

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

**Röntgenographische und spektroskopische Charakterisierung der  
lichtgetriebenen Ionenpumpe Halorhodopsin  
aus *Halobacterium salinarum***

Michael Kolbe

aus

München

München, 2001



## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Absatz 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29.01.1998 von Prof. Dr. D. Oesterhelt betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 30.08.2001

.....  
Michael Kolbe

Dissertation eingereicht am: 3.09.2001

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2002

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Gärtner



# 1 Inhaltsangabe

---

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>4</b>
<b>2. ZIELSETZUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>3. EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
3.1. VORKOMMEN UND FUNKTION VON RETINALPROTEINEN .....	8
3.2. LICHTGETRIEBENE ARCHAEALE IONENPUMPEN .....	12
3.3. EIGENSCHAFTEN HALOPHILER ORGANISMEN .....	18
3.4. SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG VON PROTEINEN .....	21
3.4.1. <i>Röntgenstrukturanalyse</i> .....	21
3.4.1.1. Beugung von Röntgenstrahlung an Kristallen .....	21
3.4.1.2. Berechnung der Elektronendichte.....	24
3.4.1.3. Lösung des Phasenproblems .....	25
3.4.2. <i>FT-IR- und -Raman-Spektroskopie</i> .....	27
3.5. ANREICHERUNG VON PHOTOZYKLUSINTERMEDIATEN.....	29
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
4.1. EINFÜHRUNG .....	33
4.1.1. <i>Strukturuntersuchungen an HR</i> .....	33
4.1.2. <i>HR-Tieftemperaturintermediate</i> .....	36
4.2. PROTEINREINIGUNG .....	36
4.3. KRISTALLISATION DES HALORHODOPSIN WILDTYPS SOWIE EINIGER MUTANTEN .....	37
4.4. RÖNTGENSTRUKTURANALYSEN .....	41
4.4.1. <i>Datensammlung</i> .....	41
4.4.2. <i>Molekularer Ersatz (Molecular Replacement), Modellbau und Verfeinerung</i> ..	42
4.5. STRUKTUR DES AUSGANGSZUSTANDES (HR578).....	43
4.5.1. <i>Die Kristallpackung</i> .....	43
4.5.2. <i>Der Aufbau des HR-Trimers</i> .....	44
4.5.3. <i>Die Chloridbindungsstelle</i> .....	46
4.6. LAUE DIFFRAKTION .....	49
4.7. STATISCHE UV/VIS-SPEKTROSKOPIE AN KRISTALLEN .....	51
4.7.1. <i>Das K-Intermediat</i> .....	51
4.7.2. <i>Das L-Intermediat</i> .....	56
4.8. FT-IR- UND -RAMAN-SPEKTROSKOPIE AN KRISTALLEN .....	58
<i>Vergleich von Kristall- und Suspensionsspektren</i> .....	58
4.8.2. <i>Bestimmung des Isomerenverhältnisses in HR-Kristallen</i> .....	62
4.8.3. <i>Temperaturstudie des L<sub>I</sub>/L<sub>II</sub>-Übergangs in HR-Kristallen</i> .....	65
4.9. MALDI-TOF SPEKTROSKOPIE AN HR- UND BR-ISOLATEN .....	69



<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
5.1. THEORIE DER KRISTALLISATION VON MEMBRANPROTEINEN IN MESOPHASEN .....	73
5.2. VERGLEICH DER TERTIÄRSTRUKTUREN VON HR UND BR.....	79
5.3. DIE RETINALBINDUNGSTASCHE .....	80
5.4. DIE QUARTÄRSTRUKTUREN VON HR UND BR .....	84
5.5. KONSERVIERTE AMINOSÄUREN ARCHAEALER RETINALPROTEINE .....	86
5.6. DIE CHLORIDBINDUNGSSTELLE.....	91
5.6.1. <i>Selektivität versus Spezifität</i> .....	94
5.6.2. <i>Der Palmitinsäure-Protein-Komplex</i> .....	95
5.7. TRANSPORTMODELL DER ARCHAEALEN IONENPUMPEN HR UND BR .....	96
5.8. PUTATIVE CHLORID-AUFNAHME UND -ABGABE .....	102
5.9. MÖGLICHER TRANSPORTWEG DES SUBSTRATES DURCH HR .....	104
5.10. SPEKTROSKOPISCHE ANALYSE VON PHOTOZYKLUSINTERMEDIATEN .....	106
5.10.1. <i>UV/VIS-Spektroskopie</i> .....	106
5.10.2. <i>FT-IR und -Raman Spektroskopie an HR-Kristallen</i> .....	108
5.10.3. <i>Konformationsänderungen im HR-Kristall</i> .....	110
<b>6. AUSBLICK.....</b>	<b>113</b>
<b>7. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>114</b>
7.1. MATERIAL.....	114
7.1.1. <i>Reagentien und Enzyme</i> .....	114
7.1.2. <i>Sonstige Materialien</i> .....	114
7.1.3. <i>Stämme</i> .....	115
7.1.4. <i>Nährmedien</i> .....	115
7.1.5. <i>Puffer und Lösungen</i> .....	116
7.2. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN .....	119
7.3. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN .....	119
7.3.1. <i>HR-Isolierung</i> .....	119
7.3.2. <i>HR-Kristallisation</i> .....	120
7.3.3. <i>Mechanische Isolierung von HR-Kristallen aus Lipidphasen</i> .....	121
7.3.4. <i>Isolierung von HR-Kristallen mittels Lipaseverdau</i> .....	122
7.3.5. <i>BR-Isolierung</i> .....	122
7.3.6. <i>BR-Wildtyp</i> .....	122
7.3.7. <i>BR-Kristallisation nach "klassischen" Methoden</i> .....	123
7.3.7.1. <i>Primärsolubilisierung</i> .....	123
7.3.7.2. <i>Detergenzwechsel</i> .....	124
7.3.7.3. <i>Kristallisationsversuche</i> .....	124
7.3.8. <i>BR-Kristallisation in artifiziellen Membransystemen</i> .....	125



# 1 Inhaltsangabe

---

7.3.8.1.	Solubilisierung .....	125
7.3.8.2.	Reinigung .....	125
7.3.8.3.	Kristallisationsversuche .....	126
7.3.9.	<i>Isolierung archaealer Lipidfraktionen</i> .....	126
7.3.10.	<i>Herstellung und Isolierung isotope-markierten BR's</i> .....	127
7.3.10.1.	Herstellung isotope-markierten Algenmediums .....	127
7.3.10.2.	Herstellung isotope-markierten Algenmediums .....	128
7.3.10.3.	Probenpräparation für die NMR-Spektroskopie .....	129
7.3.11.	<i>Spektroskopische Methoden</i> .....	130
7.3.11.1.	UV/VIS-Spektroskopie .....	130
7.3.11.2.	FTIR-Spektroskopie .....	131
7.3.11.3.	Proteinkristallographische Methoden .....	131
7.3.11.3.1.	Datensammlung .....	131
7.3.11.3.2.	Daten-Indizierung, -Integration und Datenreduktion .....	132
7.3.11.3.3.	Molekularer Ersatz .....	132
7.3.11.3.4.	Laue Diffraktionsstudien .....	132
7.3.11.3.5.	Graphische Darstellungen .....	132
<b>8.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b> .....	<b>133</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>135</b>
9.1.	ZUSAMMENFASSUNG DER FT-IR UND MIKRO-RESONANZ-RAMAN DATEN .....	135
9.1.1.	<i>Resonanz-Raman Schwingungsbanden am Kristall bei 568 nm</i> .....	135
9.1.2.	<i>Liste der gesammelten Datensätze an HR-Kristallen</i> .....	136
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>139</b>
<b>11.</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>140</b>
<b>12.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>142</b>
<b>13.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>147</b>



## 1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung, die Kristallisation und die Röntgenstrukturanalyse der lichtgetriebenen Anionenpumpe Halorhodopsin (HR) aus *Halobacterium salinarum* vorgestellt. Aufbauend auf die 3-dimensionale Struktur von HR und von Bakteriorhodopsin (BR) wird ein Modell des Ionentransportes (Protonen und Halidionen) in archaealen Ionenpumpen entwickelt, welches die unterschiedliche Spezifität und Vektorialität dieser Retinalproteine mit Rücksicht auf die bekannten biochemischen Daten erklärt. Eine quantitative Analyse der Chromophorenkonformation im HR-Grundzustand (Resonanz-Raman-Spektroskopie) sowie lichtinduzierter Veränderungen (UV/VIS- und FTIR-Spektroskopie) vervollständigt die Beschreibung der HR-Kristalle und ermöglicht die Durchführung weitergehender Strukturanalysen zum Anionentransport in HR.

Es schließt sich eine detaillierte Beschreibung der Beobachtungen zur HR-Kristallisation an und abschließend wird eine Hypothese zur Kristallisation integraler Membranproteine in Gegenwart von Lipidphasen entwickelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Modifikationen entsprechend Duschl *et al.* (1988)<sup>[1]</sup> ein Isolierungsprotokoll für die Reinigung von HR (HR-Mutanten) im mg-Maßstab etabliert. In Anlehnung an die Kristallisation von BR in kubischen Lipidphasen<sup>[19]</sup> konnte eine Methode zur Kristallisation des HR-Wildtyps wie auch verschiedener Mutanten (u. a. T111V, R108 Q und K) entwickelt werden. Auf dieser Basis wurden ebenfalls "Kokristalle" des Wildtyps in Gegenwart von Bromidionen sowie Kristalle der Mutante R108Q in mit und ohne zusätzliches Guanidiniumhydrochlorid gezüchtet, deren Röntgenstrukturanalyse (HR-Mutanten, Kokristalle) derzeit noch nicht abgeschlossen.

Die HR-Mikrokristalle beugen monochromatische Röntgenstrahlung bis zu hoher Auflösung. Selbst bei extrem kurzen Belichtungszeiten mit polychromatischer Röntgenstrahlung werden Diffraktionsmuster bis ca. 2.5 Å beobachtet was prinzipiell auch zukünftige, zeitaufgelöste Röntgenbeugungsexperimente an HR ermöglichen sollte.

Die Strukturlösung erfolgte mittels molekularem Ersatzes, basierend auf einem reduzierten Modell der BR-Struktur<sup>[19]</sup>. Das atomare Modell des HR-Grundzustandes konnte anschließend bis zu einer Auflösung von 1,8 Å bei einem kristallographischen R-Faktor von 23,7 bestimmt werden.

Diese erstmalig beobachtete 3-dimensionale Struktur einer Anionenpumpe zeigt, daß im Grundzustand ein Chloridion pro HR-Molekül nahe der protonierten Schiff Base (PSB) gebunden ist. Anion und PSB, des im all-trans Konformer vorliegenden Chromophors, bilden ein Ionenpaar (Distanz 3,8 Å). Die Chloridbindungsstelle stabilisiert das Anion, welches umgeben von drei Wassermolekülen inmitten der Membran ca. 18 Å von der zytoplasmatischen Oberfläche entfernt lokalisiert ist. Zwischen Substrat und Protein gibt es lediglich eine



Wasserstoffbrücke, die durch insgesamt 10 Van der Waals-Kontakte zu aliphatischen Wasserstoffen ergänzt wird. Hinzu kommen elektrostatische Stabilisierungen des Anions über ein nahe gelegenes protoniertes Arginin, dessen Anteil an der Substratbindung bereits eindeutig biochemisch belegt werden konnte, sowie durch die positiv geladene PSB. Die unregelmäßige erste Atomschicht und deren vorwiegend hydrophober Charakter erklären die niedrige Affinität des Proteins zu verschiedenen Halidionen (10-40 mmol).

HR liegt im Kristall gefaltet in sieben transmembrane Helices in Form von Trimeren im Verhältnis 1:1 mit Palmitinsäure vor. Das Trimer wird über eine Vielzahl konservierter Aminosäuren - die Protein/Protein- als auch Protein/Lipid-Kontakte bilden - stabilisiert und ist zur zytoplasmatischen Oberfläche kelchartig geöffnet. Die Kristallpackung, der schichtweise parallel angeordneten Trimere, entspricht dem Aufbau sogenannter Typ I Kristalle, wie sie bereits vor 15 Jahren vorhergesagt wurde<sup>[154]</sup>. Der kristallographische Nachweis der Palmitinsäure in räumlicher Nähe zur Chloridbindungsstelle deckt sich mit älteren Untersuchungen, die eine Affinität von HR zum Lipid und eine Abhängigkeit des Opsinshifts und der Photozykluskinetik von diesem Lipid belegen.

Aus Sicht der unterschiedlichen Ionenspezifität und Transportrichtung ist die sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit zur Protonenpumpe Bakteriorhodopsin des gleichen Organismus überraschend. Die beiden lichtgetriebenen Ionenporter zeigen starke Ähnlichkeit in der relativen Anordnung vieler konservierter Aminosäuren, wichtiger Wasserstoffbrückenbindungen und gebundener Wassermoleküle. Hinzu kommen konservierte Helixdeformationen ( $\pi$ -bulge,  $3_{10}$ -Helix), die nahe dem Chromophor gelegen, eine Funktion im Transportzyklus vermuten lassen.

Auf Grund der Ähnlichkeiten in den Photozyklen beider Retinalproteine und der strukturellen Übereinstimmungen wird ein vereinheitlichendes mechanistisches Modell für die Ionen-transportprozesse bis zum L (HR) bzw. M (BR) Intermediat aufgestellt. Die vorgestellte Beschreibung erlaubt es, sämtliche nachgewiesenen Transportmoden (transportierte Ionen, Transportrichtung) der Ionenpumpen zu erfassen. Kern dieses Transportmodells ist die lichtinduzierte Änderung des vektoriiellen Dipolmoment der PSB und ein daran ausgerichtete Ionen-transport.

Durch die Analyse der Oberflächenladung und der B-Faktorverteilung wurden Vorhersagen zur Chlorid-Aufnahme und Abgabe in HR abgeleitet. Zusammen mit einer Betrachtung der HR-internen Kavitäten sowie der konservierte Aminosäuren verschiedener Halopsine ergibt sich ein potentieller Transportweg des Substrates durch das gesamte Molekül.

Für weitere Strukturanalysen wurden durch Variation von Anregungstemperatur und Belichtungs-Wellenlänge Protokolle zur Anreicherung von HR-Photozyklusintermediaten entwickelt. Die qualitative und quantitative Analyse (mittels UV/VIS-Spektroskopie) erfolgte am HR-Wildtyp für das K- und das L-Intermediat.



Darüberhinaus gelang es mittels (Mikro)-Resonanz-Raman und FTIR-Spektroskopie an Einzel-Kristallen (in Zusammenarbeit mit J. Heberle, KFI Jülich) eine Bestimmung des Retinal-Isomerenverhältnisses vorzunehmen, sowie den putativen Übergang von L<sub>I</sub> nach L<sub>II</sub> näher zu charakterisieren.

Den Abschluß der *in situ* Kristalluntersuchungen bilden massenspektroskopische Analysen (MALDI-TOF), die für HR- und BR-Kristalle miteinander verglichen werden.

Basierend auf den Beobachtungen zur Kristallisation von HR und BR in Lipidphasen wurde ein Modell der zu Grunde liegenden Prozesse aufgestellt. Dieses setzt das Kristallwachstum und den Aufbau der Lipidphase miteinander in Beziehung. Mit diesem Modell für Membranproteine und Lipidphase kann die Entstehung von Typ I-Kristallen erklärt werden und es lassen sich Vorhersagen für weitere Experimente treffen.



## 2. Zielsetzung

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die Analyse der vektoriellen Katalyse archaealer Ionenpumpen mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse oder der NMR-Spektroskopie.

Zu diesem Zweck waren Kristallisationsexperimente an HR und BR sowie an einigen, bereits verfügbaren Mutanten durch zu führen. Darüber hinaus sollte spezifisch isotopenmarkiertes BR für die Flüssigphasen-NMR-Spektroskopie hergestellt werden.

Neben der Röntgenstrukturanalyse sollten weitere zerstörungsfreie spektroskopische Methoden an Proteinkristallen zum Einsatz kommen. Mit der geplanten in situ Analyse waren die Art und der Anteil photochemisch erzeugter Katalyseintermediate für die zukünftigen Röntgenbeugungsexperimenten zu charakterisieren.



### 3. Einleitung

#### 3.1. Vorkommen und Funktion von Retinalproteinen

Die Umwandlung von Sonnenenergie zum Antrieb biochemischer Reaktionen (als auch der Schutz vor schädigender Strahlung) ist die Grundlage der Lebensvorgänge auf der Erde. Phototrophe Prozesse (Photosynthese, Stofftransport) ebenso wie die Photorezeption (Phototaxis, Sehvermögen) laufen sowohl auf der Basis vergleichsweise einfacher Systeme als auch in komplexen supramolekularen Proteinkomplexen ab. Obgleich der in der Biologie weit verbreiteten Photoprozesse werden lediglich wenige, chemisch differente Chromophore zur Lichtabsorption genutzt<sup>[2]</sup>.

Die Retinyliden Proteine, sind eine, weit verbreitete, Klasse von Chromoproteinen (mehr als

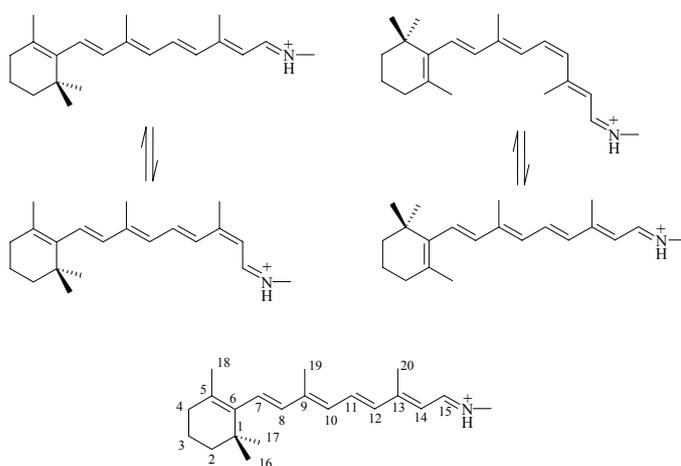


Abb. 1: Retinalkonfigurationen und Isomerisierung in archaealen (links) und eukaryotischen Rhodopsinen (rechts), unten: Bezifferungsnomenklatur des Retinals

300 bis dato bekannt), deren Vertreter sowohl in Prokaryonten (Bakteria und Archaea) als auch in Eukaryonten nachgewiesen wurden. Das gemeinsame Merkmal dieser lichtumwandelnden Proteine ist die prosthetische Gruppe, das sogenannte Retinal, oder dessen Derivate (Abb. 1).

Zwei in ihren Primärstrukturen recht unterschiedliche Subklassen (konvergente Evolution hinsichtlich der Proteinfaltung) sind die archaealen Rhodopsine sowie die Rhodopsine höherer

Eukaryonten (u. a. Lichtrezeptoren des Auges auch Visual Pigments, VP's, genannt)<sup>[25][3]</sup>. Beiden Klassen gemeinsam ist die kovalente Bindung des Chromophors Retinal (als Vitamin-A Aldehyd) an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins in Helix G (auch Helix 7 genannt) als protonierte Schiffsche Base (PSB)<sup>[4][5]</sup>. Ebenfalls identisch ist die Faltung dieser Proteine in sieben membranspannende Helices<sup>[6]</sup>. Trotz dieser Gemeinsamkeiten zeigen die Apoproteine beider Klassen, genannt Opsine, keine Sequenzhomologie und auf der Basis der bisher erbrachten strukturellen Informationen ein unterschiedliches Arrangement der sieben Helices zueinander.

Ebenfalls zu unterscheiden ist die Konformation des gebundenen Chromophors in beiden Klassen. Während die unbelichteten archaealen Rhodopsine eine (all-trans, 15-anti)- Konformation einnehmen (siehe Abb. 1, links oben), wurde für die VP's eine 11-cis Konformation



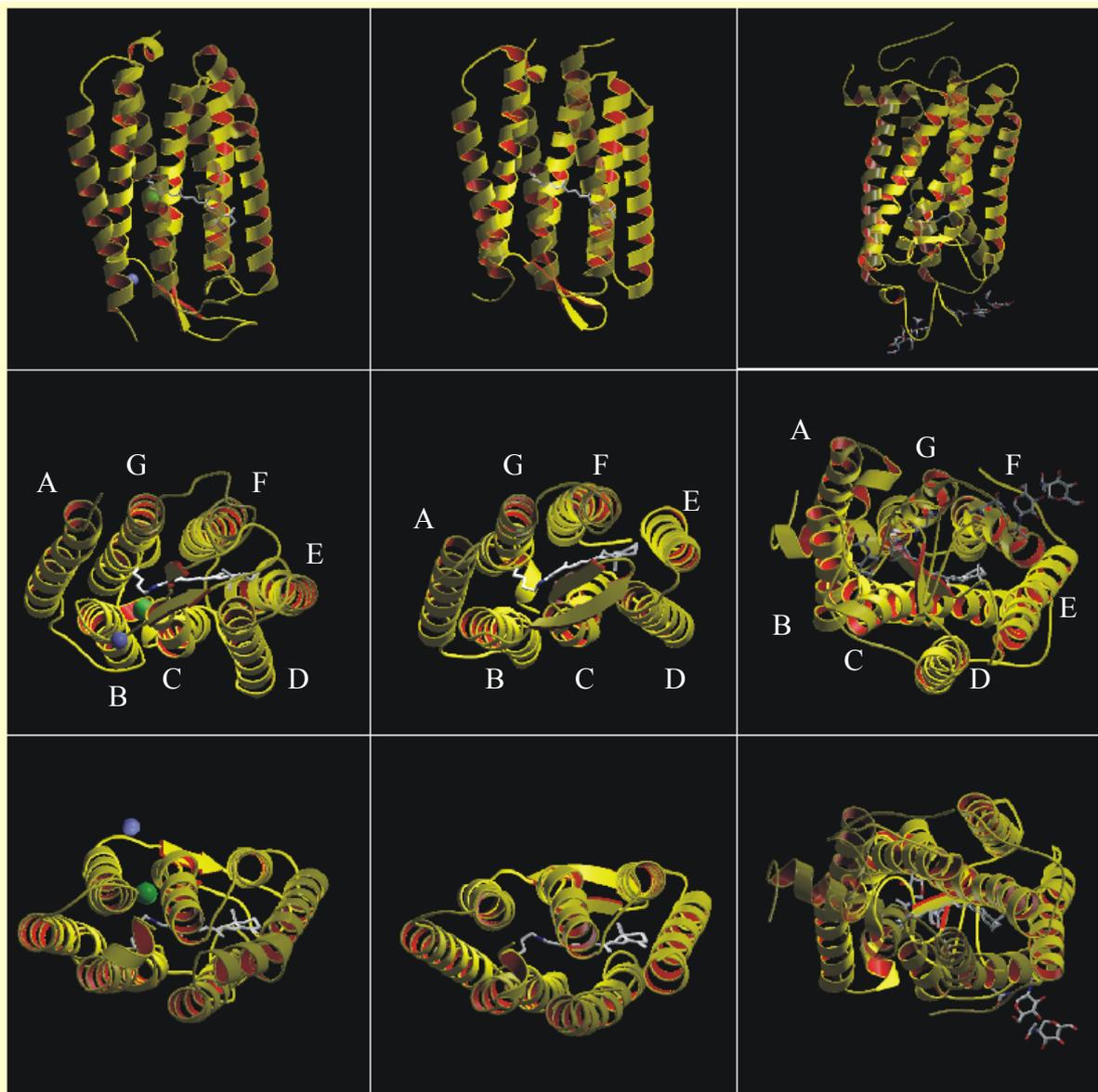


Abb. 2: Vergleich der Tertiärstrukturen der bis dato röntgenographisch charakterisierten Rhodopsine Halorhodopsin<sup>[11]</sup> (linke Spalte) und Bacteriorhodopsin<sup>[12]</sup> (mittlere Spalte) aus *H. salinarum*, Rhodopsin (rechte Spalte) aus Rind<sup>[13]</sup>; die Spalten zeigen von oben nach unten ähnliche Ansichten von der Seite auf die Helices A, B und C im Vordergrund liegend sowie der extrazellulären (Mitte) und der cytoplasmatischen bzw. intradiskalen Seite (unten)

des Chromophors im unbelichteten Zustand nachgewiesen<sup>[7]</sup> (siehe Abb. 1, rechts oben). Die Konformation an C<sub>6</sub>- C<sub>7</sub> (siehe Abb. 1 unten) unterscheidet sich ebenfalls und zwar in ein 6-s-trans- (archaeale Rhodopsine) bzw. 6-s-cis-Isomer (VP's)<sup>[8][25]</sup>.

Eine Ähnlichkeit zu den archaealen Rhodopsinen hinsichtlich der Chromophorenkonfiguration weisen die Retinochrome höherer Eukaryonten dar, deren Aufgabe -wahrscheinlich die Regeneration von 11-cis Retinal- eine Bindung des all-trans Isomers nahelegt<sup>[9]</sup>. Lichtabsorption des Chromophors hat für archaeale Rhodopsine die Isomerisierung von all-trans zum 13-cis Retinal zur Folge<sup>[10]</sup> (siehe Abb. 1 links). Im Unterschied dazu "photoisome-



risieren“ VP's (siehe Abb. 2 rechts) von 11-cis nach all-trans, um dann in weiteren Reaktionen die Schiff Base (SB) zu hydrolysieren<sup>[7]</sup>.

In Abb. 2 sind vergleichend die Tertiärstrukturen (Proteinrückgrat) aller bis dato röntgenographisch bestimmten Retinalproteine dargestellt<sup>[11][12][13]</sup>. Deutliche Ähnlichkeit ist in der relativen Anordnung der Helices bei den archaealen Rhodopsinen (linke und mittlere Spalte) zu erkennen. In beiden archaealen Rhodopsinen spannen sieben transmembrane Helices einen im unbelichteten Zustand ausschließlich zur extrazellulären Seite geöffneten Kanal auf. Der Chromophor teilt diesen Kanal in eine extrazelluläre (ez) und eine zytoplasmatische (zp) Halbseite. Weiterhin Ähnlichkeit besteht im antiparallelen Falblatt der verbindenden Schleife zwischen Helix B und C auf der zp-Halbseite (linke und mittlere Spalte, Mitte).

Mit ebenfalls einer Polypeptidkette weist Rhodopsin (RH) im unbelichteten Zustand eine starke Verkippung der Helices gegeneinander sowie Helixdeformationen (Aufweitungen und Knicke) in allen sieben transmembranen Helices auf (rechte Spalte). Von den insgesamt sieben Helixstörungen in RH sind sechs auf den Verlust von Wasserstoffbrücken im Proteinrückgrat, jeweils induziert durch ein Prolin (P53, P170, P215, P267, P291 und P303), zurück zu führen. Weitere drei Störungen der Helixstruktur, die nicht auf Prolin basieren (Threonin 92, Valin 129 und Valin 300) kommen in RH hinzu. Interessanterweise sind in Rhodopsin, bis auf den Knick in Helix A, der auf P53 zurückgeführt werden kann, alle oben aufgeführten Positionen in direkter Nachbarschaft zum Chromophor. Der Chromophor selbst ist in Rhodopsin in Richtung der ez-Oberfläche verschoben (siehe Abb. 2, rechte Spalte, oben).

Abschließend sei erwähnt, daß Rhodopsin im Unterschied zu den archaealen Rhodopsinen in mindestens zwei Positionen glykosyliert ist, eine Disulfidbrücke aufweist sowie am Carboxyterminus zumindest in zwei Positionen palmitoyliert ist (Cysteinpaar)<sup>[25]</sup>. Da die Palmitoylierungsstellen sowie weitere Teile der potentiellen G-Protein-Bindestelle in der Röntgenstruktur nicht aufgelöst sind, kann über die Signalweitergabe dieses Lichtrezeptors nur spekuliert werden.

Das (je nach Organismus) mit 35-50 kDa im Vergleich zu den archaealen Rhodopsinen mit ca. 27 kDa hohe Molekulargewicht der VP's<sup>[14]</sup> schlägt sich vorwiegend in den deutlich größeren intradiskalen und zytoplasmatischen Bereichen nieder. Diese u. a. für die G-Protein-Bindung relevanten Bereiche zeigen in einer Vielzahl G-Protein gekoppelter Rezeptoren konservierte Sequenzen in den Schleifen-Bereichen zwischen Helices A bis C und D/E<sup>[15]</sup>.

Von Rhodopsin ist bekannt, daß es trotz seiner hohen Konzentration unter physiologischen Bedingungen in monomerer Form in den Disk-Membranen der Stäbchen vorliegt<sup>[16]</sup>. Für die beiden archaealen Ionenpumpen hingegen wurde z. T. lange vor den Röntgenstrukturuntersuchungen eine supramolekulare Anordnung bestehend aus Homotrimeren bzw. hexagonalen Membranbereichen (Bakteriorhodopsin) nachgewiesen<sup>[17][160]</sup>. Für diese Organisation



sind neben den direkten Wechselwirkungen über Oberflächenamino­säuren auch spezifische Protein/Lipid-Interaktionen<sup>[18]</sup> verantwortlich.

Weitere Retinyliden Proteine mit Ähnlichkeiten zu BR konnten vor kurzem in dem Pilz *Neurospora crassa*<sup>[19]</sup> sowie in einem nicht näher charakterisierten Bakterium<sup>[20]</sup> nachgewiesen werden. In diesen Proteinen ist neben dem retinalbindenden Lysin in Helix G analog zu den archaealen Bakteriorhodopsinen auch die Asparaginsäure in Position 85 konserviert. Dessen Carboxylgruppe ist der primäre Protonenakzeptor des SB-Protons im Anschluß an die Deprotonierung der PSB. Desweiteren sind Sequenzen in Helix G (DXXXXK in der Schleife), in Helix F (WXXYPXXW ) und das SB Gegenion in Helix C (RYXDWXXTTP), konserviert<sup>[25]</sup>. Dies, sowie Aktivitätsstudien, des in *E.coli* heterolog exprimierten Proteins, legen eine Verbreitung dieser Protonenpumpe auch in nicht archaealen Organismen nahe. Zhai *et al.*(2001)<sup>[21]</sup> veröffentlichten kürzlich eine Studie, in der sie auf Grund von Sequenzhomologien zu archaealen Rhodopsinen weitere 7 Trans-Membran Proteine (7 TM) vergleichbaren Molekulargewichtes identifizieren. Diese 7 TM Proteine werden in Hefen und Pilzen stressinduziert gebildet (durch Azidifizierung, organische Lösemittel oder Hitzeschock<sup>[22]</sup>). Darüberhinaus konnte eine Klasse humaner 7 TM Proteine hoher Sequenzhomologie mit Aufgabe im transmembranen Transport von Cystein identifiziert werden<sup>[23]</sup>.



### 3.2. Lichtgetriebene archaeale Ionenpumpen

Archaeale Rhodopsine dienen als Ionenpumpen, Phototaxis Rezeptoren<sup>[25]</sup>, während eukaryotische Rhodopsine als photosensitive Rezeptorproteine<sup>[24]</sup> identifiziert wurden.

Vor nunmehr 30 Jahren gelang es erstmals aus der Zellmembran des Archaeons *Halobacterium salinarum* (*H. salinarum* ehemals *H. halobium*) eine kristalline Proteinfraction zu iso-

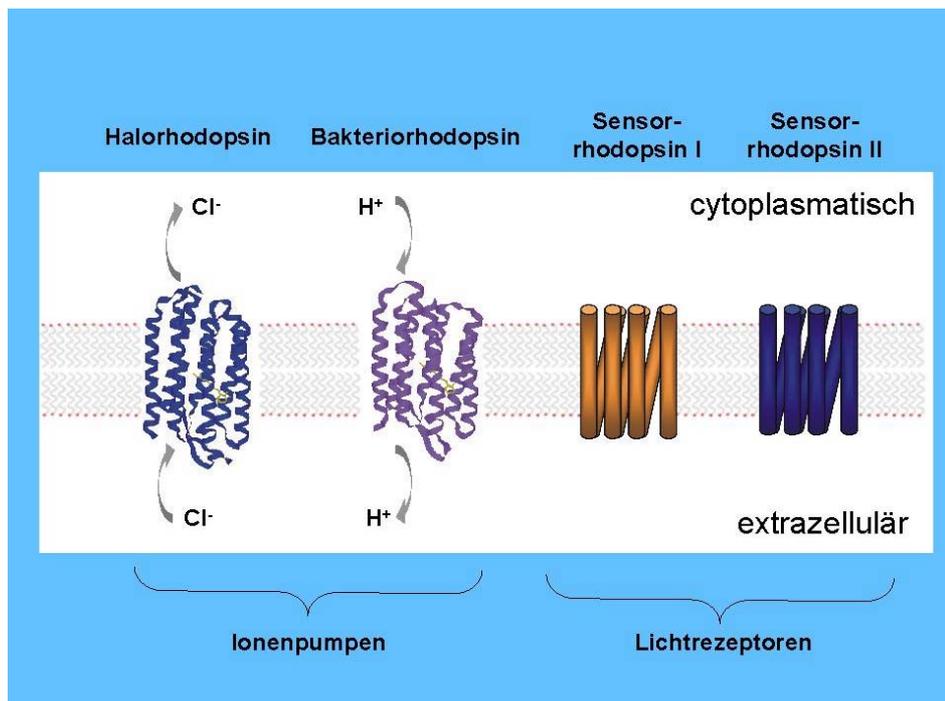


Abb. 3: Vergleichende Darstellung der vier archaealen Rhodopsine: Halo-, Bakterio-, Sensorrhodopsin I und Sensorrhodopsin II

lieren, genannt Purpurmembra, die als Protein ausschließlich Bakteriorhodopsin enthält. Oesterhelt und Stoeckenius (1971)<sup>[4]</sup> konnten zeigen, daß dieses integrale Membranprotein als prosthetische Gruppe ein Vitamin-A Derivat (Retinal) bindet. In den folgenden Jahren wurden drei weitere in ihrer Primärstruktur und Funktion verschiedene Retinalproteine in dem gleichen Archaeon nachgewiesen<sup>[25]</sup>. Abb. 3 stellt vergleichend diese vier archaealen Retinalproteine dar. Es existieren die beiden lichtgetriebenen Ionenpumpen Halorhodopsin (HR) und Bakteriorhodopsin (BR) sowie zwei Lichtrezeptoren, Sensorhodopsin I (SRI) und Sensorhodopsin II (SRII).

In allen archaealen Retinalproteinen wird durch Lichtabsorption ein Zyklus von Reaktionsintermediaten durchlaufen, welcher Netto den Transport eines Ions oder eine Signalweitergabe zur Folge hat. Unabhängig von der Funktion bleibt in Archaea der Chromophor im gesamten Reaktionszyklus kovalent an das Opsin gebunden. In den Rhodopsinen der Säuger hingegen wird die PSB-Bindung nach Isomerisierung unter Bildung des Apoproteins und freien all-trans Retinals gelöst<sup>[26]</sup>. Reisoomerisierung des Chromophors im Pigmentepithel und Rekonstitution der 11-cis Isomers mit dem Opsins schließen den Zyklus<sup>[27]</sup>. Die Vorteile dieses „offenen“ Zyklus bestehen in zusätzlichen Lichtadaptions-mechanismen wie dem regulierbaren Verhältnis von Chromophor zu Opsin über das der Anteil aktivierbarer Lichtrezeptoren beeinflusst werden kann<sup>[28]</sup>.

Die beiden Ionenpumpen, von denen, wie oben bereits erwähnt, die Anordnung in homotrimeren Strukturen bekannt ist, benötigen bis auf das Retinal keine weiteren Kofaktoren (Protein etc.) und sind auch im monomeren Zustand funktionell aktiv. Die archaealen Lichtrezeptoren hingegen benötigen für die Signalweitergabe ein weiteres membranständiges Transduktions-Protein (Htr)<sup>[29]</sup>. In dessen Gegenwart liegen wahrscheinlich Heterodimere bestehend aus SR und Htr vor<sup>[30]</sup>. Sensorrhodopsine im Komplex mit den Transducer-

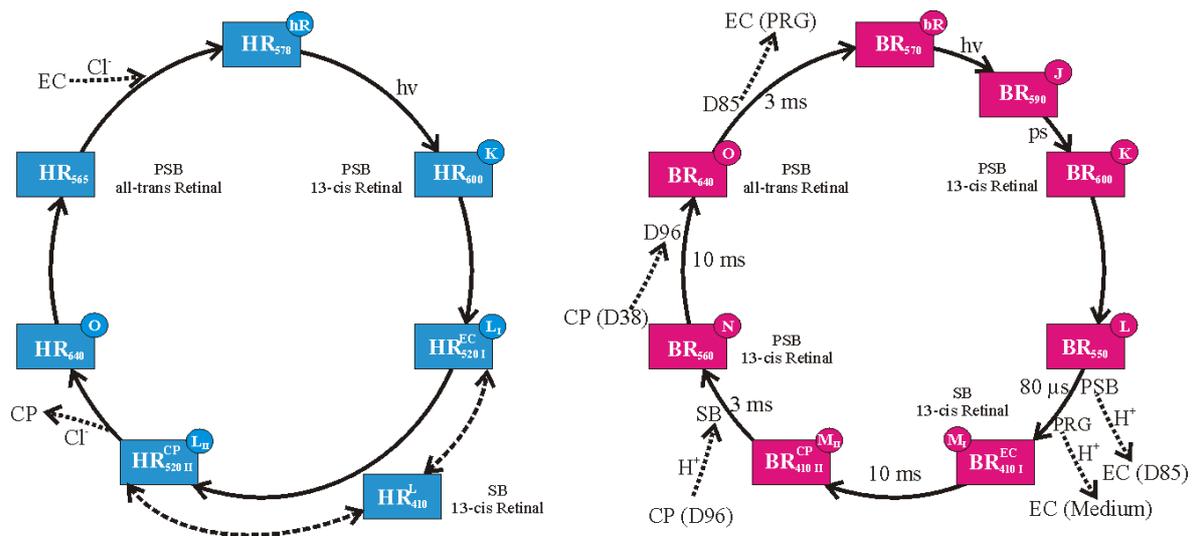


Abb. 4: Photozyklen der beiden archaealen Ionenpumpen Halorhodopsin, HR, (links) und Bakteriorhodopsin, BR, (rechts)- Die UV/VIS- und FTIR-spektroskopisch identifizierten Photozyklusintermediate sind jeweils durch die jeweiligen Absorptionsmaxima (Indizes) bzw. die in der Literatur üblichen Kürzel (Kreise) gekennzeichnet. Ebenfalls dargestellt sind die bis dato identifizierten Ionentransferschritte; Erläuterungen siehe Text.

Proteinen bilden im Unterschied zur ungebundenen Form im Verlaufe der Photozyklen „langlebige“ Photointermediate (ms bis s Bereich), die eine Signalweitergabe und -amplifikation gewährleisten. In Abwesenheit der entsprechenden Transducer-Proteins kommt es zu einer Beschleunigung des katalytischen Zyklus, der mit einem Protonentransport verbunden ist<sup>[31][32]</sup>.



Die nebenstehende Abbildung (Abb. 4) verdeutlicht die auf der Basis von UV/VIS- und FTIR-Spektroskopie unterteilten Photozyklen der beiden Ionenpumpen HR und BR unter physiologischen Bedingungen (hohe Salzkonzentration, pH = 5 bis 9). Neben den hier vorgestellten Photozyklen werden in der Literatur weitere, davon abweichende, Modelle für andere pH-Bereiche oder Retinalkonfigurationen diskutiert, die hier nicht weiter vorgestellt werden sollen<sup>[33][34]</sup>. Zur Unterscheidung der Photozyklus-Intermediate sind die Absorptionsmaxima (in nm) als Indizes angegeben und die ebenfalls übliche Buchstabennomenklatur ist jeweils rechts oben angehängt.

Beiden Retinalproteinen ist die Isomerisierung des Chromophors im Picosekunden Bereich vom (all-trans, 15-syn)- zum (13-cis, 15-syn)-Isomer nach Absorption eines Photons (siehe Abb. 1)<sup>[35]</sup> gemeinsam. Der jeweilige Zyklus wird durch thermische erzeugte Intermediate (Dunkelreaktionen) wie Ionentransport- bzw. Umprotonierungsschritte und konformelle Änderungen der beiden Proteine, die die Zugänglichkeit zur SB von ez nach zp und zurück verändern vervollständigt<sup>[36]</sup>. Trotz der spektroskopischen Ähnlichkeit beider Ionenpumpen sollen, auf Grund der Verschiedenartigkeit der transportierten Ionen, die Photozyklen<sup>[37]</sup> von HR und BR getrennt diskutiert werden.

Bakteriorhodopsin isomerisiert nach Lichtabsorption innerhalb weniger Pikosekunden mit einer Quantenausbeute von 0.6. Im Verlauf dieser Reaktion werden mindestens 51,8 kJ/mol für weitere thermische Reaktionen gespeichert<sup>[38][39]</sup>. Röntgenkristallographische Untersuchungen kontinuierlich bestrahlter (532 nm) Einzelkristalle bei 110 K deuten neben der Retinalisomerisierung auch die Lageänderung eines Wassermoleküls in direkter Nachbarschaft zur Carboxylgruppe der Asparaginsäure 85 (D85) an<sup>[136]</sup>.

Im zweiten thermischen Intermediat, genannt L<sup>[40]</sup>, konnte mittels FTIR-Spektroskopie Änderungen der Amid I und Amid II Banden bzw. Änderungen des Proteinerückgrats gezeigt werden<sup>[139]</sup>. Auf der Basis ortsspezifischer Mutagenese (Punktmutagenese) wurden mit der gleichen Technik Umgebungsänderungen von Wassermolekülen und aromatischen Resten in der Nähe von Asparaginsäuren gezeigt<sup>[130]</sup>. Trotz der Fortschritte mit der Untersuchung von BR-Tiefemperaturintermediaten liegen bisher allerdings noch keine gesicherten Strukturinformationen für das L-Intermediat vor.

Der Übergang von L- zum M-Intermediat ist bei einem pH-Wert von sieben nachweislich (FTIR- und UV/VIS-Spektroskopie) mit zwei Protonentransferschritten verbunden. Dies sind die Deprotonierung der PSB bzw. Protonierung von D 85 und die Abgabe eines Protons auf der extrazellulären Seite des Proteins<sup>[41][42]</sup>. Für den letzten Protonentransfer-Schritt konnte gezeigt werden, daß die Protonen-Abgabe nicht direkt in das umgebende Medium sondern an die ez-Oberfläche der PM erfolgt<sup>[43]</sup>. Die Deprotonierung der PSB, mit einer Zeitkonstante von 80 µs<sup>[44][45]</sup> ist deutlich an der starken Blauverschiebung des Absorptionsmaximums nach 412 nm zu erkennen. Akzeptor des Protons ist die Carboxylgruppe von D85, einer Aminosäure, die 4.2 Å relativ zum Schiff Basen-Stickstoff nach ez verschoben ist<sup>[46]</sup>. Der Mecha-



nismus dieser Umprotonierung ist bis dato nicht geklärt; es ist allerdings wahrscheinlich, daß zumindest ein Wassermolekül daran beteiligt ist<sup>[47]</sup>. Ein mechanistisches Modell basiert auf der intermediären Bildung eines Hydronium-Ions<sup>[48]</sup>. Eine anderes Modell erklärt diesen Schritt mit der zwischenzeitlichen Bildung eines Hydroxidions<sup>[47]</sup>. Dazu gäbe ein Wassermolekül ein Proton an D85 ab, wanderte dann auf die zytoplasmatische Halbseite von BR und deprotonierte die PSB unter Rückbildung eines Wassermoleküls. Der zweite Prozeß unter Bildung des M<sub>I</sub>-Intermediats ist die Abgabe eines Protons an der Oberfläche der Membran (ez). Als Protonendonator wird eine Gruppe dreier Aminosäuren (Arginin 82, Glutamin 194, Glutamin 204), hier als Proton-Release-Group (PRG) bezeichnet, diskutiert<sup>[49]</sup>.

Mit der anschließenden Bildung von M<sub>II</sub> ist eine vergleichsweise große Konformationsänderung des Proteins verbunden, die u. a. durch FTIR<sup>[50][51]</sup>, Pulverdiffraktometrie<sup>[51]</sup> sowie Elektronenkristallographie<sup>[52][53]</sup> an Purpurchlorophyll (PM) belegt werden kann. Trotz dieser Änderungen bleibt das Absorptionsmaximum während dieses Übergangs konstant, d. h. ein elektrostatischer oder sterischer Einfluß auf das Retinal und seine nächste Umgebung liegt wahrscheinlich nicht vor. Die Röntgenstrukturanalyse (RSA) des zu 65 % angereicherten M<sub>II</sub>-Zustandes am Wildtyp zeigt eine Verschiebung von Helix F und dem Schleifenbereich nach G<sup>[54]</sup>. Der in früheren Intermediaten “verschlossene“ zytoplasmatische Halbkanal weist jetzt ein ausgedehntes Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen Asparaginsäure 96 (D96) und der SB auf.

Die deutliche Rotverschiebung um 150 nm im Folgeschritt korreliert mit der Reprotonierung der SB. Als Protonendonator konnte die Asparaginsäure in Position 96 detektiert werden, die auf der Grundlage obiger Daten über einen Wasserstoffbrückenmechanismus<sup>[55]</sup> mit der SB in Verbindung steht<sup>[56][57][58]</sup>.

Letztes identifiziertes Intermediat vor dem BR-Grundzustand (bR) ist das mit 40 nm nochmals rotverschobene O-Intermediat. Mit dessen Entstehung ist die Reisomerisierung des 13-cis Retinals und die Reprotonierung von D96 verknüpft<sup>[59][60]</sup>. Als Protonenakzeptor auf der zytoplasmatischen Oberfläche des Proteins kommen mehrere saure Aminosäuren im Schleifenbereich AB und CD in Betracht<sup>[61][62]</sup>. Die trimere Organisation von BR in der PM legt den Schluß nahe, daß diese Aminosäuren ähnlich einem Antennensystem für den Einfang von Protonen agieren. Allerdings konnte via Punktmutagenese lediglich für Asparaginsäure 38 (D38), einem Rest, der am putativen Eingang zum zp-Halbkanal liegt, eine signifikante Verzögerung des Photozyklus gezeigt werden<sup>[63]</sup>.

Zur Rückbildung von bR wird im letzten Schritt des Zyklus ein Proton von D85 auf die PRG übertragen<sup>[64]</sup>. Neben Wassermolekülen spielt hierbei wahrscheinlich Arginin 82 (R82) als “Transferrest“ mit flexibler Seitenkette eine Hauptrolle<sup>[65]</sup>.

Für die unspezifische Anionenpumpe Halorhodopsin (HR) werden in Abhängigkeit des zu transportierenden Substrats und der Konformation des Retinals verschiedene Photozyklen



diskutiert, für die, verglichen mit BR, weit weniger detaillierte Informationen bekannt sind. Auch hier soll zur Vereinfachung nur der Transportzyklus unter physiologischen Bedingungen (hohe Konzentration von Chloridionen und all-trans-Konformation des Retinals im Ausgangszustand) diskutiert werden. Einleitend sei bemerkt, daß HR eine für vorwiegend monoatomige, einfach geladene Anionen selektive Pumpe ist<sup>[66][67]</sup>. Von HR werden Halogenidionen (mit Ausnahme von Fluorid als kompetitiven Inhibitor) und Nitrationen gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert. Die Bindung dieser Ionen wird durch die „Bindungsstelle II“ (in der Literatur als site II bezeichnet) ermöglicht, die in ihrer Lage, Selektivität und Bindungsaffinität ( $K_M = 10 \text{ mM}$ ) von der „Bindungsstelle I“ (site I) unterschieden wird. An die Bindungsstelle I binden zweiwertige Anionen wie bspw. Sulfationen, die allerdings von HR nicht transportiert werden<sup>[68]</sup>.

Wie für BR ist der initiierte endergonische Schritt die Retinalisomerisierung, der sich mehrere unterscheidbare thermische Reaktionsintermediate anschließen. Die Quantenausbeute für die Photoisomerisierung ist mit einem Wert von 0.3 nur halb so groß wie für BR<sup>[69]</sup>. UV/VIS-spektroskopische Tieftemperaturstudien (80-110K) an HR zeigen die Existenz zweier unterscheidbarer K-Intermediate bei 80 K an, wovon eines nach Erwärmung auf 110 K in das andere überführt werden kann<sup>[70]</sup>. Dioumaev und Braiman (1997)<sup>[71]</sup> konnten später tatsächlich die Existenz zweier K-Subtypen bei Raumtemperatur mittels zeitaufgelöster FTIR-Spektroskopie in der Sequenz  $K_E$  zu  $K_L$  zeigen ( $K_E$ : early K  $K_L$ : late K). Obwohl die Meßparameter beider Studien nicht identisch sind, und es sich mithin auch nicht um vergleichbare K-Intermediate handeln muß, zeigen sich mehrfache Übereinstimmungen der zeitlich frühen bzw. bei 80 K erhaltenen Spektren.

Das oder die K-Intermediat(e) geht (gehen) im  $\mu\text{s}$ -Bereich in das  $L_I$ -Intermediat über, für das eine 13-cis, 15-syn-Konfiguration der PSB nachgewiesen werden konnte<sup>[72]</sup>. Mit diesem Schritt ist neben einer  $pK_A$ -Abnahme der PSB von 9.6 auf 4.8 auch die Lageveränderung des gebundenen Chloridions (site II) verknüpft. Dieser Befund stützt sich auf elektrische (Impedanz)- und FTIR-Messungen des L-Zustandes<sup>[73][172]</sup>, wonach sich die Ladungszustand an HR-Membranen bzw. Differenzbanden für die PSB und Arginine signifikant verändern. Ähnlich der Konformationsänderung von BR beim Übergang von  $M_I$  nach  $M_{II}$  werden für HR zwei L-Intermediate postuliert<sup>[68]</sup>. Die Verbindung beider L-Intermediate besteht in einer Konformationsänderung, die eine Verbindung zwischen Chromophor und Zytoplasma herstellt.

Die Abgabe des Chloridions ist mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums um 90 nm nach 610 nm (O-Intermediat) verbunden. Basis dieser Rotverschiebung ist die Chloridabhängigkeit des Gleichgewichts zwischen  $L_{II}$ - und O-Intermediat ( $K = 450 \text{ mM}$ )[74]. Die Retinalkonfiguration im O-Intermediat wurde auf Grund von FTIR-Studien als 13-cis Isomer identifiziert.



Der Zyklus von HR schließt mit dem 565-Intermediat ab, dessen Entstehung mit der Reisisomerisierung des Chromophors nach all-trans verknüpft wird. Zur Rückbildung des unbelichteten HR's (vielfach in der Literatur als hR bezeichnet) fehlt noch die Anionenbindung an die Bindungsstelle II<sup>[74]</sup>. Die Existenz eines um 5 nm blauverschobenen Intermediats ist für kinetische Messungen des HR-Photozyklus nie zweifelsfrei nachgewiesen worden. Vielmehr stützt sich dieses Modell auf Titrationsexperimente an unbelichtetem HR (hR). Hier beobachtet man eine entsprechende Verschiebung des Absorptionsmaximums mit abnehmender Chloridionenkonzentration<sup>[75]</sup>.

Ein wesentlicher Unterschied der Transportzyklen beider Ionenpumpen ist die intermediäre Deprotonierung der PSB von BR ( $M_I/M_{II}$ ) und die permanent protonierte SB in HR. Allerdings verliert HR unter permanenter Belichtung seine Fähigkeit des Ionentransports, was auf die Deprotonierung der PSB unter Bildung von  $HR_{410}^L$  zurückzuführen ist<sup>[76][75]</sup>. Wie oben bereits erwähnt, sinkt der  $pK_A$  im L-Intermediat auf 4.8. Unter kontinuierlicher Belichtung verliert deshalb HR im L-Zustand das SB-Proton und eine neue blauverschobene Spezies entsteht. Es wurde gezeigt, daß Azidionen die Deprotonierung der PSB nach Aufnahme über die zytoplasmatische Seite katalysieren<sup>[77]</sup>. *In vivo* konnte nachgewiesen werden, daß die Bestrahlung mit Wellenlängen  $> 360$  nm in Gegenwart von Azidionen schließlich einen einwärtsgerichteten Protonentransport zur Folge.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß für die hier diskutierten Rhodopsine ( $\lambda_{\max, hR} = 578$ ,  $\lambda_{\max, bR} = 568$ ,  $\lambda_{\max, sRI} = 587$ ,  $\lambda_{\max, sRI} = 487$ ,  $\lambda_{\max, rH, bovine} = 495$ ) durch Absorption eines Photons entsprechender Energie eine Sequenz von photochemisch unterscheidbaren Intermediaten eingeleitet wird. Der im picosekunden-Bereich erfolgenden Retinalisomerisierung (rotverschobenes Intermediat) folgen im millisekunden-Bereich Intermediate mit deprotonierter SB, sogenannte M-Zustände (Ausnahme HR). Dies sind im Falle der Lichtrezeptoren (G-Proteininteraktion oder Transducerinteraktion) Signalzustände oder, ebenfalls gekoppelt an vergleichsweise große konformative Änderungen Zugänglichkeitsänderungen in BR. In dieser Hinsicht eine Ausnahme ist HR, bei dem die Deprotonierung der SB einen möglichen "Seitenast" des Photozyklus darstellt (und zwar pH-abhängig unter hohem Lichtfluß), der nicht mit einem Anionentransport verbunden ist. Unter physiologischen Bedingungen bleibt für dieses Retinalprotein die PSB erhalten.



### 3.3. Eigenschaften halophiler Organismen

In der Mehrzahl halophiler Archaea konnte bis dato ein Haloopsin-Gen nachgewiesen werden<sup>[78]</sup>. HR transportiert im Unterschied zur Protonenpumpe BR Halidanionen oder Nitrationen entgegen dem vorliegenden Membranpotential ins Zellinnere. Der aktive Halidimport dient der Erhaltung eines osmotischen Gleichgewichtes während des Zellwachstums halophiler Archaea. Um in dieser Phase möglichst isoosmolare Verhältnisse mit dem zellumgebenden Medium hoher Salzkonzentration zu gewährleisten bietet der lichtgetriebenen Transport durch HR eine Alternative zu ATP-verbrauchenden Prozessen. Zusätzlich bewirkt eine durch HR erbrachte Chloridaufnahme den Einstrom großer Stoffmengen an Kalium-Ionen in die Zelle<sup>[78]</sup> (Kalium-Speicher). Die im Vergleich zum umgebenden Medium hohe intrazelluläre Kaliumkonzentration treibt weitere Kalium-abhängige Transportprozesse der Zelle an.

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Analyse der lichtgetriebenen Anionenpumpe Halorhodopsin liegt, deren physiologische Funktion in der Erhaltung des osmotischen Gleichgewichts besteht, soll im Folgenden kurz auf die bekannten Mechanismen der Osmoadaptation<sup>[79]</sup> eingegangen werden. Als Osmoadaptation<sup>[80]</sup> wird die Fähigkeit einer Zelle definiert, sich Veränderungen des äußeren osmotischen Drucks anzupassen. Zu diesem Zweck nutzen Organismen verschiedene Osmoregulationsmechanismen.

Halotolerante Bakterien sowie halotolerante, methanogene Archaea und Algen haben niedrige intrazelluläre Salzkonzentrationen. Die geregelte Synthese kleiner organischer Verbindungen dient hier zur Erhaltung des osmotischen Gleichgewichtes<sup>[81]</sup>.

Organismus	Externe Na <sup>+</sup> -Konzentration <sup>a</sup>	Interne K <sup>+</sup> -Konzentration
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	0.02 – 0.20	0.65–1.1
<i>Methanospirillum hungatei</i>	0.03	0.15–0.20
<i>M. thermolithotrophicus</i>	1.0	0.9
<i>Methanogenium cariaci</i>	1.0	0.95
<i>Methanosarcina thermophila</i>	<0.05	0.18
<i>Methanohalophilus portucalensis</i>	2.0	0.76
<i>H. halobium</i>	3.4 – 4.3	2.1
<i>H. salinarium</i>	4.00	4.57
<i>N. occultus</i>	3.4	1.1

Tabelle 1: Zusammenstellung der intra- und extrazellulären Kationenkonzentration halophiler Archaea<sup>[82]</sup>

- a) Für NaCl-Konzentrationen < 0,5 M sind in den angegebenen extrazellulären Na<sup>+</sup> alle Natriumverbindungen des Mediums zusammengefaßt

Diese sogenannten kompatiblen Osmolyte sind polare, wasserlösliche Moleküle (Glycerol, Glycin, Betain etc.), die bei physiologischem pH-Wert in ungeladener oder zwitterionischer Form vorliegen und die Stoffwechselprozesse der Zelle nicht beeinflussen. Die Bildung und



Einstellung der intrazellulären Konzentration dieser Verbindungen, wird über die extrazelluläre Salzkonzentration geregelt. In Folge der hohen Wasserlöslichkeit werden viele Wassermoleküle von den kompatiblen Osmolyten gebunden und die Wechselwirkung letzterer mit umgebenden Proteinmolekülen ist minimal.

Von halophilen Organismen<sup>[82]</sup> (halophile Archaea, anaerobe halophile methanogene Archaea, Halobacteriaceae) ist bekannt, daß diese zur Osmoregulation als Alternative zu kompatiblen Osmolyten intrazellulär hohe Kaliumkonzentrationen<sup>[83]</sup> anreichern (siehe Tabelle 1). Die Anreicherung intrazellulärer Natriumionen erfolgt mittels eines Na/H<sup>+</sup>-Antiporter, der über Bakteriorhodopsin oder Elektronentransportenzyme der Atmungskette energetisiert wird. Kaliumionen gelangen passiv durch Diffusion (in Folge des Membranpotentials) in die Zelle. Der gerichtete Anionentransport erfolgt lichtgetrieben über Halorhodopsin oder über ein Symportsystem für Natriumkationen und Chloridionen<sup>[84]</sup>. Deshalb haben diese Organismen salztolerierende oder gar salzabhängige Enzyme entwickelt. So zeigt die Aminosäure-Zusammensetzung halophiler Proteine eine signifikante Erhöhung der Anteile saurer oder kleiner ungeladener Aminosäuren (Glycin, Alanin, Valin). Im Gegensatz dazu ist der Anteil basischer (Lysin) sowie aliphatischer Aminosäuren in halophilen Organismen stark reduziert<sup>[85]</sup>.

Aktivitätsstudien halophiler Enzyme in Abhängigkeit unterschiedlicher K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> Konzentration weisen einen deutlichen Anstieg der Aktivität mit zunehmender Salzkonzentration auf. Neutronenbeugungsexperimente an der Malatdehydrogenase (MalDH) aus *Haloarcuula marsimortui* (*H. marsimortui*) zeigen, daß an der Proteinoberfläche ein spezifisches Arrangement von Carboxylgruppen, an die Salze wie KCl und NaCl, sowie Wassermoleküle koordinativ binden, die halophilen Eigenschaften bestimmt<sup>[86][87]</sup>. Es finden sich also spezifische Wechselwirkungen zwischen umgebenden Kationen und halophilen Proteinen und keine unspezifische Stabilisierungen über negative Oberflächenladungen. Für Ferredoxin aus *H. marsimortui* werden diese Ergebnisse auf Grund der Röntgenstrukturanalyse bestätigt<sup>[88]</sup>. Insgesamt 34 saure Aminosäuren liegen auf der Proteinoberfläche, wobei wiederum 2 bis 6 Wassermoleküle pro Carboxylgruppe an der Oberfläche detektiert wurden. In der gesamten Struktur wurden 237 Wassermoleküle zugeordnet, von denen die „Oberflächenwasser“ ein extensives Wasserstoffbrückennetzwerk bilden, über das 4 Kaliumkationen an der Oberfläche eines Monomers, und zwei weitere zwischen zwei Monomeren stabilisiert (koordiniert) werden. Neben diesen spezifischen Wechselwirkungen von Ionen mit halophilen Enzymen werden weitere unspezifische Mechanismen diskutiert. Als Folge der hohen Salzkonzentration sollten sich die vergleichsweise wenigen hydrophoben Wechselwirkungen halophiler Protein noch verstärken<sup>[85]</sup>.

Die Zellmembran halophiler Organismen weist im Unterschied zu anderen Prokaryonten einen hohen Anteil negativ geladener Lipide auf. Die resultierenden elektrostatischen Repulsionskräfte der Lipidkopfgruppen werden durch die hohen Ionenstärken (Kationen) unter



physiologischen Bedingungen kompensiert und somit die Lipiddoppelschichten dieser Organismen stabilisiert.

Diese Mechanismen garantieren eine starke Wechselwirkung zwischen Zelle und Solvens. Versuche an Liposomenpräparationen aus *E. coli* Lipiden –diese enthalten vorwiegend neutrale Lipide- unter hoher Ionenstärke führen zur Aggregation und Fällung der Liposomen. Die speziellen Lipide der halophilen Archaea (negative geladene Kopfgruppen, Phytanol-Seitenketten) bilden im Unterschied zu den Bakterien-Lipiden (Palmytoyl-Lipide) unter hohen Ionenstärken stabile dispergierte Liposomen und könnten somit ein “Aussalzen“ der Zelle verhindern<sup>[84]</sup>.



### 3.4. Spektroskopische Untersuchung von Proteinen

#### 3.4.1. Röntgenstrukturanalyse

##### 3.4.1.1. Beugung von Röntgenstrahlung an Kristallen

Eine Darstellung der Röntgenkristallographie kann mittlerweile in einer Vielzahl von Monographien nachgelesen werden<sup>[89][90][91][92]</sup>. Im folgenden soll deshalb lediglich eine kurze Einführung in die Thematik vorgestellt werden.

Der für die Proteinkristallographie wichtige Prozeß bei der Wechselwirkung von Röntgenstrahlung mit Festkörpern ist die Beugung. Trifft Röntgenstrahlung auf einen Kristall, d. h. einem Festkörper, dessen Atome eine regelmäßige 3-dimensionale Anordnung einnehmen, dann können durch Beugung Sekundärstrahlen mit geringerer Frequenz als die Primärstrahlung (inelastische Beugung oder Compton-Effekt) sowie mit identischer Frequenz wie die Primärstrahlung (elastische Beugung oder Thomson Streuung) nachgewiesen werden. Auf der elastischen Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen, welche 1912 erstmals von Max von Laue auf Grund der ähnlichen Dimensionen der Atomabstände in Kristallen und der Wellenlänge von Röntgenstrahlung vorhergesagt wurde, basiert die Proteinkristallographie.

Ursache für die elastische Beugung ist die Wechselwirkung des oszillierenden elektrischen Feldvektors mit den Elektronen der Atome. Die zur Schwingung angeregten Elektronen wirken wie oszillierende elektrische Dipole, die ihrerseits Strahlung gleicher Wellenlänge (Sekundärstrahlung) emittieren. Auf Grund der Phasenverschiebung der Sekundärstrahlung

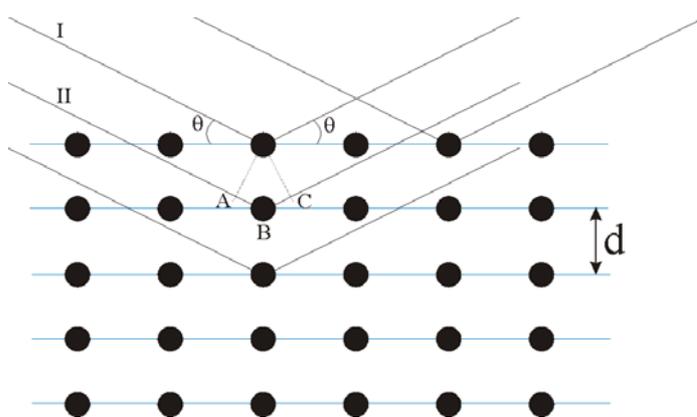


Abb. 5: Schematische Darstellung eines 2-dimensionalen Kristallgitters mit mehreren einfallenden (von links) und gebeugten Röntgenstrahlen unter einem Glanzwinkel  $\theta$ ;  $d$  gibt den Netzebenenabstand an.

kommt es nur bei einem ganzzahligen Vielfachen des Gangunterschiedes ( $n \cdot \lambda$ ) zur konstruktiven Überlagerung oder Interferenz, was gleichbedeutend mit einer erhöhten Intensität ist. Ist dies nicht der Fall, führt die Überlagerung zu gegenseitiger Auslöschung der Sekundärstrahlen, auch destruktive Interferenz genannt.

Eine Analyse der Röntgenbeugung ist in Abb. 5 (2-dimensionaler Ausschnitt des Raumgitters) an Hand

paralleler Streuebenen in einem Kristall dargestellt. Den Kristall selber ist aus unendlich vielen identischen Einheiten, den Elementarzellen durch periodische Translation in alle drei Raumrichtungen aufgebaut.

Im vorliegenden Modell wird die Röntgenbeugung wie eine Reflexion betrachtet, wodurch das Verständnis und eine mathematische Beschreibung der Vorgänge vereinfacht wird. Die einfallenden Röntgenstrahlen werden an den Gitterebenen reflektiert. Für zwei parallele Strahlen (Strahlen I und II in Abb. 5) resultiert eine Weglängendifferenz von  $AB + BC$  die gleich  $2d \sin \theta$  sein muß ( $d$ : Abstand der Gitterebenen,  $\theta$ : Reflexionswinkel). Konstruktive Interferenz ist nur für den Fall zu erwarten, in denen  $AB + BC$  ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ( $n \cdot \lambda$ ) ist, d. h. nur dann sind die reflektierten Wellen in Phase. 1913 erstmals beschrieben wird diese Bedingung Bragg'sche-Bedingung (-Gleichung) genannt:

$$n\lambda = 2d \sin \Theta$$

Mit Hilfe der Ewald-Konstruktion<sup>[93]</sup> kann die Bragg'sche-Gleichung bei Verwendung des reziproken Gitters als Vektorkonstruktion (Vektoren sind im nachfolgenden Text fett gedruckt) dargestellt werden (Abb. 6).

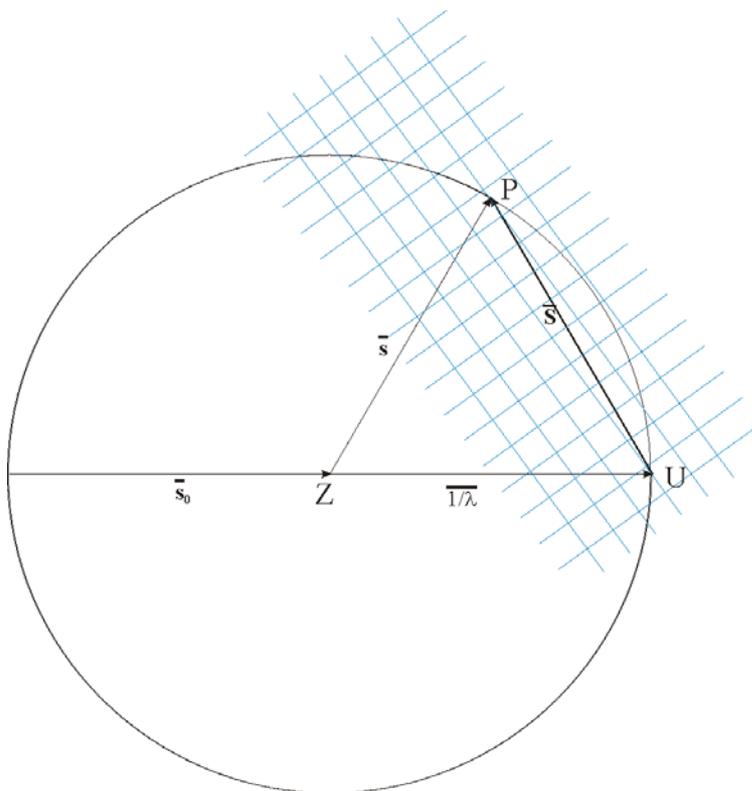


Abb. 6: Ewald-Konstruktion<sup>[93]</sup>; Erläuterungen siehe Text.

Der Kristall befindet sich im Zentrum der Ewald-Kugel mit dem Radius  $1/\lambda$ . Ein einfallender Röntgenstrahl ( $s_0$ ) wird am Kristallgitter unter dem Winkel  $2\theta$  gebeugt ( $s$ ). Der Ursprung ( $U$ ) des reziproken Gitters befindet sich dann auf der Oberfläche der Ewald-Kugel und zwar, wo diese sich mit dem Vektor des Primärstrahls schneidet. Für  $S$ , den Differenzvektor gilt, daß dieser rechtwinklig zur Gitterebene des Kristallgitters steht (siehe Gleichungen II bis IV). Wenn der Endpunkt von  $S$  die Ewald-Kugel schneidet, ist  $P$  der entsprechende Punkt des reziproken

Gitters. Anders ausgedrückt bedeutet dies, daß für jeden Punkt  $P$  des reziproken Gitters, der



auf der Ewald-Kugel zum liegen kommt, die Bragg'sche-Gleichung erfüllt ist. Wird der Kristall rotiert, dann drehen sich entsprechend das reziproke Gitter und folglich werden nacheinander für die unterschiedlichen Punkte des Kristallgitters die Beugungs- oder Reflexionsbedingungen erfüllt.

$$n\lambda = 2d \sin \Theta \Leftrightarrow \frac{n}{d} = \frac{2 \sin \Theta}{\lambda} = |\vec{S}| \quad \text{Gleichung I}$$

$$\text{Es sei } |\vec{s}_0| = |s| = \frac{1}{\lambda} \quad \text{sowie } \vec{S} = \vec{s} - \vec{s}_0 \quad \text{mit } \vec{S} \perp \text{ Gleichung II bis IV}$$

Die Röntgenbeugung erfolgt durch die Elektronen eines Atoms. Die Elektronen sind auf ein endliches Volumen verteilt und es wird in der Regel angenommen, daß diese Verteilung für ein einzelnes Atom eine sphärische Symmetrie aufweist. Damit ist die Beugung am Atom nicht von der Richtung des Differenzvektors  $\mathbf{S}$  abhängig, sondern hängt allein von dessen

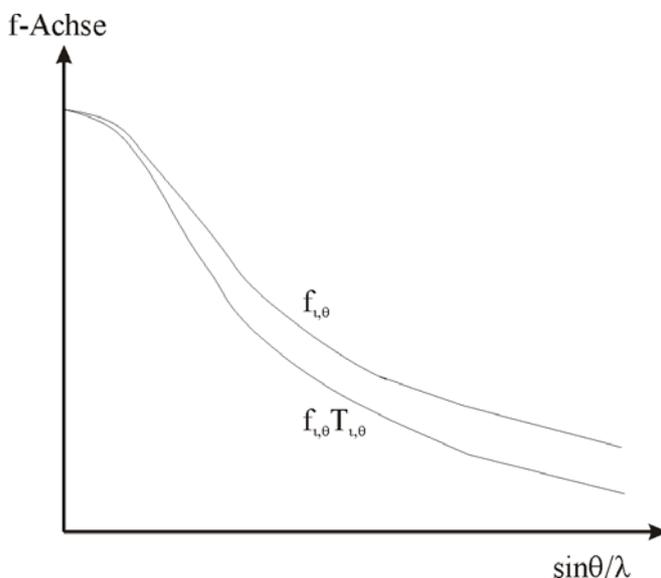


Abb. 7: Schematische Auftragung des Atomstrukturfaktors  $f_{i,\theta}$  bzw. des für die thermische Vibration korrigierten Atomstrukturfaktors  $f_{i,\theta} T_{i,\theta}$ .

Betrag ab (siehe Gleichung I). Deshalb werden die Streuamplituden einzelner Atome, genannt Atomstrukturfaktoren ( $f_{i,\theta}$ ), in der Regel als Funktion von  $\sin(\theta)/\lambda$  wie in Abb. 7 aufgetragen.  $f_{i,\theta}$  hängt von der Atomart (Elektronenzahl), dem Beugungswinkel, der Wellenlänge sowie von dem thermischen Vibrationen (Temperaturfaktor) eines Atoms ab. Aus diesem Grunde ist in Abb. 7 eine zweite, korrigierte Kurve eingetragen, die durch Multiplikation des Atomfaktors mit einem Temperaturfaktor ( $T_{i,\theta}$ ) erhalten werden kann.  $T_{i,\theta}$ , obwohl anisotrop, wird in

der Proteinkristallographie auf Grund des ungünstigen Verhältnis zwischen Observablen und anzupassenden Parametern üblicherweise als isotrop angesetzt (reduziert den Parametersatz von 3 Ortskoordinaten auf eine). In diesen Korrekturfaktor gehen allerdings noch weitere Unsicherheiten wie z. B. fehlerhafte Datenskalierung und statistische Unordnung des Kristalls ein.

Die an einem Kristall gestreute Gesamtwelle wird durch Summation der Einzelbeiträge des Atomvolumens nach Gleichung V erhalten. Die Atomstrukturfaktoren addieren sich innerhalb



einer Elementarzellen mit  $n$  Atomen unter Multiplikation mit ihrem jeweiligen Phasenwinkel zum Strukturfaktor (Gleichung VI) auf.

$$f(\vec{S}) = \int_v \rho(\vec{r}) e^{(2\pi i \vec{r} \vec{S})} dv \quad \text{Gleichung V}$$

$$F(\vec{S}) = \sum_{j=1}^n f_j e^{(2\pi i \vec{r}_j \vec{S})} \quad \text{Gleichung VI}$$

Auf Grund der Fehlordnung (Mosaizität) von Kristallen sind die Beugungsreflexe nicht unendlich scharf (punktförmig), sondern die Gitterebenen aus Abb. 5 befinden sich über einen endlichen Winkelbereich in "Reflexstellung". Die resultierende Gesamintensität  $I(\mathbf{h})$  eines am Kristall gebeugten Röntgenstrahls ( $I_0$ ), der mit einer gleichförmigen Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  durch die Reflexposition rotiert, ist nachfolgend durch die Darwinsche Formel<sup>[94]</sup> gegeben.

$$I(\vec{h}) = \frac{I_0}{\omega} \lambda^3 \frac{e^4}{m^2 c^4} \frac{1 + \cos^2 2\Theta}{2} \frac{L A V_x}{V^2} |F(\vec{h})|^2 \quad \text{Gleichung VII}$$

In Gleichung VII ist mit  $\mathbf{h}$  ein Reflex, mit  $m$  die Elektronenmasse, mit  $c$  die Lichtgeschwindigkeit und mit  $e$  die Elementarladung bezeichnet. Der Term  $(1 + \cos^2 2\Theta)/2$  wird als Polarisationsfaktor bezeichnet, der die partielle Polarisierung des gebeugten Röntgenstrahls für den Bragg-Winkel  $\Theta$  bei einem unpolarisierten Primärstrahl angibt.  $L$ , der Lorenzfaktor, berücksichtigt die relative Zeit, die jeder Reflex in der Reflexposition verbringt.  $A$  ist der Absorptionsfaktor,  $V_x$  das Kristallvolumen und  $V$  das Volumen der Elementarzelle.

$|F(\mathbf{h})|$  ist somit die Strukturfaktoramplitude für einen Reflex  $\mathbf{h}$ . Daraus folgt bei kinematischer Streuung ohne Mehrfachstreuung, dass die Intensität  $I(\mathbf{h})$  des Sekundärstrahls proportional zum Amplitudenquadrat des Streufaktors  $|F(\mathbf{h})|$  ist.

### 3.4.1.2. Berechnung der Elektronendichte

Der Strukturfaktor  $|F(\mathbf{h})|$ , der die gesamte Information eines Beugungsexperimentes enthält, ist die Fourier-Transformation der Elektronendichte( $\rho$ ). Demnach kann letztere am Ort  $xyz$  durch inverse Fourier-Transformation nach Gleichung IX berechnet werden

$$\vec{F}(hkl) = |\vec{F}(hkl)| e^{i\alpha(hkl)} \quad \text{Gleichung VIII}$$

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \vec{F}(hkl) e^{(-2\pi i [hx+ky+lz])} \quad \text{Gleichung IX}$$



Der Phasenwinkel  $\alpha(hkl)$  eines Reflexes  $hkl$  in der Darstellung des Strukturfaktors aus Gleichung VIII bleibt in einem Beugungsexperiment unbestimmt. Lediglich die Strukturfaktoramplituden  $|F(hkl)|$  werden nach der Integration der Reflexintensitäten gewonnen (Gleichung VIII). Diese auch als Phasenproblem bekannte Unbestimmtheit kann nur unter Einsatz zusätzlicher Methoden gelöst werden.

#### 3.4.1.3. Lösung des Phasenproblems

Vier Möglichkeiten zur Lösung des Phasenproblems sind möglich:

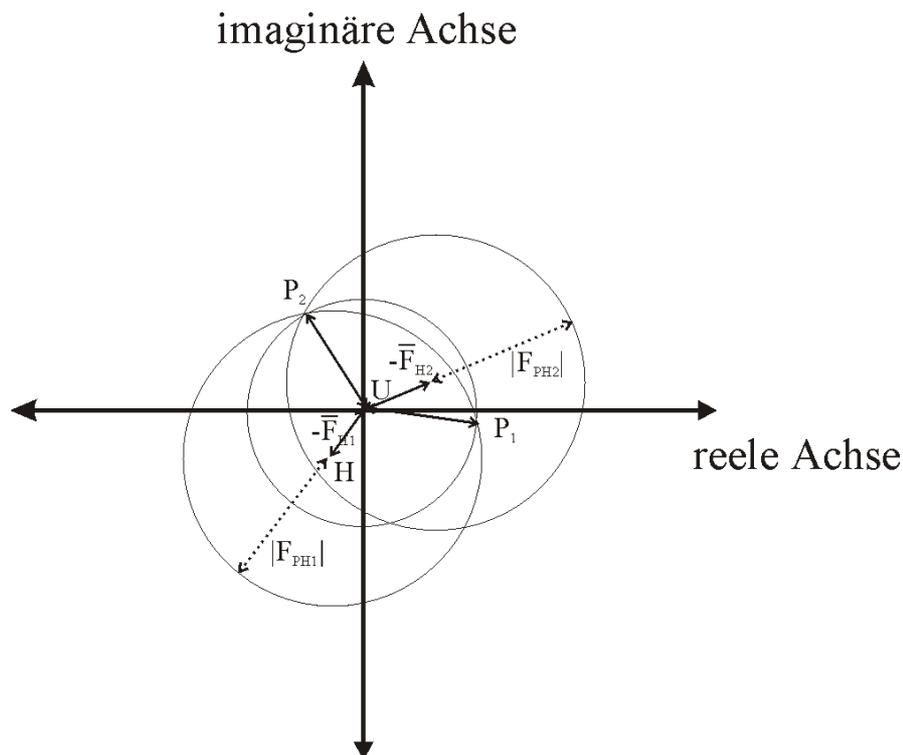
- a) Multipler isomorpher Ersatz (MIR)
- b) Multiple anomale Dispersion (MAD)
- c) Molekularer Ersatz
- d) Direkte Methoden

Der multiple isomorphe Ersatz mit Schweratomderivaten ist die am häufigsten verwendete Methode zur Lösung des Phasenproblems. Neuere Methoden wie das MAD-Experiment gewinnen allerdings zunehmend an Bedeutung<sup>[95]</sup> und werden in jüngster Zeit sogar ohne Derivatisierung von Proteinen (Seleno-Methionin, Seleno-Tryptophan etc.) auch direkt über den Schwefel des Cyst(e)ins bzw. Methionins versucht[. Für große Proteine/Proteinkomplexe wird, wenn keine weiteren Strukturinformationen vorliegen<sup>[96][97][98]</sup>, allerdings nach wie vor der MIR unumgänglich sein. Mit der zunehmenden Anzahl verfügbarer Proteinstrukturen steigt die Chance mit Patterson-Suchmethoden (Molekularer Ersatz) eine anfängliche Phaseninformation für die Strukturbestimmung bei homologen Proteinen durchzuführen<sup>[99][100][101]</sup>. Direkte Methoden werden bis dato in der Kleinmolekülkristallographie erfolgreich angewandt.

Der multiple isomorphe Ersatz soll nachfolgend kurz beschrieben werden. Durch Inkubation von Kristallen mit schwermetallhaltigen Lösungen kann es zur Diffusion der Verbindungen durch Solvenskanäle im Kristall und anschließender Bindung (kovalent wie auch nicht-kovalente Bindungen sind möglich) kommen. Bleibt die kristallinterne Ordnung während eines solchen Prozesses erhalten, dann lassen sich die Positionen der Schweratome in der Elementarzelle durch einen mathematischen Vergleich von Schwermetall-Derivat(en) und nativem Kristall via Differenz-Patterson-Funktionen bestimmen.

Die Patterson-Funktion ist eine Fourier-Addition sämtlicher Intensitäten (Quadrate der Strukturfaktoramplituden) ohne Berücksichtigung von Phaseninformationen.





$$P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |\vec{F}(hkl)|^2 \cos(2\pi)(hu + kv + lw) \quad \text{Gleichung X}$$

$$d|F|_{iso} = |F_{PH}| - |F_P| \quad \text{Gleichung XI}$$

Abb. 8: Harker-Konstruktion: Jedem Reflex wird ein Kreis mit dem Radius  $|F_P|$  um den Ursprung (U) gezeichnet. Für jedes weitere Schwermetallderivat ergibt sich ein weiterer Kreis, versetzt um  $-F_{H1}$  ( $-F_{H2}$  etc.) mit dem Radius  $F_{PH1}$  ( $F_{PH2}$  etc.). Die resultierenden Schnittpunkte ( $P_1$  bzw.  $P_2$ ) markieren zwei mögliche Werte für die Phase  $\alpha_p$ . Nur durch Hinzunahme eines weiteren, unabhängigen Derivates kann eindeutig ein gemeinsamer Schnittpunkt (hier  $P_2$ ) und damit die Phase des nativen Datensatzes bestimmt werden.

Die Patterson-Funktion (Gleichung X) beinhaltet die interatomaren Vektoren. Somit ergibt sich, mit und ohne Schwermetall-Derivatisierung eine Differenz der Struktur Faktoren des nativen Proteins und des Derivates nach Gleichung XI.

Im Anschluß an die Verfeinerung der Schweratomparameter können die Struktur Faktoren  $|F|_{iso}$  über die Harker-Konstruktion (Abb. 8) bestimmt und damit die Phasen des nativen Datensatzes errechnet werden.

In der Regel ist die Phasenbestimmung mit einem einzigen Derivat (SIR) nicht eindeutig wie aus Abb. 8 ersichtlich (hier sind zwei Lösungen möglich). Deshalb werden in der Praxis häufig mindestens zwei Derivate untersucht.



### 3.4.2. FT-IR- und -Raman-Spektroskopie

In dieser Arbeit wurden unter anderem die Infrarot- und Raman-Spektroskopie zur Untersuchung von HR-Kristallen verwendet. Beide Methoden geben Aussagen über Molekülschwingungen wieder, basieren jedoch auf verschiedenen physikalischen Prinzipien<sup>[102][103]</sup>.

Im Falle der Infrarot (IR)-Spektroskopie wird Elektromagnetische (EM)-Strahlung des infraroten Bereichs ( $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) mit der Probe zu Wechselwirkung gebracht. Die Energie der EM-Strahlung liegt im Bereich der Übergangsenergien für Molekülschwingungen. In Folge der Anregung spezifischer Schwingungsübergänge fehlen in der transmittierten Strahlung (dem Absorptionsspektrum) distinkte Wellenzahlen. Im Unterschied dazu werden bei der Raman-Spektroskopie (Re)-Emissionsspektren aufgenommen. Dazu wird die Probe mit monochromatischem Licht bestrahlt, welches möglichst nicht von der Probe absorbiert wird. Die durch elastische Streuung isotrop in alle Raumrichtungen re-emittierte Strahlung wird, soweit sie die gleiche Wellenzahl wie das eingestrahlte Licht hat, als Rayleigh Strahlung bezeichnet. Daneben werden symmetrisch (in Bezug auf die Wellenzahl) zur Rayleigh-Strahlung Emissionslinien kleinerer Wellenzahl (Stokes-Linien) und höherer Wellenzahl (anti-Stokes-Linien) registriert (sogenannter Raman-Effekt<sup>[104]</sup>). Diese als Raman-Linien bezeichneten Emissionsbanden sind in isotropen Proben unabhängig von der Immitterfrequenz. Das Auftreten der Raman-Linien wird durch inelastische Beugung an den Molekülen der Probe erklärt. Die immitierte Strahlung (der Photoquant) regt hierbei Molekülschwingungen (durch Zusammenstöße) an. Die Stokes-Linien entstehen anschließend durch Re-Emission angeregter Moleküle, wobei die Abgabe gleichmäßig in alle Raumrichtungen erfolgt.

Die Frequenzverschiebung der Stokes-Linien relativ zur Immitterfrequenz entspricht somit den korrespondierenden Banden im IR-Spektrum. Ebenso kann es zur Überlagerung von Immitterfrequenz und abgegebener Strahlung angeregter Moleküle kommen. Resultierende anti-Stokes-Linien sind im Vergleich zu den Stokes-Linien intensitätsärmer, da für jede dieser Linien die bei Verlassen des angeregten Zustandes emittierte Strahlung in Resonanz mit Rayleigh-Streustrahlung treten muß. Außerdem ist der Anteil angeregter Moleküle gemäß der Boltzmann-Verteilung bei Raumtemperatur gering. In den dazugehörigen Raman-Spektren werden deshalb nur die Intensitäts-starken Stokes-Linien abgebildet. Durch die Annäherung der Erregerfrequenz an die Absorptionsfrequenz für den Übergang in einen elektronisch angeregten Zustand kommt es zu einer Potenzierung des Raman-Effekts. Dieser Resonanz-Raman-Effekt ist besonders für die Untersuchung von Chromoproteinen vorteilhaft, da hier die Immitterfrequenz an die Absorptionsbanden des Chromophors angepaßt werden kann. Einschränkung sei bemerkt das Fluoreszenzstrahlung, die bei der Rückkehr aus elektronisch angeregten Zuständen auftritt, die vergleichsweise schwache Raman-Streuung überdecken



kann. In Bezug auf die Untersuchungen an HR-Kristallen zeigt die Fluoreszenz die größte Beeinflussung des Resonanz-Raman-Spektrum. Die Anregungswellenlänge wird deshalb so gewählt, daß ein bestmöglicher Kompromiß zwischen Signalverstärkung durch den Resonanz-Raman-Effekt und Fluoreszenzeinflüsse zustande kommt.

Sowohl der Raman- als auch der IR-Spektroskopie liegen Auswahlregeln zu Grunde, die je nach Methode Schwingungsmoden erlauben oder verbieten. Diese Auswahlregeln sind im Fall der IR-Spektroskopie an eine Änderung des Dipolmoments geknüpft. Es sind hier nur die Schwingungen aktiv, die mit eine Änderung des Dipolmoments verbunden sind. Anschaulich erklärt bedeutet dies, daß der elektrische Feldvektor der Meßstrahlung mit dem Dipolmoment des/der Moleküls/Molekülgruppe wechselwirken muß. Hingegen gilt für die Raman-Spektroskopie, daß sich die Polarisierbarkeit des Moleküls im aktiven Schwingungsmodus ändern muß. Nur unter dieser Bedingung kommt es zu einer Wechselwirkung des elektrischen Feldvektors mit der Probe.

Es sei noch erwähnt, das in den durchgeführten Experimenten ausschließlich Fourier transformierte (FT) Raman- und IR-Spektren analysiert wurden. Im Unterschied zur Detektion distinkter Wellenzahlen werden hier gleichzeitig alle am Detektor ankommenden Frequenzen über einen kurzen Zeitbereich aufgenommen (Interferogramm, komplexes Signal in Abhängigkeit von der Zeit) und nach Zerlegung der periodischen Funktion in Summen von Sinus- und Cosinusfunktionen (Fourier-Analyse) mittels Transformation nach Fourier die zeitliche Signalveränderung in eine wellenzahlabhängige Signalveränderung überführt. Der Vorteil diese Methode gegenüber der Detektion einzelner Wellenlängen liegt hierbei primär in der enormen Zeitersparnis dieser Methode.



### 3.5. Anreicherung von Photozyklusintermediaten

Auf die Struktur des unbelichteten Halorhodopsins aufbauend wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Versuche unternommen, Photozyklusintermediate zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden neben der Sammlung von Röntgenstrukturdaten auch spektroskopische Untersuchungen an den Kristallen im UV/VIS- und IR-Bereich vorgenommen. An dieser Stelle sollen deshalb mögliche Strategien zur Anreicherung von Photozyklusintermediaten bei Retinalproteinen hinsichtlich der Möglichkeiten und Limitierungen kurz beleuchtet werden.

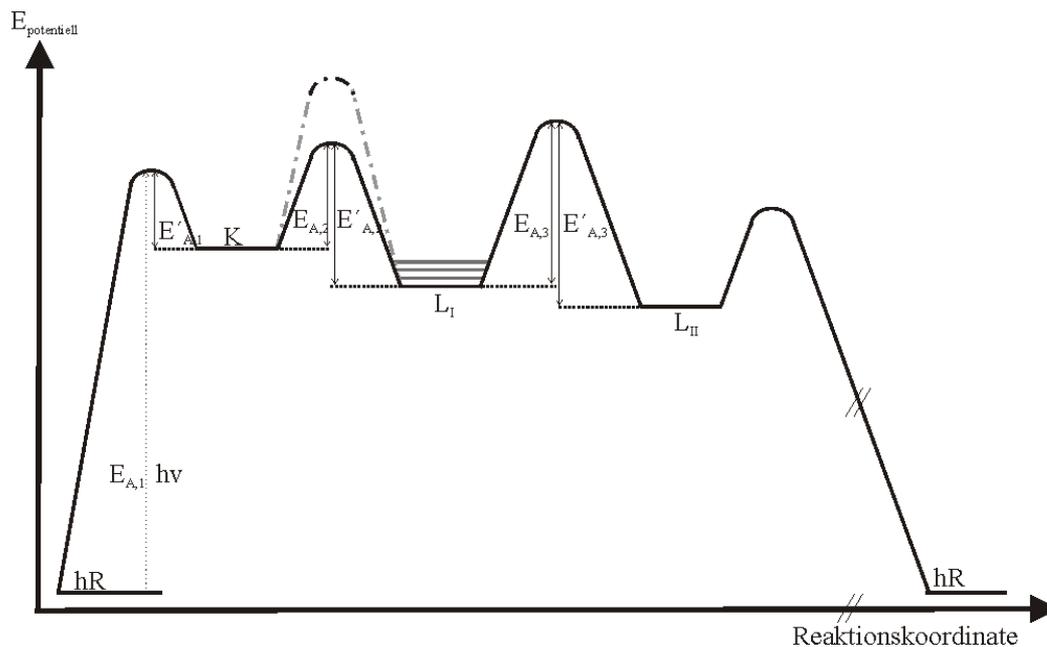


Abb. 9: Darstellung möglicher Energieprofile für Retinalproteine entlang einer imaginären Reaktionskoordinate. ( $E_A$ : Aktivierungsenergie, weitere Abkürzungen siehe Text)

Unabhängig von der jeweiligen Strategie zur Anreicherung von Reaktionsintermediaten sei angemerkt, daß sich strukturelle Änderungen im 3-D Kristall von denen in Lösung oder *in vitro* ablaufenden Prozessen unterscheiden können. Beispiele solcher Unterschiede sind für das Photoactive Yellow Protein ausführlich an Hand der strukturellen Differenzen zwischen NMR<sup>[105]</sup> (Spektroskopie in Lösung) und RSA<sup>[106]</sup> (Spektroskopie an 3-D Festkörpern) beschrieben. Auch für Bakteriorhodopsin werden in Abhängigkeit von der Methode (Elektronenmikroskopie und -Kristallographie [EM] versus RSA) und/oder Probenform (2-D versus 3-D) strukturelle Unterschiede bei Intermediaten beobachtet<sup>[107][108]</sup>. Leider sind diese Differenzen, besonders was die Untersuchung von 3-D Kristallen anbelangt, möglicherweise systemimmanent. Das heißt, Kristallkontakte und/oder Kristallpackungen verhindern eventuell strukturelle Änderungen in 3-D Kristallen, was in manchen Fällen den Verlust der kristallinen Ordnung begründen mag. Hinzu kommt, daß gerade bei EM-Untersuchungen oftmals extreme pH-Werte gewählt werden<sup>[109][110]</sup>, die die Messungen beeinträchtigen



können. Der Einfluß des Aggregatzustandes und der Meßparameter ist deshalb nicht unmittelbar auf die Diskrepanzen beider Methoden zurückzuführen.

Eine weitere grundsätzliche Frage bei der Verwendung der RSA ist die Vergleichbarkeit von Strukturen bzw. Strukturänderungen, die bei tiefen Temperaturen untersucht werden (dies ist der Regelfall bei der RSA, um eine Schädigung des Kristalls durch unspezifische Reaktionen gebildeter Radikal zu minimieren) mit den bei Raumtemperatur beobachteten Änderungen.

Konzentriert man sich auf die RSA ergeben sich grundsätzlich die Möglichkeiten zeitaufgelöste (Laue-Methode) oder statische Untersuchungen durchzuführen. Auf die Laue-Methoden soll in diesem Rahmen nicht näher eingegangen werden. Für die statischen Untersuchungen ist es notwendig, daß die Reaktionsintermediate gezielt angereichert und über die Meßzeit stabilisiert werden können. Zu diesem Zweck werden beispielsweise bei enzymatischen Reaktionen inhibierende, photolabile Substratanaloga eingesetzt, bei denen nach Initiation der Reaktion durch Photolyse gezielt die reaktive Komponente freigesetzt wird<sup>[111]</sup>. Im Falle der Chromoproteine kann durch die Belichtung bei definierter Wellenlänge eine Serie von Reaktionen eingeleitet werden. Die beiden hier erwähnten Beispiele finden sowohl in zeitaufgelöster RSA als auch in der stationären Analyse bei tiefen Temperaturen Anwendung.

Eine weitere, allerdings umstrittene Möglichkeit, ist die Verwendung von Mutanten, deren Reaktionskinetik (siehe Abb. 9, Übergang K nach L<sub>1</sub>) am Übergang von einem Intermediat zu Nächsten derart verzögert (die Aktivierungsbarriere erhöht) ist, daß es zur Anreicherung eines Intermediates kommt. Hauptproblem bei diesen Experimenten ist die Vergleichbarkeit gewonnener Informationen von Mutante und Wildtyp.

Der gezielte Reaktionsbeginn mittels pH-Änderung, der ursprünglich bei zeitaufgelösten RSA genutzt wurde, kann allerdings auf die statische RSA übertragen werden<sup>[111]</sup>. Diese bisher wenig genutzte Möglichkeit, ist kürzlich von Kiefersauer *et al.* (2000)<sup>[112]</sup> im Hinblick auf ein mit Feuchtigkeits- und pH-Kontrolle kombiniertes Kühlsystem publiziert worden. Die Autoren beschreiben eine Modifikation des herkömmlichen Kühlsystem zur RSA, mit dessen Hilfe die Ordnung im Kristall über die Manipulation des Feuchtigkeitsanteils (Transformation) kontrolliert werden kann. Durch geschickte Kombination einer pH-Änderung mit der Feuchtigkeit sollte hier eine Möglichkeit bestehen Reaktionen über den pH-Wert zu kontrollieren.

Neben diesen (photo-)chemischen Parametern können gezielt Temperaturänderungen zur Inhibition von beispielsweise photochemisch induzierten Reaktionen genutzt werden. In Abb. 9 ist ein hypothetisches Energiediagramm für den HR-Photozyklus wiedergegeben. Nachdem durch Absorption eines Photons und Retinalisomerisierung der K-Zustand erreicht wird, muß erneut eine Aktivierungsenergie für den Übergang nach L<sub>1</sub> erbracht werden. Initiiert man den Photozyklus bei Temperaturen kleiner 120 K, dann ist die Aktivierungsbarriere zum Erreichen des Folgeintermediats (L) höher als die durchschnittliche kinetische Energie



(Schwingungsfreiheitsgrade gemäß der Boltzmann-Verteilung). Einschränkend sei bemerkt, daß mit dieser Methode der kinetischen Anreicherung kaum größere konformelle Änderungen im Festkörper erreicht werden können. Die damit verbundene Änderung von Kristallkontakten führt i. d. R. zum Verlust der Ordnung im Kristall (siehe oben). Besteht dieses Problem nicht, dann können mit dieser Strategie durch Temperaturerhöhung systematisch die Folgeintermediate angereichert werden, vorausgesetzt, die Aktivierungsenergien für die Hinreaktion nehmen von Übergang zu Übergang zu und das jeweilige Produkt hat eine geringere potentielle Energie als der vorangehende Zustand.

Bei der Wahl einer solchen Strategie sind einige Punkte zu beachten: Grundsätzlich gilt, daß die erzeugten Tieftemperaturintermediate nicht a priori mit Raumtemperaturintermediaten gleichzusetzen sind. Weitere funktionelle Charakterisierungen des Kristalls, (UV/VIS, FTIR, EPR etc) sind deshalb notwendig, um einen Vergleich mit physiologischen Bedingungen zu erstellen. Darüber hinaus können zeitaufgelöste Studien (Photozyklus von HR oder serielle Abfolge der Rhodopsin-Intermediate) eine deutliche Temperaturabhängigkeit zeigen. So ist zu berücksichtigen, das sich die Aktivierungsenergien (für Hin- und/oder Rückreaktion) temperaturabhängig verändern. Zusätzlich ist zu beachten, das derart gebildete Photoprodukte mitunter nicht einheitlich, sondern, strukturell heterogen, über einen Konformationsraum verteilt sind. In Abb. 9 ist dieses Problem für das L<sub>1</sub>-Intermediat mit mehreren Zuständen erhöhter potentieller Energie angedeutet. Aus Gründen der Vereinfachung gibt Abb. 9 allerdings nur die potentielle Energie entlang einer Reaktionskoordinate wieder. Es können durch Temperatur-, Druckänderungen etc. auch andere Reaktionskoordinaten beschriftet werden.

Eine Alternative ist deshalb die Akkumulation des langlebigsten Photointermediates unter photostationären Bedingungen bei Raumtemperatur mit anschließendem schockgefrieren des Zustandes. Auf diese Weise läßt sich allerdings nur ein Intermediat erzeugen. In diesem Fall ist es notwendig weitere Studien mit Mutanten durchzuführen, durch deren Belichtung sich ein anderes, bestenfalls physiologisches, Intermediat anreichern läßt.

Sowohl für die bei tiefen Temperaturen angereicherten als auch für die bei Raumtemperatur erzeugten Intermediate gilt, daß während der RSA keine Folgereaktionen ablaufen, da sonst lediglich ein zeitlich gemitteltes Bild über alle durchlaufenen Zustände erhalten wird.

Im speziellen Fall der photoinduzierbaren Reaktionen kommt eine weitere Einschränkung bei den durch tiefe Temperaturen angereicherten Intermediaten hinzu. Durch die intensive Belichtung der Kristalle kann es zu einer starken lokalen Erwärmung kommen. Das vorrangige Ziel besteht also darin einen sinnvollen Kompromiß zwischen minimal aufzuwendender Bestrahlungsdosis und Ausbeute eines Intermediats zu erzielen. Die kürzlich von Edman *et al.* (1999)<sup>[136]</sup> publizierte Prozedur zur Erzeugung des K-Intermediates von BR im Kristall ist aus diesem Grund skeptisch zu bewerten. Die Tatsache das dieses Intermediat selbst bei 100 K nicht über längere Zeit stabil ist, hat die Autoren veranlaßt während der gesamten Datensammlung eine Belichtung des Kristalls vorzunehmen (photostationäres Gleichgewicht). In



Folge der kontinuierlichen Belichtung ist davon auszugehen, dass es zu einer starken lokalen Erwärmung am Ort des Chromophors und in Folge thermisch induzierter Reaktionsprodukten kommt.



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Einführung

#### 4.1.1. Strukturuntersuchungen an HR

Die bisher präsentierten HR-Strukturmodelle basieren sämtlich auf Untersuchungen 2-dimensionaler Kristalle (2-D Kristalle) mittels Elektronen-Kristallographie und -Mikroskopie. In allen Fällen wurden *in vivo* gebildete 2-D Kristalle (HR-PM, Schwimmdichte 1.14 – 1,16

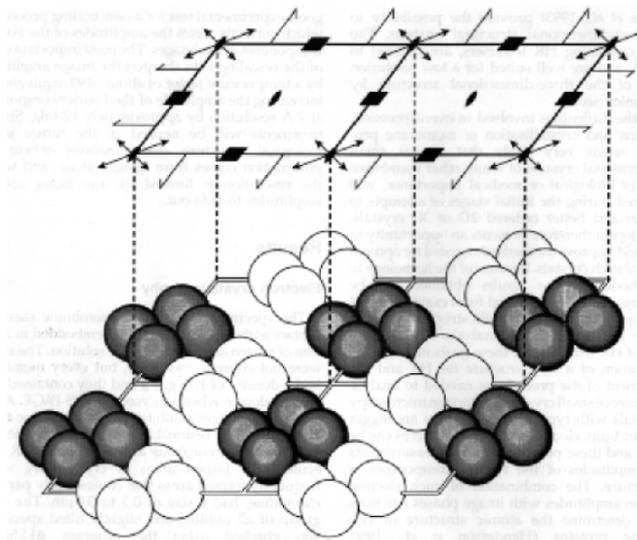


Abb. 10: HR Packung der 2-D Kristalle im  $p42_12$  Gitter. Jeweils vier gleich orientierte Monomere (gleicher Füllung) sind zu einem Tetramer zusammengefaßt. Die zwei Tetramere einer asymmetrischen Einheit sind durch die Quadrate (Zellkonstante 102 Å)

g\*cm<sup>-3</sup>) über Dichtegradientenzentrifugation isoliert und bis auf die Entfernung der Saccharose ohne weitere Behandlung auf Kohlenstoff-beschichteten Kupfer-Gittern tiefgefroren und mikroskopiert. Die in der ersten elektronenmikroskopischen Studie von Havelka *et al.* (1993)<sup>[113]</sup> generierte Projektion mit einem Auflösungslimit von 6 Å in der Membranebene zeigt Tetramere identisch orientierter Moleküle. Dies ist in Abb. 10 schematisch durch schwarze und weiße Kugeln angedeutet. In der zweiten elektronenmikroskopischen Untersuchung<sup>[114]</sup> konnte durch Tomographie an 2-D Kristallen erstmals ein 3-dimensionales Modell (3-D) des Monomers erzeugt werden. Der Kontakt innerhalb jedes dieser Tetramere wird über die Helices D und E eines Monomers mit Helix B des anliegenden Monomers vermittelt. Die Tetramere wiederum lagern sich antiparallel zueinander an. Vermittelt wird der Intertetramer-Kontakt über zwei F Helices benachbarter Monomere. Ähnlich dem Tetramer bilden die Helices B, D und E zweier benachbarter Monomere den Intratrimer-Kontakt (siehe Abb. 23) in den 3-D Kristallen von HR. Hinzu kommen hier noch Protein-Lipid-Wechselwirkungen der Palmitinsäure mit den Helices D und C sowie D und B zweier Monomere. Im Unterschied zu den *in vivo* Kristallen erfolgen die Intertrimer-Kontakte in den 3-D-Kristallen ausschließlich über dazwischen liegende Lipide.

Fehlorderungen, wie z. B. die Versetzung der kristallinen Bereiche sowie Fehlstellen (Löcher), in den 2-D Kristallen limitieren in beiden vorangehenden Untersuchungen die maximale



Auflösung. Mit der Einführung einer verbesserten Mittelungsprozedur (unbending-Prozedur), hier wird der gesamte 2-D Kristall durch Translation (in der x,y-Ebene) eines kleinen, möglichst gut geordneten Bereiches (Referenzbereich) korrigiert, ließ sich kürzlich die Auflösungsgrenze nochmals verbessern<sup>[115]</sup>. Auf der Basis der vorangegangenen Untersuchung konnte mit dieser Prozedur und weiteren 85 Diffraktionsbildern die effektive Auflösung auf 5 Å in der Membranebene und 12 Å orthogonal zur Membranebene verbessert werden. Die entsprechende Elektronendichte ist in Abb. 11 gezeigt. Erstmals sind hier durchgehende Elektronendichtebereiche der sieben Helices zu erkennen (Teilabb. B und C) und auch der  $\beta$ -Ionon Ring, nahe Helix E, ist zu lokalisieren (Teilabb. A und C).

Auch bei einer maximalen Auflösung von 5 Å ist die Helixanordnung von HR und BR nahezu identisch. Versuche, die EM-Strukturen beider Proteine bei dieser Auflösung zur Deckung zu

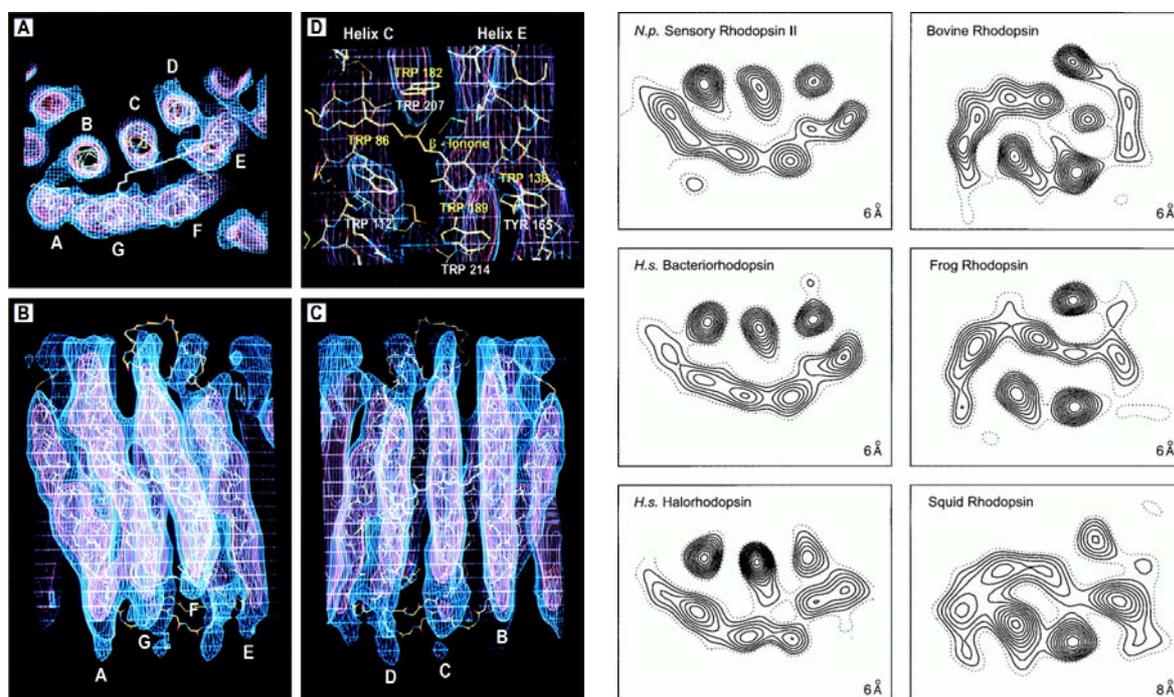


Abb. 11: links: Elektronendichtekarten von HR nach Kunji *et al.* (2000)<sup>[115]</sup> A Sicht auf die extrazelluläre Seite B und C Ansichten der Helices in der Membranebene; D Vergrößerung der Retinalumgebung um den Ionon-ring

Abb. 12: rechts: Vergleich der Projektionen (Ansicht ez bzw. intradiscal) verschiedener 7 TM-Proteine orthogonal zur Membranebene<sup>[25]</sup>. Alle Darstellungen sind auf 6 Å Auflösung normiert (Ausnahme Squid).

bringen (hier nicht gezeigt), ergeben nur geringe Abweichungen, vorzugsweise in Helix E und F. In Abb. 12 sind zum Vergleich die Projektionen verschiedener Rhodopsine orthogonal zur Membranebene bei 6 Å dargestellt. Der Vergleich der extrazellulären bzw. intradiskalen Ansichten zeigt die starke Ähnlichkeit der archaealen Rhodopsine (Abb. 12, links) bzw. deren Unterschiede zu eukaryotischen Rhodopsinen (Abb. 12, rechts). In allen drei archaealen



Vertretern sind die Helices B, C und D als isolierte Bereiche zu erkennen, Helix A, E bis G sind relativ dazu angewinkelt und gehen in der Projektion ineinander über (Abb. 12). Deutlich verschieden dazu sind die eukaryotischen Rhodopsine deren 3-dimensionale Struktur schon in der Einleitung (Abschnitt 3.1) am "Rinderrhodopsin" näher erläutert wurde.

Es bleibt festzuhalten, daß auch bei niedriger Auflösung ein unterschiedliches Helixarrangement zwischen archaealen und eukaryotischen Rhodopsinen zu erkennen ist.



#### 4.1.2. HR-Tieftemperaturintermediate

Strukturuntersuchungen an HR-Intermediaten wurden bis dato nicht publiziert. Die zur Verfügung stehenden 2-D-Kristalle sind von zu geringer Qualität und erst kürzlich konnte die Auflösung von Kunji *et al.* (2000)<sup>[115]</sup> auf 6 Å verbessert werden (siehe 4.1.1).

In dieser Arbeit wurden mehrere Strategien zur Anreicherung und Strukturanalyse von Photozyklusintermediaten untersucht. Für das bei 110 K stabile K-Intermediat wurden sowohl Messungen bei konstanter Belichtung (532 nm) als auch mit einmaliger Vorbelichtung vorgenommen. Der zur Anreicherung der (des) L-Intermediate(s) vorgenommene Versuch durch Temperaturerhöhung auf 200 K (ab 170 K kann der L-Zustand UV/VIS-spektroskopisch nachgewiesen werden) der tiefgefrorenen Kristalle erwies sich als nicht gangbarer Weg. Die gefrorenen Kristalle verlieren mit ihrer Erwärmung auf 195 K nach Belichtung (632 nm) reproduzierbar ihre kristalline Ordnung. Um dennoch eine Anreicherung des L-Intermediats zu erreichen wurden deshalb bei Raumtemperatur kontinuierlich belichtete Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Unter diesen photostationären Bedingungen reichert sich bei Raumtemperatur das langlebigste Intermediat (L) des Photozyklus von HR an.

#### 4.2. Proteinreinigung

Die Isolierung von HR erfolgte mit Änderungen nach Duschl *et al.* (1988)<sup>[190]</sup> wie unter 7.3.1 beschrieben. Um eine HR-Solubilisat möglichst konstanter Zusammensetzung hinsichtlich

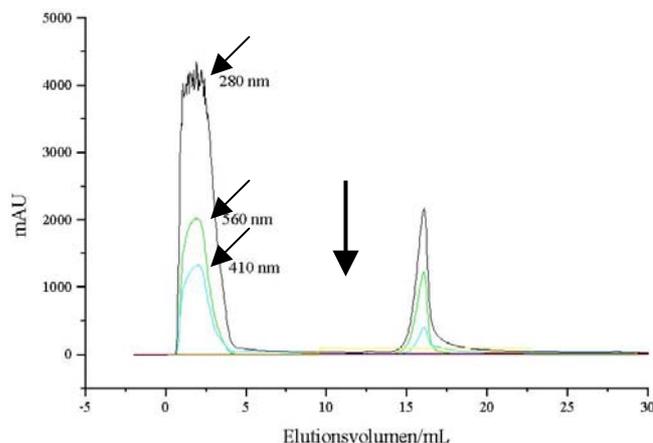


Abb. 13: Chromatogramm einer HR-Reinigung. In Cholat solubilisiertes HR wird an eine Phenyl substituierte Sepharose-Matrix gebunden und nach Entfernung von Proteinverunreinigungen durch einen Detergenzwechsel auf  $\beta$ -Oktylglukosid eluiert. Weitere Einzelheiten siehe 7.3.1 HR-Isolierung.

des Protein/Lipid-Verhältnis zu erhalten, wurde bei definiertem Stoffmengenaufrag mit konstantem Bettvolumen, Volumen an Waschpuffer, konstantem Volumenstrom etc. gearbeitet. An Stelle des von Duschl verwendeten Phenylsepharose CL-4b Mediums wurde eine "vorgepackte" Resource-Phenylsepharose, deren Vorteil neben den reproduzierbareren Packungseigenschaften in ihrer hohen Beladungskapazität liegt, verwendet. Im Unterschied zum CL-4b Medium wird bei diesem



Säulentyp selbst bei geringer Proteinbeladung nur ein Elutionspeak ( $\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$ ) für HR nach dem Detergenzwechsel gefunden.

Abb. 13 zeigt ein typisches Chromatogramm der HR-Reinigung mit Hilfe der Phenyl-Sepharose. Der vertikale Pfeil bei 11 mL Elutionsvolumen markiert den Detergenzwechsel von 0 auf 100 %  $\beta$ -Oktylglukopyranosid (OG). Vor dieser Marke wird ein Elutionspeak mit hoher Proteinkonzentration ( $\lambda_1 = 280 \text{ nm}$ , Linie 1.) aber geringem HR-Anteil ( $\lambda_2 = 570 \text{ nm}$ , Linie 2) gefunden. Nach dem Detergenzwechsel auf OG erkennt man wiederum drei korrespondierende Peaks ( $\lambda_1 = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 = 560 \text{ nm}$ ,  $\lambda_3 = 420 \text{ nm}$  [Linie 3] bei ca 20 mL Elutionsvolumen). Für das HR-Wildtypprotein können so bis zu 80 % reinen HR-Solubilisats gemessen an solubilisierter HR-Membranfraktion gewonnen werden. Die Reinheit des HR geht mit einem Verhältnis der Absorptionsmaxima für 280/560 von ca 1.6 gegen 100 %<sup>[116]</sup>.

Eine Änderung des Solubilisierungspuffers von 4 M NaCl auf 3.0, 3.5 oder 4.0 M KCl, um einen nachträglichen Wechsel des Salzes zu vermeiden, ergab keinen Einfluß auf die Solubilisierungsausbeute und Stabilität von HR. Die nach Konzentration des Solubilisats erhaltenen UV/VIS-Spektren zeigten geringe (< 2 %) oder nicht mehr nachweisbare Anteile an Cytochrom C (Spektren nicht gezeigt).

#### 4.3. Kristallisation des Halorhodopsin Wildtyps sowie einiger Mutanten

Für die HR-Kristallisation wurde die von Landau *et al.* (1996)<sup>[191]</sup> beschriebene Methode der kubischen Lipidphasen verwendet. Dazu wird die Proteinlösung mit dem Lipid Monoolein in einem Massenverhältnis gemischt (ca 1/2), welches die Ausbildung einer bikontinuierlichen kubischen Lipidphase zur Folge hat (siehe auch Abschnitt 5.1). Merkmal der kubischen Lipidphase ist die dreidimensionale Anordnung einer ununterbrochenen Lipiddoppelschicht.

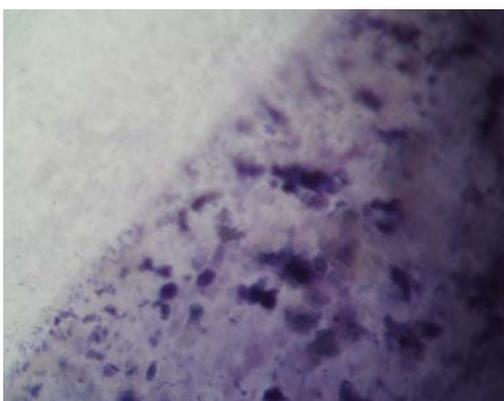


Abb. 14: Ausschnitt einer Lipid/ Protein-Mischung. Deutlich zu erkennen ist die Trennung in eine lipidreiche (links oben) und eine proteinreiche Phase (rechts)



Abb. 15: Vergrößerter Ausschnitt der lipidreichen Phase entsprechend der nebenstehenden Abbildung. Zu erkennen sind hunderte Kristallkeime.

Einmal in diese Lipidschicht integrierte Membranproteine sollten über laterale Diffusion jeden beliebigen Ort innerhalb des Membransystems erreichen und somit leicht eine neue relative Orientierung einnehmen können. Die Vorgänge im Verlauf der Kristallisation sind bisher nicht bekannt. In Abschnitt 5.1 wird deshalb und auf Grund der in dieser Arbeit gewonnenen Beobachtungen eine Hypothese zu den Vorgängen im Kristallisationsverlauf (in kubischen Lipidphasen) aufgestellt.

Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen war auf Grund der langen Kristallisationszeit (3-9 Monate) für den HR-Wildtyp langwierig. Um den Aufwand der Probenpräparation zu verringern und eine möglichst große Anzahl von Parametern zu variieren, wurden neben der Variation der Kristallisationsbedingungen zusätzliche Anstrengungen unternommen, die Inkubationszeit der Ansätze stark zu verkürzen und die verwendeten Probenmengen zu minimieren. Die Präparation erfolgte zu Beginn, wie von Landau *et al.*<sup>[191]</sup> beschrieben, in Glasröhrchen (Innendurchmesser 5 mm, Länge 300 mm) mit Volumina der kubischen Phase von etwa 20  $\mu\text{L}$ . Das Gesamtvolumen wurde im Verlauf der Optimierung auf 7-10  $\mu\text{L}$  verringert. Um die zeitaufwendige Überführung des festen Lipids zu umgehen, wurde anschließend versucht das Lipid in flüssiger Form (Schmelzpunkt ca. 35 °C) in die Kristallisations-

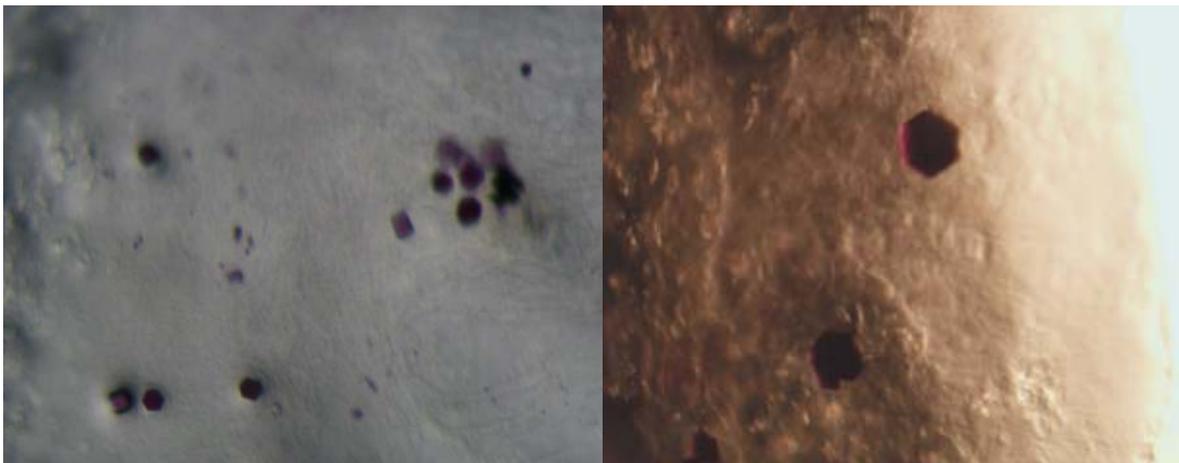


Abb. 16: HR-Kristalle eingebettet in eine Monoolein-Matrix. Die Kristalle haben die ungefähren Abmessungen von  $150 \times 150 \times 20 \mu\text{m}$

ansätze zu überführen. Diese Vorgehensweise birgt den Nachteil in sich, daß es zu einer unvollständigen Mischung von Lipid und Proteinlösung kommt. Abb. 14 und Abb. 15 zeigen Ausschnitte einer mit flüssig überführtem Lipid präparierten Phase. Das vor der Durchmischung erstarrte Lipid erlaubt selbst durch intensive Mischung von Lipid und Proteinlösung keine Ausbildung einer homogenen Phase (Abb. 15). Diese Phasentrennung verhinderte die Kristallisation zwar nicht, doch führen die hohen lokalen Proteinkonzentration zur Ausbildung einer Vielzahl von Kristallkeimen und in Folge dessen zum Wachstum vieler kleiner Kristalle (maximaler Durchmesser 50  $\mu\text{m}$ ) wie in Abb. 15 gezeigt. Auch ein schnelles Vermischen der Lipidschmelze mit der Proteinlösung führt zu einer Auftrennung in protein- bzw. lipidreiche Phasen mit dem Unterschied, daß sich die wäßrige Lösung auf Grund ihrer

vergleichsweise hohen Dichte nach einmaliger Zentrifugation unterhalb der lipidreichen Phase sammelt. Ein hoher Zerteilungsgrad bzw. eine hohe Lipidoberfläche sind somit unumgänglich, um eine möglichst homogene kubische Lipidphase zu erhalten. Um das Lipid dennoch zügig in die einzelnen Kristallisationsansätze zu überführen, wurden anschließend Eppendorf-Reaktionsgefäße (für die PCR, 250  $\mu\text{L}$  Volumen) verwendet, deren vergleichsweise großer Durchmesser ein leichtes Eintragen des festen Lipids ermöglicht. Darüber hinaus lassen sich die entstandenen Kristalle in diesem System sehr viel leichter aus der Lipidmatrix isolieren.

Abb. 16 zeigt HR-Kristalle (des Wildtyps) nach ca. 9 monatiger Inkubationszeit. Die Lipidmatrix ist zu diesem Zeitpunkt nahezu farblos und das anfänglich homogen verteilte Protein liegt jetzt in kristalliner Form vor. Die hexagonalen Kristalle haben Abmessungen von 100 bis 200  $\mu\text{m}$  in den größten Dimensionen und ca 10 bis 20  $\mu\text{m}$  orthogonal dazu. Die Konsistenz des Lipids ist jetzt zähflüssig und nicht mehr gelartig wie unmittelbar nach der Präparation. Mit einer erfolgreichen Kristallisation von HR ist somit offenbar ein Phasenübergang von einer kubischen zu einer lamellaren Lipidphase verbunden (siehe Kapitel 5.1).

Da die Kinetik eines solchen Phasenübergangs unmittelbar mit dem zu Beginn vorliegenden Lipidanteil zusammenhängt, sollen im folgenden nur die Endkonzentrationen der beteiligten Komponenten für einen Lipidanteil von 58 % (w/w) angegeben werden:

$$58 \% \text{ (w/w) Lipid} / c(\text{HR}) = 3,3 \text{ bis } 3,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} / c(\text{KCl}) = 1,5 \text{ bis } 1,7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} / \\ c(\text{Tris-HCl}) = 2\text{-}5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ (pH} = 7,2) / 3\text{-}5 \% \text{ (w/w) } \beta\text{-OG}$$

Eine Vorhersage über den Verlauf einer Kristallisation läßt sich, in Abhängigkeit von den Präparationsbedingungen, nach 2 bis 8 Wochen machen. Bei erfolgreicher Wahl der Kristallisationsbedingungen erscheinen in der Lipidmatrix Kristallisationskeime wie in Abb. 17 dargestellt.



Abb. 17: HR-Kristallisationsexperiment nach ca 8 Wochen. Es bilden sich Kristallisationskeime und das zu Beginn homogen verteilte Protein konzentriert sich stellenweise

stellenweise transparent. Die zu Beginn der Präparation homogen gefärbte Lipidmatrix ist jetzt stellenweise transparent.

Es soll allerdings nicht unerwähnt bleiben, daß vereinzelt Kristallisationsansätze beobachtet werden, die dieses Stadium erreichen und keine Ausbildung größerer Kristalle zeigen. Eine endgültige Aussage über den Erfolg der Kristallisation läßt sich wie eingangs erwähnt also erst nach mehreren Monaten vornehmen.

Abschließend soll noch auf die Kristallisation der beiden Punktmutanten T111V

(Threonin in Position 111 substituiert durch Valin) und R108K (Arginin in Position 108



substituiert durch Lysin) eingegangen werden. In Abb. 18 ist ein Kristallisationsansatz der Mutante T111V gezeigt, der zwei unterschiedlich gefärbte Regionen aufweist. Das Protein an der Lipidoberfläche (rechte Seite der Abb. 18) ist violett gefärbt und umgibt mehrere Proteinkristalle. Im Unterschied dazu ist die linke Seite des Ansatzes durch das Protein blau gefärbt ohne erkennbar Kristalle zu enthalten.

Rüdiger *et al.* (1996)<sup>[165]</sup> konnten zeigen, daß der Austausch von Threonin gegen Valin in Position 111 zu einem deutlichen Anstieg der Chloridbindungskonstante (Michaelis-Menten-Konstante,  $K_m$ ) in den molaren Bereich (ca. 1 M während HR-Wt 4-40 mM) führt. Die Chloridbindung geht mit einer Änderung des Absorptionsmaximums von 565 nm nach 575 nm einher. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums von HR ist also ein Indikator für die Bindung von Chloridionen. Demnach ist die Chloridkonzentration an der Lipidoberfläche niedriger (Abb. 18 rechts) und korreliert mit der Kristallisation. Ein ähnliche räumliche Aufteilung der Kristallisation läßt sich, allerdings ohne Farbänderung, beim Wildtyp beobachten, bei dem Kristallisation i. d. R. von der Lipidoberfläche in die Matrix voranschreitet.

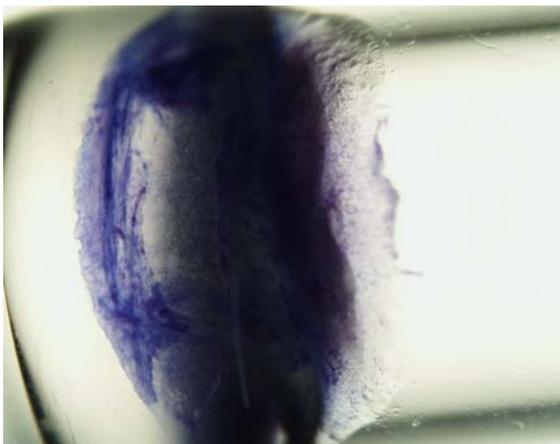


Abb. 18: Kristallisationsexperiment der HR-Mutante T111V. Die Probe zeigt zwei unterschiedlich gefärbte Bereiche

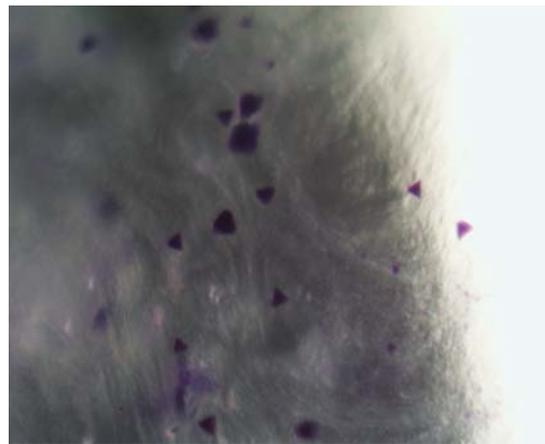


Abb. 19: Kristallisationsexperiment der HR-Mutante R108 K

Die trigonale Kristallform der R108K-Kristalle soll ebenfalls erwähnt werden (Abb. 19). Eine ähnliche Kristallmorphologie wird für die Kristalle der Punktmutation R108Q (Austausch gegen Glutamin) beobachtet. Die Raumgruppe dieser Kristalle ist nicht mehr hexagonal sondern rhomboedrisch (Tabelle 2).

## 4.4. Röntgenstrukturanalysen

### 4.4.1. Datensammlung

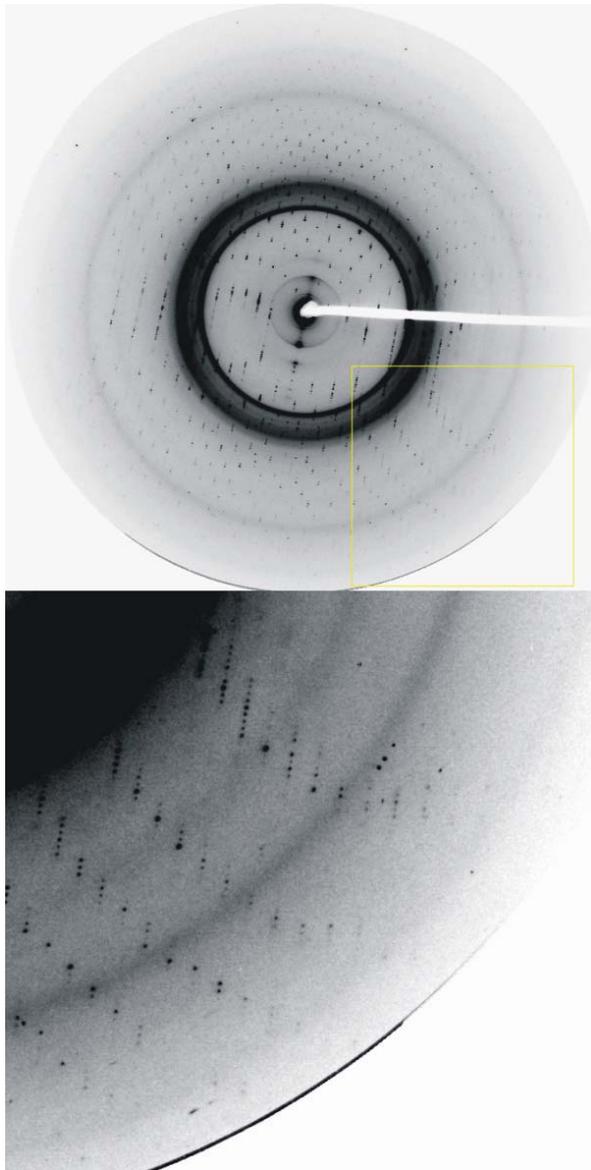


Abb. 20: Diffraktionsbild des Kristalls pd283h aufgenommen an der ID14/3 (Detektor: MarCCD). Die Auflösung am Detektorrand beträgt  $1.8 \text{ \AA}$  (Drehwinkel  $0.5$ ,  $\lambda = 0,93 \text{ \AA}$ ). Die untere Abbildung zeigt eine Vergrößerung des oben markierten Ausschnitts.

Die Datensammlung erfolgte an den Meßstationen BW6 des Hasylab (DESY) in Hamburg (Deutschland) und ID14/3 des ESRF in Grenoble (Frankreich). Eine Untersuchung der Kristalle an der abteilungseigenen Drehanode ( $\text{Cu-K}\alpha$ ) war auf Grund des geringen Volumens der Kristalle nicht erfolgreich. Alle Messungen erfolgten soweit nicht anders vermerkt zur Minimierung des Strahlenschadens an schockgefrorenen Kristallen ( $100 \text{ K}$  oder  $77 \text{ K}$ ) bei  $100 \text{ K}$ . Um eine möglichst einheitliche Chromophorenzusammensetzung zu erhalten, wurden die Kristalle vor dem Einfrieren am Lichtmikroskop lichtadaptiert und nach der Montage unter stark reduziertem Umgebungslicht oder, wenn möglich, bei Dunkelheit röntgenographisch vermessen. Eine Lichtreduktion sollte mögliche Photoreaktionen verhindern. Die Auflösung, der jeweils an einem Kristall gemessenen Daten, konnte schrittweise von anfänglich  $2,9 \text{ \AA}$  auf  $1,8 \text{ \AA}$  (Abb. 20) verbessert werden. Eine Auflistung aller gesammelten Datensätze ist im Anhang angegeben.

Die Bestimmung der Raumgruppe und der Zellparameter erfolgte mit den Programmen MOSFLM<sup>[117]</sup> oder DENZO<sup>[118]</sup>. Dazugehörige kristallographische Statistiken sind im folgenden Abschnitt aufgeführt

(Tabelle 2). Der HR-Wildtyp kristallisiert in der hexagonalen Raumgruppe  $p6_322$  während die Kristalle der Punktmutante R108Q in einer rhomboedrischen Raumgruppe vorliegen.

#### 4.4.2. Molekularer Ersatz, Modellbau und Verfeinerung

Als Suchmodell des molekularen Ersatzes fand das BR-Model 1BRR<sup>[119]</sup> nach Modifizierung Verwendung. Dazu wurden im Suchmodell die Aminosäuren in 34 Positionen durch die entsprechende HR-Sequenz substituiert, sowie 69 Reste gegen Alanin unter Verwendung des Programms INSIGHT II (Molecular Simulations) ausgetauscht. Das gesamte Suchmodell bestand aus insgesamt 188 Aminosäuren (Reste 9 bis 67, 78 bis 152 und 167 bis 223), was 78 % der im HR-Monomer gefundenen Reste entspricht. Für die Phasierung durch Translationsuche, Rigid-Body Verfeinerung, Simulated-Annealing und Torsionswinkelverfeinerung mittels CNS<sup>[120]</sup> ergab sich eine erste Lösung mit einem R-Faktor von 40,3 (freier R-Faktor 43,7). Nach weiterer Modellverfeinerung unter Hinzunahme der Schleifenbereiche und der HR-Sequenz konnte das Modell über eine durchgehende Polypeptidkette (Aminosäuren Alanin 24 bis Alanin 262) auf einen R-Faktor von 23,7 (freier R-Faktor 25,7) verfeinert werden. Dazu waren insgesamt zwölf Verfeinerungszyklen notwendig. Die Kontrolle der Bindungswinkel und -längen mit PROCHECK<sup>[121]</sup> ergab keine anomalen Abweichungen. Zum Modellbau (Einpaßen des idealisierten atomaren Modells in die Elektronendichte) wurden die Programme O<sup>[122]</sup> oder MAIN<sup>[123]</sup> verwendet. Zielfunktion war dabei die Minimierung der R-Faktoren.

	Datensatz HR-Wildtyp	Datensatz R108Q
	pd283h	HRRQ
Maximale Auflösung	1,8 Å	3,5 Å
Unabhängige Reflexe	26590	
Multiplizität	6,6	
Vollständigkeit	98,2 (92,3*)	
R/R <sub>free</sub>	0,237/0,257	
a,b /O	67,3	
c/O	209,7	
Raumgruppe	p6322	r

Tabelle 2: \* im Auflösungsbereich 1,8-1,9 Å



## 4.5. Struktur des Ausgangszustandes (HR578)

### 4.5.1. Die Kristallpackung

HR kristallisiert in Gegenwart von KCl und Monoolein (MO) in der hexagonalen Raumgruppe  $p6_322$ . In Abb. 21 ist die Kristallpackung in Aufsicht der  $ac$ -Ebene dargestellt. HR liegt in Form von Trimeren vor, die mit dem zur Kristallisation verwendeten Lipid MO in un-

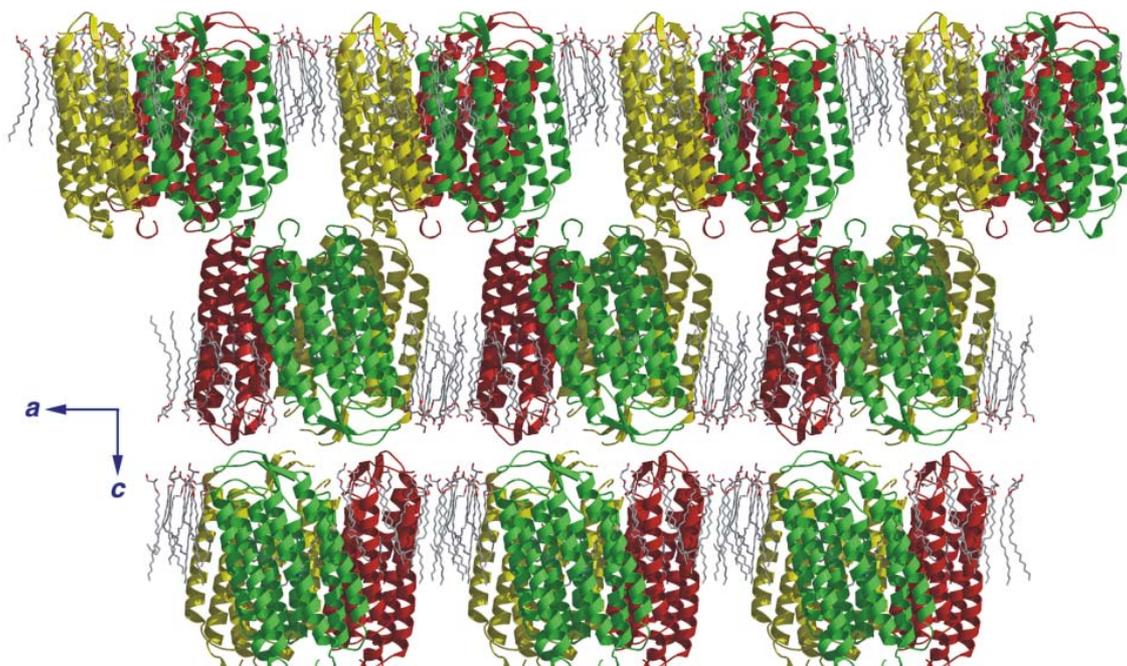


Abb. 21: Schnitt durch die  $a,c$ -Ebene der Kristallpackung von HR ( $P6_322$ ). Die einzelnen Monomer sind gelb, grün und rot eingefärbt, die intratrimeren MO-Moleküle sind grau, die Glycerolkopfgruppen rot markiert.

mittelbarem Kontakt stehen. Die “Kristallisationsmatrix“ MO hat somit einen direkten Beitrag zur Kristallpackung. Orthogonal zu dieser Ansicht (entlang der  $c$ -Achse) vermitteln, wie in (Abb. 22) dargestellt, direkte Protein-Protein-Kontakte über die beiden Schleifenregionen zwischen den Helices AB und BC, sowie über den Carboxyterminus dem Kristallaufbau Stabilität. Die einzelnen Schichten sind, für Membranproteinkristalle vergleichsweise dicht gepackt, entlang der  $c$ -Achse alternierend in der Reihenfolge  $ez/ez/zp/zp$  angeordnet (Abb. 21).

Die  $a,b$ -Schichten sind aus parallel angeordneten Trimeren aufgebaut. Die supramolekulare Anordnung und Orientierung in den 3-D Kristallen unterscheidet somit von dem zuvor von Havelka *et al.* (1993)<sup>[113]</sup> an 2-D Kristallen gezeigten Aufbau in antiparallele Tetramere. Zwischen den  $a,b$ -Schichten des 3-D Kristalls liegen Wassermoleküle, die vorzugsweise in der Region um den Carboxyterminus und die BC-Schleifenregion angeordnet sind.

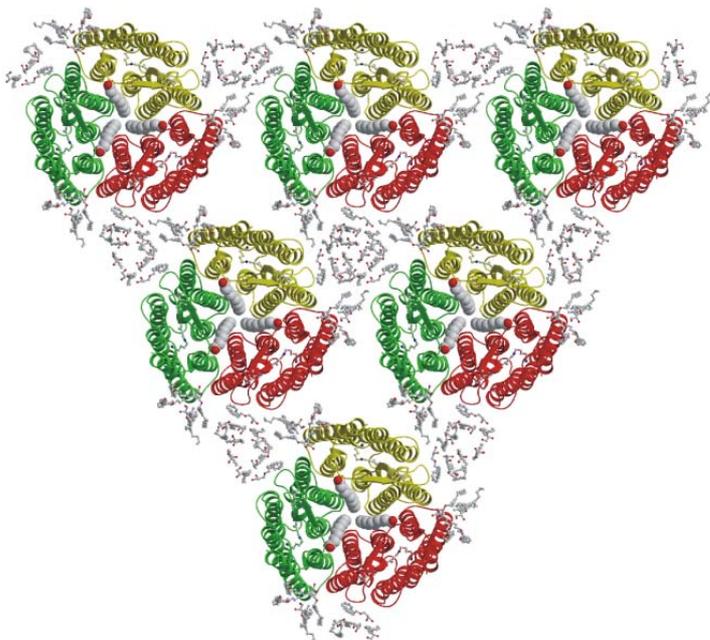


Abb. 22: Schnitt durch die a,b-Ebene der Kristallpackung von HR (p6<sub>3</sub>22), Farbkodierung siehe Abb. 21

Innerhalb eines Trimers ist ebenfalls ein Lipid, die Palmitinsäure<sup>[126][143]</sup>, im Verhältnis 1/1 Lipid/HR gebunden (Abb. 23). Dieses Lipid steht in Kontakt zu einer Reihe von hydrophoben Resten (Alanin, Isoleucin und Prolin) zweier, sich berührender Monomere, über die es Beiträge zum Intratrimer Kontakt liefert. Neben diesen hydrophoben Wechselwirkungen wird das Trimer über Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Helices D und E eines Trimers mit Helix B eines anliegenden Trimers stabilisiert.

#### 4.5.2. Der Aufbau des HR-Trimers

Halorhodopsin faltet in sieben transmembrane Helices (A bis G), eine weitere zur Membran parallel liegende Helix (Helix G') auf der zytoplasmatischen Halbseite und ein antiparalleles Faltblatt auf der extrazellulären Oberfläche. Der Chromophor Retinal ist an Lysin 242 (K242) in Helix G über eine Schiff Base gebunden.

Wie in Abschnitt 4.5.1 bereits erwähnt, liegt HR im Kristall als Trimer zusammen mit Palmitinsäure (PS) vor. Das Trimer bildet die Form eines Kelches, indem es sich von der zytoplasmatischen Seite hin zur extrazellulären Umgebung öffnet. Die PS ihrerseits steht im Van der Waals-Kontakt (VdW) zu zwei aneinanderliegenden Monomeren und stabilisiert die trimere Architektur. Die dichte Packung auf der zytoplasmatischen Seite erfolgt erkennbar über Protein-Lipid-Kontakte. Die hydrophoben Wechselwirkungen des Lipids in dieser

Ein Blick auf die a,b-Ebene in Abb. 22 zeigt, daß der Intertrimer-Kontakt über zehn strukturell geordnete Lipide (MO), die eine lamellare Schicht bilden<sup>[124]</sup>, erfolgt. Die Abstände von 4,5 bis 4,7 Å zwischen den Lipid-Kopfgruppen sind typisch für lamellare L<sub>α</sub>-Phasen von monoalkylierten Lipiden<sup>[125]</sup>. Die anfänglich kubische Lipidphase hat demzufolge im Verlauf der Kristallisation, zumindest im Kristall, eine Phasenänderung von der kubischen zur lamellaren Phase (L<sub>α</sub>) durchlaufen.

Innerhalb eines Trimers ist ebenfalls ein Lipid, die Palmitinsäure<sup>[126][143]</sup>, im Verhältnis



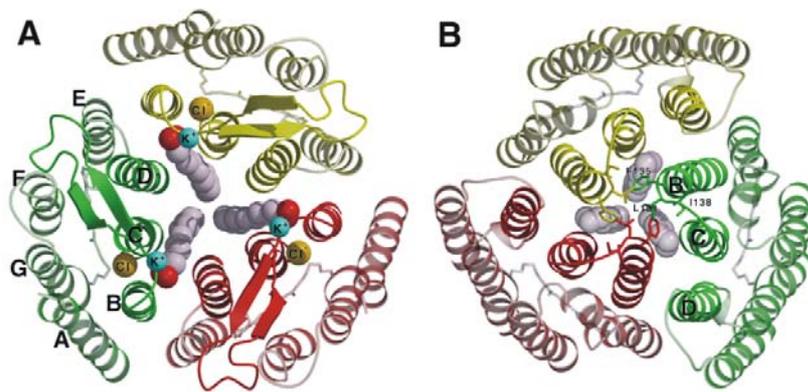


Abb. 23: Ansicht des HR-Trimers von der zytoplasmatischen (A), sowie von der extrazellulären Seite (B). Die HR-Monomere eines Trimers (gelb, grün und rot) sind als Bändermodell, die Palmitinsäure, Chloridionen (gelb) und Kaliumionen (blau) als Kugel und Stabmodell dargestellt

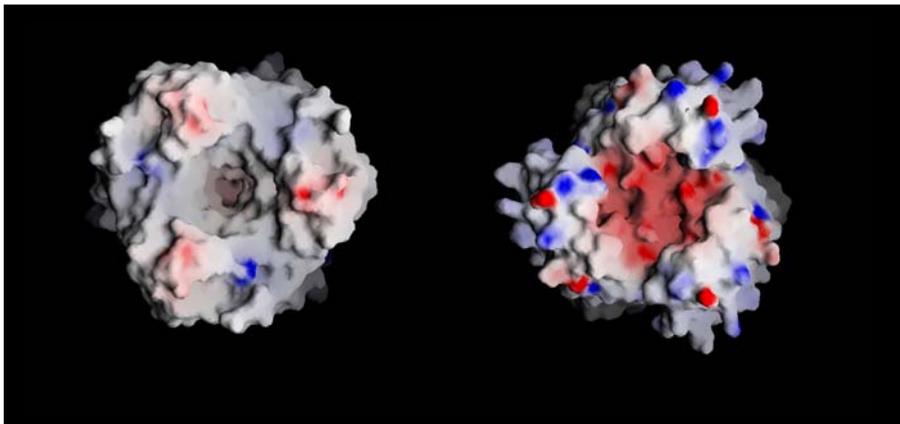


Abb. 24: Verteilung der Oberflächenladung des HR-Trimers in der Ansicht von ez (links) und zp (rechts). Die Färbung entspricht dem Verlauf der Partialladungen von positiv (blau) nach negativ (rot); der negative Bereich auf zp-Seite geht auf D128/D130 zurück. Die Darstellung wurde mit dem Programm Grasp erzeugt.

(T111), die je eine Wasserstoffbrückenbindungen zur Carboxylgruppe der PS ausbilden. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung wird von einem Kaliumion zur Carboxylgruppe der PS gebildet.

Über dem Monomer liegt der mit 23 (*H. salinarum*) bis 33 (*N. pharaonis*) Aminosäuren, im Vergleich zum entsprechenden Segment in BR, große BC-Schlaufen-Bereich. Dieser z. T. hochkonservierte Bereich wird durch ein antiparalleles Faltblatt der Reste Glutamin 87 bis Methionin 91 und Glu100 bis Ser104 ausgebildet. Die gesamte BC-Schleife legt sich über die Helices C bis F auf der zytoplasmatischen Seite von HR. Die verbindende Schleife von Prolin 92 bis Alanin 98, von denen fünf Reste innerhalb der HR's eine hohe Sequenzhomologie aufweisen, verankert den gesamten BC-Bereich über Kontakte zu Resten in der EFG-Region.

Region erfolgen über die Alkylseitenkette. Darüber hinaus sind an der Ausbildung des Trimers die symmetrieverwandten Reste Leucin 131 (L131), Phenylalanin 135 (F135) und Isoleucin 138 (I138) beteiligt (siehe Abb. 23). Von diesen drei Aminosäuren ist F135, in allen publizierten HR-Sequenzen (siehe Abb. 54) und I138 bis auf eine Ausnahme (Valin) konserviert.

Die mit der Palmitinsäure in Van der Waals-Kontakt stehenden Aminosäuren sind ohne Ausnahme in allen untersuchten HR-Sequenzen konserviert. Es handelt sich dabei um Threonin 85, Leucin 110, Isoleucin 142 und Valin 146. Gleiches gilt für die beiden Reste Serin 75 (S75) und Threonin 111



Otomo (1995)<sup>[127]</sup> konnte zeigen das ein Austausch des in allen HR's konservierten Histidins in Position 95 (H95 gegen Arginin) zur Denaturierung des Proteins unter Belichtung führt. Die strukturelle Grundlage für diesen Befund findet sich in den beiden Wasserstoffbrücken zu den Carbonylgruppen von Valin 218 und Glycin 220 im FG-Schleifenbereich. Beide Bindungen sind die einzigen Kontakte, die diese extrazelluläre Region in ihrer Position über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren.

In Abb. 24 ist die Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche, angedeutet durch den Farbverlauf (blau: positiv, rot: negativ), dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die partiell positiv geladene Region auf der extrazellulären Seite, die auf Arginin 103 zurückzuführen ist. Dieser Bereich ist von mehreren konservierten hydrophoben Aminosäuren (Leucin 29, Leucin 80, Valin 227) flankiert. Die zytoplasmatische Seite des Monomers präsentiert vergleichsweise viele positive Partialladungen. Dafür verantwortlich sind fünf Arginine in Helix G' (R258) und im BC-Schleifenbereich (R52, R55, R58, R60).

#### 4.5.3. Die Chloridbindungsstelle

Im unbelichteten Zustand nimmt der Chromophor zum überwiegenden Teil die (all-trans, 15-anti)-Konformation ein, wie von Alshut *et al.* (1985)<sup>[128]</sup> mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie gezeigt. Die RSA ergibt die in Abb. 25 gezeigte Anordnung der Chloridbindungsstelle (CBS). Der Kristall wurde vor der RSA lichtadaptiert und sollte deshalb mindestens 70 % all-trans Anteile des Retinals aufweisen (siehe Abschnitt 4.8.2).

HR kristallisiert in Gegenwart von hohen KCl-Konzentrationen. Folglich sollten sämtliche relevanten Bindungsstellen von Chloridionen besetzt sein. In der Struktur ist ein Chloridion, ca 18 Å entfernt von der zytoplasmatischen Oberfläche (Grenze: Arginin 103) eindeutig zu lokalisieren. Das Ion liegt von drei Wassermolekülen umgeben in 3,8 Å Entfernung von der protonierten Schiff Base (PSB). Die gegensätzlich geladene PSB und das Chloridion bilden keine Wasserstoffbrücke. Mit einem Winkel von 105° zwischen PSB-Vektor und Chloridion liegt vielmehr ein Ionenpaar vor. Die Nachbarschaft, ohne das eine gerichtete Bindung vorliegt, erklärt die zuvor gefundene Anionenabhängigkeit in den FTIR-Spektren<sup>[129]</sup>. An zwei der drei Wassermoleküle (Wat508, Wat512) ist das Ion über Wasserstoffbrücken (beide 3,2 Å) gebunden, während die Entfernung zu Wasser 505 (Wat505) mit 4,7 Å keine derartige Bindung zuläßt. Die drei Wassermoleküle sind, wie in Abb. 25 dargestellt, über ein Wasserstoffbrückennetzwerk (gelbe Linien) jeweils mit ein bis drei weiteren Aminosäuren verbunden. Die einzige Bindung vom Chloridion zum Protein bildet Serin 115 (S115, Abstand 3,1 Å). Diese in allen Haloopsinen konservierte Aminosäure liegt am Übergang der 3<sub>10</sub>-Helix zur α-Helix. Es sei angemerkt, daß die damit verbundene Änderung der Helixsteigung an gleicher Position sowohl in HR als auch in BR vorkommt. Diese Abweichung von der "normalen" α-Helix wird wahrscheinlich durch sterische Wechselwirkung zwischen Retinal und dem in



allen archaealen Retinalproteinen konservierten Tryptophan in diesem Bereich begünstigt. (W112 in HR, W86 in BR).

Ebenfalls in allen archaealen Retinalproteinen konserviert ist der in der Sequenz vier Reste zurück liegende Argininrest (R108 in HR, R82 in BR). Dieses Arginin ist in HR an der Koordination der beiden Wassermoleküle Wat505 (über den Amidstickstoff des Rückgrats) und

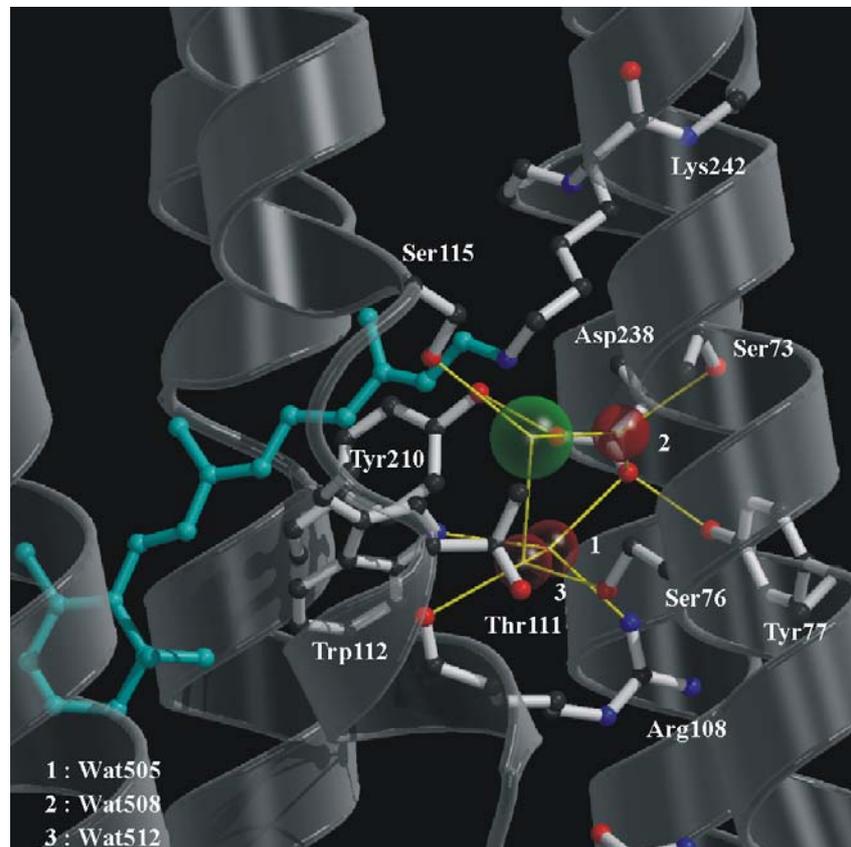


Abb. 25: Chloridbindungsstelle des HR-Grundzustandes (hR). Die beteiligten Aminosäuren, das Retinal (türkis) sowie die beteiligten Heteroatome (Chloridion: grün, Sauerstoffe: rot sind als Kugel und Stab Modelle dargestellt; Wasserstoffbrückenbindungen sind gelb eingefärbt)

Wat512 (über die Guanidinogruppe) beteiligt. Eine Beteiligung des Arginins an der Substratbindung, war von M. Rüdiger *et al.*<sup>[165]</sup> bereits vorhergesagt worden, wobei die Autoren annehmen, daß die Wechselwirkung auf einer direkten Koordination am Chloridion basiert. Im Unterschied zu HR koordiniert in BR die Argininseitenkette an weitere auf der zytoplasmatischen Seite liegende Wassermoleküle. In HR findet man anstatt dessen eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Guanidinogruppe und dem Sauerstoff des Glutamins 105 (Q105). Eine Beteiligung dieser Aminosäure am Chloridtransport konnte von M. Rüdiger (1996)<sup>[130]</sup> gezeigt werden, nachdem ein Austausch durch Glutaminsäure eine signifikante Abnahme der spezifischen Transportaktivität von HR bewirkt.

Entgegen der bisherigen Annahme, daß T111 unmittelbar über Wasserstoffbrückenbildung an der Chloridbindung beteiligt sei, zeigt sich in der HR-Struktur des unbelichteten Zustandes (Abb. 25), daß dessen Hydroxygruppe vom Anion wegzeigt. T111 interagiert anstatt dessen



mit der Carboxylgruppe der PS (siehe Abschnitt 5.6.2). Der Kontakt mit dem Substrat erfolgt demzufolge über VdW-Wechselwirkungen der Methylgruppe. In Abb. 26 ist zur Erläuterung die erste "Schicht" der chloridumgebenden Atome dargestellt. Statt einer gerichteten Wasserstoffbrückenbindung erfolgt der Kontakt weniger spezifisch über einen großen Bereich der Substratoberfläche mit der Methylgruppe von T111. Wie auch T111 sind alle weiteren in Abb. 26 gezeigten Aminosäuren (Valin 72, Serin 73, Serin 76, Tryptophan 112) in HR's konserviert.

Im Vergleich mit den BR-Strukturen der PDB-Datenbank ergeben sich unter anderem zwei wichtige Ähnlichkeiten in den Strukturen des Protein-Rückgrats. In beiden Retinalproteinen ist der vor dem SB-Lysin gelegene Rest ein Alanin (A241 in HR, A215 in BR). Dieses Alanin ist beidemal an einer lokalen Deformation bzw. einem Knick ( $\pi$ -bulge) in Helix G beteiligt. Infolge dieser Störung ist die Abfolge der Wasserstoffbrückenbindungen (in einer  $\alpha$ -Helix zwischen Rest  $n$  und  $n + 4$ ) um eine Position "verschoben", und zwar von Rest  $n$  nach  $n + 5$ .

Eine weitere  $\pi$ -bulge ist für beide Proteine zum Ende der Helix E zu erkennen. In HR geht Leucin 179, in BR Valin 151 erst mit den fünf Reste später gelegenen Aminosäuren eine Wasserstoffbrücke ein. Der sich anschließende Bereich weist in HR erhöhte B-Faktoren auf, was auf eine Zunahme der Flexibilität dieses Bereiches schließen lässt. In den BR-Strukturen ist dieser Bereich entweder fehlgeordnet (1C3W) oder wie in der Struktur von Essen *et al.* (1997)<sup>[119]</sup> (PDB-Code 1BRR) ebenfalls mit einer signifikanten B-Faktorerhöhung verbunden. Die korrespondierende Region in der nachfolgenden Helix F weist in beiden Proteinen ebenfalls deutlich erhöhte B-Faktoren auf.

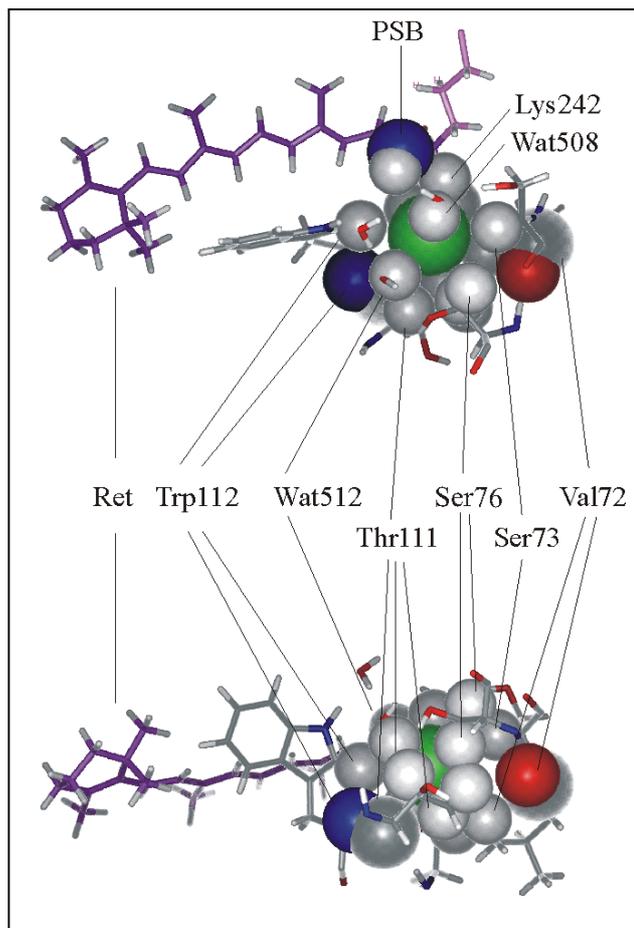


Abb. 26: Kugel-Darstellung des Chloridions (grün) und der es unmittelbar umgebenden Atome (Kohlenstoff und Wasserstoff: grau, Stickstoff: blau, Sauerstoff: rot). Das Retinal ist in violett als Stäbchenmodell wiedergegeben. (Beide Darstellungen unterscheiden sich durch eine 90°-Drehung um das Retinal Rückgrat, Aminosäurecodierung siehe Text)

#### 4.6. Laue Diffraktion

Neben den monochromatischen Diffraktionsexperimenten mit HR-Kristallen wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der Versuch unternommen, nach der Laue-Methode Diffraktionsbilder von HR zu erhalten. Planung und Durchführung dieser Methode erfolgte in

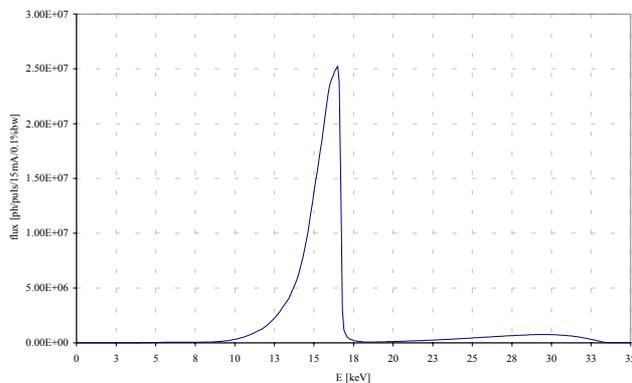


Abb. 28: Laue-Emissionsspektrum der Beamline ID09 zur Zeit des Experiments; Emissionsmaximum bei  $0,75 \text{ \AA}$  mit einer Halbwertsbreite von 12 %

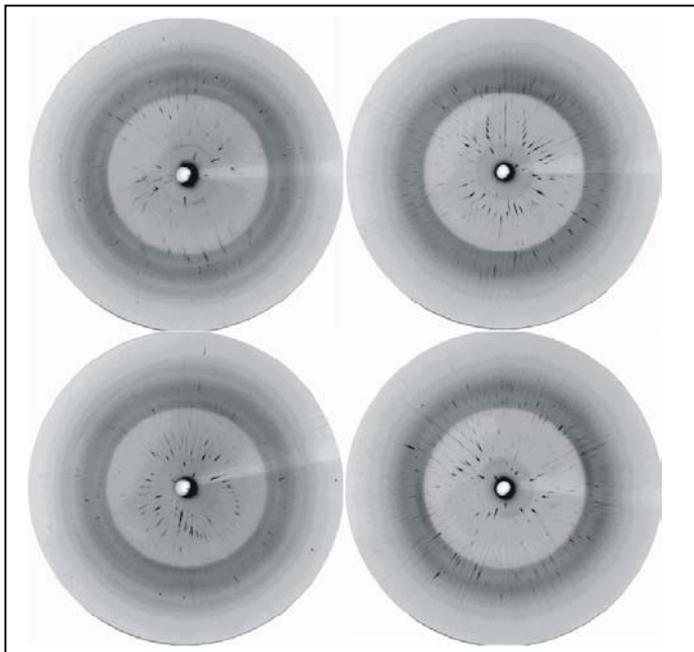


Abb. 27: Laue-Diffraktionsbilder vier verschiedener HR-Kristalle; Auflösung am Detektorrand entspricht  $2,4 \text{ \AA}$ , Belichtungszeit mit Röntgenstrahlung im Wellenlängenbereich  $0,7\text{-}0,9 \text{ \AA}$  und einer Belichtungszeit von  $1,4 \text{ ms}$

Zusammenarbeit mit Friedrich Schotte vom ESRF in Grenoble.

Für diese Experimente wurden Kristalle ausreichenden Volumens ( $> 0,2 \text{ \mu m}^3$ ) an der ID09 (Laue-Beamline) des ESRF, Grenoble, mit polychromatischer Röntgenstrahlung im Wellenlängenbereich  $0,70\text{-}0,79 \text{ \AA}$  belichtet (siehe Abb. 28). Das primäre Ziel dieser auf zeitaufgelöste RSA vorbereitenden Experimente besteht in der Erzeugung eines Diffraktionsbildes nach Belichtungszeiten mit Röntgenstrahlung im ms-Bereich. Um den experimentellen Aufwand möglichst gering zu halten, wurden die Untersuchungen bei einer Temperatur von  $100 \text{ K}$  an Kristallen in Nylonschlaufen durchgeführt. Diese Vorgehensweise vermeidet eine aufwendige Montage der Kristalle in Glaskapillaren. Der gefrorene Zustand erlaubt mithin keine größeren strukturellen Änderungen (eine Ausnahme stellt die Isomerisierung des Retinals dar). Abb. 27 zeigt die Laue-Diffraktionsbilder vier verschiedener HR-Kristalle.

Die Aufnahmen stellen eine Auswahl der vier besten von insgesamt 18 getesteten Kristallen dar. Das potentielle Auflösungslimit liegt im Bereich von 2.5 bis 3.0 Å. Alle Kristalle weisen eine hohe Mosaizität auf ( $> 0.5$ ), was ein "Verschmieren" des Diffraktionsbildes zur Folge hat. Zum Vergleich ist in Abb. 29 ein simuliertes Laue-Diffraktionsbild auf der Basis der HR-Kristallparameter dargestellt.

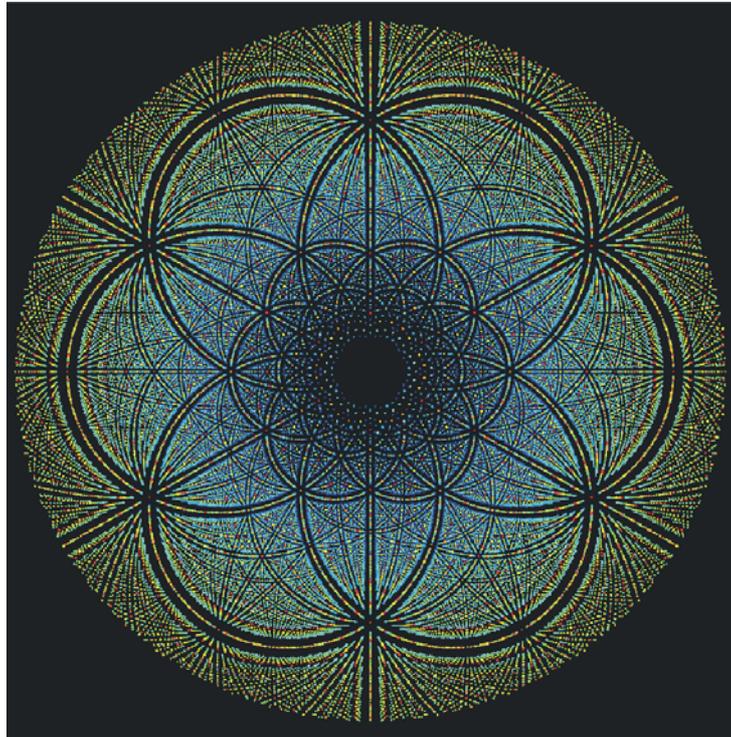


Abb. 29: simuliertes Laue-Diffraktionsbild:  $\lambda = 0,72 - 0,78$  Å, Auflösungsgrenze 2.5 Å, Gitterkonstanten  $a = b = 209$  Å,  $c = 67$  Å; Die Abbildung wurde mit dem Programm LaueGen erzeugt.

## 4.7. Statische UV/VIS-Spektroskopie an Kristallen

### 4.7.1. Das K-Intermediat

Abb. 30 zeigt das UV/VIS-Spektrum eines einzelnen HR-Kristalls mit Dimensionen kleiner  $50 \times 50 \times 10$  [ $\mu\text{m}$ ]. Der Kristall wurde zur Messung mit Hilfe einer Nylon-Schleife (Durchmesser  $100 \mu\text{m}$ ) aus der Lipidmatrix isoliert und bei  $100 \text{ K}$  schockgefroren.

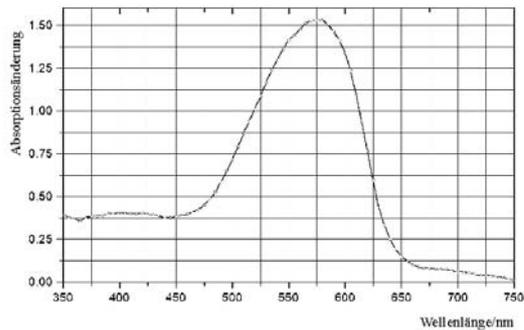


Abb. 30: Absolutspektrum lichtadaptierterter HR-Kristalle;  $\text{HR}_{578}$  (Referenz: Luft)

Analog einer HR-Membran-fraktion weist dieser, vor der Isolierung lichtadaptierte Kristall ein Absorptionsmaximum von etwa  $575 \text{ nm}$  auf. Kleine Abweichungen davon können auf die Streuung des Meßlichtes am anisotropen Kristall zurückgeführt werden. Dieses für lichtadaptierte HR-Kristalle typische Absorptionsspektrum belegt, daß die photochemischen Eigenschaften des unbelichteten HR's im kristallinen Zustand

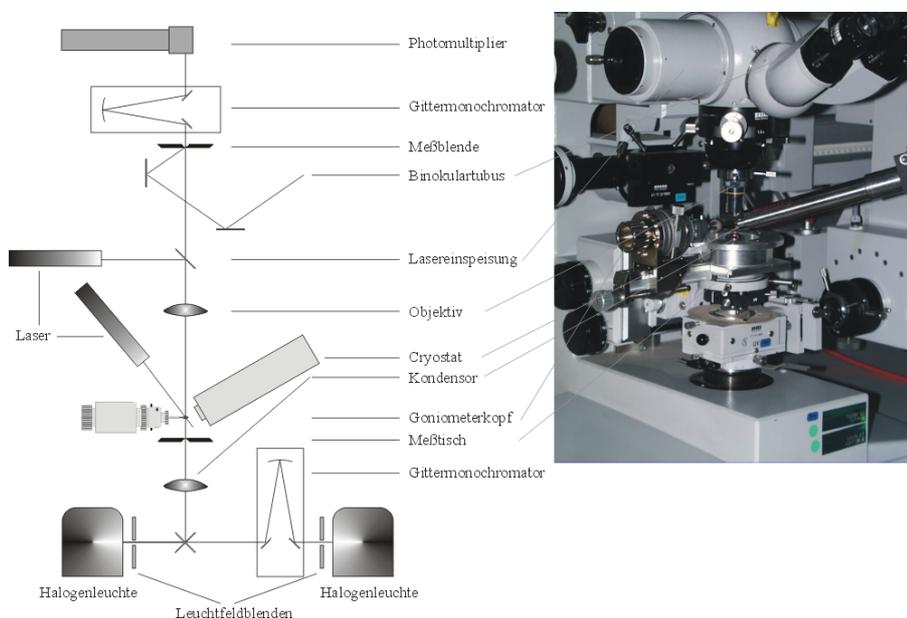


Abb. 31: Schematischer Aufbau (links) und Photo des verwendeten Mikrospektrophotometers. Der Proteinkristall ist am Goniometerkopf befestigt und kann über die Optik des Spektrometers oder direkt beleuchtet werden (Laser im Photo nicht enthalten).

nicht gestört sind bzw. nicht durch die Proteiniso-lierung verändert werden.

An Kristallen der maximalen Größe von  $50 \times 50 \times 10$  [ $\mu\text{m}$ ] wurden anschließend Experimente zur Erzeugung von Photozyklusintermediaten durchgeführt (Abb. 31), da diese mit Extinktionen kleiner 1,5 nach dem Lambert-Beer-Gesetz genügen sollten. Die Anreicherung des jeweiligen Intermediats erfolgte entweder durch Illumination unter photostationären Bedingungen bei Raumtemperatur mit anschließendem Schockgefrieren des Kristalls oder über kinetische Inhibition einer Zyklusfolgereaktion bei tiefen Temperaturen (siehe Kapitel 3.5). Die UV/VIS-Spektroskopie dient in diesem Zusammenhang zur qualitativen und quantitativen Analyse des jeweils erzeugten Photozyklusintermediats. Auf dieser Basis konnten Protokolle

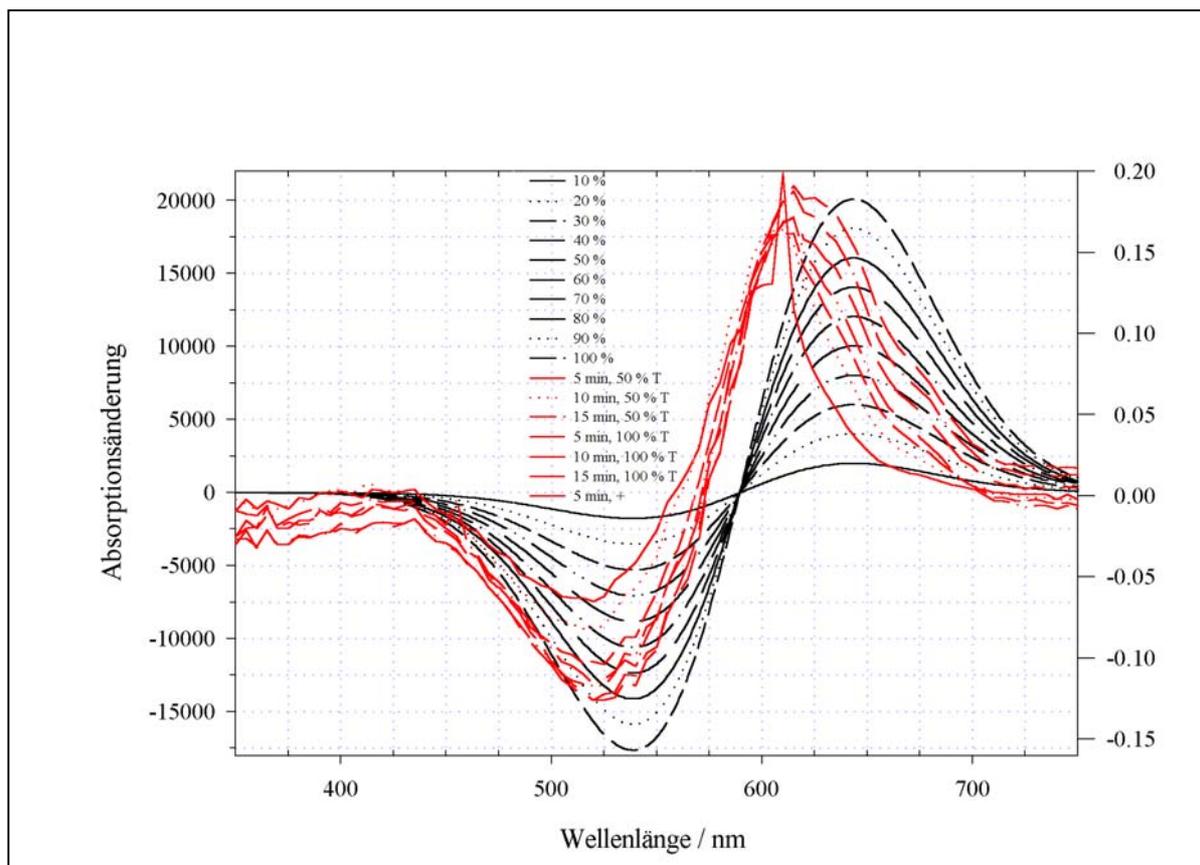


Abb. 32: Differenzspektrum ( $HR_{K,LT}-HR_{578}$ ) von HR-Kristallen bei 110 K. Aufgetragen sind die Spektren nach verschiedenen Belichtungszeiten (rote Kurven, 532 nm Illumination) sowie die simulierten Differenzspektren ( $HR_{578}-HR_L$ ) als schwarze Kurven (siehe Legende). Ordinate in rel. Einheiten (a.u.)

zur Anreicherung des K- und des (der) L-Intermediat(e)s entwickelt werden.

Abb. 32 zeigt eine Abfolge mehrerer Differenzspektren ( $HR_K-hR$ ) zu verschiedenen Zeiten der Erzeugung des rotverschobenen K-Intermediats. Die roten Linien geben die Messungen bei 110 K wieder. Der lichtadaptierte Kristall wurde zu diesem Zweck, wie oben beschrieben, für die Messungen positioniert und ein Referenzspektrum des unbelichteten Zustandes (hR)

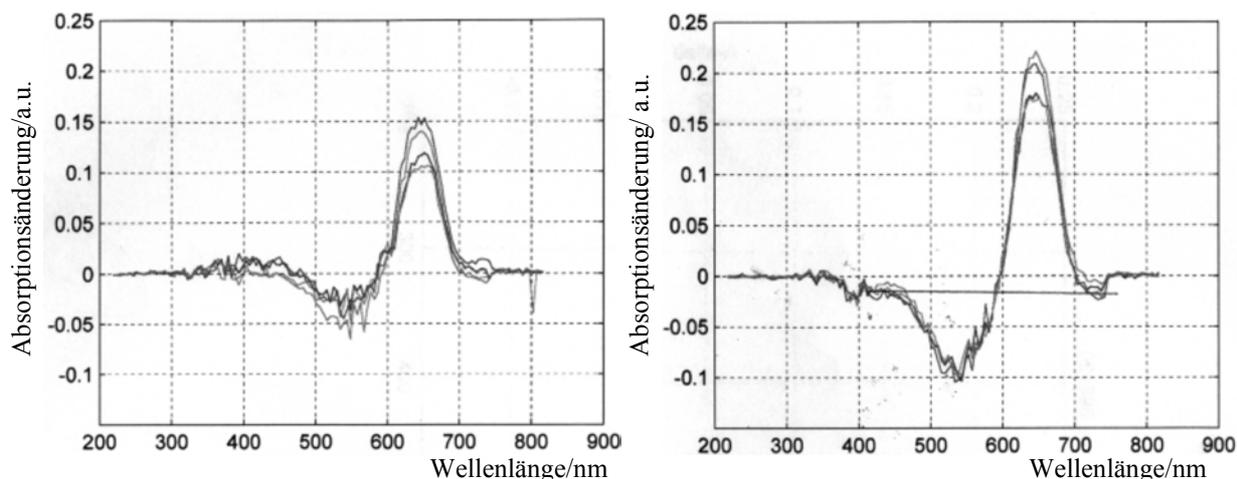


Abb. 33: Differenzspektren ( $HR_{K,LT} - HR_{578}$ ) von HR-Membransuspension nach Belichtung (532 nm) bei 100 K und Belichtungszeiten von 1, 2, 3, 4 min (links) bzw. bei 77 K, 1, 2, 3, 4 min (Messungen: S. Paula)

aufgenommen (siehe Abb. 30). Anschließend erfolgte die Belichtung des Kristalls mit Licht der Wellenlänge 532 nm (Argon/Krypton-Lasersystem) über die Optik des Mikrospektralphotometers aus Abb. 31.

Ein etwaiger Einfluß durch ungleiche Anteile des Laserlicht-Polarisationswinkels wurde für die UV/VIS-Messungen nicht weiter berücksichtigt. Ein solches Vorgehen ist für die vergleichenden Messungen an einem Kristall aus folgenden Gründen zulässig: Bei der Anreicherung eines Intermediats für die RSA wurden die Kristalle während der Belichtung permanent um  $360^\circ$  rotiert oder die Belichtungen nach Durchtritt durch einen Depolarisator durchgeführt. Eine Abhängigkeit der Photoreaktion resp. deren Quantenausbeute von der Polarisationssebene des Laserlichtes kann deshalb ausgeschlossen werden.

Die Messung der Differenzspektren erfolgt nach verschiedenen Illuminations-Zeiten und -Intensitäten (Ergo, Illuminations-Dosen). Mit fortschreitender Illumination bleicht der hR-Zustand weiter aus (negative Differenzbande bei 530 nm) und entsprechend entstehen höhere Anteile des K-Intermediats (positive Differenzbande bei 630 nm). Eine Steigerung der Laserlichtintensität um den Faktor 2 bewirkt nochmals eine signifikante Zunahme des K-Anteils im Kristall. Diese Ausbeute stagniert allerdings mit fortschreitender Belichtung (nach ca. 10 min, ohne Filter [100% relativer Transmission]). Folglich ergeben sich mit höheren Belichtungs Dosen auch höhere Anteile des K-Intermediats, bis ein maximaler Umsatz erreicht ist. Die Differenzspektren am Kristall sind nahezu identisch mit den entsprechenden Suspensionsspektren (siehe Abb. 33) gereinigter HR-Membranen bei tiefen Temperaturen. In Abb. 33 sind zum Vergleich Messungen an Membransuspensionen bei 100 K bzw. 77 K gezeigt. Diese Differenzspektren gleichen den von Zimanyi *et al.* (1989)<sup>[131]</sup> publizierten Tieftemperaturspektren an HR sowie den im ns-Bereich erhaltenen Differenzspektren aus zeitaufgelösten Studien<sup>[132]</sup> und belegen nochmals die Anreicherung dieses Intermediats im



Kristall. Für die Berechnung der Intermediatanteile im Kristall (Abb. 32) wurden auf der Basis der Formeln in Gleichung 1 die K-Anteile berechnet:

Obwohl die experimentellen Daten hinsichtlich einer Abschätzung der K-Intermediatausbeute analysiert wurden, soll hier darauf hingewiesen werden, daß die erhaltenen Aussagen mit mehreren Fehlerquellen behaftet sein könnten. So erfolgt die Umsatzesberechnung in Referenz zum hR-Spektrum, das seinerseits mit einem hohen Lichtstreuanteil und Absorptionsmaximum zum Gesamtfehler beiträgt. Auch wurde der Anteil des 13-cis Konformers im hR-Zustand sowie dessen mögliche Folgeprodukte (es wird die Existenz eines parallelen Photozyklus diskutiert) nicht näher berücksichtigt, d. h., es wurde lediglich ein einfaches chemisches Gleichgewicht von hR- Zustand und K-Intermediat betrachtet. Es ist wichtig zu betonen, daß die verwendeten Extinktionskoeffizienten, Halbwertsbreiten und Peakmaxima der einzelnen Zustände auf die interpolierten Spektren zeitaufgelöster Messungen bei Raumtemperatur zurückgehen, die sich von den tatsächlichen Absolutspektren leicht unterscheiden könnten. Die auf dieser Basis mit Hilfe einer Gauss-Funktion kalkulierten Absolut- und Differenzspektren gelten streng genommen nur bei Raumtemperatur. Dies könnte einer der Gründe

*Es....gilt :*

$$\begin{aligned} \varepsilon_{578nm}(HR_{578}) &= 5 * 10^4; \varepsilon_{520nm}(HR_{578}) = 2,81 * 10^4; \varepsilon_{540nm}(HR_{578}) = 3,83 * 10^4; \\ \varepsilon_{600nm}(HR_{578}) &= 4,01 * 10^4; \varepsilon_{640nm}(HR_{578}) = 8,64 * 10^3 \\ \varepsilon_{600nm}(HR_{600}) &= 5,3 * 10^4; \varepsilon_{620nm}(HR_{600}) = 4,29 * 10^4; \varepsilon_{640nm}(HR_{600}) = 2,40 * 10^4 \\ \varepsilon_{520nm}(HR_{520}) &= 3,9 * 10^4; \varepsilon_{480nm}(HR_{520}) = 2,32 * 10^4; \varepsilon_{500nm}(HR_{520}) = 3,20 * 10^4; \end{aligned}$$

*Es...sei :*

$$\begin{aligned} \text{Summenpeak} &= x\%(Intermediat) + y\%(hR) = \sum Peak; \\ \text{Differenzpeak} &= \sum Peak - hR_{Peak} = (x\%(Intermediat) + y\%(hR)) - y\%(hR) \\ y\% &= y\%hR - 100\%hR; \\ E_{\lambda 1} &= x\%Intermediat - y\%hR = \varepsilon_{Int,\lambda 1}c_{Int} - \varepsilon_{hR,\lambda 1}c_{hR} = \varepsilon_{Int,\lambda 1}(c_{hR,0} - c_{hR}) - \varepsilon_{hR,\lambda 1}(c_{hR} - c_{hR,0}) \\ E_{\lambda 1} &= c_{hR,0}(\varepsilon_{Int,\lambda 1} + \varepsilon_{hR,\lambda 1}) - c_{hR}(\varepsilon_{Int,\lambda 1} - \varepsilon_{hR,\lambda 1}) \\ \Leftrightarrow c_{hR} &= \frac{c_{hR,0}(\varepsilon_{Int,\lambda 1} + \varepsilon_{hR,\lambda 1}) - E_{\lambda 1}}{(\varepsilon_{Int,\lambda 1} - \varepsilon_{hR,\lambda 1})} \Rightarrow x_{hR} = \frac{c_{hR}}{c_{hR,0}}; x_{Int} = 1 - x_{hR} \end{aligned}$$

Gleichung 1: Ansatz zur Berechnung der Intermediatsanteile auf der Grundlage gemessener Differenzspektren. Die Extinktionskoeffizienten ( $\varepsilon$ ) bei jeweiliger Wellenlänge ( $\lambda$ ) sind auf der Basis der HR-Intermediatsspektren berechnet<sup>[74]</sup>. Die kursiv geschriebenen Indices geben die Wellenlänge wieder, bei der die Berechnung der Extinktionskoeffizienten erfolgt. In Klammern ist jeweils das zugrunde liegende Absolutspektrum des verwendeten HR-Intermediats angegeben. Mit Summenpeak ist die Absorptionsänderung bei der jeweiligen Wellenlänge im Differenzspektrum gekennzeichnet. Dieser setzt sich aus dem jeweils angereicherten Intermediat und verbleibendem hR zusammen. Die kalkulierten Differenzpeaks geben den tatsächlichen Anteil der Intermediatee nach Abzug des dazugehörigen hR-Referenzspektrums wieder. Der Anteil ( $x_{Int}$ ) eines Intermediates berechnet sich bei der jeweiligen Wellenlänge nach Lambert-Beer (Gültigkeit sei vorausgesetzt).



für die relative Verschiebung (ca 25 nm) der simulierten Spektren von den gemessenen Differenzspektren in Abb. 32 sein.



#### 4.7.2. Das L-Intermediat

In Abb. 34 sind die Differenzspektren des L-Intermediates wiedergegeben. Die Anreicherung des HR<sub>520</sub>-Intermediates erfolgte bei Temperaturen von 180 K (grüne Kurven), 200 K (rote

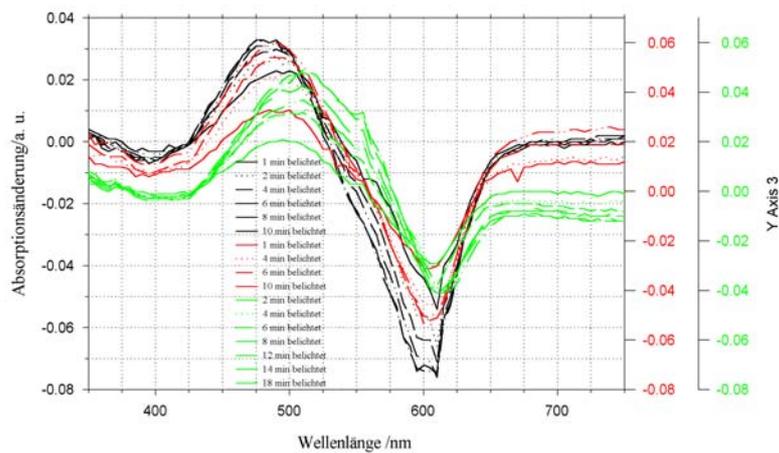


Abb. 34: Differenzspektren (HR<sub>520</sub> - hR) nach Belichtung einzelner Kristalle mit Licht von 533 nm Wellenlänge. Die Messungen erfolgten bei 180 K (grüne Kurven), 200 K (rote Kurven) und 210 K (schwarze Kurven) nach verschiedenen Illuminationszeiten (siehe Legende).

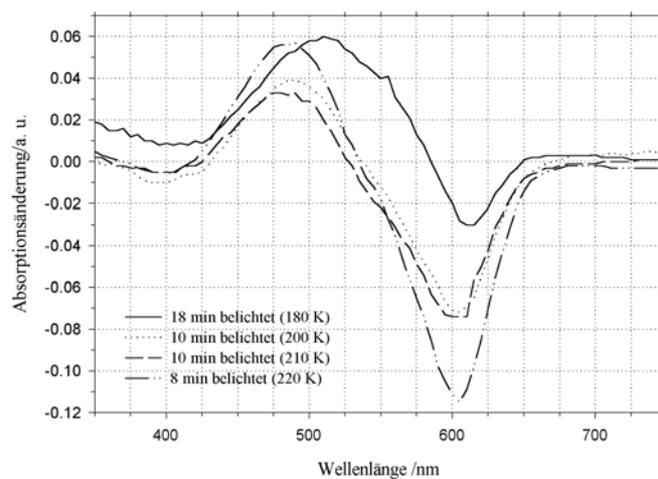


Abb. 35: Vergleich der Differenzspektren (HR<sub>520</sub> - hR) nach 10 bis 20 minütiger Illumination bei 633 nm im Temperaturbereich von 180 K bis 220 K (siehe Legende).

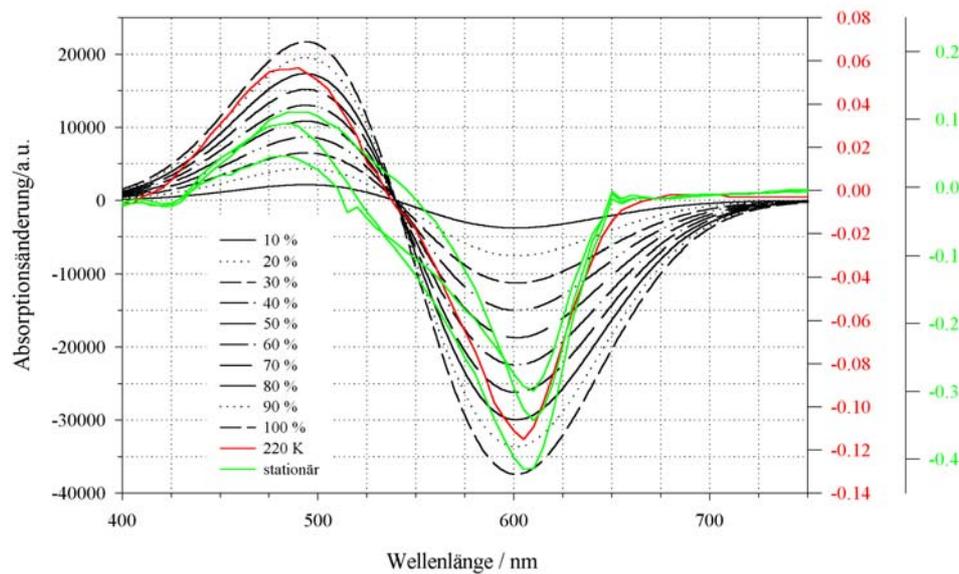


Abb. 36: Differenzspektren ( $HR_{520} - hR$ ) am Einzelkristall nach Einstellung des photostationären Gleichgewichtes (Illumination 633 nm) bei Raumtemperatur. Schwarze Kurven geben die simulierten (0-100 % L), farbige Kurven gemessene Differenzspektren wieder. Die Kristalle wurden anschließend unter kontinuierlicher Belichtung bei 100 K schockgefroren.

Kurven) und 210 K (schwarze Kurven) mit verschiedenen langen Illuminations-Zeiten (siehe Legende). Deutlich zu erkennen ist das Ausbleichen des Ausgangszustandes ( $hR$ ) und das Auftreten eines blauverschobenen Intermediats bei ca. 500 nm. Trotz Illuminationszeiten von bis zu 20 min. ergaben die Differenzspektren ( $HR_{520} - hR$ ) am Einzelkristall nach Einstellung des photostationären Gleichgewichtes (Illumination 633 nm) keine signifikante Erhöhung des L-Anteils.

Als alternative Strategie wurden Kristalle (HR-Wildtyp), bei Raumtemperatur kontinuierlich belichtet und nach ca. 5 s schockgefroren. Die so erhaltenen Spektren wurden gegen ein zuvor gemessenes Spektrum des gleichen Kristalls bei 100 K ohne Belichtung referenziert. In Abb. 36 sind die Differenzspektren derart behandelter Kristalle gezeigt. Differenzmaxima und -Minima sind für beide Strategien nahezu identisch. Demnach wird auch bei Raumtemperatur durch Belichtung vorzugsweise das L-Intermediat im Kristall angereichert.

Der Vergleich der Differenzspektren nach beiden Strategien zeigt, daß die L-Anteile, bei Raumtemperatur signifikant zunehmen. Allerdings gelten hier ebenso wie für die für K-Intermediatstudien Einschränkungen hinsichtlich der Quantifizierung.

## 4.8. FT-IR- und -Raman-Spektroskopie an Kristallen

### 4.8.1. Vergleich von Kristall- und Suspensionsspektren

Mit dem Ziel zusätzliche Informationen zum cis/trans-Verhältnis des Chromophors zu erhalten wurden Mikro-Resonanz-Raman Messungen an intakten HR-Kristallen vorgenommen.

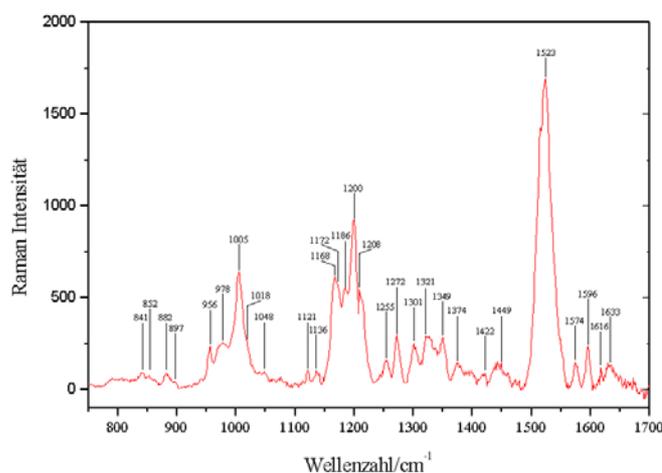


Abb. 37: Mikroresonanz-Raman Spektrum (Raumtemperatur) eines HR-Kristalls in Gegenwart von MO bei Illumination mit 568 nm. Der Kristall wurde in Gegenwart von 4 M KCl gezüchtet

Dieses Vorgehen hat den Vorteil, daß die Probe nicht nachträglich behandelt werden muß, was u. a. Aufarbeitungsfehler vermeidet. Die geringe benötigte Probenmenge dieser Methode ist ein weiterer Vorteil, da andernfalls für eine chromatographische Trennung der Isomeren eine Vielzahl von Kristallen aufgearbeitet werden müßte. Hinzu kommt, daß das ebenfalls in der Probe enthaltene MO die chromatographische Trennung der Retinalisomeren beeinflusst.

In Abb. 37 ist ein entsprechendes Mikro-Resonanz-Raman Spektrum eines HR-Kristalls, aufgenommen bei Raumtemperatur, in Gegenwart von 4 M KCl, wiedergegeben. Eine vollständige Liste der identifizierten Schwingungsbanden ist in Abschnitt 9.1.1) angehängt. Das Signal/Rausch-Verhältnis ist gegenüber den publizierten Lösungs- bzw. Suspensionsspektren deutlich verbessert. Im Bereich von 1560 bis 1620  $\text{cm}^{-1}$  sind drei Schwingungsbanden klar zu erkennen, wovon bis dato zwei in der Literatur als isolierte Streckschwingungen der Doppelbindung zwischen C(7)=C(8) (1596  $\text{cm}^{-1}$ ) bzw. C(5)=C(6) (1596  $\text{cm}^{-1}$ ) im Retinal identifiziert und beschrieben wurden<sup>[133]</sup>. Die Bande bei 1616 $\text{cm}^{-1}$  wird hier zum ersten mal für HR beobachtet. Zur intensitätsstärksten Bande des Raman-Spektrums im Bereich von 1523  $\text{cm}^{-1}$  tragen alle C=C Streckschwingungen des Retinals von C(9) bis C(14) bei. Da dieser Streckschwingungsbereich spezifisch für den Chromophor ist<sup>[128]</sup>, wirken sich Konformationsänderungen im Verlauf des Photozyklus von HR als auch Konformere in einem Photozyklusintermediat deutlich auf diese Bande aus.

Im Unterschied zu BR, das sich durch kurze Belichtung (10 min. weißes Licht) aus seiner dunkeladaptierten Form (40 % cis, 60 % all-trans) in 100 % all-trans (lichtadaptierte Form)



überführen läßt, verbleiben bei HR nach Lichtadaption 13-cis Anteile<sup>[134][138]</sup>. In Abschnitt 4.8.2 wird der Versuch unternommen die Isomerenzusammensetzung im Kristall und in Membransuspension qualitativ und quantitativ zu bestimmen.

Von den drei breiten Schwingungsbanden im Bereich von 1460 bis 1360  $\text{cm}^{-1}$  sind die beiden Peaks bei 1449  $\text{cm}^{-1}$  und 1374  $\text{cm}^{-1}$  in der Literatur beschrieben<sup>[128]</sup>, allerdings ohne, daß ein eindeutiger Schwingungsmodus direkt oder über den Vergleich mit BR (1448  $\text{cm}^{-1}$  und 1378  $\text{cm}^{-1}$ ) zugeordnet wird. Erstere Schwingungsbande verschiebt sich nach Austausch gegen  $\text{D}_2\text{O}$  zu höherer Frequenz, während letztere Bande keinen Isotopeneffekt zeigt. Im Bereich von 1330 bis 1230  $\text{cm}^{-1}$  treten, vier z. T. verbreiterte Schwingungsbanden auf, die ebenfalls, ohne eindeutige Zuordnung eines Schwingungsmodus, schon beschrieben wurden<sup>[129]</sup>. Die Banden bei 1321  $\text{cm}^{-1}$  und 1255  $\text{cm}^{-1}$  reagieren bei einem Wechsel des Solvens auf  $\text{D}_2\text{O}$  mit Intensitätsabnahme bzw. das Signal verschwindet vollständig.

Der protonierten Schiff Base konnten zwei Schwingungsbanden eindeutig zugeordnet werden. Im chloridgebundenen Zustand verschiebt sich die Streckschwingung der PSB<sup>[128]</sup> bei 1633  $\text{cm}^{-1}$  nach Austausch gegen  $\text{D}_2\text{O}$  entsprechend dem Isotopieeffekt zu kleineren Wellenzahlen. Der Austausch von Chlorid gegen Nitrat hingegen (in  $\text{H}_2\text{O}$ ) hat eine Verschiebung nach 1642  $\text{cm}^{-1}$  zur Folge. Interessanterweise wird für das L-Intermediat von HR eine ähnliche Verschiebung dieser Frequenz (auf 1644  $\text{cm}^{-1}$ ) mit einer Stärkung der PSB bzw. einer Schwächung der Wechselwirkung zwischen PSB und zu transportierendem Anion korreliert<sup>[72]</sup>. Die in-plane Biegeschwingung bei 1349  $\text{cm}^{-1}$  ist die zweite, eindeutig der PSB zugeordnete, Bande<sup>[128]</sup>.

Im Fingerprint-Bereich von 1215 bis 1150  $\text{cm}^{-1}$  erscheinen vier Banden. Eine fünfte Bande ist als Schulter bei 1172  $\text{cm}^{-1}$  zu erkennen. In der Literatur sind die Schwingungsbanden des all-trans Retinals (ohne Angabe der Moden) bei 1208  $\text{cm}^{-1}$ , 1200  $\text{cm}^{-1}$  und 1170  $\text{cm}^{-1}$  sowie für das 13-cis Konformer bei 1186  $\text{cm}^{-1}$  beschrieben. Im obigen Raman-Spektrum ist allerdings deutlich eine Verschiebung der Bande von 1170  $\text{cm}^{-1}$  nach 1168  $\text{cm}^{-1}$  zu erkennen. Diese Schwingungsbande weist eine Schulter bei 1172  $\text{cm}^{-1}$  auf.

Die drei Peaks im Bereich von 1140 bis 1040  $\text{cm}^{-1}$  sind bisher weder für HR noch für BR näher in der Literatur beschrieben. Allerdings zeigen die publizierten Resonanz-Raman-Spektren von BR Banden bei gleichen Wellenzahlen, was die Ähnlichkeit der Spektren und folglich der Chromophorkonformation beider Proteine nochmals unterstreicht.

Im Bereich kleiner 1040  $\text{cm}^{-1}$  können weitere acht Schwingungsbanden identifiziert werden, von denen zwei bereits beschrieben und zwei weitere bereits eindeutig zugeordnet wurden. Bei 1005  $\text{cm}^{-1}$  erkennt man die gekoppelten Biegeschwingungen der Methylgruppen an C(9) und C(13). Dem obigen Raman-Spektrum ist jedoch eine Schulter dieser Bande bei etwa 1018  $\text{cm}^{-1}$  zu entnehmen. Bei 956  $\text{cm}^{-1}$  liegt die gekoppelte out-of-plane Biegeschwingung der Wasserstoffe an C(11) und C(12), deren schwache Intensität mit einer geringen Abweichung des Chromophors von einer einheitlichen Konformation korreliert.



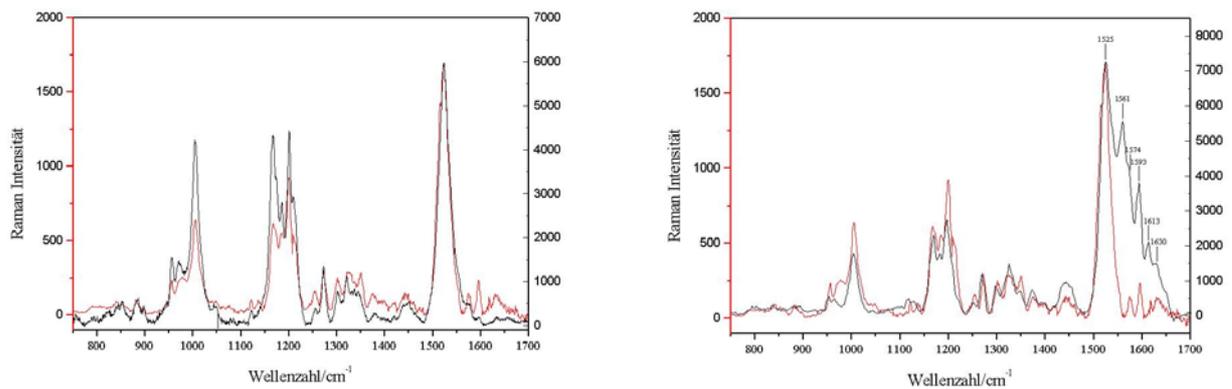


Abb. 38: Mikroresonanz-Raman Spektren eines HR-Kristalls aufgenommen bei Raumtemperatur in Gegenwart von MO links: Illumination mit 568 nm (rote Kurve) bzw. 752 nm (schwarze Kurve); rechts: Illumination mit 568 nm (rote Kurve) bzw. 458 nm (schwarze Kurve); Der Kristall wurde in Gegenwart von 4 M KCl gezüchtet

Weitere Resonanz-Raman-Spektren von HR-Kristallen mit verschiedenen Imitterfrequenzen sind in Abb. 38 gezeigt. Bei Messungen mit 752 nm (rechte Seite Abb. 38) nimmt die Intensität der niederfrequenten Schulter der all-trans Bande bei  $1168\text{ cm}^{-1}$  weiter zu. Ebenfalls signifikant sind die in der Literatur bisher nicht beschriebenen Schwingungsbanden bei Wellenzahlen kleiner  $900\text{ cm}^{-1}$ .

Raman-Spektren bei 458 nm Anregungswellenlänge wiederum belegen die Existenz mehrerer Banden oberhalb der dominanten Streckschwingung bei  $1523\text{ cm}^{-1}$  (Abb. 37). Genau genommen können fünf Banden in diesem Bereich identifiziert werden. Vergleicht man diese mit der Raman-Anregung bei 568 nm (Abb. 38), so fällt auf, daß alle Banden um zwei bis drei Wellenzahlen zu höherer Frequenz verschoben sind.

Neben den schon bekannten Streckschwingungen belegt dieses Spektrum die Existenz, der oben schon erwähnten Bande bei  $1616\text{ cm}^{-1}$ . Diese Bande erscheint ebenfalls in den FTIR-Spektren (siehe Abb. 41). Zusätzlich kann noch eine weitere Raman-Bande im Bereich von  $1561\text{ cm}^{-1}$  identifiziert werden, die in den anderen Spektren von der starken C=C Schwingungsbande bei  $1523\text{ cm}^{-1}$  verdeckt wurde. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß diese Schwingung zu einem Photointermediat gehört, das durch die Anregungswellenlänge von 458 nm entsteht.



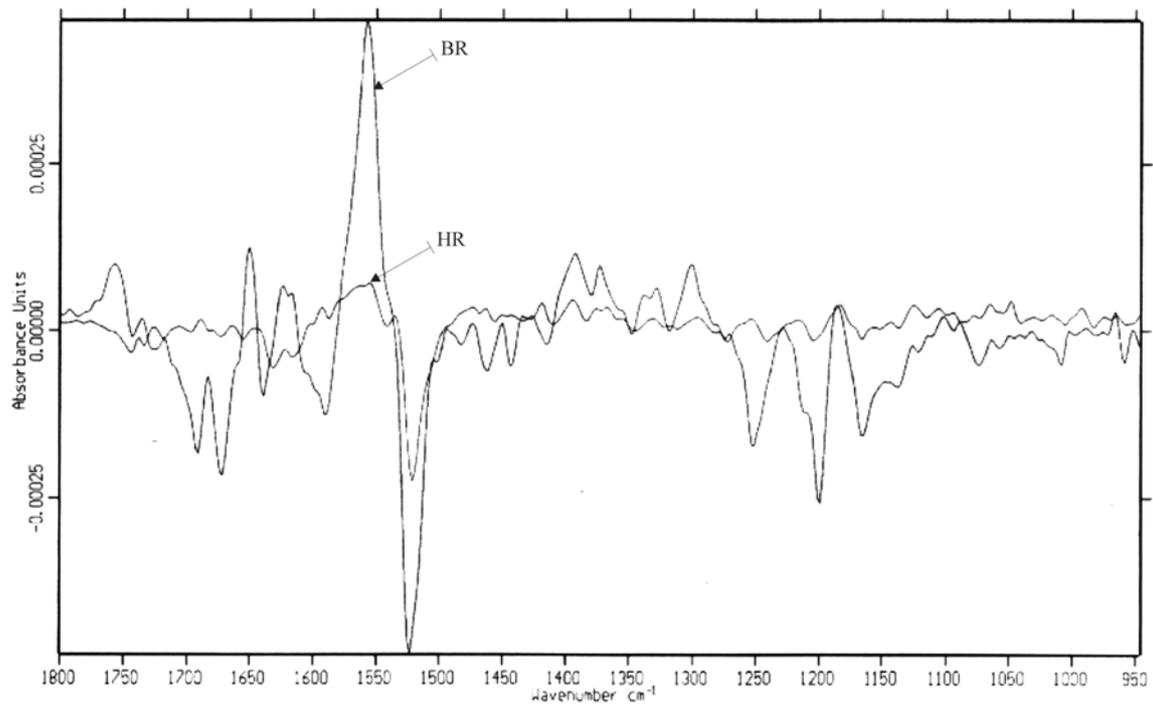


Abb. 39: FTIR-Spektren von HR- bzw. BR-Kristallen umgeben von MO. Die Messungen erfolgten bei 5°C nach Belichtung mit Licht der Wellenlängen 633 (HR) oder 532 nm (BR). Messungen von J. Heberle, KFA Jülich

Analog zu den Versuchen an BR-Kristallen<sup>[135]</sup> wurde der Versuch unternommen, zeitaufgelöste Studien an HR-Kristallen zu erhalten. Die Messungen dazu erfolgten bei 5 °C an hunderten von Einzelkristallen zugleich, die zwischen zwei CaF<sub>2</sub>-Platten präpariert in statistischer Orientierung vorlagen. In Abb. 39 sind bei gleicher Skalierung die FTIR-Differenzspektren von HR und BR wiedergegeben. Das Signal zu Rausch-Verhältnis ist für HR deutlich geringer als für BR. Messungen zu verschiedenen Zeiten nach der Belichtung ergaben für HR keine signifikanten Signale von Photozyklusintermediaten mehr, weshalb von weiteren zeitaufgelösten Analysen abgesehen wurde.

#### 4.8.2. Bestimmung des Isomerenverhältnisses in HR-Kristallen

Für die weitere röntgenographische Analyse der HR-Kristalle (Intermediatsstudien, weitere Optimierung des hR-Zustands) ist eine möglichst genaue Kenntnis des Isomerenverhältnisses notwendig. Die Schwierigkeiten strukturelle Differenzierung von Intermediatgemischen vorzunehmen steigen, sobald ein Anteil deutlich überwiegt. Anteile von < 30 % eines Intermediats sind selbst bei hochaufgelösten Röntgenstrukturdaten (< 2 Å) kaum signifikant<sup>[136]</sup>. Die Intermediatsanalysen werden zusätzlich erschwert, sobald sehr kleine Konformationsänderungen oder flexible Seitenketten wie beispielsweise vom Chromophor bindenden Lysin betrachtet werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Mikro-Resonanz-Raman Spektroskopie verwendet, da mit ihrer Hilfe *in situ* Untersuchungen einzelner Kristalle möglich sind. Etwaige Fehler bei der Probenaufarbeitung, wie sie für die HPLC notwendig ist, werden vermieden. Ein zusätzlicher Vorteil gegenüber der Chromatographie ist die vergleichsweise geringe Probenmenge (Untersuchungen erfolgen am Einzelkristall) bei spektroskopischen Methoden.

Die Streckschwingungen im Bereich von 1515 bis 1545  $\text{cm}^{-1}$  sowie 1150 bis 1210  $\text{cm}^{-1}$  reagieren empfindlich auf Änderungen des cis/trans-Isomerenverhältnis im Retinal. Auf dieser Basis kann über eine Simulationen beispielsweise der C=C Streckschwingungsbande(n) um 1522  $\text{cm}^{-1}$  mittels mehrerer Gauss-Funktionen eine Quantifizierung der Anteile über die Bestimmungen der Peakflächen erfolgen. Analysen<sup>[137]</sup> an HR-Membransuspensionen ergeben für lichtadaptierte Proben 75 % all-trans und 25 % 13-cis Retinal. Diese Ergebnisse stimmen mit der quantitativen Analyse nach Flüssigchromatographie (HPLC) der isolierten Isomerenmischung im Bereich der Meßabweichungen überein.

Abb. 40 gibt die simulierten C=C Streckschwingungsbereiche im Vergleich mit den Meßdaten (758 nm Anregungswellenlänge) für einen HR-Wildtyp-Kristall (links) und eine Membransuspension des Wildtyps (rechts) wieder. Nach einer Basislinien-Korrektur wurde die Summenbande im Wellenlängenbereich von 1482  $\text{cm}^{-1}$  bis 1566  $\text{cm}^{-1}$  mit insgesamt fünf einzelnen Gauss-Funktionen angepaßt (1497, 1521, 1523, 1537 und 1555  $\text{cm}^{-1}$ ). Zimányi und Lanyi<sup>[137]</sup> ordnen dem all-trans Isomer eine Bande bei 1523  $\text{cm}^{-1}$  und dem 13-cis Isomer eine Bande bei 1534  $\text{cm}^{-1}$  zu. Für die Bestimmung des Isomerenverhältnisses wurden in dieser Studie die Banden bei 1497 und 1551  $\text{cm}^{-1}$  nicht weiter berücksichtigt, da sie bisher keinem der beiden Isomere eindeutig zugeordnet werden konnten. Die damit verbundenen Fehler sind mit Rücksicht auf die dazugehörigen Peakflächen kleiner als 10 %.

In dieser Studie werden deshalb die Flächen der Peakmaxima bei 1521,6; 1523,4 (beides all-trans Banden) und 1537,5  $\text{cm}^{-1}$  (13-cis Bande) für die prozentuale Berechnung der Isomerenanteile verwendet. Tabelle 3 gibt die kalkulierten Retinalanteile wieder. Nach Addition der Peakflächen ergibt sich im Kristall ein all-trans Anteil von 76,4 % und in der Membran von



83,2 %. Unter der Annahme, daß die Messungen Abweichungen kleiner 10 % nicht sicherstellen, ergeben sich für den Kristall und die Membransuspensionen nach Lichtadaption

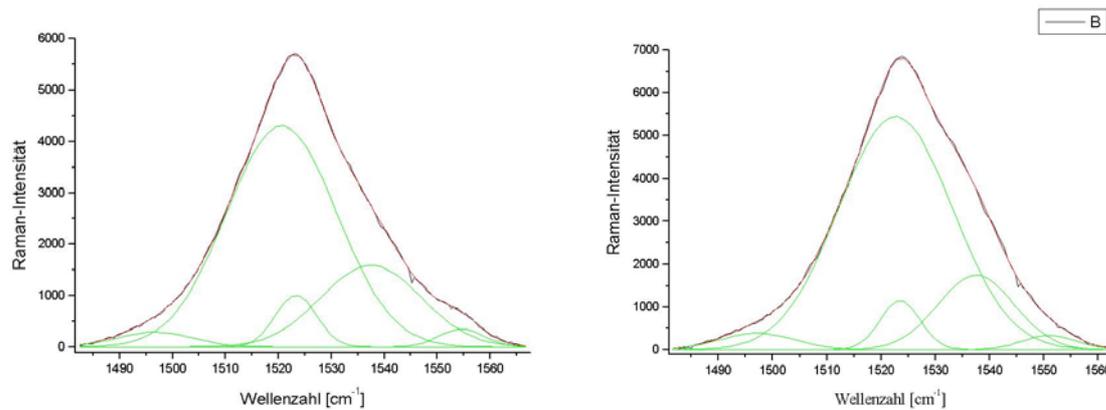


Abb. 40: Resonanz-Raman Spektrum des C=C Streckschwingungsbereiches im HR-Kristall (links) sowie für eine HR-Membransuspension (rechts): Vergleich des gemessenen (schwarz), des simulierten Spektrums (rot) und der jeweils beitragenden Gauss-Funktionen vergleichbare all-trans Anteile von etwa 80 %. Dieser Wert deckt sich mit den in der Literatur wiedergegebenen Werten für HR-Membranfraktionen<sup>[137]</sup>.

Halorhodopsin-Wildtyp		
Peak-Maximum [cm <sup>-1</sup> ]	Kristall [%]	Membransuspension [%]
1521,6	70,2	77,6
1523,4	6,2	5,7
1537,5	23,6	16,7
Halorhodopsin-Mutante Arginin 108 ->Lysin		
1522,3	80,4	-
1523,8	19,5	-
1535,8	0,1	-

Tabelle 3: Prozentualer Anteil der Retinalisomere errechnet aus dem C=C-Streckschwingungsflächen im Resonanz-Raman Spektrum. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und Anregung mit 753 nm nach Lichtadaption der Proben.

In Abb. 62 (rechts) ist eine analoge Messung für die Punktmutante R108K dargestellt. Diese von Rüdiger und Oesterhelt<sup>[179]</sup> erstmals beschriebene Mutation führt zu einem vollständigen Verlust des aktiven Chloridtransports durch HR. Die Anpassung des C=C-Streckschwing-



ungsbereiches für diese Punktmutante, mit nunmehr lediglich vier Gauss-Funktionen, führt zu dem Ergebnis, das nahezu ausschließlich all-trans Retinal vorliegt.



### 4.8.3. Temperaturstudie des L<sub>I</sub>/L<sub>II</sub>-Übergangs in HR-Kristallen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht Diffraktionsdaten von HR-Photozyklusintermediaten zu sammeln. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Strategien zur Anreicherung eines Intermediats untersucht (Anreicherung von Photozyklusintermediaten). Bei der gezielten Erzeugung des L-Intermediats in schockgefrorenen HR-Wildtypkristallen durch Belichtung bei definierten Temperaturen (< 220 K) kommt es reproduzierbar zum Verlust der 3-dimensionalen Ordnung im Kristall. Daß diese Störung mit einer photoinduzierten Reaktion gekoppelt ist, zeigen entsprechende Versuche ohne Illumination, bei denen keine sichtbare Veränderung des Diffraktionsbildes beobachtet werden konnte. Der Temperaturbereich dieser putativen Konformationsänderung konnte auf 195 ± 5 K eingengt werden. Um die ablaufenden Reaktionen im Kristall genauer zu charakterisieren, wurde in Zusammenarbeit mit J. Heberle unter identischen Bedingungen wie im Röntgenexperiment eine temperaturabhängige FTIR-Differenzspektroskopie im Bereich von 190 bis 200 K vorgenommen. Die Illumination des schockgefrorenen Kristalls erfolgt nach Erreichen der Zieltemperatur mit der zum RSA-Experiment identischen Lichtquelle bei einer Wellenlänge von 632 nm. Die resultierenden FTIR-Differenzspektren sind in Abb. 42 dargestellt.

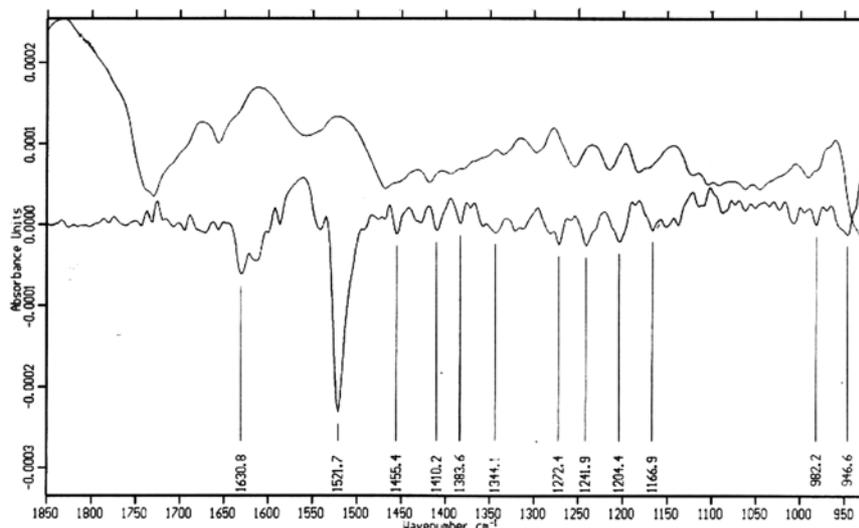


Abb. 41: : FTIR-Absolutspektrum aufgenommen an einem Kristallensemble (mehrere dutzend Kristalle) in Gegenwart der MO-Lipidphase (Meßtemperatur 250 K, Illumination 632 nm). Die untere Kurve zeigt das entsprechende (L-hR)-Differenzspektrum.

Vorab sei angemerkt, daß diese Einkristall-Spektren in vielen Bereichen aufgelöste Banden zeigen, die bei Messungen an vielen Kristallen zugleich (Abb. 41) oder an HR-Suspensionen lediglich als Summenbanden detektiert werden. In Abb. 41 ist zum Vergleich ein (L-hR)-Differenzspektrum, aufgenommen an mehreren dutzend Kristallen, wiedergegeben. Die negativen Banden gehören zum unbelichteten Zustand (hR) während die positiven Banden L-



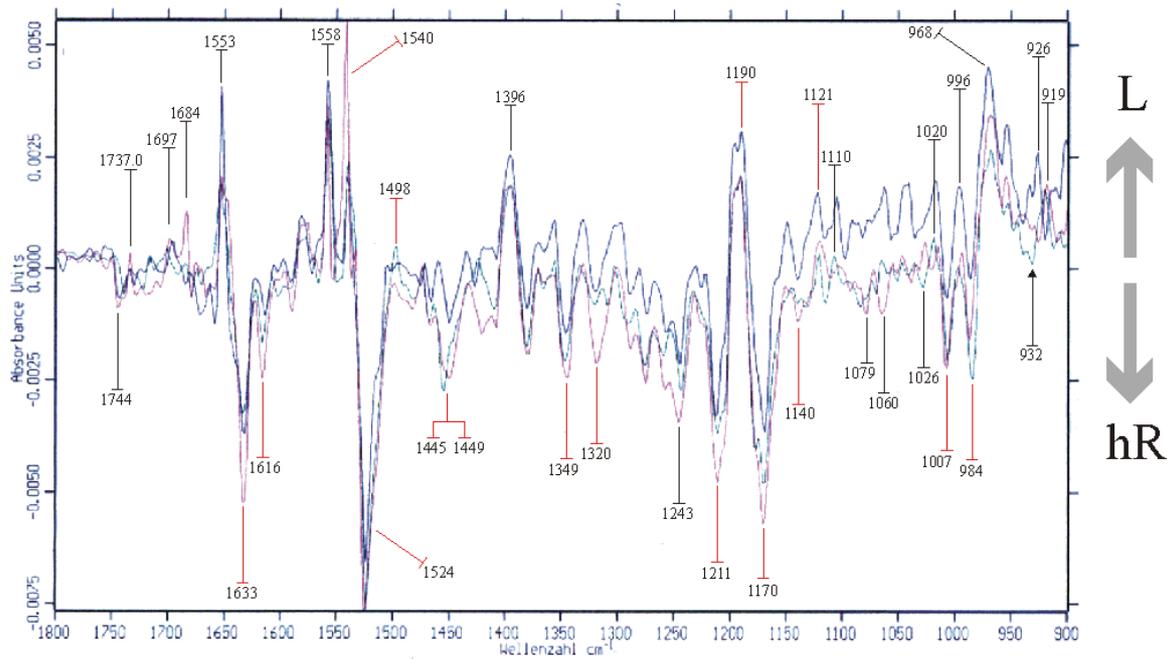


Abb. 42: (L-hR)-FTIR-Differenzspektren am HR-Wildtyp-Kristall nach jeweils 5 minütiger Belichtung bei 632 nm. Die Spektren sind bei 190 K (grün), 195 K (blau) und 200 K (violett) aufgenommen. Banden, die sowohl IR als auch Raman aktiv sind, sind rot gekennzeichnet

Zuständen entsprechen. Dieses Spektrum gleicht den in der Literatur gegebenen Differenzspektren an Membransuspensionen<sup>[138]</sup>.

Deutlichstes Merkmal sind die C=C-Streckschwingungen beider Zustände im Bereich von 1600 bis 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Die weiteren Differenzbanden sind größtenteils aus mehreren Einzelschwingungen zusammengesetzt und haben nur geringe Intensität. Vergleicht man dieses Spektrum mit den Einkristallspektren aus Abb. 42, dann zeigt sich für letztere eine deutliche Verbesserung des Signal zu Rausch-Verhältnisses und die Auflösung von Summenbanden in Einzelbanden. Auffällig ist die Aufspaltung der einzelnen positiven Bande bei 1560  $\text{cm}^{-1}$  (siehe Abb. 41) in zwei einzelne Banden bei 1558  $\text{cm}^{-1}$  und 1540  $\text{cm}^{-1}$ . Im weiteren soll nur soweit für die Diskussion der Einzelkristallspektren an dieser Stelle notwendig auf die jeweiligen Unterschiede eingegangen werden.

Mit steigender Temperatur nehmen die C=N-Streckschwingung der PSB (1633  $\text{cm}^{-1}$ , 1449  $\text{cm}^{-1}$ ) sowie die C-C-(1211  $\text{cm}^{-1}$ , langwellige Schulter bei 1170  $\text{cm}^{-1}$ ) und die C=C-Streckschwingungen (1524  $\text{cm}^{-1}$ ) von all-trans HR weiter ab. Die entsprechenden 13-cis Streckschwingungen des L-Zustandes erscheinen als kurzwellige Schulter der Bande bei 1653  $\text{cm}^{-1}$  (C=N) und 1558  $\text{cm}^{-1}$  (C=C). Diese Abnahme zeigt sich ebenfalls für die potentielle C=C-Streckschwingung bei 1616  $\text{cm}^{-1}$  die bereits im Resonanz-Raman-Spektrum identifiziert werden konnte (siehe Abschnitt 4.8.1). Ebenfalls signifikant ist die stetige Abnahme der Intensität bei 1320  $\text{cm}^{-1}$ . Der Schwingungsmodus dieser Bande ist bisher nicht identifiziert worden. Ein Einfluß des SB-Protons, zeigt sich für diese Raman-aktive Schwingung an



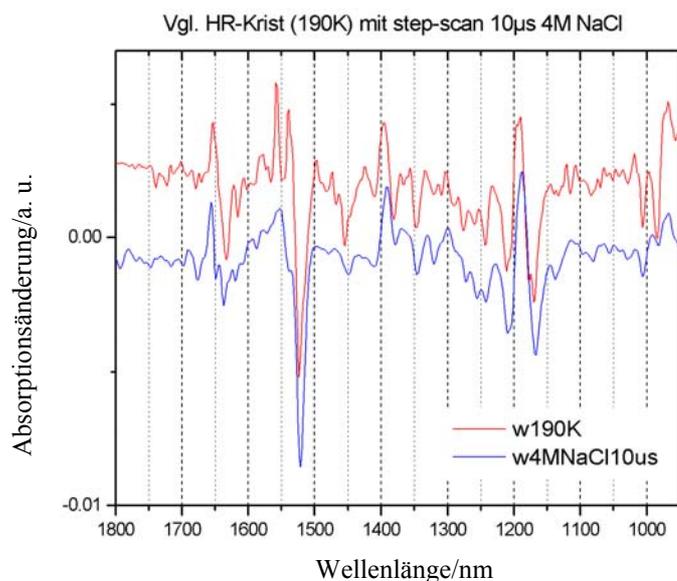


Abb. 43: Vergleich eines zeitlich isolierten FTIR-Differenzspektrums (10  $\mu$ s, blaue Kurve) einer Membransuspension mit dem Einkristallspektrum bei 190 K (rote Kurve). Messung von J. Heberle (Forschungszentrum Jülich)

der deutlichen Verschiebung bei einem Deuteriumaustausch. Gleiches gilt für die "Retinalschwingung" bei 1445  $\text{cm}^{-1}$ , deren Minimum sich mit steigender Temperatur nach 1449 verschiebt. Auffallend ist die Intensitätszunahme der Bande bei 1684  $\text{cm}^{-1}$  mit zunehmender Temperatur. Diese wurde von Rüdiger *et al.* (1996)<sup>[174]</sup> als Streckschwingung der Guanidinogruppe von R108

identifiziert. Weitere temperaturabhängige Schwingungsbanden sind im Fingerprint-Bereich der Spektren zu sehen, denen allerdings keine Schwingungsmoden zugeordnet sind und die mithin hier auch nicht weiter diskutiert werden sollen.

Potentiell größere Änderungen der Proteinkonformation sind mit sogenannten Amid I (gekoppelte C=O-Streckschwingungen und N-H-Biegeschwingungen) und Amid II (gekoppelte C-N-Streckschwingungen und N-H-Biegeschwingungen) Banden verbunden. Im Amid I-Bereich (1600 bis 1700  $\text{cm}^{-1}$ ) ist als starke Raman-inaktive Schwingung eine Bande bei 1653  $\text{cm}^{-1}$  zu erkennen. Diese Amid I-Bande zeigt ihr Intensitätsmaximum bei 195 K. Im Amid II-Bereich (1600 bis 1500  $\text{cm}^{-1}$ ) erscheinen zwei starke Schwingungsbanden bei 1558  $\text{cm}^{-1}$  und 1540  $\text{cm}^{-1}$ . Diese beiden Banden sind, wie oben erwähnt, bei Messungen an Membransuspensionen oder Kristallensembles nicht aufgelöst, sondern als Summenbande erkennbar. Die langwellige Bande bei 1558  $\text{cm}^{-1}$  ist Raman-inaktiv und wird in der Literatur als mögliche Amid II-Bande oder C=C-Streckschwingung identifiziert. Über das hier untersuchte Temperaturintervall zeigt diese gekoppelte Schwingung eine konstante positive Intensität. Signifikant temperaturabhängig hingegen ist die Schwingung bei 1540  $\text{cm}^{-1}$ . Diese Bande zeigt bei 200 K maximale Intensität, mit gegenüber geringerer Temperatur deutlich größerer Amplitude.

Ebenfalls eine Änderung durchlaufen die C=O-Streckschwingungen bei 1740  $\text{cm}^{-1}$  im Verlauf der L-Bildung. Die Differenzbande bei 1744/1737 ist im betrachteten Temperaturintervall konstant und kann im Hinblick auf BR Asp 141 zugeordnet werden<sup>[139][140]</sup>. Diese in BR, HR und SRI konservierte Aminosäure, gibt für alle drei Proteine eine Differenzbande im ähn-

lichen Bereich bei Übergang vom unbelichteten Zustand nach L<sup>[141]</sup>. Eine Verschiebung hin zu kleineren Wellenzahlen im L-Zustand wird als Wechselwirkung mit einer hydrophileren Umgebung gedeutet<sup>[139]</sup>.



#### 4.9. MALDI-TOF Spektroskopie an HR- und BR-Isolaten

Die qualitative Analyse der "bindenden" Membranlipide im Verlaufe einer Proteinisolierung kann, sowohl für die Stabilität und Funktion von Membranproteinen als auch für ihre erfolgreiche Kristallisation essentiell sein. Zu diesem Zweck wurden Proben nach verschiedenen Schritten der HR-Isolierung mittels Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight (MALDI-TOF) - Spektroskopie im Negativ Modus untersucht. Letzteres ist notwendig, um negativ geladene Molekülonen in Richtung des Detektors zu beschleunigen. Unter diesen

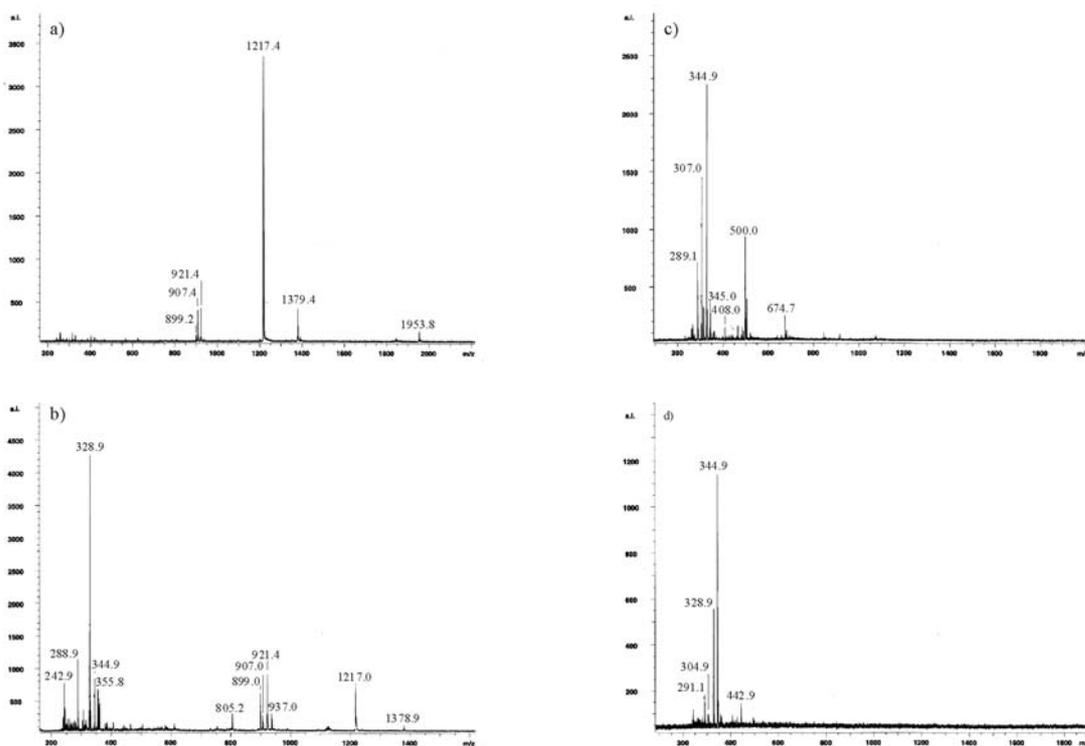


Abb. 44: MALDI-TOF Spektren von HR-Präparationen (eingebettet in DHB) aufeinander folgender Isolierungsschritte: a) HR-haltige Gesamtmembranfraktion nach Dichtegradientenzentrifugation b) nichtbindendes HR-Eluat (Cholat-Solubilisat) der Affinitätschromatographie c) HR-Eluat (OG-Solubilisat) der Affinitätschromatographie d) HR-Kristall nach Entfernung des anhaftenden MO

Meßbedingungen war es möglich, die negativ geladenen archaealen Lipidspezies von Membranfraktionen, Solubilisaten in Gegenwart nichtionischer Detergentien als auch von isolierten Proteinkristallen zu identifizieren.

In Abb. 44 sind typische Massenspektren von HR-Isolaten dargestellt. In Teilabbildung a) ist das Spektrum einer Probe, die direkt nach der Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurde, wiedergegeben. Die Molekülpeaks entsprechen den für halophile Organismen typischen Lipiden, die sich aus einem Glyko-, Sulfoglyko-, Phospho- oder Phosphoglyko- substituierten Diphytanyl-„Stamm“ (2,3 Di-O-alkyl-sn-glycerol, genannt Archaeol, siehe Tabelle 4) zusam-



mensetzen. Diese gesättigten Etherlipide haben am substituierten Sauerstoff eine in der Natur einzigartige Stereochemie. Im Vergleich zu den Bakterien und Eukaryonten ist bei den Archaea die Stereochemie am asymmetrischen Kohlenstoff genau umgekehrt (2R)<sup>[142]</sup>. Zum Vergleich ist in Abb. 45 (Teilabbildung a) das Massenspektrum einer PM solubilisiert in OG

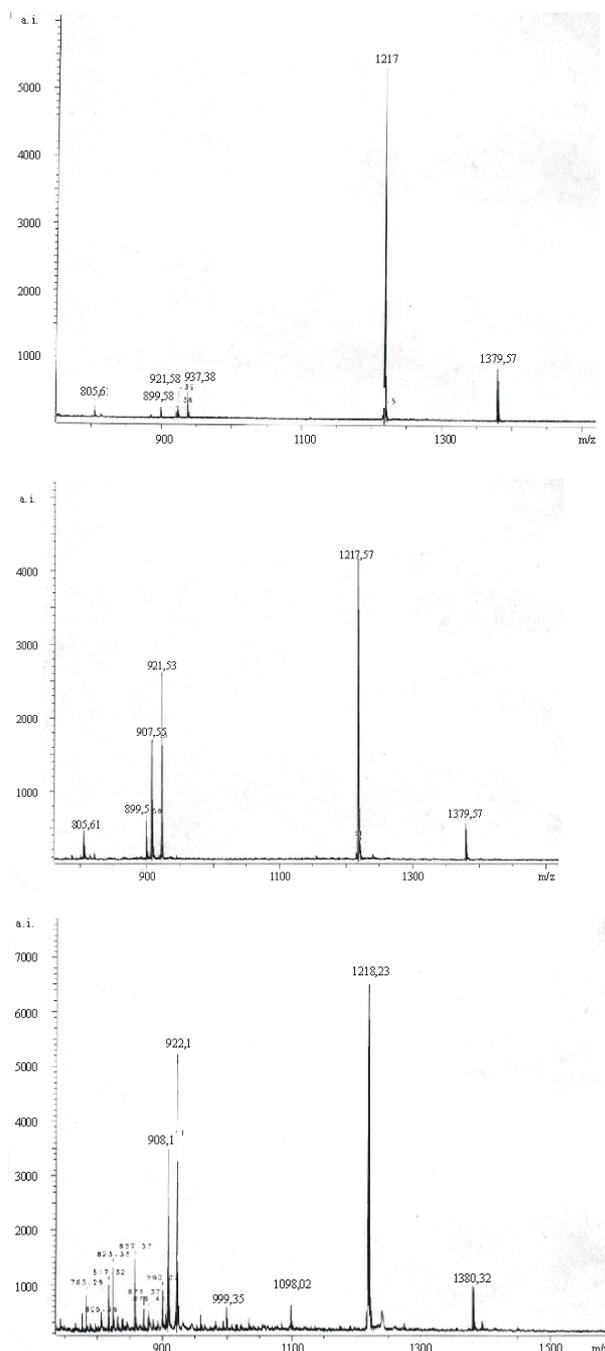


Abb. 45: MALDI-TOF Spektren einer BR-Präparation (eingebettet in DHB): a) PM-Solubilisat in OG b) BR-Eluat des Anionenaustausches DEAE-Sephacel (in OG) c) BR-Kristall

dargestellt. Demnach sind in HR- und BR-haltigen Membransolubilisaten die gleichen Lipide vorhanden.

Auch für nichtbindende (Affinitätschromatographie, Resource-Phe) Anteile solubilisierten HR's während der chromatographischen Reinigung (Abb. 44, Teilabbildung b) wurden noch alle Lipide nachgewiesen, während nach Detergenzwechsel im OG-haltigen Eluat keines dieser Lipide mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 44, Teilabbildung c). Das Peak-Muster unterhalb 400 m/z (Masse/Ladung) ist mit dem Massenspektrum der verwendeten Matrix DHB (Dihydroxybenzoesäure), aufgenommen im Laufpuffer, nahezu identisch (Daten nicht gezeigt). Für die Massenpeaks bei 408, 500 und 647,7 m/z konnte keine eindeutige Zuordnung erfolgen. In Teilabbildung d) ist das Massenspektrum eines HR-Kristalls wiedergegeben. Die im Eluat gefundenen Massenpeaks können hier nicht wiedergefunden werden und nur ein Signal bei 442,9 m/z ist eindeutig nicht der Matrix zu zuordnen.

In Abb. 45 sind die entsprechenden Massenspektren

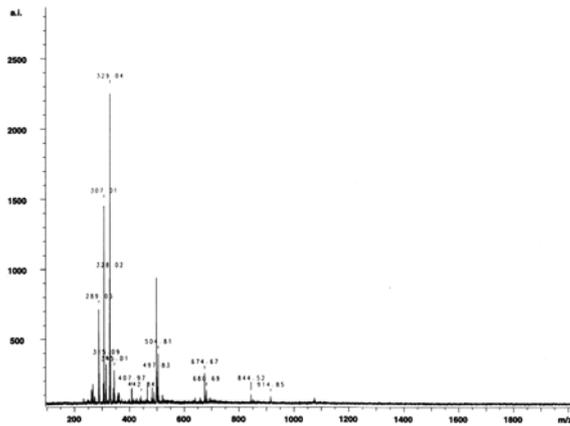


Abb. 46: MALDI-TOF Spektrum von Palmitinsäure (Kokristalliat mit DHB)

von BR im Verlauf einer Proteinreinigung (Kapitel 7.3.5) dargestellt. Die zur Kristallisation verwendete BR-Fraktion des Anionenaustauschers enthält ebenso wie der BR-Kristall noch alle Glyko- und Phospholipide der PM (Abb. 45, Teilabbildung B). Dieses Ergebnis wird durch die Röntgenstrukturen der 3-D Kristalle von BR bestätigt. Essen *et al.* (1997)<sup>[204]</sup> und andere Gruppen<sup>[12]</sup> haben in ihren veröffentlichten BR-Strukturen die

Beteiligung dieser Lipide am Intra- und Intertrimerkontakten aufgezeigt.

Auf Basis der RSA wurde im Trimer eine Lipidspezies gefunden, die im Verhältnis 1:1 zum HR-Monomer vorliegt. Dieses Lipid wurde u. a. auf Grund der einheitlichen Elektronendichte, die keinen Einbau von Methylgruppen, wie sie für das Archaeol typisch sind, zulässt, Palmitinsäure zugeordnet. Diese Zuordnung stützt sich darüberhinaus auf Untersuchungen von Colella *et al.* (1998)<sup>[143]</sup>, die nachweisen konnten, daß das HR-Solubilisat zwei Fraktionen bei einer Affinitätschromatographie (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, Pharmacia) bildet, wobei die retardierte Fraktion einen hohen Palmitinsäureanteil zeigt, während die nichtbindende Fraktion deutlich geringere Anteile enthält.

Auf der Basis der MALDI-Spektroskopie konnte in dieser Arbeit kein eindeutiger Nachweis für die Existenz der Palmitinsäure im Eluat oder Kristall erbracht werden (siehe zum Vergleich Abb. 44), da diese mit einer Masse von 256,4 g/mol in einen Massenbereich fällt, in dem Matrixanteile (DHB) detektiert werden. Allerdings konnten auch für reine Palmitinsäure, eingebettet in DHB, kein eindeutiger Nachweis dieses Lipids erbracht werden (siehe Abb. 46).

Abschließend sei bemerkt, das im Massenspektrum des Kristalls ein Peak bei 291,1 m/z auftritt, der wahrscheinlich dem Detergenz OG zuzuordnen ist, das wie an anderer Stelle ausgeführt, für die erfolgreiche Kristallisation von HR essentiell ist.

Lipidspecies	Purpurchmembran /g/mol	Probe a)	Probe b)	Probe c)	Probe d)
PA	731,14	-	-	-	-
PG	806,23	-	805,2	-	-

Lipidspecies	Purpurmembra- bran /g/mol	Probe a)	Probe b)	Probe c)	Probe d)
PGS	885,29	907,4 (PGS+Na <sup>+</sup> )	907,4 (PGS+Na <sup>+</sup> )	-	-
PGP-Me	899,22	899,2 und 921,4 (PGP- Me+Na <sup>+</sup> )	899,2 und 921,4/937,0 (PGP- Me+Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )	-	-
S-TGA-1	1218,67	1217,4	1217,0	-	-
S-TeGA-1	1380,82	1379,4	1378,9	-	-
Archaeol	652	-	-	-	-

PA: Phosphatidylarchaeol; PG: Phosphatidylglycerol; PGS: Phosphatidylglycerosulfat; PGP-ME: Methyl-Phosphatidylglycerophosphat; S-TGA-1: sulfatisiertes Triglycosylarchaeol ; S-TeGA-1: sulfatisiertes Tetraglycosylarchaeol

Tabelle 4: identifizierte Lipidspezies der verschiedenen Isolierungsstufen von HR gemäß Abb. 44.



## 5. Diskussion

### 5.1. Theorie der Kristallisation von Membranproteinen in Mesophasen

Nachfolgend wird versucht, die Kristallisation von Proteinen in artifiziellen Membransystemen phänomenologisch zu erklären. Der hier vorgeschlagene Ablauf und die sich daraus ergebenden Folgerungen sollen nur für integrale Membranproteine gelten. Ebenfalls in der Literatur beschriebene Kristallisationsexperimente an löslichen Proteinen (Bsp. Lysozym) in Gegenwart artifizieller Membransysteme seien somit von dieser Betrachtung ausgenommen und können, soweit notwendig, auf anderen Mechanismen beruhen.

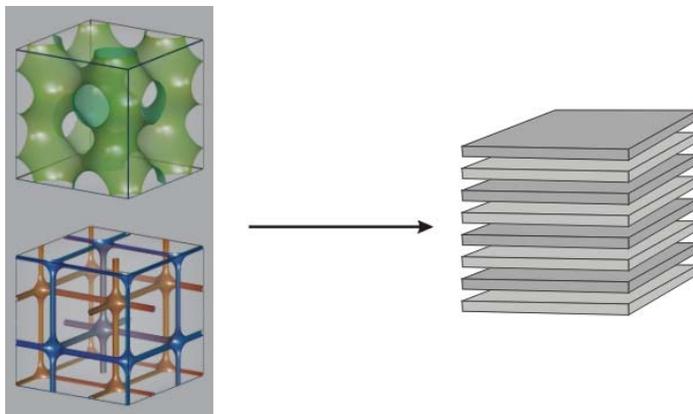


Abb. 47: Anfangs- und Endzustand des zur HR-Kristallisation verwendeten Lipid(MO)/Wasser-Gemisches. Die zu Beginn kubische Lipidphase (links), deren Membranaufbau (links oben) und Wasserkanalstruktur (links unten) illustriert ist, geht im Verlauf der Kristallisation in eine lamellare Anordnung von Lipiddoppelschichten über

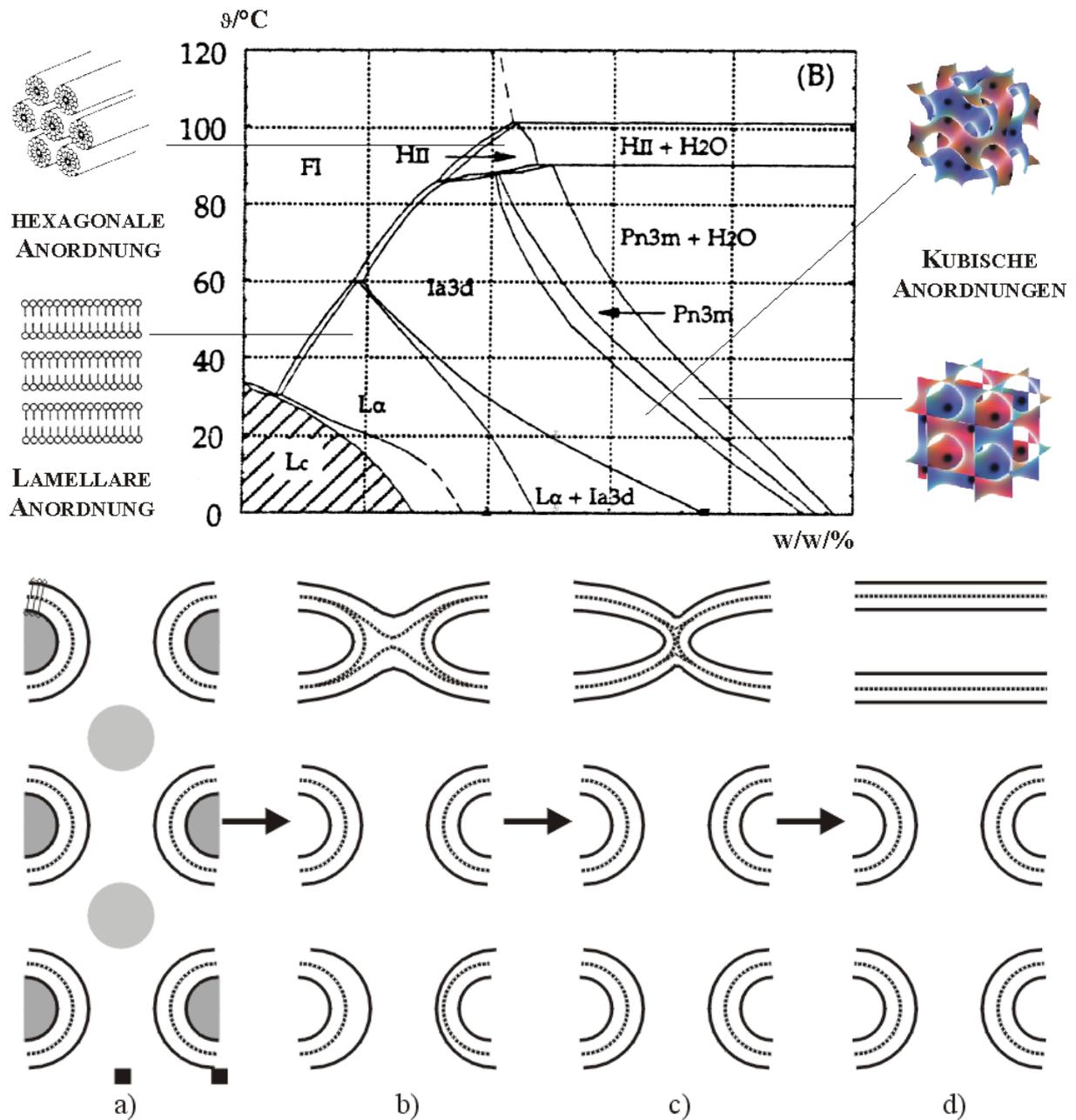
Für die Kristallisation von HR und BR in Lipidphasen ist es notwendig, eine Mischung von solubiliertem Membranprotein und Lipid zu präparieren, die eine kubische Symmetrie aufweist. Andererseits ergibt die Strukturanalyse der hexagonalen HR-Kristalle eine Umwandlung der anfänglich kubischen Lipidphase zu einer lamellaren Anordnung (Abb. 47). Dieser Befund erklärt die erkennbare Viskositätsabnahme der Lipidphase im Verlaufe der Kristallisation. In Abb. 47 sind der Anfangszustand (links) und der vermutliche

Endzustand der Lipidphasen im Kristallisationsexperiment schematisch dargestellt.

Die kubische Symmetrie zu Beginn der Kristallisation wurde mehrfach mit röntgenographischen Methoden von verschiedenen Gruppen nachgewiesen und gilt als gesichert<sup>[144][145][146]</sup>. Die lamellare Anordnung des Lipids im Endzustand stützt sich neben den oben angeführten Ergebnissen für HR auf röntgenographische Untersuchungen an MO-Lipidphasen in denen Ubiquinon-Kristalle<sup>[147]</sup> gezüchtet wurden. In der unmittelbaren Kristallumgebung konnte im Verlauf der Kristallisation eine Umwandlung der Lipidanordnung von kubisch nach lamellar mit Röntgenkleinwinkelbeugung beobachtet werden.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse ist es hilfreich, eine Hypothese des Kristallisationsmechanismus in Lipidphasen abzuleiten, die als Grundlage für weitere Experimente dienen





kann. Nachfolgend soll dies unter besonderer Berücksichtigung der Lipidphaseneigenschaften versucht werden.

Für das binäre Mischungssystem MO/Wasser wurde kürzlich von Qui und Caffrey (2000)<sup>[146]</sup> ein Phasendiagramm publiziert, das die existierenden Lipidphasen in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis und der Temperatur wiedergibt (Abb. 48). Entlang der Isothermen bei 22 °C können je nach Lipid/Wasser-Mischungsverhältnis kristallin-lamellare (L<sub>c</sub>), lamellare (L<sub>α</sub>) und kubische (Ia3d und Pn3m) Lipidphasen auftreten. Weitere Untersuchungen der MO/Wasser-Mischung in Gegenwart von verschiedenen Salzen sowie gängiger nichtionischer Detergenzien wie OG oder DM zeigen, daß dieses System außerordentlich tolerant gegenüber chemisch unterschiedlichen Additiven ist und nur geringe Änderungen des oben skizzierten Phasendiagramms beobachtet werden<sup>[145]</sup>. Das für die Kristallisationsexperimente gewählte Mischungsverhältnis von Lipid zu Wasser (60/40) entspricht bei 22 °C einer bikontinuier-



Abb. 48: Phasendiagramm der binären Mischung Monoolein/Wasser; Erläuterungen siehe Text.

Abb. 49: Vorgeschlagener Mechanismus der der Membranprotein-Kristallisation zu Grunde liegenden Phasenumwandlung der Lipidphasen. Die Lipiddoppelschichten sind als durchgängige Linien gekennzeichnet, wobei die hydrophobe Kontaktfläche der Lipide als unterbrochene Linie hervorgehoben ist a) 2-dimensionaler Schnitt durch ein kubisch primitives Gitter, die Wasserkanäle in Blickrichtung sind grau unterlegt b) Fusion der an der Grenzfläche des kubischen Systems liegenden Lipiddoppelschicht über den Kontakt der trans-Lipideinzelschichten c) fortschreitende Fusion der inneren Lipideinzelschicht d) Ausbildung zweier Lipiddoppelschichten, wodurch das kubischen Lipidsystem sukzessive von der Phasengrenzfläche her abgebaut wird.

lichen kubischen Lipidphase. Diese Phase ist auch in Gegenwart von lipidlöslichen Proteinen (bspw. Bakteriorhodopsin) im geschlossenen System über Monate stabil, was daran zu erkennen ist, daß sich keine erkennbaren Kristallkeime ausbilden bzw. eine Phasenänderung unter dem Lichtmikroskop zu erkennen ist.

In Abb. 49 ist der hier zu diskutierende Mechanismus für die Kristallisation in Gegenwart von Lipidphasen in vier Teilschritten skizziert. Zur Vereinfachung sind in die Membran eingefügte Proteine nicht dargestellt. Die zu Beginn vorliegende kubische Lipidphase aus Abb. 47 ist hier (Abb. 49) als 2-dimensionaler Schnitt durch das kubische Netzwerk in der Teilabbildung a) dargestellt (siehe zum Vergleich auch Abb. 47, links). Im Kristallisationsexperiment ist nicht davon auszugehen, daß die frisch präparierte kubische Lipidphase ein einheitliches System darstellt, sondern daß diese vielmehr aus unendlich vielen mikroskopischen Bereichen kubischer Symmetrie, die ungeordnet nebeneinander vorliegen, besteht. Eben solche Lipidpartikel kubischer Symmetrie dispergiert in wässrigen Pufferlösungen wurden von Landh<sup>[148]</sup> erstmalig beschrieben. Diese sogenannten Cubosomen sind mit Abmessungen im  $\mu\text{m}$ -Bereich von einer Lipideinzelschicht umgeben. Für eine Beschreibung der grundsätzlichen Vorgänge im Kristallisationsverlauf ist es weniger wichtig, ob Cubosomen, d. h., räumlich vollständig durch eine Lipideinzelschicht abgegrenzte kubische Bereiche, entstehen. Vielmehr kommt es darauf an, daß die abgegrenzten kubischen Bereiche sehr wahrscheinlich von einer Lipideinzelschicht umgeben sind, wie es in der Teilabbildung b) skizziert ist. Der in b) vorliegende Kontakt der trans-stehenden Lipideinzelschichten (trans-monolayer contact, TMC) sollte auf Grund energetischer Betrachtungen<sup>[149]</sup> ein wesentlicher Teilschritt in der Phasenumwandlung sein. Im Anschluß bildet sich ein Kontakt der inneren Lipideinzelschichten, ein sogenannter Stengel (stalk-Intermediat), aus dem letztlich zwei Lipiddoppelschichten hervorgehen. Die Grenzfläche zwischen lamellarer und kubischer Lipidphase hat sich durch diese Abfolge um eine Lipiddoppelschicht verschoben. Um diese Phasenumwandlung mit der Kristallisation eines integralen Membranproteins zu korrelieren, sei nun angenommen, das die in die Lipidschichten eingelagerten Proteine von der Grenzfläche beider Phasen einen Kristallisationsprozess durchlaufen. Im bikontinuierlichen kubischen Lipidsystem können die Membranproteine frei lateral diffundieren. Kommt es nun zu



dem oben beschriebenen Phasenübergang, dann bildet sich im einmaligen ersten Schritt an der Phasengrenzfläche ein 2-dimensionaler Proteinkristall, der im weiteren Verlauf der Kristallisation schichtweise in die dritte Dimension aufgebaut wird. Die kubische Lipidphase dient hierbei als Solvens, mit dessen Hilfe weitere Proteinmoleküle passender Orientierung an die Kristall-(lipid)grenzfläche gelangen. Die Kristallisation eines integralen Membranproteins ist demnach lokal mit einem systematischen Zusammenbruch der kubischen Lipidphase verknüpft.

Phasenübergänge vom kubischen zum lamellaren Arrangement können durch Wasserentzug

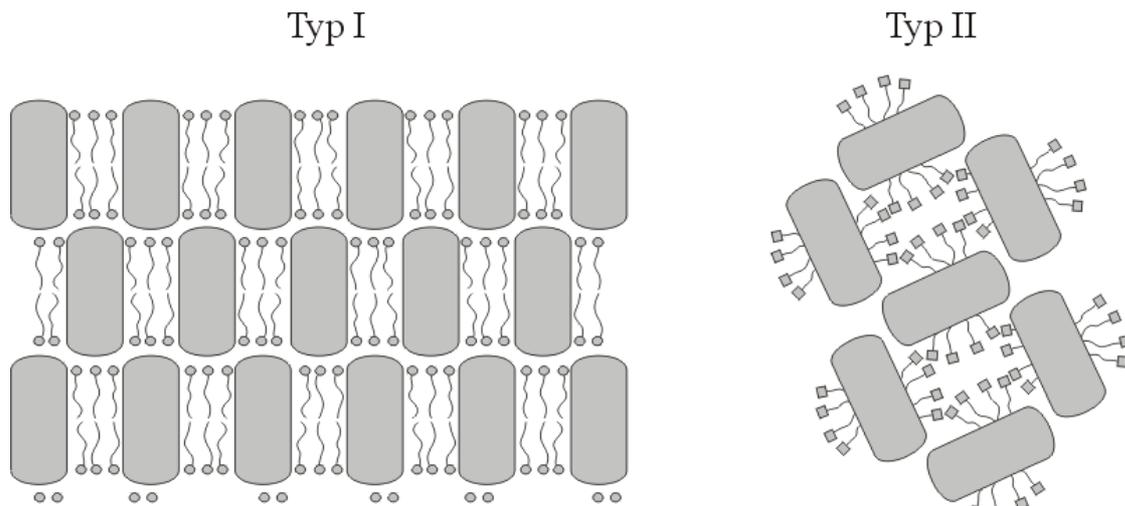


Abb. 50: Vergleich der Membranproteinkristalle vom Typ I und Typ II; Erläuterungen siehe Text

oder die Gegenwart von kleinen amphiphilen Verbindungen bewirkt werden. Wie aus Abb. 48 ersichtlich, ist bei einer Verringerung des Wasseranteils unter 35 % (w/w), die lamellare Phase thermodynamisch bevorzugt. Sobald also der kubischen Lipidphase, beispielsweise über die Gasphase, Wasser entzogen wird (Kristallisation über Gasphasendiffusion) oder, wenn vor Abschluss des Systems ein wasserbindendes Agens hinzugegeben wird (batch-Kristallisation), kommt es bei Temperaturen kleiner 60°C zu einem Phasenübergang unter Ausbildung lamellarer Lipiddoppelschichten.

Im Beispiel der Kristallisation von BR wird als wasserbindende Komponente ein Gemisch festen Natrium-/Kalium-Phosphats (Sörensen-Salz) hinzugefügt. Somit hat man es in diesem Fall nicht mit einem Präzipitant im üblichen Sinne zu tun, vielmehr bewirkt der Wasserentzug, daß es zu einem Phasenübergang im System Lipid/Wasser kommt. Das Sörensen-Salz enthält in der verwendeten Form zwei Mole Hydratwasser neigt aber in Gegenwart von Feuchtigkeit zur Verwitterung, d. h., zur Bindung weiteren Kristallwassers. Im Fall der BR-Kristallisation bedeutet die nachträgliche Zugabe des Sörensen-Salzes die Bindung von bis zu 10 Mol Wasser pro Mol eingesetzten Salz. Da die ablaufende Wasserbindung eine Grenzflächenreaktion (Salz/Pufferlösung) ist, läßt sich allerdings keine direkte Aussage über die Anzahl gebundener Anteile Wasser machen, obwohl die BR-Kristallisation eine deutliche Abhängigkeit vom Stoffmengenanteil des Salzes im Kristallisationsansatz zeigt. Folglich hängt



die erfolgreiche Kristallisation auch noch von der effektiven Salzoberfläche bzw. dem Zerteilungsgrad des Salzes ab. Dies ist nicht zuletzt einer der Gründe für die schwierige Reproduktion der BR-Kristallisation in Lipidphasen.

Die Ausbildung intra- und intermembraner Protein-Protein-Wechselwirkungen sollte den oben beschriebenen Phasenübergang ebenfalls erleichtern. Weitere Möglichkeiten eine Phasenumwandlung zu bewirken, bestehen in einer Absenkung der Temperatur (siehe Abb. 48) oder der Zugabe kleiner amphiphiler Moleküle wie beispielsweise natürlicher polarer Lipide oder Detergentien. Für die Beimengung der Detergentien OG<sup>[150]</sup> und DM<sup>[151]</sup> ergeben sich systematische Verschiebungen der Phasengrenze im System MO/Wasser, die einer Verlagerung des Phasendiagramms entlang der x-Achse (in Richtung geringerer Wasseranteile) entsprechen. Mit Erreichen von Detergenzanteilen größer 0.1 M werden schließlich keine kubischen Lipidphasen mehr ausgebildet.

Gustafsson *et al.* (1999)<sup>[152]</sup> konnten zeigen, daß Zusätze von Natrium-Cholat zur Bildung von Lipidvesikeln mit kubischer Symmetrie führen. Derartige Lipidvesikel könnten den eingangs erwähnten Cubosomen entsprechen, die durch Beimengung des Blockkopolymers Poloxamer 407 erhalten wurden. Neto *et al.* (1999)<sup>[153]</sup> haben kürzlich AFM-Untersuchungen an MO-Cubosomen vorgenommen, die nach Einbringen eines Blockcopolymers in größeren Mengen erhalten werden. Mit Abmessungen von 300\*300\*30 µm sind Cubosomen deutlich kleiner, als die in Lipidphasen gebildeten Proteinkristalle. Für den Fall, daß ähnlich dimensionierte Strukturen eine Rolle bei der Kristallisation spielen, hätte man es unter Annahme des obigen Mechanismus mit der Ausbildung von Kristallisationskeimen zu tun. Die Anzahl dieser Keimbildungsbereiche sollten sich gemäß diesen Überlegungen verstärkt durch nachträgliche Erzeugung weiterer lamellarer Grenzflächen bspw. durch Sonifikation der Mischung, noch steigern lassen.

Gemäß der von Michel<sup>[154]</sup> vorgenommenen Unterteilung 3-dimensionaler Membranproteinkristalle in zwei Klassen, haben wir es bei den beiden archaealen Ionenpumpen mit Kristallen des Typ I zu tun. Die hexagonalen HR Kristalle sind mit ihrer schichtweisen Anordnung von geordneten Lipiddoppelschichten (siehe Abb. 50) ein ideales Beispiel für diesen Kristalltyp. Die intertrimer-Kontakte innerhalb der Lipiddoppelschicht kommen ausschließlich über Protein/Lipid-Wechselwirkungen zustande wie es für den Typ I von Michel vorgeschlagen wurde. Hinzu kommen intratrimer-Kontakte sowohl über Protein/Lipid- als auch über Protein/Protein-Wechselwirkungen. Orthogonal zur Membranebene existieren Protein/Protein-Kontakte hauptsächlich über die zytoplasmatischen und extrazellulären Schleifenregionen. Der hier aufgestellte Kristallisationsmechanismus in Lipid-Mesophasen erklärt den Aufbau von Typ I Kristallen über die geordnete Aggregation von 2-D Proteinkristallen.

Die Züchtung geordneter Kristalle diesen Typs ist verglichen mit dem Typ II bis heute das schwierigere Vorhaben. Die geordnete Kristallisation integraler Membranproteine mit kleinen



hydrophilen Domänen in artifiziellen Lipidphasen könnte helfen diese Barriere zu überwinden und zukünftig auch stark hydrophobe Proteine in größerer Variation strukturell zu untersuchen.



## 5.2. Vergleich der Tertiärstrukturen von HR und BR

Eine systematische Analyse der Primärstrukturen archaealer Retinalproteine führte Ihara *et al.* (1999)<sup>[155]</sup> zu einer phylogenetischen Einteilung in vier Gruppen. Die vorgenommene Einteilung basiert auf einem Vergleich von insgesamt 25 codierenden Genen für Retinalproteine (HR, BR, SRI, SRII). Die Unterteilung in vier Gruppen korreliert mit der Funktion der Proteinen, wonach die phylogenetische Ähnlichkeit der beiden Ionenpumpen HR und BR zueinander größer, als zu den ebenfalls näher miteinander verwandten Lichtrezeptoren SRI und SRII ist.

Im Vergleich der Primärstrukturen aller bis dato identifizierten archaealen Retinalproteine finden sich insgesamt 16 Aminosäuren, die in den vier Klassen gemäß Ihara *et al.* (1999)<sup>[155]</sup> konserviert sind. Bis auf eine Ausnahme liegen diese Reste in helicalen und transmembranen Bereichen. Lediglich ein Glycin in der extrazellulären EF-Schleifenregion ist ebenfalls konserviert. Die nachfolgende Tabelle faßt sämtliche 16 konservierten Aminosäuren für HR und BR sowie deren strukturellen Ähnlichkeiten zusammen:

Aminosäure HR/BR	Halorhodopsin	Bakteriorhodopsin
Y77/Y57*	H-Brücke zu D238	H-Brücke zu D212 und H <sub>2</sub> O 407
R108/R82*	H-Brücke zu H <sub>2</sub> O 505 und H <sub>2</sub> O 512	H-Brücke H <sub>2</sub> O 407 und H <sub>2</sub> O 406
Y109/Y83*	H-Brücke zu H <sub>2</sub> O 515 (diese koordiniert an H <sub>2</sub> O 507 und Y234)	H-Brücke zu W189 (H <sub>2</sub> O 405)
W112/W86*	H-Brücke zu H <sub>2</sub> O 505, im 3 <sub>10</sub> -Helixbereich der Helix C	Beginn 3 <sub>10</sub> -Helixbereich der Helix C
T116/T90*	Ende 3 <sub>10</sub> -Helixbereich der Helix C, H-Brücke zu Asp141 (2.55 Å)	Ende 3 <sub>10</sub> -Helixbereich der Helix C, H-Brücke zu Asp115 (2.5 Å)
P117/P91	Helixknick Vorkommen für spätere Intermediate wichtig, erst ab 250mM Cl-Transport, K <sub>M</sub> (Cl)>2M vs. 180mM bei wt	Helixknick, -brecher
G148/G122*	in Helix D nahe Cyclohexenring	in Helix D nahe Cyclohexenring
L179/L152	Helix E, Beginn flexibler Region	Helix E, Beginn flexibler Region
L199/L174	Helix F, hydrophobe Region, eventuell Wasserbarriere verhindert dessen Einfluß bzw. Ausfluß	Helix F, hydrophobe Region, eventuell Wasserbarriere verhindert dessen Einfluß bzw. Ausfluß
W207/W182*	VdW-Kontakt zum Retinal (liegt zwischen C19/C20), H-Brücke zu H <sub>2</sub> O 506	VdW-Kontakt zum Retinal (liegt zwischen C19/C20), H-Brücke zu H <sub>2</sub> O 501
Y210/Y185*	H-Brücke zu D238, flankiert Retinal (liegt parallel)	H-Brücke zu D212, flankiert Retinal (liegt parallel)
P211/P186*	flankiert Ionon-Ring (liegt parallel), Verlust H-Brücke im Backbone (Helixbrecher)	flankiert Ionon-Ring (liegt parallel), Verlust H-Brücke im Backbone (Helixbrecher)
W214/W189	liegt unterhalb Ionon-Ring, eventuell	liegt unterhalb Ionon-Ring, H-



Aminosäure HR/BR	Halorhodopsin	Bakteriorhodopsin
*	zusammen mit Positionen 210,211,214 an Retinalaufnahme beteiligt	Brücke zu Y83, eventuell an Retinalaufnahme beteiligt
G220/G195	verankert BC-loop	?
D238/D212*	H-Brücke zu Y77, Y210, H <sub>2</sub> O 508	H-Brücke zu Y57, Y185, H <sub>2</sub> O 402 und H <sub>2</sub> O 406
K242/K216*	Retinalbindung via SB	Retinalbindung via SB

Tabelle 5: Liste der 16 in allen archaealen Retinalproteinen konservierten Aminosäuren. Spalte 1 gibt jeweils die Aminosäurekurzbezeichnung und die Position an (HR/BR). Die mit einem Stern versehenen Reste gehören zur Retinalumgebung. In den beiden weiteren Spalten sind die Eigenschaften wie Wasserstoffbrückenbindungen, sterische Kontakte etc. aufgeführt. Abkürzung: W = Wat, H-Brücke = Wasserstoffbrückenbindung

### 5.3. Die Retinalbindungstasche

In den beiden Spalten für Halorhodopsin und Bakteriorhodopsin sind die strukturellen Gemeinsamkeiten der 16 konservierten Aminosäuren auf der Basis der verfügbaren Strukturdaten (PDB-Code<sup>[156]</sup>: 1E12, 1C3W) verglichen. Mit einem Stern (\*) versehene Aminosäuren befinden sich in der näheren Umgebung des Retinals und werden nachfolgend als „Bindungstaschen-Reste“ bezeichnet.

Ein Strukturvergleich der 12 konservierten Bindungstaschen-Reste zeigt (Abb. 51), daß deren relative Lage und das dazugehörige Wasserstoffbrücken-Netzwerk zum überwiegenden Teil konserviert sind. Darüber hinaus ist zu erkennen, daß Helixdeformationen und die Lage zumindest zweier Wassermoleküle in beiden Strukturen an vergleichbaren Positionen auftreten. Der hohe Konservierungsgrad dieser Bindungstaschen-Reste wird in der Literatur üblicherweise auf eine Optimierung des Opsin-Shifts (Veränderung des Absorptionsmaximums durch die Proteinumgebung) und die Möglichkeit zur Aufnahme freien Retinals (nach der Opsinsynthese) zurückgeführt. Ein Zusammenhang zwischen Struktur und Transportfunktion dieser Aminosäuren ist erstmals mit der hier präsentierten HR-Struktur im Vergleich zu der BR-Struktur möglich.

In Abb. 51 ist zu diesem Zweck die Retinalumgebung der beiden archaealen Ionenpumpen dargestellt. Die strukturelle Ähnlichkeit beider Proteine zeigt sich deutlich in der Anordnung der dargestellten Aminosäuren sowie im korrespondierenden Wasserstoffbrücken-Netzwerk. Lediglich die für BR gefundene Wasserstoffbrücke zwischen Tyrosin 83 und Tryptophan 189 liegt in HR nicht vor. Ebenfalls auffällig sind die vier Helixdeformationen an nahezu identischen Positionen<sup>[157]</sup> in Helix A (66-70), Helix C (112-117), F (207-211, Übergang zu  $3_{10}$ -Helix) und die  $\pi$ -bulge in Helix G (241-245). Eine  $\pi$ -bulge, zeichnet sich unter anderem durch die Versetzung der Helix-stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen um eine Position von der  $\pi$ -Helix mit  $n = n+4$  nach  $n = n+5$  aus.



Anstatt am  $\alpha$ -Helix-stabilisierenden Wasserstoffbrücken-Netzwerk beteiligt zu sein, inter-

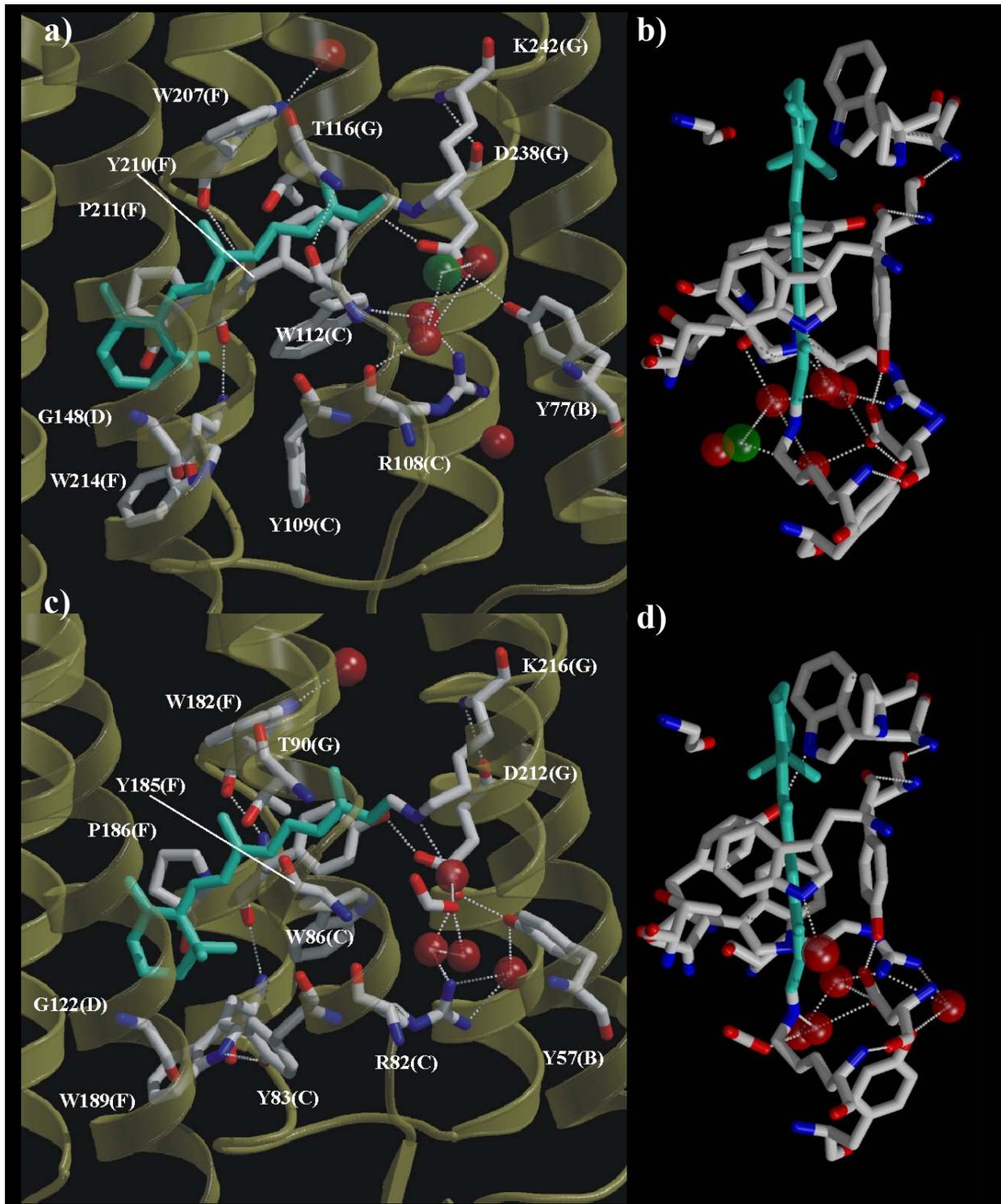


Abb. 51: Strukturvergleich der Retinalumgebung in HR und BR: Die konservierten Aminosäuren sind als Kugel-Stab-Modelle hervorgehoben, Wassermoleküle (rot), Chloridionen (grün) und Retinal (türkis) sind eingefärbt. Eine Teilansicht von HR ist in den Teilabbildung a) und b), von BR in c) und d) gezeigt. In den Teilabbildungen b) und d) ist der Blick des Beobachters von der zytoplasmatischen Seite auf den Chromophor gerichtet. Die Aminosäurebezeichnung setzt sich aus dem Einbuchstaben-code, der Sequenznummer und dem Helixbuchstaben (in Klammern) zusammen (Abbildung siehe eine Seite zuvor)



agiert der Carbonyl-Sauerstoff von Alanin 241 mit einem Wassermolekül (506 in HR, 501 in BR). Dieses Wassermolekül in konservierter Position ist mit Tryptophan 207 (W207) verbunden (siehe auch Abb. 52), was exakt der Situation in BR entspricht (W182). Das SB-Lysin 242 (K242) in HR ist im Unterschied zu BR (K216) am intrahelicalen Wasserstoffbrücken-Netzwerk beteiligt<sup>[12]</sup>, wengleich der Vektor der Carbonylfunktion ebenfalls von der Helixachse abweicht. In BR hingegen, bindet der Carbonylsauerstoff ein weiteres Wassermolekül und der sich anschließende  $\alpha$ -Helixbereich ist um etwa  $15^\circ$  relativ zur Achse der  $\alpha$ -Helix vor der  $\pi$ -bulge versetzt. Eine Schwächung der intrahelicalen Wasserstoffbrücke von K242 könnte in nachfolgenden Photozyklusschritten für die intermediäre Bindung des

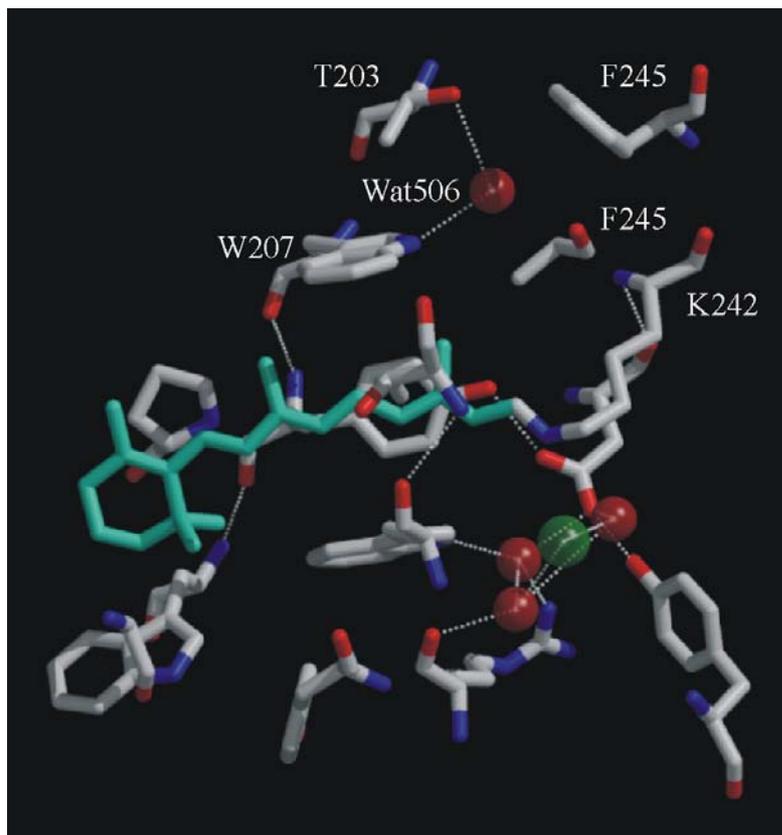


Abb. 52: Kugel-Stab-Modell der CBS und der Wasser 506 umgebenden Aminosäuren auf der zytoplasmatischen Halbseite von HR. Die gegenüber Abb. 51 a) neu hinzugekommene Reste sind explizit bezeichnet. Erläuterungen siehe Text.

Substrats notwendig sein.

Weitere Ähnlichkeiten der Bindungstaschen von HR und BR werden beim Vergleich der dargestellten Wassermoleküle und des Chloridions deutlich. Die an W207 (W182 in BR) koordinierten, sowie zwischen Guanidino- (R108 resp 82) und Carboxylgruppe (D238 resp 212) liegenden Wassermoleküle (Wat505/406) sind hinsichtlich ihrer Lage und Umgebung in beiden Proteinen strukturell verwandt. Für das Chloridion zeigt sich, daß es mit einem der beiden carboxylischen Sauerstoffe von D85 in BR zur Deckung kommt.

Es besteht deshalb die Möglichkeit, daß die in Abb. 51 dargestellten strukturellen Gemeinsamkeiten eine Grundlage für

die in beiden Proteinen auftretende Konformationsänderung im Photozyklusverlauf bilden. In beiden Proteinen hat der lichtinduzierte Transport des Substrates (Proton bzw. Hydroxid-Ion oder Chloridion) unmittelbar eine Veränderung der benachbarten Wasserstoffbrücken zur Folge. Die Neuorientierung der Asparaginseitenkette in Helix G (D238 bzw. 212 in BR) erscheint unvermeidlich, sobald in Folge der SB-Isomerisierung das Chloridion seine Lage ändert oder die Carboxylgruppe von D85 in BR protoniert wird. Eine solche Neuorientierung



könnte sich, vermittelt über das parallel zum Retinal liegende Tyrosin (Y210 bzw. Y185 in BR), auf die Konformation der Helix F auswirken. Der im VdW-Kontakt zum Ionon-Ring stehende Indolring (W214 bzw. W189) sollte diesen Effekt nach der lichtinduzierten Lageänderung des Retinals zusätzlich verstärken. Hinzu kommt, daß ein auf der zytoplasmatischen Halbseite, ebenfalls in Helix F lokalisiertes Tryptophan (W207 bzw. W182) auch im VdW-Kontakt zum Retinal steht.

Somit hat in beiden Ionenpumpen eine Isomerisierung der PSB vermittelt über ein Wasserstoffbrückennetzwerk und über sterische Kontakte einen Einfluß auf die Orientierung der Helix F, vorausgesetzt, die angeführten Effekte negieren sich nicht. Zaccai hat kürzlich in einem Übersichtsartikel zu Neutronenbeugungsstudien an Proteinen<sup>[158]</sup> (u. a. an BR) nochmals festgestellt, daß die Retinalbindungstasche und der überwiegende Transmembranbereich von BR sehr geringe thermische Bewegungen über einen weiten Temperaturbereich zeigen. Diese dynamischen Messungen spiegeln die B-Faktorverteilungen der RSA wieder, die für HR und BR im Transmembranbereich mit 20 bis 25 Å<sup>2</sup> sehr gering sind. Demzufolge ist die Retinalbindungstasche im Vergleich zu anderen Bereichen der Proteine rigide und thermische Abweichungen von der Proteinkonformation sind daher sehr gering.

Für den Transport eines Anions sind in HR größere strukturelle Änderungen notwendig, da in der Struktur des unbelichteten Zustandes keine zusammenhängenden Kavitäten ausreichenden Volumens auf der zp-Seite vorhanden sind. Die hier prinzipiell angenommene Konformationsänderung, vermittelt über ein konserviertes Wasserstoffbrückennetzwerk, wird darüber hinaus noch durch weitere strukturelle Merkmale gestützt. Eine Analyse der B-Faktor-Verteilung aus den RSA beider Ionenpumpen weist signifikant höhere Werte (35 bis 40 Å<sup>2</sup>) für gleiche Bereiche in den Helices E und F auf. Die damit verbundene erhöhte Beweglichkeit endet jeweils in den von der idealen  $\alpha$ -Helix abweichenden Regionen. In der Helix E wird diese Region durch eine weitere  $\pi$ -bulge eingeleitet, die wiederum in HR und BR zu finden ist. Dieser Bereich ist in BR fehlgeordnet (Luecke *et al.* (1999)<sup>[12]</sup>, PDB-Code: 1C3W) oder mit hohen B-Faktoren belegt (Essen *et al.* (1997)<sup>[19]</sup>, PDB-Code: 1BRR). Die Carbonylfunktionen der Aminosäuren Alanin 178 und Leucin 179 (A150 und A151 in BR) bilden eine nichtparallele Ebene zur Helixachse. Leucin 179, am Beginn der  $\pi$ -bulge, ist ebenfalls in allen archaealen Retinalproteinen konserviert.

Die vorangehende Interpretation ist auf Grund des Mangels an Strukturen von Photozyklusintermediaten (einschließlich die der Sensorrhodopsine) nicht umfassend zu beweisen. Einen universellen Zusammenhang zwischen Retinalisomerisierung und Proteinkonformation archaealer Retinalproteine wird letztlich erst durch weitere, vergleichende Strukturanalysen herzustellen sein.



#### 5.4. Die Quartärstrukturen von HR und BR

Wie im Kapitel 4.1.1 beschrieben, liegt HR in den 3-D Kristallen in trimerer Form vor. Diese Anordnung unterscheidet sich von den HR-Tetrameren, die erstmals von Havelka *et al.* (1993)<sup>[113]</sup> (siehe S. 33) beschrieben wurden. Für die elektronenkristallographischen Untersuchungen wurden *in vivo* gebildete 2-D Kristalle verwendet. Allerdings ließen sich diese Kristalle nur aus einer Fraktion hoher Schwimmdichte (HR-PM, Dichte 1,14 bis 1,16 g\*cm<sup>-3</sup>) von etwa 5 % des exprimierten HR isolieren. Die antiparallele Anordnung der Tetramere hat bei Belichtung netto keinen gerichteten Transport von Chloridionen zur Folge, was das wichtigste Argument gegen die physiologische Relevanz dieser Anordnung ist. Nur unter Annahme, daß die übrigen, "nichtkristallinen" HR-Anteile einheitlich in einer Richtung in der Membran orientiert sind, resultiert dennoch ein gerichteter Netto-Transport von Anionen. Eine Neuorientierung im Verlauf der 2-D Kristallisierung ist auf Grund der wenigen Präparationsschritte, die ohne Detergenzzusatz erfolgten, nahezu auszuschließen. Außerdem konnte die orthogonale Anordnung von *in vivo* 2-D Kristallen, welche mit der Havelkaschen Raumgruppe P2 vereinbar ist, mittels Gefrierbuchtechniken an ganzen Zellen von HR-Überexpressionsstämmen nachgewiesen werden. Demnach ist es wahrscheinlich, daß die gefundenen Tetramere lediglich von einem geringen Anteil des synthetisierten HR's gebildet werden, während der überwiegende Anteil der Proteine eine gerichtete Anordnung in der Membran einnimmt. Die Annahme, daß es sich dabei um die in dieser Arbeit gefundenen Trimere handeln könnte, stützt sich auf mehrere Beobachtungen. Zum einen konnte vor kurzem nachgewiesen werden, daß der HR-Überexpressionsstamm D2 neben orthogonalen auch hexagonale 2-D Kristalle bildet (H. Besir, persönliche Mitteilung). Zum anderen spricht der Vergleich mit dem ebenfalls in trimerer Form vorliegenden BR für eine ähnliche Anordnung bei HR. Für BR konnte gezeigt werden, daß die a,b-Schichten in den 3-D Kristallen dem Aufbau der *in vivo* gebildeten Purpurmembraan ähneln<sup>[159]</sup>. Darüberhinaus weist für beide archaealen Ionenpumpen im Unterschied zu den Sensorrhodopsinen, die Doppelbande im CD-Spektrum<sup>[160]</sup> auf eine supramolekulare Organisation der HR-Moleküle hin.

Ein Vergleich der supramolekularen Strukturen von HR (Trimer versus Tetramer) zeigt, daß in beiden Fällen die Helices D und E eines Monomers mit der Helix B eines anliegenden Monomers in Kontakt stehen. Bei den Trimeren kommen zudem noch über die Palmitinsäure (PS) vermittelte Wechselwirkungen der Helix C (siehe Abschnitt 4.5.2) hinzu, so daß letztlich vier Helices für die Monomer/Monomer-Kontakte im Trimer verantwortlich sind. Sämtliche mit der Palmitinsäure (PS) in Kontakt stehenden Reste sind in den deponierten HR Primärstrukturen konserviert. Dies gilt sowohl für Serin 76 (S76) und Threonin 111 (T111) - beide bilden Wasserstoffbrücken zur Carboxylgruppe der PS (siehe Abb. 56) - als auch für die mit



der Alkylseitenkette des Lipids in hydrophobem Kontakt stehenden Aminosäuren (siehe Abschnitt 5.5).

So kann man sich den Übergang von Tetramer zum Trimer durch eine Vergrößerung des Winkels zwischen zwei benachbarten Monomeren von  $90^\circ$  auf  $120^\circ$  vorstellen, bei dem das durch den vergrößerten Öffnungswinkel freiwerdende Volumen von der PS ausgefüllt wird. Die Monomere sind im Komplex um ca  $11^\circ$  relativ zur dreizähligen Drehachse im Trimerzentrum gekippt. Der zp-Verschluß wird, wie oben erwähnt, über die PS und weitere hydrophobe Wechselwirkungen der konservierten Aminosäuren Phenylalanin 135 und Isoleucin 142 vermittelt. Auf der zp-Seite stehen die Monomere in unmittelbarem Kontakt, während sie zur ez-Seite eine kelchförmige Öffnung bilden.

In beiden Ionenpumpen gibt es auf der extrazellulären Seite eine komplexe Schleifenregion zwischen den Helices B und C. Beiden Proteinen gemeinsam ist das antiparallele Faltblatt in dieser Region. In HR ist die gesamte Schleife um 4 bis 14 Aminosäuren länger als in BR. Die Schleife legt sich über die Helixenden D bis G und verdeckt so den überwiegenden Anteil der extrazellulären Proteinoberfläche. Im Zentrum dieser Schleife steht in HR ein konserviertes Histidin (H95), das über Wasserstoffbrücken zu V218 und G220 die Schleifenregion stabilisiert. Ein Austausch dieser Aminosäure gegen Alanin hat die Denaturierung von HR bei Belichtung zur Folge. Außerdem führt der Austausch zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums nach  $555 \text{ nm}^{[67]}$ . Die gesamte Region ist demzufolge über dieses Histidin fixiert, was auch einen Einfluß auf die putativ an der Chloridaufnahme beteiligten Aminosäuren hat. Reste wie Glutamin 105 (Q105) und Arginin 103 (R103) auf der extrazellulären Oberfläche von HR liegen am Übergang der BC-Schleife in die Helix C. Für die Punktmutation H95A, bei der die Schleife nicht mehr verankert ist, resultiert darüberhinaus ein stark reduzierter Anionentransport (Chlorid- und Nitrattransportrate ca 10-20% des Wildtyps).



### 5.5. Konservierte Aminosäuren archaealer Retinalproteine

In der Superposition des C $\alpha$ -Positionen des Protein-Rückgrats (Strukturalignment, Abb. 53) von HR und BR kann das pentahelicale Fragment der Helices C bis G beider Proteine mit

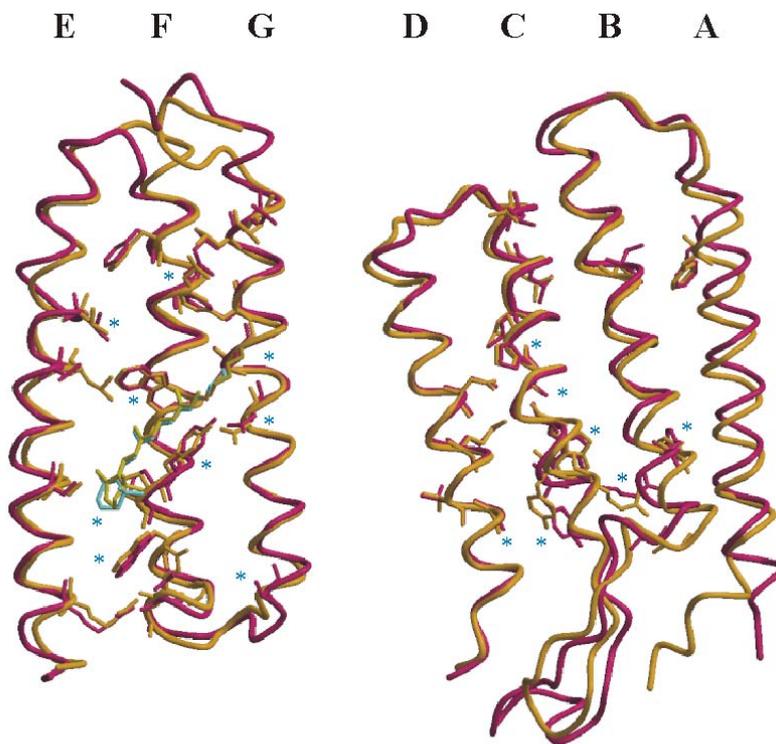


Abb. 53: Superposition des Proteinrückgrats von HR (rot, 1E12) und BR (gelb, 1BRR). Hervorgehoben sind das Retinal (HR: türkis, BR: gelb) sowie Aminosäuren, die in allen archaealen Retinalproteinen (Stern) sowie in allen archaealen Ionenpumpen konserviert sind.

geringer Abweichung zur Deckung gebracht werden. Über insgesamt 122 Aminosäuren im Transmembranbereich dieses Fragmentes resultieren durchschnittlich 0,77 Å Abweichung voneinander (rmsd, root mean square deviation). Relativ zu diesem pentahelicalem Fragment weichen Helix A und B in HR und BR um 2,1 Å bzw 1,3 Å voneinander ab. Schließt man die in allen archaealen Retinalproteinen konservierten Aminosäuren in diesen Vergleich ein, ergibt sich ein ähnliches Bild (in Abb. 53 mit einem Stern gekennzeichnet). In Tabelle 6 ist

deshalb der Konservierungsgrad der Aminosäuren nach Sekundärstrukturelementen gegliedert.

Die "hochkonservierten" und an der Bindungstasche beteiligten Aminosäuren (Y77/57, R108/82, W112/86, T116/90, G148/121, W207/182, Y210/185, P211/185, W214/189, D238/212, K242/216 in BR) wurden bereits an anderer Stelle besprochen und sollen deshalb hier nur kurz behandelt werden. Tyrosin 57 (Y77/57 in BR) ist die einzige konservierte Aminosäure im Helixsegment AB. Der aromatische Ring liegt für HR und BR trotz der versetzten Helices in nahezu gleicher Position und ist über eine Wasserstoffbrücke mit D238/212 (Helix F) verbunden. In Helix C kommen drei an der Bindungstasche beteiligte Aminosäuren (R108/82, W112/86, T116/90) hinzu. Bis auf R108/82, deren Seitenketten-



orientierungen sich in HR und BR nur geringfügig unterscheiden, liegen alle diese Reste in nahezu identischer Position. T116/90 und R108/82 stabilisieren die Struktur über Wasserstoffbrückenbindungen zu Helix G und D. Für das Threonin ist dies der Kontakt zu D141/115 (Helix D), der sich im Übergang zum L-Intermediat noch verstärkt (siehe auch 4.8.1). Die wichtige Rolle von D141 zeigt sich unmittelbar bei Austausch dieses Restes gegen Glycin. Der Verlust der Wasserstoffbrückenbindung führt zu einer Blauverschiebung des Absorptionsmaximums von HR um 20 nm. G148/122, nimmt in beiden Retinalproteinen eine nahezu identische Position ein und steht im VdW-Kontakt zum Ionon-Ring (4,1 Å). Für die vier konservierten Aminosäuren in Helix F sind die Positionen der Seitenketten in HR und BR ebenso wie für den Chromophor sehr ähnlich. Jede diese Aminosäuren steht im VdW-Kontakt zum Retinal. In Helix G komplementieren D238/212 und das retinalbindende Lysin K242/216 die Reihe der Bindungstaschen-Reste. D238/212 bilden unmittelbar oder vermittelt über Wassermoleküle Kontakte mit den Helices B, C und F, was die Relevanz dieser Aminosäure noch unterstreicht. Ein Austausch der Asparaginsäure verhindert die Expression von Haloopsin oder hat die Denaturierung des Proteins während der Belichtung zur Folge (H. Besir, persönliche Mitteilung).

Element	Position in HR (Summe)	Identität HR/BR	Identität HR/BR/SR's
Helix A	27-50 (23)	1	-
Schleife AB	51-58 (8)	-	-
Helix B	59-82 (23)	2	1
Schleife BC	83-106 (24)	1	-
Helix C	107-127 (21)	8	5
Schleife CD	128-130 (3)	-	-
Helix D	131-151 (23)	4	1
Schleife DE	152-158 (5)	-	-
Helix E	159-189 (31)	4	1
Schleife EF	190-192 (3)	-	-
Helix F	193-216 (24)	6	5
Schleife FG	217-226 (10)	3	1
Helix G	227-253 (27)	6	2

Tabelle 6: Zusammenfassung der konservierten Aminosäuren archaealer Retinalproteine. Spalte zwei gibt die Helixbegrenzungen und Längen der Sekundärstrukturelemente an; Nomenklatur gemäß HR. In den beiden folgenden Spalten sind die konservierten Aminosäuren im Vergleich von HR und BR (Spalte drei) und im Vergleich aller archaealer Retinalproteine quantifiziert (Spalte vier)

Lediglich in den beiden Ionenpumpen konserviert und an der Bindungstasche beteiligt sind darüberhinaus noch D141/115, M144/118 und S168/141. Bei allen drei Aminosäuren nehmen



die Seitenketten nahezu die gleiche Orientierung und Position ein. Von D141/115 wurde oben bemerkt, daß es eine Wasserstoffbrückenbindung zu Helix C eingeht. Das eine Helixwindung folgende M144/118 weist mit dem Schwefelatom zum Ionon-Ring (4,1 Å) und kommt als putatives Nukleophil<sup>[161]</sup> für die thermische Reiseromerisierung des 13-cis Retinals in Betracht.

Weitere drei konservierte Reste, die nicht unmittelbar an der Bindungstasche beteiligt sind,

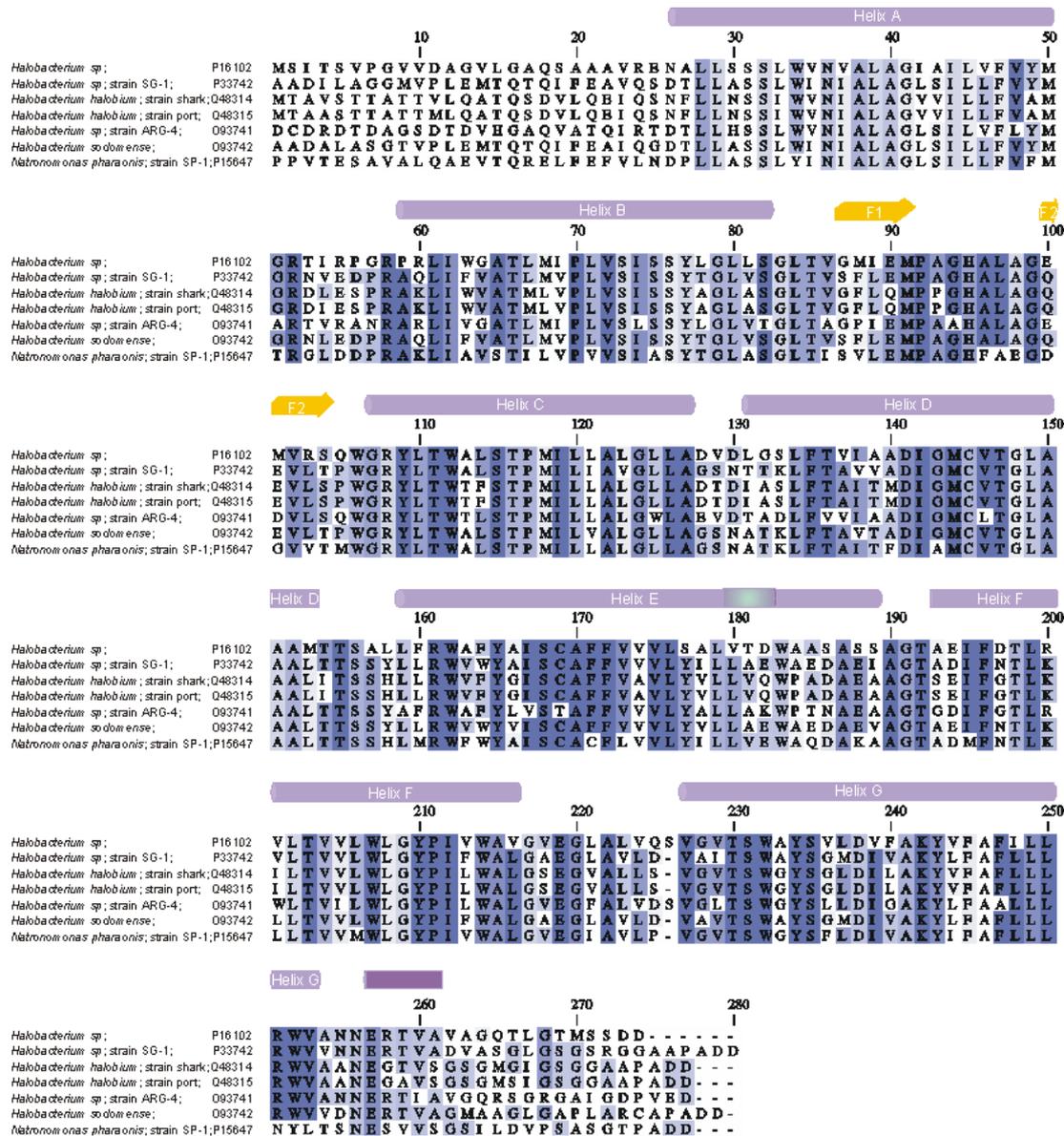


Abb. 54: Sequenzalignment der bis dato deponierten (Datenbank TREMBL) HR Primärstrukturen. P16102 entspricht der HR-Sequenz aus *Halobacterium Salinarum*. Der Konservierungsgrad nimmt mit der Blaufärbung zu. Die folgenden Aminosäuren wurden zur Vereinfachung an den Aminotermini weggelassen: MIETA (P33742), MRSRTY HDQSVCGPYGSQRT(O93741), MMET (O93742) und MTETL (P15647); außerdem wurde das Segment SSVMLGGEEV zwischen Position G99 and D100 in P15647 ausgelassen. (blosum matrix, gap extension 0.05, gap distance 0.05, pairgap 0.05)



scheinen strukturelle und/oder funktionelle Aufgaben in den Retinalproteinen zu übernehmen. Dies sind P117/91, das die Helixdeformation in Helix C einleitet, und zwei Leucine (L175/142 und L199/174) deren Seitenketten in beiden Ionenpumpen die gleiche Orientierung einnehmen. Der Austausch von P117 gegen Alanin verschiebt die Chloridbindung zu deutlich höheren Werten ( $K_{M,Cl^-} > 2 M$ )<sup>[162]</sup>. L175/142 ist an einer hydrophoben Region auf der cp-Seite beteiligt und steht im VdW-Kontakt zu Helix F (R200/175), während die Seitenkette von L199/174 zu Helix G zeigt.

Engt man diese Betrachtung auf alle bisher isolierten HR's und BR's ein, kommen in Helix A ein Phenylalanin (F47 bzw. F27) und in Helix B ein Threonin (T66/46) hinzu. Das Phenylalanin steht mit Helix G in Van der Waals-Kontakt und obwohl die Helices A in diesem Bereich nicht deckungsgleich sind, liegen die aromatischen Ringsysteme in HR und BR in nahezu identischer Position. Das Threonin in Helix B steht ebenfalls im Van der Waals-Kontakt zu F47/27

Ab Helix C steigt der Konservierungsgrad wiederum deutlich an und insgesamt drei hydrophobe Leucine können in HR und BR in diesem Bereich gefunden werden. Alle drei Leucine liegen auf der zytoplasmatischen Halbseite jeweils fast eine Helixwindung voneinander versetzt. L120/94 und L123/97 nehmen in beiden Strukturen die nahezu identische Orientierung ein und stehen entweder mit den Helices D und E (L120/94) oder Helix F im Van der Waals-Kontakt.

In der darauffolgenden Helix E wird wiederum ein Leucin gefunden (L176/149), dessen Seitenketten im Vergleich HR/BR zwar um ca. 90° zueinander verdreht sind, das aber interessanterweise eine Windung unterhalb der  $\pi$ -bulge dieser Helix (HR) bzw. des Helixknicks (BR) liegt. Am Beginn dieser Helix findet sich ein Arginin (R161/134), das in HR und BR eine Wasserstoffbrückenbindung zu Q219/194 (ebenfalls in beiden Ionenpumpen konserviert) im Schleifenbereich FG bildet. Genau diese Region wird in BR mit der Abgabe des Protons in Zusammenhang gebracht. In HR ist dieser Bereich großflächig von der BC-Schleife verdeckt und deshalb die Chloridaufnahme sehr wahrscheinlich mit einer anderen extrazellulären Region verknüpft.

Es wurde bereits die Seitenkettenorientierung eines Leucins im Zusammenhang mit der  $\pi$ -bulge in Helix E diskutiert. In Helix F tritt ein in Sequenz und Orientierung ebenfalls konserviertes Phenylalanin auf (F196/171), dessen Ring unterhalb der EF Schleife ebenfalls im VdW-Kontakt mit an der  $\pi$ -bulge beteiligten Resten steht.

In der Helix G ist mit dem Auftreten der zweiten  $\pi$ -bulge das, mit Ausnahme von SRII konservierte A241/215, verbunden, das in HR und BR die gleiche Position einnimmt. Die weiteren hydrophoben Aminosäuren F245/219, L249/223 und L250/224 nehmen in den beiden Ionenpumpen ähnliche Orientierungen ein. Zusammen mit L199/174, F47/27 und T66/46 bilden diese Reste eine Art „hydrophoben Verschluß“ auf der zytoplasmatischen Halbseite der Proteine nahe der Proteinoberfläche. Durch diese hydrophobe Umgebung ist die



Hydroxylgruppe von T66/46 in Richtung der Helices EFG (putativer Ionentransportweg) gerichtet.

Die bisher sequenzierten Haloopsine (siehe Abb. 54) umfassen 112 konservierte Aminosäuren, was 41% der insgesamt 274 Reste (HR aus *H. salinarum*, Stamm D2) entspricht. Tabelle 7 faßt die Konservierungsgrade und Homologien der Halorhodopsine, gegliedert nach Sekundärstrukturelementen, nochmals zusammen.

Strukturelement	Position	Identität	Ähnlichkeit
Helix A	27-50 (24)	13(0.54)	20(0.83)
Schleife AB	51-58 (8)	2(0.25)	3(0.38)
Helix B	59-82 (24)	11(0.46)	17(0.71)
<i>Schleife BC</i>	83-106(23)	9(0.39)	14(0.61)
Faltblatt1	87-91(5)	1(0.2)	3(0.6)
Faltblatt2	100-104(5)	1(0.2)	3(0.6)
Helix C	107-127(21)	16(0.76)	18(0.86)
<i>Schleife CD</i>	128-130(3)	0(0.0)	0(0.0)
Helix D	131-153(23)	12(0.52)	16(0.70)
<i>Schleife DE</i>	154-158(5)	2(0.4)	2(0.4)
Helix E	159-189(31)	11(0.35)	20(0.65)
<i>Schleife EF</i>	190-192(3)	3(1.0)	3(1.0)
Helix F	193-216(24)	13(0.54)	16(0.67)
<i>Schleife FG</i>	217-226(10)	4(0.4)	6(0.6)
Helix G	227-253(27)	14(0.52)	22(0.81)
<i>Schleife GG'</i>	254-256(3)	1(0.3)	1(0.3)
Helix G'	257-261(5)	1(0.20)	2(0.4)
Summe	234	112 (0.48)	160 (0.68)

Tabelle 7: Liste der Sekundärstrukturelemente in HR und BR, In Spalte 2 sind die Aminosäurepositionen von HR (Anzahl beteiligter Reste) angegeben. Die Spalten 3 und 4 geben jeweils die Anzahl in beiden Ionenpumpen identischer bzw. ähnlicher Aminosäuren an. Dies entspricht einer konservativen Mutation, bei der die Ladung unverändert bleibt oder ein ähnlich hydrophober Charakter im eingeführten Rest vorliegt. In Klammern ist der Anteil am jeweiligen Segment aufgeführt. Die Schleifenbereiche sind zur Verdeutlichung kursiv geschrieben.



## 5.6. Die Chloridbindungsstelle

Über die RSA konnte ein Chloridion auf der extrazellulären Halbseite von HR in Chromophornähe identifiziert werden. Da die Kristallisation in Gegenwart von 3,5 M KCl erfolgt, sollten alle potentiellen Halid-Bindungsstellen mit Affinitäten im mM-Bereich gesättigt sein. Deshalb ist davon auszugehen, daß das identifizierte Substratanion die einzige Halid-Bindungsstelle im unbelichteten Zustand von HR besetzt. In Abb. 55 ist die Chloridbindungsstelle (CBS) schematisch für den Zustand des unbelichteten HR dargestellt. Das Ion selber befindet sich etwa 18 Å unterhalb der extrazellulären (Abstand zu R103) bzw. 29 Å entfernt von der zytoplasmatischen Membranoberfläche (Abstand zu T259) in einer Entfernung von 3,8 Å von der protonierten Schiff Base (PSB). In seiner unmittelbaren Umgebung befinden sich drei Wassermoleküle und neun Aminosäuren. In wäßriger Lösung hingegen sind Halidionen mit 3,2 Å Abstand von sechs Wassermolekülen umgeben<sup>[163]</sup>. Folglich hat im Laufe der Chloridaufnahme eine partielle Dehydratisierung des Anions stattgefunden. Der Bereich, in dem die Dehydratisierung abläuft, kann aus der Struktur nicht direkt entnommen werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß dieser Prozeß beim Eintritt in das Protein, an der Grenzfläche zum umgebenden Medium abläuft (siehe Abschnitt 5.8).

Rest	HR	BR	SRI	SRII
S73	+	+ (Ala)	+ (Ala)	+ (Ala)
S76	+	~	+	+ (Ala)
Y77	+	+	+	+
R108	+	+	+	+
T111	+	+ (Asp)	+ (Asp)	+ (Asp)
W112	+	+	+	+
S115	+	+ (Thr)	+ (Thr)	+ (Thr)
Y210	+	+	+	+
D238	+	+	+	+

Tabelle 8: Liste der chloridumgebenden Aminosäuren in HR. Konservierte Reste sind mit einem + gekennzeichnet. In BR, SRI oder SRII ausgetauschte und ebenfalls konservierte Aminosäuren sind in Klammern angegeben. Nicht konservierte Reste sind mit einem ~ markiert.

Die neun Aminosäuren in unmittelbarer Umgebung des Chlorids sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Jede der neun Aminosäuren ist in den bekannten HR's konserviert, was die funktionelle Relevanz dieser Reste bestätigt.

Serin 115 (S115) ist die einzige Aminosäure, die eine gerichtete Bindung zum Chloridion eingeht (3.1 Å). Diese Aminosäure ist Teil von Helix C und liegt am Übergang der 3<sub>10</sub>-



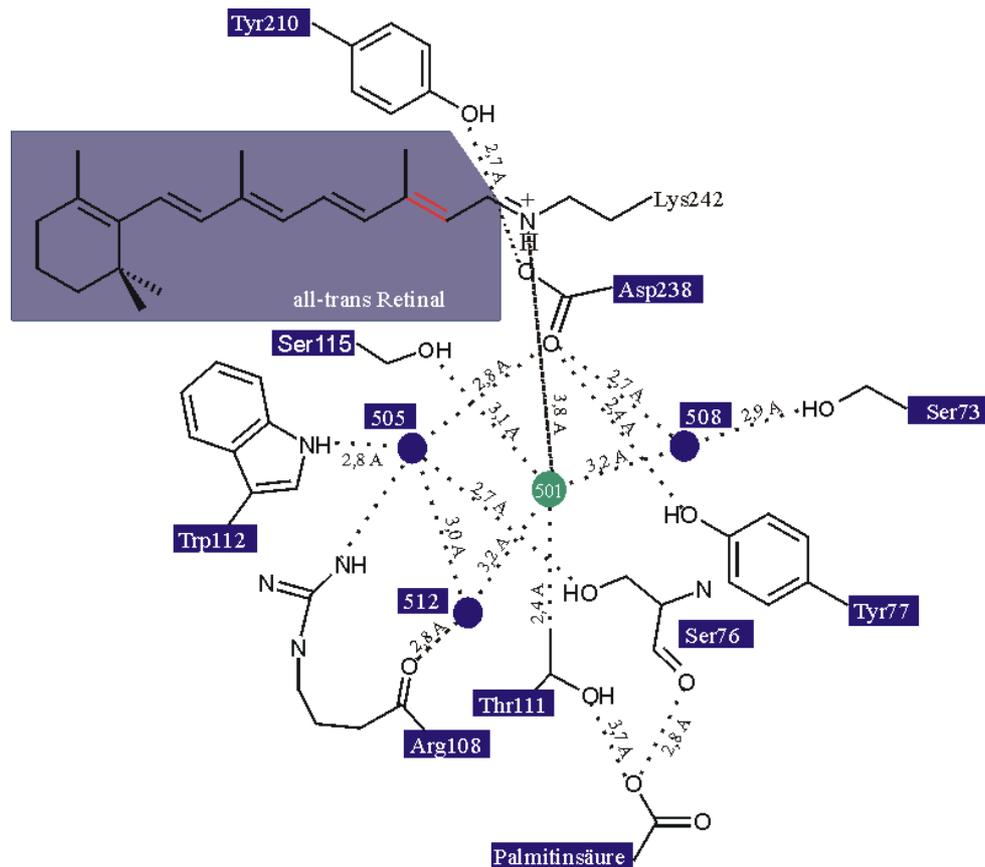


Abb. 55: Schematische Darstellung der Chloridbindungsstelle (CBS) im unbelichteten HR. Die beteiligten Aminosäuren sind als Strichformeln, die Wassermoleküle als blaue Kreise dargestellt. Das Chloridion (501) ist grün unterlegt.

Helixregion zur  $\alpha$ -Helix (siehe Abschnitt „Konservierte Aminosäuren archaealer Retinalproteine“). Relativ zum Retinal betrachtet liegt S115 am Beginn der zytoplasmatischen Halbseite von HR. Dies und die Tatsache, daß es sich um die einzige erkennbare Wasserstoffbrücke des Substrates zu einer Aminosäure handelt, legt die Vermutung nahe, daß die bewegliche Hydroxymethylseitenkette, das Anion zumindest einige Ångström auf seinem Transport von der extrazellulären zur zytoplasmatischen Seite im Verlauf des Transportzyklus begleitet.

Das Chloridion selbst ist direkt an zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu Wasser 508 (3,1 Å) und zu Wasser 512 (3,2 Å) beteiligt. Eine ähnliche Bindung zur PSB ist im all-trans-Zustand mit einer Entfernung von 3,8 Å nicht möglich und auch die relative Orientierung des NH-Bindungsvektors der PSB spricht dagegen ( $\text{Winkel}_{\text{N-H,Cl}} = 105^\circ$ ). Die hier vorgestellte Struktur korreliert mit FTIR-Daten an HR, die eine geringe Distanz von PSB und Anion vorhersagen<sup>[164]</sup>. Ein deutlicher Unterschied zu früheren Modellen der Chloridbindung ist hinsichtlich der beteiligten Aminosäuren R108 und T111 festzustellen.

Arginin 108 ist nicht, wie bisher angenommen, ein direkter Ligand des Chloridions, sondern ist, vermittelt über ein Wassermolekül (Wat512), an der Substratbindung beteiligt. Insgesamt



zwei der drei chloridumgebenden Wassermoleküle (Wat505 und Wat512) werden von R108 über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Wasser 505 ist an die Amidgruppe des Proteinrückgrats gebunden, während Wasser 512 an die Guanidinogruppe des Arginins koordiniert. Eine direkte Wechselwirkung zwischen dieser Gruppe und dem Chloridion ist mit einem Abstand von 7,4 Å, zumindest im unbelichteten Zustand von HR, nicht möglich. Analog zu Wasser 505 in HR liegt in ähnlicher Position in BR (Wat406) ein Wassermolekül, das allerdings an die Guanidinogruppe gebunden ist (siehe Abschnitt 5.3). Die Funktion dieses in beiden Ionenpumpen mehrfach koordinierten Wassers, das keine Wasserstoffbrückenbindung zum Chloridion eingeht, könnte demnach auch in einer Stabilisierung der Retinalbindungstasche liegen. Diese Annahme wird durch die Strukturdaten des K-Intermediates von BR gestützt, für die dieses Wassermolekül auch nach der Isomerisierung des Chromophors die gleiche Position einnimmt<sup>[136]</sup>.

Im Unterschied dazu scheint für zwei weitere Wassermoleküle eine Lageänderung im Verlauf der PSB-Isomerisierung zu erfolgen. Die von Rüdiger<sup>[130]</sup> gemachten Beobachtungen an HR, wonach ein Austausch von R108 gegen neutrale Aminosäuren zum Verlust der Chloridbindung und der Transportaktivität führt, ist der komplexen Funktion (Ladung, Wasserstoffbrücken) dieses Restes zu entnehmen. Die Guanidinogruppe bildet, neben den oben erwähnten Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken zu Serin 231 und Serin 235 (beide konserviert in HR) sowie zum Sauerstoff vom Q105 nahe der extrazellulären Oberfläche des Proteins. Auch der Austausch der Guanidinogruppe gegen eine Amidfunktion (R108Q) führt zu einem vollständigen Verlust der HR Transportaktivität. Rüdiger *et al.* (1995)<sup>[165]</sup> zeigten, daß sich die Wildtyp-Eigenschaften dieser Punktmutante durch die nachträgliche Zugabe von Guanidiniumsalzen rekonstituieren lassen. In Gegenwart von Guanidinium erlangt die Mutante R108Q Bindungsaffinitäten und Photozykluseigenschaften des HR-Wildtyps zurück. Strukturdaten und die damalige Interpretation der Rekonstitutionsversuche führen zu dem gleichen Schluß, daß die Guanidinogruppe eine zentrale Rolle in der Chloridbindung und wahrscheinlich auch in Teilen dessen Transportes eine wichtige Rolle spielt.

T111 interagiert entgegen der bisherigen Annahme nicht über die Hydroxyl-Gruppe der Seitenkette mit dem Chloridion sondern steht mit seiner Methylgruppe im VdW-Kontakt zu diesem. Obwohl diese hydrophoben Wechselwirkungen schwächer und unspezifischer sind als die angenommene Wasserstoffbrücke, so erfolgen sie doch über einen großen Teil der Chloridoberfläche (siehe Abb. 26).

Die Annahme einer Wasserstoffbrückenbindung zum Substrat stützte sich primär auf Mutagenesestudien, bei denen ein Valin oder Methionin an Stelle von T111 eingeführt wurde<sup>[130][162]</sup>. Infolge eines solchen Austausches kommt es zu einer Verzögerung des L-Zerfalls. Der Einfluß dieser Punktmutationen kann auf zweierlei Weise gedeutet werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, daß der Hydroxylgruppe in späteren Photozyklusintermediaten eine noch unbekannte Rolle zukommt. Zum anderen könnte die Wasserstoffbrücke die Palmitin-



säure und darüber ferner das Trimer stabilisieren und so für eine optimalen Ausrichtung der Methylgruppe notwendig sein. Die Hydroxygruppe von T111 ist 2,8 Å entfernt von der Carboxylfunktion der PS. Ein Einfluß gebundener PS auf die photochemischen Eigenschaften von HR konnte schon gezeigt werden<sup>[143]</sup>.

Ingesamt 15 Wasserstoffe, 10 davon aliphatisch, bilden zusammen mit zwei Stickstoffen und einem Sauerstoff eine unregelmäßig angeordnete erste Atomlage um das Ion. Die Affinität der CBS ist also nicht auf eine definierte Anordnung weniger Aminosäuren zurückzuführen, sondern basiert auf einer überwiegend hydrophoben Stabilisierung durch die aliphatischen Wasserstoffe weiterer Reste (Valin 72, Serin 73, Serin 76, Tyrosin 77, Tryptophan 112) aus Tabelle 8. Hinzu kommen die Nähe der PSB, und von R108 die das negativ geladene Chloridion zusätzlich elektrostatisch stabilisieren. Die Nähe des Substrats zur PSB im all-trans Zustand deutet an, daß die lichtinduzierte Isomerisierung unmittelbar zur energetischen Destabilisierung des Anions, und zwar über elektrostatische und eventuell auch sterische Wechselwirkungen führt. Demnach können selbst kleine Veränderungen der CBS – hervorgerufen durch die Isomerisierung nach 13-cis - ausreichen, um genügend potentielle Energie im System zu speichern, so daß in nachfolgenden Photozyklusschritten das Substrat entgegen dem Membranpotential ins Zellinnere transportiert wird.

In 5,6 Å Abstand zum Substrat liegt das deprotonierte D238. Beide bilden zusammen mit R108 ein komplexes Gegenion zur positiv geladenen PSB. Diese Situation ist in BR ähnlich, wo das in gleicher Lage zum Chlorid stehende D85 mit D212 und R82 das komplexe Gegenion der PSB bilden. Ein vergleichbares Arrangement ist für die rot- und grün-absorbierenden Sehpigmente bei Vertebraten von Kleinschmidt *et al.* (1992)<sup>[166]</sup> vorgeschlagen worden. Diese Klasse von Chromoproteinen (siehe auch 3) zeigt eine deutlich Abhängigkeit des Absorptionsmaximums (bis zu 55 nm Verschiebung) von der Halidionkonzentration. Es besteht deshalb die Möglichkeit, daß diese Sehpigmente ähnlich wie HR Chloridionen in Nähe der PSB binden und mit deren Hilfe das Absorptionsmaximum regulieren.

### 5.6.1. Selektivität versus Spezifität

Halobakterien wachsen in Gegenwart hoher Chloridionkonzentrationen. Wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben, ermöglicht HR den Transport von Chloridionen unter Nutzung von Lichtenergie. Es konnte gezeigt werden, daß andere Halogenidionen (Bromid und Jodid) als auch Nitrationen von HR transportiert werden. Die Affinität der Substratbindungsstelle liegt für Halide (mit Ausnahme des kompetitiven Inhibitors Fluorid) im Bereich von 10-40 mM, d. h., es gibt in dieser Hinsicht keine großen Affinitätsunterschiede. Mittels FTIR-Spektroskopie wurde mehrmals durch verschiedene Gruppen bewiesen, daß alle Halidionen im unbelichteten Zustand (hR) an die gleiche Bindungsstelle binden. Somit ist die hier dargestellte CBS repräsentativ für alle Halidionen und die Bindung erfolgt in HR selektiv für diese Ionen.



Halorhodopsin ist also ein spezifischer lichtgetriebener Transporter für Halidionen. Berücksichtigt man den unregelmäßigen und hydrophoben Aufbau, der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren, werden beide Eigenschaften verständlich. Die hydrophobe Umgebung durch die beteiligten Methylen- und Methylgruppen ist in der Lage die stark polarisierbaren Halidionen zu stabilisieren. Die unsymmetrische Anordnung der Liganden toleriert darüber hinaus Anionen verschiedenen Durchmessers. ( $\text{Cl}^-$ : 1,81  $\text{Br}^-$ : 1,96  $\text{I}^-$ : 2,20)<sup>[167]</sup>. Unter den gegebenen Wachstumsbedingungen halophiler Archaea (> 4 M Chlorid) sollte weder eine Spezialisierung auf hohe Substrataffinitäten noch eine Spezifität für Chloridionen notwendig sein.

### 5.6.2. Der Palmitinsäure-Protein-Komplex

Palmitinsäure (PS) tritt im Verhältnis 1:1 mit HR auf. In Abb. 56 ist ein Palmitatmolekül mit samt der umgebenden Aminosäuren dargestellt. Die Zuordnung des Palmitinsäure basiert auf der Elektronendichte, sowie auf dem Nachweis, das dieses Lipid mit HR gereinigt wird<sup>[143][168]</sup>. Die Elektronendichte in der

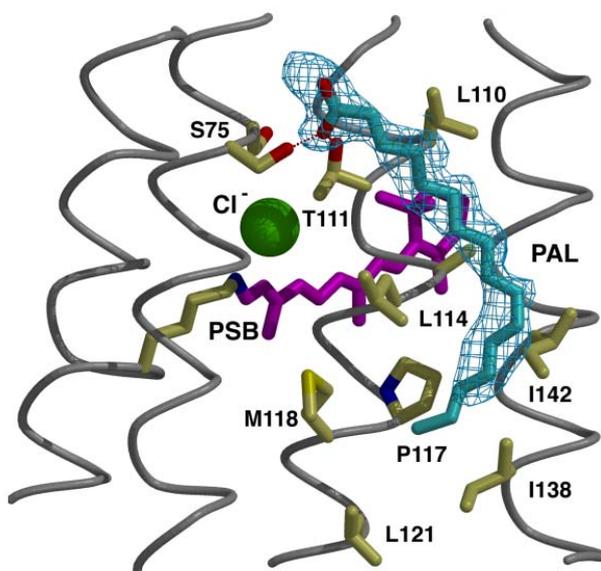


Abb. 56: Darstellung der Elektronendichte ( $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ ;  $0,8 \sigma$ ) und des Modells (Stabmodell, türkis) der Palmitinsäure. Im VdW-Kontakt befindliche oder über Wasserstoffbrücken gebundene Aminosäuren sowie das Retinal sind als Stabmodelle hervorgehoben.

Nähe der CBS ist eingebettet zwischen zwei aneinander liegenden Monomeren im Zentrum des Trimers. Auf Grund des kontinuierlichen schlauchförmigen Verlaufes können die typischen Haloarchaea-Lipide mit ihren verzweigten Alkylseitenketten (Archaeol) ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus ist es nach der chromatographischen Reinigung von HR nicht mehr möglich Archaeol-haltige Lipide mittels MALDI-TOF-Spektroskopie nachzuweisen. Ebenfalls erfolglos verläuft der Nachweis in HR-Kristallen, die, falls vorhanden, diese Lipide in stark angereicherter Form enthalten sollten. Ein entsprechender Nachweis archaealer Lipide ist für die BR-Kristallisation auf allen Stufen der Reinigung und an isolierten Kristallisation eindeutig zu erbringen (siehe Abschnitt 4.9).



Die Identifizierung der PS mittels MALDI-TOF ist nicht möglich, da der zu erwartende Molekülpeak in den Massenbereich der verwendeten Matrizen fällt. Dennoch sprechen Form und Länge der Elektronendichte für den PS-Einbau. Gemessen an den Glycerolkopfgruppen der Monooleinsäure befindet sich die Carboxylgruppe des Lipids etwa 10 Å unterhalb der potentiellen Membrangrenze. Darüberhinaus sind alle mit der PS in Kontakt stehenden Aminosäuren in HR konserviert. Speziell die Carboxylgruppe der PS bildet zwei Wasserstoffbrückenbindungen (S75 und T111, je 2,8 Å Distanz). Die damit verbundene räumliche Nähe zur PSB und CBS würde den Einfluß der PS auf das Absorptionsmaximum sowie nachgewiesene Veränderungen in der Photozykluskinetik erklären<sup>[169]</sup>.

### 5.7. Transportmodell der archaealen Ionenpumpen HR und BR

Wie in Abschnitt 5.5 gezeigt, weisen die beiden Ionenpumpen HR und BR über 234 Aminosäuren eine Sequenzhomologie von 48 % auf. Bei Ausdehnung dieses Vergleichs auf die Tertiärstrukturen beider Ionenpumpen ergeben sich grundlegende strukturelle Ähnlichkeiten (Abschnitt 5.4). Im unbelichteten Zustand können die membranständigen Bereiche beider Proteine mit geringer Abweichung zur Deckung gebracht werden. Gleiches gilt für die Überlagerung von Chromophor, konservierten Aminosäuren und einigen Heteroatomen in HR und BR (siehe Abb. 53).

Die Kavitäten im Transmembranbereich sind in den unbelichteten Proteinen fast ausschließlich auf der extrazellulären Halbseite zu finden. Ein ausreichendes Volumen für Wassermoleküle bzw. Chloridionen auf der zytoplasmatischen Halbseite ist nur nahe der  $\pi$ -Bulge in Helix G vorhanden. Ansonsten ist diese Halbseite in beiden Retinalproteinen insofern "verschlossen", als keine Anionen oder Wassermoleküle ohne Änderung der Proteinkonformation von oder zur zytoplasmatischen Oberfläche gelangen können. Das komplexe Gegenion der positiv geladenen PSB, bestehend aus R108/82, D238/212 und einem Chloridion bzw. D85, ist hinsichtlich Ladungsverteilung und Aufbau ebenfalls in HR/BR konserviert (siehe Abb. 51). Die PSB sowie die beteiligten Aminosäuren haben die gleiche relative Orientierung zueinander, während das Chloridion in HR mit einem Sauerstoffatom der Carboxylgruppe (OD1) von D85 zur Deckung kommt. Diese Ähnlichkeit wird nochmals bestätigt, wenn man berücksichtigt, daß der Austausch von D85 durch ein Threonin (D85T) BR in einen einwärts gerichteten Chloridtransporter überführt<sup>[170][171]</sup>. Eine einfache Punktmutation in BR ist also ausreichend, sowohl die Ionenspezifität als auch die Vektorialität des Ionentransports von HR zu erlangen. Weitere Ähnlichkeiten hinsichtlich der identifizierten Wassermoleküle und Helixdeformationen in beiden Ionenpumpen wurden bereits an anderer Stelle diskutiert (siehe Abschnitt 5.3). Aus diesem Grunde ist es sinnvoll, die mechanistischen Grundlagen für den gerichteten Ionentransport im Kontext von HR und BR zu betrachten. Die gleichen Gründe wurden



bereits an anderer Stelle (siehe Abschnitt 5.3) für die Betrachtung der zu erwartenden Konformationsänderungen in HR und BR angeführt.

Die Bildung des K-Intermediates ist in BR und HR mit einer Richtungsänderung des N->H-Vektors der PSB verbunden. Im Verlauf dieser photochemisch induzierten Änderung des

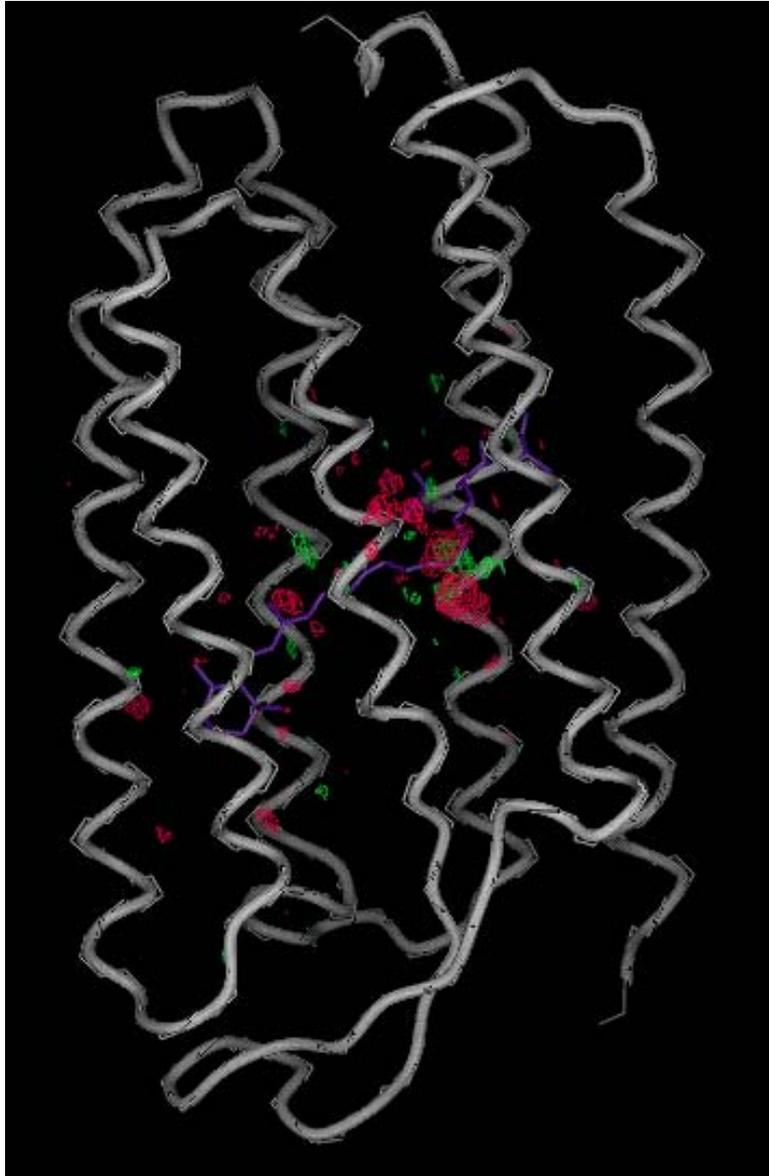


Abb. 57: HR-Bändermodell mit negativer (rot) und positiver (blau) Differenz-Elektronendichte (hR-K) konturiert bei  $3,3 \sigma$ . Retinal und K242 sind als Stabmodell hervorgehoben.

Dipolmoments von all-trans nach 13-cis, 15-anti verändert sich die Richtung des Bindungsvektors von zp nach ez. Edman *et al.* (1999)<sup>[136]</sup> konnten zeigen, daß die Bildung dieses Intermediates in BR keine weiteren signifikanten Veränderungen der Proteinstruktur zur Folge hat. Für HR ergibt die vorläufige Analyse der Differenzelektrorendichte zwischen K-Intermediat und Grundzustand (hR) ebenfalls nur geringe Änderungen, die ausschließlich am Chromophor und in dessen nächster Umgebung erfolgen (Abb. 57). Die während dieser endergonischen Reaktion aufgenommene Energie dissipiert demnach nicht, sondern wird ausschließlich zur Retinalisomerisierung und zur Überwindung elektrostatischer Anziehungskräfte eingesetzt. Letzteres wird für HR und BR

bei Berücksichtigung des komplexen Gegenions deutlich. Nach der Isomerisierung werden die beiden negativ geladenen Gruppen Chlorid bzw. D85 und D238 bzw. D212 nicht mehr durch den positiv polarisierten Wasserstoff der PSB stabilisiert. Die Bildung des rotverschobenen Folgeintermediates, genannt  $L_1$  ( $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$ ), ist mit einer Stärkung der Interaktion von Substrat und Chromophor in HR verbunden. Braiman *et al.* (1994)<sup>[172]</sup> konnten zeigen,



daß die beobachteten FTIR-Differenzbanden von PSB und R108 gleichbedeutend mit einer Schwächung der Wechselwirkung von Chlorid und R108 bzw. einer Stärkung zur PSB sind. Unter Berücksichtigung der 3-D Struktur läßt sich diese stärkere Wechselwirkung von Substrat und PSB als gerichtete Bewegung des Chloridions auf die zytoplasmatische Halbseite, entlang des N-H-Dipolvektors, deuten. Mindestens zwei Beobachtungen untermauern diese Theorie. So führt die Deprotonierung der PSB in HR und somit der Ladungsverlust, zum vollständigen Verlust der Pumpaktivität. Zum anderen hat die thermische Isomerisierung (Dunkeladaptation) der PSB zum (13-cis, 15-syn)- Konformer keinen Transport zur Folge (Abb. 58). Tatsächlich konnte mit verschiedenen Methoden gezeigt werden, daß die  $L_1$ -Bildung mit der

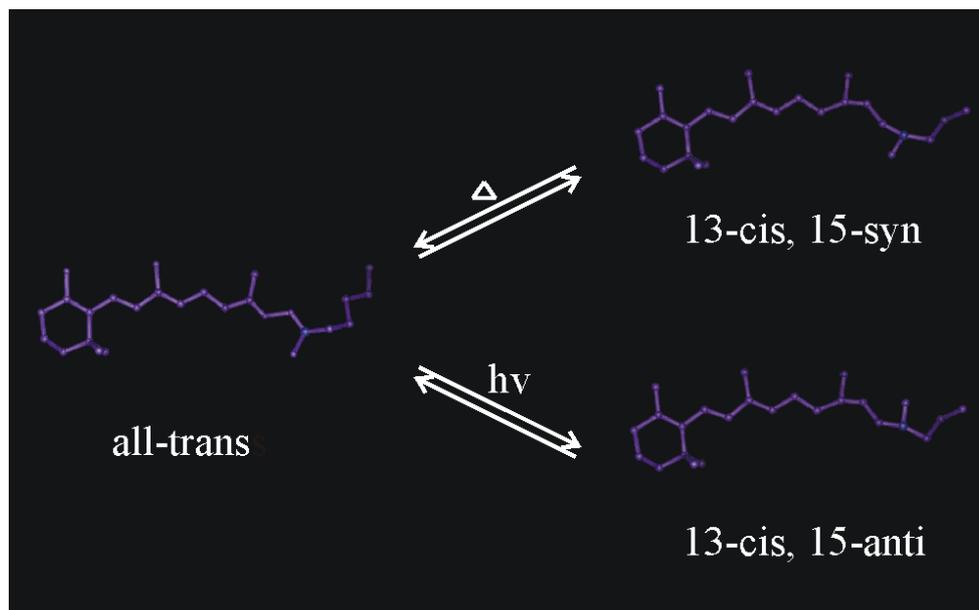


Abb. 58: Die möglichen Konstitutionsisomere des Retinals in archaealen Rhodopsinen; das obere Gleichgewicht entspricht dem thermischen Gleichgewicht bei Lichtabwesenheit (Dunkeladaptation), der untere Reaktionsweg entspricht dem lichtinduzierten Übergang von hR nach K

Chloridkonzentration im Medium korreliert <sup>[173]</sup> (J. Heberle, persönliche Mitteilung). Demnach erfolgt die Entstehung des  $L_1$ -Intermediates chloridabhängig, wie im Modell angenommen.

Die Bindungsstelle des Substrates im  $L_1$ -Intermediat ( $M_1$  in BR) läßt sich auf Grund fehlender RSA nicht eindeutig belegen. Es ist jedoch sinnvoll anzunehmen, daß sich das Anion im  $L_1$ -Intermediat in der zytoplasmatischen Kavität nahe A241 -diese Aminosäure ist in BR, HR und SR1 konserviert-, T203, W207 und dem einzigen zytoplasmatischen Wasser (Wat506) befindet. Dafür spricht ebenfalls der Konservierungsgrad dieses Threonins, dessen Austausch gegen Valin oder Methionin eine 10 bis 100-fache Verzögerung des L-Zerfalls bewirkt<sup>[140]</sup>. Außerdem liegt dieser Bereich in der Nähe der PSB, was den Ergebnissen von FTIR-Studien entspricht, die eine Bindung des Chlorids in Nähe zur PSB schlußfolgerten.



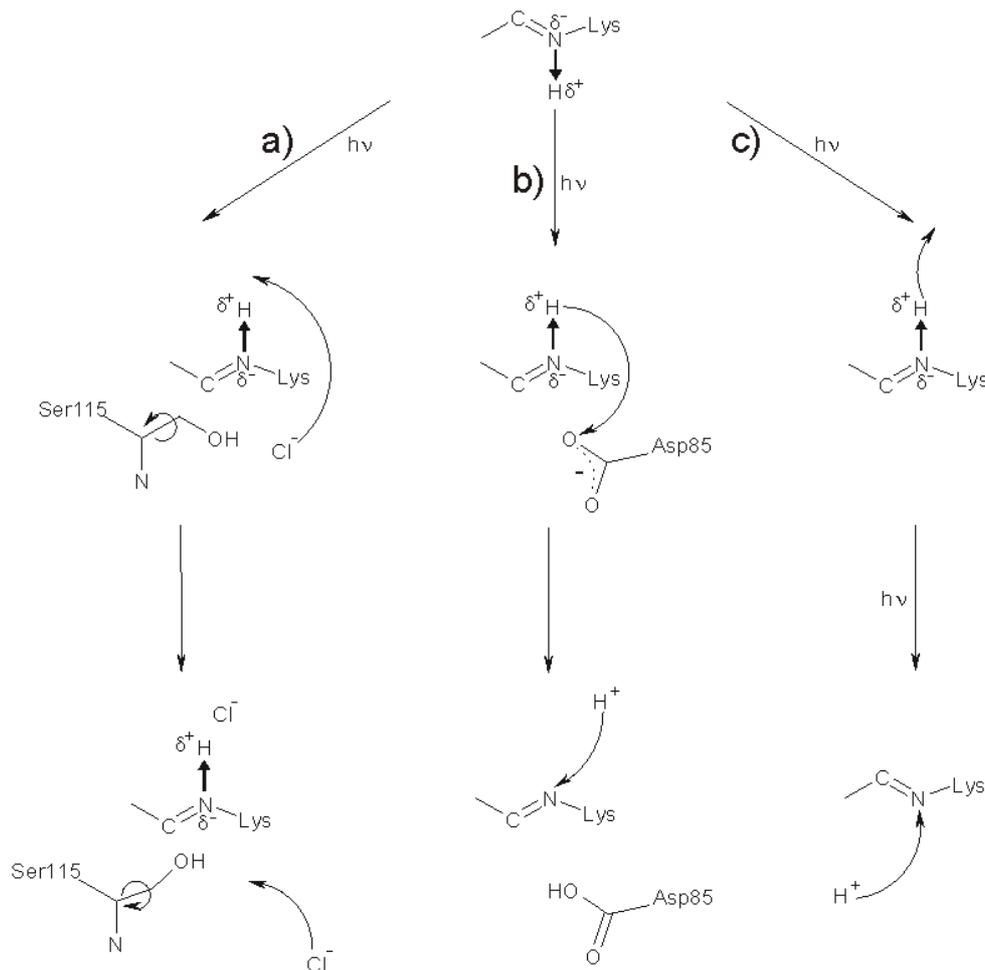


Abb. 59: Transportmoden archaerischer Ionenpumpen: a) Chloridtransport in HR und BR-D85T, b) Protonentransport in BR, c) Protonentransport in HR und BR-D85T bei Abwesenheit von Chloridionen (nähere Erläuterungen siehe Text)

Vorangegangene Mutagenesestudien der Aminosäuren in diesem Bereich ergaben nur für T203 signifikante Änderungen des Chloridtransportes (Pumprate 5 % des Wildtyps) und der Kinetik der L-Zerfalls<sup>[174]</sup>. Die Migration des Anions entlang des Dipolvektors könnte, zumindest partiell, von S115 oberhalb des Retinals in Helix C gelegen, begleitet werden. Diese Aminosäure ist konserviert und könnte durch mögliche Seitenkettenrotation die Bewegung des Anions begleiten und dieses stabilisieren.

Demnach sind Chlorid- bzw. Protonentransport in HR und BR sehr ähnliche Prozesse. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede des Ionentransportes sollen deshalb nachfolgend nochmals zusammengefaßt werden.

In Abb. 59 ist ein vereinfachtes Transportmodell für HR (Teilabbildung a und c), BR (Teilabbildung b) und die BR Mutante D85T (Teilabbildung a) wiedergegeben. Es seien im Folgen-



den nur die PSB und substratbindende Aminosäuren ohne Berücksichtigung der röntgenographisch identifizierten Wassermoleküle betrachtet.

Im unbelichteten Zustand ist die PSB zur extrazellulären Seite ausgerichtet. In hR (Teilabbildung a) bildet das zu transportierende Anion ein Ionenpaar mit der positiv geladenen Schiff Base zusätzlich koordiniert an S115 als einzige Aminosäure. Ebenfalls mit protonierter Schiff Base liegt BR (Teilabbildung b) im unbelichteten Zustand vor. Das erste gemeinsame Photozyklusintermediat beider Proteine entsteht durch die Absorption eines Photons. In diesem Prozeß isomerisiert die PSB vom all-trans zum (13-cis, 15-anti)-Isomer, was gleichbedeutend mit einer Richtungsänderung des Dipolmomentes dieser Gruppe ist (siehe auch Abb. 58). Durch diese Isomerisierung sind das gebundene Anion und die PSB in HR (Teilabbildung a) energetisch weniger stabilisiert als im Grundzustand (hR). Die durch Lichtabsorption aufgenommene Energie schafft somit die Voraussetzung für die serielle Abfolge der anschließenden (thermischen) Intermediate des Photozyklus. Im Übergang zum L<sub>I</sub>-Intermediat bewegt sich das Anion deshalb in Richtung des Dipolmomentes der PSB zur zytoplasmatischen Halbseite des Proteins. Dieser Transportschritt in die Nähe des Schiff Basen Protons wird möglicherweise durch die Seitenkette von S115 mitvollzogen. Für BR (Teilabbildung b) ist eine solche Verschiebung der gebundenen Ladung des deprotonierten D85 nicht möglich. Außerdem nimmt der pK<sub>A</sub> von D85 durch die Isomerisierung der PSB um ca 5 Zehnerpotenzen zu (in bR pK<sub>A,D85</sub> ca. 2)<sup>[37]</sup>. Entsprechend wird für den pK<sub>A</sub> der PSB eine Zunahme nach der Isomerisierung beobachtet (in bR pK<sub>A,PSB</sub> 12,5 bis 13)<sup>[37]</sup>. Diese Änderungen sind gleichbedeutend mit einer geringeren (bzw. höheren) Protonen-Affinität der PSB (bzw. von D85). Aus diesen Gründen kommt es im Rahmen eines Protonentransfers zur Protonierung von D85 unter gleichzeitiger Deprotonierung der Schiff Base. Dies entspricht dem Transport eines Protons von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Halbseite und kann deutlich als blauverschobenes M<sub>I</sub>-Intermediat identifiziert werden.

In beiden Ionenpumpen kommt es anschließend mit der Bildung von L<sub>II</sub> (M<sub>II</sub>) zu Konformationsänderungen, die eine Verbindung zwischen der zytoplasmatischen Oberfläche und der PSB herstellen. Dadurch ist gewährleistet, daß in weiteren Schritten die Chloridabgabe (für HR) bzw. die Protonenaufnahme (für BR) erfolgen kann (Schritte in Abb. 59 nicht gezeigt). Daß tatsächlich zwei L-Species für HR existieren, konnte sowohl über zeitaufgelöste UV/VIS- als auch mittels FTIR-Spektroskopie nachgewiesen werden<sup>[138][172]</sup>.

Auf die Umwandlung von BR in eine einwärts gerichtete Chloridpumpe wurde mehrfach hingewiesen. Die zu Grunde liegende Punktmutation D85T<sup>[139]</sup> hat einen Verlust der negativen Ladung auf der extrazellulären Halbseite zur Folge, so daß der resultierende Anionentransport gemäß dem Modell für HR aus Teilabbildung a) beschrieben werden kann.

Eine Umwandlung von HR in eine, allerdings auswärts gerichtete, Protonenpumpe, ist ebenfalls möglich (Teilabbildung c). Bamberg *et al.* (1993)<sup>[175]</sup> konnten zeigen, daß HR nach Belichtung mit Licht der Wellenlänge größer 495 nm und in Abwesenheit von Haliden, isomeri-



siert und das Schiff Basen Proton in das Zytoplasma abgibt. Ein weiteres Photon (Wellenlänge  $> 360$  nm) führt zur Reisomerisierung der deprotonierten Schiff Base und ermöglicht anschließend die Aufnahme eines Protons vom umgebenden Medium. Somit kann HR durch eine 2-Photonenabsorption in Abwesenheit von Halidionen in eine einwärtsgerichtete Protonenpumpe überführt werden. Gleiches gilt für D85T in BR. Bei Abwesenheit von Halidionen transportiert auch diese Mutante Protonen über einen 2-Photonen-Mechanismus in Richtung des Zytosols. Alle aufgeführten Moden sind durch das vergleichsweise einfache mechanistische Modell aus Abb. 59 erklärbar.

Der Übergang von  $L_I$  nach  $L_{II}$  für HR bzw. von  $M_I$  nach  $M_{II}$  für BR ist in beiden Proteinen mit einer Konformationsänderung verknüpft. Für BR wurden die mit diesem  $M_I/M_{II}$ -Übergang verknüpften Konformationsänderungen mehrfach unabhängig voneinander nachgewiesen. Im Fall von HR sind Konformationsänderung auf der zytoplasmatischen Halbseite notwendig, damit die Anionen die Proteinoberfläche erreichen können. Beide L-Zustände unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Proteinkonformation und ihres Wassergehaltes während die Chloridlokalisierung in beiden Zuständen sehr ähnlich oder identisch ist<sup>[176][177]</sup>. Es ist deshalb möglich anzunehmen, daß  $L_I$  und  $L_{II}$  in HR wie  $M_I$  und  $M_{II}$ <sup>[178]</sup> in BR korrespondierende Zustände darstellen. Erst die anschließenden Photointermediate führen folglich zur Substratabgabe in HR. In dieser Hinsicht kann die Rotverschiebung im anschließenden O-Intermediat (640 nm) als Verlust der Wechselwirkung zwischen PSB und Chlorid gedeutet werden. Die zyklische Natur des katalytischen Prozesses verlangt, daß sich darüberhinaus noch mindestens eine weitere Konformationsänderung, eine Reisomerisierung des Chromophors sowie eine erneute Chloridaufnahme anschließen.



### 5.8. Putative Chlorid-Aufnahme und -Abgabe

Für ein umfassenderes Verständnis des Anionentransportes durch HR ist es notwendig zu wissen, in welchen Regionen die Substrat-Aufnahme und -Abgabe erfolgen. Gemäß FTIR-Differenzspektroskopie ist die Besetzung der Halid-Bindungsstelle mit geringen Änderungen der Proteinkonformation verbunden während der Chromophor vergleichsweise große Konformationsänderungen erfährt<sup>[138]</sup>. Aus diesem Grund ist es legitim die Struktur des unbelichteten, chloridgebundenen HR-Monomers für eine Identifizierung möglicher Halidbindungsstellen der extrazellulären Oberfläche zu Grunde zu legen.

Die Annahme, daß die Anionaufnahme über positiv geladene Aminosäuren an der Oberfläche erfolgen sollte, schränkt die Auswahl auf die Region um R103 und Q105 als mögliche extrazelluläre Bindungsstelle ein. In Abb. 60 (links) ist deshalb das Oberflächenpotential eines HR-Monomers dargestellt. Die Region um R103 und Q105 ist rot eingekreist. Q105 steht über eine Wasserstoffbrückenbindung in direktem Kontakt zur R108, daß bekanntlich an der Stabilisierung gebundener Anionen beteiligt ist. Eine Halidaufnahme via Q105 könnte demnach vermittelt über Änderungen der Seitenkettenkonformation von R108 erfolgen. Q105 ist ähnlich der CBS von mehreren konservierten, hydrophoben Aminosäuren (Leucin 29, Leucin 33, Leucin 80, Valin 86, Valin 227) umgeben. Eine derart hydrophobe Umgebung könnte ein Möglichkeit zur Dehydratisierung von Substrationen beim Übergang in das Protein darstellen. Die Beteiligung von Q105 am Anionentransport wurde bereits über Mutagenesestudien nach-

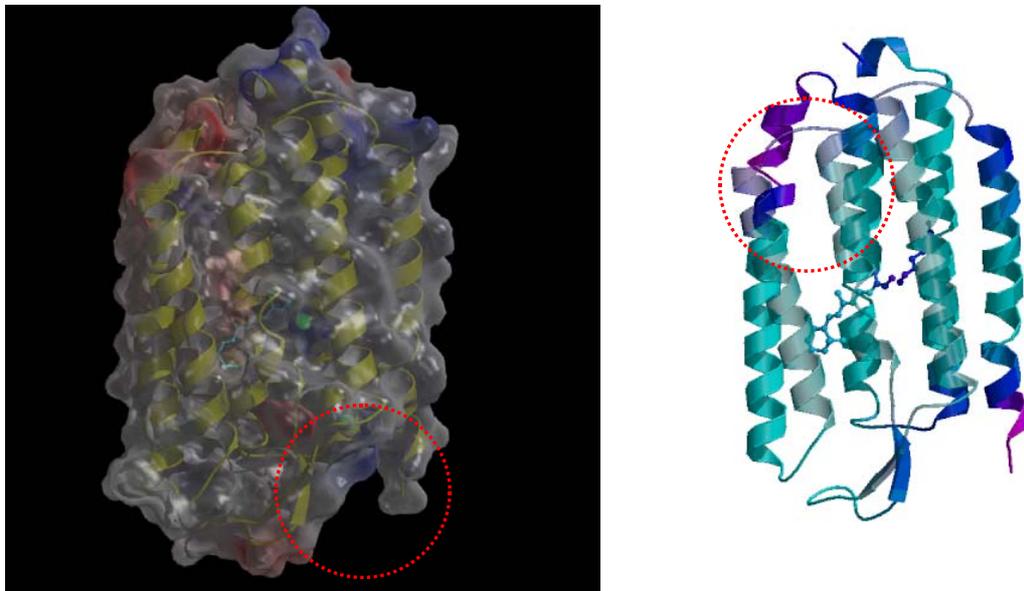


Abb. 60: Mögliche Regionen der Halid-Aufnahme (links) und -Abgabe (rechts) in HR (rote Kreise). In der linken Abbildung ist die Proteinoberfläche eines HR-Monomers nach Oberflächenpotentialen gefärbt (blau: positiv, rot negativ). In der rechten Abbildung ist das Monomer entsprechend B-Faktoren eingefärbt.

gewiesen. Demnach hat der Austausch gegen eine negativ geladene Aminosäure (Q105E) eine verzögerte Anionen-Aufnahme<sup>[179]</sup> zur Folge und das unbelichtete Protein weist ein blauverschobenes Absorptionsmaximum ( $\lambda_{\max} = 560$ ) auf. Der von Ihara *et al.* (2000)<sup>[155]</sup> auf Grund von Sequenzvergleichen identifizierte konservierte Cluster in Helix G (S231 bis S235) ist nicht wie bisher angenommen an der Chloridbindung beteiligt. Vielmehr ist dieser stark hydrophile Bereich am extrazellulären Ende von Helix G wahrscheinlich an der Chlorid-Aufnahme beteiligt (siehe Abschnitt 5.5). S231 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu Q105, daß, wie oben erwähnt, seinerseits über den Sauerstoff an R108 bindet. S235 am Rand dieses hydrophoben Clusters steht im Kontakt (H-Brücke) zu R108. Alle vier Aminosäuren (S231, S235 und Q105, R108) ragen in den hypothetischen Aufnahmekanal von HR, der die CBS mit der positiven Oberflächenregion von HR verbindet.

Bereits mehrfach wurde auf die “geschlossene“ zytoplasmatische Halbseite von HR und die damit zwingende Konformationsänderung im Photozyklusverlauf hingewiesen. In Abb. 60 ist das HR-Monomer nach B-Faktoren gefärbt dargestellt. Die Korrelation zwischen zunehmender Proteinmobilität und steigenden B-Faktoren legt den Schluß nahe, daß der mobile EF-Bereich (roter Kreis) die notwendige Konformationsänderung beim Übergang von  $L_I$  nach  $L_{II}$  durchlaufen könnte. Ein Abknicken des gesamten EF-Bereiches zwischen der  $\pi$ -Bulge (Ala178 bis Leu199) und Pro211, die die Helixstabilität schwächen, könnte in HR und BR gleichermaßen einen freien Zugang zwischen der zytoplasmatischen Halbseite und dem Zytosol ermöglichen.



### 5.9. Möglicher Transportweg des Substrates durch HR

Auf der Basis der Halorhodopsinstruktur konnten in dieser Arbeit Aussagen über Halidbindung- und -transport im Verlauf des Photozyklus vorgenommen werden. In Abb. 61 wird ver-

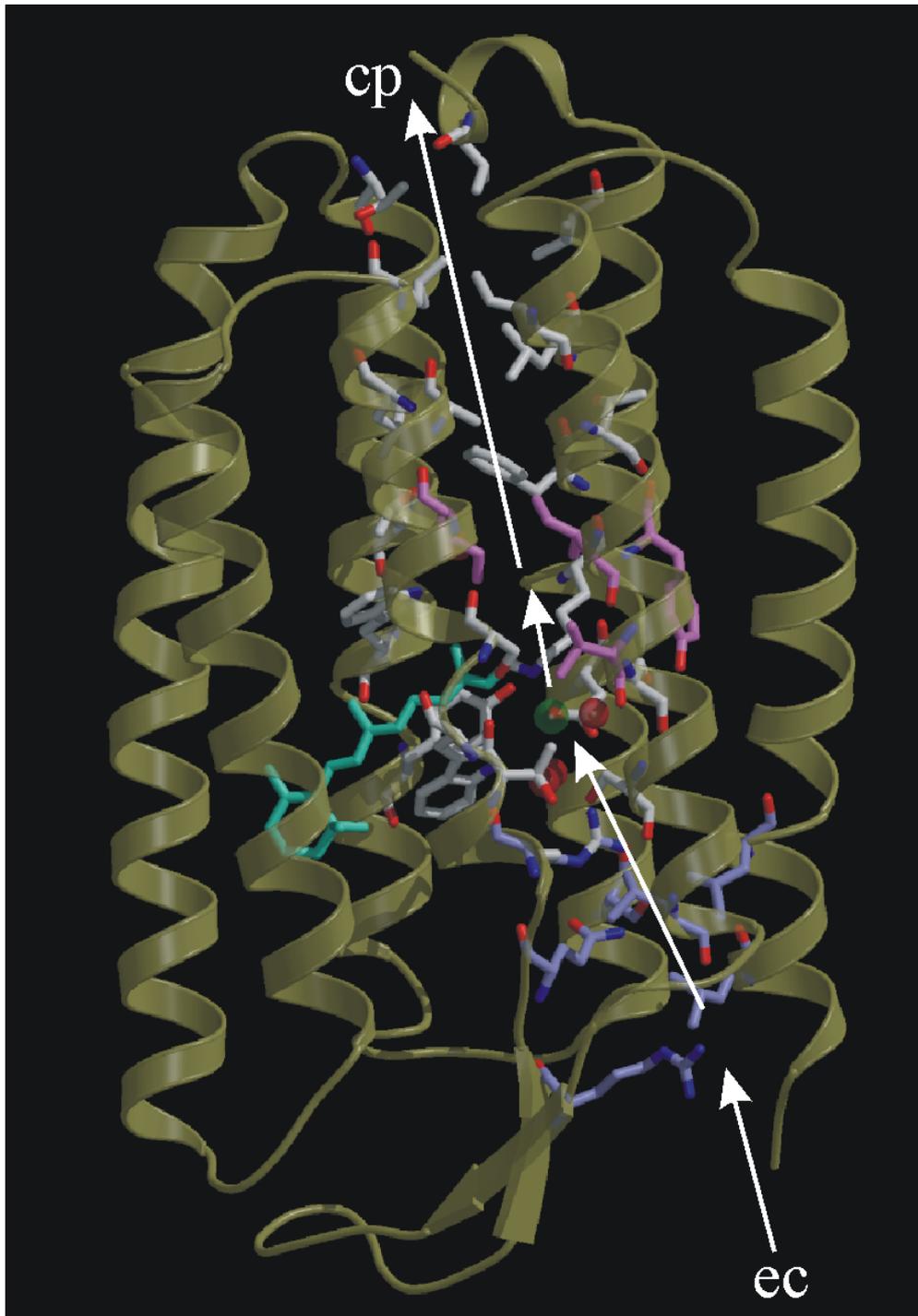


Abb. 61: Vier hypothetische Regionen des Chloridtransportes durch HR. Blau: Aufnahme-region (R103, Q105, S231, S235), grau: CBS (73, 76, 108, 111, 112, 115, 210, 238), violett Chloridtransfer (69, 72, 119) und grau: Chloridabgabe (62, 66, 122, 123, 126, 245, 249, 253, 260)



sucht diese Aussagen und Annahmen bildlich zusammen zu fassen. Als putative Aufnahme-region kommen die an der Oberfläche gelegenen Aminosäuren R103 und Q105 in Betracht. Diese geladenen Reste sind von drei konservierten und hydrophoben Leucinen bzw. Isoleucin (29, 33, 80) umgeben, welche möglicherweise die teilweise Dehydratisierung substratkoordinierender Wassermoleküle bewirken. Einmal aufgenommene Halidionen bewegen sich gemäß diesem Modell entlang der ebenfalls konservierten und hydrophilen S231 und S235. In der chloridfreien Form sollte die Seitenkette von R108 flexibler sein und daher eine Möglichkeit bieten den Transport des Anions von der Oberfläche zur CBS zu unterstützen. Das gebundene Anion ist von acht konservierten Aminosäuren und drei Wassermolekülen umgeben (Abschnitt 5.6). Im Anschluß an die lichtinduzierte Isomerisierung der PSB erfolgt eine Bewegung des Halidions auf die zytoplasmatische Halbseite von HR, die wahrscheinlich partiell vom koordinierenden S115 (durch Rotation dessen Seitenkette) mitvollzogen wird. In Abschnitt 5.8 wurde die Kavität um T203 und W207 als wahrscheinliche Chloridbindungsstelle im L<sub>I</sub>-Intermediat diskutiert. Die Differenzdichten des L-Intermediats und der kurze zurückgelegte Weg des Anions legen eine Beteiligung von mindestens drei hydrophoben Aminosäuren (I69, V72, I119), sämtlich konserviert, am Transport nahe. Das konservierte T243 in Helix G definiert die Oberfläche des Monomers und ist in obiger Abbildung ebenfalls berücksichtigt.

Für die an der Halidabgabe beteiligten Aminosäuren kann keine gesicherte Aussage gemacht werden, da sich die Proteinkonformation der zytoplasmatischen Halbseite von HR im Verlauf der Photozyklus verändert. Die in Abb. 61 dargestellten konservierten Aminosäuren (I62, T66, A122, L123, L126, P245, L249, V253, V260, Kohlenstoffatome weiß) sind bis auf T192 sämtlich hydrophob. Alle Reste liegen in dem vier Helix-Fragment B, C, F und G. Die Darstellung der Halidabgabe ist in sofern sinnvoll, weil bis dato neben T203 keine einzelnen zytoplasmatischen Aminosäuren identifiziert werden konnten, die eine intermediäre Bindung des Substrats eingehen. Eine einfache Abgabe des Anions an das Zytosol entlang hydrophober Aminosäuren wie oben dargestellt, ist aus diesen Gründen wahrscheinlich.



## 5.10. Spektroskopische Analyse von Photozyklusintermediaten

### 5.10.1. UV/VIS-Spektroskopie

Die verwendeten spektroskopischen Methoden hatten die Charakterisierung von Photozyklusintermediaten am Einzelkristall zum Ziel. Im Unterschied zur RSA, bei der ein möglichst großes durchstrahltes Probenvolumen angestrebt wird, ist bei den spektroskopischen Methoden die Verwendung möglichst klein dimensionierter Kristalle vorteilhaft ( $OD < 1,5$ ), um dem Lambert-Beer-Gesetz zu genügen. In Abschnitt 4.7 wurde gezeigt, daß im Verlauf der Reinigung und Kristallisation die photochemischen Eigenschaften von HR erhalten bleiben. Die UV/VIS-Kristallspektren zeigen auch im gefrorenen Zustand keine signifikanten Unterschiede (Absorptionsmaximum, Halbwertsbreite) zu Lösungsspektren von HR-Membranen, d. h., die Wildtyp-Kristalle haben das übliche Absorptionsmaximum von 575 nm im Grundzustand. Eine Anreicherung von weiteren Photozyklusintermediaten ist, wie nachfolgend diskutiert, ebenfalls möglich.

Das Ergebnis der Versuche zur kinetischen Anreicherung von Photozyklusintermediaten bei tiefen Temperaturen kann wie folgt zusammengefaßt werden: Zwischen 110 und 150 K wird selektiv das K-Intermediat angereichert, während im untersuchten Temperaturbereich von 180 bis 220 K vorzugsweise das L-Intermediat gebildet wird.

Im hR-HR<sub>K</sub>-Differenzspektrum ist eine positive Bande des K-Zustandes bei etwa 640 nm und eine Ausbleichbande bei 540 nm zu erkennen. Unter Zuhilfenahme publizierter Absolutspektren ergeben sich in Abhängigkeit von der Illuminationsdosis die in Tabelle 9 aufgeführten K-Anteile bei 110 K.

Anteil K-Intermediat / %	Bemerkung
9,4	5 min Belichtung, rel Transmission 50 %
16,3	10 min Belichtung, rel Transmission 50 %
20,9	15 min Belichtung, rel Transmission 50 %
23,3	5 min Belichtung, rel Transmission 100 %
29,0	10 min Belichtung, rel Transmission 100 %
32,5	15 min Belichtung, rel Transmission 100 %
37,2	5 min Belichtung, rel Transmission >100 %

Tabelle 9: K-Anteile im Kristall nach variierenden Belichtungs-Zeiten und -Intensitäten. Der Kristall hat eine optische Dichte von 1,4 (rel. = relativ)

Der Anteil am K-Intermediates steigt demnach mit der Belichtungs-dosis und nähert sich unter den gegebenen Illuminationsbedingungen keinem Grenzwert. Eine Verdopplung der Lichtintensität von 50 auf 100 % Transmission korreliert mit der Ausbeute an K. Folglich ergeben



höhere Belichtungsdosen höhere Anteile des K-Intermediate, bis bei gegebener Intensität ein maximaler Umsatz erreicht ist. Bei maximaler Laserleistung kann auf diese Weise etwa 37 % des K-Intermediates angereichert werden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß eine weitere Steigerung des Lichtflusses zu weiteren Ausbeutesteigerungen führt.

Im Anschluß der Belichtung erreichte K-Anteile bleiben in Kristallen bei Dunkelheit über Zeiträume von mindestens 30 min konstant (S. Paula & G. Carlsson, persönliche Mitteilungen). Dies erlaubt eine RSA dieses Intermediats, zumindest in Kombination mit brillanter Synchrotronstrahlung und schnell auslesenden CCD-Detektoren (minimierte Detektionszeit). Eine Untersuchung der Stabilität des K-Intermediats über längere Zeiträume ist auf Grund von Verschiebungen der Basislinie nicht oder nur schwer möglich.

Für die Anreicherung des L-Intermediates am HR-Wildtyp wurden anfänglich Versuche unternommen, L-Anteile über Belichtung gefrorener Kristalle bei tiefen Temperaturen (180-220 K) anzureichern. Obgleich ein Ausbleichen des Ausgangszustandes (hR) und das Auftreten eines blauverschobenen Intermediats bei ca 500 nm zu erkennen ist, sind die Anteile des L-Intermediates bei diesen Temperaturen mit maximal 5 % vergleichsweise klein (Vergleiche K-Anteile in Tabelle 9). Bei konstanter Temperatur deutet der isosbestische Punkt der Differenzspektren die Beteiligung von nur zwei Zuständen an. Den Extrema des Differenzspektrums zufolge handelt es sich um hR und das L-Intermediat. Der isosbestische Punkt wie auch die entsprechenden Minima und Maxima verschieben sich mit zunehmender Temperatur zu kürzeren Wellenlängen (siehe Abb. 34 und Abb. 35). Die wahrscheinlich auf den steigenden Anteil an L zurückzuführende Blauverschiebung konvergiert gegen ein Differenzmaximum von ca. 485 nm und ein Minimum von ca. 600 nm bei Temperaturen oberhalb 200 K (siehe auch Abb. 35). Trotz Belichtungszeiten von bis zu 20 min ergaben die Differenzspektren ( $HR_{520} - hR$ ) am Einzelkristall (Anregung bei 633 nm) keine signifikante Erhöhung des L-Anteils.

Die für eine RSA zu geringe Intermediatsausbeute und die Beobachtung, daß die Kristalle reproduzierbar ihre 3-Dimensionale Ordnung bei Belichtung oberhalb 190 K verlieren machen eine alternative Strategie erforderlich. Zu diesem Zweck werden die justierten Kristalle (HR-Wildtyp) bei Raumtemperatur kontinuierlich belichtet (ca. 5 s) und anschließend unter Bestrahlung bei 100 K schockgefroren. Unter diesen photostationären Bedingungen sollte sich bei Raumtemperatur das Intermediat, dessen Zerfall mit der höchsten Aktivierungsenergie verbunden ist, anreichern. Für den HR-Wildtyp ist dies das  $L_I$ -Intermediat. Die Entstehung des Folgeproduktes  $L_{II}$  ist sehr wahrscheinlich mit größeren Konformationsänderungen verbunden, was die hohe Aktivierungsbarriere erklärt<sup>[138]</sup>.

Mit einem Anteil von maximal 20 % L-Intermediat, liegen die so erreichten Umsätze signifikant über der zuvor erwähnten Methode (Tieftemperaturanreicherung). Allerdings gelten hier die gleichen Einschränkungen wie für die K-Intermediatsstudien hinsichtlich der Quantifizierung. Derart behandelte Kristalle behalten im Unterschied zu vorangegangenen Prozedur,



ihre 3-dimensionale Ordnung bei. Somit sollte bei optimierter Anreicherung des L-Intermediats eine Datensammlung am HR-Wildtyp möglich sein. Obgleich Ausbeuten kleiner 20 % eine RSA dieses Intermediats *per se* nicht ausschließen, ist es dennoch hilfreich weitere Umsatzsteigerungen zu erzielen.

### 5.10.2. FT-IR und -Raman Spektroskopie an HR-Kristallen

An HR Membran-Suspensionen oder Solubilisaten wurden mehrfach Versuche unternommen Resonanz-Raman- und FT-IR-Spektren zu erhalten<sup>[180]</sup>. Bei diesen Versuchen limitierte die begrenzte Konzentration an HR jeweils das Signal/Rausch Verhältnis. Hinzu kommt, daß HR-Membran-Suspensionen in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen (KCl) zur Präzipitation neigen. Die damit verbundenen Schwierigkeiten wie inhomogene Proteinverteilung und resultierende Streueffekte der Probe verhindern sowohl statische als auch zeitaufgelöste Messungen unter hohen Salzkonzentrationen. Die Verwendung von Mikrospektralphotometern mit Meßstrahldurchmessern im  $\mu\text{m}$ -Bereich ermöglicht es, die bei Messungen an Kristallen ebenfalls störenden Streueffekte zu minimieren.

Das Signal/Rausch-Verhältnis dieser Mikro-Resonanz-Raman-Messungen ist gegenüber den publizierten Lösungs- bzw. Suspensionsspektren deutlich verbessert. Darüber hinaus finden sich alle bisher beschriebenen Raman-Banden in den Kristallspektren wieder.

Von den drei Schwingungsbanden im Bereich  $1560$  bis  $1620\text{ cm}^{-1}$  sind bisher zwei als isolierte Streckschwingungen der Doppelbindung zwischen C(7)=C(8) bzw. C(5)=C(6) des Retinal identifiziert. Die hier erstmals im Resonanz-Raman identifizierte Bande bei  $1616\text{ cm}^{-1}$  geht wahrscheinlich auf das retinalbindende K242 zurück. Zur intensitätsstärksten Bande im Bereich von  $1523\text{ cm}^{-1}$  tragen alle C=C Streckschwingungen des Retinals von C(9) bis C(14) bei.

Tatsächlich setzt sich diese Bande aus den Einzelbanden für all-trans und 13-cis Retinal zusammen. Mit Entfernung des Chlorids verschiebt sich das Maximum dieser Streckschwingung nach  $1530\text{ cm}^{-1}$ <sup>[181]</sup>. Dieser Chloridabhängigkeit der Schwingungsbande entspricht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums im UV/VIS-Spektrum von  $578\text{ nm}$  auf  $565\text{ nm}$  in der Chlorid-freien Form. Auf Grund der Nähe des Substrates zum Retinal, wird die Indikatoreigenschaft dieser Bande für Konformation und Substratnähe des Retinals verständlich. Ähnliches kann für die Streckschwingungsbande der PSB bei  $1633\text{ cm}^{-1}$  beobachtet werden. Ein Wechsel auf Nitrationen oder Perchlorat-Anionen ergibt eine Verschiebung nach  $1642\text{ cm}^{-1}$ , ähnlich dem L-Intermediat von HR. Diese Verschiebung wird allgemein als Schwächung der Wechselwirkung von PSB und Substrat interpretiert, was nahelegt, daß die mehratomigen Anionen von HR in größerer Entfernung zur PSB gebunden werden als Halide. Zur Berechnung der Isomerenverhältnisse im lichtadaptierten Kristall wurden drei der insgesamt fünf Gauss-Funktionen (siehe Abschnitt 4.8.2) verwendet. Lichtadaptierte HR-



Kristalle (Wildtyp) haben etwa 75 % all-trans Retinal resp. 25 % 13-cis Retinal. Dies stimmt mit den ebenfalls untersuchten Membransuspensionen (80 % all-trans Retinal resp. 20 % 13-cis Retinal) im Rahmen der Fehlergrenzen überein. Ähnliche Isomerenverhältnisse werden für HR-Membransuspensionen nach Extraktion und chromatographischer Trennung der Retinalisomere erhalten<sup>[137]</sup>.

Für BR konnte mehrfach gezeigt werden, daß ein Verlust der Purpurchromophor-Struktur, beispielsweise durch Solubilisierung oder ortsspezifische Mutagenese, für den 2-D Kristall essentieller Aminosäuren (z. B. W80-Austausch) die Lichtadaption beeinflusst. Derart modifiziertes BR weist selbst nach längerer Belichtung mit weißem Licht 13-cis Anteile auf. Folglich ist die Kristallinität für die Lichtadaption mitverantwortlich (kooperative Effekte). Die Annahme, daß die regelmäßige Anordnung von HR im Kristall ähnlich wie in der Purpurchromophor-Membran von BR zu einer Steigerung des all-trans Anteils nach Lichtadaption führt, kann nach den obigen Messungen zumindest für den HR-Wildtyp nicht bestätigt werden.

Überraschenderweise führt der Austausch des Arginins in Position 108 gegen Lysin (R108K)

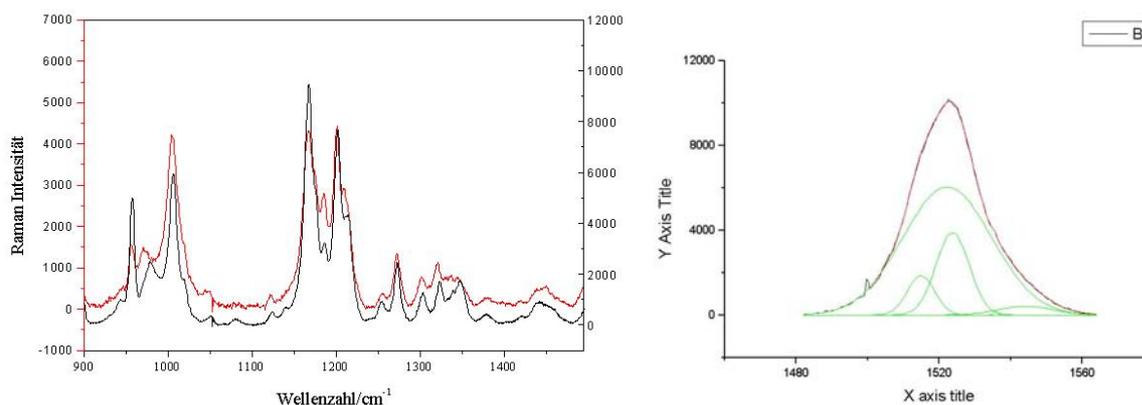


Abb. 62: Mikro-Resonanz-Raman Spektren (Raumtemperatur) eines HR-Kristalls der Punktmutante R108K in Gegenwart von MO nach Illumination bei 568 nm. Der Kristall wurde in Gegenwart von 4 M KCl gezüchtet a) Kristall (schwarze Linie) im Vergleich zu einer HR-Membransuspension (rote Linie) b) Ausschnitt des C=C Streckschwingungsbereiches um 1500 cm<sup>-1</sup>; Farbcode siehe Abb. 40

zu nahezu 100 % all-trans Retinal im Kristall. Isomerenverhältnisse nach Austausch gegen andere Aminosäuren in Position 108 liegen bis auf den Austausch gegen Glutamin (R108Q) nicht vor. Im Fall von R108Q allerdings werden mit Anteilen von 65 bis 70 % des all-trans Isomers, je nachdem ob in Ab- oder Anwesenheit von Guanidinium, keine zum Wildtyp signifikanten Unterschiede detektiert.

Demnach ist der Kristallverband und/oder die Aminosäure in Position 108 an der Lichtadaption von HR maßgeblich beteiligt. Eine sinnvolle Interpretation dieses Ergebnisses stützt sich



auf die strukturell identifizierten Reste der CBS im HR-Wildtyp. Im unbelichteten HR liegt ein Wassermolekül (Wat505) in Nähe zum Proton der PSB. Dieses wird von der Guanidino-Gruppe von R108 koordiniert. Im (13-cis, 15-syn)-Konformer des Retinals ist es deshalb nicht auszuschließen, daß dieses Wassermolekül eine Wasserstoffbrücke zum Schiff Basen-Proton bildet und damit diesen Zustand stabilisiert. In der Punktmutante R108K ist dieses Wassermolekül sehr wahrscheinlich in seiner Position gegenüber dem Wildtyp verschoben oder -weniger wahrscheinlich- nicht vorhanden. Ein Austausch dieses Arginins gegen das unter physiologischen Bedingungen ebenfalls positiv geladene Lysin bezeichnet man als konservative Mutation. Rüdiger *et al.* (1995)<sup>[165]</sup> konnten zeigen, daß von dieser Mutante Halidionen weder gebunden noch transportiert werden. Das Absorptionsmaximum von 556 nm, das keine anionenabhängigen Verschiebungen zeigt, legt zusätzlich den Schluß nahe, das R108K nicht in der Lage ist Anion zu binden. Lysin mit ähnlich langer Seitenkette wie Arginin ist im Unterschied zu Arginin nicht mehr in der Lage eine Wasserstoffbrücke zu Q105 auszubilden. Die Bedeutung von Q105 für die Substrataufnahme und eventuell dessen Bindung wurde bereits eingehend an anderer Stelle diskutiert (siehe Abschnitt 5.8). Schließt man weitere Haloopsine, bei denen Q105 durch andere Aminosäuren ersetzt ist in diese Betrachtung ein, dann ergeben sich weitere Indizien für diese Argumentation. Bei Austausch gegen Methionin wie in HR aus *N. pharaonis* findet keine Lichtadaption statt. Vielmehr werden nach chromatographischer Trennung der Isomeren konstant 85 bis 90 % all-trans Retinal nachgewiesen. Ein weiteres Indiz für den hohen all-trans Gehalt an Retinal in der Punktmutation R108K finden sich an anderen Stellen des RR-Spektrums. So ist die in-plane Biegeschwingung der PSB ( $1349\text{ cm}^{-1}$ ) zu höheren Wellenzahlen bei schärferem Peakmaximum als im Wildtyp verschoben. Dies deutet eine veränderte Orientierung sowie eine einheitlichere Konformation der PSB an. Auch weist die C-C Streckschwingungsbande des 13-cis Intermediats bei  $1185\text{ cm}^{-1}$  eine deutlich verringerte Intensität auf als im HR-Wildtyp. Genau genommen ist der gesamte C-C-Streckschwingungsbereich zwischen  $1168$  und  $1210\text{ cm}^{-1}$  dem lichtadaptierten RR-Spektrum von BR sehr ähnlich. Es kann also festgehalten werden, daß die Retinalkonformation in der HR-Mutante R108K nahezu 100 % beträgt. Gründe dafür müssen neben dem Verlust der Substratbindung (andere inaktive HR-Mutanten weisen deutlich 13-cis Anteile auf) in der Seitenkettenkonformation von R108 liegen. Wasser 505 mit seiner räumlichen Nähe zur PSB kommt als möglicher Bindungspartner der PSB im 13-cis Konformer, zumindest in Anteilen des Proteins, in Betracht.

### 5.10.3. Konformationsänderungen im HR-Kristall

Wie bereits in Abschnitt 4.8.3 erläutert, verlieren gefrorene HR-Wildtypkristalle bei Illumination ( $> 600\text{ nm}$ ) im Temperaturbereich von  $195\pm 5\text{ K}$  reproduzierbar ihre Kristallordnung. Versuche bei Temperaturänderung mit und ohne Belichtung der Kristalle führen zu dem Er-



gebnis, daß es sich dabei um lichtinduzierte Veränderungen im Kristall handelt. Mit dem Ziel eine genauere Kenntnis der atomaren Prozesse zu erlangen wurden unter identischen Bedingungen FTIR-Differenzspektren an HR-Einzelkristallen aufgenommen.

Die erhaltenen Spektren weisen scharfe Differenzbanden auf, woraus sich schließen läßt, daß der Chromophor eine definierte Konformation im HR-Grundzustand einnimmt. Im untersuchten Temperaturbereich von 190 bis 200 K zeigen sich starke temperaturabhängige Unterschiede im gesamten spektralen Bereich (siehe Abb. 42). Das im untersuchten Temperaturbereich vorwiegend L-Intermediate bei Belichtung entstehen, ist mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie eindeutig belegt (siehe Abschnitt 4.7). Falls der Verlust der Kristallordnung auf Konformationsänderungen des Proteins beruht, sollte sich dies an den Streck- und Deformationsschwingungen des Proteinrückgrades (Amid I und II) ablesen lassen.

Die Amid I-Bande von L ist eindeutig dem positiven Differenzpeak bei  $1653\text{ cm}^{-1}$  zuzuordnen<sup>[182]</sup>. Gemessen an den Amplituden aller Banden im Spektrum erfolgen demnach im Verlauf der Illumination relativ starke Veränderungen des Proteinrückgrades. Das Maximum dieser Änderungen wird bei 195 K erreicht.

Für eine Zuordnung der Amid II-Schwingungen kommen zwei Banden im Bereich  $1500$  bis  $1600\text{ cm}^{-1}$  in Betracht. Bisher veröffentlichte FTIR-Differenzspektren des  $L_I/L_{II}$ -Übergangs in HR ergeben lediglich eine breite Bande bei ca.  $1550\text{ cm}^{-1}$ . Ein entsprechendes Differenzspektrum erhält man durch Belichtung vieler HR-Kristalle zugleich bei 253 K (siehe Abb. 43). Es ist deshalb nicht eindeutig zu belegen, welche der beiden Banden der Einzelkristallspektren aus Abb. 42 dem Amid-II- bzw. dem C-C-Streckschwingungsmodus zuzuordnen ist. Analog zum L-Intermediat in BR sollte die längerwellige Bande zur C-C Streckschwingung von  $HR_L$  und folglich nur die starke Differenzbande bei  $1540\text{ cm}^{-1}$  zum Amid II gehören<sup>[183]</sup>. Letztere zeigt die stärksten Unterschiede beim Übergang zum L-Intermediat, und zwar bei Temperaturen oberhalb 195 K. Obwohl für diese Bande kein Wasserstoff/Deuterium-Effekt zu verzeichnen ist, könnte es sich dennoch um eine Amid II Schwingung handeln. Die Einführung von Deuterium setzt nämlich voraus, daß die Proteinregion für schwereres Wasser zugänglich ist. Für Membranproteine sind allerdings die transmembranen Bereiche durch das umgebende Lipid von der Umgebung abgeschirmt. Entsprechende Austausche in BR zeigen, daß transmembrane Amidprotonen des Proteinrückgrades nicht oder nur schwer gegen Deuterium austauschen.

Somit kommt es bei etwa 195 K durch Illumination des Kristalls zu relativ großen Konformationsänderungen im Protein. Dieses Ergebnis stimmt mit den beobachteten Verlusten der Kristallordnung überein. Da im betrachteten Temperaturbereich keine signifikanten Anteile weiterer Photointermediate UV/VIS-spektroskopisch nachweisbar sind, handelt es sich höchstwahrscheinlich um den Übergang von  $L_I$  nach  $L_{II}$ . Von beiden Intermediaten wird analog zum  $M_I/M_{II}$ -Übergang in BR angenommen, daß sie durch eine Konformationsänderung, die die Zugänglichkeit von  $ez$  nach  $zp$  ändert, verknüpft sind. Die damit einhergehenden



Konformationsänderungen des Chromophors sind gemäß den Einzelkristallspektren wesentlich geringer. Auffällig ist lediglich die starke Abnahme einiger (ebenfalls Raman-aktiver) Schwingungsmoden bei Temperaturen oberhalb 195 K. Die C=N-Streckschwingung der PSB ( $1633\text{ cm}^{-1}$ ), sowie die C-C-Banden des Grundzustandes ( $1211$  und  $1170\text{ cm}^{-1}$ ) nehmen in diesem Temperaturbereich weiter ab. Die entsprechenden 13-cis Schwingungen von L erscheinen entweder als Schulter bei  $1654\text{ cm}^{-1}$  (C=N) oder isolierte Bande um  $1190\text{ cm}^{-1}$ . Sehr wahrscheinlich ist mit dem Übergang von  $L_I$  in ein späteres Intermediat ein vollständiges durchlaufen des gesamten HR-Photozyklus möglich, so daß der Anteil des HR-Grundzustandes bei Temperaturen oberhalb 195 K zunimmt.

Mit der Bildung der L-Intermediate sind zumindest zwei Änderungen verbunden, die sich eindeutig bestimmten Aminosäuren zuordnen lassen. Am kurzwelligen Ende des FTIR-Spektrums (ca  $1740\text{ cm}^{-1}$ ) erscheint die Differenzbande der Carboxylgruppe (C=O Streckschwingung) von Asparaginsäure 141. Im unbelichteten HR bildet D141 (Helix D) eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxygruppe von Threonin 116 (Helix C). Die Differenzbande mit (negativem Peak bei  $1744\text{ cm}^{-1}$  und positivem Peak bei  $1737\text{ cm}^{-1}$ ) zeigt eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen an. Diese Verschiebung kann als eine Verlagerung dieser Gruppe in eine hydrophilere Umgebung bzw eine Stärkung der Wasserstoffbrücke zwischen D141 und T116 bei Entstehung von L gedeutet werden<sup>[184]</sup>. Demnach kommen sich die Helices C und D zumindest in der Nähe des Chromophors in L näher. Eine vergleichbare Stärkung der Wasserstoffbrückenbindung wird in BR zwischen den homologen Resten D115/T89 beobachtet.

Arginin 108 ist die zweite Aminosäure, deren Konformationsänderungen im Photozyklusverlauf eindeutig zugeordnet werden kann. Die Guanidinogruppe weist Differenzbanden bei etwa  $1695/1688\text{ cm}^{-1}$  und  $1169\text{ cm}^{-1}$  auf<sup>[130]</sup>. Im  $L_I/L_{II}$ -Übergang nimmt die Bandenintensität des HR-Grundzustandes bei  $1695,5$  und  $1169,8\text{ cm}^{-1}$  mit zunehmender Temperatur ab. Im Gegenzug taucht bei Temperaturen oberhalb 195 K eine neue positive Bande bei  $1684\text{ cm}^{-1}$  auf. Ein Vergleich des Lösungs- und Kristallspektren führt zu dem Schluß, daß R108 mit dem Zerfall des  $L_I$ -Intermediates eine größere Konformationsänderung durchläuft. Diese Interpretation stünde im Einklang mit einer Beteiligung von R108 an der Substrataufnahme im späteren Verlauf des HR-Photozyklus.



## 6. Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgenommene Strukturanalyse des HR-Grundzustandes sollte in Zukunft durch die Analyse von Photozyklusintermediaten ergänzt werden. Das hier vorgestellte Strukturmodell bietet eine gute Grundlage für die zielgerichtete Punktmutagenese zur Erzeugung von Mutanten mit signifikant veränderter Photozykluskinetik. HR kommt hier auf Grund seiner Halid-Substrate (hohe Elektronenzahl) nicht nur im Vergleich der Retinalproteine ein besonderer Vorteil zu, sondern auch im weiteren Sinne, da die Photoinduzierbarkeit eine gezielte Erzeugung und Analyse von Reaktionsintermediaten ermöglicht, die für ATP-verbrauchende Ionenpumpen nicht erreichbar ist. Zusammen mit spektroskopischen Methoden besteht eine gute Möglichkeit zukünftige Intermediats-Analysen auf der Basis von HR-Mutanten für die RSA zu optimieren. Darüber hinaus haben die Diffraktionsstudien mit polychromatischer Röntgenstrahlung gezeigt, daß es bei Verwendung von Kristallen geringer Mosaizität und hohen Beugungsverhaltens möglich sein sollte, auch zeitaufgelöste Strukturanalysen im ms-Bereich mittelfristig zu verfolgen.

Das hier entwickelte Kristallisationsprotokoll ermöglicht die Kristallisation der vielversprechendsten HR-Mutanten für die Röntgenstrukturanalyse.

Die weitere Analyse des für HR ungewöhnlich hohen all-trans Gehalt der Kristalle der Mutante R108K (100 %), könnte es ermöglichen, die Ursachen für die sogenannte Dunkeladaption in Retinalproteinen besser zu verstehen und sollte ebenfalls erklären, warum durch Lichtadaption am HR-Wildtyp zu keiner Zeit 100 % all-trans-Retinal erzeugt werden kann.

Auf der Basis der vorgestellten Hypothese zur Kristallisation in Lipidphasen werden zukünftig Versuche erfolgen, deren Ziel ein besseres Verständnis und die weitere Optimierung dieser Methode mit Blick auf unterschiedliche Membranproteine ist.



## 7. Material und Methoden

### 7.1. Material

Universal-Mikroskop-Spektral-Photometer (UMSP 80), Carl Zeiss, Oberkochen, Germany

#### 7.1.1. Reagenzien und Enzyme

Agarose	Seakem, Marine Colloids Div., FMC Corp., Rockland, USA
Antischaummittel	Roth, Karlsruhe
Bacteriological Pepton L37	Oxoid, Wesel
Bacto-Agar	Difco, Detroit, MI, USA
Benzamidin	Sigma, München
Cystein	Sigma, München
$\beta$ -D-Oktylglucosid	Boehringer, Mannheim
$\beta$ -D-Dodecylmaltosid	Sigma, München
Kaliumbromid	Sigma, München
Kaliumchlorid	Merk, Darmstadt
Kaliumjodid	Sigma, München
Magnesiumsulfat	Merk, Darmstadt
2,4-Methylpentandiol	Fluka
Monoolein	Sigma, München
Monopalmitolein	Sigma, München
Natrium-Cholat	Sigma, München
Na-Zitrat	Merk, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Siedesalz (NaCl)	Staatliche Saline, Bad Reichenhall

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in p. a. Qualität von den Firmen Merk, Sigma oder Fluka bezogen.

#### 7.1.2. Sonstige Materialien

BioGel A-0,5m	Biorad, Richmond, USA
DEAE-Sephacel	Pharmacia, Freiburg
DNA-Restriktionsendonucleasen	Boehringer Mannheim GmbH



Glasröhrchen	Special Verre, Geispolsheim
Konzentratoren	Pall Filtron, oder Amicon, Wiesbaden
Kristallisationsschalen	Charles Supper, Natrick, USA
Kristallmanipulation (Schleifen, Zangen etc)	Hampton Research, San Diego, USA
Phenylsepharose	Pharmacia, Freiburg
Röntgenkapillaren	Müller, Berlin
Sterilfilter	Millipore GmbH, Eschenborn
Source PHE	Pharmacia, Freiburg
Superose-12	Pharmacia, Freiburg

### 7.1.3. Stämme

#### *Halobacterium salinarum* Stämme

<b>S9</b> <sup>[185]</sup>	BR <sup>++</sup> , HR <sup>+</sup> , SRI <sup>+</sup> , SRII <sup>+</sup> , Car <sup>-</sup> , Rub <sup>-</sup> , Ret <sup>+</sup> Wurde zur Isolierung von BR-Wildtyp verwendet
<b>JW5</b>	BR <sup>++</sup> , HR <sup>+</sup> , SRI <sup>+</sup> , SRII <sup>+</sup> , Car <sup>-</sup> , Rub <sup>-</sup> , Ret <sup>-</sup>
<b>D2</b> <sup>[186]</sup>	BR <sup>-</sup> , HR <sup>++</sup> , SRI <sup>+</sup> , SRII <sup>+</sup> , Car <sup>-</sup> , Rub <sup>-</sup> , Ret <sup>+</sup> , exprimiert HR und geht auf den Stamm HN5 zurück, wurde zur Isolierung von HR-Wildtyp verwendet
<b>TOM</b> <sup>[187]</sup>	BR <sup>-</sup> , HR <sup>-</sup> , SRI <sup>+</sup> , SRII <sup>+</sup> , Car <sup>-</sup> , Rub <sup>-</sup> , Ret <sup>+</sup> , Deletion der beiden Ionenpumpen BR und HR. Dieser Stamm geht auf ? zurück und wurde zur Transformation und Isolierung verschiedener HR-Mutanten verwendet
<b>HN5</b> <sup>[188]</sup>	BR <sup>-</sup> , HR <sup>-</sup> , SRI <sup>+</sup> , SRII <sup>+</sup> , Car <sup>-</sup> , Rub <sup>-</sup> , Ret <sup>+</sup> , ein BR und HR negativer Stamm, der zur Transformation und Isolierung verschiedener HR-Mutanten verwendet wurde

### 7.1.4. Nährmedien

#### Nährmedium für *Halobacterium salinarum*<sup>[189]</sup>

Zur Herstellung der Nährmedien wurde destilliertes Wasser verwendet. Vor der Sterilisation der Medien im Autoklaven (120°C) wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH (NaOD) auf einen pH-Wert im Bereich von 7,0 bis 7,2 eingestellt.

	g/L
NaCl	250
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	20
Na-Zitrat *2 H <sub>2</sub> O	3



KCl	2
Oxoid-Pepton	10

Agarplatten-Medien enthielten zusätzlich 15g Bacto-Agar pro Liter.

### 7.1.5. Puffer und Lösungen

#### Basalsalzlösung

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

#### Lysepuffer

1 M NaCl

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.

#### Laufpuffer A

0.4 % (w/w) Natrium-Cholat,

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

50 mM Tris/HCl (pH = 7.2)

#### Laufpuffer B

1% (w/w) Octyl-β-D-glucoopyranosid (OG)

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

50 mM Tris/HCl (pH = 7.2)

#### BR-Puffer 1

25 mM Na/K-Phosphat (pH = 5.6)

1,2 % Oktylglukosid

bidest. Wasser

Salz	Algenmedium 1	<sup>1</sup> H/ <sup>15</sup> N-Algenmedium	<sup>1</sup> H/ <sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C-Algenmedium
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 mg /L		



Salz	Algenmedium 1	<sup>1</sup> H/ <sup>15</sup> N-Algenmedium	<sup>1</sup> H/ <sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C-Algenmedium
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0.44 g /L		
Na-EDTA	37.3 mg /L		
KJ	0.83 mg /L		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0.25 mg /L		
KNO <sub>3</sub>	1.9 g /L	K <sup>15</sup> NO <sub>3</sub>	K <sup>15</sup> NO <sub>3</sub>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65 g /L	<sup>15</sup> H <sub>4</sub> <sup>15</sup> NO <sub>3</sub>	<sup>15</sup> H <sub>4</sub> <sup>15</sup> NO <sub>3</sub>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.34 g /L		
CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0.025 mg /L		
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0.025 mg /L		
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	27.8 mg /L		
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.37 g /L		
22.3 mg /L	MnSO <sub>4</sub> * 4H <sub>2</sub> O		
ZnSO <sub>4</sub> * 4H <sub>2</sub> O	8.6 mg /L		

pH auf 6,0 eingestellt vor Sterilfiltration

Kaliumcarbonat-Puffer

2 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ KH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH = 7.5

Isotopenmarkiertes Halobakterienmedium 1

4.22 g <sup>2</sup>H-markierte Aminosäuren

235.0 g NaCl

10.0 g MgSO<sub>4</sub>

2.0 g KCl

1.13 g Tris-D

in 750 mL D<sub>2</sub>O aufnehmen

Isotopenmarkiertes Halobakterienmedium 2

0.75 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.75 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*3H<sub>2</sub>O

0.5 g KNO<sub>3</sub>

in 50 mL D<sub>2</sub>O aufnehmen

Isotopenmarkiertes Halobakterienmedium 3

70.0 mg CaCl<sub>2</sub>\* 2H<sub>2</sub>O

5.0 mg CuSO<sub>4</sub>\* 5H<sub>2</sub>O

230.0 mg FeCl<sub>2</sub>\* 4H<sub>2</sub>O

2.0 g Ascorbinsäure



30.0 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   
44.0 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
in 10 mL  $\text{D}_2\text{O}$  aufnehmen

#### Vitaminlösung

100.0 mg Thiamin  
100.0 mg Folsäure  
10.0 mg Biotin  
in 10 mL  $\text{D}_2\text{O}$  aufnehmen



## 7.2. Mikrobiologische Methoden

Die Anzucht der Halobakterien-Kulturen erfolgte i. d. R. ausgehend von Einzelkolonien. Zu diesem Zweck wurde in regelmäßigen Abständen (maximal alle 3 Monate) 1 mL einer frischen Kultur ausgedünnt und auf Agarplatten ausgestrichen.

Die weitere Anzucht erfolgte in Flüssigkulturen über 4 bis 5 Tage ( $OD_{600} \approx 100-130$ ) bei 40 °C und 100 rpm unter Lichtabwesenheit. Für die Flüssigkulturen wurden Einzelkolonien (eine Ausnahme war der Stamm D2, hier 1 mL Flüssigkultur-Inoculum) in 35 mL Nährmedium (100 mL Erlenmeyerkolben) überführt. Diese Kulturen dienten zum Animpfen größerer Flüssigkulturen, jeweils im Verdünnungsverhältnis 1:20. Je nach Bedarf wurden weitere 700 mL-Kulturen (in 2 L-Erlenmeyerkolben), 10 L-Kulturen (New Brunswick Scientific Co.; New Brunswick, New Jersey) und 200 L-Kulturen beimpft. Die 10 und 200 L-Ansätze wurden bei 300 rpm und einer Luftzufuhr von 2 L/min in Gegenwart eines Antischaummittels angezogen.

## 7.3. Proteinbiochemische Methoden

### 7.3.1. HR-Isolierung

Die Isolierung von HR-Wildtyp als auch verschiedener HR-Mutanten erfolgte auf der Basis der Methode von Duschl<sup>[190]</sup> *et al.* Die Aufarbeitung erfolgte, wenn nicht anders vermerkt bei 4°C unter Lichtabwesenheit bzw. schwachem Rotlicht ( $\lambda > 630$  nm).

D2-Zellen wurden im 1 L-Maßstab in 2 L Erlenmeyer-Kolben aufgezogen. Kulturen (pro Aufreinigung 10 L) mit einer  $OD_{600} \approx 100-150$  wurden vor der Zentrifugation für 2 h mit Eiswasser gekühlt und anschließend bei 4°C pelletiert (Sorvall GS-3, 20 krpm, 30 min oder Hettich Roto Silenta/RP, 4krpm, 1 h). Die Resuspendierung der Zellpellets von 1 L-Kultur erfolgte mit ca. 30 ml vorgekühlter Basalsalzlösung in Gegenwart von DNase. Die Suspension wurde anschließend vorsichtig in vorgekühltem Lysepuffer im Verhältnis 1:10 (v/v) aufgenommen und über Nacht bei 4°C (Kühlraum) gerührt.

Die erhaltenen Gesamtmembranfraktion (GMF) wurde zentrifugiert (35 krpm, Ti45, 40 min) und erneut in Lysepuffer resuspendiert. Nach einmaliger Wiederholung erfolgte die Resuspendierung des Pellets. Anschließend wurde die Suspension weiter von Hand homogenisiert, das Homogenisat kurz zentrifugiert (Sorval, SS34, 10 krpm, 2 min) und der Überstand weiterverwendet. Nach erneuter Zentrifugation der Membranfraktion (35 krpm, Ti45, 40 min) wurde das Pellet in 12 bis 15 mL Lysepuffer aufgenommen und auf Saccharosegradienten (25 bis 45 % [w/w], Lysepuffer) verteilt. Nach der Ultrazentrifugation (Sorval TST28, 14 h, 25 krpm) und Isolierung der HR-Fraktion schloß sich zweimaliges Waschen im Lysepuffer an (35 krpm, Ti45, 40 min). Das erhaltene Pellet wurde in Lysepuffer



zu einer  $OD_{570}$  von etwa 10 ( $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  HR) resuspendiert und die HR-Membranfraktion bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Die HR-Membranfraktion wurde mit Lysepuffer auf eine  $OD_{570}$  von 4 verdünnt und durch Zugabe von festem Kaliumchlorid (bei anfänglichen Reinigungen wurde Natriumchlorid verwendet) eine Salzkonzentration von 3.0, 3.5 oder 4.0 M eingestellt. Die Mischung wurde bis zur Auflösung des Salzes bei Raumtemperatur gerührt (5 bis 10 min) und anschließend mit Cholat-Solubilisierungspuffer auf eine Cholat-Konzentration von 5 % eingestellt. Die Mixtur sollte bei Raumtemperatur etwa 1h rühren und abschließend bei  $15^\circ\text{C}$  unlösliche Anteile durch Ultrazentrifugation abgetrennt werden (Beckman TL-100, TLA-100.3, 40 krpm, 30 min).

Die sich anschließende Reinigung des Halorhodopsins via hydrophober Affinitätschromatographie erfolgte auf chromatographischen Stationen der Firma Pharmacia (ÄKTAexplorer oder SMART System) bei 4 bis  $6 \text{ }^\circ\text{C}$  unter schwachem Rotlicht. Die Chromatographie-Säulen sowie der Rest des Systems wurden in Laufpuffer A äquilibriert.

Das Solubilisat wurde steril filtriert und in Gegenwart von Laufpuffer A (ebenfalls steril filtriert) bei einem Fluß von  $1.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  auf die Säule des Typs Resource-PHE (in einigen Fällen auch auf Penyl-Sepharose des Typs 4-LB) aufgetragen. Nach Waschen mit 10 mL Laufpuffer A erfolgte durch den Wechsel auf Laufpuffer B ein Detergenzwechsel und die Elution gebundenen HR's. Das Eluat wurde in 1.5 mL-Einheiten fraktioniert. Während der chromatographischen Reinigung wurden kontinuierlich verschiedene Parameter (Abschnitt 4.2) verfolgt werden. Die Eluatfraktionen mit hoher 560 nm Absorption (2-3 Fraktionen) wurden vereinigt und anschließend mittels Membranfiltration (50 kDa Ausschlußgröße) konzentriert.

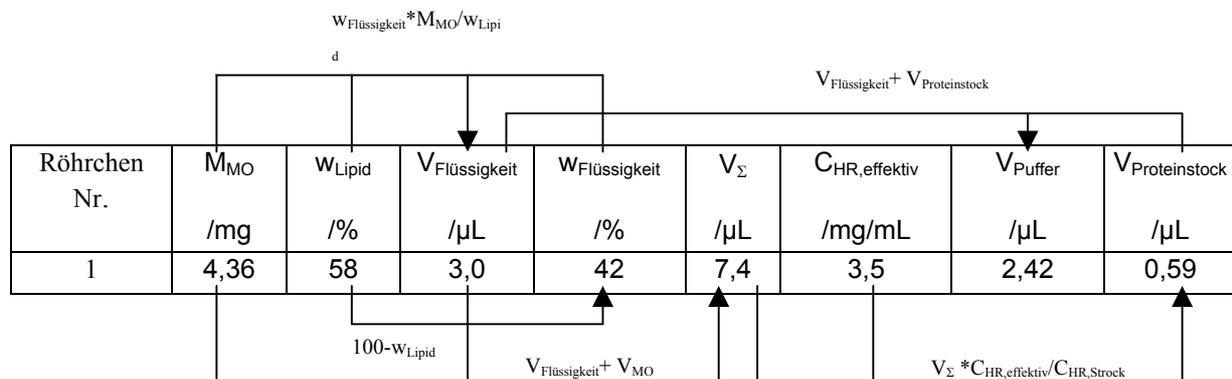
### 7.3.2. HR-Kristallisation

Die erfolgreiche Kristallisation von HR-Wildtyp sowie einiger funktionell charakterisierter Mutanten erfolgte mit Änderungen nach der Methode von Landau und Rosenbusch<sup>[191]</sup>. Zu diesem Zweck wurde das nach Reinigung und Detergenzwechsel in OG solubilisierte HR mit MO (1-Monooleoyl-*rac*-Glycerol) zur bikontinuierlichen kubischen Lipidphase vermischt.

Für die Präparation einer homogenen proteinhaltigen Lipidphase wurde wie folgt verfahren: Monoolein (MO) oder Monopalmitolein (MP) wurde in Pulverform zu 4 bis 7 mg in Glasröhrchen (Microtubes Verre) oder Eppendorf-Reaktionsgefäße (0.2 mL) überführt. Nach sorgfältigem Verschließen der Glasröhrchen mit Parafilm konnten die Aliquots in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1.5 mL) aufbewahrt werden. Eventuell an Wandungen anhaftendes Lipid wurde durch kurzzeitige Zentrifugation ( $30 - 35 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 kg) pelletiert. Die Lagerung der Ansätze bis zu ihrer Verwendung erfolgte bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  und Lichtabwesenheit.



Das unten stehende Schema faßt die Einwägen und Volumina für die erfolgte Präparation zusammen. Der gewählte Massenanteil des Lipides lag im Bereich von 58 bis 62 während die effektive Proteinkonzentration in den Ansätzen zwischen 3 und 3.5 mg/mL variierte (HR-Konzentration der Stocklösung lag unterhalb 15 mg/mL). Bei Raumtemperatur wurde von einer HR-Stocklösung bekannter Konzentration das entsprechende Aliquot zu dem Lipid gegeben. Zur Vereinfachung wurde für das Lipid ein Dichte von 1 mg/ $\mu$ L angenommen. Zur Erzielung geeigneter Protein-Konzentrationen im Ansatz mußte noch das entsprechende Aliquot des gleichen Puffers zum Ansatz gegeben werden. Im Falle von Bromid- oder Guanidiniumhydrochlorid-Kokristallen erfolgte die Zugabe der Chemikalie über den Puffer. Die Ansätze wurden in 10-20 min Intervallen bei Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge). Beginnend bei 4000 rpm erfolgte Steigerung der Umdrehungszahl in 500 rpm Inkrementen bis auf 10000 rpm. Zwischen den einzelnen Zentrifugationsschritten waren die Röhren jeweils um 180° gedreht zu drehen.



Für die Kristallisation in kubischen Lipidphasen sollte ähnlich der "klassischen" Kristallisation eine Untersuchung bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen stattfinden. Für HR konnten für einen Lipidmassenanteil von 58-62 %, Kaliumchlorid-Konzentrationen von 3,0 - 4,0 M und Protein-Konzentrationen von 3,0 bis 4,5 mg\*mL<sup>-1</sup> Protein beobachtet werden. Das Optimum der Proteinkonzentration lag für obige Salzkonzentrationen und Lipidanteile bei 3,2-3,5 mg\*mL<sup>-1</sup>.

### 7.3.3. Mechanische Isolierung von HR-Kristallen aus Lipidphasen

Zur Isolierung der Kristalle aus den gelartigen Lipidphasen wurden bevorzugt mechanische Methoden verwendet. Nach Lichtadaption der Proteinkristalle (mehrere Minuten Belichtung eines Kristallisationsansatzes mit Licht des sichtbaren Spektrums unter dem Lichtmikroskop) konnte unter Verwendung von Mikro-Bestecken (Hampton-Research) die Lipidanteile des Ansatzes soweit entfernt werden, daß die Isolierung eines einzelnen Kristalls mittels Nylon-Schleufe möglich war. Die Kristallisationsansätze hatten während dieser Präparation



möglichst wenig Kontakt zur Umgebungsluft haben, um einen Wasserverlust der Lipidphase zu minimieren. Einmal in einer Schlaufe isolierte Kristalle wurden in möglichst kurzer Zeit direkt in flüssigem Stickstoff oder im Stickstoffstrom (100 K) schockgefroren. Die Zugabe eines Additives zur Vermeidung von Wasserkristallen während des Gefrierens war nicht notwendig.

#### **7.3.4. Isolierung von HR-Kristallen mittels Lipaseverdau<sup>[192]</sup>**

Die Lipidphasen wurden mit dem identischen Volumen einer Lipaselösung (*Candida rugosa* [EC 3.1.1.3] 50 mg/mL in gesättigtem Sörensen-Puffer, (pH ca 5) versetzt und 24 h bei 20 °C inkubiert. Kristalle, die in opaker, flüssiger Phase aufschwammen konnten durch kurze Zentrifugation an die Phasengrenze Glycerol/Fettsäure gebracht, mittels einer Schlaufe entnommen und in obigen Puffer aufgenommen werden.

#### **7.3.5. BR-Isolierung**

Die Isolierung der Purpurmembran erfolgte entsprechend der Methode von Oesterhelt & Stoeckenius<sup>[193]</sup>. Für die Punktmutante Asp 85 Thr wurden einige Veränderungen des Protokolls vorgenommen (siehe unten)

#### **7.3.6. BR-Wildtyp**

S9 Zellen wurden in Gegenwart von DNase über Nacht gegen bidestilliertes Wasser dialysiert. Nach zentrifugation des Lysats bei 4 °C (Sorval, SS-34, 20 krpm, 30 min), wurde der Überstand (zytosolische Fraktion) verworfen und das Pelett in möglichst wenig bidestilliertem Wasser resuspendiert. An die Homogenisierung von Hand schloß sich erneut (siehe oben) eine Zentrifugation an. Das Pellet wurde vorsichtig resuspendiert, ohne die bräunlichen Membranfragmente an der Pelletunterseite mit aufzunehmen. Dieser Schritt wiederholte sich bis das PM-Pelett keine braunen Anteile mehr aufwies (2-3 mal) und der Überstand farblos war. Die Resuspendierung des erhaltenen Peletts erfolgte in einem möglichst geringen Volumen bidestilliertem Wassers und die Suspension wurde auf kontinuierliche Saccharose-Gradienten (25-45% w/w) verteilt. Die anschließende Ultrazentrifugation erfolgte bei 9 °C (TST-28, 25 krpm, 14 Stunden) Die PM erschien als stark violett gefärbte Bande im unteren Drittel des Gradienten mit einer Schwimmdichte von 1.2 g/ml. Nach Fraktionierung der Gradienten wurde die PM über Nacht unter Rühren gegen bidestilliertes Wasser dialysiert, wobei das Wasserreservoir mindestens einmal durch frisches Wasser zu ersetzen war. Das Dialysat wurde abschließend bei 4 °C (Sorval, SS-34, 20 krpm,



30 min) zentrifugiert und die so erhaltene, gereinigte PM bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 7.3.7. BR-Kristallisation nach "klassischen" Methoden

Zur Kristallisation des Bakteriorhodopsin Wildtyps als auch der hier untersuchten Mutanten wurde eine nahezu quantitative primäre Solubilisierung in Gegenwart von Triton X-100 durchgeführt, an die sich ein Detergenzaustausch gegen  $\beta$ -D-Oktylglucopyranosid anschloß. Diese Abfolge gewährleistet eine maximale Ausbeute solubilisierter BR's sowie durch den anschließenden Detergenzwechsel die Verwendung eines chemisch einheitlichen Agens. Zur Wechsel sowie zur Abtrennung weiterer Proteineverunreinigungen schloß sich eine Immobilisierung der BR-Detergenzmizelle an einen schwachen Anionenaustauscher sowie ein ausgiebiger „Waschschritt“ an. Die so erhaltene BR-Fraktion wurde durch Salzzugabe fraktioniert eluiert, so daß im Anschluß lediglich die Anteile mit einer BR-Konzentration größer 20 mg\*ml<sup>-1</sup> für weiteren Kristallisationsexperimenten Verwendung fanden. Letzteres Vorgehen reduziert die Versuchszeit und, weit wichtiger, verhindert die unkontrollierte Detergenzanreicherung in der sonst notwendigen Konzentrierung des Proteins.

Die Kristallisationsversuche wurden im sitzenden Tropfen (sitting drop) Verfahren bei 4 °C unter schwachem Licht bzw. Lichtabwesenheit durchgeführt. Die durchgeführten Experimente erfolgten in Gegenwart sättigender Konzentrationen von Benzamidin oder Cystein mit dem Präzipitanz Ammoniumphosphat. Reinigung und Kristallisation erfolgten mit geringfügigen Änderungen gemäß der Methode von G. Schertler<sup>[194]</sup> sowie R. Siebert<sup>[195]</sup>.

#### 7.3.7.1. Primärsolubilisierung

Das zweidimensionale Kristallgitter der Purpormembran (nur diese Membranfraktion wurde im weiteren verwendet) birgt neben dem Vorteil der schnellen Isolierung den Nachteil nur unter vergleichsweise extremen Bedingungen Detergenzmizellen zu bilden. Um eine möglichst große Ausbeute an Solubilisat zu erhalten bot sich die Verwendung von Triton X-100, einem nichtionischen Detergenzes mit einem hydrophilen Polyetherende, an. Die Nutzung anderer, ausschließlich milder nichtionischer Detergenzien wurde zwar mehrfach untersucht, ergab jedoch bis auf die Mutante D 85 T keine befriedigenden Ausbeuten solubilisierter Proteins. Eine 1 % ige Triton X-100 Lösung in 25 mM Na/K-Phosphatpuffer (pH = 5,6) wurde im Verhältnis 4/1 (v/v) mit ca 120 mg PM vermischt und 14 bis 16 h bei 34 °C unter Lichtausschluß gerührt. Die Mischung wurde anschließend mindestens 30 min zentrifugiert (Beckmann, TI45, 50 krpm, 16 °C) und der Überstand vorsichtig vom Pellet abgetrennt.



### 7.3.7.2. Detergenzwechsel

Das Solubilisat wurde auf eine zuvor gepackte äquilibrierte Säule des schwachen Anionenaustauscher DEAE-Sephacel bei geringem Volumenstrom aufgetragen. Das Säulenmaterial wurde zuvor ausgiebig in 25 mM Na/K-Phosphatpuffer (pH = 5,6) gewaschen, anschließend in gleichem Puffer in Gegenwart von 1 % Triton aufgenommen. Nach der Säulenpräparation (Säuleninnendurchmesser 2 cm, Säulenbetthöhe 1 cm) erfolgte eine Äquilibrierung des Austauschers mit 10 mL Triton-haltigen Puffers bei konstantem Volumenstrom (5-10 mL\*h<sup>-1</sup>). Die Probenauftrag auf die lichtgeschützte Säule erfolgte bei gleichem Volumenstrom. Nichtbindende Anteile wurden verworfen. Im Anschluß erfolgte ein Waschriff (50 mL) mit gleichem Puffer in Gegenwart von 0,5 % (w/w) OG zur Erzielung eines möglichst vollständigen Detergenzwechsels. Der Waschriff hat neben der Abreicherung von Proteinverunreinigungen eine Abreicherung von Membranlipiden zur Folge. Aus diesem Grund war das Volumen an Waschriff über verschiedene Versuche konstant zu halten. Zur Kontrolle des Tritonanteils wurden die Absorptionsänderungen bei 280 nm photometrisch ermittelt. Die Elution des gebundenen BR's erfolgte durch den Wechsel auf den gleichen Waschriff mit einer zusätzlichen Stoffmengenkonzentration von 150 mM Natriumphosphat bei schwachem Licht. Das gefärbte Eluat wurde in Fraktionen zu 0,5 bis 1.0 mL gesammelt und photometrisch die BR-Konzentration bestimmt. Für weitere Kristallisationsversuche wurden nur die Fraktionen mit einer BR-konzentration größer 20 mg\*mL<sup>-1</sup> verwendet. Auf dem Säulenkörper verbliebene BR-Anteile wurden ebenfalls verworfen. Von hier an erfolgte die Lagerung der Solubilisats bei 4 °C.

### 7.3.7.3. Kristallisationsversuche

Die BR Kristallisationsversuche via Dampfdiffusion erfolgten im Verfahren des sitzenden Tropfens. Bei konstanter Proteinkonzentration wurden die Anteile an Benzamidin oder Cystein im Tropfen sowie dessen pH-Wert systematisch verändert. Die Boden- oder Präzipitanzlösung bestehend aus Natriumacetat gepuffertem Ammoniumsulfat wurde ebenfalls in ihrem Salzgehalt variiert.

Zu diesem Zweck wurden die BR-Fraktionen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zu 20 mg\*mL<sup>-1</sup> mit dem gleichen Volumen an 3 M Natriumphosphatlösung (pH-Bereich 5,2 bis 5,8 in pH-Schritten zu 0,1 variiert) vermischt und mit 8 % (w/w) Benzamidin oder Cystein versetzt. Letztere Anteile überschreiten in jedem Fall das Löslichkeitsprodukt an Benzamidin bzw. Cystein in der Mischung. Die Suspensionen wurden vorsichtig gemischt und anschließend bei 4 °C o/n unter Lichtausschluß gelagert. Unter diesen Bedingungen bildeten sich Kristalle an Benzamidin bzw. Cystein. Diese wurden via Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, 30 min, 4 °C, 14 krpm) abgetrennt. Nach sorgfältiger Fraktionierung des Überstands konnte das BR direkt in Tropfen zu 20µL gegen 1 mL Tropfen 1,8 bis 2,3 M Ammoniumsulfat



Präzipitanzlösungen in Kristallisationsschalen eingesetzt werden. Die Bodenlösung enthält zusätzlich 0,2 M Zitronensäure/NaOH-Puffer im pH-Bereich 4,0 bis 6,0. Die Lagerung der Ansätze erfolgte unter Lichtausschluß bei 4 °C.

Die Optimierung der jeweiligen Kristallisationsbedingungen basierte auf einem sogenannten "grid-screening"-Verfahren. Hierzu wurden systematisch die pH-Werte der Proteinlösung, der Bodenlösung sowie der Präzipitanzkonzentration in der Bodenlösung verändert. An das erfolgreiche Absuchen des Rasters in Variationen von 0,2 für den pH sowie 0,5 für die Präzipitanzkonzentrationen schloß sich ein feineres Raster in 0,1 Schritten für beide Parameter an.

### 7.3.8. BR-Kristallisation in artifiziellen Membransystemen

Kristallisationsversuche von Bakteriorhodopsin-Wildtyp sowie der Mutanten D 38 R und D 96 N wurden ähnlich dem HR auch auf der Basis artifizieller Membransysteme, den bikontinuierlichen kubischen Lipidphasen, unternommen. Weitere Bemerkungen zur Methode sind deshalb unter HR-Kristallisation(s. S. 120) vermerkt.

#### 7.3.8.1. Solubilisierung

BR wurde sowohl durch Behandlung in Triton X-100 solubilisiert (siehe S. 120), als auch durch Sonifikation in Gegenwart des Detergenzes OG. Dazu wurde die PM in einem Volumen des BR-Puffer 1 resuspendiert, so daß sich ein Massenverhältnis von w(Detergenz) zu w(Protein) von 20/1 ergab (Bsp.:wenn von 20 mg BR ausgegangen wurde, mußten 400 mg OG vorliegen (dies entsprach mit  $M(\text{OG}) = 294,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  etwa  $n = 1,5\cdot 10^{-1} \text{ mol}$ ). Die PM-Suspension wurde in ein Pyrex-Röhrchen überführt und bei 0 °C in 10 - 15 min-Intervallen beschallt (Branson Sonifier - Cell Disruptor B 15 -; pulsed: 50 %, output control: 5). Die Beschallung war fortzuführen, bis ein konstantes Absorptionsmaximum (bei ca 560 nm) sowie ein Minimum des Lichtstreuanteils im UV/VIS-Spektrum resultierte (für Wt etwa 30-40 min). Anschließend erfolgte die Abtrennung nicht solubilisierter Anteile via Zentrifugation (Ti45-Röhrchen, 1 h,  $2\cdot 10^5 \text{ g}$ ). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Solubilisierungsausbeute über die BR-Konzentration photometrisch bei 550 nm bestimmt ( $\epsilon = 5,8\cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ). Zur weiteren Verwendung wurde das Solubilisat auf BR-Konzentrationen oberhalb  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  konzentriert (5 kDa cutt-off).

#### 7.3.8.2. Reinigung

Anfänglich (zur Reproduktion der Daten von Landau et al196) wurden weitere gelchromatographische Reinigungsschritte eingefügt. Dazu wurde das Solubilisat möglichst konzentriert auf eine in Puffer (BR-Puffer 1) äquilibrierte Gelpermeationssäule in  $200 \mu\text{L}$ -



Volumina aufgetragen. Als Säulenmaterialien fanden entweder BioGel A-0.5 (Säule ist zu präparieren) oder Superose12 Verwendung. Die Trennungen wurden bei einem Volumenstrom von 12 mL\*h<sup>-1</sup> gefahren.

#### 7.3.8.3. Kristallisationsversuche

Die nachfolgenden Schritte erfolgten bei 22 C. Das BR-Solubilisat ( $C_{BR} > 12 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) wurde nach Einwaage von 5-7 mg Lipid in Endkonzentrationen zu 3-4 mg\*ml<sup>-1</sup> BR mit BR-Puffer 1 verdünnt. Das Optimum der Proteinkonzentration lag für die hier angegebenen Salzkonzentrationen und Lipidanteile bei 3,2-3,5 mg\*mL<sup>-1</sup>. Der Lipidanteil wurde zwischen 55 und 65 % (w/w) systematisch bei entsprechend verändertem Wasseranteil variiert. Nach Präparation der kubischen Phase, wurden feste Mengen eines Na/K-Phosphat-Gemisches eingetragen, so daß Salzendkonzentrationen von 2,0 - 3,5 M vorlagen. Das verwendete Salzgemisch bestand aus einer ungemörserten Mischung von Di-Natriumhydrogenphosphat und Kalium-di-hydrogenphosphat (Sörensen-Salz) mit einem Lösungs-pH von 5,6. Das feste Salz wurde abschließend durch eine etwa 30 minütige Zentrifugation am Boden des Röhrchens gesammelt. Die Röhrchen wurden sorgfältig verschlossen (um einen Gasphasenaustausch mit der Umgebung zu verhindern). Die Herstellung der kubischen Lipidphase ist auf der S. 120 näher beschrieben.

#### 7.3.9. Isolierung archaealer Lipidfraktionen

Es können ganze Zellen oder Membranfraktionen eingesetzt werden, wobei der jeweilige Wassergehalt möglichst genau bekannt sein sollte. die Zellen /Membranfraktionen wurden unter Berücksichtigung des schon enthaltenen Wassers in einer Mischung von Chloroform/Methanol/Wasser : 26/53/21 (v/v) 2 min homogenisiert {100 mLCCl<sub>3</sub>H/200 mL MeOH/80 mL H<sub>2</sub>O}. Zu der Mischung wurde soviel Chloroform gegeben, das sich ein Mischungsverhältnis von 55/31/14 ergibt. Nach 30 s Schütteln der Emulsion (Scheidetrichter) {350 mLCCl<sub>3</sub>H/200 mL MeOH/80 mL H<sub>2</sub>O} erfolgte die Zugabe von bidest. Wasser, so daß ein Mischungsverhältnis von 41/24/35 erreicht wurde. Nach weiteren 30 s emulgieren. {350 mLCCl<sub>3</sub>H/200 mL MeOH/300 mL H<sub>2</sub>O}. schloß sich zur erleichterten Phasentrennung eine Zentrifugation über 5 min (Sorvall, GS3, 3000 rpm) in Alu-Gefäßen an. Zur Abrennung unlöslicher Bestandteile wurde die in zwei Phasen zerfallene Mischung über einen Faltenfilter in einen Scheidetrichter gegeben und die Phasentrennung abgewartet (eventuell erneute Zentrifugation). Die Chloroformextraktion der Wasser/Methanol-Phase sollte 2-3 mal wiederholt werden. Zur Lipidisolierung wurden die Chloroformphasen (untere Phase) vereinigt, das Volumen bestimmt (Standzylinder), über Natriumsulfat getrocknet und abschließend in einen tarierten Rundkolben filtriert. Nachdem am Rotationsverdampfer zur Trockene wurde, konnte das Lipid bis zu seiner Verwendung bei -20 C gelagert werden.

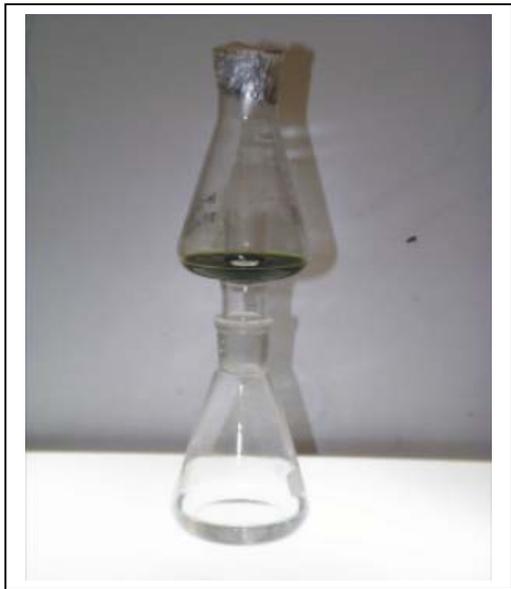


### 7.3.10. Herstellung und Isolierung isotopenmarkierten BR's

#### 7.3.10.1. Herstellung isotopenmarkierten Algenmediums

Für die Zucht halobakterieller Kulturen spezifischer Isotopenmarkierung wurden eigens präparierte Aminosäurehydrolysate der Grünalge *Scenedesmus obliquus* (*S. obliquus*) eingesetzt. Da das Ziel in der Präparation zweier verschiedenener Markierungsmuster ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  oder  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ) an BR bestand, mußten die entsprechenden Isotopenmuster schon in die Kultur von *S. obliquus* eingebracht werden. Als Vorkultur dienten für beide Markierungsmuster unmarkierte *S. obliquus*-Zellen.

Dazu wurden 50 mL des Algenmediums 1 in Doppelstockkolben vorgelegt (siehe Abb, oberes Reservoir) und unter sterilen Bedingungen beimpft.



In das untere Reservoir wurden 100 mL eines sterilen Kaliumcarbonat-Puffers überführt. Die Grünalgen Kultur wuchs photoautotroph bei 30 °C, 60 rpm unter kontinuierlicher Belichtung 12 bis 14 Tage in verschlossener Apparatur.

Aus den so erhaltenen Vorkulturen wurden unmarkierte Medien direkt mit 4 mL angeimpft während zu deuterierende Kulturen schrittweise an das schwerere Isotop Anpassung fanden. Um einen möglichst vollständige Deuterierungsgrad zu erreichen wurden die Mediensalze mehrmals in schwerem Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Für die  $^{13}\text{C}$ -Markierung wurde anstelle des herkömmlichen Kaliumcarbonat Puffers ein  $\text{K}_2^{13}\text{CO}_3$ -Puffer verwendet. Die präparative Fermentation der Algen erfolgte in den entsprechenden Medien in 12 L-Fermentern, die im Verhältnis 1/10 beimpft wurden.  $^{13}\text{C}$  markierte Medien wurden in einem geschlossenen System diskontinuierlich mit  $^{13}\text{CO}_2$  begast, während die „herkömmlichen“  $^{12}\text{C}$  Medien unter kontinuierlicher Begasung mit synthetischer Luft (5 %  $\text{CO}_2$ ) fermentiert wurden.

Die Kulturen wuchsen je nach Markierungsmuster 14 bis 21 Tage bei 30 °C unter permanenter Belichtung. Das Zellwachstum wurde durch tägliche Messung der optischen Dichte bei 800 nm ( $\text{OD}_{800}$ ) verfolgt. Die Zellernte erfolgte über ein steriles Filtersystem, wobei das Filtrat wieder in den Fermenter zurückgeführt wurde. Zu diesem Zweck wurden jeweils 1 L der Ausgangskultur als Inoculum im Fermenter belassen. Auf diese Weise konnten 4 bis 5 Wachstumszyklen der Grünalge mit dem gleichen Nährmedium erreicht werden.

Die lyophilisierten Algen eines Markierungsmusters wurden vereinigt (65,7 g  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ; 54,7 g  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) und anschließend in drei Schritten nach Soxhlett mit Hexan, Chloroform und



letztlich Methanol(20%)/Chloroform jeweils 14 bis 16 h extrahiert. Das Lösemittel der erhaltenen Extrakte wurde destillativ entfernt und das Extrakt bei  $-20\text{ C}$  gelagert. Vor dem Lyophilisieren und Aufschluß des Rückstandes wurde dieser noch in einem Methanol-Überschuß aufgenommen. Der saure Aufschluß des Extraktionsrückstandes ( $56,9\text{ g }^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ ;  $51,4\text{ g }^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ ) erfolgte in  $1,2\text{ L } 1\text{ M HCl (DCI)}$  erfolgte über 48 am Rückfluß. Anschließend wurde die Suspension über Aktivkohle filtriert, mit Natronlauge (NaOD) neutralisiert und letztlich das Lösemittel an der Lyophile weitestgehend abgetrennt. Die so erhaltenen spezifisch markierten Peptid/Zucker/Salz-Gemische dienten als „Pepton“ für die anschließende Halobakterien Fermentation.

Zu diesem Zweck wurde der Aminosäureanteil des Peptons durch titrimetrische Salzbestimmung ( $44,0\text{ g Pepton resp. } 12,9\text{ g NaCl für } ^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ ;  $38,7\text{ g Pepton resp. } 11,45\text{ g NaCl } ^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ ) bestimmt.

#### 7.3.10.2. Herstellung isotopenmarkierten Algenmediums

Für  $1\text{ L}$  Deuterium markierte Medien wurden  $4,22\text{ g } ^2\text{H}$ -markierte Aminosäuren mit den Salzen für Isotopenmarkiertes Halobakterienmedium 1vermischt und in  $750\text{ mL D}_2\text{O}$  aufgenommen. Zu dieser Lösung kamen  $7\text{ mL}$  des isotopenmarkierten Halobakterienmediums 2,  $70\text{ }\mu\text{L}$  des isotopenmarkierte Halobakterienmediums 3 sowie  $35\text{ }\mu\text{L}$  der Vitaminlösung. Die erhaltene Lösung wurde steril filtriert ( $0,45\text{ }\mu\text{m}$  Ausschlußgröße) und auf einen pH-Wert von  $6,8$  (effektiv  $+0,4\text{ pH-Einheiten}$  auf grund des Isotopeneffektes) mit DCI eingestellt. Die Halobakterienfermentation erfolgte zu  $750\text{ mL-Kulturen}$  in zuvor sterilisierten  $3\text{ L-Erlenmeyerkolben}$  bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  und  $100\text{ rpm}$  im Dunkeln. Die Zucht deuterierter Kulturen verlief über einen Zeitraum von 2 bis 3 Wochen, wobei als Indikator der Wachstumsphase in regelmäßigen Abständen die  $\text{OD}_{800}$  diente.

Mit dem Ziel Bakteriorhodopsin mit  $^1\text{H}$ -markiertem Chromophor zu isolieren, wurde der retinaldefiziente Stamm JW5 verwendet. Die Komplementierung des Mediums mit all-trans Retinal setzte nach dem Anwachsen der Kulturen (2 bis 4 Tage) ein. Von diesem Zeitpunkt an wurden die Kulturen jeweils mit  $7\text{ }\mu\text{mol}$  Retinal (iso-propanolische Lösung) in  $24\text{ h}$  Abstand versetzt. Der Chromophoreintrag wurde bei starkem „Schütteln“ der Kultur unterhalb der Medienoberfläche vorgenommen, um hohe lokale Konzentrationen des membraninsertierenden Retinals zu vermeiden.

Mit dem „Abflachen“ der logarithmischen Wachstumskinetik erfolgten in regelmäßigen Abständen Bestimmungen des PM-Gehaltes. Dazu wurden  $1\text{ mL}$  Proben der Kulturen entnommen und nach hypotonischer Lyse der Zellen der BR-Gehalt UV/VIS-spektrometrisch bei  $570\text{ nm}$  ermittelt.

Die weitere Isolierung der PM erfolgte mit den nachfolgend aufgeführten Änderungen wie unter 7.3.5 beschrieben. In der weiteren Aufarbeitung wurde zur Einführung austauschbarer



Protonen normales Wasser verwendet. Im Unterschied zur herkömmlichen PM-Isolierung wurde hier allerdings auf Grund der höheren Schwimmdichte ein Saccharose-Gradient von 45 bis 65 % (w/w) verwendet. Die PM-Fraktion dieser Gradienten wurde sorgfältig von ebenfalls violett gefärbten Fraktionen kleinerer Schwimmdichte, diese enthalten weitere Membranproteinverunreinigungen, abgetrennt und bis zur weiteren Verwendung nach Entfernen der Saccharose bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Ausbeuten: 132.3 mg  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markierte PM  
49.6 mg  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markierte PM

### 7.3.10.3. Probenpräparation für die NMR-Spektroskopie

Für die weitere Probenpräparation wurde die isotopenmarkierte jeweils solubilisiert und nach Auftauen der PM bei Raumtemperatur die Probenkonzentration nochmals UV/VIS-spektroskopisch bei 560 nm bestimmt (128.52 mg  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ). Zur Solubilisierung wurde jeweils ein Probenaliquot (2.4 mL  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , 1.3 mL  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) mit folgenden Additiven des Solubilisierungspuffers vermischt:

Chemikalien	$^2\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ -markierte PM			$^2\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -markierte PM		
	Additive 1	Additive 2	Solubilisierungs-Puffer	Additive 1	Additive 2	Solubilisierungs-Puffer
PM	44 mg	-	-	25 mg		
DM	1200 mg	-	0.9 %			
Phosphat	240 $\mu\text{L}$	-	9.1 mM			
D <sub>2</sub> O	1.2 mL	-	9.1 %			
H <sub>2</sub> O	-	9.6 mL	90.9 %			
V <sub>ges</sub>	3.6	9.6	13.2			

PM: Purpurmembran, DM:  $\beta$ -D-Dodecyl-d<sub>25</sub>-maltosid, Pi: Na/K-Phosphatpuffer (pH = 5.6)

Die Solubilisierungsmischung wurde in Corex-Glasröhrchen (12 mL) überführt und diskontinuierlich sonifiziert (Branson Sonifier, CELL DISRUPTOR B 15, pulsed 50 %, output control 3). Der Justierung der Schallmitterspitze (konische Mikrospritze) erfolgte derart, daß keine Schaumbildung auftritt. Nach 30 –40 min Sonifikation im Wasserbad konnten im UV/VIS-Spektrum keine Steuanteile bei nativer Probe mehr identifiziert werden und die Beschallung wurde abgebrochen. Zur Abtrennung nicht solubilisierter Bestandteile schloß sich ein Ultrazentrifugationsschritt an (Ti 50, 10 C, 80 kg), und der erhaltene Überstand wurde bei 10 C auf jeweils auf ein Endvolumen von 0.5 mL konzentriert (Pall Filtron Macrosep bzw. Microsep, 50 kD Ausschlußvolumen; Sorval SS34, 5 kg) und die Probenkonzentration bzw. Ausbeute bei 560 nm bestimmt (80 %  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Solubilisat, ). Die  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  Probe enthielt 48.7 mg



### 7.3.11. Spektroskopische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden spektroskopische Untersuchungen an BR- und HR-Kristallen als auch an entsprechenden Proteinlösungen unternommen. Je nach Meßprinzip und Aggregatzustand fanden die Messungen bei Raumtemperatur oder bei definierten tieferen Temperaturen statt. Nachfolgend sind die experimentellen Parameter für die diversen spektroskopischen Methoden mit Ausnahme der Röntgenstrukturanalysen aufgeführt. Letztere Messungen wurden an diversen Meßstationen entweder am DESY<sup>[197]</sup> oder am ESRF<sup>[198]</sup> vorgenommen. Die experimentellen Bedingungen (Standort, apparativer Aufbau) sind via Internet einzusehen<sup>[199]</sup>. Die weiteren kristallographischen Parameter der ausgewerteten Datensätze wurden in den entsprechenden Ergebnisteilen dieser Arbeit besprochen und darüberhinaus ist im Anhang eine tabellarische Aufstellung sämtlicher Datensätze beigefügt. Eine kurze Einführung in die Grundlagen der verwendeten kristallographischen Methoden ist in der Einleitung zu finden.

#### 7.3.11.1. UV/VIS-Spektroskopie

Zur Identifizierung und Konzentrationsbestimmung sowie für die Titration der Punktmutante T111V (HR) wurde eine UV/VIS-Spektrometer des Typs Lambda 2 von Perkin Elmer verwendet. Etwaige weitergehende Bearbeitung der Daten erfolgte mit den Programmen Excel oder Microcal Origin. Für die Konzentrationsbestimmung der lichtstreuenden Membranproben wurde eine angepasste Funktion des Typs  $k \cdot \lambda^{-4}$  abgezogen.

Für den Vergleich der UV/VIS-spektroskopischen Daten (kinetisches Einfangen von Zyklusintermediaten, Kinetik des Intermediatzerfalls) wurden Vergleichsmessungen an OG-solubilisierten Proben bei den entsprechenden Temperaturen ermittelt. Die Anregung der Proben erfolgte mit einem Excimer-gepumpten Farbstofflaser (EMG 53 MSC und FL 3001) der Firma Lambda Physik. Die Detektion des Meßlichtes (50 W Halogenlampe) erfolgte nach Beugung an einem Gitter mit einem Dioden-Array (32 Kanäle im Wellenlängenbereich 340 bis 760 nm).

Die Aufnahme der Tieftemperaturspektren an Proteinkristallen erfolgte anfangs mit einem mobilen Mikrospektralphotometer nach Hajdu<sup>[200]</sup> später mittels eines fest installierten Mikrospektralphotometers der Firma Zeiss (Jena). Das Hajdu'sche Spektrometer, das lediglich eine optische Einheit der Bauteile Kondensator, Probenhalterung, Lochblenden, Monookular und Objektiv darstellt, wurde durch eine Lichtquelle (100 W, Oriel Instruments) und einen Detektor (Princeton Applied Research, Model 1235, Digital Triple Grating Spectrograph) vervollständigt. Ein Laser des Typs Quanta Ray (Spectra Physics) diente zur Initiation des Photozyklus bei Raumtemperatur. Zur Erzeugung der Tieftemperaturintermediate kamen verschiedene weitere Lasersysteme zur Anwendung. Zu Beginn der lichtinduzierten Experimente wurden ein Nd:Yag Laser (532 nm, 10 mW) sowie ein HeNe



Laser (633 nm, 15 mW) verwendet. Im weiteren Verlauf dieser Doktorarbeit erfolgte ein Wechsel auf ein kompaktes Multiline Argon-Krypton Lasersystem (11 Wellenlängen zwischen 467 und 752 nm, Leistung zwischen 4 und 20 mW).

Die Justierung definierter Temperaturen erfolgte mit Hilfe eines 600 Series Cryostream Cooler (Oxford Cryosystems).

#### 7.3.11.2. FTIR-Spektroskopie

Die FTIR- und Resonanz-Raman-spektroskopischen Experimente fanden in Zusammenarbeit mit Dr. Joachim Heberle und seiner Gruppe am Kernforschungszentrum Jülich statt. Für die FTIR-Spektroskopie wurde ein eigens zur Untersuchung von Mikrokristallen konstruiertes Mikrospektralphotometer verwendet. Der Aufbau dieses Spektrometers ähnelt dem Zeiss-Mikrospektralphotometer (Abb. 31), wobei zur Kühlung der Kristalle ebenfalls ein 600 Series Cryostream Cooler (Oxford Cryosystems) Verwendung fand.

Für die Mikroresonanz-Raman Untersuchungen wurde ein Gerät der Firma Bruker verwendet. Zur Messungen wurden die Kristalle zusammen mit der Lipidmatrix zwischen zwei Objekträgern fixiert und bei Raumtemperatur entweder mit Licht der Wellenlängen 458 nm, 568 nm oder 752 nm angeregt.

#### 7.3.11.3. Proteinkristallographische Methoden

##### 7.3.11.3.1. Datensammlung

Für die röntgenographische Analyse wurden BR-Kristalle der Punktmutante D38R (nach Schertler) sowie HR-Kristalle (Wildtyp und Punktmutanten) nach der Methode der kubischen Lipidphasen verwendet. Die BR-Kristalle (nach Schertler) wurden nach der Isolierung mittels einer Nylonschlaufe in einen Cryo-Puffer (4 M Ammoniumsulfat, pH =5,6) überführt und bei 100 K schockgefroren<sup>[201]</sup>.

Zur Präparation der Mikrokristalle aus der kubischen Lipidphase wurden ebenfalls Nylonschlaufen verwendet. Die Isolierung der Kristalle aus den gelartigen Lipidphasen erfolgte, falls notwendig, mit Hilfe eines Mikro-Bestecks (Micro-Tools, Hampton Research). Zur Datensammlung wurden die Kristalle bei 100 K oder 77 K ohne weitere Behandlung schockgefroren.

Die Datensammlung erfolgte (soweit nicht anders vermerkt) bei 100 K mit Drehwinkeln im Bereich von 0,3 bis 0,5 °. Sowohl die Suche nach geeigneten Kristallen als auch die Sammlungen der Daten fanden entweder an der BW6 (HASYLAB, DESY, Hamburg) oder am ESRF (ID14/1, ID14/3, ID09, Grenoble, Frankreich) unter Verwendung von CCD-Detektoren (MarResearch, Hamburg oder ADSC, Quantum) statt. Für die weitere Datenprozessierung wurden jeweils „vollständige“ Datensätze eines Kristalls verwendet



#### 7.3.11.3.2. Daten-Indizierung, -Integration und Datenreduktion

Für die Bestimmung der Raumgruppe, der Zellparameter der Kristallorientierung sowie zur Integration und Skalierung der Daten wurden die Programme MOSFLM6.0/SCALA<sup>[202]</sup> oder DENZO/Scalepack<sup>[203]</sup> verwendet. Das Programm TRUNCATE wurde zur weiteren Datenreduktion eingesetzt.

#### 7.3.11.3.3. Molekularer Ersatz

Für das Suchmodell des molekularen Ersatzes fand das BR-Model 1BRR<sup>[204]</sup> nach Modifikation Verwendung. Dazu wurden im Suchmodell die Aminosäuren in 34 Positionen durch die entsprechende HR-Sequenz substituiert, sowie 69 Reste gegen Alanin unter Verwendung des Programms INSIGHTII (Molecular Simulations) ausgetauscht. Das gesamte Suchmodell bestand aus insgesamt 188 Aminosäuren (Reste 9 bis 67, 78 bis 152 und 167 bis 223), d. h. 78 % der letztlich im HR-Monomer gefundenen Reste. Für die Phasierung (Translationssuche, Rigid-Body Verfeinerung, Simulated-Annealing und Torsionswinkelverfeinerung) mittels CNS<sup>[205]</sup> ergab sich eine Lösung mit einem R-Faktor von 40,3 (freier R-Faktor 43,7). Nach weiterer Modellverfeinerung, unter Hinzunahme der Schleifenbereiche und der HR-Sequenz, konnte das Modell über eine durchgehende Polypeptidkette (Aminosäuren Alanin 24 bis Alanin 262) bis auf einen R-Faktor von 23,7 (freier R-Faktor 25,7) verfeinert werden. Die Kontrolle der Bindungswinkel und -längen mit PROCHECK<sup>[206]</sup> ergab keine anomalen Abweichungen. Zum Modellbau (Einpaßen des idealisierten atomaren Modells in die Elektronendichte) wurden die Programme O<sup>[207]</sup> oder MAIN<sup>[208]</sup> verwendet. Zielfunktion war dabei die Minimierung der R-Faktoren.

#### 7.3.11.3.4. Laue Diffraktionsstudien

Zu diesem Zweck wurden HR-Kristalle bei 100 K 1.4 ms mit polychromatischer Röntgenstrahlung im Wellenlängenbereich 0,70 – 0,79 Å belichtet. Die Einstellung der Strahlbegrenzer (slits) entsprach mit 0,1 mm \* 0,1 mm in etwa der Größe der verwendeten Kristalle.

#### 7.3.11.3.5. Graphische Darstellungen

Für die graphische Aufbereitung der Strukturdaten wurden die Programme MolScript v2.1<sup>[209]</sup>, Raster3D<sup>[210]</sup>, BobScript<sup>[211]</sup>, MolMol<sup>[212]</sup>, PovChem v2.1<sup>[213]</sup>, Pov-Ray<sup>[214]</sup>, Mega-Pov, Grasp<sup>[215]</sup> verwendet.



## 8. Abkürzungen und Symbole

Å	Ångström
2-d	2-dimensional
3-d	3-dimensional
AS	Aminosäure
BR (bR)	Bakteriorhodopsin, (Ausgangszustand Photozyklus)
c	Konzentration
Car	Carotinoid
d. a.	dunkeladaptiert
DHB	Di-hydroxybenzoesäure
DM	β-D-Dodezylmaltosid
ec	extrazellulär
EM	Elektronenmikroskopie
EM	elektromagnetisch
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
<i>H. salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatography (High-Performance-LC)
HR (hR)	Halorhodopsin, (Ausgangszustand Photozyklus)
HR-PM	Halorhodopsin-Purpurmembran
kDa	Kilodalton
l. a.	lichtadaptiert
MO	Monoolein- <i>rac</i> -Glycerol
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
OG	β-D-Oktylglykopyranosid
PA	Phosphatidylarchaeol
PG	Phosphatidylglycerol
PGP-ME	Methyl-Phosphatidylglycerolsulfat
PGS	Phosphatidylglycerolsulfat
PM	Purpurmembran
PSB	protonierte Schiff Base
Ret	Retinal
RH	Rhodopsin
rpm	Umdrehungen pro Minute (round per minute)
RR	Resonan-Raman
RSA	Röntgenstrukturanalyse
Rt	Raumtemperatur



---

Rub	Ruberin
SB	Schiff Base
SRI (sRI)	Sensorrhodopsin I, (Ausgangszustand Photozyklus)
SRII (sRII)	Sensorrhodopsin II, (Ausgangszustand Photozyklus)
S-TGA-1	sulfatisiertes Triglycosylarchaeol
S-TeGA-1	sulfatisiertes Tetraglycosylarchaeol
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VIS	visible
VP	Visual Pigment
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
Wt	Wildtyp
zp	zytoplasmatisch (Zytoplasma)
$\varepsilon$	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
$\lambda$	Wellenlänge



## 9. Anhang

## 9.1. Zusammenfassung der FT-IR und Mikro-Resonanz-Raman Daten

## 9.1.1. Resonanz-Raman Schwingungsbanden am Kristall bei 568 nm

Wellenzahl/cm-1	Modus	Bemerkung
1633	$\nu_{C=NH}$	Streckschwingung der PSB in D <sub>2</sub> O nach 1623 cm <sup>-1</sup> verschoben bei Austausch von Cl <sup>-</sup> gegen NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> nach 1642 cm <sup>-1</sup> verschoben
1616	?	?
1596	$\nu_{C=C}$	Streckschwingung der C(5)=C(6) Doppelbindung Unabhängig von Cl <sup>-</sup> Konzentration
1574	$\nu_{C=C}$	Streckschwingung der C(7)=C(8) Doppelbindung Unabhängig von Cl <sup>-</sup> Konzentration
1568	$\nu_{C=C}$	Streckschwingung der C=C Doppelbindungen im 410 Zustand, gilt auf Grund der starken Intensität als deutliches Indiz
1523	$\nu_{C=C}$	Streckschwingungen der Doppelbindungen von C(9) bis C(14) im all-trans Retinal mit niederfrequenter Schulter des 13-cis Anteils In Abwesenheit von Cl <sup>-</sup> nach 1530 cm <sup>-1</sup> verschoben
1449	?	breite Schwingungsbande, die durch D <sub>2</sub> O nach 1445 cm <sup>-1</sup> verschoben wird
1422	?	?
1374	?	von Deuterierung unbeeinflusst
1349	$\varphi_{N-H}$	in-plane Biegeschwingung der PSB wird durch D <sub>2</sub> O nach 968 cm <sup>-1</sup> verschoben
1321	?	Intensitätsabnahme in D <sub>2</sub> O Unverändert bei Wechsel auf NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
1301	?	von Deuterierung unbeeinflusst
1272	?	von Deuterierung unbeeinflusst



Wellenzahl/cm-1	Modus	Bemerkung
1255	?	Verschwindet in D <sub>2</sub> O oder NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
1208	?	wird all-trans Retinal zugeordnet
1200	?	wird all-trans Retinal zugeordnet
1185	?	wird a13-cis Retinal zugeordnet
1172		wird all-trans Retinal zugeordnet
1168	?	?
1136	?	?
1121	?	?
1048	?	?
1018	?	?
1005	$\varphi_{\text{C-CH}_3}$	In-phase Biegeschwingung der Methylgruppen an C(9) und C(13) des Retinals von Deuterierung unbeeinflusst
978	?	?
956	$\varphi_{\text{HC=CH}}$	gekoppelte out-of-plane Biegeschwingung der Wasserstoffe an C(11) und C(12)
897	?	?
880	$\varphi_{\text{C-H}}$	out-of-plane Biegeschwingung an C(14)-H
852	?	?
841	?	?

### 9.1.2. Liste der gesammelten Datensätze an HR-Kristallen

Datum	26.07.1999	Meßstation	BW6
Bezeichnung	pd274	pd274b	pd274bex
Maximale Auflösung / Å	2,8	2,4	2,7
Unabhängige Reflexe			
Multiplizität			



Vollständigkeit / %			
Zellparameter a, b / Å c / Å			
Raumgruppe	p6 <sub>3</sub> 22	p6 <sub>3</sub> 22	p6 <sub>3</sub> 22
Bemerkungen	unbelichtet	unbelichtet	Belichtet (532 nm)
<b>Datum</b>	<b>2.09.1999</b>	<b>Meßstation</b>	<b>ID14/3</b>
<b>Bezeichnung</b>	<b>pd283a</b>	<b>pd283aex</b>	<b>pd283aex2</b>
Maximale Auflösung / Å	1,8	1,9	2,25
Unabhängige Reflexe			
Multiplizität			
Vollständigkeit / %			
Zellparameter a, b / Å c / Å			
Raumgruppe	p6 <sub>3</sub> 22	p6 <sub>3</sub> 22	p6 <sub>3</sub> 22
Bemerkungen	unbelichtet	95K, kontinuierliche Belichtung mit 532 nm, 5 mW (direkt)	140 K, kontinuierliche Belichtung mit 532 nm, 5 mW (direkt), Messung bei 140 K
<b>Datum</b>	<b>2.09.1999</b>	<b>Meßstation</b>	<b>ID14/3</b>
<b>Bezeichnung</b>	<b>pd283h</b>	<b>pd283hex</b>	<b>pd283hex2</b>
Maximale Auflösung / Å	1,8	1,85	2,1
Unabhängige Reflexe			
Multiplizität			
Vollständigkeit / %			
Zellparameter a, b / Å c / Å			
Raumgruppe	p6 <sub>3</sub> 22	p6 <sub>3</sub> 22	p6 <sub>3</sub> 22
Bemerkungen	Unbelichtet*	120 K, kontinuierliche Belichtung mit 532 nm, 5 mW (direkt), Messung bei 120 K	160 K, Belichtung mit 532 nm, 5 mW (direkt), Messung bei 100 K ohne Licht
<b>Datum</b>	<b>2.09.1999</b>	<b>Meßstation</b>	<b>ID14/3</b>
<b>Bezeichnung</b>	<b>Pd283fex</b>	<b>fatty1</b>	<b>fatty1ex2</b>



Maximale Auflösung / Å	2,2	1,8	2,7
Unabhängige Reflexe			
Multiplizität			
Vollständigkeit / %			
Zellparameter a, b / Å c / Å			
Raumgruppe	p6 <sub>3</sub> 22	p6 <sub>3</sub> 22	p6 <sub>3</sub> 22
Bemerkungen	180 K, Belichtung mit 532 nm, 5 mW (direkt), Messung bei 100 K ohne Licht	160 K, Belichtung mit 633 nm, 15 mW (direkt), Messung bei 100 K ohne Licht	190 K, Belichtung mit 633 nm, 15 mW (direkt), Messung bei 100 K ohne Licht



## 10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Oesterhelt für das fortwährende Interesse und die immerwährende Unterstützung dieser Arbeiten. Sein Enthusiasmus und die zahlreichen Diskussionen und Anregungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Im weiteren möchte ich mich bei den vielen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben bedanken:

Dr. L.-O. Essen für die vielen fachlichen Diskussionen und die stetige Hilfe bei protein-kristallographischen Arbeiten

Für die Betreuung bei Synchrotronexperimenten Dr. H. D. Bartunik, Dr. G. P. Bourenkov, Dr. D. Kosciesza, und B. Fried (HASYLAB, Hamburg) sowie Dr. W. Burmeister, Dr. M. Wulff und Dr. F. Schotte (ESRF, Grenoble)

Mein ganz besonderer Dank gilt H. Besir für die vielen z. T. wissenschaftlichen Gespräche und die schöne Zusammenarbeit, ohne die diese Arbeit niemals zu diesem Ausmaß angewachsen wäre.

B. Kessler, Dr. H. Patzelt und S. Gronau für die Einführung in die halophile Welt wobei Frau B. Kessler mein besonderer Dank für die fortwährend produktive Zusammenarbeit gilt.

Dr. S. Paula, Dr. J. Tittor und G. Carlsson für die UV/VIS-spektroskopischen Experimente und Diskussionen

Dr. P. Schmieder, Prof. H. Oschkinat, B. Simon und Mario Schubert vom FMP/Berlin für die fruchtbare Zusammenarbeit auf dem Gebiet der NMR-Spektroskopie danken.

Prof. Dr. W. Gärtner und S. Berendsen für die hervorragende Einführung in den anfangs bizarren Umgang mit Vertebraten-Rhodopsin

Dr. habil. J. Heberle für die Zusammenarbeit bei FTIR-spektroskopischen HR Untersuchungen und die herrlich entspannten Diskussionen.

Dr. F. und Dr. M. Storch sowie dem gesamten "Großen Labor" für die tolle Zeit.

Ein spezieller Dank geht an Dr. H. Zischka für die vielen, vielen z. T. wissenschaftlichen Diskussionen. Es gilt: Wissenschaft muß Spaß machen!

Ebenfalls besonders gedankt sei Dr. J. T. Kaiser für das immer offene Ohr bei kristallographischen Fragen, die Einführung in das Programm Main

W. Gmelin, Dr. M. Pfeiffer für die Diskussionsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit

Herrn H. Schieffele für die Umsetzung so mancher Idee

Frau S. Haslbeck für die Herstellung von Unmengen an Nährmedien und die liebe Nachbarschaft



## 11. Lebenslauf

### **Michael Kolbe**

geboren am 23. September 1970 in München

Familienstand: ledig

#### Schul- und Berufsausbildung:

07. 1977 - 06. 1982	Grundschule in Heide, Schleswig-Holstein
07. 1982 - 06. 1988	Realschule in Heide, Schleswig-Holstein
07. 1988 - 01. 1991	Berufsausbildung zum Chemikant, Bayer AG, Brunsbüttel
08. 1991 - 06. 1992	Fachoberschule in Meldorf, Schleswig-Holstein

#### Studium:

08. 1992 - 08. 1994	Grundstudium der Chemie an der Universität-Gesamthochschule Paderborn
08. 1994	Vordiplom
08. 1994 - 08. 1997	Hauptstudium der Chemie an der Universität Hamburg
12. 1996	mündliche Diplomprüfung
02. 1997 - 08. 1997	Diplomarbeit zum Thema: "Kinetische Untersuchungen zur radikalischen Polymerisation von Alkyl(meth)acrylaten und Methacrylsäure im Lösemittel 1-Propanol" in der Gruppe von Prof. Dr. H.-U. Moritz am Institut für Technische und Makromolekulare Chemie der Universität Hamburg
02. 1997 - 07. 1997	Stipendium der Atotech GmbH Deutschland
14. 08. 1997	Abschluss als Diplom-Chemiker
seit Jan. 1998	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried), Abteilung Membranbiochemie, Prof. Dr. D. Oesterhelt

#### Berufsbezogene Nebentätigkeiten:

01. 1991 - 09. 1991	Tätigkeit als Chemikant, Bayer AG, Werk Brunsbüttel (Turmbiologie und Gasphasenoxidation),
02. und 11. 1995	studentische Hilfskraft in der Abteilung Lebensmittelchemie und Biochemie der Universität Hamburg (Analytik biogener Amine)



- 
03. 1995 - 04. 1995      Werkstudent bei der Bayer AG, Werk Brunsbüttel  
(Routineanalytik der MDI-Produktion)
02. 1997 - 12. 1997      Lehrtätigkeit als Dozent für Chemie und Biochemie an der  
Lehranstalt für Technische Assistenten in der Medizin am AK  
St. Georg in Hamburg
- WS 1997/98              Praktikumsassistent im physikalisch-chemischen Praktikum für  
Verfahrenstechniker an der Universität Hamburg
- WS 1997/98              Praktikumsassistent im anorganisch-chemischen Praktikum für  
Mediziner und Zahnmediziner an der Universität Hamburg



## 12. Abbildungsverzeichnis

1. *Abb. 1: Retinalkonfigurationen und Isomerisierung in archaealen (links) und eukaryotischen Rhodopsinen (rechts), unten: Bezifferungsnomenklatur des Retinals* ..... 8
2. *Abb. 2: Vergleich der Tertiärstrukturen der bis dato röntgenographisch charakterisierten Rhodopsine Halorhodopsin<sup>[11]</sup> (linke Spalte) und Bakteriorhodopsin<sup>[12]</sup> (mittlere Spalte) aus *H. salinarum*, Rhodopsin (rechte Spalte) aus Rind<sup>[13]</sup>; die Spalten zeigen von oben nach unten ähnliche Ansichten von der Seite auf die Helices A, B und C im Vordergrund liegend sowie der extrazellulären (Mitte) und der cytoplasmatischen bzw. intradiskalen Seite (unten)* ..... 9
3. *Abb. 3: Vergleichende Darstellung der vier archaealen Rhodopsine: Halo-, Bakterio-, Sensorrhodopsin I und Sensorrhodopsin II* ..... 12
4. *Abb. 4: Photozyklen der beiden archaealen Ionenpumpen Halorhodopsin, HR, (links) und Bakteriorhodopsin, BR, (rechts)- Die UV/VIS- und FTIR-spektroskopisch identifizierten Photozyklusintermediate sind jeweils durch die jeweiligen Absorptionsmaxima (Indizes) bzw. die in der Literatur üblichen Kürzel (Kreise) gekennzeichnet. Ebenfalls dargestellt sind die bis dato identifizierten Ionentransferschritte; Erläuterungen siehe Text.* ..... 13
5. *Abb. 5: Schematische Darstellung eines 2-dimensionalen Kristallgitters mit mehreren einfallenden (von links) und gebeugten Röntgenstrahlen unter einem Glanzwinkel  $\theta$ ;  $d$  gibt den Netzebenenabstand an.* ..... 21
6. *Abb. 6: Ewald-Konstruktion<sup>[92]</sup>; Erläuterungen siehe Text.* ..... 22
7. *Abb. 7: Schematische Auftragung des Atomstrukturfaktors  $f_{i,\theta}$  bzw. des für die thermische Vibration korrigierten Atomstrukturfaktors  $f_{i,\theta}T_{i,\theta}$*  ..... 23
8. *Abb. 8: Harker-Konstruktion: Jedem Reflex wird ein Kreis mit dem Radius  $|F_p|$  um den Ursprung (U) gezeichnet. Für jedes weitere Schwermetallderivat ergibt sich ein weiterer Kreis, versetzt um  $-F_{H1}$  ( $-F_{H2}$  etc.) mit dem Radius  $F_{PH1}$  ( $F_{PH2}$  etc.). Die resultierenden Schnittpunkte ( $P_1$  bzw.  $P_2$ ) markieren zwei mögliche Werte für die Phase  $\alpha_p$ . Nur durch Hinzunahme eines weiteren, unabhängigen Derivates kann eindeutig ein gemeinsamer Schnittpunkt (hier  $P_2$ ) und damit die Phase des nativen Datensatzes bestimmt werden.* ..... 26
9. *Abb. 9: Darstellung möglicher Energieprofile für Retinalproteine entlang einer imaginären Reaktionskoordinate. ( $E_A$ : Aktivierungsenergie, weitere Abkürzungen siehe Text)* ..... 29
10. *Abb. 10: HR Packung der 2-D Kristalle im  $p4_21_2$  Gitter. Jeweils vier gleich orientierte Monomere (gleicher Füllung) sind zu einem Tetramer zusammengefasst. Die zwei Tetramere einer asymmetrischen Einheit sind durch die Quadrate (Zellkonstante 102 Å).....* 33
11. *Abb. 11: links: Elektronendichtekarten von HR nach Kunji et al. (2000)<sup>[114]</sup> A Sicht auf die extrazelluläre Seite B und C Ansichten der Helices in der Membranebene; D Vergrößerung der Retinalumgebung um den Ionon-ring* ..... 34
12. *Abb. 12: rechts: Vergleich der Projektionen (Ansicht ez bzw. intradiscal) verschiedener 7 TM-Proteine orthogonal zur Membranebene<sup>[25]</sup>. Alle Darstellungen sind auf 6 Å Auflösung normiert (Ausnahme Squid).* ..... 34



13. *Abb. 13: Chromatogramm einer HR-Reinigung. In Cholat solubilisiertes HR wird an eine Phenyl substituierte Sepharose-Matrix gebunden und nach Entfernung von Proteinverunreinigungen durch einen Detergenzwechsel auf  $\beta$ -Oktylglukosid eluiert. Weitere Einzelheiten siehe 7.3.1 HR-Isolierung.* 36
14. *Abb. 14: Ausschnitt einer Lipid/ Protein-Mischung. Deutlich zu erkennen ist die Trennung in eine lipidreiche (links oben) und eine proteinreiche Phase (rechts)* .....37
15. *Abb. 15: Vergrößerter Ausschnitt der lipidreichen Phase entsprechend der nebenstehenden Abbildung. Zu erkennen sind hunderte Kristallkeime.* .....37
16. *Abb. 16: HR-Kristalle eingebettet in eine Monoolein-Matrix. Die Kristalle haben die ungefähren Abmessungen von  $150*150*20 \mu\text{m}$ .* .....38
17. *Abb. 17: HR-Kristallisationsexperiment nach ca 8 Wochen. Es bilden sich Kristallisationskeime und das zu Beginn homogen verteilte Protein konzentriert sich stellenweise* .....39
18. *Abb. 18: Kristallisationsexperiment der HR-Mutante T111V. Die Probe zeigt zwei unterschiedlich gefärbte Bereiche* .....40
19. *Abb. 19: Kristallisationsexperiment der HR-Mutante R108 K* ..... 40
20. *Abb. 20: Diffractionsbild des Kristalls pd283h aufgenommen an der ID14/3 (Detektor: MarCCD). Die Auflösung am Detektorrand beträgt  $1.8 \text{ \AA}$  (Drehwinkel  $0.5$ ,  $\lambda = 0,93 \text{ \AA}$ ). Die untere Abbildung zeigt eine Vergrößerung des oben markierten Ausschnitts.* .....41
21. *Abb. 21: Schnitt durch die a,c-Ebene der Kristallpackung von HR (P6<sub>3</sub>22). Die einzelnen Monomer sind gelb, grün und rot eingefärbt, die intratrimeren MO-Moleküle sind grau, die Glycerolkopfgruppen rot markiert.* .....43
22. *Abb. 22: Schnitt durch die a,b-Ebene der Kristallpackung von HR (p6<sub>3</sub>22), Farbkodierung siehe Abb. 21* .....44
23. *Abb. 23: Ansicht des HR-Trimers von der zytoplasmatischen (A), sowie von der extrazellulären Seite (B). Die HR-Monomere eines Trimers (gelb, grün und rot) sind als Bändermodell, die Palmitinsäure, Chloridionen (gelb) und Kaliumionen (blau) als Kugel und Stabmodell dargestellt* .....45
24. *Abb. 24: Verteilung der Oberflächenladung des HR-Trimers in der Ansicht von ez (links) und zp (rechts). Die Färbung entspricht dem Verlauf der Partialladungen von positiv (blau) nach negativ (rot); Die Darstellung wurde mit dem Programm Grasp erzeugt* .....45
25. *Abb. 25: Chloridbindungsstelle des HR-Grundzustandes (hR). Die beteiligten Aminosäuren, das Retinal (türkis) sowie die beteiligten Heteroatome (Chloridion: grün, Sauerstoffe: rot sind als Kugel und Stab Modelle dargestellt; Wasserstoffbrückenbindungen sind gelb eingefärbt* .....47
26. *Abb. 26: Kugel-Darstellung des Chloridions (grün) und der es unmittelbar umgebenden Atome (Kohlenstoff und Wasserstoff: grau, Stickstoff: blau, Sauerstoff: rot). Das Retinal ist in violett als Stäbchenmodell wiedergegeben. (Beide Darstellungen unterscheiden sich durch eine 90°-Drehung um das Retinal Rückgrat, Aminosäurecodierung siehe Text)* .....48
27. *Abb. 27: Laue-Emissionsspektrum der Beamline ID09 zur Zeit des Experiments; Emissionsmaximum bei  $0,75 \text{ \AA}$  mit einer Halbertsbreite von 12 %* .....49



28. *Abb. 28: Laue-Diffraktionsbilder vier verschiedener HR-Kristalle; Auflösung am Detektorrand entspricht 2.4 Å, Belichtungszeit mit Röntgenstrahlung im Wellenlängenbereich 0,7-0,9 Å und einer Belichtungszeit von 1.4 ms* ..... 49
29. *Abb. 29: simuliertes Laue-Diffraktionsbild:  $\lambda = 0,72 - 0,78 \text{ \AA}$ , Auflösungsgrenze 2.5 Å, Gitterkonstanten  $a = b = 209 \text{ \AA}$ ,  $c = 67 \text{ \AA}$ ; Die Abbildung wurde mit dem Programm LaueGen erzeugt* ..... 50
30. *Abb. 30: Absolutspektrum lichtadaptierterter HR-Kristalle; HR<sub>578</sub> (Referenz: Luft)* ..... 51
31. *Abb. 31: Schematischer Aufbau (links) und Photo des verwendeten Mikrospektralphotometers. Der Proteinkristall ist am Goniometerkopf befestigt und kann über die Optik des Spektrometers oder direkt beleuchtet werden (Laser im Photo nicht enthalten).* ..... 51
32. *Abb. 32: Differenzspektrum (HR<sub>K,LT</sub>-HR<sub>578</sub>) von HR-Kristallen bei 110 K. Aufgetragen sind die Spektren nach verschiedenen Belichtungszeiten (rote Kurven, 532 nm Illumination) sowie die simulierten Differenzspektren (HR<sub>578</sub>-HR<sub>I</sub>) als schwarze Kurven (siehe Legende)*..... 52
33. *Abb. 33: Differenzspektren (HR<sub>K,LT</sub>-HR<sub>578</sub>) von HR-Membransuspension nach Belichtung (532 nm) bei 100 K und Belichtungszeiten von 1, 2, 3, 4 min (links) bzw. bei 77 K, 1, 2, 3, 4 min (Messungen: S. Paula)*..... 53
34. *Abb. 34: Differenzspektren (HR<sub>520</sub> - hR) nach Belichtung einzelner Kristalle mit Licht von 533 nm Wellenlänge. Die Messungen erfolgten bei 180 K (grüne Kurven), 200 K (rote Kurven) und 210 K (schwarze Kurven) nach verschiedenen Illuminationszeiten (siehe Legende).* ..... 56
35. *Abb. 35: Vergleich der Differenzspektren (HR<sub>520</sub> - hR) nach 10 bis 20 minütiger Illumination bei 633 nm im Temperaturbereich von 180 K bis 220 K (siehe Legende).* ..... 56
36. *Abb. 36: Differenzspektren (HR<sub>520</sub> - hR) am Einzelkristall nach Einstellung des photostationären Gleichgewichtes (Illumination 633 nm) bei Raumtemperatur. Schwarze Kurven geben die simulierten (0-100 % L), farbige Kurven gemessene Differenzspektren wieder. Die Kristalle wurden anschließend unter kontinuierlicher Belichtung bei 100 K schockgefroren.* ..... 57
37. *Abb. 37: Mikroresonanz-Raman Spektrum (Raumtemperatur) eines HR-Kristalls in Gegenwart von MO bei Illumination mit 568 nm. Der Kristall wurde in Gegenwart von 4 M KCl gezüchtet* ..... 58
38. *Abb. 38: Mikroresonanz-Raman Spektren eines HR-Kristalls aufgenommen bei Raumtemperatur in Gegenwart von MO links: Illumination mit 568 nm (rote Kurve) bzw. 752 nm (schwarze Kurve); rechts: Illumination mit 568 nm (rote Kurve) bzw. 458 nm (schwarze Kurve); Der Kristall wurde in Gegenwart von 4 M KCl gezüchtet* ..... 60
39. *Abb. 39: FTIR-Spektren von HR- bzw. BR-Kristallen umgeben von MO. Die Messungen erfolgten bei 5°C nach Belichtung mit Licht der Wellenlängen 633 (HR) oder 532 nm (BR). Messungen von J. Heberle, KFA Jülich* ..... 61
40. *Abb. 40: Resonanz-Raman Spektrum des C=C Streckschwingungsbereiches im HR-Kristall (links) sowie für eine HR-Membransuspension (rechts): Vergleich des gemessenen (schwarz), des simulierten Spektrums (rot) und der jeweils beitragenden Gauss-Funktionen*..... 63
41. *Abb. 41: FTIR-Absolutspektrum aufgenommen an einem Kristallensemble (mehrere dutzend Kristalle) in Gegenwart der MO-Lipidphase (Meßtemperatur 250 K, Illumination 632 nm). Die untere Kurve zeigt das entsprechende (L-hR)-Differenzspektrum.* ..... 65



42. *Abb. 42: (L-hR)-FTIR-Differenzspektren am HR-Wildtyp-Kristall nach jeweils 5 minütiger Belichtung bei 632 nm. Die Spektren sind bei 190 K (grün), 195 K (blau) und 200 K (violett) aufgenommen. Banden, die sowohl IR als auch Raman aktiv sind, sind rot gekennzeichnet.....*66
43. *Abb. 43: Vergleich eines zeitlich isolierten FTIR-Differenzspektrums (10  $\mu$ s, blaue Kurve) einer Membransuspension mit dem Einkristallspektrum bei 190 K (rote Kurve). Messung von J. Heberle (Forschungszentrum Jülich).....*67
44. *Abb. 44: MALDI-TOF Spektren von HR-Präparationen (eingebettet in DHB) aufeinander folgender Isolierungsschritte: a) HR-haltige Gesamtmembranfraktion nach Dichtegradientenzentrifugation b) nichtbindendes HR-Eluat (Cholat-Solubilisat) der Affinitätschromatographie c) HR-Eluat (OG-Solubilisat) der Affinitätschromatographie d) HR-Kristall nach Entfernung des anhaftenden MO...69*
45. *Abb. 45: MALDI-TOF Spektren einer BR-Präparation (eingebettet in DHB): a) PM-Solubilisat in OG b) BR-Eluat des Anionenaustausches DEAE-Sepacel (in OG) c) BR-Kristall.....*70
46. *Abb. 46: MALDI-TOF Spektrum von Palmitinsäure (Kokristallisiert mit DHB).....*71
47. *Abb. 47: Anfangs- und Endzustand des zur HR-Kristallisation verwendeten Lipid(MO)/Wasser-Gemisches. Die zu Beginn kubische Lipidphase (links), deren Membranaufbau (links oben) und Wasserkanalstruktur (links unten) illustriert ist, geht im Verlauf der Kristallisation in eine lamellare Anordnung von Lipiddoppelschichten über.....*73
48. *Abb. 48: Phasendiagramm der binären Mischung Monoolein/Wasser; Erläuterungen siehe Text.....*75
49. *Abb. 49: Vorgeschlagerener Mechanismus der Membranprotein-Kristallisation zu Grunde liegenden Phasenumwandlung der Lipidphasen. Die Lipiddoppelschichten sind als durchgängige Linien gekennzeichnet, wobei die hydrophobe Kontaktfläche der Lipide als unterbrochene Linie hervorgehoben ist a) 2-dimensionaler Schnitt durch ein kubisch primitives Gitter, die Wasserkanäle in Blickrichtung sind grau unterlegt b) Fusion der an der Grenzfläche des kubischen Systems liegenden Lipiddoppelschicht über den Kontakt der trans-Lipideinzelschichten c) fortschreitende Fusion der inneren Lipideinzelschicht d) Ausbildung zweier Lipiddoppelschichten, wodurch das kubischen Lipidsystem sukzessive von der Phasengrenzfläche her abgebaut wird. ....*75
50. *Abb. 50: Vergleich der Membranproteinkristalle vom Typ I und Typ II; Erläuterungen siehe Text... 76*
51. *Abb. 51: Strukturvergleich der Retinalumgebung in HR und BR: Die konservierten Aminosäuren sind als Kugel-Stab-Modelle hervorgehoben, Wassermoleküle (rot), Chloridionen (grün) und Retinal (türkis) sind eingefärbt. Eine Teilansicht von HR ist in den Teilabbildung a) und b), von BR in c) und d) gezeigt. In den Teilabbildungen b) und d) ist der Blick des Beobachters von der zytoplasmatischen Seite auf den Chromophor gerichtet. Die Aminosäurebezeichnung setzt sich aus dem Einbuchstabencode, der Sequenznummer und dem Helixbuchstaben (in Klammern) zusammen (Abbildung siehe eine Seite zuvor).....*81
52. *Abb. 52: Kugel-Stab-Modell der CBS und der Wasser 506 umgebenden Aminosäuren auf der zytoplasmatischen Halbseite von HR. Die gegenüber Abb. 51 a) neu hinzugekommene Reste sind explizit bezeichnet. Erläuterungen siehe Text.....*82
53. *Abb. 53: Superposition des Proteinrückgrads von HR (rot, 1E12) und BR (gelb, 1BRR). Hervorgehoben sind das Retinal (HR: türkis, BR: gelb) sowie Aminosäuren, die in allen archaealen Retinalproteinen (Stern) sowie in allen archaealen Ionenpumpen konserviert sind. ....*86



54. *Abb. 54: Sequenzalignment der bis dato deponierten (Datenbank TREMBL) HR Primärstrukturen. P16102 entspricht der HR-Sequenz aus Halobacterium Salinarum; folgende Aminosäuren wurden zur Vereinfachung an den Aminotermini weggelassen: MIETA (P33742), MRSRTY HDQSVCGPYGSQRT(O93741), MMET (O93742) und MTETL (P15647); außerdem wurde das Segment SSVMLGGEEV zwischen Position G99 and D100 in P15647 ausgelassen. (blosum matrix, gap extension 0.05, gap distance 0.05, pairgap 0.05) .....88*
55. *Abb. 55: Schematische Darstellung der Chloridbindungsstelle (CBS) im unbelichteten HR. Die beteiligten Aminosäuren sind als Strichformeln, die Wassermoleküle als blaue Kreise dargestellt. Das Chloridion ist grün unterlegt. ....92*
56. *Abb. 56: Darstellung der Elektronendichte ( $2F_{obs}-F_{calc}$ ;  $0,8 \sigma$ ) und des Modells (Stabmodell, türkis) der Palmitinsäure. Im VdW-Kontakt befindliche oder über Wasserstoffbrücken gebundene Aminosäuren sowie das Retinal sind als Stabmodelle hervorgehoben. ....95*
57. *Abb. 57: HR-Bändermodell mit negativer (rot) und positiver (blau) Differenz-Elektronendichte (hR-K) konturiert bei  $3,3 \sigma$ . Retinal und K242 sind als Stabmodell hervorgehoben. ....97*
58. *Abb. 58: Die möglichen Konstitutionsisomere des Retinals in archaealen Rhodopsinen; das obere Gleichgewicht entspricht dem thermischen Gleichgewicht bei Lichtabwesenheit (Dunkeladaptation), der untere Reaktionsweg entspricht dem lichtinduzierten Übergang von hR nach K.....98*
59. *Abb. 59: Transportmoden archaealer Ionenpumpen: a) Chloridtransport in HR und BR-D85T, b) Protonentransport in BR, c) Protonentransport in HR und BR-D85T bei Abwesenheit von Chloridionen (nähere Erläuterungen siehe Text).....99*
60. *Abb. 60: Mögliche Regionen der Halid-Aufnahme (links) und -Abgabe (rechts) in HR (rote Kreise). In der linken Abbildung ist die Proteinoberfläche eines HR-Monomers nach Oberflächenpotentialen gefärbt (blau: positiv, rot negativ). In der rechten Abbildung ist das Monomer entsprechend B-Faktoren eingefärbt.....102*
61. *Abb. 61: Vier hypothetische Regionen des Chloridtransportes durch HR. Blau: Aufnahme-region (R103, Q105, S231, S235), grau: CBS (73, 76, 108, 111, 112, 115, 210, 238), violett Chloridtransfer (69, 72, 119) und grau: Chloridabgabe (62, 66, 122, 123, 126, 245, 249, 253, 260) .....104*
62. *Abb. 62: Mikro-Resonanz-Raman Spektren (Raumtemperatur) eines HR-Kristalls der Punktmutante R108K in Gegenwart von MO nach Illumination bei 568 nm. Der Kristall wurde in Gegenwart von 4 M KCl gezüchtet a) Kristall (schwarze Linie) im Vergleich zu einer HR-Membransuspension (rote Linie) b) Ausschnitt des C=C Streckschwingungsbereiches um  $1500 \text{ cm}^{-1}$ ; Farbcode siehe Abb. 40109*



## 13. Literaturverzeichnis

---

- 1 Duschl, A., McCloskey, M., A., und Lanyi, J., K., Functional Reconstitution of Halorhodopsin – Properties of Halorhodopsin -containing Proteoliposomes, *J. Biol. Chem.*, **263**, 17016 (1988)
- 2 Hellingwerf, K., J., Hoff, W., D., und Crielaard, W., Photobiology of microorganisms: How photosensors catch a photon to initialize signalling, *Molecular Microbiology*, **21**, 683 (1996)
- 3 Hofmann, K., P., Jager, S., und Ernst, O., P., Structure and function of activated rhodopsin, *Israel J. Chem.*, **35**, 339 (1995)
- 4 Oesterhelt, D., und Stoeckenius, W., Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium, *Nature New Biol.*, **233**, 149 (1971)
- 5 Wald, G., Vitamin A in eye tissues, *J. Gen. Physiol.*, **18**, 905, (1935)
- 6 Oesterhelt, D., The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 489 (1998)
- 7 Hubbard, R., Brown, P., K., und Kropf, A., Action of light on visual pigments, *Nature*, **183**, 442 (1959)
- 8 Vandersteen, R., Biesheuvel, P., L., Mathies R., A., *et al.*, Retinal analogs with locked 6-7 conformations show that bacteriorhodopsin requires the 6-S-trans conformation of the chromophore, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 6410 (1986)
- 9 Hao, W., und Fong, H., K., The endogenous chromophore of retinal G protein-coupled receptor opsin from the pigment epithelium, *J. Biol. Chem.*, **274**, 6085 (1999)
- 10 Oesterhelt, D., Meentzen, M., und Schuhman, L., Reversible dissociation of purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophores, *Eur. J. Biochem.*, **40**, 453 (1973)
- 11 Kolbe, M., Besir, H., Essen, L.-O., und Oesterhelt, D., Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution, *Science*, **288**, 1390 (2000)
- 12 Luecke, H., Schobert, B., Richter, *et al.*, Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **291**, 899 (1999)
- 13 Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., *et al.*, Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor *Science*, **289**, 739 (2000)
- 14 Ovchinnikov, Y., A., Abdulaev, N., G., Feigina M., Y., *et al.*, The complete amino-acid-sequence of visual rhodopsin, *Bioorganicheskaya Khimiya*, **8**, 1011 (1982)
- 15 Fryxell, K., J., und Meyerowitz, E., M., The evolution of rhodopsins and neurotransmitter receptors, *J. Mol. Evol.*, **33**, 367 (1991)
- 16 Wey, C., L., Edidin, M., A., Cone, R., A., *et al.*, Lateral diffusion of rhodopsin in photoreceptor cells measured by fluorescence Redistribution after photobleaching; *Fed. Proc.*, **39**, 2068 (1980)
- 17 Oesterhelt, D., und Stoeckenius, W., Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium. *Nature - New Biology*, **233**, 149 (1971)



- 18 Besir, H., persönliche Mitteilung
- 19 Bieszke, J. A., Braun, E. L., Bean, *et al.*, The nop-1 gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8034, (1999)
- 20 Bèjà, O., Aravind, L., Koonin, E., V., *et al.*, Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea, *Science*, **289**, 1902 (2000)
- 21 Zhai, Y., Heijne, W., H., M., Smith, *et al.*, Homologues of archaeal rhodopsins in plants, animals and fungi: structural and functional predications for a putative fungal chaperone protein, *BBA*, **1511**, 206 (2001)
- 22 Piper, P., W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, P., *et al.*, hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase, *Cell Stress Chaperones* **2**, 12, (1999)
- 23 Saier, Jr., und M., H., A functional/phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters, *Microbiol. Mol., Biol. Rev.*, **64**, 354, (2000)
- 24 Bowmaker, J., K., The ecology of visual pigments, in *Rhodopsins and Phototransduction*, Wiley-VCH, 21 (1999)
- 25 Spudich, J. L., Yang, C.-S., Jung, *et al.*, Retinylidene Proteins: Structures and Functions from Archaea to Humans, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 365 (2000)
- 26 Wald, G., Carotenoids and the visual cycle, *J. Gen. Physiol.*, **19**, 351 (1935)
- 27 Hubbard, R., und Wald, G., The mechanism of rhodopsin synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **37**, 69 (1951)
- 28 Pepe, I., M., Rhodopsin and phototransduction, *J. Photochem. Photobiol.*, **48**, 1 (1999)
- 29 Spudich, E., N., Hasselbacher, C., A., und Spudich, J., L., Methyl-accepting protein associated with bacterial sensory rhodopsin-I, *J. Bacteriol.*, **170**, 4280 (1988)
- 30 Zhang, X., N., und Spudich, J., L., HtrI is a dimer whose interface is sensitive to receptor photoactivation and His-166 replacements in sensory rhodopsin I, *J. Biol. Chem.*, **273**, 19722 (1998)
- 31 Bogomolni, R., A., Stoeckenius, W., Szundi, I., *et al.*, Removal of transducer HTRI allows electrogenic proton translocation by sensory rhodopsin-I, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 10188 (1994)
- 32 Haupts, U., Bamberg, E., und Oesterhelt, D., Different modes of proton translocation by sensory rhodopsin I, *EMBO J.*, **15**, 1834 (1996)
- 33 Varo, G., Analogies between halorhodopsin and bacteriorhodopsin, *BBA*, **1460**, 220 (2000)
- 34 Varo, G., Zimanyi, L., Fan, X., L., *et al.*, Photocycle of halorhodopsin from *Halobacterium salinarium*, *Biophys. J.*, **68**, 2062 (1995)
- 35 Kochendoerfer, G., G., und Mathies, R., A., Ultrafast spectroscopy of rhodopsins - Photochemistry at its best!, *Israel J. Chem.*, **35**, 211 (1995)
- 36 Haupts, U., Tittor, J., Bamberg, E., *et al.*, General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: The isomerization/switch/transfer (IST) model, *Biochemistry*, **36**, 2 (1997)



- 37 Balashov, S., P., Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin, *BBA*, **1460**, 75 (2000)
- 38 Polland, H., J., Franz, M., A., Zinth W., *et al.*, Energy-transfer from retinal to amino-acids - a time-resolved study of the ultraviolet emission of bacteriorhodopsin, *BBA*; **851**, 407, (1986)
- 39 Gai, F., Hasson, K., C., McDonald, J., C., *et al.*, Chemical dynamics in proteins: The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin, *Science*, **279**, 1886, (1998)
- 40 Hendrickson, F., M., Burkard, F., und Glaeser, R., M., Structural Characterization of the L-to-M Transition of the Bacteriorhodopsin Photocycle, *Biophys. J.*, **75**, 1446 (1998)
- 41 Druckmann, S., Ottolenghi, M., Pande, J. A., *et al.*, *Biochemistry*, **21**, 4953 (1982)
- 42 Balashov, S., P., Govindjee, R., und Ebrey, T., G., *Biophys. J.*, **60**, 475 (1991)
- 43 Heberle, J., Riesle, J., Thiedemann, G., *et al.*, *Nature*, Proton migration along the membrane-surface and retarded surface to bulk transfer, **370**, 379 (1994)
- 44 Liu, S., Y., Govindjee, R., und Ebrey, T., G., *Biophys. J.*, **57**, 951 (1990)
- 45 Heberle, J., und Dencher, N., A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 5996 (1992)
- 46 Subramaniam, S., Greenhalgh, D., A., und Khorana H., G., Aspartic Acid-85 in bacteriorhodopsin functions both as proton acceptor and negative counterion to the schiff-base, *J. Biol. Chem.*, **267**, 25730 (1992)
- 47 Luecke, H., Richter, H., T., und Lanyi, J., K., *Science*, **280**, 1934 (1998)
- 48 Mitsuoka, K., Hirai, T., Murata, K., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **286**, 861 (1999)
- 49 Zimányi, L., Váró, G., Chang, M., Ni, R., *et al.*, *Biochemistry*, **31**, 8535 (1992)
- 50 Weidlich, O., Rodig, C., und Siebert, F., Time-resolved step-scan FTIR investigations on the M-1 -> M-2 transition in the light-driven proton pump bacteriorhodopsin, *Laser Chem.*, **19**, 179 (1999)
- 51 Sass, H., J., Schachowa, I., W., Rapp, G., *et al.*, The tertiary structural changes in bacteriorhodopsin occur between M states: X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy, *EMBO J.*, **16**, 1484 (1997)
- 52 Subramaniam, S., Gerstein, M., Oesterhelt, D., *et al.*, R., Electron-diffraction analysis of structural-changes in the photocycle of bacteriorhodopsin, *EMBO J.*, **12**, 1 (1993)
- 53 Subramaniam, S., Lindahl, I., Bullough, P., *et al.*, Henderson R, Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle, *J. Mol. Biol.*, **287**, 145 (1999)
- 54 Sass, H., J., Buldt, G., Gessenich, R., *et al.*, Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin, *Nature*, **406**, 649 (2000)
- 55 Eigen, M., Proton Transfer, Acid-Base Catalysis and Enzymatic Hydrolysis. I: Elementary Steps, *Angew. Chem.*, **75**, 489 (1963)
- 56 Stern, L., J., Ahl, P., L., Marti, T., *et al.*, Membrane-embdded aspartic acids in bacteriorhodopsin causes specific changes in different steps of the photochemical cycle, *Biochemistry*, **28**, 10035 (1989)
- 57 Otto, H., Marti, T., Holz, M., *et al.*, Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the schiff-base of bacteriorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 9228 (1989)



- 58 Tittor, J., Soell, C., Oesterhelt, D., *et al.*, A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96-Asn is fully reactivated by azide, *EMBO J.*, **8**, 3477 (1989)
- 59 Souvignier, G., und Gerwert, K., *Biophys. J.*, **63**, 1393 (1992)
- 60 Zscherp, C., und Heberle, J., *J. Phys. Chem.*, **101**, 10542 (1997)
- 61 Misra, S., Govindjee, R., Ebrey, T., G., *et al.*, Proton uptake and release are rate-limiting steps in the photocycle of the bacteriorhodopsin mutant E204Q, *Biochemistry*, **36**, 4875 (1997)
- 62 Brown, L., S., Needleman, R., und Lanyi, J., K., Functional roles of aspartic acid residues at the cytoplasmic surface of bacteriorhodopsin, *Biochemistry*, **38**, 6855 (1999)
- 63 Riesle, J., Oesterhelt, D., Dencher, N., A., *et al.*, J., D38 is an essential part of the proton translocation pathway in bacteriorhodopsin, *Biochemistry*, **35**, 6635 (1996)
- 64 Balashov, S., P., Govindjee, R., Kono, M., *et al.*, *Biochemistry*, **32**, 10331 (1993)
- 65 Balashov, S., P., Lu, M., Imasheva, *et al.*, *Biochemistry*, **38**, 2026 (1999)
- 66 Schobert, B., und Lanyi, J., K., Halorhodopsin is a light driven chloride pump, *J. Biol. Chem.*, **257**, 306 (1982)
- 67 Otomo, J., Anion selectivity and pumping mechanism of halorhodopsin, *Biophys. Chem.*, **56**, 137 (1995)
- 68 Oesterhelt, D., Structure and function of halorhodopsin, *Israel J. Chem.*, **35**, 475 (1995)
- 69 Arlt, T., Schmidt, S., Zinth, W., *et al.*, The initial reaction dynamics of the light-driven chloride pump halorhodopsin, *Chem. Phys. Lett.*, **241**, 559 (1995)
- 70 Zimanyi, L., Ormos, P., und Lanyi, J., K., Low-Temperature Photoreactions of Halorhodopsin. 1. Detection of Conformational Substates of the Chromophore, *Biochemistry*, **28**, 1656 (1989)
- 71 Dioumaev, A., K., und Braiman, M., S., Nano- and Microsecond Time-Resolved FTIR Spectroscopy of the Halorhodopsin Photocycle, *Photochem. Photobiol.*, **66**, 755 (1997)
- 72 Diller, R., Stockburger, M., Oesterhelt, *et al.*, *FEBS Lett*, **217**, 297 (1987)
- 73 Okuno, D., Asaumi, M., und Muneyuki, E., Chloride concentration dependency of the electrogenic activity of halorhodopsin, *Biochemistry*, **38**, 5422 (1999)
- 74 Tittor, J., Oesterhelt, D., Maurer, R., *et al.*, The photochemical cycle of halorhodopsin – absolute spectra of intermediates obtained by flash-photolysis and fast difference spectra measurements, *Biophys. J.*, **52**, 999 (1987)
- 75 Oesterhelt, D., Hegemann, P., und Tittor, J., *EMBO J.*, **4**, 2351 (1985)
- 76 Ogorusu, T., Maeda, A., Sasaki, N., *et al.*, *J. Biochem.*, **90**, 1267 (1981)
- 77 Hegemann, P., Oesterhelt, D., und Steiner, M., *EMBO J.*, **4**, 2347, (1985)
- 78 Oesterhelt, D., Photosynthese der zweiten Art: Die halophilen Archaea, in Häder, Donat-P., *Photosynthese*, Thieme-Verlag (1999)
- 79 Madern, D., Ebel, E., und Zaccai, G., Halophilic adaptation of enzymes, *Extremophiles*, **4**, 91 (2000)



- 80 Martin, D. D., Ciulla, R. A.; und Roberts, M. F., Osmoadaptation in Archaea, *Applied And Environmental Biology*, **65**, 1815 (1999)
- 81 Madigen, T., M., und Oren, A., Thermophilic and halophilic extremophiles, *Current Opinion in Microbiology*, **2**, 265 (1999)
- 82 Vossenbergh, J., Driessen, A. J. M., Grant, W. D., *et al.*, Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic Archaea have a low H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> permeability at high salt concentration, *Extremophiles*, **3**, 253 (1999)
- 83 Vossenbergh, J., Driessen, A. J. M., Grant, W. D., *et al.*, Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic Archaea have a low H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> permeability at high salt concentration, *Extremophiles*, **3**, 253 (1999)
- 84 Dennis, P., P., und Schimmin, L., C., Evolutionary divergence and salinity mediated selection in halophilic Archaea, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 90 (1997)
- 85 Madern, D., Pfister, C., und Zaccai, G., Mutation at a single acidic amino-acid enhances the halophilic behaviour of malate-dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts, *Eur. J. Biochem.*, **230**, 1088 (1995)
- 86 Madern, D., und Zaccai, G., Stabilisation of halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* by divalent cations - Effects of temperature, water isotope, cofactor and pH, *Eur. J. Biochem.*, **249**, 607 (1997)
- 87 Taupin, C., M., J., Hartlein, M., und Leberman, R., Seryl-tRNA synthetase from the extreme halophile *Haloarcula marismortui* - Isolation, characterization and sequencing of the gene and its expression in *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.*, **243**, 141 (1997)
- 88 Frolow, F., Harel, M., Sussman, J., L., *et al.*, Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin, *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 452 (1996)
- 89 Blundell, T., L., und Johnson, L., N., Protein crystallography, Academic Press (1976)
- 90 Helliwell, J., R., Macromolecular crystallography with synchrotron radiation, Cambridge University Press (1992)
- 91 Drenth, J., Principles of Protein X-Ray Crystallography, Springer Verlag (1999)
- 92 Ladd, M., F., C., und Palmer, R., A., Structure Determination by X-ray Crystallography, Plenum Press (1994)
- 93 Ewald, P., P., Das „reziproke Gitter“ in der Strukturtheorie, *Z. Kristallogr.*, **56**, 129 (1921)
- 94 Darwin, C., G., The theory of x-ray reflexion, *Phil. Mag.*, **27**, 315 (1914)
- 95 Hendrickson, W., A., Smith, J., L., Phizackerley, R., P., *et al.*, Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation, *Proteins*, **4**, 77 (1988)
- 96 Ban, N., Nissen, F., Hansen, J., *et al.*, Placement of protein and RNA structures into a 5 angstrom-resolution map of the 50S ribosomal subunit, *Nature*, **400**, 841 (1999)
- 97 Ban, N., Nissen, F., Hansen, J., *et al.*, The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 angstrom resolution, *Science*, **289**, 905 (2000)



- 98 Cramer, P., Bushnell, D., A., Fu, J., *et al.*, Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism, *Science*, **288**, 640 (2000)
- 99 Hoppe, W., Die Faltmolekülmethode und ihre Anwendung in der röntgenographischen Konstitutionsanalyse von Biflorin, *Z. Elektrochem.*, **61**, 1076 (1957)
- 100 Hoppe, W., Die Faltmolekülmethode: Eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen, *Acta Cryst.*, **10**, 750 (1957)
- 101 Rossmann, M., G., Blow, D., M., The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit, *Acta Cryst.*, **15**, 24 (1962)
- 102 Atkins, P., W., *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH (1988)
- 103 Hesse, M., *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, Thieme (1997)
- 104 Raman, C., V., *et al.*, *Nature*, **121**, 501 (1928)
- 105 Rubinstenn, G., Vuister, G., W., Mulder, F., A., A. *et al.*, Structural and dynamic changes of photoactive yellow protein during its photocycle in solution, *Nature Struct. Biol.*, **5**, 568 (1998)
- 106 Genick, U., K., Borgstahl, G., E., O., Ng, K., *et al.*, Structure of a Protein Photocycle Intermediate by Millisecond Time-Resolved Crystallography, *Science*, **275**, 1471 (1997)
- 107 Sass, H., J., Büldt, G., Gessenich, R. *et al.*, Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin, *Nature*, **406**, 649 (2000)
- 108 Subramaniam, S. und Henderson, R., Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin, *Nature*, **406**, 649 (2000)
- 109 Subramaniam, S., und Henderson, R., Crystallographic analysis of protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle, *BBA*, **1460**, 157 (2000)
- 110 Heberle, J., Fitter, J., Sass, H., J., *et al.*, Bacteriorhodopsin: the functional details of a molecular machine are being resolved, *Biophys. Chem.*, **85**, 229 (2000)
- 111 Schlichting, I., und Goody, R., S., Triggering methods in crystallographic enzyme kinetics, *Methods. Enzymol.*, **277**, 467 (1997)
- 112 Kiefersauer, R., Than, M., E., Dobbek, H. *et al.*, A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes, *J. Appl. Cryst.*, **33**, 1223 (2000)
- 113 Havelka, W., A., Henderson, R., Heymann, J., W., *et al.*, Projection Structure of Halorhodopsin from *Halobacterium halobium* at 6 Å Resolution Obtained by Electron Cryo-microscopy, *J. Mol. Biol.*, **234**, 837 (1993)
- 114 Havelka, W., A., Henderson, R., und Oesterhelt, D., Three-dimensional Structure of Halorhodopsin at 7 Å Resolution, *J. Mol. Biol.*, **247**, 726 (1995)
- 115 Kunji, E., R., S., von Gronau, S., Oesterhelt, D., *et al.*; The three-dimensional structure of halorhodopsin to 5 Å by electron crystallography: A new unbending procedure for two-dimensional crystals by using a global reference structure, *PNAS*, **97**, 4637 (2000)



- 116 Steiner, M, und Oesterhelt, D., Isolation and properties of the native chromoprotein halorhodopsin, *EMBO J.*, **2**, 1379 (1983)
- 117 Leslie, A. G. W., Ed., Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data, *CCP4 and ESF-EACMB Newsletters on Protein Crystallography Daresbury*, Warrington WA44AD, UK. SERC Laboratory (1991)
- 118 Otwinowski, Z. und Minor, W., Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.*, **276**, 307 (1997)
- 119 Essen, L., O., Siegert, R., Lehmann W., D., *et al.*, Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 11673 (1998)
- 120 Brünger A. T. Adams, P., D., Clore, G., M., *et al.*, Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination, *Acta Crystallogr. D* **54**, 905 (1998)
- 121 Laskowski, R., A. *et al.*, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283 (1993)
- 122 Jones, T., A., Zou, J., Y., Cowan, S., W., *et al.*, Improved Methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models, *Acta Crystallogr. A* **47**, 110 (1991)
- 123 Turk, D., Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Proteinstrukturen, Dissertation, TU München (1992)
- 124 Barauskas, J., Razumas, V., Nylander, T., Solubilization of ubiquinone-10 in the lamellar and bicontinuous cubic phases of aqueous monoolein, *Chem. Phys. Lipids*, **97**, 167 (1999)
- 125 Pascher, I., Lundmark, M., Nyholm P., G., *et al.*, Crystal-structures of membrane lipids, *Biochem. Biophys. Acta*, **1113**, 339 (1992)
- 126 Besir, H., Dissertation, LMU München (2001)
- 127 Otomo, J., Anion Selectivity And Pumping Mechanism Of Halorhodopsin, *Biophys. Chem.*, **56**, 137 (1995)
- 128 Alshuth, T., Stockburger, M., Hegemann, P., *et al.*, Structure of the retinal chromophore in Halorhodopsin, *FEBS Lett.*, **179**, 55 (1985)
- 129 Walter, T., J., und Braiman, M., S., Anion-protein interactions during halorhodopsin pumping: halide binding at the protonated Schiff'sche base, *Biochemistry*, **33**, 1724 (1994)
- 130 Rüdiger, M., Mechanistische Untersuchungen an den lichtgetriebenen Ionenpumpen Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin aus *H. salinarum*, Dissertation, LMU München (1996)
- 131 Zimányi, L., P. Ormos, und J. K. Lanyi, Low-temperature photoreactions of halorhodopsin. 1. Detection of conformation substates of the chromoprotein, *Biochemistry*, **28**, 1656 (1989)
- 132 Váró, G., L. Zimányi, X. Fan, L., *et al.*, Photocycle of halorhodopsin from *Halobacterium salinarium*, *Biophys. J.*, **68**, 2062 (1995)
- 133 Maeda, A., Ogurusu, T., und Yoshizawa, T., Resonance Raman Study on Binding of Chloride to the Chromophore of Halorhodopsin, *Biochemistry*, **24**, 2517 (1985)



- 134 Kamo, N., Hazemoto, N., Kobatake, Y., *et al.*, Y., Light and dark-adaptation of halorhodopsin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **238**, 90, (1985)
- 135 Heberle, J., Buldt, G., Koglin, E., *et al.*, Assessing the functionality of a membrane protein in a three-dimensional crystal, *J. Mol. Biol.*, **281**, 587 (1998)
- 136 Edman, K., Nollert, P., Royant, A., *et al.*, High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle, *Nature*, **401**, 822 (1999)
- 137 Zimányi, L., und Lanyi, J., K., Fourier Transform Raman Study of Retinal Isomeric Composition and Equilibration in Halorhodopsin, *J. Phys. Chem. B.*, **101**, 1930 (1997)
- 138 Chon, Y.-S., Kandori, H., Sasaki, J., *et al.*, Existence of Two L Photointermediates of Halorhodopsin from *Halobacterium salinarum*, Differing in Their Protein and Water FTIR Bands, *Biochemistry*, **38**, 9449 (1999)
- 139 Sasaki, J., Lanyi, J., K., Needleman, R., *et al.*, Complete identification of C=O stretching vibrational bands of protonated aspartic-acid residues in the difference infrared-spectra of M-intermediate and N-intermediate versus bacteriorhodopsin, *Biochemistry*, **33**, 3178 (1994)
- 140 Rüdiger, M., Dissertation, LMU-München (1996)
- 141 Bousché, O., Spudich, E., N., Spudich, J., L., *et al.*, Conformational-changes in sensory rhodopsin-I – Similarities and differences with bacteriorhodopsin, halorhodopsin, and Rhodopsin, *Biochemistry*, **30**, 5395 (1991)
- 142 Seghal, S., N., Kates, M., und Gibbons, N., E., *Can. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 69 (1962)
- 143 Colella, M., Lobasso, S., Babudri, F., *et al.*, Palmitic acid is associated with halorhodopsin as a free fatty acid Radiolabeling of halorhodopsin with H-3-palmitic acid and chemical analysis of the reaction products of purified halorhodopsin with thiols and NaBH<sub>4</sub>, *Biochem. Biophys. Acta*, **1370**, 273 (1998)
- 144 Caffrey, M., A lipid's eye view of membrane protein crystallization in mesophases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 486 (2000)
- 145 Ai, X., und Caffrey, M., Membrane protein crystallization in lipidic mesophases: Detergent effects, *Biophys. J.*, **79**, 394 (2000)
- 146 Qiu, H., und Caffrey, M., The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects, *Biomaterials*, **21**, 223 (2000)
- 147 Barauskas, J., Razumas, V., und Nylander, T., Solubilization of ubiquinone-10 in the lamellar and bicontinuous cubic phases of aqueous monoolein, *Chem. Phys. Lipids*, **97**, 167 (1999)
- 148 Landh, T., Phase-behavior in the system pine oil monoglycerides-poloamer-407-water at 20 °C, *J. Phys. Chem.*, **34**, 8453 (1994)
- 149 Siegel, D., P., The Modified Stalk Mechanism of Lamellar/Inverted Phase Transitions and Its Implications for Membrane Fusion, *Biophys. J.*, **78**, 291 (1999)
- 150 Angelov, B., Ollivon, M., und Angelova, A., X-ray Diffraction Study of the Effect of the Detergent OctylGlucoside on the Structure of Lamellar and Nonlamellar Lipid/Water Phases of Use for Membrane Protein Reconstitution, *Langmuir*, **15**, 8225 (1999)



- 151 Ai, X., Caffrey, und M., Membrane Protein Crystallization in Lipidic Mesophases: Detergent Effects, *Biophys. J.*, **79**, 394 (2000)
- 152 Gustafsson, J., Nylander, T., Almgren, M., *et al.*, Phase Behavior and Aggregate Structure in Aqueous Mixtures of Sodium Cholate and Glycerol Monooleate, *J. Coll. Interface Sci.*, **211**, 326 (1999)
- 153 Neto, C., Aloisi, G., Baglioni, P., *et al.*, Imaging soft matter with the atomic force microscope: Cubosomes and hexosomes, *J. Phys. Chem. B.*, **103**, 3896 (1999)
- 154 Michel, H., General and Practical Aspects of Membrane Protein Crystallization, in *Crystallization of membrane proteins*, CRC Press, 73 (1991)
- 155 Ihara, K., Umemura, T., Katagiri, I. *et al.*, Evolution of the archaeal rhodopsins: Evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation, *J. Mol. Biol.*, **285**, 163 (1999)
- 156 <http://www.rcsb.org/pdb/>
- 157 Riek, R., P., Rigoutsos, I., Novotny, J., *et al.*, Non- $\alpha$ -Helical Elements Modulate Polytopic Membrane Protein Structure, *J. Mol. Biol.*, **306**, 349 (2001)
- 158 Zaccai, G., How Soft Is a Protein? A Protein Dynamics Force Constant Measured by Neutron Scattering, *Science*, **288**, 1604 (2000)
- 159 Belrhali, H., Nollert, P., Royant, A., *et al.*, Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrana at 1.9 angstrom resolution, *Struct. Fold. Des.*, **7**, 909 (1999)
- 160 Hasselbacher, C., A., Spudich, J., L., und Dewey, T., G., Circular Dichroism of halorhodopsin comparison with bacteriorhodopsin and sensory rhodopsinI, *Biochemistry*, **27**, 2540 (1988)
- 161 Plischka, P., Untersuchungen zur Chemie, Isomerisierung und Farbe des Retinalchromophors in Bacteriorhodopsinmutanten, Dissertation, LMU-München (2000)
- 162 Rumpel, K., Selektion und Analyse von Mutanten der lichtgetriebenen Anionenpumpe Halorhodopsin, Dissertation, LMU-München (1993)
- 163 Yamagami, M., Wakita, H., und Yamaguchi, T., Neutron-Diffraction study on chlorid-ion solvation in water, methanol, and N,N-dimethylformamide, *J. Chem. Phys.*, **103**, 8174 (1995)
- 164 Walter, T., J., und Braiman, M., S., *Biochemistry*, **33**, 1724 (1994)
- 165 Rüdiger, M., Haupts, U., Gerwert, K., *et al.*, Chemical reconstitution of a chloride pump inactivated by a single point mutation, *EMBO J.*, **14**, 1599 (1995)
- 166 Kleinschmitt, J., und Harosi, F., I., Anion sensitivity and spectral tuning of cone visual pigments in situ, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 9181 (1992)
- 167 Wiberg, N., Lehrbuch der anorganischen Chemie / Holleman-Wiberg, W. d. Gruyter, **91**, 415 (1985)
- 168 Besir, H., persönliche Mitteilung
- 169 Corcelli, M., Lobasso, S., Babudri, F., *et al.*, Palmitic acid is associated with halorhodopsin as a free fatty acid Radiolabeling of halorhodopsin with H-3-palmitic acid and chemical analysis of the reaction products of purified halorhodopsin with thiols and NaBH<sub>4</sub>, *BBA*, **1370**, 273 (1998)



- 170 Sasaki, J., Brown, L., S., Chon, Y., S. *et al.*, Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump, *Science*, **269**, 73 (1995)
- 171 Tittor, J., Haupts, U., and Haupts, C. *et al.*, Chloride and proton transport in bacteriorhodopsin mutant D85T: different modes of ion translocation in a retinal protein, *J. Mol. Biol.*, **271**, 405 (1997)
- 172 Braiman, M., S., Walter, T., J., and Briercheck, D., M., Infrared spectroscopic detection of light-induced change in chloride-arginine interaction in halorhodopsin, *Biochemistry*, **33**, 1629 (1994)
- 173 Tittor, J., Oesterhelt, D., Maurer, R., *et al.* The photochemical cycle of halorhodopsin – absolute spectra of intermediates obtained by flash-photolysis and fast difference spectra measurements, *Biophys. J.*, **52**, 999 (1987)
- 174 Rüdiger, M., und Oesterhelt, D., Specific arginine and threonine residues control anion binding and transport in the light-driven chloride pump halorhodopsin, *EMBO J.*, **16**, 3813 (1997)
- 175 Bamberg, E., Tittor, J., und Oesterhelt, D., Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 693 (1993)
- 176 Chon, Y., S., Kandori, H., and Sasaki, J. *et al.*, Existence of two L photointermediates of halorhodopsin from *Halobacterium salinarium*, differing in their protein and water FTIR bands, *Biochemistry*, **39**, 9449 (1999)
- 177 diese Arbeit
- 178 Oesterhelt, D., The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 489 (1998)
- 179 Rüdiger, M., and Oesterhelt, D., Specific arginine and threonine residues control anion binding and transport in the light-driven chloride pump halorhodopsin, *EMBO J.*, **16**, 3813 (1997)
- 180 Maeda, A., Application of FTIR Spectroscopy to the Structural Study on the Function of Bacteriorhodopsin, *Israel Journal of Chemistry*, **35**, 387 (1995)
- 181 Alshuth, T., Stockburger, M., Hegemann, P., *et al.*, Structure of the retinal chromophore in Halorhodopsin, *FEBS*, **179**, 55 (1985)
- 182 Hutson, M., S., Shilov, S., V., Krebs, R., *et al.*, Halide dependence of the halorhodopsin photocycle as measured by time-resolved infrared spectra, *Biophys. J.*, **80**, 1452 (2001)
- 183 Earnest, T., N., Roepe, P., Braiman, M., S., *et al.*, *Biochemistry*, **25**, 7793 (1986)
- 184 Brudler, R., Rammelsberg, R., Woo, T., T., *et al.*, Structure of the I1 early intermediate of photoactive yellow protein by FTIR Spectroscopy, *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 265 (2001)
- 185 Stoeckenius, W., Lozier, R. H., und Bogomolni, R. A., Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria, *Biochem. Biophys. Acta*, **505**, 215 (1979)
- 186 Heymann, J., Entwicklung eines rekombinanten DNA-Systems für die Überexpression und Mutagenese der lichtgetriebenen Anionenpumpe Halorhodopsin von Halobakterien, Dissertation, LMU-München (1993)
- 187 Besir, H., Dissertation, LMU-München (2001)



- 188 Rumpel, K., Selektion und Analyse der lichtgetriebenen Anionenpumpe Halorhodopsin, Dissertation, LMU-München (1993)
- 189 Oesterhelt D., und Krippahl G., Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically deficient mutants, *Annales de Microbiologie*, **134B**, 137-50 (1983)
- 190 Duschl, A., McClosekey, M. A., und Lanyi, J. K., Functional Reconstitution of Halorhodopsin, *J. Biol. Chem.*, **263**, 17016 (1988)
- 191 Landau, E. M. und Rosenbusch, J. P., Lipidic Cubic Phases - a Novel Concept for the Crystallization of Membrane Proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 14532, (1996)
- 192 Nollert, P. und Landau, E. M., Enzymic release of crystals from lipidic cubic phases, *Biochemical Society Transactions*, **26**, 709-713 (1998)
- 193 Oesterhelt, D., und Stoeckenius, W., Isolation of the Cell Membrane of Halobacterium halobium and ist Fractionation into Red and Purple Membrane, *Methods Enzymol.*, **31**, 667 (1974)
- 194 Schertler, G. F. X., Kristallisation von Bakteriorhodopsin - Charakterisierung des M-Intermediats im Kristall, Dissertation, LMU-München, Wissenschaftliche Forschungsbeiträge Biologie/Biochemie/Chemie, Bd. 41 (1988)
- 195 Siegert, R., Dissertation, LMU-München (1999)
- 196 Landau, E. M., und Rosenbusch, J. P., Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization of membrane proteins, *Proc., Natl. Acad. Sci.*, **93**, 14532, (1996)
- 197 Hasylab, Hamburg (<http://desyntwww.desy.de/has/facility/vacuum/main.htm>)
- 198 ESRF, Grenoble, Frankreich ([http://www.esrf.fr/exp\\_facilities/exp\\_facilities.html](http://www.esrf.fr/exp_facilities/exp_facilities.html))
- 199 [www.esrf.fr](http://www.esrf.fr)
- 200 Hadfield, A. T. und Hajdu, J. A fast and portable micro-spectrophotometer for time- resolved X-ray diffraction experiments, *J. Appl. Cryst.*, **26**, 839-842, (1993)
- 201 Siegert, R., Dissertation, LMU-München, (1999)
- 202 CCP4, *Acta Cryst.*, **50**, 760 (1994)
- 203 Carter, Jr., C., W., und Sweet, R., M., Eds., Macromolecular Crystallography, part A, Academic Press, **307** (1997)
- 204 Essen, L., O., Siegert, R., Lehmann W., D., *et al.*, Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 11673 (1998)
- 205 Brünger A. T. *et al.*, *Acta Crystallogr. D* **54**, 905 (1998)
- 206 Laskowski, R., A. *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283 (1993)
- 207 Jones, T., A., Zou, J., Y., Cowan, S., W., *et al.*, Improved Methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models, *Acta Crystallogr. A* **47**, 110 (1991)
- 208 Turk, D., Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Proteinstrukturen, Dissertation TU München (1992)



- 
- 209 Kraulis, P., MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of proteins, *J. Appl. Cryst.*, **24**, 946 (1991)
- 210 Bacon, D., J., und Anderson, W., F., A fast algorithm for rendering spacefilling molecule pictures, *J. Mol. Graphics*, **6**, 219 (1988)
- 211 Esnouf, R., M., An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities, *J. Mol. Graphics*, **15**, 132 (1997)
- 212 Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K, MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, *J Mol Graphics*, **14**, 51 (1996)
- 213 <http://www.chemicalgraphics.com>
- 214 <http://www.povray.org>
- 215 Nicholls, A., Sharp, K., und Honig, B., GRASP – graphical representation and analysis of surface properties, *Biophys. J.*, **64**, A166 (1993)

