

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

**Strukturelle und funktionelle Untersuchungen
an der
lichtgetriebenen Anionenpumpe Halorhodopsin
aus
*Halobacterium salinarum***

Walter Gmelin

aus

Wolfratshausen

1. Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13, Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Oesterhelt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.
München, 1. September 2003

.....

Walter Gmelin

Dissertation eingereicht am

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Februar 2004

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1	Vorkommen und Funktion archaealer Rhodopsine	3
2.2	Struktureller Aufbau der archaealen Rhodopsine	5
2.3	Der Chromophor	7
2.4	Photozyklus der archaealen Rhodopsine Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin	9
2.4.1	Der Photozyklus von BR und der Mechanismus des Protonentransports in BR	9
2.4.2	Der Photozyklus von HR und der Mechanismus des Anionentransports in BR	13
2.5	3D-Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	15
2.6	Zielsetzung	20
3.	Ergebnisse	21
3.1	Proteinreinigung und Kristallisation von HR-Mutanten	21
3.2	Optimierung der Kristallisationsbedingungen	22
3.2.1	Datensammlung und Prozessierung	26
3.2.2	Molekularer Ersatz, Modellbau und Verfeinerung	27
3.3	Struktur des Grundzustandes von T203V	29
3.3.1	Kristallpackung	29
3.3.2	Tertiär-/Quartärstruktur	31
3.3.3	Chloridbindungsstellen im Grundzustand von T203V	35
3.3.4	Struktur des Grundzustands Bromid-haltiger T203V-Kristalle	40
3.4	Struktur des L ₁ -Intermediats von T203V	42
3.4.1	UV/Vis-Spektroskopie an T203V-Kristallen	42
3.4.2	FTIR-Messungen an T203V-Kristallen	45
3.4.3	Verfeinerung des L ₁ -Intermediats	47
3.4.4	L ₁ -Intermediatstruktur Bromid-haltiger T203V-Kristalle	51

3.4.5	Vergleich der Kavitäten von Intermediat- und Grundzustand	53
3.4.6	Veränderungen der Chloridbindungsstasche CB I	55
3.5	Charakterisierung weiterer HR-Mutanten	60
3.5.1	Chromophorabsorption der HR-Mutanten und pK_a -Werte der Schiff'schen Base	61
3.5.2	Retinal-Isomerenverhältnisse in HR-Mutanten	65
3.5.3	Transportaktivitäten der HR-Mutanten	67
3.5.4	Photozyklusmessungen durch Blitzlichtphotolyse	69
4.	Diskussion	72
4.1	Verlauf der Kristallisation in der kubischen Lipidphase	72
4.2	Verfeinerung des L_1 -Intermediats in T203V	77
4.2.1	Betrachtungen zur Verfeinerung und Strukturaufklärung von Intermediatzuständen in Bakteriorhodopsin	77
4.2.2	Erzeugung und Verfeinerung des L_1 -Intermediats von T203V	84
4.3	Struktur des Grundzustands von T203V	88
4.3.1	Quartärstruktur von Halorhodopsin im Kristall	88
4.3.2	Chloridbindungsstellen in Halorhodopsin	89
4.4	Struktur des L_1 -Intermediats in T203V	92
4.5	Funktionelle Reste innerhalb der beiden Chloridbindungsstellen CB I und CB II	94
4.5.1	Die Chloridbindungsstelle CB II	94
4.5.2	Die Chloridbindungsstelle CB I	96
4.6	Synthese von Katalysezyklus und Photozyklus in Halorhodopsin	97
4.6.1	Der Katalysezyklus von Halorhodopsin	97
4.6.2	Zusammenfassendes Modell des Photozyklus in Halorhodopsin	100
5.	Material und Methoden	102
5.1	Material	102
5.1.1	Reagentien und Enzyme	102
5.1.2	Stämme verwendeter Organismen	103
5.1.2.1	Escherichia coli-Stämme	103
5.1.2.2	Halobacterium salinarum-Stämme	103

5.1.3	Nährmedien	104
5.1.4	Puffer und Lösungen	104
5.1.4.1	Basalsalzlösung	104
5.1.4.2	Lysepuffer	104
5.1.4.3	Laufpuffer A	104
5.1.4.4	Laufpuffer B	104
5.2	Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden	105
5.2.1	Transformation und Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	105
5.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	105
5.2.3	Transformation von <i>H. salinarium</i>	106
5.2.4	Kultivierung von <i>Halobacterium salinarium</i>	107
5.3	Biochemische Methoden	108
5.3.1	Isolierung der HR-Membranfraktionen	108
5.3.2	Retinalextraktion und Isomerentrennung	108
5.3.3	Messung der Transportaktivität von HR an intakten Zellen	109
5.3.4	Kristallisationsansätze von HR-Mutanten	109
5.3.5	Isolierung der Protein-Kristalle aus der kubischen Lipid-Phase	110
5.4	Spektroskopische Methoden	111
5.4.1	UV-vis-Spektroskopie	111
5.4.2	Blitzlicht-Photolyse	111
5.4.3	FTIR-Spektroskopie	112
5.4.4	Proteinkristallographische Methoden	112
5.4.4.1	Datensammlung und Datenreduktion	112
5.4.4.2	Strukturlösung und Modellverfeinerung	112
5.4.4.3	Graphische Darstellung	113
6.	Abkürzungsverzeichnis	114
7.	Literaturverzeichnis	116
8.	Anhang	123
8.1	Liste der gesammelten und ausgewerteten Datensätze	123
8.2	Pipettierschema für einen typischen Kristallisationsansatz in der	123

kubischen Lipidphase

9.	Danksagung	125
10.	Lebenslauf	127

1. Zusammenfassung

Halorhodopsin ist ein integrales Membranprotein aus *Halobacterium salinarum*. Es ist eine lichtgetriebene Anionenpumpe, die unter phototrophen Lebensbedingungen die osmotische Balance während des Zellwachstums aufrechterhält. Durch die aufgenommene Lichtenergie werden in einem Photozyklus Chloridionen entgegen dem Membranpotential in das Zellinnere gepumpt.

Nachdem die hochaufgelöste Röntgenstruktur des Grundzustands von Halorhodopsin in dieser Arbeitsgruppe bereits gelöst wurde (Kolbe, 2000), konnte die strukturelle Analyse der Photozyklusintermediate fortgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Grundzustand und das L₁-Intermediat von Halorhodopsin in der Mutante T203V strukturell charakterisiert. Wie im Wildtyp, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Anreicherung des L-Intermediats im Photozyklus. Die Mutation bedingt jedoch im Vergleich zum Wildtyp-Protein einen zehnfach langsameren L-Zerfall (Rüdiger, 1997). Es konnte anhand von UV/Vis-Spektren gezeigt werden, daß T203V-Kristalle nach photostationärer Belichtung (532 nm) im gefrorenen Zustand bei 100 K 50-60 Prozent L-Intermediat ausbilden. Das Wildtyp-Protein bildet nach dem gleichen Belichtungsprotokoll lediglich 20-30 Prozent L-Intermediat aus (Kolbe, Dissertation 2001). Im Photozyklus von Halorhodopsin existieren zwei L-Intermediate, L₁ und L₂, die UV/Vis-spektroskopisch ununterscheidbar sind. Durch FTIR-Messungen ist es möglich diese beiden L-Intermediate zu unterscheiden und es konnte gezeigt werden, daß in der Mutante T203V das L₁-Intermediat von Halorhodopsin gebildet wurde.

In der Struktur des Wildtyps (1E12) konnte eine Chloridbindungsstelle CB I in der Nähe der protonierten Schiff'schen Base (PSB) charakterisiert werden, die in der Mutante bestätigt werden konnte. Bei der Strukturlösung der Mutante T203V wurde eine zusätzliche Chloridbindestelle CB II innerhalb des Proteins, in der Nähe der extrazellulären Oberfläche, gefunden. Die beiden Chloridbindestellen wurden in einem weiteren Experiment durch Substitution der Chloridionen durch Bromidionen bestätigt.

Im L_1 -Intermediat von T203V zeigten sich keine größeren Änderungen des Proteinrückgrats und der Seitenketten. Beide Chloridionen befanden sich weiterhin in den beiden zuvor bestimmten Chloridbindestellen. Es konnte somit gezeigt werden, daß der Ionentransferschritt im L_1 -Intermediat noch nicht stattfand.

Die charakteristische Verschiebung des Absorptionsmaximums der L-Intermediate von 578 nm zu 520 nm wurde im Allgemeinen mit einer Annäherung des Chloridions von CBI an die PSB interpretiert. Die Röntgenstruktur des L_1 -Intermediats zeigte aber keine Annäherung. Aufgrund der Auflösung von 1.9 Å für die Intermediatstruktur konnte keine zweifelsfreie Erklärung für die Farbverschiebung geliefert werden. Dennoch werden in dieser Arbeit mögliche Interpretationen für die Farbverschiebung beschrieben.

Im weiteren wurden in dieser Arbeit Mutationsstudien an Halorhodopsin durchgeführt, die sich auf Reste innerhalb der Retinalbindungstasche beschränkten. Aus früheren Arbeiten war bereits bekannt, daß Mutanten von R108 keine Pumpaktivität besaßen (Rüdiger, 1995). R108 bildet mit der PSB zum Chloridion Cl501 sowie D238 ein komplexes Gegenion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Mutanten von D238 ebenfalls keine Pumpaktivität besaßen und somit D238 einen entscheidenden Rest für die korrekte Funktion von Halorhodopsin darstellt.

2. Einleitung

2.1 Vorkommen und Funktion archaealer Rhodopsine

Archaeale Rhodopsine sind Proteine, die sich in der Zellmembran halophiler Organismen wiederfinden. Diese extremophilen Organismen bilden neben den Prokaryoten und Eukaryoten das dritte Reich der Lebewesen und werden als Archaea bezeichnet. Viele Archaea wurden zunächst in ökologischen Nischen gefunden, die bei hohen Drücken, Temperaturen oder Salzkonzentrationen optimale Lebensbedingungen vorfinden. Das erste archaeale Rhodopsin wurde 1971 in einem halophilen Archaeon, dem *Halobacterium salinarum*, beschrieben [Oesterhelt, Stoeckenius, 1971]. Neben Bakteriorhodopsin wurden in *H. salinarum* 3 weitere Rhodopsine, Halorhodopsin, Sensorhodopsin I und Sensorhodopsin II entdeckt.

Für Bakteriorhodopsin wurde nachgewiesen, daß es sich um eine lichtgetriebene Protonenpumpe handelt, die entgegen dem Membranpotential aktiv Protonen aus der Zelle pumpt. Auf dieser Beobachtung basierend wurde vermutet, daß der aufgebaute Protonengradient zur ATP-Synthese verwendet wird und Bakteriorhodopsin neben dem Photoreaktionszentrum ein zweites photosynthetisches System darstellt [Oesterhelt, Hartmann, 1977].

Aufgrund der extremen Lebensbedingungen stellt das Zellwachstum, wie auch die Zellteilung, besondere Herausforderungen an dieses Archaeon. Während des Zellwachstums muß fortwährend die osmotische Balance zwischen Zellinnerem und Umgebung gewahrt bleiben. Kationen können aufgrund des negativen Membranpotentials passiv in die Zelle strömen. Im Gegensatz dazu müssen Anionen aktiv in die Zelle transportiert werden. Unter nichtphototrophen Bedingungen werden Anionen durch einen Transporter in die Zelle gepumpt. Unter phototrophen Bedingungen steht dem Archaeon eine weitere lichtgetriebene Ionenpumpe zur Verfügung: Halorhodopsin ist wie Bakteriorhodopsin eine lichtgetriebene Ionenpumpe, die jedoch im Gegensatz zu Bakteriorhodopsin Chlorid-Ionen in die Zelle pumpt. Somit kann Halorhodopsin während des

phototrophen Wachstums die osmotische Balance zwischen Zellinnerem und der Umgebung aufrechterhalten.

Die beiden Sensorhodopsine SR I und SR II sind keine Ionenpumpen, sondern Lichtrezeptoren, die ein phototaktisches Verhalten der Zelle auslösen [Marwan, Oesterhelt, 1999]. Sie sind die „Augen“ des Archaeons und ermöglichen ihm unter Lichteinfall die optimalen Wachstumsbedingungen zu finden. Strukturell bilden die Sensorhodopsine einen Komplex mit ihren entsprechenden Transducer HTR I und HTR II (Vermittler-Proteine). Das aufgenommene Lichtsignal mündet über die vermittelnden Transducerproteine in die archaeale Signalkaskade zur Steuerung des Flagellarmotors. Der SR I/HTR I-Komplex reagiert auf oranges wie auch auf UV-Licht. Oranges Licht vermittelt eine positive Phototaxis und ermöglicht unter phototrophen Bedingungen eine optimale Nutzung der Lichtenergie. UV-Licht stellt im Gegensatz dazu eine schädliche Strahlungsquelle dar und löst deshalb eine photophobische Reaktion des Archaeons aus. SR II stellt einen reinen UV-Lichtrezeptor dar und löst eine photophobische Reaktion des Archaeons aus.

2.2 Struktureller Aufbau der archaealen Membranproteine

Alle archaealen Rhodopsine besitzen eine ähnliche Tertiärstruktur. Ein Vergleich der drei bekannten Röntgenstrukturen zeigt, daß sie aus sieben Transmembranhelices aufgebaut sind, die über interhelikale Schleifen miteinander verbunden werden (Abbildung 2-1). Das all-trans Retinal ist über eine Schiff'sche Base kovalent an ein Lysin gebunden und unterteilt das Protein in eine cytoplasmatische und eine extrazelluläre Hälfte. Die Verbindung zwischen Helix B und Helix C bildet in sämtlichen archaealen Rhodopsine ein antiparalleles Faltblatt aus.

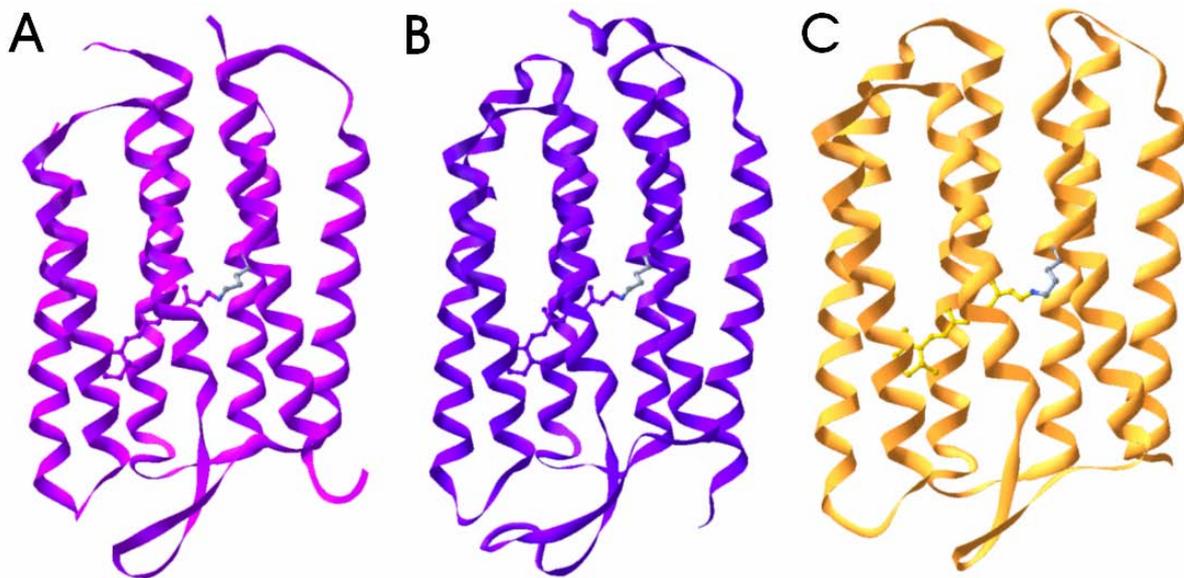


Abbildung 2-1: Bänderdarstellung der strukturell bekannten archaealen Rhodopsine: A) Bakteriorhodopsin, B) Halorhodopsin, C) Sensorhodopsin II. Sämtliche archaeale Rhodopsine sind aus sieben Transmembranhelices aufgebaut. Zwischen Helix B und Helix C bildet sich ein β -Faltblatt aus. Der Chromophor, Retinal, ist an ein Lysin in Helix G kovalent gebunden.

Ein weiterer Vergleich dieser Strukturen zeigt auf, daß Helix C bis Helix G einen strukturell konservierten Kern bilden: Die strukturelle Überlagerung von Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin zeigt, daß die C_{α} -Positionen der Helices C bis Helices G im Mittel nur um 0.74 \AA voneinander abweichen, die beiden Helices A und B jedoch deutlich größere Unterschiede (2.1 \AA und 1.3 \AA) aufweisen. Diese strukturelle Kerndomäne umschließt das Retinal und ein Sequenzvergleich der archaealen Rhodopsine aus *H. salinarum* zeigt, daß die Mehrzahl der

konservernten Aminosäurereste sich in diesem strukturellen Kern befinden (Abbildung 2-2).

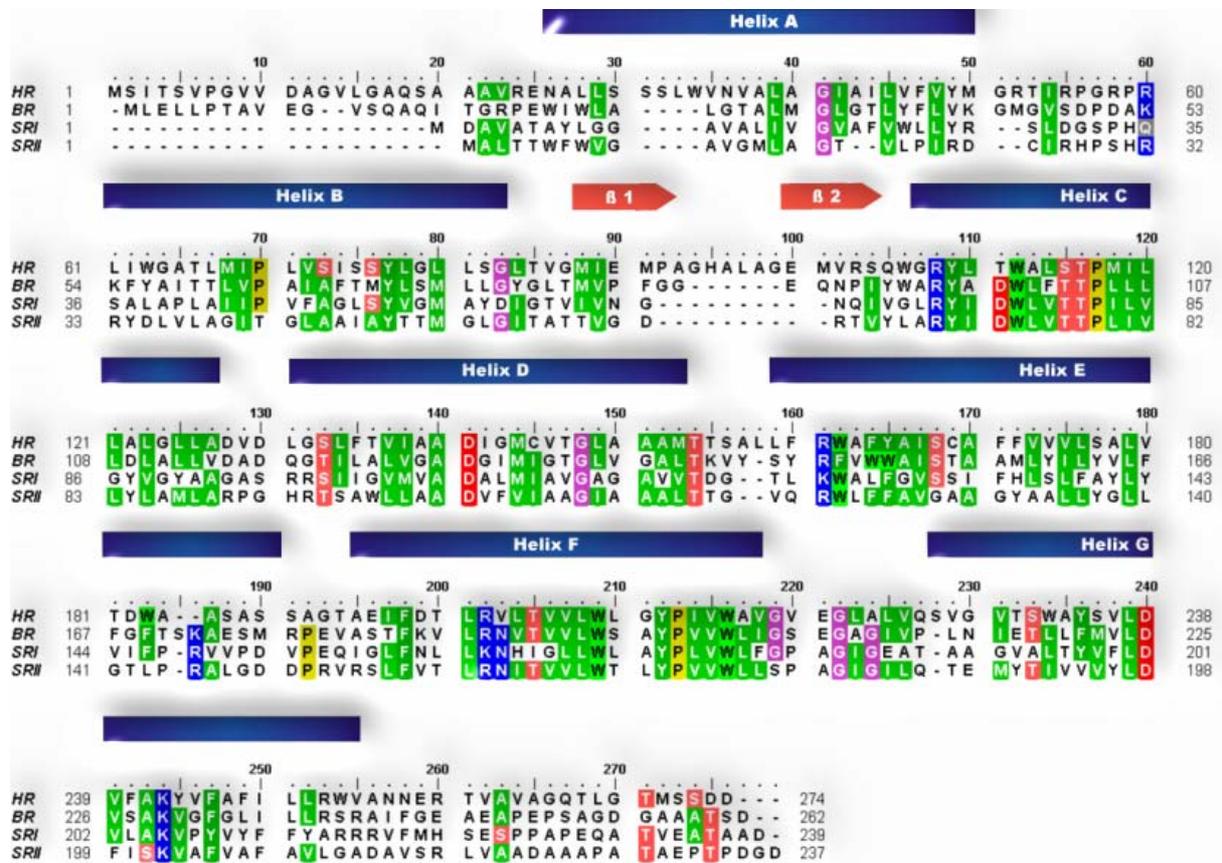


Abbildung 2-2: Sequenzvergleich der archaealen Rhodopsine in *H. salinarum* (R1) mit dem Programm BioEdit, Version 5.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Die farblich unterlegten Aminosäuren entsprechen einer berechneten Identität, bzw. Ähnlichkeit von mindestens 60 Prozent. In grün sind die neutralen Aminosäuren, in rot die sauren, in blau die basischen Aminosäuren und in violett sind die Glycine dargestellt.

2.3 Der Chromophor

In der Natur erfolgt die Aufnahme von Lichtenergie durch spezifische Chromophore, z.B. Chlorophyll, Retinal, Zimtsäure. Das Absorptionsmaximum der Chromophore wird durch die Proteinumgebung stark beeinflusst. Beispielsweise liegt das Absorptionsmaximum von freiem Retinal bei 360 nm und verschiebt sich in Bakteriorhodopsin um ca. 200 nm. In Bakteriorhodopsin sind mehrere Effekte für diese starke Verschiebung des Absorptionsmaximums verantwortlich. Die positive Ladung der protonierten Schiff'schen Base (PSB) führt zu einer Verschiebung nach 450 nm. Die Proteinumgebung führt zusätzlich zu einer weiteren Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 560 nm und wird im allgemeinen als Opsin-Verschiebung bezeichnet. Diese starke Verschiebung läßt sich auf den Abstand zwischen PSB und Gegenion zurückführen [Albeck et al, 1992] wie auch auf polare Reste innerhalb der Retinalbindungsstelle. In Bakteriorhodopsin bilden D85, D212 und R82 über ein Wasserstoffbrückennetzwerk ein komplexes Gegenion zur Schiff'schen Base aus. In Halorhodopsin bilden entsprechend ein Chlorid-Ion, D238 und R108 das komplexe Gegenion zur PSB aus. Zusätzlich konnte gezeigt werden [Subramaniam *et al.*, 2000], daß auch die Krümmung des Retinals die Verschiebung des Absorptionsmaximums beeinflusst.

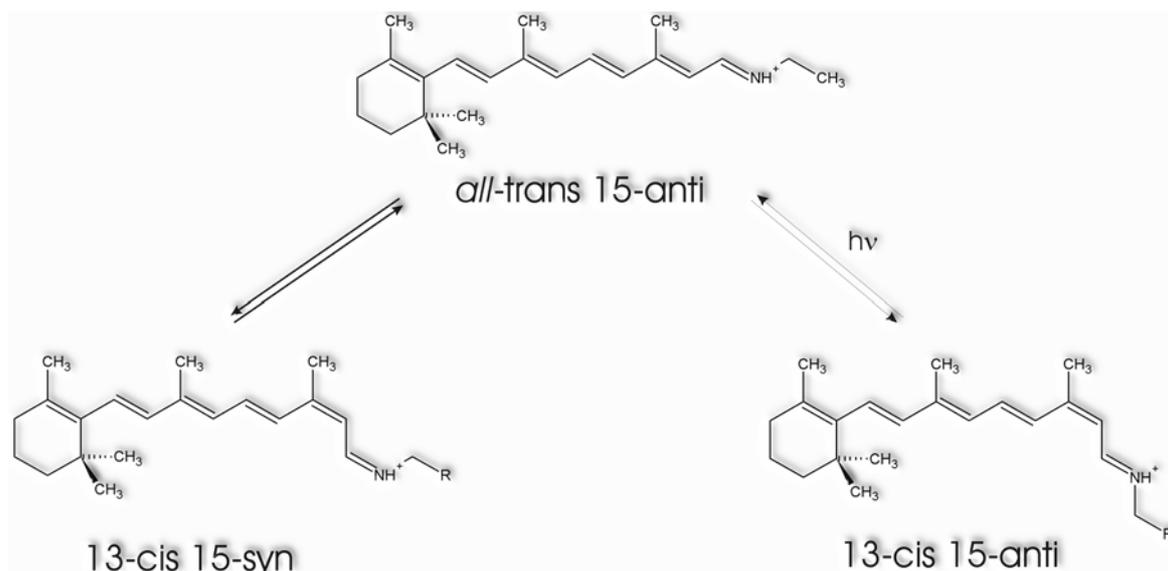


Abbildung 2-3: Retinalkonformere in archaealen Rhodopsinen. Im dunkel-adaptierten Zustand liegen sowohl all-trans wie auch 13-cis, 15-syn Retinal im Protein vor. Nach Photolyse isomerisiert all-trans Retinal zu 13-cis, 15-anti Retinal, das im Verlauf des Photozyklus nach all-trans Retinal thermisch rückisomerisiert.

In Abbildung 2-3 sind die unterschiedlichen Retinalkonformere abgebildet. Lichtadaptiertes Bakteriorhodopsin enthält als einzige Spezies all-trans Retinal. Im Gegensatz dazu enthält lichtadaptiertes Halorhodopsin neben ca. $\frac{2}{3}$ all-trans Retinal, $\frac{1}{3}$ 13-cis, 15-syn Retinal. Dunkeladaptiertes Bakteriorhodopsin wie auch dunkeladaptiertes Halorhodopsin enthalten sowohl all-trans wie auch 13-cis, 15-syn Retinal. Im Photozyklus isomerisiert nach Belichtung all-trans Retinal zu 13-cis, 15-anti Retinal und relaxiert anschließend thermisch zu all-trans Retinal zurück.

2.4 Photozyklus der archaealen Rhodopsine Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin

Wie bereits beschrieben handelt es sich bei Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin um lichtgetriebene Ionenpumpen. Durch Lichtanregung werden Ionen entgegen dem Membranpotential über die Zellmembran gepumpt.

In sämtlichen Rhodopsinen führt die Absorption eines Photons zur Isomerisierung von all-trans Retinal zu 13-cis, 15-anti Retinal. Dieser Schritt leitet Reaktionsschritte ein, die aufgrund ihrer spektralen Absorptionseigenschaften voneinander unterscheidbar sind und in einem zyklischen Prozeß in ihren Ausgangszustand zurückkehren. Die beiden Ionenpumpen BR und HR durchlaufen diesen Photozyklus in 10 ms. Im Gegensatz hierzu sind die beiden sensorischen Rhodopsine SR I und SR II um einen Faktor 100-500 mal langsamer und sind somit auf ihre sensorische Funktion optimiert [Marwan, Oesterhelt, 1999].

2.4.1 Der Photozyklus von BR und der Mechanismus des Protonentransport in BR

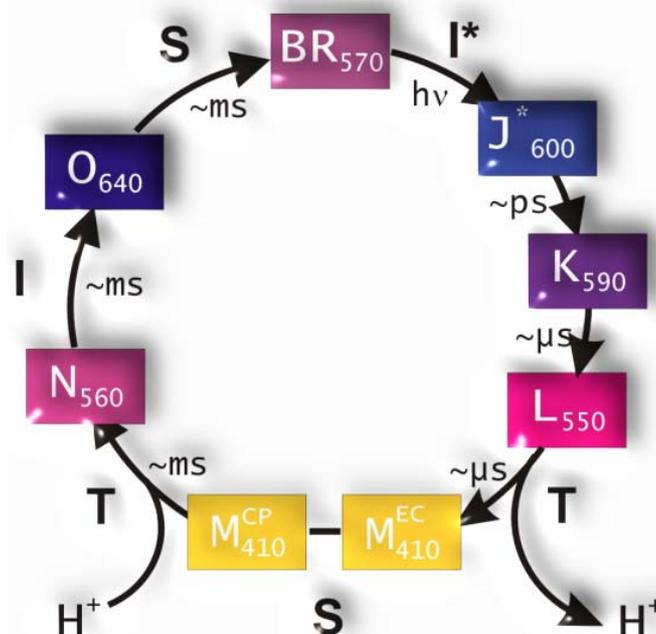


Abbildung 2-4: Photozyklus von Bakteriorhodopsin. Nach der Isomerisierung (I^*) erfolgt der Transfer (T) des Protons von der PSB an D85. Nach einer Zugänglichkeitsänderung (S) wird ein Proton wieder aufgenommen (T). 13-cis Retinal isomerisiert thermisch zu all-trans Retinal (I) und die PSB ändert ihre Zugänglichkeit in den Ausgangszustand (S).

In Bakteriorhodopsin bildet sich nach der Retinalisomerisierung zunächst ein rotverschobenes K-Intermediat. Die Bildung dieses rotverschobenen Intermediats wird als ein hochenergetisiertes Intermediat betrachtet, in der die PSB aufgrund der Isomerisierung die Wechselwirkung mit ihrem komplexen Gegenion verloren hat.

Die Röntgenstruktur dieses K-Intermediats zeigt, daß es im Protein bis auf die Retinalisomerisierung noch zu keinen größeren strukturellen Änderungen gekommen ist [Schobert *et al.*, 2002, Abbildung 2-5]. Sämtliche Bewegungen innerhalb der Retinalbindungstasche des K-Intermediats waren kleiner als 0.2 Å.

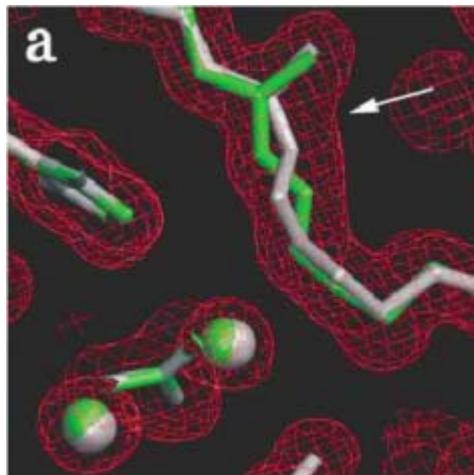


Abbildung 2-5: Abbildung der Umgebung der Retinalbindungstasche des K-Intermediats in BR. In grün ist der Grundzustand dargestellt, in grau das K-Intermediat. In rot ist $2F_o - F_c$ Elektronendichtekarte gezeigt. Es sind kaum strukturelle Änderungen sichtbar [Schobert *et al.*, 2002].

Auf das K-Intermediat folgt im nächsten Schritt ein blauverschobenes, sogenanntes L-Intermediat. Für dieses L-Intermediat konnte aus FTIR-Messungen gezeigt werden, daß es zu Änderungen der Amid I- und Amid II-Banden kommt, woraus geschlossen wird, daß 13-cis Retinal bereits teilweise relaxiert vorliegt [Zscherp *et al.*, 1997]. Obwohl eine Röntgenstruktur dieses Intermediats vorliegt, muß diese Struktur in Anbetracht des gezeigten Spektrums in Zweifel gezogen werden [Royant *et al.*, 2000]. In weiteren Veröffentlichungen konnten die Autoren zeigen, daß das Spektrum dieser Struktur aus einem Gemisch von L- und M-Intermediat besteht [Royant *et al.*, 2001, Neutze *et al.*, 2002].

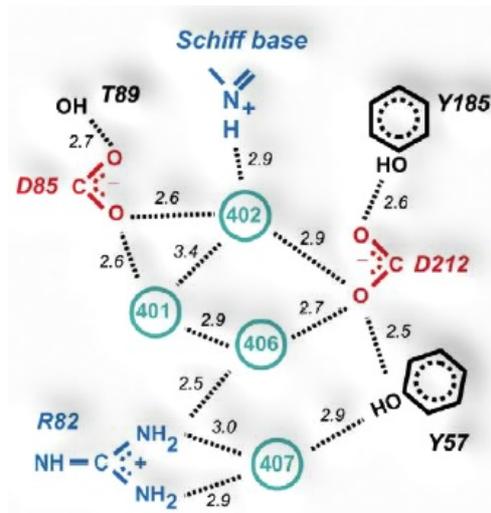


Abbildung 2-6: Schema der beteiligten Aminosäurereste und Wassermoleküle innerhalb der Retinalbindungstasche im Grundzustand. Die gestrichelten Linien geben mögliche Wasserstoffbrückenbindungen wieder. Die Abstände sind in Angstrom angegeben.

Im M_2 -Intermediat hat die PSB ihr Proton an D85 abgegeben und die deprotonierte Schiff'sche Base zeigt ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 410 nm. FTIR-Messungen wie auch die Röntgenstruktur zeigen für das M_2 -Intermediat bis auf R82 keine größeren Änderungen der Seitenketten. Im Grundzustand von BR stehen D85 und R82 über die Wassermoleküle 401 und 406 miteinander in Kontakt (Abbildung 2-6). Die Protonierung von D85 führt zu einer Konformationsänderung von R82 (Abbildung 2-7) und bildet mit E194 und E204 Wasserstoffbrücken [Luecke *et al.*, 2000]. Während der Lebensdauer des M-Intermediats wird das Proton von E204 nahe der extrazellulären Oberfläche an das Medium abgegeben.

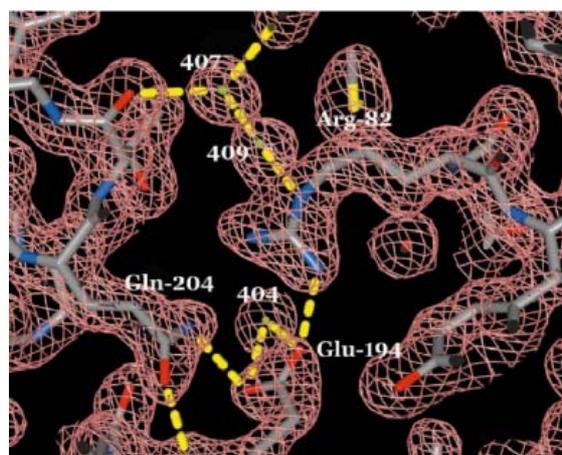


Abbildung 2-7: Abbildung der Seitenkette R82 im M-Intermediat. R82 koordiniert mit E194 und E204 über Wasserstoffbrücken.

Die Bildung des M_2 -Intermediats geht mit größeren konformellen Änderungen einher, die sowohl durch FTIR-Messungen und Elektronenkristallographie, als auch durch Röntgenstrukturdaten bestätigt werden konnten. Die Röntgenstruktur zeigt, daß auch innerhalb der Retinalbindungstasche größere Änderungen erfolgen. Das Wassermolekül 402 konnte in der Struktur von M_2 nicht mehr lokalisiert werden. Die Schiff'sche Base ist in den cytoplasmatischen Halbraum orientiert und kann im nächsten Schritt von D96 reprotoniert werden.

Die Reprotonierung von 13-cis Retinal führt zu einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums und wird als N-Intermediat bezeichnet. In einem späten N-Intermediat wird D96 reprotoniert und im vorletzten Schritt reisomerisiert 13-cis Retinal thermisch zu all-trans Retinal, dem O-Intermediat. Beim Übergang des O-Intermediats in den Grundzustand erfolgt die Deprotonierung von D85 und die Reprotonierung der extrazellulären Abgabestelle des Protons.

2.4.2 Der Photozyklus von HR und der Mechanismus des Anionentransports

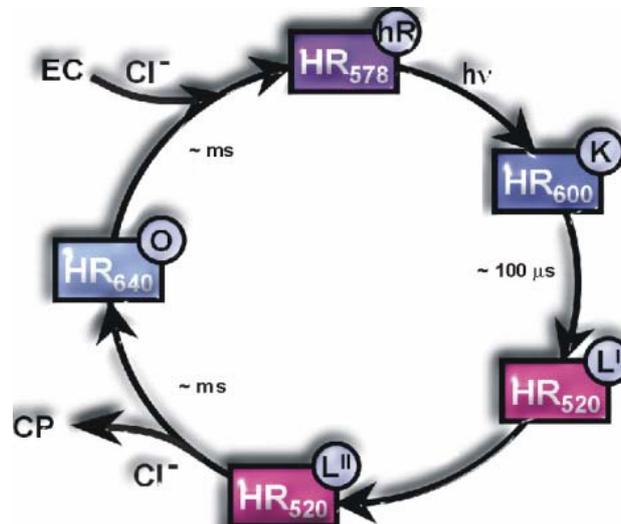


Abbildung 2-8: Photozyklus von HR. Nach Belichtung von Halorhodopsin wird 13-cis Retinal gebildet. Das erste Photozyklus-Intermediat, das K-Intermediat, ist rotverschoben und wird mit einem Stabilitätsverlust der positiven Ladung an der PSB diskutiert. Im nächsten Schritt bilden sich die blauverschobenen L₂- und L₁-Intermediate. Cl⁻ wird in das Cytoplasma abgegeben und es wird ein rotverschobenes O-Intermediat gebildet. Nach Reversion wird ein spektroskopisch nicht näher identifiziertes Intermediat (hier X-Intermediat) erhalten. Im letzten Schritt wird ein Chlorid-Ion aufgenommen.

Der Photozyklus von HR aus *H. salinarum* ist nicht so ausführlich untersucht wie in Bakteriorhodopsin. Zusätzlich muß berücksichtigt werden, daß einige Experimente zu Photozyklusintermediaten sich auf Ergebnisse von *Natronobacterium pharaonis* Halorhodopsin beziehen. Zur Verdeutlichung der Problematik sei darauf hingewiesen, daß in sHR (HR aus *H. salinarum*) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Zerfall des L-Intermediats darstellt, in pHR (HR aus *N. pharaonis*) jedoch der Zerfall des O-Intermediats den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beschreibt.

Nach der Isomerisierung von all-trans Retinal bildet sich wie in BR ein rotverschobenes K-Intermediat. Aus laserinduzierten optoakustischen Messungen an pHR wurde geschlossen, daß im K-Intermediat die aufgenommene Energie des Photons im 13-cis Retinal gespeichert vorliegt [Losi, 2001]. Die Rotverschiebung wird auf die Destabilisierung der positiven Ladung an der Schiff'schen Base zurückgeführt. Im nächsten Schritt relaxiert 13-cis Retinal und bildet ein

blauverschobenes L-Intermediat. Die Blauverschiebung wird in diesem Zusammenhang mit einer Restabilisierung der positiven Ladung an der PSB diskutiert. Man nimmt an, daß während der Lebensdauer der beiden L-Intermediate sich das Chlorid-Ion aus der Chloridbindungsstelle auf der extrazellulären Seite auf die cytoplasmatische Seite bewegt. In einem weiteren Schritt wird das Chlorid-Ion an das Cytoplasma abgegeben und es bildet sich ein rotverschobenes O-Intermediat. Dieses O-Intermediat konnte bisher nur in der Mutante Q105E aus *H. salinarum* und in pHR gemessen werden [Rüdiger *et al.*, 1995; Varo *et al.*, 1995]. Im vorletzten Schritt reisomerisiert 13-cis Retinal thermisch zu all-trans Retinal. Dieses Intermediat konnte nicht spektroskopisch nachgewiesen werden, muß aber im Rahmen des Photozyklus gefordert werden [Rüdiger, Dissertation 1996]. Im letzten Schritt erfolgt dann die Aufnahme des Chlorid-Ions und das System befindet sich wieder im Grundzustand.

2.5 3D-Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Für die Strukturaufklärung von Proteinen stehen sehr wenige Methoden zur Verfügung, die sich grundsätzlich in zwei Ansätze gliedern lassen. Zum Einen hat sich seit einigen Jahren die NMR-Spektroskopie als eine Methodik etabliert, die im Besonderen das Studium der Proteine im wässrigen Milieu und somit in seiner „natürlichen“ Umgebung zuläßt. Desweiteren ermöglicht diese Methodik die dynamische Untersuchung von Proteinen. Die zweite Methodik beruht auf dem physikalischen Prinzip der elastischen Beugung elektromagnetischer Strahlung am Proteinkristall. Erst die hochsymmetrische Anordnung der Proteine, wie sie in einem Kristall vorliegt, ergibt ein sogenanntes Beugungsmuster des eingestrahnten Röntgenstrahls an den Elektronen des Proteins. Das Prinzip der Beugung, also der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit der Materie, beschäftigte Max von Laue und er gilt als Entdecker der Röntgenstrahlinterferenzen.

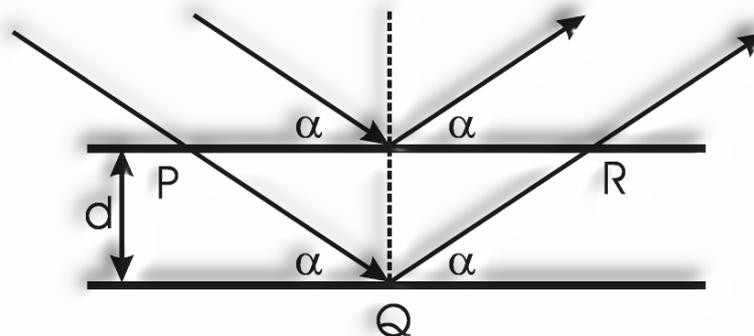


Abbildung 2-9: Bragg'sches Beugungsgesetz. Der eintreffende Röntgenstrahl wird mit dem Winkel α an den Gitterebenen gebeugt. Der Ebenenabstand sei d . P und R sind Schnittpunkte des Röntgenstrahls mit der ersten Ebene. An Q wird der eintreffende Röntgenstrahl an der zweiten Ebene gebeugt.

Auf der experimentellen Seite wurden bald Bragg Vater und Sohn die führenden Forscher auf dem damals neuen Gebiet der Röntgenstrukturanalyse. Sie schlugen vor, daß man Atome im Kristall als Spiegelebenen betrachten könnte. Betrachtet man das dreidimensionale Gitter in einer zweidimensionalen Projektion, so erfolgt konstruktive Interferenz, wenn der Gangunterschied zwischen einfallendem Strahl und ausfallendem Strahl ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge des Röntgenstrahls bildet. Dies bedeutet, daß in Abbildung 2-9

$$(1) PQ + QR = n \cdot \lambda$$

dem Gangunterschied entspricht. Aus

$$(2) \sin \alpha = PQ/d$$

mit dem Ebenenabstand d ergibt sich aus durch Einsetzen von Gleichung 1 in Gleichung 2 das *Bragg'sche Gesetz* der Beugung:

$$(3) 2d \sin \alpha = n \cdot \lambda$$

Zu jener Zeit, als Laue Habilitand bei Sommerfeld in München war, beschäftigte sich Peter Paul Ewald im Rahmen seiner Doktorarbeit mit der Untersuchung eines theoretischen Modells aus gitterförmig angeordneten Resonatoren in Kristallen. Erst das Zusammentreffen von Laue und Ewald führte zu der Theorie Laues der Röntgenstrahlinterferenzen. Ewald schuf die sogenannte dynamische Theorie der Röntgenstrahlinterferenzen und nach ihm ist im Zusammenhang mit der Strukturaufklärung die Ewald-Konstruktion benannt (Abbildung 2-10). Die Ewald-Konstruktion ist zunächst eine andere graphische Darstellung der Bragg Reflexion. Sie beschreibt die möglichen Richtungen in einem reziproken Gitter, in dem der Röntgenstrahl konstruktiv interferiert.

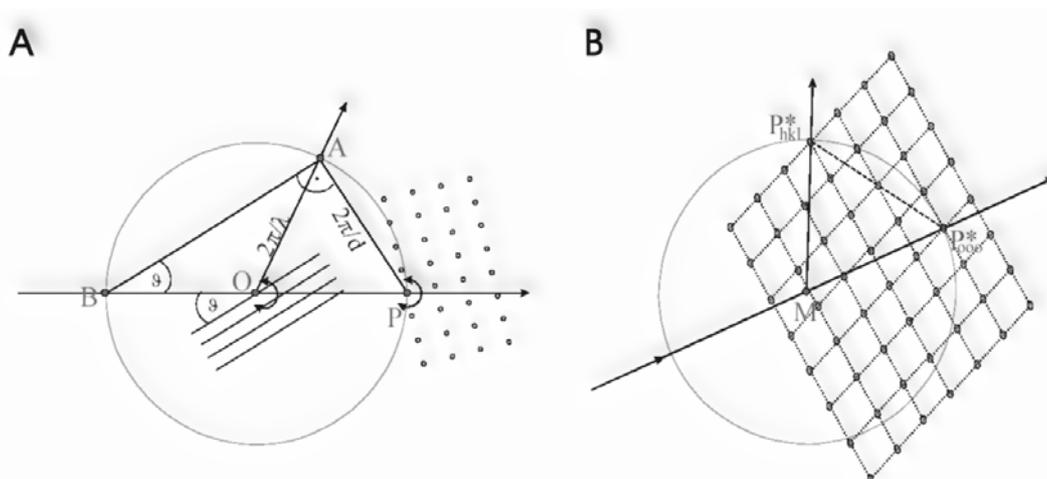


Abbildung 2-10: Ewald-Konstruktion. A) Darstellung der Bragg-Reflexion am Kristallgitter. Im Ursprung O wird der Wellenvektor k ($2\pi/\lambda$) mit dem Winkel ϑ gebeugt. Die Punkte A , B und P befinden sich auf einem Thales-Kreis, dem Ewald-Kreis. Schneidet ein Punkt A das Gitter, so tritt positive Interferenz auf. B) Ewald-Konstruktion mit reziproken Gitter. M ist der Ursprung, P_{000}^* stellt den virtuellen Ursprung dar und P_{hkl}^* ist der Schnittpunkt des Ewald-Kreises mit dem reziproken Gitter (Koehler).

Diese Konstruktion erlaubt Punkte im Kristallgitter korrespondierenden Punkten im reziproken Raum zuzuordnen wie auch jede Gitterebene (hkl) in einem streuenden Kristall einer Bragg-Reflexion zuzuordnen.

Auf dem Diffraktionsbild sind Punkte unterschiedlicher Intensität I_{hkl} abgebildet. Die Intensität I_{hkl} entspricht im Prinzip dem Betrag des Quadrats der Strukturfaktoramplituden. In die Strukturfaktoramplitude fließt neben der Intensität I_{hkl} ein Skalierungsfaktor K ein, der von der Strahlintensität, der Kristallgröße und weiterer Parameter abhängt. Der sogenannte Lorentzfaktor L berücksichtigt die Geometrie des Detektorsystems. Ein Polarisationsfaktor P berücksichtigt bei der Beugung des Röntgenstrahls, daß der Röntgenstrahl sich als elektromagnetische Welle aus einem parallelen und einem senkrecht stehenden Wellenvektor zusammensetzt und das diese beiden Wellenvektoren ein unterschiedliches Beugungsverhalten am Kristallgitter zeigen:

$$|F_{hkl}|^2 = K \cdot I / (L \cdot P)$$

Die Strukturfaktoramplitude $|F_{hkl}|$ enthält im Prinzip die gesamte Information des gebeugten Röntgenstrahl und somit die Information der korrespondierenden Elektronendichte. Sie ist im mathematischen Sinne die Fourier-Transformierte der Elektronendichte und daher läßt sich durch Fourier-Transformation die Elektronendichte aus den Strukturfaktoramplituden generieren.

Die Elektronendichte ρ kann wie folgt beschrieben werden:

$$\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Der Exponentialterm enthält die komplexe Darstellungsweise der Wellenfunktion, die bei der Aufnahme verloren geht, da im Diffraktionsbild nur noch die Intensität und somit die Strukturfaktoramplitude als Information abgebildet wird. Der Verlust der relativen Phase wird in der Röntgenkristallographie als das Phasenproblem bezeichnet.

Zur Lösung des Phasenproblems existieren verschiedene Ansatzmöglichkeiten, die jedoch alle als Grundlage die Patterson-Methode verwenden. Die Patterson-

Funktion ρ_{uvw} ist eine Fourier-Reihe, deren Koeffizienten die Strukturfaktoramplituden bilden.

$$\rho_{uvw} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| \cdot e^{-2\pi i(hu+kv+lw)}$$

Das Maximum an der Stelle uvw gibt in der Patterson-Funktion den relativen Abstand uvw zweier Atome an. Die Höhe des Maximums der Patterson-Funktion ist proportional zur Ordnungszahl der Atome und somit ergeben die Abstände zweier schwerer Atome besonders hohe Intensitäten.

Zur Lösung des Phasenproblems durch singulären oder multiplen isomorphen Ersatz (SIR, MIR) wird dieser physikalische Zusammenhang ausgenützt und der zu vermessende Kristall mit Schwermetall-Ionen derivatisiert. Im ersten Schritt wird die Patterson-Funktion des derivatisierten Kristalls berechnet und unter Zuhilfenahme der Lösung aus dem SIR/MIR-Datensatz kann die Patterson-Funktion und somit die relativen Phasen des nativen Datensatzes gelöst werden.

Die MAD-Methode (multiwavelength anomalous dispersion) beruht auf einem anderen physikalischen Effekt als bei der SIR/MIR-Methode. Ihnen beiden ist jedoch gemein, daß man zunächst die Patterson-Funktion für wenige starke Reflexe berechnet und anschließend die relativen Atompositionen verwendet um die restlichen Atompositionen aller Atome im Protein zu berechnen. Im MAD-Experiment wird die Wellenlänge des Röntgenstrahl so gewählt, daß diese Wellenlänge nahe der Eigenfrequenz (Absorptionskanten) bestimmter Atomsorten (Se, S, Fe, Br, I) liegt und es zu Resonanzeffekten des gestreuten Röntgenstrahls kommt. Über dieses anomale Signal kann das Phasenproblem ähnlich der SIR/MIR-Methode gelöst werden.

Sind bereits Strukturen homologer Proteine bekannt, so besteht die Möglichkeit die Patterson-Funktion durch molekularen Ersatz (MR, molecular replacement) zu lösen. Die Lösung der Patterson-Funktion besteht aus zwei verschiedenen Sätzen von Vektoren. Der eine Satz an Vektoren beschreibt die intramolekularen Abstände zweier Atome innerhalb eines Proteinmoleküls, der zweite Satz an Vektoren die intermolekularen Abstände der Atome, falls sich in der Einheitszelle mehrere Proteine befinden. Für die MR-Methode werden zunächst die intramolekularen

Lösungen der Patterson-Funktion gesucht und durch Rotation der Basis kann eine beste Lösung der Patterson-Funktion ermittelt werden. Befinden sich mehrere Proteine in der Einheitszelle so muß noch eine Translationssuche zur Ermittlung der intermolekularen Lösung der Patterson-Funktion erfolgen.

Im nächsten Schritt erfolgt die Erstellung einer Elektronendichtekarte und die molekulardynamische Verfeinerung des Strukturmodells. Am Ende des Verfeinerungsprozesses entsteht das fertige Strukturmodell, das die beste Lösung der experimentell bestimmten Daten liefert.

2.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand der Röntgenstrukturanalyse das L-Intermediat von Halorhodopsin aus *H. salinarum* strukturell aufgeklärt werden um Einblicke in den katalytischen Zyklus von Halorhodopsin zu erhalten.

Zur Lösung dieser Aufgabe sollte die Mutante T203V in der kubischen Lipidphase kristallisiert werden. Diese Mutante besitzt im Vergleich zum Wildtyp-Protein einen zehnfach verlangsamten Photozyklus, deren geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Zerfall des L-Intermediats darstellt. Es sollte daher möglich sein dieses L-Intermediat im photostationären Gleichgewicht zu einem höheren Anteil anzureichern, als dies im Wildtyp-Protein möglich war (20-30 %, Kolbe Dissertation 2001). Im Photozyklus von HR existieren zwei UV/Vis-spektroskopisch ununterscheidbare L-Intermediate. Anhand von FTIR-Messungen ist es möglich diese beiden L-Intermediate zu unterscheiden und eindeutig zuzuordnen. Daher sollten für Kristalle der Mutante T203V ebenfalls FTIR-Messungen durchgeführt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Proteinreinigung und Kristallisation von HR-Mutanten

Die Isolierung der Mutanten von Halorhodopsin erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Duschl *et al.* (1988), das bereits für den Wildtyp erfolgreich angewendet wurde (Besir, Dissertation 2001): Die Zellen werden abzentrifugiert und nach der Resuspendierung gegen 150 mM NaCl in 25 mM Tris·HCl lysiert. Anschließend wird die Membranfraktion durch Ultra-Zentrifugation (ca. 100000 g) isoliert und im nächsten Schritt durch Dichte-gradientenzentrifugation weiter aufgereinigt. Das aufgereinigte Protein wurde anschließend in einem Cholat-Puffer (25 mM Tris·HCl, 3M KCl, 5% Natriumcholat, pH 7.2) solubilisiert. Die weitere Proteinreinigung erfolgte über ein programmierbares FPLC-System (ÄKTAExplorer, Pharmacia) mit einer industriell-vorgepackten Resource-Phe-Säule (Pharmacia) aufgereinigt (Besir 2001, Kolbe 2001, Dissertationen). In diesem Schritt wurde zunächst das solubilisierete Protein an die Säulenmatrix gebunden und im durch Detergenzwechsel des Elutionspuffers zu Octylglucosid (25 mM Tris·HCl, 3M KCl, 1.0% OG, pH 7.2) von der Säule eluiert.

Die verschiedenen Halorhodopsin-Mutanten wurden in der kubischen Lipidphase (Landau und Rosenbusch, 1998) nach Modifikationen von Kolbe und Besir kristallisiert: Die Kristallisation von HR erfolgt ohne Zugabe eines Präzipitans, jedoch bei nahezu gesättigter Kaliumchlorid-Konzentration (3.0-4.0M KCl, 1.0% OG, pH 7.0-7.5).

3.2 Optimierung der Kristallisationsbedingungen

Halorhodopsin wurde in der kubischen Lipidphase schon erfolgreich von Kolbe *et al.* (Kolbe *et al.*, 2000) kristallisiert. Die Kristallisation erfolgte jedoch typischerweise in einem Zeitraum von 9-15 Monaten (Kolbe, Dissertation, 2001). Somit war es ein vorrangiges Ziel in dieser Arbeit eine vereinfachte Handhabung des Systems, sowie eine deutliche Beschleunigung der Kristallisation zu erreichen. Hierfür wurde die Prozedur der Kristallisation in Einzelschritte zerlegt und die einzelnen Schritte optimiert: Zum einen wurden unterschiedliche Reaktionsgefäße für die Kristallansätze ausprobiert, zum anderen wurden unterschiedliche Methoden zur Einwaage des Lipids untersucht. Ein weiterer Schritt in der Reproduzierbarkeit der Präparation betraf die Konzentrierung des Proteins, sowie die systematische Analyse der Octylglucosid-Konzentration auf das Kristallisationsverhalten.

Wie bei Landau und Rosenbusch beschrieben, wurde HR-Wt in Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 5mm, sowie einer Länge von 300 mm kristallisiert. Bereits die Präparation der kubischen Phase in den Glasröhrchen erwies sich als sehr fehleranfällig. Bei der Einwaage des festen Lipids wurde versucht, die komplette Menge des Lipids mit einem Mikrospatel ans Ende des Glasröhrchens zu bringen. Ein Teil des Lipids blieb jedoch meist an der Glaswandung des Röhrchens haften und konnte auch nicht abzentrifugiert werden. Wurde nun die berechnete Menge an Proteinlösung zu der eingesetzten Menge an Lipid dazu pipettiert, verfälschte die tatsächliche geringere Menge an Lipid zur Ausbildung der kubischen Phase das Verhältnis von Lipid zu Proteinlösung. Bei kleinen Mengen an Lipid ($\approx 5\text{mg}$) konnte dies zu sehr großen Fehlern führen. Dies mag einer der Gründe für die schwierige Eingrenzung der Kristallisationsbedingungen gewesen sein. Des Weiteren war die gezielte Isolierung eines bestimmten Kristalls aus dem Ansatz ohne Beschädigung sehr schwer und umständlich. Alternativ wurden 200 μl PCR-Reaktionsgefäße als mögliche Gefäße für die Präparation der kubischen Phase untersucht. Wie sich zeigte, waren diese PCR-Reaktionsgefäße in Präparation und Einwaage wesentlich leichter zu handhaben und die Fehleranfälligkeit geringer. Eine weitere Vereinfachung des System bezog sich auf die Einwaage des Lipids. Das Lipid, Monoolein, konnte nach Erwärmung auf 37 °C

flüssig pipettiert werden. Beim Abkühlen erstarrte das Lipid zu einem homogenen Festkörper. Dies führte jedoch bei der Präparation der kubischen Phase zu einer unzureichenden Vermischung von Lipid und Proteinlösung. Das Protein integrierte zumeist in das obere Drittel der kubischen Phase und verteilte sich nicht über die gesamte Phase. Die einhergehende hohe lokale Proteinkonzentration führte in diesen Ansätzen zum Wachstum vieler kleiner Kristalle. Daraus folgte, daß das Pipettieren des Lipids zwar eine Vereinfachung der Präparation darstellte, aber auf Grund der oben genannten Nachteile das Lipid weiterhin in fester Form eingewogen wurde.

Die Kristallisation von Halorhodopsin in PCR-Reaktionsgefäßen brachte zusätzlich eine drastische Änderung des Kristallisationsverhaltens mit sich. Das Kristallwachstum erfolgte mit 8-12 Wochen sehr viel schneller als bisher. Jedoch waren die erhaltenen Kristalle zunächst von schlechter Qualität: Häufig traten kleine und dünne Kristalle auf, die zur Strukturaufklärung nicht verwendet werden konnten. Deshalb war im ursprünglichen Protokoll zur Kristallisation von Wildtyp-HR von der Verwendung von PCR-Reaktionsgefäßen abgesehen worden (Kolbe, Dissertation 2001).

Um das unterschiedlich schnelle Kristallisationsverhalten zu verstehen, wurde die Materialbeschaffenheit der beiden Reaktionsgefäße untersucht. Zur Überprüfung der Durchlässigkeit wurden die verwendeten Glasröhrchen, sowie die PCR-Reaktionsgefäße mit getrocknetem Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator befüllt. Über einen Zeitraum von mehreren Monaten trat eine Verfärbung und somit ein Wasseraustausch mit der Umgebung in den PCR-Reaktionsgefäßen sehr viel schneller ein als in den Glasröhrchen. Dies paßt zu der Annahme, daß die Kristallisation von Membranproteinen in der kubischen Lipidphase mit einem Phasenübergang in eine lamellare Phase einhergeht, die durch eine Veränderung des Lipid/Wasser Verhältnisses erfolgen kann (Nollert *et al.*, 2001; Caffrey, 2003).

Nachdem nun in einem realistischen Zeitraum die Kristallisation möglich war, wurde die Reproduzierbarkeit der Kristallisationsbedingungen optimiert. Hierfür war es notwendig, die Bedingungen, welche die Kristallisation beeinflussten, besser zu definieren. Es zeigte sich bei Konzentrierung des solubilisierten Proteins, daß die Proteinlösung bei gleicher Konzentration unterschiedlich viskos wurde. Ein möglicher Grund hierfür ist eine unterschiedliche Detergenzkonzentration. Deshalb

wurde das konzentrierte Protein gegen Puffer (25mM TRIS·HCl + 3.3M KCl + 1.0% OG) dialysiert. Die Proteinlösung wurde dann zum Lipid pipettiert und die gewünschte Endkonzentration von 3.5 mg Protein/ml kubischer Phase durch Zugabe der entsprechenden Menge von Proteinpuffer (25mM TRIS·HCl + 3.3M KCl) erreicht. Zugleich konnte durch Zugabe des Puffers die Konzentration an Octylglucosid zwischen 10-20% im Kristallisationsansatz systematisch variiert werden. Im Anhang ist das Pipettierschema zu einem Kristallisationsansatz der Mutante T203V von HR wiedergegeben.

Die Entwicklung des Kristallisationsverhalten wurde über die gesamte Zeit dokumentiert. Den aufgezeichneten Beobachtungen ist zu entnehmen, daß HR-Mutanten bei 20% OG-Konzentration am schnellsten auskristallisieren und sich die Kristallisationsgeschwindigkeit mit abnehmender OG-Konzentration verlangsamt. Im Bereich zwischen 54-50% Lipidanteil, 18% OG, sowie 3.3M KCl lagen die optimalen Bedingungen für die erfolgreiche Kristallisation der Halorhodopsin-Mutanten.

Zusammenfassend konnte durch die Verwendung von PCR-Reaktionsgefäßen das Kristallwachstum um einen Faktor vier bis fünf beschleunigt werden. Die systematische Untersuchung der Detergenzkonzentration ermöglichte des Weiteren die Reproduzierbarkeit und die Qualität des Kristallwachstums zu optimieren. Somit gelang es, ein optimiertes Protokoll für die Kristallisation weiterer HR-Mutanten zu erstellen.

Mit dem verbesserten Kristallisationsprotokoll wurden die Mutanten R103V, Q105E, T203V und der Wildtyp von HR kristallisiert. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag jedoch auf der erfolgreichen Kristallisation der Mutante T203V. Alle Mutanten kristallisierten in einer hexagonalen, sowie in einer trigonalen Kristallform. Die Kristalle erreichten 50-150 μm in ihrer größten Dimension (Abbildung 3-1).

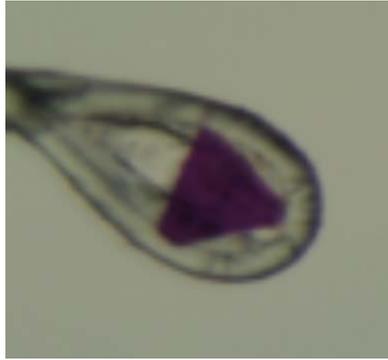


Abbildung 3-1: Trigonaler T203V-Kristall; typische Abmessungen zwischen 50-150 μm in der größten Dimension und 10-20 μm orthogonal dazu

Am Beispiel der Mutante T203V konnte gezeigt werden, daß die optimierten Kristalle an der abteilungsinternen Drehanode ein Diffraktionsbild liefern und somit eine Screening der Kristalle vor den Meßzeiten am Synchrotron möglich wäre. Die Auflösung des Diffraktionsbildes an der Drehanode erreichte bis 2.8 Å (Abbildung 3-2).

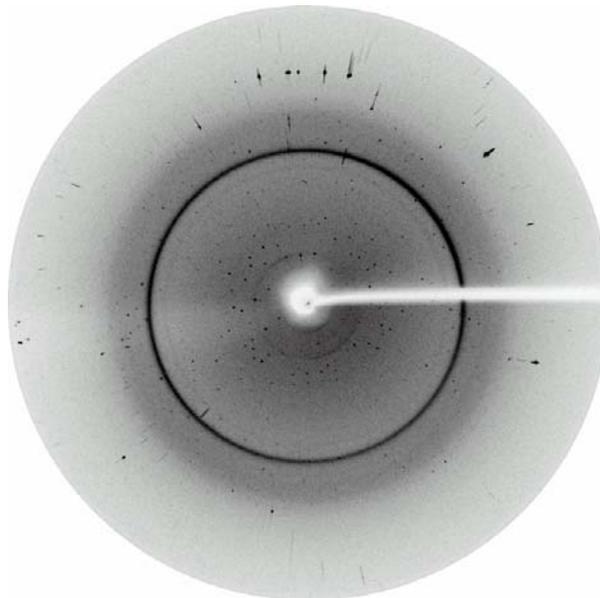


Abbildung 3-2: Diffraktionsbild eines T203V Kristalls an der abteilungsinternen Drehanode

3.2.1 Datensammlung und Prozessierung

Das der Röntgenkristallographie zugrunde liegende Prinzip ist die Wechselwirkung der elektromagnetischen Welle des Röntgenstrahls mit den Elektronen der Proteinmoleküle im Kristallgitter. Die Wellenlänge des Röntgenstrahls liegt im Auflösungsbereich der Bindungslängen von Atomen. Dies führt dazu, daß der Röntgenstrahl am Kristallgitter nach dem Bragg'schen Brechungsgesetz gebeugt wird. Das resultierende Diffraktionsbild wird mit einem Röntgendetektor erfasst. Zur Berechnung der dreidimensionalen Molekülstruktur ist es nötig, ein dreidimensionales Diffraktionsbild des Kristalls zu erhalten. Der zu messende Winkelbereich für einen kompletten Datensatz ergibt sich aus der Raumgruppe des Kristalls.

Die Datensammlung erfolgte an den Meßstationen (ID14-1, ID14-2, ID14-4, ID29, BM14) des ESRF in Grenoble (Frankreich), sowie an der Meßstation (PX06) SLS des Paul-Scherrer-Instituts in Villigen (Schweiz). Um den Strahlenschaden der Kristalle gering zu halten, wurden sie im Kryostrom bei 100 K vermessen. Für die Messung des Grundzustands der T203V-Kristalle wurden die Kristalle bei der Präparation am Lichtmikroskop lichtadaptiert. Die Auflösung der Daten erreichte 1.7 Å im Grundzustand. Für das L₁-Intermediat wurden die Kristalle 10 sec bei RT mit einem 633 nm HeNe-Laser (15 mW) belichtet und anschließend erneut schockgefroren (Die Akkumulation der Intermediate wird in Kapitel 3.4 genauer besprochen). Die Auflösung dieser Daten erreichte bis 1.9 Å.

Für die Prozessierung der gewonnenen Daten, d.h. Bestimmung von Raumgruppe, Zellparameter und Datenreduktion, wurde das Programm XDS verwendet (Kabsch *et al.*, 1993). Alle untersuchten Mutanten (T203V, Q105E, R103V), sowie der Wildtyp kristallisierten in der hexagonalen Raumgruppe R32. Im Gegensatz hierzu kristallisierte der Wildtyp nach dem ursprünglichen Protokoll (Kolbe, Dissertation 2001) jedoch in der hexagonalen Raumgruppe P6₃22.

3.2.2 Molekularer Ersatz, Modellbau und Verfeinerung

Für die Zusammenstellung und die Verfeinerung der 3-dimensionalen Struktur des Proteins muß eine Elektronendichte berechnet werden. Für die Berechnung der Elektronendichte werden die Intensitäten des Diffraktionsbildes in einen Vektor, die Strukturfaktoramplitude, konvertiert. Zur vollständigen Beschreibung dieses Wellenvektors sind neben der Kenntnis von Amplitude und Wellenlänge zusätzlich die relativen Phasen des Vektors notwendig. Ein generelles Problem der Röntgenstrukturanalyse ist jedoch, daß diese Phaseninformation bei der Datensammlung verlorengeht. Für die Lösung dieses sogenannten Phasenproblems gibt es mehrere mögliche Ansätze, die in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich beschrieben wurden. Liegt das Strukturmodell eines verwandten Moleküls bereits vor, kann dieses als Suchmodell zur Lösung des Phasenproblems verwendet werden. Diese Methode wird als Molekularer Ersatz (molecular replacement) bezeichnet.

In dieser Arbeit wurde als Suchmodell der HR-Wildtyp mit dem hinterlegten PDB-Code 1E12 verwendet. Es wurden alle 253 Aminosäuren in das Suchmodell von AmoRe eingeschlossen, einem Programm zur Lösung des Phasenproblems durch Molekularen Ersatz (Navazza *et al.*, 1994). Für eine erste Phasierung der Daten wurde die Rotationssuche in AmoRe durchgeführt, d.h. durch Rotation des Suchmodells die beste Lösung zur Beschreibung der gemessenen Elektronendichte gesucht.

Im nächsten Schritt wurde die Lösung der Rotationssuche durch einen ersten Verfeinerungsschritt verbessert. Hierfür wird das starre Suchmodell durch sog. rigid-body Verfeinerung an die experimentellen Daten angepaßt. Für die rigid-body Verfeinerung, wie auch für die nächsten Verfeinerungsschritte, wurde das Molekulardynamik-Programm CNS in der Version 1.1 verwendet (Brünger *et al.*, 1998).

Das Suchmodell wurde nun durch simuliertes Aufheizen und Abkühlen, sog. simulated-annealing, sowie anschließende Temperaturfaktor-Verfeinerung, sog. B-factor-Verfeinerung, mit CNS 1.1 weiter verbessert. Zunächst ergab sich für die Lösung des Suchmodells ein R-Faktor von 26% bzw. ein freier R-Faktor von 28%. Nach weiterer Modellverfeinerung unter Hinzunahme der Aminosäuren A22, V23,

A263, sowie der Chloridionen, der Wassermoleküle und des Retinals konnte die Struktur auf einen R-Faktor von 23.2 (freier R-Faktor 25.6) bei einer Auflösung von 1.7 Å verfeinert werden. Die Elektronendichtekarten wurden mit Hilfe des interaktiven Programms O, Version 7 (Jones *et al.*, 1991) analysiert und Molekülbereiche manuell in die Elektronendichte eingepaßt.

Datensammlung	Grundzustand	Intermediat
Auflösung	20.0-1.6Å	20.0-1.8Å
Unabhängige Reflexe	35303	23209
Multiplizität	8.0 (7.9)	8.5 (8.5)
Mosaizität, Wilson B	0.14°, 28.5	0.13°, 26.7
I/σ(I)	24.9 (2.4)	17.1 (3.2)
R _{merge}	14.0% (74.5%)	11.7% (45.2%)
Verfeinerung		
Auflösung	20.0-1.7 Å	20.0-1.9 Å
Zahl der Reflexe / Testreflexe	28830, 1442	19178, 959
Vollständigkeit	99.8%	91.9%
R-Faktor/R _{free}	23.2%, 25.6%	23.7%, 26.1%
Msd für Bindungen, Winkel	0.010, 1.2°	0.015, 1.4°
Proteinreste, Lipide	241, 2	241, 2
Ionen	2, 67	2, 39
$R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_{\text{hkl}} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle }{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_{\text{hkl},i}}; \langle I_{\text{hkl}} \rangle \text{ ist die mittlere Intensität der symmetrie-}$ $\text{verwandten Reflexe } I_{\text{hkl},i}$ $I/\sigma(I) : \text{Mittel der Beugungsintensitäten geteilt durch deren Standardabweichung}$ $\text{R-Faktor} = \frac{\sum_{\text{hkl}} F_0 - F_{\text{calc}} }{\sum_{\text{hkl}} F_0 }; F_0 \text{ gemessene Strukturfaktoren, } F_{\text{calc}} \text{ berechnete Strukturfaktoren}$ $\text{R}_{\text{free}}\text{-Faktor} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \varepsilon F_0 - F_{\text{calc}} }{\sum_{\text{hkl}} \varepsilon F_0 }; \text{der Test-Satz (5\% des vollständigen Datensatzes) wurde}$ $\text{während der Verfeinerung ausgeschlossen}$		

Tabelle 3-1: Statistik der charakterisierten Kristalle (bk516/1, bk516/2): In Klammern sind die Werte bei höchster Auflösung angegeben.

3.3 Struktur des Grundzustandes von HR-T203V

3.3.1 Kristallpackung

Sämtliche Kristalle, Wildtyp-HR, R103V, Q105E, wie auch T203V, kristallisierten unter den optimierten Bedingungen in der hexagonalen Raumgruppe R32. Aus der Raumgruppe ergibt sich zum einen eine dreizählige Achse ($R\bar{3}2$), sowie eine senkrechte Spiegelebene ($R\bar{3}2$). Desweiteren beschreibt R32 eine dreizählige Schraubachse.

Ausgehend von einem Halorhodopsin-Molekül in der Einheitszelle wird durch die 3-zählige Drehachse ein Trimer generiert. Dieses Trimer wird durch die nächste Symmetrieoperation, der Spiegelung, in eine zweite Ebene gelegt. In Abbildung 3-3 ist zu sehen, daß zwei Trimere zueinander antiparallel angeordnet sind. Führt man vom Trimer ausgehend eine 120° Schraubdrehung durch, so erzeugt man in einer weiteren Ebene ein neues Trimer. In Abbildung 3-3, A) generiert man aus dem zentralen blauen Trimer durch eine 120° Schraubdrehung wiederum ein blaues Trimer in der nächsten Ebene. Durch weitere zweimalige Schraubdrehung wird in der a,b Projektion die Identität erreicht. Für die vollständige Beschreibung der übergeordneten Struktur von T203V im Kristallgitter sind somit drei Ebenen nötig.

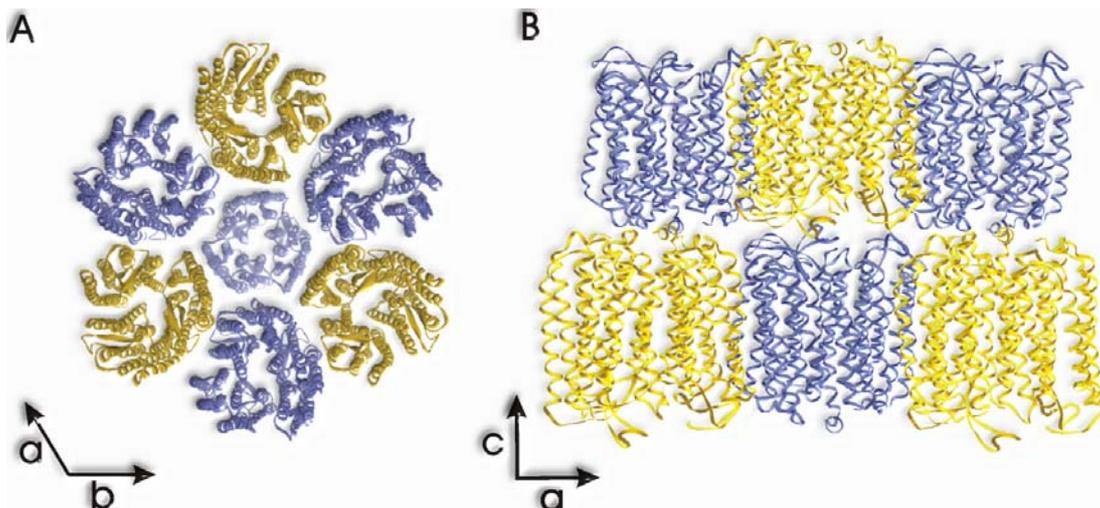


Abbildung 3-3: A) Aufsicht a-b Ebene: In blau sind die Trimere von der cytoplasmatischen Seite zu sehen, in gelb sind die Trimere mit der extrazellulären Seite zum Betrachter orientiert. B) Querschnitt durch die a-c Ebene: Die Trimere sind in der nächsten Ebene zueinander antiparallel angeordnet.

Die publizierte Wildtypstruktur von Halorhodopsin (1E12) kristallisierte im Gegensatz zu der Mutante T203V in der Raumgruppe $P6_322$. In der Wildtyp-Struktur konnten Elektronendichten durch geordnete Lipide interpretiert werden. Auch in der Mutante T203V sind Elektronendichten in der Umgebung des Proteins zu erkennen. Es gelang jedoch nicht diesen eine geordnete Matrixstruktur, wie im Wildtyp-Kristall, zuzuordnen. Dies ist auf die unterschiedliche Anordnung der Trimere im Kristallgitter zurückzuführen. In der Raumgruppe R32 sind die Trimere dichter gepackt als die Trimere in der Raumgruppe $P6_322$. In Abbildung 3-4 wurde die Wildtypstruktur mit der Struktur der Mutante T203V überlagert. Man sieht, dass die in der Wildtypstruktur gefundenen Lipide teilweise im benachbarten Trimer der Mutante liegen.

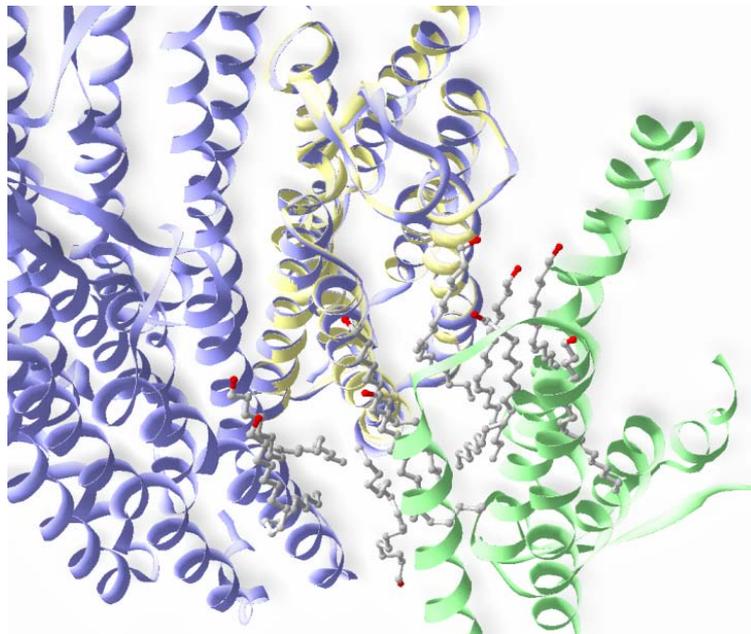


Abbildung 3-4: Überlagerung der Wildtypstruktur (1E12) mit der Struktur der Mutante T203V. Das Wildtyp-Protein kristallisierte in der Raumgruppe $P6_322$. Die Mutante T203V kristallisierte in der Raumgruppe R32. Einige der im Wildtyp-Protein gefundenen Lipide liegen in der Überlagerung im benachbarten Trimer der Mutante T203V.

Es konnte lediglich die bereits in der Wildtyp-Struktur beschriebene Palmitinsäure eindeutig in die Elektronendichte der Struktur von T203V eingebaut werden (Abbildung 3-6). Zusätzlich konnte in der Struktur ein Detergenzmolekül, β -Octylglucosid, einer Elektronendichte zugeordnet werden.

3.3.2 Tertiär-/Quartärstruktur

Halorhodopsin liegt im Kristall als Trimer vor. Im Zentrum des Trimers befinden sich drei Palmitate. Halorhodopsin ist gegenüber der Membranebene leicht gekippt und bildet somit als Trimer eine trichterförmige Quartärstruktur aus.

Das Monomer besteht, wie alle Rhodopsine, aus sieben Transmembranhelices (A-G), die durch interhelikale Schleifen miteinander verknüpft sind. Auf der cytoplasmatischen Seite bildet der Carboxy-terminus eine kurze Helix (G') aus, welche parallel zur Membran verläuft. Auf der extrazellulären Seite bildet die BC-Schleife ein antiparalleles Faltblatt aus (Abbildung 3-5). Die intratrimeren Kontakte bilden sich wie im Wildtyp (Kolbe *et al.*, 2000) zwischen den BC und CD Helix-Paaren.

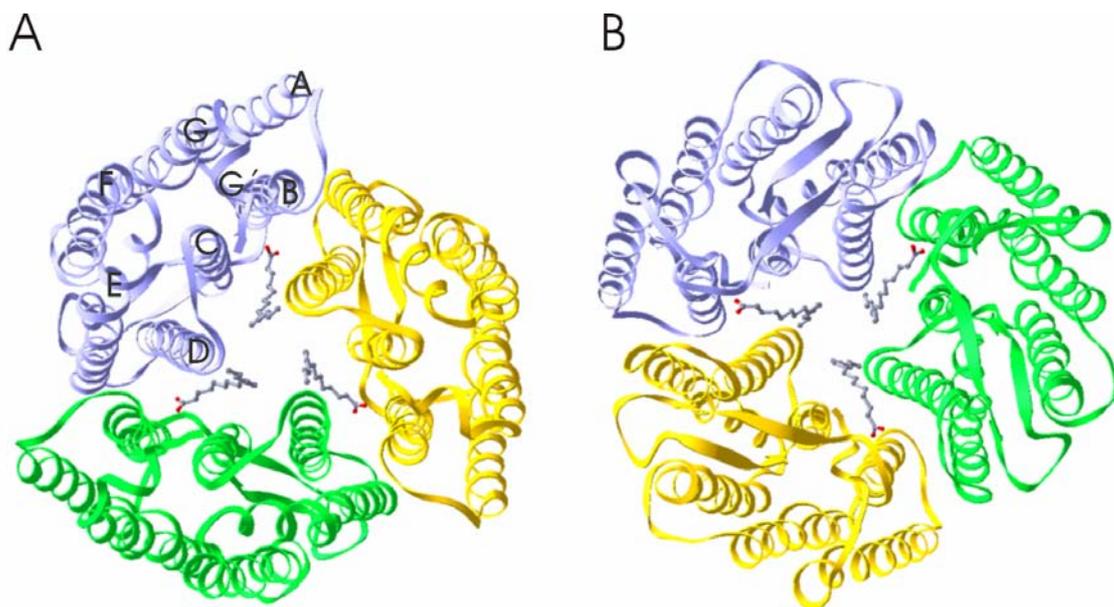


Abbildung 3-5: Aufsicht auf das Trimer von der cytoplasmatischen Seite A) und der extrazellulären Seite B). Die einzelnen Monomere von T203V sind farblich unterschiedlich dargestellt. Zusätzlich sind die Palmitinsäure-Moleküle innerhalb des Trimers als Kugel-Stab-Modell dargestellt.

Der Chromophor Retinal ist an K242 in Helix G gebunden. Wie in der Wildtyp-Struktur, bildet Palmitat mit seiner Carboxylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxylgruppe von S75, sowie zur Hydroxylgruppe von T111 aus (Abbildung 3-6). Die Alkylkette des Palmitats ist zwischen zwei Monomere eingebettet und stabilisiert somit die trimere Architektur (Kolbe *et al.*, 2000). Im Gegensatz zur Wildtyp-Struktur nimmt T111 eine weitere Konformation ein. Die Hydroxylgruppe weist hier zusätzlich in die Chloridbindungstasche und koordiniert das Chloridion Cl501.

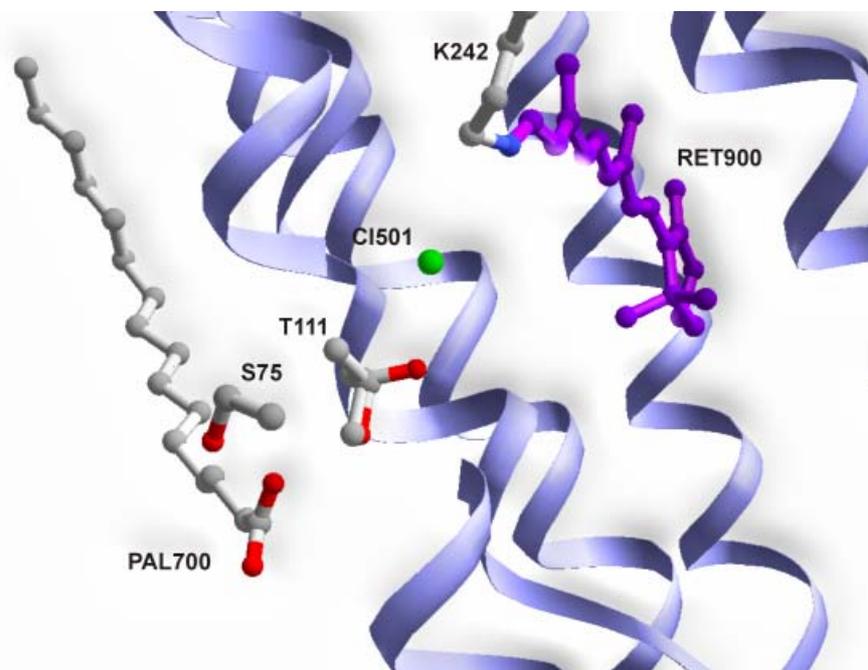


Abbildung 3-6: Es sind im Kugel-Stab-Modell Palmitat mit S75, sowie T111 mit K242 und dem gebundenen *all-trans* Retinal dargestellt. Das Chloridion Cl501 ist grün dargestellt. Die Carboxyl-Gruppe des Palmitats bildet mit den Hydroxylgruppen der Reste S75, T111 Wasserstoffbrückenbindungen aus. Für T111 ist die zweite Konformation dargestellt. In der abgebildeten Konformation koordiniert die Hydroxylgruppe von T111 mit Cl501.

Ansonsten zeigt die Überlagerung von Wildtyp-Protein und Mutante keine wesentlichen Unterschiede (Abbildung 3-7). Die mittlere Abweichung des C_{α} -Rückgrats der beiden Moleküle beträgt 0.44 Å. Die größten Unterschiede sind N-terminal für A22-R24 zu beobachten. Hier haben die deutliche besseren Elektronendichten zu einer verbesserten Struktur geführt.

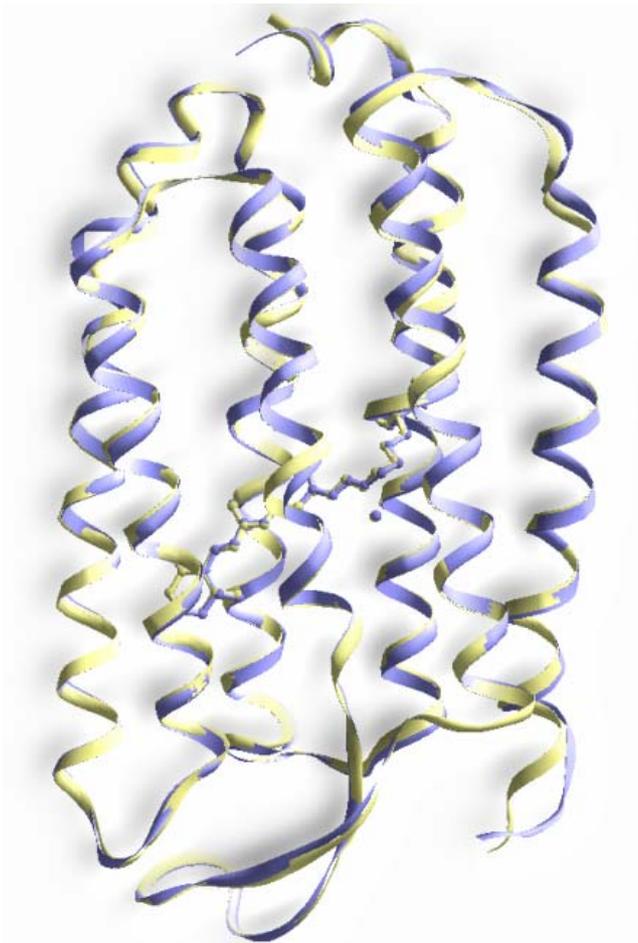


Abbildung 3-7: Überlagerung der Wildtypstruktur (1E12) mit dem Grundzustand von T203V. In blau ist die Struktur von T203V, in gelb ist die Struktur des Wildtyp-Proteins im Bändermodell dargestellt. Im Kugelstabmodell sind all-trans Retinal, Lysin 242 und das Chloridion Cl501 hervorgehoben. Die mittlere Abweichung des C α -Rückgrats beträgt 0.44 Å.

Ebenso zeigte ein Vergleich der Retinalbindungstasche die hohe Übereinstimmung der Wildtyp-Struktur und der Mutante bei der Verfeinerung (Abbildung 3-8). Die Überlagerung zeigt, daß die Positionen wichtiger Reste innerhalb der Retinalbindungstasche, sowie des all-trans Retinals und des Chloridions Cl501 der Mutante T203V, gut mit der Struktur des Wildtyp-Proteins übereinstimmen. In Kapitel 3.3.3 werden die Unterschiede innerhalb der Chloridbindungsstelle I näher besprochen. Im Grundzustand der Mutante T203V wurde neben den alternativen Konformationen von T111 ein zusätzliches Wassermolekül (WAT5XY) gefunden.

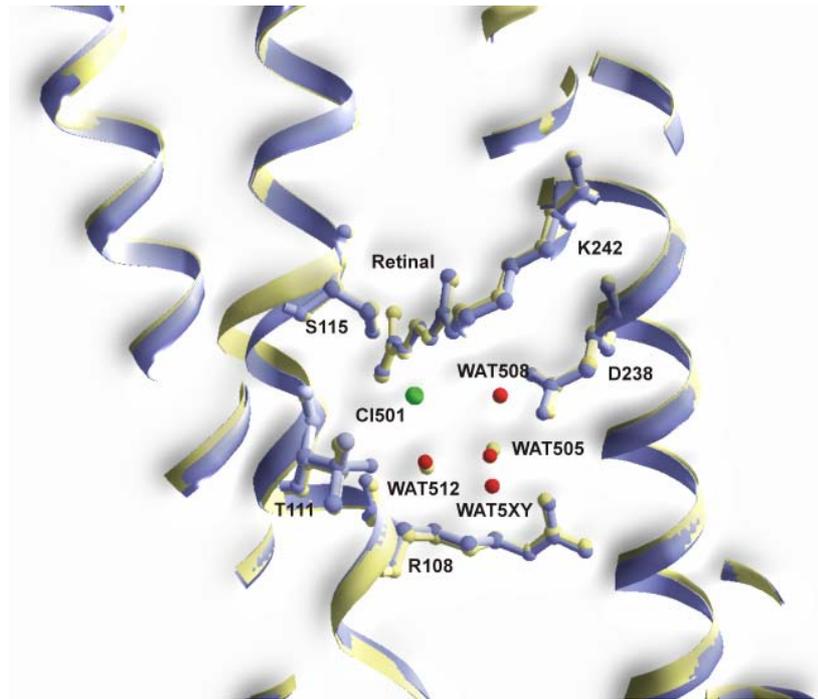


Abbildung 3-8: Überlagerung der Wildtyp-Struktur (1E12) mit dem Grundzustand von T203V im Bereich der Retinalbindungstasche. In blau ist die Struktur von T203V, in gelb die Struktur des Wildtyp-Proteins dargestellt. Einige wichtige Reste innerhalb der Retinalbindungstasche sind im Kugelstabmodell hervorgehoben. In grün ist Cl501, in rot die Wassermoleküle im Grundzustand von T203V dargestellt. In gelb sind neben dem Bändermodell des Wildtyp-Proteins ebenso die Wasser und das Chloridions dargestellt.

3.3.3 Chloridbindungsstellen im Grundzustand von T203V

In der Wildtyp-Struktur konnte bereits eine Chloridbindungsstelle, 3,8 Å von der protonierten Schiff'schen Base (PSB) entfernt, bestimmt werden. Diese wird im weiteren Text als Chloridbindungsstelle I (CB I) bezeichnet. Das Chloridion ist in der Wildtyp-Struktur von drei Wasser-Molekülen umgeben.

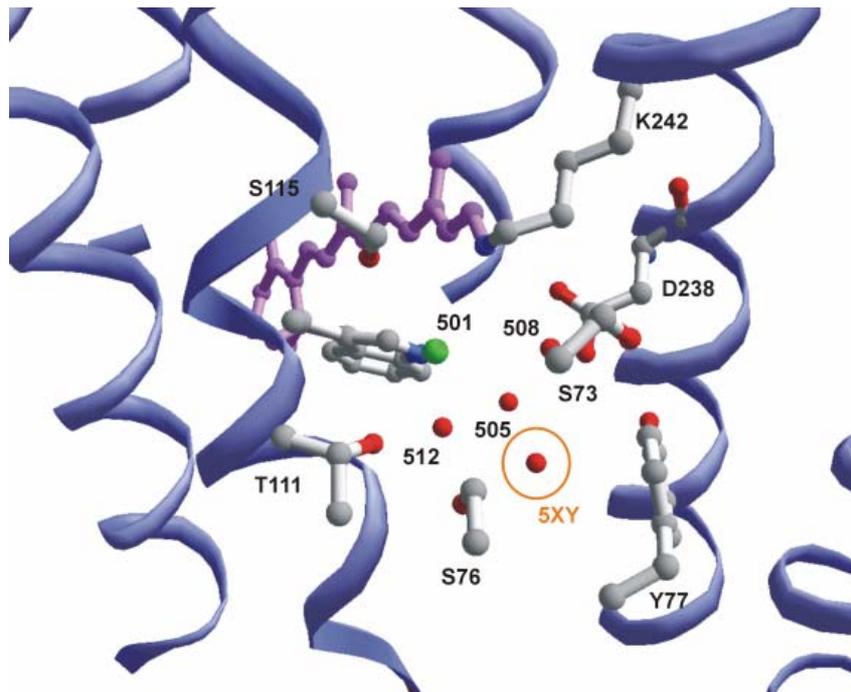


Abbildung 3-9: Chloridbindungsstelle im T203V-Grundzustand. All-*trans* Retinal ist violett eingefärbt. Zusätzlich sind die beteiligten Aminosäurereste der Bindungstasche, sowie das Chloridion (grün) und die Wassermoleküle (rot) dargestellt. Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gepunktete Linien eingezeichnet. Das zusätzlich gefundene Wassermolekül 5XY ist nochmals farblich hervorgehoben.

Im Grundzustand der Mutante T203V koordinieren, wie im Wildtyp, zwei Wassermoleküle (WAT508, WAT512) über eine Wasserstoffbrückenbindung direkt an Cl501. Statt eines weiteren Wassermoleküls (WAT505) in der Wildtyp-Struktur befinden sich im Grundzustand von T203V zwei weitere Wassermoleküle (WAT505, WAT5XY) in räumlicher Nähe zum Chloridion (Abbildung 3-9). Der Abstand dieser Wassermoleküle ist jedoch für die Ausbildung weiterer Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Chloridion zu groß. Im Gegensatz zur Wildtyp-Struktur befinden sich also vier statt der drei Wassermoleküle in der Chloridbindungstasche des Grundzustands.

Die Temperaturfaktoren der beiden Wassermoleküle WAT512, WAT5XY sind im Vergleich zur Umgebung deutlich erhöht. Dies kann an hohen Beweglichkeit der Wassermoleküle oder nicht-vollständiger Besetzung dieser Positionen liegen.

Berechnungen zur Chloridbindungstasche der Wildtyp-Struktur haben gezeigt, daß die Bindungstasche Platz für vier Wassermoleküle bietet (Ullmann, Heidelberg, persönliche Mitteilung).

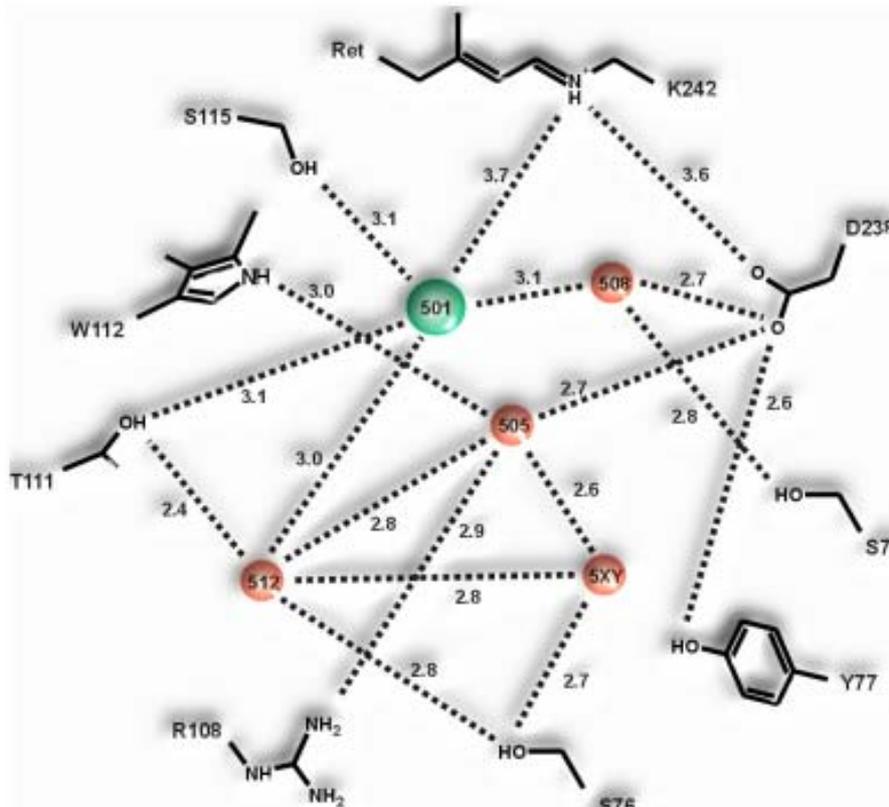


Abbildung 3-10: Schema der beteiligten Aminosäurereste der Chloridbindungstasche nahe der PSB. Das Chloridion ist grün dargestellt; die beteiligten Wassermoleküle sind orange-rot dargestellt. Entfernungen der beteiligten Gruppen untereinander sind in Å angegeben.

In der Wildtyp-Struktur wurde das Chloridion nur von S115 direkt koordiniert (3.05 Å). In der Kristallstruktur der Mutante T203V koordinierte im Gegensatz dazu zusätzlich T111 über eine Hydroxylgruppe Cl501 (3.1 Å). Wie bereits im Kapitel 3.3.2 beschrieben, wurde die Elektronendichte an T111 am besten durch zwei Konformationen beschrieben.

Halobacterium sp. (strain NRC-1):	P1610210.....20.....30.....40.....50
Halobacterium sp. (strain SG1):	P33742	MSITTSVPGVV	DAGV LGAQSA AAVRENALLS SSSLWVNWALA GTATLFFVYM
Halorubrum sodomense:	O93742	MIETAADILAGGMV	PLEMTQTQIF EAVQSDTLA SSSLWINIALA GLSILLFVYM
Natronomonas pharaonis:	P15647	MMETAADALASGTV	PLEMTQTQIF EAIQGDTLA SSSLWINIALA GLSILLFVYM
Halobacterium halobium (strain shark):	Q48314	MTETLPPVTESAVAL	QAEVTRQELF EFLVNDPFLA SSSLVINIALA GLSILLFVYM
Halobacterium halobium (strain port):	Q48315	MTAVSTTATT	VLQATQSDVL QEIQSNFLLN SSIWVNWALA GVVILLFVAM
Halorcula vallismortis:	P94853	MPAASTTATT	MLQATQSDVL QEIQSNFLLN SSIWVNWALA GVVILLFVAM
Halobacterium sp. (strain arg-4):	O93741	MPAASTAATT	LLQASQSEVL GEIQSNFLLN SSSLWVNWALA GLSILLFVAM
		MRSRTYHDQSVCGPYGQSQRDCCRDTDAQS	DTDVHGAQVA TQTRTDTLLH SSSLWVNWALA GLSILLFVYM
Halobacterium sp. (strain NRC-1):	P1610260.....70.....80.....90.....100
Halobacterium sp. (strain SG1):	P33742	GRTIRPGRPR	LIWGATLMIP LVSISSYLGL LSGLTVGMIE MPAGHALAGE.....
Halorubrum sodomense:	O93742	GRNVEDPRAQ	LIFVATLMVP LVSISSYVGL VSGLTVSFLE MPAGHALAGQ.....
Natronomonas pharaonis:	P15647	GRNLEDPRAQ	LIFVATLMVP LVSISSYVGL VSGLTVSFLE MPAGHALAGQ.....
Halobacterium halobium (strain shark):	Q48314	TRGLDDPRAK	LIAVSTILVP VVSIASYVGL ASGLTTSVLE MPAGHFAEGSSVMLGGEEVD
Halobacterium halobium (strain port):	Q48315	GRDLESRAK	LIWVATMLVP LVSISSYVGL ASGLTVGFQ MPPGHALAGQ.....
Halorcula vallismortis:	P94853	GRDIESRAK	LIWVATMLVP LVSISSYVGL ASGLTVGFQ MPPGHALAGQ.....
Halobacterium sp. (strain arg-4):	O93741	GRELESSRAK	LIWVATMLVP LVSISSYVGL ASGLTVGFQ MPPGHALAGQ.....
		ARTVRANRAR	LIVGATLMIP LVLSLSSYLGL VTGLTAGPIE MPAHALAGE.....
Halobacterium sp. (strain NRC-1):	P16102110.....120.....130.....140.....150
Halobacterium sp. (strain SG1):	P33742	MVRSQWGRYL	TWALSTPMIL LALGLLADVD LGSFLTVAIA DIGMVCVTGLA
Halorubrum sodomense:	O93742	EVLTPWGRYL	TWALSTPMIL JAVGLLAGSN TTKLFTAVVA DIGMVCVTGLA
Natronomonas pharaonis:	P15647	EVLTPWGRYL	TWALSTPMIL JAVGLLAGSN TTKLFTAVVA DIGMVCVTGLA
Halobacterium halobium (strain shark):	Q48314	GVVTMWGRYL	TWALSTPMIL LALGLLAGSN ATKLFATITF DIAMCVCVTGLA
Halobacterium halobium (strain port):	Q48315	EVLSPWGRYL	TWTFSTPMIL LALGLLADTD IASLFTAITM DIGMVCVTGLA
Halorcula vallismortis:	P94853	EVLSPWGRYL	TWTFSTPMIL LALGLLADTD IASLFTAITM DIGMVCVTGLA
Halobacterium sp. (strain arg-4):	O93741	EVLSPWGRYL	TWTFSTPMIL LALGLLADTD IASLFTAITM DIGMVCVTGLA
		DVLSQWGRYL	TWFLSTPMIL LALGLWLAEVD TADLFVVAIA DIGMCLTGLA
Halobacterium sp. (strain NRC-1):	P16102160.....170.....180.....190.....200
Halobacterium sp. (strain SG1):	P33742	AAMTTSALLF	RWAFYAISSCA FFWVVL SALV TDWAASASSA GTAEIFDTRL
Halorubrum sodomense:	O93742	AALTTSSYLL	RWVWYAISSCA FFWVVL YILL AEWAEDAIEA GTADIFNTLK
Natronomonas pharaonis:	P15647	AALTTSSYLL	RWVWYAISSCA FFWVVL YILL AEWAEDAIEA GTAEIFNTLK
Halobacterium halobium (strain shark):	Q48314	AALTTSSHLL	RWFWYAISSCA CFLVVL YILL VEWQAQAKAA GTADMNTLK
Halobacterium halobium (strain port):	Q48315	AALTTSSHLL	RWVWYAISSCA FFWAVL YVLL VQWPADEAEA GTSEIFGTLK
Halorcula vallismortis:	P94853	AALTTSSHLL	RWVWYAISSCA FFWAVL YVLL VQWPADEAEA GTSEIFGTLK
Halobacterium sp. (strain arg-4):	O93741	AALTTSSYAF	RWAFYLVSTA FFWVVL YALL AKWPTNAEAA GTGDI FGTLR
Halobacterium sp. (strain NRC-1):	P16102210.....220.....230.....240.....250
Halobacterium sp. (strain SG1):	P33742	VLTVVLWLG Y	PIVWAVGVEG LALVQSVGVT SWAYSVLDFV AKYVFAFILL
Halorubrum sodomense:	O93742	VLTVVLWLG Y	PIFWALGAEG LAVLD. VAIT SWAYSGMDIV AKYVFAFILL
Natronomonas pharaonis:	P15647	LLTVVLWLG Y	PIFWALGAEG LAVLD. VAVT SWAYSGMDIV AKYVFAFILL
Halobacterium halobium (strain shark):	Q48314	LLTVVWMLG Y	PIVWALGVEG IAVL P. VGV T SWYSGFLDIV AKYVFAFILL
Halobacterium halobium (strain port):	Q48315	ILTVVLWLG Y	PILWALGSEG VALLS. VGV T SWYSGGLDIL AKYVFAFILL
Halorcula vallismortis:	P94853	ILTVVLWLG Y	PILWALGSEG VALLS. VGV T SWYSGGLDIL AKYVFAFILL
Halobacterium sp. (strain arg-4):	O93741	WLTVILWLG Y	PILWALGVEG FALVDVSGVLT SWYSGSLDID AKYVFAALL
Halobacterium sp. (strain NRC-1):	P16102260.....270
Halobacterium sp. (strain SG1):	P33742	RWVANNERTV	AVAGQTLGTM SSSD.....
Halorubrum sodomense:	O93742	RWVNNERTV	ADVASGLGSG SRGGAAADD
Natronomonas pharaonis:	P15647	RWVDNERTV	AGMAAGLGAP LARCAPADD
Halobacterium halobium (strain shark):	Q48314	NYLTSNESVV	SGSILDVPSA SGTTPADD..
Halobacterium halobium (strain port):	Q48315	RWVAANEGTV	SGSGMIGSG GAAPADD..
Halorcula vallismortis:	P94853	RWVAANEGAV	SGSGMISGSG GAAPADD..
Halobacterium sp. (strain arg-4):	O93741	RWVANNERTI	AVQGRSGRGA IGDVPED..

Tabelle 3-2: Sequenzvergleich der hinterlegten Halorhodopsin-Sequenzen in Swiss-Prot/TrEMBL (<http://www.expasy.org/sprot/>)

Aus dem Sequenzvergleich in Tabelle 3-2 ist zu entnehmen, daß T111 in allen Halorhodopsinen konserviert vorliegt. T111 befindet sich in einem gestörten Abschnitt der Helix C, einer 3_{10} -Helix (L110-A113), der sich in allen bekannten Strukturen archaer Rhodopsine wiederfindet. In Mutationsstudien konnte bereits gezeigt werden, daß die konservative Mutation von Threonin gegen Valin nur moderate Veränderungen in der Transportaktivität aufwies (M. Rüdiger, Doktorarbeit 1995).

7.5 Å unterhalb der protonierten Schiff'schen Base und 7.3 Å vom Chloridion entfernt befindet sich R108. In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, daß R108 für die Funktionalität eine entscheidende Rolle spielt. Mutationsstudien (R108K,

R108Q) zeigten eine deutliche Abnahme, bzw. Inaktivierung der Pumpaktivität von HR (Rüdiger, 1996). Das Wassermolekül WAT505 koordiniert an R108 über die Carbonylgruppe der Amidbindung des Proteinerückrats, sowie das Wassermolekül WAT512 über die Guanidiniumgruppe. Die Guanidiniumgruppe von R108 bildet zusätzlich eine Wasserstoffbrückenbindung zu Q105. Durch Mutationsstudien konnte ebenfalls gezeigt werden, daß Q105E eine veränderte Kinetik im Photozyklus zeigt. Die Mutation Q105E zeigt in Photozyklusmessungen einen biphasischen Zerfall des L-, sowie des O-Intermediats. Für die veränderte Kinetik wurde eine verzögerte Aufnahme des Chloridions als mögliche Erklärung vorgeschlagen (M. Rüdiger, Doktorarbeit 1995).

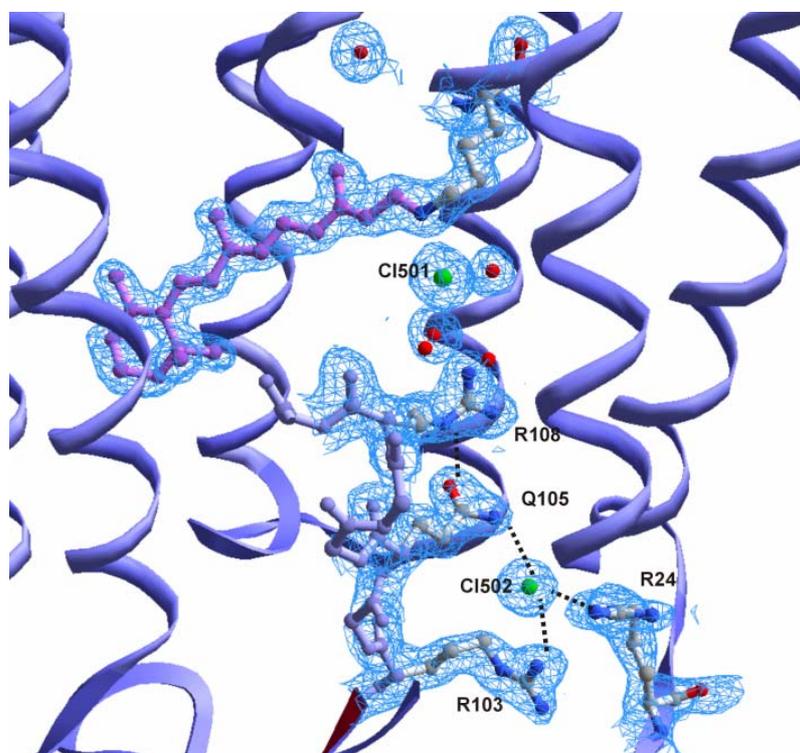


Abbildung 3-11: In grün sind die beiden Chloridionen dargestellt, in rot Wassermoleküle. Im weiteren sind die drei koordinierenden Aminosäurereste R24, R103, Q105, sowie R108 hervorgehoben. Retinal ist violett eingefärbt. 2fofc-Elektronendichten sind für die ausgewählten Bereiche in hellblau dargestellt.

Im Grundzustand der Mutante T203V konnte ein weiteres Chloridion 3.2 Å unterhalb von Q105 lokalisiert werden. Neben Q105 sind zwei weitere basische Aminosäuren, R103, sowie R24, an der Koordination des zweiten Chloridions Cl502 beteiligt (Abbildung 3-11). Diese Chloridbindungsstelle wird im weiteren Verlauf der Arbeit als Chloridbindungsstelle II (CB II) bezeichnet.

Okuno *et al.* (1999) schlug aus photoelektrischen Messungen eine weitere, zweite Chloridbindungsstelle auf der extrazellulären Seite vor. In der Wildtyp-Struktur konnte jedoch eine weitere Chloridbindungsstelle nicht zweifelsfrei bestimmt werden (Kolbe, persönliche Mitteilung).

3.3.4 Struktur des Grundzustands Bromid-haltiger T203V-Kristalle

Um die beiden Chloridbindungsstellen experimentell zu erhärten, wurde in den Kristallen versucht die Chloridionen durch Bromid-Ionen zu ersetzen. Wenn die Ionisierungsenergie der inneren Elektronenschalen eines bestimmten Atoms in der Nähe der Energie des Röntgenstrahls liegt, kommt es zu Resonanzeffekten. Die Phasenverschiebung ist in diesem Fall nicht mehr für alle streuenden Atome gleich. Es kommt zu intrinsischen Phasenverschiebungen, welche die Aufhebung des Friedel'schen Gesetzes zur Folge hat: Die Inversionssymmetrie des Beugungsbildes verschwindet. Das anomale Signal führt zu deutlich veränderten Intensitäten in den Differenzelektronendichten, welche die eindeutige Lokalisation der anomalen Streuer innerhalb des Kristallgitters ermöglicht. Das Phänomen der anomalen Streuung wird üblicherweise zur Lösung von *de-novo* Strukturen verwendet. Das Ziel dieses Versuches war es jedoch, durch das anomale Signal um der Br-Absorptionskante im Röntgenspektrum die Positionen der Bromid-Ionen und damit wiederum die Positionen der Chloridionen eindeutig zu bestimmen.

Für die Präparation Bromid-haltiger Kristalle wurden Kristallansätze 12 Stunden vor der Messung mit einer KBr-haltigen kubischen Phase überschichtet. Die wäßrige Lösung enthielt vor der Präparation 3.3M KBr. Nach der Inkubation wurde ein Kristall, wie bereits beschrieben, vermessen. Die Wellenlänge des Röntgenstrahl wurde auf 0.9195 Å, nahe der Bromid-Absorptionskante, eingestellt. Die Prozessierung der Daten erfolgte wie bereits beschrieben. Mit der Ausnahme, daß die Friedel-Paare getrennt waren. Für die Verfeinerung wurden das Protein, sowie das Retinal miteinbezogen, jedoch keine weiteren Wassermoleküle oder Ionen berücksichtigt. Anschließend wurden die Differenzsignale aus der Differenzelektronendichte $F_o - F_{calc}$ bestimmt. Für die verfeinerte Strukturlösung ergab sich bei einer Auflösung von 2.4 Å ein R-Faktor von 21%, bzw. R_{free} von 26%.

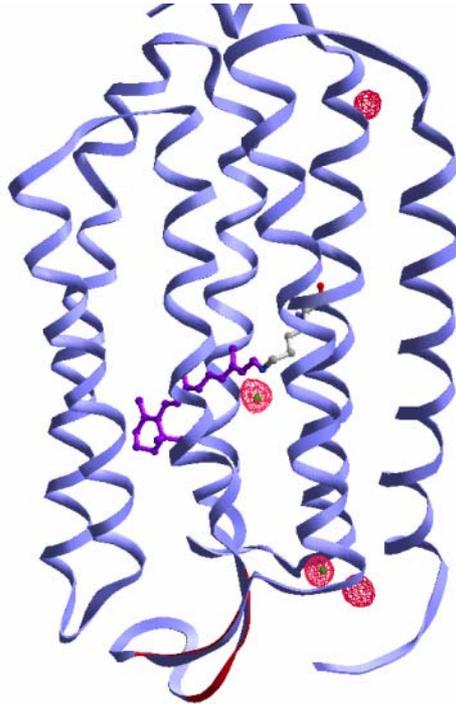


Abbildung 3-12: Es sind in rot die vier größten Differenzelektronendichten $F_o - F_{calc}$ (4.5σ) im T203V-Grundzustand der bromidhaltigen Kristalle dargestellt. Die Bromidionen sind grün dargestellt. Zu sehen sind neben den zwei Differenzdichten an den Positionen der Bromidionen, zwei weitere Elektronendichten an den Oberflächen des Proteins.

In Abbildung 3-12 sind die Differenzelektronendichten $F_o - F_{calc}$ bei 4.5σ dargestellt. Es sind innerhalb des Proteins eindeutig die beiden Differenzelektronendichten für die Positionen der beiden Chloridionen zu sehen, sowie weitere Bindungsstellen für Bromid- bzw. Chloridionen an den Oberflächen des Proteins. Die Messungen an Bromid-haltigen Kristallen bestätigen NMR-Messungen mit ^{35}Cl von Falke *et al.* (1984), daß neben zwei Chloridbindungsstellen sich weitere Chloridbindungsstellen an der Oberfläche des Proteins befinden (Falke *et al.*, 1984). In einer weiteren Messung konnten die beiden Bindungsstellen innerhalb des Proteins ebenso nachgewiesen werden. Die Differenzelektronendichten waren an den Oberflächen jedoch weitaus geringer als in der Abbildung 3-12 gezeigt.

3.4 Struktur des L₁-Intermediats von HR-T203V

Die erste hochaufgelöste Struktur von HR (Kolbe *et al.*, 2000) sowie die Strukturaufklärung verschiedener Photozyklusintermediate von Bakteriorhodopsin zeigten, daß eine Strukturanalyse von Photozyklusintermediaten in Halorhodopsin grundsätzlich möglich sein sollte. Außerdem zeigten bereits erste Versuche, daß für den Wildtyp eine strukturelle Charakterisierung des K- und L-Intermediats möglich ist (Carlsson, Daten unveröffentlicht; Kolbe, Dissertation 2001).

Für die Anreicherung des L-Intermediats in Wildtyp-Kristallen konnten nach Belichtung 20-30% Ausbeute erzielt werden (Carlsson, Kolbe, Dissertation). Nachdem für die Charakterisierung eines Intermediats eine minimale Besetzung von 30% erreicht werden sollte, lag die Charakterisierung des L-Intermediats im Wildtyp an der Grenze vertretbarer Interpretation (Kolbe, persönliche Mitteilung). Alternativ können Mutanten von Halorhodopsin durch ihre geänderte Reaktionskinetik zu wesentlich höheren Ausbeuten an Intermediaten führen. Deswegen wurde in dieser Arbeit die Mutante T203V als Kandidat für die Charakterisierung des L-Intermediats verwendet.

3.4.1 UV/Vis-Spektroskopie an T203V-Kristallen

Die HR-Mutante T203V zeigt gegenüber dem Wildtyp im Photozyklus einen 10-fach verlangsamten Zerfall des L-Intermediats (Rüdiger, 1997). Daher sollten belichtete T203V-Kristalle im photostationären Zustand einen höheren Anteil des L-Intermediats aufweisen als entsprechende Wildtyp-Kristalle. Somit sollte eine erfolgreiche Charakterisierung des L-Intermediats in T203V möglich sein.

Für die Messung des L-Intermediats im photostationären Zustand wurden dünne T203V-Kristalle zunächst bei 100 K im Kryostrom gefroren. Anschließend wurden die Kristalle durch Blocken des Kryostroms 10 Sekunden bei Raumtemperatur mit einem 633 nm HeNe-Laser (15 mWatt) belichtet und sofort auf 100 K zurückgefroren. Die Anreicherung des L-Intermediats lag zwischen 45-75% nach Belichtung (siehe Tabelle 3-3). Die Umsätze wurden aus den Differenzspektren von HR₅₂₀-HR₅₇₈ berechnet. Zur Berechnung wurden die Extinktionskoeffizienten von solubilisiertem HR aus der Literatur verwendet (Tittor *et al.*, 1987).

Datei-Nr	hR		$\epsilon=14000$		hR _L -hR			
	$\epsilon=48000$					$\epsilon=-31000$		
	OD	OD/ ϵ	ΔOD_{500}	$\Delta OD/\epsilon$	% L	ΔOD_{610}	$\Delta OD/\epsilon$	% L
020122-GC01/04	1,4	30 μ	0,24	17 μ	57	-0,70	23 μ	75
020123-2_03/04	1,6	33 μ	0,22	15,7 μ	47	-0,60	19 μ	58
020123-2_05/06	1,7	35 μ	0,16	11,4 μ	32	-0,68	22 μ	62
020123-2_07/09	0,84	18 μ	0,13	9,3 μ	53	-0,26	8,4 μ	48
020123-2_10/11	1,5	32 μ	0,20	14 μ	44	-0,56	18 μ	58
020123-2_12/13	1,7	36 μ	0,26	19 μ	52	-0,65	21 μ	59
020123-4_01/02	1,7	35 μ	0,28	20 μ	58	-0,60	19 μ	55
020204-1_01/02	1,1	24 μ	0,16	11,4 μ	48	-0,25	8,1 μ	35

Tabelle 3-3: Die Daten wurden gemeinsam mit G. Carlsson am Mikrospektralphotometer bei 100K gemessen und von G. Carlsson ausgewertet. Zunächst sind für die verschiedenen Meßreihen die Absorption des Grundzustands, sowie deren Anteile angegeben. Anschließend wurde der Anteil des ausgebleichten Grundzustands und die Bildung des L-Intermediats mit den angegebenen molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt.

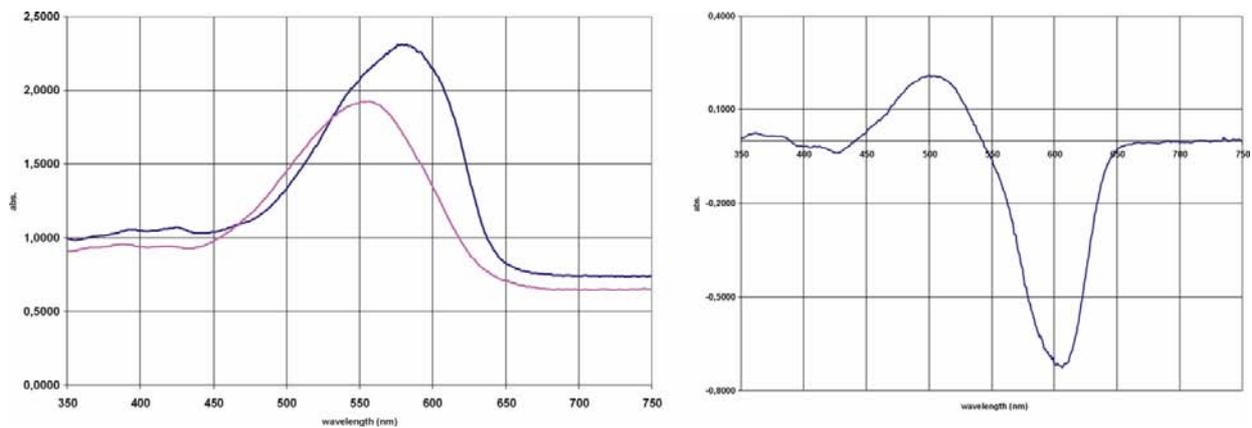


Abbildung 3-13: a) Absolutspektren des Grundzustands T203V in blau, sowie des belichteten Kristalls in rosa. Die Spektren wurden bei 100K aufgenommen. Der Kristall wurde 10sec bei RT mit einem HeNe-Laser bei 633nm belichtet. b) Differenzspektrum des belichteten Kristalls.

Die hohen Schwankungen bei der Bestimmung des Intermediat-Anteils können zum Teil auf den Versuchsaufbau zurückgeführt werden. Häufig sieht man in den Absolutspektren, daß nach Auftauen und Belichtung die Lichtstreuung und somit die Hintergrundabsorption zunahm. Ebenso führte das Auftauen und erneutes Frieren zu geringen, aber auch zu größeren Repositionierungen des Kristalls (siehe nächstes Kapitel). Nachdem der Kristall in seiner Schichtdicke variierte führte dies zu Unterschieden in der optischen Dichte des Kristalls. Diese Veränderungen des Kristalls, bzw. seiner Positionierung führten somit zu einer Schwankung der berechneten Intermediatanteile in den verschiedenen Ansätzen.

Nach Belichtung nimmt der Anteil an L-Intermediat über die Zeit kontinuierlich ab. Typischerweise dauert die gesamte Aufnahme eines Datensatzes 30 Minuten. Die Abnahme des L-Intermediats über die Zeit wurde durch Messung am Mikrospektralphotometer bestimmt (Carlsson, Dissertation). Am Ende der Messung eines Datensatzes lag der Intermediat-Anteil noch zwischen 45-55 %.

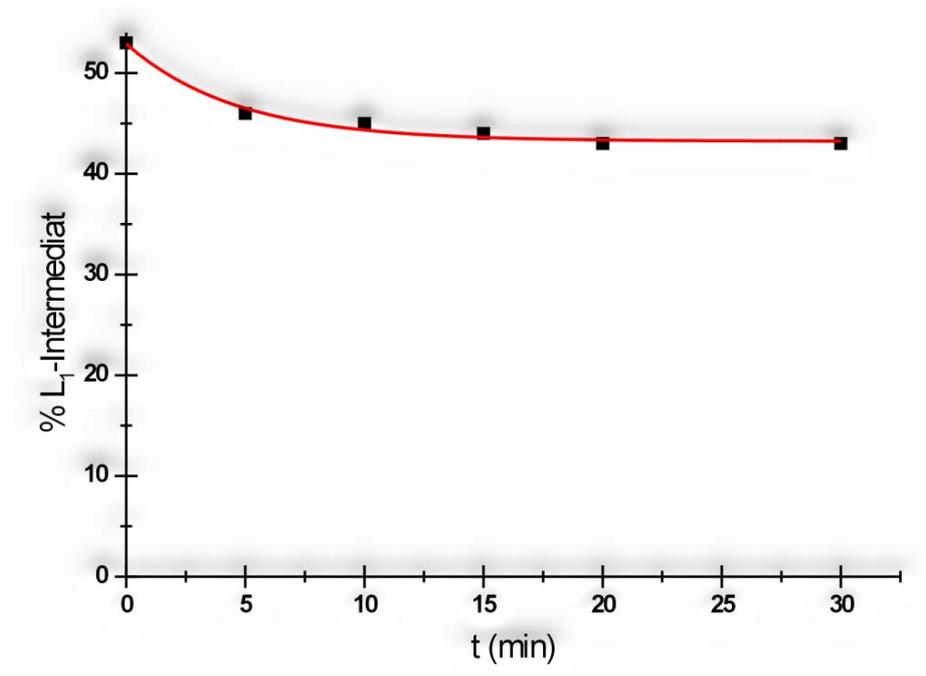


Abbildung 3-14: Abnahme des Anteils an L₁-Intermediat über die Zeit (5.9.02)

3.4.2 FTIR-Messungen an T203V-Kristallen

Für die Charakterisierung des L-Intermediats in den belichteten T203V-Kristallen wurden FT-IR-Messungen am Kernforschungszentrum Jülich in Zusammenarbeit mit Rouslan Efremov und PD Dr. Heberle durchgeführt. Für die FT-IR-Messungen wurden Kristalle isoliert und zwischen zwei CaF_2 -Platten fixiert. Die Kristalle wurden kontinuierlich mit einem 633 nm HeNe-Laser belichtet. Zunächst wurden UV/Vis-Differenzspektren der Kristalle zur Verifizierung der am Mikrospektralphotometer gemessenen Daten aufgenommen. Anschließend wurden am gleichen Kristall FT-IR-Messungen durchgeführt. Für die Charakterisierung der beiden L-Intermediate L_1 und L_2 sind die Streckschwingungen der Amidbande I im Bereich von 1650-1665 cm^{-1} entscheidend.

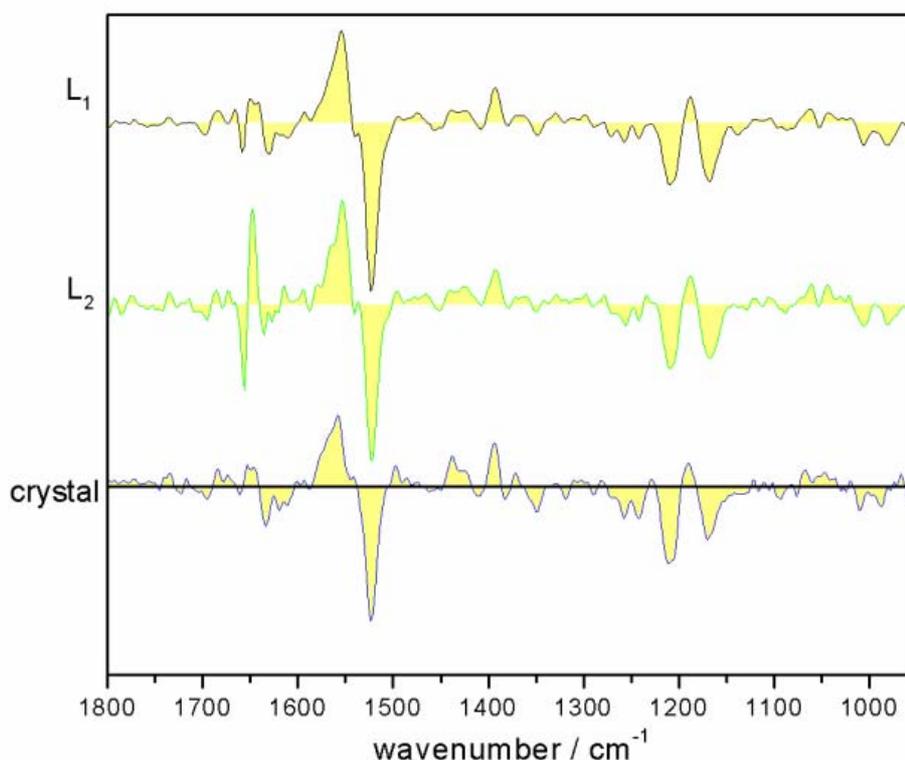


Abbildung 3-15: FTIR-Spektren von HR-Wildtyp und T203V-Kristall. Die beiden oberen Spektren sind von PD Dr. J. Heberle gemessene Referenzen am Wildtyp. Das untere Spektrum wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. J. Heberle bei RT an einem T203V Kristall mit kontinuierlicher Belichtung durch einen 633nm HeNe-Laser gemessen.

In zeitaufgelösten FT-IR-Messungen nimmt während der Lebensdauer von L (Verhältnis der C=C Streckschwingung im Bereich von 1580-1500 cm^{-1} ist konstant) die Streckschwingung im Bereich der Amid I Bande zu. Eine Zunahme dieser

Streckschwingung weist auf eine Konformationsänderung des Proteins während der Lebensdauer des L-Intermediats hin. Aufgrund der gemessenen Signalgröße im Bereich der Amid I Bande existiert also ein L₁-Intermediat und ein L₂-Intermediat nach der Konformationsänderung. Im vermessenen Kristall (Abbildung 3-15) wird nach diesen Kriterien ein L₁-Intermediat erzeugt, d.h. es haben noch keine Konformationsänderungen im Protein stattgefunden.

Es sei darauf hingewiesen, daß die Messungen nicht im gefrorenen Zustand bei 100K sondern bei Raumtemperatur durchgeführt wurden. Da es beim Auftauen und Rückfrieren zu kleinen Verschiebungen des Kristalls kommen kann und die Besetzungsunterschiede der Schwingungszustände nur sehr klein sind, waren FT-IR Messungen der aufgetauten und rückgefrorenen Kristalle nicht auszuwerten. Unabhängige Messungen von Teng *et al.* (1998) zeigten, daß bei sprunghaften Temperaturänderungen im Stickstoffstrom der thermische Temperaturkoeffizient $t=4$ ms bei einem Kristall mit einem Volumen von 10^{-4} mm³ beträgt. Dieses Volumen entspricht der Größenordnung der vermessenen Kristalle. Nach zwei Halbwertszeiten hat man ca. 85 % der erwünschten Temperatur erreicht. Die Zeitdimensionen liegen somit deutlich unterhalb der Zerfallszeit des L₁-Intermediats (100 ms) in der Mutante T203V. Es kann somit angenommen werden, daß es sich bei dem gefrorenen Intermediat um das L₁-Intermediat handelt.

3.4.3 Verfeinerung des L₁-Intermediats

Für die Intermediatstruktur wurde im ersten Schritt eine rigid-body Verfeinerung mit T203V als Anfangsmodell durchgeführt. In den nächsten Schritten wurde der Datensatz zunächst in einer Konformation verfeinert. Im weiteren Verlauf der Verfeinerung wurden wichtige Reste der Chloridbindungsstelle I, sowie ausgewählte Reste in zwei alternativen Konformationen verfeinert: Y109, W112, S115, W207, E219, D238, K242, RETC901, CI501, WAT508. In der Verfeinerung wurden die Konformation des Grundzustandes festgehalten.

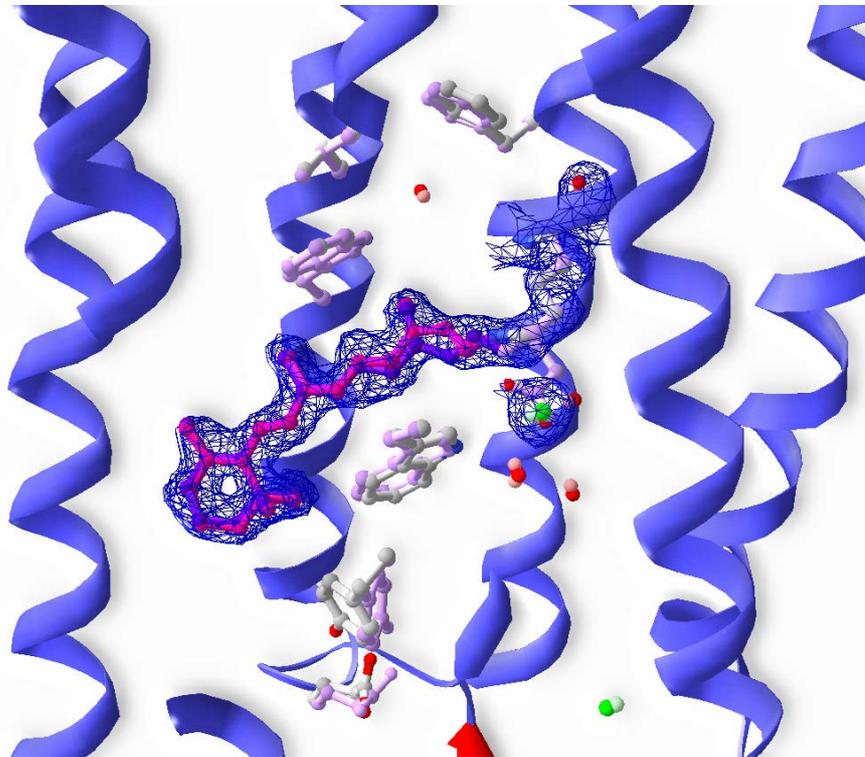


Abbildung 3-16: In hell-violett sind ausgewählte Reste des Grundzustands dargestellt, sowie in hell-rot die Wasser im Grundzustand. In hellgrün sind die beiden Chloridionen des Grundzustands dargestellt. Entsprechend sind für die für das Intermediat die Reste in grau, Wasser in rot, sowie Chloridionen in grün dargestellt. all-trans Retinal ist im Grundzustand in violett dargestellt und im L₁-Intermediat ist 13-cis Retinal in magenta dargestellt.

Die beiden Konformationen wurden mit einem Anteil von 40% Grund- und 60% Intermediatzustand verfeinert. Für die Beurteilung des Anteils an Grund- und Intermediatzustand wurden die Anteile des Intermediats zwischen 40-60% variiert und zum einen visuell mit der $2F_o - F_{calc}$, bzw. $F_o - F_{calc}$ Elektronendichtekarte

verglichen, zum anderen die Temperaturfaktoren der alternativ verfeinerten Zustände auf die Konsistenz überprüft.

Im Verfeinerungsprogramm CNS Version 1.1 ist es prinzipiell möglich die Besetzungsgrade alternativer Konformationen als Gruppe zu berechnen und zugleich die Konformationen zu verfeinern. Der hierfür verwendete Algorithmus scheint jedoch für diese Verfeinerung ungeeignet zu sein, da die Änderungen in der Struktur nur sehr gering sind und somit keine korrekte Ermittlung des Anteils aus den gemessenen Elektronendichten möglich ist.

Mit Ausnahme von Y109 und E219, welche miteinander eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden, sind im L₁-Intermediat keine größeren Änderungen in der Struktur sichtbar. Y109 befindet sich ebenso wie T111, sowie W112 in Helix C. E219 befindet sich kurz vor Helix F. Beide Reste sind in allen archaealen Halorhodopsinen konserviert, sowie in Bakteriorhodopsin (Y83, E194). Alle Intermediatstrukturen von Bakteriorhodopsin zeigen jedoch keine signifikanten Änderungen dieser beiden Reste.

In der Umgebung der Chloridbindungsstelle I sind lediglich kleine Bewegungen des Chloridions, sowie der Wassermoleküle und der umgebenden Reste zu erkennen (Abbildung 3-16). Die Positionen der beiden in der Struktur gefundenen Chloridionen konnten mit Hilfe Bromid-haltiger T203V-Kristalle bestimmt werden (siehe Kapitel 3.4.4).

Die Verfeinerung des gebundenen 13-*cis* Retinals wird in Kapitel 3.4.6 im Rahmen der Veränderungen innerhalb der Chloridbindungsstelle I genauer besprochen. In Abbildung 3-14 ist die Differenzdichtekarte $F_{exc} - F_{grund}$ dargestellt. Hierfür wurde vom Intermediatdatensatz der Grundzustandsdatensatz abgezogen. Diese geben ein Bild der Änderungen innerhalb des Proteins wieder. Bei der Interpretation der Differenzdichtekarte muß berücksichtigt werden, daß die beiden Datensätze an unterschiedlichen Kristallen gemessen wurden.

In Abbildung 3-17 ist eine deutliche negative Differenzdichte um die PSB zu sehen. Der Grund hierfür ist die Isomerisierung von all-trans Retinal zu 13-*cis*, 15-*anti* Retinal. Eine positive Differenzdichte ist in der Umgebung der PSB nicht zu sehen. Ein Grund hierfür mag in der Berechnung der Differenzdichtekarte an Datensätzen zweier Kristalle liegen. Eine deutlich positive Differenzdichte ist zusätzlich in der Nähe von WAT506 zu sehen.

Im Intermediatzustand ist in der Umgebung des Chloridions sowohl eine negative Differenzdichte wie auch eine positive Differenzdichte zu sehen, die durch die Bewegung des Chloridions entstand. Der Abstand der beiden Differenzdichten beträgt 1.9 Å. Dieser Abstand gibt nicht den tatsächlichen Abstand des bewegten Chloridions wieder, da die Zentren der Differenzdichten nicht den Zentren des Chloridions im Grundzustand, bzw. im L₁-Intermediat entsprechen. Diese Zentren werden durch die Verfeinerung ermittelt und entsprechen einer Bewegung um 0.3 Å.

Kleine Änderungen sind oberhalb der 3₁₀-Helix an den Resten S115, T116 und I119 zu sehen, die mit dem gespannten Helixabschnitt in Zusammenhang stehen können (Abbildung 3-17B).

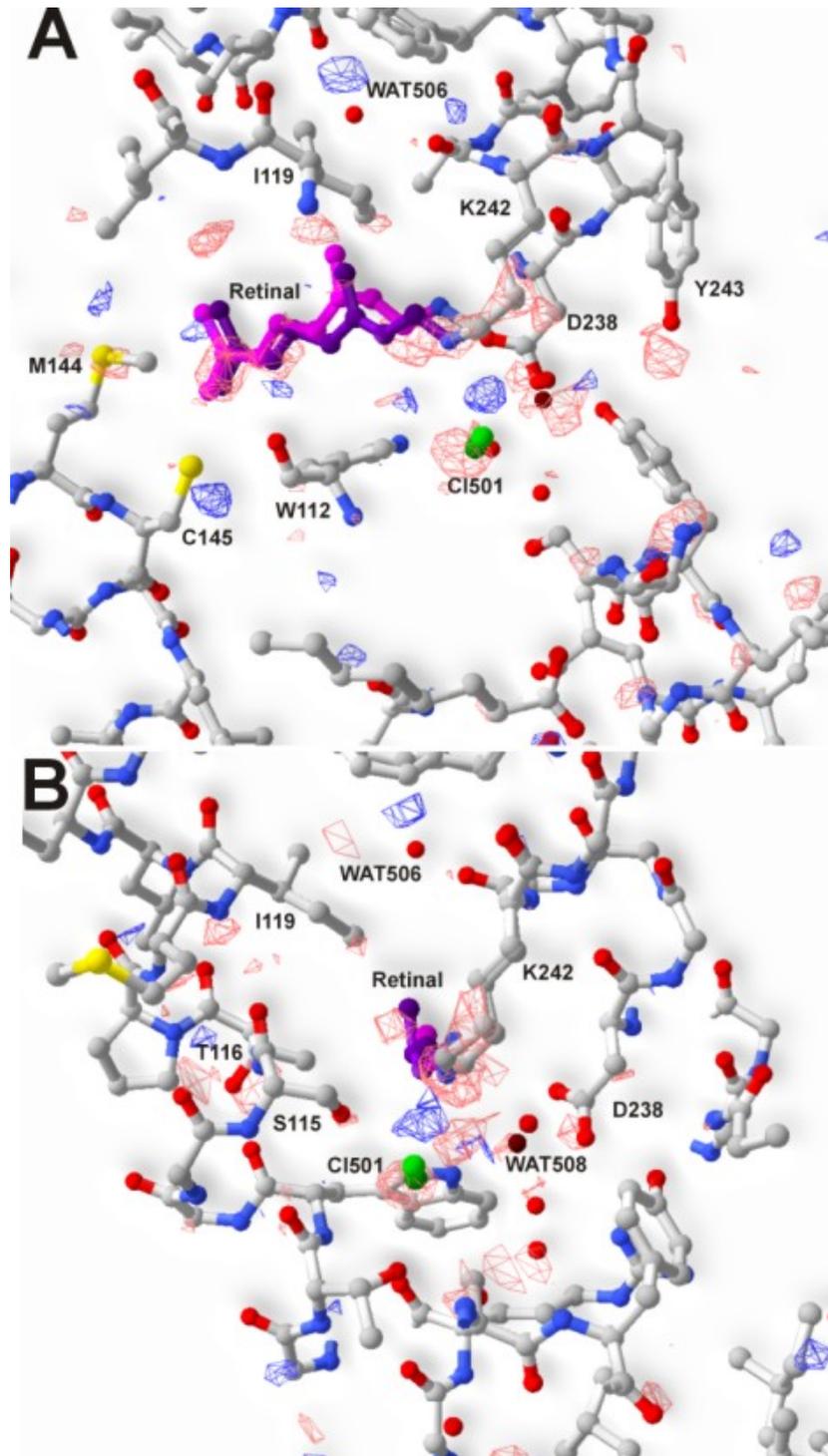


Abbildung 3-17: Differenz-Fourier-Dichtekarten $F_{\text{exc}} - F_{\text{grund}}$ des L_1 -Intermediats, abgezogen vom Grundzustand. In rot sind die negativen Differenzdichten (3.0σ), in blau sind die positiven Differenzdichten (2.8σ) dargestellt. Eine negative Differenzdichte ist in der Umgebung der PSB zu sehen. In der Nähe des Chloridions ist eine deutliche negative, wie auch positive Differenzdichte sichtbar. Kleinere Änderungen sind oberhalb der 3_{10} -Helix bei den Resten S115, T116, I119 zu sehen.

3.4.4 L-Intermediatstruktur Br-haltiger T203V-Kristalle

Die Kristallansätze von T203V wurden, wie bereits in Kapitel 3.3.4 beschrieben, 12 Stunden vor der Messung mit einer KBr-haltigen kubischen Phase überschichtet. Die wässrige Lösung enthielt bei der Präparation eine Konzentration von 3.3M KBr. Durch die Überschichtung und Inkubation mit der Bromid-haltigen kubischen Phase sollten die Chloridionen durch Bromid-Ionen teilweise ersetzt werden. Nach der Inkubation wurde ein Kristall, wie bereits beschrieben, vermessen. Für den Kristall ergab sich bei einer Auflösung bis 2.6 Å ein R-Faktor von 23%, bzw. R_{free} von 30%.

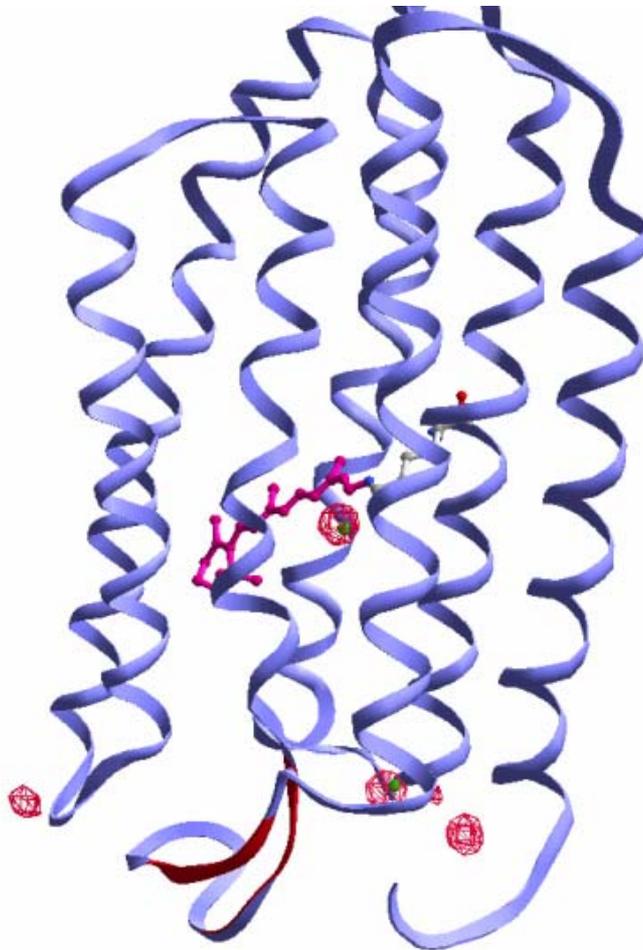


Abbildung 3-18: Halorhodopsin ist im Bändermodell dargestellt. 13-cis Retinal ist in magenta dargestellt, K242 in grau, sowie die beiden Chloridionen in grün. Die $F_o - F_{\text{calc}}$ Differenzelektronendichten bei 4.5σ sind in rot dargestellt.

Für die Lokalisierung der Bromidbindungsstellen im Kristall, bzw. der Chloridbindungsstellen wurden die Differenzelektronendichten $F_o - F_{calc}$ mit einer unteren Ausschlußgrenze von 4.5σ betrachtet. In Abbildung 3-18 sind eindeutig die beiden Chloridionen in den beiden Chloridbindungsstellen CB I und CB II zu sehen. Somit befinden sich im L_1 -Intermediat noch beide Chloridionen auf der extrazellulären Seite im Protein.

3.4.5 Vergleich der Kavitäten von Intermediat- und Grundzustand

Die Größe der Kavitäten des Intermediat- und des Grundzustand wurden mit dem Programm CastP (Jie Liang, 1998) analysiert. Dieses Programm bestimmt Kavitäten und Öffnungen für Solvens-Moleküle anhand einer Volumenberechnung potentieller Kavitäten und Öffnungen im Molekül. Im Programm wird angenommen, daß ein Solvens-Molekül einen Durchmesser von 1.4 Å hat. Unter dieser Annahme lassen sich die potentiellen Kavitäten ermitteln und somit auch deren umgebenden Reste. Anschließend wird eine genauere Berechnung des Volumens durch komplexe Algorithmen durchgeführt, die hier nicht weiter erläutert werden. Im Näheren sollen die Kavitäten der beiden Chloridbindungsstellen betrachtet werden, sowie die Regionen von Y109 mit E219 und V203 mit F245. Y109, sowie E219 beschreiben im L₁-Intermediat die einzige deutliche Änderung. Die Kavität V203 mit F245 befindet sich direkt oberhalb des gebundenen Retinals, im cytoplasmatischen Halbraum von Halorhodopsin. Im Grundzustand, wie auch im L₁-Intermediatzustand befindet sich ein Wassermolekül in dessen Kavität.

Kavität	Grundzustand	Intermediat
CI501 (Å ³)	125.9	131.1
CI502 (Å ³)	46.3	44.5
Y109 & E219 (Å ³)	103.5	182.3
V203 & F245 (Å ³)	48.7	59.9

Tabelle 3-4: Volumina der Kavitäten von den beiden Chloridbindungsstellen, sowie der Kavität oberhalb des Retinals und von Y109 mit E219. Die Volumina wurden mit dem Programm CastP (<http://cast.engr.uic.edu/cast/>) berechnet.

Wie aus Tabelle 3-4 zu entnehmen, kommt es zu keiner großen Volumenänderung der Kavität um CI501. Das gleiche gilt für die Kavität der zweiten Chloridbindungsstelle CI502. Im Gegensatz dazu führt die Bewegung von Y109, E219 zu einer deutlichen Volumenzunahme dieser Kavität.

	Reste
Grundzustand	103, 105, 109, 218, 219, 227, 230, 231, 234
Intermediatzustand	103, <u>104</u> , 105, <u>108</u> , 109, <u>112</u> , 218, 219, 227, 230, 231, 234

Tabelle 3-5: Vergleich der beteiligten Reste im Grund-, sowie L₁-Intermediat, welche die Kavität Y109 mit E219 beschreiben.

Ein Vergleich der berücksichtigten Aminosäuren für die Kavitätsberechnung (Tabelle 3-5) zeigt, daß durch die Drehbewegung von Tyr109 zusätzliche Aminosäuren (S104, R108, W112) für die Berechnung berücksichtigt wurden.

Ebenso nahm das Volumen der Kavität V203 mit F245 leicht zu. Es waren jedoch keine deutlichen Bewegungen einzelner umgebender Reste zu erkennen.

3.4.6 Veränderungen der Chloridbindungstasche I

Wie bereits erwähnt, finden innerhalb der Chloridbindungstasche keine größeren Änderungen statt.

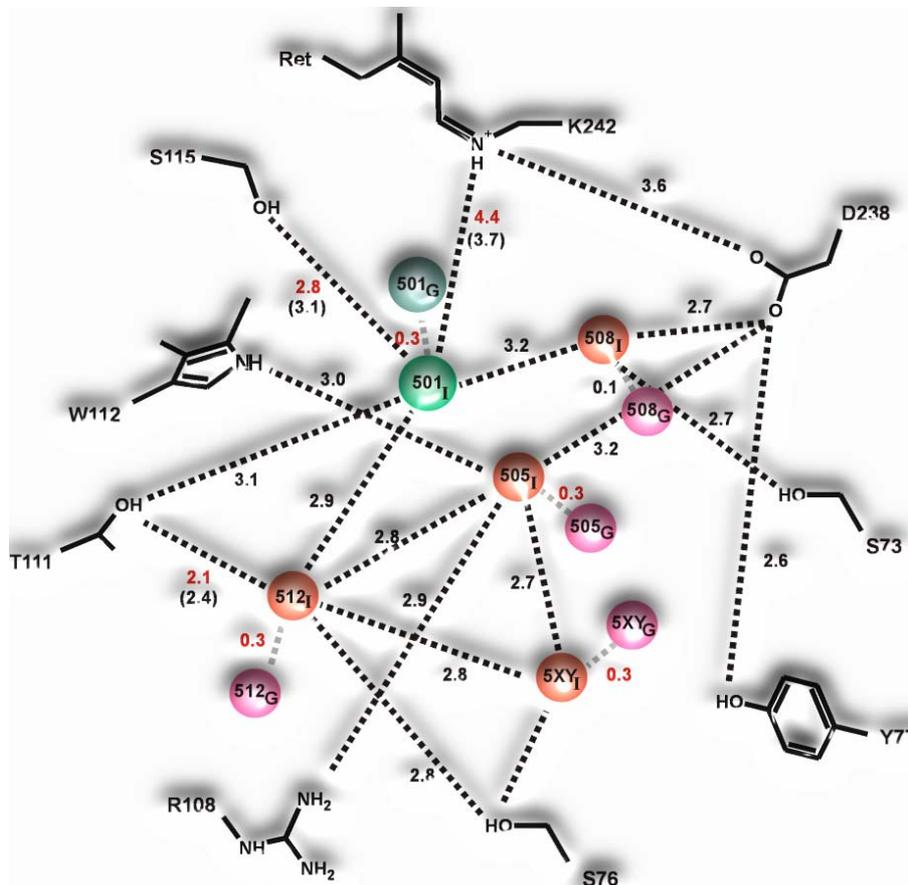


Abbildung 3-19: Schema der beteiligten Aminosäurereste der Chloridbindungstasche I im L₁-Intermediat. Das Chloridion ist grün dargestellt; die beteiligten Wassermoleküle sind orange-rot dargestellt. Das Chlorid-Ion des Grundzustands ist türkis eingefärbt, die Wasser des Grundzustands sind rosa eingefärbt. Entfernungen der beteiligten Gruppen untereinander sind in Å angegeben. In rot sind die Abstände eingefärbt, welche sich ändern. In Klammern sind die Abstände des Grundzustands angegeben.

Die Wassermoleküle innerhalb der Chloridbindungsstelle CBI konnten im Intermediat-Zustand gemessenen Elektronendichten zugeordnet werden. Cl501 ist im L₁-Intermediat weiterhin auf der extrazellulären Seite, in der Chloridbindungstasche CBI, lokalisiert. Eine Lokalisierung von Cl501 lieferte die Intermediat-Struktur der Bromid-haltigen Kristalle.

Das Chloridion Cl501, sowie die Wassermoleküle WAT505, WAT512, WAT512 bewegen sich nur um 0.3 Å aus dem Grundzustand heraus. Der Abstand zwischen S115 und dem Chloridion nimmt um 0.3 Å ab (Abbildung 3-19).

Eine deutliche Änderung des Abstands ergibt nach der Retinalisomerisierung zwischen der Schiff'schen Base und dem Chloridion. In der Verfeinerung des Intermediatzustandes nimmt der Abstand von 3.7 Å auf 4.4 Å zu. Die Abstandszunahme zwischen Schiff'scher Base und Chloridion ist jedoch inkonsistent mit der bisherigen Annahme einer Annäherung des Chloridions im L₁-Intermediates, die auf Untersuchungen und theoretischen Rechnungen zu gebundenem Retinal beruht (Oesterhelt *et al.*, 1986).

Für die Verfeinerung von gebundenen „Liganden“ in Proteinen, hier Retinal in Halorhodopsin, werden in CNS eine Topologie-Datei, sowie eine Parameter-Datei benötigt. In der Topologie-Datei werden die Bindungen, Winkel, Torsionswinkel der Atome des Liganden geometrisch definiert. In dieser Datei wird lediglich festgelegt, welches Atom des Liganden mit dem entsprechenden Nachbarn eine kovalente Bindung bildet, bzw. im Falle von Winkeln werden die beiden benachbarten Atome angegeben. In der Parameter-Datei werden dann die entsprechenden Energien für diese Bindungen, die Winkelgrade, sowie die Energien der Winkel, bzw. Torsionswinkel angegeben, die zuvor in der Topologie-Datei geometrisch festgelegt wurden. Diese Vorgaben werden dann in den molekulardynamischen Verfeinerungsschritten zur Beschreibung des Liganden verwendet.

Für die Verfeinerung des Retinals mit der Schiff'schen Base wurde in der Parameter-Datei von CNS eine vollständige 13-cis Isomerisierung um 180° angenommen. Die Energieparameter für die Beschreibung der Bindungsenergien, Winkel, sowie der Dihedralenwinkel (Torsionswinkel) des Retinals wurden in der Verfeinerung nicht herabgesetzt und somit nicht freigegeben. Werden die Energieparameter der Torsionswinkel zwischen C₁₄-C₁₅ und C₁₅-NH⁺ freigegeben, so nimmt der Torsionswinkel zwischen C₁₅-NH⁺ 131° ein. Die Schiff'sche Base dreht sich somit in Richtung D238. Der Abstand zwischen zwischen NH⁺ und D238 nimmt unter diesen Vorgaben von 3.6 Å auf 3.2 Å ab (Abbildung 3-20). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die spektrale Änderung des L₁-Intermediats sein.

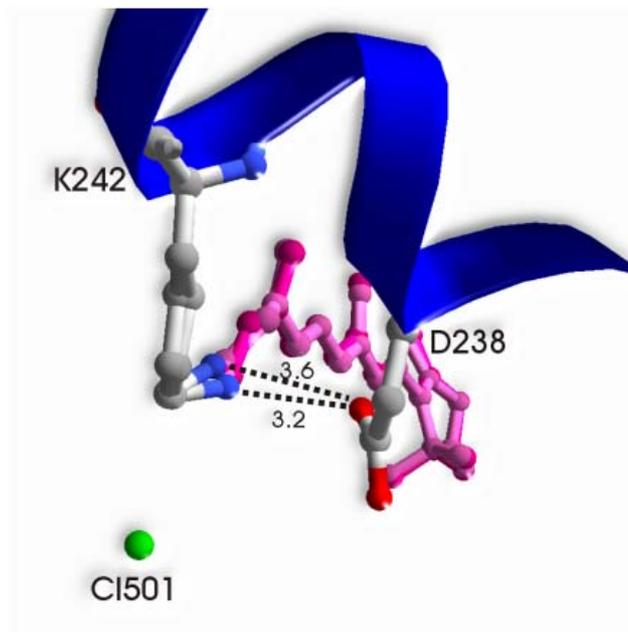


Abbildung 3-20: Verfeinerung des L_1 -Intermediats mit freigegebenen Energieparametern für die Torsionswinkel C_{14} - C_{15} und C_{15} - NH^+ (13-cis Retinal in pink) und im Vergleich dazu mit vollen Energieparametern (13-cis Retinal in rose) für die Torsionswinkel.

Ein weiteres Programm für die Verfeinerung von Röntgenstrukturen ist SHELX. SHELX unterscheidet sich im Wesentlichen von CNS darin, daß dieses Programm zur Beschreibung von Liganden weder eine getrennte Topologie-Datei noch eine Parameter-Datei verwendet. Statt dessen wird der Ligand mit den Proteinkoordinaten direkt vom Programm eingelesen. Für den Liganden werden nur die Abstände der benachbarten Atome (Bindungen; 1,2-Abstand), bzw. die der übernächsten Nachbarn (Winkel; 1,3-Abstand) angegeben. Es entfallen in diesem Programm somit die Energieparameter. Für die Verfeinerung des Retinals muß die Planarität in gewissen Grenzen vorgegeben werden. Die Verfeinerung läuft nicht über „simulated-annealing“, sondern über die geometrische Verfeinerung der Atome in die Elektronendichte. Dies setzt jedoch eine hohe Auflösung ($< 2.5\text{\AA}$) der gemessenen Elektronendichte voraus, welche für die Auflösung des Intermediat-Datensatzes gegeben war. Die Verfeinerung des Intermediates in SHELX lieferte für die Beschreibung des C_{15} - NH^+ Torsionswinkels einen Winkel von ca. 90° , der für eine π -Bindung nicht möglich ist (Abbildung 3-21).

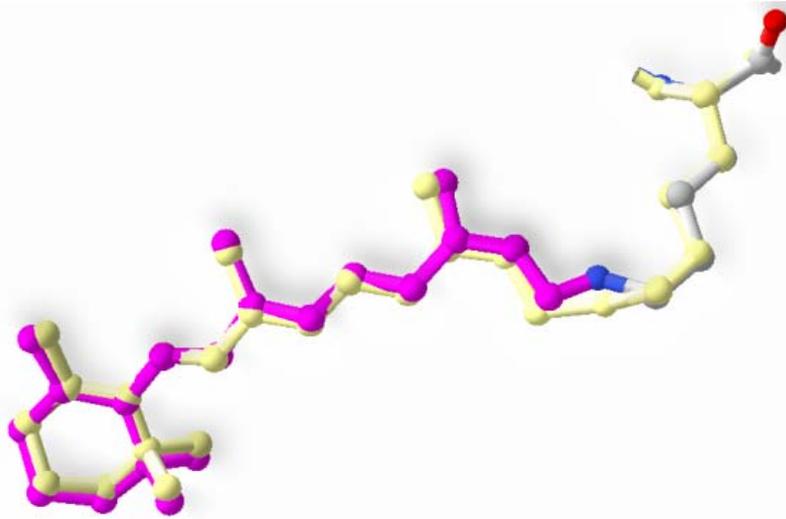


Abbildung 3-21: Vergleich der Verfeinerung von Retinal und PSB mit den Programmen CNS und SHELX. In pink ist die verfeinerte Struktur des Retinals mit CNS V.1,1 dargestellt. In gelb ist die entsprechende Verfeinerung mit SHELX dargestellt. Die unterschiedliche Orientierung der PSB ist deutlich zu sehen. In SHELX liefert die Beschreibung des $C_{15}\text{-NH}^+$ Torsionswinkels einen Winkel von 90° .

Beide Verfeinerungs-Programme lieferten keine eindeutigen Aussagen zur Orientierung der Schiff'schen Base. Eine weitere Möglichkeit wäre jedoch auch, daß die Energie nach der Isomerisierung noch im gesamten Retinal des L_1 -Intermediats gespeichert vorlag und die Proteinumgebung sich noch nicht geändert hatte. Dies entspräche dem Modell eines „harten“ Kerns in der Nähe des Retinals und einer „weichen“ Umgebung.

Insgesamt zeigte sich, daß für die Orientierung der Schiff'schen Base und die spektrale Farbänderung des Chromophors die Strukturlösung des Intermediatdatensatzes keine eindeutige Aussage liefert. Im Vergleich zu der veröffentlichten Struktur des entsprechenden M_1 -Intermediats von Bakteriorhodopsin hatten die Autoren versucht den Intermediatdatensatz bei einer Auflösung bis zu 1.43 \AA ohne energetische Einschränkungen des 13-cis Retinals zu verfeinern. Für die vermessenen vier Kristalle erhielten die Autoren jeweils vier unterschiedliche Torsionswinkel, die zum Teil beträchtlich voneinander abwichen (Lanyi *et al.*, 2002). Dies zeigt, daß es auch bei höheren Auflösungen zu großen Unstimmigkeiten in der akkuraten Beschreibung der Bindungs- und Torsionswinkel kommt, wenn man Retinal ohne energetische Einschränkungen verfeinert.

Im weiteren wird in dieser Arbeit die Lösung der Modellstruktur des Intermediatdatensatzes mit den vollständigen Energieparametern für 13-cis Retinal verwendet. Es sei nochmals daran erinnert, daß über die Orientierung der Schiff'schen Base keine eindeutige Aussage getroffen werden kann und somit der Grund der spektralen Änderung im L₁-Intermediat verborgen bleibt. Es läßt sich aber festhalten, daß die Position von C1501 durch die Bromidaustausch-Experimente im Intermediat eindeutig belegt wurden. Daraus ergibt sich, daß C1501 nicht für die spektrale Änderung im L₁-Intermediat verantwortlich ist.

3.5 Charakterisierung weiterer HR-Mutanten

Aufgrund der ersten hochaufgelösten Struktur von Halorhodopsin (Kolbe *et al.*, 2000) war es möglich, durch gezielte Mutationen innerhalb des Proteins ein verbessertes Verständnis über die Beteiligung einzelner Aminosäurereste im Photozyklus zu erhalten. Im Besonderen wurde der Schwerpunkt auf Punktmutationen innerhalb der Chloridbindungsstelle I gelegt, sowie in der Umgebung der Chloridbindungsstelle II. Es wurden folgende Mutanten charakterisiert: S73A, S76A, Y77F, R103V, Q105M, S115A, D238E, D238N. S73 bildet eine Wasserstoffbrücke zu WAT503 aus. Dieses Wasser koordiniert wiederum mit D238 und dem Chloridion Cl501. S76 kann sowohl zu WAT512, sowie zu WAT5XY Wasserstoffbrücken ausbilden. WAT512 koordiniert an Cl501. Y77 bildet eine Wasserstoffbrücke mit D238 aus und ist in sämtlichen Halorhodopsinen konserviert (Tabelle 3-2). S115 bildet eine Wasserstoffbrücke mit Cl501 aus. D238 befindet sich wie S115 in der Chloridbindungsstelle I und bildet eine Wasserstoffbrücke zu WAT508 aus. R103 koordiniert in der Chloridbindungsstelle II das zweite Chloridion Cl502. Ebenso koordiniert Q105 in der Chloridbindungsstelle II das zweite Chloridion Cl502. Für S73, S76, Y77, S115 wurden konservative Mutationen durchgeführt, d.h. es wurden die funktionellen Gruppen durch Mutation eliminiert. Für R103, sowie Q105 wurden beide Reste gegen ihre entsprechenden Reste aus *Natronomonas pharaonis* Halorhodopsin mutiert. Mit D238 wurden unterschiedliche Mutationen durchgeführt: Durch Mutation zu Glutamat wurde eine weitere Methylen-Gruppe eingeführt, bzw. durch Mutation gegen Asparagin eine Ladungsumkehr erzeugt. Es gelang nicht die Mutante D238A zu exprimieren. Alle Plasmide der untersuchten Halorhodopsin-Mutanten wurden von H. Besir im Vektor pHUSneu dargestellt (Besir, Dissertation 2001) und im Laborstamm TOM exprimiert. Die Isolierung der Halorhodopsin-Membranfraktion erfolgte, wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt, nach einem modifizierten Protokoll von *Duschl et al.* (1988): Die Membranfraktion wurde nach Lyse der Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert und aufgereinigt.

3.5.1 Chromophorabsorption der HR-Mutanten und pK_a -Werte der Schiff'schen Base

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß Anionen die Chromophorabsorption in membrangebundenem Halorhodopsin beeinflussen. Bei konstanter Ionenstärke zeigten HR-Suspensionen in Gegenwart verschiedener Anionen unterschiedliche Absorptionsmaxima, sowie unterschiedliche Extinktionskoeffizienten (Rüdiger, Doktorarbeit 1995; Steiner *et al.*, 1984; Schobert *et al.*, 1986). Es konnte gezeigt werden, dass im Besonderen polyatomare Anionen eine deutliche Änderung des Absorptionsmaximums erzeugen.

Durch Säure-Base-Titration der PSB in unterschiedlichen Salzlösungen gleicher Ionenstärke ließen sich durch SVD-Analyse der titrierten UV-Vis Spektren die pK_a -Werte der PSB, sowie die Absorptionsmaxima des protonierten Grundzustands ermitteln. Bei der SVD-Analyse handelt es sich mathematisch um ein numerisches Verfahren der Einzelwert-Zerlegung. In unserem Fall liefert die Analyse die pK_a -Werte der PSB als Eigenwerte und die entsprechenden Absorptionsspektren der protonierten, bzw. deprotonierten Schiff'schen Base als Eigenfunktionen.

Aufgrund der sehr starken Streuung der Membranfraktionen im UV/VIS-Bereich, mußte von den Daten eine geeignete Streukurve abgezogen werden (Abbildung 3-22). Es zeigte sich, daß die Streukurve nicht durch Rayleigh-Streuung, d.h. eine Funktion mit $\alpha \cdot \lambda^{-4}$ beschrieben werden kann, sondern durch eine Funktion mit $\alpha \cdot \lambda^{-3}$. Rayleigh-Streuung ist eine Sonderform der sogenannten Mie-Streuung. Sind die Partikel hinreichend klein, so kann die Streuung mit λ^{-4} beschrieben werden. Nimmt jedoch die Partikelgröße zu, verkleinert sich der Exponent und somit erhält man eine andere Funktion der Streukurve.

Neben der Korrektur der Streuung, wurde eine Volumenkorrektur der Daten aufgrund der Verdünnung der Probe durch die Titration berücksichtigt. Sämtliche Schritte der Datenkorrektur wurden durch ein Makro in Excel automatisiert durchgeführt.

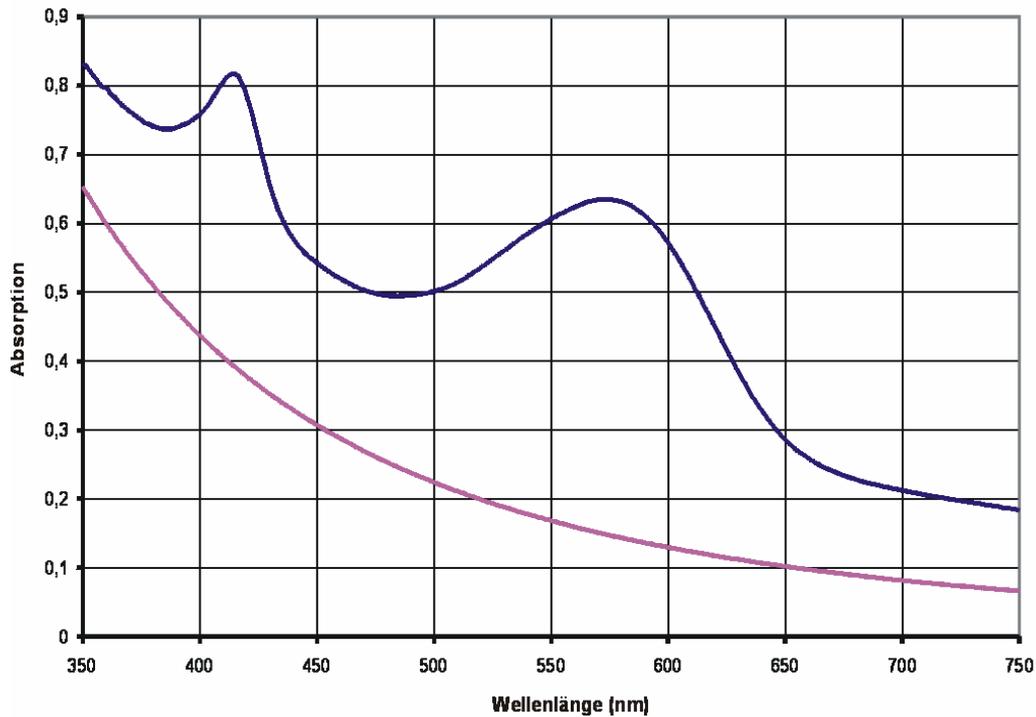


Abbildung 3-22: pH-Titration der Mutante R103V in Gegenwart von 4.4M KBr. In blau ist ein Absorptionsspektrum bei pH 5.6 abgebildet. In rosa ist die angenommene Streukurve eingezeichnet (R103V_011123).

HR Mutante	SO ₄ ²⁻		Cl ⁻		Br ⁻		NO ₃ ⁻	
	λ_{\max}	pK _A	λ_{\max}	pK _A	λ_{\max}	pK _A	λ_{\max}	pK _A
Wt-HR	570	7.4	578	9.5	582			
R108Q	578	12.0	578	12.0	574			
S73A	573	7.5	560	9.5	563	9.6	560	9.0
S76A	569	8.9	578	10.9	579	9.3	565	10.3
Y77F	563	11.4	564	12.0	-	-		
R103V	570	9.0	583	10.3	582	10.8	567	10.5
S115A	591	7.4	586	8.0	580	8.9	574	8.7
D238E	564	8.7	563	8.7	568	9.1	556	9.7
D238N	Denat.	Denat.	571	8.4	574	7.6	570	8.0
Q105M	572	8.8	580	9.8	580	11.3	568	9.7

Tabelle 3-6: Absorptionsmaxima und pK_a-Werte der verschiedenen HR-Mutanten in Gegenwart verschiedener Anionen. Die Werte wurden durch Säure-Base Titration und anschließender SVD-Analyse ermittelt.

In Tabelle 3-6 sind die Absorptionsmaxima der untersuchten HR-Mutanten angegeben, sowie die pK_a-Werte der Säure-Base Titration. In früheren Arbeiten (Rüdiger, Dissertation 1996) konnte gezeigt werden, daß in Gegenwart polyatomarer einwertiger Anionen eine deutliche Verschiebung des

Absorptionsmaximums erfolgte. Die hier charakterisierten Mutanten zeigten in Gegenwart von Nitrat ebenso eine deutliche Blauverschiebung.

Für die beiden D238-Mutanten, die keine Transportaktivität besaßen, waren keine anionenabhängigen Farbänderungen meßbar. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die Mutation von Aspartat zu Glutamat eine deutliche Blauverschiebung des Absorptionsmaximums. Ebenso waren im Rahmen der Meßgenauigkeit die pK_a -Werte der Säure-Base-Titration der Schiff'schen Base in diesen Mutanten unabhängig vom vorliegenden Anion. Daraus ergab sich, daß in der Mutante D238E keine Bindung des Anions erfolgte. Die Mutation von Aspartat zu Asparagin führte zu einer Ladungsvernichtung an diesem Rest. Dies veränderte die Elektrostatik innerhalb der Chloridbindungsstelle I grundlegend, was einen Verlust der Anionenbindungsstelle zur Folge haben konnte. Die Mutation von Aspartat zu Glutamat veränderte nicht die Ladung am Rest 238, jedoch wurde durch diese Mutation eine weitere CH_2 -Gruppe im Rest eingeführt. Die Größe der Chloridbindungsstelle nahm ab und es wurde angenommen, daß die Bindungsstellen der Wassermoleküle bzw. des Chloridions unvollständig besetzt wurden. Dies führte zum Verlust der Anionenbindung.

Mit Ausnahme der Mutationen an D238 führten sämtliche Mutationen innerhalb der Chloridbindungsstelle I nicht zu einem Verlust der Anionentransportaktivität. Dies galt ebenso für die Mutationen der beiden Aminosäurereste T111, S115 zu Alanin, welche im Wildtyp eine direkte Wasserstoffbrücke mit dem Chloridion ausbilden. S115A zeigte jedoch in Gegenwart von Chloridionen eine deutliche Rotverschiebung seines Absorptionsmaximums ($\lambda=586$ nm) im Vergleich zum Wildtyp ($\lambda=578$ nm), welche die Mutante T111A nicht zeigte. Während sämtliche Mutanten und der Wildtyp in Gegenwart von Sulfat-Ionen eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums aufwiesen, bedingten die neutralen Mutationen an S115A und T111V eine Blauverschiebung des Absorptionsmaximums.

Die Gegenwart gebundener Anionen führte in sämtlichen aktiven Mutanten zu einer pK_a -Wert Erhöhung, wie sie bereits für den Wildtyp bekannt ist.

Es wurden lediglich für die Mutanten S73A und S76A die Chloridbindungskonstanten bestimmt. Für S73A ergab sich eine K_M von 1.3 M und für S76A eine K_M von 0.6 M. Es zeigte sich für die beiden Mutanten, daß eine Mutation innerhalb der Chloridbindungsstelle I zu einer deutlichen Erhöhung der

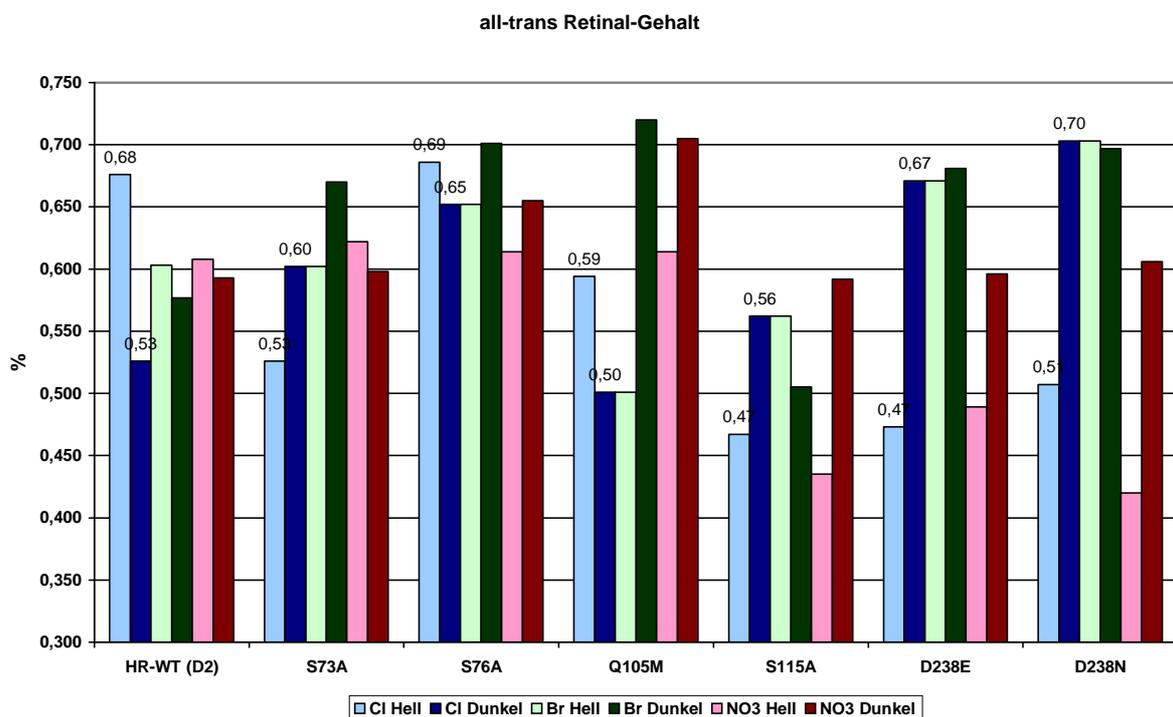
Bindungskonstante und somit zu einer Destabilisierung der Chloridbindungsstelle führte.

Aufgrund des hohen Streuanteils im UV/Vis-Bereich, sowie aufgrund der teilweise sehr geringen Ausbeute, war eine zuverlässige Bestimmung der Bindungskonstante der anderen Mutanten nicht möglich.

3.5.2 Retinal-Isomerenverhältnis in HR-Mutanten

Der Wildtyp von HR zeigt eine lichtabhängige Änderung des all-*trans* zu 13-*cis* Verhältnisses, erreicht aber im Gegensatz zu Bakteriorhodopsin im lichtadaptierten Zustand keine 100% all-*trans* Retinal (Lanyi *et al.*, 1986; Varo *et al.*, 1995).

Für die Bestimmung der Isomerenverhältnisse im lichtadaptierten, bzw. dunkeladaptierten Zustand in Gegenwart verschiedener Anionen wurden die Retinalisomere aus den Membranfraktionen unter Lichtausschluß organisch extrahiert. Für den lichtadaptierten Zustand wurden die Proben mit einem Diaprojektor 10 min belichtet. Die dunkeladaptierten Proben wurden 24 Stunden vor der Messung bei RT im Dunkeln inkubiert. Für die anschließende Berechnung der Retinal-Isomerenverhältnisse wurden die Integrale der Signale im Verhältnis ihrer molaren Extinktionskoeffizienten korrigiert (Plischka, 2000).



Bei der Dunkeladaptation nimmt der 13-*cis* Anteil in HR-Wildtyp, sowie in den Mutanten S76A und Q105M zu. Die Mutanten S73A, S115A, D238E, D238N zeigen für die Lichtadaptation ein genau entgegengesetztes Verhalten zum Wildtyp.

Zudem fällt auf, daß der Anteil an all-trans Retinal in den Mutanten S115A, D238E, D238N im Vergleich zum Wildtyp mit ca. 50% deutlich geringer ausfällt. S115A zeigt in den Transportmessungen eine deutlich verringerte Transportaktivität; die beiden D238-Mutanten weisen keine Transportaktivität mehr auf. Im Gegensatz zu bisherigen Messungen an Halorhodopsin-Mutanten (R108Q, Q105E, T111V, M. Rüdiger, 1996) weicht der all-trans Anteil des Retinals in lichtadaptierten Proben der Mutanten zum Teil deutlich ab. Ein möglicher Grund hierfür kann wieder eine geänderte Elektrostatik innerhalb der Chloridbindungsstelle I sein, welche wiederum das Isomerenverhältnis von Halorhodopsin beeinflusst.

3.5.3 Transportaktivitäten der HR-Mutanten

Die Transportaktivitäten von Halorhodopsin wurden an Suspensionen intakter Zellen durch Messung der pH-Änderung während der Belichtung bestimmt. Durch Belichtung werden aktiv Chloridionen in die Zelle transportiert. In Gegenwart des Protonophors Carbonylcyanid-meta-chlorphenylhydrazon (CCCP) strömen auf Grund der Ladungsdifferenz Protonen passiv in die Zelle ein. Dies führte zu einer Alkalinisierung der Zellsuspension, die mit einer pH-Elektrode gemessen werden kann. Zur Kontrolle wurde Triphenylphosphoniumbromid (TPP^+Br) im Überschuß zugegeben. Der TPP^+ -Einstrom überwiegt den Protoneneinstrom und es ist keine lichtinduzierte Alkalinisierung mehr detektierbar. Zur Quantifizierung der Menge an Chloridionen wird eine bekannte Menge an HCl der Suspension zugesetzt und die pH-Änderung gemessen (Oesterhelt, 1982).

Für die Bestimmung der spezifischen Transportaktivitäten der Mutanten wird die zelluläre Konzentrationen an Halorhodopsin benötigt. Aufgrund der geringen Expressionsrate einiger HR-Mutanten konnte die Halorhodopsin-Konzentration nicht durch Lyse der verwendeten Zellsuspensionen bestimmt werden. Statt dessen wurde aus größeren Ansätzen Protein isoliert und am Ende die Proteinmenge bestimmt.

Mutante (Ansatz)	spez. Akt. (Cl/HR*min)	spez. Akt. auf Wt-HR normalisiert
D2 (GME01/44)	470	100%
S73A/V261A (GME01/41)	367	78%
S76A (GME01/39)	377	80%
Q105M (GME01/42)	290	62%
S115A (GME01/49)	200	43%
D238E (GME01/37)	0	0%
D238N (GME01/71)	0	0%

Tabelle 3-7: Spezifische Transportaktivität der HR-Mutanten für Chlorid. In der ersten Spalte sind die Absolutwerte, in der zweiten Spalte sind prozentualen Abweichungen gegenüber dem Wildtyp angegeben.

Für die spezifische Transportaktivität von HR-Wildtyp wurde mit 470 Chloridionen pro Minute eine höhere Aktivität als in früheren Arbeiten ermittelt (414 Cl/min·HR, M. Rüdiger, 1996; 380 Cl/min·HR, Oesterhelt, 1982). Für die beiden Mutanten

S73A/V261A, S76A, wurden im Vergleich zum Wildtyp etwas geringere Transportaktivitäten ermittelt. Diese Werte waren jedoch in der gleichen Größenordnung wie die ermittelten Aktivitäten in früheren Arbeiten. Es muß hier darauf hingewiesen werden, daß für die Messung der Wildtypaktivität der Überproduzent D2 verwendet wurde. Die HR-Mutanten wurden im Gegensatz zum Wildtyp im Laborstamm TOM exprimiert. Dies mag eine mögliche Ursache der geringeren Transportaktivität gewesen sein. Eine deutlich geringere spezifische Transportaktivität wies die Mutante S115A auf. Im Vergleich zum Wildtyp wies sie lediglich eine 40%-ige spezifische Transportaktivität auf und im Vergleich zu den Mutanten S73A/V261A, S76A eine um 50% verringerte spezifische Transportaktivität. Die beiden Mutanten D238E, sowie D238N waren vollständig inaktiv. Bisher war nur bekannt, daß Mutationen an R108 zu einem völligen Verlust der Transportaktivität führten. Wie bereits beschrieben, enthält die Mutation D238E eine zusätzliche Methylen-Gruppe. Die Gesamtelektrostatik der umgebenden Reste innerhalb der Chloridbindungsstelle I ist nicht verändert. Die Mutation verringerte jedoch die Größe der Kavität, sowie die Wechselwirkung der einzelnen Reste innerhalb der Bindungsstelle I. Dies führte offensichtlich zu einer Inaktivierung der Funktion von Halorhodopsin. D238N veränderte die Gesamtelektrostatik, jedoch nicht die Größe der Chloridbindungsstelle. Dies führte ebenso zum Verlust der Pumpaktivität. Nachdem Mutationen der anderen beteiligten Reste der Chloridbindungsstelle, insbesondere auch S115A, nicht zum totalen Verlust der Pumpaktivität führten, scheint D238 eine entscheidende Rolle in der Funktion von Halorhodopsin zuzukommen. D238 ist in allen archealen Rhodopsinen konserviert. Im Kapitel über die Verfeinerung des L₁-Intermediats wurde schon über D238 diskutiert, dessen Carboxylat-Rest als möglicher Anionenpartner für die spektrale Farbverschiebung in Frage käme. Wie bereits beschrieben, ließ jedoch die Verfeinerung keine gesicherte Aussage über diese mögliche Wechselwirkung zu.

3.5.4 Photozyklusmessungen durch Blitzlichtphotolyse

Für die Messung zeitaufgelöster transienter Absorptionsänderungen während des Photozyklus wurden die Proben der untersuchten HR-Mutanten mit einem Laserblitz bei 532 nm angeregt. An der Blitzlichtphotolyse-Apparatur (Uhl *et al.*, 1985) wurden anschließend Serien blitzinduzierter Differenzspektren an Suspensionen membrangebundener HR-Mutanten in Basalsalz gemessen. Aus dem zeitlichen Verlauf ausgewählter Wellenlängen (580 nm: Grundzustand, 500 nm L-Intermediat, 660 nm : O-Intermediat) lassen sich grundsätzlich durch einen multiexponentiellen Fit die Zeitkonstanten für Bildung, wie auch Zerfall der Intermediate bestimmen. Die starke Streuung verschiedener HR-Mutanten erlaubte es jedoch teilweise nicht, die Daten quantitativ zu analysieren. Nach den ersten Messungen entstand an der Blitzlichtphotolyse-Apparatur ein irreparabler Defekt der Hardware, welcher keine weitergehende Analyse ermöglichte. Im weiteren werden somit nur die ersten Messungen der HR-Mutanten besprochen, für die keine Zeitkonstanten berechnet wurden.

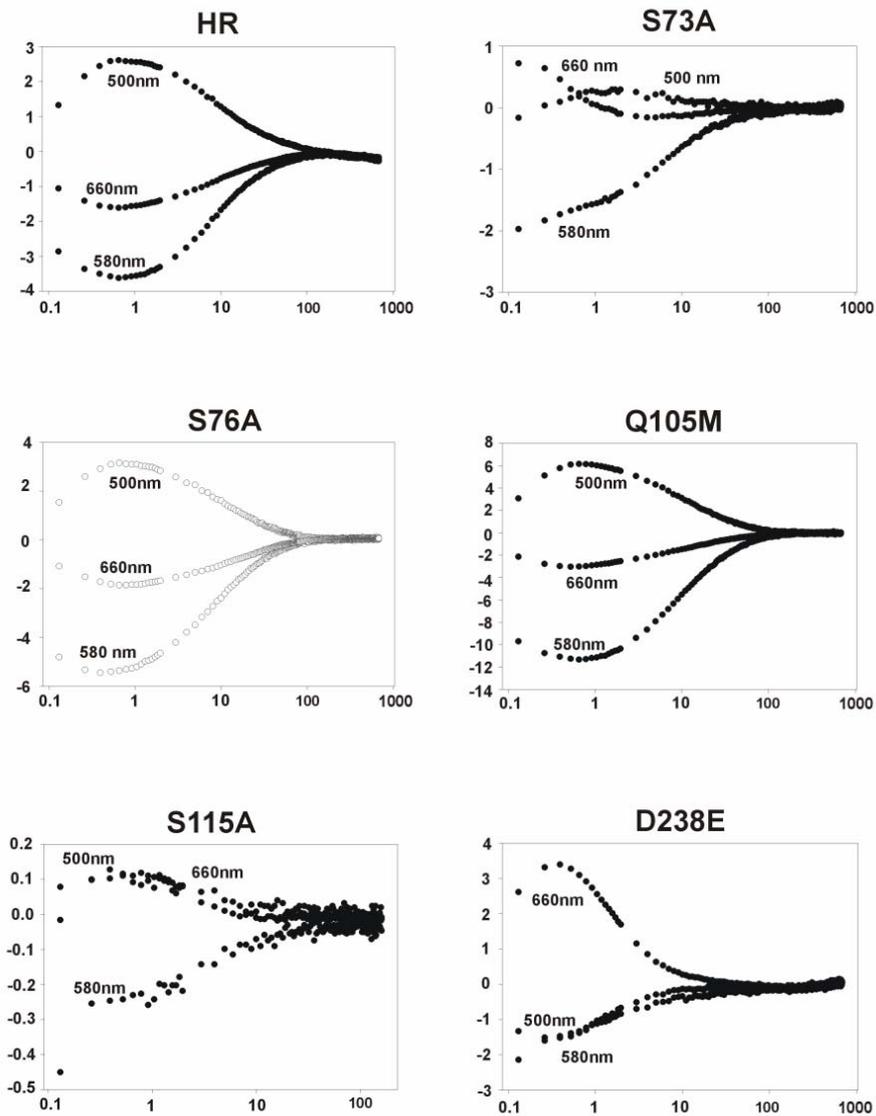


Abbildung 3-23: Blitzinduzierte Absorptionsänderungen bei 500nm, 560nm und 660nm verschiedener HR-Mutanten und des Wildtyps in 4.4M NaCl

Aus dem Absorptionsverläufen in Abbildung 3-23 war zu entnehmen, daß sowohl für den Wildtyp, wie auch die Mutanten Q105M und S76A lediglich das L-Intermediat als positiv transiente Amplitude erkennbar war. Für die Mutanten S73A, S115A waren, neben den positiv transienten Amplituden des L-Intermediats, die positiv transienten Amplituden des O-Intermediats zu erkennen. Die schnelle Bildung, wie auch der Zerfall eines 640-Intermediats in der Mutante D238E ist typisch für inaktive HR-Mutanten. Die Mutanten R103V, wie auch D238N konnten zu dem Zeitpunkt der Messungen noch nicht exprimiert werden. Durch den Defekt an der Blitzlichtphotolyse-Apparatur war es nicht möglich diese noch zu vermessen.

4. Diskussion

4.1 Verlauf der Kristallisation in der kubischen Lipidphase

Bei der Proteinkristallisation in der kubischen Lipidphase handelt es sich um eine neuere Methode zur Kristallisation von Membranproteinen, die erstmals für die Kristallisation von Bakteriorhodopsin erfolgreich angewendet wurde (Landau *et al.*, 1996). Mittlerweile konnte Sie erfolgreich auf weitere archeale Membranproteine, wie Halorhodopsin (Kolbe *et al.*, 2000) und Sensorhodopsin I (Gordeliy *et al.*, 2002) angewendet werden.

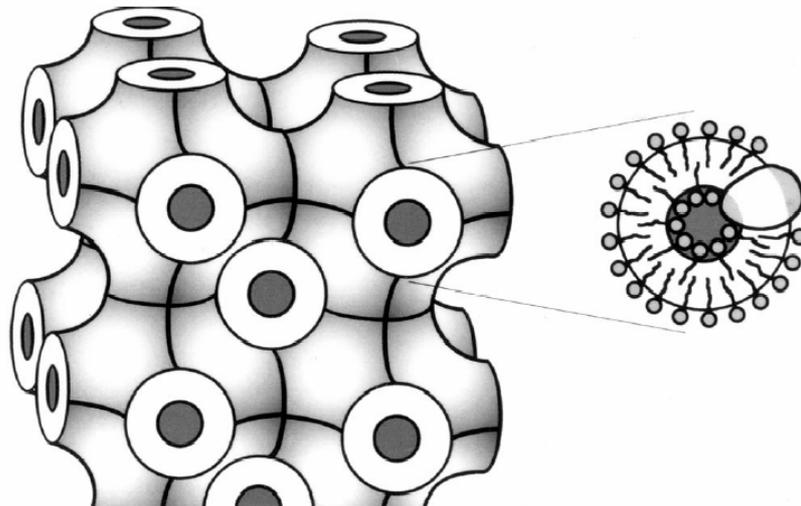


Abbildung 4-1: Schema der kubischen Lipidphase (Landau *et al.*, 1996). Die linke Hälfte der Abbildung zeigt die dreidimensionale minimale Lipidoberfläche und in dunkelgrau die Wasserkanäle. In der rechten Hälfte der Abbildung ist eine Vergrößerung der Lipiddoppelschicht zu sehen. In diese Lipiddoppelschicht ist ein Membranprotein eingelagert.

Zu Beginn des Kristallisationsexperiments bildet das Protein/Lipid-Gemisch eine kubische Lipidphase aus (Caffrey *et al.*, 2000). Diese besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Lipiddoppelschichten. Die kontinuierliche Verbindung der Lipiddoppelschichten erzeugt zwei voneinander getrennte Wasserkanäle. Durch Kleinwinkel-Röntgenbeugung wurde nachgewiesen, daß diese Phase eine kubische Symmetrie hat (Caffrey *et al.*, 2003).

Als Interpretationsgrundlage des Kristallisationsprozess kann das Phasendiagramm von Monoolein und Wasser verwendet werden (Abbildung 4-2), nachdem Caffrey

et al. durch Kleinwinkel-Röntgenbeugung zeigen konnten, daß dieses binäre Phasendiagramm gegenüber Protein und Detergenz in hohem Maße tolerant ist (Caffrey *et al.*, 2003).

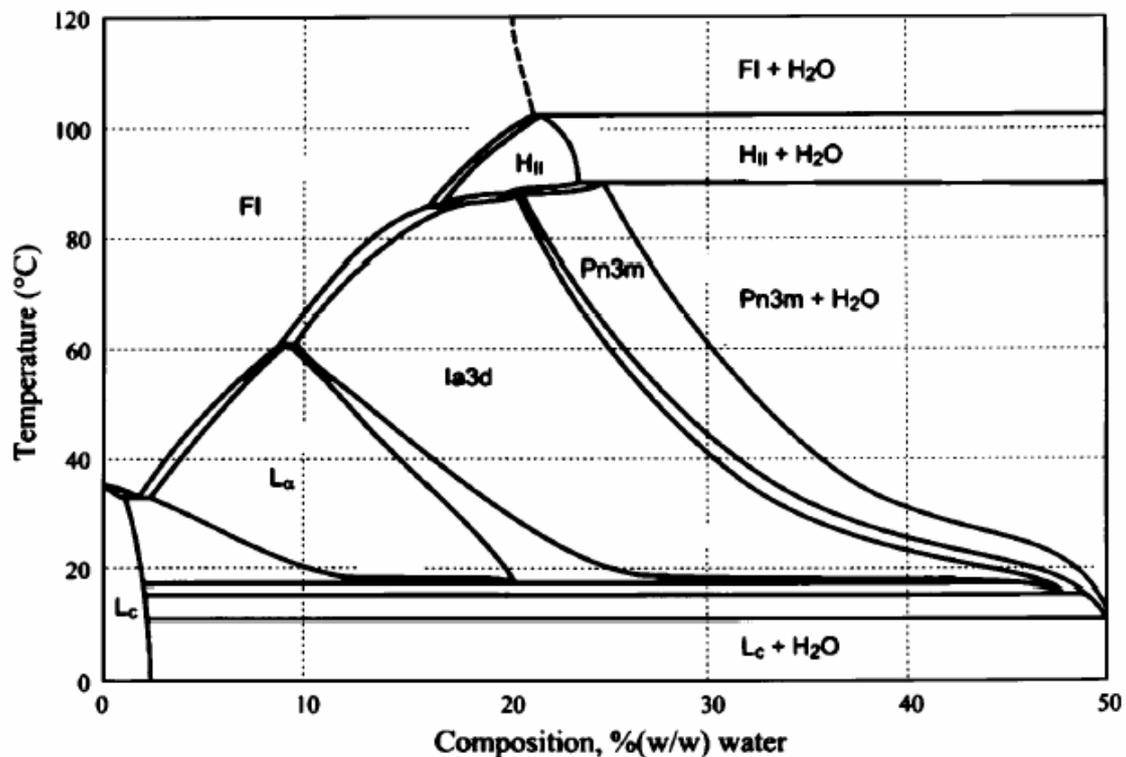


Abbildung 4-2: Phasendiagramm eines Monooleol-rac-glycerol/Wasser-Gemisches (Rummel *et al.*, 1997). Die unterschiedlichen Phasenbezeichnungen lauten: L_c: lamellar kristallin, L_α: lamellar flüssigkristallin, H_{II}: invertierte hexagonal, lα3d: G-Oberfläche, Pn3m: P-Oberfläche, FI: flüssig isotrope Oberfläche. lα3d, Pn3m beschreiben kubische Lipidphasen

Für die Kristallisation in der kubischen Lipidphase wird angenommen, daß das Membranprotein zunächst in die Lipiddoppelschicht der kubischen Phase incorporiert (Caffrey *et al.*, 2000; Nollert *et al.*, 2001). Um den Kristallisationsprozess zu initiieren wird in der Originalvorschrift für Bakteriorhodopsin ein Phosphatsalz zugegeben und durch die kubische Phase zentrifugiert. Man nimmt an, daß die extreme, lokal induzierte Dehydratisierung durch das Phosphatsalz die treibende Kraft der Nukleation und des Kristallwachstums darstellt (Caffrey *et al.*, 2000). Nollert *et al.* (2002) zeigten zusätzlich, daß die Salzzugabe zu einer stärkeren Krümmung der dreidimensionalen Lipiddoppelschicht führt und dies zu einer kleineren Gitterkonstante der kubischen Lipidphase führt.

Die nächsten Schritte des Kristallisationsprozess sind nicht bekannt. Jedoch führt die Salzsättigung der wäßrigen Phase zunächst zu einer Erhöhung der Ionenstärke.

Man nimmt an, daß dies zu einer Abschirmung von Oberflächenladungen des Membranproteins führt und dies Protein-Protein-Wechselwirkungen, die Nukleation und das Kristallwachstum fördert (Caffrey *et al.*, 2003).

Die partielle Dehydratisierung der kubischen Phase erzeugt in der Umgebung der Salzkristalle lamellare Bereiche mit kristallinen Proteinaggregaten, die übereinander gestapelt zu einem dreidimensionalen Proteinkristall wachsen (Abbildung 4-3). Nach der Klassifikation von Michel entspricht dies einer Typ I Kristallisation für Membranproteine (Michel, 1991).

Die Cokristallisation von SR I mit HTR I wurde ebenfalls durch Zugabe von Phosphatsalz als Präzipitans initiiert und es kann somit angenommen werden, daß die Kristallisation nach dem oben beschriebenen Schema verlief (Gordeliy *et al.*, 2002).

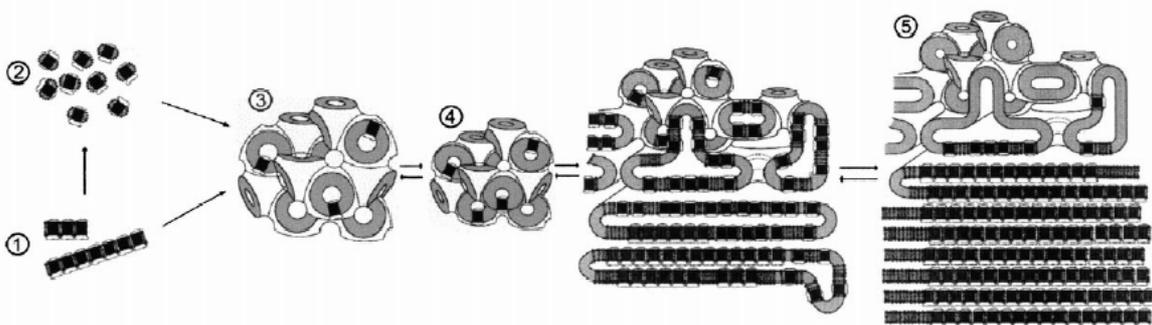


Abbildung 4-3: Schematische Darstellung des Wachstums dreidimensionaler Kristalle in der kubischen Lipidphase (Nollert *et al.*, 2001). Im ersten Schritt migrieren solubilisiertes Protein, bzw. BR-PM in die kubische Lipidphase (1-3). Die Zugabe an Sørensen-Salz führt zu einer stärkeren Krümmung der Membranoberfläche und zu einer Verkleinerung der Einheitszelle (4). Dies führt zur Ausbildung lamellarer Bereiche mit kristallinen Proteinaggregaten. Mit zunehmendem Wachstum der lamellaren Schichten bilden sich dreidimensionale Kristalle (5).

Im Gegensatz hierzu erfolgte die Kristallisation von Halorhodopsin nicht durch Zugabe von festem Salz. Statt dessen war die wäßrige Phase mit 3.3M KCl bereits zu Beginn der Kristallisationsansätze nahezu abgesättigt. Nimmt man den gemeinsamen Mechanismus der Kristallisation der kubischen Phase als Grundlage, so gibt es für die Kristallisation von Halorhodopsin zwei Möglichkeiten:

1. Es entstand bereits bei der Bildung der kubischen Phase der Proteinlösung mit dem Lipid ein metastabiles Gleichgewicht der kubischen Phase, das mit der Zeit in eine thermodynamisch günstigere lamellare Form überging, ohne seine Mischungsverhältnis zu ändern.

2. Analog zur Kristallisation von Bakteriorhodopsin wurde dem Ansatz Wasser entzogen bzw. entwich Wasser aus den Ansätzen. Dies führte zu einem Phasenübergang des Gemisches von Proteinlösung/Lipid.

Die Kristallisation von Proteinen kann durch verschiedene Parameter, wie Temperatur, Additive, Präzipitantien, beeinflusst werden.

Durch die Präparation, wie auch die Lagerung der Ansätze bei 22° C, wurde die Temperatur als Parameter nicht weiter berücksichtigt. Im Screening nach den optimalen Kristallisationsbedingungen wurde die Konzentration des Detergenz OG (10-20 %) variiert (siehe Kapitel 3.2). Es konnte gezeigt werden, daß bei der höchsten Konzentration an zugewasstem OG-Puffer (20%) die Kristallisation am schnellsten erfolgte. Die erhaltenen Kristalle zeigten jedoch keine hohe kristallographische Auflösung. Mit abnehmender OG-Konzentration nahm auch die Geschwindigkeit der Kristallisation ab. Dies deutet darauf hin, daß die Detergenzkonzentration entscheidend zur Destabilisierung der kubischen Phase beiträgt.

Wie bereits erwähnt, erfolgte die Kristallisation von Halorhodopsin ohne Zugabe von Salz als Präzipitans. Sollte den Kristallisationsansätzen Wasser entzogen worden sein, so mußte dies auf eine andere Weise geschehen sein. In Kapitel 3.2 wurde bereits beschrieben, daß das zunächst verwendete Protokoll für die Kristallisation von Halorhodopsin (Kolbe Dissertation, 2001) Glasröhrchen verwendete und die Zeit der Kristallisation 9-15 Monate betrug. Wie bereits beschrieben (Kapitel 3.2), konnte in dieser Arbeit die Kristallisationsgeschwindigkeit unter Verwendung von PCR-Reaktionsgefäßen um einen Faktor drei bis fünf beschleunigt werden. Um dieses Phänomen zu erklären, wurde die Luftdurchlässigkeit der verschiedenen Gefäße untersucht. Es zeigte sich, daß die PCR-Reaktionsgefäße für Luftfeuchtigkeit deutlich durchlässiger waren und somit eine Änderung des Phasengemisches aus Proteinlösung und Lipid durch Verdunstung erleichtert wurde.

Diese Indizien legen den Schluß nahe, daß für die Kristallisation von Halorhodopsin, wie für Bakteriorhodopsin, ein Zusammenbruch der kubischen Phase durch Änderung des Verhältnisses von Puffer zu Lipid notwendig ist. Zugleich zeigte aber auch die Abhängigkeit der Kristallisation von der

Detergenzkonzentration, daß die Zugabe von OG als Additiv zusätzliche Effekte auf die Kristallisationsgeschwindigkeit ausübt. Zusätzlich zeigte sich, daß zwar die Detergenzkonzentration einen Einfluß auf die Geschwindigkeit ausübt, jedoch eine größere Rolle als Additiv für die Qualität der Kristalle spielt (Kapitel 3.2).

Die systematische Untersuchung des Kristallisationsverhalten von Halorhodopsin zeigt, daß sich das generelle Prinzip der Kristallisation von Membranproteinen in der kubischen Phase auch in diesem Fall anwenden läßt: Das Membranprotein rekonstituiert zunächst in die Lipiddoppelschicht der kubischen Phase. Der Wasserentzug durch Zugabe von Phosphatsalz, bzw. durch Verdampfung führt zu einem Zusammenbruch der kubischen Lipidphase. Die hohe Ionenstärke der wäßrigen Phase führt zu einer Abschirmung der Oberflächenladungen. Dies führt zu Protein-Protein-Wechselwirkungen, die zunächst zur Bildung von zweidimensionalen Kristallen in einer lamellaren Schicht führen. Die Stapelung mehrerer lamellarer Schichten führt dann zum Wachstum eines dreidimensionalen Kristalls.

4.2 Verfeinerung des L₁-Intermediats in T203V

4.2.1 Betrachtungen zur Verfeinerung und Strukturaufklärung von Intermediat-Zuständen in Bakteriorhodopsin

Nachdem die erste hochaufgelöste Röntgenstruktur von Bakteriorhodopsin 1997 gelöst wurde (Pebay-Peyroula *et al.*, 1997), konnte die strukturelle Analyse der Photozyklusintermediate begonnen werden.

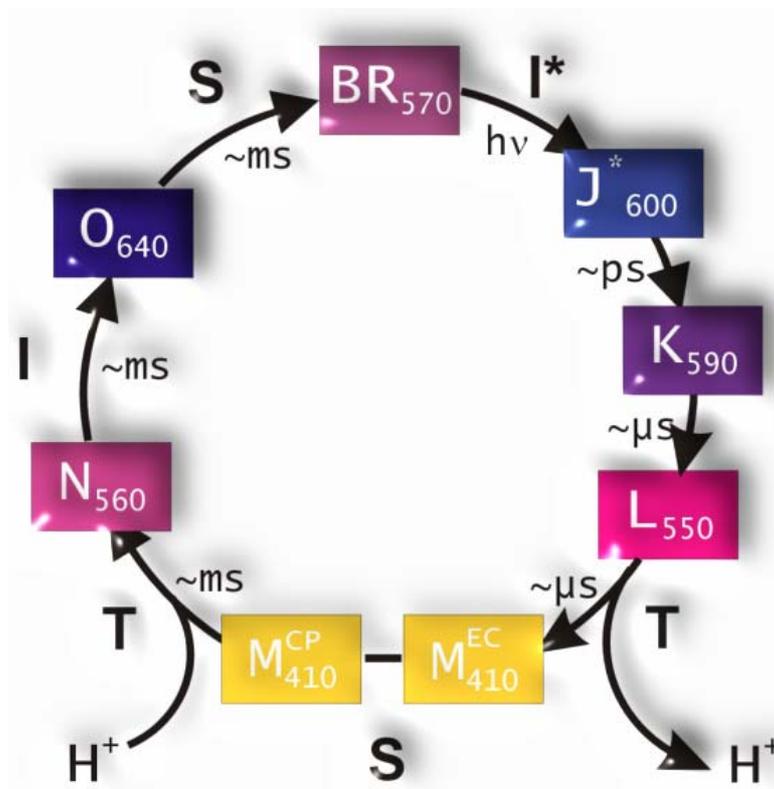


Abbildung 4-4: Photozyklus von Bakteriorhodopsin. Im Schema sind die verschiedenen Photozyklus-Intermediate und die Größenordnung der Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung der Intermediate angegeben. Zusätzlich sind die verschiedenen Katalyseschritte im IST-Modell wiedergegeben (I: Isomerisierung, S: Schalter, T: Transfer)

Will man derartige Photozyklusintermediate strukturell charakterisieren, muß der interessierende Schritt im Photozyklus verlangsamt sein. Dies kann zum Einen durch unterschiedliche Belichtungsprotokolle von Wildtypkristallen erreicht werden. Basierend auf Wildtypkristallen wurden die Strukturen des K- und des M-Intermediats bestimmt (Schobert *et al.*, 2002; Sass *et al.*, 2000; Facciotti *et al.*, 2001; Lanyi *et al.*, 2002). Allerdings konnte kein Intermediat zu 100% angereichert

werden. Dies gelang nur mit Kristallen von Bakteriorhodopsin-Mutanten (Luecke *et al.*, 1999; Luecke *et al.*, 2000; Rouhani *et al.*, 2001). In diesen Mutanten ist ein bestimmter Schritt des Zyklus sehr stark verlangsamt. Eine generelle Annahme bei der Betrachtung von Intermediatzuständen im Kristall ist, daß die Photozyklusintermediate der Mutanten auch in gleicher Sequenz und Art wie im Wildtypprotein durchlaufen werden und nur die kinetischen Konstanten unterschiedlich sind.

Die BR-Mutanten, in denen ein Photozyklusintermediats fast vollständig angereichert werden konnte, vereinfachten die Komplexität der Strukturmodellierung und lieferten somit neben dem Grundzustand die verlässlichsten Strukturösungen eines erhaltenen Intermediats. Zum ersten Mal gelang dies mit der erfolgreichen Kristallisation der Mutante D96N (Luecke *et al.*, 1999), die ein M-Intermediat angereichert. Dieses M-Intermediat diskutieren die Autoren als sogenanntes spätes M_N -Intermediat, dessen Existenz nur in der Mutante D96N aber nicht im Wildtyp nachgewiesen wurde. Im FTIR-Spektrum zeigt die Mutante eine veränderte Amid I-Bande, die für ein N-Intermediat charakteristisch ist. Die Schiff'sche Base liegt jedoch noch in ihrer deprotonierten Form vor.

Die gleiche Arbeitsgruppe konnte ein weiteres, sogenanntes „früheres“ M-Intermediat, als das schon charakterisierte M-Intermediat, in der Mutante E204Q bestimmen (Luecke, 2000). Die 100%ige Anreicherung des Intermediats wurde durch spektroskopische Daten belegt. Interessanterweise ist in Membransuspensionen der Mutante E204Q der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Zerfall des O-Intermediats. Belichtet man die Membransuspension mit gelben Licht, so reichert sich im photostationären Zustand primär das O-Intermediat an (Brown *et al.*, 1995). In den Kristallen der Mutante E204Q wurde jedoch ein M-Intermediat erhalten. Die Autoren geben an, daß bei Kinetikmessungen des Photozyklus in den Kristallen ein langlebiges M-Intermediat angereichert gefunden wurde.

Dieser Arbeitsgruppe gelang durch Kristallisation der Mutante D85S, ein sogenanntes O-„ähnliches“ Intermediat strukturell zu charakterisieren (Rouhani *et al.*, 2001). Die Grundlage für diese Annahme bildeten Eigenschaften des O-Intermediats in Bakteriorhodopsin, die der Grundzustand von D85S ebenso aufweist. So ist das Absorptionsmaximum von D85S im Vergleich zum Wildtyp

blauverschoben. Des Weiteren liegt die Schiff'sche Base, wie auch in D96N protoniert vor und aus Resonanz-Raman-Spektren wurde für das O-Intermediat im Wildtyp eine *all-trans* Konfiguration ermittelt, die im Grundzustand von D85S ebenso vorhanden ist.

Faßt man die Intermediatstrukturen der Mutanten zusammen, so zeigt sich im Falle der Mutante D96N, daß das M_N -Intermediat nicht im Wildtyp existiert. Ebenso überraschend war, daß man in den Kristallen der Mutante E204Q nicht die Struktur des O-Intermediats, sondern ein frühes M-Intermediat erhielt. In diesem Zusammenhang sollte man als kritischer Betrachter bedenken, daß diese Strukturen also nicht Intermediatstrukturen des Wildtyps wiedergeben, sondern nur eine strukturelle Diskussionsgrundlage zu Vorgängen während des Photozyklus liefern.

Um diese Problematik zu umgehen, kann man versuchen durch unterschiedliche Belichtungsprotokolle ein bestimmtes Photozyklusintermediat im Wildtyp anzureichern. Für das M-Intermediat des Wildtyps wurden nach speziellen Belichtungsprotokollen ca. 60% M-Intermediat neben 40% Grundzustand erhalten (Sass *et al.*, 2000; Facciotti *et al.*, 2001; Lanyi *et al.*, 2002). Sass *et al.* belichteten Kristalle 1sec mit einem 512nm Laser bei Raumtemperatur und froren den Kristall anschließend im Stickstoffstrom bei 100K zurück. Facciotti, wie auch Lanyi belichteten die Kristalle 3min bei 210K und kühlten die Kristalle anschließend auf 100K zurück. Sowohl Sass, wie auch Facciotti verzichteten aufgrund der Auflösung der Intermediate auf eine Herabsetzung der Energieparameter für 13-cis Retinal. Dementsprechend erlauben die beiden Intermediatstrukturen keine Aussage über die Orientierung der Schiff'schen Base.

Aufgrund sehr hochaufgelöster Daten (bis 1.43Å) hoben Lanyi *et al.* die geometrischen Beschränkungen für 13-cis Retinal und die Schiff'sche Base auf (Lanyi *et al.*, 2002).

Table 2. Retinal bond and torsion angles in non-illuminated bacteriorhodopsin (BR),^{20,21} the K intermediate,²¹ the M₁ intermediate (this study), and other, earlier reported M states^{24,25}

Coordinate set ^a	C ₁₂ -C ₁₃ =C ₁₄ bond angle (deg.)	C ₁₃ =C ₁₄ torsion (deg.)	C ₁₄ -C ₁₅ torsion (deg.)	C ₁₅ =NZ torsion (deg.)
BR (1C3W)	113	-157	179	-163
BR (1M0L)	112	-154	177	-172
K (1M0K)	145 ± 12	-2 ± 39	138 ± 35	101 ± 31
M ₁ (crystal 1)	125	5	144	96
M ₁ (crystal 2)	133	-22	110	146
M ₁ (crystal 3)	122	30	60	142
M ₁ (average) ^b	126 ± 7	4 ± 26	110 ± 42	124 ± 28
M ₂ (1F4Z)	125	13	-173	-161
M ₂ ' (1C8S)	114	-2	-166	-169

Positive torsion angles refer to clockwise rotation from 0° when viewed from the β-ionone ring of the retinal, negative torsion angles refer to counter-clockwise rotation. Thus, 180° and -180° coincide.

^a The data for crystal 1 are in Table 1. The crystallographic resolutions for crystals 2 and 3 were 1.54 Å and 1.60 Å, respectively.

^b Averages weighted according to the number of unique structure factors in the data sets.

Tabelle 4-1: C₁₂C₁₃C₁₄ Winkel und ausgewählte Torsionswinkel des BR Grundzustands, des K-Intermediats und des M₁-Intermediats sowie von späteren M-Intermediaten (Lanyi *et al.*, 2002).

Wie man aus Tabelle 4-1 erkennt, weichen die Torsionswinkel teilweise um über 80° (Torsionswinkel C₁₄-C₁₅) voneinander ab. Daraus ergibt sich, daß selbst bei einer sehr hohen Auflösung von 1.4-1.6Å eine Aufhebung der geometrischen und energetischen Beschränkungen für die Verfeinerung des Retinals und der Schiff'schen Base nicht zulässig ist. Insbesondere sind die daraus gefolgerten energetischen und mechanistischen Betrachtungen für den Katalyse-Zyklus in Bakteriorhodopsin fragwürdig.

Zeitgleich veröffentlichten die Autoren die Struktur des K-Intermediats, das nach Berechnungen zu 40% angereichert wurde. In dieser Arbeit wurden die Beschränkungen für das gebundene Retinal ebenso aufgehoben und es zeigten sich hier ebenso die hohen Abweichungen zwischen den vermessenen Kristallen.

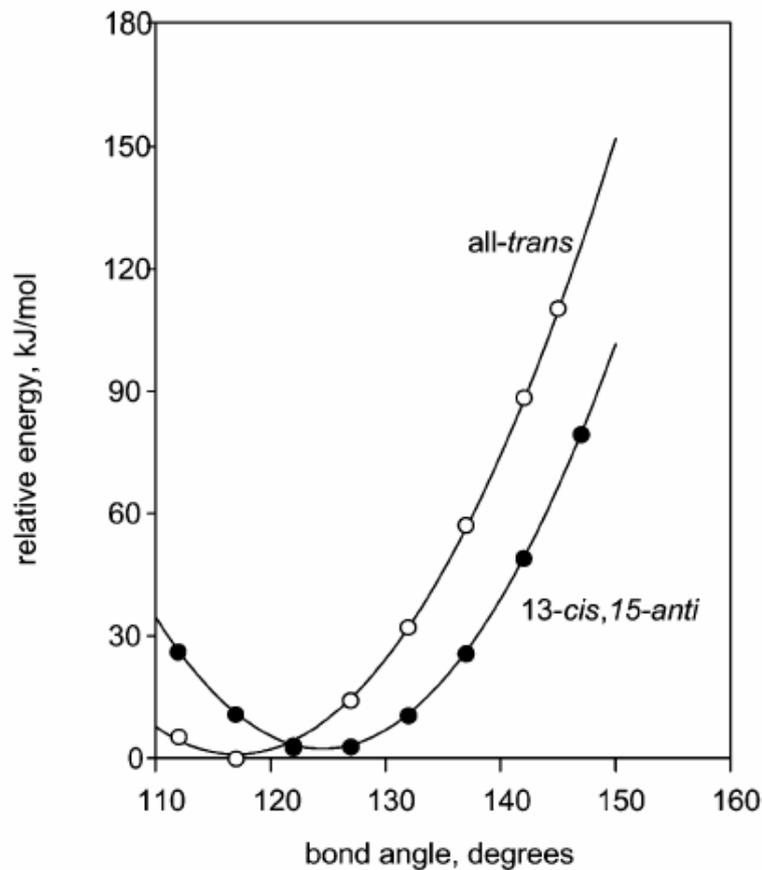


Abbildung 4-5: Energiegewinn aufgrund einer Änderung des C_{13} Bindungswinkels für 13-cis, 15-anti Retinal. Die Berechnungen erfolgten nach *ab initio* Rechnungen mit dem Programm Gaussian 98 (Schobert *et al.*, 2002).

In Abbildung 4-5 ist entsprechend *ab initio* Berechnungen die Energie gegen die C_{13} -Bindungswinkel ($C_{12}-C_{13}=C_{14}$) für all-trans Retinal, wie auch 13-cis Retinal angegeben. Aus dem Energiediagramm ergibt sich für eine Enthalpiedifferenz von 49 kJ/mol ein Winkel von 142° , das der gemessenen Enthalpiedifferenz des K-Intermediats entspräche. Dieser Winkel liegt somit in guter Übereinstimmung mit dem mittleren gemessenen Wert von 145° (Tabelle 4-1). Betrachtet man jedoch die einzelnen Winkel der vermessenen Kristalle, so würde man eine Enthalpiedifferenz zwischen 3 und ca. 160 kJ/mol erhalten. Diese Einzelergebnisse zeigen eine starke Abweichung von der mittleren gemessenen Enthalpiedifferenz und somit erscheint ein Vergleich des mittleren gemessenen Winkels mit den theoretischen Berechnungen in diesem Versuch nicht statthaf.

Royant *et al.* (Royant *et al.*, 2000) veröffentlichten die Struktur des L-Intermediats in Bakteriorhodopsin. Das Differenzspektrum der kristallographisch untersuchten

Kristalle zeigte jedoch als Hauptanteil ein deutlich blauverschobenes M-Intermediat (Abb. 4-6).

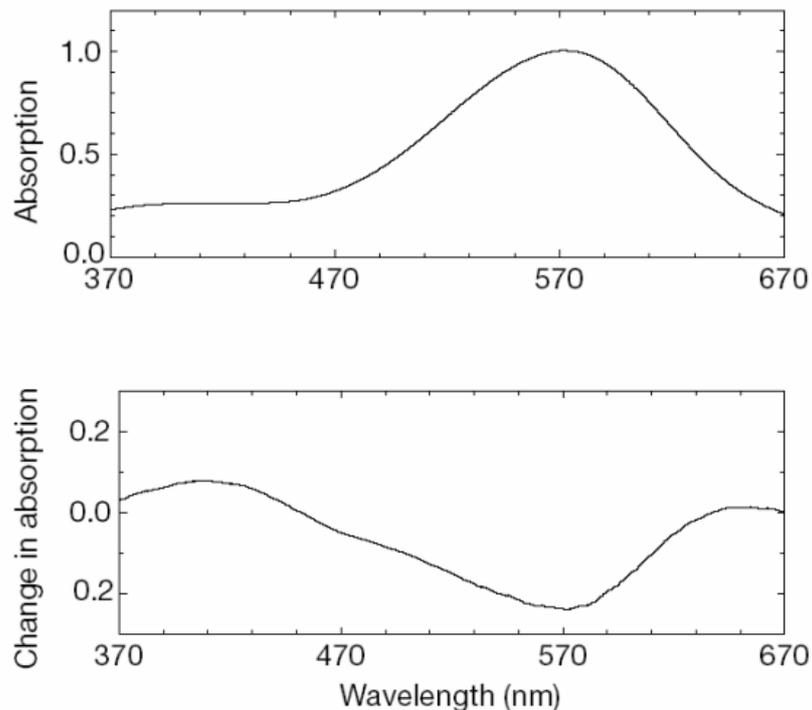


Abbildung 4-6: Differenzspektrum vor und nach Belichtung. Das Differenzspektrum nach Belichtung mit einem 532nm Laser zeigt deutlich die Anreicherung des M-Intermediats (Royant *et al.*, 2000).

In weiteren Veröffentlichungen wurden anschließend die verschiedenen Intermediate für das Belichtungsprotokoll berechnet. Für das M-Intermediat wurde ein Anteil von 12% berechnet, sowie für das L-Intermediat ein Anteil von 30% berechnet (Royant *et al.*, 2001). Die Autoren beschrieben für das L-Intermediat bereits eine deutliche Änderung von R82. Die Guanidiniumgruppe von R82 klappt in Richtung der Abgabegruppen E204 und E194. Die Orientierung von R82 ist in späteren Intermediaten ebenfalls deutlich sichtbar.

Ein geringer Anteil von 30% eines Intermediats erschwert die Interpretation der Daten erheblich. Im Gegensatz zur Verfeinerung des L₁-Intermediats von Halorhodopsin erlaubte das Belichtungsprotokoll in Bakteriorhodopsin die Messung des Grundzustands, wie auch des Intermediats an einem Kristall. Dies erlaubte somit die Betrachtung von Differenzelektronendichte-Karten zur Analyse der Strukturänderungen. Die Autoren merkten an, daß sie aufgrund der Auflösung von 2.1Å die Energieparameter für die Verfeinerung des 13-cis Retinals im L-

Intermediat nicht herabsetzen und somit über die Orientierung der Schiff'schen Base keine weitere Aussage treffen konnten.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Interpretation gemessener Strukturdaten ist die Berücksichtigung von Strahlenschäden im Kristall, die durch den hohen Energiefluß der Röntgenstrahlen am Synchrotron verursacht werden können. Matsui *et al.* konnten zeigen, daß bei der Messung des K-Intermediats von Bakteriorhodopsin unter den gewählten Bedingungen in ihrem Versuchsaufbau Strahlenschäden entstanden (Matsui *et al.*, 2002). Im Allgemeinen sind Brüche von Disulfid-Bindungen, Decarboxylierungen der Aspartat- und Glutamatreste und der Verlust der Hydroxylgruppen von Tyrosinen bekannt (Burmeister *et al.*, 2000; Ravelli *et al.*, 2000; Weik *et al.*, 2000).

In diesem Kapitel wurde ein Überblick über die Strukturmodellierung und Verfeinerung aller Photozyklus-Intermediate in Bakteriorhodopsin wiedergegeben. Die strukturellen Lösungen der verschiedenen Intermediate geben einen zuverlässigen Überblick größerer Änderungen des Proteins wieder. Trotzdem ist die Auflösung der Intermediate zu gering um zuverlässige Aussagen über kleinere Bewegungen innerhalb des Katalysezentrums wiederzugeben. Die Erzeugung „harter“ Strukturdaten verleitet jedoch leicht zu einer Überinterpretation der gemessenen Struktur. Insbesondere zeigen die Daten des K-Intermediats (Schobert *et al.*, 2002), wie auch des „frühen“ M-Intermediats im Wildtyp von Bakteriorhodopsin (Lanyi *et al.*, 2002), daß die starke Überlappung des all-trans Retinal des Grundzustands und der 13-cis Konfiguration im Intermediat keine zuverlässige Verfeinerung dieser beiden Konformationen bei der Lösung des Intermediat-Datensatzes lieferte und somit keine Aussage über die Orientierung der Schiff'schen Base getroffen werden kann.

4.2.2 Erzeugung und Verfeinerung des L₁-Intermediats von T203V

Wie bereits im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben, wurde das L₁-Intermediat der Mutante T203V gemessen. Diese Mutation befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite von Halorhodopsin, oberhalb des Retinals. Im Wildtyp koordiniert die Hydroxylgruppe von T203 mit einem Wassermolekül. Die Mutation von Threonin zu Valin führt, im Vergleich zum Wildtyp, zu einer Verlangsamung des L-Zerfalls um den Faktor 10. Dies erlaubte nach dem verwendeten Belichtungsprotokoll eine 60%-ige Anreicherung des L₁-Intermediats. Für die Anreicherung des L₁-Intermediats wurden die gefrorenen T203V-Kristalle durch Blockierung des Kryostroms aufgetaut und bei RT mit einem 633nm Laser 10sec belichtet. Anschließend wurde der Kristall im Kryostrom auf 100K zurückgefroren. Durch UV/Vis Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß an einem Kristall reversibel durch Auftauen, Belichten und Zurückfrieren das L₁-Intermediat erzeugt werden konnte und durch erneutes Auftauen und Zurückfrieren der Grundzustand wieder erhalten werden konnte. Führt man diese Reihenfolge jedoch ebenso am Synchrotron durch und sammelte zunächst die Strukturdaten des L₁-Intermediats, so ging nach dem Auftauen und Zurückfrieren für den Grundzustands das Diffraktionsvermögen des Kristalls verloren. Es darf angenommen werden, daß während der Messung durch Röntgenlicht kontinuierlich Radikale im Protein erzeugt wurden. Das anschließende Auftauen setzte die Radikale frei und zerstörte die Ordnung des Kristalls.

Für die Verfeinerung des L₁-Intermediats wurde ein Anteil von 60% Intermediatzustand angenommen. Für die Bestimmung des Intermediat-Anteils wurden die spektroskopische Daten herangezogen. Obwohl ein hochaufgelöster Datensatz mit 1.9 Å für das Intermediat erhalten wurde, konnten das Retinal und die Schiff'sche Base nicht ohne energetische Beschränkungen verfeinert werden. Im Ergebnisteil der Arbeit (Kapitel 3.4.3) wurde bereits ausführlich beschrieben, daß die Farbverschiebung mit einer Annäherung des Chloridions Cl501 erklärt wird. Dies jedoch im Widerspruch zur verfeinerten Struktur des L₁-Intermediats steht.

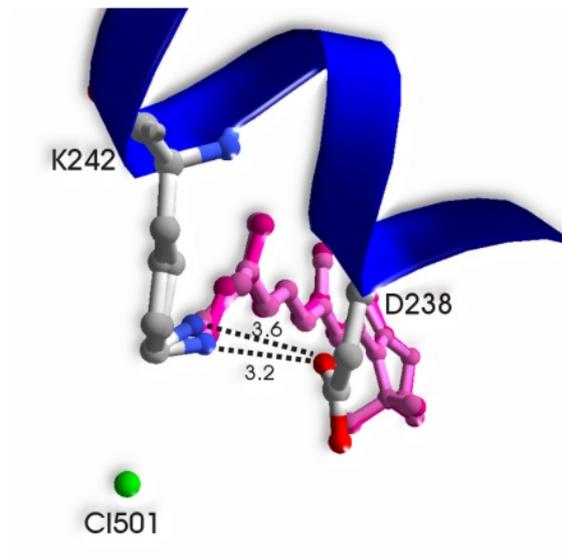


Abbildung 4-7 (=Abbildung 3-20): Verfeinerung des L_1 -Intermediats mit freigegebenen Energieparametern für die Torsionswinkel C_{14} - C_{15} und C_{15} - NH^+ (13-cis Retinal in pink) und im Vergleich dazu mit vollen Energieparametern (13-cis Retinal in rose) für die Torsionswinkel.

Wurden die Energieparameter herabgesetzt, so konnte gezeigt werden, daß die Schiff'sche Base nicht vollständig isomerisiert, sondern einen Torsionswinkel von 120° für die C_{15} - NH Bindung liefert. Die Schiff'sche Base nähert sich mit 3.2\AA im L_1 -Intermediat im Vergleich zu 3.6\AA im Grundzustand dem Rest D238 (Abbildung 4-7). Diese Annäherung könnte die spektrale Farbverschiebung erklären. Die Betrachtung der Differenzdichten aus Intermediatzustand und Grundzustand, die jeweils an zwei unterschiedlichen Kristallen gemessen wurden, zeigen eine negative Differenzdichte in der Umgebung der Schiff'schen Base. Eine signifikante positive Differenzdichte konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abbildung 4-8). Die vorangegangene Diskussion (siehe Kapitel 4.2.1) veranlaßte insgesamt zu einer vorsichtigen Interpretation des L_1 -Intermediats in der Mutante T203V. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, kann daher über die Orientierung der Schiff'schen Base keine Aussage getroffen werden.

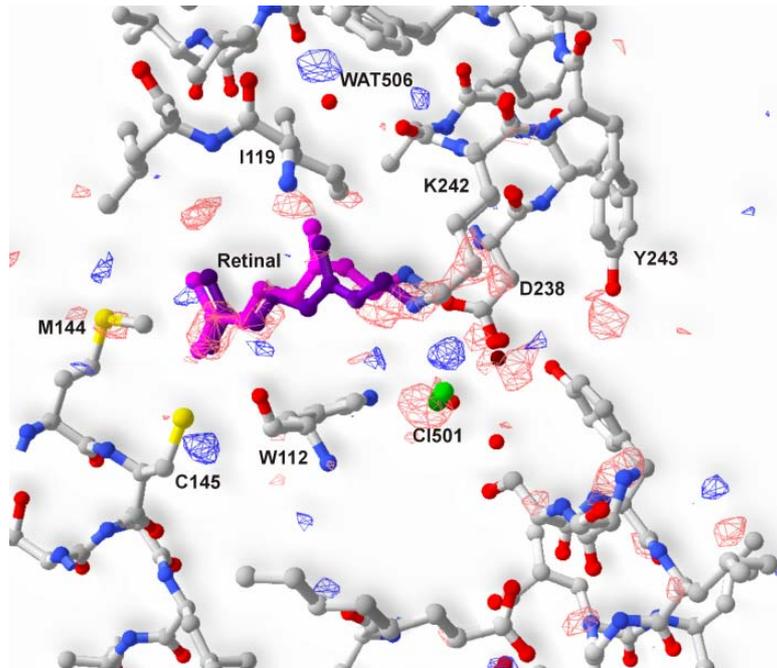


Abbildung 4-8: Differenz-Fourier-Dichtekarten $F_{\text{exc}} - F_{\text{grund}}$ des L_1 -Intermediats, abgezogen vom Grundzustand. In rot sind die negativen Differenzdichten (3.0σ), in blau sind die positiven Differenzdichten (2.8σ) dargestellt. Eine negative Differenzdichte ist in der Umgebung der PSB zu sehen. In der Nähe des Chlorid-Ions ist eine deutliche negative, wie auch positive Differenzdichte sichtbar. Kleinere Änderungen sind oberhalb der 3_{10} -Helix bei den Resten S115, T116, I119 zu sehen.

Nachdem die Verfeinerung der prozessierten Daten zunächst mit CNS erfolgte, die Verfeinerung aber keine befriedigende Antwort für die Orientierung der Schiff'schen Base lieferte, wurde das Verfeinerungsprogramm SHELX verwendet. Der Grund hierfür war, daß SHELX im Gegensatz zu CNS kein simuliertes Aufheizen und Abkühlen durchführt, sondern nach einem geometrischen Minimum für die Lage der Atome in der Elektronendichte sucht. Diese Verfeinerungsmethode ist jedoch nur bei hoch aufgelösten Strukturdaten möglich ($< 2.0 \text{ \AA}$). Die Vorteile von SHELX liegen insbesondere im Auflösungsbereich von 1.0 \AA . Dies ist auf den Ursprung dieses Programms zurückzuführen, da es zur Strukturaufklärung anorganischer Kleinmoleküle entwickelt wurde. Nachdem in der Proteinkristallisation die Auflösung zumeist geringer ist, müssen geometrische Beschränkungen für Liganden eingefügt werden. Diese geometrischen Beschränkungen sind jedoch nichts anderes als energetische Beschränkungen, die aufgrund der mangelnden Auflösung ($1.5\text{-}2.5 \text{ \AA}$) eingefügt werden. Nimmt man beispielsweise keine geometrischen Beschränkungen zur Beschreibung des

Retinals an, so liefert auch SHELX keine bessere Lösung zur Beschreibung des 13-cis Retinals (Abbildung 4-9).

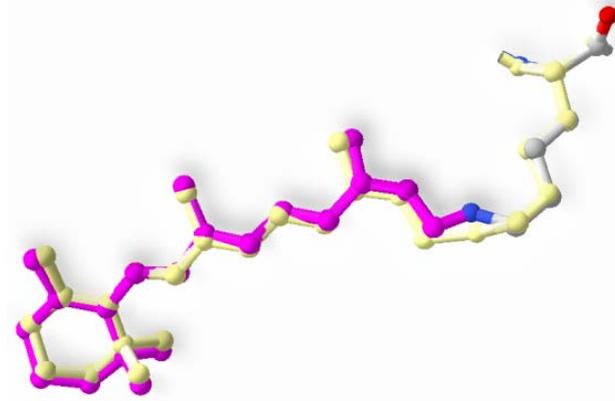


Abbildung 4-9 (=Abbildung 3-21): Vergleich der Verfeinerung von Retinal und PSB mit den Programmen CNS und SHELX. In pink ist die verfeinerte Struktur des Retinals mit CNS V.1,1 dargestellt. In gelb ist die entsprechende Verfeinerung mit SHELX dargestellt. Die unterschiedliche Orientierung der PSB ist deutlich zu sehen. In SHELX liefert die Beschreibung des C_{15} -NH⁺ Torsionswinkels einen Wert von 90°.

Insgesamt ließ sich also in Bezug auf die Verfeinerung festhalten, daß die verwendeten Programme unterschiedliche Ansätze für die Verfeinerung anwenden und diese ihre Vor- und Nachteile besitzen. In dieser Arbeit konnte aber die Fragestellung der Orientierung der Schiff'schen Base von keinem der beiden Programme zweifelsfrei beantwortet werden.

4.3 Struktur des Grundzustands von T203V

4.3.1 Quartärstruktur von Halorhodopsin im Kristall

Für die Anordnung von Halorhodopsin innerhalb der Zellmembran gibt es bisher nur elektronenmikroskopische Aufnahmen an kristallinen Membranfraktionen (Havelka, 1995). Die kristalline Membranfraktion wurde aus Zellen isoliert, in denen Halorhodopsin sieben- bis achtfach überexprimiert wurde. Die Membranfraktionen zeigten, daß Halorhodopsin als Tetramer vorliegt und im Tetramer die einzelnen Monomere zueinander antiparallel angeordnet sind. Diese antiparallele Anordnung kann jedoch bei Belichtung keinen gerichteten Transport von Chlorid-Ionen bewirken, was darauf hinweist, daß es sich nicht um die physiologische Quartärstruktur handelt. In der Dissertation von Kolbe wurde dieser Punkt bereits diskutiert und die physiologische Relevanz des Tetramers in Frage gestellt. Zusätzlich wurde in der Dissertation von Besir gezeigt, daß ebenso kristalline Membranfraktionen in einer hexagonalen Raumgruppe erhalten wurden und somit angenommen werden kann, daß Halorhodopsin als Trimer vorliegt.

Als weiteres Indiz für die physiologische Quartärstruktur des Trimers spricht, daß sowohl im Wildtyp-Protein, das im ursprünglichen Kristallisationsprotokoll als Trimer in der Raumgruppe $P6_322$ vorliegt und im optimierten Protokoll sowohl der Wildtyp, wie auch sämtliche Mutanten wieder als Trimer aber jetzt in der Raumgruppe $R32$ kristallisierte.

Man muß daher davon ausgehen, daß Halorhodopsin in vivo als Trimer vorkommt und das Tetramer eine Besonderheit des Überproduzenten darstellt.

4.3.2 Chloridbindungsstellen in Halorhodopsin

In der Struktur von T203V wurden im Gegensatz zur Wildtyp-Struktur statt einer, zwei Chloridbindungsstellen im extrazellulären Halbkanal von Halorhodopsin eindeutig bestimmt. Die Chloridbindungsstelle CB I nahe der PSB konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden und eine weitere, zweite Chloridbindungsstelle CB II wurde in der Nähe der extrazellulären Oberfläche gefunden (siehe Kapitel 3.3.3, Abbildung 3-9). Obwohl in der Literatur schon mehrmals eine zweite Chloridbindungsstelle im extrazellulären Halbkanal angenommen wurde (Varo *et al.*, 1995; Okuno *et al.*, 1999), konnte diese jedoch in der Wildtypstruktur nicht eindeutig nachgewiesen werden. Okuno *et al.* gelang es durch elektrische Messungen zu zeigen, daß mindestens eine weitere Chloridbindungsstelle in Halorhodopsin existiert. Für die erste Chloridbindungsstelle CB I ermittelte Okuno eine K_M von 0.06M erhalten, welche in guter Übereinstimmung mit zuvor gemessenen Daten lag (Schobert *et al.*, 1982; Rüdiger, Dissertation 1995). Für die zweite Chloridbindungsstelle CB II wurde eine deutlich höhere K_M von 6M erhalten. Diese hohe K_M könnte auch die Probleme bei der eindeutigen Zuordnung der zweiten Chloridbindungsstelle CB II im Wildtyp, wie auch in T203V, erklären, nachdem die CB II im Protein nicht zwangsläufig vollständig besetzt wurde. Erst die Versuche mit Bromid-Ansätzen konnten eine eindeutige Zuordnung dieser zweiten Chloridbindungsstelle CB II liefern. Dies ist zum einen auf die höhere Affinität von Bromid im Vergleich zu Chlorid zurückzuführen, wie auch auf die Messung des anomalen Signals bei der Röntgenbeugung. Neben den beiden Chloridbindungsstellen wurde in früheren NMR-Experimenten mit ^{35}Cl gezeigt, daß sich auf der Oberfläche von Halorhodopsin weitere Chloridbindungsstellen befinden müßten (Falke *et al.*, 1984). Die Bromid-Experimente konnten hier ebenso zeigen, daß sich an der Oberfläche von Halorhodopsin weitere Bindungsstellen befinden. Aus den Bromid-Experimenten ist eine weitere Chloridbindungsstelle an der Oberfläche in der Nähe von CB II lokalisiert. Diese Bindungsstelle könnte den Weg des Anions über die Oberfläche in den Anionenkanal beschreiben.

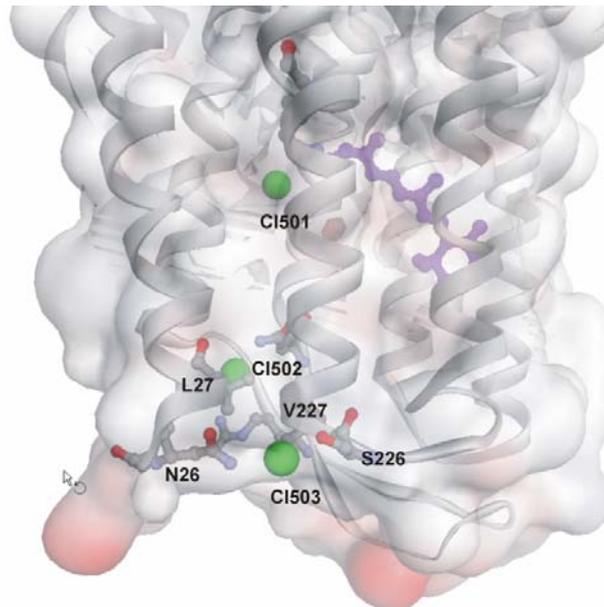


Abbildung 4-10: Das Chlorid-Ion Cl503: Das dritte Chlorid-Ion Cl503 wird koordiniert von N26 und S226 an der Oberfläche der extrazellulären Seite. Weiterhin sind die beiden Chlorid-Ionen Cl501 und Cl502 dargestellt. Die Orientierung der Reste L27, sowie V227 zeigen, daß kein direkter Kanal von Cl503 zu Cl502 besteht.

Innerhalb der Chloridbindungstelle CB I wurde neben den drei Wassermolekülen aus der Wildtypstruktur (WAT505, WAT508, WAT512) ein zusätzliches Wassermolekül gefunden.

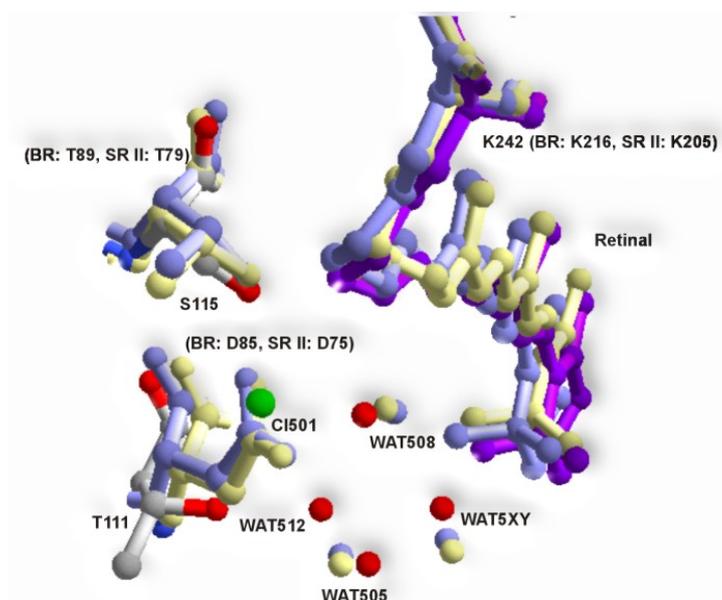


Abbildung 4-11: Wassermoleküle auf der extrazellulären Seite der Retinalbindungstasche im Vergleich. In grau sind die Seitenketten von HR dargestellt. In rot sind die Wassermoleküle, in grün das Chloridion Cl501 von HR dargestellt. Im Vergleich dazu sind die entsprechenden Reste, bzw. Wassermoleküle von BR in blau bzw. von SR II in gelb dargestellt.

Ein Vergleich der Wassermoleküle WAT505, WAT508, sowie WAT5XY mit den entsprechenden Wasser des Grundzustands in Bakteriorhodopsin zeigt, daß sich diese Wassermoleküle an ähnlichen Positionen zu den korrespondierenden Wassermolekülen in Bakteriorhodopsin (401, 402, 406) befinden. Entsprechend finden sich diese Wasser in der Struktur von SR II mit HTR II wieder (Gordeliy *et al.*, 2002). Somit zeigt sich, daß nicht nur Reste innerhalb einer Proteinfamilie konserviert sind, sondern ebenso Wassermoleküle konserviert vorliegen.

Konservierte Wassermoleküle innerhalb der Retinalbindungstasche				
HR	WAT505	WAT508	WAT5XY	WAT512
BR	401	402	406	-
SR II	11	12	32	-

Tabelle 4-2: Konservierte Wassermoleküle innerhalb der Chloridbindungsstelle CB I, die sich in Strukturen anderer archaealer Rhodopsine in der Umgebung der PSB wiederfinden.

C1501 befindet sich im Vergleich mit Bakteriorhodopsin an der Position von D85, der Protonenakzeptor-Gruppe von Bakteriorhodopsin. WAT512 ist das einzige nicht konservierte Wasser innerhalb der Retinalbindungstasche. In Halorhodopsin ist D85 an der entsprechenden Position gegen ein Threonin ausgetauscht. Es könnte somit sein, daß dieses zusätzliche Wasser WAT512 zur Stabilisierung des Wasserstoffbrücken-Netzwerks benötigt wird, das in Bakteriorhodopsin, wie auch Sensorhodopsin II durch das Carbonylatom der Carboxylatgruppe D85 (BR), bzw. D75 (SR II) entsprechend stabilisiert wird. Dies würde somit auch erklären, weshalb dieses Wassermolekül in den anderen Strukturen von Bakteriorhodopsin und Sensorhodopsin II nicht vorliegt, sondern ein für den Ionentransport notwendiges Wasser darstellt. Dies könnte aber auch bedeuten, daß dieses zusätzliche Wassermolekül mit dem C1501 koordiniert sein muß und nicht vollständig dehydratisiert vorliegen kann.

4.4 Struktur des L₁-Intermediats in T203V

Im Ergebnis-Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, daß in der Struktur des L₁-Intermediats keine größeren Strukturänderungen innerhalb des Proteins zu erkennen sind. Die Isomerisierung von all-trans Retinal zu 13-cis Retinal führt wie in Bakteriorhodopsin zu einer sterischen Wechselwirkung der C20 Methylgruppe mit W207, die analog zu Bakteriorhodopsin im späteren Teil des Photozyklus zu einer auswärts gerichteten Bewegung von Helix F führen sollte. Die beiden Chlorid-Ionen sind weiterhin auf der extrazellulären Hälfte innerhalb der Chloridbindungsstellen CB I und CB II lokalisiert. Innerhalb der CB I sind lediglich kleinere Bewegungen des Chlorid-Ions und der beteiligten Wassermoleküle zu sehen (Kapitel 3.4.6, Abbildung 3-19).

Die größten Strukturänderungen sind bei Y109/E219 zu sehen. Y109 liegt in Helix C, E219 am Anfang von Helix F. Die Betrachtung der Kavität mit den Resten Y109/E219 von Grundzustand und Intermediatzustand zeigt, daß sich diese Kavität deutlich erweitert. Diese Erweiterung ist darauf zurückzuführen, daß drei weitere Reste S104, R108, W112 aus Helix C für die Kavitätsberechnung hinzukommen (siehe Ergebnisse 3.4.5). Dies deutet auf strukturelle Änderungen innerhalb von Helix C hin, die bereits für das L-Intermediat in Bakteriorhodopsin beobachtet wurden (Edman, Dissertation 2002). Für das sog. L-Intermediat in Bakteriorhodopsin, das auch einem M-Intermediat entsprechen könnte (siehe Kapitel 4.2.1) wurden Differenzdichtekarten aus Intermediat- und Grundzustand berechnet. Neutze (Neutze *et al.*, 2002) erzeugte das L-Intermediat auf zwei unterschiedliche Weisen, zum einen durch Belichtung bei 150 K mit grünem Licht, bzw, bei 170 K mit rotem Licht. Interessanterweise zeigen die Differenzspektren bei 170 K keine Differenzdichten um die PSB (Abbildung 4-11). Die Differenzdichten für das L-Intermediat bei 150 K stimmen in Teilen qualitativ mit den gemessenen Differenzdichten des L₁-Intermediats in dieser Arbeit überein (siehe Abbildung 3-15, Abbildung 4-8). So sind zum einen deutliche Änderungen um die PSB zu beobachten, wie auch Änderungen innerhalb der Helix C. Zum Anderen sind Änderungen für das Wassermolekül 402, sowie den Rest D85 zu sehen. In Halorhodopsin sitzt an dieser Stelle CL501. Diese Änderungen zeigen sich jedoch auch schon im K-Intermediat von Bakteriorhodopsin.

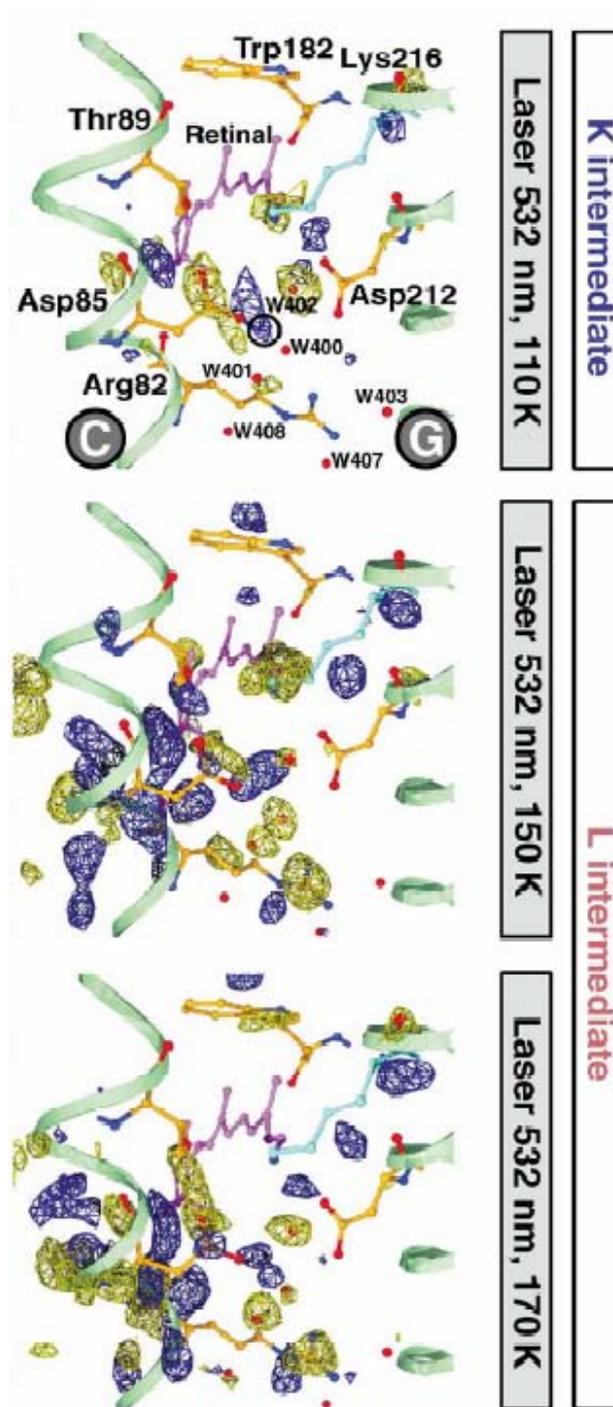


Abbildung 4-12: Differenzdichten des K-, und L-Intermediats von Bakteriorhodopsin (Neutze *et al.*, 2002). In gelb sind die negativen Differenzdichten aus belichtetem und unbelichtetem Zustand dargestellt, in blau die positiven Differenzdichten.

Zusammenfassend lassen die geringen Strukturänderungen innerhalb der frühen Intermediate von Halorhodopsin wie in den entsprechend frühen Intermediaten von Bakteriorhodopsin den Schluß zu, daß sich die aufgenommene Energie des Photons sich noch im Chromophor, also im Farbpigment mit umgebenden Resten, befindet und noch nicht an das gesamte Protein abgegeben wurde.

4.5 Funktionelle Reste innerhalb der beiden Chloridbindungsstellen CB I und CB II

4.5.1 Die Chloridbindungsstelle CB II

Innerhalb der Chloridbindungsstelle CB II wurden die beiden Reste R103, Q105 mutiert und charakterisiert. Der dritte Rest, R24, wurde bis dato nicht mutiert und charakterisiert. Die beiden Mutationen wurden so gewählt, daß ihre Mutationen den Resten in Pharaonis Halorhodopsin entsprachen. Für die beiden Mutanten Q105M, sowie R103V konnte gezeigt werden, daß beide weiterhin Transportaktivität besaßen. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein zeigt die Mutante Q105M eine leicht verringerte Transportaktivität (Kapitel 3.5.3), sowie die Mutante Q105E (Rudiger *et al.*, 1997). Diese Mutante zeigte einen biphasischen Zerfall des L- und O-Intermediats. Dies deutet darauf hin, daß die Aufnahme des Anions behindert wird. Aus den Messungen folgt, daß die Reste Q105 und R103 die entscheidenden Bindungspartner des Chloridions innerhalb der zweiten Chloridbindungsstelle darstellen. Mit einer Bindungskonstante von 6 M liegt sie jedoch deutlich unterhalb der physiologischen Chlorid-Konzentration. Okuno *et al.* zeigten durch elektrophysiologische Messungen, daß Halorhodopsine aus *H. salinarum*, sowie aus *N. pharaonis* drei Chloridbindungsstellen besitzen: Eine Chloridbindungsstelle nahe dem Retinal, eine weitere an der extrazellulären Oberfläche, sowie eine weitere an der cytoplasmatischen Oberfläche (Okuno *et al.*, 1999). Letztere konnte weder im Grundzustand noch im Intermediatzustand lokalisiert werden.

Aus den Strukturdaten von Halorhodopsin aus *H. salinarum* und dem Sequenzvergleich (siehe Kapitel 3.3.3) ergibt sich somit, daß es sich im Falle von Pharaonis Halorhodopsin bei der Chloridbindungsstelle CB II nicht um die gleiche Chloridbindungsstelle, wie in *Salinarum* Halorhodopsin handeln kann. R24 ist in Pharaonis Halorhodopsin durch Leucin, R103 durch Valin und Q105 durch Methionin ersetzt worden. Nachdem in *Salinarum* Halorhodopsin dies die einzigen direkt koordinierenden Reste des Chlorid-Ions sind und keine weiteren Wassermoleküle dieses Chlorid-Ion koordinieren, müßte sich die zweite Chloridbindungsstelle in Pharaonis Halorhodopsin an einer anderen Stelle befinden.

4.5.2 Die Chloridbindungsstelle CB I

Die Mutationen innerhalb der Chloridbindungsstelle CB I hatte in den meisten Fällen nur moderaten Einfluß auf die Transportaktivität. Die Mutationen der Serin-Reste innerhalb der Chloridbindungsstelle CB I gegen Alanin führten zu keinem Verlust der Transportaktivität. Dies zeigte sich auch für die Mutante S115A, welche im Wildtyp eine direkte koordinierte Bindung mit dem Chlorid-Ion ausbildet. In diesem Fall zeigte sich jedoch, daß diese Mutation zu einer erheblichen Reduktion der spezifischen Transportaktivität führte und nur noch max. 50% der ursprünglichen Aktivität betrug. S115 findet sich in allen bekannten Sequenzen archaealer Halorhodopsine wieder. Einen weiteren Hinweis auf die strukturelle Bedeutung dieses Restes liefert auch die geringe Expressionsrate des mutierten Proteins, welche für die inaktiven Mutanten D238E, D238N ähnlich gering war. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß S115 in Halorhodopsin eine wichtige Rolle spielt. In diesem Zusammenhang wird eine mögliche Seitenkettenrotation von S115 diskutiert, welche die Bewegung des Anions von der extrazellulären Seite auf die cytoplasmatische Seite begleiten und stabilisieren würde (Kolbe *et al.*, 2000). Für R108 wurde bereits gezeigt, daß Mutationen an dieser Position das Protein komplett inaktivierten, bzw. zu einer geringen Restaktivität führten (M. Rüdiger, 1996). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß neben Mutationen an R108 die beiden Mutanten D238E und D238N keine Transportaktivität besitzen. Des weiteren zeigte sich, daß die Expressionsraten für die beiden Mutanten D238E und D238N sehr gering waren und die Mutante D238A nicht exprimiert werden konnte. Dies deutet auf eine zentrale Rolle von D238 in der Funktionalität von Halorhodopsin hin. In Bakteriorhodopsin konnte gezeigt werden, daß die korrespondierende Mutation D212N nur noch ein Drittel der Transportaktivität des Wildtyps zeigt (Moltke *et al.*, 1995). D212, R82 und D85 bilden ein komplexes Gegenion zur protonierten Schiff'schen Base. Analog zu Bakteriorhodopsin bilden R108, D238 mit Cl501 in Halorhodopsin ein komplexes Gegenion zu der protonierten Schiff'schen Base. Wird nun die Elektrostatik dieses komplexen Gegenions gestört führt dies in Halorhodopsin zu drastischeren Konsequenzen als in Bakteriorhodopsin, nämlich zunächst zum Verlust des Chloridions Cl501 und somit zum Verlust der Transportaktivität.

4.6 Synthese von Katalysezyklus und Photozyklus in Halorhodopsin

4.6.1 Der Katalysezyklus von Halorhodopsin

Für die Beschreibung des Katalysezyklus sämtlicher archaealer Rhodopsine wurde ein allgemeines Modell der verschiedenen Transportmoden entwickelt. Dieses sogenannte „IST-Modell“ beschreibt die unterschiedlichen Einzelereignisse des Katalysezyklus mit einem minimalen Satz an Parametern: die Retinalisomerisierung (Isomerisierung = I), die Zugänglichkeitsänderung des aktiven Zentrums (Ionenbindestelle der PSB; Schalter = S) und der Ionentransferschritt zum aktiven Zentrum hin, sowie von aktiven Zentrum weg (Transfer = T) (Haupts *et al.*, 1997).

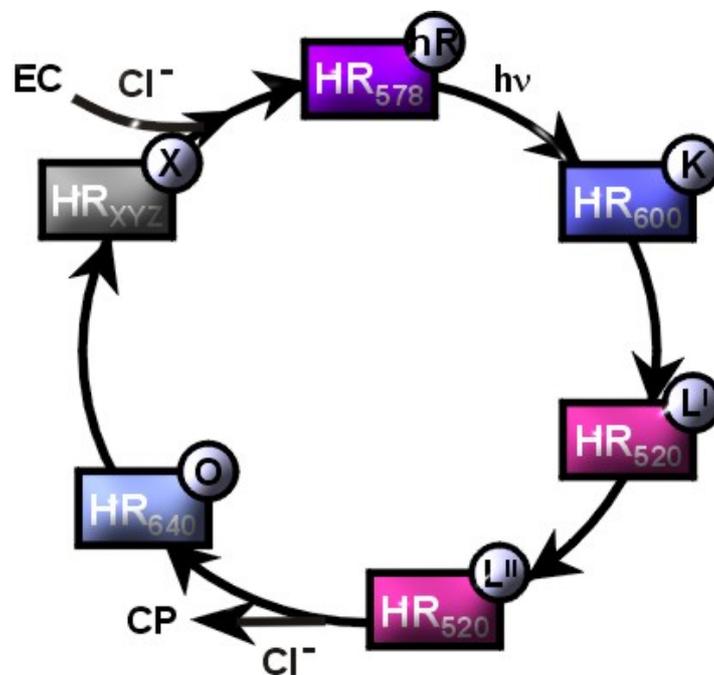


Abbildung 4-13: HR-Photozyklus: Nach Belichtung von Halorhodopsin wird 13-cis Retinal gebildet. Das erste Photozyklus-Intermediat, das K-Intermediat, ist rotverschoben und wird mit einem Stabilitätsverlust der positiven Ladung an der PSB diskutiert. Im nächsten Schritt bilden sich die blauverschobenen L₁- und L₂-Intermediate. Cl⁻ wird in das Cytoplasma abgegeben und es wird ein rotverschobenes O-Intermediat gebildet. Nach Reversion wird ein spektroskopisch nicht näher identifiziertes Intermediat (hier X-Intermediat) erhalten. Im letzten Schritt wird ein Chlorid-Ion aufgenommen.

In Abbildung 4-13 ist der Photozyklus von HR dargestellt. Für die Beschreibung des Katalysezyklus von HR im IST-Modell sind zwei grundsätzliche Ausgangssituationen möglich:

1. Das katalytisch aktive Zentrum in Halorhodopsin ist bereits im Grundzustand mit einem Chlorid-Ion besetzt,
2. oder das katalytisch aktive Zentrum liegt unbesetzt vor.

Diese beiden unterschiedlichen Ausgangssituationen haben nach dem IST-Modell einen entscheidenden Einfluß auf die Reihenfolge der Einzelereignisse.

Beiden Ausgangssituationen ist gemeinsam, daß im ersten Schritt eine photochemische Retinalisomerisierung (I^{*}) erfolgt. Liegt nun das katalytisch aktive Zentrum bereits besetzt vor, so muß im nächsten Schritt eine Änderung der Zugänglichkeit erfolgen, der „Schalter“ (S). Dies entspricht der Änderung des Dipolvektors der PSB von der extrazellulären Seite zur cytoplasmatischen Seite. Im nächsten Schritt folgt das Anion der PSB und gelangt das Anion so auf die cytoplasmatische Seite. Dies entspricht einem „Transfer“-Schritt (T). Anschließend erfolgt die thermische Reisomerisierung (I) von 13-cis Retinal zu all-trans Retinal. Durch die Umkehr des Dipolvektors erfolgt wiederum eine Zugänglichkeitsänderung (S), dem die Besetzung des katalytisch aktiven Zentrums (T) als letzten Schritt folgt (Abb. 4-14A).



Abbildung 4-14: IST-Modell von Halorhodopsin. A) Abfolge des Katalysezyklus mit anfangs besetztem katalytisch aktivem Zentrum; B) Abfolge des Katalysezyklus mit anfangs freiem katalytisch aktivem Zentrum.

Im zweiten Fall folgt unmittelbar nach der photochemischen Isomerisierung (I^{*}) zunächst die Besetzung des katalytisch aktiven Zentrums (T). Erst im nächsten Schritt erfolgt die Zugänglichkeitsänderung mit der Reorientierung der PSB (S). Dem folgt die Abgabe des Anions an die cytoplasmatische Seite (T) mit der anschließenden thermischen Reisomerisierung (I). Um den Zyklus zu

vervollständigen muß im letzten Schritt die Zugänglichkeitsänderung (S) erfolgen (Abb. 4-14B).

Im L_1 -Intermediat von Halorhodopsin zeigte sich zum einen, daß weder große Konformationsänderungen innerhalb des Proteins stattfanden, noch daß eine größere Bewegung des Chlorid-Ions Cl501 in der Chloridbindungsstelle CBI erfolgte. Vor der strukturellen Aufklärung des L_1 -Intermediats wurde die spektrale Farbänderung mit einer Annäherung des Chlorid-Ions an die PSB diskutiert. Aus der Intermediat-Struktur ergab sich jedoch, daß in keinem Fall eine absolute Annäherung des Chlorid-Ions an die Schiff'sche Base erfolgte. Daraus folgt für die Beschreibung des Katalysezyklus von Halorhodopsin, daß im Grundzustand das katalytisch aktive Zentrum bereits besetzt vorliegt und somit die PSB mit der Chloridbindungsstelle CBI das katalytisch aktive Zentrum bildet. Nach der Isomerisierung (I^*) erfolgt die Zugänglichkeitsänderung, der „Schalter“ (S). Diese Zugänglichkeitsänderung macht keine Aussage über die genaue Orientierung der PSB, d.h. eine Annäherung der PSB in Richtung D238 ist in diesem Modell nicht auszuschließen. Als nächstes erfolgt der „Transfer“-Schritt, welcher die Abgabe des Chlorid-Ions auf die cytoplasmatische Seite zur Folge hat. In diesem Zusammenhang wird die Kavität von T203 mit dem Wassermolekül WAT506 und W207 als mögliche transiente Chloridbindungsstelle diskutiert (Rüdiger, Dissertation 1995). In T203V wird diese mögliche transiente Bindungsstelle durch die Mutation gestört und somit der „Transfer“-Schritt des Anions verzögert. Dies führt zur Akkumulation des L_1 -Intermediats. Nach der Abgabe des Chlorid-Ions, welche im Photozyklus dem O-Intermediat bei 640nm entspricht, folgt die thermische Reiseromerisierung (I) des 13-cis Retinals zu all-trans Retinal. Der Reiseromerisierung folgt unmittelbar die Zugänglichkeitsänderung (S) und im letzten Schritt erfolgt die Besetzung der Chloridbindungsstelle CBI (T). Diese Besetzung der Chloridbindungsstelle CBI wird als letztes Intermediat mit einem Absorptionsmaximum bei 565nm diskutiert, konnte aber spektroskopisch nicht nachgewiesen werden. Diese chloridfreie Form wurde von Rüdiger stattdessen als X-Intermediat bezeichnet.

4.6.2 Zusammenfassendes Modell des Photozyklus in Halorhodopsin

Im IST-Modell werden die Einzelereignisse innerhalb des katalytisch aktiven Zentrums beschrieben. Diese Einzelereignisse im katalytischen Zentrum müssen jedoch nicht mit den einzelnen Photozyklus-Intermediaten von Halorhodopsin zusammenfallen. Deshalb wird versucht, ein Gesamtbild der verschiedenen Ereignisse während des Photozyklus wiederzugeben und, soweit möglich, werden die Einzelereignisse des Katalysezyklus mit einbezogen.

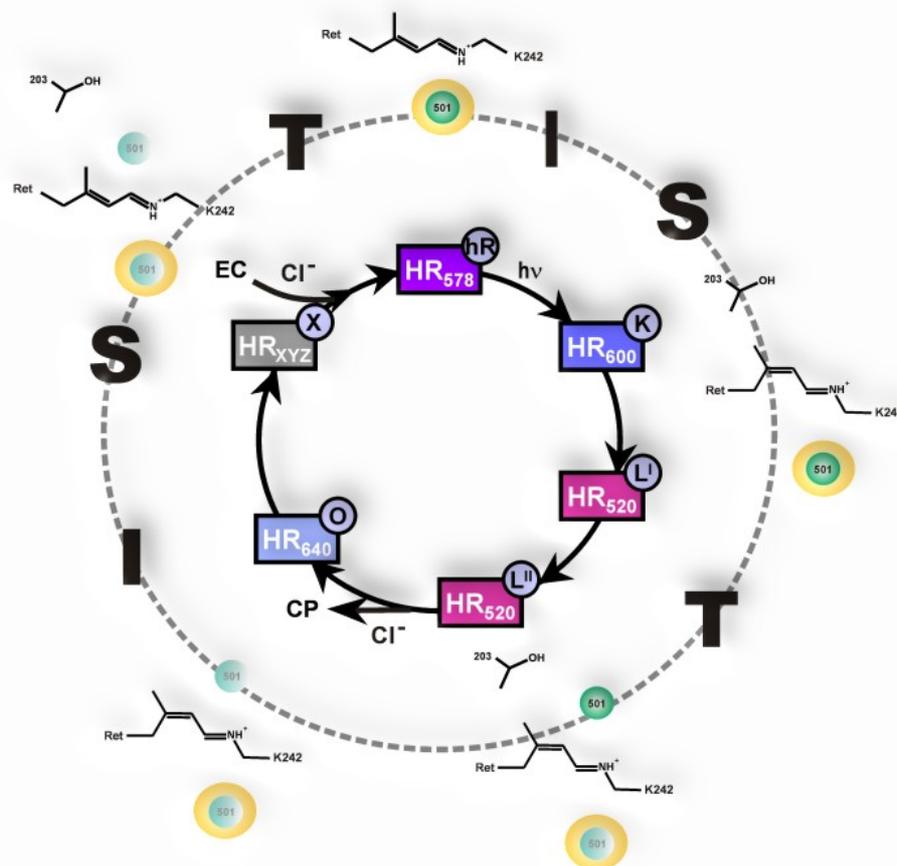


Abbildung 4-15: Gemeinsames Schema des Photozyklus und Katalysezyklus in Halorhodopsin. Der innere Zyklus beschreibt die verschiedenen Photozyklusintermediate, der äußere Zyklus beschreibt die Besetzungszustände des katalytisch aktiven Zentrums. Nach der Isomerisierung (I^{*}) von all-trans Retinal zu 13-cis Retinal sind in der Umgebung der Retinalbindungstasche keine größeren Änderungen zu beobachten. Das Chlorid-Ion Cl⁻501 befindet sich im L₁-Intermediat weiterhin auf der extrazellulären Seite. Die Zugänglichkeit der PSB hat sich aber geändert (S). Zwischen L₁- und L₂-Intermediat wird Cl⁻501 auf die cytoplasmatische Seite transportiert (T). Im nächsten Schritt wird das Chlorid-Ion ans Cytoplasma abgegeben und es bildet sich ein rotverschobenes O-Intermediat. Nach der thermischen Rückisomerisierung (I) und der Zugänglichkeitsänderung der PSB (S) wird ein Chlorid-Ion aufgenommen um in den Ausgangszustand zurückzukehren (T).

In Abbildung 4-15 ist ein Schema des Photozyklus dargestellt. Im Grundzustand sind beide Chloridbindungsstellen CB I und CB II besetzt. Wie beschrieben, entspricht CB I mit der PSB dem katalytisch aktiven Zentrum. Im ersten Schritt erhält man nach der Isomerisierung zunächst ein rotverschobenes K-Intermediat (600nm). Im IST-Modell entspricht dies dem ersten Schritt (I^{*}). Für das K-Intermediat sind in Halorhodopsin, wie auch in Bakteriorhodopsin, nur geringe strukturelle Änderungen sichtbar (Kolbe, Dissertation) und die gesamte aufgenommene Energie des Photons befindet sich im 13-cis Retinal. Die geringen Änderungen um das Retinal deuten wie in Bakteriorhodopsin darauf hin, daß der Chromophor noch verdrillt vorliegt (Kolbe, Dissertation 2001; Edman, Dissertation 2002). Im nächsten Schritt erfolgt spektroskopisch eine Relaxierung des 13-cis Retinals zum L₁-Intermediat. Die beiden Chlorid-Ionen Cl501 und Cl502 befinden sich noch in den Chloridbindungsstellen CB I und CB II. Die PSB weist schon in den cytoplasmatischen Halbraum. Die spektrale Farbänderung des Chromophors ergibt sich entweder durch eine Verformung des Retinals durch die Proteinumgebung oder durch die Wechselwirkung der PSB mit D238. Im nächsten Schritt ändert sich die Zugänglichkeit mit der Ausbildung des L₂-Intermediats und dies entspricht dem Schalter-Schritt „S“. Das L₂-Intermediat ist spektral vom L₁-Intermediat nicht zu unterscheiden, konnte aber durch Raman- und FTIR-Messungen nachgewiesen werden (Heberle, unveröffentlicht). Es erfolgt nun die Abgabe des Chlorid-Ions Cl501 ins Cytoplasma über die transiente Bindestelle T203, die sich aus der Funktion dieses Restes in der Abgabereaktion ergibt. Die Abgabe von Cl501 entspricht im IST-Modell dem Transfer-Schritt „T“, im Photozyklus entspricht dies der Bildung des rotverschobenen O-Intermediats (640nm). Das Chlorid-Ion Cl502 befindet sich weiterhin in der Chloridbindungsstelle CB II. Im Photozyklus erfolgt, wie auch im IST-Modell, die Reisoomerisierung (I). Dieser Reisoomerisierung muß im IST-Modell eine Zugänglichkeitsänderung (S) folgen. Im letzten Schritt (T) erfolgt die Besetzung der Chloridbindungsstelle CB I durch Cl502 aus CB II. CB II wiederum wird von einem neuen Chlorid-Ion besetzt.

Diese letzten Schritte konnten bisher nicht spektroskopisch nachgewiesen werden, die Geschlossenheit des Photozyklus fordert jedoch ein weiteres Intermediat. Es wurde gezeigt, daß dieses Intermediat nicht der chlorid-freien Form von Halorhodopsin mit einem Absorptionsmaximum bei 565nm entspricht (Rüdiger,

Dissertation 1996). In diesem Zusammenhang wird dieses Intermediat als X-Intermediat bezeichnet und in dieser Arbeit so übernommen.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Reagentien und Enzyme

Antischaummittel Roth, Karlsruhe

Bacteriological Pepton L37 Oxoid, Wesel

Bacto-Agar Difco, Detroit, MI, USA

Siedesalz (NaCl) Staatliche Saline, Bad Reichenhall

Kaliumchlorid Merck, Darmstadt

Na-Citrat Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid

Kaliumbromid

Kaliumjodid

Monoolein Sigma, München

Monopalmitolein Sigma, München

β -D-Oktylglucosid Boehringer, Mannheim

β -D-Nonylglucosid Boehringer, Mannheim

β -D-Decylmaltosid, Sigma, München

β -D-Dodecylmaltosid Sigma, München

Natrium-Cholat Sigma, München

BioGel A-0,5m Biorad, Richmond, USA

DNA-Restriktionsendonucleasen, Boehringer Mannheim GmbH

Kristallisationsschalen Charles Supper, Natrick, USA

Konzentratoren Pall Filtron (Millipore)

Konzentratoren Amicon, Wiesbaden

Source PHE, Pharmacia, Freiburg

Kristallmanipulation (Schleifen, Zangen etc) Hampton Research, San Diego, USA

Sterilfilter, Millipore GmbH, Eschborn

Superose-12, Pharmacia, Freiburg

Glasröhrchen Special Verre, Geispolsheim

5.1.2 Stämme verwendeter Organismen

5.1.2.1 *Escherichia coli*-Stämme

DH5 α [Gibco-BRL]

5.1.2.2 *Halobacterium salinarum*-Stämme

S9:

BR++, HR+, SRI+, SRII+, Car-, Rub-, Ret+

Dieser Stamm wurde zur Isolierung von BR-Wildtyp verwendet.

D2:

BR-, HR++, SRI+, SRII+, Car-, Rub-, Ret+, exprimiert HR und geht auf den Stamm HN5 zurück. Dieser Stamm wurde zur Isolierung von HR-Wildtyp verwendet

TOM:

BR-, HR-, SRI+, SRII+, Car-, Rub-, Ret+, Deletion der beiden Ionenpumpen BR und HR. Dieser Stamm wurde zur Transformation und Isolierung verschiedener HR-Mutanten verwendet

5.1.3 Nährmedien

Nährmedium für *Halobacterium salinarum*

Halobakterielles Nährmedium wurde mit bi-destilliertem Wasser angesetzt. Dazu wurden entsprechend:

NaCl	250 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20 g/l
KCl	2 g/l
Na-Citrat·2H ₂ O	3 g/l
Oxoid-Pepton	10 g/l

zugegeben. Das gelöste Medium wurde mit 4 M NaOH auf einen pH-Wert im Bereich von 7,0 bis 7,2 eingestellt.

5.1.4 Puffer und Lösungen

5.1.4.1 Basalsalzlösung

Die Basalsalzlösung entspricht in ihrer Zusammensetzung dem Kulturmedium für *H. salinarum*, jedoch ohne Pepton-Zusatz.

5.1.4.2 Lysepuffer

3 M MCl

25 mM Tris/HCl (pH = 7.2)

Cholat-Solubilisierungspuffer

20 % Natrium-Cholat in

25 mM Tris-HCl (pH ~7.6) aufnehmen

und anschließend den pH-Wert langsam mit verdünnter HCl auf einen pH = 7.5 einstellen.

Ausfallendes Cholat wird durch Zentrifugation abgetrennt.

5.1.4.3 Laufpuffer A

0.4 % (w/w) Natriumchololat,

3 M KCl bzw. 3.0, 3.5 oder 4.0 M KCl

50 mM Tris/HCl (pH = 7.2)

5.1.4.4 Laufpuffer B

1% (w/w) Octyl-b-D-glucopyranosid (OG)

4 M KCl bzw. 3.0, 3.5 oder 4.0 M KCl

50 mM Tris/HCl (pH = 7.2)

5.2 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

5.2.1 Transformation und Kultivierung von *Escherichia coli*

70 μl kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 μl DNA-Lösung (2-100 ng) versetzt. Die Ansätze wurden 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in vorgekühlte Transformationsküvetten umgefüllt. Die Zellen wurden mit einem Elektroporationsgerät bei 1.5 kV, 800 Ohm und 250 mF einem kurzen Spannungsstoß ausgesetzt. Die Abklingzeiten betragen 12-17 ms.

Die Zellsuspension wurde sofort mit 1 ml LB Medium verdünnt und eine Stunde in einem Temperierschrank bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Verdünnung von 10^{-5} und 10^{-6} auf Selektiv-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

Für DNA-Isolierungen wurden 5ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum von einem Einzelklon ausgehend angeimpft und ca. 8-12 Stunden inkubiert.

5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Einzelkolonien werden von einer LB-Platte mit Ampicillin mit einer sterilen Impföse gepickt und in 3-4 ml ampicillinhaltiges LB-Medium angeimpft. Die Kultur wird über Nacht bei 37 °C mit 250 rpm geschüttelt. 3 ml werden 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Isolierung der Vektor-DNA erfolgte mit dem QIAprep® Spin Plasmid Kit (Qiagen, Düsseldorf).

Das Zellpellet wird zunächst in 250 μl P1-Puffer (100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A, 10 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0) resuspendiert und in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dazu werden 250 μl Lyse-Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % w/v Natriumdodecylsulfat) gegeben und durch langsames Schwenken vermischt, bis eine homogene, viskose Lösung entstanden war. Nach Zugabe von 350 μl des Neutralisationspuffers N3-Puffer wird sofort leicht geschüttelt. Dabei fallen Proteine und genomische DNA mit SDS als weißer, flockiger Niederschlag aus. Nach 10 min Zentrifugation bei 9000 rpm wird der klare Überstand auf die

Spinprep-Säulen aufgetragen. Diese werden in 2 ml Eppendorfgläsern 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säulen werden mit 750 μ l Puffer PE (ethanolhaltiger Waschpuffer) gewaschen und nach Entleeren der Auffanggefäße erneut 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert, um den ethanolhaltigen Puffer PE vollständig von der Vektor-DNA abzutrennen. Anschließend werden die Säulen in sterile Eppendorfgläser aufgesetzt und die DNA mit 50 μ l H₂O eluiert.

5.2.3 Transformation von *H.salinarum*

Die Transformation von *H. salinarum* wird nach Cline *et al.* (1989) durchgeführt. 2 ml einer schnell wachsenden Kultur werden 5 min in einem Eppendorfgläser bei 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 200 μ l SPH-Puffer (2 M NaCl, 25mM KCl, 15 % w/v Saccharose, 50 mM Tris/HCl, pH 8.75) langsam durch leichtes Schwenken resuspendiert. Durch Zugabe von 10 μ l 0.5 M EDTA in SPH-Puffer werden Sphäroblasten erzeugt, wodurch die Anlagerung und Aufnahme von DNA ermöglicht wird. Unter dem Mikroskop sind die kugelförmigen Sphäroblasten deutlich von den ursprünglich stäbchenförmigen Zellen zu unterscheiden. Für die Transformation werden 1 - 2 μ g Vektor-DNA in 2 M NaCl (DNA-Lösung mit gleichem Volumen 4 M NaCl gemischt) zur Sphäroblasten-Suspension gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 220 μ l PEG600-Lösung (60 % w/v in SPH-Puffer) in den Deckel des Gefäßes pipettiert, die Lösung durch vorsichtiges Schwenken gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Danach werden 1.5 ml SVLPuffer (4.3 M NaCl, 80 mM MgCl₂, 10 mM *tri*-Natriumcitrat-Dihydrat, 1.4 mM CaCl₂, 15 % w/v Saccharose, 50 mM Tris/HCl, pH 7.4) zugegeben und die Zellen erneut 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 2 ml Vollmedium resuspendiert und im geschlossenen Reagenzglas 24 - 48 h bei 37° C auf einem Reagenzglas-Roller (TC7, New Brunswick) inkubiert. 100 - 300 μ l dieser Lösung werden je nach Resistenzgen im Vektor auf Halo-Platten mit Mevinolin (25 μ M) bzw. Novobiocin (2 μ g/ml) ausgestrichen.

5.2.4 Kultivierung von *Halobacterium salinarium*

Ausgehend von Einzelkolonien wurden 35 ml Flüssigkultur mit den entsprechenden Zellen der HR-bzw. BR-Mutanten angeimpft und 5-9 Tage bei 40 °C und 100 rpm in einem Schüttler unter Lichtabwesenheit angezogen. Anschließend wurden die Zellen in 1l Flüssigkultur überführt und weitere 5-9 Tage in einem Raum bei 37° C und 100 rpm geschüttelt. Für die weitere Anzucht der Zellen wurden 50 ml Flüssigkultur zu 1l Medium zugegeben und unter den bereits oben beschriebenen Bedingungen die Zellen angezogen.

5.3 Biochemische Methoden

5.3.1 Isolierung der HR-Membranfraktionen

Die Isolierung von HR-Wildtyp als auch verschiedener HR-Mutanten erfolgte auf der Basis der Methode von Duschl^[189] et al.

HR-haltige Zellen werden analog zur BR-Isolierung in einer Hettich-Zentrifuge bei 4 °C, 4000 rpm über 40 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen werden anschließend in Basalsalz resuspendiert und mit einer Spatelspitze DNase I versetzt. Die Zellen werden über Nacht bei 4 °C gegen 150 mM NaCl, 50 mM TRIS-HCl (Niedersalzpuffer) dialysiert. Das Lysat wird bei 10 °C, 40000 rpm 40 min in einem Ti-45-Rotor (100000g) zentrifugiert. Die so erhaltene Gesamtmembranfraktion wird in wenig Niedersalzpuffer resuspendiert und homogenisiert. Dieser Schritt wird nochmals durchgeführt und die homogenisierte Gesamtmembranfraktion auf einen Zuckergradienten (25/45% w/w, Niedersalzpuffer) aufgetragen. Der Ansatz wird bei 10 °C, 25000 rpm und 10 °C in einem TST28-Rotor über Nacht (14h) gefahren. Die HR-Fraktion wird mit einer Schwimmdichte von 1.11-1.14 gcm⁻³ isoliert. Die isolierte HR-Fraktion wird in Niedersalzpuffer aufgenommen und 40 min bei 100000 g abzentrifugiert. Dieser Reinigungsschritt wird ein weiteres Mal durchgeführt und die HR-Membranfraktion in wenig Niedersalzpuffer aufgenommen.

5.3.2 Retinalextraktion und Isomerentrennung

Die Bestimmung der Retinal-Isomerenverhältnisse erfolgte mit geringen Modifikationen nach Scherrer et al. (1989). Zu 100 µl einer Membransuspension (OD₅₇₀=1) werden in einem PCR-Tube 300 µl Ethanol, sowie 300 µl n-Hexan zugegeben. Nach kurzer Zentrifugation wird die Hexanphase abgenommen und zwei Minuten über Na₂SO₄ getrocknet. 100 µl werden für die HPLC-Analyse verwendet.

Die Trennung erfolgte über eine Kieselgel-Säule (Lichrosorb Si60) mit 95/5% n-Hexan/Ethylacetat als Laufmittel. Die Retinal-Isomere wurden bei 365 nm detektiert (Kontron Uvicon 725-Detektor) und mit Hilfe eines Integrators (Shimadzu C R1A)

quantifiziert. Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden Hubbard et al. (1971) entnommen: $48000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ all-*trans*-, $39000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 13-*cis*-Retinal.

5.3.3 Messung der Transportaktivität von HR an intakten Zellen

Die Transportexperimente wurden nach Oesterhelt (1982) durchgeführt. HR-haltige Zellen wurden in einer Hettich-Zentrifuge bei RT, 4000 rpm 40 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in Basalsalz ohne Citrat aufgenommen und das Volumen bestimmt. Analog wurde mit den entsprechenden Bromid- oder Nitrat-Lösungen vorgegangen. Ein definierter Teil der Zellen wurde separiert und aus ihnen, wie bereits beschrieben, die HR-Membranfraktion isoliert und die Menge an HR spektroskopisch (Perkin-Elmer UV/Vis-Spektrometer) bestimmt. Der andere Teil der Zellen wird auf eine $\text{OD}_{570}=4$ eingestellt.

Für die Pumpmessungen werden $400 \mu\text{l}$ der Zellsuspension zu 6 ml Basalsalz ohne Citrat in eine thermostatisierte Meßküvette bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ zugegeben. Die Suspension wurde mit $20 \mu\text{l}$ einer $50 \mu\text{M}$ CCCP-Lösung versetzt und anschließend auf pH 6.7-6.9 äquillibriert.

Die Zellen wurden mit einer Xenonlampe belichtet, in deren Strahlengang ein OG515-Filter, sowie ein KG3-Filter eingeführt wurde. Die Anfangsgeschwindigkeiten der lichtinduzierten pH-Erhöhung wurden bei unterschiedlichen Lichtintensitäten graphisch ermittelt. Als Kontrolle wurde nach der Messung $20 \mu\text{l}$ einer 100 mM TPP^+ -Lösung zugegeben und die Zellen belichtet. Die Quantifizierung der Pumpaktivität erfolgte durch Zugabe einer definierten Menge Protonen ($25 \mu\text{l}$ 10 mM HCl).

5.3.4 Kristallisationsansätze von HR-Mutanten

Für die Kristallisation der HR-Mutanten wurde die Methode der bikontinuierlichen kubischen Phase nach Landau und Rosenbusch, sowie Kolbe (2001) modifiziert verwendet.

Die HR-Membranfraktion wurde mit Niedersalzpuffer auf eine $\text{OD}_{570}=4$ eingestellt und anschließend mit festem KCl auf eine Konzentration von 3M eingestellt. Zur

Solubilisierung wurde der Ansatz mit einer 20 %, 25 mM Tris-HCl-Lösung, pH=7.5 auf eine Endkonzentration von 5% Cholat verdünnt. Das solubiliserte HR wurde anschließend in einer Beckamnn Tisch-Ulrazentrifuge (TL-100, TLA-100.3) bei 15 °C, 40000 rpm, 30 min zentrifugiert.

Das solubilisierte Halorhodopsin wurde über hydrophobe Affinitätschromatographie (Resource-PHE, Pharmacia, ÄKTAexplorer) säulenchromatographisch weiter aufgereinigt. Das System wurde zunächst mit Laufpuffer A äquilibriert. Das steril filtrierte Solubilisat wird auf die Säule aufgetragen und mit 10 ml Laufpuffer A gewaschen. Anschließend wurde durch Detergenzwechsel mittels Laufpuffer B HR von der Säule eluiert. Die Fraktionen mit hoher Absorption bei 560 nm, sowie geringer Absorption bei 420 nm wurden vereinigt und unter Verwendung von 50 kD Konzentratoren auf ca. 20 mg/ml HR aufkonzentriert.

Für eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Daten wurden das aufkonzentrierte Solubilisat gegen 3.3 M KCl, 1.0% OG, 25mM Tris-HCl-Lösung dialysiert.

Die aufkonzentrierte Proteinlösung wurde zu Monoolein zugegeben. Die Proteinkonzentration wurde auf eine Endkonzentration von 3.5 mg/ml festgelegt. Die Einstellung der Endkonzentration erfolgte durch Zugabe einer 3.3 M KCl-Lösung, deren OG-Konzentration systematisch zwischen 14 und 20% variiert wurde. Zusätzlich wurde der Lipidanteil zwischen 50-60% variiert.

Die Darstellung der kubischen Phase erfolgte, wie für BR beschrieben, durch Zentrifugation der Ansätze. Die Kristallansätze wurden in einem Klimaschrank bei 22 °C inkubiert.

5.3.5 Isolierung der Protein-Kristalle aus der kubischen Lipid-Phase

Die Proteinkristalle wurden gezielt mit einer Nylon-Schlaufe aus der zumeist viskosen Lipid-Phase isoliert. Die isolierten Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff oder im Stickstoffstrom bei 100 K weggefroren. Die Zugabe eines Additives zur Vermeidung von Wasserkristallen während des Gefrierens war nicht notwendig.

5.4 Spektroskopische Methoden

5.4.1 UV-vis-Spektroskopie

UV-vis-Spektren wurden sowohl an einem Lambda 2-Photometer, sowie an einem Shimadzu-Photometer aufgenommen. Die digitalisierten Daten wurden mit Hilfe der Programme Microsoft Excel (Version '97), bzw. Microcal Origin (4.0) durchgeführt. Bei stark streuenden Proben wurden eine entsprechend angepasste $k\lambda^{-4}$ -Funktion abgezogen. Volumenänderungen bei Titrationsexperimenten wurden durch entsprechende Skalierung der Daten berücksichtigt. Die Absorptionsmaxima wurden durch SVD-Analyse der Titrationsexperimente ermittelt.

Spektren von HR-Kristallen wurden unter Kryo-Bedingungen (600 Series Cryostream Cooler, Oxford Cryosystems) bei unterschiedlichen Temperaturen an einem Mikrospektralphotometer der Fima Zeiss aufgenommen. Zur Anreicherung der Photozyklus-Intermediate im HR-Kristall wurden ein 633nm HeNe-Laser (15mW), sowie ein 532 nm Nd:Yag-Laser (10mW) verwendet.

5.4.2 Blitzlicht-Photolyse

Blitzinduzierte Absorptionsänderungen an Halorhodopsin-Mutanten wurden mit einem polychromatischen Blitzlichtphotolysapparat gemessen (Uhl et al. 1985). Die Anregung der Proben erfolgte durch einen Excimer-gepumpten Farbstofflaser (Lambda-Physik EMG 53 MSC und FL 3001), der mit dem Farbstoff Coumarin 153 (Lambda-Physik LC540) bei 585 nm betrieben wurde. Eine 50 W Halogenlampe diente als Meßlicht und mit Hilfe eines Diodenarrays wurden die Intensitätsänderungen gleichzeitig auf 32 Kanälen im Wellenlängenbereich von 340 nm bis 760 nm aufgenommen. Die Signale wurden verstärkt und durch einen Analog/Digital-Wandler an einem PDB-11 Rechner gespeichert. Die Steuerung der Messung erfolgte durch das Programm "Dataqueen" (H. Desel, 1985). Die Daten wurden mit dem Programm "Oricon" (M. Wahl, 1994) konvertiert und anschließend am PC mit Microcal Origin Vers. 4.0 ausgewertet. Leider trat ein irreparabler Schaden des AD-Wandler an der PDB-11 auf.

Blitzinduzierte Absorptionsänderungen wurden anschließend an einem Mikrospektralphotometer nach Hajdu vermessen. Als Lichtquelle diente eine 100 W Xe-Lampe (Oriel Instruments), als Detektor eine CCD-Kamera (Princeton Applied Research, Model 1235, Digital Triple Grating Spectrograph). Die Proben wurden mit einem Nd:Yag Laser angeregt.

5.4.3 FTIR-Spektroskopie

Die FTIR-Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Joachim Heberle und seiner Arbeitsgruppe am Forschungszentrum Jülich. Für die FTIR-Messungen wurde ein umgebautes Mikroskop durch die Firma Bruker verwendet. An diesem konnten neben FTIR-Messungen auch ohne Umbau UV-vis-Spektren aufgenommen werden. Die Kristalle wurden mit einer Nylon-Schleife isoliert und unter Kryo-Bedingungen vermessen. Oder es wurden die Kristalle bei RT vermessen, wobei die Kristalle zum Schutz vor Austrocknung zwischen zwei CaF₂-Fenster fixiert wurden.

5.4.4 Proteinkristallographische Methoden

5.4.4.1 Datensammlung und Datenreduktion

HR-Kristalle wurden aus der kubischen Lipidphase wie oben beschrieben isoliert und bei 100 K vermessen. Die Datensammlung erfolgte am ESRF (ID14/1, ID14/2, ID14/4) sowie an der SLS unter Verwendung von CCD-Detektoren (Mar345, MarResearch und ADSC, Quantum). Die Kristalle wurden entlang einer Achse senkrecht zum Röntgenstrahl mit einem Winkelinkrement von 1° pro Bild rotiert.

Die Bestimmung der Raumgruppe, der Zellparameter, der Kristallorientierung, sowie Integration und Skalierung erfolgten mit dem Programm XDS (Kabsch, 2001).

5.4.4.2 Strukturlösung und Modellverfeinerung

Um aus den gewonnenen Reflexamplituden der Diffraktionsbilder durch Fouriertransformation Elektronendichten zu erhalten, muß die Phaseninformation

bekannt sein. Zur Lösung dieses sog. "Phasenproblems" wurde in dieser Arbeit die Methode des Molekularen Ersatzes verwendet. Für das Suchmodell wurde die Struktur 1E12 von Wt-HR verwendet und das Program AmoRE zur Lösung der Patterson-Suche angewendet. Die Meßdaten wurden in einem Auflösungsbereich von 3.5-20 Å verwendet.

Für die Verfeinerung der Daten (simulated-annealing, B-factor refinement, minimzing) wurde das Programm CNS in der Version 1.1 verwendet. Die Elektronendichtekarten wurden mit Hilfe des interaktiven Programms O, Version 7 (Jones et al., 1991) analysiert und Molekülbereiche manuell in die Elektronendichte eingepaßt. Das Strukturmodell wurde soweit verbessert, daß der R-Faktor, einem Maß für die Übereinstimmung zwischen beobachteter und aus dem Modell berechneter Strukturamplituden, für den Grundzustand der HR-Mutante T203V des Ansatzes bk516 ca. 22%, bzw. für das Strukturmodells des Intemediats 25% betrug.

5.4.4.3 Graphische Darstellung

Für die graphische Darstellung der Strukturdaten wurden die Programme SwissPDBViewer, sowie ViewerLite verwendet.

6. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (10 ⁻¹⁰ m)
bp	Basenpaare
BR	Bacteriorhodopsin
CP	Cytoplasma, cytoplasmatisch
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Extrazellulärraum, extrazellulär
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	rasche Protein-Flüssigkeitschromatographie (<i>fast protein liquid chromatography</i>)
GMF	Gesamtmembranfraktion
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
<i>H. salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
HR	Halorhodopsin
Kb	Kilobase(n)
KD	Kilodalton
λ	Wellenlänge
λ_{\max}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums
Mev	Mevinolin
MO	1-Monooleyl- <i>rac</i> -glycerol
OD _x	optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
OG	<i>n</i> -Octyl- β -glucosid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG _x	Polyethylenglykol (x: mittlere Molmasse)
Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPH	Sphäroblastenlösung

SR I	Sensorrhodopsin I
SR II	Sensorrhodopsin II
T	Temperatur
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-ethylendiamin (1,2-Bis(dimethylamino)-ethan)
TPP ⁺	Tetraphenylphosphonium
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
UV/Vis	Ultraviolett/Sichtbar (<i>Ultraviolet/Visible</i>)
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse

Für Aminosäuren wird der Einbuchstabencode verwendet.

7. Literaturverzeichnis

- Besir, H. (2001). „Untersuchung der lipidvermittelten Kristallisation der Ionenpumpen Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin aus *Halobacterium salinarum*“. Dissertation, LMU-München
- Brown, L. S., J. Sasaki, et al. (1995). „Glutamic acid 204 is the terminal proton release group at the extracellular surface of bacteriorhodopsin.“ J Biol Chem **270**(45): 27122-6.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., et al. (1998). „Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination“, Acta Cryst. **D54**, 905-921.
- Burmeister, W.P. (2000). „Structural changes in a cryo-cooled protein crystal owing to radiation damage“. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., **56**, 328-41.
- Caffrey, M. (2000). „A lipid's eye view of membrane protein crystallization in mesophases.“ Curr Opin Struct Biol **10**(4): 486-97.
- Caffrey, M. (2003). „Membrane protein crystallization.“ J Struct Biol **142**(1): 108-32.
- Cline, S.W., Lam, W.L., et al. (1989). „Transformation methods for halophilic archaeobacteria“. Can. J. Microbiol., **35**, 148-152.
- Duschl, A., M. A. McCloskey, et al. (1988). „Functional reconstitution of halorhodopsin. Properties of halorhodopsin-containing proteoliposomes.“ J Biol Chem **263**(32): 17016-22.
- Edman, K. (2002). „Energy transduction and sensory signalling in Haloarchaea“, Dissertation, Chalmers University of Technology, Göteborg (Sweden).

- Facciotti, M. T., S. Rouhani, et al. (2001). „Structure of an early intermediate in the M-state phase of the bacteriorhodopsin photocycle.“ Biophys J **81**(6): 3442-55.
- Falke, J. J., S. I. Chan, et al. (1984). „Halide binding by the purified halorhodopsin chromoprotein. II. New chloride-binding sites revealed by ³⁵Cl NMR.“ J Biol Chem **259**(4): 2185-9.
- Giacovazzo, C. (1992) „Fundamentals of Crystallography“. International Union of Crystallography, Oxford Science Publications, ISBN 0-19-855578-4
- Gordeliy, V. I., J. Labahn, et al. (2002). „Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex.“ Nature **419**(6906): 484-7.
- Haupts, U., J. Tittor, et al. (1997). „General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: the isomerization/switch/transfer (IST) model.“ Biochemistry **36**(1): 2-7.
- Havelka, W. A., R. Henderson, et al. (1995). „Three-dimensional structure of halorhodopsin at 7 Å resolution.“ J Mol Biol **247**(4): 726-38.
- Hubbard, R., Brown, P.K., et al. (1971). „Methodology of Vitamin A and visual pigments“. Methods Enzymol. **18C**, 615-623
- Jones, T., A., Zou, J., *et al.* (1991) „Improved Methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models“. Acta Crystallogr. A **47**, 110
- Kabsch, W. (1993). „Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants“ J. Appl. Cryst. **26**, 795-800

- Kolbe, M., H. Besir, et al. (2000). „Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution.“ Science **288**(5470): 1390-6.
- Kolbe, M. (2001). „Röntgenographische und spektroskopische Charakterisierung der lichtgetriebenen Ionenpumpe Halorhodopsin aus *Halobacterium salinaru*. Dissertation, LMU-München
- Lanyi, J. K. (1986). „Photochromism of halorhodopsin. cis/trans isomerization of the retinal around the 13-14 double bond.“ J Biol Chem **261**(30): 14025-30.
- Lanyi, J. K. (1986). „Mechanism of base-catalyzed Schiff base deprotonation in halorhodopsin.“ Biochemistry **25**(21): 6706-11.
- Lanyi, J. and B. Schobert (2002). „Crystallographic structure of the retinal and the protein after deprotonation of the Schiff base: the switch in the bacteriorhodopsin photocycle.“ J Mol Biol **321**(4): 727-37.
- Losi, A., A. A. Wegener, et al. (2001). „Thermodynamics of the early steps in the photocycle of *Natronobacterium pharaonis* halorhodopsin. Influence of medium and of anion substitution.“ Photochem Photobiol **74**(3): 495-503.
- Luecke, H., B. Schobert, et al. (1999). „Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 Å resolution.“ Science **286**(5438): 255-61.
- Luecke, H., B. Schobert, et al. (1999). „Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution.“ J Mol Biol **291**(4): 899-911.
- Luecke, H., B. Schobert, et al. (2000). „Coupling photoisomerization of retinal to directional transport in bacteriorhodopsin.“ J Mol Biol **300**(5): 1237-55.
- Liang, J., Edelsbrunner, H., Woodward, C. (1998). „Anatomy of Protein Pockets and Cavities: Measurement of Binding Site Geometry and Implications for Ligand Design“. Protein Science, **7**, 1884-1897.

- Michel, H. (1991). „General and Practical Aspects of Membrane Protein Crystallization“. Crystallization of membrane proteins, CRC Press, 73.
- Navazza, J. (1994). „AMoRe: an automated package for molecular replacement. Acta Crystallogr. **A50**, 157-163
- Neutze, R., E. Pebay-Peyroula, et al. (2002). „Bacteriorhodopsin: a high-resolution structural view of vectorial proton transport.“ Biochim Biophys Acta **1565**(2): 144-67.
- Nollert, P., H. Qiu, et al. (2001). „Molecular mechanism for the crystallization of bacteriorhodopsin in lipidic cubic phases.“ FEBS Lett **504**(3): 179-86.
- Nollert, P., J. Navarro, et al. (2002). „Crystallization of membrane proteins in cubo.“ Methods Enzymol **343**: 183-99.
- Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. (1971). „Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium“. Nature New Biol. **233**, 149-152
- Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. (1973). „Functions of a new photoreceptor membrane“. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 2853-2857
- Oesterhelt, D. (1982): “Reconstitution of the retinal proteins Bacteriorhodopsin and halorhodopsin“ Methods Enzymol., **88**, 10-17
- Oesterhelt, D. (1982): “Photophosphorylation and Reconstitution of Photophosphorylation in Halobacterial Cells“. Methods Enzymol., **88**, 350-355.
- Oesterhelt, D., Hegemann, P., et al. (1986). „Trans-cis isomerization of vretinal and a mechanism for ion translocation in halorhodopsin“. Eur. Biophys. J. **14**, 123-129.

- Okuno, D., M. Asaumi, et al. (1999). „Chloride concentration dependency of the electrogenic activity of halorhodopsin.“ Biochemistry **38**(17): 5422-9.
- Pebay-Peyroula, E., G. Rummel, et al. (1997). „X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases.“ Science **277**(5332): 1676-81.
- Plischka, P. (2001). „Untersuchungen zur Chemie, Isomerisierung und Farbe des Retinalchromophors in Bacteriorhodopsinmutanten“. Dissertation, LMU-München
- Ravelli, R.B., McSweeney (2000). „The 'fingerprint' that X-rays can leave on structures“. Structure Fold Des., **8**(3), 315-28
- Rouhani, S., J. P. Cartailler, et al. (2001). „Crystal structure of the D85S mutant of bacteriorhodopsin: model of an O-like photocycle intermediate.“ J Mol Biol **313**(3): 615-28.
- Royant, A., K. Edman, et al. (2000). „Helix deformation is coupled to vectorial proton transport in the photocycle of bacteriorhodopsin.“ Nature **406**(6796): 645-8.
- Royant, A., K. Edman, et al. (2001). „Spectroscopic characterization of bacteriorhodopsin's L-intermediate in 3D crystals cooled to 170 K.“ Photochem Photobiol **74**(6): 794-804.
- Rüdiger, M., U. Haupts, et al. (1995). „Chemical reconstitution of a chloride pump inactivated by a single point mutation.“ Embo J **14**(8): 1599-606.
- Rüdiger, M. (1996). „Mechanistische Untersuchungen an den lichtgetriebenen Ionenpumpen Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin aus *Halobacterium salinarum*“. Dissertation, LMU-München

- Rüdiger, M. and D. Oesterhelt (1997). „Specific arginine and threonine residues control anion binding and transport in the light-driven chloride pump halorhodopsin.“ Embo J **16**(13): 3813-21.
- Sass, H. J., G. Buldt, et al. (2000). „Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin.“ Nature **406**(6796): 649-53.
- Scherrer, P., Mathew, M.K., et al. (1989). „Retinal isomer ratio in dark-adapted purple membrane and bacteriorhodopsin monomers“. Biochemistry **28**, 829-834
- Schobert, B. and J. K. Lanyi (1986). „Electrostatic interaction between anions bound to site I and the retinal Schiff base of halorhodopsin.“ Biochemistry **25**(14): 4163-7.
- Schobert, B., J. Cupp-Vickery, et al. (2002). „Crystallographic structure of the K intermediate of bacteriorhodopsin: conservation of free energy after photoisomerization of the retinal.“ J Mol Biol **321**(4): 715-26
- Steiner, M., D. Oesterhelt, et al. (1984). „Halide binding by the purified halorhodopsin chromoprotein. I. Effects on the chromophore.“ J Biol Chem **259**(4): 2179-84.
- Teng, T., Moffat, K. (1998). „Cooling Rates During Flash Cooling“. J. Appl Cryst. **31**, 252-257
- Uhl, R., Meyer, B., et al. (1985). „A polychromatic flash photolysis apparatus“. J. Biochem. Biophys. Methods **10**, 35-48
- Varo, G., L. Zimanyi, et al. (1995). „Photocycle of halorhodopsin from Halobacterium salinarium.“ Biophys J **68**(5): 2062-72.

- Varo, G., L. S. Brown, et al. (1995). „Light-driven chloride ion transport by halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*. 1. The photochemical cycle.“ Biochemistry **34**(44): 14490-9.
- Varo, G., R. Needleman, et al. (1995). „Light-driven chloride ion transport by halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*. 2. Chloride release and uptake, protein conformation change, and thermodynamics.“ Biochemistry **34**(44): 14500-7.
- Weik, M., Ravelli, R.B., et al. (2000). „Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation“. Proc Natl Acad Sci. **97**, 623-8
- Zscherp, C., Heberle, J. (1997). „Infrared difference spectra of the intermediates L, M, N, and O of the Bacteriorhodopsin photoreaction obtained by time-resolved attenuated total reflection spectroscopy.“ J. Phys. Chem. **101**, 10542-10547

Internetadressen:

Bioedit: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

SwissPDBViewer: <http://www.expasy.org/spdbv/>

Abbildungen Kristallographie:

<http://www.uni-erlangen.de/docs/FAU/fakultaet/natl/www.lks.physik.uni-erlangen.de/>

8. Anhang

8.1 Liste der gesammelten und ausgewerteten Datensätze

Datensatz	Datum	Zellkonstante	Auflösung (Å)	R/R _{free}	Bemerkung
bk516_1_coll_1	03.03.02	94.5, 94.5, 157.1	20.0-1.7	0.23, 0.26	Grundzustand
bk516_1_coll_3	03.03.02	93.5, 93.5, 150.1	20.0-1.9	0.31, 0.33	Grundzustand
bk721_5_coll_1	09.11.02	94.5, 94.5, 158.4	20.0-1.9	0.22, 0.23	Grundzustand
bk516_2_coll_1	03.03.02	95.0, 95.0, 157.7	20.0-1.9	0.24, 0.26	Intermediat
bk721_2_coll_1	09.11.02	95.4, 95.4, 158.4	20.0-1.9	0.26, 0.28	Intermediat
bk721_coll_1	09.11.02	94.6, 94.6, 157.3	20.0-1.9	0.24, 0.26	Intermediat
bk726_coll_1	02.09.02	94.7, 94.7, 157.8	20.0-2.0	0.24, 0.27	Intermediat
bk713_coll_2	11.09.02	94.7, 94.7, 157.1	20.0-2.0	0.25, 0.28	Grundzustand, Br
bk713_coll_1	11.09.02	94.8, 94.8, 157.9	20.0-2.5	0.30, 0.36	Intermediat, Br
bk808_coll_2	25.11.02	94.7, 94.7, 157.0	20.0-2.4	0.21-0.26	Grundzustand, Br
bk808_coll_4	25.11.02	94.6, 94.6, 156.3	20.0-2.6	0.23-0.30	Intermediat, Br

8.2 Pipettierschema für einen typischen Kristallisationsansatz in der kubischen Lipidphase

Ansatz Nr.:	T203V2		pH=7.5; 3.0M KCl		Puffer mit 50mM Tris pH7.0				Datum:	15.03.02
Ansatz-Nr.:	Lipid (mg)	Lipid %	Liquid %	c(Prot.) (mg/ml)	VProt.-Stock (µl)	Vbuffer (µl)	Vfinal (µl)	HR-Mutante	Puffer	Bemerkungen
BK/ 578	6,1	54	46	3,5	2,64	2,56	11,30	T203V	20% OG, 3.5M KCl	
BK/ 579	5,0	54	46	3,5	2,16	2,10	9,26	T203V	20% OG, 3.5M KCl	
BK/ 580	5,7	54	46	3,5	2,46	2,39	10,56	T203V	20% OG, 3.5M KCl	
BK/ 581	5,4	54	46	3,5	2,33	2,27	10,00	T203V	20% OG, 3.5M KCl	
BK/ 582	5,1	52	48	3,5	2,29	2,42	9,81	T203V	20% OG, 3.5M KCl	
BK/ 583	5,2	52	48	3,5	2,33	2,47	10,00	T203V	20% OG, 3.5M KCl	
BK/ 584	5,9	52	48	3,5	2,65	2,80	11,35	T203V	20% OG, 3.5M KCl	
BK/ 585	5,5	52	48	3,5	2,47	2,61	10,58	T203V	20% OG, 3.5M KCl	
BK/ 586	5,2	50	50	3,5	2,43	2,77	10,40	T203V	20% OG, 3.5M KCl	
BK/ 587	5,4	50	50	3,5	2,52	2,88	10,80	T203V	20% OG, 3.5M KCl	
BK/ 588	5,5	50	50	3,5	2,57	2,93	11,00	T203V	20% OG, 3.5M KCl	
BK/ 589	5,3	50	50	3,5	2,47	2,83	10,60	T203V	20% OG, 3.5M KCl	
BK/ 590	5,1	54	46	3,5	2,20	2,14	9,44	T203V	18% OG, 3.5M KCl	
BK/ 591	6,0	54	46	3,5	2,59	2,52	11,11	T203V	18% OG, 3.5M KCl	
BK/ 592	5,5	54	46	3,5	2,38	2,31	10,19	T203V	18% OG, 3.5M KCl	
BK/ 593	5,2	54	46	3,5	2,25	2,18	9,63	T203V	18% OG, 3.5M KCl	
BK/ 594	5,7	52	48	3,5	2,56	2,70	10,96	T203V	18% OG, 3.5M KCl	
BK/ 595	5,5	52	48	3,5	2,47	2,61	10,58	T203V	18% OG, 3.5M KCl	
BK/ 596	5,3	52	48	3,5	2,38	2,51	10,19	T203V	18% OG, 3.5M KCl	
BK/ 597	5,4	52	48	3,5	2,42	2,56	10,38	T203V	18% OG, 3.5M KCl	
BK/ 598	5,7	50	50	3,5	2,66	3,04	11,40	T203V	18% OG, 3.5M KCl	
BK/ 599	5,9	50	50	3,5	2,75	3,15	11,80	T203V	18% OG, 3.5M KCl	
BK/ 600	5,3	50	50	3,5	2,47	2,83	10,60	T203V	18% OG, 3.5M KCl	
BK/ 601	5,8	50	50	3,5	2,71	3,09	11,60	T203V	18% OG, 3.5M KCl	
BK/ 602	5,5	54	46	3,5	2,38	2,31	10,19	T203V	16% OG, 3.5M KCl	
BK/ 603	5,3	54	46	3,5	2,29	2,22	9,81	T203V	16% OG, 3.5M KCl	
BK/ 604	5,5	54	46	3,5	2,38	2,31	10,19	T203V	16% OG, 3.5M KCl	
BK/ 605	6,1	54	46	3,5	2,64	2,56	11,30	T203V	16% OG, 3.5M KCl	
BK/ 606	6,0	52	48	3,5	2,69	2,85	11,54	T203V	16% OG, 3.5M KCl	
BK/ 607	5,6	52	48	3,5	2,51	2,66	10,77	T203V	16% OG, 3.5M KCl	
BK/ 608	5,9	52	48	3,5	2,65	2,80	11,35	T203V	16% OG, 3.5M KCl	
BK/ 609	5,7	52	48	3,5	2,56	2,70	10,96	T203V	16% OG, 3.5M KCl	
BK/ 610	4,6	50	50	3,5	2,15	2,45	9,20	T203V	16% OG, 3.5M KCl	
BK/ 611	4,9	50	50	3,5	2,29	2,61	9,80	T203V	16% OG, 3.5M KCl	
BK/ 612	5,3	50	50	3,5	2,47	2,83	10,60	T203V	16% OG, 3.5M KCl	
BK/ 613	6,0	50	50	3,5	2,80	3,20	12,00	T203V	16% OG, 3.5M KCl	
				Ges.-Vol:	68,84					
Prot.-Stock)=		15		mg/ml						

An dieser Stelle danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Oesterhelt danke ich für die fortwährende großzügige Unterstützung, die vielen Anregungen, das Interesse am Fortgang der Arbeit und die Möglichkeit eigenen Ideen nachzugehen.

Weiterhin möchte ich mich im Besonderen bei weiteren Personen bedanken:

Dr. Jörg Tittor, dem Semantiker, danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft, sowie die zahlreichen kulinarischen Gespräche.

Dr. Kornelius Zeth danke ich für die zahlreichen Anregungen und für die große Hilfe bei der Einarbeitung in das umfassende Thema der Kristallographie und Strukturlösung: Synchrotron-Trips müssen nicht langweilig sein!

Weiterhin danke ich Brigitte Kessler, vielleicht die beste TA der Welt. Auf alle Fälle haben wir eine sehr nette und produktive gemeinsame Zeit verbracht.

Auch gilt mein besonderer Dank Christoph Oppawsky, mit dem ich meine Kaffeeliebe teilen konnte und für die vielen unterhaltsamen Zeiten.

Ich danke auch Frau Eleonore Haack nicht nur für Ihre administrative Unterstützung, sondern auch für zahlreiche anregende Gespräche.

Ich danke auch Dr. Stefan Paula für die Hilfe bei der Spektroskopie und die lustige gemeinsame Zeit. Gunilla Carlsson danke ich für die Spektroskopie der Kristalle und für ihre nette hilfsbereite Art.

Weiterhin danke ich Dr. Bianca Marg, meiner besten Labornachbarin: geteiltes Leid ist halbes Leid. Hier gilt auch mein Dank meinen „Mitbewohnern“ des Schreibzimmers: Christian Klein danke ich für die zahlreichen politischen Diskussionen und für den Einblick, daß man als Sozialist durchaus zwei Autos (Porsche und Bulli), ein Haus auf dem Lande besitzen darf und mit der Arbeit eines Unternehmensberater liebäugeln kann. Miriam Aregger danke ich ebenso für die zahlreichen Diskussionen und die nette Zeit: Die Schweizer sind ein wirklich nettes Bergvolk.

Ansonsten danke ich dem Oe-Labor: Jens Twellmayer, Andy Wende, Sabine Thiessen. Im Besonderen danke ich hier Bettina Brustmann, die mir nicht nur fachlich eine Hilfe war und Sussanne von Gronau für die netten Mittagessen.

Mein Dank gilt auch Dr. Christian Benda und Dr. Andreas Schaer. Wir haben eine lustige Zeit gehabt. Es lebe „Superexpress“!

Zuletzt danke ich meiner Familie, die mich in guten wie in schlechten Zeiten immer unterstützt hat! Ich danke ganz herzlich meiner Frau, Julia, mit der ich diesen Weg gemeinsam gegangen bin:

Das Leben beginnt erst jetzt!

Lebenslauf

Name	Walter Gmelin
Geburtsdatum	15. Juli 1970
Geburtsort	Wolfratshausen
Schulbildung	
1976-1980	Grundschule Weidach, Grundschule Icking
1980-1989	Gymnasium Icking
1989	Allgemeine Hochschulreife
Studium	
1989-1993	Studium der technischen Physik an der TU München
1993-1999	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Mai 1998	Diplomhauptprüfung
Juli 1998 - Januar 1999	Diplomarbeit am Genzentrum München in der Arbeitsgruppe Prof. Famulok: Zeitaufgelöste Charakterisierung von Ribozymen durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
Promotion	
April 1999 – September 2003	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie bei Prof. Oesterhelt: Mechanistische Untersuchungen an der lichtgetriebenen Ionenpumpe Halorhodopsin – die Röntgenstruktur des L ₁ -Intermediats
Seit September 2003	Fluka Chemie GmbH, Buchs SG (Schweiz)

