem Ergebnis kann eine Bindung von Arginin abgeleitet werden, für Ornithin ist das nicht möglich. Eine Transportaktivität kann aus der Messung mit Arginin nicht abgeleitet werden, da gegen Citrullin gemessen wurde und dadurch kein Austauschpartner zur Verfügung stand.

3.7.7 Zusammenfassung

OE5204R konnte durch folgende Ergebnisse als Arginin/Ornithin-Austauscher identifiziert werden:

- Das Wachstum des Deletionsstamms war unter anaeroben Bedingungen gegenüber TOM entsprechend den theoretischen Vorhersagen beeinträchtigt.
- Zellvesikel des Deletionsstamms zeigten keine Arginin/Ornithin-Austauscheraktivität.
- Durch Komplementierung des Deletionsstamms mit oe5204R-HIS konnte die Arginin/Ornithin-Austauscheraktivität zum Teil wieder hergestellt werden.
- Durch elektrische Messungen am isolierten und in Liposomen rekonstituierten Protein konnte die Bindung von Arginin gezeigt werden.

4 Diskussion

4.1 Das mathematische Modell der elektrischen Messung elektrogenen Transports

4.1.1 Bacteriorhodopsin als Stromquelle

Die Darstellung des Ladungstransports durch Bacteriorhodopsin als spannungsabhängige Stromquelle stellt eine Vereinfachung dar. Das physikalische Modell geht immer vom Transport einer ganzen Elementarladung aus. Der Transportzyklus besteht jedoch aus einer primären Deprotonierung und einer sekundären Reprotonierung dieses Proteins. Diese beiden Teilschritte gehen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und Anteilen in den Transport einer Elementarladung ein (Deprotonierung 0,2 e, 76 μ s; Reprotonierung 0,8 e, 10 ms; [74], [76], [77]). Im Fall von BR-D96N ist nur die Reprotonierung von der Azidkonzentration abhängig. Zu Beginn der Belichtung überwiegt die Deprotonierung, bis sich ein Gleichgewicht zwischen De- und Reprotonierung eingestellt hat. Dieser Schritt läuft sehr schnell ab und äußert sich in einem initialen Peak, der vom Modell nicht wiedergegeben wird. Diese Abweichung fällt besonders beim Vergleich der Messung mit BR-D96N-Proteoliposomen ohne Azid mit dem Modell auf. Nach der Belichtung wird deprotoniertes Bacteriorhodopsin wieder reprotoniert. Das führt dazu, dass der Ladungstransport nicht mit dem Ende der Belichtung sondern erst mit der vollständigen Reprotonierung von Bacteriorhodopsin abgeschlossen ist. Auch dieses Verhalten wird vom physikalischen Modell nicht wiedergegeben. Die daraus resultierende Abweichung zwischen Modell und Messung ist an allen gezeigten Beispielen erkennbar.

4.1.2 Unterbestimmtheit des Gleichungssystems

Die mit dem mathematischen Modell bestimmten Größen für $R_{PI/A}$, $C_{PI/B}$, $R_{PI/B}$ und $H^+/BR/min$ basieren auf den aus der angenommenen Geometrie abgeleiteten Größen $C_{PI/A}$, n_{BR} , n_{PI} und dem maximal erreichbaren Membranpotential U_{max} .

Wurde durch Optimierung von $R_{PI/A}$, $C_{PI/B}$, $R_{PI/B}$ und $H^+/BR/min$ die beste Übereinstimmung zwischen Rechnung und Messung erreicht, ist es nicht möglich diesen Fehler durch Optimierung von $C_{PI/A}$, n_{BR} , n_{PI} und U_{max} weiter zu verringern. Die Änderung eines geometrisch bestimmten Parameters führt immer zu einem größeren Fehler, der aber durch Optimierung der anderen Parameter immer auf den Ausgangswert verbessert werden kann. Für ein gemessenes Signal wird also mit beliebigen aus der Geometrie abgeleiteten Parametern immer die gleiche durch $R_{PI/A}$, $C_{PI/B}$, $R_{PI/B}$ und $H^+/BR/min$ bestimmte Funktion mit der bestmöglichen Übereinstimmung gefunden. Das bedeutet, dass die für $R_{PI/A}$, $C_{PI/B}$, $R_{PI/B}$ und $H^+/BR/min$ bestimmten Größen nur für die eine festgelegte Geometrie Gültigkeit besitzen und dass durch Vergleich zwischen Rechnung und Messung die geometrisch bestimmten Parameter nicht optimiert werden können.

4.2 Methodenvalidierung der elektrischen Messung elektrogenen Transports

Zum Nachweis elektrogenen Transports über die Membran von Proteoliposomen wurde das Detektionssystem SURFE²R One der Firma Iogate eingesetzt. Das gemessene lichtinduzierte Signal lag bei durchschnittlich 0,6 nA und bei einer Einzelmessung mindestens um den Faktor 30 über dem Rauschen. Durch Mittelwertbildung aus mehreren Messungen war es möglich diesen Faktor auf > 100 zu steigern.

Die aus isoliertem Lipid von *H. salinarum* hergestellten Proteoliposomen erwiesen sich als geeignet zur Beschichtung der Sensoroberfläche. Diese Lipide waren erste Wahl, da diese Methode zur Charakterisierung elektrogener Transportvorgänge an Membranproteinen halophiler Archaeen eingesetzt werden sollte und so zur Rekonstitution dieser Proteine die Lipide des Ursprungsorganismus eingesetzt werden konnten. Die zur Beschichtung eines Sensors mit Proteoliposomen minimal notwendige Zeit wurde mit zwei Stunden ermittelt. Längere Adsorptionszeiten hatten, wie von Iogate angegeben, keine negativen Auswirkungen. Die zur Oberflächenbeschichtung optimale Menge lag bei 5 - 10 µl Proteoliposomen mit einer Lipidkonzentration von 2 mg/ml. Größere Mengen führten zu einer Abnahme des Signals auf 50 % des Maximalwerts. Die Oberflächenchemie erwies sich dabei als äußerst robust. Mehr als 90 % der präparierten Sensoren waren funktionstüchtig. Zur Messung elektrogener Transportvorgänge, die durch einen Konzentrationsgradienten getrieben werden, wurde der Puffer an der Oberfläche des Sensors mit einem Druck von 100 mbar gewechselt. Dabei nahm das Signal eines mit Bacteriorhodopsin-Proteoliposomen beschichteten Sensors innerhalb der ersten sechs Pufferwechsel auf 65 % des Ursprungswertes ab. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass lose gebundene Proteoliposomen weg gespült wurden. Weitere Pufferwechsel führten zu keiner weiteren Abnahme des Signals. Die mechanische Stabilität der Oberflächenbeschichtung ist für Pufferwechsellmessungen ausreichend.

Der durch kapazitive Kopplung mit der Oberfläche des Sensors induzierte Strom gibt die relative Änderung des Membranpotentials der Proteoliposomen wieder. Der Zusammenhang zwischen initialem lichtinduzierten Strom und der Transportaktivität konnte nachgewiesen werden. Sowohl die Lichtintensität, die zur halbmaximalen Transportaktivität von Bacteriorhodopsin führt, als auch die Azidkonzentration, die bei einem mit BR-D96N-Proteoliposomen beschichteten Sensor zur halbmaximalen Aktivitätssteigerung führt, sind mit den Literaturwerten vergleichbar.

Die zur Validierung des Detektionssystems SURFE²R One durchgeführten Experimente mit Bacteriorhodopsin-Proteoliposomen zeigten, dass diese Methode zum universellen Nachweis eines elektrogenen Transports über die Membran von Proteoliposomen geeignet ist.

4.3 Expression und Isolierung von Membranproteinen

Die homologe präparative Expression der identifizierten Na^+/H^+ -Austauscherhomologen von *H. salinarum* war in zwei (OE3889R und OE5204R) von sechs Fällen erfolgreich. Es ist unklar, warum in vier Fällen noch nicht einmal der Nachweis der Expression durch Westernblot möglich war, da mit Ausnahme des exprimierten offenen Leserahmens alle anderen Parameter wie Stamm, Plasmid und damit auch der Promotor gleich waren. Die Ausbeute an isoliertem Protein lag bei 0,20 - 0,25 mg/l Kultur.

In einem (NP1832A) von sieben Fällen erfolgreich war die heterologe Expression der identifizierten Na^+/H^+ -Austauscherhomologen von *H. salinarum* und *N. pharaonis* in EP432 mit dem pBAD-Expressionssystem, das auf die native RNS-Polymerase von *E. coli* zurückgreift. Die Expression von NP1576A-HIS und NP4702A-HIS war in EP432 mit pBAD-Plasmid nicht, in BL21(DE3)Rosetta mit einem pET27bMod-Vektor jedoch mit hohen Ausbeuten möglich. Diese geringe Erfolgsquote kann demnach auf das, im Vergleich zu T7-Expressionssystemen, geringen Transskriptionniveau und die fehlende Substitution seltener tRNSs zurückgeführt werden. Der Einsatz der pET-Vektoren in EP432 war nicht möglich, da die Transkription auf eine genomisch kodierte T7-Polymerase angewiesen ist, über die EP432 nicht verfügt. Die Substitution seltener tRNSs scheiterte daran, dass das Rosetta-Plasmid Chloramphenicolresistenz vermittelt, EP432 diese jedoch als Relikt aus der Deletion der Na^+/H^+ -Austauscher auf der genomischen DNA kodiert.

Die präparative Expression der Na^+/H^+ -Austauscherhomologen von *N. pharaonis* in BL21(DE3)Rosetta mit dem pET27bMod-Vektor war in allen Fällen erfolgreich. Dieses System erwies sich auch als geeignet zur Expression der Retinalproteine Halorhodopsin von *N. pharaonis* und Acerhodopsin von *A. acetabulum*. Die Ausbeute an isoliertem Protein lag bei 0,12 - 1,2 mg/l Kultur.

Es stellte sich heraus, dass die zur Induktion eingesetzte IPTG-Konzentration, ein Faktor der bei der Expression löslicher Proteine weitgehend unberücksichtigt bleibt, einen erheblichen Einfluss auf den Expressionslevel der Membranproteine hat. Bei NP1832A-HIS wurde die stärkste Expression ohne IPTG erreicht, bei Acerhodopsin-HIS wurde ein scharfes Optimum bei 22 μM IPTG gefunden und bei NP4702A-HIS führte die höchste IPTG-Konzentration von 1mM zur maximalen Expression. Die Ursachen für diese extremen Unterschiede sind unklar.

Die Expression der Retinalproteine in einem zellfreien *E. coli* Expressionssystem war im Fall von Acerhodopsin erfolgreich. Die Funktion des isolierten Proteins konnte nachgewiesen werden. Dies deutet auf einen selbständigen Faltungsmechanismus hin.

Die Isolierung der solubilisierten Membranproteine durch NiNTA-Chromatographie führte zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Mit den Retinalproteinen konnten Reinheitsgrade $> 90\%$ erzielt werden. Wurde diese Reinigungsmethode unverändert auf die Na^+/H^+ -Austauscherhomologen von *N. pharaonis* angewendet, war das isolierte Protein deutlich stärker verunreinigt. Auch durch Modifikation des Protokolls konnten nur Reinheitsgrade von 20 - 70 % erzielt werden. Da alle Parameter der Proteinisolierung von Retinalproteinen und Na^+/H^+ -Austauscherhomologen vergleichbar waren, kann ausgeschlossen werden, dass die zusätzlichen Verunreinigungen durch unspezifische Bindung an das Säulenmaterial entstanden. Es ist wahrscheinlicher, dass die Verunreinigungen an das zu isolierende Protein gebunden und dadurch am Säulenmaterial immobilisiert waren. Dies kann durch die größeren lipophilen Bereiche der im Vergleich zu den Retinalproteinen (7 Transmembrandomänen) großen Na^+/H^+ -Austauscherhomologen (10 - 13 Transmembrandomänen) erklärt werden. Vergleicht man die erzielte Reinheit mit der Anzahl der Transmembrandomänen, kann folgender Zusammenhang hergestellt werden:

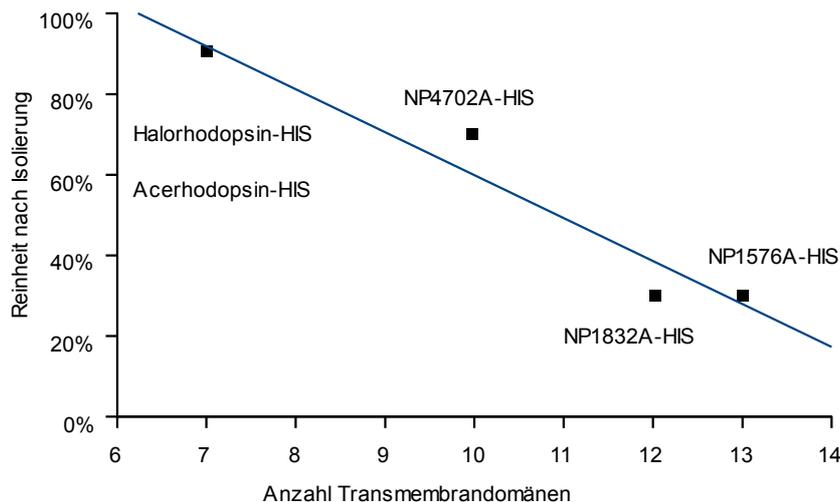


Abbildung 78: Anzahl der Transmembrandomänen gegen die erzielte Reinheit des isolierten Proteins nach NiNTA-Chromatographie.

Mit zunehmender Lipophilie scheinen unspezifische Bindungen zwischen dem zu isolierenden Membranprotein und anderen Proteinen zuzunehmen. In dieser Arbeit wurde zur Solubilisierung von Membranproteinen ausschließlich DDM eingesetzt. Möglicherweise besitzen andere Detergentien die Fähigkeit, die unspezifischen lipophilen Bindungen stärker zu reduzieren.

4.4 Isolierung und Funktionsnachweis von Halorhodopsin und Acerhodopsin

Halorhodopsin und Acerhodopsin konnten mit außergewöhnlich hoher Reinheit (> 90 %) und großer Menge (0,5 - 1,2 mg/l Kultur) isoliert werden. Im Fall von Acerhodopsin war ohne weitere Reinigungsschritte eine Kristallisation in der kubischen Phase möglich. Leider war die Qualität der aufgenommenen Streumuster nicht ausreichend, um auf die Struktur des Moleküls zu schließen. Kristallisationsexperimente mit Halorhodopsin waren erfolglos.

Bei Halorhodopsin liegt das theoretische Verhältnis zwischen der Absorption des Opsin und der des Retinals liegt bei 1,29 : 1. Praktisch erzielt wurde ein Verhältnis von 1,64 : 1. Das isolierte Protein enthält demnach noch Verunreinigungen, die für das Scheitern der Kristallisationsexperimente verantwortlich sein könnten.

Bei Acerhodopsin liegt das theoretische Verhältnis zwischen der Absorption des Opsin und der des Retinals liegt bei 1,40 : 1. Praktisch erzielt wurde ein Verhältnis von 1,43 : 1. Die Reinheit des isolierten Proteins liegt demnach in der Nähe von 100 %.

Die Herstellung der Proteoliposomen und die Beschichtung eines Sensors zum elektrischen Nachweis des elektrogenen Transports konnte ohne Änderung von Bacteriorhodopsin übernommen werden. Die Funktion der Proteine wurde durch die gemessenen Ströme bestätigt, die in ihrer Intensität mit Bacteriorhodopsin vergleichbar waren, was auf eine ähnliche Transportaktivität hindeutet.

4.5 Versuch der Identifikation eines Na⁺/H⁺-Austauschers halophiler Archaeen

Die Charakterisierung des lichtinduzierten Protonentransports von Zellvesikeln der Deletionsstämme von *H. salinarum* lieferte einen Hinweis, dass es sich bei OE1653R um einen Na⁺/H⁺-Austauscher handeln könnte. Im Rahmen dieser Arbeit war es aber nicht möglich einen Na⁺/H⁺-Austauscher von *H. salinarum* oder *N. pharaonis* zweifelsfrei zu identifizieren.

4.5.1 Bioinformatische Analyse des Genoms von *H. salinarum* und *N. pharaonis*

Der Ausgangspunkt der Identifikation eines halophilen Na⁺/H⁺-Austauschers war die Suche nach homologen offenen Leserahmen im Genom von *H. salinarum* und *N. pharaonis* durch Sequenzvergleich mit experimentell identifizierten Na⁺/H⁺-Austauschern anderer Organismen. Das Problem dieser bioinformatischen Analyse bestand darin, dass mit einer Ausnahme alle bis jetzt identifizierten Na⁺/H⁺-Austauscher aus den Domänen der Bakterien und der Eukaryoten stammen und damit die größtmögliche evolutionäre Distanz zu den halophilen Archaeen aufweisen. Erschwerend kommt noch hinzu, dass es sich um eine sehr heterogene Proteinfamilie handelt [81]. Es ist also nicht sichergestellt, dass sich tatsächlich Na⁺/H⁺-Austauscher unter den ausgewählten Kandidaten befinden.

4.5.2 Nachweis von elektrogenem Na⁺/H⁺-Austausch über die Membran von Proteoliposomen

Im Rahmen dieser Arbeit ist es nicht gelungen mit dem Detektionssystem SURFE²R One elektrogenen Na⁺/H⁺-Austausch an NP1832A-HIS- und NP4702A-HIS-Proteoliposomen nachzuweisen.

Die Präparation der Proteoliposomen und die Beschichtung der Sensoren wurde entsprechend den Validierungsexperimenten mit Bacteriorhodopsin durchgeführt. Die Versuchsbedingungen wurden in Anlehnung an die Publikation von Zuber et al. [68], in der vergleichbare Messungen mit NhaA, einem Na⁺/H⁺-Austauscher von *E. coli*, beschrieben werden, gewählt und in einem weiten Bereich variiert.

Alle Erfahrungen, die durch die Validierungsexperimente gesammelt wurden, deuten darauf hin, dass das Problem vermutlich nicht in der Methode zu suchen ist. Die Detektion einer Membranpotentialänderung adsorbierter Proteoliposomen funktioniert zuverlässig. Es ist wahrscheinlicher, dass die eingesetzten Proteine nicht zu einem elektrogenen Na⁺/H⁺-Austausch fähig sind. Die möglichen Gründe dafür sind vielfältig:

- Es handelt sich nicht um Na⁺/H⁺-Austauscher.
- Eine funktionelle heterologe Expression dieser Proteine in *E. coli* ist nicht möglich.
- Der Na⁺/H⁺-Austausch erfolgt elektrisch neutral.
- Eine funktionelle Rekonstitution in Liposomen ist unter den gewählten Bedingungen nicht möglich.
- Die Proteine sind unter den gewählten Messbedingungen oder auf Grund des HIS-Tags nicht aktiv.

Die bioinformatische Identifikation der Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen ist auf Sequenzen experimentell bestätigter Na⁺/H⁺-Austauscher anderer Organismen angewiesen. Da in der Domäne der Archaeen bisher nur ein identifizierter Na⁺/H⁺-Austauscher existiert und die evolutionäre Distanz zu den Domänen der Bakterien und der Eukaryoten sehr groß ist, sind die Ergebnisse unsicher. Eine Möglichkeit, die bioinformatische Identifikation zu verbessern, existiert nicht. Eine heterologe Expression war im Fall der Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen von *N. pharaonis* unumgänglich, da für diesen Organismus keine Transformationsmethode existiert. Die Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Expression könnte erhöht werden, indem man als Expressionsorganismus nicht *E. coli* sondern *H. salinarum* wählt, was jedoch mit einem deutlich höheren Zeitaufwand für die Klonierung verbunden ist.

Ob im Fall von *N. pharaonis* der Na⁺/H⁺-Austausch elektrisch neutral oder, wie bei *H. salinarum* [34], elektrogen erfolgt, ist unbekannt. Es stehen keine etablierten Methoden zur Verfügung, um diese Frage zu klären.

Mit welcher Wahrscheinlichkeit eine funktionelle Rekonstitution in Liposomen gelingt, ist unbekannt. Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode konnten alle untersuchten Retinalproteine erfolgreich rekonstituiert werden. Ob sie auch auf große Membranproteine mit mehr als 10 Transmembrandomänen übertragbar ist, ist unklar.

Die für die Experimente eingesetzte Salzkonzentration war technisch durch das Detektionssystem auf maximal 1 M NaCl begrenzt. Höhere Ionenstärken führten bei Pufferwechsellmessungen zu Artefakten, deren Stromstärke im Bereich des erwarteten Signals lag. Es ist möglich, dass die untersuchten Proteine bei diesen Salzkonzentrationen nicht funktionell sind.

4.5.3 Das Wachstum der Deletionsstämme von *H. salinarum*

Das Wachstum der Deletionsstämme von *H. salinarum* war mit dem des Wildtyps vergleichbar. Ein Na⁺-sensitiver Phänotyp, wie er von *E. coli* bekannt ist [51], konnte nicht nachgewiesen werden. Für dieses Ergebnis gibt es folgende mögliche Erklärungen:

- Es existiert mehr als ein Na⁺/H⁺-Austauscher.
- *H. salinarum* ist gegenüber hoher Na⁺-Konzentration im Zytosol unter den gewählten Versuchsbedingungen resistent.
- Es befindet sich kein Na⁺/H⁺-Austauscher unter den ausgewählten Homologen.

4.5.4 Charakterisierung des lichtinduzierten Protonentransports der Deletionsstämme

Die Charakterisierung des lichtinduzierten Protonentransports von Zellvesikeln der Deletionsstämme von *H. salinarum* führte zu dem Ergebnis, dass Zellvesikel des oe1653R-Deletionsstamms unter allen getesteten Bedingungen einen signifikant höheren H⁺-Nettoexport aufweisen. Daraus kann abgeleitet werden, dass durch OE1653R Protonen, die von Bacteriorhodopsin aus den Vesikeln transportiert wurden, wieder in die Vesikel gelangen. Da eine theoretische Funktion als Protonenpermease unwahrscheinlich ist, muss der Protonenimport an den Transport eines weiteren Substrats gekoppelt sein. Die Messungen wurden in reiner 4M NaCl-Lösung durchgeführt, als Substrate kommen also nur Na⁺ oder Cl⁻ in Frage. Übertragen auf die Funktion von OE1653R deutet das auf einen Na⁺/H⁺-Austausch hin. Theoretisch wäre auch ein Cl⁻/OH⁻ -Austausch möglich, wie von Duschl und Wagner in [78] für *H. salinarum* postuliert. Da jedoch bei der bioinformatischen Selektion kein Hinweis auf diese Funktion gefunden wurde, ist dies unwahrscheinlich. Das Ergebnis kann nur als Hinweis gewertet werden, da es durch vergleichbare Messungen an ganzen Zellen in Basalsalz ohne Citrat nicht bestätigt werden konnte (J. Tittor, nicht veröffentlicht).

Um die Probleme, die durch die Komplexität ganzer Zellen entstehen, zu reduzieren, wurden diese Messungen mit Zellvesikeln durchgeführt. Die Herstellung erfolgte durch Extrusion ganzer Zellen. Vesikel bilden geschlossene Kompartimente, besitzen alle Transportfunktionen der Zelle, beinhalten aber kein Zytoplasma und können dadurch weder ein elektrisches Membranpotential noch Ionengradienten aufbauen. Außerdem wird die Degradation eines Substrats durch den Stoffwechsel der Zelle verhindert. Es besteht jedoch die Gefahr, dass beim Aufbrechen der Zellen auch Vesikel mit umgekehrter Seitenorientierung entstehen. Die Transportaktivität der getesteten Vesikel betrug 33 % des Literaturwerts. Eine Erklärung für diesen Unterschied liegt möglicherweise in der Herstellungsmethode. In [33] wurden die Vesikel durch Einfrieren und Auftauen hergestellt, für diese Experimente wurden sie durch Extrusion hergestellt, was möglicherweise zu einem höheren Anteil an Vesikeln mit umgekehrter Seitenorientierung geführt hat.

Dieses Experiment konnte nur mit den Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen von *H. salinarum* durchgeführt werden, da für *N. pharaonis* keine Transformationsmethode existiert und dieses Experiment mit diesem Organismus durch das Fehlen einer lichtgetriebenen Protonenpumpe prinzipiell nicht möglich ist.

4.5.5 Das Wachstum von EP432 nach heterologer Komplementation

Die heterologe Komplementation von EP432, einer Na⁺-sensitiven Δ nhaA Δ nhaB Mutante von *E. coli* TA15 [51], mit den offenen Leserahmen der Na⁺/H⁺-Austauscherhomologen von *H. salinarum* und *N. pharaonis* führte zu keinem verwertbaren Ergebnis. Dieser Stamm zeigt eine hohe Sensitivität gegenüber Na⁺, da ein aktiver Transport von Na⁺ aus dem Cytosol auf Grund der Deletion beider Na⁺/H⁺-Austauscher nicht mehr möglich ist. Die Resistenz von EP432 gegenüber Na⁺ kann durch Komplementation mit einem Na⁺/H⁺-Austauscher wieder hergestellt werden. Dies stellt eine Standardmethode zum Nachweis der Aktivität potentieller Na⁺/H⁺-Austauscher dar, die u.a. von Strausak et al. zur Identifikation des Na⁺/H⁺-Austauschers von *Enterococcus hirae* in [53] eingesetzt wurde. Erstaunlicherweise war EP432 nach Transformation mit einem pBAD-Plasmid immer in der Lage, sich an eine Na⁺-Konzentration von 170 mM zu adaptieren, auch ohne Rekombination mit einem potentiellen Na⁺/H⁺-Austauscher, wie im Fall von pHR als Negativkontrolle. In LB-Medium mit 170 mM Na⁺ konnte, entsprechend [51], für EP432 ohne pBAD-Plasmid nie Wachstum gezeigt werden. Die wiedererlangte Na⁺-Resistenz muss demnach auf den Einfluss des Plasmids an sich zurückgeführt werden. Diese Schlussfolgerung stellt die Verwertbarkeit von Wachstumsexperimenten mit rekombinierten EP432-Stämmen zur Identifikation von Na⁺/H⁺-Austauschern grundsätzlich in Frage. Außerdem muss überlegt werden, ob eine hohe zytosolische Na⁺-Konzentration im Bereich der physiologischen Ionenstärke tatsächlich eine systemische Toxizität für die *E. coli* aufweist, oder eher zu einer regulativen Hemmung des Wachstums führt, die auch ohne Na⁺/H⁺-Austausch umgangen werden kann.

4.5.6 Nachweis von Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität der komplementierten EP432-Stämme

Der Nachweis von Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität an Zellvesikeln der rekombinierten EP432-Stämme durch Acridinorange-Fluoreszenz führte ebenfalls zu keinem verwertbaren Ergebnis. Die Funktion der Methode konnte durch Positiv- (DH5 α) und Negativkontrolle (EP432) bestätigt werden. Bei keinem der rekombinierten Stämme war Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität nachweisbar, was jedoch keine Aussagekraft besitzt, da mit Ausnahme von NP1832A-HIS keine Expression nachweisbar und auch in diesem Fall auf Grund der heterologen Expression die Funktionalität nicht sichergestellt war.

4.6 Beurteilung des Detektionssystems SURFE²R One

Detektion eines elektrogenen Transports

Aus den Validierungsexperimenten und der physikalischen Betrachtung lässt sich eine generelle Eignung dieser Methode für den quantitativen Nachweis elektrogener Transportvorgänge über die Membran von Proteoliposomen oder Zellvesikeln ableiten.

Die Auswertung der Messungen mit BR-D96N-Proteoliposomen ergab, dass bei elektrogenen Transportvorgängen bereits ab einer initialen Transportgeschwindigkeit von 136 H⁺/BR/min ein auswertbares Signal zur Verfügung steht. Diese Wechselzahl wird von Transportsystemen für kleine Moleküle, soweit bis jetzt bekannt ist, mindestens erreicht. LacY, der Laktose-Transporter von *E. coli*, erreicht eine Wechselzahl von 1000 /min [86]. NhaA, ein Na⁺/H⁺-Austauscher von *E. coli*, erreicht 90000 /min [79].

Identifikation von Teilschritten eines elektrogenen Transports

Im Fall des lichtgetriebenen Transportvorgangs von BR-D96N ist es möglich, Teilschritte des Transportvorgangs zu identifizieren. Zu Beginn der Belichtung ist die initiale Deprotonierung und nach Beendigung der Belichtung ist die Reprotonierung zu erkennen. Das bedeutet, dass das Detektionssystem SURFE²R One in der Lage ist, Ladungsverschiebungen kleiner einer Elementarladung pro Transportprotein nachzuweisen. Dies gelingt, weil das Licht als treibende Kraft die gesamte Sensoroberfläche zum selben Zeitpunkt erreicht und der Transport im Vergleich zur zeitlichen Auflösung des Messsystems (1 ms Abtastrate) langsam erfolgt. Im Fall von BR-WT sind auf Grund der höheren Geschwindigkeit des Transports diese Teilschritte nicht mehr erkennbar. Wird ein Transportvorgang durch einen Pufferwechsel getrieben, verringert sich die zeitliche Auflösung erheblich, da die Front des Puffers ca. 5-10 ms benötigt, um die gesamte Sensoroberfläche zu erreichen und deswegen den limitierenden Faktor darstellt. Unter diesen Bedingungen ist es nicht möglich, Teilschritte eines Transports zu identifizieren, die schneller ablaufen.

Nachweis eines elektrisch neutralen Transports

Auf Grund der zum Anfluten des Puffers notwendigen Zeit ist dieses System zum Nachweis von elektrisch neutralen Transportvorgängen, die durch einen Pufferwechsel getrieben werden, ungeeignet, auch wenn Teilschritte eines solchen Transports elektrogen erfolgen. Unter der Annahme, dass der Transportvorgang im Vergleich zum Pufferwechsel auf der Oberfläche des Sensors schnell abläuft, löscht sich das Signal aus, da die Transportvorgänge an unterschiedlichen Positionen auf der Sensoroberfläche zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestartet werden.

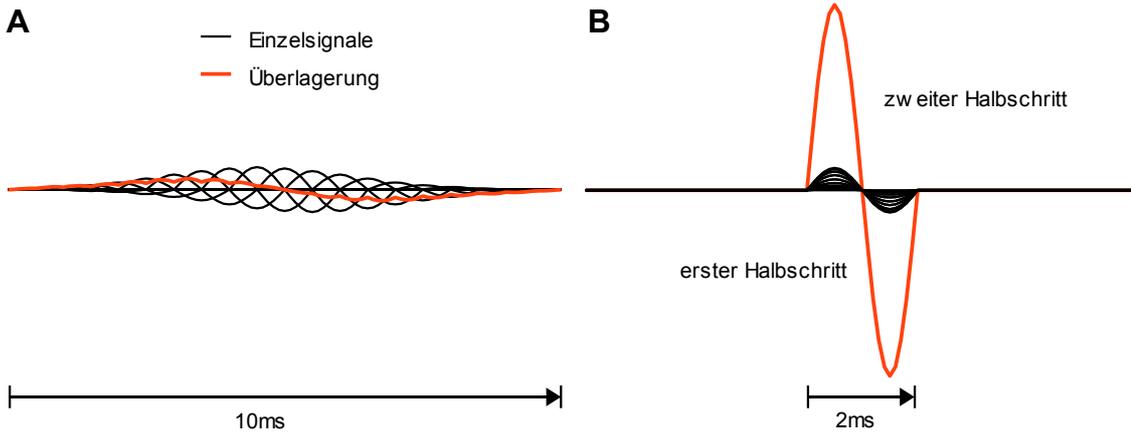


Abbildung 79: Signalauslöschung durch phasenverschobene Überlagerung von Einzelsignalen eines elektrisch neutralen Transports mit elektrogenen Halbschritten.

A: Für 17 in einem Zeitraum von 10 ms um je 0,5 ms phasenverschobene und entsprechend der Gauß-Verteilung gewichtete Einzelsignale mit einer Länge von 2 ms wurde die Überlagerung berechnet.

B: Zum Vergleich die Berechnung der phasensynchronen Überlagerung der Einzelsignale. Abgebildet das relative Signal gegen die Zeit.

Nachweis von elektrogenen Substratbindung

Fehlt bei einem Symport oder bei einem Austausch das Cosubstrat, kann der Transportzyklus nicht vollständig ablaufen. Es findet nur Substratbindung statt. Läuft dieser Teilschritt elektrogen ab, kann er detektiert werden, da keine Signalauslöschung durch den zweiten Halbschritt mit entgegengesetztem elektrogenem Effekt stattfindet. Für das Beispiel der Argininbindung an OE5204R wurde gezeigt, dass die Empfindlichkeit des Geräts zur Detektion ausreichend ist. Ein weiterer Beleg für die Nachweisbarkeit eines elektrogenen Vorgangs mit einer Ladungsverschiebung kleiner einer Elementarladung pro Protein ist die Darstellbarkeit der initialen lichtinduzierten Deprotonierung von BR-D96N bei einer Messung ohne Azid.

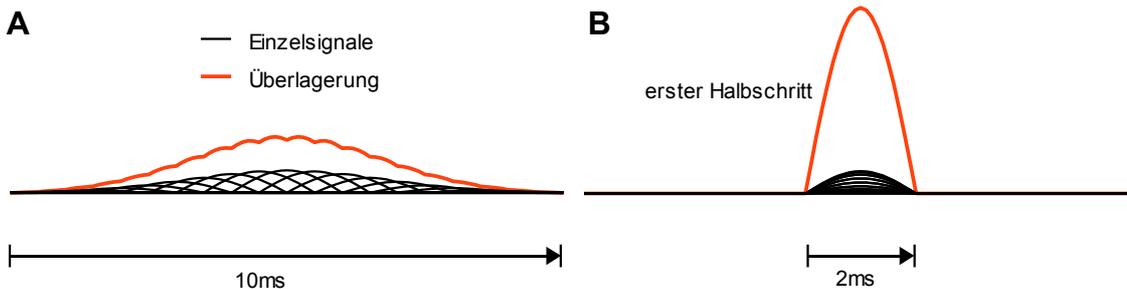


Abbildung 80: Überlagerung phasenverschobener Einzelsignale eines elektrogenen Halbschritts.

A: Für 17 in einem Zeitraum von 10 ms um je 0,5 ms phasenverschobene und entsprechend der Gauß-Verteilung gewichtete Einzelsignale mit einer Länge von 2ms wurde die Überlagerung berechnet.

B: Zum Vergleich die Berechnung der phasensynchronen Überlagerung der Einzelsignale. Abgebildet das relative Signal gegen die Zeit.

Beurteilung der Eignung zum Test auf putative Substrate und zur Charakterisierung eines Transporters

Prinzipiell ist dieses Detektionssystem geeignet, um das Substrat eines Transporters zu identifizieren. In der Praxis existieren zwei erhebliche Einschränkungen.

Eine Voraussetzung ist, dass funktionell rekonstituiertes Protein vorliegt. Solange aber das Substrat eines Transporters unbekannt ist, kann auch mit alternativen Methoden dessen Funktionalität nicht geprüft werden. Dieses grundsätzliche Problem lässt sich nicht umgehen.

Eine weitere Voraussetzung ist, dass das isolierte Protein mit hoher Reinheit vorliegt, die aber, besonders im Fall von Membranproteinen, oft nicht zu erreichen ist. Sind Verunreinigungen mit anderen Proteinen vorhanden, kann jedes gemessene Signal auch darauf zurückzuführen sein.

Kann ein Transportprotein mit bekanntem Substrat funktionell und mit hoher Reinheit isoliert und rekonstituiert werden, ist diese Methode erste Wahl zur Charakterisierung, um mit minimalem Material- und Zeitaufwand ein breites Spektrum verschiedener Bedingungen zu testen.

4.7 Identifikation von OE5204R als Arginin/Ornithin-Austauscher

Durch die an Zellvesikeln durchgeführten Transportexperimente konnte gezeigt werden, dass OE5204R die Zellmembran von *H. salinarum* zum Transport von Arginin befähigt. Die Menge des aufgenommenen Arginins konnte durch Beladen der Zellvesikel mit 1 mM Ornithin um den Faktor 5 erhöht werden. Wurde dieses Experiment unter sonst gleichen Bedingungen mit beladenen Zellvesikeln des Deletionsstamms durchgeführt, lag die Menge des aufgenommenen Arginins um den Faktor 3 unter der, die mit unbeladenen Zellvesikeln des Wildtyps bestimmt wurde. Daraus lässt sich schließen, dass OE5204R der von Storch et al. in [33] charakterisierte Arginin/Ornithin-Austauscher von *H. salinarum* ist.

Durch entsprechende Wachstumsversuche konnte das erwartete Verhalten von TOM Δ oe5204R bestätigt werden. Vergleicht man das fermentative Wachstum unter anaeroben Bedingungen in Komplexmedium mit 1 % Arginin als zusätzlicher Energiequelle, erreicht der Deletionsstamm in der stationären Phase nur 70 % der Zelldichte im Vergleich zu TOM. Obwohl es sich bei Arginin um eine essentielle Aminosäure handelt, ist die Deletion von oe5204R nicht letal, führt aber zu reduziertem Wachstum. Es muss demnach eine weitere Quelle für diese Aminosäure existieren. In Frage kommen unspezifische Aminosäuretransporter oder der Import von Polypeptiden, der auf Grund der bioinformatischen Analyse des Genoms vorhergesagt wird [62]. Zum reduzierten Wachstum kann aber auch beitragen, dass durch die Deletion von oe5204R dem Organismus die Fermentation von Arginin als Energiequelle nur noch eingeschränkt zur Verfügung steht, da Ornithin nicht mehr exportiert werden kann und im Cytosol akkumuliert.

Die Funktionalität von OE5204R-HIS wurde durch Transportmessungen an Zellvesikeln des komplementierten Deletionsstamms nachgewiesen. Nach Isolation und Rekonstitution in Liposomen wurde mit diesem Protein der elektrogene Effekt der Bindung von Arginin und Ornithin mit dem Detektionssystem SURFE²R One untersucht. Für Arginin konnte eine signifikante Ladungsverschiebung gezeigt werden, für Ornithin war dies nicht möglich. Dieses Ergebnis kann mit der Ladung der gebundenen Aminosäure erklärt werden. Arginin ist unter physiologischen Bedingungen einfach positiv geladen, Ornithin ist ungeladen. Bei der Bindung von Arginin wird eine positive Ladung auf der Oberfläche des Sensors immobilisiert, die Bindung von Ornithin erfolgt elektrisch neutral.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass es sich bei OE5204R um den Arginin/Ornithin-Austauscher von *H. salinarum* handelt. Seine physiologische Aufgabe ist die Aufnahme von Arginin und die Abgabe von Ornithin, das bei der Fermentation von Arginin über den ADI-Stoffwechselweg zur Gewinnung von ATP im Cytosol gebildet wird [84].

5 Material und Methoden

5.1 Geräte

Anwendung / Gerät	Name	Hersteller
Amplifikation von DNS Thermocycler	T3000	Biometra
Auftrennung von DNS-Gemischen DNS-Gelkammern	Eigenbau	MPI Martinsried
Auftrennung von Proteingemischen (analytisch)		
Protein-Gelsystem	SDS-Elektrophorese-Tank Protean	Biorad
Protein-Gelsystem	MightySmall Dual Gel Caster SE245	Hoefler
Protein-Gelsystem	MightySmall SE250	Hoefler
Protein-Gelsystem	Xcell SureLock	Invitrogen
Auftrennung von Proteingemischen (präparativ)		
FPLC	P900, UV900, Frac900	Amersham Pharmacia Biotech
Belichtung Quecksilberdampflampe	HBO 100W	Osram
Bestimmung der Fluoreszenz Fluorimeter	LS50B	Perkin Elmer
Bestimmung der Lichtabsorption oder der statischen Lichtstreuung		
Photometer	Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Photometer	Lambda2	Perkin Elmer
Photometer	Nanodrop ND-1000	PeqLab
Photometer	Victor3 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer
Photometer	Photoelectric Colorimeter 800-3	Klett-Summerson
Bestimmung der Lichtintensität Luxmeter	LaserCheck	Coherent
Bestimmung der Partikelgröße DLS	PDDL/CoolBatch 90T + PD2000DLS	Precision Detectors
Bestimmung der Radioaktivität Szintillationszähler Geigerzähler	Tri-Carb 2100 TK LB1210B	Packard Berthold
Bestimmung des Gewichtes Waage Waage	Laboratory LC2200P AT200	Sartorius Mettler
Blot von DNS Vakuumblotrahmen	Eigenbau	MPI Martinsried
Blot von Proteinen Blotkammer	Xcell II Blot Module	Invitrogen
Deionisierung von Wasser Bidestillationsanlage Reverse-Osmose-System	FiStream MilliQplus PF	Fisons Millipore

Anwendung / Gerät	Name	Hersteller
Detektion von elektrogenen Reaktionen auf Oberflächen Detektionssystem	SURFE ² R One	longate
Dokumentation von Protein-Gelen Scanner	Expression 1680 Pro	Epson
Dokumentation von DNS-Gelen Fluoreszenzdetektionssystem	TFPM/WL Vilber Lourmat	LTF Labortechnik
Dosierung von Flüssigkeiten Pipetten	Gilson 2, 10, 100, 200, 1000µl	Abimed
Entwickeln von Röntgenfilmen Röntgenfilmentwickler	X-OMat 1000	Kodak
Fördern von Flüssigkeiten Schlauchpumpe	Minipuls 2	Abimed
Gefriertrocknung Lyophile	Alpha 2-4	Christ
Homogenisierung, Zellaufschluss French Press Ultraschallsonde Ultraschallsonde Ultraschallbad Extruder	French Pressure Cell Press Sonifier 250 Sonifier 450 Modell 1210 Lipofast Basic	Aminco Branson Branson Branson Avestin
Messwertaufnahme Multimeter, A/D-Wandler	VC960	Voltkraft
Pelletierung Zentrifuge Zentrifuge Zentrifuge Zentrifuge Zentrifuge Zentrifuge Zentrifuge	Centrifuge 5417R Roto Silenta/RP TL100 mit Rotor TLA100.3 Centrifuge 5415D Rotixa 120R RC5C mit Rotoren SS-34, SLA-3000 LE-80K mit Rotoren 45Ti, 50Ti, 60Ti, HF20A250	Eppendorf Hettich Beckman Eppendorf Hettich Sorvall Beckman
pH-Messung pH-Messverstärker pH-Messverstärker pH-Elektrode pH-Elektrode	pH27 Modell 511 InLab 423 InLab 422	Knick Bachofer Mettler Toledo Mettler Toledo
Rühren, Schütteln Schüttler Magnetrührer Mischer Schwenktisch Vortexer	AJ120 MR2000 Thermomixer compact 3D Rocking Platform STR9 Vortex Genie 2	Infors Heidolph Eppendorf Stuart Scientific Scientific Industries
Spannungsversorgung Netzteil	0 – 1200 V, 0 – 100 mA	Hölzel Technik

Anwendung / Gerät	Name	Hersteller
Sterilisierung		
Autoklav	Varioklav	H+P Labortechnik
Autoklav	Modell 23	Melag
Autoklav	Getinge Nr. 8690	Schild
Kryostat	RM6	Lauda
UV-DNS-Immobilisierung		
Crosslinker	UV-Stratalinker 2400	Stragtagene
Zelltransformation		
Elektroporator	Gene Pulser	Biorad

5.2 Chemikalien

Substanz

Acridinorange Zinkchlorid Doppelsalz	Roth
Agar (Bacto)	Becton, Dickinson & Co
Agarose	Biozym
Albumin bovine Fraction V pH7 (BSA)	Serva
ϵ -Aminocaprinsäure	Fluka
Ammoniumpersulfat	Kodak
Ampicillin-Natrium	Roth
^3H -L-Arginin	Moravек Biochemicals
L-Arginin monohydrochlorid	Sigma
L-Asparagin	Merck
tri-Natrium ATP	Sigma
BisTris	Fluka
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
2-Butanol	Merck
Calciumchlorid	Merck
Chloramphenicol	Serva
Cholinchlorid	Sigma
L-Citrullin	Sigma
Coomassie-Brilliant-Blau G-250	Serva
Coomassie-Brilliant-Blau R-250	Serva
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck
n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid (DDM)	Anatrace
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	Merck
Essigsäure	Fluka
Ethidiumbromid	Sigma
Formaldehyd	Merck
Glycin	Riedel-de Haën
Glyzerin 87%	Riedel-de Haën
Harnstoff	Merck
Hefeextract (Bacto)	Becton, Dickinson & Co
Imidazol	Merck
Iodacetamid	Fluka
IPTG	Gerbu
Kaliumacetat	Riedel-de Haën
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycindisulfat	Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Maleinsäure	Merck
Manganchlorid-Dihydrat	Merck
Mercaptoethanol	Merck
Mevinolin (= Lovastatin)	MST
Natriumcarbonat	Roth
Natriumchlorid	Merck
^{22}Na triumchlorid	Perkin Elmer
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
n-Octyl- β -D-Glycopyranosid (OG)	Anatrace
L-Ornithin monohydrochlorid	Sigma
PEG600	Sigma
Pepton (Bacto)	Becton, Dickinson & Co
2-Propanol	Fluka
Protogel (30%, Acrylamid : Bis-Acrylamid = 37,5 : 1)	National Diagnostic
Rubidiumchlorid	Fluka

D(+)-Saccharose	Roth
Saccharose	Roth
SDS	Serva
L-Serin	Merck
Silbernitrat	Riedel-de Haën
TEMED	Serva
Tricin	Sigma
Tris	Sigma
Triton X-100	Serva
Trypton (Bacto)	Becton, Dickinson & Co
Tween20	Sigma
X-Gal	Roth

Enzym	Aktivität	
BamHI	10 u/µl	Fermentas
BglII	10 u/µl	Fermentas
Dnase I	569 u/mg	Sigma
HindIII	10 u/µl	Fermentas
LA Taq	5 u/µl	TaKaRa Bio Inc.
NcoI	10 u/µl	Fermentas
NdeI	10 u/µl	Fermentas
T4 DNS Ligase	5 u/µl	Fermentas
XhoI	10 u/µl	Fermentas

Antikörper

Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente	Roche
Mouse anti 6x His, DIA 900	Dianova
Goat anti Mouse HRP Conjugate	Biorad

Kit

ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
CSDP Chemiluminescenc Substrate	Roche
pCR2.1-TOPO Kit	Invitrogen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Pure Yield Plasmid Midiprep System	Promega
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
Rapid Translation System RTS 100, E. coli HY Kit	Roche

DNS-Marker

DNA molecular-weight marker VII, DIG-labeled	Roche
Range Mix DNA-Ladder	BIOlidal

Protein-Marker

Multimark Multi-Colored Standard	Invitrogen
ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB
BenchMark His-tagged	Invitrogen

Sonstiges

Nylonmembran für Southernblot	Hybond N+	Amersham Biosciences
Chromatographie-Papier	Chromatography Paper 3 mm Chr	Whatman
Röntgenfilm	Curix HC1.00G	Agfa
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße	15 ml, 50 ml	Falcon
Cellulosenitratfilter	0,22 µM, 0,45 µM, Ø = 25 mm	Sartorius
Elektroporationsküvette	d = 1mm	Biorad
Fertiggele	NuPAGE 4-12% Bis-Tris	Invitrogen
PVDF-Membran für Westernblot	Immobilon-P	Millipore
NTA-Säulen	HiTrap Chelating, V = 1 ml	Amersham Biosciences
Dialyseschlauch	Visking, 14kD	Roth
Detergens-Adsorber	Biobeads SM2 Adsorbent	Biorad
Szintillationsflüssigkeit	Rotiszint eco plus	Roth
Polycarbonatfilter	0,2 µm, Ø= 25 mm	Avestin

5.3 Software, Datenbanken

Anwendung	Name	Quelle
Analyse von Sequenzierungschromatogrammen	FinchTV 1.13	Geospiza
Sequenzanalyse, Primerdesign, Plasmiddesign	ApE 1.12	http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/
Bildbearbeitung	Corel Photopaint 11 Gimp	Corel http://www.gimp.org
Vektorzeichnungen	Corel Draw 11 Open Office Draw 2.3	Corel http://de.openoffice.org/
Textverarbeitung	Open Office Writer 2.3	http://de.openoffice.org/
Programmierung in Turbopascal	Delphi 2005	Borland
DNS/Protein-Alignment	ClustalX	ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/clustalw2
photometrische BR-Quantifizierung in streuenden Proben	PM-Quanti 1.1	diese Arbeit
Quantifizierung von Proteingelen	GelQuanti	diese Arbeit
DNA-/Proteinsequenzdatenbanken	Halolex Pfam NCBI	http://halolex.mpg.de http://pfam.sanger.ac.uk/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

5.4 Stämme

Folgende Stämme wurde in dieser Arbeit verwendet:

E. coli

DH5 α	F ⁻ , endoA1, hsdR17 (rK ⁻ , rK ⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, D (argF-lacZya) U169, F80dlacZDM15	Gibco BRL
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
EP432	melBLid, Δ nhaB1, cam ^R , Δ nhaA1, kan ^R , Δ lacZY, thr1	Pinner et al. 1993

H. salinarum

S9	BR ⁺⁺ , HR ⁺ , SRI ⁺ , SRII ⁺ , Car, Rub ⁺ , Ret ⁺ , Vac ⁻	(Stoeckenius <i>et al.</i> , 1979)
Snob	bop ⁻ , HR ⁺ , SRI ⁺ , SRII ⁺ , Car, Rub ⁺ , Ret ⁺	(Pfeiffer <i>et al.</i> , 1999)
TOM	bop ⁻ , hop ⁻ , SRI ⁺ , SRII ⁺ , Car ⁻ , Rub ⁻ , Ret ⁺	(Besir, Dissertation 2001)

5.5 Mikrobiologische Methoden

5.5.1 Kultivierung und Stammhaltung von E. coli

E. coli-Zellen wurden mit LB-Medium [13] unter folgenden Bedingungen kultiviert:

Gefäß	Volumen	Kulturbedingungen	Inoculum
Reagenzglas 15 ml	5 ml	37°C / 250 UpM	Einzelkolonie, Glystock
Erlenmeyerkolben 100 ml	50 ml	37°C / 250 UpM	1 ml, Glystock
Erlenmeyerkolben 2 l	1 l	23-37°C / 220 UpM	50 ml
Petrischale (LB + 1,5 % Agar)	35 ml	37°C	50 µl einer 1:10 ⁶ -Verdünnung

Zusammensetzung von LB-Medium:

Bacto Trypton	10 g	1 % (w/v)
Bacto Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
NaCl	10 g	171 mM
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml	
pH	7,0 - 7,2	eingestellt mit NaOH autoklaviert

Zur Aufbewahrung wurden 0,5 ml einer ausgewachsenen Kultur mit 0,5 ml sterilem Glycerin (87 %) gemischt und bei -70°C gelagert.

Zur Selektion wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Chloramphenicol	35 µg/ml

5.5.2 Kultivierung und Stammhaltung von *H. salinarum*

H. salinarum Zellen wurden mit Komplexmedium [12] unter folgenden Bedingungen kultiviert:

Gefäß	Volumen	Kulturbedingungen	Inoculum
Erlenmeyerkolben 100 ml	35 ml	40°C / 110 UpM	1 ml, Einzelkolonie
Erlenmeyerkolben 2 l	1 l	37°C / 110 UpM	35 ml
Petrischale (KM + 1,5 % Agar)	35 ml	37°C	50 µl einer 1:10 ⁶ -Verdünnung

Zusammensetzung von Komplexmedium:

Bacto Pepton	10 g	1 % (w/v)
NaCl	250 g	4,3 M
KCl	2 g	27 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20 g	81 mM
Na ₃ Citrat·2H ₂ O	3 g	10 mM
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml	
pH	7,2	eingestellt mit NaOH autoklaviert

Die Zusammensetzung von Basalsalz entspricht der von Komplexmedium ohne Pepton.

Zur Aufbewahrung wurden 35 ml ausgewachsene Kultur in einem dicht verschlossenen Gefäß im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Selektion wurde Mevinolin in einer Konzentration von 25 µM, für Platten direkt nach einer Transformation von 18 µM, eingesetzt.

5.5.3 Bestimmung der relativen Zelldichte

Es wurden 0,5 ml der Kultur abgenommen und die Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Standardphotometer gegen das entsprechende Medium bestimmt.

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit wurden in einem 100 ml-Seitenarmkolben (Klett-Kolben) 50 ml LB-Medium bzw. 35 ml Komplexmedium vorgelegt und mit 100 Klett-ml einer ausgewachsenen Kultur angeimpft. Die Lichtstreuung wurde zu definierten Zeitpunkten mit einem Klett-Photometer bestimmt.

5.6 Molekularbiologische Methoden

5.6.1 Präparation genomischer DNS aus *H. salinarum* und *N. pharaonis*

2 ml einer Kultur mit einer $OD_{600nm} > 1,0$ wurden 2 Minuten bei 13000 g zentrifugiert und das Pellet in 400 μ l destilliertem Wasser resuspendiert, was zu einer sofortigen Lyse der Zellen führte. Enthaltene Proteine wurden durch eine 15 minütige Inkubation bei 70°C denaturiert. Die resultierende Mischung aus DNS und allen anderen Zellbestandteilen ist geeignet zur Anwendung in PCR-Reaktionen und präparative DNS-Restriktionen für Southern Blots.

5.6.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte durch alkalische Lyse der Zellen [35] und Adsorption der DNS an eine stationäre Silikatmatrix [36] mit dem Plasmid-Miniprep-Kit der Firma Qiagen nach Standardprotokoll.

5.6.3 Amplifikation von DNS-Fragmenten

DNS-Fragmente bis 6 kB wurden mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert [2]. Verwendet wurde die LA Taq Polymerase von Takara Bio Inc. mit GC-Puffer und den vom Hersteller mitgelieferten Nukleotiden nach Standardprotokoll.

Temperaturprogramm:

Denaturierung	94°C	60 Sekunden	
Denaturierung	94°C	30 Sekunden	← 30x
Primerhybridisierung	55 - 72°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	60 Sekunden pro kB	
Reaktionsende	4°C		

Die Hybridisierungstemperatur wurde auf 4°C unter der theoretischen Schmelztemperatur des am schwächsten bindenden Primers festgelegt. Unspezifische Ergebnisse ließen sich oft durch eine Erhöhung von 2 – 4°C verbessern.

Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes:

Template-DNS	< 100ng
Primer 1 (100 μ M)	1 μ l
Primer 2 (100 μ M)	1 μ l
dNTPs (jeweils 2,5 mM)	8 μ l
2x GC-Puffer	25 μ l
H ₂ O (bidest)	ad 50 μ l

5.6.4 Sequenzierung von DNS

Zur Sequenzierung von DNS wurde die Didesoxymethode nach Sanger eingesetzt [5]. Verwendet wurde der ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Applied Biosystems. Dieser Reaktionsmix beinhaltet dNTPs, basenspezifisch fluoreszenzmarkierte Didesoxynucleotide und eine thermostabile DNS-Polymerase.

Temperaturprogramm:

Denaturierung	94°C	30 Sekunden	← 30x
Primerhybridisierung *	50 - 59°C	30 Sekunden	
Elongation	60°C	240 Sekunden	
Reaktionsende	4°C		

* nur wenn die berechnete Schmelztemperatur des Primers unter 64°C lag

Zusammensetzung eines Sequenzierungsansatzes:

Plasmid-DNS	1 µg
Primer (10 µM)	1 µl
BigDye Reaktionsmix	2 µl
BigDye Puffer	1 µl
5 M Betain	2 µl
H ₂ O (bidest)	ad 10 µl

Das Ergebnis der Sequenzierungsreaktion wurde auf einem ABI 3730 Sequencer analysiert.

5.6.5 Konzentrationsbestimmung von DNS

Isolierte DNS wurde photometrisch über die Absorption bei 260 nm nach Sambrook [37] quantifiziert.

Näherungsweise gilt für Doppelstrang-DNS: $c_{\text{DNS}} [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \cdot 50$

Bei reiner DNS ist das Verhältnis $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}} < 2$, höhere Werte deuten auf Verunreinigung mit Protein hin.

5.6.6 Restriktion von DNS

Analytischer Verdau von Plasmiden:

200 ng Vektor-DNS, 2 Units des Restriktionsenzym und 1 µl des empfohlenen 10x Puffers wurden in einem Volumen von 10 µl für eine Stunde bei der empfohlenen Temperatur und 5 Minuten bei 95°C zur Deaktivierung des Enzyms inkubiert.

Präparativer Verdau von Plasmiden:

2 µg DNS wurden mit 10 Units des Restriktionsenzym und 3 µl des empfohlenen 10x Puffers in einem Volumen von 30 µl für zwei Stunden bei der empfohlenen Temperatur und 5 Minuten bei 95°C zur Deaktivierung des Enzyms inkubiert.

Präparativer Verdau von genomischer DNS:

Für Southern Blots wurden 20 µl der entsprechend Abschnitt 5.6.1 präparierten DNS mit 5 µl des Restriktionsenzym und 10 µl des empfohlenen 10x Puffers in einem Volumen von 100 µl für 3 - 5 Stunden bei 37°C und 5 Minuten bei 95°C zur Deaktivierung des Enzyms inkubiert.

5.6.7 Gelelektrophorese von DNS-Fragmenten

Verwendet wurden Flachbettelektrophoreseapparaturen mit verschiedener Breite, einer Gellänge von 8 cm und einer Gelhöhe von 0,8 cm. Die Elektrophorese wurde mit 0,7 % Agarose in TBE-Puffer bei konstanter Spannung von 60 V durchgeführt. Pro Tasche wurden 200 ng DNS und 3 µl 5x Auftragspuffer in einem Volumen von 15 µl aufgetragen.

Zusammensetzung des 5x Auftragspuffers:

Saccharose	50 g	50 %
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	100 µl einer 0,1 M Lösung	0,1 mM
Bromphenolblau	100 mg	0,1 % (w/v)
SDS	100 mg	0,1 % (w/v)
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml	
pH	7,0	eingestellt mit NaOH

Zusammensetzung des 10x TBE-Puffers:

Tris	108 g	892 mM
Borsäure	55 g	890 mM
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	7,44 g	20 mM
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml	
pH	~8,0	ergibt sich aus dem Verhältnis Tris / Borsäure

5.6.8 Detektion von DNS-Fragmenten im Gel durch Ethidiumbromid

Die Bindung von Ethidium an DNS erhöht die Quantenausbeute der Fluoreszenz dieses Farbstoffs bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm um den Faktor 50 - 100 [42]. Dieser Effekt ermöglicht die Detektion von DNS im Agarosegel.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 20 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml gefärbt und 30 Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen. Der Fluoreszenznachweis erfolgte mit dem Geldokumentationssystem TFP/WL Vilber Lourmat (LTF Labortechnik)

5.6.9 Isolierung von DNS-Fragmenten aus dem Gel

Die Bande wurde auf einem UV-Tisch (Chroma 43 / Bachofen) ausgeschnitten und die DNS mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega durch Adsorption der DNS an eine stationäre Silikatmatrix [36] nach Standardprotokoll isoliert.

5.6.10 Ligation von DNS-Fragmenten

Die DNS-Ligase des Bacteriophagen T4 knüpft, getrieben von ATP, die kovalente Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nukleotiden eines DNS-Strangs [43].

Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:4 gemischt. 200 ng dieser DNS wurden in einem Volumen von 20 µl mit 0,5 µl T4-DNS-Ligase (5 u/µl) und 2 µl des mitgelieferten 10x Ligationspuffers (Fermentas) über Nacht bei 12°C inkubiert.

5.6.11 Transformation von E. coli Zellen

Herstellung chemokompetenter Zellen

Der Vorläufer dieser Methode wurde von Cohen et al. [1] beschrieben. 50 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C/250 UpM geschüttelt. Bei einer OD_{600nm} von 0,8 wurde die Kultur 15 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei 4000 g und 4°C 10 Minuten pelletiert. Die Zellen wurden in 16 ml RF1-Lösung resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Durch 10 minütige Zentrifugation bei 4000 g und 4°C wurden die Zellen wieder pelletiert, in 4 ml RF2-Lösung resuspendiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert, zu je 70 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70°C gelagert.

Zusammensetzung der RF1-Lösung:

RbCl	1,2 g	100 mM
MnCl ₂ ·2H ₂ O	810 mg	50 mM
Kaliumacetat	3 ml einer 1 M Lösung	30 mM
Glyzerin 87 %	15 g	15 % (w/v)
CaCl ₂	113 mg	10 mM
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml	
pH	5,8	mit Essigsäure eingestellt, steril filtriert

Zusammensetzung der RF2-Lösung:

RbCl	0,12 g	10 mM
MOPS	2 ml einer 0,5 M Lösung	10 mM
Glyzerin 87 %	15 g	15 % (w/v)
CaCl ₂	831 mg	75 mM
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml	
pH	6,8	mit NaOH eingestellt, steril filtriert

Transformation chemokompetenter Zellen mit isoliertem Plasmid

Zu einem in Eiswasser aufgetauten Aliquot wurden ca. 100 ng Plasmid-DNS pipettiert. Nach 20 Minuten bei 0°C wurde der Ansatz für 45 Sekunden in einem Wasserbad bei 42°C erwärmt und anschließend wieder für 2 Minuten im Eiswasser gekühlt. Die Zellen wurden nach Zugabe von 500 µl LB-Medium für 60 Minuten bei 37°C und 250 UpM geschüttelt und anschließend in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Platten mit dem der Resistenzkassette des Plasmids entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Mit pUC19 als Kontrolle wurde eine Effizienz von $1,4 \cdot 10^8$ transformierte Zellen pro µg DNS erreicht.

Transformation elektrokompenter Zellen mit Ligationsprodukt

Die Elektroporation von *E. coli* wurde von Dower et al. [3] beschrieben. Verwendet wurden ElectroMAX Stbl4 Zellen der Firma Invitrogen. 20 µl dieser Zellen wurden mit 0,5 µl des Ligationsansatzes gemischt und in eine Küvette mit 1 mm Elektrodenabstand pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit einer Spannung von 1,2 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω. Die transformierten Zellen wurden für 90 Minuten in 1 ml SOC-Medium bei 30°C und 250 UpM geschüttelt und anschließend in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Platten mit dem der Resistenzkassette des Plasmids entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Mit pUC19 als Kontrolle wurde eine Effizienz von $4,2 \cdot 10^{10}$ transformierte Zellen pro µg DNS erreicht.

5.6.12 Transformation von *H. salinarum* Zellen

Diese Methode wurde von Cline et al. [4] an *H. volcanii* beschrieben. Die Zellen wurden durch dreimaliges überimpfen bei 60 - 80 Klett von 1 ml Kultur in 35 ml Komplexmedium und Schütteln bei 37°C und 250 UpM auf die Transformation vorbereitet. Bei 60 - 80 Klett wurden von der letzten Kultur 2 ml abgenommen, die Zellen bei 1500 g und 20°C pelletiert und durch Schwenken in 200 µl SPH-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µl 250 mM EDTA in SPH-Puffer bilden sich aus den stäbchenförmigen Zellen runde Sphäroblasten, dieser Vorgang wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Es wurden 5 µg Plasmid-DNS in 20 µl SPH-Puffer zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken mit dem Transformationsansatz gemischt. Nach 20 Minuten wurde der Ansatz mit 240 µl 60 % PEG600 in SPH-Puffer zuerst unterschichtet und dann durch mehrmaliges Kippen gemischt. Nach weiteren 20 Minuten wurden 1,5 ml SV-Puffer zugegeben und durch Schwenken mit dem Transformationsansatz gemischt. 5 Minuten später wurden die Zellen bei 1500 g und 20°C 5 Minuten pelletiert, in 1 ml Komplexmedium resuspendiert und in einem 15 ml-Röhrchen bei 37°C und 110 UpM über Nacht geschüttelt. Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen wurden je 200 µl auf Komplexmediumplatten mit 18 µM Mevinolin ausgestrichen. Nach 2 - 3 Wochen waren Kolonien gewachsen. Die Transformationseffizienz lag zwischen 0 - 100 transformierten Zellen pro µg DNS.

Zusammensetzung des SPH-Puffers:

NaCl	11,7 g	2 M
KCl	186 mg	25 mM
Saccharose	15 g	15 % (w/v)
Tris	606 mg	50 mM
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml	
pH	8,75	mit HCl eingestellt, steril filtriert

Zusammensetzung des SV-Puffers:

NaCl	25,1 g	4,3 M
KCl	201 mg	27 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,97 g	80 mM
Na ₃ Citrat · 2H ₂ O	294 mg	10 mM
CaCl ₂	15,5 mg	1,4 mM
Saccharose	15 g	15 % (w/v)
Tris	606 mg	50 mM
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml	
pH	7,4	mit HCl eingestellt, steril filtriert

5.6.13 Deletion von *H. salinarum*-Genen

Die flankierenden Regionen vor und nach dem zu deletierenden Gen wurden amplifiziert, fusioniert und in den pMKK100-Shuttle-Vektor integriert. Dieses Plasmid wurde in *H. salinarum* transformiert. Die Selektion erfolgte auf Mevinolin-X-Gal-Komplexmediumplatten, die Integration des Vektors in die genomische DNS wurde zusätzlich durch eine PCR mit Primern, die spezifisch auf dem Plasmid binden, bestätigt. Nach drei Passagen mit einem Inoculum von 10 µl in 35 ml Komplexmedium ohne Mevinolin wurde die Kultur auf X-Gal-Komplexmediumplatten ausgestrichen. Bei blauen Klonen ist das Plasmid noch vorhanden, weiße Klone haben das Plasmid entweder mit oder ohne dem zu deletierenden Bereich verloren. Durch PCR mit Primern, die auf den flankierenden Bereichen binden, wurde ein Bereich amplifiziert, der die deletierte Region beinhaltet. Anhand der Größe des PCR-Produkts wurden Deletionsmutanten ausgewählt und durch Southernblot bestätigt.

5.6.14 Southern Blot

Diese Methode wurde von E. Southern [6] zur spezifischen Detektion von DNS-Fragmenten nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel entwickelt und in dieser Arbeit in modifizierter Form zur Bestätigung von Deletionen in *H. salinarum* verwendet.

Allgemeine Beschreibung dieser Methode

Anhand der DNS-Sequenz wird ein Restriktionsenzym ausgewählt, das die genomische DNS vor und nach dem zu analysierenden Bereich schneidet und zu einem Fragment führt, dessen Größe auf dem Gel bestimmt werden kann (2 - 8 kB). Mit diesem Enzym verdaute DNS wird in einem Agarosegel aufgetrennt, mit einer Vakuum- Blot-Apparatur auf eine Nylonmembran übertragen und mit UV-Licht fixiert.

Durch PCR wird eine DNS-Sonde amplifiziert, deren Sequenz einem Abschnitt des zu analysierenden Bereichs entspricht. Um später eine Detektion zu ermöglichen, wird zum PCR-Ansatz mit Digoxigenin (DIG) markiertes dUTP hinzugefügt, das teilweise anstatt dTTP in den DNS-Strang eingebaut wird. Die Membran mit den fixierten DNS-Fragmenten wird mit der denaturierten Sonde inkubiert, die spezifisch an die entsprechende Sequenz bindet. Der Nachweis der Sonde auf der Membran erfolgt durch Chemilumineszenz mit einem Konjugat aus DIG-Antikörper und alkalischer Phosphatase.

Blot der genomischen DNS

Ein Volumen von 20 µl entsprechend Abschnitt 5.6.1 präparierter und entsprechend Abschnitt 5.6.6 verdauter DNS wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Als Größenmarker diente DNS molecular-weight marker VII, DIG-labeled von Roche. Das Gel wurde zur Vorbereitung auf den Transfer 5 Minuten in 0,25 M HCl, 30 Minuten in Alkalilösung und 30 Minuten in Neutralisierungslösung inkubiert. Die DNS wurde mit einer Vakuum-Blot-Apparatur auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Biosciences) übertragen (2 Stunden bei 50 mbar). Chromatographie-Papier und Membran wurden vor dem Zusammenbau des Sandwiches in 10x SSC-Puffer getränkt. Die DNS wurde mit UV-Licht (UV-Stratalinker 2400, 1200x 100 µJ) auf der Membran fixiert.

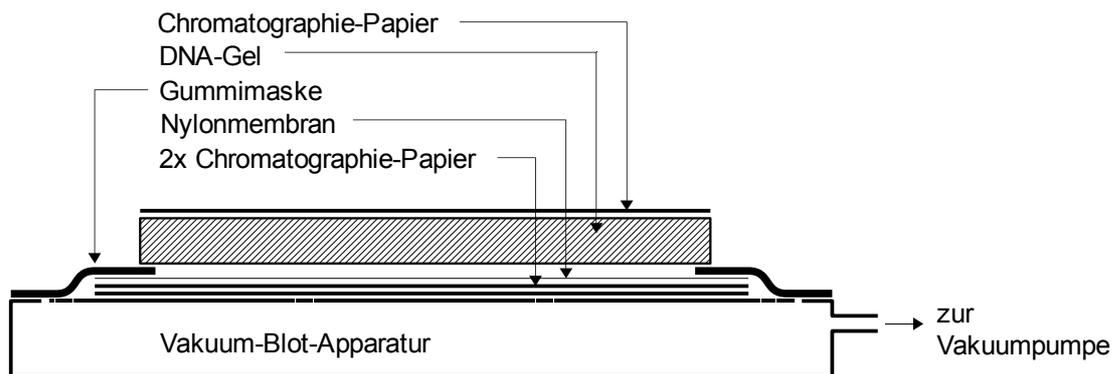


Abbildung 81: Aufbau der Southern blot -Apparatur zum Transfer von DNS aus einem Gel auf eine Nylonmembran.

Zusammensetzung der Alkalilösung:

NaCl	23,4 g	1 M
NaOH	8,0 g	0,5 M
H ₂ O (bidest)	ad 400 ml	

Zusammensetzung der Neutralisierungslösung:

NaCl	70,1 g	3 M
Tris	24,2 g	0,5 M
H ₂ O (bidest)	ad 400 ml	
pH	7,5	eingestellt mit HCl

Zusammensetzung des 20x SSC-Puffers:

NaCl	175,3 g	3 M
Na ₃ Citrat · 2H ₂ O	88,2 g	0,3 M
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml	
pH	7,0	eingestellt mit HCl, autoklaviert

Herstellung der Sonde

Auf dem zu analysierenden DNS-Fragment wurde ein 400 - 600 Basen langer Abschnitt ausgewählt und durch eine Standard-PCR-Reaktion (Abschnitt 5.6.3) mit Zusatz von 1 nMol DIG-dUTP amplifiziert. Die Reinigung der Sonde erfolgte durch Gelelektrophorese und Extraktion aus dem Gel (Abschnitte 5.6.7, 5.6.8 und 5.6.9). Kurz vor der Hybridisierung wurden 5-15 µl der Sonde (~2 µg DNS) mit Hybridisierungspuffer (DIG Easy Hyb-Lösung, Roche) auf 4 ml verdünnt und zur Trennung der Einzelstränge 10 Minuten in einem kochenden Wasserbad erhitzt und 5 Minuten in Eiswasser gekühlt.

Hybridisierung der Sonden

Die Membran wurde in einer sich drehenden Hybridisierungsflasche 30 Minuten bei 42°C mit 15 ml Hybridisierungspuffer äquilibriert und über Nacht mit der denaturierten Sonde unter den selben Bedingungen inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 2x 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 50 ml HW-Lösung1 und 2x 30 Minuten bei 68°C mit 50 ml HW-Lösung2 gewaschen.

Zusammensetzung der HW-Lösung1:

20x SSC	100 ml	
SDS	1,0 g	0,1 %
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml	

Zusammensetzung der HW-Lösung2:

20x SSC	5 ml	
SDS	1,0 g	0,1 %
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml	

Detektion der hybridisierten Sonden

Die Membran wurde 5 Minuten in 50 ml Waschpuffer, 30 Minuten in 30 ml Blockpuffer und 30 Minuten in 20 ml des 1:10000 in Blockpuffer verdünnten Antikörper-Konjugat (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase, Fab Fragmente, Roche) in einer Kunststoffschale geschwenkt. Nach 2x 45 minütigem Waschen mit 50 ml Waschpuffer wurde die Membran mit 1 ml Detektionslösung (CSDP Chemiluminescenc Substrate, Roche) für 5 Minuten zwischen zwei Folien inkubiert, von hinten abgetupft und zwischen zwei Folien eingeschweißt. Der Nachweis der Chemilumineszenz erfolgte durch Röntgenfilm (Curix HC1.00G, Agfa), die Zeit der Exposition (30 Sekunden bis 10 Minuten) richtete sich nach der Intensität der Lumineszenz.

Zusammensetzung des Waschpuffers:

Tween20	3 ml	0,3 % (v/v)
AK-Puffer	ad 1000 ml	

Zusammensetzung des Blockpuffers:

Blocking 10 %	10 ml	1 %
AK-Puffer	ad 1000 ml	

Zusammensetzung des AK-Puffers:

Maleinsäure	11,7 g	0,1 M
NaCl	8,8 g	0,15 M
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml	
pH	7,5	mit NaOH eingestellt, autoklaviert

Zusammensetzung von Blocking 10 %:

Blocking Reagent	25 g	10 % (w/v)
AK-Puffer	ad 250 ml	autoklaviert, Lagerung bei 4°C

5.7 Oligonukleotide

Zur Konstruktion und Sequenzierung von Plasmiden wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Gen	Name	Sequenz (5' -> 3')	Verwendung
NP1832A	NP1832A_Topo_fwd	CCATGGCCGAGTTCGGCG	Klonierung in pET27bMod
	NP1832A_Topo_rwd	GGGATCCGTCGTCGGCCGTTTG	Klonierung in pET27bMod
	NP1832A-Seq1324-	GTCGTCGGGATGGTCTTTTC	Sequenzierung
	NP1832A-Seq- 428	GTTGGCGTAGTCGTCGAAG	Sequenzierung
	NP1832A_395-	GTTGCTGTTCTTCGACGAC	Sequenzierung
NP4702A	NP4702A_Topo_fwd	CCATGGCACTCGATTTCACG	Klonierung in pET27bMod
	NP4702A_Topo_rwd	GGGATCCGTCAGCGCGGTGG	Klonierung in pET27bMod
	NP4702A_336-	GGTCTGGAGTTGCTTTCC	Sequenzierung
NP1576A	NP1576A-fwd	ACCATGGCCGACAGCGCTGCCGATAG	Klonierung in pET27bMod
	NP1576A-rwd	GGGATCCCTCGTGGGGTGAACCGCTTGAC	Klonierung in pET27bMod
	NP1576A 432-	CGAACACGTCTCCTCGCTGCTGG	Sequenzierung
OE1653R	OE1653Rfwd	ATACTCGAGATGAGTACTGACCAGACGGACGGG	Klonierung in pBADmod-HIS
	OE1653Rrwd	TATGGATCCTGCGCGCGCCACCTCC	Klonierung in pBADmod-HIS
	OE1653R334-	AAACCATCCAGACGGGGCAG	Sequenzierung
OE3960F	OE3960Ffwd	ATACTCGAGATGAGCGACTTCACGCCGCTTG	Klonierung in pBADmod-HIS
	OE3960Frwd	TATGGATCCGTCGTCGTCAGTTGCGGGCCG	Klonierung in pBADmod-HIS
	OE3960F542-	TGTCGGACACCACGAACCTC	Sequenzierung
OE3961R	OE3961Rfwd	ATACTCGAGATGGCATCGTACGGCGTGTGG	Klonierung in pBADmod-HIS
	OE3961Rrwd	TATATAAGCTTTTAGTGGTGGTGGTGGTGG-	Klonierung in pBADmod-HIS
	OE3961R557-	CCCCCGCCAGCGCCGCG AGCTTGGGACCACTCCGTTCC	Sequenzierung
OE3889R	OE3889R-fwd	ACCATGGGCTCCGGAATCATTCCCGTCGTTGCG	Klonierung in pET27bMod
	OE3889R-rwd	GGGATCCCCGTCGTCGGGGTGACACCAGTTG	Klonierung in pET27bMod
	OE3889R 432-	CAACGACGTGACCGCCGCCATCC	Sequenzierung
	OE3889R 929-	CGGTCTGGTGGCGCTGGTCATCC	Sequenzierung
	OE3889R-Seq1	ATATGGATCCCGTCGGGGACGGCCAGAAGTTCCG	Deletion Upstream-Fragment
	OE3889R-Rev2	AGATAAGCTTGGTTTCGGGAAGTTTCGTCTCCGTGGG	Deletion Upstream-Fragment
	OE3889R-Rev4	GCGGGCGCGATGCGCAGCCTCCAGTCGTATCACG	Deletion Downstream-Fragment
	OE3889R-Seq3	GAGGCTGCGCATCGCGCCGCTCACTCCTGGAC	Deletion Downstream-Fragment
	OE3889R-fl.A.Seq8	GTCTCCGAGTGGGCCGCCAGC	Sonde Southern-Blot flank. Region
	OE3889R-fl.A.Rev9	GCGTCGGCGGTGTGTTAGGTGC	Sonde Southern-Blot flank. Region
	OE3889R-Gen-Seq10	CTTCATCGGGCTGGCGGCGTGC	Sonde Southern-Blot Gen
	OE3889R-Gen-Rev11	CGTCTTCGACCAGCACCGTTCTCC	Sonde Southern-Blot Gen
	OE3889R-HIS-Seq7	ATATCATATGAGCTCCGGAATCATTCCCGTCCG	Klonierung in pBPHM

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Bis 40 Basen: Reinheitsgrad 'desalted'
 Mehr als 40 Basen: Reinheitsgrad 'HPLC-purified'

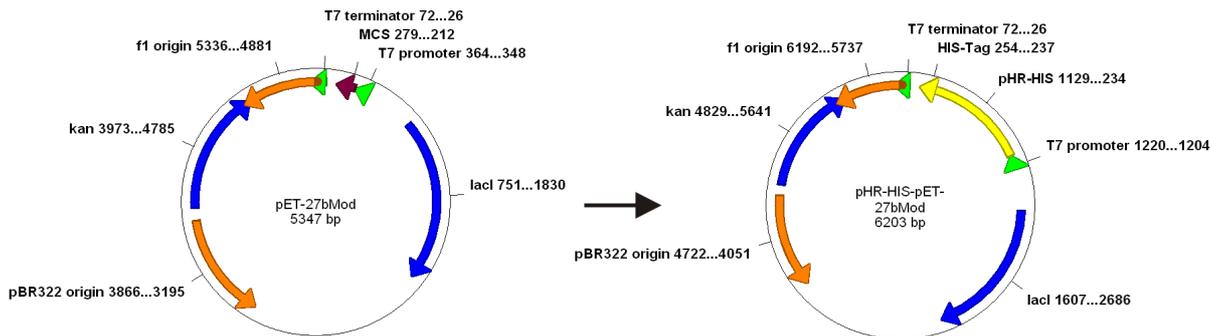
5.8 Plasmide

5.8.1 pET-Expressionsplasmide

Name	Quelle
pHR-HIS-pET27bMod	Martin Engelhard [7]
NP1832A-HIS-pET27bMod	diese Arbeit
NP4702A-HIS-pET27bMod	diese Arbeit
NP1576A-HIS-pET27bMod	diese Arbeit
OE3889R-HIS-pET27bMod	diese Arbeit
ace-HIS-pET27bMod	Jörg Tittor

Das pET-System [10] wurde zur heterologen Überexpression von Proteinen in E. coli eingesetzt. Die Transkription erfolgt durch eine IPTG-induzierbare, in der genomischen DNS des Expressionsstamms kodierte T7-Polymerase. Alternativ ist auch der Einsatz in zellfreien Expressionssystemen mit T7-Polymerase möglich. Das pET27bMod-Plasmid vermittelt Kanamycin-Resistenz.

Alle pET27bMod-Plasmide gehen auf das pHR-HIS-pET27bMod-Plasmid von Martin Engelhard zurück [7], [9].



N-Terminus:

```

      NcoI
      ┌───┴───┐
Plasmid-DNS: ...AGATATAACCATGGCTGAGACATTGCCACCGGTA...
Translation:  R Y T M A E T L P P V
Original:      M T E T L P P V
                └───────────────────┘
                Start                pHR-HIS
    
```

C-Terminus:

```

      BamHI                               HindIII
      ┌───┴───┐                           ┌───┴───┐
Plasmid-DNS: ...GGCACTCCCGCTGACGACGGATCCCACCACCACCACCACCACTAATAAGCTTGC...
Translation:  G T P A D D G S H H H H H H *
Original:      G T P A D D
                └───────────────────┘
                HIS-Tag
                └───────────────────┘
                pHR-HIS                Stop
    
```

Abbildung 82: Der Aufbau des Plasmids pET27bMod und die Klonierungsstrategie für pHR-HIS.

Die Translation beginnt am Startcodon, das in der NcoI-Schnittstelle enthalten ist. Die erste Base des zweiten Triplets ist aus diesem Grund immer Guanin, was in diesem Fall zu einer Mutation der entsprechenden Aminosäure von Threonin zu Alanin führt.

Der C-Terminus des Proteins ist über Glycin und Serin mit einem 6x Histidin-Tag verbunden.

Klonierungsstrategie

Die Inserts wurden von genomischer DNS amplifiziert, durch den 5'-Primer wurde eine NcoI-Schnittstelle und durch den 3'-Primer eine BamHI-Schnittstelle mit je zwei Basen Überhang eingeführt. Nach Zwischenklonierung in einen pCR2.1-TOPO-Vektor und Sequenzierung wurde das Insert mit diesen Restriktionsenzymen ausgeschnitten und durch Gelelektrophorese und Extraktion aus dem Gel isoliert.

Zur Verwendung als Vektor wurde pHR-HIS-pET27bMod mit NcoI/BamHI geschnitten und durch Gelelektrophorese und Extraktion aus dem Gel isoliert. Insert und Vektor wurden ligiert und in elektrokompente Zellen transformiert. Von ausgewählten Klonen wurden 5ml-Kulturen angeimpft, am nächsten Morgen das Plasmid isoliert und sequenziert.

5.8.2 pBAD-Expressionsplasmide

Name	Quelle
pBAD/HIS_B	Invitrogen
NP1576A-HIS-pBAD	diese Arbeit
NP1832A-HIS-pBAD	diese Arbeit
NP4702A-HIS-pBAD	diese Arbeit
OE1653R-HIS-pBAD	diese Arbeit
OE3960F-HIS-pBAD	diese Arbeit
OE3961R-HIS-pBAD	diese Arbeit
OE3889R-HIS-pBAD	diese Arbeit
pHR-HIS-pBAD	diese Arbeit

Das pBAD-System [8] dient zur Expression von Proteinen in *E. coli* auf physiologischem Level und wurde zur heterologen Rekombination deletierter Gene eingesetzt. Der durch Arabinose induzierbare Promotor zeichnet sich durch eine gute Steuerbarkeit aus. Die Transkription erfolgt durch die RNS-Polymerase von *E. coli* und ist nicht auf modifizierte Expressionsstämme angewiesen. Das pBAD/HIS_B-Plasmid vermittelt Ampicillin-Resistenz.

Klonierungsstrategie für pHR-HIS-pBAD, NP1576A-HIS-pBAD, NP1832A-HIS-pBAD, NP4702A-HIS-pBAD und OE3889R-HIS-pBAD:

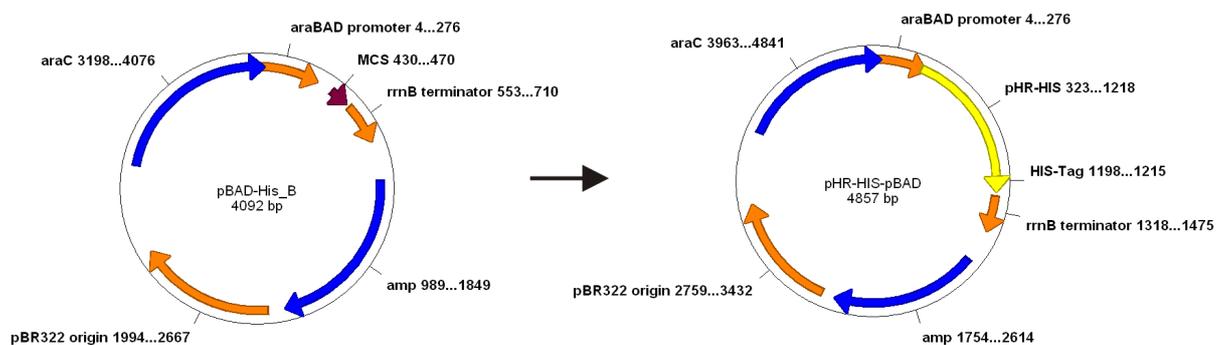


Abbildung 83: Aufbau des Plasmids pBAD-HIS_B und Klonierungsstrategie für pHR-HIS.

Das Ausgangsplasmid pBAD/HIS_B ist über die Schnittstellen NcoI und HindIII zu den pET27bMod-Plasmiden kompatibel. Mit diesen Enzymen wurden die Inserts zusammen mit dem HIS-Tag aus den schon vorhandenen pET27bMod-Plasmiden geschnitten und mit dem entsprechend geöffneten pBAD/HIS_B-Vektor ligiert.

Nach der Transformation in elektrokompente Zellen wurden mit ausgewählten Klonen 5 ml-Kulturen angeimpft, am nächsten Morgen das Plasmid isoliert und sequenziert.

Klonierungsstrategie für OE1653R-HIS-pBAD, OE3960F-HIS-pBAD und OE3961R-HIS-pBAD:

Die Klonierung über NcoI/BamHI war in diesen Fällen nicht möglich, da diese Gene mindestens eine dieser Schnittstellen kodieren. Zuerst wurde der Vektor modifiziert:

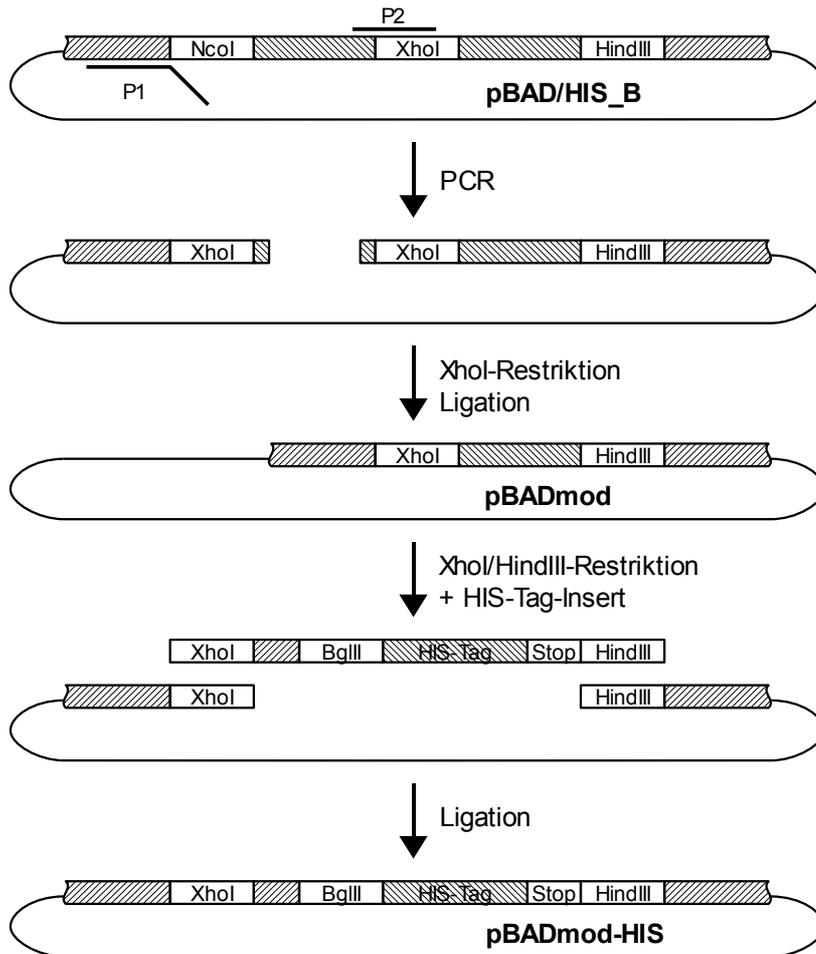


Abbildung 84: Konstruktion des Plasmids pBADmod-HIS aus dem Ursurpsplasmid pBAD-HIS_B.

Die NcoI-Schnittstelle des Ausgangsplasmids pBAD/HIS_B wurde durch PCR über den Primer P1 in eine XhoI-Schnittstelle umgewandelt. Das PCR-Produkt wurde mit XhoI geschnitten, gereinigt und durch eine intramolekulare Ligation mit einer zweiten in der MCS enthaltenen XhoI-Schnittstelle zum pBADmod circularisiert. Dieses Plasmid wurde über XhoI/HindIII aufgeschnitten und gereinigt. Das Plasmid pBADmod-HIS entstand durch Ligation mit konstruierten Oligonukleotiden, die eine BglII-Schnittstelle und einen HIS-Tag kodieren.

OE1653R und OE3960F wurden von genomischer DNS amplifiziert, durch die Primer wurde am 5'-Ende eine XhoI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle angefügt. Die Fragmente wurden in einen pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert, in chemokompetente Zellen transformiert und sequenziert. Der Vektor pBADmod-HIS wurde mit XhoI und BglII aufgeschnitten und nach Ligation mit den mit XhoI und BamHI ausgeschnittenen Fragmenten in elektrokompente Zellen transformiert und sequenziert. Der überlappende Bereich einer BamHI-Schnittstelle und einer BglII-Schnittstelle ist kompatibel.

OE3961R wurde über entsprechende Primer am 5'-Ende mit einer XhoI-Schnittstelle und am 3'-Ende mit einem HIS-Tag und einer HindIII-Schnittstelle versehen. Die Klonierung in das pBADmod-HIS-Plasmid erfolgte über diese Schnittstellen.

5.8.3 pBPH-M-Expressionsplasmid

Name	Quelle
oe3889R-HIS-pBPH-M	diese Arbeit

Das Plasmid pBPH-M [89] ist ein Shuttle-Vektor für *E. coli* und *H. salinarum* und wurde zur homologen Expression von Proteinen in *H. salinarum* eingesetzt. In *E. coli* wird es extrachromosomal repliziert und kodiert ein Ampicillin-Resistenzgen. In *H. salinarum* wird es durch homologe Regionen (oe3349 trunc) in die genomische DNS integriert und vermittelt Mevinolin-Resistenz. Die Transkription des zu exprimierenden Gens wird über den bop-Promotor gesteuert.

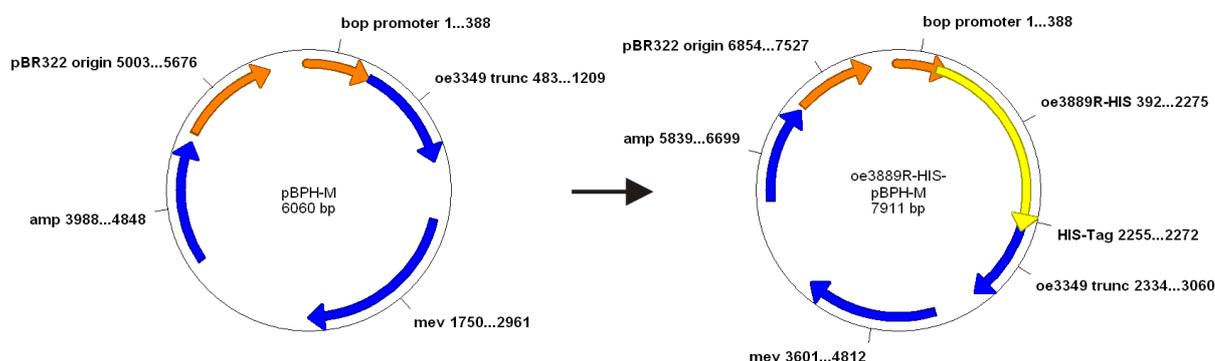


Abbildung 85: Aufbau des Plasmids pBPH-M und Klonierungsstrategie für oe3889R-HIS.

oe3889R wurde mit entsprechenden Primern am 5'-Ende mit einer NdeI-Schnittstelle und am 3'-Ende mit einem HIS-Tag und einer BamHI-Schnittstelle versehen. Die Klonierung in das pBPH-M-Plasmid erfolgte über diese Schnittstellen.

5.8.4 pMKK100-Deletionsplasmid

Name	Quelle
Δ oe3889R-pMKK100	diese Arbeit

Das Plasmid pMKK100 [11] ist ein Shuttle-Vektor für *E. coli* und *H. salinarum* und wurde zur Deletion von oe3889R eingesetzt. In *E. coli* wird es extrachromosomal repliziert und kodiert ein Ampicillin-Resistenzgen. In *H. salinarum* wird es durch eingefügte homologe Regionen in die genomische DNS integriert, vermittelt Mevinolin-Resistenz und β -Galactosidase-Aktivität.

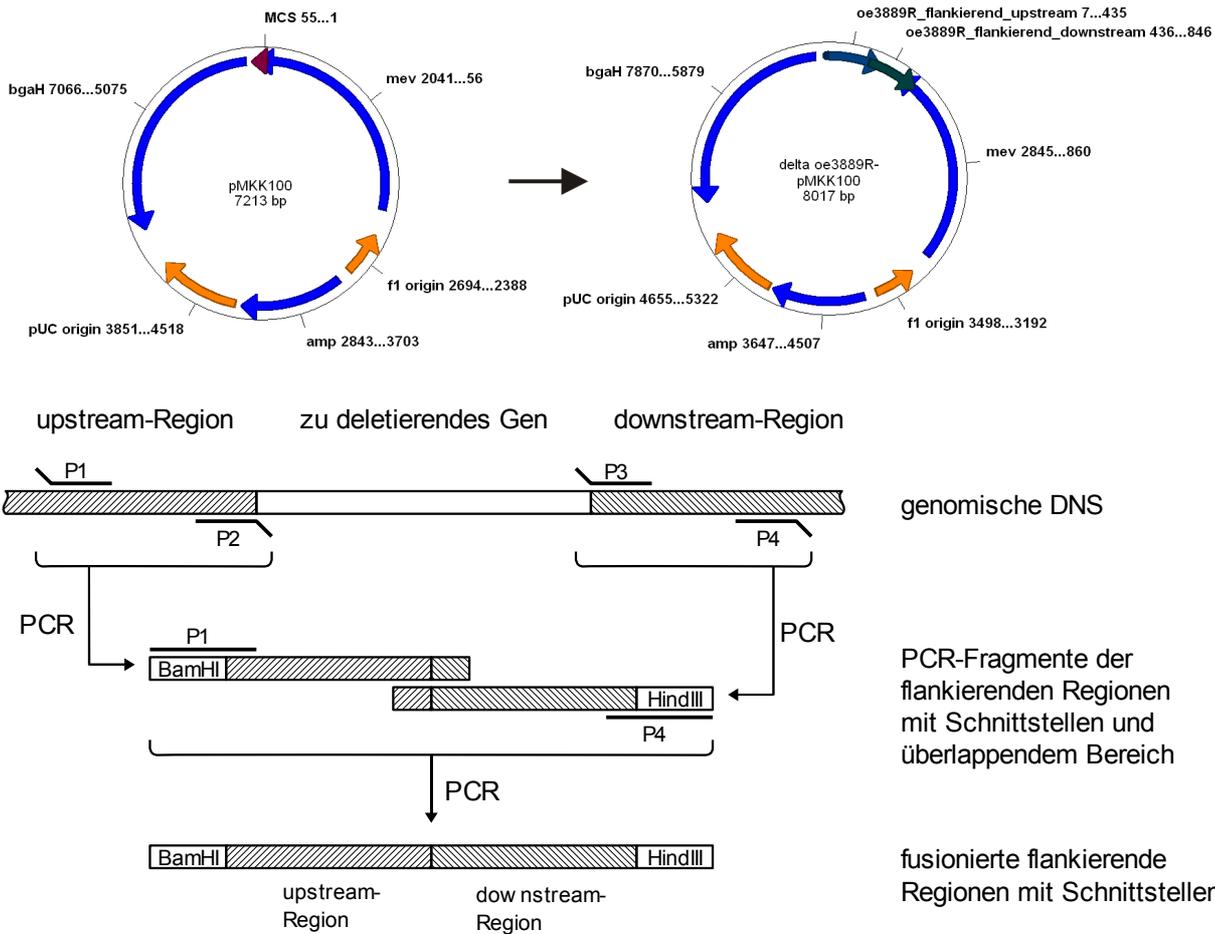


Abbildung 86: Aufbau des Plasmids pMKK100 und Klonierungsstrategie für die flankierenden Sequenzen von oe3889R.

Im ersten Schritt wurde je ein Fragment mit der Größe von 400 - 500 Basen vor und nach dem zu deletierenden Gen amplifiziert. Durch die Primer wurden terminale Schnittstellen (P1, P4) und ein homologer Bereich (P2, P3) mit einer Schmelztemperatur von $> 70^{\circ}\text{C}$ eingeführt. Im zweiten Schritt wurden diese Fragmente fusioniert.

Das Fusionsprodukt wurde in einen pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert und sequenziert. Die Integration in das pMKK100-Plasmid erfolgte über BamHI/HindIII.

5.9 Biochemische Methoden

5.9.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Näherungsweise photometrische Quantifizierung von Proteingemischen

Die Absorption der Proteinlösung wurde bei 280 nm gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über eine BSA-Eichgerade.

Vereinfachend wurde angenommen, dass der Anteil von Tryptophan, Tyrosin und Cystein im Proteingemisch vergleichbar ist mit dem Anteil in BSA.

Photometrische Quantifizierung von isoliertem Protein mit bekannter Aminosäurezusammensetzung:

Aus der Anzahl der Tryptophane, Tyrosine und Cysteine wurde der Extinktionskoeffizient des Proteins für 280 nm berechnet [15]:

$$\epsilon_{\text{Protein}} = n_{\text{Tryptophan}} \cdot 5630 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} + n_{\text{Tyrosin}} \cdot 1215 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} + n_{\text{Cystein}} \cdot 110 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Die Proteinkonzentration wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz aus der gemessenen Absorption berechnet.

Quantifizierung durch Bicinchoninsäure-Assay

Verwendet wurde der BCA Protein Assay Kit von Pierce nach Standardprotokoll. Die Proteinkonzentration wurde mit einer BSA-Eichkurve bestimmt.

Im Alkalischen wird Cu^{2+} in Gegenwart von Protein zu Cu^{+} reduziert. Bicinchoninsäure bildet selektiv mit Cu^{+} einem Komplex, der über die Absorption bei 562 nm quantifiziert wird [14].

5.9.2 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Methode beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von denaturiertem Protein in Anwesenheit von SDS. Dieses Detergens bindet an das Protein und zerstört die Faltung [45]. Die negativen Ladungen von SDS führt dazu, dass die native Ladung der Proteine kaum mehr eine Rolle spielt und das wichtigste Trennkriterium das Molekulargewicht ist [44].

NuPAGE Bis-Tris

Dieses System wurde mit Fertiggelen und MES-Puffer (Invitrogen) nach Standardprotokoll verwendet.

SDS-PAGE nach Laemmli [16]

Diese Gele sind aus einem Sammelgel mit 5 % Acrylamid und einem Trenngel mit 7,5 - 14 % Acrylamid aufgebaut. Die Dicke der Gele betrug 0,75 mm.

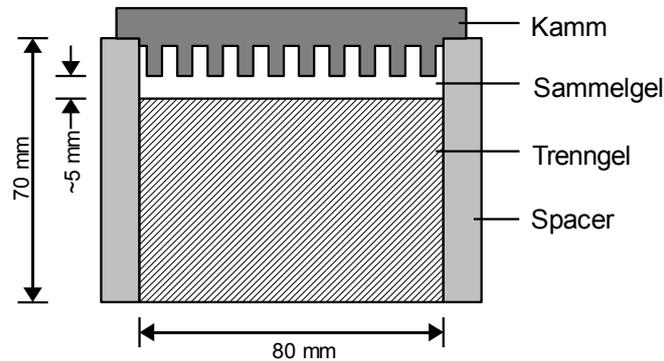


Abbildung 87: Aufbau und Abmessungen eines Laemmli Minigels, Elektrophoresesystem Hoefer.

Zusammensetzung des Trenngels:

Acrylamidkonzentration:	7,5 %	10 %	14 %
Protogel (30 %)	1,25 ml	1,68 ml	2,35 ml
1,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
H ₂ O (bidest)	2,48 ml	2,00 ml	1,38 ml
10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O	25 µl	25 µl	25 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl

Zusammensetzung des Sammelgels:

Acrylamidkonzentration:	5 %
Protogel (30 %)	325 µl
0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8	500 µl
H ₂ O (bidest)	1,185 ml
10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O	10 µl
TEMED	2,0 µl

Zuerst wurde das Trenngel zwischen die Platten gegossen und mit H₂O-gesättigtem 2-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das 2-Butanol abgegossen und das Gel mit Wasser abgespült. Wassertropfen zwischen den Platten wurden mit Chromatographiepapier entfernt. Anschließend wurde das restliche Volumen mit Sammelgel gefüllt und der Kamm zwischen die Platten gesteckt. Nach der Polymerisation wurde das fertige Gel-Sandwich maximal 24 Stunden in feuchten Tüchern bei 4°C gelagert.

Zusammensetzung des 10x Laufpuffers:

Glycin	144,1 g	1,92 M
SDS	10 g	1 %
Tris	30,3 g	250 mM
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml	
pH	8,3	eingestellt mit HCl

Die Proben wurden auf die erforderliche Proteinkonzentration eingestellt, mit dem Ladepuffer gemischt und 10 Minuten bei 37°C geschüttelt. Pro Spur wurden je nach eingesetztem Kamm 10 - 20 µl aufgetragen.

Zusammensetzung des 5x Ladepuffers:

Glyzerin 87 %	2,5 ml	25 % (v/v)
SDS	750 mg	7,5 % (w/v)
Mercaptoethanol	1,25 ml	12,5 % (v/v)
Bromphenolblau	2,5 mg	0,025 % (w/v)
Tris	303 mg	250 mM
H ₂ O (bidest)	ad 10 ml	
pH	8,0	eingestellt mit HCl

Die Laufkammer wurde mit Wasser auf 18°C gekühlt. Die Stromstärke betrug 25 mA pro Gel und wurde auf 50 mA pro Gel erhöht, nachdem der Blaupuffer in das Trenngel eingelaufen war.

Tricin-SDS- Polyacrylamid-Elektrophorese (Tricin-SDS-PAGE) nach Schägger

Diese Methode der Gelelektrophorese wurde von Schägger und Jagow [17] entwickelt. Die Gele waren aus einem Sammelgel mit 4 % Acrylamid und einem Trenngel mit 10 % Acrylamid aufgebaut. Die Abmessungen entsprachen den Gelen nach Lämmli.

Zusammensetzung des Trenngels:

Protogel (30 %)	1,67 ml
3 M Tris/HCl, 0,3 % SDS, pH 8,45	1,67 ml
Glyzerin 87 %	0,5 ml
H ₂ O (bidest)	ad 5,0 ml
10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O	25 µl
TEMED	2,5 µl

Zusammensetzung des Sammelgels:

Protogel (30 %)	333 µl
3 M Tris/HCl, 0,3 % SDS, pH 8,45	625 µl
H ₂ O (bidest)	ad 2,5 ml
10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O	20 µl
TEMED	2 µl

Die Herstellung erfolgte entsprechend den Lämmli-Gelen.

Zusammensetzung des Anoden-Laufpuffers:

Tris	24,2 g	200 mM
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml	
pH	8,9	eingestellt mit HCl

Zusammensetzung des Kathoden-Laufpuffers:

Tris	24,2 g	100 mM
Tricin	17,9 g	100 mM
SDS	1,0 g	0,1 % (w/v)
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml	
pH	~8,25	ergibt sich aus dem Verhältnis Tris / Tricin

Die Proben wurden auf die erforderliche Proteinkonzentration eingestellt, mit dem Ladepuffer gemischt und 10 Minuten bei 37°C geschüttelt. Pro Spur wurden je nach eingesetztem Kamm 10 - 20 µl aufgetragen.

Zusammensetzung des 2x Ladepuffers:

Glyzerin 87 %	1,2 ml	12 % (v/v)
SDS	400 mg	4 % (w/v)
Mercaptoethanol	200 µl	2 % (v/v)
Coomassie-Brilliant-Blau G-250	1,0 mg	0,01 % (w/v)
Tris	60,6 mg	50 mM
H ₂ O (bidest)	ad 10 ml	
pH	6,8	eingestellt mit HCl

Die Stromstärke betrug 20 mA pro Gel und wurde auf 35 mA pro Gel erhöht, nachdem der Blaupuffer in das Trenngel eingelaufen war. Die Gelkammer wurde auf 18°C gekühlt.

5.9.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Zur zweidimensionalen Auftrennung von Proteingemischen wurde eine Kombination aus Blue-Native-Polyacrylamid-Elektrophorese (BN-PAGE) [18] und Tricin-SDS-PAGE) [17] eingesetzt.

Die erste Dimension: BN-PAGE

Diese Methode beruht auf der elektrophoretischen Trennung nativer Proteine in Anwesenheit von Coomassie G. Die Bindung dieses Farbstoffs verschiebt die Ladung der Proteine ins Negative. Durch diese zusätzlichen Ladungen wandern auch basische Proteine zur Anode. Die unter diesen Bedingungen negativ geladenen Proteine stoßen einander ab, was zu einer Reduzierung unspezifischer Protein-Protein-Bindungen führt.

Das Gel war aus einem Sammelgel mit 4 % Acrylamid und einem Gradienten-Trenngel mit 6 - 12 % Acrylamid aufgebaut.

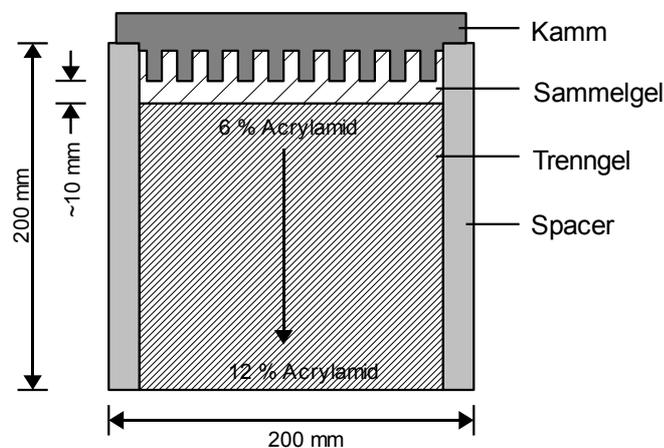


Abbildung 88: Aufbau und Abmessungen eines Blue-Native Gradientengels zur nativen Auftrennung in der ersten Dimension, Elektrophoresesystem Biorad.

Die Dicke des Gels betrug 0,75 mm. Das Trenngel wurde während der Polymerisation mit wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet.

Zusammensetzung des Trenngels für 10 Gele:

Acrylamidkonzentration:	6 %	12 %
Protogel (30 %)	2,1 ml	4,2 ml
6x Gelpuffer	1,75 ml	1,75 ml
6x Aminosäurenbuffer	1,75 ml	1,75 ml
Glyzerin 87 %	-	2,1 ml
H ₂ O (bidest)	ad 10,5 ml	ad 10,5 ml
10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O	20 µl	20 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Zusammensetzung des Sammelgels für 2 Gele:

Acrylamidkonzentration:	4 %
Protogel (30 %)	1,33 ml
6x Gelpuffer	1,67 ml
H ₂ O (bidest)	ad 10 ml
10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O	100 µl
TEMED	10 µl

6x Gelpuffer:

ε-Aminocaprinsäure	39,4 g	3 M
BisTris	6,28 g	0,3 M
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml	
pH	7,0	eingestellt mit HCl

6x Aminosäurenpuffer:

Glycin	4,44 g	0,6 M
Serin	6,31 g	0,6 M
Asparagin	9,01 g	0,6 M
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml	

Zusammensetzung des 10x Anoden-Laufpuffers:

BisTris	31,4 g	500 mM
H ₂ O (bidest)	ad 300 ml	
pH	~7,0	nicht eingestellt

Zusammensetzung des 10x Kathoden-Laufpuffers:

BisTris	3,14 g	150 mM
Tricin	8,96 g	500 mM
H ₂ O (bidest)	ad 100 ml	
pH	7,0	eingestellt mit HCl

Der 10x Kathodenpuffer wurde zu je 50 ml geteilt und auf je 500 ml verdünnt. Zur ersten Hälfte wurden 0,02 % Coomassie G hinzugefügt. Die Elektrophorese wurde mit Coomassie-Kathodenpuffer gestartet. Nachdem die Front die Hälfte der Strecke im Gel zurückgelegt hatte wurde er gegen Kathodenpuffer ohne Coomassie ausgetauscht.

Solubilisierung und Auftrag der Proben

Die Solubilisierungsansätze wurden über Nacht bei 4°C geschüttelt, der nicht solubilisierter Anteil wurde am nächsten Morgen 20 Minuten mit 150000 g bei 4°C abzentrifugiert. Zum solubilisierter Anteil wurden 10 µl Coomassie-Beladelösung hinzugefügt. Pro Spur wurde ein Volumen von 60 µl entsprechend 200 µg Protein aufgetragen.

Zusammensetzung des Solubilisierungsansatzes:

Protein	800 µg
Ladepuffer	62,5 µl
10 % DDM in H ₂ O	25 µl
H ₂ O (bidest)	ad 230 µl

Zusammensetzung des Ladepuffers:

ε-Aminocapronsäure	984 mg	750 mM
BisTris	105 mg	50 mM
Na ₂ -EDTA	1,9 mg	0,5 mM
Basalsalz ohne MgCl ₂	1,25 ml	12,5 % (v/v)
H ₂ O (bidest)	ad 10 ml	
pH	7,0	eingestellt mit HCl

Zusammensetzung der Coomassie-Beladelösung:

ε-Aminocapronsäure	98,4 mg	750 mM
Coomassie G	50 mg	5 % (w/v)
H ₂ O (bidest)	ad 1 ml	

Die Gelkammer wurde auf 0°C gekühlt. Die Stromstärke betrug am Anfang 10 mA pro Gel und wurde auf 20 mA erhöht, nachdem die Front in das Trenngel eingelaufen war.

Die Spuren wurden ausgeschnitten und zwischen zwei Folien bei -20°C gelagert.

Die zweite Dimension: Tricin-SDS-PAGE

Das Gel war aus einem Trenngel mit 10 % Acrylamid, dem ersten Sammelgel mit 4,8 % Acrylamid, dem zweiten Sammelgel mit 4 % Acrylamid und dem Gel-Streifen der BN-PAGE-Elektrophorese aufgebaut.

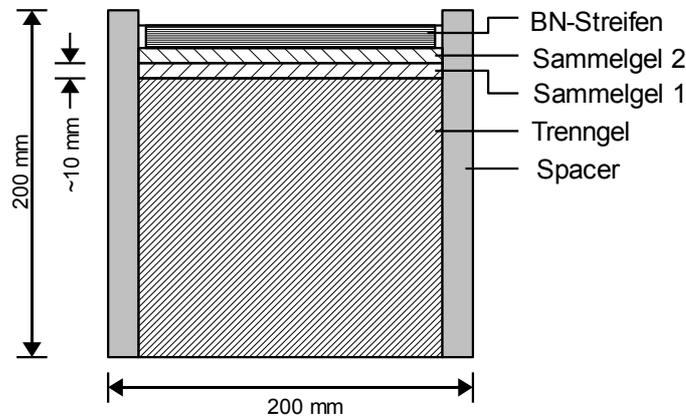


Abbildung 89: Aufbau und Abmessungen eines Tricin-SDS Gels zur denaturierenden Auftrennung in der zweiten Dimension, Elektrophoresesystem Biorad.

Die Dicke des Gels betrug 1,5 mm. Das Trenngel und die Sammelgele wurden während der Polymerisation mit wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet.

Zusammensetzung des Trenngels:

Protogel (30 %)	16,7 ml
3 M Tris/HCl, 0,3 % SDS, pH 8,45	16,7 ml
Glyzerin 87 %	6,67 g
H ₂ O (bidest)	ad 50 ml
10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O	167 µl
TEMED	16,7 µl

Zusammensetzung des ersten Sammelgels:

Protogel (30 %)	800 µl
3 M Tris/HCl, 0,3 % SDS, pH 8,45	1,2 ml
H ₂ O (bidest)	ad 5,0 ml
10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O	50 µl
TEMED	5 µl

Zusammensetzung des zweiten Sammelgels:

Protogel (30 %)	665 µl
6x Gelpuffer BN-PAGE	835 µl
H ₂ O (bidest)	ad 5,0 ml
10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O	50 µl
TEMED	5 µl

Die Vorbereitung der ausgeschnittenen Spuren des BN-PAGE-Gels erfolgte durch je 15 minütiges Schwenken in DTT-SDS-Puffer und Iodacetamid-SDS-Puffer.

Zusammensetzung des DTT-SDS-Puffers:

DTT	0,5 g	1 % (w/v)
SDS	1,0 g	2 % (w/v)
Tris	303 mg	50 mM
H ₂ O (bidest)	ad 50 ml	
pH	8,8	eingestellt mit HCl

Zusammensetzung des Iodacetamid-SDS-Puffers:

Iodacetamid	2,4 g	4,8 % (w/v)
SDS	1,0 g	2 % (w/v)
Tris	303 mg	50 mM
H ₂ O (bidest)	ad 50 ml	
pH	8,8	eingestellt mit HCl

Der Gelstreifen wurde auf das zweite Sammelgel gelegt und mit 0,5 %-Agarose in Tricin-SDS-PAGE-Kathodenpuffer eingegossen.

Die Stromstärke betrug 20 mA pro Gel, die Gelkammer wurde auf 18°C gekühlt.

5.9.4 Proteinfärbung im Gel

Coomassie Färbung

Dieses Protokoll stellt eine Abwandlung der Standardmethode nach Zehr et al. [39] dar und ist zur Detektion von Proteinbanden ab 50 ng (Minigel) geeignet.

Das Gel wurde 30 Minuten in der Coomassie-Färbelösung und anschließend über Nacht in der Entfärbelösung geschwenkt.

Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung:

Coomassie-Brilliant-Blau R-250	1,7 g	0,17 % (w/v)
Ethanol	400 ml	40 % (v/v)
Eisessig	100 ml	10 % (v/v)
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml	

Eisessig und Wasser wurden erst zugesetzt, nachdem sich Brilliant-Blau R-250 vollständig in Ethanol gelöst hatte.

Zusammensetzung der Entfärbelösung:

2-Propanol	125 ml	12,5 % (v/v)
Eisessig	100 ml	10 % (v/v)
H ₂ O (bidest)	ad 1000 ml	

Alternativ dazu können Coomassie gefärbte Proteingele auch in Wasser durch mehrfaches Aufkochen im Mikrowellenherd entfärbt werden, eine massenspektroskopische Analyse von ausgeschnittenen Banden wird dadurch aber unmöglich.

Silberfärbung

Dieses Protokoll stellt eine Abwandlung der Standardmethode nach Blum et al. [38] dar und ist zur Detektion von Proteinbanden ab 5 ng (Minigel) geeignet.

Zur Fixierung des Proteins wurde ein Minigel 30 Minuten bis 16 Stunden in 50 ml 50 % Methanol / 12 % Essigsäure und anschließend dreimal 20 Minuten in 50 ml 50 % Ethanol geschwenkt. Zur Vermeidung unspezifischer Silberpräzipitate wurde das Gel eine Minute in 0,02 % Natriumthiosulfat geschwenkt und zwei mal eine Minute in Wasser gewaschen. Nach 20 minütigem Schwenken in Silbernitratlösung wurde das Gel in Natriumcarbonatlösung entwickelt bis die gewünschte Färbung erreicht war und in 5 % Essigsäure gestoppt.

Zusammensetzung der Silbernitratlösung:

Silbernitrat	100 mg	0,2 % (w/v)
Formaldehyd	18,8 µl	0,038 % (v/v)
H ₂ O (bidest)	ad 50 ml	

Zusammensetzung der Natriumcarbonatlösung:

Natriumcarbonat	3 g	6 % (w/v)
Formaldehyd	12,5 µl	0,025 % (v/v)
Natriumthiosulfat	0,25 mg	0,0005 % (w/v)
H ₂ O (bidest)	ad 50 ml	

Für Gele mit 20 cm · 20 cm wurden jeweils 300 ml eingesetzt.

5.9.5 Western Blot

Diese Methode wurde von J. Renart [19] und H. Towbin [20] zur spezifischen immunologischen Detektion von Proteinen nach Auftrennung durch SDS-PAGE entwickelt und in dieser Arbeit zum Nachweis des 6x Histin-Tags überexprimierter Proteine eingesetzt.

Der Transfer auf die Membran

Das im Gel durch SDS solubilisierte und dadurch negativ geladene Protein wird durch Elektrophorese auf eine PVDF-Membran übertragen.

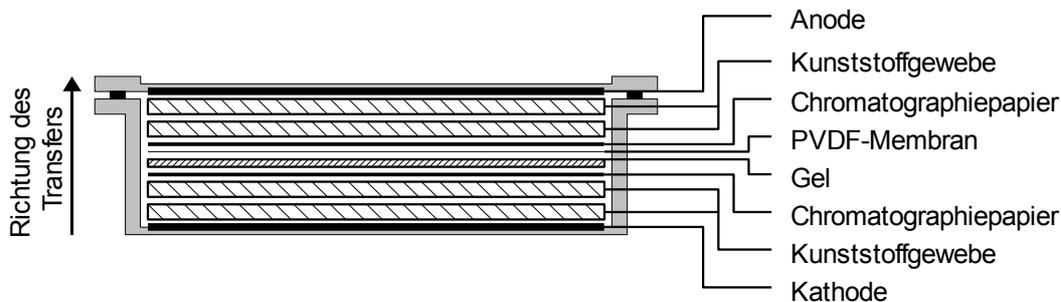


Abbildung 90: Aufbau der Westernblot -Apparatur zum Transfer von Protein aus einem Gel auf eine PVDF-Membran.

Vor dem Zusammenbau des Sandwiches wurden die Kunststoffgewebe und die Chromatographiepapiere mit Blotpuffer getränkt, die PVDF-Membran wurde zwei Minuten in Methanol gelegt. Nach dem Zusammenbau wurde die Kassette mit Blotpuffer aufgefüllt. Während der Elektrophorese wurde die Kassette mit Wasser auf Raumtemperatur gekühlt. Der Transfer dauerte zwei Stunden bei einer Stromstärke von 100 mA.

Zusammensetzung des Blot-Puffers:

Tris	3,03 g	25 mM
Glycin	14,4 g	192 mM
H ₂ O (bidest)	ad 1,0 l	
pH	~8,3	ergibt sich aus dem Verhältnis Tris / Glycin

Bindung der Antikörper

Um unspezifische Bindung des Antikörpers an die Oberfläche der Membran zu verhindern, wurde der Blot 1 - 16 Stunden in 25 ml BSA-TBST bei Raumtemperatur (eine Stunde) bzw. bei 4°C (16 Stunden) geschwenkt. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde eine Stunde in 10 ml BSA-TBST mit 5 µl Maus IgG1 anti 6x Histidin geschwenkt. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen wurde mit 20 ml BSA-TBST dreimal gespült und drei Mal 15 Minuten gewaschen. Die Membran wurde eine Stunde in 10 ml BSA-TBST mit 1 µl des Maus-IgG spezifischen HRP-Antikörperkonjugats geschwenkt. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Spülen und dreimaliges 15 minütiges Waschen mit 20 ml TBST entfernt.

Zusammensetzung von BSA-TBST:

BSA	7,5 g	3 % (w/v)
10x TBST	25 ml	
H ₂ O (bidest)	ad 250 ml	

Zusammensetzung 10x TBST-Puffers:

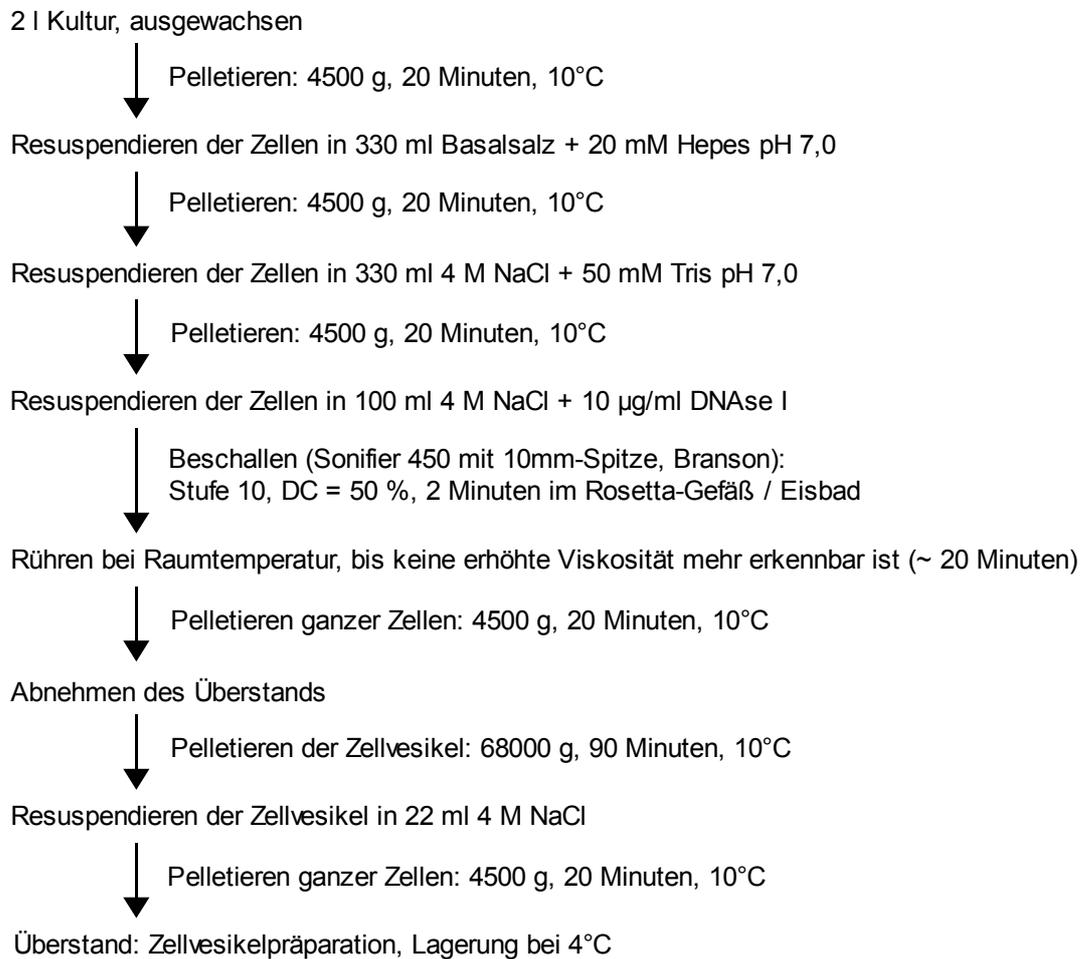
NaCl	87,7 g	1,5 M
Tris	12,1 g	100 mM
Triton X-100	20 g	2 % (w/v)
H ₂ O (bidest)	ad 1,0 l	
pH	7,4	eingestellt mit HCl

Detektion

Die Membran wurde zwischen zwei Folien für 5 Minuten mit 1 ml der Detektionslösung (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, GE-Healthcare) inkubiert, von hinten abgetupft und zwischen zwei Folien eingeschweißt. Der Nachweis der Chemilumineszenz erfolgte durch Röntgenfilm (Curix HC1.00G, Agfa), die Zeit der Exposition (2 Sekunden bis 15 Minuten) richtete sich nach der Intensität der Lumineszenz.

5.9.6 Präparation von Vesikel aus *H. salinarum*-Zellen durch Extrusion

Die Präparation der Vesikel wurde von MacDonald und Lanyi [24] übernommen:



Die Proteinkonzentration der so hergestellten Zellvesikelpräparationen lag bei 3,2 - 5,0 mg/ml. MacDonald und Lanyi geben für nach dieser Methode hergestellte Vesikel einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,5 µm und ein Einschlussvolumen von 3 µl pro mg Protein an.

5.9.7 Präparation von Vesikel aus *H. salinarum*-Zellen durch Einfrieren und Auftauen

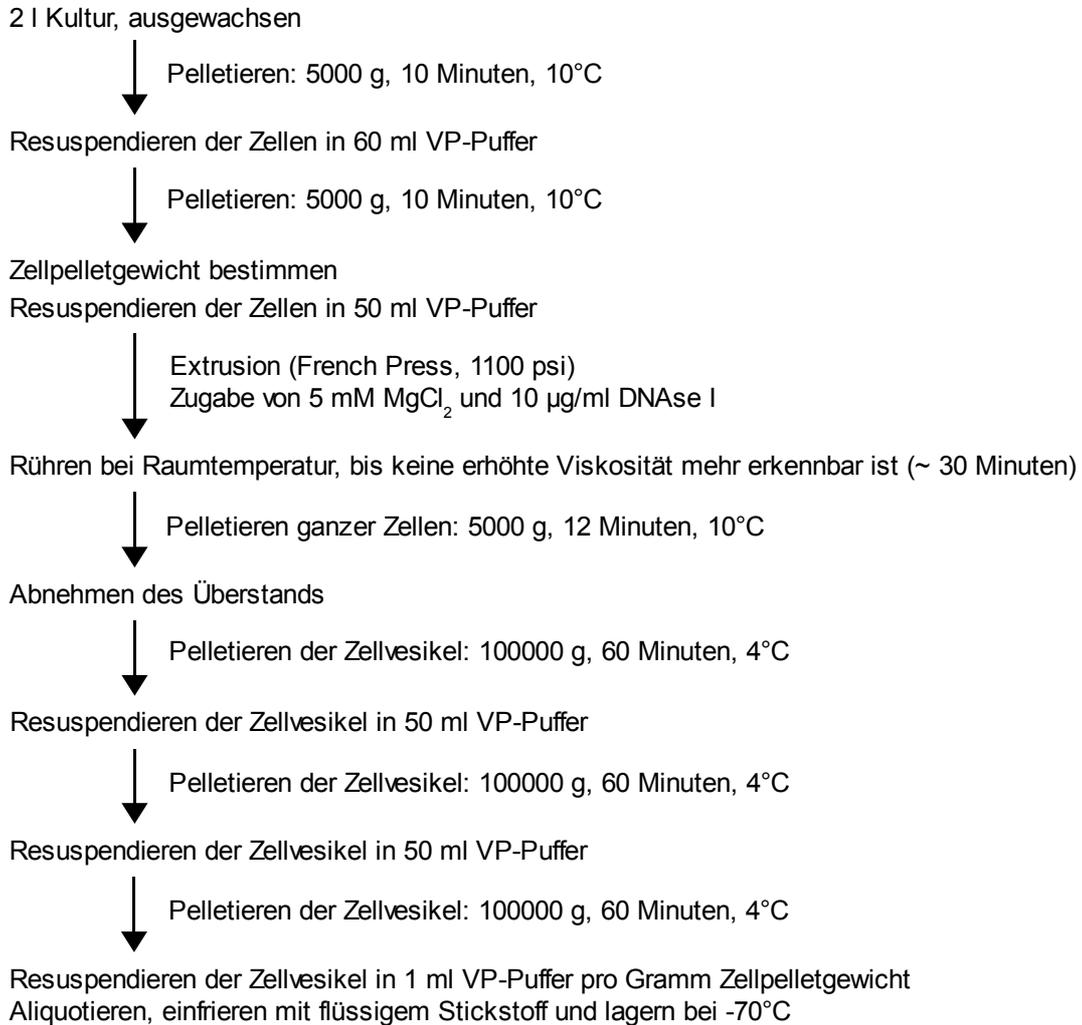
Die Methode der Herstellung wurde von Storch et al. [33] übernommen. Die Kultur wurde bei 6000 g pelletiert, in BS-Hepes resuspendiert und auf $OD_{600nm} = 4$ eingestellt. 45 ml der Zellsuspension wurden mit flüssigem Stickstoff gefroren, nach Zugabe von DNase I (0,1 mg/ml) in einem 35°C warmen Wasserbad aufgetaut und bei Raumtemperatur geschwenkt bis keine erhöhte Viskosität mehr erkennbar war. Ganze Zellen wurden durch 20 minütige Zentrifugation bei 7200 g und 10°C abgetrennt. Die Vesikel wurden eine Stunde mit 160000 g bei 10°C pelletiert und in 2 ml BS-Hepes resuspendiert.

Zum Beladen mit Ornithin wurde diese Aminosäure mit einer Konzentration von 1 mM zugegeben und der Ansatz für 64 Stunden bei 4°C geschwenkt.

Direkt vor einem Experiment wurden die Vesikel auf 10 ml verdünnt, eine Stunde mit 160000 g bei 10°C pelletiert und auf eine Proteinkonzentration von 30 mg/ml mit BS-Hepes resuspendiert.

5.9.8 Präparation von Vesikel aus E. coli Zellen durch Extrusion

Diese Methode geht auf Rosen [25] zurück und ist auf einen möglichst hohen Anteil von Vesikeln mit seitenverkehrter Membranorientierung optimiert.



Zusammensetzung des VP-Puffers (Vesikelpräparationspuffer):

Cholinchlorid	19,5 g	140 mM
Saccharose	85,6 g	250 mM
DTT	77 mg	0,5 mM
Tris	1,21 g	10 mM
H ₂ O (bidest)	ad 1,0 l	
pH	7,4	eingestellt mit HCl

Die Proteinkonzentration der so hergestellten Zellvesikelpräparationen lag bei 8 - 14 mg/ml.

5.9.9 Analytische Isolierung der Zellmembranen von *E. coli*

Nach dem Zellaufschluss liegen die Membranen der Zellen als flache Bruchstücke oder sphärische Vesikel vor. Diese Membranfragmente sind ab 100000 g sedimentierbar. Dadurch ist eine Isolierung der Membranproteinfraktion möglich.

50 ml Kultur wurden 15 Minuten bei 5000 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 5 ml Aufschlusspuffer mit 10 µg/ml DNase I resuspendiert.

Zusammensetzung des Aufschlusspuffers:

NaCl	17,5 g	300 mM
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	8,90 g	50 mM
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	1,86 g	5 mM
H ₂ O (bidest)	ad 1,0 l	
pH	8,0	eingestellt mit HCl

In einem mit Eiswasser gekühlten Spitzbodenglas wurden die Zellen 4 Minuten beschallt (Sonifier 250, Branson, Sonde mit Ø = 3 mm, Stufe 4, DC = 50 %). Nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch 15 minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C abgetrennt. Die Membranen wurden durch 60 minütige Zentrifugation mit 150000 g bei 4°C pelletiert und in 250 µl Aufschlusspuffer resuspendiert. Bei ausgewachsenen Kulturen lag die Proteinkonzentration der Proben bei 10 - 20 mg/ml.

5.9.10 Präparative Isolierung der Zellmembranen von *E. coli*

Die Kultur wurde 20 Minuten bei 7200 g und 4°C zentrifugiert, das Pellet mit Aufschlusspuffer abgespült und pro Liter Kultur in 20 ml Aufschlusspuffer mit 10 µg/ml DNase I resuspendiert. Die Zellen wurden in einem mit Eiswasser gekühlten Rosetta-Gefäß beschallt (Sonifier 450, Branson, Sonde mit Ø = 10 mm, Stufe 10, DC = 50 %). Zur Kontrolle des Aufschlusses wurden 10 µl der Zellsuspension abgenommen, mit 1 ml Aufschlusspuffer verdünnt und die OD_{600nm} bestimmt. Das Beschallen wurde beendet, wenn die OD_{600nm} 3 % des Ausgangswertes unterschritten hatte. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch 15 minütige Zentrifugation mit 7200 g bei 4°C abgetrennt. Die Membranen wurden durch 60 minütige Zentrifugation mit 150000 g bei 4°C pelletiert, in 3 ml Solubilisierungspuffer pro Liter Kultur resuspendiert und gepottert. Bei ausgewachsenen Kulturen lag die Proteinkonzentration bei ~30 mg/ml.

5.9.11 Analytische Isolierung der Zellmembranen von *H. salinarum*

Die Zellen von 1 l Kultur wurden bei 7200 g und 10°C 20 Minuten pelletiert, in 20 ml Basalsalz mit 10 µg/ml DNase I resuspendiert und über Nacht im Verhältnis von 1:100 gegen deionisiertes Wasser dialysiert. Große Aggregate wurden 30 Minuten bei 5000 g und 10°C abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen, die Membranen 90 Minuten bei 200000 g und 10°C pelletiert und in 2 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und gepottert. Bei ausgewachsenen Kulturen lag die Proteinkonzentration der Proben bei 12 - 17 mg/ml.

Da der Zellaufschluss durch Dialyse gegen deionisiertes Wasser erfolgt, besteht die Gefahr, dass die Proteine denaturiert werden und damit ihre Funktion verlieren.

5.9.12 Präparative Isolierung der Zellmembranen von *H. salinarum*

Die Kultur wurde 20 Minuten bei 7200 g und 10°C zentrifugiert, das Pellet mit Aufschlusspuffer abgespült und pro Liter Kultur in 20 ml Basalsalz mit 10 µg/ml DNase I resuspendiert. Die Zellen wurden in einem mit Eiswasser gekühlten Rosetta-Gefäß 15 Minuten beschallt (Sonifier 450, Branson, Sonde mit Ø = 10 mm, Stufe 10, DC = 50 %). Nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch 20 minütige Zentrifugation mit 7200 g bei 10°C abgetrennt. Die Membranen wurden durch 90 minütige Zentrifugation mit 200000 g bei 10°C pelletiert und in 2 ml Basalsalz pro Liter Kultur resuspendiert und gepottert. Bei ausgewachsenen Kulturen lag die Proteinkonzentration bei ~20 mg/ml.

Zur Solubilisierung wurden die Membranen abzentrifugiert und in Solubilisierungspuffer aufgenommen.

5.9.13 Solubilisierung der Membranen

Das Ziel der Solubilisierung ist die Membranstruktur der Lipide aufzubrechen und die Membranproteine einzeln in Lösung zu bringen ohne sie zu denaturieren. Erreicht wird dies durch Inkubation mit einem Detergens mit niedriger CMC, in diesem Fall n-Dodecyl-β-D-Maltopyranosid (DDM) [23]. Das Detergens deckt den lipophilen Bereich der Membranproteine ab und bildet mit dem Lipid Mischmizellen.

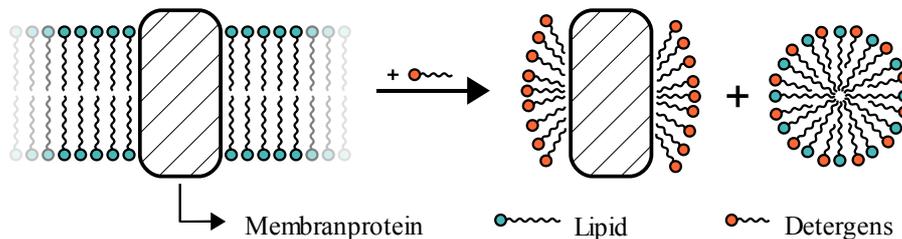


Abbildung 91: Modellvorstellung der Solubilisierung von Membranproteinen.

Die isolierten Membranen wurden mit Solubilisierungspuffer auf eine Proteinkonzentration von 5,5 mg/ml verdünnt und nach Zugabe von 1 % DDM über Nacht bei 18°C gerührt.

Zusammensetzung des Solubilisierungspuffers:

NaCl	4,38 g	300 mM
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	2,07 g	50 mM
H ₂ O (bidest)	ad 250 ml	
pH	6,0	eingestellt mit HCl/NaOH

Durch 60 minütige Zentrifugation bei 150000 g und 4°C wurde der nicht solubilierte Anteil abgetrennt.

Für eine NiNTA-Chromatographie ist die Verdünnung des im Aufschlusspuffers enthaltenen EDTAs ausreichend, für CuNTA-Chromatographie müssen die Membranen vor der Solubilisierung mit Solubilisierungspuffer gewaschen werden, da sonst das Kupfer von der Säulenmatrix eluiert wird.

5.9.14 Solubilisierung von Bacteriorhodopsin

Der Solubilisierungsansatz wurde in einem Spitzbodenglas, das mit einem Wasserbad auf 20°C temperiert wurde, 15 Minuten beschallt (Sonifier 250, Branson, Sonde mit $\varnothing = 3$ mm, Stufe 3, DC = 50 %). Der nicht solubilisierter Anteil wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 100000 g und 10°C entfernt. Die Proteinkonzentration des solubilisierter Bacteriorhodopsins lag bei 2,2 - 2,4 mg/ml.

Zusammensetzung eines Solubilisierungsansatzes:

Purpormembran		12 OD·ml
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	100 µl einer 0,2 M-Lösung mit pH 5,6	10 mM
DDM	20 mg	1 %
H ₂ O (bidest)	ad 2,0 ml	

5.9.15 NiNTA-Chromatographie

Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde von Porath et al. [22] zur Fraktionierung von Proteinen eingeführt. Als Trennkriterium wird die durch Histidin und Cystein vermittelte Retention der Proteine an die durch Chelatbindung am Säulenmaterial immobilisierten Metallionen ausgenutzt.

E. Hochuli [21] erkannte, dass sich der Einsatzbereich dieser Methode stark erweitern lässt, indem man die Affinität des zu isolierenden Proteins zum Säulenmaterial durch Fusion mit zusätzlichen Histidinen (HIS-Tag) erhöht.

Zur Vorbereitung auf die chromatographische Reinigung des Proteins wurde der Solubilisierungsansatz 2,5 Stunden im Verhältnis 1:100 gegen Chromatographiepuffer A dialysiert und steril filtriert. Ein Zusatz von DDM zum Dialysepuffer war nicht notwendig, da DDM zum größten Teil in Mizellen zu je 110 - 140 Monomeren vorliegt [23] und dadurch kaum dialysierbar ist.

Zusammensetzung von Chromatographiepuffer A:

NaCl	7,3 g	500 mM
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	2,2 g	50 mM
Imidazol	340 mg	20 mM
Harnstoff	0 - 30 g	0 - 2 M
DDM	250 mg	0,1 %
H ₂ O (bidest)	ad 250 ml	
pH	8,0	eingestellt mit HCl, steril filtriert

Zusammensetzung von Chromatographiepuffer B:

NaCl	7,3 g	500 mM
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	2,2 g	50 mM
Imidazol	4,26 g	250 mM
Harnstoff	0 - 30 g	0 - 2 M
DDM	250 mg	0,1 %
H ₂ O (bidest)	ad 250 ml	
pH	8,0	eingestellt mit HCl, steril filtriert

Es wurden HiTrap Chelating Säulen (Amersham Biosciences) mit einem Volumen von 1 ml eingesetzt. Der Fluss betrug 0,8 ml pro Minute.

Nach dem Äquilibrieren der Säule mit fünf Säulenvolumen Chromatographiepuffer A wurde der gegen Chromatographiepuffer A dialysierte Solubilisierungsansatz aufgetragen. Unspezifisch gebundenes Protein wurde durch Waschen mit 10 - 20 Säulenvolumen einer Mischung aus Chromatographiepuffer A und Chromatographiepuffer B abgereichert. Die durch dieses Verhältnis eingestellte Imidazolkonzentration (50 - 150 mM) richtete sich nach der Stärke der Bindung des Proteins an die Säule. Die Elution erfolgte mit Chromatographiepuffer B. Der Zusatz von Harnstoff kann, abhängig vom Protein, durch teilweise Entfaltung die Bindung an die Säule deutlich verbessern.

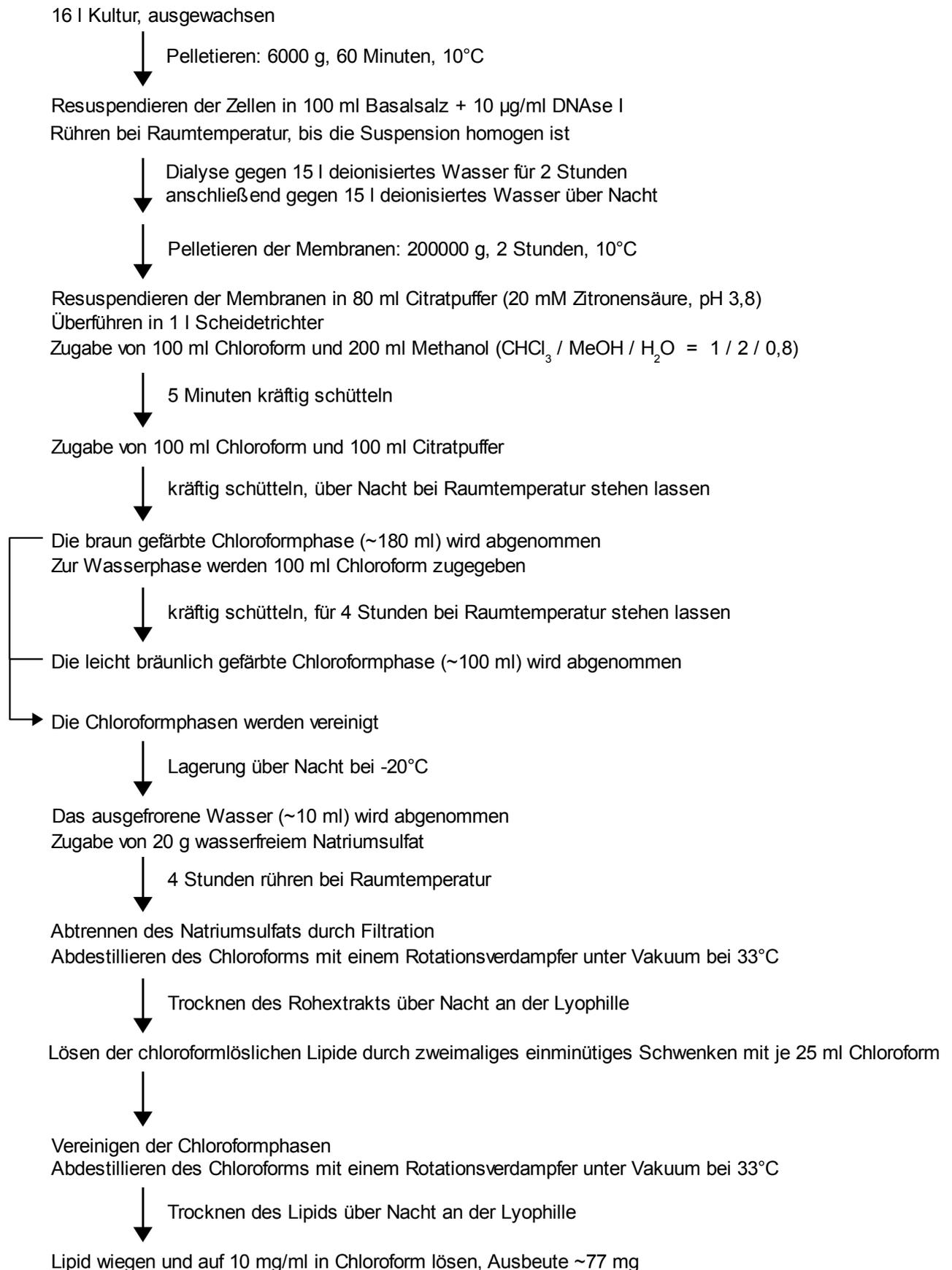
5.9.16 Proteinexpression mit einem zellfreien E. coli-System

Die zellfreie Proteinexpression basiert auf einem Zelllysat mit funktionellem Transkriptions- und Translationsapparat, dem alle für diese Schritte notwendigen niedermolekularen Substanzen und die DNS des zu exprimierenden Proteins hinzugefügt werden [40].

Verwendet wurde das Rapid Translation System RTS 100, E. coli HY Kit von Roche nach Standardprotokoll. Die Transkription erfolgt in diesem System durch eine T7-RNS-Polymerase. Dies ermöglicht die Verwendung von pET-Expressionsplasmiden mit T7-Promotor.

5.9.17 Lipidextraktion aus *H. salinarum*-Zellen

Diese Lipidextraktion basiert auf der Standardmethode nach Bligh und Dyer [26].



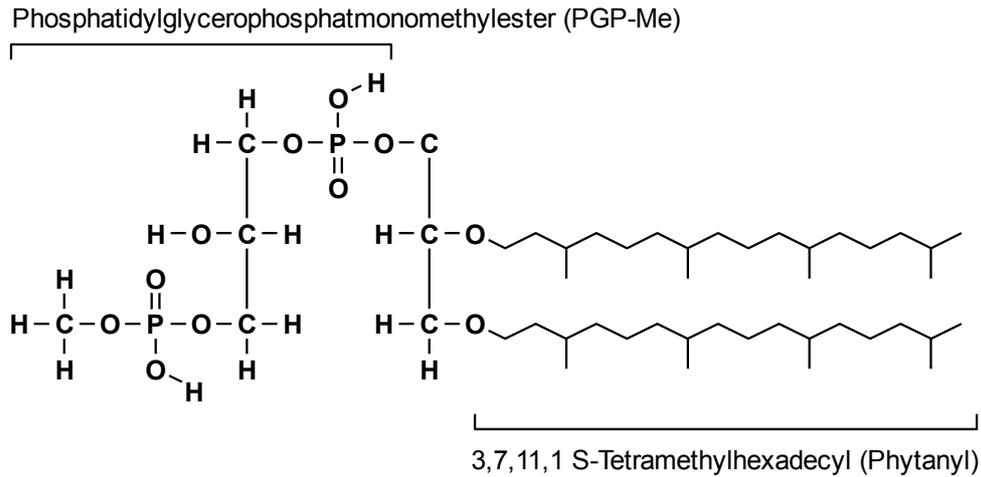


Abbildung 85: Die Strukturformel des in der Zellmembran von *H. salinarum* dominierenden Lipids nach Kates et al. [27].

5.9.18 Herstellung von Liposomen

Liposomen bestehen aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten mit kugelförmiger Geometrie. Die Extrusion von Lipidsuspensionen durch Polycarbonatfilter, eingeführt von Olson et al. [28], ist eine einfache und reproduzierbare Methode zur Herstellung von unilamellaren Liposomen mit definiertem Durchmesser.

In einen 50ml Rundkolben wurden 800 µl des mit einer Konzentration von 10 mg/ml in Chloroform gelösten Lipids gegeben. Mit einem Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel unter Vakuum bei Raumtemperatur vollständig abgedampft. Der Lipidfilm wurde mit 2 ml Rekonstitutionspuffer mehrmals eingefroren (Trockeneis / Ethanol) und bei Raumtemperatur aufgetaut, bis mit dem Auge keine Inhomogenitäten mehr erkennbar waren. Diese Suspension wurde elfmal durch einen Polycarbonatfilter mit 200 nm Porengröße extrudiert (Lipofast Basic, Avestin).

5.9.19 Rekonstitution von solubilisiertem Membranprotein in Liposomen

Diese Methode wird von Rigaud et al. in [41] beschrieben. Zur Rekonstitution der Membranproteine in Liposomen werden die Liposomen mit dem durch DDM solubilisiertem Protein gemischt und das Detergens durch einen Polystyroladsorber entfernt. Das Protein integriert dabei spontan in die Lipiddoppelschicht.

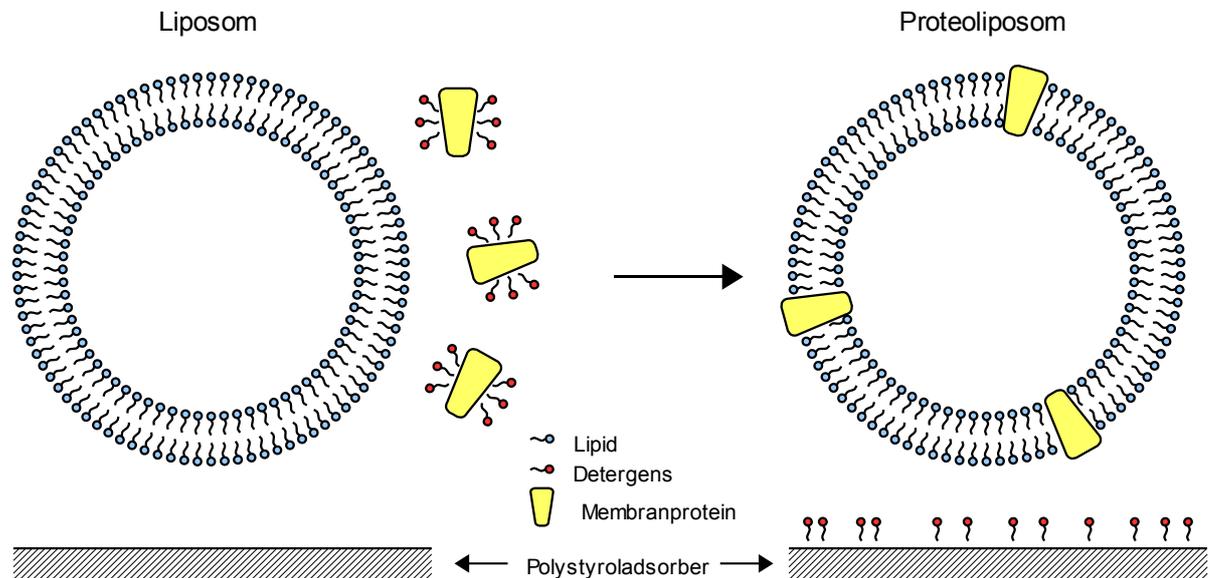


Abbildung 92: Modellvorstellung der Rekonstitution von Membranproteinen in Liposomen.

Der Polystyroladsorber (Biobeads SM2 Adsorbent, Biorad) wurde einmal mit Methanol und dreimal mit Rekonstitutionspuffer im Verhältnis 1:10 gewaschen.

1 ml der Liposomenpräparation mit einer Lipidkonzentration von 4 mg/ml wurden mit 300 mg Polystyroladsorber (Nassgewicht) und solubilisiertem Protein entsprechend einem Lipid zu Protein Verhältnis von 20:1 gemischt und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Am nächsten Morgen wurde der Adsorber erneuert und die Mischung weitere 4 Stunden geschwenkt. Die Proteoliposomen wurden abgenommen und bei 4°C gelagert.

Das Problem dieser Methode liegt im Detergenseintrag bei Zugabe des solubilisierten Proteins, da ab einer bestimmten Konzentration die Liposomen zerstört werden. Eine erfolgreiche Präparation von Proteoliposomen ist ab Proteinkonzentrationen > 0,5 mg/ml in DDM-Konzentrationen von < 0,1 % möglich (Erfahrungswert). Eine voneinander unabhängige Beeinflussung dieser Größen ist in der Praxis schwer möglich, da DDM beim Aufkonzentrieren des Proteins durch Filtration ebenfalls konzentriert wird und nicht dialysierbar ist.

5.10 Biophysikalische Methoden

5.10.1 Nachweis der Arginin/Ornithin-Austauscheraktivität von *H. sal.* Zellvesikeln

Der durch den Konzentrationsgradienten getriebene Austausch von Arginin gegen Ornithin wurde von Storch et al. in [33] gezeigt. Zellvesikel wurden mit Ornithin beladen und in ein Medium mit ^3H -Arginin verdünnt. Nach einer definierten Zeit wurden die Vesikel durch Filtration abgetrennt und die aufgenommene Menge ^3H -Arginin durch Szintilationsmessung quantifiziert.

Vor der Messung wurden die nach Abschnitt 5.9.7 hergestellten Vesikel mit BS-Hepes auf eine Proteinkonzentration von 7,5 mg/ml eingestellt, alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden 12,5 μM ^1H -Arginin und 0,5 μCi ^3H -Arginin in 320 μl BS-Hepes vorgelegt. 40 μl der Zellvesikel wurden zugegeben und durch zweimaliges auf- und abpipettieren mit der Vorlage gemischt. Nach definierter Zeit wurde der Ansatz durch einen mit BS-Hepes gewaschenen Cellulosenitratfilter (Porengröße 0,45 μM , Durchmesser 25 mm, Sartorius) gesaugt und zweimal mit je 1 ml BS-Hepes gewaschen. Zur Bestimmung der aufgenommenen Menge ^3H -Arginin wurde der Filter in Szintilationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth) aufgelöst und die Radioaktivität in einem Szintilationszähler (Tri-Carb 2100 TK, Packard) gemessen.

5.10.2 Nachweis der lichtgetriebenen Na^+ -Extrusion aus *H. sal.* Zellvesikeln

Der an der Zellmembran anliegende Protonengradient und das elektrische Membranpotential treiben bei *H. sal.* den Na^+/H^+ -Austausch der zur Na^+ -Extrusion aus der Zelle führt. Dieser Transportvorgang kann in Anwesenheit von Bacteriorhodopsin durch Licht aktiviert werden, wie von Lanyi und MacDonald in [34] gezeigt wurde.

Nach Abschnitt 5.9.6 hergestellte Zellvesikel wurden bei 70000 g 10 Minuten pelletiert und auf eine Proteinkonzentration von 50 mg/ml in 4 M NaCl resuspendiert. 100 μl dieser Vesikel wurden mit 100 μl Beladungslösung gemischt. Es stellt sich eine dem Messpuffer entsprechende Zusammensetzung ein. Die Vesikel wurden 64 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Zusammensetzung der Beladungslösung:

3 M KCl	66,6 μl	2,0 M
$^{22}\text{NaCl}$	10 μl einer Verdünnung mit 0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$	1 μCi
1 M Tris pH 7,5	2 μl	20 mM
H_2O (bidest)	ad 100 μl	

Zusammensetzung des Messpuffers:

NaCl	116,9 g	2,0 M
KCl	74,6 g	1,0 M
Tris	1,21 g	10 mM
H_2O (bidest)	ad 1000 ml	
pH	7,5	eingestellt mit HCl, durch 0,45 μm gefiltert

Zur Messung der lichtinduzierten Na^+ -Abgabe wurden die beladenen Vesikel mit Messpuffer auf 10 ml verdünnt und in einer Kunststoffkuvette mit 80 mW/cm^2 belichtet.

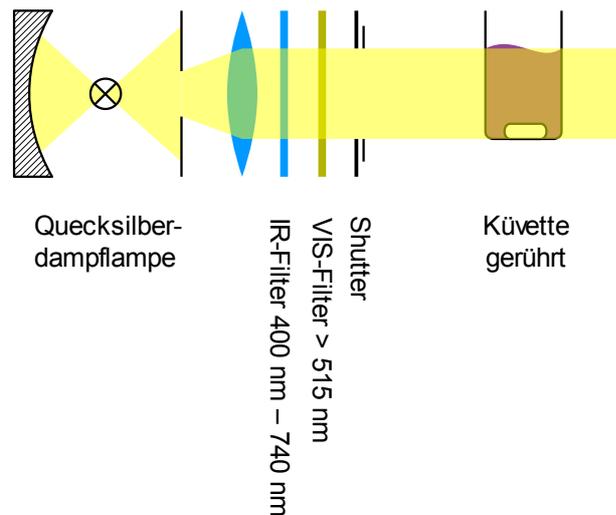


Abbildung 93: Versuchsaufbau zum Nachweis der lichtinduzierten Na^+ -Abgabe aus Zellvesikeln.

Zu definierten Zeitpunkten wurden $500 \mu\text{l}$ durch einen mit Messpuffer gewaschenen Cellulosenitratfilter (Porengröße $0,45 \mu\text{M}$, Durchmesser 25 mm, Sartorius) gesaugt und zweimal mit je 1 ml Messpuffer gewaschen. Zur Bestimmung der in den Vesikeln enthaltenen Menge $^{22}\text{Na}^+$ wurde der Filter in Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth) aufgelöst und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Tri-Carb 2100 TK, Packard) gemessen.

5.10.3 Nachweis der Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität von E. coli Zellvesikeln

Eine sehr elegante Methode zum indirekten Nachweis der Na⁺/H⁺-Austauscheraktivität von E. coli Zellvesikeln wird von Rosen in [25] beschrieben. Dieser Assay nützt aus, dass bei der Extrusion von E. coli Zellen unter bestimmten Bedingungen (siehe Abschnitt 5.9.8) auch Vesikel mit seitenverkehrter Membranorientierung entstehen. Solche Vesikel sind durch Zugabe von ATP energetisierbar, das bedeutet, dass die ATP-Synthase durch Hydrolyse von ATP Protonen nach Innen pumpt und dadurch einen elektrochemischen Gradienten aufbaut. Der pH-Wert in den Vesikeln lässt sich qualitativ durch Acridinorange fluoreszenz verfolgen. Dieser bei neutralem pH-Wert membranängige Fluoreszenzfarbstoff ist wird in energetisierten Vesikeln protoniert und sammelt sich dort in hoher Konzentration an. Ab einer Konzentration von 0,2 mM quenchen sich die Acridinorangemoleküle gegenseitig [29] und die Fluoreszenz nimmt ab. Zugabe von Na⁺ führt, vermittelt vom Na⁺/H⁺-Austauscher, zu einer Abgabe von Protonen, der pH-Wert im Inneren der Vesikel steigt, Acridinorange entweicht aus den Vesikeln und die Fluoreszenz nimmt zu. Durch Zugabe von Ammonium wird der Protonengradient vollständig abgebaut, die ursprüngliche Fluoreszenzintensität ist wieder messbar.

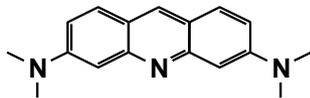


Abbildung 94: Die Strukturformel von Acridinorange.

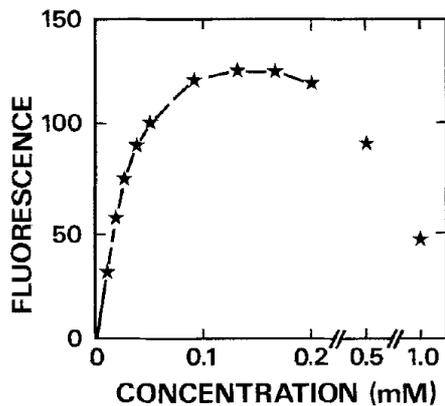


Abbildung 95: Fluoreszenz von Acridinorange in Tris/HCl-Puffer pH 7,4 als Funktion der Konzentration, entnommen aus [29].

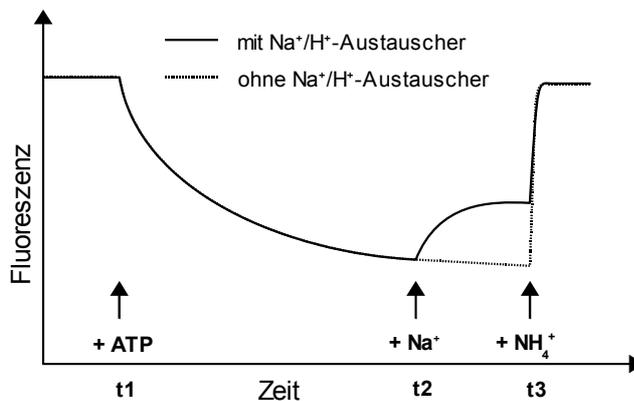


Abbildung 96: Qualitative Darstellung der Fluoreszenzantwort des Assays in An- und Abwesenheit eines Na⁺/H⁺-Austauschers.

In einer gerührten und auf 20°C temperierten Fluoreszenzküvette wurden 2 ml Messpuffer mit 2 µM Acridinorange, 4 mM KCl und einer 100 µg Protein entsprechenden Menge Vesikel vorgelegt. Nach 60 - 120 Sekunden stellte sich eine konstante Fluoreszenz ein. Zum Zeitpunkt t1 wurden 100 µM ATP zugegeben, zum Zeitpunkt t2 10 mM NaCl und zum Zeitpunkt t3 10 mM NH₄Cl. Alle Substanzen wurden in Messpuffer gelöst und der pH-Wert wenn nötig mit Tris korrigiert.

Zusammensetzung des Messpuffers:

Cholinchlorid	19,5 g	140 mM
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1,02 g	5 mM
BisTris	2,09 g	10 mM
H ₂ O (bidest)	ad 1,0 l	
pH	6,0 / 7,0 / 8,0	eingestellt mit HCl/KOH

5.10.4 Messung des lichtinduzierten Protonentransports an *H. salinarum* Zellvesikel

Bacteriorhodopsin pumpt, getrieben von Licht, Protonen aus Zellvesikeln. Im ungepufferten Medium kann die resultierende pH-Änderung mit einer pH-Elektrode gemessen werden.

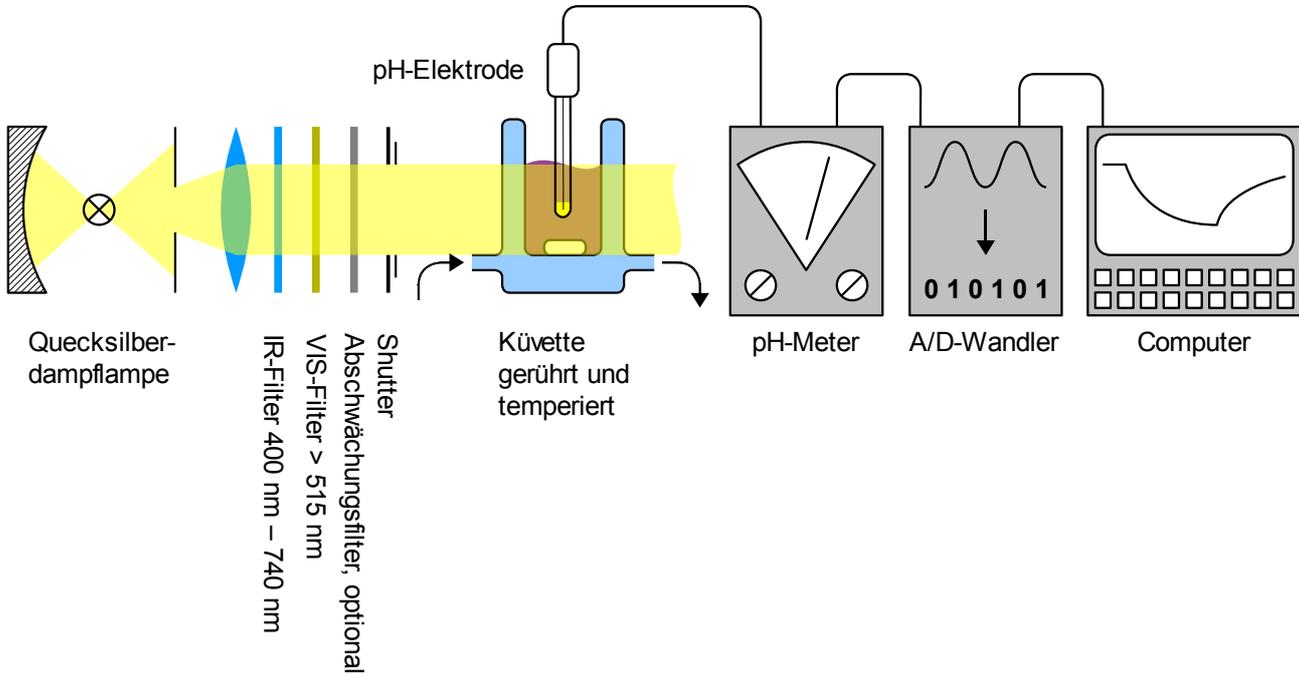


Abbildung 97: Versuchsaufbau zum Nachweis des lichtinduzierten H⁺-Transports aus Zellvesikeln.

In diese gemessene pH-Änderung gehen neben dem primären Protonentransport durch BR auch durch den Protonengradienten und/oder das elektrische Potential getriebene Sekundärtransporte, wie zum Beispiel der Na⁺/H⁺-Austausch, ein.

Gemessen wurde mit nach Abschnitt 5.9.6 hergestellten Zellvesikeln in einem Volumen von 7 ml mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml in 4 M NaCl. Die Nennleistung der Quecksilberdampflampe betrug 100 W. Das Licht wurde auf den Wellenlängenbereich zwischen 515 nm und 740 nm begrenzt. Ohne zusätzliche Abschwächungsfilter betrug die an der Küvette gemessene Lichtintensität 80 mW/cm² (Lasercheck, Coherent) berechnet auf eine Wellenlänge von 560 nm. Die Küvette wurde gerührt und durch einen Kryostat (RM6, Lauda) auf 20°C temperiert. Die pH-Elektrode (InLab 422, Mettler Toledo) wurde täglich regeneriert.

5.10.5 Die Sensorpräparation zur elektrischen Detektion elektrogenen Transports

Auf die Goldoberfläche des Sensors wird eine 'supported lipid membrane' aufgebracht, wie von Florin und Gaub in [31] beschrieben. Die der Oberfläche zugewandte Seite besteht aus Octadecylmercaptan, das über den Schwefel an das Gold gebunden ist. Die abgewandte Seite besteht aus Di-Phytanoyl-Phosphatidyl-Cholin und Octadecylamin. Dieses primäre Amin ist mit einem pKs von 11 unter physiologischen Bedingungen protoniert und vermittelt der Membran eine positive Ladung, die die Adsorption von Liposomen aus negativ geladenen Lipiden ermöglicht [32].

Die Sensoren und die zur Beschichtung der Oberfläche nötigen Lösungen wurden von Iongate bezogen.

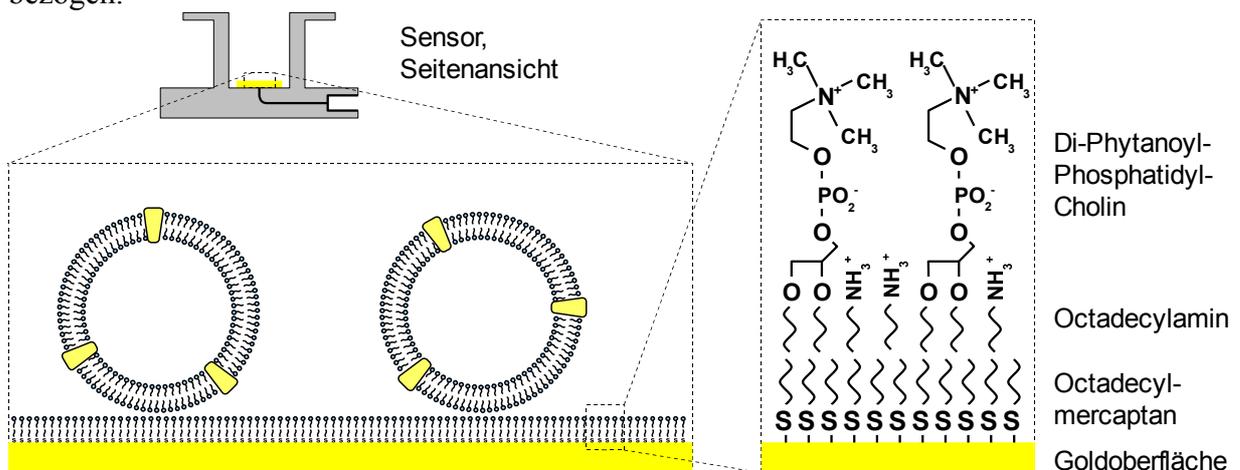


Abbildung 98: Aufbau der Oberfläche eines Sensors des Detektionssystems SURFE^{2R} One.

Der Sensor wurde für 15 Minuten mit 50 μ l 1 mM Octadecylmercaptan in 2-Propanol bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde entfernt, die Oberfläche dreimal mit 200 μ l 2-Propanol gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. Der Sensor wurde weitere 15 Minuten kopfüber gelagert um Lösungsmittelreste abzdampfen.

Anschließend wurden 3 μ l einer Mischung aus 0,125 mg/ml Octadecylamin und 7,5 mg/ml Di-Phytanoyl-Phosphatidyl-Cholin in Dekan auf die Oberfläche pipettiert und 50 μ l des Messpuffers zugegeben. Nach 60 Minuten bei 4°C wurde der Sensor im Gerät mit Messpuffer gespült. Die gemessene Kapazität lag bei 200 - 400 nF/cm², die Leitfähigkeit bei 10 - 28 nS/cm², Literaturwerte: 570 nF/cm² und 1,6 nS/cm² [31], gemessen an frisch aufgedampften Goldoberflächen.

Der Sensor wurde wieder ausgebaut und das Volumen des Messpuffers auf \sim 50 μ l reduziert. 10 μ l der entsprechend Abschnitt 5.9.19 hergestellten Proteoliposomen wurden zugegeben und durch vorsichtiges auf und ab pipettieren mit dem Puffer gemischt. Die Öffnung wurde mit Parafilm verschlossen und der Sensor über Nacht bei 4°C gelagert.

5.11 Informatische Methoden

5.11.1 Korrektur von UV-VIS-Spektren streuender Bacteriorhodopsin-Proben

Bacteriorhodopsin in Liposomen, Purpurmembran oder Zellvesikeln entzieht sich einer präzisen spektroskopischen Quantifizierung, da die im Bereich der Wellenlänge liegende Größe der Membranstrukturen zu Lichtstreuung führt und dadurch eine zu hohe Absorption vortäuscht.

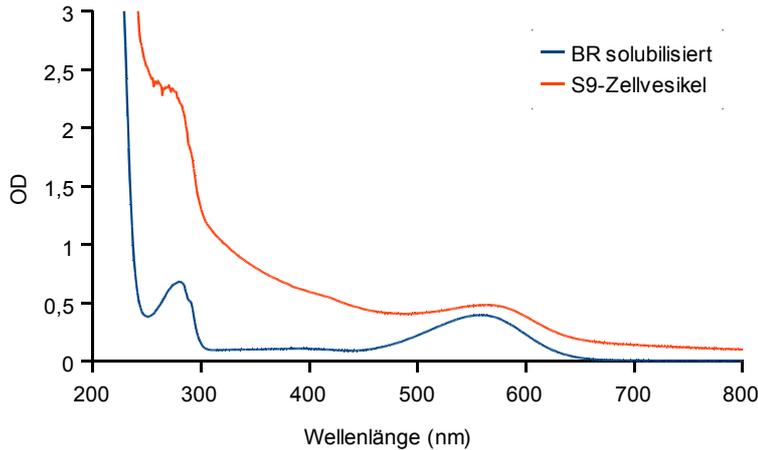


Abbildung 99: Vergleich der UV/VIS-Spektren von S9-Zellvesikeln und solubilisiertem Bacteriorhodopsin.

Mathematische Beschreibung der Lichtstreuung

In die physikalisch korrekte Beschreibung der Lichtstreuung nach Mie geht unter anderem die Geometrie der Partikel ein, eine Größe die für Routinemessungen nicht zugänglich ist. Aus diesem Grund wurde eine Funktion gesucht, die ohne Rücksicht auf die physikalischen Hintergründe das Spektrum einer streuenden Probe im relevanten Bereich zwischen 400 nm - 800 nm möglichst genau wiedergibt. Zur Darstellung reiner Streuung wurde als Modell Milch gewählt.

Beim Test verschiedener Polynome zeigte sich, dass eine ausreichend genaue Beschreibung durch

$$OD(\lambda) = (1/\lambda^2) \cdot c + a$$

möglich ist.

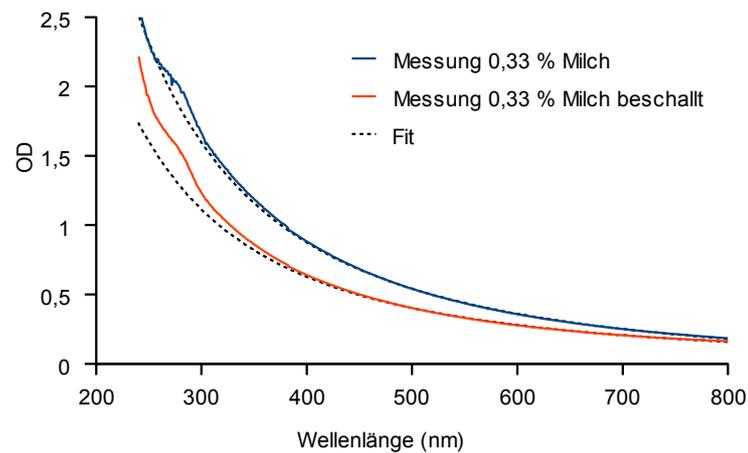


Abbildung 100: Vergleich zwischen gemessenen Streukurven und dem entsprechenden Fit.

Mathematische Beschreibung eines streuenden BR-Spektrums

Unter der Annahme, dass die an Milch als Modell hergeleitete Beschreibung der Lichtstreuung auch für vesikuläre Suspensionen Gültigkeit besitzt, lassen sich durch sukzessive Approximation eines numerischen BR-Referenzspektrums und der Streukurve an ein gemessenes Spektrum Streuungsfehler eliminieren:

Die Streukurve: $OD(\lambda) = (1/\lambda^2) \cdot c + a$

Der Faktor a bestimmt die y-Position der Streukurve:

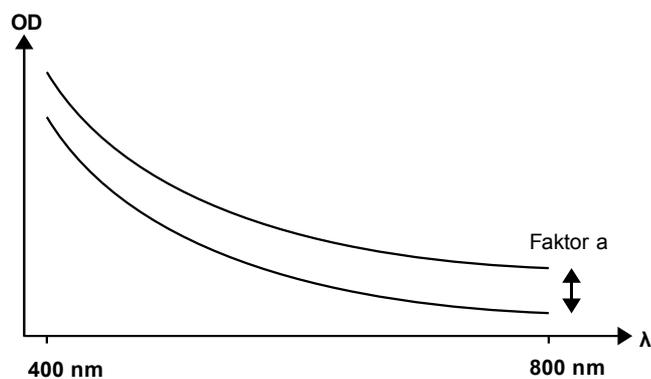


Abbildung 101: Der Einfluss des Faktors a auf die Streukurve.

Der Faktor c bestimmt die Steigung der Streukurve:

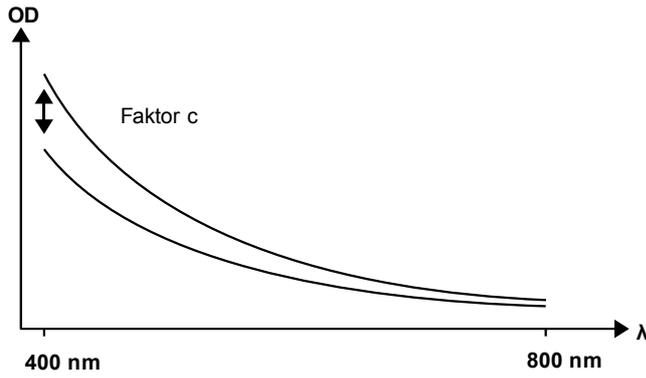


Abbildung 102: Der Einfluss des Faktors c auf die Streukurve.

Das BR-Referenzspektrum

Dieses Spektrum wurde mit solubilisiertem Bacteriorhodopsin gemessen.

Der Faktor ΔOD bestimmt die y-Streckung des Spektrums:

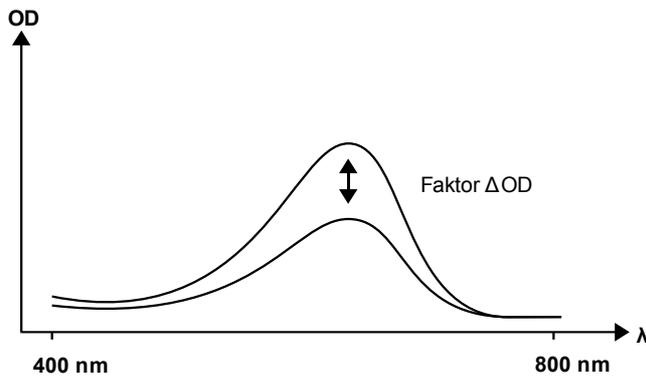


Abbildung 103: Der Einfluss des Faktors ΔOD auf das BR-Referenzspektrum.

Der Faktor $\Delta \lambda$ bestimmt die Lage des Absorptionsmaximums:

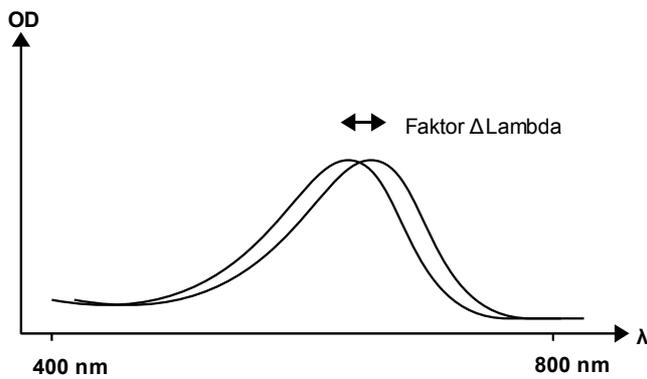


Abbildung 104: Der Einfluss des Faktors $\Delta \lambda$ auf das BR-Referenzspektrum.

Die Berechnung des Spektrums

Das berechnete Spektrum setzt sich aus dem BR-Referenzspektrum und der Streukurve zusammen:

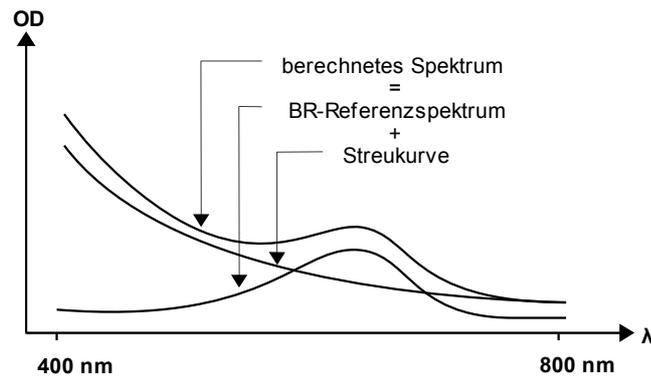
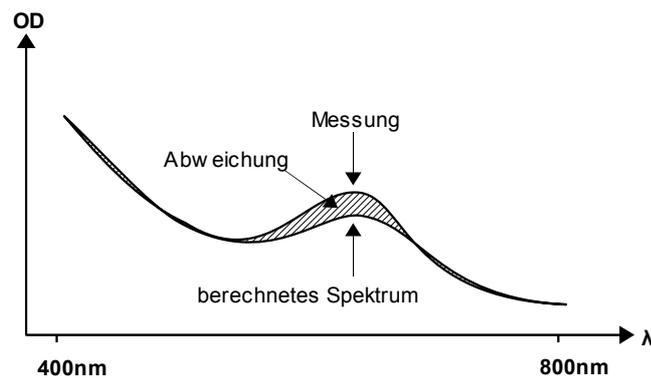


Abbildung 105: Die Berechnung des Spektrums aus Streukurve und BR-Referenzspektrum.

Die Anpassung an das gemessene Spektrum

Die Anpassung eines berechneten Spektrums an ein gemessenes erfolgt über die Optimierung der Parameter a , c , ΔOD und $\Delta \lambda$. Der zu minimierende Faktor ist die Abweichung zwischen Rechnung und Messung, die als Fläche zwischen den beiden Kurven quantifizierbar ist:



$$\text{Abweichung} = \int_{400 \text{ nm}}^{800 \text{ nm}} \sqrt{(\text{Messung}(x) - \text{Rechnung}(x))^2} dx$$

Abbildung 106: Die Berechnung der Abweichung zwischen dem gemessenen und dem berechneten Spektrum.

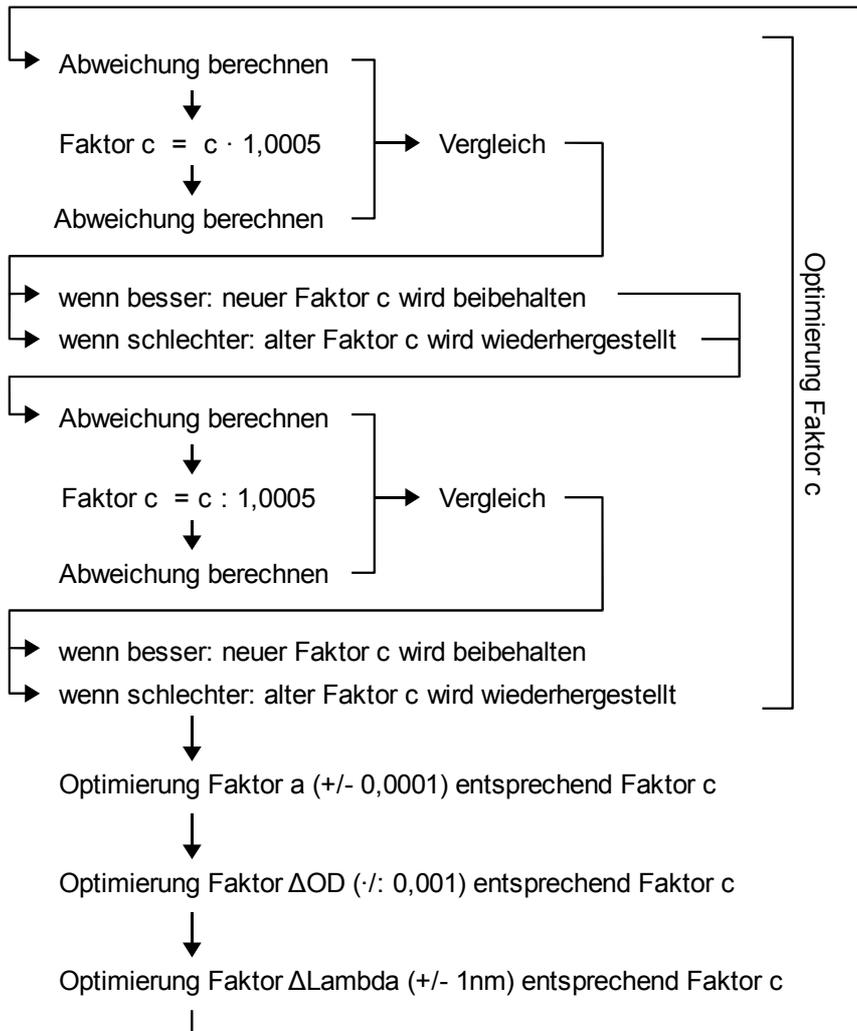


Abbildung 107: Algorithmus der Parameteroptimierung.

Das Ergebnis ist eine Beschreibung der Lichtstreuung durch die Parameter a und c und die Beschreibung des BR-Spektrums durch die Parameter ΔOD und ΔLambda , wodurch sich die beiden Spektren separat darstellen lassen.

Die Umsetzung in ein Computerprogramm

Der Algorithmus zur Optimierung der Parameter wurde in Turbopascal (Delphi 2005, Borland) formuliert und als Programm 'PM-Quanti' in dieser Arbeit eingesetzt.

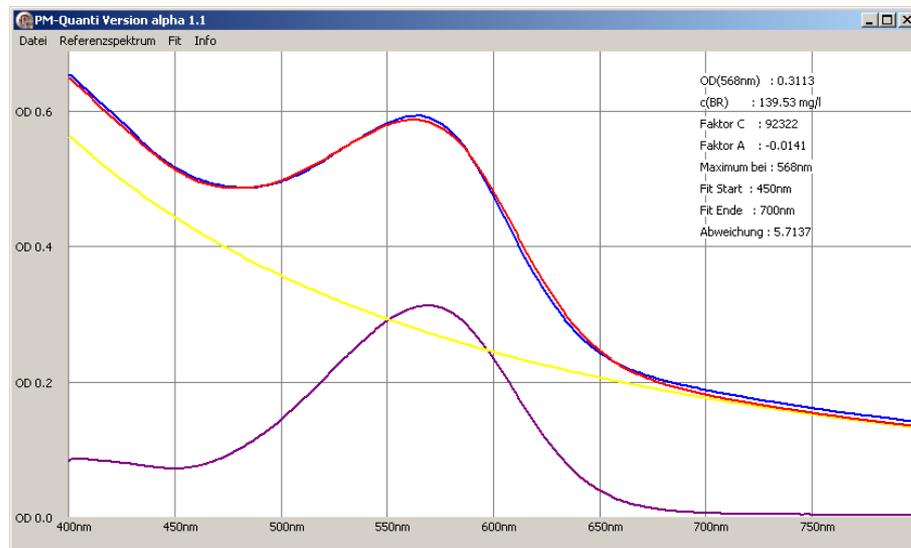


Abbildung 108: Das Programm PM-Quanti.

5.11.2 Quantifizierung von Proteinbanden auf Coomassie gefärbten Gelen

Die Intensität der Färbung einer Proteinbande nach Färbung mit Coomassie ermöglicht bei ausreichendem Abstand zu anderen Banden eine selektive Quantifizierung.

Zur Auswertung der Färbung wird das Gel gescannt. Zuerst werden die Farbwerte einer Spur in x-Richtung und anschließend der zu quantifizierende Peak in y-Richtung integriert. Als Ergebnis erhält man die Peakfläche. Unter der Annahme, dass alle Proteine im Verhältnis zum Molekulargewicht die selbe Menge Coomassie adsorbieren, kann durch eine Eichung mit einem Protein bekannter Konzentration die absolute Menge bestimmt werden. Eine Alternative dazu ist, wenn die Gesamtmenge des aufgetragenen Proteins bekannt ist, diese mit der Fläche aller Peaks gleichzusetzen und aus dem Verhältnis der Flächen zueinander die einzelnen Banden zu quantifizieren.

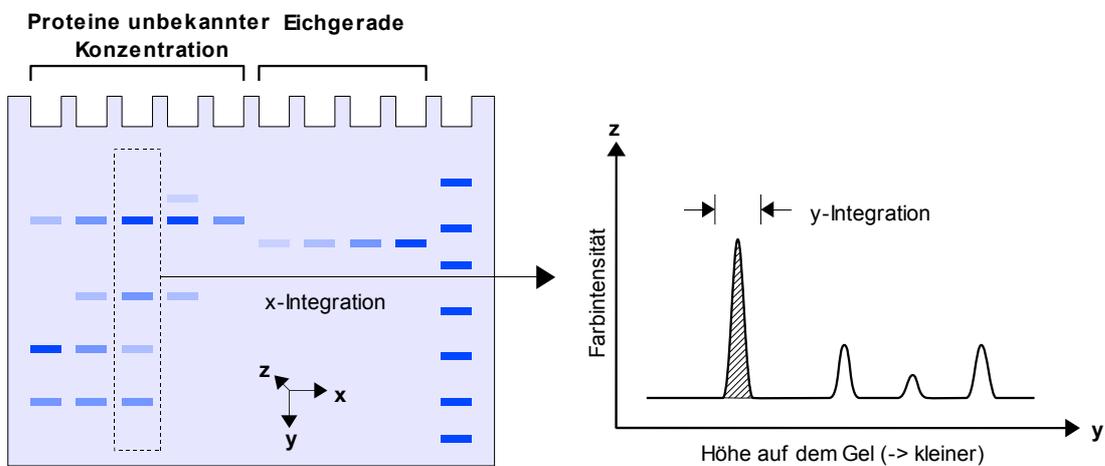


Abbildung 109: Quantifizierung der in einer Bande enthaltenen Proteinmenge nach Färbung mit Coomassie durch Integration der Farbwerte.

Die x-Integration der Spuren wurde in einem selbst geschriebenen Programm, die y-Integration der Peaks in Microsoft Excel durchgeführt.

Literaturverzeichnis

- [1] Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69: 2110-2114
- [2] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis BM, Erlich HA (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-491
- [3] Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16: 6127-6145
- [4] Cline SW, Schalkwyk LC, Doolittle WF (1989) Transformation of the Archaeobacterium *Halobacterium volcanii* with Genomic DNA. *Journal of Bacteriology* 171: 4987-4991
- [5] Sanger F, Air GM, Barrel BGI, Brown NL, Coulson AR, Fiddes JC, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage Φ X174 DNA. *Nature* 265: 687-695
- [6] Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol* 98: 503-517
- [7] Hohenfeld IP, Wegener AA, Engelhard M (1999) Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 442: 198-202
- [8] Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J (1995) Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose PBAD Promoter. *Journal of Bacteriology* 177: 4121-4130
- [9] Klostermeier D, Seidel R, Reinstein J (1998) Functional Properties of the Molecular Chaperone DnaK from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol* 279: 841-853
- [10] Tabor S, Richardson CC (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Biochemistry* 82: 1074-1078
- [11] Koch MK, Oesterhelt D (2005) MpcT is the transducer for membrane potential changes in *Halobacterium salinarum*. *Molecular Microbiology* 55: 1681-1694
- [12] Krippahl G, Oesterhelt D (1983) Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants.pdf. *Ann. Microbiol.* 134B: 137-150
- [13] Bertani G (1951) Studies on Lysogenesis. *Journal of Bacteriology* 62: 293-300
- [14] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Frovenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85
- [15] Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4: 2411-2423
- [16] Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

- [17] Schagger H, Jagow G (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166: 368-379
- [18] Schagger H (1995) Native Elektrophoresis for Isolation of Mitochondrial Oxidativ Phosphorylation Protein Complexis. *Methods in Enzymology* 260: 190-202
- [19] Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Biochemistry* 76: 3116-3120
- [20] Towbin H, Staehelint T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Biochemistry* 76: 4350-4354
- [21] Hochschuli E, Bannwarth W, Dobeli H, Genz R, Stuber D (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology* 6: 1321-1325
- [22] Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598 - 599
- [23] Le Maire M, Champeil P, Moller JV (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et Biophysica Acta* 1508: 86-111
- [24] MacDonaldt RE, Lanyi JK (1975) Light-Induced Leucine Transport in Halobacterium halobium Envelope Vesicles: A Chemiosmotic System. *Biochemistry* 14: 2882-2889
- [25] Rosen PR (1986) Ion Extrusion Systems in Escherichia coli. *Methods in Enzymology* 125: 328-336
- [26] Bligh EG, Dyer WJ (1959) A Rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917
- [27] Kates M, Moldoveanu N, Stewart LC (1993) On the revised structure of the major phospholipid of Halobacterium salinarium. *Biochimica et Biophysica Acta* 1169: 46-53
- [28] Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D (1979) Preparation of Liposomes of Defined Size Distribution by Extrusion through Polycarbonate Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 557: 9-23
- [29] Cools AA, Janssen LHM (1986) Fluorescence response of acridine orange to changes in pH gradients across liposome membranes. *Experientia* 42: 954-956
- [30] Seifert K, Fendler K, Bamberg E (1993) Charge transport by ion translocating membrane proteins on solid supported membranes. *Biophysical Journal* 64: 384-391
- [31] Florin EL, Gaub HE (1993) Painted supported lipid membranes. *Biophysical Journal* 64: 375-383
- [32] Dancshazy Z, Karvaly B (1976) Incorporation of bacteriorhodopsin into a bilayer lipid membrane; a photoelectric-spectroscopic study. *FEBS Letters* 72: 136-138
- [33] Storch KF, Rudolph J, Oesterhelt D (1999) Car: a cytoplasmic sensor responsible for arginine chemotaxis in the archaeon Halobacterium salinarum. *EMBO* 18: 1146–1158
- [34] Lanyi JK, MacDonald RE (1976) Existence of Electrogenic Hydrogen Ion/Sodium Ion Antiport in Halobacterium halobium Cell Envelope Vesicles. *Biochemistry* 15: 4608-4614

-
- [35] Bimboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1524
- [36] Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Biochemistry* 76: 615-619
- [37] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning, Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press : E5
- [38] Blum H, Hildburg B, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99
- [39] Zehr BD, Savin TJ, Hall RE (1989) A One-Step, Low Background Coomassie Staining Procedure for Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 182: 157-159
- [40] Zubay G (1973) In Vitro Synthesis of Protein in Microbial Systems. *Annu. Rev. Genet.* 7: 267-287
- [41] Rigaud JL, Pitard B, Levy D (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1231: 223-246
- [42] Le Pecq JB, Paoletti C (1966) A New Fluorometric Method for RNA and DNA Determination. *Analytical Biochemistry* 17: 100-107
- [43] Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fared GC, Richardson CC (1968) Enzymatic Breakage and Joining of Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Biological Chemistry* 243: 4543-4555
- [44] Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 28: 815-820
- [45] Maizel JV, Habel K, Salzman NP (1969) *Fundamental Techniques in Virology*. Academic Press, New York : 334-362
- [46] Finn RD, Mistry J, Schuster-Böckler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Durbin R, Eddy SR, Sonnhammer ELL, Bateman A (2006) Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Research* 34: D247–D251
- [47] Higgins DG, Sharp PM (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73: 237-244
- [48] Fujisawa M, Kusumoto A, Wada Y, Tsuchiya T, Ito M (2005) NhaK, a novel monovalent cation/H⁺ antiporter of *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* 183: 411–420
- [49] Patenge N, Berendes A, Engelhardt H, Schuster SC, Oesterhelt D (2001) The fla gene cluster is involved in the biogenesis of flagella in *Halobacterium salinarum*. *Molecular Microbiology* 41: 653–663
- [50] Hellmer J, Pätzold R, Zeilinger C (2002) Identification of a pH regulated Na⁺/H⁺ antiporter of *Methanococcus jannaschii*. *FEBS Letters* 527: 245-249
- [51] Pinner E, Kotler Y, Padan E, Schuld S (1993) Physiological Role of NhaB, a Specific Na⁺/H⁺ Antiporter in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 268: 1729-1734
- [52] Ruepp A, Soppa J (1996) Fermentative Arginine Degradation in *Halobacterium salinarum* (Formerly *Halobacterium halobium*): Genes, Gene Products, and Transcripts of the arcRACB Gene Cluster. *Journal of Bacteriology* 178: 4942–4947

- [53] Strausak D, Waser M, Solioz M (1993) Functional Expression of the Enterococcus hirae NaH-Antiporter in Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry 268: 26334-26337
- [54] Oesterhelt D, Stoeckenius W (1973) Functions of a New Photoreceptor Membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2853-2857
- [55] Oesterhelt D (1982) Reconstitution of the Retinal Proteins Bacteriorhodopsin and Halorhodopsin. Methods in Enzymologie 88: 10-17
- [56] Tittor J, Soell C, Oesterhelt D, Butt HJ, Bamberg E (1989) A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96 -> Asn is fully reactivated by azide. EMBO 8: 3477 - 3482
- [57] Gerwert K, Hess B, Soppa J, Oesterhelt D (1989) Role of aspartate-96 in proton translocation by bacteriorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4943-4947
- [58] Lumileds (2005) Technical Datasheet DS23 power light source Luxeon Star. Lumileds : 1-19
- [59] Jones WJ, Leigh JA, Mayer F, Woese CR, Wolfe RS (1983) Methanococcus jannaschii sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. Arch Microbiol 136: 254-261
- [60] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4576-4579
- [61] Ginzburg M, Sachs L, Ginzburg BZ (1970) Ion Metabolism in a Halobacterium. The Journal of General Physiology 55: 187-207
- [62] Pfeiffer F, Schuster SC, Broicher A, Falb M, Palm P, Rodewald K, Ruepp A, Soppa J, Tittor J, Oesterhelt D (2008) Evolution in the laboratory: The genome of Halobacterium salinarum strain R1 compared to that of strain NRC-1. Genomics 91: 335-346
- [63] Lanyi JK (1974) Salt-Dependent Properties of Proteins from Extremely Halophilic Bacteria. Bacteriological Reviews 38: 272-290
- [64] Baxter RM (1959) An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of Halobacterium salinarium. Can. J. Microbiol. 5: 47-57
- [65] Bamberg E, Apell HJ, Deneher NA, Sperling W, Stieve H, Läuger P (1979) Photocurrents Generated by Bacteriorhodopsin on Planar Bilayer Membranes. Biophys. Struct. Mechanism 5: 277-292
- [66] Happe M, Teathera RM, Overath P, Knobling A, Oesterhelt D (1977) Direction of proton translocation in proteoliposomes formed from purple membrane and acidic lipids depends on the pH during reconstitution. Biochim Biophys Acta 465: 415-420
- [67] Schobert B, Lanyi JK (1982) Halorhodopsin Is a Light-driven Chloride Pump. Journal of Biological Chemistry 257: 10306-10313
- [68] Zuber D, Krause R, Venturi M, Padan E, Bamberg E, Fendler K (2005) Kinetics of charge translocation in the passive downhill uptake mode of the Na⁺/H⁺ antiporter NhaA of Escherichia coli. Biochimica et Biophysica Acta 1709: 240-250
- [69] (2007) Datasheet DLPCA-200. FEMTO Messtechnik GmbH : 1-5
- [70] Béjà O, Spudich EN, Spudich JL, Leclerc M, DeLong EF (2001) Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. Analytical Biochemistry 411: 786-789
- [71] Crowley JM (1973) Electrical Breakdown of Bimolecular Lipid Membranes as an Electromechanical Instability. Biophysical Journal 13: 711-724

-
- [72] Montal M, Mueller P (1972) Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 3561-3566
- [73] Nagle JF, Tristram-Nagle S (2000) Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469: 159-195
- [74] Drachev LA, Kaulen AD, Skulachev VP (1984) Correlation of photochemical cycle, H⁺ release and uptake, and electric events in bacteriorhodopsin. *FEBS Letters* 178: 331-335
- [75] Elferink MGL, Wit JG, Driessen AJM, Konings WN (1994) Stability and proton-permeability of liposomes composed of archaeal tetraether lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1193: 247-254
- [76] Heberle J, Riesle J, Thiedemann G, Oesterhelt D (1994) Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer. *Nature* 370: 379-382
- [77] Geibel S, Friedrich T, Ormos P, Wood PG, Nagel G, Bamberg E (2001) The Voltage-Dependent Proton Pumping in Bacteriorhodopsin Is Characterized by Optoelectric Behavior. *Biophysical Journal* 81: 2059–2068
- [78] Duschl A, Wagner G (1986) Primary and Secondary Chloride Transport in *Halobacterium halobium*. *Journal of Bacteriology* 168: 548-552
- [79] Taglicht D, Padan E, Schuldiner S (1991) Overproduction and Purification of a Functional Na⁺/H⁺ Antiporter Coded by *nhaA* (*ant*) from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 11289-11294
- [80] Hunte C, Screpanti E, Venturi M, Rimon A, Padan E, Michel H (2005) Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* 435: 1197-1202
- [81] Padan E, Venturi M, Gerchman Y, Dover N (2001) Na⁺/H⁺ antiporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1505: 144-157
- [82] DasSarma S, DasSarma P (2006) Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences* : 1-9
- [83] Knol J, Sjollem K, Poolman B (1998) Detergent-Mediated Reconstitution of Membrane Proteins. *Biochemistry* 37: 16410-16415
- [84] Hartmann R, Sickinger H-D, Oesterhelt D (1980) Anaerobic growth of halobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3821-3825
- [85] Falb M, Pfeiffer F, Palm P, Rodewald K, Hickmann V, Tittor J, Oesterhelt D (2005) Living with two extremes: Conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis*. *Genome Res.* 15: 1336-1343
- [86] Viitanen P, Garcia ML, H. Kaback R (1984) Purified reconstituted lac carrier protein from *Escherichia coli* is fully functional. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1629-1633
- [87] Tsunoda SP, Ewers D, Gazzarrini S, Moroni A, Gradmann D, Hegemann P (2006) H⁺-Pumping Rhodopsin from the Marine Alga *Acetabularia*. *Biophysical Journal* 91: 1471–1479
- [88] West IC, Mitchell P (1974) Proton/Sodium Ion Antiport in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 144: 87-90
- [89] Patenge N, Haase A, Bolhuis H, Oesterhelt D (2000) The gene for a halophilic β -galactosidase (*bgaH*) of *Haloferax alicantei* as a reporter gene for promoter analyses in *Halobacterium salinarum*. *Molecular Microbiology* 36: 105-113

- [90] Haupts U, Tittor J, Oesterhelt D (1999) CLOSING IN ON BACTERIORHODOPSIN:
Progress in Understanding the Molecule. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28: 367–399

Abkürzungsverzeichnis

Ace	Acerhodopsin von <i>Acetabularia acetabulum</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BN	Blue-Native
BR	Bacteriorhodopsin
BS	Basalsalz
BS-Hepes	Basalsalz + 20mM Hepes, pH7,0
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
CMC	critical micelle concentration / kritische Mizellbildungskonzentration
CuNTA	Poly-Nitrilotriessigsäure-Kupferkomplex
DC	duty cycle / Tastgrad
DDM	n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid
DIG	Digoxigenin
DLS	dynamische Lichtstreuung
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ϵ	Extinktionskoeffizient
et al.	et alii / und andere
KM	Komplexmedium
HRP	Horseradish peroxidase / Meerrettichperoxidase
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MCS	cloning site / Klonierungsstelle
n	Anzahl
NiNTA	Poly-Nitrilotriessigsäure-Nickelkomplex
OD	optische Dichte bei 1cm Weglänge
OG	n-Octyl- β -D-Glycopyranosid
P	Primer
pHR	Halorhodopsin von <i>Natronomonas pharaonis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Natriumlaurylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Die Bezeichnung der offenen Leserahmen und Proteine von *H. salinarum* und *N. pharaonis* erfolgte entsprechend der Datenbank www.halolex.mpg.de [62].

oeXXXX	bezeichnet einen offenen Leserahmen von <i>H. salinarum</i>
OEXXXX	bezeichnet das kodierte Protein
npXXXX	bezeichnet einen offenen Leserahmen von <i>N. pharaonis</i>
NPXXXX	bezeichnet das kodierte Protein

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei

meinem Doktorvater Herrn Prof. Dieter Oesterhelt, der mir die Promotion in einem sehr freien und sehr motivierenden Umfeld ermöglichte und für die bestmöglichen Bedingungen sorgte.

Dr. Jörg Tittor, für die Betreuung meiner Arbeit. Auch schwersten wissenschaftlichen Problemfällen nahm Jörg den Schrecken. Besonders bedanken möchte ich mich für die Unterstützung bei den Experimenten mit ^{22}Na .

Dr. Eva-Kathrin Sinner für die Betreuung meiner Arbeit. Viele der für diese Arbeit wesentlichen Grundlagen wurden mit Evas Unterstützung im XL-Labor gelegt.

Dr. Birgit Wiltschi und Judith Scholz, die mich zu Beginn meiner Arbeit im XL-Labor in die molekularbiologischen Methoden einführten.

Andy Wende, Brigitte Kessler, Jens Twellmeyer, Susanne von Gronau und Wilfried Staudinger für die gute Zusammenarbeit auf allen möglichen Gebieten.

Sigi Bauer, Bea Scheffer und Frank Siedler für massenspektrometrische Analysen und Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse.

Lissy Weyher-Stingl für schnelle und unbürokratische Hilfe im Gerätepark der Core Facility.

Walter Erhardt für schnelle Hilfe bei kleineren und größeren Problemen mit elektrischem Gerät.

Frau Haack, der gute Geist dieser Abteilung, der uns alle bürokratischen Sorgen abnahm.

Martin Engelhard für das Plasmid pHR-pET27bMod.

Ethana Padan für den E. coli-Stamm EP432.

Dr. Stefan Schork, Dr. Robin Krause und dem gesamten Team der Firma longate für hervorragenden Service und schnelle Hilfe.

Dr. Anne Katrin Werenskiold für die kritische Begutachtung der Einleitung.

Prof. Haralabos Zorbas für die intuitive Vermittlung dieser Promotionsstelle.

meinen Eltern, deren Unterstützung eine große Last von meinen Schultern nahm.

meiner Frau Bettina, die in allen Bereichen wesentlich zum Gelingen beigetragen hat. Im Labor ermöglichte erst ihre Fähigkeit, auch dem störrischsten Halobacterium die gewünschte Mutation unterzuschieben, viele wichtige Experimente. Außerhalb war sie die psychologische Stütze.

Lebenslauf

Florian Wimmer

geboren am 11.3.1975
in Simbach am Inn
verheiratet, ein Sohn

Schulbildung

September 1981 - Dezember 1982

Volksschule in Töging

Januar 1983 - Juli 1985

Volksschule in Marktl

September 1985 - Juni 1995

König-Karlmann-Gymnasium in Altötting

Zivildienst

September 1995 - Oktober 1996

BRK-Altenheim in Altötting, Pflege

Studium

Oktober 1996 - April 1997

Elektrotechnik an der TU Wien

Mai 1997 - Oktober 2001

Pharmazie an der LMU München

Praktisches Jahr

November 2001 - April 2002

Marien-Apotheke in Marktl

Mai 2002 - Oktober 2002

Merck in Darmstadt

Dezember 2002

Staatsexamen

Anstellung

Januar 2003 - September 2004

Marien-Apotheke in Marktl

Praktikum

Oktober 2004 - Dezember 2004

Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried
Abteilung Membranbiochemie, Dr. E.-K. Sinner

Promotion

seit Januar 2005

Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried
Abteilung Membranbiochemie, Prof. Dr. D. Oesterhelt