
**Funktionelle Expression von Channelrhodopsin 2 (ChR2)
in der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* und
biophysikalische Charakterisierung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Taryn Kirsch
aus Lohne, Deutschland

Frankfurt am Main, 2007

D30

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation
angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Erster Gutachter: Prof. Dr. E. Bamberg

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. G. Nagel

Datum der Disputation 11.07.2008

Meinen Eltern

<u>1. EINLEITUNG.....</u>	<u>1</u>
1.1 RHODOPSINE	3
1.2 ARCHAEALE RETINALPROTEINE	4
1.2.1 VERGLEICH ZWISCHEN BACTERIORHODOPSIN UND SENSORRHODOPSIN II	6
1.3 <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> UND IHRE SPEZIFISCHEN PHOTOREZEPTORPROTEINE	9
1.4 STRUKTUR UND FUNKTION VON CHANNELRHODOPSIN 2 (CHR2)	15
1.5 DIE METHYLOTHROPHE HEFE <i>PICHIA PASTORIS</i> ALS HETEROLOGES EXPRESSIONSSYSTEM.	19
1.6 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT.....	25
<u>2. MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>26</u>
2.1 CHEMIKALIEN.....	26
2.1 ALLGEMEINE CHEMIKALIEN.....	27
2.1.1 PROTEASE INHIBITOREN	28
2.1.2 DETERGENTIEN.....	29
2.1.3 SÄULENMATRIZES	29
2.1.4 ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN	30
2.1.5 VERWENDETE KITS UND ANTIKÖRPER	32
2.1.6 VEKTOREN UND STÄMME	33
2.1.7 PRIMER.....	33
2.1.8 MEDIEN	34
2.2 METHODEN.....	37
2.2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	37
2.2.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	41
2.2.3 BIOPHYSIKALISCHE METHODEN	53
<u>3. ERGEBNISSE.....</u>	<u>58</u>
3.1 EXPRESSION VON CHR2-315-YFP IN <i>XENOPUS LAEVIS</i> Oozyten.....	58
3.2 CHR2-315-YFP-HIS IN EINER STABIL-TRANSFIZIERTEN HEK293-ZELLINIE.....	59
3.3 ZELLFREIE EXPRESSION VON CHR2-315-YFP.....	60

3.4	EXPRESSION VON CHR2-315-T-YFP-HIS IN DER METHYLOTROPHEN HEFE <i>PICHIA PASTORIS</i>	64
.....		
3.4.1	AUFREINIGUNG VON CHR2-315-T-YFP-HIS UND DER MUTANTE H134R.....	69
3.4.2	DURCHFÜHRUNG EINER GELFILTRATION UND MALDI-TOF-ANALYSE.....	73
3.5	UNTERSUCHUNG DER ELEKTROGENEN EIGENSCHAFTEN UND ÜBERPRÜFUNG DER FUNKTIONALITÄT VON CHR2-315-T-YFP-HIS UND DER MUTANTE H134R.....	76
3.5.1	LADUNGSTRANSPORTMESSUNGEN VON CHR2-315-T-YFP-HIS AUS HEK293-MEMBRANEN AN DER BLM.....	76
3.5.2	LADUNGSTRANSPORTMESSUNGEN VON CHR2-315-H134R-T-YFP-HIS AUS <i>PICHIA PASTORIS</i> AN DER BLM.....	80
3.5.3	BLM-LADUNGSTRANSPORTMESSUNGEN AN AUFGEREINIGTEN CHR2-315-T-YFP-HIS-PROTEOLIPOSOMEN AUS <i>PICHIA PASTORIS</i>	83
3.6	UNTERSUCHUNGEN DER SPEKTROSKOPISCHEN EIGENSCHAFTEN VON CHR2.....	87
3.6.1	HPLC-ANALYSE DER RETINALISOMEREN VON CHR2	87
3.6.2	ZEITAUFGELÖSTE LASER-ABSORPTIONSMESSUNGEN VON CHR2	88
4.	<u>DISKUSSION</u>	<u>93</u>
4.1.	HETEROLOGE EXPRESSION VON CHR2 UND SEINE N-GYKOSYLIERUNG.....	93
4.2	EXPRESSION VON CHR2-315-TEV-YFP-HIS IN DER METHYLOTROPHEN HEFE <i>PICHIA PASTORIS</i>.....	97
4.3	LADUNGSTRANSPORTMESSUNGEN VON CHR2 AN DER BLM.....	98
4.4	SPEKTROSKOPISCHE EIGENSCHAFTEN VON CHR2	101
4.5.	DER PHOTOZYKLUS VON CHR2.....	104
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>.....	<u>105</u>
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>107</u>
7.	<u>ANHANG</u>	<u>118</u>

1. Einleitung

Biologische Membranen sind für nahezu alle Lebensvorgänge unerlässlich. Prozesse wie die biologische Energiegewinnung durch Photosynthese und oxidative Phosphorylierung sind nur zwei Beispiele einer Unzahl von Prozessen, die an Membransystemen ablaufen können. Die Signifikanz von Membranproteinen, die in eben diesen Prozessen eine Hauptrolle spielen, kann deshalb nicht überschätzt werden. Mehr als 25 % aller Genprodukte sind Membranproteine, die in allen Zell- und Organellmembranen vorzufinden sind. Trotz der in den letzten Jahren gemachten Fortschritte in der Strukturbiologie ist das Verständnis über Struktur und Mechanismen verschiedener Membranproteine immer noch wesentlich geringer als das von löslichen Proteinen.

Lichtaktivierbare Proteine, wie z.B. biologische Photorezeptoren, sind deshalb besonders dazu geeignet, dynamische Veränderungen in der Proteinstruktur in Relation zu ihrer Funktion zu untersuchen. Denn diese Proteine können über Laser und Blitzlicht getriggert werden, was zu einer exzellenten zeitlichen Auflösung ihrer dynamischen Strukturveränderung führt. Da es sich bei ihnen um signaltransduzierende Proteine handelt, sind oftmals große Veränderungen in den Konformationsübergängen, die zur Bildung des signaltransduzierenden Zustands führen, zu erwarten. Einen weiteren Beitrag, den diese so genannten Photosensorproteine zur strukturellen Aufklärung von funktionellen Konformationsübergängen liefern können, liegt in der Anwesenheit ihres Chromophors und damit ihrer spezifischen Lichtabsorption begründet. In der Literatur sind bereits viele verschiedene Photorezeptorproteine beschrieben und klassifiziert worden. Dabei ist die einschlägige Vorgehensweise eine Klassifizierung, die der chemischen Struktur des lichtabsorbierenden Chromophors zugrunde liegt. Des Weiteren ist ein vorangehender Sequenzabgleich unerlässlich, um die vielen Photorezeptorproteine innerhalb einer Familie gliedern zu können.

Die wohl wichtigsten bekannten Familien sind die Rhodopsine, Phytochrome, Xanthopsine, Cryptochrome, Phototropine und die BLUF-Proteine (Abb. 1). Die primäre Photochemie dieser Proteinklasse resultiert in einer Konfigurationsänderung ihres Chromophors.

Die ersten drei in Abb.1 gezeigten Familien, weisen als Konfigurationsänderung eine *Trans/Cis*-Isomerisierung auf. Doch neuerliche Ergebnisse liefern den Beweis für eine weitere Form der Photochemie, wie die Cysteinyl-Addukt-Formation in der LOV-Domäne der Phototropine. Beide Formen initiieren die durch Absorption eines Photons ausgelöste Signalkaskade.

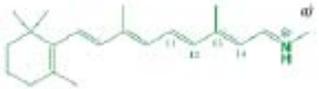
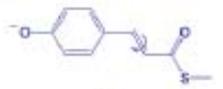
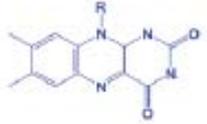
Chromophore				
Klassen	Beispiel	Strukturelement	Photosensor-Familie	Photochemie
Tetrapyrrole	Phytochromobilin		Phytochrome	<i>trans</i> ↔ <i>cis</i>
Polyene	Retinal		Rhodopsine	<i>trans</i> ↔ <i>cis</i>
	Coumarinsäure		Xanthopsine	<i>trans</i> ↔ <i>cis</i>
'aromatische'	Flavin		Cryptochrome	Elektronentransfer
			Phototropin	Cysteinyl-Addukt-Formation
			BLUF-Proteine	Protonentransfer

Abb. 1: Charakterisierung der verschiedenen Chromophorklassen und der dazu gehörigen Photosensorfamilien (Van der Horst & Hellingwerf, 2004).

Abbildung 1 zeigt nur einen kleinen Auszug der bisher in der Natur entdeckten Photorezeptorproteine. Auch wenn ein Großteil der im sichtbaren und infraroten Spektralbereich agierenden Photorezeptorproteine bereits bekannt ist, gibt es dennoch einige Systeme, die im UV-Spektralbereich fungieren. Es ist ungeklärt, ob diese Systeme Chromophore wie Carotenoide, Chlorophylle und ihre Vorstufen oder Vitamin B12 benötigen. Fast alle neu entdeckten Photosensoren werden deshalb mit einer der am besten erforschten Photosensorproteinklassen verglichen. Es handelt sich hierbei um Retinalproteine, zu denen die Rhodopsine zählen. Um ein genaueres Verständnis für die Vielfältigkeit der Rhodopsine zu erhalten, werden die nachfolgenden Kapitel zunächst die Phototransduktion der Vertebraten und anschließend die der Invertebraten beleuchten.

1.1 Rhodopsine

Die retinyliden Proteine sind eine weit verbreitete Klasse von Chromoproteinen, deren Vertreter sowohl in Prokaryonten (Bakteria und Archaea) als auch in Eukaryonten nachgewiesen wurde. Das gemeinsame Merkmal dieser lichtumwandelnden Proteine ist die prosthetische Gruppe, das so genannte Retinal oder dessen Derivate (Abb. 2)

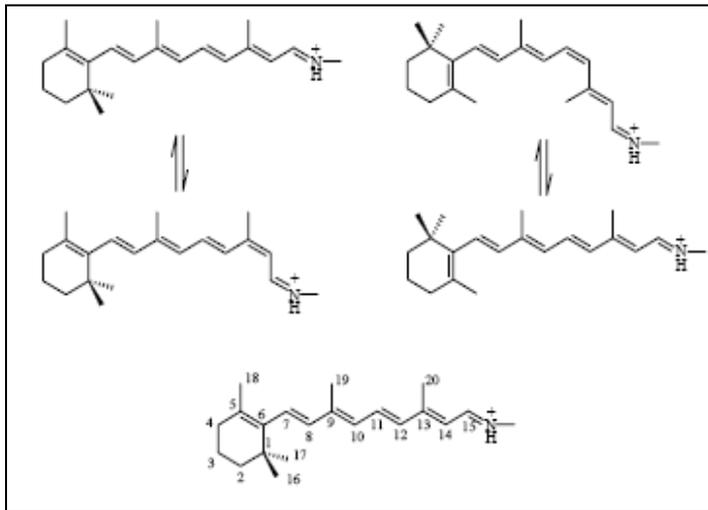


Abb. 2: **Retinalkonfigurationen und Isomerisierung in archaealen (links) und eukaryotischen Rhodopsinen (rechts)**, unten: Bezifferungsnomenklatur des Retinals

Diese transmembranen Rezeptoren gehören zu einer der am weitesten verbreiteten Proteinklassen, die 2000 Mitglieder umfassende Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Ihre Gemeinsamkeit besteht darin, extrazelluläre Signale durch Interaktion mit guanylnukleotid-bindenden Proteinen (G-Proteinen) an das Zellinnere weiterzuleiten. Trotz der durch die unterschiedlichen Funktionen

bedingten Diversität in der Sequenz, wird für alle Mitglieder dieser Proteinfamilie eine typische Anordnung von sieben transmembranen Helices (TM) als gemeinsames strukturelles Merkmal angenommen (Attwood & Findlay, 1994). Ihre Mitglieder übernehmen essentielle Funktionen als Hormon- bzw. Neurotransmitter (Birnbauer *et al.*, 1990), als Geruchs- und Geschmackssensoren (Buck & Axel, 1991) sowie die für diese Arbeit wichtige Aufnahme und Weiterverarbeitung von Licht mittels eines Photorezeptorproteins, dem Rhodopsin (Hargrave & McDowell, 1992). In den Rhodopsinen der Säuger wird die PSB-Bindung (protonierte Schiff'sche Base) nach Isomerisierung unter Bildung des Apoproteins und freien *all-trans* Retinals gelöst. Reiserisierung des Chromophors im Pigmentepithel und Rekonstitution der 11-*cis* Isomers mit dem Opsin schließen den Zyklus (Wald. & Brown, 1958). Die Vorteile dieses „offenen“ Zyklus bestehen in zusätzlichen Lichtadaptionsmechanismen, wie dem regulierbaren Verhältnis von Chromophor zu Opsin, über das der Anteil aktivierbarer Lichtrezeptoren beeinflusst werden kann.

1.2 Archaeale Retinalproteine

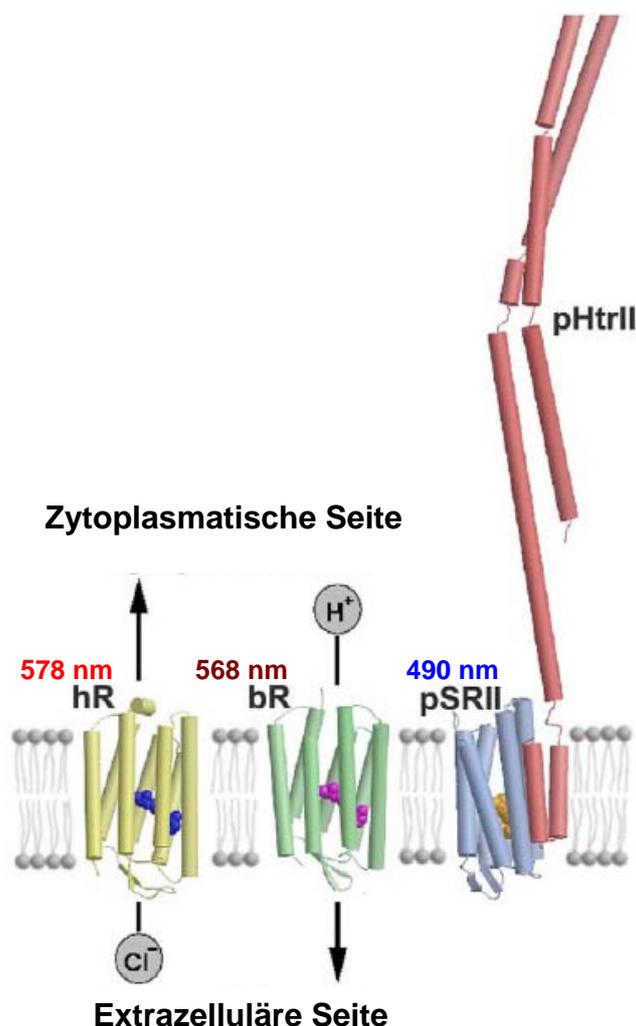
Für die Funktion als Lichtrezeptoren besitzen sowohl die eukaryontischen, als auch die archeobakteriellen Rhodopsine als universelle prosthetische Gruppe einen Retinalchromophor. Ebenfalls identisch ist die Photoisomerisierung des Chromophors als primäre Reaktion auf den Lichtreiz. Während im Rhodopsin Typ-2 die Konformation des Retinals von 11-*cis* zu *all-trans* wechselt, erfolgt diese Reaktion für archeobakterielle Rhodopsine (Typ-1) sowie für die Rhodopsine einiger Protozoa, wie der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* mit der Isomerisierung von *all-trans* zu 13-*cis* im fast umgekehrten Sinn. Ein weiterer wesentlicher Unterschied besteht darin, dass bei den letztgenannten Rhodopsinen das Retinal nach der Lichtanregung nicht vom Protein dissoziiert. So kann eine zyklische Reaktion mit thermischer Reversion des Chromophors durchlaufen werden, ohne dass eine aktive Regenerierung des Pigmentes erfolgen muss. Die Apoproteine beider Klassen, genannt Opsine, zeigen zudem keine Sequenzhomologie. Auf der Basis der bisher erbrachten strukturellen Informationen besitzen diese sieben Helices ein unterschiedliches Arrangement zueinander.

Um die Vielfalt der archaealen Retinalproteine zu verdeutlichen werden nachfolgend die Rhodopsine des wohl am Häufigsten untersuchten Vertreters der Archaea, dem *Halobacterium salinarum* (früher *H. halobium*), beleuchtet.

Halobacterium salinarum gehört zu den halophilen Archaea, die mit den methanogenen und thermoacidophilen Archaea eine dritte Domäne im phylogenetischen Stammbaum der Lebewesen bilden (Woese *et al.*, 1990). Ihren Namen bekamen die Archaea aufgrund der extremen Bedingungen, unter denen sie leben können, wie hohe Temperaturen, extreme pH-Werte und hohe Salzkonzentrationen. Halophile Archaea leben in salzhaltigen Gewässern, in denen die Salzkonzentration bis zur Sättigungsgrenze ansteigen kann. Für *H. salinarum* liegen bei etwa 4.3 M NaCl optimale Bedingungen vor. Bei Wachstumstemperaturen von 40 – 50 °C ist der Sauerstoffgehalt des Wassers niedrig. Neben der Energiegewinnung über die Atmungskette haben halophile Archaea die Möglichkeit, durch Fermentation von Arginin oder eine zweite Art der Photosynthese ATP zu synthetisieren. Letztere wird durch die auswärts gerichtete, lichtgetriebene Protonenpumpe Bacteriorhodopsin (BR) ermöglicht, die zur Familie der Retinalproteine gehört und durch vektoriellen Transport von Protonen aus der Zelle einen Protonengradienten an der Membran aufbaut, durch den die ATP-Synthese und diverse Transportprozesse ermöglicht werden (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971; Oesterhelt & Stoeckenius, 1973).

In *H. salinarum* werden neben BR noch drei weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie gefunden. Des Weiteren existieren die lichtgetriebene Anionenpumpe Halorhodopsin (HR), die im Licht die Chloridaufnahme während des Wachstums der Zellen unter isoosmolaren Bedingungen gewährleistet (Schobert & Lanyi, 1982), sowie zwei Lichtrezeptoren, Sensorrhodopsin I (SR I) und Sensorrhodopsin II (SR II).

Die Ähnlichkeit der beiden Pumpen konnte durch die Einführung einer Punktmutation experimentell bestätigt werden. Dabei wurde der Protonenakzeptor D85 in BR zum entsprechenden Rest in HR (Threonin) mutiert, wodurch BR zu einer ebenfalls einwärts gerichteten Chloridpumpe umgewandelt werden konnte (Sasaki *et al.*, 1995). Durch Absorption von zwei Photonen kann HR Protonen in die Zelle transportieren (Bamberg *et al.*, 1993).



Die Sensorrhodopsine SR I und SR II unterscheiden sich von diesen Ionenpumpen durch ihre Funktion als Photorezeptoren (SR I: Bogomolni und Spudich, 1982; SR II: Takahashi *et al.*, 1985). SR I dient als Empfänger für UV und oranges Licht, was in der Zelle eine abstoßende bzw. anziehende Reaktion auslöst. Durch das Transducerprotein HtrI wird eine Signalkaskade ausgelöst, die die Drehrichtung des Geißelapparats der Zelle ändert und so ein Wegschwimmen vom blauen bzw. Hinschwimmen zum orangen Licht ermöglicht. SR II ist ein Blaulichtrezeptor (490 nm) und löst in der Zelle durch Absorption von blauem Licht eine Fluchtreaktion aus.

Abb.3: Schematische Darstellung der Retinalproteine in der Membran von *H. salinarum* (modifiziert nach Oesterhelt, D, 1998); BR und HR: lichtgetriebene Ionenpumpen Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin (H⁺ bzw. Cl⁻), SR I/II: Lichtrezeptoren Sensorrhodopsin I und II für UV und oranges bzw. blaues Licht, mit dem Transducerprotein Htr II, der für die Weiterleitung des Lichtsignals in der Zelle sorgt. (Indizes zeigen die jeweiligen Absorptionsmaxima der Pigmente an)

1.2.1 Vergleich zwischen Bacteriorhodopsin und Sensorrhodopsin II

Um die in den nachfolgenden Kapiteln gemachten Strukturannahmen des für diese Arbeit wichtigen Rhodopsins, des Channelrhodopsin 2 aus *Chlamydomonas reinhardtii*, besser verstehen zu können, werden in diesem Kapitel zunächst die Strukturen von BR und SRII (Sensorrhodopsin II) verglichen und erläutert.

Betrachtet man die Abfolge der in einem Photozyklus durchlaufenen Intermediate, wird die Ähnlichkeit der grundlegenden photochemischen Reaktion archaebakterieller Rhodopsine wie pSRII und BR deutlich. Dies gilt insbesondere für die bereits erläuterte initiale *all-trans* zu *13-cis* Photoisomerisierung des Retinalchromophors sowie den Protonentransfer von der Schiff'schen Base (SB) zu ihrem Gegenion (D75, pSRII/D85, BR) innerhalb der ersten 100 Mikrosekunden. Dieser folgt wiederum die Bildung des „M“-Zustands (Engelhard *et al.*, 1996; Chizhov *et al.*, 1996). Durch die Deprotonierung der SB ist das Absorptionsmaximum zu etwa 390 nm hypsochrom verschoben. Simultan wird von einer komplexen Akzeptorgruppe ein Proton an das periplasmatische Medium abgegeben.

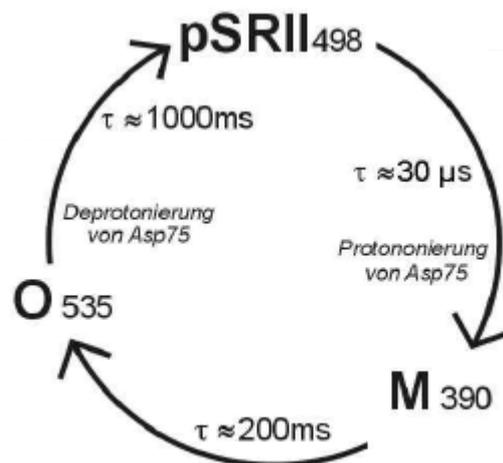


Abb. 4: Vereinfachtes Modell des Photozyklus von pSRII mit den wesentlichen Schritten der Isomerisierungen des Chromophors und des Protonentransfers von Schiff'scher Base zur Gegenladung Asp75.

Im starken Gegensatz zu BR ist der weitere Photozyklus des pSRII durch einen langlebigen „M“-Zustand (1ms-400 ms) stark verlangsamt und kehrt mit einer komplexen Kinetik über so genannte „N“- und „O“-Zustände innerhalb von Sekunden in den Grundzustand zurück (Chizhov *et al.*, 1998). Das Auftreten dieser Chromophorzustände ist indikativ für die Reprotonierung der SB von der zytoplasmatischen Seite sowie für die nachfolgende Reisoomerisierung des Chromophors. Gleichzeitig wird die Gegenladung der SB regeneriert, indem das Proton von Asp75 an die oben erwähnte Akzeptorgruppe abgegeben wird. Im Vergleich zum pSRII durchläuft BR im gleichen Zeitraum etwa 100 dieser Prozesse. Es konnte gezeigt werden, dass die Effizienz des BR in seiner Funktion als Protonenpumpe in der hohen „Turnover-Zahl“ begründet ist (Fahr *et al.*, 1981).

Was aber unterscheidet den Sensor pSRII von der Protonenpumpe BR? Durch Mutationsanalysen und anhand hochauflösender Kristallstrukturen (Essen *et al.*, 1998; Luecke *et al.*, 1999a) können eine Reihe von Aminosäureresten aufgeführt werden, die an den Protonentransferreaktionen beteiligt sind und im pSRII so nicht zur Verfügung stehen (vgl. Abb. 5). Darunter fallen saure Reste an der zytoplasmatischen Oberfläche wie D36, E161, E166 und die Schlüsselpositionen D96 und T46, die eine wesentliche Rolle in der Reprotonierung der SB spielen (Tittor *et al.*, 1989). Im pSRII sind die korrespondierenden Positionen durch hydrophobe Reste besetzt. Damit begründet sich die hohe Lebenszeit des „M“-Zustandes. Kompensiert man die letztgenannten Sequenzunterschiede durch Mutationen oder Zugabe eines Protonendonors wie Azid kann ein Photostrom regeneriert und der Zerfall des „M“-Zustandes beschleunigt werden (Takao *et al.*, 1998; Schmies *et al.*, 2000).

Weiterhin könnte die Protonenabgabe zur extrazellulären Seite dadurch behindert sein, dass



Abb. 5: Vergleich der Primärsequenz von BR und pSRII. Identische Aminosäuren sind durch Fettschrift hervorgehoben, Positionen mit einer Beteiligung an der Protonentranslokation dagegen sind schwarz hinterlegt. Transmembrane Helices sind durch ein graues Rechteck mit Überstrich gekennzeichnet.

die der Glu194 (BR) korrespondierende Position durch ein Prolin besetzt ist (Balashov *et al.*, 1997). Diese augenfälligen „Mutationen“, aber auch subtilere Veränderungen in Sequenz oder Struktur, könnten, trotz der großen Ähnlichkeiten, zur Differenzierung zwischen den Hauptfunktionen einer Protonenpumpe und eines Sensors führen. McCain *et al.* (1987) zeigten, dass die phototaktische Sensitivität durch die Lebensdauer der Photozyklusintermediate und nicht durch die Häufigkeit der Photoreaktion bestimmt ist. Wird SRI *in vivo* mit Retinalanaloga rekonstituiert, die die Reprotonierung der Schiff'schen Base, also den Zerfall des „M“-Intermediats, verzögern, so verstärkt sich proportional die photophile Antwort gegenüber orangem Licht (Yan & Spudich, 1991). Als signalgebender Zustand wird daher das „M“-Intermediat betrachtet. Das „M“-Intermediat des SRI ist aber gleichzeitig Ausgangspunkt für eine photophobe Reaktion gegenüber Blaulicht, die durch die Absorption eines zweiten Lichtquants induziert wird. Der signalgebende Zustand der photophoben Reaktion wird dem Photoprodukt des Zweiphotonenprozesses zugeschrieben (Olson *et al.*, 1995). Vergleichbare Untersuchungen am SRII lassen den Schluss zu, dass der signalgebende Zustand ebenfalls durch Deprotonierung der Schiff'schen Base erzeugt wird und noch im folgenden Intermediat mit einer reprotonierten Schiff'schen Base Bestand hat (Yan *et al.*, 1991).

1.3. *Chlamydomonas reinhardtii* und ihre spezifischen Photorezeptorproteine

C. reinhardtii ist eines der bekanntesten Modellsysteme der Forschung, um photobiologische, zell- und molekularbiologische Fragestellungen zu beantworten. Diese einzellige Grünalge aus der Familie der *Chlorophyceae* ist nur 8-10 μm groß, besitzt eine Zellwand, einen Chloroplasten, sowie als herausstehendes Merkmal einen rötlichen Augenfleck (Stigma), der Phototaxis bzw. Photophobie vermittelt (Abb.6). Zur Fortbewegung besitzt dieser Protozoe anterior ein Flagellenpaar. Durch die Schlagbewegung dieser zwei Flagellen können sich die Zellen mit einer Geschwindigkeit von ca. 120 $\mu\text{m}/\text{s}$ „brustschwimmend“, d. h. mit den

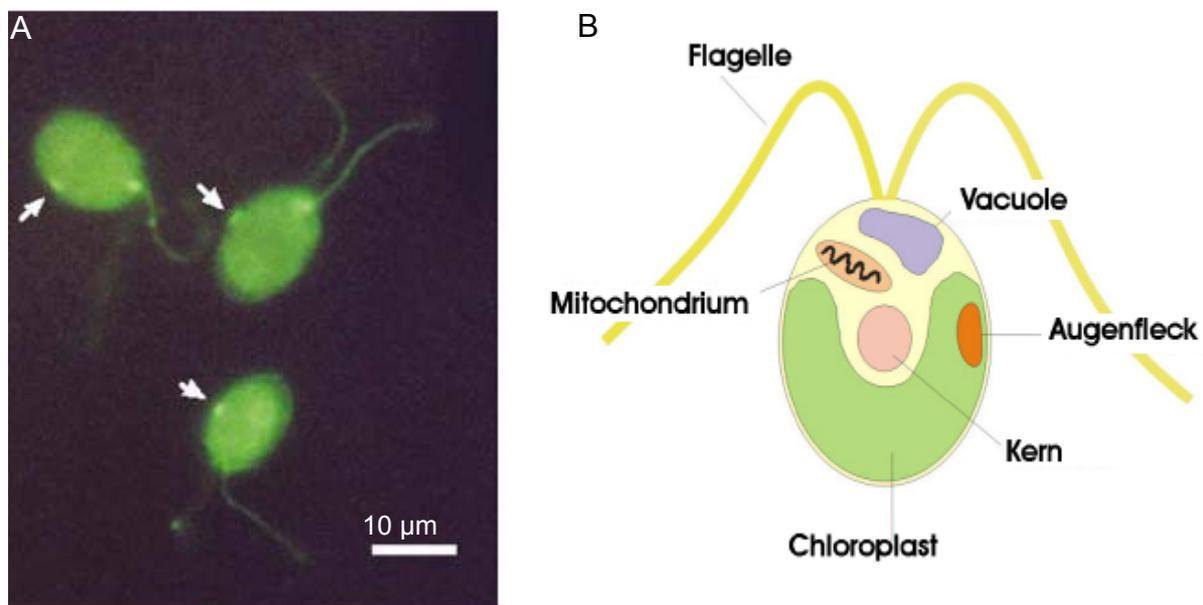


Abb.6: A) Immuncytochemische Färbung von *Chlamydomonas reinhardtii* (Suzuki et al., 2003). B) schematische Darstellung der Zelle (Hegemann & Fischer, 1999).

Flagellen voran, fortbewegen. Da letztere nicht genau in einer Ebene schlagen, resultiert eine der Vorwärtsbewegung überlagerte Rotation um die eigene Längsachse mit einer Frequenz von ca. 2 Hz. Das Schwimmverhalten der Algen wird durch die Lichtverhältnisse beeinflusst, wobei man zwei verschiedene Reaktionsmuster unterscheiden kann.

Photophobische Reaktion: Bei plötzlicher starker Änderung der Lichtintensität stoppen die Zellen ihre Schwimmbewegung, schwimmen kurz rückwärts und schließlich in eine andere Richtung vorwärts weiter. Dieses Verhalten verhindert, neben der Gefährdung durch zu starke Lichteinstrahlung, dass die Alge allzu häufig von Orten intensiver Sonneneinstrahlung zu schattigen Stellen schwimmt, so dass unnötiges Umadaptieren des photosynthetischen Apparates entfällt (Dieckmann et al., 2003).

Positive/negative Phototaxis:

Bei Dauerbeleuchtung versucht die Zelle, möglichst günstige Lichtbedingungen aufzusuchen, indem sie so lange die Richtung wechselt, bis sie bei hoher Lichtintensität von der Lichtquelle wegschwimmt oder sich bei geringer Intensität darauf zu bewegt. Dies wird dadurch erreicht, dass nur eine Flagelle ihr Schlagmuster kurzzeitig ändert. Das Photorezeptorsystem, das für die Umwandlung der Lichtsignale in Flagellenbewegungen verantwortlich ist, ist im Augenfleck lokalisiert. Abb. 6 zeigt eine schematische Darstellung der Augenfleckregion. Sie macht etwa 1 % der Zelloberfläche aus und besitzt einen Durchmesser von 1 μm . Die rötliche Farbe des „Auges“ ist auf carotinoidhaltige Vesikel zurückzuführen. Sie sind in Schichten von 125 nm Dicke und Abstand angeordnet, was jeweils $\lambda/4$ des Absorptionsmaximums des Photorezeptors entspricht. Dank dieses Aufbaus wirkt der Augenfleck als Interferenzreflektor. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Stigma einem vielschichtigen „Membran-Sandwich“ gleicht (Abb.7).

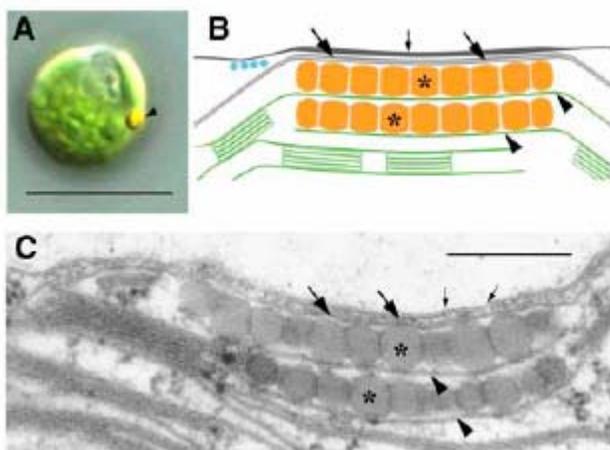


Abb.7: A) **Interferenzkontrastbild einer lebenden *Chlamydomonas* Zelle** (Maßstab 10 μm). B) **Schematische Darstellung des Augenfleckapparatus**. Die Pfeile markieren die einzelnen Membranschichten (kleiner Pfeil: Plasmamembran; große Pfeile: Thylakoidmembran). C) **Transmissions-Elektronenmicrogram** (Maßstab 300 nm) (Schmidt et al., 2006)

Die Plasmamembran befindet sich in enger Nachbarschaft zur Chloroplastenmembran (Melkonian & Robenek, 1980). Der Augenfleck von *C. reinhardtii* kann dabei bis zu acht Schichten einer membranösen Struktur aufweisen. Diese spezielle Struktur ermöglicht dem Organismus, maximal einfallendes Licht wahrzunehmen. Licht, das von der dem optischen System zugewandten Seite einstrahlt, wird an den Vesikelschichten reflektiert und durch positive Interferenz verstärkt, während Licht, das durch den Zellkörper einfällt, abgeschirmt wird. Aufgrund der Rotation der Zelle wird der Photorezeptor, der sich

in der Plasmamembran an der Außenseite des Augenflecks befindet, mit einer Frequenz von 2 Hz aktiviert.

Chlamydomonas reinhardtii diente lange Zeit der Untersuchung von Photosyntheseprozessen und Pigment-Protein-Komplexen. Diese Alge wächst heterotroph im Dunkeln durch Metabolisierung von exogenem Azetat. Die im Dunkeln gewachsenen Zellen besitzen nach wie vor eine intakte Chloroplastenstruktur und Pigmentierung und sind in der Lage, bei anschließender Illuminierung direkt in die photosynthetische CO₂-Fixierung überzugehen. Um dies genauer zu untersuchen, wurden erstmalig durch Sager (1960) genetische Manipulationen an *Chlamydomonas reinhardtii* durchgeführt. Einige Jahre später rückten jedoch mehr und mehr der Augenfleck und die Beschaffenheit seines Photorezeptorproteins in das Blickfeld der Forschung. Bis dato gab es nur Spekulationen über den Aufbau dieses Proteins. Schon vorangegangene Untersuchungen an dem phototaktischen Aktionsspektrum der vegetativen oder Gametenzellen einzelliger Algen zeigte ein typisches Rhodopsinmuster.

Schließlich konnten Foster et al. 1984 durch Experimente mit Retinal-defizienten Zellen zeigen, dass es sich bei dem Photorezeptor um ein Rhodopsin handelt. Durch einfache Zugabe von Retinal konnte die Phototaxis wiederhergestellt werden. Weitere *in vivo* Experimente mit Isomeren und Analoga des Retinals bewiesen, dass sowohl phototaktische als auch photophobische Antworten nur auf eine *all-trans*-Konformation mit anschließender Isomerisierung des Retinals an der C13-C14-Doppelbindung erfolgen können (Takahashi et al., 1991; Zacks et al., 1993). Zum finalen Beweis ist 1991 von Beckmann und Hegemann *all-trans*-Retinal extrahiert und über HPLC bestimmt worden. Somit war *C. reinhardtii* der erste Eukaryot, dem ein archaeales Retinalprotein (Typ-1) nachgewiesen werden konnte. Die komplette Erschließung des *C. reinhardtii* Genoms machte es dann möglich, noch weitere Gene, die für Opsine codieren, ausfindig zu machen (Kateriya et al., 2004) (http://www.biology.duke.edu/chlamy_genome/search.html)(<http://genome.jgi-psf.org/chlamy/>). Das Dendrogramm in Abbildung 10 zeigt die phylogenetische Verwandtschaft dieser Opsine mit anderen Typ-1 Rhodopsinen.

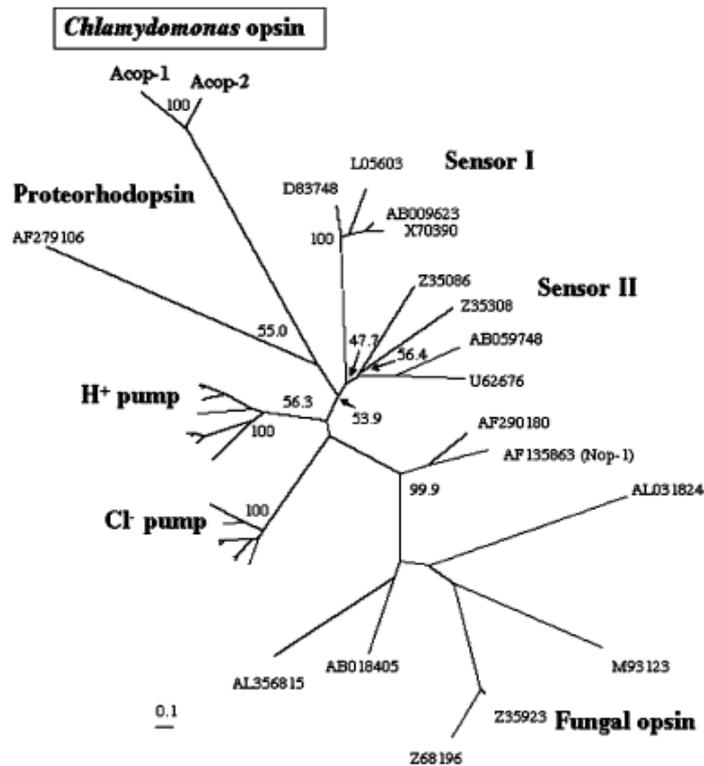


Abb.8: Dendrogramm der phylogenetischen Verwandtschaft von Typ-1 Rhodopsinen. Als Indices sind die Accession-Nr zur Genomsuche angegeben. Der Maßstab repräsentiert die geschätzten Aminosäure-Substitutionen pro Position (Suzuki et al., 2003).

Anfänglich wurden zwei Retinalproteine aus einer *Chlamydomonas* Augenfleck-Membranpräparation aufgereinigt und sequenziert (Hegemann & Deininger, 2001). Erstaunlicherweise zeigten sie eine Homologie zu invertebraten Opsinen mit einer stark konservierten Retinal-Bindungsstelle und einer G-Protein-Aktivierungsdomäne. Beide Proteine wurden gemäß der gängigen Nomenklatur Chlamyopsin 1 (Cop-1 mit 236 Aminosäuren) und 2 (Cop-2, 243 Aminosäuren) genannt. Es handelt sich bei diesen Proteinen um eine lichtabhängige Splicevariante des gleichen Gentranskripts. Durch die Antisense-Methode konnten weder Cop-1 noch Cop-2 als die primären Photorezeptoren der Phototaxis zugeordnet werden. Weitere Untersuchungen an der *Chlamydomonas*-Genomdatenbank brachten zwei um Einiges größere cDNA-Sequenzen hervor. Diese neuen Apoproteine wurden Cop-3 (712 Aminosäuren) und Cop-4 (737 As) genannt und weisen eine Homologie zu bakteriellen Opsinen auf (Hegemann et al., 2001). Andere Arbeitsgruppen, die diese Proteine fast zur selben Zeit entdeckten, benannten sie CSRA und CSRB (Sineshchekov et al., 2002) sowie Acop1 und Acop2 (Suzuki et al., 2003).

Um feststellen zu können, ob Cop-3 oder Cop-4 solch eine Ionentransportfunktion ausüben können, wurde zunächst die mRNA von Cop-3 in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert. An diesem System konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass mikrobielle Rhodopsine sich funktionell exprimieren und elektrophysiologisch messen lassen (Nagel et al, 1995). Cop-3 exprimierende Oozyten zeigten daraufhin eine lichtabhängige Stromantwort, die detailliert durch Zwei-Elektronen-Spannungsklemme (TEVC) analysiert wurde. Die beobachtete Transportaktivität ist passiv und steht in direkter Abhängigkeit zur Membranspannung und des H^+ -Konzentrationsgradienten. Auswärts gerichtete Ströme konnten bei hohem extrazellulären pH oder niedrigem intrazellulären pH beobachtet werden. Die Leitfähigkeit ist dabei hoch selektiv für Protonen. Der Strom ist während der Lichteinstrahlung stabil und fällt mit einer Zeitkonstante von $\tau = 35 \text{ ms}$ (19°C) nach Beenden des Lichtreizes ab. Die Amplitude des Stroms erhöht sich mit der Lichtintensität bis eine vollständige Sättigung erzielt ist. Das Aktionsspektrum ist rhodopsingemäß mit einem Maximum bei 500 nm (grün) ansässig. Diese Experimente ließen keinen Zweifel, dass es sich bei Cop-3 um einen Ionenkanal mit einer lichtinduzierbaren H^+ -Leitfähigkeit handelt. Entsprechend seiner neu erkannten Funktion ist dieses Photorezeptorprotein in Channelrhodopsin 1 (ChR1 oder Chop1) umbenannt worden (Nagel et al., 2002). (Abb. 10).

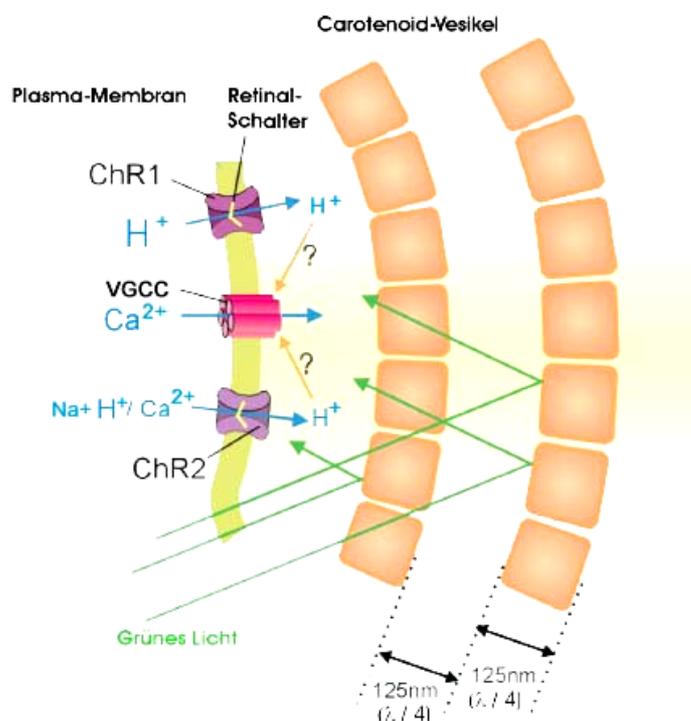


Abb. 10: **Schematische Darstellung der Augenfleckregion.** Eine Schichtanordnung aus carotinoidhaltigen Vesikeln wirkt als Interferenzreflektor und ermöglicht die Detektion der Richtung des einfallenden Lichts. Die Photorezeptoren Channelrhodopsin I und II sind an der Außenseite des Augenflecks lokalisiert und stellen lichtaktivierte Kationenkanäle dar (nach Kateriva & Hegemann, 2002

1.4 Struktur und Funktion von Channelrhodopsin 2 (ChR2)

Auch die Funktion von Cop-4 sollte nun genauer identifiziert werden, weshalb ebenfalls die cop4 mRNA in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert wurde. Erstaunlicherweise zeigten die Cop-4 Messungen des Photostroms mittels der „Giant-Patch-Technik“ eine Leitfähigkeit sowohl für H^+ als auch für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} . Des Weiteren zeigten Versuche im so genannten zellfreien oder losgelösten Patch, dass die Kanalaktivität weder von löslichen Faktoren noch Proteinen der Oozyten abhängig ist. Patch-Clamp Experimente an der humanen Zelllinie HEK293, die ebenfalls zur Expression von Cop-4 herangezogen wurde, konnten dies bestätigen. Bezüglich dieser Daten konnte Cop-4 als lichtgetriebener kationenselektiver Ionenkanal identifiziert werden und erhielt darauf den neuen Namen Channelrhodopsin 2 (ChR2 Abb. 11; Nagel et al., 2003). Für die zeitlich höher auflösende „Patch-Clamp-Technik“ wurde zuerst ein ChR2-Konstrukt mit verkürztem C-Terminus kreiert (Abb. 15). Mit diesem 315 Aminosäuren langen ChR2-Konstrukt konnte gezeigt werden, dass die N-Terminale Hälfte des Proteins mit den Transmembranhelices 1-7 für die lichtsensitive Kanalaktivität und damit für die Funktionalität von ChR2 ausreicht. Patch-Clamp-Messungen beider Konstrukte konnten belegen, dass sowohl ChR2-737 als auch ChR2-315 dasselbe Strom-Spannungsverhalten zeigen.

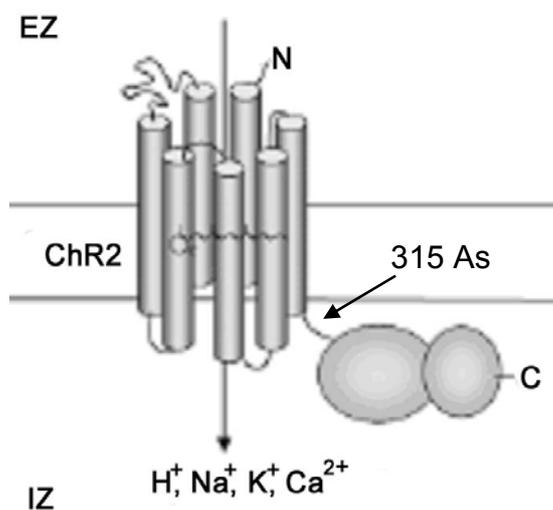


Abb. 11: **Transmembranmodell von ChR2** (737 Aminosäuren) Nagel et al., 2003

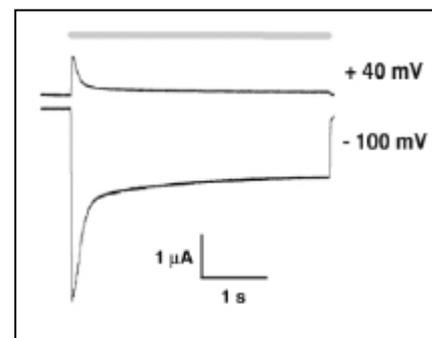


Abb. 12: **Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an ChR2-315 exprimierenden Oozyten** (Nagel et al., 2003). Der graue Balken stellt den Lichtstimulus dar.

Beide zeigen ein einwärts-gleichrichtendes Verhalten bei kontinuierlichem Lichtreiz. Der Photostrom weist einen schnellen transienten Anstieg des Signals ($\sim 200 \mu s$) mit einer langsamen stationären Komponente („steady-state“ 20 ms bis zum geschlossenen Zustand)

auf (Abb. 12). Dass sowohl beim Wildtyp als auch bei dem verkürzten ChR2 kein nachgeschaltetes Öffnen endogener Ca^{2+} - oder Chloridkanäle beobachtet werden kann, legt die Vermutung nahe, dass kein G-Protein gekoppelter Transduktionsmechanismus vorliegt. Jedoch kann das Vorhandensein eines Transducerproteins ähnlich dem HtrI bei Sensorrhodopsin I und II nicht ausgeschlossen werden.

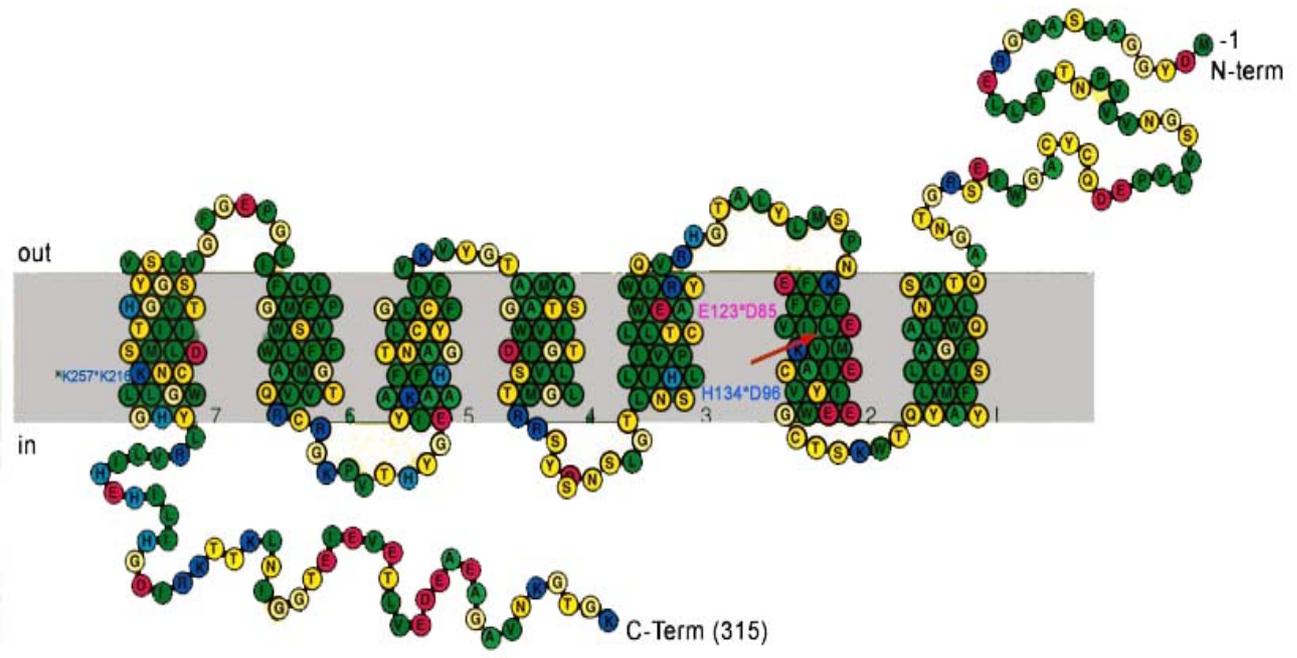


Abb. 13: **Topologiemodell von ChR2-315** (Wood, 2007)

Eingezeichnet sind Aminosäuren mit bekannten Schlüsselfunktionen in BR. D85 (Protonenakzeptor in BR; E123 in ChR2), D96 (Protonendonor der Schiff'sche Base, H134 in ChR2), Schiff'sche Base K216 (ChR2 K257).

Abbildung 12 zeigt, dass der ChR2 vermittelte Photostrom auf ein stationäres Niveau abfällt. Dies ist durch ein Umschalten auf einen weiteren Leitfähigkeitszustand begründet. Ist das Gleichgewicht unter Licht erreicht, bleibt der stationäre Strom stabil. Dennoch erreicht ein zweiter nach einer kurzen Dunkelperiode folgender Lichtpuls nicht die gleiche „Peakhöhe“, wie der vorausgegangene transiente Strom. Die Erholung des Spitzenstroms ist wiederum von zwei Faktoren abhängig. Sie ist erstens vom Membranpotential abhängig und beschleunigt sich bei negativeren Potentialen. Zweitens hängt die Erholung vom inaktiven Zustand stark vom extrazellulären pH (pH_0) ab. Sie ist langsamer bei hohem pH_0 und wird drastisch durch niedrigen pH_0 beschleunigt. Dies zeigt, dass die Wiederherstellung des aktivierbaren Kanalzustands von einer oder mehreren Protonierungen extrazellulärer Aminosäuren wie z.B. E123 (Glutamat 123 ist synonym zum Protonenakzeptor D85 in BR, Abb. 13) begleitet wird. Eine Mutation des E123 zu Glutamin (Q) hebt den transienten Photostrom völlig auf

und reduziert den stationären Photostrom um die Hälfte (Nagel et al., 2003). Damit konnte gezeigt werden, dass die Protonierung der Aminosäure E123 ausschlaggebend für die Desensibilisierung von ChR2 ist. Eine Mutation des möglichen Protonendonors H134 (D96 in BR, Abb.13 und 14) zu Arginin führt stattdessen zu einer Erhöhung des stationären Stroms, da die Desensibilisierung verlangsamt wird. Das Homologie-Modell von ChR2 in Abb. 14 zeigt, wie E123 möglicherweise als Protonenakzeptor nach Deprotonierung der Schiff'schen Base dienen könnte.

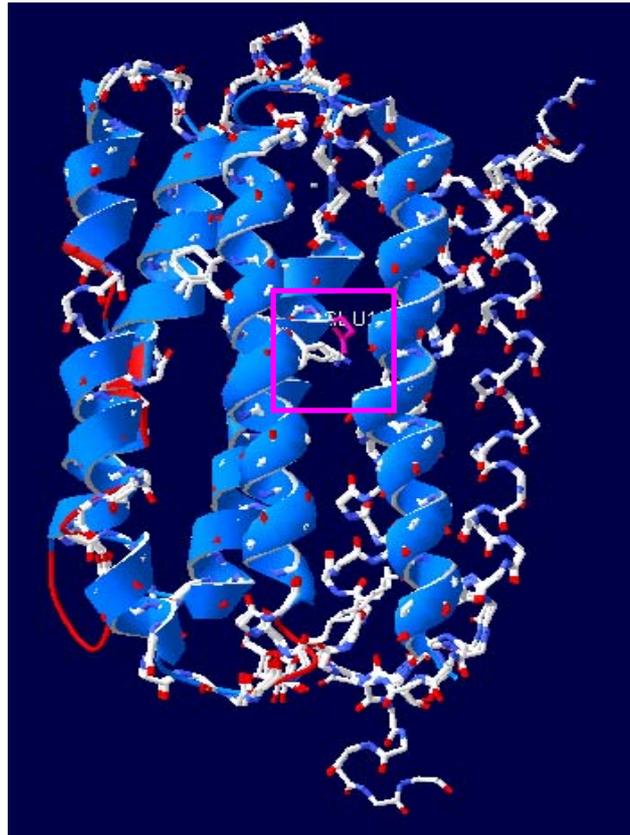


Abb.14: Auf BR basierendes ChR2-Model.

In Magenta ist die Aminosäure E123 gezeigt, die als möglicher Protonenakzeptor nach Deprotonierung der Schiff'schen Base dienen kann. Der Chromophor ist wieder in seiner *all-trans*-Konfiguration.

Die elektrophysiologischen Messungen an Oozyten lieferten bei ChR2 zudem ein anderes Aktionsspektrum als ChR1. Während ChR1 eher im grünen Bereich bei 500 nm absorbiert, liegt das Absorptionsmaximum von ChR2 bei 460 nm (Abb. 15, Deniz Dalkara, MPI für Biophysik, Frankfurt am Main, 2006). Erstaunlich ist auch die Tatsache das ChR2 in der Lage ist, sogar Ionen in der Größe von Tetramethylamonium (TMA^+) durchzulassen, da kürzlich gemachte Rauschanalysen eine Einzelkanalleitfähigkeit von etwa ~ 20 fS ergeben (Katrin Feldbauer, MPI für Biophysik; Frankfurt). Dass Channelrhodopsin 2 auch Ca^{2+} leitet, ist

bereits am Anfang dieses Kapitels erwähnt worden. Die Expression in HEK293-Zellen und anschließende elektrophysiologische Patch-Clamp-Untersuchungen im Strom geklemmten Modus konnten daraufhin belegen, dass ChR2 die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration regulieren kann. Zusammen mit der ebenfalls belegten Na^+ -Leitfähigkeit kann somit das Membranpotential der jeweilig verwendeten Expressionszelle beeinflusst werden. Viele Arbeitsgruppen haben sich aus diesem Grund ChR2 zu Nutze gemacht. Exprimiert man diesen lichtgetriebenen Kationenkanal z.B. in bestimmten Neuronen des Gehirns, kann durch einen einfachen Lichtreiz gezielt ein Zelltyp angeregt werden. Damit ist ChR2 ein hervorragendes Werkzeug zur Bestimmung neuronaler Verschaltungen (Petreanu & Svoboda, 2007).

In der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* wird diese Membrandepolarisation von ChR2 und ChR1 dazu genutzt, von phototaktischer Flagellenbewegung auf photophobische umzuschalten. Zieht man nun die Versuche von Sineshchekov und Kollegen (2002, Govorunova et al., 2004) hinzu, bei denen die zelluläre Konzentration an ChR1 und ChR2 in *Chlamydomonas* selektiv durch RNAi reduziert wurde, zeigt sich folgendes Ergebnis. *Chlamydomonas* denen ChR1 fehlte, zeigten bedeutend geringere Photoströme bei hohen Lichtintensitäten, während bei den ChR2 fehlenden *Chlamydomonas* die Ströme bei niedriger Lichtintensität reduziert waren. Da das Sättigungsverhalten bei ChR1 und ChR2 identisch ist (N. Adeishvili, MPI für Biophysik, 2006), kann angenommen werden, dass beide Photorezeptoren sowohl für Phototaxis als auch für photophobische Antworten in Frage kommen.

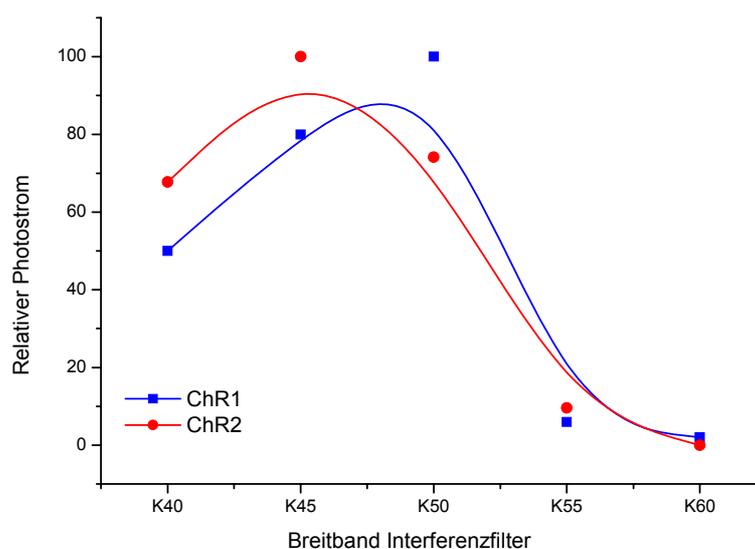


Abb. 15: **Aktionsspektrum von ChR1 und ChR2.** Normalisierte Werte des Einwertstroms, gemessen mit verschiedenen Breitband-Interferenzfiltern (Dalkara, 2006).

1.5 Die methylothrophe Hefe *Pichia Pastoris* als heterologes Expressionssystem

Hefen bieten als Wirtsorganismen für die Überexpression rekombinanter Proteine wesentliche Vorteile: Die Kultivierung von Hefen ist in der Regel einfach. Sie stellen im Vergleich zu Zelllinien höherer Organismen geringe Ansprüche an das Medium und die Kultivierungsbedingungen. Hefen lassen sich im Wesentlichen in Rührkessel-Bioreaktoren mit Standardausstattung kultivieren. Bei der Maßstabsvergrößerung von Produktionsprozessen kann auf jahrzehntelange Erfahrungen aus der Nahrungsmittelindustrie zurückgegriffen werden. Einzellige Organismen lassen sich leicht klonieren und erlauben daher, mit wohldefinierten Genpools zu arbeiten. Zudem sind Hefen genetisch gut untersucht und Protokolle zu ihrer Transformation etabliert. Wesentliche Fortschritte in der Aufklärung der genetischen Abläufe in Eukaryonten wurden an *Saccharomyces cerevisiae* gemacht (Buckholz und Gleeson, 1991). Neben *S. cerevisiae* haben sich aber auch andere Hefen als Expressionssysteme etabliert. Tabelle 1 nennt wesentliche Beispiele:

Tabelle 1: **Beispiele für die Verwendung von Hefe als Expressionssysteme**

Spezies	Promotor	Literaturstelle
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GALx (Galaktose-induziert) GAPDH (konstitutiv)	(Clare und Romanos, 1995; Gellissen und Hollenberg, 1997; Muller <i>et al.</i> , 1998)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NMT1 (konstitutiv)	(Lu <i>et al.</i> , 1997)
<i>Pichia pastoris</i>	AOX1 (Methanol-induziert) GAP (konstitutiv)	(Sreekrishna <i>et al.</i> , 1997; Higgins und Cregg, 1998)
<i>Pichia stipitis</i>	XYL1 (Xylose-induziert)	(Piontek <i>et al.</i> , 1998)
<i>Pichia methanolica</i>	AUG1 (Methanol-induziert)	(Raymond <i>et al.</i> , 1998)
<i>Hansenula polymorpha</i>	MOX (Methanol-induziert)	(Gellissen und Hollenberg, 1997)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	LAC4 (Lactose-induziert)	(Swinkels <i>et al.</i> , 1993)
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	AMY1 (Stärke-induziert)	(Piontek <i>et al.</i> , 1998)
<i>Candida boidinii</i>	AOD1 (Methanol-induziert)	(Sakai <i>et al.</i> , 1996)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	TEF (konstitutiv), XPR2 (Pepton-induziert)	(Park <i>et al.</i> , 1997; Muller <i>et al.</i> , 1998)

verändert, nach (Lin Cereghino und Cregg, 1999)

Mit den Vorteilen der einfachen Handhabbarkeit eines Einzeller-Systems verbindet sich bei Hefen das Vorhandensein eines eukaryontischen Proteinsyntheseapparates. Hefen können die notwendigen Schritte zur korrekten posttranslationalen Modifizierung von Proteinen höherer Organismen durchführen. Dazu gehören proteolytische Prozessierung, Faltung, Bildung von Disulfidbrücken und Glykosylierung (Luo *et al.*, 1995; Eckart und Bussineau, 1996; Ikegaya *et al.*, 1997; Miele *et al.*, 1997; Lin Cereghino und Cregg, 1999; Markaryan *et al.*, 1999). Die methylothrophe Hefe *Pichia pastoris* hat in den letzten Jahren besondere Aufmerksamkeit als

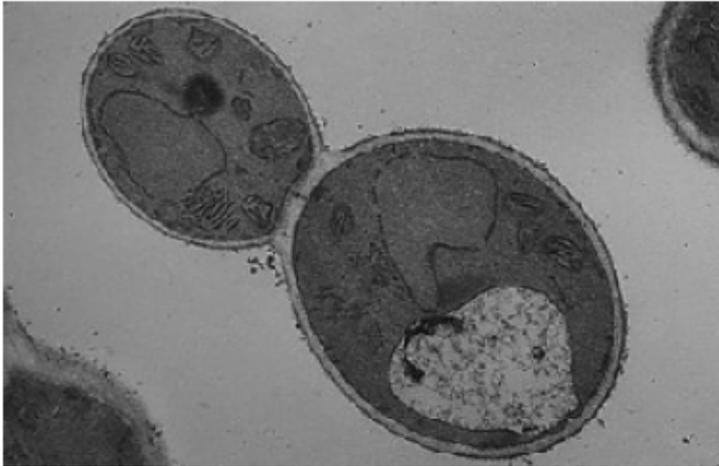


Abb. 16: **Mikroskopische Aufnahme einer knospenden *Pichia pastoris* Zelle.**

(Quelle: www.invitrogen.com)

Expressionssystem erhalten (Abb.16). Das ursprüngliche Interesse der Forschung an *Pichia* richtete sich auf die Produktion von Einzellerprotein auf der Basis von Methanol (Higgins und Cregg, 1998). Die Entdeckung des extrem starken, methanol-abhängigen *AOX1*-Promotors führte dann zur Entwicklung des *Pichia pastoris* Expressionssystems, das von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) kommerziell erhältlich ist. Dieser Promotor steuert in *Pichia* die Expression des ersten Enzyms in der Methanol-Verwertungskette, der Alkoholoxidase1, kurz AOX1 (EC 1.1.3.13). Dieses Enzym katalysiert in besonderen Organellen, den Peroxisomen die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd. FAD dient dabei als Cofaktor, das anfallende toxische Wasserstoffperoxid wird durch Katalase entgiftet. Das ebenfalls toxische Produkt Formaldehyd wird über die Kopplung an Glutathion "entschärft" und weiter verwertet (Ellis *et al.*, 1985). Die Expressionsrate der Alkoholoxidase1 in *Pichia* ist extrem hoch: Beim Wachstum auf Methanol als einziger Kohlenstoffquelle hat *AOX1* einen Anteil von 30% am gesamten löslichen Protein (Couderc und Baratti, 1980). Neben der Alkoholoxidase1 existiert die Alkoholoxidase2, die zwar weitgehend homolog ist, aber aufgrund eines schwächeren Promotors in geringerer Menge exprimiert wird. Sie ermöglicht beim Ausfall des *AOX1*-Gens trotzdem eine - wenn auch verlangsamte - Verwertung von Methanol (Ellis *et al.*, 1985; Cregg *et al.*, 1989). Das *Pichia*-Expressionssystem basiert im Wesentlichen auf der Verwendung des *AOX1*-Promotors, auch wenn mittlerweile einige andere Promotoren untersucht worden sind (Tschopp *et al.*, 1987; Waterham *et al.*, 1997). Dabei werden im Gegensatz zum häufig verwendeten autonom replizierten 2 μ -Plasmid bei *Saccharomyces cerevisiae* integrative Vektoren verwendet. Die Klonierungsschritte und Amplifikation der Plasmide werden in *E. coli* durchgeführt. Als Selektionsmarker dient in den meisten Fällen das Gen der Histidinol-Dehydrogenase (*HIS4*), das im Wirtstamm GS115 mutiert ist, so dass

eine Histidin-Auxotrophie entsteht, die durch Integration des Vektors komplementiert wird (Higgins und Cregg, 1998). Das kan^r - Gen aus Tn903, das in *P. pastoris* Resistenz gegen das Antibiotikum G418 (Geneticin) vermittelt, dient in einigen Vektoren zur Selektion auf die Integration mehrerer Expressionskassetten. Eine direkte Selektion der Transformanten auf G418-Resistenz ist allerdings nicht möglich. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren Vektoren entwickelt, die auf der Vermittlung einer Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin basieren sowie Vektoren, die den konstitutiven *GAP* Promotor verwenden. Üblicherweise existieren die Vektoren in Ausführungen mit und ohne Sekretionssignal, wobei in erster Linie das Sekretionssignal des *S. cerevisiae* Alpha-Paarungsfaktors verwendet wird. Einen Überblick über die kommerziell erhältlichen, gebräuchlichen Vektoren gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Gebräuchliche *Pichia*-Expressionsvektoren

Bezeichnung	Selektionsmarker	Promotor	Bemerkungen
pPIC3(K)	<i>his4</i>	<i>AOX1</i>	Intrazelluläre Expression. K: Multi-copy-Selektion über G418-Resistenz möglich.
pPIC9(K)	<i>his4</i>	<i>AOX1</i>	Enthält α -Faktor Sekretionssignal aus <i>S. cerevisiae</i> . K: Multi-copy-Selektion über G418-Resistenz möglich.
pPICZ(α)	<i>ble^r</i>	<i>AOX1</i>	Kleiner als pPIC3/pPIC9-Vektoren. Mit und ohne α -Faktor Sekretionssignal. Direkte Selektion und Multi-copy-Selektion über Zeocin-Resistenz.
pGAPZ(α)	<i>ble^r</i>	<i>GAP</i>	Konstitutive Expression. Kleiner als pPIC3/pPIC9-Vektoren. Mit und ohne α -Faktor Sekretionssignal. Direkte und Multi-copy-Selektion über Zeocin-Resistenz.

Die Charakteristika der kommerziell erhältlichen Wirtsstämme sind in Tabelle 3 wiedergegeben:

Tabelle 3: *Pichia*-Wirtsstämme

Bezeichnung	Genotyp	Bemerkungen
GS115	<i>his4</i>	Standard-Wirtstamm. Vektoren der pHIL, pPIC3- und pPIC9 Familien
SMD1168 SMD1163	<i>his4, pep4</i>	Protease-defizienter Wirtstamm. Vektoren wie oben. Durch Eliminierung von <i>pep4</i> fallen weitere Proteasen aus, die durch <i>pep4</i> aktiviert werden.
X33 (Y-11430)	<i>Wildtyp</i>	Vektoren der pPICz-Familie (Selektion auf Zeocin-Resistenz)
KM71	<i>his4, aox1::arg4</i>	Langsame Verwertung von Methanol

Mit dem *Pichia*-Expressionssystem sind in den letzten Jahren mehr als 800 Proteine überexprimiert worden. Die Herkunft der exprimierten Gene umfasst dabei das gesamte Spektrum der belebten Welt und die Art der exprimierten Proteine reicht von komplexen Hepatitis-B Oberflächenantigenen (Cregg *et al.*, 1987) über kleine Peptidhormone (Clare *et al.*, 1991b) bis hin zu industriellen Enzymen (Juge *et al.*, 1996). Eine Reihe von Proteinen konnte dabei im Grammbereich (bezogen auf 1 Liter Kulturvolumen) exprimiert werden. Tabelle 4 fasst die bisher besten Expressionsergebnisse zusammen. Die in Tabelle 4 genannten Beispiele stellen die Obergrenze der bisher erzielten Expressionsraten dar. Für das Gros der in *Pichia* exprimierten Proteine werden dagegen Expressionsraten im Bereich um 50 mg/L beschrieben. Am unteren Ende der Skala ist die Expression einer Reihe von Proteinen im Bereich <1 mg·l⁻¹ dokumentiert (Ohsawa *et al.*, 1995; Weiss *et al.*, 1995; Pflanz *et al.*, 1999),

Tabelle 4: Mit dem *Pichia*-Expressionssystem erzielte Ergebnisse

intrazellulär/ sekretiert	Produkt (Herkunftsorganismus)	Expressionslevel [g·l ⁻¹]	Literaturstelle
I	Tetanustoxin Fragment C (<i>Clostridium tetani</i>)	12	(Clare <i>et al.</i> , 1991a)
I	Hydroxynitril-Lyase (<i>Hevea brasiliensis</i>)	22	(Hasslacher <i>et al.</i> , 1997)
I	Hüllprotein (HIV)	1,25	(Scorer <i>et al.</i> , 1993)
I	Pertactin (<i>Bordetella pertussis</i>)	3,0	(Romanos <i>et al.</i> , 1991)
I	Tumor-Nekrosefaktor (human)	10	(Sreekrishna <i>et al.</i> , 1989)
S	α -Amylase (<i>Bacillus licheniformis</i>)	2,5	(Paifer <i>et al.</i> , 1994)
S	Koagulationshemmer (<i>Ornithodoros moubata</i>)	1,7	(Laroche <i>et al.</i> , 1994)
S	Bm86 Antigen (<i>Boophilus microplus</i>)	1,5	(Rodriguez <i>et al.</i> , 1994)
S	Invertase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	2,3	(Tschopp <i>et al.</i> , 1987)
S	Kunitz Proteaseinhibitor (human)	1,0	(Van Nostrand <i>et al.</i> , 1994)
S	Synthetische Gelatine (<i>Mus spec.</i>)	14,8	(Werten <i>et al.</i> , 1999)
S	scFv (α -CEA)	1,2	(Freyre <i>et al.</i> , 2000)

daneben existieren Fälle, in denen gar keine Expression nachgewiesen werden konnte, obwohl die Transkription im Northern-Blot nachweisbar war, so z. B. bei einem Konstrukt, das die V_H und C_{H1} Domänen eines humanen Antikörpers umfasst (M. Stassen, Universität Maastricht, persönliche Mitteilung). Hinsichtlich ihrer qualitativen Eigenschaften unterscheiden sich viele in *Pichia* überexprimierte Proteine nicht von den entsprechenden

nativen Proteinen (Fierobe *et al.*, 1997; Nilsen *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 1998; Han und Lei, 1999; Sun *et al.*, 1999). Bei einigen Proteinen verursachen *Pichia*-eigene Proteasen Probleme durch Degradation des Produkts noch während der Expression. Zum Teil ließen sich diese Probleme durch Expression bei niedrigem pH (Scorer *et al.*, 1993; Wertén *et al.*, 1999), Zusatz von Kasein-Totalhydrolysat (Clare *et al.*, 1991b; Clare *et al.*, 1998; Wertén *et al.*, 1999) oder Verwendung des proteasedefizienten Wirtsstammes SMD1168 und SMD1163 (siehe Tabelle 3) (Brankamp *et al.*, 1995; White *et al.*, 1995) vermeiden, zum Teil waren solche Maßnahmen aber auch erfolglos (Juge *et al.*, 1996; Henry *et al.*, 1997; Holmquist *et al.*, 1997). Auch bezüglich der Glykosylierung sind erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Proteinen gefunden worden: *Pichia* erkennt O- und N-Glykosylierungsstellen (Heimo *et al.*, 1997) und ist in der Lage, Glykosylierungen durchzuführen, die denen der nativen Proteine sehr ähnlich sind (Holmquist *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 1998; Han und Lei, 1999; Sun *et al.*, 1999). Die in *Pichia* festgestellten Glykosylierungen waren in einigen Fällen unterschiedlich von den in *Saccharomyces* beobachteten (Miele *et al.*, 1997), da *Pichia* scheint weniger zur Hyperglykosylierung zu neigen scheint. In einigen Fällen wurde aber auch Hyperglykosylierung beobachtet (Scorer *et al.*, 1993; Hellwig *et al.*, 1999), die zum Teil dazu führte, dass das rekombinante Protein von Antikörpern, die gegen das native Gegenstück erzeugt wurden, nicht erkannt wurde (Clare *et al.*, 1998). Es ist in solchen Fällen möglich, die Glykosylierungsstellen auf genetischer Ebene durch ortsgerichtete Mutagenese auszuschalten (Munshi *et al.*, 1997). Die Fermentation von *P. pastoris* ist insofern einfach, als das der Organismus prinzipiell keine besonderen Ansprüche an die Ausstattung des Reaktors stellt und auf billigen synthetischen Medien wächst (Zhu *et al.*, 1995; Stratton *et al.*, 1998). Mit Glycerin oder Methanol als Kohlenstoffquelle lassen sich im Zulaufverfahren extrem hohe Zelldichten von bis zu 450 g Frischgewicht pro Liter Kulturvolumen erreichen (Siegel und Brierley, 1989; Clare und Romanos, 1995; Kim *et al.*, 1997). Die Fermentationsstrategie folgt in der Regel den im Handbuch der Fa. Invitrogen gegebenen Vorschlägen: Zunächst wird im ansatzweisen Verfahren mit Glycerin als Kohlenstoffquelle fermentiert, bis die vorgelegte Menge Glycerin verbraucht ist, was am rapiden Ansteigen der gelösten Sauerstoffkonzentration erkennbar wird. Zu diesem Zeitpunkt wird Glycerin im Zulaufverfahren in limitierender Rate zugefüttert, entweder für eine bestimmte Zeit oder bis eine bestimmte Zelldichte erreicht ist. Anschließend wird das Zulaufverfahren zur Induktion auf Methanol als einzige Kohlenstoffquelle umgestellt. Die Zufuhr rate von Methanol wird dabei anhand von Erfahrungswerten langsam gesteigert. Um zu verhindern, dass Methanol zu toxischen Konzentrationen akkumuliert, wird die Methanolzufuhr in regelmäßigen Abständen gestoppt

und die Zeit bestimmt, die bis zum Ansteigen der Gelöstsauerstoffkonzentration verstreicht. Liegt diese Zeit über einem Wert von 30-60 s, wird die Methanolzufuhr rate anschließend gesenkt. Mit dieser Strategie lassen sich Zufuhr rates, die in etwa im Bereich der kombinierten Verbrauchs und Verdunstungsraten liegen, realisieren. Abweichend von diesen Fermentationstrategien sind vereinzelt *Pichia*-Fermentationen im kontinuierlichen Verfahren (Ellis *et al.*, 1985; Digan *et al.*, 1989; Sreekrishna *et al.*, 1989) und Fermentationen im Zufuhrverfahren mit Mischungen von Glyzerin und Methanol in verschiedenen Verhältnissen beschrieben (Sreekrishna *et al.*, 1989; Loewen *et al.*, 1997; Sreekrishna *et al.*, 1997; Katakura *et al.*, 1998). Diese Eigenschaften charakterisieren das *Pichia* Expressionssystem als ein System, mit dem sich bestimmte Proteine speziell bei Einsatz etwas aufwendigerer Fermentationstechnik durchaus in großen Mengen produzieren lassen. Das Problem bei der Erzeugung und Selektion von Expressorklonen für bestimmte Proteine liegt offensichtlich aufgrund proteinspezifischer Eigenschaften auf posttranskriptionaler Ebene.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Channelrhodopsin 2 ist seit seiner Entdeckung im besonderen Maße in das Rampenlicht der Forschung getreten. Es ist der einzige Kationen-Selektive Ionenkanal, der lichtgetrieben ist und mit dem es möglich ist, Zellen per Lichtanregung zu depolarisieren. Damit dient ChR2 vielen Arbeitsgruppen als Werkzeug zur gezielten Studie Neuronaler Netzwerke. Es liegen demzufolge viele elektrophysiologische Grundkenntnisse über ChR2 vor. Bis jetzt ist es doch nicht gelungen, ChR2 in hoher Rate funktionell zu exprimieren, um anschließende spektroskopische Untersuchungen durchzuführen. Expressionsversuche in *E.coli* lieferten bisher nur nicht korrekt gefaltetes Protein.

Deshalb war die Zielsetzung dieser Arbeit zunächst die funktionelle, heterologe Expression von ChR2 in einem Host-System wie der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris*. Von ihr ist bekannt, dass sie eine höchstmögliche Proteinausbeute liefern kann und in der Lage ist die posttranslationale Modifikation einem eukaryontischen System entsprechend durchzuführen (siehe vorangegangenes Kapitel).

Das gewonnene Protein sollte solubilisiert und mittels der Nickel-NTA-Chromatographie ("Nitrilo-triacetic acid") aufgereinigt werden. Das reine Protein sollte daraufhin zur funktionellen Analyse mittels lichtinduzierten Ladungstransportmessungen an planaren Lipiddoppelschichten, der so genannten BLM-Technik, gemessen werden. Da spektroskopische Messungen bei fast allen Rhodopsinen bis ins Detail durchgeführt wurden und diese im besonderen Maße Aufschluss über den Photozyklus und die Funktionsweise der jeweiligen Rhodopsine lieferten, sollte in dieser Arbeit eine spektroskopische Grundcharakterisierung von ChR2 anhand der Laser-Flash-Photolyse erfolgen. Mit dieser Methode kann die zeitliche Absorptionskinetik mit den bereits detailliert erhobenen elektrophysiologischen Daten korreliert werden. Die Zusammenführung spektroskopischer und elektrophysiologischer Daten in dieser Arbeit sollte dazu beitragen, ein molekulares Verständnis der Funktion von ChR2 zu ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A. Qualität und stammten von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche (Penzberg).

Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte mit dem Pfu-DNA Polymerase-System von Stratagene (La Jolla, USA). Die TEV-Protease wurde von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Ligationen wurden mit T4-DNA-Ligase-Kit von Roche (Penzberg) durchgeführt.

Der 1 kB DNA-Marker MassRuler™ DNA Ladder stammte von Stratagene (La Jolla, CA, USA)

Die für die Zellanzucht verwendeten Antibiotika und das *all-trans* Retinal waren von Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Nährmedien (Trypton und Hefe-Extrakt) von Roth (Karlsruhe). Der verwendete HMW-Proteinmarker SeeBlue™ (Invitrogen) enthielt Lysozyme (16 kDa), Myoglobin Red (22 kDa), Carboanhydrase (36 kDa), Alkoholdehydrogenase (50 kDa), Glutamatdehydrogenase (64 kDa), BSA (98 kDa), Phosphorylase (148 kDa) und Myosin (250 kDa). Proteinase Inhibitor Cocktail und RNase Inhibitor wurde von Roche (Penzberg) bezogen. Lipide und Detergentien waren von Sigma (Steinheim) sowie Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA).

2.1 Allgemeine Chemikalien

Acrylamid-Fertiglösung für SDS-Gele	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose, electrophoresis Grade	Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu-Isenburg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampicillin, Natriumsalz (Amp)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, Toluidinsalz (BCIP)	4- Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Calciumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Coomassie</i> Brillantblau R-250	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Desoxynukleosid-5'-triphosphate (dATP, dGTP, dTTP)	Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
1,4-Dithiothreit (DTT)	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Ethidiumbromid	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Forskolin (FSK)	Biotrend Chemikalien GmbH
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Imidazol	E. Merck, Darmstadt
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magermilchpulver "Alevita"	Nestlé, München
Magnesiumchlorid	Fluka/ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Magnesiumsulfat	Fluka/ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Koch-Light LTD, Haverhill, Suffolk, U.K.
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumhydroxyd (NaOH)	E. Merck, Darmstadt
Nitroblautetrazolium, Toluidinsalz (NBT)	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Pepton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Phenol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure 37%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Silbernitrat (AgNO ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tetracyclin-Hydrochlorid (Tet)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tunicamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

2.1.1 Protease Inhibitoren

Aprotinin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bacitracin	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Benzamidin	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Chymostatin	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
Complete [®] Proteaseinhibitor <i>Cocktail</i> , EDTA free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Leupeptin	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Pepstatin A	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.1.2 Detergentien

3-[N-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
Cholat, Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyoxyethylene-(20)-cetyl-ether (C16 / 20) Brij-58	Sigma Taufkirchen
C12E8	Sigma Taufkirchen
LDAO (n-dodecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Digitonin, wasserlöslich	Serva GmbH & Co., Heidelberg
n-Decyl- β -D-maltosid (DM)	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
n-Dodecyl- β -D-maltosid (LM)	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
n-Octyl- β -D-glucoopyranosid (OG)	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
N-dodecylphosphocholine, Fos12	Anatrace, Maumee, OH, USA
N-hexadecylphosphocholine, Fos16	Anatrace, Maumee, OH, USA
N-tetradecylphosphocholine, Fos14	Anatrace, Maumee, OH, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween)	Koch-Light LTD, Haverhill, Suffolk, U.K.
Triton X-100	Koch-Light LTD, Haverhill, Suffolk, U.K.

2.1.3 Säulenmatrizes

ImmunoPure [®] Immobilized Monomeric Avidin Gel	Pierce/KMF Laborchemie Handels GmbH, St. Augustin
MicroSpin [™] S-200 HR	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Mini Q PC 1.6/3	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ni-NTA	Qiagen GmbH, Hilden
Superose 6 PC 3.2/30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superose 12 PC 3.2/30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.4 Allgemeine Puffer und Lösungen

Agarosegel (1%)	1g Agarose 100 ml 1 × TAE Puffer 2,5 µl EtBr (10 mg/ml in H ₂ O)
Ampicillin-Stammlösung 1000 ×	150 mg/ml in H ₂ O (sterilfiltriert, bei -20°C lagern)
AP-Puffer	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Aprotinin 5000 × Auftragsmix (DNS)	10 mg/ml in PBS 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 5 mM EDTA 50% (v/v) Glycerin 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Auftragspuffer 4 × (Proteingele)	0,25M Tris/HCl, pH 6,8 8% (w/v) SDS 40% (w/v) Glycerin 20% (v/v) 2-Mercaptoethanol 0,004% (w/v) Bromphenolblau
BCIP-Lösung	50 mg BCIP/ml DMF Lagerung bei -20°C
Benzamidin (100 ×) Blotpuffer (<i>Western Blot</i>)	100 mM in H ₂ O 38 mM Glycin 10 mM Tris 20% (v/v) Methanol
Chymostatin (100 ×)	6 mg/ml in DMSO Lagerung bei -20°C für max. 1 Monat
Coomassie-Färbelösung	1,25 g Coomassie Brillantblau R-250 200 ml H ₂ O 50 ml Essigsäure 250 ml techn. Ethanol nach Ansetzen filtrieren
Elektrophoresepuffer 10 × (für Proteingele)	500 mM Tris 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS

Entfärbelösung (<i>Coomassie</i>)	1 l techn. Ethanol 1 l H ₂ O 200 ml Essigsäure
Entwickler (Silberfärbung)	2,5% Na ₂ CO ₃ 0,04% (v/v) Formaldehyd
Fixierlösung (Silberfärbung)	30% Ethanol 10% Essigsäure
Hepes-Puffer	20 mM HEPES, pH 7,4 100 mM NaCl 12 mM MgCl ₂ 0,02% NaN ₃
Konditionierlösung (Silberfärbung)	400 mM Natriumacetat, pH 6,0 0,5% (v/v) Glutardialdehyd 0,1% (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ 30% (v/v) Ethanol
Leupeptin (500 ×)	0,25 mg/ml in mp H ₂ O Lagerung bei -20°C für max. 6 Monate
Lipidmix	3% <i>n</i> -Dodecyl-β-D-Maltosid 0,6% Cholesterylhemisuccinat 1,5 % Phosphatidylcholin
NBT-Lösung	50 mg NBT/ml 70% DMF Lagerung bei -20°C
PBS-Puffer	13,7 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 13 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM NaN ₃ (fakultativ)
Pepstatin A (500 ×)	0,35 mg/ml in Methanol Lagerung bei -20°C für max. 1 Monat
PMSF (200 ×)	200 mM in Isopropanol Lagerung bei -20°C für max. 6 Monate
Ponceau S Lösung	0,2% (w/v) Ponceau S 3% (w/v) TCA
Silberlösung (Silberfärbung)	0,1% (w/v) AgNO ₃ 0,025% (v/v) Formaldehyd

TAE-Puffer 50 ×	2M Tris 1M Essigsäure 50mM EDTA, Dinatriumsalz
TBE-Puffer 10 ×	0.9 M Tris 0,9 M Borsäure 20mM EDTA, Dinatriumsalz
TBS-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,4 150 mM NaCl
TBST-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05% Tween 20

2.1.5 Verwendete Kits und Antikörper

- Quiagen PCR Purification Kit (Quiagen GmbH, Hilden)
- Quiagen Gel Excision Kit
- Eppendorf Plasmid Mini-Kit (Eppendorf, Hamburg)
- Invitrogen Plasmid-Midi-Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
- ECL-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- TNT^R Coupled Wheat Germ Extract Systems (Promega, Mannheim)
- TNT^R Coupled Reticulocyte Extract Systems (Promega, Mannheim)
- Rapid Translation System RTS 500 *E. Coli* HY Kit (Roche, Penzberg)
- Dialyse Chamber 10 K (Pearce)
- BCA Protein Assay-Kit (Biorad, München)

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen erfolgten mit dem Mini-PROTEAN II-System der Firma Biorad (München), für radioaktive Proben wurden Einmal-Gelkassetten der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

•

Antikörper: Anti-Polyhistidin His6 Peroxidase (mouse) (Roche), GFP-HRP-Conjugated (Abcam)

2.1.6 Vektoren und Stämme

- pPic9K (Invitrogen, Karlsruhe)
- pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe)
- pBK-CMV (Stratagene, La Jolla, USA)
- pUCBM20 (Roche)
- pGEMHE-RG (pGEMR) (Promega, Mannheim)
- pcDNA4TO (Invitrogen)

Stämme zur Transformation in *E.coli*:

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

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI_qZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]

Pichia pastoris

SMD 1163; Mut⁺, His⁻, proteasedefizient (*his4, pep4, prb*) Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Humane Zelllinie:

Human Embryonic Kidney-Zellen: HEK293 (Iongate, Frankfurt)

2.1.7 Primer

Es wurden nur zwei Primer benötigt, da alle anderen Inserts direkt über den Verdau mit Restriktionsenzymen gewonnen werden konnten.

SnaBI-ChR2-737: 5'-GGT TAC GTA ATG GAT TAT GGA GGC GCC-3'

GC-Anteil 51,9% T_m: 66,5°C, 93 pmol/μl

EcoRI-His9ChR2-737: 5'-CGC GAA TTC TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTG CTC GCC AAG CTC GCG-3'

GC-Anteil 55% T_m: 75 °C, 30 pmol/μl

Die Annealingtemperatur belief sich schließlich auf 64 °C und wurde über eine Gradienten-PCR bestimmt.

2.1.8 Medien

E. Coli Stamm XL1-Blue: *endA1*, *hsdR17*(rk-, mk+), *supE44*, *thi-1*, λ -, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*) U169 [F': *proAB*, *lacI*^q Δ M15, Tn10(*Tet*^r)] (Bullock et al., 1987), Stratagene GmbH, Heidelberg

LB-Medium

Bacto Trypton 10 g/l

Bacto Yeast Extract 5 g/l

NaCl 5 g/l

Bacto Agar 15 g/l (für Festmedium)

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und im Autokalven sterilisieren

Medien für die Zellkultur:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12)	Cell Concepts GmbH, Freiburg
Isocove's Modified Dulbecco's Medium (IMEM)	Cell Concepts GmbH, Freiburg
Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FKS)	GibcoBRL, Life Technologies, GmbH
L-Glutamin (200mM)	Cell Concepts GmbH, Freiburg
Penicillin-Streptomycin 100 × Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tryptose Phosphate Broth Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Medium für adhärenente Zellen:	45% IMEM/F12 45% DMEM 10% FCS 2 mM Glutamin

Kulturflaschen und –schalen:

Magnet-Rührflaschen für Spinner-System der Firma Techne Ltd, Cambridge, U.K.
 Suspensionskulturen Cellspin Spinner-System der Firma INTEGRA Biosciences/Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald

Micro Well™ Platten Nunclon™Δ: 96- Wells Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich

Multischalen Nunclon™Δ: 6/24-Wells Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich

Zellkulturflaschen Nunclon™Δ: 50 ml/24 cm² , 260 ml/83 cm² , 800/175 cm² Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich

Zellkulturschalen Nunclon™Δ: 5 ml/ 21,5 cm² , 35 ml/145 cm² Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich

Sonstige Materialien:

Autoklaven:

Systec V-150 Systec GmbH, Wetttenberg

MELAG-Dampfautoklav Typ 24 Bachofer GmbH, Reutlingen

Hoch Druckdampfsterilisator Holzner, Nussloch

DSTLV-766-1 VP-DE

Brutschrank Heraeus BB 6060 Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Brutschrank Modell QWJ 500T Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich

Einmalpipetten (serologisch, steril) Greiner GmbH, Frickenhausen

Kryoröhrchen 1 ml Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich

Mikroskop Olympus IMT-2 Olympus Optical LTD., Japan

Sterilbank Typ Nunc 20229 Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich

Trockenschrank Heraeus Typ T 5060 E Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Zählkammer, Neubauer Gesellschaft für Laborbedarf GmbH Würzburg

Zellschaber INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald

Zentrifuge Universal 2S Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen

Kulturröhrchen Gesellschaft für Laborbedarf GmbH, Würzburg

Küvetten Biorad, München

Petrischalen aus Polystyrol Greiner und Söhne GmbH & Co. KG, Nürtingen

PP-Röhrchen (15 ml/50 ml) Sarstedt, Nümbrecht

Schüttelinkubator, dreistöckig Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Schüttelinkubator, Lab-Therm	Adolf Kühner AG, Schweiz
Schüttler G10 Gyrotory [®] Shaker	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edsion, N J, USA
Tischzentrifuge Sigma-3K12	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ultrazentrifuge TL 100	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA
Vortex VF2	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik
Zentrifuge Sorvall RC 5B	Sorvall, Bad Homburg

Medien und Zubehör für <i>Pichia pastoris</i>
--

Alle Medien und Gerätschaften wurden detailgetreu aus dem **Multi-Copy *Pichia* Expression Kit (Version F 010302 25-0170)** von Invitrogen übernommen und können der Homepage unter www.invitrogen.com entnommen werden.

- Zum Zellaufschluss wurde der BeatBeater von Carl-Roth (Karlsruhe) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die Anzucht des kompetenten XL1-Blue *E.coli*-Stamms erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C in LB-Medium. Entsprechende Antibiotika wurden dem Medium in der gewünschten Konzentration zugesetzt. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Agarplatten oder aus Glycerinkulturen angeimpft. Für eine große *E. coli*-Kultur (50-250 ml) wurden die Hauptkulturen in einem Verhältnis von 1:100 mit den Vorkulturen angeimpft. Das bakterielle Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Zur längeren Lagerung von Bakterienstämmen wurden 700 µl einer Übernachtskultur mit 700 µl 87%igem sterilem Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80°C gelagert.

Klonierung

Folgende Konstrukte wurden hergestellt:

pPic9K-ChR2-315-TEV-YFP-His. Dazu wurde aus dem Vektor pBK-CMV (Klon 229) das gewünschte ChR2-315-TEV-YFP-His-Insert über die Restriktionsenzyme BamHI und NotI herausgeschnitten und nach Öffnen des pPic9K-Vektors mit den gleichen Enzymen in diesen hineinligiert. Das gleiche Prinzip wurde für das Konstrukt **pPic9K-ChR2-315H134R-TEV-YFP-His** angewendet, für das als Ausgangsvektor pBK-CMV Klon 239 mit entsprechendem Insert gewählt wurde. Für das Wildtyp-Konstrukt pPic9K-ChR2-MYC737-His wurde als Ausgangsvektor pcDNA3.1-Myc-ChR2-737 verwendet (Leihgabe des MPI für Hirnforschung, Dr. Bettina Himmel). Dazu mussten über PCR neue Schnittstellen eingeführt werden, so dass das Insert Myc-ChR2-737 über SnaBI und EcoRI einligiert werden konnte. Der fehlende His-tag wurde anschließend über eine weitere PCR mit EcoRI-His9x-Primer angefügt. Der Vektor pGem-ChR2-YFP (Klon 115) wurde zur Expression in Oozyten eingesetzt. Der pUCBM20-Vektor wurde für die zellfreie Synthese verwendet. Die Einklonierung erfolgte hier über BamHI und HindIII.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung eines DNA-Abschnittes mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase, in dieser Arbeit die Pfu-Polymerase (Stratagene). Die drei Schritte der Reaktion sind die DNA-Denaturierung bei 94°C, Bindung und Hybridisierung eines *Primer*-Paares am 3'- und 5'-Ende des zu amplifizierenden Abschnittes bei einer niedrigen Temperatur und schließlich die Synthese der neuen DNA durch die hitzestabile DNA-Polymerase bei 72°C. Diese Reaktionsfolge wird 20-30-mal wiederholt, so dass das gewünschte DNA-Fragment in exponentiell steigender Menge synthetisiert wird.

Zu Amplifizierung der DNA-Fragmente wurden 50 pmol des *Templates* mit 5 µl (1/10 Vol.) 10 × Polymerasepuffer, 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 20 pmol pro *Primer* und 1 U Polymerase gemischt. Der PCR Ansatz wurde anschließend mit H₂O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt.

Die DNA-Amplifizierung wurde innerhalb von 30 Zyklen in einer PCR-Apparatur durchgeführt. Die optimalen Reaktionsbedingungen (Inkubationszeit und Temperatur, Konzentration der einzelnen Komponenten) sind von der jeweiligen *Primer-Template*-Kombination abhängig und müssen für jede Reaktion optimiert werden.

Der Erfolg der PCR wurde auf einem Agarosegel überprüft. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden schließlich mit Hilfe von Qiaquick-Spinsäulen oder über eine präparative Gelelektrophorese mit Hilfe des Gelextraktions-Kits der Firma Qiagen aufgereinigt.

PCR-Protokoll	
Temperatur	Zeit
94°C Hotstart	1 min
94°C Denaturierung	1 min
Den Primern entsprechende Annealingtemperatur	1:15 min
72°C Elongation	2:30 min
Finale Elongation	8:00 min
Pause bei 4°C	

} 30 Zyklen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem Qiaex® Gel Extraction Kit (Qiagen, Düsseldorf) nach Herstellerangaben. Das Agarosegel wird auf einem UV-Schirm beleuchtet und das zu isolierende DNA-Fragment mit einem Skalpell herausgeschnitten. In einem Eppendorfgesäß wird das Gewicht des Gelstückchens bestimmt und pro 100 mg Gel 300 µl QX1-Puffer zugesetzt, um die Agarose aufzulösen. Nach Zugabe von 10 µl Glasmilch (QIAEX II) wird die Lösung 10 min bei 50 °C inkubiert, um die DNA an die Glaskügelchen zu adsorbieren, wobei die Lösung alle 2 min geschüttelt wird. Das Gemisch wird 30 s bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgetrennt. Nach Waschen mit 500 µl QX1-Puffer und zweimal 500 µl Puffer PE (jeweils 30 s bei 14000 rpm zentrifugiert) wird das Pellet an der Luft getrocknet und nach Zugabe von 20 µl H₂O resuspendiert. Nach 5 min bei RT (bei Fragmenten > 4 kB 10 min bei 50 °C) wird erneut zentrifugiert und der Überstand mit der DNA in ein steriles Eppendorfgesäß überführt.

Spezifische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Je nach Konzentration werden 1 - 5 µl Vektor-DNA mit 1 µl der Enzymlösung und 1/10 des Endvolumens an Enzympuffer (10 x Puffer von New England Biolabs) auf ein Endvolumen von 10 - 20 µl mit sterilem H₂O verdünnt und 1 - 2 h bei 37 °C bzw. bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

Für die Linearisierung des pPik9k-Vektors mit PmeI wird der 10fache Ansatz mit einem Endvolumen von 500 µl benötigt.

Ligation und Transformation

Die Ligation wurde mit dem Rapid-Ligation-Kit von Roche durchgeführt. Dafür wurde zur Kontrolle der Eigenligation des jeweiligen Vektors die restringierte Vektor-DNA wie folgt eingesetzt.

2 µl Vektor (100 ng)
6 µl H₂O
9 µl T4-Ligase-Puffer
2 µl DNA-Dilution-Puffer
1 µl T4-Ligase

Vektor + Insert

2 µl Vektor (~100 ng)
6 µl Insert (300 ng)
9 µl T4-Ligase-Puffer
2 µl DNA-Dilution-Puffer
1 µl T4-Ligase

Die Ligationsansätze wurden dann 5 min bei Raumtemperatur gehalten und anschließend kurz auf Eis gestellt. Daraufhin wurden jeder Probe 50 µl XL1-Blue *E.coli* hinzugefügt und diese 10 min auf Eis gehalten. Der folgende 45 sec Hitzeschock bei 42°C gewährleistet die vollständige Aufnahme der Fremd-DNA durch die kompetenten Zellen. Sie werden noch 2 min auf Eis gestellt und anschließend mit 500 µl LB-Medium versetzt (wahlweise auch NZY⁺-Medium). Zur leichten Vorinkubation werden sie 30 min bei 37 °C auf einen Brunswick-Schüttler gestellt. Nach der Vorinkubationszeit werden die Zellen auf entsprechende Agarplatten (Ampicillin, Kanamycin etc.) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Heraeus) wachsen gelassen.

Am nächsten Tag können die jeweiligen Klone in 3-50 ml LB-Medium übergeimpft und wieder bei 37°C über Nacht geschüttelt werden. Die gewachsenen Einzelkolonien können am nächsten Tag für eine Mini- oder Midi-Plasmid-Präparation eingesetzt werden.

Die Mini-Plasmid-Präparation wurde gemäß der Protokollvorschrift von Eppendorf durchgeführt. Die jeweilige Midi-Plasmid-Präparation wurde mit einem Kit von Invitrogen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Reinheit und Konzentration der gewonnen Plasmid-DNA wurde mittels des NanoDrop-Spektrometers (www.kisker-biotech.com) bei 260 nm bzw. 260/280 nm gemessen.

Eine anschließende Kontroll-Restriktion mit den bereits zuvor verwendeten Restriktionsenzymen gibt Aufschluss, über das Vorhandensein positiver Klone und damit über das Vorhandensein des gewünschten Inserts.

Nichts desto trotz muss die gewonnene Plasmid-DNA erst durchsequenziert werden, um genauere Aussagen über die Vollständigkeit des gewünschten Konstrukts machen zu können.

Die Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech (Martinsried) durchgeführt. Dazu wurde 1 µg DNA lyophilisiert und mit den entsprechenden Sequenzier-Primern an die Firma geschickt.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

Membranpräparation und Aufreinigung von Oozyten

200 Oozyten wurden mit jeweils 42 nl des pGem-ChR2-315-YFP-Konstrukts injiziert und 3 Tage bei 18 °C im Brutschrank exprimiert. Es folgte eine Homogenisierung der ChR2 exprimierenden Oozyten mit 2 ml Homogenisierungspuffer (320 mM Sucrose, 50 mM Tris, 1mM EDTA und 1 mM Complete (Proteaseinhibitor von Roche, Penzberg) pH 7,4). Dies wurde 15mal in einem Dounce-Homogenisator durchgeführt. Das Homogenat wurde anschließend bei 3000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um grobe Zelldebris zu entfernen. Dabei entstehen drei Schichten. 1. Das Eidotterpellet. 2. Der Homogenisierungspuffer mit zytosolischen Komponenten und ChR2. 3. Eine obere Schicht mit weißlichen Lipiden. Es ist wichtig, so wenig wie möglich Lipid in den nächsten Arbeitsschritt zu überführen. Deshalb muss das klare Lysat aus Punkt 2 besonders vorsichtig in ein Ultrazentrifugenröhrchen mit Sucrosegradient überführt werden. Der diskontinuierliche Sucrosegradient setzt sich wie folgt zusammen: 2 M (2 ml), 1,3 M (3,2 ml), 1,0 M (3,2 ml) und 0,6 M (2 ml). Die Lösungen wurden in TE-Puffer (50 mM Tris, 1mM EDTA, 5 mM MgCl₂ pH 7,4) angesetzt. Das klare Lysat wird vorsichtig über das letzte Sucrosekissen pipettiert. Der Gradient wird in einem Beckman SW41 swing-out Rotor bei 40.000 rpm für 4 Stunden bei 4°C zentrifugiert. Die entstandenen 1 ml Fraktionen werden von unten nach oben gesammelt und vierfach mit 1,5 M Sucrose-TE-Puffer verdünnt.

Jede Membranfraktion wird in einem Beckman SW 50.1 Rotor bei 48.000 rpm, 3 Stunden und 4°C pelletiert. Die gewonnenen Pellets werden in 80 µl TE-Puffer resuspendiert.

HEK293-Membranpräparation

20 Nunclon™ 175 cm² Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) wurden mit der stabilen HEK293-Zelllinie ChR2-315-YFP (Firma Iongate, Frankfurt Höchst) angezogen und mittels 1 µg/ml Tetrazyklin induziert. Das Ernten erfolgte nach vollständiger Konfluenz der Zellen. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen vollständig in PBS aufgenommen. Daraufhin werden die gesamten Zellen 10 min bei 4°C und 2500 rpm pelletiert. Das Pellet wird weitere 3-mal in PBS gewaschen und 2-3-mal schockgefroren. Nach dem letzten langsamen Auftauen wird das Zellpellet nochmals 10 min bei 4°C und 2500 rpm zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 5 ml HB-Puffer (> 250 mM Sucrose, 2mM EDTA, 10 mM Tris, 1mM Complete Proteaseinhibitor pH 7,4) aufgenommen. Es folgt eine 25-30-malige Homogenisierung in einem auf Eis gehaltenen Dounce-Homogenisator. Das Homogenisat wird 15 min bei 4°C und 2500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird neu in dem bereits oben aufgeführten HB-Puffer resuspendiert (5ml) und 2-3 weitere Male homogenisiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 4°C und 2500 rpm für 5 min, wird der Überstand in UZ-Röhrchen überführt und 90 min bei 33.000 rpm in einem Beckman Ti70 Rotor pelletiert. Das gewonnene Membranpellet wird entweder in 2 ml HB-Puffer aufgenommen und zur Dichtegradientenzentrifugation weiterverwendet (Sucrosegradienten sind im vorherigen Kapitel erläutert) oder wird 1:10 in 130 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7,4 aufgenommen und bei -20 °C eingefroren.

Eine Unterbrechung der N-Glykosylierung wurde durch Zugabe von 20 µg/ml Tunicamycin erreicht.

Rapid Translation System RTS 500 E.coli HY (zellfreie Synthese)

Die zellfreie Synthese im präparativen Maßstab erfolgte in einem RTS 500 Bioreaktor der Firma Roche (Penzberg, Germany) nach Angaben des Herstellers unter Zusatz von 0.1 µg/µl ungeschnittener Plasmid-DNA (RNase frei) und 4 mg/ml DOPC-Liposomensuspension in DEPC-behandeltem Wasser im Reaktionsmix sowie je 1 µM *all-trans* Retinal in Ethanol im Reaktions- und -Vorratsmix. Des Weiteren wurden zur löslichen Expression folgende Detergentien entsprechend ihrer CMC (critical micellar concentration) verwendet:

Brij58 (1,5 %), C₁₂E₈ (1 %), DDM (0,1 %), DM (0,2 %), β-OG (0,75 %), CHAPS (0,75 %), Fos12 (1 %), Triton X-100 (0,1 %), SDS (0,2 %).

Um die Volumina im Reaktionsmix bei Zugabe der zusätzlichen Komponenten konstant zu halten, wurde das *E.coli* Lysat mit 0.335 ml statt 0.525 ml Rekonstitutionspuffer rehydratisiert und somit konzentrierter eingesetzt. Die Reaktion erfolgte über 24 Stunden bei 30°C und 250 rpm unter Lichtausschluss.

Danach wurde die Reaktion durch Zusatz von 50 mM EDTA pH 8.0 gestoppt. Nach der Expression mit den jeweiligen Detergentien wurde der Reaktionsansatz 1:10 mit 20 mM Tris, 500 mM NaCl pH 7,4 verdünnt, um die Detergentskonzentration zu verringern. Die elektrophysiologische Charakterisierung des zellfrei dargestellten Genprodukts im Reaktionsansatz erfolgte unmittelbar nach Beendigung der Reaktionszeit. Für die spektroskopischen Untersuchungen wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 4°C gelagert.

Präparation von SUVs-Liposomen

Zur Herstellung von Liposomen wurden in der Regel 1 ml 20 mg/ml Lipid in Chloroform/MeOH = 1:1 in einem 25 ml Kolben vorgegeben. Das Lösungsmittel wurde in einem leichten Stickstoffstrom am Rotationsverdampfer entfernt. Der zurückbleibende Lipidfilm wurde unter Stickstoff gesetzt und mit 1 ml DEPC-behandeltem Wasser hydratisiert (entspricht einer 20 mg/ml Liposomensuspension). Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde in Abständen von je 20 min geschüttelt, so dass eine trübe Suspension multilamellarer Liposomen entsteht. Die Herstellung von „Small Unilamellar Vesicles“ (SUVs) erfolgte mittels Ultraschallbehandlung in einem Ultraschallbad bis die Liposomensuspension klar (opaleszent) erschien bzw. wurden durch 21-maliges Passagieren mit einem Liposofast (mit einem Nucleopore-Filter der Porengröße 100 nm) erzielt. Größere Lipidfragmente wurden durch Zentrifugation (15 min, 15.000 rpm, Eppendorffzentrifuge, RT) abgetrennt.

Zellfreie Expression: mit dem TNT® Coupled Wheat Germ Extract System und dem TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System

Die Expression mit beiden TNT®-Systemen erfolgte nach Angaben des Herstellers Promega (Mannheim). Auch hier wurden 1 µM *all-trans*-Retinal sowie 4 mg /ml DOPC-Liposomenlösung dazugegeben und der Reaktionsansatz entsprechend angepasst.

Membranpräparation und Aufreinigung in *Pichia pastoris*

Transformation:

Kompetente Pichiazellen werden durch das [Pichia EasyComp™ Transformation Kit](#) hergestellt.

Auch die nachfolgende Anleitung und die dazugehörigen Lösungen können diesem Kit entnommen werden. Alle Medien und Anweisungen sind auch dem „Multi-Copy *Pichia* Expression Kit“ auf der Invitrogen-Homepage zu entnehmen.

Es werden 3 µg linearisierte (PmeI, Chloroform-/Phenol-Extraktion) DNA benötigt. Nicht mehr als 5 µl DNA werden mit 50 µl der kompetenten Pichiazellen des Stammes SMD 1163 gemischt. Anschließend wird 1 ml Lösung II dazugegeben und kurz gevortext. Nun muss 1 Stunde / 30°C akkurat alle 15 Minuten die Probe kurz gevortext oder mehrfach invertiert werden (Heraeus Inkubator). Es folgt ein 10 min Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad.

Bei der anschließenden Pelletierung bei 3000 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur, liegt das Pellet in Form eines Streifens an der Reaktionsgefäßwand an.

Das Pellet wird in 1 ml Lösung III resuspendiert. Dann folgt wieder eine Pelletierung bei 3000 x g für 5 Minuten bei RT. Das Pellet befindet sich auf dem Reaktionsgefäßboden und wird in 100 µl Lösung III aufgelöst.

Jeweils zwei Ansätze (200 µl) werden auf MD-Platten ausgestrichen und die Platten in den Inkubator bei 30°C gestellt. Die Kolonien benötigen 5-10 Tage zum Wachstum.

Herstellung von MD-Agar-Platten aus Minimal-Dextrose-Medium

1.34% YNB

4 x 10⁻⁵% Biotin

2% Dextrose

800 ml Wasser und 15 g Agar für 20 Minuten autoklavieren.

Auf 60°C abkühlen:

+ 100 ml 10 x YNB

+ 2 ml 500 x Biotin

+ 100 ml 10 x D

Platten direkt gießen. 6 Monate haltbar.

Selektion der „Multi-Copy-Inserts“

Um eine möglichst hohe Expression und damit Proteinausbeute erzielen zu können, müssen die transformierten Zellen mittels Geneticin (G 418 Sulfat) selektiert werden. Vorab müssen dazu YPD-Geneticin-Platten hergestellt werden.

Yeast Extract Peptone Dextrose Medium:

10 g Yeast Extract, 20 g Pepton, 20 g Agar auf 900 ml Wasser autoklavieren und anschließend 100 ml 10 x Dextrose hinzufügen.

Geneticin (Stock 100 mg/ml) wird nun in verschiedenen Konzentrationen zu den gerade gegossenen Platten dazugegeben.: 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,5 mg/ml und 1 mg/ml.

Die Transformanten auf den MD-Platten werden nun mit 1 ml sterilem Wasser von der Platte geschabt (Zellschaber) und werden auf den jeweiligen Geneticin-Platten ausgestrichen. Es folgt eine Inkubation bei 30°C für mindestens 5 Tage.

Es werden dann die Klone der Platten mit der höchsten Geneticin-Konzentration verwendet.

Dabei ist zu erwähnen, dass dies eine übernommene Methode aus der Abteilung Molekulare Membranbiologie ist (Prof. H. Michel, MPI für Biophysik; Frankfurt).

Anzucht der *Pichia*-Kulturen

Folgende Medien wurden jeweils in einem 5 Liter Schikanekolben angesetzt:

1 Liter BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium) für die Vorkultur und 6 x 1 Liter oder 6 x 2 Liter BMMY (Buffered Methanol-complex Medium).

1. Tag 1: Eine kleine Vorkultur von 50 ml BMGY wird mit einem Klon angeimpft und 24 h bei 30°C und 220 rpm inkubiert.
2. Tag 2: Die OD₆₀₀ wird am Nanodrop bestimmt. Sie sollte mindestens bei 2 liegen!
Die Vorkultur (50 ml) wird in einen Kolben mit 1 Liter BMGY geben und ebenfalls 24 h bei 30°C und 220 rpm wachsen gelassen.
3. Tag 3: Die Kultur sollte nun eine OD₆₀₀ von 10 haben. Daraufhin werden jeweils 150 ml dieser Kultur zu einem Kolben mit 1 Liter BMMY (Methanol induziert die Proteinexpression von ChR2 aufgrund des AOX-Promotors) dazugegeben. Des Weiteren muss jedem Kolben 1 µM all-trans-Retinal hinzugefügt werden sowie

zusätzlich 25 ml Methanol (2,5%) und 2 % DMSO. Die Kultur wird dann wieder in den Schüttler gegeben und für 24 h bei 30°C und 220 rpm geschüttelt.

4. Tag 4: Ernten. Dies erfolgt in einer großen Beckman-Zentrifuge für 15 Minuten bei 3000 x g und 4°C.

Membranpräparation bei 4°C im Kühlraum

Es werden hierfür folgende Puffer benötigt:

Breaking-Buffer: 11,3 ml einer 1 M NaH ₂ PO ₄ (auf 1 Liter)	}	pH 7,4
100 mM NaCl		
1 mM EDTA		
5% Glycerol		
Membrane-Buffer: 50 mM Tris	}	pH 7,4
120 mM NaCl		
2 mM EDTA		
10% Glycerol		

Das Pellet muss nach dem Ernten gewogen werden und wird zu 30% Feuchtgewicht in Breaking-Buffer plus 200 mM PMSF Proteaseinhibitor resuspendiert. Die Zellen werden dann im „BeatBeater“ aufgeschlossen.

Dazu wird das Plastikgefäß des Beaters mit 200 ml Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) befüllt und anschließend 200 ml Zellen darüber geschichtet. Die Zellen werden jeweils 2-mal für 3 Minuten aufgeschlossen und dazwischen immer gut gekühlt, da sie aufgrund der Scherkräfte schnell eine Temperatur über 20°C erreichen. Der Aufbruch wird mittels eines Mikroskops begutachtet. Die aufgeschlossenen Zellen werden ein weiteres Mal zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen. Dies erfolgt 5 Minuten bei 3000 x g und 4°C. Der Überstand wird nun in UZ-Röhrchen gegeben (SW 45 Ti, Fassungsvermögen 75 ml) und genau austariert. Die Zentrifugation erfolgt dann bei 43.000 rpm, 1h, 4°C.

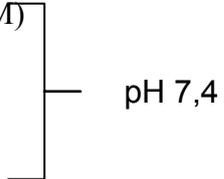
Das Pellet wird dann zu 10% Feuchtgewicht in Membrane-Buffer + 200 mM PMSF aufgenommen und mittels eines großen Keramik-Potters homogenisiert.

Anschließend erfolgt eine Proteinbestimmung am Nanodrop bei OD₂₈₀.

Solubilisierung der Membranen

Solubilisierungspuffer am Beispiel von DM:

z.B. 1% DM (Decyl-Maltosid, (Critical Mycellar Concentration) CMC ist 1,6 mM)
100 mM NaCl
20 mM Hepes
10% Glycerol
10 mM Imidazol (zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen)



pH 7,4

Die Membranen werden dem oben stehenden Puffer hinzugefügt und 1 h bei 4°C im Kühlraum gerührt.

Es folgt eine weitere Zentrifugation. 1 h 100.000 x g am Ti 70 oder 1:30 h am SW 45 Ti (falls sehr viel Material vorliegt).

Der Überstand wird dann zur Aufreinigung mit dem ÄKTA-Purifier (Amersham) weiterverwendet.

Für die Aufreinigung müssen folgende Puffer hergestellt und entgast werden:

Solubilisierungspuffer ohne Imidazol mit 0,1% DM. Die Entgasung erfolgt vor der Zugabe von DM. Elutionspuffer: Enthält dieselben Inhaltsstoffe wie der Solubilisierungspuffer plus 300 mM Imidazol und 0,1 % DM. Alle anderen Detergentien werden entsprechend ihrer CMC nach gleicher Methode eingesetzt.

Aufreinigung mit dem Äkta-Purifier

5 ml HisTrap™ HP (IMAC) (GE Healthcare Europe, München) wurden zunächst mit dem Solubilisierungspuffer ohne Imidazol aber mit 0,1% DM equilibriert. Die UV-Zellen wurden auf 280 nm, 480 nm (ChR2) und 513 nm (YFP) eingestellt. Das Solubilisierungslysate wurde dann mittels der integrierten Probenpumpe des Äkta-Purifiers mit einer Flussrate von 5 ml/min auf die Ni-Säule aufgetragen. Anschließend wurde die geladene Säule mit dem 10 mM Imidazolpuffer (0,1 % DM) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Dies wurde so lange durchgeführt bis UV280 nm die Nulllinie erreicht hatte. ChR2 wurde dann mittels eines linearen Imidazolgradienten von 0 mM bis 300 mM über 20 Probenvolumina eluiert. Die ChR2 enthaltenden Proben wurden gesammelt und anschließend zur SDS-PAGE eingesetzt.

TEV-Verdau

Um gegebenenfalls den angefügten YFP-His-tag wieder entfernen zu können, ist zuvor eine TEV-Schnittstelle (Tobacco-Etch-Virus mit der Aminosäuresequenz E XX Y X Q (G/S)) einkloniert worden. Der tag konnte mittels Inkubation über Nacht bei 4°C und unter Berücksichtigung der Konzentrationsangaben des Herstellers der TEV-Protease (Invitrogen) entfernt werden.

Glykosylierungsassay

Pichia-Membranen wurden mit 2,5 U *N*-glycosidase F (New England Biolabs, Beverly MA, USA; Roche, Penzberg) bei 4°C über Nacht inkubiert.

Tunicamycin wurde direkt zum Induktionsmedium BMMY hinzugegeben. 1 ml (1,5 mg/ml, 100x gelöst in 0,1 M NaOH) wurde zu einer finalen Konzentration von 15 µg/ml dem Medium beigemischt.

Gelfiltrations-Chromatographie

Die Gelfiltration dient dazu, Proteine der Größe nach aufzutrennen. Dazu verwendet man ein poröses Säulenmaterial. Die Auftrennung erfolgt, weil kleinere Moleküle in die Poren eindringen und ihre Passage durch die Säule verzögert wird, während größere Moleküle, die auf Grund ihrer Größe vom Eindringen in die Poren ausgeschlossen werden, schneller mit der mobilen Phase durch die Säule hindurchwandern.

Zur Analyse der Dispersität des gereinigten ChR2 wurde eine Gelfiltrationsuntersuchung in einem SmartTM Chromatographiesystem (Pharmacia, Schweden) durchgeführt. Hierbei wurde eine Superose[®] 6 PC 3.2/30 Säule verwendet. Als Puffer wurde Hepes-Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Hepes, pH 7,4) mit 0,05-0,1% *n*-Decyl-β-D-Maltosid (DM) verwendet, die Flussrate betrug 50 µl/min, die Temperatur 4 °C. Das Probenvolumen betrug 50 µl. Es wurden 100 µl Fraktionen gesammelt und diese nach Auftrennung im SDS-PAGE durch Silberfärbung untersucht.

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. In dieser Arbeit wurden 10%ige Trenn- und Sammelgele hergestellt (modifizierte Methode nach Fling & Gregerson, 1986). Folgende Lösungen wurden für die Herstellung von jeweils 6 Gelen verwendet:

Trenngel: 10 ml 30% (w/v) Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (37:1)
7,5 ml 3M Tris/HCl, pH8,85, 0,4%(w/v) SDS
9 ml H₂O₂ milli
3 ml 70% (w/v) Saccharose
475 µl 10% (w/v) APS
25 µl TEMED

Sammelgel: 3,33 ml 30% (w/v) Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (37:1)
5 ml 0,5M Tris/HCl, pH6,8, 0,4%(w/v) SDS
9,66 ml H₂O₂ milli
2,04 ml 70% (w/v) Saccharose
317 µl 10% (w/v) APS
13 µl TEMED

Bei der Probenvorbereitung wurden die Ansätze mit 1/4 ihres Volumens 4 × Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Die Proben dürfen auf keinen Fall erhitzt werden, da sonst das Membranprotein aggregiert und in der Geltasche zurück bleibt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel. Anschließend wurde das Gel gefärbt oder für *Western blot*-Analyse auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert.

Färbung von SDS-PA-Gelen

***Coomassie*-Färbung**

Die *Coomassie*-Färbung dient der schnellen, unspezifischen Färbung von Proteinbanden im SDS-Polyacrylamid-Gel. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min in *Coomassie*-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde der nichtgebundene Farbstoff durch die Entfärbelösung aus dem Gel herausgewaschen, bis die Proteinbanden ohne Hintergrund gut zu sehen waren.

Silber-Färbung

Der Vorteil der Silberfärbung liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit. Es wurde folgendes Färbeprotokoll verwendet:

Fixierung	16 min	30% (v/v) Ethanol, 10% Essigsäure
Konditionierung	16 min	2 ml 25% Glutaraldehyd, 0,1 g Natriumdithiosulfat ad 100 ml mit 0,4 Natriumacetat, 30% (v/v) Ethanol
Waschen	3 × 10 min	H ₂ O bidest
Färben	20 min	0,1 g Silbernitrat, 25 µl Formaldehyd (37% (w/v)) ad 100 ml mit H ₂ O bidest
Entwickeln	1-5 min	2,5 g Natriumcarbonat, 40 µl Formaldehyd (37% (w/v)) ad 100 ml mit H ₂ O bidest.
Stoppen	≥ 10 min	50 mM EDTA, pH7,5

Western Blot Analyse

Die mittels Polyacrylamidgelelektrophorese getrennten Proteine wurden elektrochemisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die unspezifischen Bindungsstellen auf den Membranen wurden durch Inkubation im Tween20-haltigen Puffer, der mit Magermilchpulver angesetzt wird, abgesättigt. Die Membran wurde mit dem Erstantikörper, der gegen YFP oder His gerichtet ist, 1:1000 über Nacht bei 4°C inkubiert. Ein Zweitantikörper wurde nicht eingesetzt, da der Erstantikörper bereits HRP (Horse-Reddish-Peroxidase) gekoppelt war. Damit war am anderen Tag nach 20 min Waschen mit TBS-Puffer eine Detektion des Proteins mittels der ECL-Methode (Enhanced-Chemiluminescence, Amersham) möglich. Dazu wurde die Membran mit der ECL-Lösung 1 und 2 für 1 min inkubiert und auf Röntgenfilm (Kodak) aufgetragen und 20 sec belichtet.

Massenspektrometrische Analytik

Die massenspektrometrischen Analyse von Membranproteinen mittels ESI-MS oder MALDI-TOF erfolgte in einer modifizierten Form nach der Methode von Hufnagel P. et al.1996. Dazu wurden 10 nmol Protein mittels Sephadex G25-Säulenmaterial (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) entsalzt auf 100 µl ankonzentriert (YM-50 Konzentratoren, Amicon, Bedford, MA, USA) und das Protein mit 1.9 ml einer Lösung aus 10 ml Aceton, 1 ml 25% (v/v) Ammoniak, 100 mg TCA 30 min auf Eis gefällt. Das ausgefällte Protein wurde zuerst in 1 ml eiskaltem Aceton, dann in 500 µl n-Hexan gewaschen und an der Luft getrocknet. Für die ESI-MS Messungen wurde das getrocknete Pellet in CHCl₃/ MeOH/ Trifluorethanol/ Wasser/ Ameisensäure = 100:75:50:35:4 (v/v) resuspendiert. Für die MALDI-TOF Analytik wurden 1 µl einer Probenverdünnung und 1 µl Matrixlösung auf einer MALDI-TOF Platte luftgetrocknet (Matrixlösungen: gesättigte Lösungen von 2,5-Dihydroxybenzoesäure, α-Cyanohydroxymzimtsäure oder Sinapinsäure in Acetonitril/ H₂O/ TFA = 100:100:0.1 (v/v)). Die Analyse und Durchführung des Versuchs erfolgte durch die Arbeitsgruppe Prof. Karras (Biozentrum, Frankfurt).

Rekonstitution

20 mg DOPC (1,2 Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin, 18:1 PC)(Avanti PolarLipids, Alabaster, USA) in Chloroform wurden im Stickstoffstrom zu einem Film verblasen. Es wurde 1 ml Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Hepes, pH 7,4) hinzugegeben und zur Hydratisierung mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Bildung der Liposomen wurde die Suspension mittels eines Liposofasten 21-mal durch einen 100 nm Nucleopore-Filter passagiert. Die Liposomenlösung nahm eine opaleszente Farbe an. Zu den vorgeformten Liposomen wurde im Verhältnis 1:5 aufgereinigtes ChR2 hinzugegeben. Zur Entfernung des Detergens wurden 400 mg/ml (ca. 1/3 des Flüssigkeitsvolumens) Polystyrolkugeln (BioBeads SM 2[®], Biorad, Hilden) zugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C, lichtgeschützt und unter leichtem Rühren, wurden die alten BioBeads durch die halbe Menge frische BioBeads ersetzt. Es folgte eine weitere Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur (lichtgeschütztes Rühren). Danach wurden die BioBeads durch Zentrifugation bei 13.000 rpm 5 min abgetrennt. Die Proteoliposomenlösung wurde dann 5-mal mittels Stickstoff schockgefroren und aufgetaut, und dann final bei -20 °C eingefroren.

Bleichen von Retinalproteinen

Der Extinktionskoeffizient des Retinalchromophors in ChR2 kann mit Hilfe des bekannten Extinktionskoeffizienten von Retinaloxim $33.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet werden (Scharf, 1992). Hierzu wurde solubilisiertes ChR2 in 10 mM Hepes/NaOH pH 10 mit 10 mM Hydroxylamin versetzt und eine Stunde unter moderatem Rühren mit grünem Licht bestrahlt (Wolfram-Kaltlichtlampe, 150 W, $\lambda > 480 \text{ nm}$). Um die Reaktion komplett auf die Seite des Retinaloxims zu überführen wurde mit konz. H_2SO_4 auf pH ~ 3 eingestellt.

Bestimmung des Retinal-Isomerenverhältnisses von Retinalproteinen

Zur Bestimmung des Isomerenverhältnisses von lichtadaptiertem ChR2 wurde das Retinal nach der Methode von Scherrer et al. 1989 extrahiert und mittels Normalphasen-HPLC getrennt (Säule: Prontosil 120-3-OH, Bischoff Analystechnik, Leonberg, Germany). Laufmittel A: n-Hexan, B: EtOAc, Gradient: 80% (v/v) A 10 min, 80% A \rightarrow 100% A in 2 min, 100% A 5 min, 100% A \rightarrow 80% A 2 min, Flussrate 1 ml/min. Detektion bei 365 nm. Die Probe wurde durch 10-minütige Bestrahlung mit einer Kaltlichtlampe (Wolfram-Kaltlichtlampe, 150 W, $\lambda > 480 \text{ nm}$) lichtadaptiert.

Herstellung von *Pichia pastoris* Protoplasten

Die Herstellung der *Pichia* Protoplasten wurde dem „Multi-Copy *Pichia* Expression Kit“ entnommen (Invitrogen, Katalognr. K1750-01) und kann dort der Seite 33 entnommen werden.

2.2.3 Biophysikalische Methoden

Ladungstransportvorgänge von ChR2-Membranen und -Proteoliposomen erfolgte an einer „Black Lipid Membrane“ (BLM) Apparatur. Der schematische Aufbau der Messapparatur sowie die Anlagerung von Proteoliposomen an die BLM sind in Abb. 19 schematisch dargestellt.

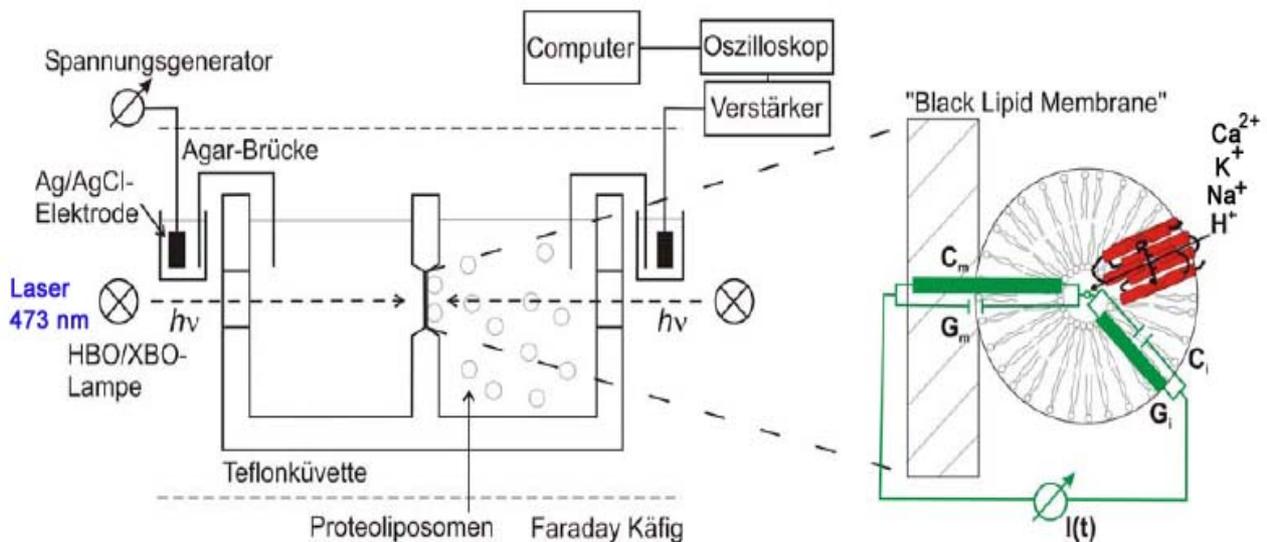


Abb.17 : **Schematische Darstellung der BLM-Apparatur.** G_m und G_i stellen die Leitfähigkeiten der BLM und der Proteoliposomen dar. C_m und C_i sind deren korrespondierende Kapazitäten (nach Bamberg & Läger, 1979).

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

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

I_0 ist der Anfangsstrom, der im Falle einer Ionenpumpe exponentiell in einen stationären Photostrom I_{p0} abfällt, welcher durch die Aktivität des Proteins und der Kapazität der BLM (C_m) sowie der proteinhaltigen Membran (C_i) bestimmt wird. τ stellt die Systemzeitkonstante dar, die von C_m , C_i und deren korrespondierenden Leitfähigkeiten G_m und G_i abhängt.

Bei der verwendeten Messapparatur liegt der Wert von τ bei 0,9 – 1 sec. Stationäre Photoströme können bei dieser Anordnung nur detektiert werden, wenn die Leitfähigkeit der BLM durch Zugabe von Entkopplern, wie dem elektroneutralen Na⁺-Ionophor Monensin oder dem Protonophor 1799, von $\sim 10^{-9}$ S/cm² auf $\sim 10^{-6}$ S/cm² vergrößert wird bzw. wenn ChR2-Proteoliposomen mittels eines Gradienten über die Vesikel zur Fusionierung mit der BLM getrieben werden.

Zur Messung von Photoströmen wird eine Teflonkammer mit zwei Fenstern verwendet, welche in zwei Hälften geteilt ist, die durch eine kreisrunde Öffnung (~ 1 mm Durchmesser) miteinander verbunden sind. Beide Kammerhälften sind jeweils über Agar- Salzbrücken mit einer Ag/AgCl-Elektrode verbunden, die in eine 100 mM NaCl-Lösung taucht. Eine Elektrode ist mit einem Spannungsgenerator gekoppelt, die andere ist über einen Verstärker, der die Daten an einen Rechner übermittelt, mit einem Oszilloskop verbunden. Zur Herstellung der BLM wurden die Öffnung beidseitig mit je 5 μ l 1.5 % Diphytanoylphosphatidylcholin in n-Decan benetzt und getrocknet. Beide Seiten wurden mit 1.3 ml des Messpuffers gefüllt und mit 3 μ l Lipidmischung (1.5 % Diphytanoylphosphatidylcholin/ Octadecylamin 60:1 (v/v) in n-Decan) versetzt. Die eingebrachte Lipidmischung verschließt die Kammeröffnung filmartig. Bei erfolgreicher Ausbildung der BLM wurde die Leitfähigkeit G und die Kapazität C über das Anlegen einer Spannung von 100 mV bzw. einer Dreiecksspannung von ± 5 mV bestimmt. Leitfähigkeit G und Kapazität C der BLM lagen etwa bei $G = 0,01-0,05$ nS und $C = 3$ nF.

BLM-Messungen mit ChR2 wurden durch Zugabe von 25 μ l rekonstituiertes Protein ($OD_{480} = 0,5$) in eine der beiden Kammern und etwa 60 min moderates Rühren durchgeführt bzw. es wurden 20 μ l Membranfragmente (1mg/ml) hinzugegeben. Nach erfolgreicher Anlagerung der Membranfragmente an die BLM konnten die kapazitiven Photoströme durch Belichtung der Kammer mittels einer XBO-Lampe (cis) (2 W/cm²) ermittelt werden. Die Wellenlängenselektion erfolgte durch Filter. Zur Ermittlung der stationären Signale wurden der Protonophor 1799 (2,6-Dihydroxy-1,1,1,7,7,7-hexafluoro-2,6-bis-trifluoromethylheptan-4-on, 4 μ M) und der elektroneutrale Na⁺/H⁺-Antiporter Monensin (4 μ M) zugesetzt. Durch den Einsatz beider Ionophore wird die Leitfähigkeit der BLM je nach Messbedingung auf etwa

$G = 1 - 50$ nS erhöht.

Incorporation von ChR2-Proteoliposomen

1976 entwickelten Miller und Racker eine Technik Kanalproteine in planare Lipiddoppelschichten einzulagern, indem Vesikel, die das Protein enthielten, mit der BLM fusionierten. Basierend auf dieser Grundlage wurde mittels eines osmotischen Gradienten ein Innendruck in den Vesikeln aufgebaut, der diese zum Schwellen und damit zur Fusion mit der BLM brachte. Ihre Hypothese besagt, dass das Anschwellen zu einer Ausdehnung der Vesikelmembran führt, welches eine Umordnung der Lipide und damit ein Verschmelzen mit der BLM ermöglichen kann.

Um dies zu erreichen wurden beide Küvettenkompartimente zunächst mit 100 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7,4 befüllt. Anschließend wurden zu dem Kompartiment, zu dem nachher die Proteoliposomen dazugegeben werden, 100 µl Lösung entfernt und umgehend durch 100 µl 4 M NaCl, 10 mM Hepes, 2mM CaCl₂, pH 7,4 ersetzt und leicht gerührt. Zu diesem osmotischen Gradienten werden durch gleichzeitiges Belichten des Kompartiments (20 % Graufilter) 20 µl ChR2-Proteoliposomen hinzugegeben. Die Innenlösung der Liposomen bestand aus 100 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7,4. Dies führte nach ca. 60 min zu einem Einbau der ChR2-Proteoliposomen.

Für die pH-Abhängigkeitsmessungen wurden jeweils 2 µl einer konzentrierten Salzsäure in das Kompartiment eintitriert. Nach Ende der Messung wurde der pH-Wert ein weiteres Mal mit einer Mikro-pH-Elektrode überprüft.

Das Aktionsspektrum wurde mittels Breitband-Interferenzfiltern erfasst und die gemessenen

Werte auf den gleichen Quantenfluss normiert.
$$I_{peak}^{norm}(\lambda) = \frac{I_{peak}(\lambda)}{J(t) \cdot \lambda}$$

Die Lichtzufuhr bei Einsatz der XBO-Lampe wurde über ein Shattersystem zeitlich geregelt. Bei Einsatz des 473 nm Lasers wurde hierfür ein Funktionsgenerator verwendet.

Spektroskopie

Die statischen Absorptionsmessungen wurden an einem Doppelstrahl Spektrophotometer durchgeführt (U3000, Hitachi, Japan). Es wurde ein 100 µl Micro-Quarzküvette verwendet.

Zeitaufgelöste Laserblitz-Absorptionsspektroskopie

Die transienten Absorptionsänderungen von ChR2 erfolgten mit einer rechnergesteuerten Messanordnung, deren schematischer Aufbau in Abbildung 20 wiedergegeben ist. Mit einem Laserpuls (Excimer-Farbstoff-Pumplaser 320 nm (RDP-1, Radiant Dye Laser Accessoires, Germany), 10 ns Pulsdauer, 2 mJ/cm²) wird die Probe photochemisch angeregt. Im rechten Winkel zum Laserpuls durchtritt ungefiltertes Licht einer Halogenlampe (Osram-XBO-75 W, 12 V) die Probenküvette (Quarzglas, Schichtdicke 0,5 cm) und wird durch einen Monochromator (mini-chrom, Optometrics, Ayer, USA)) selektiert und von einer Photodiode (UV-005, OSI, Optoelectronics, Hawthorne, USA) detektiert und nochmals durch einen Verstärker gefiltert (SR 560, Stanford Research Systems, Sunnyvale, USA). Die Signale des Detektors werden in einem digitalen Oszilloskop (Integra 10, Nicolet, USA) mit zwei linearen Zeitfenstern gespeichert und zur Datenverarbeitung an einen Rechner weitergeleitet. Hierbei werden pro Wellenlänge 16 Signale gemittelt.

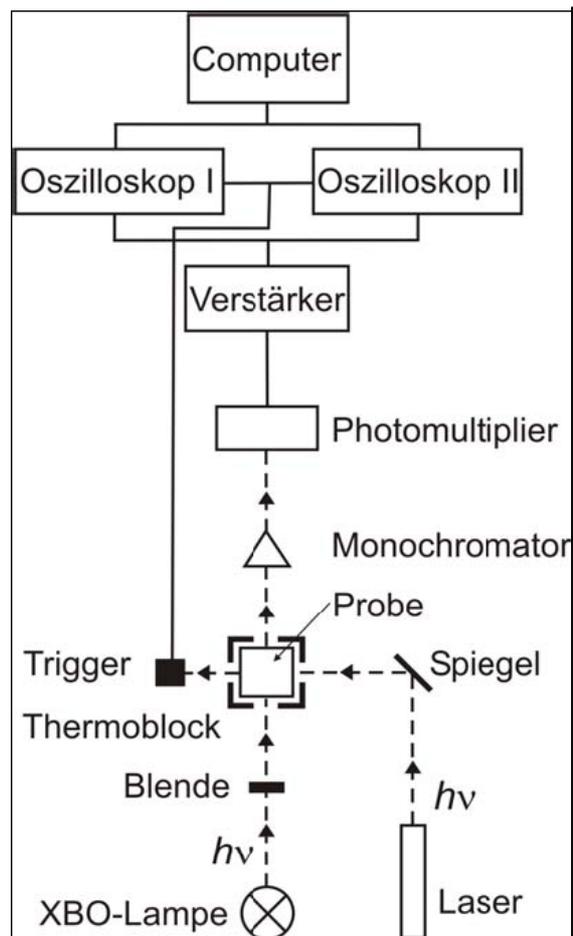


Abb. 18: Schematischer Aufbau der Laserblitzabsorptions-Apparatur

Datenverarbeitung und Analyse

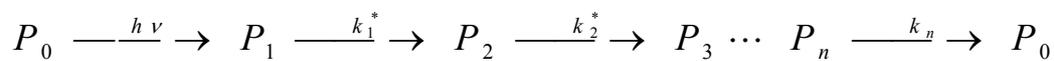
Die Analyse der absorptionsspektroskopischen Daten erfolgt nach der Methode von Chizhov & Hess, 1996 deren Grundlage das Lambert-Beersche Gesetz für $i=1\dots n$ absorbierende Spezies ist:

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \sum_i \epsilon_i \cdot c_i \cdot d$$

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

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

Die Absorptionssignale wurden in zwei einander überlappenden Zeitfenstern gespeichert, die die Kinetik des Photozyklus 100 ns nach Anregung der Probe durch den Laserpuls bis zur vollständigen Rückbildung des Grundzustandes erfassen. Die Zahl der Messdaten wurde nach einer von Müller K.H. und Plesser T. 1991 beschriebenen Methode auf eine logarithmische Zeitskala reduziert (250 Datenpunkte) und deren Standardabweichung anhand des Fehlers des Grundsignals abgeschätzt. Des Weiteren wurde die Absorptionsänderung über die Intermediatkonzentration P_i und ihre spektrale Differenz $\Delta \epsilon_i$ bestimmt und mit dem Grundzustand verglichen. Beide Parameter können über das unten dargestellte lineare Model des Photozykluses berechnet werden. (Nagle, 1991; Chizov & Hess, 1996).



$$\text{Abs}(\lambda, t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{k_i^* t} = \sum_{i=1}^n \Delta \epsilon_i^{\text{rel}}(\lambda) \cdot P_i(t)$$

wobei A_i und k_i^* die Amplituden und -Relaktionskonstanten darstellen, respektive aus der Fit-Routine. Die Daten wurden mittels Origin 7.5 (OriginLab) oder Mathcad 12 (PTC) analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von ChR2-315-YFP in *Xenopus laevis* Oozyten

In vorangegangenen Arbeiten wurde häufig *E. coli* als am besten geeignetes Expressionssystem für Membranproteine verwendet. Es zeigte sich jedoch, dass aufgrund der fehlenden posttranslationalen Modifikationsmaschinerie *E. coli* für eine eukaryontisches Membranprotein wie ChR2 ungeeignet ist (Kateriya et al., 2001). Aus diesem Grund wurde zunächst eine Expression von ChR2-315-YFP (pGem-HE-Vektor) in Oozyten durchgeführt, da hier bereits eine funktionelle Expression anhand von Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp (TEVC) Experimenten nachgewiesen wurde (Nagel et al., 1998). YFP wurde zur visuellen Kontrolle der Expression mit ChR2-315 fusioniert. Damit lassen sich ebenfalls sehr einfach fluoreszenz-spektrophotometrische Messungen durchführen. Um eine genaue Determinierung der Expression von ChR2-315-YFP in Plasmamembran (PM), Golgi und endoplasmatischem Retikulum (ER) zu ermöglichen, wurde nach der Membranpräparation eine Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Eine Western-Blot Analyse mittels eines GFP-Antikörpers konnte zeigen, dass ChR2 vermehrt in der PM vorliegt, aber auch zu ähnlichen Anteilen in Golgi und ER vorzufinden ist (Abb.19). Es wurden jeweils 10 µg Protein auf das SDS-Gel aufgetragen. Der Western-Blot zeigt die ChR2-315-YFP-Banden bei ~60 kDa. Da es sich um ein Fusionsprotein handelt, ist das Molekulargewicht ein Produkt aus 32 kDa ChR2-315 und 29 kDa YFP. Trotz Einsatz von 200 ChR2-315-YFP-injizierten Oozyten, konnte mittels BCA-Proteinbestimmung nur eine ChR2-Konzentration von 100 µg/ml erzielt werden. Damit konnte das Ziel einer spektroskopischen Grundcharakterisierung von ChR2 nicht durchgeführt werden.

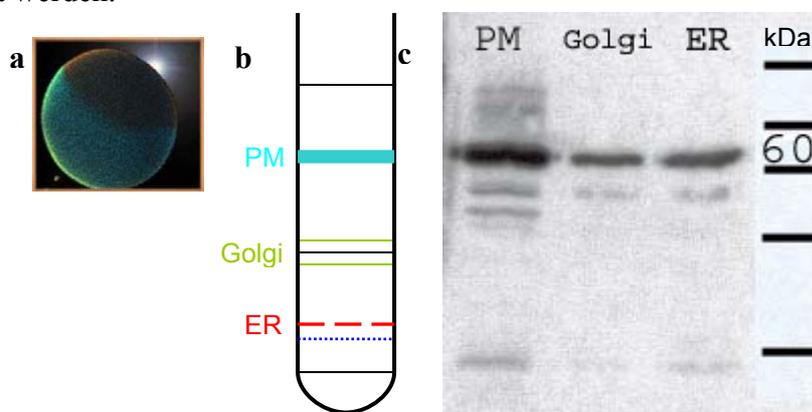


Abb.19: **Dichtegradientenzentrifugation aus Chr2-315-YFP-injizierten *Xenopus laevis* Oozyten.** A) Fluoreszenzaufnahme einer ChR2-315-YFP-Oozyte 40x Vergrößerung. B) Schema der Membranauftrennung in einem UZ-Röhrchen nach Dichtegradientenzentrifugation. C) Western-Blot mit einem GFP-HRP-Antikörper. Die Banden bei ~60 kDa zeigen Chr2-315-YFP-Expression in der Plasmamembran (PM), Golgi und Endoplasmatischem Retikulum (ER).

3.2 ChR2-315-YFP-His in einer stabil-transfizierten HEK293-Zelllinie

Da sich ChR2-315-YFP zwar funktionell in Oozyten exprimieren ließ, die Proteinausbeute jedoch zu gering für spektroskopische Untersuchungen ist, wurde ChR2-315-YFP mittels des pcDNA4TO-Vektors stabil in eine HEK293-Zelllinie transfiziert (durchgeführt durch die Firma Iongate, Frankfurt). Damit war es möglich die Proteinsynthese von ChR2-315-YFP-His durch Zugabe von 1 µg/ml Tetrazyklin (auf konfluente Zellen) zu induzieren. Das Neue Konstrukt erhielt zusätzlich einen 9xHis-tag, um eine anschließende Aufreinigung über eine Ni-NTA-Säule zu ermöglichen. Um Information über das Vorhandensein und die Notwendigkeit einer N-Glykosylierung von ChR2 zu erhalten, wurden die exprimierenden HEK293-Zellen mit 10 µg/ml Tunicamycin behandelt. Tunicamycin ist ein von *Streptomyces lysosuperificus* synthetisiertes Nukleosid-Antibiotikum, das den ersten Syntheseschritt der N-Glykosylierung hemmt. Anschließend wurde eine Membranpräparation aus 20 Nunclon™ 175 cm² Kulturflaschen angefertigt, die ein 4 g Zellpellet lieferten. Dies wurde daraufhin über eine Ni-NTA-Säule (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und zu 10 µg/µl auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der anschließende Western-Blot mit einem Anti-His-HRP-Antikörper konnte zeigen, dass Tunicamycin-behandelte ChR2-315-YFP-His-Zellen, zusätzlich zu ihrer glykosylierten 60 kDa-Bande, eine unglykosylierte Bande bei ca. 54 kDa aufweisen (Abb.20). BLM-Messungen dieser Tunicamycin-behandelten Zellen konnten zusätzlich zeigen, dass nicht-glykosyliertes ChR2 nur noch geringe Photoströme aufweist. (siehe Kapitel 3.5.1, S.76).

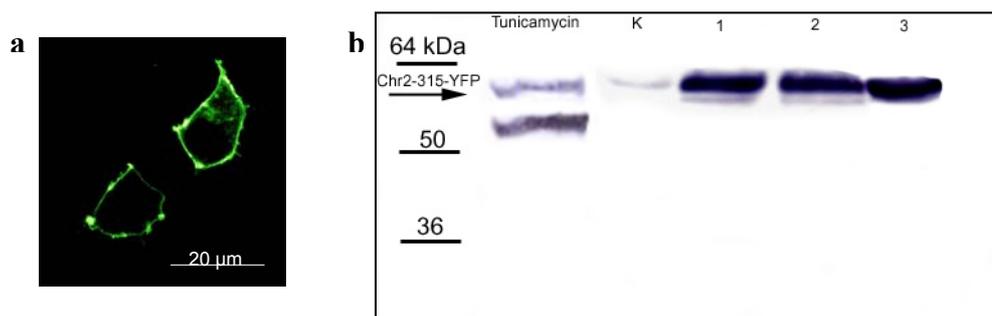


Abb.20: **Western-Blot zur Analyse der N-Glykosylierung von ChR2.** A) Konfokalmikroskopie zweier stabil-transfizierter HEK293-Zellen; 100x Vergrößerung im Immersionsobjektiv. B) Bande 1 zeigt, dass Tunicamycin-behandelte HEK293-Zellen unglykosyliertes ChR2 exprimieren, welches sich in einer weiteren Bande bei ca. 54 kDa äußert. K zeigt eine Kontrolle aus transient transfizierten HEK293. Die Banden mit den Ziffern 1-3 zeigen stabil-transfizierte HEK293 ohne Tunicamycin.

Die Aufreinigung aus der stabil-transfizierten HEK293-Zelllinie liefert eine ChR2-315-YFP-His-Ausbeute von 500 μg /ml nach BCA-Bestimmung. Damit ist erstmalig die Aufnahme eines Absorptionsspektrums möglich. Die Absorptionsmessung wurde im 100 μl Ansatz in einer Micro-Quarzküvette durchgeführt. Zu sehen ist die ChR2-Absorption bei 480 nm und die Absorption von YFP bei 513 nm (Abb.21).

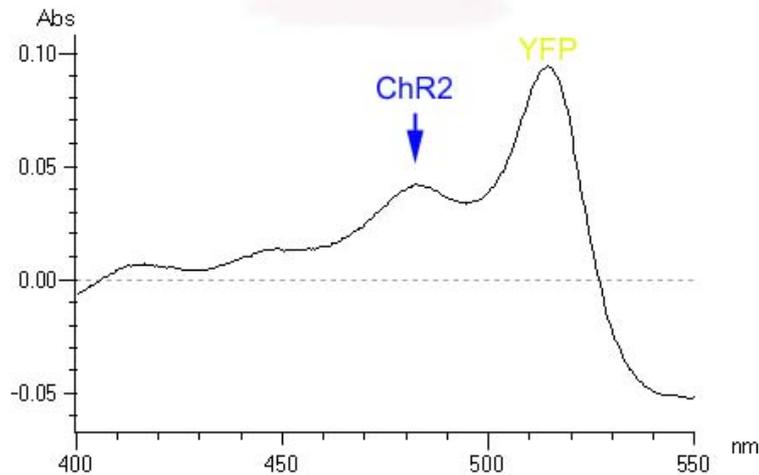


Abb.21: **Spektrophotometrische Messung von Chr2-315-YFP-His aus stabil-transfizierten HEK293-Zellen.** ChR2 zeigt eine Absorption bei 480 nm, während YFP bei 513 nm absorbiert

3.3 Zellfreie Expression von ChR2-315-YFP

Die Membranpräparation und anschließende Aufreinigung von ChR2-315-YFP-His bietet den ersten Ansatz, eine annähernd ausreichende Proteinmenge für spektrale und elektrophysiologische Funktionsmessungen (BLM-Technik) zu erhalten. Da diese Art der Proteingewinnung jedoch sehr zeitaufwendig und kostspielig ist, wurde der Ansatz der zellfreien Expression von ChR2-315-YFP gewählt.

Die zellfreie Proteinsynthese wurde 1964 von Holland J.J. & McCarthy B.J. beschrieben und von Zubay G. 1973 weiterentwickelt. Ausgehend von prokaryotischen oder eukaryotischen Zell-Lysaten, welche alle Komponenten des ribosomalen Translationsapparats besitzen, können Proteine mit einer RNA-Matrize oder im gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem mit DNA hergestellt werden. Grundsätzlich können aus jedem Organismus Extrakte für die zellfreie Synthese gewonnen werden. Kommerziell sind zellfreie Syntheseextrakte aus *E.coli*, Weizenkeimen oder Reticulozyten erhältlich (Abb.22).

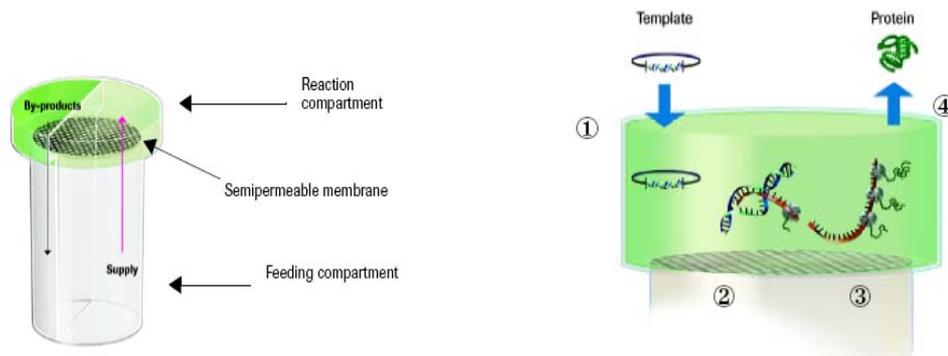


Abb.22: **Schema der „Continuous-exchange cell-free technology (CECF)**. Gezeigt sind das obere Replikationskompartiment mit seinem Reaktionsmix (RM) bestehend aus T7-RNA-Polymerase, *E.coli*-Extrakt und Chr2-315-YFP. Das so genannte „Feeding Kompartiment“ enthält alle wichtigen Precursor zur Umsetzung der Synthese (all-trans-Retinal, Lipid, Detergens, Nukleotide, tRNA etc). nach Roche, Penzberg

Neuerliche Publikationen haben zudem gezeigt, dass die zellfreie Synthese sich auch besonders für schwer zu exprimierende Membranproteine wie z.B. GPCR's eignet (Klammt et al., 2007). Rekombinante Proteine können mit dieser Methode im mg-Bereich exprimiert werden, und das in einem 1 ml Reaktionsvolumen über nur wenige Stunden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits beruhen auf der „Continuous-exchange cell-free technology (CECF). Dies bedeutet, dass das Replikationskompartiment (Reaktionsmix (RM) bestehend aus T7-RNA-Polymerase, *E.coli*-Extrakt und Chr2-315-YFP) und das so genannte „Feeding Kompartiment“ (enthält alle wichtigen Precursor zur Umsetzung der Synthese (all-trans-Retinal, Lipid, Detergens, Nukleotide, tRNA etc)) durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind. Durch kleine Magnetrührer in beiden Kompartimenten wird ein ständiger Austausch gewährleistet. Das RTS-System (Rapid-Translation-System) von Roche basiert auf *E.coli*-Lysat, während die anderen beiden Kits auf Weizenkeimextrakt und Reticulocyten-Lysat basieren (TNT[®] Coupled Systems, Promega, Mannheim). Als Vektor für die zellfreie Synthese wurde der „High-Copy“ pUCBM20-Vektor (Roche) verwendet. Chr2-315-YFP und Bacteriorhodopsin(BR, Kontrolle) wurden aus dem pGem-HE-Vektor über BamHI und HindIII inkloniert (Abb.23)

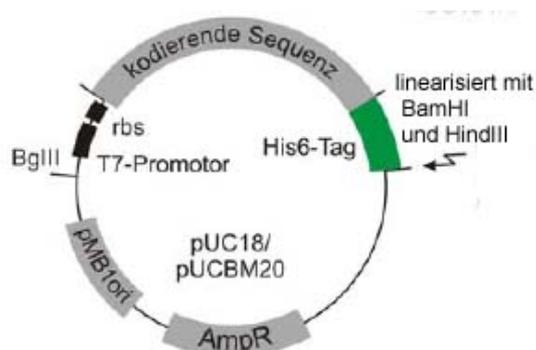


Abb.23: **Schematische Darstellung des pUCBM20-Vektors.**

Die Einklonierung der kodierenden Sequenzen erfolgte über BamHI und HindIII

Der Western-Blot in Abb.24a zeigt, dass sich ChR2-315-YFP in allen drei zellfreien Synthesystemen in hoher Konzentration (1-2mg/ml nach BCA) exprimieren lässt. Jedoch liefert das Reticulocyten-System eine weitere Bande bei 54 kDa, die vermuten lässt, dass ChR2-315-YFP hier zu einem großen Prozentsatz unglykosyliert vorliegt. Auch BR, das als Kontrolle diente, konnte mit einer Konzentration von 2,4 mg/ml mit dem RTS-System von Roche synthetisiert werden (auch gezeigt durch Kalmbach et al., 2007). Die Lokalisierung auf dem Western-Blot erfolgte im Falle von ChR2-315-YFP über einen GFP-HRP-Antikörper. BR wurde über einen His-HRP-Antikörper detektiert. Abb. 26b zeigt eine fluorimetrische Messung der CECF-Probe aus dem RTS (Hitachi Fluorescence Spektrophotometer F-4500). Die Emission von YFP liegt bei 527 nm. Keine der ChR2-315-YFP-Proben ließ eine Absorptionsmessung zu, noch konnten die Proben an der BLM auf ihre Funktionalität hin untersucht werden. Die BR-Kontrolle lieferte jedoch eine Absorption bei 568 nm und zeigte auch den charakteristischen Pumpstrom an der BLM (Abb. 24c/d). Damit war ausgeschlossen, dass die Synthese möglicherweise nur teilweise vollzogen wurde. Eine Ursache für die nicht-funktionelle Synthese könnte eine Aggregation des Proteins, sowie das Fehlen von *all-trans*-Retinal sein.

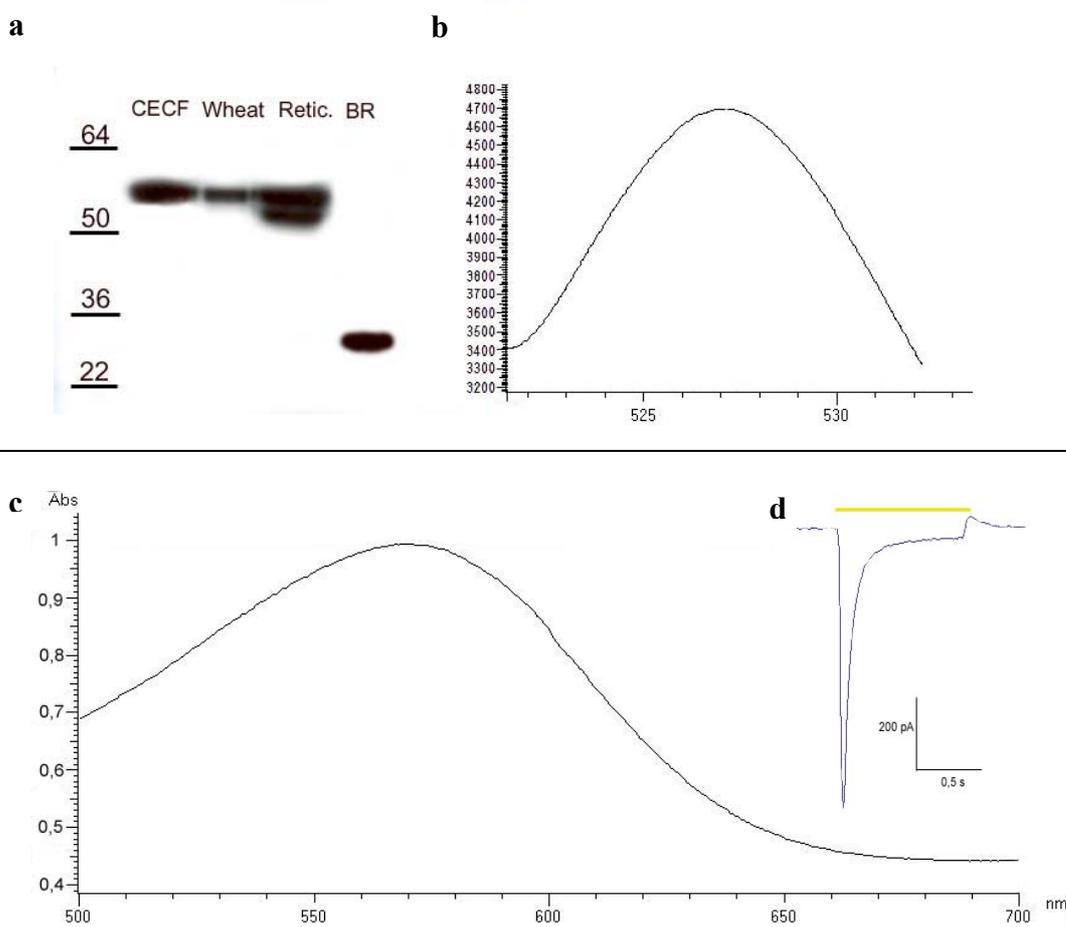


Abb.24: a) Western-Blot nach der zellfreien Synthese. b) Fluoreszenzmessung der CECF-ChR2-315-YFP-Probe. c) Absorption von zellfrei synthetisiertem BR bei 568 nm. d) Photostrom von BR (gleiche Probe wie c).

Aus diesem Grund wurde ein modifizierter CECF-Ansatz versucht. Es wurde dem Feeding-Kompartiment zusätzlich 1 μM *all-trans*-Retinal, 4 mg/ml DOPC-Liposomen sowie entsprechend ihrer CMC die Detergentien DDM, DM, Fos12, C₁₂E₈, SDS, C₁₆E₂₀, OG, Chaps



Abb.25: Einsatz verschiedener Detergentien zur Verbesserung der zellfreien Synthese. Western-Blot mit einem GFP-HRP-Antikörper. 10 μg Protein pro Bande.

und Triton-X hinzugegeben. Trotz einer verbesserten Synthese durch den Einsatz der neuen Komponenten (Proteinkonzentration liegt nun bei bis zu 3,5 mg/ml für C₁₆E₂₀), konnte dennoch kein funktionelles Chr2-315-YFP gewonnen werden.

3.4 Expression von ChR2-315-T-YFP-His in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris*

Vorausgegangene Expressionsansätze haben gezeigt, wie schwierig es ist ChR2 funktionell zu exprimieren. Dies liegt in erster Linie an der oftmals fehlenden posttranslationalen Modifikation des Proteins. *Pichia pastoris* ist ein Hostsystem, das besonders für eukaryontische Proteine geeignet ist, da es diese Maschinerie besitzt. Viele Publikationen haben gezeigt, dass es sich besonders zur Expression von schwierigen Membranproteinen, wie z.B. GPCRs eignet (Andre' und Reinhart, 2006). Aus diesem Grund wurde das bereits bestehende ChR2-315-TEV-YFP-His-Konstrukt in den auch kommerziell erhältlichen pPic9K-Vektor über BamHI und NotI einkloniert (Abb.26). Der Vektor besitzt einen speziellen Methanol-Promotor. Dieser Promotor steuert in *Pichia* die Expression des ersten Enzyms in der Methanol-Verwertungskette, der Alkoholoxidase1, kurz AOX1 (EC 1.1.3.13) und induziert somit die Proteinexpression. Zusätzlich besitzt er ein Sekretionssignal, den α -Faktor, der die Insertion des rekombinanten Proteins in die Membran ermöglicht (Sekretionssignal des *S. cerevisiae* Alpha-Paarungsfaktors).

Der hier verwendete pPic9K-Vektor ist eine Modifikation von Dr. Christoph Reinhart und enthält zusätzlich N-Terminal einen FLAG-tag und einen His10x-tag sowie eine TEV-Schnittstelle. Dieser modifizierte Vektor wurde in erster Linie ausgewählt, da er nach der TEV-Schnittstelle eine BamHI-Schnittstelle aufweist. Bereits vorher durchgeführte Versuche haben gezeigt, dass sich der vorhandene N-Terminale His-tag nicht zur Aufreinigung eignet. Dies lässt vermuten, dass der N-Terminus von ChR2 nicht gut zugänglich ist. Die Aufreinigung von ChR2-315-T-YFP-His erfolgt demnach nur über den C-Terminalen His-tag.



Abb.28: Schema des ChR2-315-T-YFP-His-Konstrukts im pPic9K-Vektor. BamHI und NotI sind die Restriktionsschnittstellen zur Einklonierung der codierenden Sequenz. TEV (Schnittstelle der Tobacco Etch Virus Protease) die Mutante H134R (synonym zu D96N in BR, Abb.15) wurde ebenfalls über BamHI und NotI einkloniert.

Die Fusion mit dem Yellow-Fluorescence-Protein (YFP, mutiertes GFP aus *Aequoria victoria*, Clontech) dient weiterhin der visuellen Kontrolle der Expression von Chr2.

Nach der Herstellung des Konstrukts, und seiner Überprüfung durch Sequenzierung, fand eine Transformation mit dem *Pichia*-Stamm SMD 1163 auf Minimal-Dextrose-Platten statt. Er zeichnet sich durch eine Proteasedefizienz aus. Darauf folgte eine Selektion der „-multi-copy-inserts“ durch Geneticin (G418).

Es wurde Klon 3 mit einer Geneticin-Resistenz von 1 mg/ml gewählt und durch ihn eine Expressionsreihe aus einer 1 Liter Kultur erstellt. Dabei wurde die Expression sowohl visuell, als auch durch Western-Blot-Analyse bestimmt. Der *Pichia*-Kultur wurden bei 9, 12, 24, 32, und 48 Stunden Proben entnommen. Des Weiteren wurde auch die Expression ohne Zugabe von *all-trans*-Retinal untersucht. Der Western-Blot in Abb. 29a zeigt, dass die Expression bei 24h am höchsten ist. Ohne Zugabe von *all-trans*-Retinal ist sie im gleichen Zeitraum um die Hälfte verringert. Abbildungen 27 b-d zeigen Fluoreszenzaufnahmen der Probe bei 24 Stunden.

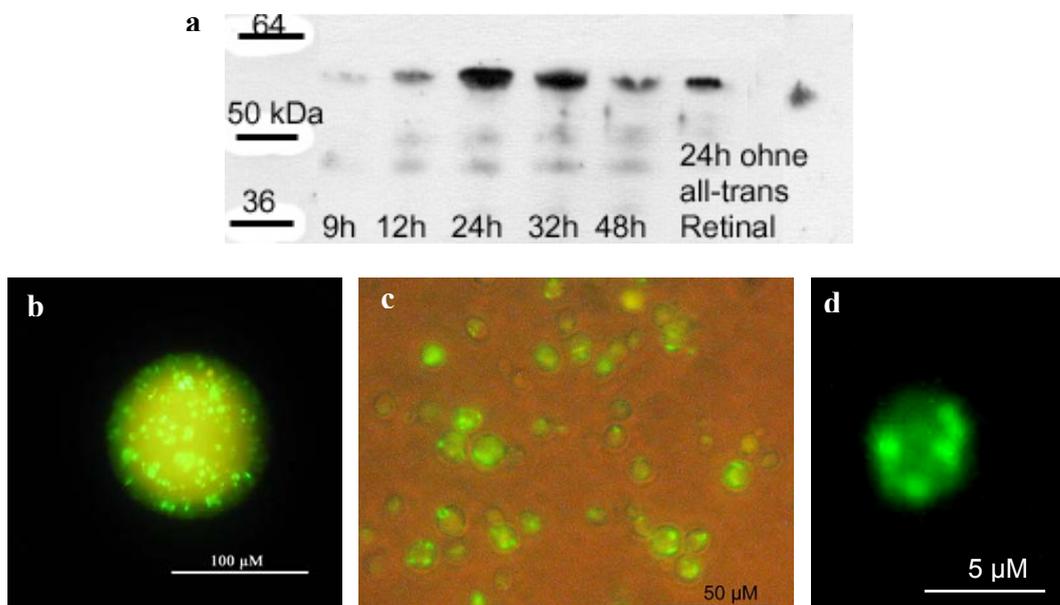


Abb.27: a) **Expressionsreihe von Chr2-315-T-YFP-His in *Pichia pastoris*.** Western-Blot mit einem Anti-His-HRP-Antikörper. Chr2-T-YFP-His liegt bei etwa 60 kDa. b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Probe bei 24 h, 20x Vergrößerung. c) 40 x Vergrößerung, Durchlicht + Fluoreszenz. D) 100 x Vergrößerung.

Tests zur Optimierung der Kulturlösung haben gezeigt, dass BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium) das beste Medium für eine optimale Expressionsrate ist. YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) und YPG (+Glycerol) erzielen eine etwas schlechtere Expression (Abb.28).

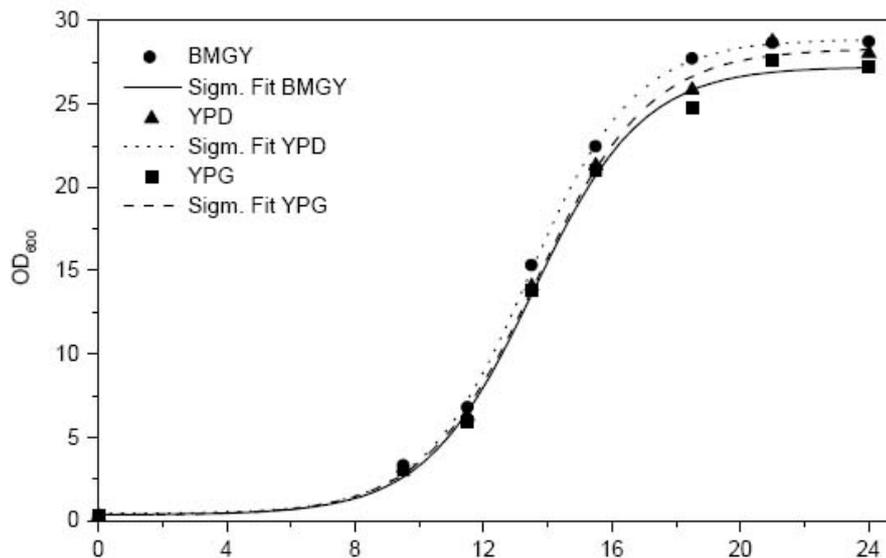


Abb.28: **Wachstum von *Pichia pastoris* Klon 3 in verschiedenen Medien im Schüttelkolben.** Die Kolben wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ jeweils 1%ig aus der gleichen Vorkultur (in BMGY) angeimpft. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben gezogen und das Wachstum anhand der Bestimmung der Optischen Dichte verfolgt.

Eine erste kleine Membranpräparation aus einer 500 ml Kultur liefert bereits 12g Gesamtprotein. Darauf folgten eine Solubilisierung mit DDM (N-Dodecyl-Maltosid oder auch LM) und eine anschließende spektrophotometrische Analyse. Die Messung einer Absorption bei 480 nm für ChR2 und 513 nm für YFP zeigt, dass *Pichia pastoris* in der Lage ist funktionelles ChR2 zu exprimieren (Abb.29). Spätere elektrophysiologische Messungen an der BLM können dies unterstreichen (siehe Kapitel ab S.79).

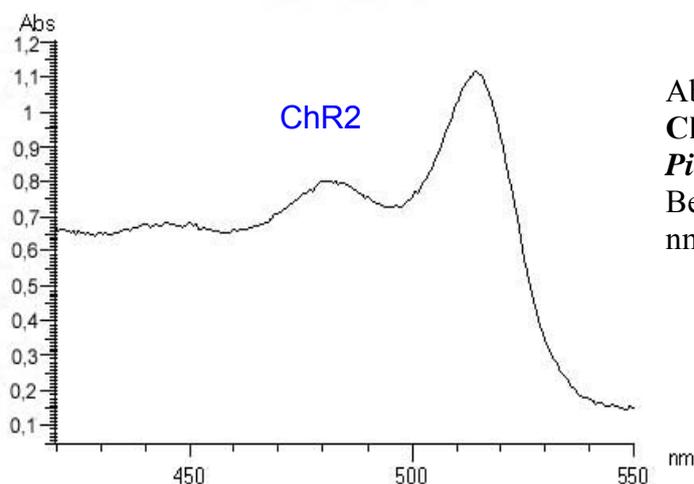


Abb.29: **Absorptionsspektrum von Chr2-315-T-YFP-His exprimiert in *Pichia pastoris*.**

Bei 480 nm absorbiert ChR2 und bei 513 nm YFP.

Da die Solubilisierung mit DDM ein erster Versuch war, sollten noch weitere Detergentien auf eine mögliche bessere Micellbildung mit Chr2 hin untersucht werden. Entsprechend ihrer CMC wurden 1% DM, DDM, Triton X-100, SDS, CHAPS, C12E8, LDAO, Fos12 und OG getestet. *Pichia*-Membranen, die Chr2-315-T-Y-H exprimiert haben, wurden für 1 Stunde bei 4°C unter stetigem Rühren solubilisiert. Anschließend wurden sofort Proben für die Spektroskopie und zur Western-Blot-Detektion entnommen. Abb. 30a zeigt die spektrophotometrischen Daten, aus denen hervorgeht, dass DM und DDM besonders gut solubilisieren. Der Western-Blot in Abb.30b bestätigt dieses Ergebnis. Aus diesem Grund werden alle nachfolgenden Solubilisierungen mit DM durchgeführt. Dazu wird DM zunächst auf seine Absorptions-Stabilität in einem Zeitraum von 0 bis 48 Stunden und nach 1 Woche hin getestet. Abb.31 demonstriert, dass DM auch nach 1 Woche ein noch stabiles Chr2-315-T-Y-H-Spektrum aufweist.

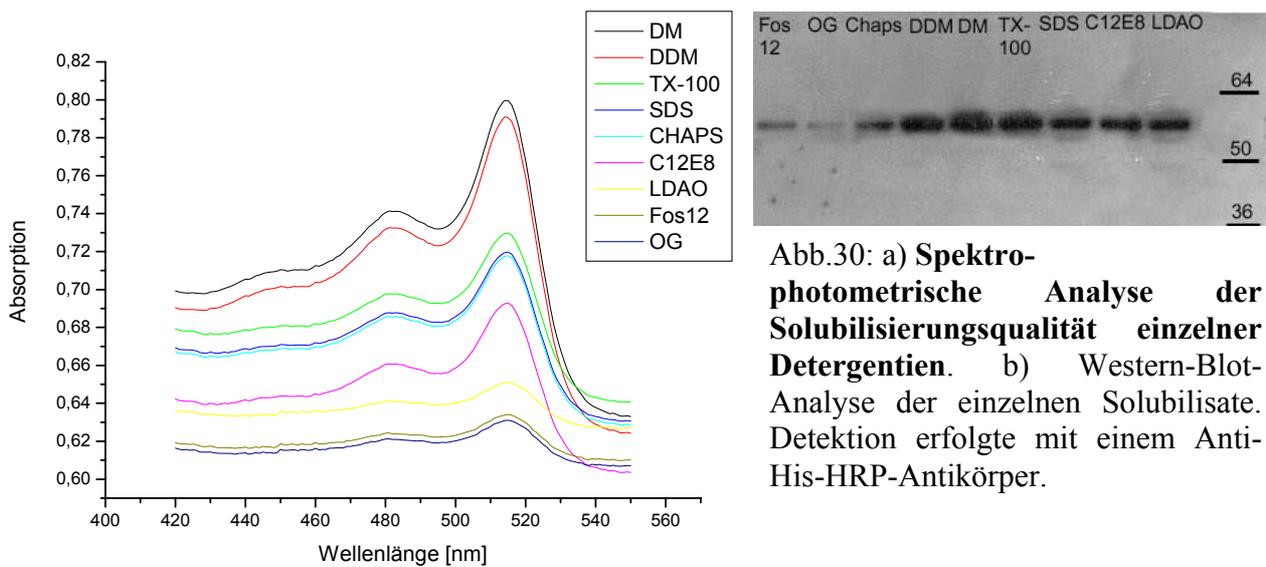


Abb.30: a) **Spektrophotometrische Analyse der Solubilisierungsqualität einzelner Detergentien.** b) Western-Blot-Analyse der einzelnen Solubisitate. Detektion erfolgte mit einem Anti-His-HRP-Antikörper.

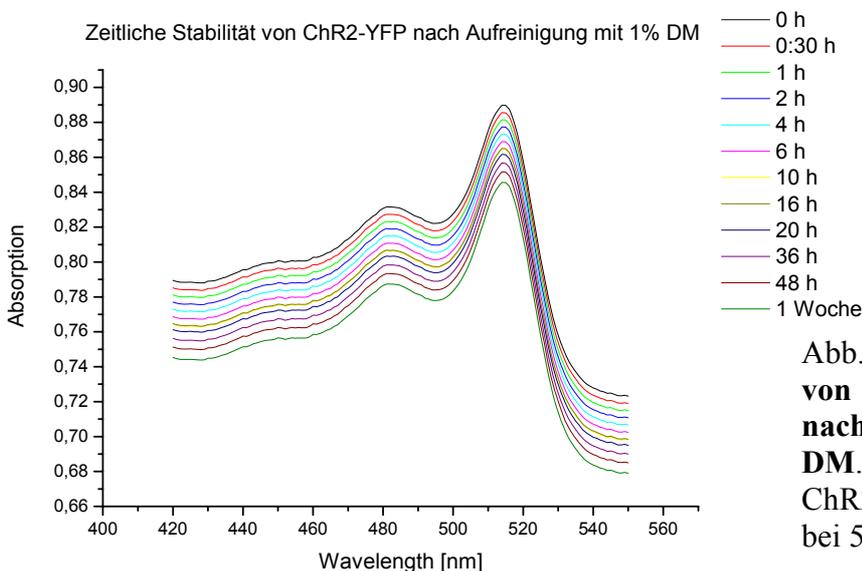


Abb.31: **Stabilitätsanalyse von Chr2-315-T-YFP-His nach Solubilisierung mit 1% DM.** Die Absorption von Chr2 liegt bei 480 nm, YFP bei 513 nm.

Deglykosylierungstest

Zu den Solubilisierungstest wurde bei *Pichia pastoris* die Fähigkeit zur N-Glykosylierung getestet, da dies eine wesentliche Voraussetzung für ein funktionelles Chr2 ist. Dabei wurden *Pichia*-Membranen mit 2,5 U N-glycosidase F (PNGase F, *Flavobacterium meningosepticum*) behandelt. Sie hydrolysiert alle Typen von Asparagin-gebundenen N-Glycanen der Glycoproteine. Des Weiteren wurde 15 µg/ml Tunicamycin zum Induktionsmedium BMMY dazugegeben. Tunicamycin ist ein von *Streptomyces lysosuperificus* synthetisiertes Nukleosid-Antibiotikum, das den ersten Syntheseschritt der N-Glykosylierung hemmt. Es wurde bereits in Kapitel 3.2 bei HEK293-Membranen eingesetzt. Abb.32 zeigt, dass bei fehlender N-Glykosylierung durch N-glycosidase F und Tunicamycin eine zusätzliche Bande bei ca. 54 kDa auftritt. Dies ist nicht der Fall bei der Kontrolle Chr2-315-T-YFP-His. *Pichia pastoris* ist damit in der Lage, die erforderliche N-Glykosylierung bei Chr2 zu vollziehen.

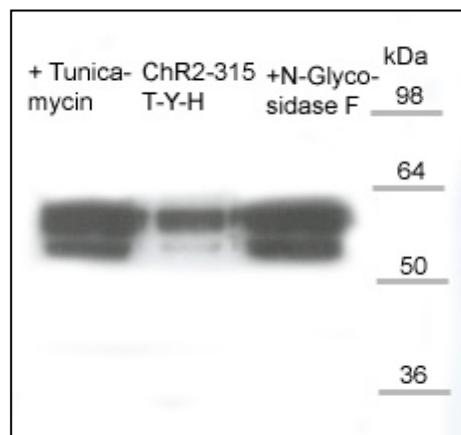


Abb.32: **Hydrolyse der N-Glycane durch N-glycosidase F und Tunicamycin bei Chr2-315-T-YFP-His in *Pichia pastoris*.** Western-Blot mit einem Anti-His-HRP-Antikörper. Chr2-315-T-YFP-His liegt bei 60 kDa. Nach der Deglykosylierung entsteht eine zweite Bande bei ca. 54 kDa.

3.4.1 Aufreinigung von ChR2-315-T-YFP-His und der Mutante H134R

Ein weiteres Konstrukt beinhaltet die ChR2-Mutante H134R (Abb.26). Sie entspricht der Mutante D96N in Bacteriorhodopsin. Patch-Clamp Untersuchungen konnten zeigen, dass sie im Gegenzug zu D96N keine verlangsamte Kinetik aufweist, sondern größere stationäre Ströme liefert. Aus diesem Grund war es interessant auch diese Mutante aufzureinigen und sowohl anhand kinetischer Absorptionmessungen, als auch elektrophysiologisch mittels der BLM zu charakterisieren. Dass die Mutante H134R ebenfalls funktionell in *Pichia pastoris* exprimiert werden kann, zeigt das Absorptionsspektrum in Abb.33 nach Solubilisierung mit 1% DM und Aufreinigung über eine Ni-NTA-Säule. Es ist identisch mit dem Ausgangskonstrukt (Abb. 29) und weist keine spektrale Verschiebung auf. Die zusätzliche Absorption bei 410 nm stellte eine Verunreinigung durch eine Cytochromoxidase dar. Dies konnte mittels Reduktion durch Dithionit belegt werden.

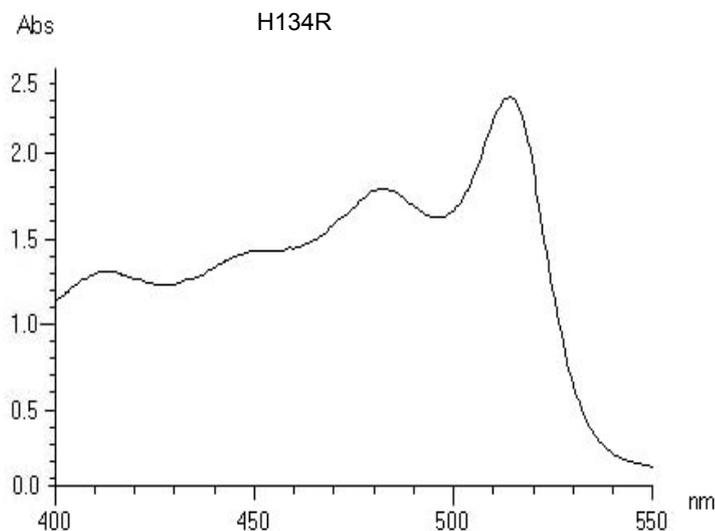


Abb.33: **Absorptionsspektrum der aufgereinigten ChR2-H134R-Mutante.** Das Spektrum wurde nach Aufreinigung über eine Ni-NTA-Säule aufgezeichnet. ChR2 absorbiert bei 480 nm und YFP bei 513 nm.

Die nachfolgenden Abbildungen 34a und b zeigen die Chromatogramme von ChR2-315-T-YFP-His und ChR2-315-H134R-T-YFP-His. Beide Proteine wurden mittels des Amersham Äkta-Purifier im automatisierten Verfahren aufgereinigt. Es handelt sich hierbei um die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC). Der Äkta-Purifier besitzt eine integrierte UV-Zelle, die es möglich macht, unmittelbar während des Elutionsvorgangs mit Imidazol die Wellenlängen 280 nm (Proteinkonzentration), 480 nm (ChR2) und 513 nm (YFP) aufzuzeichnen. Der verkürzte ChR2-Wildtyp liefert nach der Aufreinigung bis zu 7,5 mg/ml Protein (Abb.35), während die Expression und Aufreinigung der Mutante H134R sogar bis zu 10 mg / ml Protein liefert.

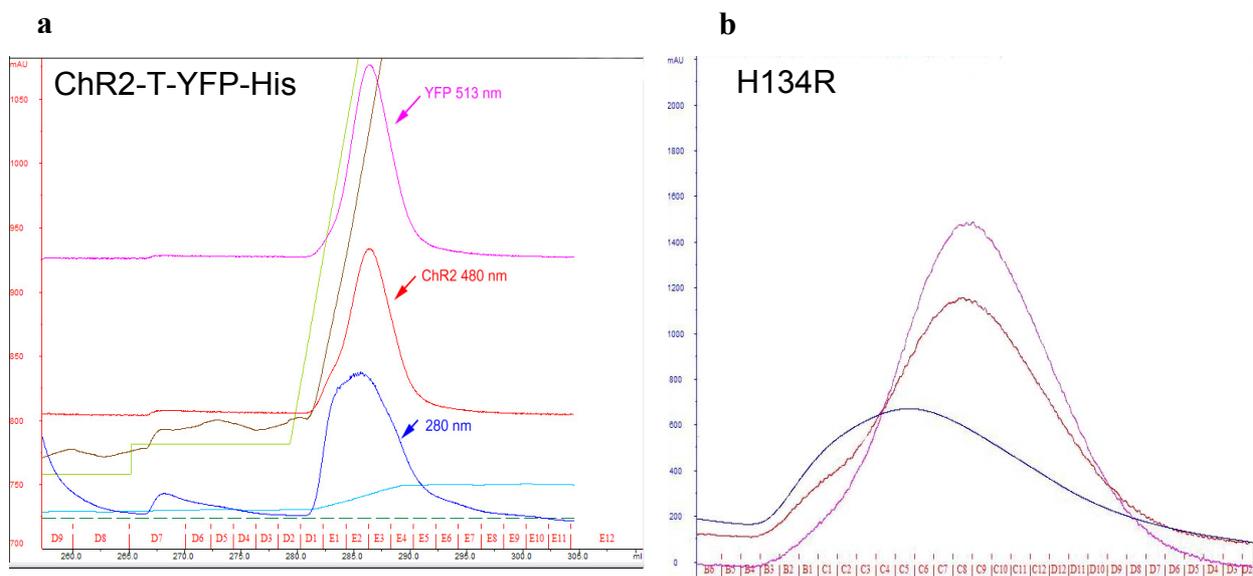


Abb.34: a) Äkta-Chromatogramm von ChR2-315-T-YFP-His. Die Elution erfolgte bei 150 mM Imidazol. Magenta: YFP, Rot: ChR2, Blau: Proteinabsorption. b) Chromatogramm der Elution von Mutante H134R.

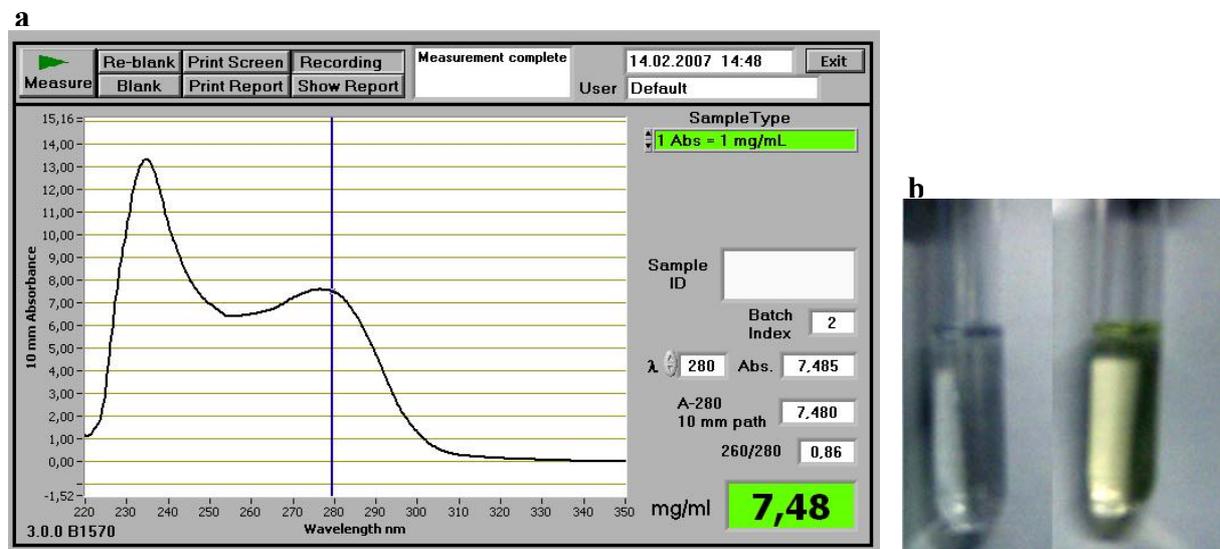


Abb. 35: a) Proteinbestimmung des aufgereinigten ChR2-315-T-YFP-His. b) Eluat nach der Aufreinigung. Rechts befindet sich die ChR2-315-T-YFP-His-Probe, links Puffer.

Um die Reinheit der Probe bei einer Elution über einen Imidazolgradienten zu verfolgen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und anschließend ein Western-Blot erstellt (Abb.36 a/b). Die Proben 5 bis 7 zeigen den höchsten ChR2-315-T-YFP-His-Anteil. Hier liegt der Imidazolgehalt zwischen 100-200 mM. Der mit einem Anti-His-HRP-Antikörper durchgeführte Western-Blot spiegelt dies wider. Die Banden bei ca. 70 kDa zeigen eine Verunreinigung durch eine Cytochromoxidase. Sie kann durch nochmalige Aufreinigung über eine Anionenaustauschchromatographie eliminiert werden.

Die Ionenaustauschchromatographie ist eines der wichtigsten flüssigkeitschromatographischen Trennverfahren für die präparative Biochemie. Grundlegend basiert ihr Prinzip auf der Interaktion von gelösten positiv oder negativ geladenen Teilchen mit einer entgegengesetzt geladenen festen Trägermatrix. Bei einer Anionenaustauschchromatographie (AEX) besteht die Trägermatrix aus positiv geladenen Gruppen (hier Diethylaminoethan, DEAE Sepharose). Diese Gruppen liegen über einen weiten pH-Bereich protoniert und damit positiv geladen vor. Das negativ geladene Gegenion ist Chlorid (Cl⁻). Unter Austausch dieses Gegenions kann ein negativ geladenes Molekül, in diesem Fall ChR2 nach Verdau mit der TEV-Protease, an die Matrix gebunden werden. ChR2 hat einen ermittelten pI (isoelektrischen Punkt) von pH 11 und weist damit eine negative Nettoladung auf (ermittelt durch www.expasy.org/Multident) (Abb. 37a).

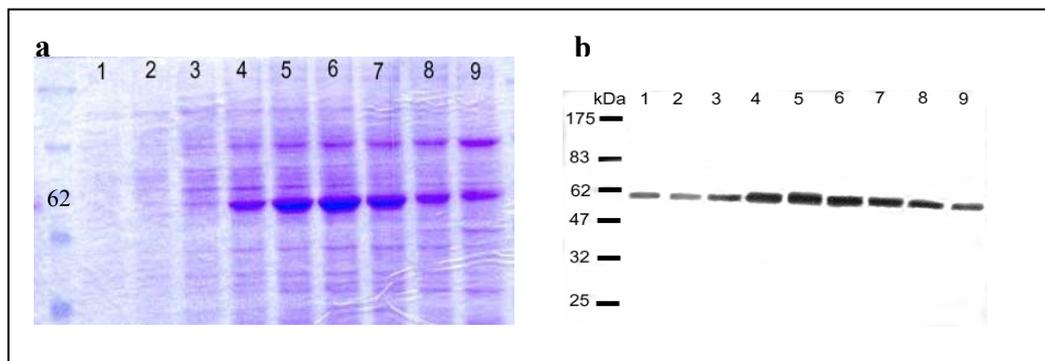


Abb.36: a) **SDS-Gel-Coomassie verschiedener Imidazol-Elutionsschritte.** Imidazolkonzentration von 0-300 mM. b) Western-Blot der Eluate. Anti-His-HRP-Antikörper. ChR2-315-T-YFP-His liegt bei etwa 60 kDa

Um vollständig reines ChR2 zu erhalten, wurde danach ein Verdau mit der TEV-Protease durchgeführt und YFP-His abgespalten. Anschließend wurde das verdaute Protein über eine DEAE Sepharose™ Fast Flow-Säule gereinigt. Abb. 37b zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel bei dem ChR2 in einer Höhe von ca. 32 kDa läuft. Der Verdau und die nochmalige Reinigung über einen Anionenaustauscher resultiert in einem starken Verlust an Protein. Die Konzentration von ChR2 beträgt nur noch etwa 800 µg/ml, nach Einsatz von 200 ml. Dies liegt in der geringen Bindungseffizienz dieses Systems begründet.

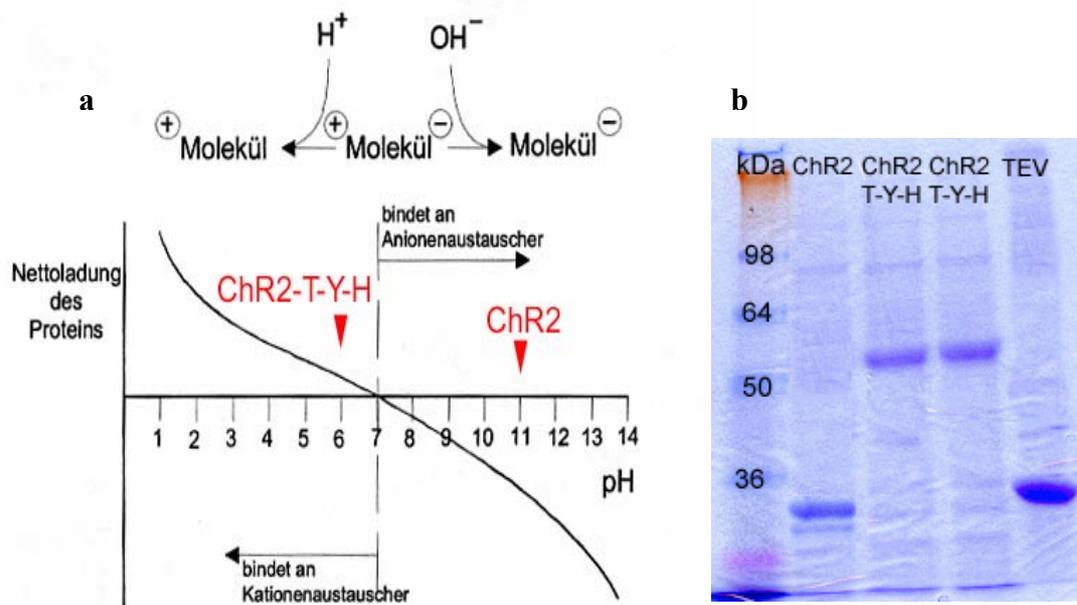


Abb.37: a) Schema der Nettoladung von ChR2. b) SDS-Gel-Coomassie. ChR2 liegt bei 32 kDa, ChR2-315-T-Y-H bei 60 kDa, TEV mit His-tag bei 33 kDa

3.4.2 Durchführung einer Gelfiltration und MALDI-TOF-Analyse

Durch die Gelfiltration werden Substanzen nach Molekulargewicht getrennt. Für die Gelfiltration werden quervernetzte Polymere als Gelfiltrations-Medien verwendet. Aufgrund eines Ausschlusseffekts eluieren große Moleküle vor kleineren. Dies ermöglicht eine zusätzliche Reinigung des Proteins und gibt Aufschluss über etwaige Aggregation oder Dimerisierung des Proteins. Das gereinigte ChR2-315-T-YFP-His wurde mit Hilfe der Gelfiltration über eine Superose 6-Säule bei 280, 480 und 513 nm analysiert. Das Retentionsprofil in Abb. 38a zeigt ein Absorptionsmaximum für alle drei Wellenlängen bei einem Retentionsvolumen von 1,18 ml. Daraus lässt sich erschließen, dass ChR2 als Monomer vorliegt. Zudem zeigt ChR2 keine Aggregation nach der IMAC-Aufreinigung. Das SDS-Silbergel in Abb. 38b bestätigt die zusätzlich gewonnene Reinheit.

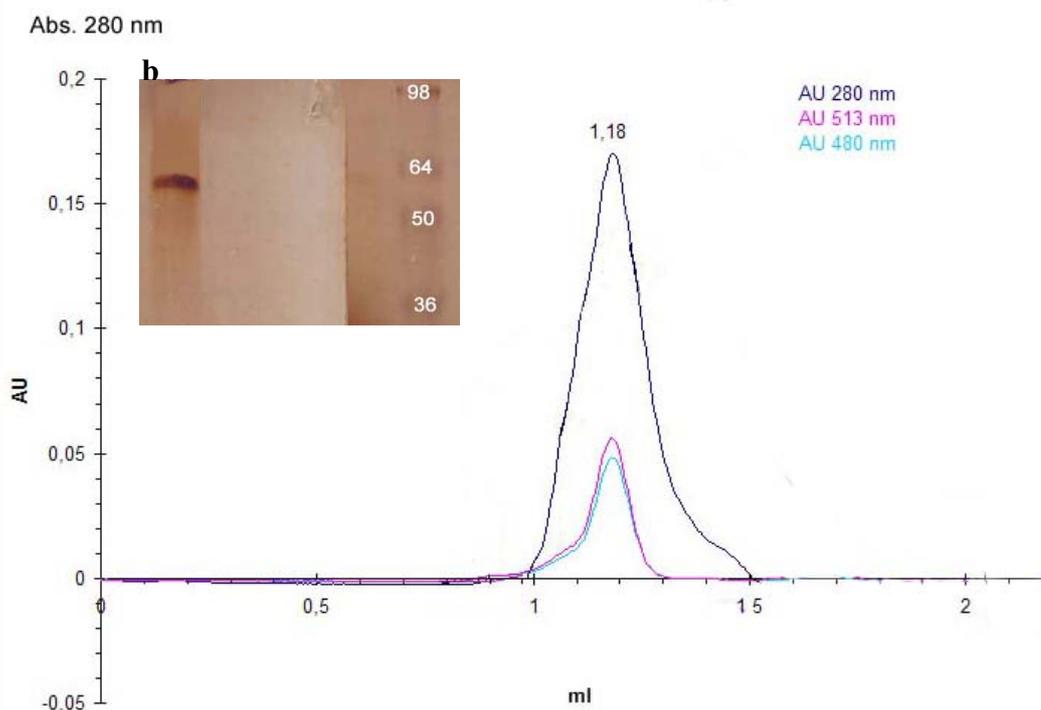


Abb.38: a) **Retentionsprofil (Superose 6) des gereinigten Rezeptors (Eluat der Ni-NTA-Säule)**. Blau: Absorption bei 280 nm, Magenta: 513 nm, Türkis: 480 nm. b) SDS-Silbergel des Eluats aus der Gelfiltration

MALDI-TOF

Wie andere Massenspektrometer auch, besteht das MALDI-TOF Massenspektrometer im Wesentlichen aus drei Komponenten: der Ionenquelle, dem Analysator und dem Detektorsystem. In der Ionenquelle wird die Probe mittels eines Lasers ionisiert und die entstehenden Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt. In dem Analysator werden sie nach ihrer Flugzeit aufgetrennt und anschließend von einem Detektorsystem registriert. Chr2-315-T-YFP-His wurde wie bereits beschrieben nach der Methode von Hufnagel P. et al.1996 für die MALDI-TOF-Analyse eingesetzt. Mit dieser Methode lässt sich eindeutig klären, ob es sich hier tatsächlich um Chr2 handelt und nicht wie schon oft geschehen, ein histidinreiches endogenes Protein aufgereinigt wurde. Abb. 39 zeigt den so genannten „Fingerabdruck“ von Chr2-315-T-YFP-His nach tryptischem Verdau und Erkennung der einzelnen signifikanten Peptidfragmente. Ein Screening mit dem Mascot-Programm (www.expasy.org) konnte das Massenspektrogramm als Chr2-315-T-YFP-His identifizieren (siehe S. 75).

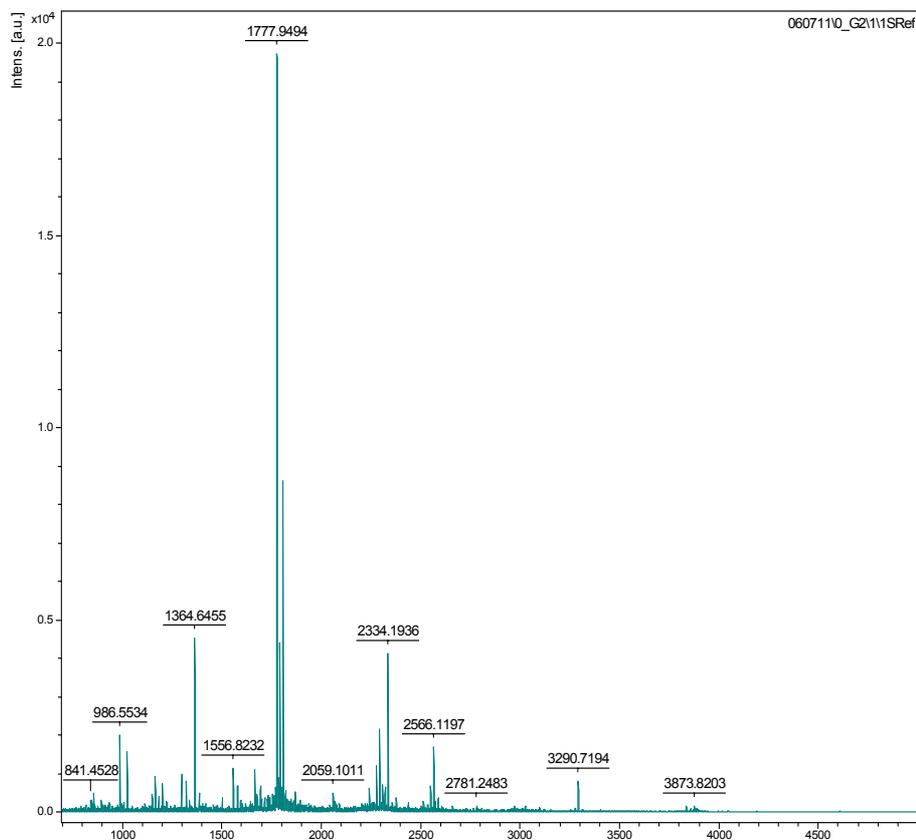


Abb.39: MALDI-TOF Massenspektrogramm von gereinigtem Chr2-315-T-YFP-His nach tryptischem Verdau.

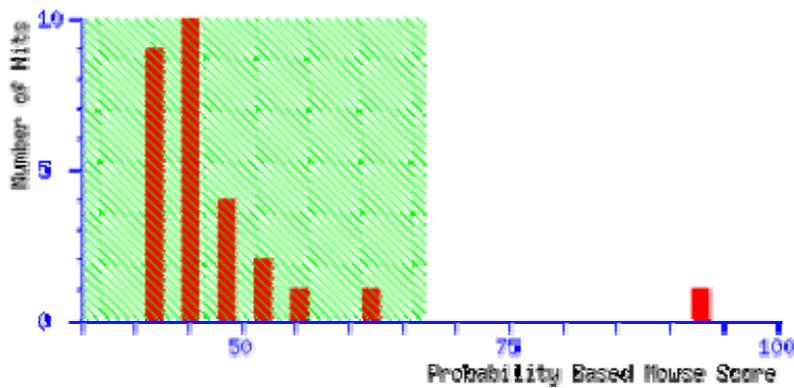
MATRIX **SCIENCE** Mascot Search Results

User :
 Email :
 Search title : 60 kDa Bande 3
 MS data file : 0_E2_1.mi
 Database : CDS_Mammalian_plus
 Mammalian_plus_constructs_KBMS3.0.20040121 (255627 sequences; 87033222 residues)
 Timestamp : 28 Jul 2006 at 11:20:45 GMT
 Top Score : 93 for **tb|1**, Chr2-TEV-YFP-His

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein Scores greater than 67 are significant ($p < 0.05$).



- [tb|1](#) Mass: 63937 Score: **93** Expect: 0.00014 Queries
 matched: 17
 Chr2-TEV-YFP-His

3.5 Untersuchung der elektrogenen Eigenschaften und Überprüfung der Funktionalität von ChR2-315-T-YFP-His und der Mutante H134R

3.5.1 Ladungstransportmessungen von ChR2-315-T-YFP-His aus HEK293-Membranen an der BLM

ChR2 lässt sich wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, auch in HEK293-Zellen exprimieren. Um die Erhaltung der Funktionalität, elektrogenes Verhalten und die Lichtabhängigkeit studieren zu können, wurden HEK293-Zellmembranen mittels der BLM-Technik („Black Lipid Membrane“ BLM) analysiert.

Modellmembranen bieten eine wichtige Möglichkeit, prinzipielle Transportmechanismen oder die Rolle einzelner elektrischer Membranparameter gezielter zu untersuchen, als das an biologischen Membranen möglich wäre. So sind der passive Ionentransport durch die Lipidmatrix oder der Wirkungsmechanismus rekonstituierter Membranproteine ohne deren Beeinflussung durch andere Transportsysteme mit Hilfe von Modellmembranen untersuchbar. Dieses Modellsystem ermöglicht demnach eine isolierte Betrachtung aktiver und passiver Transportmechanismen. Mit einer hohen zeitlichen Auflösung (Ketterer & Läger, 1971) ist diese Methode ebenfalls zur Untersuchung schneller Mechanismen, wie dem Übergang eines Proteinzustandes in den Nächsten geeignet (Babes & Fendler, 2000). Allerdings dürfen Ergebnisse, die mit Modellmembranen gewonnen werden, auf keinen Fall unkritisch auf biologische Membranen übertragen werden, da die oftmals veränderten physiologischen Bedingungen zur Denaturierung und Aggregation oder zu Artefakten (z.B. Lichtartefakt) führen können.

Für lichtinduzierbare Ionenpumpen oder –Kanäle wie ChR2 eignen sich besonders Ladungstransportmessungen an planaren Lipiddoppelschichten, um eine detaillierte Charakterisierung der elektrogenen Eigenschaften zu erhalten. Die BLM-Messungen finden unter „Steady-state“ oder Fließgleichgewichts-Bedingungen statt (vergl. Abschn. 2.2.3). Die Probe wird hierzu über die gesamte Messdauer mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt und der resultierende Photostrom detektiert. Im Gegensatz dazu stellen die zeitaufgelösten spektroskopischen Messungen des Photozyklus von ChR2 „Single-Turnover“-Experimente dar (Kapitel 3.6.2). Diese können auch anhand von Strommessungen an der BLM durchgeführt werden. Sie sind in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht durchgeführt worden. Die nachfolgenden Seiten beziehen sich nun zunächst auf transiente Ströme

(aufgrund der kapazitiven Kopplung), da mit den HEK293-Membranen kein Einbau in die BLM erzielt werden konnte.

Nach Anlagerung von HEK293-Membranen mit Chr2-315-T-YFP-His bei pH 7,4 wird ein 500 ms Lichtblitz (Lichtquelle XBO-Lampe) auf die Verbundmembran gegeben. Unmittelbar mit dem Lichtreiz erfolgt ein schneller transienter Photostrom (Abb. 40).

Der negative transiente Strom mit einer maximalen Amplitude von bis zu 0,65 pA/mm klingt innerhalb von wenigen Millisekunden monoexponentiell auf die Grundlinie ab und zeigt den sehr schnellen proteininternen Ladungstransport. Reine HEK293-Membranen zeigen keinen Strom bei gleicher Belichtung.

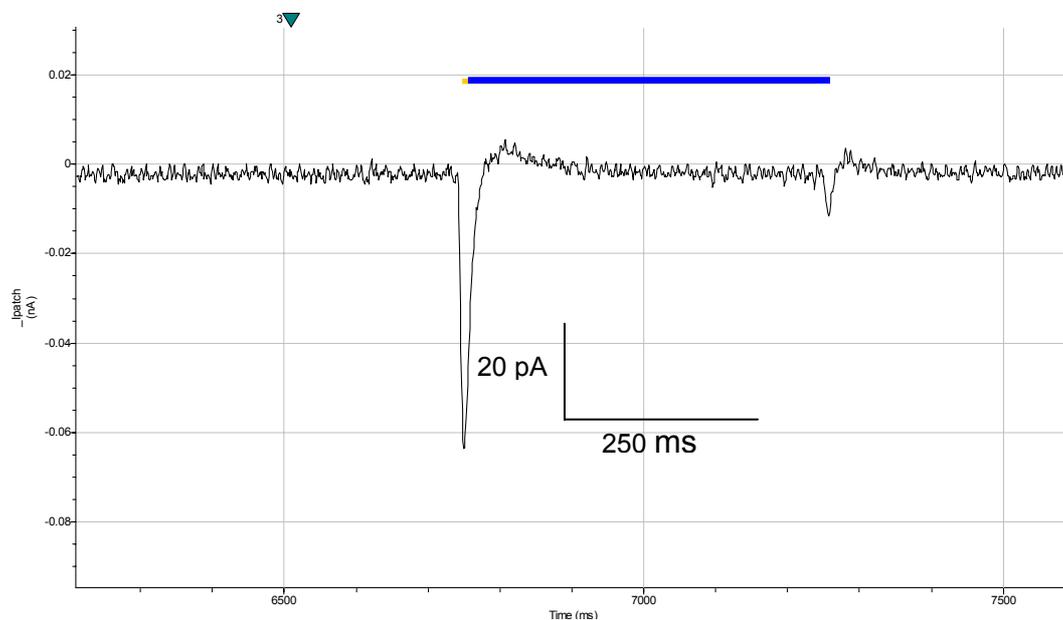


Abb. 40: Transienter Photostrom von Chr2-315-T-YFP-His in HEK293-Zellmembranen bei pH 7,4. An- und abschalten der Lichtquelle ist durch gelben Balken gekennzeichnet (XBO-Lampe). Pufferbedingungen: 100 mM NaCl, 10 mM Hepes.

Messungen zur Wellenlängenabhängigkeit mit verschiedenen Breitband-Interferenzfiltern (Abb. 41a) zeigen deutlich ein nahezu identisches Aktionsspektrum (Abb. 41b), wie sie vorausgegangene TEVC-Messungen bereits gezeigt haben (Kapitel 1.5, Abb. 15). Das Aktionsmaximum liegt bei 480 nm und stimmt damit mit dem spektroskopischen Absorptionsmaximum überein (Kapitel 3.2, Abb. 22).

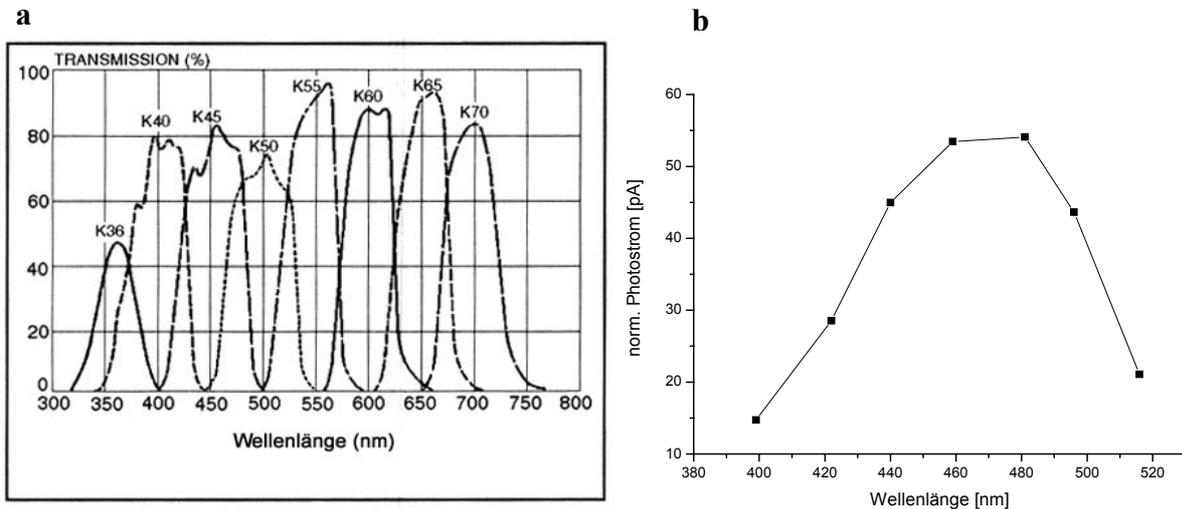


Abb. 41: a) Schema des spektralen Einsatzbereiches von Breitband-Interferenzfiltern. b) Aktionsspektrum von ChR2-315-T-YFP-His in Hek293-Zellmembranen. BLM-Messung bei pH7,4, XBO-Lampe, Breitband-Interferenzfilter, Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Hepes.

Es folgten nun Messungen zur pH-Abhängigkeit von ChR2-315-T-YFP-His. In der Publikation von Nagel et al., 2003 wurde bereits gezeigt, dass sich die Erholung zum Grundzustand bei niedrigem externen pH erhöht und dies in einem größeren Photostrom resultiert. Auch dies konnte anhand der BLM-Messungen belegt werden. Bei pH 2 wird der höchste Photostrom mit 110 pA erreicht (Abb. 42 a/b). Bei pH 8,5 ist ein Photostrom kaum

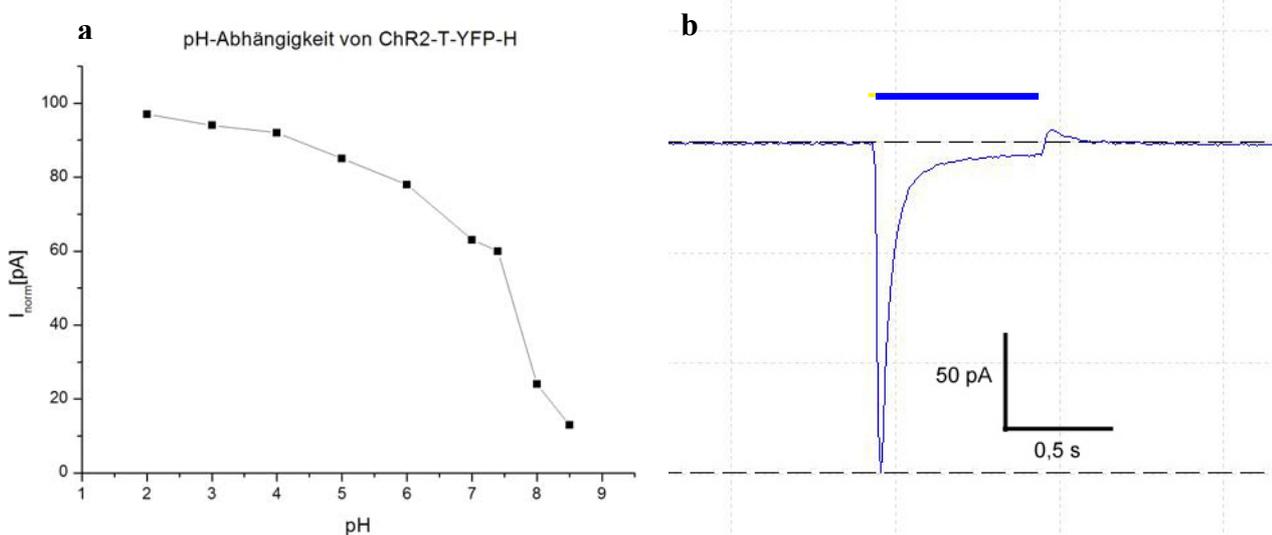


Abb. 42: a) pH-Abhängigkeit von ChR2-315-T-YFP-His in HEK293-Zellmembranen. BLM-Messung von pH 2- pH 9. 1 sec Belichtung (XBO-Lampe). Puffer: 100 mM NaCl. pH mit konz. Salzsäure bzw. NaOH eintitriert. b) Photostrom bei pH 2.

noch zu messen, da das Protein bereits zu aggregieren begann.

Wie in Kapitel 3.2 bereits gezeigt wurde, ist die Glykosylierung von ChR2 wichtig für die Funktionalität dieses Proteins. Dies belegt auch Abbildung 43, in der eine BLM-Messung von Tunicamycin behandelten HEK293-Membranen dargestellt ist. Das Signal zeigt aufgrund einer anderen BLM-Meßapparatur eine Ausrichtung nach „oben“. Trotz gleicher Messbedingungen (siehe oben) konnte nur ein Photostrom von 2 pA gemessen werden. Diese Messungen wurden mit einem $n = 12$ durchgeführt und lieferten stets das gleiche Resultat. Das Signal beruht demnach nicht auf eine mögliche schlechte Membrananlagerung an die BLM. Eine direkte Zugabe von Tunicamycin während des Anlagerungsprozesses war nicht möglich, da dies zum Reißen der BLM führte.

Zusammengenommen kann belegt werden, dass ChR2 funktionell in HEK293-Zellen exprimiert werden kann und auch nach einer Membranpräparation noch funktionell vorliegt. Die vorhandenen BLM-Messungen zeigen demnach transiente Ströme die möglicherweise auf einen proteininternen Ladungstransport hinweisen. Dass dies nicht nur auf das HEK293-Präparat zutrifft, belegt das nachfolgende Kapitel „Ladungstransportmessungen von ChR2-315-T-YFP-His aus *Pichia pastoris* an der BLM“.

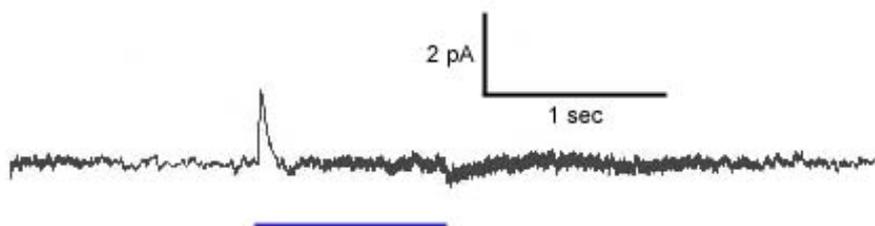


Abb. 43: **Tunicamycin behandelte HEK293-Zellmembranen zeigen die Erforderlichkeit einer N-Glykosylierung.** Der ChR2-315-T-YFP-His basierenden Photostrom ist nur noch bei 2 pA. Belichtung 1 sec (XBO-Lampe), 100 mM NaCl, 10 mM Hepes, pH 7,4.

3.5.2 Ladungstransportmessungen von ChR2-315-H134R-T-YFP-His aus *Pichia pastoris* an der BLM

Membranen sowie Membranvesikel aus *Pichia pastoris* können aufgrund ihrer Zellwand nicht ohne weiteres für BLM-Messungen eingesetzt werden, wie vorangegangene Messungen belegen konnten (hier nicht gezeigt). Zuvor muss die Zellwand mit Zymolyase verdaut werden. Zymolyase hydrolysiert Glucosepolymere an ihren β -1,3-Bindungen. Eine komplett verdaute Zellwand ist in der EM-Abbildung 44 zu erkennen. *Pichia pastoris* Protoplasten wurden dann, wie bereits im Methodenteil beschrieben, in einer Membranpräparation aufgearbeitet und zur funktionellen Analyse an der BLM eingesetzt. Nachfolgend werden Messungen des ChR2-315-H134R-Konstrukts beschrieben. Die Mutante H134R entspricht der bereits detailliert untersuchten Mutante D96N in Bacteriorhodopsin (Tittor & Bamberg, 1989). Hier ist der mögliche Protonendonator (H134) zur Reprotonierung der Schiff'schen Base gegen ein Arginin ausgetauscht worden. Elektrophysiologische Patch-Clamp-Messungen an HEK293-Zellen, die diese Mutante exprimierten, konnten zeigen, dass sie einen erhöhten stationären Strom liefert.

Untersuchungen der H134R Mutante aus dem *Pichia pastoris* Expressionssystem sollten deshalb weiteren Aufschluss über diese Mutante geben.

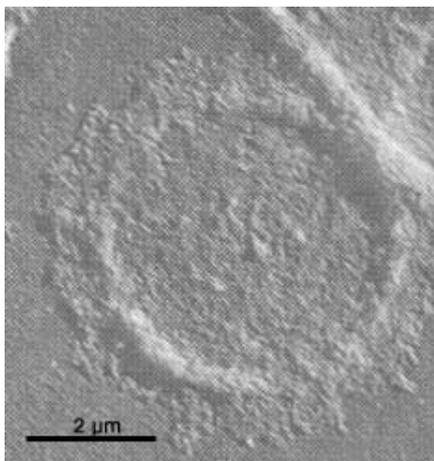


Abb. 44: *Pichia pastoris* Protoplast nach Zellwandverdau mit Zymolyase.

Gezeigt ist ein EM-Bild (Gefrierbruch-Technik, „Freeze-Fracture“). Maßstab 2 μ m.

Nach dem Verdau und der anschließenden Membranpräparation lassen sich die H134R-Membranen unter den gleichen Bedingungen wie zuvor die HEK293-Zellmembranen, an die BLM anlagern und messen. Abb. 45 zeigt zwei BLM-Messungen zur pH-Abhängigkeit. Bei Einschalten des Lichts bei pH 7,4 folgt unmittelbar ein transientser Strom, der in wenigen Millisekunden monoexponentiell auf die Grundlinie abfällt. Das zweite negativ-transiente Signal, das auf eine zweite Belichtung nach einer weiteren Sekunde anschließt, erreicht nicht den Ausgangsstrom des ersten Signals von 220 pA. Dieses Verhalten wurde bereits in Nagel et al., 2003 beschrieben. Geht man nun zu pH 4 über, erhöht sich der Photostrom auf bis zu 450 pA mit gleichbleibendem Verhalten. Abb. 46a legt deutlich dar, dass die Mutante H134R bedeutend größere Ströme bei niedrigeren pH-Werten liefert. Allerdings weist die Mutante H134R schon bei pH 7,4 einen größeren Strom auf als der Wildtyp (nicht gezeigt, da identisch mit der HEK293-Messung auf S.78).

Zusätzlich ist ein positiver Strom nach Beenden des Lichtreizes auszumachen. Hierbei handelt es sich um eine kurzfristige Entladung der Verbundmembran nach Abschaltung des Lichtes. Das Aktionsspektrum der Mutante weist das gleiche Maximum bei dem Breitband-Interferenzfilter K45 auf. Lediglich die Ströme sind auch hier nach Normierung auf den gleichen Quantenfluss der jeweiligen Breitband-Interferenzfilter höher (Abb. 46b).

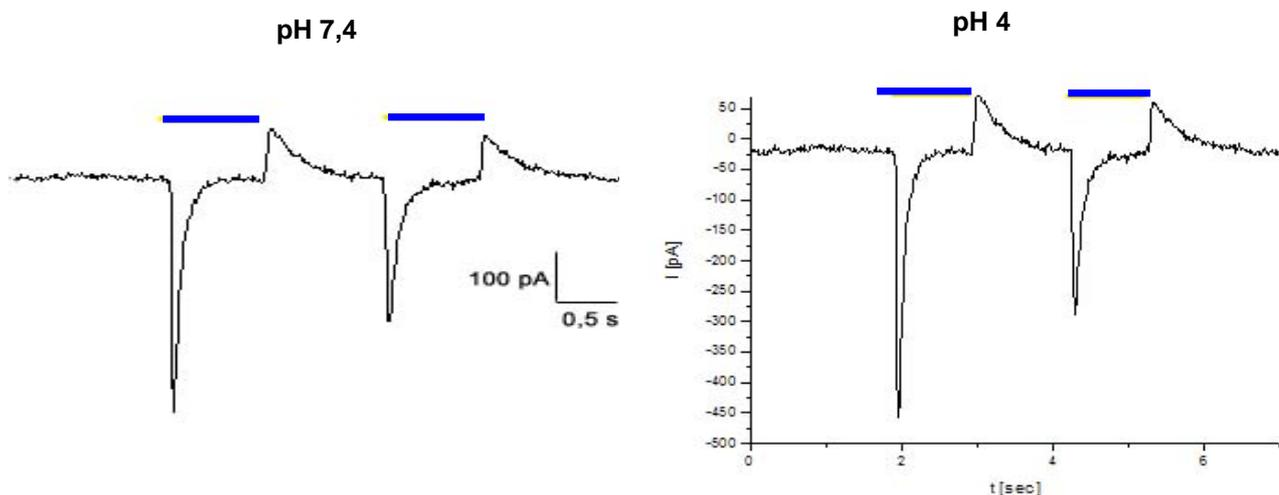


Abb. 45: Erhöhung des Photostroms von angelagerten *Pichia pastoris*-Membranen mit ChR2-315-H134R-T-YFP-His bei niedrigem pH. An- und abschalten der Lichtquelle ist durch einen blauen Balken gekennzeichnet (XBO-Lampe). Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Hepes. Messung erfolgte bei pH 7,4 und 4.

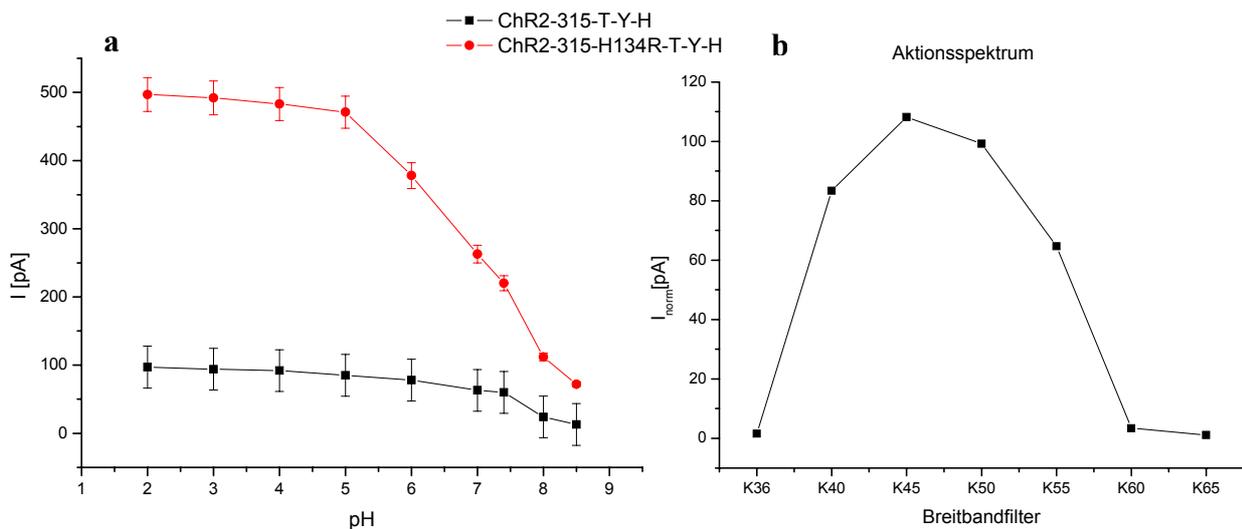


Abb. 46: a) **pH-Abhängigkeit der Mutante H134R im Vergleich mit dem Wildtyp.** Die Mutante (rot) zeigt größere Ströme als der Wildtyp (schwarz). b) **Aktionsspektrum der Mutante H134R.** Gemessen mit Breitband-Interferenzfiltern. Maximum: K45. Puffer bei a und b: 100 mM NaCl, 10 mM Hepes.

Bei den auf der vorherigen Seite abgebildeten Signalen liegt aufgrund einer reinen Anlagerung der Membranen kein stationärer Strom vor. Dies kann jedoch durch Herstellung von Membranvesikeln mittels der „Freeze-Thaw-Technik“ und Anlegen eines Gradienten über die Vesikel bewirkt werden. Abb. 47a zeigt deutlich einen stationären Strom von 16 pA. Die Leitfähigkeit beträgt 900 pS, der Spitzenstrom liegt bei 342 pS. Beachtet man jedoch die geringe Einzelkanalleitfähigkeit von ca. 20 fS für ChR2 und einen Einbau der nicht gerichtet ist, so können diese niedrigen Werte durchaus zustande kommen. Der negative Amplitudenstrom zeigt nun eine Abklingkonstante von $\tau = 70$ ms.

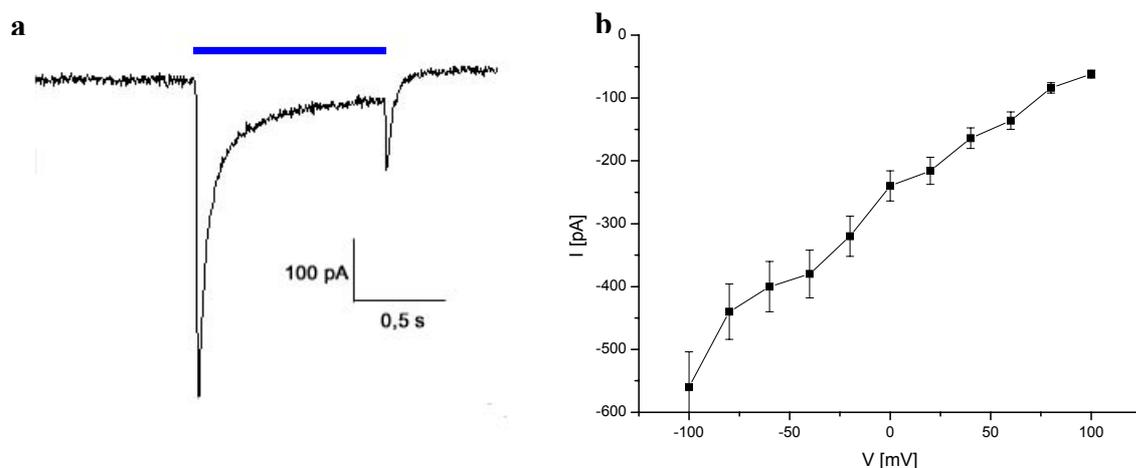


Abb. 47: a) **Photostrom nach Einbau der H134R-Membranvesikel in die BLM.** An- und Abschalten der Lichtquelle ist durch einen blauen Balken gekennzeichnet (XBO-Lampe). Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Hepes. Messung erfolgte bei pH 7,4. b) **Strom-Spannungskennlinie der Mutante H134R.**

Diese Zeitkonstante der Mutante H134R ist langsamer als die veröffentlichte Zeitkonstante des Wildtyps von 20 ms (Nagel et al., 2003). Die Strom-Spannungskennlinie des transienten Stroms in Abb. 47b ist nahezu linear. Der Strom kehrt sich nicht um.

3.5.3 BLM-Ladungstransportmessungen an aufgereinigten ChR2-315-T-YFP-His-Proteoliposomen aus *Pichia pastoris*

Mit Hilfe der Gefrierbruchelektronenmikroskopie kann der Zustand von Proteoliposomen und die Lokalisierung der darin enthaltenen Membranproteine untersucht werden. Diese Methode wurde bereits häufig zur Charakterisierung von natürlichen oder künstlichen Membranen mit BR verwendet (Gulik-Krzywicki *et al.*, 1987, Sternberg *et al.*, 1992 und 1993, Usukura *et al.*, 1981). In Abb. 51a ist das Schema einer Gefrierbruch-Membran mit Proteinen dargestellt. Zunächst wird eine Zellsuspension auf einem Träger rasch in flüssigem Propan oder Stickstoff gefroren und in einer Gefrierbruchapparatur im Vakuum ($p < 10^{-6}$ bar) bei tiefen Temperaturen aufgebrochen. Anschließend erfolgt die Untersuchung am Elektronenmikroskop. Abb. 49b zeigt einen intakten Proteoliposomen aus 20 mg/ml DOPC mit ChR2-315-T-YFP-His im Verhältnis 1:5 (Gefrierbruch-EM angefertigt durch Dr. Winfried Haase; MPI für Biophysik, Frankfurt). Die einheitliche Verteilung der Proteine innerhalb des Liposomen lässt darauf schließen, dass keine Aggregation von ChR2-315-T-YFP-His vorliegt.

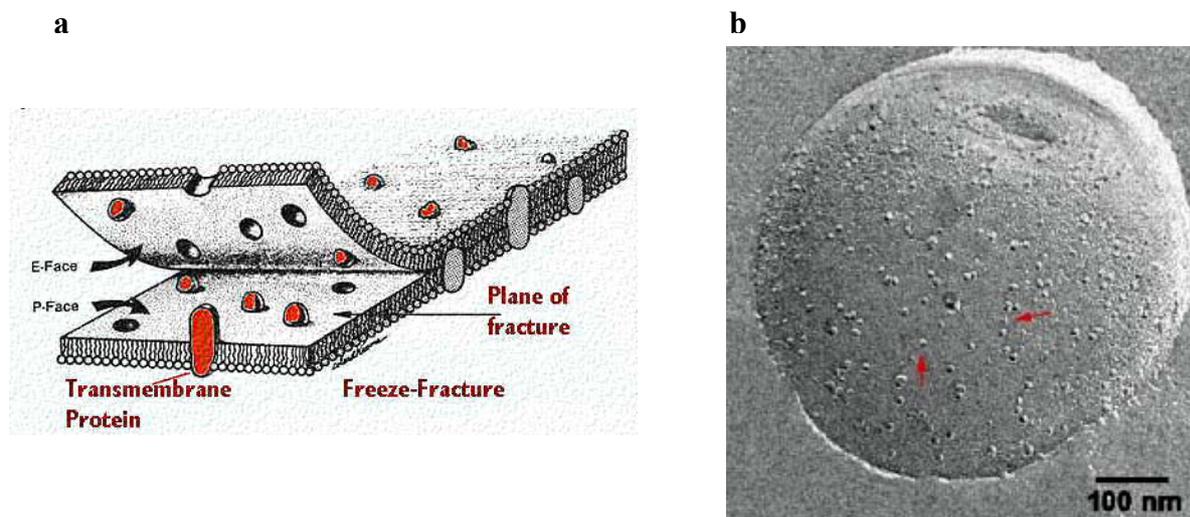


Abb. 49: a) Schema eines Gefrierbruch-EM-Bildes. b) Gefrierbruch-EM-Bild eines ChR2-315-T-YFP-His Proteoliposomen. 20 mg/ml DOPC in 100 mM NaCl, 10 mM Hepes, pH 7,4 im Verhältnis 1:5 mit ChR2-315-T-YFP-His versehen. Methode siehe S. 55. Maßstab: 100 nm

ChR2-315-T-YFP-His-Proteoliposomen wurden wie bereits im Methodenteil beschrieben mittels eines Gradienten, und darauf folgendem osmotischen Druck auf die Liposomen zur Fusion mit der BLM gebracht.

Die transienten Ströme, die nach Einbau und Belichtung gemessen werden können, sind kleiner als die Ströme von eingebauten Membranvesikeln. Dies begründet sich möglicherweise durch eine zu niedrige Proteinkonzentration in den Proteoliposomen. Das molare Mischungsverhältnis von Protein zu Liposomen betrug 1:5 und konnte aufgrund der erhöhten Aggregation des Proteins nicht verändert werden. Abb. 50 a zeigt den ChR2-315-T-Y-H-Photostrom bei pH 7,4 und bestätigt somit die Funktionalität des aufgereinigten und rekonstituierten ChR2-315-T-YFP-His aus *Pichia pastoris*. Bei pH 7,4 wird ein negativ-transienter Strom von 60 pA erreicht, bei einer Belichtungszeit von 6 sec. Der stationäre Strom liegt bei 21 pA. Die Zeitkonstante des Abklingens beträgt $\tau = 70$ ms. Bei pH 2 (Abb. 50b) kann sogar ein Strom von 170 pA gemessen werden. Der stationäre Strom liegt nun bei 30 pA. Aber erst durch Anlegen einer negativen Spannung zeigt sich eine Erhöhung des stationären Stroms auf fast 45 pA (Abb. 51a). Die Erhöhung des stationären Stroms ist bei niedrigen pH-Werten sogar noch größer (Abb. 51b). Die Abklingkonstante fällt bei pH 2 auf $\tau = 40$ ms ab.

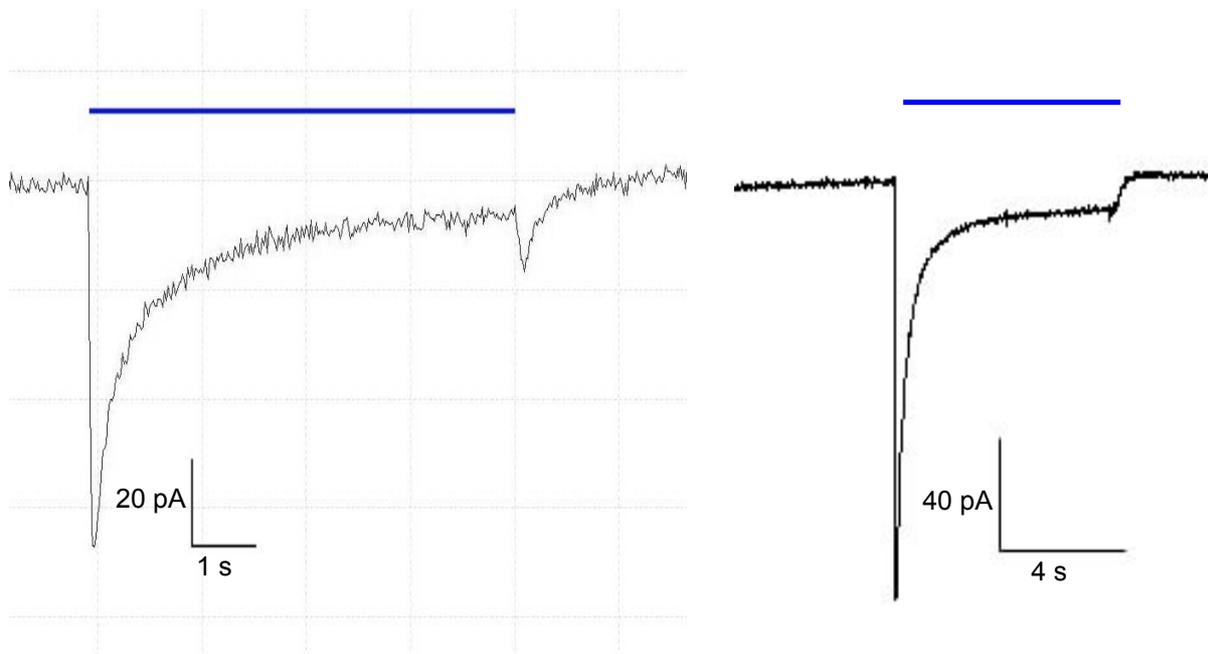


Abb. 50: a/b: **Einbau von aufgereinigten ChR2-315-T-YFP-His-Proteoliposomen in die BLM.** a) pH 7,4, b) pH 2. Die blauen Balken deuten die Belichtungszeit an (XBO-Lampe). Puffer: 100 mM NaCl. 10 mM Hepes in cis und trans sowie in den Proteoliposomen. Gradient erzeugt durch Zugabe von 100 μ l 4 M NaCl, 10 mM Hepes, 2mM CaCl₂ trans.

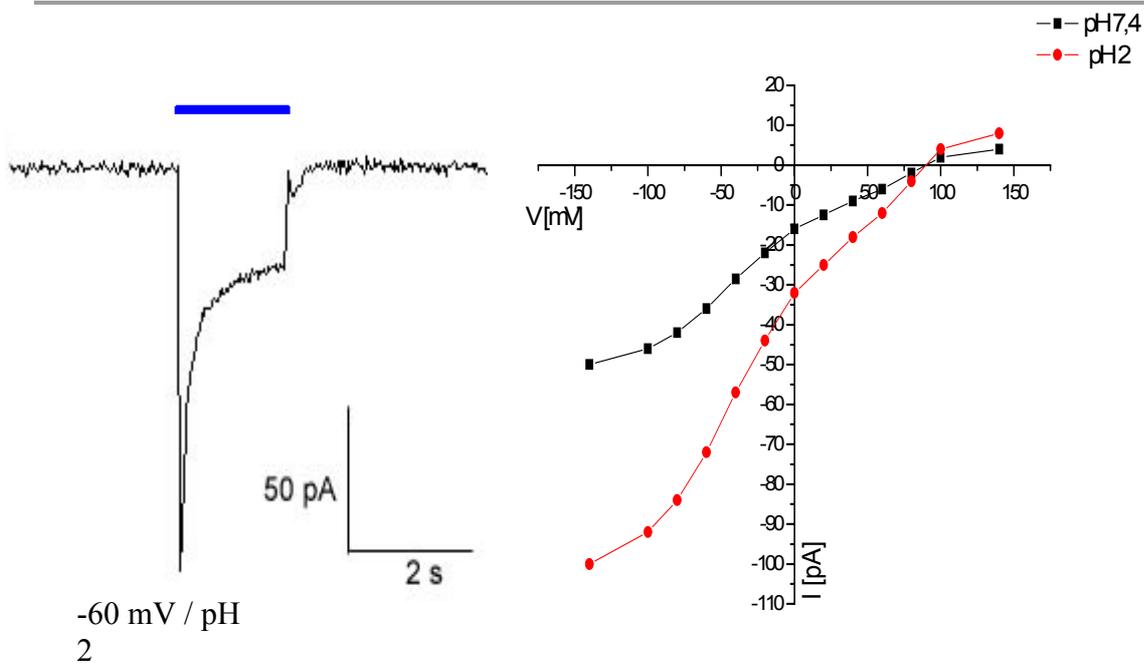


Abb. 51: a) Erhöhung des stationären Stroms bei niedrigem pH und negativer Spannung. b) Strom-Spannungskennlinie des stationären Stroms bei pH 7,4 und pH 2. Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Hepes in cis und trans sowie in den Proteoliposomen. Gradient erzeugt durch Zugabe von 100 μ l 4 M NaCl, 10 mM Hepes, 2mM CaCl_2 trans. Blauer Balken: Belichtungszeit 2 sec (XBO-Lampe).

Im Patch-Clamp konnte an HEK293-Zellen, die Chr2-315-YFP exprimieren, gezeigt werden, dass bei Belichtung mit blauem Licht (473 nm Laser) und zusätzlichem Einschalten von grünem Licht (540 nm XBO-Lampe) eine weitere Aktivierung des stationären Stroms erzielt werden kann. Dieser Versuch wurde daraufhin auch an der BLM durchgeführt (Abb. 52). Die Messung erfolgte bei pH 4 und -60 mV Spannung. Sie bestätigt das mögliche Vorhandensein eines Intermediates im Wellenlängenbereich von 520-540 nm, das den Photozyklus ähnlich dem Zerfall des O-Zustandes bei BR „kurzschließt“ (siehe auch spektroskopische Daten S.90 und folgende) (Toth-Boconadi & Stoeckenius, 2003).

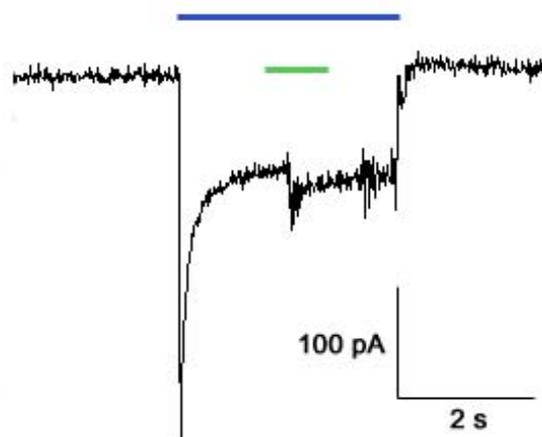


Abb. 52: Photostrom nach Doppelillumination mit blauem und grünem Licht. Blauer Balken: Belichtung mit einem 473 nm Laser für 4 sec. Grüner Balken: Belichtung bei 540 nm, XBO-Lampe nach 1 sec Blaulicht (Dauer 1 sec). Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 4, -60 mV Spannung.

Verhalten des stationären Stroms nach Zugabe der Ionophore 1799 und Monensin

Weiterhin interessant ist das Verhalten des stationären Stroms nach Zugabe von 1 μM 1799 (Protonophor) und 1 μM Monensin (Na^+/H^+ -Antiporter). Die Zugabe von Ionophoren zur Probe, führt, wie der Einbau auch, zu einer Entkopplung des elektrochemischen Gradienten der BLM-Membran und der daran angelagerten Proteoliposomen. Aus diesem Grund wird unter diesen Bedingungen ausschließlich ein aktiver Transport von Ladung beobachtet. Nach Zugabe der Entkoppler erhöht sich die Leitfähigkeit von $\sim 10^{-9}$ S/cm² auf $\sim 10^{-6}$ S/cm². Der stationäre Strom steigt auf nahezu 40 pA zu Beginn der Zugabe (Abb. 53a). Messungen bei verschiedenen Lichtintensitäten konnten zeigen, dass zu einem Großteil nur der transiente Strom von der Intensität des Lichtes abhängig ist (Abb. 53b).

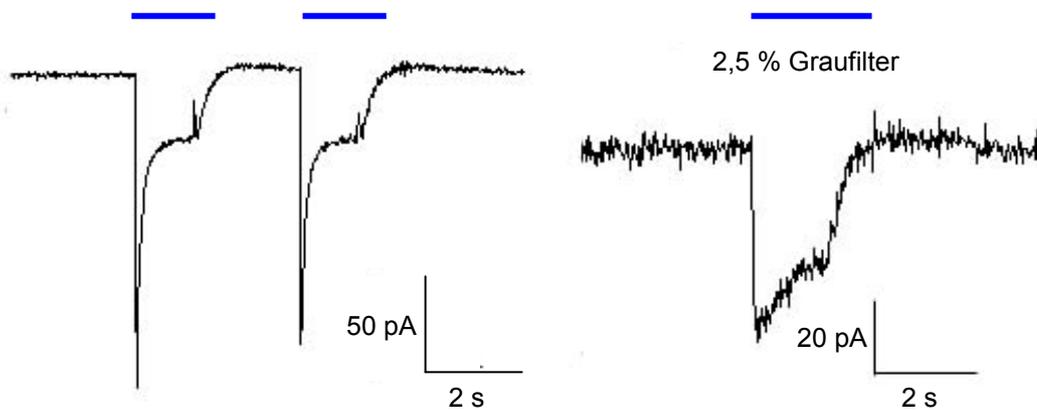


Abb. 53: a) **Stationärer Strom nach Zugabe von Ionophoren.** 1 μM 1799 und 1 μM Monensin wurden cis und trans zu den Kompartimenten dazugegeben. Blauer Balken entspricht 2 sec Belichtung (XBO-Lampe). b) **Verhalten des stationären Stroms bei 2,5% Lichtintensität.** Einsatz verschiedener Graufilter. Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Hepes, pH 7,4

Im Gegensatz zu Messungen ohne Ionophoren liegt das Umkehrpotential des stationären Stroms bei -30 mV. Der transiente Strom lässt sich zu keiner Zeit umkehren (Abb. 54 a und b).

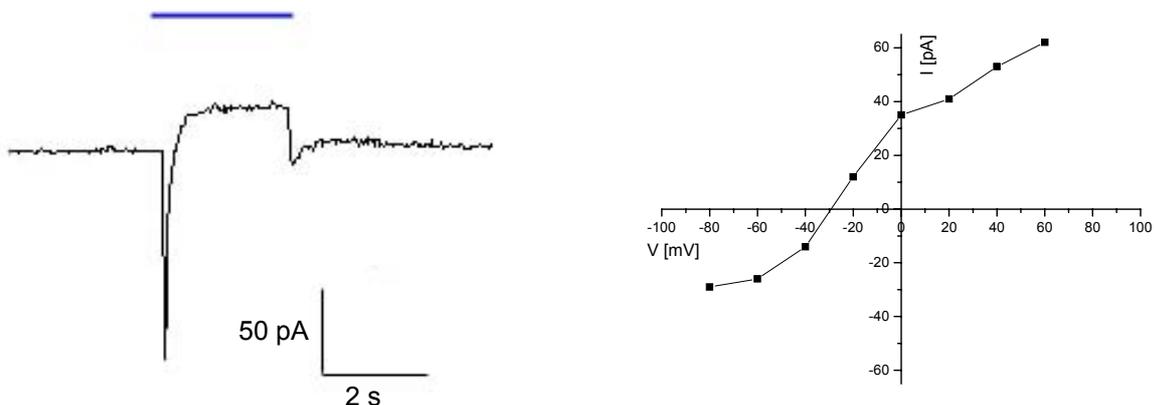


Abb. 54: a) **Der stationäre Strom kehrt bei -30 mV um.** b) **Strom-Spannungskennlinie des stationären Stroms.** Zugabe von 1 μM Monensin und 1 μM 1799. Belichtung (blau) 2 sec. Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7,4.

3.6 Untersuchungen der spektroskopischen Eigenschaften von ChR2

3.6.1 HPLC-Analyse der Retinalisomeren von ChR2

In einem Retinalextraktionsexperiment von Scherrer et al., 1989 konnte das Retinalisomerenverhältnis von BR bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass der Retinalchromophor im spektroskopischen Grundzustand als Gemisch von zwei Isomerisierungszuständen *13-cis* und *all-trans* vorliegt. In dieser Arbeit wurde nach gleichem Prinzip eine Extraktion des lichtadaptierten ChR2 mit anschließender HPLC-Analyse bei 365 nm und 4°C durchgeführt. Da die *cis*-Isomere des Retinals im Allgemeinen eine kleinere Oberfläche im Vergleich zur *all-trans* Konfiguration besitzen, eluieren diese schneller vom Säulenmaterial. Deshalb kann anhand der Retentionspeaks und ihrer Zeiten aus Abb. 57a geschlossen werden, dass sich der erste Elutionspeak aus *13-cis*-Retinal zusammensetzt und der größte Peak aus *all-trans*-Retinal. Dies ergibt ein Retinalisomerenverhältnis von 1:5 *13-cis/all-trans* Retinal. Bei dunkel adaptiertem ChR2 konnte mittels der HPLC nur *all-trans*-Retinal identifiziert werden (Abb. 55b).

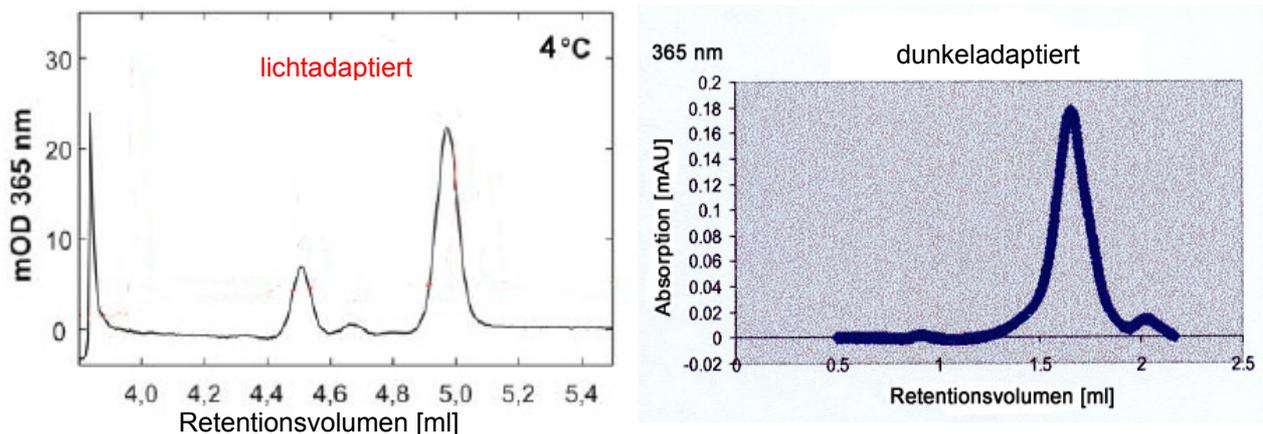


Abb. 55: a) Normalphasen HPLC-Chromatogramm der Retinalisomere von lichtadaptiertem und b) dunkeladaptiertem ChR2 nach organischer Lösungsmittlextraktion bei 4°C. Puffer: ChR2 in 100 mM NaCl, 10 mM HEPES in DOPC-Liposomen, pH 7,4.

3.6.2 Zeitaufgelöste Laser-Absorptionsmessungen von ChR2

Bevor zeitaufgelöste Laser-Absorptionsmessungen durchgeführt werden konnten, wurde zunächst von der verwendeten Probe ein Absorptionsspektrum, sowie ein Anregungsspektrum von ChR2 und YFP aufgezeichnet (Abb. 56 a und b). Das Anregungsspektrum in Abb. 56b wurde am Fluorimeter nach Abspaltung des YFP durch eine TEV-Protease durchgeführt. Sie lässt sich mit dem vorher gemachten ChR2-YFP-Absorptionsspektrum in Deckung bringen (YFP > 513 nm, ChR2 > 480 nm). Das YFP-Spektrum zeigt eine kleine Schulter bei 490 nm. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass ChR2 möglicherweise ein leicht verschobenes Absorptionsmaximum hat und dies bedingt durch YFP. Das ChR2-Anregungsspektrum zeigt deshalb ein Maximum bei ca 468 nm (Abb. 56b).

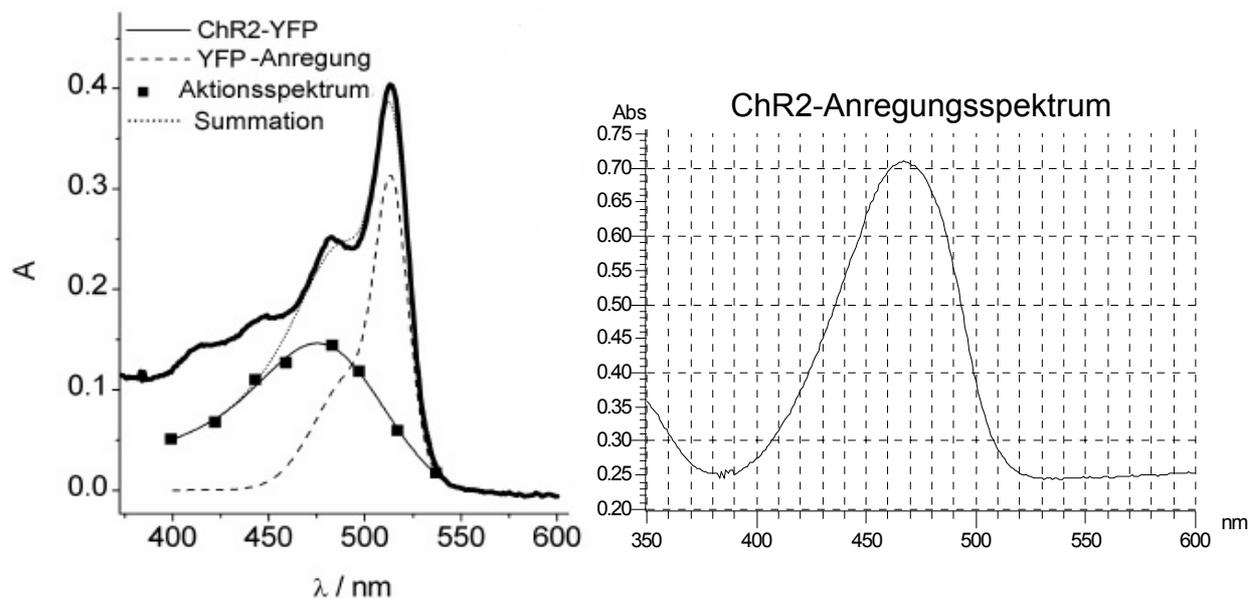


Abb. 56: a) **Summation der Spektren von ChR2-315-YFP aufgereinigt aus *Pichia pastoris*.** b) **Anregungsspektrum von ChR2-315 nach Abspaltung von YFP durch TEV-Protease.** b) Fluorimetermessung. Puffer: 100 mM NaCl, 20 mM HEPES, 0,2 % DM, pH7,4.

Die Laser-Blitzlicht-Photolyse bietet nun die Möglichkeit einzelne ChR2-Zustände und ihre jeweiligen Intermediate zu analysieren. Die nachfolgenden Messungen wurden mit Hilfe von Dr. Christian Bamann (MPI für Biophysik, Frankfurt) durchgeführt

Zunächst wurde der Grundzustand der ChR2-315-YFP-Probe mit einer $OD_{480\text{ nm}} = 0,25$ mit einem kurzen Laserpuls von 10 ns angeregt. Abb. 57a zeigt Messungen zur Absorptionsänderung bei zehn verschiedenen Wellenlängen (400 - 595 nm). Das Bleichen des

Grundzustandes wurde bis zu einer Wellenlänge von 400 nm verfolgt. Bei längeren Wellenlängen konnte die Formierung und der Zerfall eines spektral gesonderten Intermediats ausgemacht werden. Es liegt bei einer Wellenlänge von 541 nm (Abb. 57b). Die Formierung des Signalbeginns konnte durch die limitierende Zeitauflösung des Systems ($\sim 10 \mu\text{s}$) nicht beobachtet werden. Deshalb kann die Formierung besonders früher Intermediate im anfänglichen Mikrosekundenbereich nicht ausgeschlossen werden.

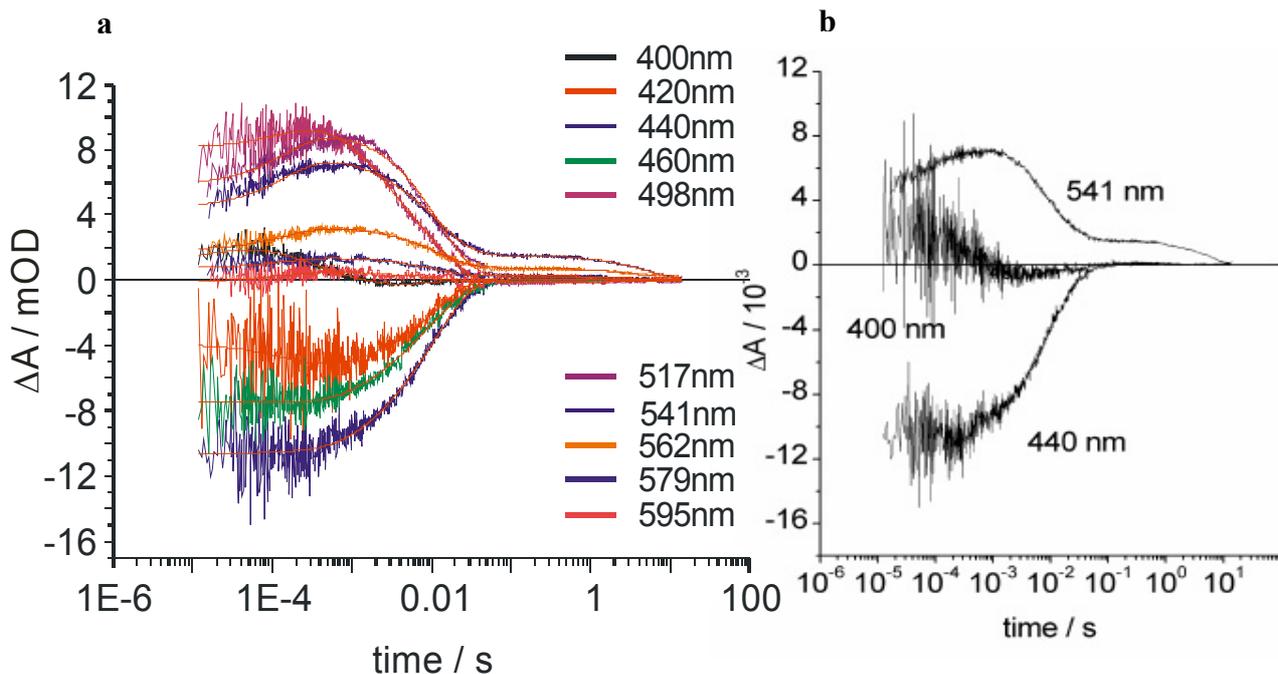


Abb. 57: a) **Absorptionskinetik von ChR2-315-YFP bei verschiedenen Wellenlängen.**

b) **Laser-Blitzlichtinduzierte Absorptionsänderungen.** Anregung bei 480 nm Excimer Farbstofflaser. Werte wurden 16-fach gemittelt. Die roten Linien in a) zeigen die kalkulierten Kurven aller zehn Wellenlängen nach Ermittlung durch einen globalen Fit.

Die Kinetik der spektralen Unterschiede wurde über einen globalen Fit aus allen Wellenlängensignalen ermittelt. Die darüber erhaltenen Daten liefern vier verschiedene Relaxationsprozesse, die sich zeitlich gut voneinander trennen lassen (58a). Die Information aus den Amplituden und Relaxationsratenkonstanten wurden weiterhin dazu benutzt, die Absorptionsänderungen bezüglich ihrer Intermediatekonzentration $P_i(t)$ und deren spektrale Differenz $\Delta\epsilon_i$ in Relation zum Grundzustand zu setzen (58b). Dabei wurde ein lineares Modell mit irreversiblen Schritten angefertigt, welches eine Anordnung abnehmender Relaxationsratenkonstanten beinhaltet (Abb. 60). Dies liefert die exakte Lösung im Hinblick auf die Zeitabhängigkeit der Intermediate. Hierbei sind die Ratenkonstanten der Übergänge von einem Intermediat zum nächsten, mit den Relaxationsratenkonstanten der globalen „Fit-Routine“ gleichzusetzen. Wie aus dem Zeitverlauf der Absorptionsdaten zu erkennen ist, umspannt das Auftreten der Intermediate acht Größenordnungen in der Zeit und reicht bis in

den Sekundenbereich hinein (Abb. 58b). Der Grund hierfür ist die langsame Relaxation von Intermediat P4 zum Grundzustand.

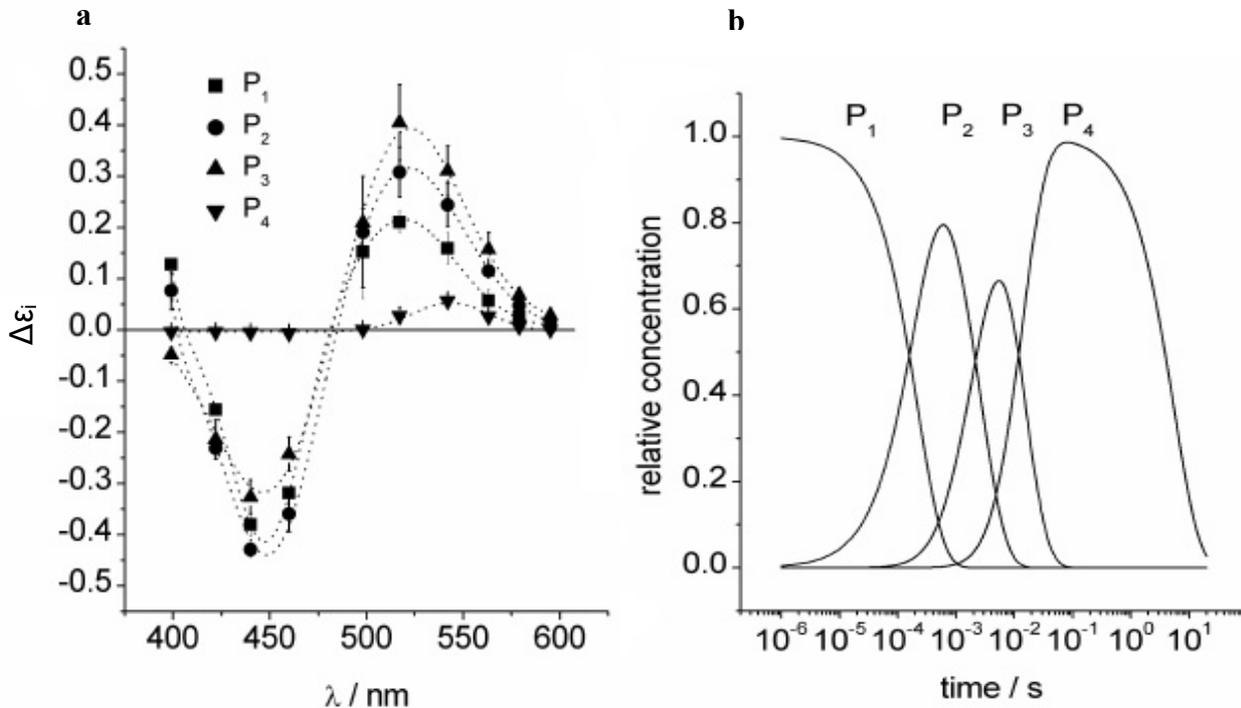


Abb. 58: a) **Relative spektrale Veränderungen des Grundzustands.** b) **Relative Konzentration der Intermediate in Anlehnung an ein lineares Model.** Die Daten wurden aus drei verschiedenen Messungen mit drei verschiedenen Proben erhoben.

Das Differenzspektrum in Abb. 58a zeigt deutlich die spektralen Unterschiede der Intermediate verglichen mit dem Grundzustand. Die ersten drei Intermediate haben eine ähnliche Charakteristik mit einem Wellental um 450 nm und einem Peak bei 520 nm. Sie überlagern sich zu einer einzelnen Spezies, die gegenüber dem Grundzustand von ChR2 rotverschoben ist. Obwohl vier Relaxationszeiten nötig sind, um den Zeitverlauf der Absorptionsänderung zu beschreiben, gibt es nur eine Spezies mit einem unterschiedlichen visuellen Spektrum bei 540 nm. Eben solche spektroskopisch nicht sichtbaren Übergänge einiger Intermediate („spectrally silent“) wurden bereits für Bacteriorhodopsin beschrieben (Chizhov & Hess, 1996). Nichtsdestotrotz sind kleine Veränderungen der Intermediate bezüglich ihrer $\Delta\epsilon_i$ Größenordnung erkennbar.

Diese spektroskopischen Daten ermöglichen nun im Einklang mit den elektrophysiologischen Ergebnissen eine Identifikation der funktionellen Zustände von ChR2. Korreliert man den Zeitverlauf der spektralen Intermediate mit den Kanalcharakteristiken wie Offen-Zustand und Geschlossen-Zustand, so ergeben sich folgende Kanalzustände und Zeiten. Der Kanal öffnet mit einer Zeitkonstante von 200 μs und schließt mit einer Relaxationszeit von ~ 10 ms. Des Weiteren zeigt ein Vergleich der Intermediate P2 und P3 mit einer Patch-Clamp-Messung des Offen-Zustands bei 480 nm, sowie anschließende Summierung dieser Intermediate, dass beide Zustände zur Kationenleitfähigkeit des Kanals beitragen (Abb. 59). Daraus lässt sich ein Kanalzustandsmodell mit vier Zuständen ableiten (Abb. 60). P_0 ist der geschlossen-anregbare Zustand von ChR2. Nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 480 nm folgen die frühen möglichen Intermediate M, N (540 nm und dem N-Zustand bei BR ähnlich) bzw. O (dem Zustand von pSR11). ChR2 befindet sich damit im angeregten Zustand P_1 (200 μs). Es folgen die Offen-Zustände P2 und P3, die die Kationenleitfähigkeit ermöglichen. Der abschließende Zustand P_4 stellt den offenen, aber nicht mehr anregbaren Zustand dar und ist der limitierende Schritt des Zyklus (Relaxation von 10 ms und mehr).

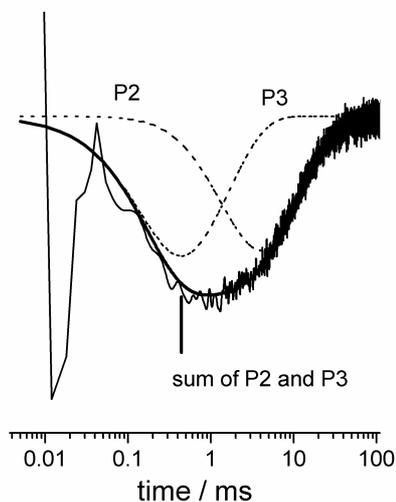


Abb.59: Vergleich des Photostroms bei -20 mV Haltepotential mit der relativen Intermediatekonzentration der Zustände P2 und P3. Intermediate sind Abb. 61b zu entnehmen. Der Strom wurde 10 kHz Lowpass gefiltert.

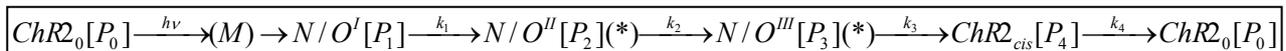


Abb. 60: 4-Zustands-Modell der ChR2 Kanalcharakteristik.

Absorptionskinetik der ChR2-Mutante H134R

Zum Abschluss wurde ein Vergleich der Absorptionskinetik von ChR2-315-T-YFP-His und der Mutante H134R durchgeführt. Es handelt sich, wie in den Versuchen zuvor, um aufgereinigtes Protein aus *Pichia pastoris* mit einer OD_{480} von 0,3.

Elektrophysiologische Messungen konnten bereits zeigen, dass die Mutante H134R einen größeren stationären Strom liefert. Anhand von Messungen der Absorptionskinetik sollten nun mögliche Unterschiede zum Wildtyp untersucht werden.

Es wurden zunächst die zwei spektral gesonderten Wellenlängen bei 460 nm und 517 nm betrachtet. In Abb. 62 ist zu erkennen, dass die Mutante H134R (460 nm > blau und 517 nm > türkis) eine Relaxationszeit von bis zu 100 ms erreicht. Der Wildtyp hat eine Relaxationszeit von nur 12 ms. Der rot umrandete Bereich stellt den Zerfall vom offenen Kanalzustand zum geschlossenen Zustand hin dar. τ_{Zerfall} ist dabei bei der Mutante H134R in den Bereich um mehrere 100-200 ms hin verschoben. Der Wildtyp hat eine Zerfallskonstante von $\tau = 20$ ms. Dies mag ein Grund für den erhöhten stationären Strom der Mutante sein.

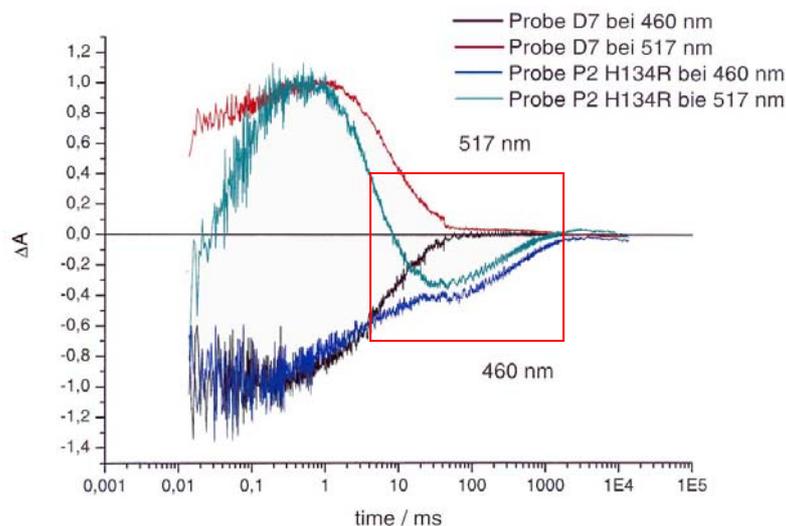


Abb. 62: **Vergleich der Absorptionskinetik von ChR2-315-YFP und der Mutante H134R.** Messungen wurden an der Laser-Blitzlicht-Photolyse durchgeführt. Puffer: 100 mM NaCl, 20 mM Hepes, 0,2% DM, pH 7,4. Schwarz und Rot: ChR2-YFP, Blau und Türkis: H134R.

4. Diskussion

4.1. Heterologe Expression von ChR2 und seine N-Glykosylierung

Die Reaktion archaebakterieller Organismen auf Lichtreize wird durch die Kombination zweier unterschiedlicher Signaltransduktionswege vermittelt. Die Verknüpfung der Lichtrezeption durch Photorezeptorproteine wie Rhodopsine, die ihre strukturelle Entsprechung bei eukaryontischen G-Proteinen finden, mit der Transduktion über prokaryontische Rezeptoren kann daher als allgemeines Modellsystem für transmembrane Signalgebung verstanden werden. Channelrhodopsin 2 als eukaryontischer, lichtgetriebener und kationenselektiver Ionenkanal stellt eine Besonderheit dar. Seine funktionelle Expression ist daher wichtig für die Erschließung neuer Informationen über die verschiedenen Signaltransduktionswege von Membranproteinen. Die Schwierigkeit, Membranproteine, und im Besonderen Photorezeptorproteine wie ChR2, in heterologen Expressionssystemen funktionell zu exprimieren, liegt in der korrekten Faltung des jeweiligen Proteins und in der ausreichenden Bindung des Chromophors Retinal begründet. ChR2 als eukaryontisches Protein aus der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist aus diesem Grund auf eine Expression in Eukaryonten angewiesen, da hier die notwendige posttranslationale Modifikation, wie die N-Glykosylierung, stattfinden kann. Für eukaryotische Zellen ist die so genannte N-Glykosylierung kennzeichnend. Sie beginnt an der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran, wo Schritt für Schritt zwei N-Acetylglucosamin- und fünf Mannose-Moleküle auf ein Dolicholphosphat übertragen werden Abb. 63(1). Ein noch nicht bekannter Mechanismus sorgt dafür, dass der ganze Komplex anschliessend in das Lumen des ER flippt Abb. 63(2), wo ihm vier weitere Mannose-Reste und zugleich auch noch drei Glucose-Moleküle hinzugefügt werden Abb. 63(3). Unter Freisetzung des Dolicholphosphats wird dann das Oligosaccharid 'en bloc' auf die Asparaginreste von Polypeptidketten, die im Begriff sind, sich zu einem Protein zu falten, übertragen Abb. 63(4). Während sich das Protein in die richtige Konformation faltet, werden die drei Glucose-Reste und ein Mannose-Molekül durch den Einsatz verschiedener Enzyme wieder entfernt Abb. 63(5, 6, 7). Das Glykoprotein wird darauf mittels Vesikeln in den Golgi-Apparat eingeschleust Abb. 63(8), wo es zusätzliche Veränderungen erfährt. Nochmals werden Mannose-Reste entfernt, dafür kommen schrittweise drei N-Acetylglucosamin-Moleküle dazu Abb. 63(9, 10, 11, 12). Abschliessend

wird der Komplex mit Hilfe verschiedener Enzyme mit einem Fucose-Molekül und drei Galaktose- und Sialinsäure-Moleküle vervollständigt Abb. 63(13, 14).

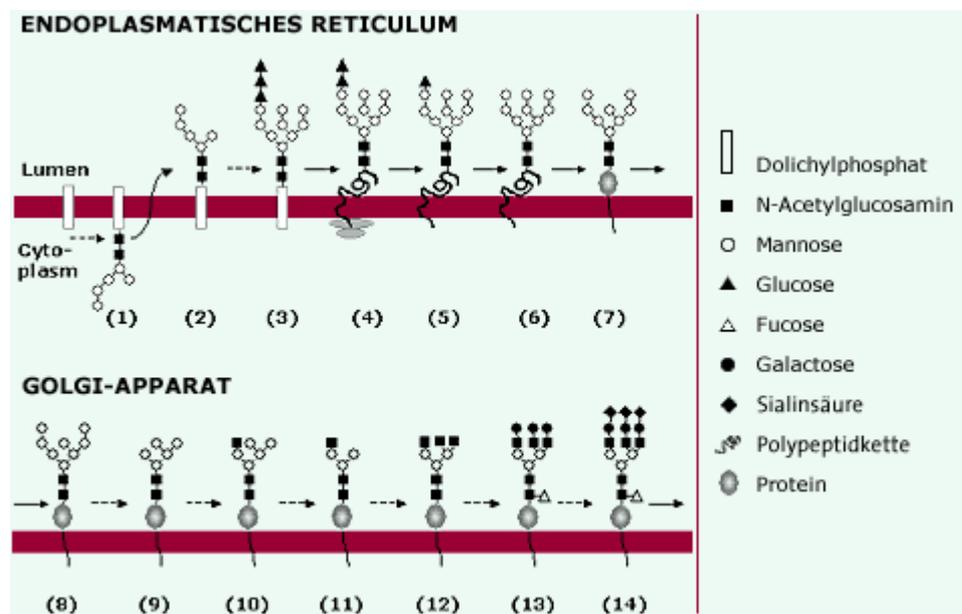


Abb. 63: Die **Biosynthese von Glykoproteinen am Beispiel der N-Glykosylierung**. Schritte 1-14 sind im Text erläutert.

Wie auf Seite 68 bereits gezeigt werden konnte, ist die N-Glykosylierung ein wichtiger Bestandteil der posttranslationalen Modifikation von Chr2. Ist diese vorsätzlich gestört, so z.B. durch Hinzugabe von PNGase F oder Tunicamycin oder aber auch einfach fehlend, durch Einsatz eines prokaryontischen Expressionssystems wie *E. coli*, führt dies zu einer fehlerhaften Faltung und damit zu keiner Insertion von Chr2 in die Plasmamembran.

Die Mechanismen einer korrekten Proteinfaltung sind bis heute noch teils ungeklärt. Fakt ist, dass eine korrekte Faltung stark durch Faktoren wie Temperatur, pH, Detergentien und Salze beeinflusst werden kann. Der Faltungsmechanismus vieler integraler Membranproteine ist ein komplexer Prozess, der enzymkatalysiert aber auch spontan ablaufen kann. Beide Prozesse finden in der Regel kotranslational statt, d.h. dass sich die wachsende Polypeptidkette, während sie am Ribosom synthetisiert wird, in die Membran faltet.

Ein weiterer nicht zu verkennender Punkt bei der heterologen Expression von Membranproteinen ist deshalb ihre Insertion in die Membran und damit ihre Expressionsrate. Oftmals liegt das Protein in so genannten „Inclusion Bodies“ vor und wird nicht in die Plasmamembran inseriert. Des Weiteren kann das Protein überwiegend im ER und Golgi-Apparat vorliegen. Um dies klären zu können, ist eine Membranpräparation mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation mittels eines Sucrosegradienten unabdingbar.

Aus diesem Grund wurde ChR2, wie in Kapitel 3.1 (S.58) beschrieben, zunächst in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und anschließend eine Membranpräparation mit Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Oozyten stellen neben *Pichia pastoris* ebenfalls ein einfaches eukaryontisches Expressionssystem dar, mit dem Vorteil der direkten Funktionsanalyse des Proteins über elektrophysiologische TEVC-Messungen (Zwei-Elektroden-Spannungsklemme). Sie eignen sich deshalb besonders als Etablierungssystem für neu zu exprimierende Proteine, wie ChR2, bei denen die Bedingungen zur erfolgreichen Expression noch völlig unklar waren. Da in unserem Labor zudem elektrophysiologische Daten über funktionelles ChR2, welches in Oozyten exprimiert wurde, vorlagen ((Nagel et al., 2003), war eine erste Abschätzung der Expressionsbedingungen in diesem Expressionssystem naheliegend.

Anhand der Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Antikörperdetektion im Western-Blot konnte gezeigt werden, dass ChR2 zwar zu einem Großteil in der Plasmamembran vorliegt, aber auch Golgi und ER nahezu 40 % der Expression ausmachen. Demnach sind bei ChR2 eine hohe Expressionsrate und damit optimale Expressionsparameter außerordentlich wichtig. Für die Expression in Oozyten wurde zusätzlich erstmalig ein ChR2-Fusionskonstrukt mit YFP getestet. Damit konnte das Expressionsniveau schon vor Durchführung aufwendiger Präparationen visuell bestimmt werden, da die Zellen grün fluoreszieren. Da aus Oozyten wenig ChR2 gewonnen werden kann, wurde das nächst höhere Expressionssystem gewählt. Kapitel 3.2 belegt, dass ChR2-315-YFP funktionell in HEK293-Zellen exprimiert werden kann. Hier konnte erstmalig ein Absorptionsspektrum von ChR2 aufgezeichnet werden. Es zeigt, dass ChR2 bei 480 nm absorbiert. Zusätzlich konnte an diesem Expressionssystem der eingangs erwähnte Glykosylierungstest entwickelt werden, der klar demonstriert, dass ChR2 glykosyliert wird. Eine Deglykosylierung resultiert auch hier in einer inaktiven ChR2-Form, die nicht mehr absorbiert. Das Protein wird nicht mehr in die Membran inseriert. Funktionsstudien an der BLM können dieses Resultat untermauern, da nur noch ein Photostrom von wenigen pA gemessen werden kann (S.79). Die Expression in HEK293-Zellen liefert demnach funktionelles Protein, jedoch ist auch hier die Ausbeute zu gering, um aufgereinigtes ChR2 elektrophysiologisch und absorptionskinetisch hinlänglich zu charakterisieren. Auch bei diesem Expressionssystem liegt der klare Vorteil in einer direkten Analyse funktioneller Eigenschaften mittels der Patch-Clamp-Technik. Zur Herstellung von isoliertem ChR2 ist es jedoch nach wie vor zeitintensiv, kostspielig und resultiert in einer zu geringen Proteinausbeute.

Zellfreie Expression von ChR2-315-YFP

Die zellfreie Proteinsynthese wurde 1964 von Holland J.J. & McCarthy B.J. beschrieben und von Zubay G. 1973 weiterentwickelt. Ausgehend von prokaryotischen oder eukaryotischen Zell-Lysaten, welche alle Komponenten des ribosomalen Translationsapparats besitzen, können Proteine mit einer RNA-Matrize oder im gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem mit DNA hergestellt werden. Grundsätzlich können aus jedem Organismus Extrakte für die zellfreie Synthese gewonnen werden. Kommerziell sind zellfreie Syntheseextrakte aus *E.coli*, Weizenkeimen oder Reticulozyten erhältlich (Abb.22, S.61). Neuerliche Publikationen haben zudem gezeigt, dass die zellfreie Synthese sich auch besonders für schwer zu exprimierende Membranproteine wie z.B. GPCRs eignet (Klammt et al., 2007). Aus diesem Grund sollte dieses System, trotz Verwendung von prokaryotischem Lysat, für die Expression von ChR2 getestet werden. Die Ergebnisse in Abbildung 24 (S.62) konnten darlegen, dass sich ChR2 mit dieser Methode im mg-Bereich exprimieren lässt. Eine Funktionalität konnte jedoch nur in der Kontrolle mit Bacteriorhodopsin nachgewiesen werden, was die grundsätzlich korrekte Handhabung und Verwendung der Materialien nahelegt. Deshalb wurde anschließend ein modifizierter zellfreier Syntheseansatz gewählt. Dem Feeding-Kompartiment wurden 1 μM *all-trans* Retinal, 4 mg/ml DOPC-Liposomen und verschiedene Detergentien entsprechend ihrer CMC hinzugefügt. Dennoch konnte kein funktionelles ChR2 gewonnen werden. Es muss deshalb geschlossen werden, dass aufgrund der fehlenden posttranslationalen Modifikation durch die jeweiligen Lysate keine korrekte Faltung des Proteins stattgefunden hat. Vermutlich ist auch die *all-trans*-Retinal-Bindung gestört. Die Schwierigkeit der *in vitro* Expression besteht demnach darin, dass sich das Genprodukt spontan in die Membran faltet. Der Mechanismus der spontanen Faltung eines integralen Membranproteins in eine hydrophobe Umgebung verläuft dabei über zwei Stufen (Huang & Khorana, 1981). Ist diese gestört, kommt es, wie in dieser Arbeit geschehen, zur Aggregation des Proteins, welches anhand der Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden konnte (Bilder nicht gezeigt).

4.2 Expression von ChR2-315-TEV-YFP-His in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris*

Hefen bieten als Wirtsorganismen für die Überexpression rekombinanter Proteine wesentliche Vorteile: Die Kultivierung von Hefen ist in der Regel einfach. Sie stellen im Vergleich zu Zelllinien höherer Organismen geringe Ansprüche an das Medium und die Kultivierungsbedingungen. Des Weiteren lassen sich Hefen im Wesentlichen in Rührkessel-Bioreaktoren mit Standardausstattung kultivieren. Mit den Vorteilen der einfachen Handhabbarkeit eines Einzeller-Systems verbindet sich bei Hefen das Vorhandensein eines eukaryontischen Proteinsyntheseapparates. Hefen können die notwendigen Schritte zur korrekten posttranslationalen Modifizierung von Proteinen höherer Organismen durchführen. Dazu gehören proteolytische Prozessierung, Faltung, Bildung von Disulfidbrücken und Glykosylierung (Luo *et al.*, 1995; Eckart und Bussineau, 1996; Ikegaya *et al.*, 1997; Miele *et al.*, 1997; Lin Cereghino & Cregg, 1999; Markaryan *et al.*, 1999). Die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* hat in den letzten Jahren besondere Aufmerksamkeit als Expressionssystem erhalten, da sich auch schwer zu exprimierende Membranproteine wie GPCRs funktionell und mit einer hohen Konzentration exprimieren und über ein zusätzliches Sekretionssignal (α -Faktor) besonders erfolgreich in die Membran inserieren lassen (Andre & Reinhart, 2006). Die Ergebnisse auf S. 65 zeigen, dass ChR2 bereits nach 24h Expression in *Pichia pastoris* eine Expressionsrate von 90% erreicht. Abb. 29 auf Seite 66 belegt zudem die Funktionalität des exprimierten ChR2 anhand seiner spezifischen Absorption bei 480 nm. Auch nach der Aufreinigung mittels der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) blieb die Funktionalität erhalten. Tests mit verschiedenen Detergentien konnten zeigen, dass DM (n-decylmaltosid) das am besten geeignete Detergens zur Aufreinigung ist, da es die Stabilität des Proteins gewährleistet. Der anschließende Deglykosylierungstest lieferte den bereits erwähnten Beweis für die Notwendigkeit einer N-Glykosylierung für die Funktionalität und erfolgreiche Insertion von ChR2 in die Membran. Zudem konnte der Test belegen, dass *Pichia pastoris* in der Lage ist, die erforderliche Glykosylierung durchzuführen (S.68). Abb. 37b auf Seite 72 sowie das Anregungsspektrum von ChR2 auf Seite 88 (56b) beweisen zudem, dass sich YFP und His-tag problemlos von dem Protein entfernen lassen und das Protein dennoch seine Funktionalität behält. Dies geht jedoch mit einem hohen Verlust an isoliertem ChR2 einher, da trotz mehrfacher Modifizierung der Aufreinigungsbedingungen der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie

(IMAC) zur Entfernung des Tags und des YFP's auch bereits isoliertes ChR2 auf der Säule blieb.

Auch die Mutante H134R (homolog zu D96N in BR) lässt sich ohne weiteres in *Pichia pastoris* funktionell exprimieren und aufreinigen (S.69 und 70). Vergleicht man nun zusätzlich die Proteinmengen, die nach einer Aufreinigung vorliegen (Oozyten 100 µg/ml; HEK293 > 500 µg/ml- 1 mg/ml, aber sehr kostspielig und zeitaufwändig; zellfreie Synthese > kein funktionelles Protein; *Pichia pastoris* > 7 mg/ml aufgereinigtes Protein, beweist das *Pichia pastoris* Expressionssystem, dass es effizient funktionelles ChR2 in hoher Konzentration produzieren kann. Des Weiteren liegt das isolierte ChR2 so vor, dass durch weitere Erhöhung der Proteinausbeute erstmalig kristallographische Untersuchungen an ChR2 zur Strukturanalyse in Betracht gezogen werden können. (S. 72/73).

4.3 Ladungstransportmessungen von ChR2 an der BLM

Es konnte nun gezeigt werden, dass *Pichia pastoris* das geeignete Expressionssystem zur funktionellen Expression von ChR2 ist. Doch nicht nur die statischen Absorptionsmessungen haben die Funktionalität bestätigt. Bei ChR2 aus HEK293-Zellen konnten bereits die ersten BLM-Messungen mit Membranfragmenten durchgeführt werden (S.76-79). Doch erst mit Zymolyase behandelten Membranfragmenten und aufgereinigtem ChR2 aus *Pichia pastoris* wurden ausreichend große Ströme erzielt. Die Membranfragmente scheinen sich ähnlich wie bei BR mit der extrazellulären Seite an die BLM anzulagern. Dies resultiert in einem negativ transienten Signal, welches innerhalb weniger Millisekunden monoexponentiell auf die Grundlinie abfällt. Bei diesem Signal liegt nur eine pH-Abhängigkeit vor. Andere Kationen beeinflussen den Photostrom nicht. Der Photostrom folgt unmittelbar mit dem Lichtreiz. Sein Aktionsspektrum ist mit dem von vorangegangenen TEVC-Messungen identisch und zeigt ein Absorptionsmaximum bei 480 nm. Die Fusionierung von Proteoliposomen mit der BLM ermöglichte Messungen des stationären Stroms von ChR2 (S.83 und folgende). Dabei war es entscheidend, welches Lipid zur Vesikelherstellung verwendet wurde. Erst das ungesättigte C18:1 Phospholipid DOPC ermöglichte die Fusionierung von ChR2-Proteoliposomen mit der BLM (Abb.50). Für die erfolgreiche Insertion von ChR2 ist die Dicke der Lipiddoppelschicht von erheblicher Bedeutung. DOPC bildet eine Membrandicke von 27,1 Å aus und bildet damit eine dickere Schicht als andere Phospholipide (Nagle & Tristram-Nagle, 2000). So haben z.B. strukturelle Daten von BR gezeigt, dass BR in einer Lipidumgebung eine hydrophobe Dicke von 35 Å besitzt (Luecke et al., 1999). Geht man nun davon aus, dass ein

ähnlicher Fall bei ChR2 aufgrund seiner Homologie zu BR vorliegt, so ist auch hier eine dickere Lipidschicht von Vorteil. Aus diesem Grund wird ChR2 durch die dickere DOPC-Membran (siehe Formel unten) im Vergleich zu anderen Lipiden, wie z.B. POPE (5,32 nm), zusätzlich stabilisiert und die Insertion ermöglicht.

$$D_m = \frac{8,8542 \cdot 10^{-12} \frac{A \cdot s}{V \cdot m} \cdot 2 \cdot 10^{-6} m^2}{1,375 \cdot 10^{-9} \frac{A \cdot s}{V}} = 1,288 \cdot 10^{-8} m = 12,88 nm \text{ (für 1,5 \% DOPC in Dekan)}$$

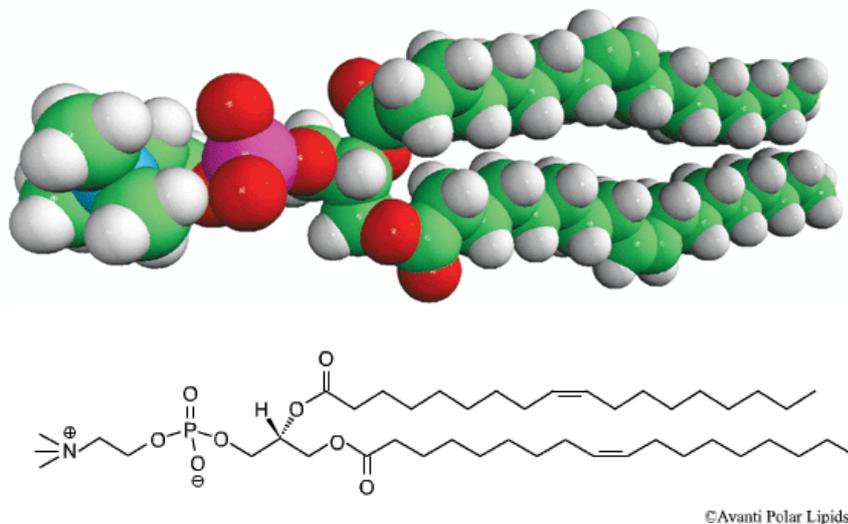


Abb. 64: **3D-Modell und Struktur des ungesättigten Phospholipids**

Nach erfolgreicher Fusionierung von ChR2 in die BLM konnten erstmalig stationäre Ströme gemessen werden. Ihr Verhalten und das des transienten Stroms entsprechen jedoch nicht den bisherigen Daten aus TEVC- und Patch-Clamp-Experimenten, da keine Einwärts-Gleichrichtung vorliegt. Auch das Umkehrpotential liegt nicht bei 0 mV. Der transiente Strom zeigt ein lineares Strom-Spannungsverhalten und kehrt sich nicht um. Dies ist auch bei der Mutante H134R der Fall (S.81) Der stationäre Strom kehrt sich beim Wildtyp hingegen bei 90 mV um (S.85), während er bei der Mutante H134R bei 20 mV umkehrt.

Bei pH-Veränderungen zeigen beide Ströme wieder ein identisches Verhalten. Wie in der Publikation von Nagel et al., 2003 beschrieben, zeigt ChR2 ein charakteristisches Verhalten bei Absenkung des „externen“ pH-Wertes. Bei niedrigen pH-Werten wird die „Recovery“ zum Grundzustand beschleunigt, was wiederum zu größeren Strömen führt. Dies legt die Protonierung einer oder mehrerer Aminosäuren nahe. Im Falle von BR wäre dies Aspartat 96. Synonym dazu in ChR2 ist dies Histidin H134 auf der Transmembrandomäne 3

(TM3). Die Mutante H134R zeigt sogar eine größere pH-Abhängigkeit, da hier das Histidin durch das noch stärker polare Arginin ausgetauscht wurde (S.82). Dies mag ein Indiz für die entsprechende Protonierung sein. Ein weiteres Merkmal der Mutante sind die größeren Spitzenströme (S.81). Dies ist vermutlich das Resultat eines verlängerten „Offen-Zustandes“ und kann durch die Absorptionskinetik auf Seite 92 bestätigt werden. Des Weiteren legt es die Vermutung nahe, dass die Aminosäuren der TM3 zur Ionenleitfähigkeit des Kanals beitragen.

Die Zeitkonstanten des Wildtyps und der Mutante H134R sind ebenfalls unterschiedlich. Der ChR2 Wildtyp-Kanal öffnet mit einer Zeitkonstante $\tau_1 = 200 \mu\text{s}$ und schließt mit einer Relaxationszeit von ca. 10 ms. Die Mutante schließt mit ca. 70 ms. Dies bestätigt zusätzlich den verlängerten „Offen-Zustand“ des Kanals.

Doppelilluminierung mit blauem und grünem Licht

Dass bei retinalen Proteinen, wie z.B. BR, einzelne Intermediate des Photozyklus eigenständige Photoreaktionen durchlaufen können, ist hinlänglich bekannt (Balashov & Ebry, 2001). Bereits 1977 stellten Ormos & Karvaly in umfassenden Experimenten fest, dass das M-Intermediat aus BR durch Absorption von blauem Licht in der Lage ist, den Photozyklus direkt in den Grundzustand zu überführen. Dabei fehlt jedoch der ansonsten stattfindende vektorielle Protonentransport. Dieses Phänomen wird als „Blaulicht-Effekt“ bezeichnet. Der Photozyklus wird quasi „kurzgeschlossen“. Im Falle von ChR2 konnte kein Blaulicht-Effekt festgestellt werden. Dies muss jedoch nicht das Fehlen eines M-Intermediats bedeuten. Viel mehr liegt der Aufbau und Zerfall des M-Intermediats in einem Zeitbereich unter $10 \mu\text{s}$, der über die in dieser Arbeit aufgeführten Methoden der BLM und Blitzlichtspektroskopie nicht aufgelöst werden konnte. Die Laser-Blitzlichtspektroskopie konnte jedoch ein spektral deutlich verschiedenes Intermediat im Wellenlängenbereich von 540 nm auflösen (S.89 und 90). Aus diesem Grund wurde ein Doppelilluminierungsversuch mit blauem (480 nm) und grünem (540 nm) Licht an der BLM durchgeführt (S.85). Wie in vorangegangenen Voltage-Clamp-Experimenten bereits gezeigt, konnte durch zusätzliche Illuminierung mit grünem Licht eine Erhöhung des stationären Stroms verzeichnet werden. Dies bestätigt das Vorhandensein des rotverschobenen Intermediats elektrophysiologisch. Des Weiteren zeigt der Versuch, dass ähnlich wie beim Blaulicht-Effekt bei BR, der Photozyklus kurzgeschlossen bzw beschleunigt werden kann.

4.4 Spektroskopische Eigenschaften von ChR2

Der spektroskopische Grundzustand von ChR2 liegt, wie die Resultate belegt haben, bei 480 nm (S.66 und S.88). Damit ist er dem Grundzustand von Sensorrhodopsin II (SRs II und pSR II) aus *Halobacterium salinarum* und *Natronobacter pharaonis* weitaus ähnlicher als dem von BR (Abb.65). Das gilt auch für die initiale *all-trans* zu *13-cis* Photoisomerisierung des Retinalchromophors. In Versuch 3.6.1 auf Seite 87 konnte gezeigt werden, dass sich ChR2 aus einem Retinalisomerenverhältnis von 1:5 *13-cis/all-trans* Retinal zusammensetzt.

Der Protonentransfer von der Schiff'schen Base (SB) zu ihrem Gegenion (D75, pSR II / D85, BR) verläuft bei pSR II innerhalb der ersten 100 Mikrosekunden, um den „M“-Zustand zu erzeugen (Engelhard *et al.*, 1996; Chizhov *et al.*, 1996). Durch die Deprotonierung der SB ist das Absorptionsmaximum zu etwa 390 nm hypsochrom verschoben. Simultan wird von einer komplexen Akzeptorgruppe ein Proton an das periplasmatische Medium abgegeben.

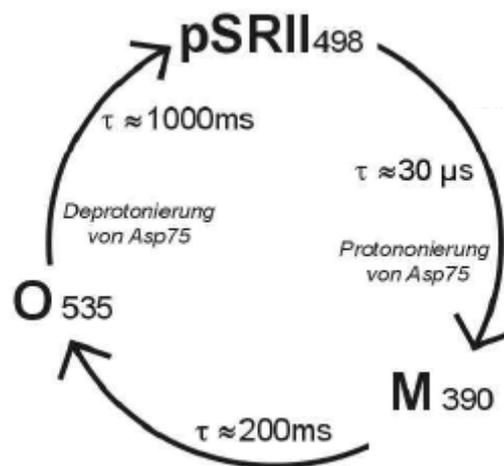


Abb.65: Vereinfachtes Modell des Photozyklus von pSR II mit den wesentlichen Schritten der Isomerisierungen des Chromophors und des Protonentransfers von Schiff'scher Base zur Gegenladung Asp75.

Betrachtet man Abbildung 57b auf Seite 89, so ist auch hier eine schnell zerfallende Spezies mit einer positiven Absorption bei 400 nm auszumachen. Dies mag ein Indikator für das M-Intermediat und damit für die Deprotonierung einer Schiff'schen Base sein.

Im starken Gegensatz zu BR ist der weitere Photozyklus des pSR II durch einen langlebigen „M“-Zustand (1ms-400 ms) stark verlangsamt und kehrt mit einer komplexen Kinetik über so genannte „N“- und „O“-Zustände innerhalb von Sekunden in den Grundzustand zurück (Chizhov *et al.*, 1998). Das Auftreten dieser Chromophorzustände ist indikativ für die

Reprotonierung der SB von der zytoplasmatischen Seite sowie für die nachfolgende Reisoomerisierung des Chromophors. Gleichzeitig wird die Gegenladung der SB regeneriert, indem das Proton von Asp75 an die oben erwähnte Akzeptorgruppe abgegeben wird. pSRII besitzt keinen Donor wie BR (D96), an dieser Stelle befindet sich ein Tyrosinrest. Dies erklärt die Langlebigkeit des M-Intermediats (Brown & Spudich, 2001).

Der mögliche Protonendonator der Schiff'schen Base liegt bei ChR2 an Stelle 134 und wird durch ein Histidin (H134) repräsentiert. Das aus der möglichen Deprotonierung stammende Proton wird bei ChR2 auf ein Glutamat an Stelle 123 übertragen (E123, Abb. 66). Dieser Akzeptor ist sowohl bei BR als auch bei pSRII ein Aspartat (D85/D75).

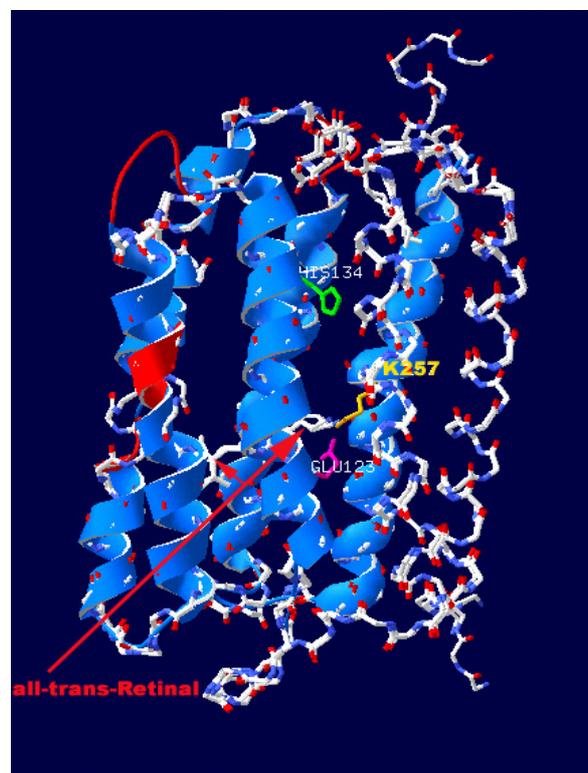


Abb. 66: **3D-Model von ChR2**. Hervorgehoben sind der Protonendonator H134 (Grün), der Protonenakzeptor E123(Magenta) und die Schiff'sche Base K257 (Gelb). Die Roten Pfeile markieren die Lage des Chromophors *all-trans*-Retinal

Kurz nach der Lichtanregung ist bei ChR2 ein rotverschobenes Intermediat bei 540 nm zu erkennen (S.89). An dieser Stelle des Photozyklus würde die Schiff'sche Base reprotoniert werden (Lanyi, 2004). Auch dies ist dem Zyklus von pSRII sehr ähnlich, da es dort mit dem O-Intermediat vergleichbar ist (siehe vorherige Seite). Bei BR wäre dies das sogenannte N-Intermediat, welches bei 530 nm absorbiert. Dies geht einher mit der Rückbildung des Grundzustandes und ist durch die Isomerisierung des Retinals und die Herstellung des ursprünglichen Protonierungszustandes determiniert. In einem von Spudich (1998)

vorgeschlagenen allgemeinen molekularen Modell für Photorezeptoren wird der Salzbrücke zwischen protonierter Schiff'scher Base und ihrer Gegenladung eine Schlüsselrolle zugesprochen. Der Mechanismus fordert, dass das Aufbrechen dieser Salzbrücke, die Helices G und C verknüpft, eine Auswärtsbewegung der F-Helix im frühen Photozyklus bewirkt. Simultan zum „O“-Zerfall wird die Gegenladung der reprotonierten Schiff'schen Base durch Deprotonierung von Asp75 bei pSRII, Asp85 bei BR und E123 bei ChR2 wiederhergestellt. Dabei ist bei pSRII der M-Zustand der Signalgebende, während bei ChR2 der Anstieg in der Leitfähigkeit nach der Reprotonierung der Schiff'schen Base beginnt.

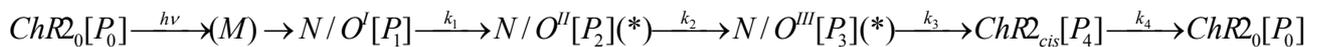
Betrachtet man nun die einzelnen „turnover“-Events auf Seite 90 (Abb. 58a) und korreliert die spektroskopischen Eigenschaften von ChR2 mit den Kanal-Charakteristika, so kristallisieren sich klar vier Intermediate heraus. Während die Photochemie des Retinals die Leitfähigkeit der Kationen triggert, ist der Prozess, der zur Selektivität und Permeabilität führt, weiter unbekannt. Im Gegensatz zum oben beschriebenen vektoriellen Transport der anderen Rhodopsine ist bei ChR2 das Retinal möglicherweise kein Teil der ionenleitenden Pore. Das Protein ist deshalb in der Lage strukturelle Unterschiede zu durchlaufen, die sich von den spektralen Veränderungen unterscheiden und möglicherweise den elektronischen Zustand des Chromophors stören. Die Öffnung des Kanals geht mit der Bildung der Spezies P2 einher. Die signifikanten Absorptionsänderungen sind zu diesem Zeitpunkt bereits vollzogen und durch den Vergleich von $\Delta\varepsilon_1$ und $\Delta\varepsilon_2$ ersichtlich (S.90, Abb. 58a) (Bamann et al, JMB 2007 in Press). Der Übergang von P₁ zu P₂ ist direkt mit dem „Offen-Zustand“ des Kanals verknüpft und birgt das N- bzw. O-Intermediat.

Verglichen mit den einzelnen „turnover“-Events ergibt sich bei stationären Lichtbedingungen ein weitaus komplizierteres Modell des Photozyklus von ChR2. Wie in der Publikation von Nagel et al., 2003 bereits beschrieben, kann stationäres Licht den Übergang der Spezies P4 zum Grundzustand drastisch beschleunigen. Dies mag einen „Zwei-Photonen-Prozess“ implizieren.

Der gesamte Photozyklus kann damit, wie im Doppelilluminierversuch auf Seite 85 gezeigt, durch zusätzliches Grünlicht kurzgeschlossen und womöglich beschleunigt werden. Spezies P3 geht somit direkt in den Grundzustand über und umläuft somit den kinetisch limitierenden Zustand P4. Nimmt man nun diese einzelnen „turnover“-Events zusammen, führt dies zu der Erhebung des nachfolgenden Photozyklus (Abb. 67).

4.5. Der Photozyklus von ChR2

Mit den vorliegenden Ergebnissen kann ein möglicher Photozyklus von ChR2 zusammengestellt werden (Abb.67). Spektroskopische Daten, die im Resultateteil dieser Arbeit näher erläutert wurden, konnten das bisher gängige Drei-Zustands-Modell (Nagel et al., 2003) zu einem Modell mit vier Zuständen erweitern. Dabei ist P_0 der „geschlossen-aktivierbare Zustand“, in dem das Retinal in der *all-trans*-Konformation vorliegt. Wird nun ein Photon absorbiert, geht der Kanal in wenigen μs ($< 200 \mu\text{s}$) über die *13-cis*-Isomerisierung des Retinals in einen „Offen-Zustand“ (P_1) über. Diesem folgen zwei kationenleitfähige Zustände (P_2 und P_3) im Bereich $< 1 \text{ ms}$. An dieser Stelle sind die signifikanten spektralen Unterschiede bereits durchlaufen worden (S.90). Das N/O Intermediat ist dabei für das Öffnen des Kanals verantwortlich. Im Zustand P_3 schließt sich ChR2 wieder. P_4 ist ein inaktiver und langlebiger Zustand, der den kinetisch limitierenden Faktor des Zyklus darstellt und spektral nicht vom Grundzustand zu unterscheiden ist. Der Übergang von P_4 zu P_0 kann unter stationären Lichtbedingungen durch ein weiteres Photon drastisch beschleunigt werden. Anschließend befindet sich der Kanal wieder in seiner Ausgangsposition, dem Grundzustand.



5. Zusammenfassung

Chlamydomonas reinhardtii ist eines der bekanntesten Modellsysteme der Forschung, um photo-, zell- und molekularbiologische Fragestellungen zu untersuchen. Die phototaktischen Reaktionen dieser einzelligen Grünalge werden durch mikrobielle Rhodopsine, sogenannte Photorezeptoren initiiert, deren Chromophor *all-trans*-Retinal ist. Eines dieser Rhodopsine ist Channelrhodopsin 2 (ChR2). Ein Sequenzvergleich mit anderen mikrobiellen Rhodopsinen aus Archaeobakterien, wie z.B. der lichtgetriebenen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin, zeigt eine Homologie von bis zu 20 %. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass die hydrophobe N-terminale Hälfte mit circa 300 von 737 Aminosäuren ebenso aus einem Siebentransmembranhelixmotiv besteht, wie dies für Rhodopsinmoleküle typisch ist.

Seit der Entdeckung 2003 durch Nagel *et al.* ist bekannt, dass es sich bei ChR2 um einen lichtgetriebenen, kationenselektiven Ionenkanal handelt, der in dieser Form bisher nicht bekannt war. Diese biophysikalische Charakteristik konnte durch detaillierte elektrophysiologische Daten erhoben werden. Sie lieferten zudem die Erkenntnis, dass ChR2 als „Werkzeug“ in der Neurobiologie verwendet werden kann, da die lichtinduzierte Depolarisation zum Feuern von Aktionspotentialen in ChR2-exprimierenden Neuronen führt. Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, die molekularen Mechanismen von ChR2 aufzuklären, indem elektrophysiologische, spektroskopische und biochemische Daten miteinander korreliert wurden. Dazu wurde ChR2 funktionell in der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* exprimiert. Ein Glykosylierungstest konnte belegen, dass *Pichia pastoris* in der Lage ist, die für ChR2 erforderliche N-Glykosylierung durchzuführen. Mit einer 90%igen Expression war es somit möglich, ausreichend Protein für eine Metallchelataffinitätschromatographie zu gewinnen. Weiterhin konnte die bestehende Funktionalität nach der Isolierung von ChR2 nachgewiesen werden. Dies erfolgte zum einen über Messungen des charakteristischen Photostroms mittels der BLM-Technik. Zum anderen konnte dies durch spektroskopische Messungen der spezifischen Absorption von ChR2 bei 480 nm bestätigt werden. Die zeitaufgelöste Laserblitzabsorptionsspektroskopie lieferte zudem Differenzspektren des isolierten ChR2, die erstmalig das Vorhandensein eines spektral verschiedenen Intermediats bei 540 nm zeigten. Zusammen mit dem Zeitverlauf aller vier korrespondierenden Intermediate und der Hinzunahme elektrophysiologischer Daten konnte somit ein linearer Photozyklus bestehend aus vier Zuständen erstellt werden (erstellt durch Dr. Christian Bamann). Die ersten drei Intermediate des Photozyklus P1-P3 werden demnach durch die rotverschobene Spezies beschrieben, mit einer Relaxationszeit von unter einer

Millisekunde. Dieses rote Intermediat spiegelt die Konformationsänderung des Retinals wider und geht mit dem Öffnen des Kanals einher. Die Zustände P2 und P3 konnten beide als kationenleitende Zustände identifiziert werden. Das Schließen des Kanals wird durch den Übergang von P3 zu P4 (spektral mit dem Grundzustand gleich) vermittelt. Das Zurückkehren in den Grundzustand folgt einem langsamen Prozess im Bereich von mehreren Sekunden. Biochemische, spektroskopische und elektrophysiologische Daten haben damit erfolgreich zur weiteren Aufklärung der molekularen Funktionsweise von ChR2 beigetragen. Mit diesen Ergebnissen ist nun die Erschließung neuer Informationen über die verschiedenen Signaltransduktionswege von Membranproteinen möglich.

6. Literaturverzeichnis

- André N, Cherouati N, Prual C, Steffan T, Zeder-Lutz G, Magnin T, Pattus F, Michel H, Wagner R, Reinhart C.**, (2006) Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Sci.* 2006 May;15(5):1115-26. Epub 2006 Apr 5.
- Attwood, T.K. & Findlay, J.B.**, (1994) Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* 1994 Feb; 7(2):195-203
- Babes A, Fendler K.**, (2000) Na(+) transport, and the E(1)P-E(2)P conformational transition of the Na(+)/K(+)-ATPase. *Biophys J.* Nov; 79(5): 2557-71.
- Balashov, S.P., Imasheva, E.S., Ebrey, T.G., Chen, N., Menick, D.R. & Crouch, R.K.** (1997). Glutamate-194 to cysteine mutation inhibits fast light-induced proton release in bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **36**, 8671-8676.
- Balashov SP, Ebrey TG.**, (2001) Trapping and spectroscopic identification of the photointermediates of bacteriorhodopsin at low temperatures. *Photochem Photobiol.* 2001 May;73(5):453-62.
- Bamberg,E., Apell,H.-J., Dencher,N.A., Sperling,W., Stieve,H., & Läger,P.** (1979) Photocurrents generated by bacteriorhodopsin on planar bilayer membranes. *Biophys. Struct. Mech.*, **5**, 277-292.
- Baylor, D.** (1996) How photons start vision. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jan 23;93(2):560-5. Review.
- Beckmann M, Hegemann P.**, (1990) In vitro identification of rhodopsin in the green alga *Chlamydomonas*. *Biochemistry.* 1991 Apr 16;30(15):3692-7.
- Birnbaumer, L.; Brown, A.M.**, (1990) G proteins and the mechanism of action of hormones, neurotransmitters, and autocrine and paracrine regulatory factors. *Am Rev Respir Dis.* 1990 Mar;141(3 Pt 2):S106-14
- Blaurock, A.E. & Stoeckenius, W.**, (1971) Structure of the purple membrane. *Nat New Biol.* 1971 Sep 29;233(39):152-5
- Bogomolni, R.A. & Spudich, J.L.**, (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Oct;79(20):6250-4.
- Braiman M, Mathies R.**, (1982) Resonance Raman spectra of bacteriorhodopsin's primary photoproduct: evidence for a distorted 13-cis retinal chromophore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Jan;79(2):403-7
- Brankamp, R. G., Sreekrishna, K., Smith, P. L., Blankenship, D. T., Cardin, A. D.** (1995). Expression of a synthetic gene encoding the anticoagulant- antimetastatic protein ghilanten by the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, **6**, 813-820.
- Brown LS, Dioumaev AK, Lanyi JK, Spudich EN, Spudich JL.**, (2001) Photochemical reaction cycle and proton transfers in *Neurospora* rhodopsin. *J Biol Chem.* 2001 Aug 31;276(35):32495-505. Epub 2001 Jul 2
- Buck, L.; Axel, R.**, (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell.* 1991 Apr 5;65(1):175-87
- Buckholz RG, Gleeson MA.**, (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology (N Y).* 1991 Nov;9(11):1067-72.
- Bullough PA, Henderson R.**, (1999) The projection structure of the low temperature K intermediate of the bacteriorhodopsin photocycle determined by electron diffraction. *J Mol Biol.* 1999 Mar 12;286(5):1663-71.

- Burns, M.E. & Baylor, D.A.**, (2001) Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:779-805
- Chizhov I, Schmies G, Seidel R, Sydor JR, Lüttenberg B, Engelhard M.**, (1998) The photophobic receptor from *Natronobacterium pharaonis*: temperature and pH dependencies of the photocycle of sensory rhodopsin II. *Biophys J.* 1998 Aug;75(2):999-1009.
- Chizhov,I., Chernavskii,D.S., Engelhard,M., Mueller,K.H., Zubov,B.V., & Hess,B.** (1996) Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.*, **71**, 2329-2345.
- Clare, J. J., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Sreekrishna, K., Romanos, M. A.** (1991a). High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *BIO/TECHNOLOGY*, **9**, 455-460.
- Clare, J. J., Romanos, M. A.** (1995). Expression of cloned genes in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Methods Mol Cell Biol*, **5**, 319-329.
- Clare, J. J., Romanos, M. A.** (1995). Expression of cloned genes in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Methods Mol Cell Biol*, **5**, 319-329.
- Clare, J. J., Romanos, M. A., Rayment, F. B., Rowedder, J. E., Smith, M. A., Payne, M. M., Sreekrishna, K., Henwood, C. A.** (1991b). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, **105**, 205-212.
- Couderc, R., Baratti, J.** (1980). Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agric Biol Chem*, **44**, 2279-2289.
- Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P., Stillman, C. A.** (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*, **9**, 1316-1323.
- Cregg, J. M., Tschopp, J. F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, W., Craig, W. S., Buckholz, R. G., Madden, K. R., Kellaris, P. A., Davis, G. R., Smiley, B. L.** (1987). High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *BIO/TECHNOLOGY*, **5**, 479-485.
- Dieckmann, C.L.**, (2003) Eyespot placement and assembly in the green alga *Chlamydomonas*. *Bioessays*. 2003 Apr;25(4):410-6.
- Digan, M. E., Lair, S. V., Brierley, R. A., Siegel, R. S., Williams, M. E., Ellis, S. B., Kellaris, P. A., Provow, S. A., Craig, W. S., Velicelebi, G., Harpold, M. M.** (1989). Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast, *Pichia pastoris*. *BIO/TECHNOLOGY*, **7**, 160-164.
- Doig AJ, Williams DH.**, (1991) Is the hydrophobic effect stabilizing or destabilizing in proteins? The contribution of disulphide bonds to protein stability. *J Mol Biol.* 1991 Jan 20;217(2):389-98
- Ebnet E, Fischer M, Deininger W, Hegemann P.**, (1999) Volvoxrhodopsin, a light-regulated sensory photoreceptor of the spheroidal green alga *Volvox carteri*. *Plant Cell.* 1999 Aug;11(8):1473-84.
- Eckart, M. R., Bussineau, C. M.** (1996). Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr Opin Biotechnol*, **7**, 525-530.
- Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., F., W. A., Harpold, M. M., R., G. T.** (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*, **5**, 1111-1121.
- Engelhard M, Scharf B, Siebert F.**, (1996) Protonation changes during the photocycle of sensory rhodopsin II from *Natronobacterium pharaonis*. *FEBS Lett.* 1996 Oct 21;395(2-3):195-8.

- Essen, L.O. & Oesterhelt, D.**, (1998) A cold break for photoreceptors. *Nature*. 1998 Mar 12;392(6672):131, 133.
- Essen, L.O, Siegert, R., Lehmann, W.D. & Oesterhelt, D.** (1998). Lipid patches in membrane protein oligomers - crystal structure of the bacteriorhodopsinlipid complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**, 11673-11678.
- Fahr, A., Läuger, P. & Bamberg, E.** (1981). Photocurrent kinetics of purplemembrane sheets bound to planar bilayer membranes. *J.Membr.Biol.* **60**, 51-62.
- Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y.**, (2001) Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev.* 2001 Jan;81(1):117-151
- Fierobe, H. P., Mirgorodskaya, E., Frandsen, T. P., Roepstorff, P., Svensson, B.** (1997). Overexpression and characterization of *Aspergillus awamori* wild-type and mutant glucoamylase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: comparison with wild-type recombinant glucoamylase produced using *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* as hosts. *Protein Expr Purif*, **9**, 159-170.
- Foster KW, Saranak J, Patel N, Zarilli G, Okabe M, Kline T, Nakanishi K.**, (1984) A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*.
- Freyre, F. M., Vazquez, J. E., Ayala, M., Canaan-Haden, L., Bell, H., Rodriguez, I., Gonzalez, A., Cintado, A., Gavilondo, J. V.** (2000). Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*; **76**, 157-63.
- Fuhrmann M, Stahlberg A, Govorunova E, Rank S, Hegemann P.**, (2001) The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *J Cell Sci.* 2001 Nov;114(Pt 21):3857-63.
- Gärtner, W.** (2000). Invertebrate visual pigments., Vol 3 (Amsterdam, Elsevier).
- Gartner, W., and Losi, A.** (2003). Crossing the borders: archaeal rhodopsins go bacterial.
- Gellissen, G., Hollenberg, C. P.** (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* -- a review. *Gene*, **190**, 87-97.
- Gellissen, G., Hollenberg, C. P.** (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* -- a review. *Gene*, **190**, 87-97.
- Govorunova EG, Jung KH, Sineshchekov OA, Spudich JL** (2004) *Chlamydomonas* Sensory Rhodopsin A and B: cellular content and role in photophobic responses. *Biophys J.* Apr.; 86(4): 2342-9
- Gulik-Krzywicki T, Seigneuret M, Rigaud JL.**, (1987) Monomer-oligomer equilibrium of bacteriorhodopsin in reconstituted proteoliposomes. A freeze-fracture electron microscope study. *J Biol Chem.* 1987 Nov 15;262(32):15580-8.
- Han, Y., Lei, X. G.** (1999). Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys*, **364**, 83-90.
- Hardie, R.C. & Rhaghu, P.**, (2001) Visual transduction in *Drosophila*. *Nature*. 2001 Sep 13;413(6852):186-93. Review.
- Hardie, R.C.**, (2001) Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol.* 2001 Oct;204(Pt 20):3403-9. Review
- Hargrave, P.A. & McDowell, J.H.**, (1992) Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB J.* 1992 Mar;6(6):2323-31

- Hargrave, P.A.; Hamm, H.E.; Hoffmann, K.P.**, (1993) Interaction of rhodopsin with the G-protein, transducin. *Bioessays*. 1993 Jan;15(1):43-50. Review
- Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Bona, R., Rumbold, K., Luckl, J., Griengl, H., Kohlwein, S. D., Schwab, H.** (1997). High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr Purif*, **11**, 61-71.
- Haupts U, Haupts C, Oesterhelt D.**, (1995) The photoreceptor sensory rhodopsin I as a two-photon-driven proton pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 25;92(9):3834-8
- Haupts U, Tittor J, Bamberg E, Oesterhelt D.**, (1997) General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: the isomerization/switch/transfer (IST) model. *Biochemistry*. 1997 Jan 7;36(1):2-7
- Haupts U, Tittor J, Oesterhelt D.** (1999) Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1999;28:367-99
- Havelka WA, Henderson R, Heymann JA, Oesterhelt D.**, (1993). Projection structure of halorhodopsin from *Halobacterium halobium* at 6 Å resolution obtained by electron cryo-microscopy. *J Mol Biol*. 1993 Dec 5;234(3):837-46
- Heimo, H., Palmu, K., Suominen, I.** (1997). Expression in *Pichia pastoris* and purification of *Aspergillus awamori* glucoamylase catalytic domain. *Protein Expr Purif*, **10**, 70-79.
- Hellwig, S., Robin, F., Drossard, J., Raven, N. P., Vaquero-Martin, C., Shively, J. E., Fischer, R.** (1999). Production of carcinoembryonic antigen (CEA) N-A3 domain in *Pichia pastoris* by fermentation. *Biotechnol Appl Biochem*, **30**, 267-275.
- Henderson R, Unwin PN.**, (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*. 1975 Sep 4;257(5521):28-32
- Henry, A., Masters, C. L., Beyreuther, K., Cappai, R.** (1997). Expression of human amyloid precursor protein ectodomains in *Pichia pastoris*: analysis of culture conditions, purification, and characterization. *Protein Expr Purif*, **10**, 283-291.
- Heymann JA, Havelka WA, Oesterhelt D.**, (1993) Homologous overexpression of a light-driven anion pump in an archaebacterium. *Mol Microbiol*. 1993 Feb;7(4):623-30
- Higgins, D. R., Cregg, J. M.** (1998). Introduction to *Pichia pastoris*. In: *Pichia Protocols*, D. R. Higgins, J.M. Cregg, eds. Humana Press, Totowa, NJ, 1-15.
- Hisatomi, O. & Tokunaga, F.**, (2002) Molecular evolution of proteins involved in vertebrate phototransduction. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2002 Dec;133(4):509-22. Review
- Holland JJ, McCarthy BJ.** (1964) Stimulation of Protein Synthesis in vitro by denaturated DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964 Dec;52:1554-61.
- Holmquist, M., Tessier, D. C., Cygler, M.** (1997). High-level production of recombinant *Geotrichum candidum* lipases in yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, **11**, 35-40.
- Huang KS, Bayley H, Liao MJ, London E, Khorana HG.**, (1981) Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. *J Biol Chem*. 1981 Apr 25;256(8):3802-9
- Ikegaya, K., Hirose, M., Ohmura, T., Nokihara, K.** (1997). Complete determination of disulfide forms of purified recombinant human serum albumin, secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Anal Chem*, **69**, 1986-1991.
- Juge, N., Andersen, J. S., Tull, D., Roepstorff, P., Svensson, B.** (1996). Overexpression, purification, and characterization of recombinant barley alpha-amylases 1 and 2 secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, **8**, 204-214.

- Juge, N., Andersen, J. S., Tull, D., Roepstorff, P., Svensson, B.** (1996). Overexpression, purification, and characterization of recombinant barley alpha-amylases 1 and 2 secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, **8**, 204-214.
- Kalmbach, R.; Chizhov, I; Schumacher, M. C., Friedrich, T; Bamberg, E & Engelhard, M.** (2007). Functional Cell-free Synthesis of a Seven Helix Membrane Protein: In situ Insertion of Bacteriorhodopsin into Liposomes. *J. Mol. Biol.* (2007) 371, 639–648
- Karplus M, Weaver DL.**, (1994) Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data. *Protein Sci.* 1994 Apr;3(4):650-68.
- Katakura, Y., Zhang, W., Zhuang, G., Omasa, T., Kishimoto, M., Goto, Y., Suga, K.** (1998). Effect of methanol concentration on the production of human β -glycoprotein Domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J Ferm Bioeng*, **86**, 482-487.
- Kateriya S, Nagel G, Bamberg E, Hegemann P.**, (2004) "Vision" in single-celled algae. *News Physiol Sci.* 2004 Jun;19:133-7.
- Ketterer b, Neumcke B & Lauser P.**, (1971) Transport Mechanism of Hydrophobic Ions through Lipid Bilayer Membranes
- Kim, T. R., Goto, Y., Hirota, N., Kuwata, K., Denton, H., Wu, S. Y., Sawyer, L., Batt, C. A.** (1997). Highlevel expression of bovine beta-lactoglobulin in *Pichia pastoris* and characterization of its physical properties. *Protein Eng*, **10**, 1339-1345.
- Klammt C, Schwarz D, Dotsch V, Bernhard F.**, (2007) Cell-free production of integral membrane proteins on a preparative scale. *Methods Mol Biol.* 2007;375:57-78.
- Klammt C, Schwarz D, Eifler N, Engel A, Piehler J, Haase W, Hahn S, Dotsch V, Bernhard F.**, (2007) Cell-free production of G protein-coupled receptors for functional and structural studies. *J Struct Biol.* 2007 Jun;158(3):482-93. Epub 2007 Jan 23.
- Kolbe M, Besir H, Essen LO, Oesterhelt D** , (2000) Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8  resolution. *Science.* 2000 May 26;288(5470):1390-6
- Kunji ER, von Gronau S, Oesterhelt D, Henderson R.**, (2000) The three-dimensional structure of halorhodopsin to 5  by electron crystallography: A new unbending procedure for two-dimensional crystals by using a global reference structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 25;97(9):4637-42
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lanyi JK.**, (2004) Bacteriorhodopsin. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:665-88
- Lanyi JK.**, (2004) X-ray diffraction of bacteriorhodopsin photocycle intermediates. *Mol Membr Biol.* 2004 May-Jun;21(3):143-50.
- Lanyi, J.K.**, (1999) Progress toward an explicit mechanistic model for the light-driven pump, bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* 1999 Dec 31;464(3):103-7.
- Laroche, Y., Storme, V., De Meutter, J., Messens, J., Lauwereys, M.** (1994). High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)*, **12**, 1119-1124.
- Lin Cereghino, G. P., Cregg, J. M.** (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotechnol*, **10**, 422-427.
- Loewen, M. C., Liu, X., Davies, P. L., Daugulis, A. J.** (1997). Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **48**, 480-486.

- Lu, Q., Bauer, J. C., Greener, A.** (1997). Using *Schizosaccharomyces pombe* as a host for expression and purification of eukaryotic proteins. *Gene*, **200**, 135-144.
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailier, J.P. & Lanyi, J.K.** (1999a). Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Ångstrom resolution. *J.Mol.Biol.* **291**, 899-911.
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailier, J.P. & Lanyi, J.K.** (1999b). Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 Ångstrom resolution. *Science* **286**, 255-261.
- Luecke H, Richter HT, Lanyi JK.,** (1998) Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution. *Science*. 1998 Jun 19;280(5371):1934-7.
- Luecke H, Schobert B, Cartailier JP, Richter HT, Rosengarth A, Needleman R, Lanyi JK.,** (2000) Coupling photoisomerization of retinal to directional transport in bacteriorhodopsin. *J Mol Biol.* 2000 Jul 28;300(5):1237-55
- Luecke H, Schobert B, Richter HT, Cartailier JP, Lanyi JK.,** (1999b) Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution. *Science*. 1999 Oct 8;286(5438):255-61.
- Luecke H, Schobert B, Richter HT, Cartailier JP, Lanyi JK.,** (1999a) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J Mol Biol.* 1999 Aug 27;291(4):899-911.
- Luecke, H.,** (2000) Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Aug 30;1460(1):133-56. Review.
- Luo, D., Mah, N., Krantz, M., Wilde, K., Wishart, D., Zhang, Y., Jacobs, F., Martin, L.** (1995). VI-linker-Vh orientation-dependent expression of single chain Fv-containing an engineered disulfide-stabilized bond in the framework regions. *J Biochem (Tokyo)*, **118**, 825-831.
- Markaryan, A., Morozova, I., Lee, B. S., Kaplan, A.** (1999). Atypical processing of amyloid precursor fusion protein by proteolytic activity in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun*, **262**, 263-268. Ellis et al., 1985
- McCain, D.A., Amici, L.A. & Spudich, J.L.** (1987). Kinetically resolved states of the Halobacterium halobium flagellar motor switch and modulation of the switch by sensory rhodopsin I. *J.Bacteriol.* **169**, 4750-4758.
- Melkonian, M. & Robenek, H.,** (1980) Eyespot membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*: a freeze-fracture study. *J Ultrastruct Res.* 1980 Jul;72(1):90-102.
- Miele, R. G., Nilsen, S. L., Brito, T., Bretthauer, R. K., Castellino, F. J.** (1997). Glycosylation properties of the *Pichia pastoris*-expressed recombinant kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator. *Biotechnol Appl Biochem*, **25**, 151-157.
- Miller C, Arvan P, Telford JN, Racker E.,** (1976) Ca⁺⁺-induced fusion of proteoliposomes: dependence on transmembrane osmotic gradient. *J Membr Biol.* 1976;30(3):271-82.
- Miller C, Racker E.,** (1976) Fusion of phospholipid vesicles reconstituted with cytochrome c oxidase and mitochondrial hydrophobic protein. *J Membr Biol.* 1976 May;26(4):319-33.
- Montell, C.,** (1999) Visual transduction in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:231-68. Review
- Muller, S., Sandal, T., Kamp-Hansen, P., Dalboge, H.** (1998). Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, **14**, 1267-1283.
- Munshi, C. B., Fryxell, K. B., Lee, H. C., Branton, W. D.** (1997). Large-scale production of human CD38 in yeast by fermentation. *Methods Enzymol*, **280**, 318-330.

- Murphy, K. P., Jr., Gagne, P., Pazmany, C., Moody, M. D.** (1998). Expression of human interleukin-17 in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein Expr Purif*, **12**, 208-214.
- Nagel G, Kelety B, Möckel B, Büldt G, Bamberg E.**, (1998) Voltage dependence of proton pumping by bacteriorhodopsin is regulated by the voltage-sensitive ratio of M1 to M2. *Bioophys J.* 1998 Jan;74(1):403-12.
- Nagel G, Möckel B, Büldt G, Bamberg E.**, (1995) Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping. *FEBS Lett.* 1995 Dec 18;377(2):263-6.
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P.**, (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science.* 2002 Jun 28;296(5577):2395-8.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E.**, (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Nov 25;100(24):13940-5. Epub 2003 Nov 13
- Nagel,G., Möckel,B., Büldt,G., & Bamberg,E.** (1995) Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping. *FEBS Letters*, **377**, 263-266.
- Nagle JF, Tristram-Nagle S.**, (2000) Structure of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Nov 10;1469(3):159-95
- Nilsen, S. L., DeFord, M. E., Prorok, M., Chibber, B. A., Bretthauer, R. K., Castellino, F. J.** (1997). Highlevel secretion in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the recombinant kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator. *Biotechnol Appl Biochem*, **25**, 63-74.
- Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W.**, (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol.* 1971 Sep 29;233(39):149-52.
- Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W.**, (1973) Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Oct;70(10):2853-7.
- Oesterhelt, D.**, (1998) The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr Opin Struct Biol.* 1998 Aug;8(4):489-500. Review.
- Ohsawa, I., Hirose, Y., Ishiguro, M., Imai, Y., Ishiura, S., Kohsaka, S.** (1995). Expression, purification, and neurotrophic activity of amyloid precursor protein-secreted forms produced by yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, **213**, 52-58.
- Olson, K.D., Zhang, X.-N. & Spudich, J.L.** (1995). Residue replacements of buried aspartyl and related residues in sensory rhodopsin I: D201N produces inverted phototaxis signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**, 3185-3189.
- Ormos P, Dancsházy Z, Karvaly B.**, (1978) Mechanism of generation and regulation of photopotential by bacteriorhodopsin in bimolecular lipid membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1978 Aug 8;503(2):304-15
- Paifer, E., Margolles, E., Cremata, J., Montesino, R., Herrera, L., Delgado, J. M.** (1994). Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast*, **10**, 1415-1419.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M.**, (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science.* 2000 Aug 4;289(5480):739-45
- Park, C. S., Chang, C. C., Kim, J. Y., Ogrydziak, D. M., Ryu, D. D.** (1997). Expression, secretion, and processing of rice alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem*, **272**, 6876-6881.

- Petreanu L, Huber D, Sobczyk A, Svoboda K.** (2007) Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci.* 2007 May;10(5):663-8. Epub 2007 Apr 15.
- Pflanz, S., Tacke, I., Grötzinger, J., Jacques, Y., Dahmen, H., Heinrich, P. C., Müller-Newen, G.** (1999). A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130. *FEBS Lett*, **450**, 117-122.
- Piontek, M., Hagedorn, J., Hollenberg, C. P., Gellissen, G., Strasser, A. W.** (1998). Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **50**, 331-338.
- Piontek, M., Hagedorn, J., Hollenberg, C. P., Gellissen, G., Strasser, A. W.** (1998). Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **50**, 331-338.
- Rao, V.R. & Oprian, D.D.** (1996) Activating mutations of rhodopsin and other G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1996;25:287-314
- Raymond, C. K., Bukowski, T., Holderman, S. D., Ching, A. F., Vanaja, E., Stamm, M. R.** (1998). Development of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica* for the expression of the 65 kilodalton isoform of human glutamate decarboxylase. *Yeast*, **14**, 11-23.
- Rodriguez, M., Rubiera, R., Penichet, M., Montesinos, R., Cremata, J., Falcon, V., Sanchez, G., Bringas, R., Cordoves, C., Valdes, M.** (1994). High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J Biotechnol*, **33**, 135-146.
- Romanos, M. A., Clare, J. J., Beesley, K. M., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Makoff, A. J., Dougan, G., Fairweather, N. F., Charles, I. G.** (1991). Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine*, **9**, 901-906.
- Royant A, Edman K, Ursby T, Pebay-Peyroula E, Landau EM, Neutze R.** (2000) Helix deformation is coupled to vectorial proton transport in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Nature.* 2000 Aug 10;406(6796):645-8
- Sager, R.** (1960) Genetic systems in Chlamydomonas. *Science.* 1960 Nov 18;132:1459-65
- Sakai, Y., Akiyama, M., Kondoh, H., Shibano, Y., Kato, N.** (1996). High-level secretion of fungal glucoamylase using the *Candida boidinii* gene expression system. *Biochim Biophys Acta*, **1308**, 81-87.
- Sakmar, T.P.** (2002) Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Apr;14(2):189-95
- Sasaki J, Yuzawa T, Kandori H, Maeda A, Hamaguchi H.** (1995) Nanosecond time-resolved infrared spectroscopy distinguishes two K species in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys J.* 1995 May;68(5):2073-80.
- Sass HJ, Büldt G, Gessenich R, Hehn D, Neff D, Schlesinger R, Berendzen J, Ormos P.** (2000) Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin. *Nature.* 2000 Aug 10;406(6796):649-53
- Scharf, B.E. & Engelhard, M.** (1994) Blue Halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*: Wavelength Regulation by Anions. *Biochemistry*, **33**, 6387-6393.
- Scherrer, P., Mathew, M.K., Sperling, W., & Stoeckenius, W.** (1989) Retinal Isomer Ratio in Dark-Adapted Purple Membrane and Bacteriorhodopsin Monomers. *Biochemistry*, **28**, 829-834.
- Schmidt, M.** (2006) Proteomic Analysis of the Eyespot of Chlamydomonas reinhardtii Provides Novel Insights into Its Components and Tactic Movements.
- Schmies, G., Chizhov, I. & Engelhard, M.** (2000). Functional expression of Histagged sensory rhodopsin I in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **466**, 67-69.

- Schobert, B & Lany, J.K.**, (1982) Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J Biol Chem.* 1982 Sep 10;257(17):10306-13.
- Scorer, C. A., Buckholz, R. G., Clare, J. J., Romanos, M. A.** (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, **136**, 111-119.
- Scorer, C. A., Buckholz, R. G., Clare, J. J., Romanos, M. A.** (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, **136**, 111-119.
- Siegel, R. S., Brierley, R. A.** (1989). Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentations with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng*, **34**, 403-404.
- Sineshchekov OA, Jung KH, Spudich JL.**, (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 25;99(13):8689-94. Epub 2002 Jun 11.
- Spudich, J.L.**, (1998) Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins. *Mol Microbiol.* 1998 Jun;28(6):1051-8
- Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J. T., Smith, P. L., Wierschke, J. D., Subramaniam, A., Birkenberger, L. A.** (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, **190**, 55-62.
- Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P., Parker, K.** (1989). High-level expression, purification and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*, **28**, 4117-4125.
- Sternberg B, L'Hostis C, Whiteway CA, Watts A.**, (1992) The essential role of specific *Halobacterium halobium* polar lipids in 2D-array formation of bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Jul 8;1108(1):21-30.
- Stratton, J., Chiruvolu, V., Meagher, M.** (1998). High cell-density fermentation. *In: Pichia Protocols*, D. R. Higgins, J. M. Cregg, eds. Humana Press, Totowa, NJ, 107-121.
- Subramaniam S, Henderson R.**, (2000) Crystallographic analysis of protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Aug 30;1460(1):157-65
- Subramaniam S, Henderson R.**, (2000) Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin. *Nature.* 2000 Aug 10;406(6796):653-7.
- Subramaniam S, Lindahl M, Bullough P, Faruqi AR, Tittor J, Oesterhelt D, Brown L, Lanyi J, Henderson R.** (1999) Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle. *J Mol Biol.* 1999 Mar 19;287(1):145-61
- Sun, J., Bird, C. H., Buzza, M. S., McKee, K. E., Whisstock, J. C., Bird, P. I.** (1999). Expression and purification of recombinant human granzyme B from *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun*, **261**, 251-255.
- Suzuki T, Yamasaki K, Fujita S, Oda K, Iseki M, Yoshida K, Watanabe M, Daiyasu H, Toh H, Asamizu E, Tabata S, Miura K, Fukuzawa H, Nakamura S, Takahashi T.**, (2003) Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Feb 14;301(3):711-7
- Swinkels, B. W., van Ooyen, A. J., Bonekamp, F. J.** (1993). The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **64**, 187-201.

- Takahashi T, Mochizuki Y, Kamo N, Kobatake Y.** (1985) Evidence that the long-lifetime photointermediate of s-rhodopsin is a receptor for negative phototaxis in *Halobacterium halobium*
- Takahashi T, Yoshihara K, Watanabe M, Kubota M, Johnson R, Derguini F, Nakanishi K.** (1991) Photoisomerization of retinal at 13-ene is important for phototaxis of *Chlamydomonas reinhardtii*: simultaneous measurements of phototactic and photophobic responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Aug 15;178(3):1273-9.
- Takao, K., Kikukawa, T., Araiso, T. & Kamo, N.** (1998). Azide accelerates the decay of M-intermediate of pharaonis phoborhodopsin. *Biophys.Chem.* **73**, 145-153.
- Tittor, J., Soell, C., Oesterhelt, D., Butt, H.-J. & Bamberg, E.** (1989). A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96-->Asn is fully reactivated by azide. *EMBO J.* **8**, 3477-3482.
- Tittor J, Haupts U, Haupts C, Oesterhelt D, Becker A, Bamberg E.** (1997) Chloride and proton transport in bacteriorhodopsin mutant D85T: different modes of ion translocation in a retinal protein. *J Mol Biol.* 1997 Aug 22;271(3):405-16
- Tittor J, Oesterhelt D, Bamberg E.** (1995) Bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T and D85, 96N as proton pumps. *Biophys Chem.* 1995 Sep-Oct;56(1-2):153-7.
- Tóth-Boconádi R, Keszthelyi L, Stoeckenius W.** (2003) Photoexcitation of the O-intermediate in bacteriorhodopsin mutant L93A. *Biophys J.* 2003 Jun;84(6):3857-63.
Trends Microbiol **11**, 405-407.
- Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A., Gingeras, T. R.** (1987). Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucl Acids Res.* **15**, 3859-3877.
- Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W., Grinna, L.** (1987). High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *BIO/TECHNOLOGY*, **5**, 1305-1308.
- Van der Horst, M.A. & Hellingwerf, K.J.** (2004) Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc Chem Res.* 2004 Jan;37(1):13-20.
- Van Nostrand, W. E., Schmaier, A. H., Neiditch, B. R., Siegel, R. S., Raschke, W. C., Sisodia, S. S., Wagner, S. L.** (1994). Expression, purification, and characterization of the Kunitz-type proteinase inhibitor domain of the amyloid beta-protein precursor-like protein-2. *Biochim Biophys Acta*, **1209**, 165-170.
- Vonck, J.** (2000) Structure of the bacteriorhodopsin mutant F219L N intermediate revealed by electron crystallography. *EMBO J.* 2000 May 15;19(10):2152-60
- Vought BW, Salcedo E, Chadwell LV, Britt SG, Birge RR, Knox BE.** (2000) Characterization of the primary photointermediates of *Drosophila* rhodopsin. *Biochemistry.* 2000 Nov 21;39(46):14128-37.
- Wald, G. & Brown, P. K.** (1958) Human rhodopsin. *Science* **127**, 222-226
- Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V., Cregg, J. M.** (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, **186**, 37-44.
- Weiss, S., Famulok, M., Edenhofer, F., Wang, Y. H., Jones, I. M., Groschup, M., Winnacker, E. L.** (1995). Overexpression of active Syrian golden hamster prion protein PrPc as a glutathione S-transferase fusion in heterologous systems. *J Virol*, **69**, 4776-4783.

- Werten, M. W., van den Bosch, T. J., Wind, R. D., Mooibroek, H., de Wolf, F. A.** (1999). High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*, **15**, 1087-1096.
- Werten, M. W., van den Bosch, T. J., Wind, R. D., Mooibroek, H., de Wolf, F. A.** (1999). High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*, **15**, 1087-1096.
- Wetlaufer, D.B.**, (1973) Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Mar;70(3):697-701.
- White, C. E., Hunter, M. J., Meininger, D. P., White, L. R., Komives, E. A.** (1995). Large-scale expression, purification and characterization of small fragments of thrombomodulin: the roles of the sixth domain and of methionine 388. *Protein Eng*, **8**, 1177-1187.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML.**, (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun; 87(12):4576-9.
- Yan, B. & Spudich, J.L.** (1991). Evidence that the repellent receptor form of sensory rhodopsin I is an attractant signaling state. *Photochem. & Photobiol.* **54**, 1023-1026.
- Yan, B., Takahashi, T., Johnson, R. & Spudich, J.L.** (1991). Identification of signaling states of a sensory receptor by modulation of lifetimes of stimulusinduced conformations: The case of sensory rhodopsin II. *Biochemistry* **30**, 10686-10692
- Zacks DN, Derguini F, Nakanishi K, Spudich JL.**, (1993) Comparative study of phototactic and photophobic receptor chromophore properties in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys J*. 1993 Jul;65(1):508-18.
- Zhu, A., Monahan, C., Zhang, Z., Hurst, R., Leng, L., Goldstein, J.** (1995). High-level expression and purification of coffee bean alpha-galactosidase produced in the yeast *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys*, **324**, 65-70.
- Zubay G.**, (1973) In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet*. 1973;7:267-87.
- Zuker, C.** (1996). The biology of vision of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 571-

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BR	<i>Halobacterium salinarum</i> Bakteriorhodopsin
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CHAPS	3-[N-(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
ChR1	Channelrhodopsin 1
ChR2	Channelrhodopsin 2
CMC	Kritische Mizellenkonzentration
DEPC	Diethyl-pyrocbonat
DM	n-Decyl- β -D-maltosid
DDM	N-Dodecyl- β -D-maltosid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagel's Medium</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	C18:1-Dioleoylphosphatidylcholin
DOPE /POPE	C18:1-Dioleoylphosphatidylethanolamin
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FSK	Forskolin
g	Zentrifugalbeschleunigung; $1g = 9,81 \text{ m/s}^{-2}$
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	Stunden
HEK	<i>Human Embryo Kidney</i>
H ₂ O ₂ milli	Durch eine Milli-Q-Plus-Anlage (Millipore) gereinigtes Wasser
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-ethylsulfonsäure)
HtrII	Transducer des Sensor Rhodopsin II
IMAC	Metallchelat-Affinitätschromatographie

kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Bertani</i>
LM	n-Dodecyl- β -D-maltosid
Maldi-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation detection by Time-of-Flight
min	Minute
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD _x	Optische Dichte bei Wellenlänge x nm
OG	n-Octyl- β -D-glucoopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SB	Schiff'sche Base
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRI	<i>Halobacterium salinarum</i> Sensorisches Rhodopsin I
SRII	<i>Halobacterium salinarum</i> Sensorisches Rhodopsin II
pSRII	pharaonis Sensor-Rhodopsin II
SUVs	<i>Small Unilamellar Vesicles</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trimethoxyaminomethan
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein
ϵ_x	Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge x nm
λ_x	Wellenlänge des Lichts bei Wellenlänge x nm
τ	Halbwertszeit beim exponentiellen Abbau eines elektrischen Feldes Zeitkonstante

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

CHR2-TEV-YFP-His9x

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAA
GFSILLMFYAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLRYA
EWLLTCPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFLGLCYG
ANTFFHAAKAYIEGYHTVPGRCRQVVVTGMAWLFFVSWGMFPILFILGPEGFGVLSVYGSTV
GHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGYVQS
AATMVSKEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVWP
TLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTL
VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADH
YQNTPIGDGPVLLPDNHYSYQSALSADPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYHHHHH
HHHHLK

FLAG-Tag: N-Terminus: DYKDDDDK-

TEV-Cleavage site: ENLYFQG

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Ernst Bamberg für seine exzellente Betreuung und dafür, dass er immer ein offenes Ohr hatte und stets beruhigende Worte fand.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Georg Nagel, der mich als Doktorandin annahm und mein Projekt mitgestaltete.

Des Weiteren gilt mein Dank Christian Bamann, der hervorragende spektroskopische Daten lieferte und somit meine Arbeit maßgeblich unterstützte.

Außerordentlichen Dank möchte ich all unseren Technischen Assistentinnen und im besonderen Maße Anja Becker aussprechen.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe Michel, deren Mitarbeiter mir immer hilfsbereit unter die Arme griffen.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe Biophysikalische Chemie, die meine Zeit der Doktorarbeit, wie im Flug vergehen ließ. Auch Heidi Bergemann möchte ich für das Querlesen meiner Arbeit ganz herzlich danken.

Vielen Dank Büro B1.155 und ganz besonders Eva Bongartz meiner Soulmate. Schön, dass es dich gibt.

Und nun kommen die drei wichtigsten Menschen in meinem Leben, ohne die ich dies alles nie geschafft hätte: Meine Eltern Shireen und Harry Kirsch. UND Jan.

Nicht zu vergessen sind aber auch meine Freunde in der Heimat. Danke, dass ihr immer da seid.

Taryn Kirsch

Personal Data	<ul style="list-style-type: none"> • Marital status: unmarried • Citizenship: German • Age: 29 Year old • Place of birth: 49393 Lohne, Germany
Education	<ul style="list-style-type: none"> • 1984-1988 Grundschule in Lohne • 1988-1990 Orientierungsstufe in Lohne • 1990-1997 Allgemeines Gymnasium in Lohne
Degree/ Studies	<ul style="list-style-type: none"> • 1997 Starting to study Biology at the Carl-Von-Ossietzky-University in Oldenburg • Semester: 11 • Degree: Diploma September 2003
Language	<ul style="list-style-type: none"> • English is my second mother-language
Skills and Courses	<ul style="list-style-type: none"> • Placement at the Department of ZNS-Research at Boehringer-Ingelheim Company • Molecular Biology • Immunhistology • Confocal Microscopy • Electrophysiology • Biochemistry • Biophysics • P&G R&D PhD-Seminar in Egham April2006
Employer/ Current Job	PhD-Student at the Max-Planck-Institute of Biophysics Frankfurt a. M.