

Purpurmembran: Ein affines 2D-Templat



DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

BJÖRN HEIDEL
aus Fellingshausen

Marburg an der Lahn 2009

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

.....

Björn Heidel

Marburg, den

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Norbert A. Hampp

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2009

„Fantasie haben heißt nicht,
sich etwas auszudenken, es
heißt, sich aus den Dingen
etwas zu machen.“

Thomas Mann

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Halophilie: Die Liebe zum Salz „άλς“ (altgr. „halys“)	1
1.1. <i>Halobacterium salinarum</i> : Taxonomie, Habitat und Anpassung.....	1
1.2. Purpurmembran als ein natürliches Produkt des Extremophilen	3
2. Struktur der Purpurmembran	5
3. Die enzymatische Funktion des Monomerbausteins Bakteriorhodopsin	8
4. Nanotechnologie und Purpurmembran	12
5. Genetische Modifikation der Purpurmembran und Anforderung	13
6. Biosensorik: Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA)	17
7. Interpretation der Affinitätsreaktion an der aktivierten Sensoroberfläche	19
8. Zielsetzung	21
8.1. Integration einer Argininsequenz.....	21
8.1.1. Wechselwirkung zwischen immobilisierten Biphosphat-Pinzetten (BP) und den Guanidylgruppen von Argininen	21
8.1.2. Interaktionsanalyse der biomolekularen Wechselwirkung zwischen Purpurmembranspezies (PM-BOP/Arg ₍₇₎ ; PM-BOP-WT) und Biphosphat-Pinzetten mit Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie (RIFS).....	22
8.1.3. Kinetische Beschreibung und Interpretation der Assoziationsreaktion auf der Sensoroberfläche	23
8.2. Integration von Peptidsequenzen zur Nanopartikelsynthese	23
8.3. Integration des „ <i>Peptide Carrier Proteins</i> “ (PCP; T-Domäne) für die nichtribosomale Peptidsynthese.....	23
8.4. Integration von „ <i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> “	23
8.5. Anhängen von „ <i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> “ über eine Linkersequenz.....	24
II. Ergebnisse	25
9. Funktionalisierung des C-Terminus von Bakteriorhodopsin	25
9.1. Konstruktion der Deletionsmutante SNOB _{Marburg} und Charakterisierung der verwendeten Stämme.....	25
9.2. Integration einer Argininsequenz als Erkennungsmotiv für Biphosphatpinzetten: Konstruktion von <i>pUS-Mev-bop-arg₍₇₎</i>	27

Inhaltsverzeichnis

9.3.	Integration von Templatstrukturen zur Nanopartikelsynthese in den C-Terminalen Teil von BOP: Konstruktion von <i>pUS-Mev-bop-ag₄</i> , <i>pMKK₁₀₀-bop-ag₄</i> , <i>pUS-Mev-bop-co₃-p₁</i> und <i>pMKK₁₀₀-bop-co₃-p₁</i>	27
9.4.	Konstruktion von <i>pHUS-brfus(MCS)-bop-pcp</i> und <i>pMKK₁₀₀-bop-pcp</i>	28
9.5.	Konstruktion von <i>pUS-Mev-bop-egfp</i> und <i>pMKK₁₀₀-bop-egfp</i>	28
9.6.	Konstruktion von <i>pUS-Mev-bop-linker-egfp</i> und <i>pMKK₁₀₀-bop-linker-egfp</i>	28
9.7.	Konstruktion von <i>pEF-bop-egfp</i>	28
10.	Isolierung und Analyse der exprimierten Membranfraktionen PM-BOP/ARG₍₇₎	30
10.1.	Saccharosegradient und Zonale-Ultrazentrifugation	30
11.	Kontrolle der Membranfraktionen mit SDS-Gelelektrophorese	31
12.	UV-VIS Analytik	32
13.	Massenspektrometrie	34
13.1.	ESI-TOF-MS (positiv Modus): Massenspektrum	34
13.2.	ESI-TOF-MS (positiv Modus): Rekonstruktion der molaren Masse	34
14.	Rasterkraftmikroskopie	36
15.	Biosensorik: Reflektometrische Interferenz Spektroskopie (RIFS)	38
15.1.	Interaktion zwischen Purpormembranspezies und Biphosphat-Pinzetten	38
15.2.	Ansatz zu einer Beschreibung der intermolekularen Interaktion auf dem Sensorchip.....	41
III.	Diskussion	43
16.	Gentechnische Prozessführung	43
17.	Massenspektrometrie	46
18.	Rasterkraftmikroskopie	47
19.	Untersuchung der biomolekularen Interaktion zwischen Purpormembranspezies und Biphosphatpinzetten	47
19.1.	Interpretation der Affinitätsreaktion an der Sensoroberfläche	47
19.2.	Interaktionskurven	50
19.3.	Interpretation der Wechselwirkung zwischen Purpormembranspezies und Biphosphat-Pinzetten durch Bestimmung der Assoziationsratenkonstante k_a	51
20.	Schlussfolgerung	52
IV.	Material und Methoden	53
21.	Chemikalien	53
22.	Kits und DNA-modifizierende Enzyme	54

23.	Medien, Puffer und Antibiotika	55
23.1.	Nährmedien und Puffer	55
23.2.	Nährmedien für <i>E.coli</i>	55
23.3.	Komplex-Medium für <i>Hbt.salinarum</i>	56
23.4.	Antibiotika	56
24.	Stämme und Vektoren	57
24.1.	Stämme der verwendeten Organismen	57
24.2.	Vektoren.....	58
25.	Mikrobiologisches Arbeiten	61
25.1.	Kultivierung und Stammhaltung von <i>E.coli</i>	61
25.2.	Kultivierung und Stammhaltung von <i>Hbt.salinarum</i>	61
26.	Molekularbiologische Methoden	62
26.1.	Transformation von <i>E.coli</i> (DH5 α).....	62
26.1.1.	Herstellung elektrokompenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	62
26.1.2.	Elektroporation von <i>E.coli</i> -Zellen.....	62
26.1.3.	Herstellung chemokompenter <i>E.coli</i> -Zellen	63
26.1.4.	Chemoporation von <i>E.coli</i>	64
26.2.	Transformation von <i>Hbt.salinarum</i>	65
26.2.1.	Kultivierung der Zellen.....	66
26.2.2.	Sphäroplasten Präparation	66
26.2.3.	Fusion mit der Plasmid- DNA durch PEG Zugabe.....	66
26.2.4.	Regeneration	66
26.2.5.	Selektionsmarker halophile β -Galaktosidase	67
27.	Extraktion von DNA	68
27.1.	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	68
27.1.1.	Aufreinigung von DNA durch Ethanolpräzipitation	69
27.1.2.	Aufreinigung von DNA durch Isopropanolpräzipitation	69
27.2.	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> über QIAprep spin Säulen	70
27.3.	Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> über Qiaprep Midi-Kit	70
27.4.	Präparation ungereinigter genomischer DNA aus <i>Hbt.salinarum</i>	70
28.	Restriktionsverdau	71
29.	DNA-Agarosegel-Elektrophorese und Extraktion	71
30.	Bestimmung der DNA-Konzentration	72
31.	Sequenzierung der DNA	73
32.	Erzeugung von PCR Fragmenten mittels „two-step-PCR“	73

33.	Oligonucleotidprimer	75
34.	T4 Ligation	75
35.	Klonieren mit dem Rekombinase-System	76
36.	Biochemische Methoden	77
36.1.	Reinigung der Purpurmembran und Test auf analytische Reinheit	77
36.1.1.	Zonalzentrifugation: Reinigung der Purpurmembran über den Zwei-Phasen-Saccharosegradienten	77
36.1.2.	Reinigung über den Vier-Phasen-Saccharosegradienten.....	78
36.1.3.	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Purpurmembran durch UV-Vis Spektroskopie	79
37.	Massenspektrometrie	80
37.1.	Probenvorbereitung	80
37.2.	Konditionen der Massenspektrometrie	80
38.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	81
39.	Western-Blot	83
39.1.	„Semi dry“-Elektroblot	83
40.	Rasterkraftmikroskopie (<i>atomic force microscopy, AFM</i>)	84
40.1.	Probenvorbereitung	84
40.2.	Konditionen der Rasterkraftmikroskopie	84
41.	Biosensorik	85
V.	Anhang	86
42.	Oligonukleotide	86
43.	PCR-Strategie	88
44.	Vektorkarten	89
45.	Referenzen	97

Zusammenfassung der Dissertation

Das Archaeon *Halobacterium salinarum* besiedelt extrem halophile Lebensräume. Bei anaeroben Bedingungen wird das integrale Membranprotein Bakteriorhodopsin exprimiert. Bakteriorhodopsin (BR) ist eine lichtgesteuerte Protonenpumpe und spielt eine Schlüsselrolle in der Energiegewinnung der Zelle. BR ist in der Zellmembran zu zweidimensionalen kristallinen hexagonalen Strukturen angeordnet, den Purpurmembranen (PM). Aufgrund seiner Eigenschaften öffnet sich die Tür für vielfältige biotechnologische Anwendungen.

Für Applikationen auf Oberflächen und den Aufbau von Hybridstrukturen muss eine gezielte Orientierung von Monolagen der supramolekularen PM erreicht werden. Erschwert wird dies durch das Suspensionsverhalten und nicht vorhandene Brownsche Molekularbewegung.

Es hat sich gezeigt, dass dazu chemische Modifizierungen der PM zwar in breitem Umfang möglich sind und so Ankerstrukturen eingeführt werden können, allerdings wurde keine 100%ige Derivatisierung erreicht. Deshalb wurde in dieser Arbeit versucht über gentechnische Modifizierung des cytosolischen COOH-Terminus von Bakteriorhodopsin (BR) direkt Ankerstrukturen einzuführen, die dann in 100% der Moleküle vorliegen. Das resultierende biologische Templat Purpurmembran sollte als strukturierte Matrix zur Immobilisierung anderer Biomaterialien und für den Aufbau dreidimensionaler geordneter Hybrid-Biomaterialien erforscht werden.

Dazu wurden verschiedene Klonierungsstrategien verfolgt. Entsprechend wurden Anforderungen im Umgang mit dem Expressionsorganismus *Hbt.salinarum*, sowie an sein Produkt gentechnisch veränderter Purpurmembran (PM) auf Basis ursprünglicher Erkenntnisse (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Oesterhelt, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hampp etabliert und systematisiert.

Im Rahmen verschiedener Klonierungsprojekte sollten folgende Ziele erreicht werden:

Die Koexpression im COOH-Terminus des BR von kurzen Aminosäuresequenzen, wie die einer Argininsequenz als Erkennungsmotiv für Biphosphatgruppen und kurzen Peptidsequenzen zur Nanopartikelsynthese. Weiterhin sollten die Thiolierungsdomäne (T-Domäne bzw. „*Peptide Carrier Protein*“, PCP; Arbeitsgruppe Prof. Dr. Marahiel) eines Modules für die Nicht Ribosomale Proteinsynthese (NRPS)

und das verstärkt grün fluoreszierende Protein (eGFP) fusioniert werden.

Voraussetzung für eine entsprechende Analytik war die Expression der Konstrukte in einem der Bakterioopsin-Gen (*bop*) defizienten Stämme von *Hbt.salinarum* und die Ausbildung einer kristallinen Purpurmembra. In diesem Zusammenhang wurde der *bop*-defiziente Stamm SNOB_{Marburg} („S9 without *bop*“) neu etabliert. Eine erfolgreiche Transformation konnte für alle angefertigten Konstrukte mittels „Blau-Rot-Selektion“ und PCR bestätigt werden. Allerdings konnte nur die für sieben Arginine kodierende Sequenz zur Koexpression gebracht werden. Nach Isolation und Reinigung der Purpurmembra durch Ultrazentrifugation über einen Saccharose-Gradienten, wurde mit der Methode der ESI-TOF-Massenspektrometrie die neue Bakterioopsin (BOP)- bzw. Purpurmembra mutante PM-BOP/Arg₍₇₎ bestimmt.

Der Aufbau einer Hybridstruktur konnte mit der Biomolekularen Interaktionsanalyse (BIA) über die Reflektometrische Interferenz Spektroskopie (RIfS) detektiert werden. Die Interaktion der PM an einer Matrix aus inkorporierten und orientierten Biphosphat-„Pinzetten“ (BP, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Schrader) war erfolgreich. Im Vergleich mit der PM-BOP-Wildtyp (PM-BOP-WT) zeigte PM-BOP/Arg₍₇₎ einen schnelleren Interaktionsverlauf. Durch Interpretation der Affinitätsreaktion an der aktivierten Matrixoberfläche ließ sich eine Assoziationsratenkonstante k_a ermitteln. Im Ergebnis besitzt die genetisch veränderte PM-BOP/ARG₍₇₎ eine zehnfach schnellere Anbindung mit 0,05 Resonanz Einheiten (RU) pro Sekunde zu den BP gegenüber PM-BOP-WT mit 0,005 RU/s. Zudem wurde im Fall von PM-BOP/Arg₍₇₎ mehr Masse gebunden.

I. Einleitung

1. Halophilie: Die Liebe zum Salz „ἅλς“ (altgr. „halys“)

1.1. *Halobacterium salinarum*: Taxonomie, Habitat und Anpassung

Purpurne Salzseen wie die *Salinas de Janubio* auf Lanzarote (Abb. 1-1; Spanien, Kanaren), Salinen vor San Francisco oder der Owenslake in Kalifornien (beides USA) sind extreme Habitate des fakultativ autotrophen *Halobacterium salinarum*¹ (*Hbt.salinarum*; Domäne: Archaea, Stamm: Euryarchaeota, Klasse: Halobacteria, Ordnung: Halobacteriales, Familie: Halobacteriaceae, Gattung: Halobacterium)⁽¹⁾. Nach Untersuchung von 16S- und 18S-rRNA Sequenzanalysen bilden sie mit den methanogenen und thermoacidophilen Archaea nach Woese und Fox⁽²⁾ und Allers und Mechvarech⁽³⁾ im phylogenetischen Stammbaum des Lebens neben den Bakterien und Eukarya die dritte Domäne (Abb. 1-2).

Die Erschließung extremer Biotope mit einem Salzgehalt zwischen 3,5 bis 4,5 mol L⁻¹ bei physiologischem pH-Wert (7,4) und einer mittleren Temperatur von 45 °C⁽⁴⁾ verlangen aus energetischen Gesichtspunkten eine „salt in“-Strategie für den isoosmolaren Ausgleich der extrem halophilen, stäbchenförmigen Zelle (gram⁻). Deshalb liegt für die niedrige Wasseraktivität von a_w=0,75 in der Zelle erhöhtes Kaliumchlorid ([K⁺]= 5,3 mol L⁻¹, [Cl⁻]= 3,3 mol L⁻¹) als kompatibel gelöste anorganische Substanz vor. Natriumionen binden an die äußere Oberfläche der Membran und sind für die Aufrechterhaltung der zellularen Integrität absolut notwendig. Wenn nicht genügend Natrium ([Na⁺]= 2 mol L⁻¹) vorhanden ist, bricht die Zelle auseinander und lysiert.

Mit Ausnahme einzelner extrem halophiler Bakterien, die ebenfalls Kaliumionen als Osmoprotektant benutzen, wird bei keiner anderen Prokaryotengruppe diese einzigartige Anforderung an spezifische Kationen in so hohen Konzentrationen^{(5) (6)} gefunden.

¹ Artnamenwechsel: *Halobacterium halobium* zu *Halobacterium salinarum* und schließlich zu *Halobacterium salinarum*. Darunter finden sich Stämme wie *Halobacterium cutirubrum* und *Halobacterium* sp. NRC-1.



Abb. 1-1: Becken eines Salinenfeldes auf Lanzarote (Spanien, *Salinas de Janubio*) als extremes Habitat von *Halobacterium salinarum*. Je nach Populationsdichte weisen die Becken eine unterschiedliche Färbung auf.

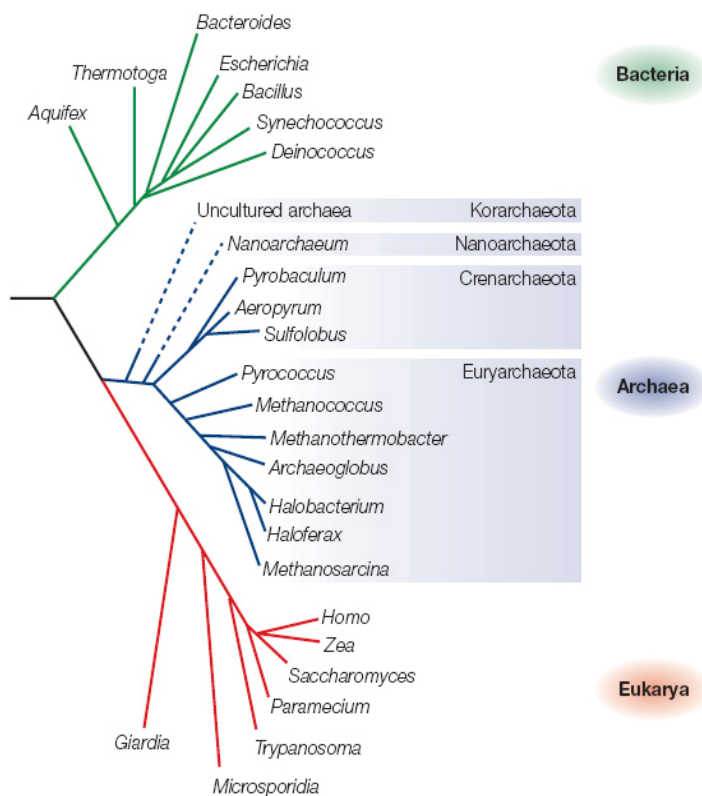


Abb. 1-2: Stammbaum des Lebens nach Woese and Fox ⁽²⁾. Basierend auf 16S- bzw. 18S-rRNA Untersuchungen besitzt der phylogenetische Zweig der Euryarchaeota die größte Diversität innerhalb der Domäne der Archaea. Er umfasst alle bekannten methanogenen, thermophilen und halophilen Archaea.

1.2. Purpurmembran als ein natürliches Produkt des Extremophilen

Zunehmende anaerobe Bedingungen lassen den heterotrophen Hauptstoffwechselweg der oxydativen Phosphorylierung (Atmungskette) von *Hbt.salinarum* zum Erliegen kommen und bewirken neben der Fermentation von Arginin⁽⁷⁾ die Induktion der Synthese des integralen Membranproteins Bakteriorhodopsin²⁽⁸⁾⁽⁹⁾ dem Monomerbaustein der photoaktiven Purpurmembran⁽¹⁰⁾ (PM). Nach Signal-Erkennungs-Partikel („signal recognition particle“, SPR) vermittelter Sekretion⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾ durch die Zellmembran und posttranslationaler Modifikation, sind die sieben, hauptsächlich hydrophoben Trans-Membran- α -Helices (A bis G), über kurze Loops verbunden (Abb. 1-3 A, B). Im Vergleich zu mesophilen Proteinen findet sich in hydrophilen Bereichen der primären Aminosäuresequenz ein hoher Anteil von Aminosäuren mit sauren Seitenketten (Glu, Asn) hauptsächlich im cytoplasmatischen C-Terminus und extrazellulären N-Terminus⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾. Bezüglich der hydrophoben Aminosäuren ist ein verstärkter Einbau der kleineren, sterisch weniger anspruchsvollen Aminosäuren Valin und Alanin zu beobachten⁽¹⁶⁾. Die Seitenketten dieser Aminosäuren sind bei physiologischem pH-Wert deprotoniert und stark negativ geladen. Dies ermöglicht die Bindung einer Hydrathülle auf der Proteinoberfläche und verhindert die Aggregation der Proteine bei hohen Salzkonzentrationen (Aussalz-Effekt). Zudem kann somit das bereits angesprochene hydratisierte Ionennetzwerk mit Na^+ als Gegenion auf der extrazellulären Seite der Purpurmembran koordiniert werden⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾.

² HaloLex: OE3106F, VNG1467G, Vorläuferprotein 262 AS mit 28238 Da, posttranslational 248 AS mit 26783,6 Da

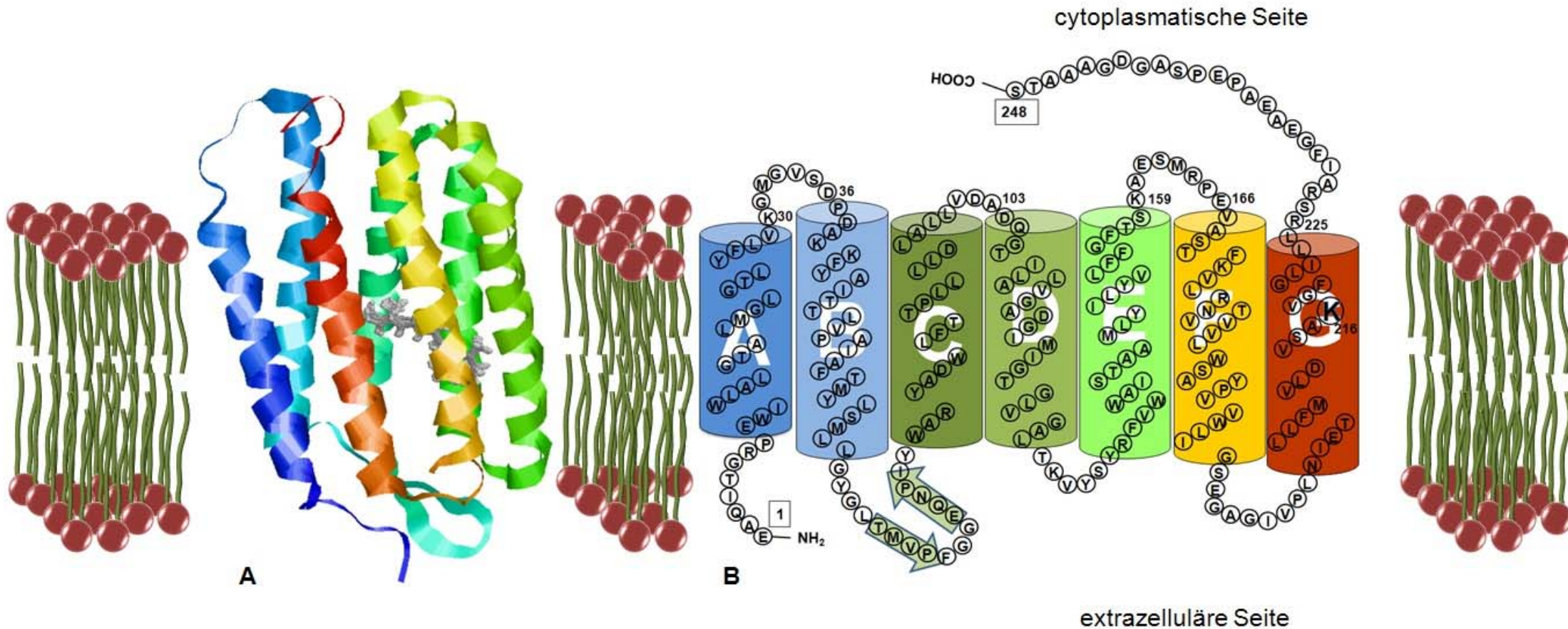


Abb. 1-3: A Strukturmodell eines Bakteriorhodopsinmonomers (BR; laterale Ansicht, Koordinaten nach PDB Eintrag 1r2n⁽¹⁹⁾). Die prosthetische Gruppe Retinal (graues Ball&Stick Modell) ist über eine Schiff'sche Base mit Lys216 (K216) der BR-Aminosäuresequenz (AS) verbunden. **B** Schematische Darstellung der posttranslationalen Primärsequenz (248 AS) von Bakterioopsin (BOP). Jedes Monomer besitzt sieben Transmembran α -Helices (A bis G, Farben entsprechend Strukturmodell), welche über Loops verbunden sind. Der B-C Loop besitzt eine β -Faltblatt-Struktur (grüne Pfeile).

2. Struktur der Purpurmembran

Untersuchungen zur Biosynthese der Purpurmembran (PM) führten zu dem Ergebnis, dass schon in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen, d.h. vor der Bakteriorhodopsin (BR)-Synthese, alle Lipide der PM vorhanden sind. Diese Braune Membran, die Bakterioopsin (BOP; retinalfreies BR) enthält, ist eine Vorstufe der PM und kann erst nach Reaktion mit Retinal zu dieser auskristallisieren^{(20) (21)}.

Pro BR-Molekül lassen sich 10 umgebende Lipidmoleküle finden, darunter etwa 6-7 Phospholipide, 2-3 Glykolipide und ein Squalenmolekül^{(22) (23)} (Abb. 2-1). In den Membranen der Archaea besitzen die polaren Lipide im Unterschied zu den pro- und eukaryotischen Fettsäureglycerinestern eine Etherbindung zwischen Glycerin und hydrophober Seitenkette (Archaeol: sn-2,3-Diphythanylglycerol)⁽²⁴⁾. Hauptsächlich findet sich mit 60-70% Phosphatidylglycerolphosphatmethylester (PGP-Me). Restliche Bestandteile bilden Phosphatidylglycerolsulfat (PGS) und Phosphatidylglycerol (PG)⁽²⁵⁾. Hauptglykolipid in der PM ist das (b-Galactopyranosyl-3-sulfat-1,6-a-mannopyranosyl-1,2-glucopyranosylarchaeol)⁽²⁶⁾. Mit Antikörpermarkierungen gegen die Kopfgruppe konnte gezeigt werden, dass dieses Glykolipid ausschließlich auf der extrazellulären Hälfte der PM vorkommt⁽²⁷⁾.

Die multiplen Kopien der integralen BR-Monomere bilden in der Plasmamembran zu Trimeren (4,4 nm Durchmesser⁽²⁸⁾) spontan hexagonale, zwei-dimensionale, kristalline Areale, die Purpurmembran (PM; 4,7 nm Dicke; bis zu 2 µm Durchmesser) aus^{(29) (30) (31)}. Atomare Strukturauflösungen durch elektronenkristallographische⁽³²⁾^{(33) (34)} und röntgenkristallographische Studien^{(35) (36) (37) (38)} (Abb. 2-2) an PM und dreidimensionalen-Kristallen von BR bestätigen die hohe Affinität der PM-Lipide zu BR, da in allen Strukturen zahlreiche Phythanylreste in ähnlichen Positionen gefunden werden.

Die hexagonale Struktur der zwei-dimensional kristallinen PM wurde erstmals durch Elektronenbeugung nachgewiesen⁽³⁹⁾ und später auch durch rasterkraftmikroskopische (atomic force microscopy, AFM) Studien belegt⁽⁴⁰⁾. Entfaltungskräfte der einzelnen Bakteriorhodopsin (BR)-Helices können mittels Einzel-Molekül-Kraftspektroskopie am COOH-Terminus detektiert werden^{(41) (42)}.

Aus dem Massenverhältnis Protein zu Lipid von 3:1 resultiert bei hohem Proteinanteil der PM gegenüber weiteren Membranfraktionen eine höhere Schwimmdichte mit $1,18 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Dies ermöglicht eine einfache Aufreinigung und Abtrennung der PM

gegenüber weiteren Zellbestandteilen durch Zonale-Ultrazentrifugation in einem Saccharosegradienten⁽⁴³⁾.

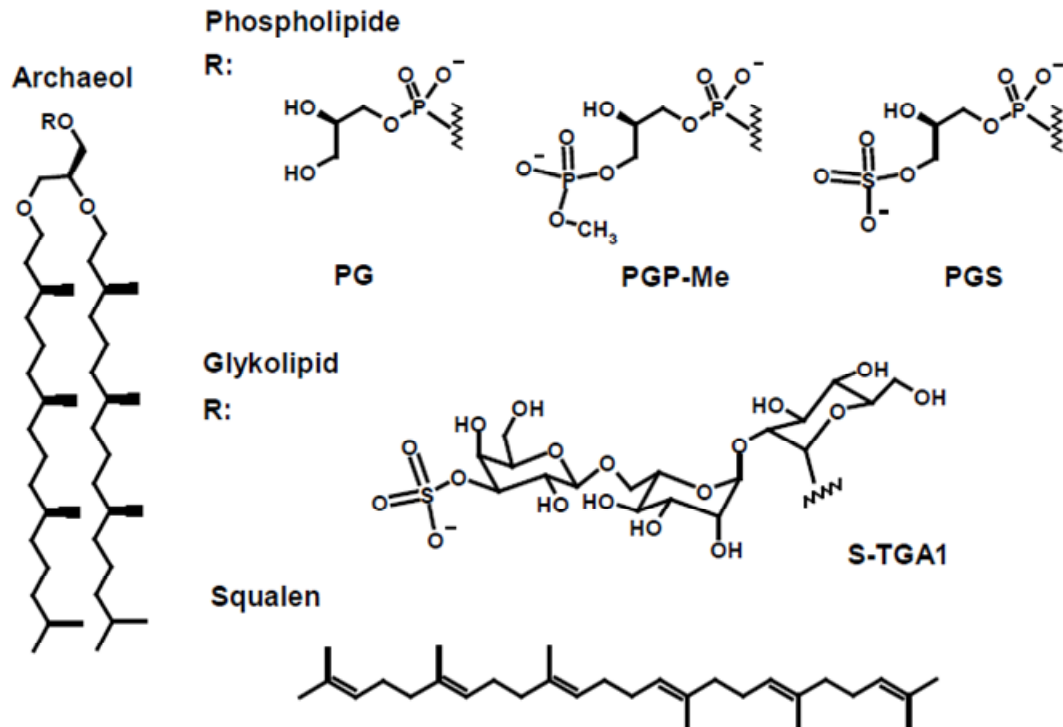


Abb. 2-1: Lipide der archaealen Membran. Alle polaren Lipide haben Archaeol (sn-2,3-diphythanylglycerol) als Anker⁽²⁴⁾, PGP-Me (Phosphatidylglycerolphosphatmethylester), PGS (Phosphatidylglycerolsulfat), PG (Phosphatidylglycerol)⁽²⁵⁾. Neben dem Glykolipid S-TGA1 (b-Galactopyranosyl-3-sulfat-1,6-a-mannopyranosyl-1,2-glucopyranosylarchaeol)⁽²⁶⁾ macht Squalen als apolares Lipid den Hauptbestandteil aus⁽²²⁾.

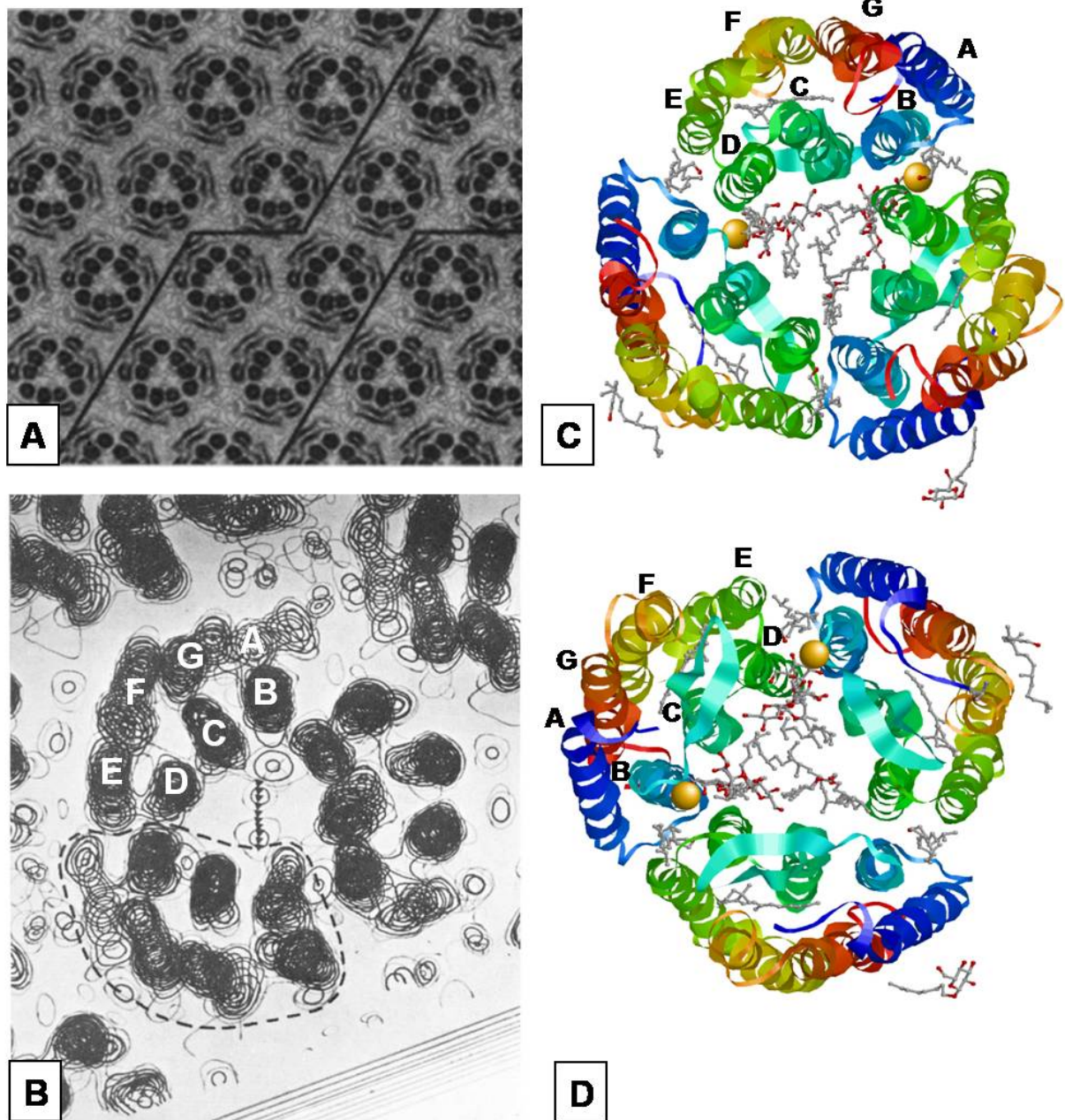


Abb. 2-2: **A** Aus Gefrierbruch und Elektronenkristallographie rekonstituierter Ausschnitt der Purpurchromatophorenmembran (PM) von *Halobacterium halobium*. Die Bakteriorhodopsinmoleküle bilden zu Trimeren hexagonale, zwei-dimensionale, kristalline Areale (ingezeichnet sind mögliche Bruchkanten der PM)⁽⁴⁴⁾. **B** Der Ausschnitt einer dreidimensionalen Projektion zeigt ein Trimer in der hexagonalen PM. Umrandet sind die Transmembranhelices eines Monomers⁽³⁹⁾ (Ansicht von der cytoplasmatischen Seite). **C** (cytoplasmatisch), **D** (extrazellulär) dreidimensional-modellierte Trimere in Aufsicht, mit Glykolipidmolekülen innerhalb und außerhalb des Trimers⁽³⁶⁾.

3. Die enzymatische Funktion des Monomerbausteins Bakteriorhodopsin

Die lichtgetriebene Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR) stellt das einfachste System zur Photosynthese dar. Der erzeugte Gradient über die Membran wird von der archealen Zelle für lebensnotwendige Prozesse, wie Energiespeicherung in Form von ATP (ATP-Synthetase), Natrium-Antiport zur Aufrechterhaltung des Turgor und der Fortbewegung mit Flagellen genutzt ^{(8) (10) (45)}.

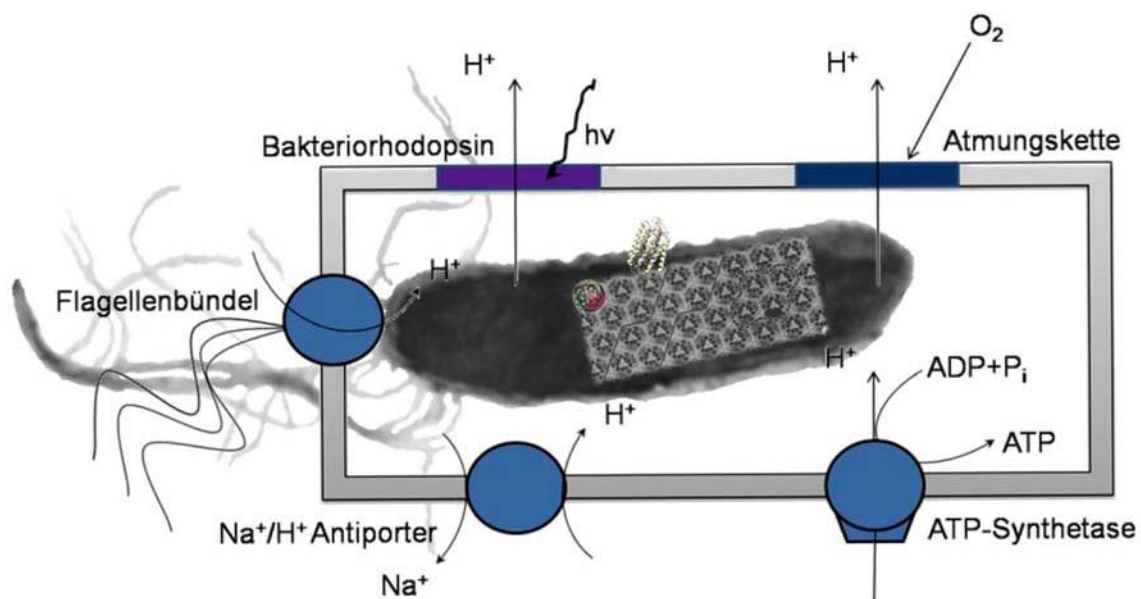


Abb. 3-1: Unter anaeroben Bedingungen wird der durch Bakteriorhodopsin erzeugte Gradient über die Membran für lebensnotwendige Prozesse genutzt. Vorrangig für Energiespeicherung in Form von ATP (ATP-Synthetase), Natrium-Antiport zur Aufrechterhaltung des Turgor und zur Fortbewegung mit Flagellen. Im Hintergrund elektronenmikroskopische Aufnahme von *Hbt.salinarum* (EM-Aufnahme verändert nach Oesterhelt-Homepage, 13500x)

Der Protonengradient kommt durch die enzymatische Funktion des BR zustande. Als Mitglied der Retinalproteine von *Hbt.salinarum*, zu denen auch Halorhodopsin, die Sensorrhodopsine SR I und II gehören, besitzt BR als Co-Faktor ebenfalls das lichtabsorbierende Chromophor, Retinal. Dieses ist über die ϵ -Aminogruppe eines konservierten Lysinrestes (Lys216) der Helix-G (Abb. 1-3) über eine Schiff'sche Base mit der primären Aminosäuresequenz von BR verbunden ^{(46) (47) (48)}. Im dunkeladaptierten Protein liegt das Retinal im thermischen Gleichgewicht in den Konfigurationen 13-cis (D₅₄₈) und all-trans (B₅₆₈) im Verhältnis 6:4 vor (Abb. 3-2). Durch Belichtung erfolgt eine quantitative Verschiebung in Richtung der all-trans

Konfiguration. Nach Absorption eines Photons im B_{568} -Zustand isomerisiert das Retinal in 13-cis, 15-anti und der Photozyklus wird gestartet ^{(49) (50)}. Dieser beinhaltet eine Reihe konformationeller Änderungen der Proteinstruktur, die sich durch unterschiedliche Absorptionsmaxima im VIS-Bereich der charakterisierten Intermediate J, K, L, M, N und O auszeichnen ⁽⁵¹⁾. Die Vektorialität des Protonentransportes wird durch das Isomerisierungs-Schalter-Transfer-(IST)-Modell ⁽⁵²⁾ erklärt. Durch die schnelle Drehung um die C13-Bindung wird unter der Veränderung des pK_s -Wertes die Schiff'sche Base deprotoniert (Abb. 3-3). Unter der Beteiligung eines internen Wassernetzwerkes wird daraufhin Asp85 protoniert (L550-zu-M^I412 Übergang, „early M“). Im Übergang M^I412 nach M^{II}412 findet durch Ausschwingen der Helix F eine Verengung des äußeren Protonenkanals auf der extrazellulären Seite und Öffnung des inneren Kanals auf der cytoplasmatischen Seite statt. Dieser „large conformational change“ in den M^{II}-Zustand wird als quasi-irreversibel angesehen ⁽⁵³⁾. Über den Protonendonator der cytoplasmatischen Seite Asp96 wird die Schiff'sche Base im Anschluss reprotoniert (M^{II}412-zu-N550 Übergang).

An der Protonenfreisetzung sind Aminosäure-Reste (Arg82, Asp212, Glu204, Glu194) des äußeren Protonenleitungschanals als sogenannter „Proton Release Complex“ (PRC) beteiligt, die in diesen hineinragen ⁽⁵⁴⁾. Die Protonenfreisetzung in das Umgebene extrazelluläre Medium ist pH-abhängig. Bei pH 7,0 geschieht die Freisetzung erst nach 1 ms; bei pH 5,0 direkt mit dem Übergang O-zu-BR ^{(55) (56) (57)}. Zwischen den beiden Glutamaten (Glu194 und Glu204) wird ein $H_5O_2^+$ -Komplex vermutet, der als Protonenendspeicherstelle bzw. Abgabegruppe fungieren soll ⁽⁵⁸⁾.

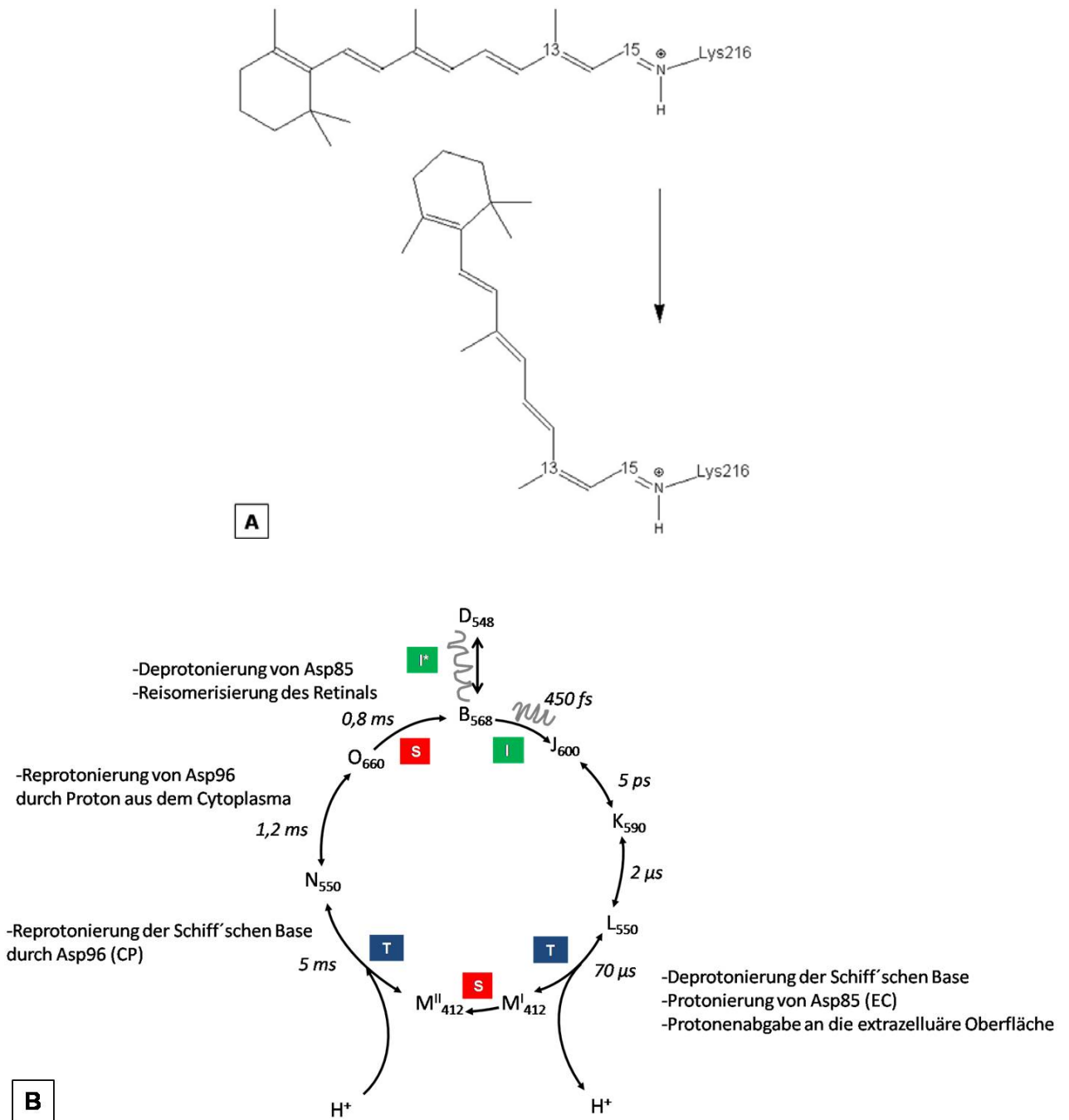


Abb. 3-2: **A** Photochemische Isomerisierung des Retinalchromophors von all-trans nach 13-cis, 15-anti Konfiguration. Dabei kommt es zur Deprotonierung der Imidbindung zwischen Retinal und Protein (Lys216). **B** Katalytischer Photozyklus des Bakteriorhodopsins. Gezeigt in vereinfachter Form sind Ausgangszustand und Intermediate mit Absorptionsmaxima und Indizes in nm (verändert nach Heßling *et al.* ⁽⁵⁹⁾; Halbwertszeiten nach Gerwert ⁽⁶⁰⁾). Der vektorielle Ionentransfer ist nach dem IST-Modell dargestellt, wobei I*/I= lichtinduzierte/thermische Isomerisierung; T= Transfer; S="Switch"; EC=extrazelluläre Proteinoberfläche, CP= cytoplasmatische Proteinoberfläche; nach Haupts *et al.* ⁽⁵²⁾.

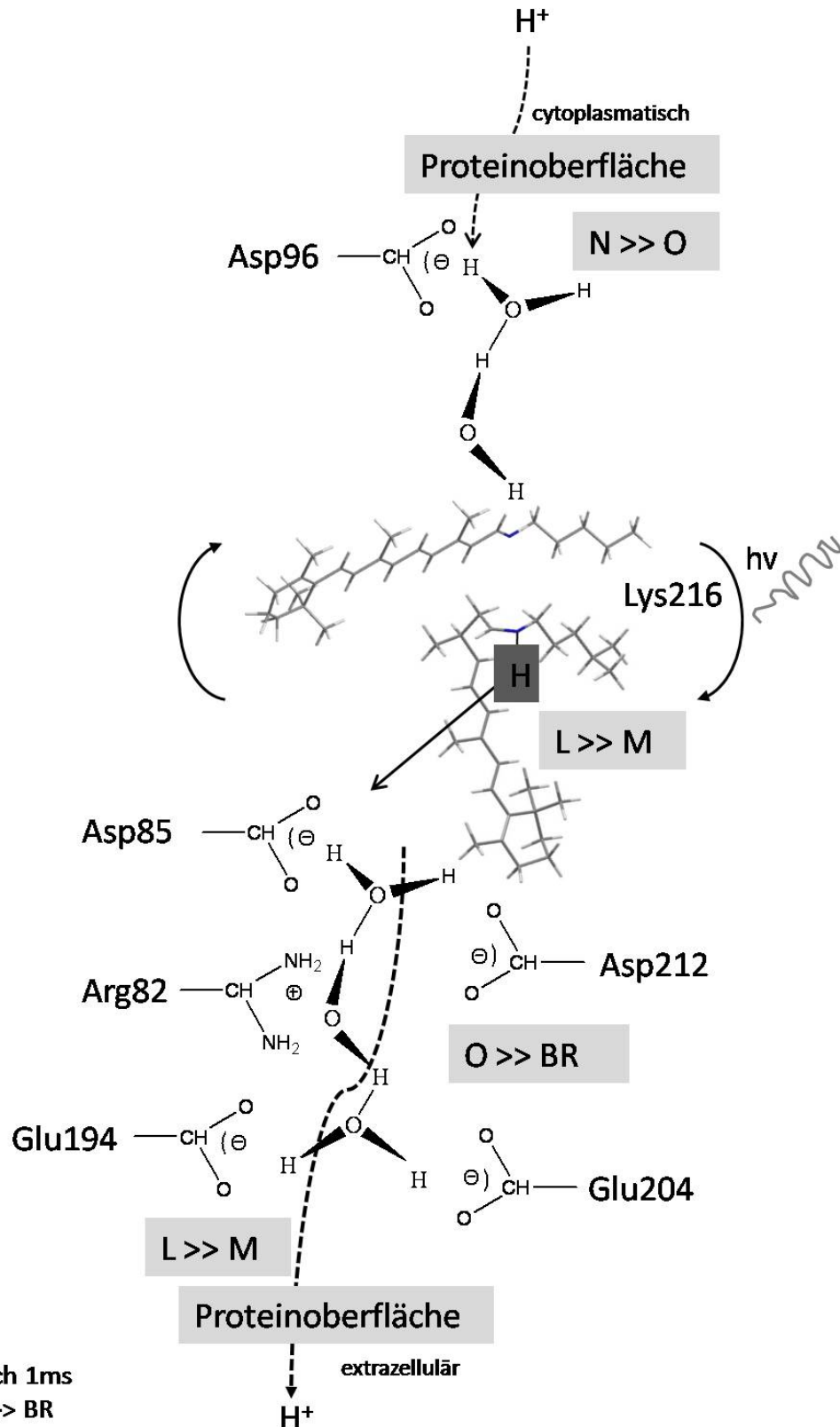


Abb. 3-3: Vorgeschlagenes Modell der Protonentranslokation verändert nach Rammelsberg *et al.* ⁽⁵⁷⁾. Der Protonengradient kommt über die enzymatische Funktion des Bakteriorhodopsins zustande. Als prosthetische Gruppe besitzt das integrale Membranprotein ein lichtabsorbierendes Molekül, das Retinal. Dieses ist über eine Schiff'sche Base an Lysin 216 (LYS216) mit der Aminosäuresequenz des Proteins verbunden. Nach der Absorption eines Photons erfolgt eine Isomerisierung des Retinals, dh.

die schnelle Drehung um die C13-Bindung von all-trans nach cis. Die bewirkte Konformationsänderung führt zur Deprotonierung der Schiff'schen Base mit Asp85 (L-zu-M Übergang) und anschließender Reprotonierung über Asp96 (N-zu-O Übergang). Weiter sind noch mehrere Aminosäure-Reste des inneren und äußeren Protonenleitungschanals beteiligt, die in diese hineinragen. Die Protonenfreisetzung in das Umgebene extrazelluläre Medium ist pH-Wert abhängig. Bei pH 7,0 geschieht die Freisetzung erst nach 1 ms; bei pH 5,0 direkt mit dem Übergang O-zu-BR. Zur Unterstützung des internen Protonentransports wird ein Wasserstoffbrückennetzwerk aus internen Wassern postuliert. Spassov *et al.* ⁽⁵⁸⁾, vermuten einen $H_5O_2^+$ -Komplex, der als Protonenendspeicherstelle bzw. Abgabegruppe zwischen den beiden Glutamaten (Glu194 und Glu204) fungieren soll.

4. Nanotechnologie und Purpurmembran

Die beschriebenen strukturellen und chemischen Eigenschaften verleihen dem Bakteriorhodopsin (BR) in der Purpurmembran (PM) nachgewiesene Stabilität gegenüber thermischen ⁽⁶¹⁾⁽⁶²⁾ und einer Vielzahl von chemischen und physikalischen Einflüssen. Zusätzlich machen photochrome ⁽⁶³⁾ und photoelektrische ⁽⁶⁴⁾ Eigenschaften des BR die PM zu einem verfügbaren Material für eine Reihe von technischen Anwendungen ⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁷⁾⁽⁶⁸⁾⁽⁶⁹⁾, wie z.B. optische Datenspeicher.

Für Applikationen auf Oberflächen und den Aufbau multipler Hybridstrukturen von PM, muss eine gezielte Orientierung von Monolagen der PM erreicht werden. Erschwert wird dies durch das Suspensionsverhalten und nicht vorhandene Brownsche Molekularbewegung. Die mechanische Art der Orientierung mittels Langmuir-Blodgett Technik wird oft benutzt, um solche Oberflächenschichten zu realisieren. Da PM-Blätter mit nur 5 nm Dicke eine hohe Flexibilität und negative Oberflächenladung aufweisen, wird dieses Verfahren zur orientierten Schichtgewinnung erschwert. Ansätze mit chemischen Ankerstrukturen, wie z.B. die Kopplung von Crosslinkern Isothiocyanat und Succinimidylester an primäre Aminogruppen ⁽⁷⁰⁾, der Einsatz von Quervernetzern, wie Glutaraldehyd ⁽⁷¹⁾, enzymatische Modifikation ⁽⁶⁶⁾⁽⁷²⁾, die Verwendung des Biotin-Streptavidin ⁽⁷³⁾ und die Kopplung von Antikörpern ⁽⁷⁴⁾ lieferten bisher nicht den gewünschten Erfolg einer hochorientierten PM-Monolage.

5. Genetische Modifikation der Purpurmembran und Anforderung

Halobacterium salinarum ist etabliert als Modellorganismus für die Untersuchung vieler biologischer Prozesse⁽⁷⁵⁾. Dies betrifft vor allem die Expression und Regulation auf genetischer und Proteinebene⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾. An das gentechnische Verfahren sind deshalb bestimmte Anforderungen gestellt:

Aufgrund der hohen physiologischen Salzkonzentration des haloarchealen Cytoplasmas besitzt das Genom von *Halobacterium sp.* NRC-1³ einen erhöhten GC-Gehalt von 68%. Weiterhin sind ein starker Dinukleotid-Bias (CG>GC; TA<AT) und eine geringe Anzahl an Stop Codons zu finden. Von 2682 möglichen Genen, kodieren nach Datenbankabgleich 1658 Open-Reading-Frames (ORFs) für Proteine⁽⁷⁸⁾. Im Vergleich dazu hat das Genom von *Escherichia coli* K-12 eine Größe von 4,639,000 bp⁽⁷⁹⁾, welches 4269 ORFs enthält⁽⁸⁰⁾.

Das Bakterioopsin-Gen (*bop*) konnte in einem Endonucleasefragment von 5,3 kb aus *Hbt.salinarum* isoliert werden. Von 1229 *bop* zugeordneten Nukleotiden codieren 786 bp für die Primärsequenz von BOP. Die Vorläufersequenz von BOP besitzt am NH₂-Terminus eine Signalsequenz von 13 Aminosäuren⁽⁸¹⁾ (AS), im posttranslationalen Hauptprotein 248 AS und am COOH-Terminus eine zusätzliche Asparaginsäure (ASN)⁽⁸²⁾. Für die posttranslationale Modifikation wird eine Zwei-Schritt-Prozessierung vorgeschlagen⁽⁸³⁾. Chymotryptischer Verdau von PM-Apomembran⁽⁸⁴⁾ (Retinal-freie PM) und Bromcyan verdaute Fragmente, daran anschließende Sequenzierung über automatisierten Edman-Abbau kombiniert mit Massenspektrometrie, konnten die AS-Sequenz von BOP endgültig aufklären⁽⁸⁵⁾

Shand and Betlach⁽⁸⁶⁾ und Tarasov *et al.*⁽⁸⁷⁾ suggerieren ein regulatorisches Modell des „*bop* gene clusters“ für die Expression von BOP durch zunehmende anaerobe Stimulation des regulierenden Bakterioopsin-Aktivator-Proteins („*Bacterioopsin-Activator*“, BAT). Erhöhte Lichtintensität induziert die Expression des Bakterioopsin-Related-Proteins („*Bacterioopsin-Regulator-Protein*“, BRP), welches als „*Enhancer*“ an *bat* bindet, dessen Expression verstärkt (BAT) und somit die Überexpression von BOP bewirkt. Eine langsame Wachstumsrate ist entscheidend für die quantitative Ausbeute an BOP und somit an PM⁽⁸⁸⁾.

³ Wildtyp: Gesamtgenom 2,571,010 bp, zusammengesetzt aus 3 zirkulären Replikons von 2,014,239 bp eines großen Chromosoms und zwei kleineren Replikons pNRC100 mit 191,346 bp und pNRC200 365,425 bp)

Im Hinblick auf gezielte Mutationen, insbesondere von längeren Gensequenzen, ist die genetische Instabilität von *Hbt. salinarum* ein entscheidender Faktor.

In den Zusammenhang mit einer hohen spontanen Mutationsrate konnten aktive Insertionssequenzen und Transposons gebracht werden, welche konstant im Genom „springen“^{(89) (90) (91)}. Simsek *et al.*⁽⁹²⁾ charakterisieren die seitenspezifische Insertion des transposablen Insertionselementes ISH1 in das Bakterioopsin-Gen (BO) und dessen vorübergehende Inaktivierung im *Hbt.salinarum* Stamm L33. Selbst im regulatorischen Abschnitt des „bop Gene Cluster“ konnten ISH-Elemente gefunden werden⁽⁹³⁾.

Unter Beachtung der beschriebenen genetisch-regulatorischen Anforderungen konnten eine Vielzahl gerichteter Punktmutationen an Bakteriorhodopsin und dessen Überexpression bisher dazu beitragen, die Beteiligung individueller Aminosäure-Reste an der katalytischen Protonentranslokation und deren Intermediatstellungen im Photozyklus spektroskopisch zu untersuchen^{(94) (95) (52)}. In diesem Zusammenhang konnte besonders die Rolle von Asp85 und Asp96 aufgeklärt werden^{(55) (56) (96)}. Durch genetische Modifikation von BOP sind folgend analysiert:

Strukturelle und dynamische Interaktionen zwischen Lipiden und Helices, sowie Helix-Helix-Interaktionen der einzelnen Monomere⁽⁹⁷⁾, die Orientierung der AS-Seitenketten des EF Loops⁽⁹⁸⁾ und dessen Substitution durch den bovinen Rhodopsin EF-Loop für Regulationsversuche^{(99) (100)}.

Hier bietet die genetische Modifikation von BOP den klaren Vorteil, dass alle Proteine mit der Mutation derivatisiert sind und eine vorherige chemische Modifizierung zur Aktivierung von BOP mit einem Anker-molekül entfällt. Nach der Expression von BOP mit einer Mutation im COOH-Terminus lässt sich so auf der cytoplasmatischen Seite eine Membranoberfläche gewinnen, welche als funktionelles Templat für halobakterielle Fusionsproteine, deren Reinigung^{(101) (102)} oder als eine affine Fläche für die Bindung eines Liganden zur Verfügung steht.

Nur in wenigen Studien wurden chimäre Peptide bzw. Proteinderivate erfolgreich transgenetisch im cytoplasmatischen BOP-COOH-Terminus integriert oder über Linkersequenzen fusioniert und in homologen (*Hbt.salinarum*) und heterologen (*Escherichia coli*)^{(103) (104)} Systemen exprimiert. Eine vorausgehende genetische Manipulation dieser Sequenzen, sollte die Anpassung an die physiologischen Bedingungen im Cytoplasma bewirken⁽¹⁰⁵⁾.

Das 1993 von Ferrando *et al.* ⁽¹⁰⁶⁾ postulierte homologe Expressionssystem wird für die zur Erzeugung von Bakterioopsin (*bop*)-Mutanten verwendet.

Die *bop* defizienten Stämme SNOB (S Nine without *bop*) ⁽¹⁰⁷⁾ und BORIS („*bop* omission in R1-strain“) ⁽¹⁰⁷⁾ werden mit einem *bop*-mutierten Shuttle-Vektor transformiert. Zum Ausschluss von genetischen Mutationen bezüglich des *bop*-Gen-Clusters und Kreuzkontaminationen wird SNOB nach dem homologen Rekombinations-Verfahren (Abb. 5-1) von Pfeiffer ⁽¹⁰⁷⁾ neu etabliert (SNOB_{Marburg}). Identifizierte Homologien zu Genen, die an der DNA-Rekombination beteiligt sind, wie z.B. *recA* in *Escherichia coli* oder *rad51* in *Saccharomyces cerevisiae* ⁽¹⁰⁸⁾ konnten dazu beitragen, den Prozess („*crossing over*“) des Einbaus vektorieller DNA anhand einer rekombinationsdefizienten halobakteriellen Mutante von *Haloferax volcanii* zu demonstrieren ⁽¹⁰⁹⁾.

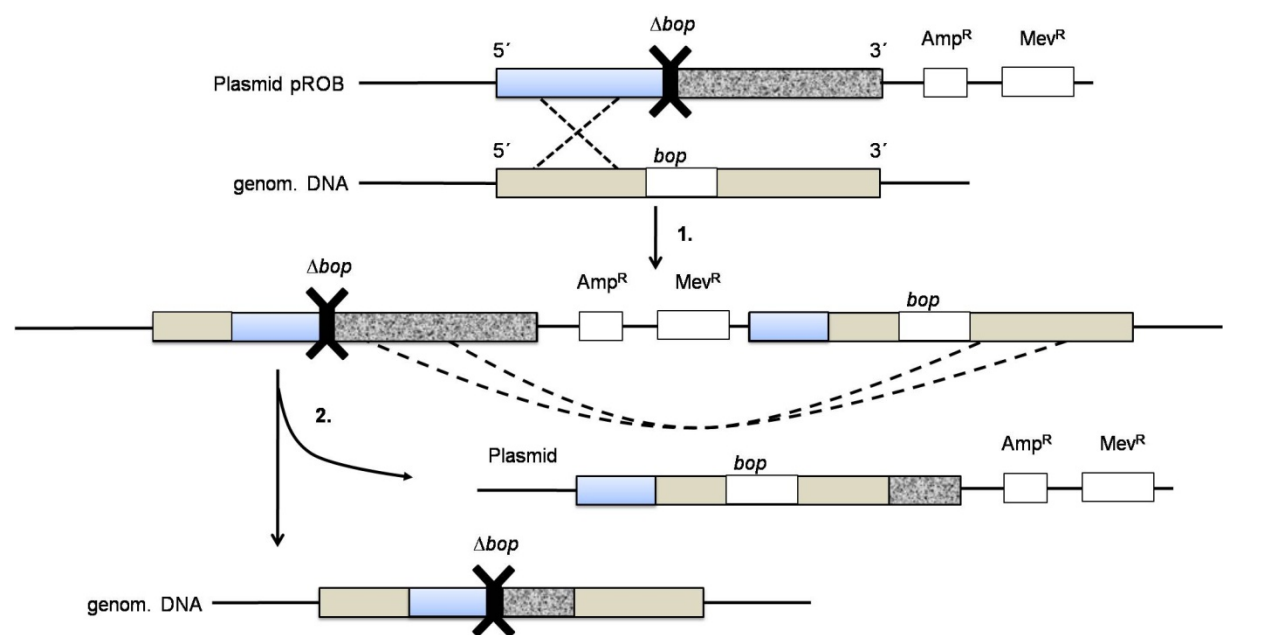









Abb. 5-1: Schema der homologen Rekombination zwischen dem Plasmid (Vektor) pROB ⁽⁹⁷⁾ mit genomischer DNA aus dem WT-Stamm S9 zur Deletion des *bop*-Gens. pROB besitzt die Deletionskassette flankiert von homologen Teilsequenzen „upstream“ (US) und „downstream“ (DS) zur halobakteriellen genomischen DNA. Nach erfolgreicher Transformation in *Hbt.salinarum* integriert der Vektor durch spontane homologe Rekombination über ein „*crossing-over*“ in das halobakterielle Genom. Nach einem zweiten „*crossing-over*“ kommt es zur Deletion von *bop*.

-  5'-flankierender Bereich des *bop*-Gens
-  3'-flankierender Bereich des *bop*-Gens
-  *bop*-Gen
-  deletiertes *bop*-Gen (Δbop)
-  Amp^R Gen für Ampicillinresistenz
-  Mev^R Gen für Lovastatin® (Mevinolin®)Resistenz
-  spontane Rekombinationsstellen

Die Wildtypstämme S9 („*strain nine*“) ⁽⁴⁹⁾ und R1 ⁽¹¹⁰⁾ dienen als Referenz.

Zusätzlich wird das bereits von Krebs *et al.* ⁽⁹⁷⁾ postulierte Austauschverfahren von *bop* gegen mutiertes (D85N, D96N) im Stamm L33 vorgenommen. Dieser besitzt, wie schon angesprochen, durch ein ISH-Element inaktiviertes *bop*.

Im Fall des ISH-tragenden Stammes L33 werden zwei „*crossing-over*“ Ereignisse für die Herstellung von BOP Mutanten benötigt. Das erste „*crossing-over*“ ober (upstream, UP) oder unterhalb (downstream, DS) des *bop* Gens führt zur Integration des gentechnisch veränderten *bop* Gens. Dieses erste „*crossing-over*“ kann über Selektionsmarker verfolgt werden. Das zweite „*crossing-over*“ führt anschließend zur Eliminierung des ISH tragenden WT *bop* Gens.

Im Gegensatz dazu reicht für die erfolgreiche Transformation des *bop* Gens in die erzeugten Deletionsstäme SNOB, SNOB_{MARBURG} und BORIS bereits ein „*crossing-over*“ aus, um die genetisch veränderte Sequenz ins Genom zu integrieren. Durch Zugabe des Wirkstoffs Lovastatin (auch Mevinolin; Mevinacor® oder Lovabeta®) ⁽¹¹¹⁾ zum Medium wird die halophile 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase; OE3637R, EC 1.1.1.34) kompetitiv gehemmt. Zusätzlich kann mit dem Reporter gen der halophilen β -Galaktosidase für ein „Blau-Rot-Screening“ ⁽¹¹²⁾ ⁽¹¹³⁾ der Erfolg des Transformationsprozesses gesteigert werden.

6. Biosensorik: Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA)

Das BIAffinity-System (analytikjenaAG) ermöglicht die markierungsfreie und zeitaufgelöste biosensorische Analyse von Bindungen zwischen biologisch oder biochemisch relevanten Systemen (Rezeptor-Liganden Interaktionen). Der „*online*“ Nachweis und die Charakterisierung von Bindungsereignissen an der Sensoroberfläche erlauben den Zugang zu thermodynamischen und kinetischen Parametern biochemischer Prozesse.

Die in dieser Arbeit verwendete direkte optische Detektionsmethode der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie („*reflectometric interference spectroscopy*“, RIfS) ⁽¹¹⁴⁾ basiert auf der Mehrfachreflexion von senkrecht einfallendem Weißlicht an dünnen, transparenten Schichten.

An den Phasengrenzen der Schichten ändert sich durch Oberflächenbelegung (z.B. Bindung eines Liganden) der Brechungsindex n und die physikalische Schichtdicke d . Dies bewirkt die Verschiebung der Extrema des Interferogramms und damit die Änderung der im Sensorgramm detektierten Resonanz-Einheiten (resonance Units, RU) der optischen Schichtdicke auf der Ordinate (Abb. 6-1 A, B).

Für die Interaktionsanalyse in dieser Arbeit wird ein SiO_2 -Sensorchip durch Immobilisation einer Matrix mit dotierten Rezeptoren aktiviert. Die Aktivierung und anschließende Interaktionsreaktion zwischen Ligand und Rezeptor wird in RIfS-Laufpuffer durchgeführt. Folgender Verlauf ergibt sich für einen Bindungszyklus (Abb. 6-1 B):

Nach Aktivierung des Sensorchips und neuem Nullabgleich kommt es nach einmaliger Injektion des Liganden zu einer Assoziation ($k_a[\text{L}][\text{R}]$) an die freien Rezeptoren bis zur Sättigung ($[\text{LR}]$).

Nach dem Erreichen des Sättigungsplateaus wird RIfS-Laufpuffer injiziert, um nicht gebundenen Liganden vom aktivierten Sensorchip zu entfernen und eine mögliche Dissoziation ($k_d[\text{LR}]$) bis hin zur vollständigen Regeneration der Matrix einzuleiten. In diesem Fall sind alle Rezeptor-Bindestellen wieder regeneriert.

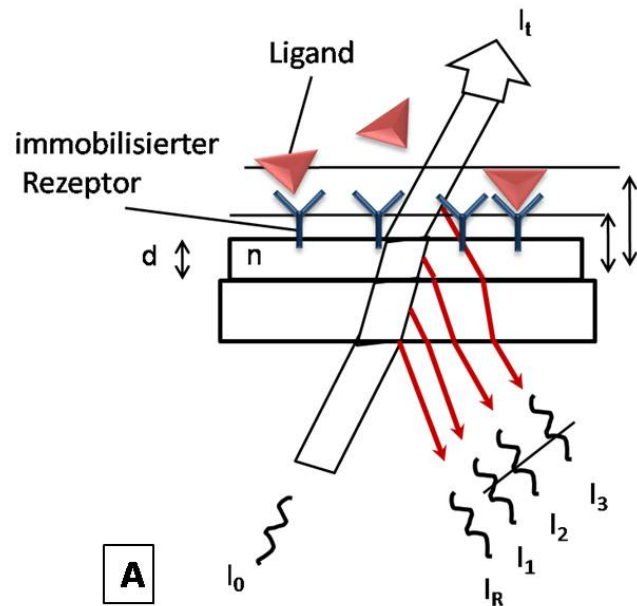
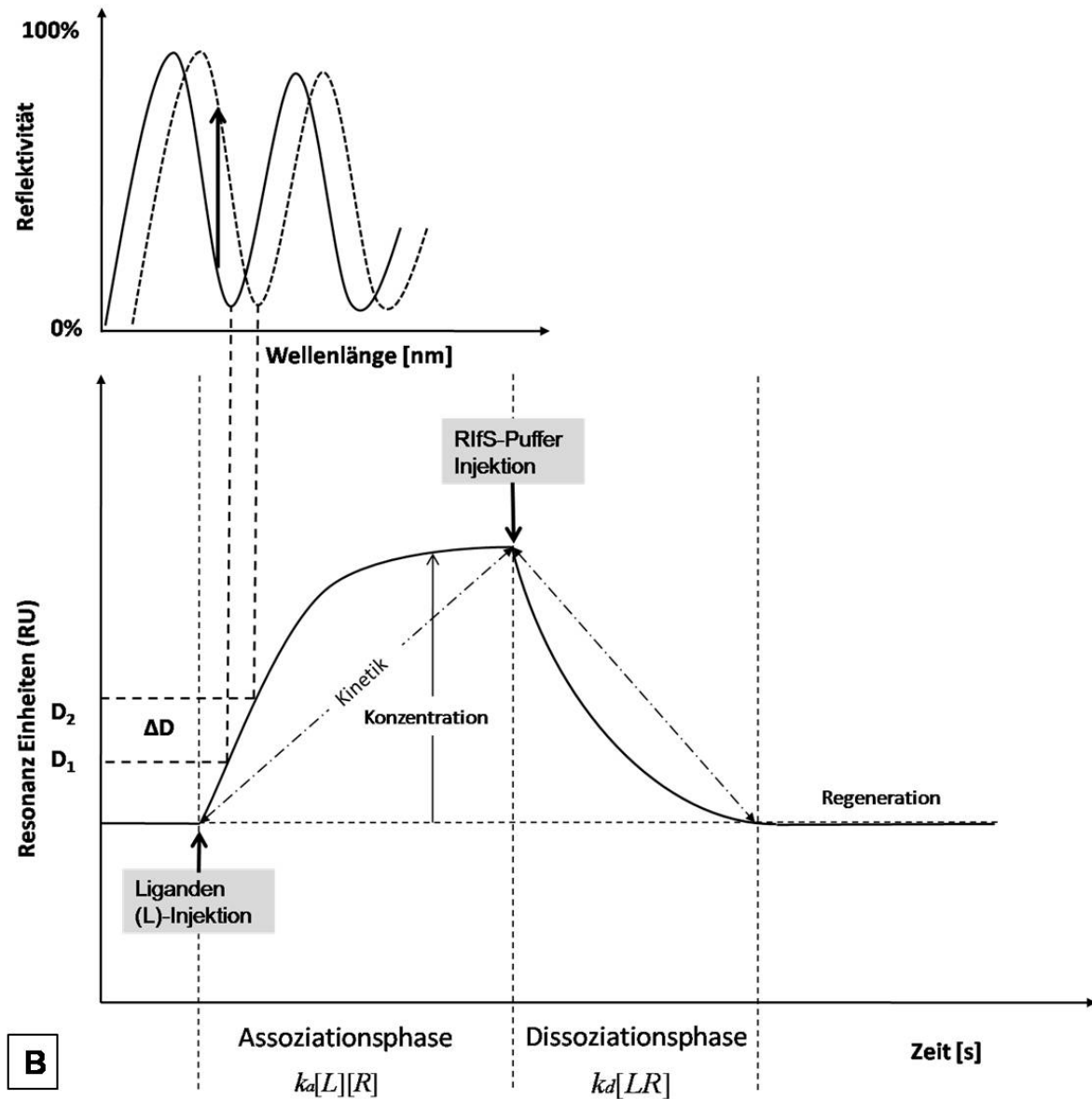
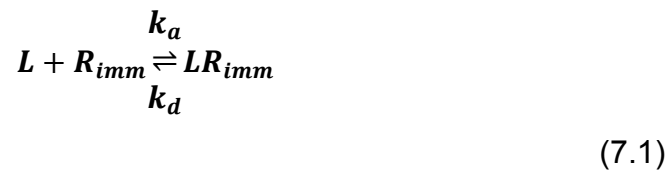


Abb. 6-1: **A** Das Detektionsprinzip der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) basiert auf der multiplen Reflexion an dünnen Schichten. **B** In Abhängigkeit der physikalischen Schichtdicke auf dem Sensorchip ändert sich der Gangunterschied im Interferogramm und damit die Resonanzeinheiten RU bzw. die optische Schichtdicke ΔD des Sensorgrammes in Echtzeit. Im Schema ist der zu erwartende Verlauf einer Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor dargestellt. Des Weiteren sind Injektionszeitpunkte markiert, um die möglichen kinetischen Phasen einzuleiten (L=Ligand; R=Rezeptor; k_a =Assoziationsratenkonstante; k_d =Dissoziationsratenkonstante).



7. Interpretation der Affinitätsreaktion an der aktivierten Sensoroberfläche

Ausgehend von der Bildung und dem Zerfall des bimolekularen Komplexes zwischen dem mobilen Liganden (L) und dem immobilisierten Rezeptor (R) folgt die Interaktion einer Kinetik pseudo-erster Ordnung Karlsson *et al.* ⁽¹¹⁵⁾:



Die Bildungsgeschwindigkeit des Rezeptor-Ligand-Komplexes [LR] ergibt sich aus:

$$\frac{d[LR]_{imm}}{dt} = k_a[L][R]_{imm} - k_d[LR]_{imm} \quad (7.2)$$

wobei k_a die Assoziationsratenkonstante ($M^{-1}s^{-1}$) und k_d die Dissoziationsratenkonstante (s^{-1}) ist.

Durch Einsatz von $[R]_{imm} = [R_0]_{imm} - [LR]_{imm}$ resultiert:

$$\frac{d[LR]_{imm}}{dt} = k_a[L]([R_0] - [LR]_{imm}) - k_d[LR]_{imm} \quad (7.3)$$

wobei $[R_0]_{imm}$ die Ausgangskonzentration an aktiv zu besetzenden immobilisierten R zum Zeitpunkt $t=0$ darstellt.

Die sensorische Antwort RU ist proportional zur Konzentration der Komplexbildung $[LR]_{imm}$ an der Matrixoberfläche und entspricht der Konzentration assoziierten [L] ⁽¹¹⁶⁾. So ist auch das maximale Signal $RU_{max}(t)$

proportional zur Oberflächenkonzentration an aktiven $[R_0]_{imm}$ auf der Matrixoberfläche.

Durch Umwandlung folgt:

$$\frac{dRU(t)}{dt} = k_a C_0 (RU_{max} - RU(t)) - k_d RU(t) \quad (7.4)$$

bzw.

$$\frac{dRU(t)}{dt} = k_a C_0 RU_{max} - (k_a C_0 + k_d) RU(t) \quad (7.5)$$

wobei $dRU(t)/dt$ die Bildungsrate des auf der Oberfläche gebundenen [LR]-Komplexes, C_0 die injizierte Konzentration an L, RU_{max} die sensorische Antwort maximaler Bindung an immobilisierte [R] sind und $(RU_{max}-RU(t))$ entspricht der Anzahl noch unbesetzter Bindungsstellen an der Oberfläche zum Zeitpunkt (t).

Aus Gleichung (7.5) ergibt sich nach dem Auftragen von $dRU(t)/dt$ gegen RU eine Steigung k , definiert als $k=k_a C_0$. Wenn die Konzentration C_0 im Durchfluss konstant bleibt, gilt die oben beschriebene Kinetik pseudo-erster Ordnung:

$$RU(t) = RU_{max} e^{-kt} \quad (7.6)$$

Der auswertbare Bereich für eine sinnvolle Bestimmung der Assoziationsratenkonstante ist durch die Anpassung dieser Exponentialfunktion an die Bindungskurve limitiert. Bei exponentiellem Verhalten der Bindungskurve ergibt sich bei Auftragung von der Ableitung von $RU(t)/d(t)$ gegen $RU(t)$ eine Gerade. Diese zeigt den Bereich an, in dem die Bindungskurve mit dem Modell der Kinetik pseudo-erster Ordnung übereinstimmt^{(117) (118)}.

8. Zielsetzung

Im Rahmen verschiedener Klonierungsprojekte und deren entsprechender Analytik sollen folgende Ziele erreicht werden:

Die Integration von kurzen Peptidsequenzen in den Bakterioopsin (BOP)-COOH-Terminus für die Interaktion mit Liganden. Dabei entfällt die Kopplung von chemischen Ankerstrukturen und der Prozess wird auf eine Ein-Schritt-Reaktion reduziert. Des Weiteren ist eine gesteigerte Bindungseffizienz gegenüber dem Wildtyp zu erwarten.

Die Koexpression von chimären löslichen Proteinen bzw. Domänen im BOP-COOH-Terminus zur einfachen Reinigung und Abtrennung dieser auf dem Templat Purpormembran. Erweiternd bietet sich die Möglichkeit der Durchführung von Strukturuntersuchungen, Aktivitätstests und Mutationsstudien.

8.1. Integration einer Argininsequenz

Nach Substitution einer Teilsequenz des BOP-COOH-Terminus durch sieben Arginine zu BOP/ARG₍₇₎, soll diese als Erkennungsmotiv für Biphosphat-Pinzetten (BP) ⁽¹¹⁹⁾. Die biomolekulare Interaktion (BIA) soll mittels Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie (RIfS) analysiert und interpretiert werden.

8.1.1. Wechselwirkung zwischen immobilisierten Biphosphat-Pinzetten (BP) und den Guanidylgruppen von Argininen

Die synthetische Biphosphatpinzette, „*arginine fork*“ basiert als biomimetisches Molekül auf der Leitstruktur molekularer RNA-Proteinerkennung des AIDS Virus ⁽¹²⁰⁾ ⁽¹²¹⁾. Die molekularen Pinzetten bilden spezifisch mit den primären Aminen einer Guanidylgruppe über ihre P=O Gruppen einen Chelatkomplex aus, der durch ein planares Netzwerk elektrostatischer Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird (Abb. 8-1) ⁽¹²²⁾ ⁽¹¹⁹⁾. Die Biphosphatgruppen sind über Stearylsäurereste in einen Stearyl-Oleyl-Phosphatidycholin (SOPC)-Bilayer inkorporiert.

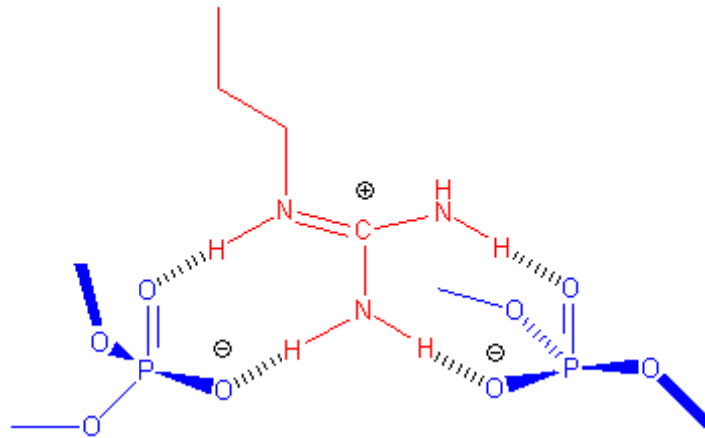


Abb. 8-1: Bildung eines Chelatkomplexes über die P=O Doppelbindung zwischen den Biphosphatgruppen einer molekularen Pinzette (blau) und der Guanidylgruppe von Arginin (rot) unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken und elektrostatischen Wechselwirkungen ⁽¹¹⁹⁾.

8.1.2. Interaktionsanalyse der biomolekularen Wechselwirkung zwischen Purpormembranspezies (PM-BOP/Arg₍₇₎; PM-BOP-WT) und Biphosphat-Pinzetten mit Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie (RIfS).

Folgender Interaktionsverlauf ist zwischen der Purpormembranmutante (PM) PM-BOP/Arg₍₇₎ und den Biphosphatgruppen der Pinzetten (BP) zu erwarten (Abb. 6-1, B):

Nach Aktivierung des Sensorchips mit dem BP dotierten Bilipid-Layer und neuem Nullabgleich sollte es nach einmaliger Injektion der Purpormembran (PM) in das Flusssystem zu einer Assoziation ($k_a[PM][BP]$) an die freien BP-Gruppen kommen, welche in einem Sättigungsplateau ($[PMBP]$) endet.

Nach dem Erreichen des Sättigungsplateaus wird mit RIfS-Laufpuffer nachgespült, um nicht gebundene PM-Fractionen vom aktivierten Sensorchip zu entfernen und eine mögliche Dissoziation ($k_d[PMBP]$) bis hin zur vollständigen Regeneration der Matrix einzuleiten. In diesem Fall sind alle BP-Bindungsstellen wieder regeneriert.

PM-BOP-WT wird für Referenzmessungen verwendet.

Weitere Referenzmessungen werden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Unter Austausch des RIfS-Puffers durch ent. H₂O, dh. Beeinflussung der Salzkonzentration und des pH-Wertes, für eine mögliche Affinitätsveränderung.

- Mit undotiertem (ohne BP-Pinzetten) SOPC-Layer, zum Ausschluss einer einfachen hydrophoben Integration von PM, durch Membranfusion.

8.1.3. Kinetische Beschreibung und Interpretation der Assoziationsreaktion auf der Sensoroberfläche

Ein weiterer Aspekt ist die kinetische Beziehung der PM-Mutante und der PM-BOP-WT zu den Biphosphatgruppen. Erwartet wird eine verbesserte Affinität der Mutante gegenüber dem WT. Dazu soll jeweils die Assoziationsratenkonstante k_a ermittelt und verglichen werden.

8.2. Integration von Peptidsequenzen zur Nanopartikelsynthese

Bestimmte Proteine dienen als Templat für die kontrollierte Abscheidung und das Wachstum anorganischer Substanzen *in vitro* ⁽¹²³⁾. In dieser Studie sollen Peptidsequenzen in den BOP-COOH-Terminus integriert werden, die zur Synthese von Silber- und Cobalt-Platin Nanopartikel dienen.

8.3. Integration des „*Peptide Carrier Proteins*“ (PCP; T-Domäne) für die nichtribosomale Peptidsynthese

Bei der nichtribosomalen Peptidsynthese (NRPS) ⁽¹²⁴⁾ ist keine mRNA als Matrize nötig, da große, modular (bis zu 1000 AS) aufgebaute Multienzymkomplexe selbst die Rolle der Matrize übernehmen und die Elongation ähnlich einem Fließband vom N- zum C-Terminus erfolgt. Bemerkenswert ist, dass die NRPS nicht auf den Einbau der 20 essentiellen Aminosäuren limitiert ist, da die Substrate postsynthetisch verändert werden können. Im Fall des zu koexprimierenden „*Peptide Carrier Proteins*“ (PCP) handelt es sich um die Thiolierungsdomäne (T-Domäne, 80 AS) eines Modules. An der T-Domäne wird das gebundene Substrat über den kovalent an einen invarianten Serinrest gebundenen Phosphopanthetein-Kofaktor (ppan-Arm) an räumlich entfernte Domänen weitergereicht.

8.4. Integration von „*enhanced Green Fluorescent Protein*“ (eGFP)

Das grün fluoreszierende Protein (GFP; 238 AS; 26,9 kDa)⁽¹²⁵⁾ wurde aus *Aequorea victoria* isoliert. Als Abwandlung besitzt das „enhanced“ GFP eine verstärkte Fluoreszenz. Diese kommt einzig durch Autokatalyse (Ser65-Tyr66-Gly67) des Proteins zustande und benötigt deshalb keine zellspezifische Prozessierung. Zu erwarten ist allerdings, dass die hohe Salzkonzentration in *Hbt.salinarum* diesen Vorgang beeinflusst.

8.5. Anhängen von „enhanced Green Fluorescent Protein“ (eGFP) über eine Linkersequenz

In einem weiteren Klonierungsprojekt soll eGFP über eine Linkersequenz an Bakteriorhodopsin (BR) angehängt (getaggt) werden. Dazu wird das Stopp-Codon von Bakterioopsin eliminiert und ein Teil der direkt anschließenden nicht-kodierenden Vektorsequenz dient als Linkersequenz. Diese verbindet BR mit eGFP.

Der natürliche Aufbau der Purpurmembran und die damit verbundenen Eigenschaften sollen durch die genetische Veränderung des BOP-COOH-Terminus nicht beeinflusst werden.

Entscheidend ist, ob die genannten chimären Fusionsproteine und Peptidsequenzen unterschiedlicher Länge und Ladung im BOP-COOH-Terminus oder an diesen angefügt in *Hbt.salinarum* transformiert, rekombiniert und exprimiert werden können.

II. Ergebnisse

9. Funktionalisierung des C-Terminus von Bakteriorhodopsin

9.1. Konstruktion der Deletionsmutante SNOB_{Marburg} und Charakterisierung der verwendeten Stämme

Nach Transformation des Deletionsvektors pROB in *Hbt.salinarum* Stamm S9 und Wachstum auf mevinolinhaltigen Platten konnten aufgrund des Mevinolinresistenzgenes (Mev^r) innerhalb der Deletionskassette purpurne Einzelkolonien selektiert werden. Da pROB sich nicht autonom replizieren (fehlender Replikationsursprung für *Hbt.salinarum*, ori⁻), sondern nur homolog rekombinieren kann (Abb. 5-1), tragen positive Transformanten sowohl die Deletionskassette als auch das Bakterioopsin-Wildtyp-Gen (*bop*). Einzelne dieser Kolonien wurden in Flüssigmedium ohne Mevinolin inokuliert. Nach mehrfacher Überimpfung wurden Aliquots auf Vollmediumplatten aufgebracht, bebrütet und anschließend einzelne, nicht purpurne, Kolonien auf Vollmediumplatten mit und ohne Mevinolin parallel angeordnet (Abb. 9-1). Im Ergebnis wuchsen Klone mit integrierter Mev^r -Resistenzkassette auf beiden Platten. Klone, welche die Resistenzkassette „verloren“ hatten, überlebten nur auf Platten ohne Mevinolin. Diese wurden gepickt und in Flüssigmedium inokuliert. Daraufhin konnte nach genomischer DNA Präparation und PCR-Prüfung (Abb. 9-2) die Etablierung von SNOB_{Marburg} bestätigt werden.

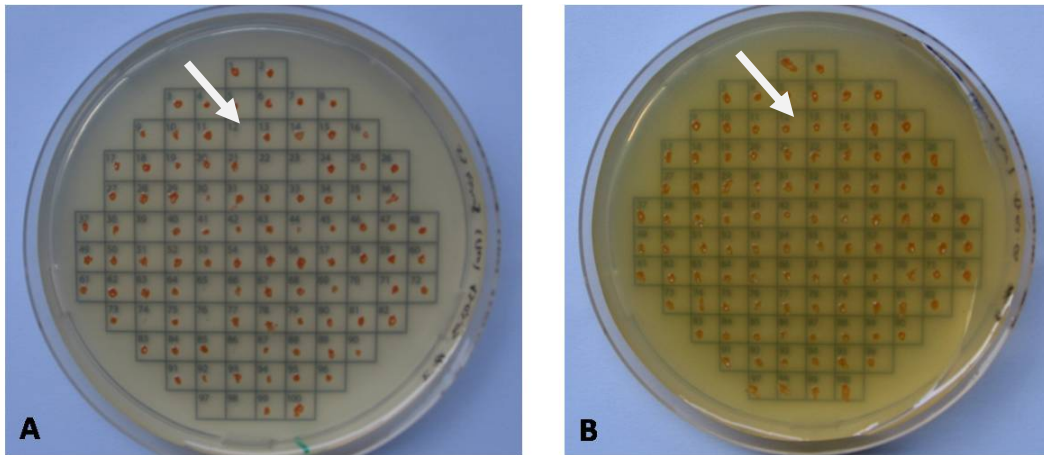


Abb. 9-1: Selektion von Einzelklonen (Pfeil), ohne Deletionskassette. Nach paralleler Anordnung von Einzelklonen und einwöchiger Inkubation zeigen vereinzelt Klone auf mevinolinhaltigem Medium (**A**) kein Wachstum im Vergleich zur Vollmediumplatte (**B**). Diese Klone haben nach Desintegration der Deletionskassette aus dem Genom, die Resistenz gegenüber Mevinolin verloren.

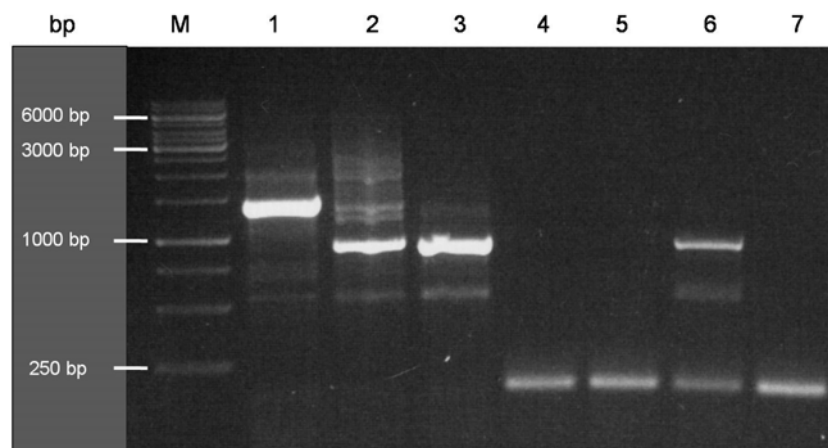


Abb. 9-2: PCR auf halobakterieller genomischer DNA mit flankierenden Primern für den codierenden Bereich des Bakterioopsingens (*bop*) *bopseq* und *boprev* (72 bp up- und 82bp downstream von *bop*). **M:** 1 kb Leiter (Angabe in bp), **1:** L33 Bande bei 1463 bp aufgrund 520 bp Insertionselementes (ISH2), **2:** S9 (WT; 943 bp), **3:** R1 (WT; 943 bp), **4:** SNOB (*bop* deletierte Sequenz; 169 bp), **5:** SNOB_{MARBURG} (reproduzierter Deletionsstamm, 169 bp), **6:** SNOB_{MARBURG} nach Transformation mit *pUS-Mev-bop-arg*₍₇₎ („Deletionsbande“ bei 169 bp und Bande resultierend vom Integrationsvektor *pUS-Mev-bop-arg*₍₇₎ mit 940 bp).

9.2. Integration einer Argininsequenz als Erkennungsmotiv für Biphosphatpinzetten: Konstruktion von *pUS-Mev-bop-arg₍₇₎*

Das *pUS-Mev-bop-arg₍₇₎* Konstrukt wurde durch gerichtete Mutagenese am Bakterioopsin-Gen (*bop*) unter Verwendung von *pUS-Mev*⁽¹²⁶⁾ und Phusion™ Hot-Start High-Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs® Inc., Frankfurt Main, Germany) generiert.

Die erste PCR-Stufe wurde mit folgenden Primerpaaren durchgeführt:

IF-*BamHI*seq und *arg₍₇₎AvrII*rev, sowie IF-*HindIII*rev und *arg₍₇₎NdeI*seq. *arg₍₇₎NdeI*seq und *arg₍₇₎AvrII*rev beinhalten die sieben Arginin kodierende Nukleotidsequenz für den C-terminalen Teil von BOP. Beide PCR-Produkte wurden über ein DNA-Gel gereinigt und als Template für eine zweite flankierende Primer Verlängerung benutzt (IF-*BamHI*seq und IF-*HindIII*rev). Das amplifizierte Endprodukt wurde mit dem In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit (Takara Bio Europe/ Clontec, France) in den Ziel-Suizidvektor *pUS-Mev* rekombiniert (Abb. 44-1).

9.3. Integration von Templatstrukturen zur Nanopartikelsynthese in den C-Terminalen Teil von BOP: Konstruktion von *pUS-Mev-bop-ag₄*, *pMKK₁₀₀-bop-ag₄*, *pUS-Mev-bop-co₃-p₁* und *pMKK₁₀₀-bop-co₃-p₁*

Die erfolgreiche Mutagenese durch die zwei-stufige PCR ging von *pUS-Mev* als Templat aus. Die mit den Primerpaaren *ag4NdeI*seq+HXREV und *ag4AvrII*rev+HXSEQ (*bop-ag₄*; Abb. 44-2), sowie *co3-p1NdeI*seq+HXREV und *co3-p1AvrII*rev+HXSEQ (*bop-co₃-p₁*; Abb. 44-3) amplifizierten Produkte wurden über ein DNA-Gel gereinigt und als Template für eine zweite flankierende Primer Verlängerung benutzt (HXSEQ und HXREV). Die Produkte wurden in den Ziel-Suizidvektor *pMKK₁₀₀* (Abb. 44-8) mit T4 Ligation über die Restriktionsschnittstellen von *BamHI* und *HindIII* integriert. Dieser besitzt als Erweiterung für die Selektion noch ein weiteres Markergen (neben der Resistenz gegenüber Lovastatin® (Mevinolin)) *bgaH*, kodierend für die halophile β -Galactosidase⁽¹¹³⁾⁽¹²⁷⁾.

9.4. Konstruktion von *pHUS-brfus(MCS)-bop-pcp* und *pMKK₁₀₀-bop-pcp*

Mittels des flankierenden Primerpaares *pcpBstEIIseq+pcpBgIIIrev* wurde auf dem Templatvektor TyC3 das *pcp* amplifiziert und nach Restriktion mit BstEII und Bgl II in die „Multiple Cloning Site“ von *pHUS-brfus-MCS*⁽¹⁰²⁾ ligiert. Anschließend wurde *bop-pcp* in *pMKK₁₀₀* (Abb. 44-4) über die sequentiellen Restriktionsschnittstellen von BamHI und HindIII integriert.

9.5. Konstruktion von *pUS-Mev-bop-egfp* und *pMKK₁₀₀-bop-egfp*

Die Amplifikation von *egfp* erfolgte aus *pUAST* durch die flankierenden Primer *egfpAvrIIseq* und *egfpNdeIrev*. Nach Restriktion mit AvrII+NdeI erfolgte eine T4-Ligation in *pUS-Mev* und *pMKK₁₀₀* (Abb. 44-5).

9.6. Konstruktion von *pUS-Mev-bop-linker-egfp* und *pMKK₁₀₀-bop-linker-egfp*

Zur Konstruktion wurden zwei Klonierungsschritte benötigt:

Erstens die Erzeugung eines „knockouts“ des Stopp-Codons (TGA) in *bop* mit Integration einer Restriktionsschnittstelle für KasI. Zweitens wurde auf dem Template des *pUAST*-Vektors über das flankierende Primerpaar *pUASTegfpKasIseq+pUASTegfpHindIIIrev* die codierende *egfp*-Sequenz amplifiziert. Anschließende Restriktion mit KasI+HindIII und eine T4-Ligation führten zu den Targetvektoren *pUS-Mev-bop-linker-egfp* und *pMKK₁₀₀-bop-linker-egfp* (Abb. 44-6).

9.7. Konstruktion von *pEF-bop-egfp*

Weiterhin wurde im Vektor *pEF-D85N*⁽¹⁰⁶⁾ das vorhandene *bop-D85N* durch *bop-egfp* substituiert. Mit der Transformation des Ursprungsvektors *pEF-D85N* zeigten sich nach Expression der Purpurmembran mit punktmutierten Bakteriorhodopsinmonomeren (D85N) blaue Klone. Nach erfolgreicher Substitution des *bop-D85N* mit *bop-egfp* blieben die zu erwartenden purpurnen Kolonien aus (Abb. 44-7).

Minipräparationen der Vektoren wurden mit diagnostischen Verdauungen an entsprechenden Restriktionsschnittstellen verifiziert. Am Beispiel von *pUS-Mev-bop-arg₍₇₎* erfolgte der spezifische Verdau mit den Restriktionsenzymen NheI+HindIII (im Doppelverdau, D), AvrII (A) und NdeI (N) (Abb. 9-3). Zur Negativkontrolle diente der unveränderte Ursprungsvektor *pUS-Mev* und das PCR Fragment (Insert) zur Positivkontrolle (Restriktion je mit (A) und (N)).

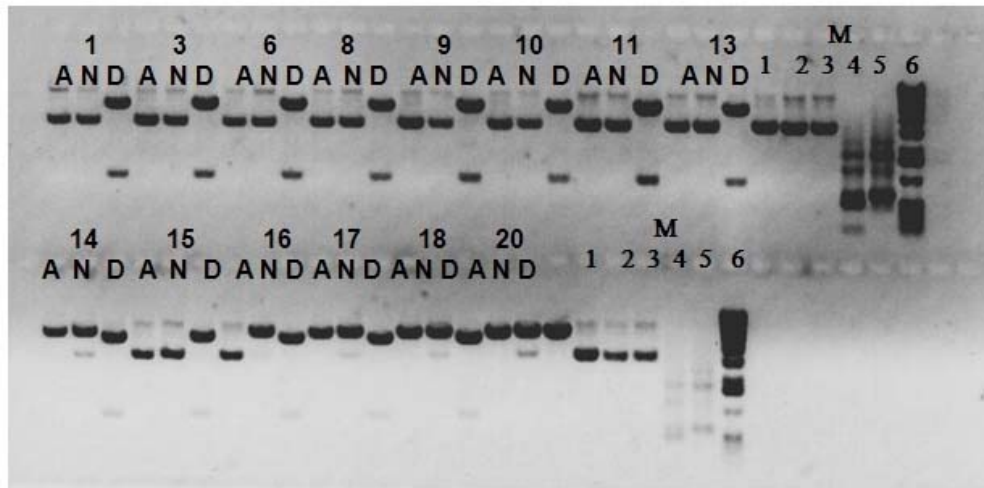


Abb. 9-3: Diagnostische Restriktion von Minipräparationen (1-20) zur Identifizierung des geforderten Vektors *pUS-Mev-bop-arg₍₇₎* mit der substituierten Argininsequenz. Verifizierung mit AvrII (**A**) und NdeI (**N**), NheI+HindIII (Doppelverdau, **D**), (**M**) Negativkontrolle 1: *pUS-Mev*, 2: *pUS-Mev* (**A**), 3: *pUS-Mev* (**N**), 4: PCR-Fragment (**A**), 5: PCR-Fragment (**N**), 6: 1kb Ladder.

Nach Transformation der Konstrukte in den *bop* defizienten Deletionsstamm SNOB_{MARBURG} wurde im Ergebnis eine erfolgreiche Expression des Konstruktes *pUS-Mev-bop-arg₍₇₎* erreicht (Abb. 9-2, Spur 6). Für die weiteren Konstrukte konnte zumindest die erfolgreiche Transformation über die halophile β -Galaktosidaseaktivität (*bgaH*-Gen; Blaue-Kolonien) und PCR auf genomischer halophiler DNA festgestellt werden.

10. Isolierung und Analyse der exprimierten Membranfraktionen PM-BOP/ARG₍₇₎

10.1. Saccharosegradient und Zonale-Ultrazentrifugation

Die Abtrennung der Purpurmembran (PM) nach dem Zellaufschluss durch Dialyse als eigene Phase gegenüber roter Membran und Zellbestandteilen erfolgte über einen Vier-Phasen-Saccharosegradienten⁽⁴³⁾.

In Abb. 10-1 (A, B) sind bei PM-BOP/ARG₍₇₎ nach Zonaler-Ultrazentrifugation im Dichtegradienten eine obere Phase und ein Pellet entstanden. Im analytischen Gradientenvergleich zu PM-WT besitzt die obere Phase PM-BOP/ARG₍₇₎ ebenfalls eine Schwimmdichte von $1,18 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (Abb. 10-1, C).

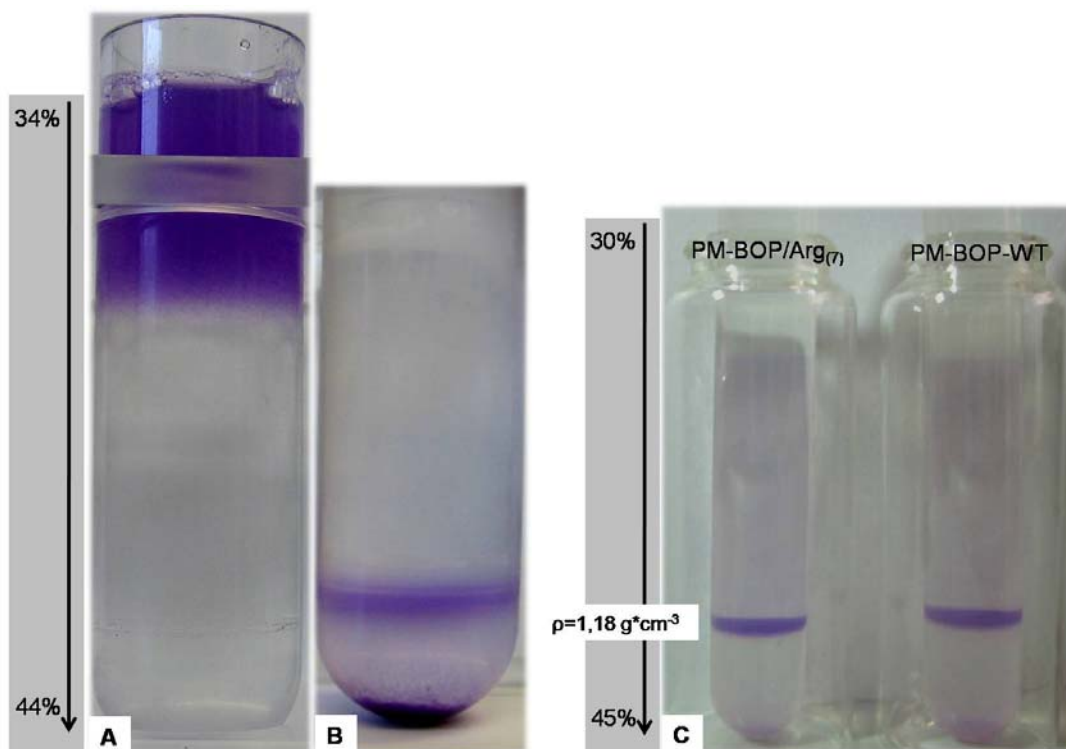


Abb. 10-1: (A, B) Reinigungsgradient von PM-BOP/ARG₍₇₎ vor und nach Zonaler-Ultrazentrifugation. Es entsteht eine obere Phase und ein Pellet. C Nach analytischer Ultrazentrifugation der oberen Phase, besitzt diese im Vergleich zum Wildtyp (PM-BOP-WT) ebenfalls eine Dichte von $\rho=1,18 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

11. Kontrolle der Membranfraktionen mit SDS-Gelelektrophorese

Von Dichtegradientenzentrifugation gereinigten Membranfraktionen wurden 400 µg einem denaturierenden Lauf im SDS-Gel unterzogen, mit Coomassie-Brilliant Blue gefärbt und geblottet (Western-Blot). Im Gel zeigten sich Proteinbanden zwischen 20 und 27 kDa auf gleicher Höhe.

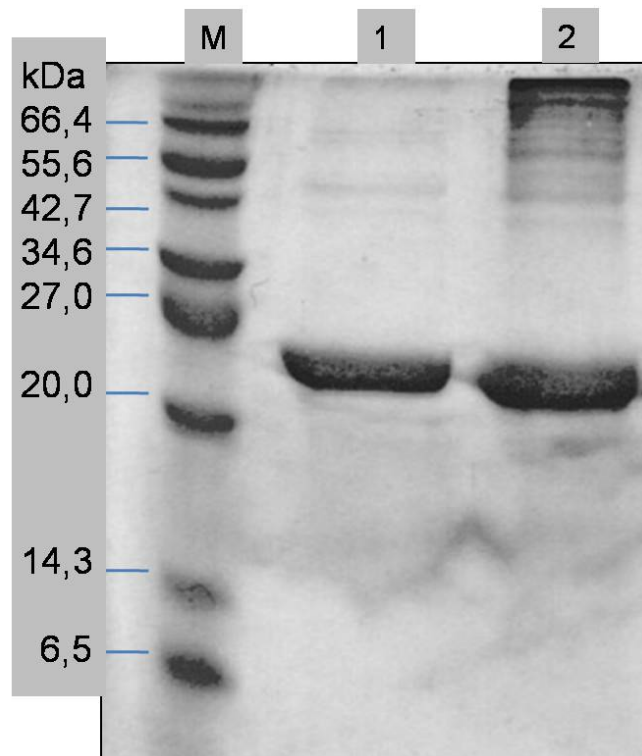


Abb. 11-1: SDS-Gelelektrophorese nach Coomassie-Brilliant Blue Färbung von **M**: Marker, **1**: Referenz PM-BOP-WT und **2**: PM-BOP/ARG₍₇₎ (15%iges Gel). Es entstehen im denaturierenden Lauf Proteinbanden zwischen 20 und 27 kDa auf gleicher Höhe (BOP-WT bekannt 26783,6 Da).

12. UV-VIS Analytik

Für die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der isolierten Purpurchromophoren (PM) wurden mit dem UV-Vis-Zweistrahlspektrometer (Lambda35, Perkin Elmer) Absorptionsspektren im Bereich von 200-800 nm aufgenommen. Der verwendete Extinktionskoeffizient für den B-Zustand von lichtadaptierter WT-Membran ist $62700 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ein OD-Wert von 1 entspricht dem empirisch ermittelten Wert von $0,56956 \text{ mg/mL}$ ($15,494 \text{ nmol/mL}$; ⁽¹²⁸⁾). Das gezeigte Absorptionsspektrum (Abb. 12-1, A) der aus 4 Litern Kultur nach 7-10 Tagen gesamt exprimierten Purpurchromophoren PM-BOP/ARG₍₇₎ zeigt bei 280 nm eine OD von 2,40 (Tryptophan, TRP, W) und bei 570 nm eine OD=1,22. In diesem Fall konnten nach Expression und Isolation der PM-BOP/ARG₍₇₎ $0,69 \text{ mg/mL}$ ($18,9 \text{ nmol/mL}$) für die weitere Analytik gewonnen werden. Die Bestimmung der Reinheit (R) wird über das Verhältnis der Absorption von Protein (280 nm) zur Absorption des Retinals (570 nm) ermittelt.

In der vorliegenden Messung beträgt $R = (280 \text{ nm}) / (570 \text{ nm}) = 1,96$. Für die Funktionsanalyse des Retinals wurde die Membran mit einer Halogenlampe für 5 min lichtadaptiert (LA), d.h. Photoisomerisierung des an Lysin-216 gebundenen Retinals von all-trans nach 13-cis und Absorption bei 570 nm (Abb. 12-1 B, LA). In Dunkeladaptation (DA) konnte bei aufgenommenen Messungen in Abstand von jeweils einer Stunde, der Übergang retinaler Reversion in Richtung (548nm) all-trans beobachtet werden.

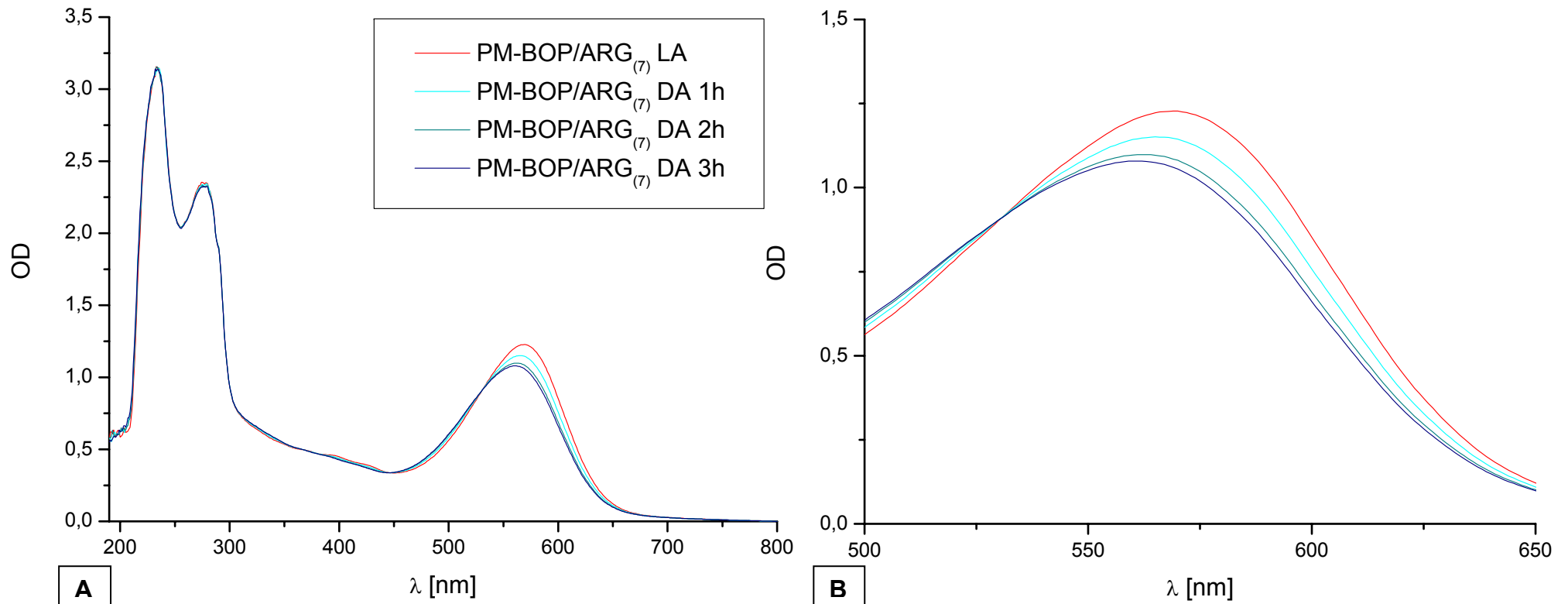


Abb. 12-1: **A** Gesamtspektrum der gewonnenen Purpurmembran PM-BOP-ARG₍₇₎ mit einer OD₂₈₀ von 2,40 (Tryptophan, TRP, W) und OD₅₇₀ von 1,22. Unter Einbezug der Umrechnungsfaktoren (OD 1=0,56956 mg/mL bzw 15,494 nmol/mL) konnten 0,69 mg/mL (18,9 nmol/mL) für die weitere Analytik gewonnen werden. **B** Ausschnitt von 500-600 nm zur Überprüfung der Reisoomerisierung des lichtadaptierten (LA) Retinals von 13-cis in den all-trans Zustand über drei 3h Dunkeladaptation (DA).

13. Massenspektrometrie

13.1. ESI-TOF-MS (positiv Modus): Massenspektrum

In Abb. 13-1 sind die Massenspektren von A Bakterioopsin-Wildtyp (BOP-WT) und B der Substitutionsmutante BOP/Arg₍₇₎ gegenüber gestellt. Unter Einsatz von 20 nmol Purpurchromophor gibt die Reihe der m/z-Peaks die Ladungsverteilung detektierter Moleküle bei gleichen Geräteparametern wieder. Auffällig ist die geringe Intensität der Signale der Mutante trotz gleicher Probenvorbereitung (m/z, cps 24 fach geringer).

13.2. ESI-TOF-MS (positiv Modus): Rekonstruktion der molaren Masse

Für die zu erwartenden theoretischen durchschnittlichen molaren Massen wurde im Fall von BOP-WT der bekannte Wert ⁽¹²⁹⁾ von 26783,6 Da und für BOP/Arg₍₇₎ der mittels PeptideMass (ExpASY Home page) kalkulierte mittlere Wert von 27283,3 Da den gemessenen Werten gegenübergestellt.

Die Rekonstruktion der gemittelten molaren Massen zeigt einen Hauptpeak der BOP-WT-Probe bei 26782,0 Da und vier weitere kleinere Peaks bei 26763,0 Da, 26802,0 Da, 26821,0 Da und 26843,0 Da. Die BOP/Arg₍₇₎-Probe weist einen Hauptpeak bei 27277,0 Da und drei kleinere Nebenpeaks bei 27316 Da, 27350,0 Da, 27384,0 Da auf. Die Peaks unterscheiden sich annähernd im Abstand von 22 Da.

Gegenüber den berechneten Werten zeigt BOP/WT eine Abweichung von minus 1,6 Da und BOP/Arg₍₇₎ von minus 6,3 Da.

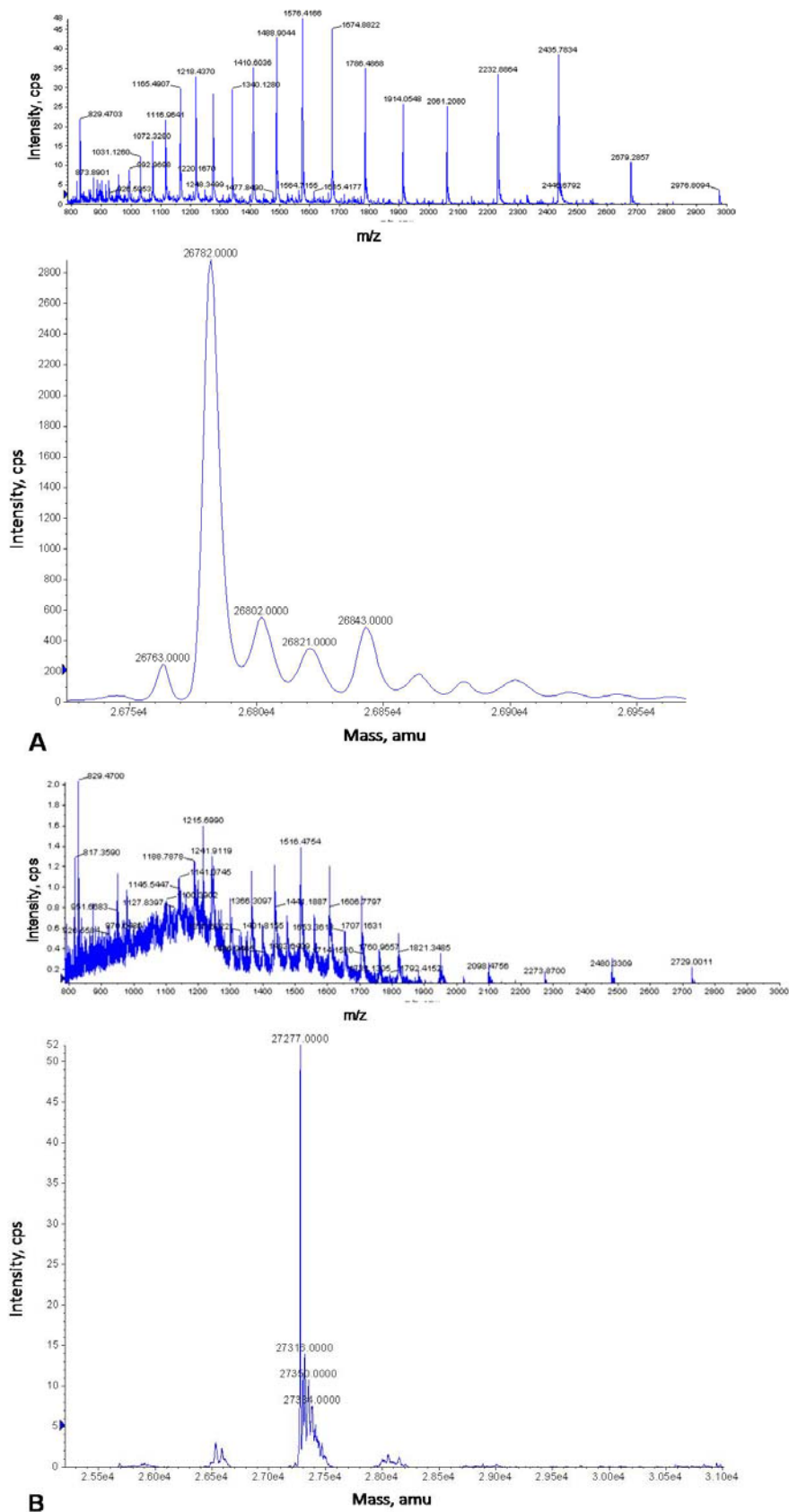


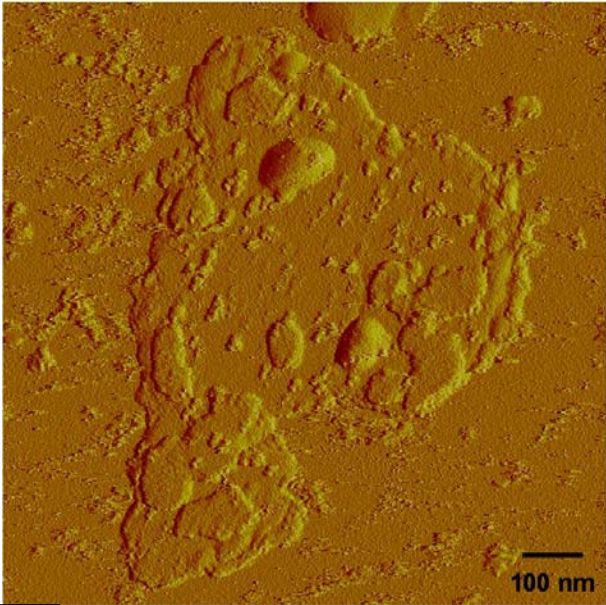
Abb. 13-1: ESI-TOF-MS (positiv Modus) Messungen: Massenspektrum (oben) und Rekonstruktion (unten). **A** Bacterioopsin Wildtyp (BOP-WT) mit 26782,0 Da und **B** Bacterioopsin Mutante BOP/ARG₍₇₎ mit 27277,0 Da.

14. Rasterkraftmikroskopie

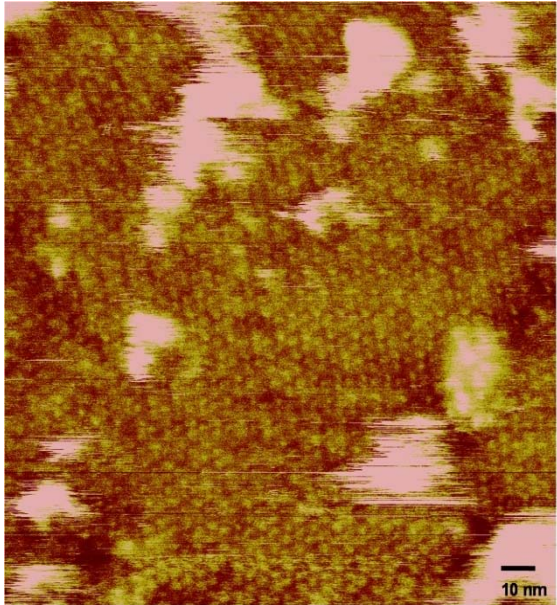
Mit dem Rasterkraftmikroskop (*atomic force microscope*, AFM) konnte die native Oberflächenstruktur der Purpormembranmutante PM-BOP/ARG₍₇₎ beobachtet werden (Abb. 14-1; Aufnahmen von Schranz, M. (2009), mit freundlicher Genehmigung). In der AFM Topologie (Abb. 14-1, B) ist ersichtlich, dass sich einzelne Bakteriorhodopsinmoleküle zu Trimeren anordnen. Diese ordnen sich wiederum zu einem hexagonalen Gitter an.

Vorzufinden sind im Gegensatz zu typischen PM-BOP-WT Aufnahmen über die Membranoberfläche verteilte Auflagerungen. Durch Höhenmessungen konnte dies bestätigt werden (Abb. 14-1, C). Im Vergleich zur nativen Membran (5,2 nm) verdoppelte sich die Schichtdicke in den Bereichen der Auflagerung (10,4 nm).

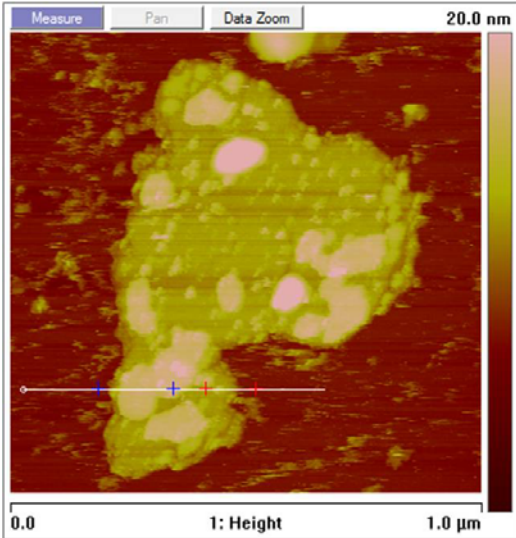
Im kraftspektroskopischen Experiment (Abb. 14-1, D) wurde unter kontrollierter Entfaltung der Bakteriorhodopsinmoleküle festgestellt, dass die beobachtete Membran mit der cytosolische Seite nach oben gerichtet war⁽¹³⁰⁾.



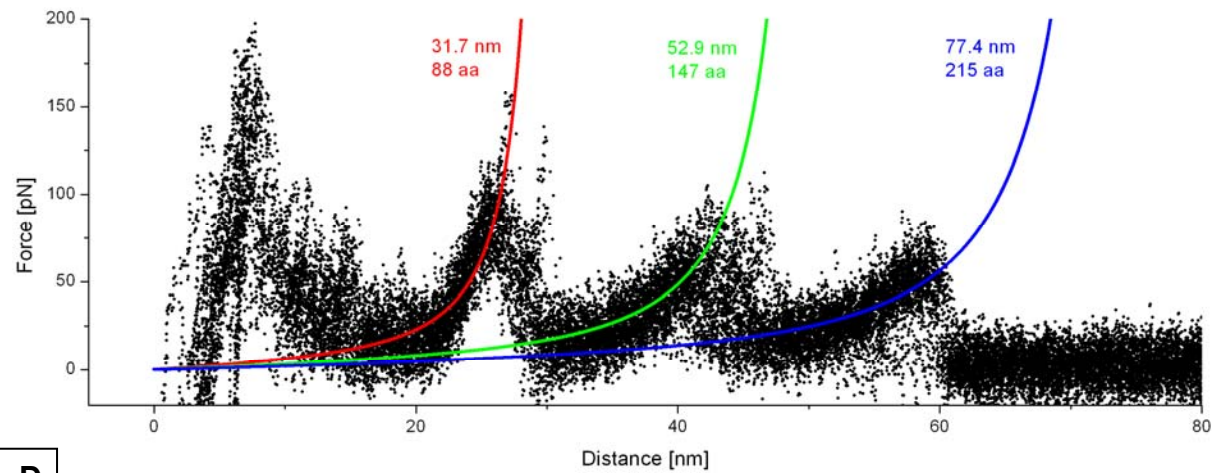
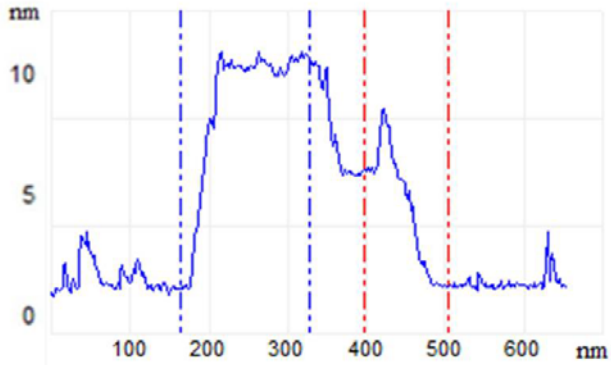
A



B



C



D

Abb. 14-1: Rasterkraftmikroskopische (*atomic force microscopy*, AFM) Untersuchungen der Purpurmembranmutante PM-BOP/ARG₍₇₎ (Aufnahmen von Schranz, M. (2009), mit freundlicher Genehmigung). **A** Die AFM-Topologie zeigt eine native Oberfläche der Purpurmembranmutante PM-BOP-ARG₍₇₎. Auffällig sind vielfache Auflagerungen **B** Die Bakteriorhodopsinmoleküle sind zu Trimeren in einem hexagonalen Gitter angeordnet. **C** Die Schichtdicke ist in den Bereichen der Auflagerung im Vergleich zur nativen Membranhöhe (5,2 nm, blaue Linien) verdoppelt (10,4 nm rote Linien). **D** Kraftspektroskopisch kontrollierte Entfaltungsexperimente an BR-Monomeren bestätigen die cytoplasmatische Ansicht der PM.

15. Biosensorik: Reflektometrische Interferenz Spektroskopie (RIfS)

15.1. Interaktion zwischen Purpurmembranspezies und Biphosphat-Pinzetten

Gemessen wurden Interaktionsverläufe zwischen den Purpurmembranspezies und den Biphosphat-Pinzetten im Durchflusssystem über zwei Flusszellen bei Raumtemperatur. In Abb. 15-1: sind die gemittelten Kurvenverläufe als Änderung der Resonanzeinheiten (resonance Units, RU) dargestellt. Der in Echtzeit verfolgbare analytische Verlauf bestand aus der Aktivierung des SiO₂-Sensorchips (**A**, 1-3) durch die Immobilisation (**A**, 1-2) des mit Biphosphat-Pinzetten (BP) dotierten Stearyl-Oleyl-Phosphatidylcholin Bilipid-Layers (SOPC) und anschließendem Abwaschen unspezifischer Bindungen durch Injektion von RIfS-Laufpuffer (**A**, 2) bis auf einen konstanten mittleren Wert von 3679 ± 33 Resonanz Einheiten („*resonance units*“, RU; **A**, 3). Danach erfolgte ein Nullabgleich.

Nach der Injektion von 3 nM der Purpurmembran Mutante PM-BOP/ARG₍₇₎ in RIfS-Laufpuffer (**B**, 1) zum Zeitpunkt 93 s, ließ sich bei einer Flussrate von 10 µL/min ein kontinuierlicher Anstieg auf ein Plateau mit einem mittleren Sättigungswert von 828 ± 7 RU beobachten. Bei Injektionsstopp von PM-BOP/ARG₍₇₎ (**B**, 2) nach 612 s, wurde alleinig RIfS-Laufpuffer durch die Flusszellen gespült und die RU fielen kontinuierlich auf 658 bei 709 s. Ein vollständiger Zerfall des Liganden-Rezeptor-Komplexes zwischen der PM-BOP/ARG₍₇₎ und immobilisiertem BP/SOPC konnte auch nach längerer Nachspülzeit (**B**, 2-3; 1380 s) nicht verzeichnet werden.

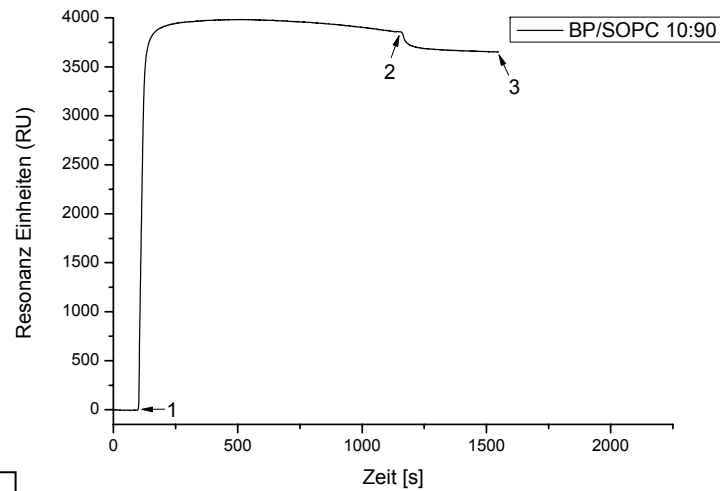
In Referenz stehende Messung von PM-BOP/ARG₍₇₎ auf SOPC zeigte bei 154 s (**B**, 1) einen geringen Anstieg auf einen mittleren Sättigungswert von 135 ± 7 RU. Nach Injektionsstopp (**B**, 2) von PM-BOP/ARG₍₇₎ mit RIfS-Laufpuffer begann ein vollständiger Abfall der RU bis 1992 s auf die Basislinie (**B**, 3).

Das Sensorgamm des Wildtypes PM-BOP-WT (3nM) zeigte mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ nach Injektion der Membran zum Zeitpunkt von (C, 1) 173 s einen abnehmenden Peak der RU auf ein Minimum von -76 (180 s), mit sofortigem Anstieg auf 440 RU. Nach Injektion des RfS-Laufpuffers (C, 2) entstand an diesem Punkt ein Peak mit einem Maximum von 528 RU (825 s), abfallend auf ein mittleres Niveau von 267 ± 12 RU.

Die Referenzmessung an SOPC ohne BP verläuft nach Injektion bei 153 s (C, 1) mit einem kurvenförmigen Anstieg bis auf 201 RU (C, 2). Nach Injektion von RfS-Laufpuffer schwankt der RU Wert um ein mittleres Sättigungsplateau von 142 ± 25 RU unverändert bis 3134 s (C, 3).

Die Veränderung der Salzkonzentration und des pH-Wertes im Austausch des RfS-Puffers gegen ent. H_2O führte zu dem Ergebnis, dass sich keine Interaktion zwischen PM und BP zeigte.

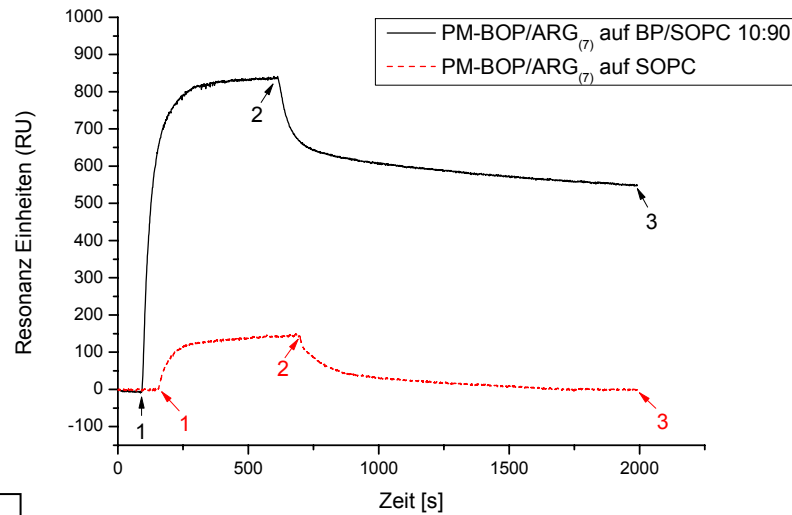
Zur Untersuchung, ob das Retinal einen Einfluss auf die Reflektion bewirkt, wurde durch Zugabe von Hydroxylamin zu den Purpurmembranspezies (PM-BOP/ $\text{ARG}_{(7)}$ und PM-WT) retinalfreie Apomembran erzeugt ⁽¹³¹⁾. Im Resultat zeigte sich kein Unterschied im Interaktionsverlauf zu den retinalgebundenen Purpurmembranspezies.



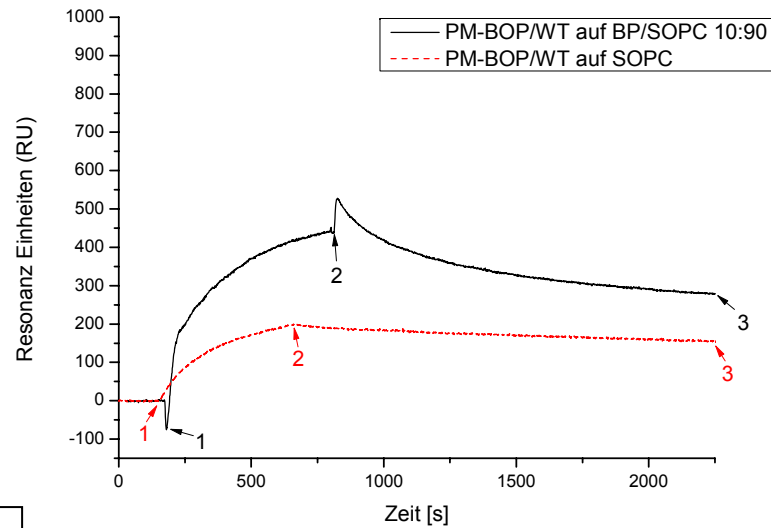
A

Abb. 15-1: Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) zwischen Biphosphat-Pinzetten (BP) und Purpurmembranspezies.

A Aufbau des mit BP dotierten Bilipidlayers. **B** Vergleich der Interaktion zwischen PM-BOP/ARG₍₇₎ mit BP (schwarze Kurve) und ohne (rote Kurve). **C** Vergleich der Interaktion zwischen PM-BOP-WT mit BP (schwarze Kurve) und ohne (rote Kurve). Signalveränderung in Resonanz Einheiten (resonance units, RU) gegen die Zeit in Sekunden (s). Zeitpunkte (schwarz und rot): 1 Injektion von entsprechendem Substrat, 2 Injektion von RfS-Laufpuffer und 3 Detektionsende.



B



C

15.2. Ansatz zu einer Beschreibung der intermolekularen Interaktion auf dem Sensorchip

In der vorliegenden Interaktion fungiert die immobilisierte Biphosphat-Pinzette (BP) als Rezeptor und die Purpurmembran (PM-BOP/ARG₍₇₎ bzw. PM-BOP-WT) als Ligand. Für eine Beschreibung des Bindungsverhaltens der Purpurmembranspezies zur Rezeptoroberfläche wurde im Folgenden versucht, eine Assoziationsratenkonstante zu bestimmen.

Der auswertbare Bereich für eine sinnvolle Bestimmung der Assoziationsratenkonstante k_a wurde durch die Anpassung der Exponentialfunktion

$$RU(t) = RU_{max}e^{-k(t-tc)} \quad (15.1)$$

an die Bindungskurve gegeben (Abb. 15-2).

Die Bindungskurven zeigten exponentielles Verhalten. Nach Auftragung der Ableitung von $dRU(t)/dt$ [s^{-1}] gegen $RU(t)$ und linearer Regression ließ sich über die Steigung die Assoziationsratenkonstante k_a ermitteln. Im Ergebnis besaß die genetisch veränderte (**A**) PM-BOP/ARG₍₇₎ eine 10fach schnellere Assoziationsrate mit 0,05 Resonanz Einheiten (RU) pro Sekunde zu den Biphosphat-Pinzetten (BP) gegenüber (**B**) PM-BOP-WT mit 0,005 RU/s. Die Schnittpunkte auf der y-Achse zeigten, dass von der Mutante maximal 16 RU/s detektiert werden (WT 1,7 RU/s).

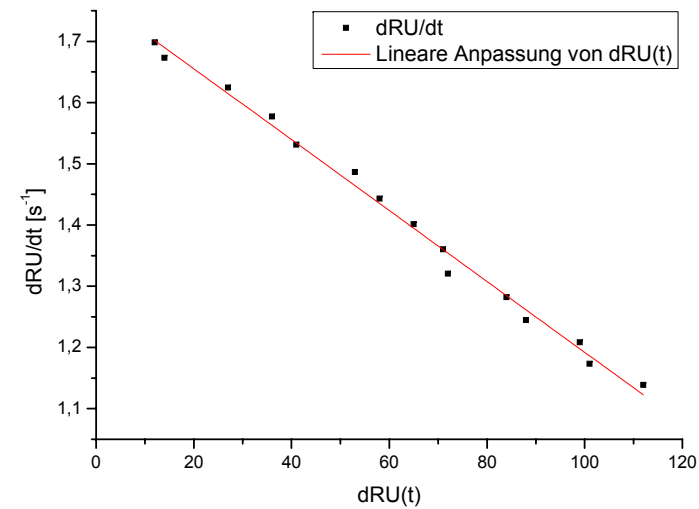
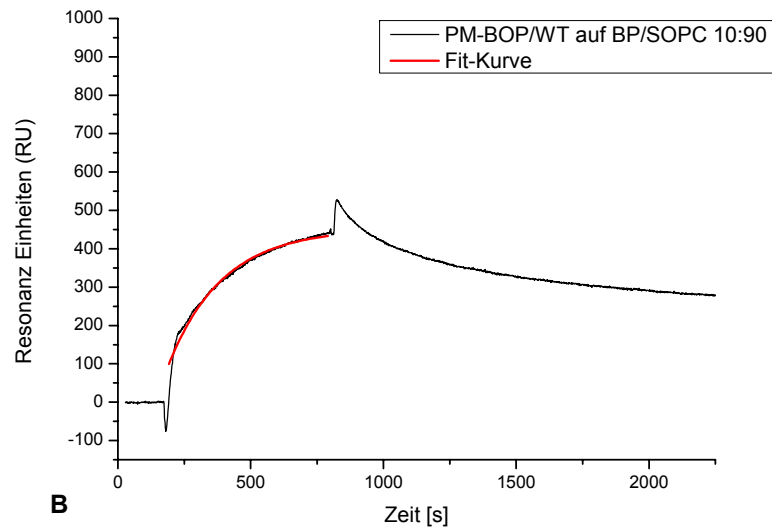
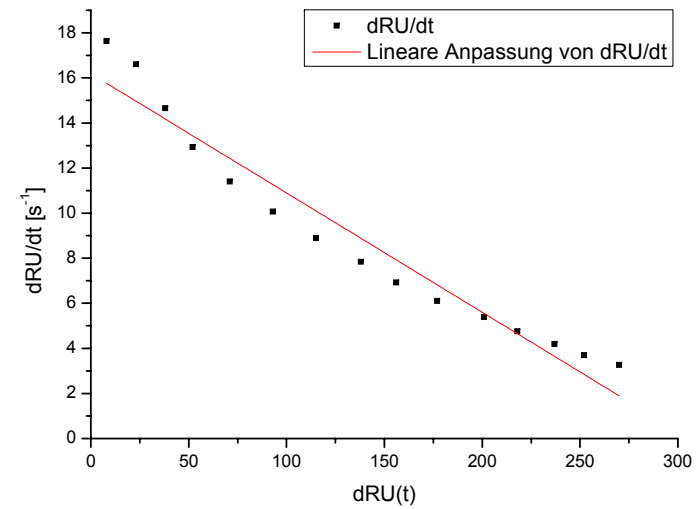
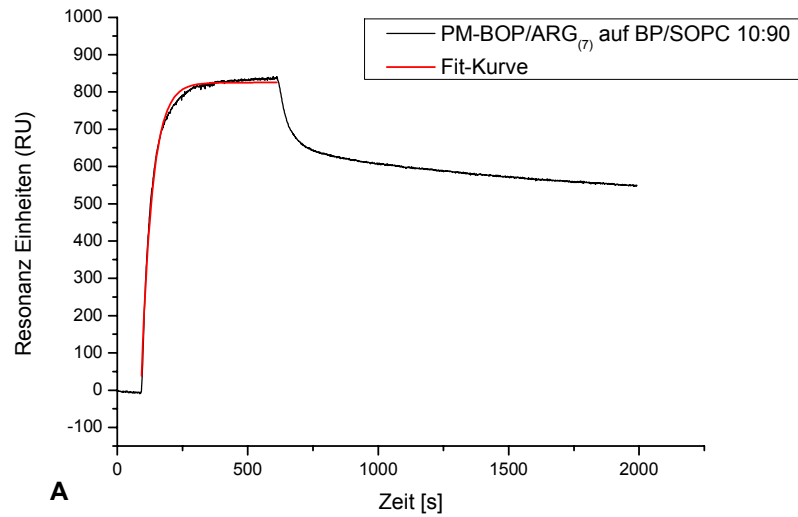


Abb. 15-2: Kinetische Analyse zur Bestimmung der Assoziationsratenkonstante k_a über die Anpassung der Exponentialfunktion $RU(t) = RU_{max}e^{-k_a(t-t_c)}$ (linearer Fit) an die Interaktionskurven von Biphosphonat-Pinzetten und **(A)** PM-BOP/ARG₍₇₎ und **(B)** PM-BOP-WT mit anschließender Ableitung $dRU(t)$ [s⁻¹] gegen $RU(t)$ und linearer Regression.

III. Diskussion

16. Gentechnische Prozessführung

Die gentechnische Prozessführung zur Integration und Fusion von kurzen Peptidsequenzen und funktionellen Proteinen bezüglich des Bakterioopsin (BOP)-COOH-Terminus und folgender Expression funktionaler Purpurmembraan konnte auf Basis ursprünglicher Erkenntnisse in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hampp etabliert und systematisiert werden. Dieser Prozess beinhaltet Klonierungsstrategien und die Erfüllung bestimmter Anforderungen an den Wirtsorganismus *Halobacterium salinarum*, sowie an sein Produkt gentechnisch veränderter Purpurmembraan (PM). Insbesondere spielt hier die besondere Handhabung und Analytik für das integrale Membranprotein Bakteriorhodopsin (BR) als Monomer und in Form der PM eine entscheidende Rolle. In diesem Punkt ist anzuführen, dass BR nur in der halobakteriellen Membran seine natürliche Funktion erhält. Weiterhin ist die trimere zwei-dimensionale hexagonale Anordnung der Monomere für die Stabilität und die Charakteristik der PM für die technische Anwendung von entscheidender Bedeutung.

Eine gentechnische Veränderung des Bakterioopsin(BOP)-COOH-Terminus bewirkt die 100%igen Derivatisierung auf der cytosolischen PM-Oberfläche.

Von den in dieser Arbeit vorgenommenen Klonierungsexperimenten zur Integration und Fusion wurden alle angefertigten und sequenzierten Konstrukte in den bakterioopsin-gen (*bop*) defizienten Stämmen SNOB, SNOB_{Marburg} und BORIS, sowie in dem ISH-tragenden Stamm L33 von *Hbt.salinarum* erfolgreich und nachweislich (Blau-Rot-Selektion und PCR) transformiert. Allerdings konnte einzig das Projekt der Integration einer Erkennungssequenz von (ARG₍₇₎) im BOP-COOH-Terminus für die Kopplung von Biphosphat-Pinzetten (BP; Kooperation mit AG Prof. Dr. Schrader) aufgrund mangelnder Expression der restlichen Konstrukte zur Analyse und Anwendung gebracht werden.

Bezüglich der Expression im bzw. am BOP-COOH-Terminus von chimärer, dh. genetisch fremder, DNA funktioneller Proteine des „Peptide Carrier Proteins“ (PCP) für die nichtribosomale Proteinsynthese und „enhanced Green Fluorescent Protein“ (eGFP) sind wahrscheinlich die Ladung, Lage und Länge der Sequenz entscheidend. Schon Pfeiffer⁽¹⁰⁷⁾ gelang die Expression eines kurzen Histidin-Taqs (HIS₍₆₎; pK_s=6) zwischen SER249 und GLU249 des BOP-COOH-Terminus. Die Integration bzw.

Fusion stark positiver Ladung in den BOP-COOH-Terminus wird durch die gelungene Expression von ARG₍₇₎ (pK_s=12,5) in dieser Arbeit untermauert. So dürfte die Integration weiterer basischer AS hinsichtlich der polaren Seitenkette und hydrophiler Eigenschaft kein Problem darstellen (z.B. Lysin pK_s=10,8).

In Untersuchungen mit erfolgreicher Expression handelte es sich um die halophilen Fusionsproteine Dihydrofolat Reduktase aus *Haloferax volcanii* (hDHFR)⁽¹⁰²⁾, Ferredoxin aus *Hbt.salinarum*⁽¹⁰³⁾ und die katalytische Untereinheit der Aspartyl Transcarbamylase von *E.coli*⁽¹⁰⁴⁾, welche auch heterogen exprimiert wurde. Die heterogene Expression in *E.coli* und Renaturierung ist möglich, doch nicht im Sinne einer stabilen Purpurmembran.

Im Falle von Nomura *et al.*⁽¹⁰⁵⁾ wurde das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) zur Anpassung an die halophilen cytosolischen Bedingungen von *Hbt.salinarum* vorher genetisch manipuliert und der GC-Gehalt gesteigert. Nach Turner *et al.*⁽¹⁰⁴⁾ sollte der GC-Gehalt des Fusionsproteins zwischen 50-70% betragen, als möglicher Faktor für die halobakterielle Polymeraseaktivität. Im Vergleich weisen die in der Arbeit fusionierten Peptid- und Proteinsequenzen aber ebenfalls einen GC-Gehalt zwischen 50-70% auf (*egfp* 61,7 %; *pcp* 55,4 %; *ag4* 66,6 %; *co3-p1* 75 %; *arg*₍₇₎ 80%). So kann dieser Aspekt verworfen werden.

Bis auf Besir, H.⁽¹⁰²⁾ wurden die Fusionsproteine über eine Linkersequenz an den BOP-COOH-Terminus fusioniert. Diese bestand bei Nomura *et al.*^{(101) (105)} aus den ersten 31codierenden Aminosäuren (AS) des halophilen Ferredoxins⁽¹³²⁾. Turner *et al.*⁽¹⁰⁴⁾ verwendet eine synthetische Peptidsequenz aus 25 AS, welche die Schnittstelle der Proteinase FaktorXA aufweist. Das Konstrukt *pUS-Mev-bop-linker-egfp* weist eine Linkersequenz von 36 AS auf, welche sogar auf genomischer halobakterieller DNA beruht. Alle anderen Konstrukte sind in den BOP-C-Terminus integriert. Stellt sich die Frage, ob die Ferredoxinteilsequenz als möglicher „Vermittler“ zwischen BOP und Fusion bzw. Integration bestehen muss? Nach Ovchinnikov *et al.*⁽¹³²⁾ und Pfeiffer⁽¹⁰⁷⁾ spielt der C-Terminus für die Expression und Funktion von BOP/BR keine Rolle. So ist auch eine posttranslationale Modifikation ausgeschlossen. Sonst wäre die Expression einer unvollständigen Chimäre zu erwarten. Des Weiteren besitzt *Hbt.salinarum* eine Reihe halophiler Proteasen. Hinsichtlich PM-BOP/ARG₍₇₎ würde die Argininsequenz für hervorragende Trypsin-Schnittstellen codieren.

Ein weiterer Aspekt für mangelnde Expression ist die Promotorstärke auf dem Expressionsvektor oder nach homologer Rekombination auf der genomischen DNA. Dagegen spricht der Fall der Expression des Wildtyp-Bacterioopsingenes als Referenz. Zudem wurden in dieser Arbeit verschiedene, bereits früher erfolgreich getestete Vektoren zur Expression eingesetzt. Unter Verwendung des Stammes L33 konnte bei allen Konstrukten nur eine Rückmutation zum Wildtyp festgestellt werden. Daher eignet sich dieser keinesfalls für solche Mutationsansätze.

17. Massenspektrometrie

Erfahrungsgemäß wurden für die Probenvorbereitung Kunststoffgefäße verwendet, um die Bildung von Natriumaddukten bei Berührung des denaturierten Proteins mit Glasoberflächen zu verhindern. In den ESI-Massenspektren erscheinen so keine größeren Schultern. Dennoch treten die zusätzlichen Peaks neben dem Hauptpeak im Abstand von annähernd 22 Da auf, d.h. es sind zu geringen Teilen Natriumaddukte im Spektrum vorhanden.

Obwohl bei der Probenvorbereitung das luftgetrocknete Proteinpellet vor Aufnahme in die Lösungsmittelkomposition (Chloroform, Methanol, ent. H₂O, Ameisensäure) sichtbar war, könnte aufgrund der substituierten stark positiven Argininsequenz (ARG₍₇₎) in den BOP-COOH-Terminus ein hoher gebundener Anteil Lipide über die polaren Kopfgruppen (negativ) verblieben sein und somit die Ionisation stören. Daher wäre die Abweichung von -6,3 Da (gemessen 27277,0 Da) gegenüber dem mittlerem theoretisch berechneten Wert (27283,3 Da) von BOP/Arg₍₇₎ über die geringe Anzahl detektierter Molekülionen (m/z gegenüber BOP-WT 24x geringer) zu erklären, da ein wesentlich schlechteres Signal- zu Rauschverhältnis vorhanden ist. Die Differenz von minus 1,6 Da bezüglich des gemessenen BOP-WT ist hinsichtlich ungenauer Kalibrierung bzw. Messungenauigkeit des Gerätes akzeptabel.

18. Rasterkraftmikroskopie

Aus den rasterkraftmikroskopischen (*atomic force microscopy*, AFM) Aufnahmen konnte eine native kristalline Membran PM-BOP/ARG₍₇₎ bestätigt werden, in der die Bakteriorhodopsinmoleküle (BR) zu Trimeren hexagonal angeordnet sind. Bemerkenswert ist, dass sich auf der cytoplasmatischen Seite, nachgewiesen durch Höhenmessung und Kraftspektroskopie, vereinzelt Auflagerungen unterschiedlicher Fläche zeigten. Die Höhenmessung dieser Auflagerungen zeigen mit 10,4 nm eine Verdopplung der nativen Membrandicke von 5,2 nm. Daraus lässt sich festhalten, dass es sich um assoziierte Membranfragmente handeln könnte, die über ihre negativ geladene Oberfläche mit den positiven gentechnisch integrierten Argininen im cytosolischen COOH-Terminus der BR Wechselwirken.

19. Untersuchung der biomolekularen Interaktion zwischen Purpormembranspezies und Biphosphatpinzetten

Im Rahmen der Biomolekularen Interaktionsanalytik (BIA) ermöglichte die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) als markierungsfreie biosensorische Analyse den Zugang zu Ligand-Rezeptor-Reaktionen an einer Oberfläche. In der vorliegenden Studie wurde die Wechselwirkung an einer SiO₂-Sensoroberfläche zwischen der supramolekularen genetisch veränderten Purpormembran PM-BOP-ARG₍₇₎ und den immobilisierten niedermolekularen Biphosphatpinzetten (BP) untersucht. PM-BOP-WT diente als Referenz.

19.1. Interpretation der Affinitätsreaktion an der Sensoroberfläche

Nach der kritischen Betrachtung von O'Shannessy, D. J. ⁽¹³³⁾ erfolgt die Interaktion zwischen zwei Bindungspartnern innerhalb einer Flusszelle bereits über eine erste Diffusion in und aus der unbewegten homogenen Phase über der Sensoroberfläche, bevor sich das eigentliche Bindungsgleichgewicht zwischen den beiden Interaktionspartnern in der „Bindungszone“ einstellen kann.

Daraus folgend setzt sich eine Affinitätsreaktion an einer Grenzschicht aus zwei Schritten zusammen:

Dem diffusions-limitierten Massentransport an die Oberfläche und der kontrollierten Kinetik der Wechselwirkung zwischen den Bindungspartnern an der Oberfläche.

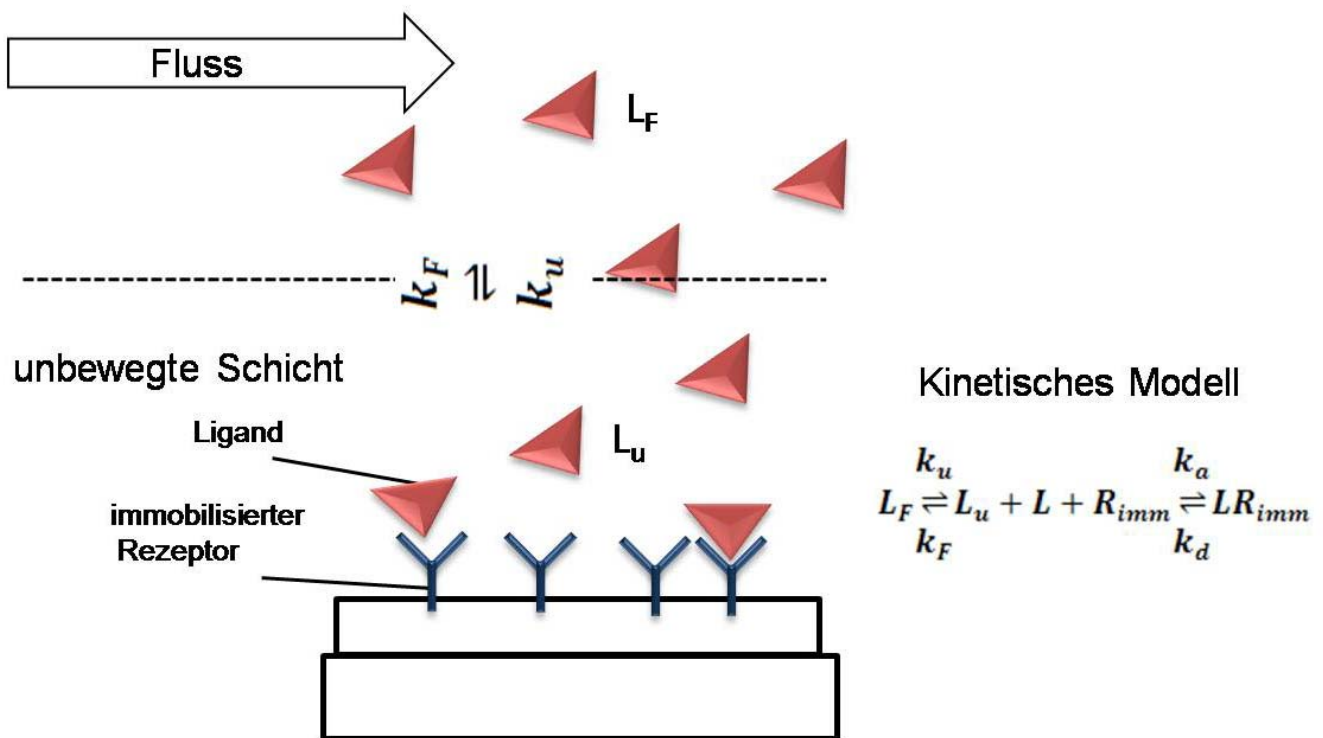


Abb. 19-1: Interaktionsmodell zwischen Ligand und immobilisiertem Rezeptor verändert nach O'Shannessy, D. J. ⁽¹³³⁾. Das Modell unterteilt die Affinitätsreaktion in einen diffusions-limitierten Massentransport von im Fluss befindlichem Ligand (L_F) an die Oberfläche in der unbewegten Schicht und eine kontrollierte Kinetik der Wechselwirkung zwischen den Bindungspartnern (L_u +immobilisierter Rezeptor) an dieser Oberfläche.

Da die Purpormembran als Makromolekül aufgrund ihrer Größe keine Brownsche Molekularbewegung besitzt, ist der oben beschriebene Aspekt des Massentransportes an die Oberfläche durch Diffusion nicht gegeben. Spekulativ werden die Purpormembranen durch die eingestellte Strömung (10 μ L/min) passiv zur Oberfläche bewegt. Für eine Wechselwirkung zwischen den Guanidyl- und Biphosphatgruppen muss eine zufällige Orientierung der PM-BOP-ARG₍₇₎ mit den auf Ihrer cytosolischen Oberfläche befindlichen mutierten COOH-Termini der Bakteriorodopsine zur Sensoroberfläche geschehen (Abb. 19-2).

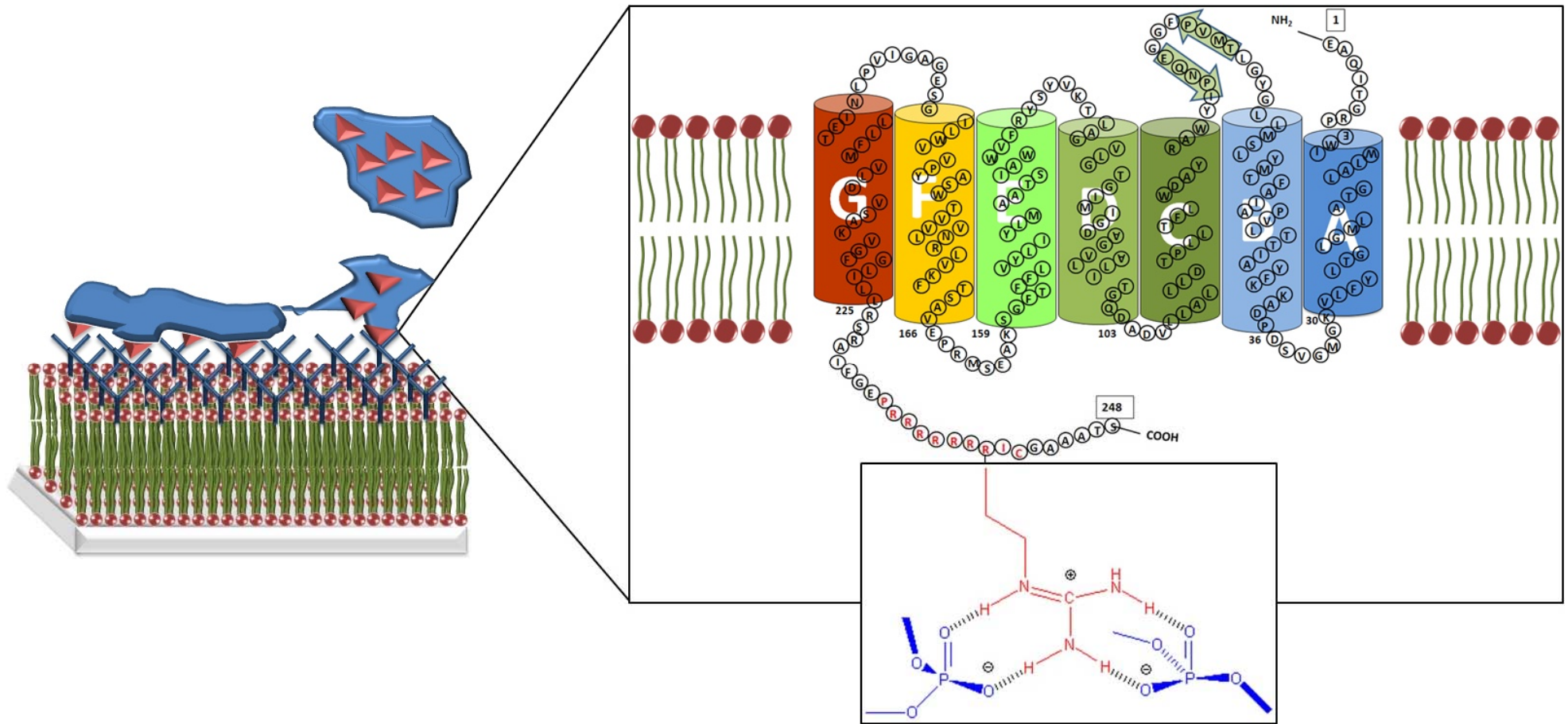


Abb. 19-2: Schema der Interaktion zwischen Purpirmembranmutante PM-BOP-Arg₇ und Biphosphatgruppen der „Pinzette“. **Zoom:** Wechselwirkung der Guanidylgruppe eines der sieben, durch gentechnische Substitution, integrierten Arginine (R) mit zwei Biphosphatgruppen unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken und ionischen Wechselwirkungen.

19.2. Interaktionskurven

In den Interaktionsverläufen des Sensorgramms (Abb. 15-1, B) der Purpurmembran Mutante PM-BOP/ARG₍₇₎ zeigen sich die Phasen der Assoziation ([BP+PM]; Punkte 1-2) mit Sättigungsplateau und Dissoziation ([BP+PM]; Punkte 2-3). Es besteht ein deutlicher Unterschied zwischen dem Interaktionsverlauf mit Biphosphat-Pinzetten (BP) und ohne (SOPC; Punkte 1-3). Zur Referenz der PM-Wildtyp (PM-BOP-WT, Abb. 15-1, C; Punkte 1-3 und 1-3) zeigt sich eine gesteigerte Assoziationsphase.

Durch nachfolgend injizierten RfS-Laufpuffer dissoziiert nicht (vollständig) gebundene PM-BOP/ARG₍₇₎ (2-3). Trotz längerer Nachspülphase geschieht keine vollständige Regeneration der BP/SOPC-Matrix. Unterstützt durch die Referenzmessung der PM-BOP/ARG₍₇₎ auf undotiertem SOPC deutet dies auf eine starke Wechselwirkung zwischen den Guanidylgruppen und den Biphosphatgruppen hin.

PM-BOP-WT zeigt im Sensorgramm auf der BP/SOPC-Matrix ein schwaches Bindungsverhalten (Sättigungsplateau 450 RU), welches auf Guanidylreste vereinzelter auf der Membranoberfläche befindlicher Arginine (Abb. 1-3, B) zurückgeführt werden könnte. Dagegen spricht allerdings ihr räumlicher Zugang. Charakteristisch sind, nach wiederholenden Messungen, der nach PM-WT Injektion negative und nach Laufpuffer positive auftretende RU Peak (Abb. 15-1, C; Punkte 1-3). Der Auslöser von Peaks sind in den Flusszellen befindliche Luftbläschen. Daher wird vermutet, dass WT-PM bei Erstkontakt mit der BP/SOPC-Matrix und beim Nachspülen durch Aufstauung diesen Effekt auslöst und daher eine eher unspezifische Bindung zeigt. Ein Einfluss des Retinals als chromophore Gruppe auf die Reflektion und Interferenz konnte durch Apomembran ausgeschlossen werden.

Quinn *et al.* ⁽¹³⁴⁾ konnten die Interaktion zwischen roten Blutkörperchen und spezifischen Antikörpern unter Flussbedingungen messen. Zum Interaktionsverlauf der Purpurmembran lassen sich Parallelen erkennen. Nach Injektion kommt es zu einem sofortigen exponentiellen Anstieg der RU in der Assoziationsphase, welche in einem Plateau endet. Dieses pseudo Stady-State ist erreicht, wenn im Falle die Konzentration der gebundenen Makromoleküle auf der Matrixoberfläche der in der Flussphase gleicht. Repulsivkräfte der gebundenen Makromoleküle verhindern dass

die in der Flussphase befindlichen Objekte die „Bindezone“ auf der Oberfläche erreichen.

19.3. Interpretation der Wechselwirkung zwischen Purpormembranspezies und Biphosphat-Pinzetten durch Bestimmung der Assoziationsratenkonstante k_a

Die Komplexbildung auf der Oberfläche durch die Bindung von Purpormembran (PM) an die immobilisierten Biphosphatgruppen (BP) ist ein bimolekularer Prozess einer Kinetik zweiter Ordnung.

Jedoch geschieht die Interaktion unter Durchflussbedingungen mit konstanten Konzentrationen der Reaktanden. Daher kann von der wesentlich einfacheren Kinetik pseudo-erster Ordnung ausgegangen werden.

Zur Bestimmung der Assoziationsratenkonstante aus den sensorischen Bindungskurven wird an den Assoziationsteil jeder einzelnen Bindungskurve eine Exponentialfunktion mit

$$RU(t) = RU_{max}e^{-k*(t-t_c)} \quad (19.1)$$

angelegt.

Mit der Ableitung des Signals $dRU(t)/dt$ gegen das Signal $RU(t)$ und linearer Regression kann die Aussage getroffen werden, dass die PM-Mutante über eine 10x höhere Affinitätsratenkonstante mit $k_a = 0,05$ RU/s gegenüber dem WT mit $k_a = 0,005$ RU/s verfügt.

Der Austausch von RlfS-Laufpuffer gegen ent. H_2O schließt Salze aus und bewirkt eine Veränderung des pH-Wertes. Dies verhindert die Wechselwirkung auf der Oberfläche zwischen Guanidyl und Biphosphatgruppen. Vermutlich wird durch Natriumionen des RlfS-Puffers zusätzlich eine Interaktion zwischen den negativ geladenen Kopfgruppen der Lipide beider Membranen vermittelt und so die Wechselwirkung zwischen den Guanidylgruppen der Arginine und den Biphosphatgruppen unterstützt. Belegt wird die Wechselwirkung mit der Messung auf undotiertem SOPC-Layer, da hier nach der RlfS-Puffer-Injektion wieder vollständig regeneriert werden kann.

20. Schlussfolgerung

Durch erfolgreiche Integration von sieben Argininen in den Monomerbaustein Bakteriorhodopsin im cytoplasmatischen COOH-Terminus wurde in Form der Purpormembran PM-BOP/Arg₍₇₎ eine hoch affine Oberfläche für die Bindung von Biphosphat-Pinzetten (Schrader, T. ⁽¹¹⁹⁾) erhalten. Bereits nach der Zonalen-Ultrazentrifugation (Pellet) und rasterkraftmikroskopischen (*atomic force microscopy*) Untersuchungen zeigte sich durch assoziierte Membranfragmente eine veränderte Affinität der cytoplasmatischen Seite gegenüber PM-BOP-WT.

Durch erzwungene Konvektion im thermisch und pH stabilen Mikrofluidsystem zeigte sich eine schnellere Interaktion zwischen den Guanidylgruppen der Arginine der Purpormembranmutante PM-BOP-Arg₍₇₎ und den Biphosphatgruppen, der in einem Stearyl-Oleyl-Phosphatidylcholin (SOPC)-Bilipidlyer immobilisierten Pinzetten im Vergleich zur PM-BOP-WT. So konnte die Ausbildung von mesomeriestabilisierten Chelatkomplexen durch Wasserstoffbrückenbindung und elektrostatischen Wechselwirkungen begünstigt werden.

Dies wird durch die detektierten Interaktionsverläufe der Reflektometrischen Interferenz Spektroskopie (RIfS) und den daraus gewonnenen Assoziationsratenkonstanten gezeigt. Bemerkenswert ist, dass es sich im Fall des Liganden um eine supramolekulare Membran handelt, die mit einem in einer SOPC-Matrix immobilisierten niedermolekularen Rezeptor wechselwirkt. Im Ergebnis gelingt so eine Kopplung zweier unterschiedlicher Membranen, wobei der Ligand eine Orientierung über spezifische Wechselwirkungen seiner affinen Oberfläche zum Rezeptor erfährt. Dies befähigt zum Aufbau von Hybridstrukturen. Unter seitenspezifischer Orientierung zweier Purpormembranen (extrazellulär-cytoplasmatisch) könnte so ein gerichteter Protonentransfer stattfinden. Des Weiteren unterstützt diese Arbeit, dass die RIfS als biosensorische Methode nicht nur zur Detektion der Bindung von Einzelmolekülen als Interaktionspartner an matrixassoziierte Rezeptoren genutzt werden kann, sondern sogar supramolekulare Membranen und Zellen ⁽¹³⁴⁾ erfasst.

IV. Material und Methoden

21. Chemikalien

Die in dieser Forschungsarbeit verwendeten Chemikalien stammen von Roth, Fluka, Merck (Darmstadt, Germany) bzw. Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) in höchstmöglichem Reinheitsgrad. Abweichungen finden sich in der folgenden tabellarischen Listung oder sind innerhalb der Methodenkapitel vermerkt:

Chemikalie	Firma
Agar Agar (high gel-strength powder)	Serva, Heidelberg, Germany
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Germany
Calciumchlorid (getrocknet)	AppliChem, Darmstat, Germany
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Mangan(II)chlorid	AppliChem, Darmstat, Germany
Milchpulver Blotting grade	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Germany
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Pepton LP0034	Oxoid LTD, Hampshire, England
Rubidiumchlorid	AppliChem, Darmstat, Germany
Sodium Dodecylsulfat	Fluka, Darmstadt, Germany
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck. Darmstadt, Germany
Trypton	AppliChem, Darmstat, Germany
Trizma [®] Hydrochloride	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Trizma [®] base, minimum 99,9%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
D(+)-Glucose Monohydrat	Fluka, Darmstadt, Germany
Siedespeisesalz	Salta
PEG ₆₀₀ Sigma Aldrich, St. Louis, USA	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

22. Kits und DNA-modifizierende Enzyme

Pfu Turbo™ DNA polymerase Stratagene (Proofreading)	La Jolla, CA, USA
Phusion Hot Start™ DNA polymerase (Proofreading)	Finnzymes OY, Espoo, Finland
Taq®-Polymerase	Amersham Buchler
QIAprep™ Spin Miniprep Kit Qiagen	Qiagen, Hilden, Germany
QIAquick™ Gel Extraction Kit Qiagen	Qiagen ,Hilden, Germany
DNase, RNase-frei	Qiagen, Hilden, Germany
Sawady Taq DNA polymerase Peqlab	Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany
T4 DNA ligase	New England Biolabs, Beverly, MI, USA
In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit	Takara Bio Europe/ Clontec, France
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	invitrogen™, Karlsruhe, Germany

23. Medien, Puffer und Antibiotika

23.1. Nährmedien und Puffer

Zur Herstellung von Nährmedien und Puffern wird ausschließlich reines Wasser (reines H₂O) verwendet. Das pH-Meter wird für eine genaue pH-Einstellung entsprechend kalibriert.

Sterilisation der Medien und Puffer erfolgt durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C und 4 bar oder sterile Filtration (0.22 µm PVDF-Filter, Roth). Gelagert werden diese hauptsächlich bei RT. Dem Nährmedium für LB-, LB_{amp100}, LB_{kan100} und Halo-Agarplatten werden vor dem Autoklavieren 15 g Bacto-Agar zugesetzt. Das heiße Agar-Medium wird unter Rühren langsam abgekühlt und in sterile Petrischalen gegossen. Selektivplatten erhalten eine Antibiotikumzugabe nach dem Abkühlen unter 60 °C. Die Lagertemperatur für Agarplatten beträgt 4 °C.

23.2. Nährmedien für *E.coli* (Sambrook *et al.* ⁽¹³⁵⁾)

LB-Medium

1% (w/v)	Trypton	10 g	Trypton
0,5% (w/v)	Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt
0,5% (w/v)	NaCl	5 g	NaCl
		ad 1 L	ent. H ₂ O

SOC-Medium

2% (w/v)	Trypton	20 g	Trypton
0.5% (w/v)	Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt
8,6 mM	NaCl	0,5 g	NaCl
2,5 mM	KCl	10 mL	0,25 M KCl
10 mM	MgCl ₂	5 mL	2 M MgCl ₂
20 mM	Glucose	20 mL	1 M glucose
		ad 1L	ent. H ₂ O

Die Filter-sterilisierten Lösungen MgCl₂ und Glucose werden nach dem Autoklavieren erst unter 60°C zugegeben.

23.3. Komplex-Medium für *Hbt.salinarum*

Hbt.salinarum Komplex-Medium

81 mM	MgSO ₄	20 g	MgSO ₄ *7H ₂ O
10 mM	Na ₃ citrat	3 g	Na ₃ citrat*2H ₂ O
27 mM	KCl	2 g	KCl
4.3 M	NaCl	250 g	NaCl
1% (w/v)	Pepton(L34, Oxoid)	10 g	
		ad 1 L	ent. H ₂ O

pH auf 7.0 mit 10 M NaOH einstellen

23.4. Antibiotika

Antibiotikum	Stock-Lösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/mL in 70% EtOH	100 µg/mL
Kanamycin	50 mg/mL in 70% EtOH	50 µg/mL
Mevinolin (Lovastatin)	10 mg/mL in EtOH	10 µg/mL

Die Mevinolin (Monacolin K, Lovastatin, 404.5 g/mol) Stock-Lösung wird mittels Ethanolextraktion aus Mevinacor™-Tabletten (MSD Sharp & Dohme, Haar, Germany; Uni-Klinkapothek Marburg, Germany) gewonnen. Dazu 10 Tabletten entsprechend 20 mg Lovastatin mit einem Mörser zerkleinern und in 20 mL EtOH (p.A.) resuspendieren. Die Suspension in einem Falcon-Tube bei RT für 1 h schütteln und bei 5000xg für 5 min abzentrifugieren. Den Überstand steril filtrieren (0.22 µm PVDF-Filter steril). Alle Antibiotika sind bei -20°C zu lagern.

24. Stämme und Vektoren

24.1. Stämme der verwendeten Organismen

<i>E. coli</i> - Stamm	Publizierter Genotyp/Phänotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZY A - argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺) phoA suppE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	invitrogen TM , Karlsruhe, Germany

<i>Hbt.salinarum</i> - Stamm ⁴	P1 ⁵	Publizierter Genotyp/Phänotyp ⁶	Referenz
S9	R1	BR ⁺⁺ , HR ⁺ , SRI ⁺ , SRII ⁺ , Car ⁻ , Rub ⁺ , Ret ⁺	Stockenius <i>et al.</i> , 1979
R1	NRL	BR ⁺ , HR ⁺ , SRI ⁺ , SRII ⁺ , Car ⁺ , Rub ⁺ , Ret ⁺ ,	Stockenius, W. and Kunau, W.H., 1968
SNOB	S9	<i>bop</i> ⁻ , HR ⁺ , SRI ⁺ , SRII ⁺ , Car ⁻ , Rub ⁺ , Ret ⁺	Pfeiffer <i>et al.</i> , 1999
SNOB _{Marburg}	S9	<i>bop</i> ⁻ , HR ⁺ , SRI ⁺ , SRII ⁺ , Car ⁻ , Rub ⁺ , Ret ⁺	diese Arbeit, 2007
BORIS	R1	<i>bop</i> ⁻ , HR ⁺ , SRI ⁺ , SRII ⁺ , Car ⁺ , Rub ⁺ , Ret ⁺	Pfeiffer, M., 2000
L33	S9	BR ⁻ , HR ⁺ , SRI ⁺ , SRII ⁺ , Car ⁻ , Rub ⁻ , Ret ⁺	Wagner <i>et al.</i> , 1981

⁴ S9, R1= Wildtypstämme (WT); SNOB, SNOB_{Marburg}= WT-Stamm S9 mit deletiertem Bacterioopsingen (w/o *bop*); BORIS=WT-Stamm R1 mit deletiertem Bacterioopsingen (*bop* omission in **R1** strain)

⁵ P1= Parentalstämme; NRL= National Research Council in Canada (Pfeiffer, M., 2000)

⁶ *bop*= Bacterioopsingen; BR= Bakteriorhodopsin; HR= Halorhodopsin;

SR I+II= Sensorrhodopsine I+II; Car= Caretinoide; Rub= Ruberine; Ret= Retinal; += Gen vorhanden und Expression ++=Gen vorhanden und Überexpression; -=Gen vorhanden und nicht Exprimiert/ bzw. im Fall von *bop*⁻ Gen deletiert

24.2. Vektoren

Für die Ausbildung zum Wildtyp (WT) oder zur Mutante wird der entsprechende Deletionsstamm (*bop*⁻) mit einem der *bop*-tragenden Expressionsvektoren ausgestattet.

Plasmid ID	Publizierter Genotyp/Phänotyp	Referenz
pUS-Mev	6302 bp , <i>E.coli</i> <i>Hbt.salinarum</i> Shuttle-Vektor: Amp ^r , Mev ^r , <i>bop</i> , f1, ColE1	Schweiger, M. (1996)
pMKK ₁₀₀	7213 bp , <i>E.coli</i> <i>Hbt.salinarum</i> Shuttle-Vektor: Amp ^r , Mev ^r , <i>bgaH</i> ⁺ , MCS	Koch, M. and Oesterhelt, D. (2005)
pHUS-brfus (MCS)	6396 bp , <i>E.coli</i> <i>Hbt.salinarum</i> Shuttle-Vektor: Amp ^r , Mev ^r , <i>bgaH</i> ⁺ , MCS	Hüseyin, B. (2001) Derivat von pUS-Mev
pROB	9600 bp , <i>Hbt.salinarum</i> Integrationsvektor, ORI ⁻ Amp ^r , MCS, <i>brp</i> -cluster,	Pfeiffer, M., 2000
pHUS- brfus(MCS)/ pMKK100(<i>bgaH</i>) (MMM)	<i>E.coli</i> <i>Hbt.salinarum</i> Shuttle-Vektor: Amp ^r , Mev^r, <i>bgaH</i>⁺, MCS	diese Arbeit

pUS-Mev- <i>bop-arg</i> ₍₇₎	6304 bp , <i>E.coli</i> <i>Hbt.salinarum</i> Shuttle-Vektor: Amp ^r , Mev ^r , <i>bop</i> , f1, ColE1,	diese Arbeit
pUAST- <i>egfp</i>	8915 bp	
pCR [®] 4Blunt-Topo	3956 bp , <i>E.coli</i> , P _{lac} , TOPO [®] Cloning site, <i>lacZα-ccdB</i> , Kan ^r , Amp ^r , pUC _{ori} , T3 u.T7 priming site	Invitrogen™, Karlsruhe, Germany
pUS-Mev- <i>bop-egfp82x</i>	7003 bp , <i>E.coli</i> <i>Hbt.salinarum</i> Shuttle-Vektor: Amp ^r , Mev ^r , <i>bop</i> , f1, ColE1	diese Arbeit
pUS-Mev- <i>bop-NcoI</i> - knockout	6918 bp	diese Arbeit
pUS-Mev- <i>bop-linker-egfp</i>	6918 bp	diese Arbeit
pMKK ₁₀₀ - <i>bop-egfp82x</i>	9269 bp	diese Arbeit
pUS-Mev- <i>bop-ag4</i>	6325 bp	diese Arbeit
pMKK100(<i>bgaH</i>)- <i>bop-ag4</i>	8002 bp	diese Arbeit
pUS-Mev- <i>bop-CO3-P1</i>	8002 bp	diese Arbeit

TycC3- <i>pcp</i> (pQE-60)		Arbeitsgruppe Prof. Dr. Marahiel
pHUS-brfus(MCS)- <i>bop-pcp</i>	6627 bp	diese Arbeit
pEF-D85N	12400 bp	Tittor, J.
	<i>E.coli</i> <i>Hbt.salinarum</i>	Ferrando et al. (1993)
	Shuttle-Vektor: Amp ^r ,	
	Mev ^r , <i>bop</i> , f1, ColE1	
pEF-D85N- <i>bop-pcp</i>	12723 bp	diese Arbeit
	<i>E.coli</i> <i>Hbt.salinarum</i>	
	Shuttle-Vektor: Amp ^r ,	
	Mev ^r , <i>bop</i> , f1, ColE1	

Amp^r: Ampicillin-Resistenzmarker für die Selektion von *E.coli* Transformanden; Mev^r: Mevinolin-(Lovastatin) Resistenzmarker für die Selektion von *H. salinarum* Transformanden
bgaH⁺: Halophiles-β-Galaktosidase-Gen (*bgaH*) als zusätzlicher Selektivmarker für Rot-Blau Klon Screening) für *H.salinarum*; MCS: „multiple cloning site“

25. Mikrobiologisches Arbeiten

25.1. Kultivierung und Stammhaltung von *E.coli*

E.coli-Zellen für die DNA-Amplifikation und -Isolation werden mit selektivem Antibiotikum versetztem LB-Medium in 15 mL Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben (50 ml Medium) inokuliert und bei 37°C schüttelnd (250 rpm) inkubiert. Zur Kurzzeithaltung wird eine homogene Übernachtskultur mit einer sterilen Impföse im Verdünnungsausstrich auf eine Agarplatte aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelklone werden in 1 mL sterilem LB-Medium resuspendiert. Ein Aliquot der Flüssigkultur (~700µL) wird zum gleichen Volumen sterilen Glycerins gegeben und nach Durchmischung in Flüssigstickstoff dauerhaft aufbewahrt.

25.2. Kultivierung und Stammhaltung von *Hbt.salinarum*

Hbt.salinarum-Zellen werden dunkel-aerob in mit 130 rpm bei 37°C schüttelnd kultiviert. Dazu in einem 100 ml Erlenmeyerkolben 35 ml Komplexmedium entsprechend 1.4% (v/v) mit einer 5 Tage alten Starterkultur inokulieren.

Zur Stammhaltung in Flüssigkultur sind 17 mL einer über 5 Tage frisch gewachsenen Kultur in ein steriles 20 ml Polyethylene-Vial (Falcontube) zu transferieren und dicht verschlossen bei RT im Dunkeln aufzubewahren.

Zur Stammhaltung auf Platten werden frische Kulturen in geeigneter Verdünnung (10^{-4} - 10^{-5}) auf Agar-Platten plattiert und nach mehrtägiger Inkubation bei 37°C luftdicht bei RT aufbewahrt.

Zur Isolierung von Membranen werden 5-6 Tage alte Zellen einer 0.7-1,5 L Kultur (2 L-Erlenmeyerkolben, Komplexmedium) in der stationären Wachstumsphase ($OD_{600} > 0,8$) verwendet. Die Flüssigkulturen werden durch Zentrifugation mit $9000 \times g$ bei 4°C für 20 min geerntet. Das Zellpellet wird in Basalsalz (Komplexmedium ohne Pepton) aufgenommen und resuspendiert.

Die Wachstumsrate für *H. salinarum* wird bei 600 nm (OD_{600}) mit einem Zweistrahlphotometer (UVIKON 922, Kontron) bestimmt. Bei einer $OD_{600} = 1.0$ enthält 1 mL Flüssigkultur 1.34×10^9 Zellen.

26. Molekularbiologische Methoden

26.1. Transformation von *E.coli* (DH5 α)

26.1.1. Herstellung elektrokompetenter *E.coli*-Zellen

Von einer Agarplatte wird mit einer sterilen Impföse ein DH5 α -Einzelklon gepickt und über Nacht in 6 mL LB-Medium bei 37°C inkubiert.

Mit 5 mL dieser Vorkultur werden 500 mL LB Medium (1:100) angeimpft und in 37 °C bei 250 rpm schüttelnd inkubiert.

Nach 15 min auf Eis werden die Zellen in 50 ml in Falcontubes überführt und mit 4.000 rpm für 15 min und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Den Überstand verwerfen und die Pellets in insgesamt 500 ml eiskaltem A.dest resuspendieren. Nach erneutem Zentrifugieren für 15 min bei 4.000 rpm und 4°C, Pellets in insgesamt 20 ml 10%igem Glycerin resuspendieren und erneut mit 4.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugieren. Anschließend resuspendieren und in insgesamt 4 ml 10%igen Glycerin vereinigen. 50 μ l Aliquots werden in 1,5 mL Eppendorf-Cups in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der elektrokompetenten Zellen erfolgt bei mindestens -70°C.

26.1.2. Elektroporation von *E.coli*-Zellen

Eine Elektroporationsküvette (2 mm Einmalküvette, Bio-Rad) 10 min auf Eis gekühlt. Ein 50 μ L Aliquot elektrokompetenter *Escherichia coli*-Zellen (DH5 α) wird auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA zugegeben (Plasmid-Retransformation 0,2 μ L; Ligation 10 μ L, entsprechend halbem Ansatz). Der Ansatz wird in die Elektroporationsküvette transferriert, so dass dieser den Boden bedeckt und sich keine Luftblasen bilden. Elektroporiert wird mit dem Gene Pulser (Bio-Rad) mit den Parametern von 400 Ω ; 1,5 kV; 25 μ F und einer Zeitkonstante von $t_{\text{const}}= 9.0-9.5$. Die transformierten Zellen werden nach der Elektroporation unter direkter Zugabe von 300 mL LB-Medium sehr vorsichtig resuspendiert und für etwa 45 min in 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Zellkultur auf entsprechenden Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

26.1.3. Herstellung chemokompetenter *E.coli*-Zellen(verändert nach Sambrook *et al.* ⁽¹³⁵⁾)**SOB-Medium**

2% (w/v)	Trypton	20 g	Trypton
0.5% (w/v)	Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt
10 mM	NaCl	0,58 g	NaCl
2,5 mM	KCl	10 mL	0,25 M KCl
10 mM	MgCl ₂	5 mL	2 M MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄	5 mL	2 M MgSO ₄
		ad 1L	ent. H ₂ O

RF1-Puffer

100 mM	RbCl	3 g	RbCl
30 mM	Kac	0,74 g	Kac
10 mM	CaCl ₂	0,4 g	CaCl ₂
15%	Glycerin	37,5 mL	Glycerin
		ad 250 mL	ent. H ₂ O

mit 1 M Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und autoklavieren

50 mM MnCl ₂	MnCl ₂	12,5 mL	1 M MnCl ₂
(steril filtriert, 0,22µm)			(steril filtriert, 0,22µm)

RF2-Puffer

10 mM	MOPS	0,5 g	MOPS
10 mM	RbCl	0,3 g	RbCl
75 mM	CaCl ₂	2,8 g	CaCl ₂
15%	Glycerin	37,5 mL	Glycerin
		ad 250 mL	ent. H ₂ O

mit 1 M NaOH auf pH 6,8 einstellen und steril filtrieren

Einer Agarplatte wird mit einer sterilen Impföse ein DH5 α -Einzelklon entnommen und über Nacht in 50 mL LB-Medium bei 37°C inkubiert.

500 ml SOB-Medium werden mit 5 mL (1:100) einer frischen E. coli-Kultur angeimpft und bei 37°C schüttelnd, bis zu einer OD₆₀₀ von maximal 0,5 kultiviert.

Nach 60minütiger Inkubation auf Eis in Falcon-Tubes die Zellen mit 4.000 rpm bei 4°C für 10 min abzentrifugieren und den Überstand verwerfen. Das Pellet in 16 mL (1/3 des Ausgangsvolumens) eiskaltem RF1-Puffer resuspendieren und für 30 min auf Eis inkubieren.

Die Zellen werden erneut mit 4.000 rpm bei 4°C für 10 min pelletiert, in 4 mL (1/12,5 des Ausgangsvolumens) eiskaltem RF2-Puffer aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert.

Schließlich wird die Zellsuspension zu 50 μ L aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei mindestens -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

26.1.4. Chemoporation von *E.coli*

(verändert nach Sambrook et al. ⁽¹³⁵⁾)

Chemokompetente Zellen (50 μ L Aliquot) werden auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA zupipettiert. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt für 1 min 30s bei 37°C im Wasserbad und anschließend eine sofortige Zugabe von 300 μ L vorgewärmtem LB-Medium. Nach 45 min Inkubation im Schüttler bei 37°C werden die Zellen auf entsprechenden Selektivplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

26.2. PEG-Transformation von *Hbt.salinarum***SPH-Lösung**

2 M	NaCl	11,7 g	NaCl
25 mM	KCl	2,5 mL	1 M KCl
15% (w/v)	Sucrose	15 g	1 M Sucrose
		ad 100 mL	ent. H ₂ O

0,5 M EDTA in SPH-Lösung

0,5 M	EDTA	9,3 g	Na ₂ EDTA*2H ₂ O
2 M	NaCl	5,85 g	NaCl
25 mM	KCl	1,25 mL	1 M KCl
15% (w/v)	Sucrose	15 g	1 M Sucrose
50 mM	Tris/HCl, pH8,75	2,5 mL	1 M Tris/HCl, pH8,75
		ad 50 mL	ent. H ₂ O

EDTA löst sich, wenn der pH-Wert auf 8,75 mit 10 M NaOH eingestellt wird

60% (w/v) PEG₆₀₀ in SPH-Lösung

Ansatz wie die SPH Lösung, aber zusätzlich 60% (w/v) PEG₆₀₀

(Merck,Darmstadt,Germany)

SVL-Lösung

4,3 M	NaCl	25,1 g	NaCl
80 mM	MgCl ₂	8 mL	1 M MgCl ₂
10 mM	Na ₃ citrat	1 mL	1 M Na ₃ citrat
1,4 mM	CaCl ₂	140 µL	1 M CaCl ₂
15 % (w/v)	Sucrose	15 g	Sucrose
50 mM	Tris/HCl, pH 7,4	5 mL	1 M Tris/HCl, pH 7,4
		ad 100 mL	ent. H ₂ O

EDTA löst sich, wenn der pH-Wert auf 8,75 mit 10 M NaOH eingestellt wird

Die Transformation von *Halobacterium salinarum* erfolgt verändert nach der Methode von Cline et al. ⁽¹³⁶⁾.

26.2.1. Kultivierung der Zellen

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Transformation ist die Erhöhung der Kompetenz unter Selektion schnell wüchsiger halobakterieller Zellen gegenüber den Rezipienten. Diese Selektion wird mit der Inokulierung schnell wachsender Einzelkolonien einer Plattenkultur in 35 mL Komplettmedium (100 mL Erlenmeyerkolben und Wattestopfenverschluss) erreicht. Nach Verfolgung schneller Wachstumsrate bei 40°C und 100 rpm, werden Flüssigkulturen mit dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 insgesamt drei Mal überimpft. Die Überimpfung erfolgt dazu jeweils in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 0,3 und für die Transformation schließlich bei OD₆₀₀ zwischen =0,4-0,8.

26.2.2. Sphäroplasten Präparation

2 mL der letzten Kultur werden mit 8000 x g für 2 min bei RT abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Nach einem zusätzlichen Anzentrifugieren wird das restliche Medium (~100 µL) abpipettiert, um Magnesiumspuren zu entfernen. Das Zellpellet ist vorsichtig in 200 µL Sphäroplasten-Lösung (SPH-Puffer) zu resuspendieren. Die anschließende Zugabe von 10 µl 0.5 M EDTA in SPH und 10 min Inkubation der Suspension bei RT erzeugt zu >99% Sphäroplasten. Eine Kontrolle der Sphäroplastenbildung erfolgt unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung.

26.2.3. Fusion mit der Plasmid- DNA durch PEG Zugabe

Die Sphäroplasten-Suspension wird in ein 2 mL Eppendorf-Cup transferiert, welches 2-3 µL (~1-2 µg) der zu transformierenden Plasmid-DNA enthält. Nach vorsichtigem durchmischen mit der DNA wird der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 220 µl der 60%igen PEG₆₀₀-Lösung werden in die Kappe des Eppendorf-Cups gefüllt und augenblicklich mit der Sphäroplasten-Suspension vermischt, indem die Kappe geschlossen und kräftig geschüttelt wird. Insbesondere ist zu beachten, dass keine lokale Konzentrierung der PEG₆₀₀-Lösung entsteht, um Zell-Lyse zu vermeiden.

26.2.4. Regeneration

Nach Inkubation für 20 min bei RT wird der größte Gehalt an PEG₆₀₀ durch Zugabe von ~1,6 mL Sphäroplasten-Verdünnungs-Lösung (SVL) unter

Zentrifugation bei 8000 x g für 2 min bei RT und vorsichtigem Abschütten des Überstandes entfernt. Nach einem zusätzlichen anzentrifugieren wird das restliche Medium (~100 µL) abpipettiert. Das Pellet vorsichtig in 800 µL Komplexmedium resuspendieren und die Zellsuspension horizontal für 16 bis 24 h mit 100 rpm bei 40°C schütteln, um den Zellen die Regeneration ihres S-Layers zu ermöglichen. Danach die Transformanden in drei Aliquots zu je 80 µL auf Selektivplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattieren. Die Restliche Zellsuspension zu 100 µL konzentrieren und gleichfalls ausplattieren.

26.2.5. Selektionsmarker halophile β -Galaktosidase

In dieser Studie tragen einige der verwendeten Shuttle-Vektoren als zusätzlichen Selektionsmarker, das bgaH-Gen von *Haloferax volcanii* (Holmes and Dyll-Smith, 1997, 2000; Patenge et al., 2000) für die halophile β -Galaktosidase. Für dieses Plasmid wird auf die Platten selektiv X-Gal (Roth, Karlsruhe, Germany) vor dem Ausplattieren der Zellen aufgebracht.

Dazu gleiches Volumen X-Gal Stocklösung (40 mg/ml X-Gal in DMF) mit gleichem Volumen sterilem, entionisiertem H₂O frisch mischen und davon pro Platte 80 µL ausplattieren. Nach dem Trocknen der X-Gal Lösung die Zellen wie gewohnt ausplattieren und die Zellsuspension vollends einziehen lassen.

Die Platten in einer transparenten Plastikbox platzieren, in der sich eine offene Petrischale mit Basalmedium befindet, um die Platten während des Bebrütens vor dem Austrocknen zu schützen und bei 40°C inkubieren. Für gewöhnlich werden die ersten Transformanden nach 10-14 Tagen sichtbar. Sobald die Kolonien zu einer angemessenen Größe herangewachsen sind, in einer durchsichtigen Plastikbox bei RT lagern, bis die Kolonien ihre eindeutige Farbe angenommen haben.

27. Extraktion von DNA

27.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

SOB-Medium

2% (w/v)	Trypton	20 g	Trypton
0.5% (w/v)	Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt
10 mM	NaCl	0,58 g	NaCl
2,5 mM	KCl	10 mL	0,25 M KCl
10 mM	MgCl ₂	5 mL	2 M MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄	5 mL	2 M MgSO ₄
		ad 1L	ent. H ₂ O

Resuspensionspuffer P1

50 mM	Tris/Cl, pH 8,0	1,2 g	Tris/Cl, pH 8,0
10 mM	EDTA	0,74 g	EDTA
		ad 200 mL	ent.H ₂ O

Zugabe von 100 µg/mL RNase A, Lagerung bei 4°C

Zell-Lysepuffer P2

200 mM	NaOH	1,6 g	NaOH
1% (w/v)	SDS	2,0 g	SDS
		ad 200 mL	ent. H ₂ O

Lagerung bei RT

Neutralisationspuffer P3

3,2 M	Potassium Acetat		Potassium Acetat
		ad 200 mL	ent. H ₂ O

mit 1 M Essigsäure auf pH 5,8 einstellen

Lagerung bei RT

Am Vortag werden Einzelklone mit sterilen Pipettenspitzen oder einer sterilen Impföse in 4 ml SOC-Flüssigmedium mit Amp (100 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 100 rpm schüttelnd inkubiert. Für die Mini-Präparation wird die Übernachtskultur (ÜNK) in 1,5 ml Eppendorf-Cups überführt und für 5 min bei 4.000 rpm in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Für eine Ertragssteigerung den Überstand mit der Wasserstrahlpumpe absaugen, den Rest der Kultur den entsprechenden Cups hinzufügen und erneut zentrifugieren. Das Bakterienpellet wird in 250 µl Resuspensionspuffer (P1) durch Vortexen gelöst. Daraufhin erfolgt die Zugabe von 250 µL Zell-Lysepuffer (P2) und eine Mischung durch mehrfaches Invertieren. Im Anschluß geschieht unter Zugabe von 350 µL Neutralisationspuffer und Zentrifugation mit 13000 rpm für 15 min bei 4°C die Ausfällung der Proteine.

27.1.1. Aufreinigung von DNA durch Ethanolpräzipitation

Der Plasmid-DNA werden 1/10 Volumenanteile 3 M NaAc, sowie 2,5 Volumenanteile 96% EtOH zugegeben und diese durch 30 min Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 70% EtOH durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 13.000 rpm und 4°C gewaschen. Der Überstand wird verworfen.

27.1.2. Aufreinigung von DNA durch Isopropanolpräzipitation

Die Plasmid-DNA wird durch Zugabe von 0,7 Volumenanteilen Isopropanol und 30 min Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet erneut in 70% EtOH für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

In beiden Fällen wird nach dem gewählten Aufreinigungsverfahren das Pellet gründlich im Heizblock bei 37°C getrocknet und durch anschließende Zugabe von 50 µL RNase-Wasser oder TE-Puffer bei 65°C für 15 min gelöst.

27.2. Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* über QIAprep spin Säulen

QIAprep spin Säulen (Qiagen, Germany) werden verwendet, um höchste Reinheitsstufen für eine Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.Coli* zu erhalten. Dazu dient das Standardprotokoll des Herstellers.

27.3. Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* über Qiaprep Midi-Kit

Für die MIDI-ÜNK werden 100 µl positive Mini-ÜNK in 50 ml SOC-Medium mit Amp (100 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 100 rpm schüttelnd inkubiert. Das weitere Verfahren der MIDI-Präparation erfolgt nach den Herstelleroptionen (Qiagen, Hilden). Das präparierte und gereinigte DNA-Pellet wird in 100 µl TE aufgenommen.

27.4. Präparation ungereinigter genomischer DNA aus *Hbt.salinarum*

Das Prinzip der Präparation genomischer DNA aus *H. salinarum* für PCR und Southern Blot beruht auf Lyse der Zellen durch Wasser ohne vorherige Reinigung. 1,2 ODmL einer frisch gewachsenen halobakteriellen Kultur werden bei 8000 *g für 2 min pelletiert und der Überstand entfernt. Nach einem zusätzlichen Anzentrifugieren wird die verbleibende Flüssigkeit abpipettiert, um noch vorhandenes Salz zu entfernen. Nach Zugabe von 400 µL sterilem ent. H₂O wird das Pellet lysiert und vollständig solubilisiert. 1 µl dieser DNA enthält annähernd 10 ng of DNA aus 4*10⁶ Zellen. Die DNA wird bei -20°C gelagert und dient als Tempat für PCRs ungefähr 6 Monate und Southern Blot (bis zu 10 Tage).

28. Restriktionsverdau

In dieser Studie durchgeführten Restriktionsverdaue dienen hauptsächlich zu Klonierungszwecken oder zum Erhalt von DNA-Fragmenten von genomischer DNA für eine Southern Blot Analyse.

Unter Beachtung der Herstellerempfehlung (New England Biolabs, Germany) werden entsprechend optimale Bedingungen bezüglich des Puffers, BSA und Temperatur gewählt. Dies gilt auch für den Fall möglicher Doppelverdaue. Sollten Endonucleasen verwendet werden, die sich in ihren optimalen Pufferbedingungen unterscheiden, erfolgt der Restriktionsverdau sequentiell.

Zu diagnostischen Zwecken werden 0,5-1 µg Proben-DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz wird mit 0,3 U Endonuclease in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 1h inkubiert. Davon werden 5 µL auf einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetragen und bei 80 V aufgetrennt. Zur Präparation (Ligation) werden 1-2 µg Proben-DNA in einem Endvolumen von 25 µL mit 1 U Endonuclease eingesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 2 h, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Der Gesamtansatz wird auf einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetragen und bei 70 V aufgetrennt.

29. DNA-Agarosegel-Elektrophorese und Extraktion

DNA-Fragmente werden elektrophoretisch in 0,5-1,5%igen Agarosegelen in 1 x TAE Puffer mit 5 V/cm aufgetrennt. Der aufgekochten Agarose wird vor dem Gießen in den Gelschlitten Sybr Safe zugesetzt (5 µL pro 50 mL). Die Proben werden in 1 x DNA-Probenpuffer in die Geltaschen appliziert und nach dem Lauf mit dem Licht der Wellenlänge 295 nm expositioniert. Extrahiert wird die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit:

Ein Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wird mit einem Skalpell ausgeschnitten und entsprechend dem Herstellerprotokoll (Qiagen, Hilden) behandelt.

50 x TAE buffer

2 M	Tris/Acetat, pH 8.5	242 g	Tris base
		57.1 ml	Essigsäure
100 mM	EDTA	37.2 g	Na ₂ EDTA·2H ₂ O
		ad 1L	ent.H ₂ O

Der 1 x TAE Elektrophoresepuffer enthält 40 mM Tris/Acetat bei pH 8,3 und 2 mM EDTA

6 x DNA-Probenpuffer

47% (v/v)	Glycerol		87% Glycerol
10 mM	Tris/Acetat, pH 7,0	100 µL	Tris/HCl, pH 7,0
0.025% (w/v)	Bromphenolblau	125 µL	2% Bromphenolblau in 20% EtOH
0.025%	Xylene Cyanol FF	125 µL	2% (w/v) Xylene Cyanol in 20% EtOH
		ad 10 mL	ent. H ₂ O

30. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration an genomischer-DNA, Plasmid-DNA oder der PCR Produkte nach Mini-und Midipräparation, bzw. der Reinigung über ein Agarosegel, werden mit dem Nanotrop-Spektralphotometer (peqlab, Germany) bei einer Absorption von 260 nm im Photometer bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 1 cm entspricht eine Absorption von 1,0 einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/mL.

Die Konzentration der DNA berechnet sich nach der folgenden Formel:

$$DNA - Konzentration \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = A_{260} * 50 * V$$

wobei A_{260} die Absorption bei 260nm, V der Verdünnungsfaktor sind und 50 µg DNA einer OD von 1 entspricht.

Aus dem Verhältnis DNA zu Protein (260 nm/230 nm) ergibt sich die Reinheit.

Zusätzlich wird die Konzentration über die UV-Bandenintensität auf Agarosegelen mit bekannten DNA-Markern kontrolliert.

31. Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung von DNA-Templaten in den hier angefertigten Plasmiden, genomischer DNA und PCR-Produkten wird nach der Methode von Sanger vollzogen. In dieser Studie wird zur schnelleren Abwicklung der Barcode-Sequenzierungsdienst der Firma AGOWA in Anspruch genommen.

Sequenzierungs Reaktionsansatz

	Volumen	Konzentration
Plasmid-DNA	10 µL	80 ng/µL
PCR-Produkt		
200-500 bp	10 µL	10 ng/µL
500-1000 bp	10 µL	20 ng/µL
1000-2000 bp	10 µL	40 ng/µL
Sequenzierungsprimer	4 µL	5pmol/µL

32. Erzeugung von PCR Fragmenten mittels „two-step-PCR“

“First step” für Fragment 1+2

10-100ng	Plasmid-DNA
20 pmol	Forward-Primer
20 pmol	Reverse-Primer
je 2,5 mM	dNTPs
3x	DMSO
5x	Phusion-Puffer
1U	Phusion™ DNA Hot-Start Polymerase
ad 50 µl	ent. H ₂ O

“Second step” für Fragment 3

10-100 ng	Fragment 1
10-100 ng	Fragment 2
20 pmol	Forward-Primer
20 pmol	Reverse-Primer
je 2,5 mM	dNTPs
3x	DMSO (100x)
5x	Phusion-Puffer
1U	Phusion™ DNA Hot-Start Polymerase
ad 50 µl	ent. H ₂ O

PCR-Reaktionsansatz für „Colony“-PCR

10 ng-100 ng	genomische DNA
20 pmol	Forward-Primer
20 pmol	Reverse-Primer
5x	Thermo buffer
je 2,5 mM	dNTPs
(2:1)	Taq-DNA Polymerase/ Deep Vent
ad 50 µl	ent. H ₂ O

Vorgang	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
melting	94°C	3 min	
melting	94°C	30 sec	9
annealing	T _m +3°C	30 sec	
extension	72°C	90 sec	
melting	94°C	30 sec	
annealing	T _m +3°C	30 sec	19
extension	72°C	90sec+5 sec pro Zyklus	
polishing	72°C	7 min	
storage	4°C		

33. Oligonucleotidprimer

Zur Involvierung einer gerichteten Mutagenese durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) an der Template-DNA werden Oligonucleotidprimer verwendet, welche in dem mutierten Bereich bis zu 10 Basenpaaren (bp) zueinander und bis zu 20 bp mit der Gensequenz komplementär sind.

Erkennungssequenzen der benutzten Restriktionsenzymewerden werden je nach Empfehlung des NEB-Katalogs bzw. der REBASE-Enzymdatenbank (<http://www.rebase.neb.com>) integriert.

Für die Sequenzierung genutzte Primer liegen bis zu 20 bp ober-und unterhalb der betreffenden Sequenz, da die ersten 30-40 Basen einer Sequenzierungsreaktion nach der nicht-radioaktiven Didesoxy-Methode mit fluoreszenzmarkierten 2-Didesoxynukleotiden schlecht detektiert werden.

Die optimale Annealingtemperatur der Primer wird über deren theoretischen Schmelztemperatur (T_m) nach näherungsweise nach der „nearest neighbor“ Methode mit dem „Oligonucleotide Properties Calculator (OligoCalc)“ von Kibbe, W.A. ⁽¹³⁷⁾ berechnet. Dieser ist verfügbar unter:

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>. Die Konzentration der Oligonukleotide wird auf 100 pmol/μL eingestellt und diese bei -20°C gelagert.

Die Primersynthese wird von der metabion AG (Martinsried, Germany) übernommen.

34. T4 Ligation

Restriktionsverdaute Plasmide und PCR-Fragmente werden mit T4-DNA Ligase (New England Biolabs® Inc., Frankfurt Main, Germany) ligiert.

Der Standardreaktionsansatz beinhaltet Plasmid und PCR-Fragment (Insert) in einem molaren Verhältnis von 1:5. Es werden 25 ng Plasmid eingesetzt.

Die Masse des verwendeten Inserts wird nach folgender Gleichung kalkuliert:

$$Masse_{Fragment}[ng] = 5 * Masse_{Vektor}[ng] * \frac{Länge_{Fragment}[bp]}{Länge_{Vektor}[bp]} \quad (34.1)$$

Reaktionsansatz für T4 DNA Ligase

(5x) T4 Ligase Puffer	2x
Vektor	25 ng
Insert	5x molar
T4 DNA Ligase	U
reinst H ₂ O	ad 20 µL

Der Reaktionsansatz wird entweder 5h bei RT oder 16°C inkubiert und anschließend transformiert.

35. Klonieren mit dem Rekombinase-System

Zur Klonierung, aber vor allem auch zur Umklonierung von Gensequenzen wird das In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit (Takara Bio Europe/Clontech, France) verwendet. Das System erlaubt die sequenz-unabhängige Insertion von PCR-Fragmenten in linearsierte Vektoren. Dazu besitzt das Insert homologe Überhänge von 15 bp zum Target-Vektor.

Reaktionsansatz für

(5x) In-Fusion Reaktionspuffer	10x
In-Fusion Enzym	0,5 U
Vektor	5x
Insert	1 x
reinst H ₂ O	ad 10 µL

Der Reaktionsansatz wird für 15 min bei 37°C, gefolgt von 15 min bei 50°C und bis zur Transformation auf Eis inkubiert.

36. Biochemische Methoden

36.1. Reinigung der Purpurmembran und Test auf analytische Reinheit

36.1.1. Zonalzentrifugation: Reinigung der Purpurmembran über den Zwei-Phasen-Saccharosegradienten

Tab. 1: Ansätze für 80 mL der Saccharose-Lösungen für den zwei-und vierphasen Gradienten.

Saccharosegehalt in der Lösung [%; w/v]	Sucrose [g]	A.dest [mL]	Brechungsindizes der Lösung [n]*
30	24	56	1,4118
34	27,2	52,8	1,3885
36,5	29,2	50,8	1,3922
38	30,4	49,6	1,3960
41	32,8	47,2	1,3999
44	35,2	44,8	1,4078
45	36	44	1,4118

*(CRC Handbook of Chemistry and Physics, 2000-2001)

Für die Aufreinigung der Purpurmembran (PM) als eigene Phase über den Zwei-Phasen-Gradienten sind je 80 mL einer 30 %igen bzw. 45 %igen (D+)-Saccharoselösung (ACROS ORGANICS) anzusetzen und auf den vorgegebenen Brechungsindex⁽¹³⁸⁾ zu kontrollieren (Tab. 1). 10 mL der 45 %igen Lösung werden in das vordere und 13 mL in das hintere Behältnis des Gradientenmischers (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS) eingefüllt. Der Rührfisch im vorderen Behältnis sollte mit mittlerer Geschwindigkeit genau vor dem Verbindungskanal beider Behältnisse rühren. Nach dem Öffnen des Verbindungskanals durchmischen sich die beiden Konzentrationen. Mit Stufe 4 wird der durchmischte Saccharose-Gradient über die Peristaltikpumpe (Pharmacia Biotech) in ein UZ-Röhrchen (38,5 mL; Kontron 9091-90200) eingetropf.

5 mL des rohen Materials (OD 20) auf den Zuckergradienten aufgeben und alle Röhrrchen mit A.dest austarieren. Bei abweichenden OD-Werten muss die Masse des aufgegebenen Rohmaterials derer in 5 mL OD 20 entsprechen. Die tarierten Buckets werden in der Ultrazentrifuge (T-1080; Rotor SW28; Kontron Instruments AG) bei 4°C für 19 h mit 25000 rpm in der UZ zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgt das Absaugen und Verwerfen des gelblichen Überstandes und der roten Phase mit der Wasserstrahlpumpe. Die freigelegte PM-Phase wird vorsichtig abpipettiert und für den Waschvorgang auf 6 saubere UZ-Röhrrchen verteilt, diese mit A.dest aufgefüllt austariert und bei 4°C für 2,5 h mit 25,000 rpm in der UZ zentrifugiert.

Der Überstand ist folglich abzusaugen und zu verwerfen. Für den Waschschrift die Pellets im Anschluß gleichmäßig auf 8 Sorvall[®]-Zentrifugenröhrrchen (Nalgene) verteilen und mit A.dest auffüllen. Abschließend jeweils 1 mL Phosphatpuffer (0,06 M, pH 6,8) hinzufügen und bei 20°C für 25 min mit 18500 rpm in der Sorvall[®]-Zentrifuge zentrifugieren (Brake Off bei 1000 rpm). Den Waschschrift wiederholen. Danach den Überstand absaugen, verwerfen und die Pellets einer Charge in Kautexflaschen (Kautex) mit wenig A.dest vereinigen.

36.1.2. Reinigung über den Vier-Phasen-Saccharosegradienten

Zur Isolation der Purpurmembra (PM) als eigene Phase über den Vier-Phasen-Gradienten sind je 80 mL einer (D+)-Saccharoselösung (ACROS ORGANICS) von 34 %; 36,5 %; 38 %; 41 % und 44 % anzusetzen und auf den vorgegebenen Brechungsindex (CRC Handbook of Chemistry and Physics, 2000-2001) zu kontrollieren (Tab. 1) 4,6 mL jeder Lösung werden der höchsten Dichte folgend über das vordere Behältnis des Gradientenmischers in ein UZ-Röhrrchen (38,5 mL; Kontron 9091-90200) eingetropft. Beim Wechsel werden der Gradientenmischer und die Pumpe mit A.dest und der niedrigeren Sucrose-Konzentration gespült. Der Gradient sollte keine Schlierenbildung im UZ-Röhrrchen zeigen.

5 mL des rohen Materials (OD 20) auf den Zuckergradienten aufgeben und alle Röhrrchen mit A.dest austarieren. Bei abweichenden OD-Werten muss die Masse des aufgegebenen Rohmaterials derer in 5 mL OD 20 entsprechen. Die tarierten Buckets (Kontron Instruments AG) werden in der Ultrazentrifuge (T-1080; Rotor TST 28-38; Kontron Instruments AG) bei 4°C für 19 h mit 25,000 rpm in der UZ zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgt das Absaugen und Verwerfen des gelblichen Überstandes

und der roten Phase mit der Wasserstrahlpumpe. Die freigelegte PM-Phase wird vorsichtig abpipettiert und für den Waschvorgang auf 6 saubere UZ-Röhrchen verteilt, diese mit A.dest aufgefüllt austariert und bei 4°C für 2,5 h mit 25,000 rpm in der UZ zentrifugiert.

Der Überstand ist folglich abzusaugen und zu verwerfen. Für den Waschschrift die Pellets im Anschluß gleichmäßig auf 8 Sorvall®-Zentrifugenröhrchen (Nalgene) verteilen und mit A.dest auffüllen. Abschließend jeweils 1 mL Phosphatpuffer (0,06 M, pH 6,8) hinzufügen und bei 20°C für 25 min mit 18500 rpm in der Sorvall®-Zentrifuge zentrifugieren (Brake Off bei 1000 rpm). Den Waschschrift wiederholen. Danach den Überstand absaugen, verwerfen und die Pellets einer Charge in Kautexflaschen (Kautex) mit wenig A.dest vereinigen.

36.1.3. Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Purpormembran durch UV-Vis Spektroskopie

Die Untersuchung der Absorptionseigenschaften BR-haltiger Proben geschieht unter Verwendung des UV-Vis-Zweistrahlspektrometers (lambda35, Perkin Elmer). Sämtliche Angaben zur Absorption erfolgen in dimensionslosen Einheiten der OD. Bei der spektroskopischen Absolutbestimmung von Konzentrationen PM-haltiger Proben ist der nichtabsorptive Anteil des Meßwertes aus der optischen Streuung zu beachten. Aufgrund variierender PM-Teilchengrößen stellt die Hintergrundstreuung keine konstante Größe dar und ist daher nicht auf dem rechnerischen Weg von der Absorption zu trennen. Zur Umgehung dieses Effektes erfolgen die Konzentrationsbestimmungen daher stets über Absorptionsmessungen für den B-Zustand des lichtadaptierten Proteins bei 570 nm mit ausreichend homogenisierten Proben und linearer Korrektur des Hintergrundes bei 800 nm auf OD null.

Der verwendete Extinktionskoeffizient für den B-Zustand ist $62700 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Für die Analyse der Proben im UV-VIS-Spektrometer 980 µL A.dest und 20 µL Probe in eine Einwegküvette pipettieren und durchmischen. Gemessen wird gegen die Referenz von 980 µL A.dest. Die Probe ist mit Chargen und Fraktionsnummer zu kennzeichnen, einzufrieren und in die Lagerliste einzutragen.

37. Massenspektrometrie

37.1. Probenvorbereitung

Die Proben wurden verändert nach Hufnagel *et al.* ⁽¹²⁹⁾ für die massenspektrometrische Messung vorbereitet:

20 nmol Purpurchromophor mit 1000 µL Ethanol in einem Eppendorf-Cup suspendieren, für 2 min vortexen und beschallen (Ultraschall-Desintegrator Sonifier II, Branson, UK; 1 s pulse on, 5 s pulse off, 25% amplitude, 5 s time). Nach Zugabe von 500 µL Hexan erfolgt eine Differentialzentrifugation für 3 min mit 3000*g bei RT und der Überstand wird verworfen. An die Addition von 1000 µL Hexan wird wiederholt 2 minütig gevortext, beschallt und zentrifugiert zu den oben genannten Konditionen. Der Überstand wird verworfen und das weiße Pellet wird für 15 min unter dem Abzug getrocknet. Abschließend wird dieses in einer Kombination bestehend aus 200 µL Chloroform, 200 µL Methanol, 175 µL A.ent. und 10 µL Ameisensäure gelöst.

37.2. Konditionen der Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Messungen werden mit einem Qstar Pulsar i Massenspektrometer (Applied biosystems, Darmstadt, Germany), ausgestattet mit einer Elektrospray-Ionisations (ESI)-Quelle, durchgeführt. Die Proben werden kontinuierlich mit 25 µL/min Flussrate über eine Spritze (Hamilton) injiziert.

Die ESI Parameter sind folgend beschrieben:

Ion Spray voltage 5000 V, Declustering potential (DP1) 80 V, Focusing potential (FP) 220 V, Declustering potential 2 (DP2) 15 V. Der Wert für Ionisierungs-(N₂) und Schutzgas (N₂) beträgt 25.

Zur Dekonvolution der gezeigten Massenspektren wird das "Bayesian Protein Reconstruct tool" verwendet, als Bestandteil des Softwarepaketes BioAnalyst 1.1.5.

38. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8

0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8	12,1 g	Tris base
in 80 mL dH ₂ O lösen und pH mit 1N HCl einstellen			
		ad 200 mL	dH ₂ O
steril filtrieren (0,22 µm) und Zugabe von			
0,4 %	SDS	0,8 g	SDS
Lagerung bei 4°C			

4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8

1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8	182 g	Tris base
in 600 mL dH ₂ O lösen und pH mit 1N HCl einstellen			
		ad 1000 mL	dH ₂ O
steril filtrieren (0,22 µm) und Zugabe von			
0,4 %	SDS	4,0 g	SDS
Lagerung bei 4°C			

5x SDS/Elektrophoresepuffer

0,125 M	Tris-HCl	15,1 g	Tris base
0,960 M	Glycin	72,0 g	Glycin
0,5%	SDS	5,0 g	SDS
		ad 1000 mL	dH ₂ O
Lagerung bei 4°C			
Zur Verwendung auf 1x einstellen, pH 8,3			

Für das Trenngel aufgeführte Ansätze sind ausreichend für drei Minigele mit den Dimensionen von 0,75 m x 7,3 cm x 8,3 cm (Höfer Scientific Instruments). Je nach

gewünschtem Trennverhalten sind folgende Mengen der einzelnen Lösungen in einem Falcontube zu mischen:

Konzentrationen [%]	7,5	12,5	15
Stock Solutions			
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	7,50	12,50	15,00
4x Tris-HCl/SDS, pH8,8	7,50	7,50	7,50
dH ₂ O	15,00	10,00	7,50
10% AMPS	0,10	0,10	0,10
TEMED	0,02	0,02	0,02

(alle Angaben in Milliliter)

Für das Sammelgel (Ansatz ebenfalls ausreichend für 3 Minigele mit den Dimensionen von 0,75 m x 7,3 cm x 8,3 cm ; Höfer Scientific Instruments) werden in einem Falcontube folgende Lösungen gemischt:

Sammelgel 4%ig	
1,30	30% Acrylamid/Bisacrylamid
2,50	4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8
6,10	dH ₂ O
0,05	10% Ammoniumpersulfat
0.01	TEMED

(alle Angaben in Milliliter)

39. Western-Blot

39.1. „Semi dry“-Elektroblot

Der horizontale „semi dry“ Transfer von gelelektrophoretisch getrennten Proteinproben auf Nitocellulose-Hybond Membranen erfolgt mit dem „Drei-Puffer-System“ beschrieben von Kyhse-Andersen, J. ⁽¹³⁹⁾:

Anodenpuffer 1, pH 10,4

0,3 M	Tris-HCl, pH10,4	3,6 g	Tris base
20 %	Methanol	20 mL	Methanol
		ad 100 mL	ent. H ₂ O

Anodenpuffer 2, pH 10,4

25 mM	Tris-HCl, pH10,4	0,3 g	Tris base
20 %	Methanol	20 mL	Methanol
		ad 100 mL	ent. H ₂ O

Kathodenpuffer, pH 9,4

25 mM	Tris-HCl, pH10,4	0,3 g	Tris base
20 %	Methanol	20 mL	Methanol
40 mM	Aminocaprinsäure	0,5 g	Aminocaprinsäure
		ad 100 mL	ent. H ₂ O

Transferaufbau:

Graphit Anodenplatte

3 Lagen Whatman-Papier getränkt in Anodenpuffer 1

6 Lagen Whatman-Papier getränkt in Anodenpuffer 2

Nitocellulose-Hybond Membran getränkt in dH₂O

SDS-Gel mit aufgetrennten Proteinproben

6 Lagen Whatman-Papier getränkt in Kathodenpuffer

Graphit Kathodenplatte

Der Transfer erfolgt mit 250 mA (15 V) für 1h.

40. Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy, AFM*)

40.1. Probenvorbereitung

10 μL (0,6 mg/mL) der Purpurmembraan werden für 20 min in Puffer (300 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8) auf einem Glimmer-Templat inkubiert. Bei diesem Standardprobenträger handelt es sich um ein mit mehreren Lagen Glimmer beklebtes Metallplättchen. Eine Glimmerschicht wird mit Tesafilm zuvor abgehoben, um eine möglichst ebene und saubere Oberfläche zu gewährleisten.

40.2. Konditionen der Rasterkraftmikroskopie

Bildgebende- und Kraftspektroskopie der auf Glimmer adsorbierten Purpurmembraan wird in Inkubationspuffer bei RT mit einem Nanoscope IV System (Veeco, Santa Barbara, Kalifornien) durchgeführt. Im Kontaktmodus (*constant force contact mode*) und für die Kraftspektroskopie wird eine scharfe Messspitze aus Siliziumnitrid (Si_3N_4) verwendet. Es ist darauf zu achten, dass die Federkonstante der Blattfeder (*cantilever*) bei Bildgebung 0,3 nN nicht überschreitet, um die Oberflächenstruktur der biologischen Proben nicht zu deformieren.

Vor dem Herausziehen und der Entfaltung von Einzelmolekülen wird die Oberfläche gescannt und über einem entsprechenden Membranpatch positioniert. Im Anschluss wird die Spitze für 0,2-0,3 s mit einer Kraft von 1,0-1,5 nN auf den Patch gedrückt. Das Anbinden eines Proteins an die Spitze wird über die Ablenkung der Blattfeder detektiert. Die erhaltene Kraftabstandskurve repräsentiert die Entfaltung eines Bakteriorhodopsin-Monomers.

41. Biosensorik

Das Flusssystem besteht aus einer Peristaltikpumpe mit Zuleitungen und einer Flusszelle, die mit zwei unabhängigen Flusskanälen ausgestattet ist. Sie wird auf die Oberfläche des Sensorchips aufgedrückt und seriell genutzt (1+2 Kanal). Jede Flusszelle ist 12 mm lang und fasst ein Volumen von 10 μl . Die Probenzuführung erfolgt automatisch über ein 5-Wegeventil. Der hydrophobe SiO_2 -Sensorchip wird mit einer Matrix durch Immobilisierung einer homogenen Stearyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin Bilayerschicht (BP/SOPC 10:90, Gesamtlipidlayerkonzentration 250 μM) mit über Stearylsäurereste inkorporierten und orientierten Biphosphat-Pinzetten (BP, 15 μM) aktiviert. Die Aktivierung und spätere Bindungsmessungen der Purpurchromophore (PM) Mutante PM-BOP/ARG₍₇₎ und des Wildtypes PM-WT an die freien BP-Bindungsstellen werden in RfS-Puffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5) mit einem Injektionsvolumen von 70 μL und einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ bei RT durchgeführt.

RfS-Laufpuffer

20 mM	Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure), pH 7,5	1,04 g	Hepes, pH 7,5
150 mM	NaCl	1,74 g	NaCl
		ad 200 mL	

V. Anhang

42. Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Mer	SMP	ATG	TGA
bopseq0+	5'-AAA TTC CGT CAC GAG CGT ACC ATA CT-3'	26	76	-72	
boprev26	5'-G CGA GTA CAA GAC CGA GTG GGG G- 3'	23	76		+82
IFBamHlseq	5'-TAG AAC TAG TGG ATC CGA CGT GAA GAT GGG GCT-3'	33	76	-369	
IFHindIIIrev	5'-CC TCT AGA AGA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACG-3'	35	78		+197
HXSEQ	5'-CGT ATG TTG TGT GGA ATT GTG AGC G-3'	25	74	-533	
HXREV	5'-TCG GTC GGT AAC TCG CGG GTT C-3'	22	72		+475
Arg ₍₇₎ NdeIseq	5'-CCT AGG CGC CGC CGC CGC CGC CGC ATA TGC GGC GCG GCC GCG ACC AGC GAC-3'	51	96		
Arg ₍₇₎ Avr IIrev	5'-GGC GGC GGC GGC GCC TAG GTT CGC CGA AGA TCG CAC GAC T-3'	40	88		
AG4NdeIseq	5'-AAC CCG TCG TCG CTC TTC CGC TAC CTC CCG TCG GAC CGC ATA TGC GGC GCG-3'	57	91		
AG4AvrIIrev	5'-GTC CGA CGG GAG GTA GCG GAA GAG CGA CGA CGG GTT CCT AGG TTC GCC GAA GAT CGC-3'	57	94		
CO3-P1NdeIseq	5'-TCG GTC TCG GTC GGC ATG AAG CCG TCG CCG CGC CCG CGC ATA TGC GGC	57	96		

	GCG GCC GCG-3'				
CO3-P1AvrIIrev	5'-CGG GCG CGG CGA CGG CTT CAT GCC GAC CGA GAC CGA CCT AGG TTC GCC GAA GAT CGC-3'	57	93		
eGFPAvrIIseq	5'-GCG GCT CGA GGG TAC CTA GGC ATG GTG AGC AA-3'	32	78		
eGFPNdelrev	5'-ATC CTC TAG ATT ACA TAT GCT GTA CAG CTC-3'	30	84		
PCPBstEIIseq	5'-CGA GCA GGT AAC CCG ATG CCC GTA ACC GAA GCG CAA-3'	36	86		
PCPBgl IIrev	5'-ATG GTG ATG AGA TCT CGT GGC GAC ATA CTG GGC-3'	33	82		
pUASTeGFPKasIseq	5'-CGA GCA GGC GCC AAC ATG GTG AGC AAG GGC GAG-3'	33	76		
pUASTeGFPHindIIIrev	5'-ATG GTG ATG AAG CTT CTA GTG GAT CCT GTA CAG CTC-3'	36	78		

43. PCR-Strategie

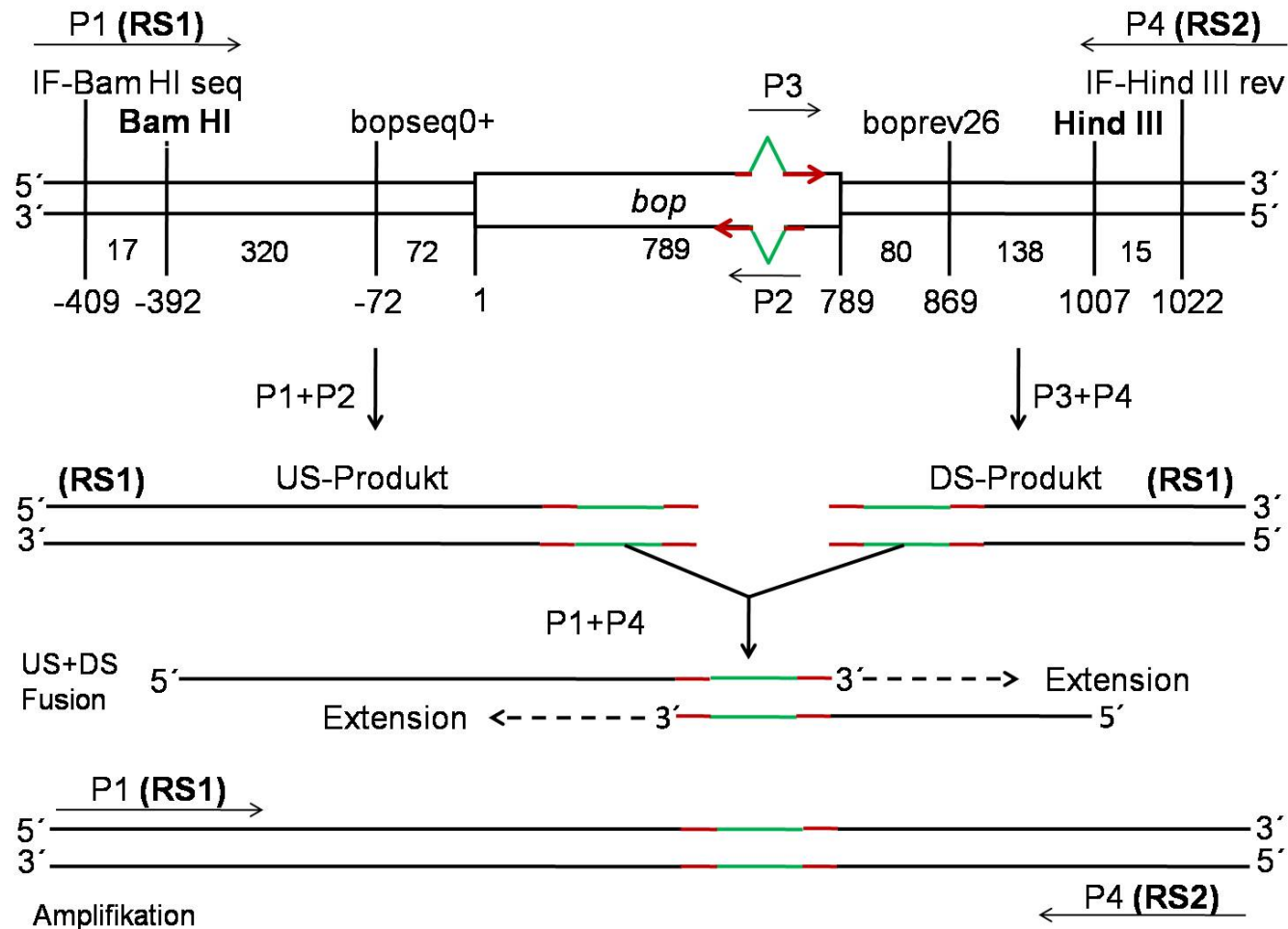


Abb. 43-1: Schematische Darstellung der zwei Stufen PCR-Strategie am Beispiel von *bop-arg(7)*. Mit den Primerpaaren IF-*Bam*HIseq (Primer 1 (P1) mit Restriktionsschnittstelle1 (RS1)) und *arg(7)AvrII*rev (P2), sowie IF-*Hind*IIIrev (P4(RS2)) und *arg(7)NdeI*seq (P3) werden zwei Fragmente „upstream“ (US-Produkt) und „downstream“ erzeugt. Diese werden in einem zweiten PCR-Schritt als Template für eine weitere flankierende Primerverlängerung benutzt. *arg(7)NdeI*seq und *arg(7)AvrII*rev beinhalten die sieben Arginin codierende Nukleotidsequenz für den C-terminalen Teil von BOP. *bopseq0+* und *boprev26* dienen zur Sequenzierung.

44. Vektorkarten

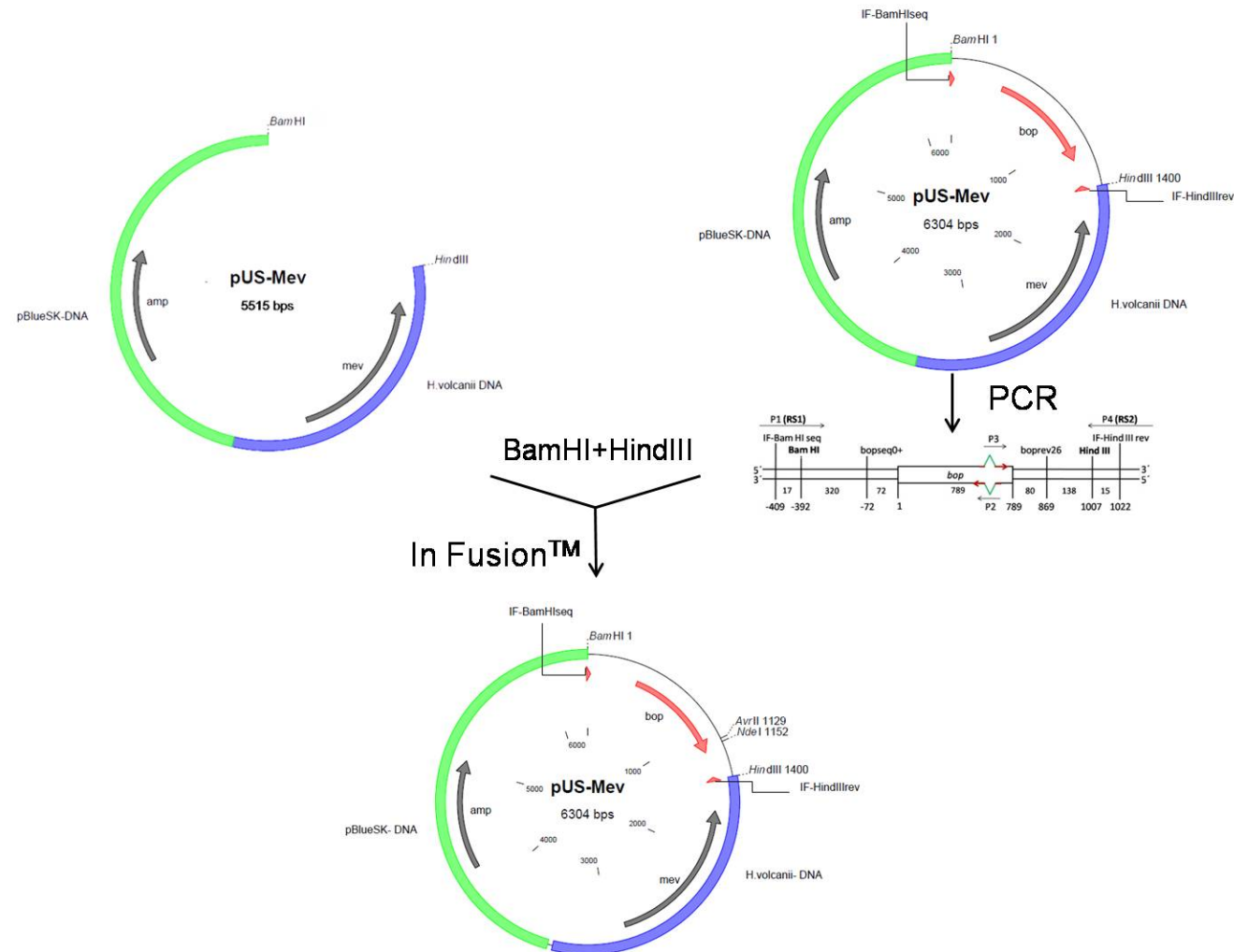


Abb. 44-1: Konstruktionsschema von *pUS-Mev-bop-arg₍₇₎*. Das durch zweistufige PCR generierte Endprodukt und der Zielvektor *pUS-Mev* werden sequenziell an den Restriktionsschnittstellen von *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und durch Rekombination (In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit, Takara Bio Europe/ Clontec, France) miteinander verknüpft.

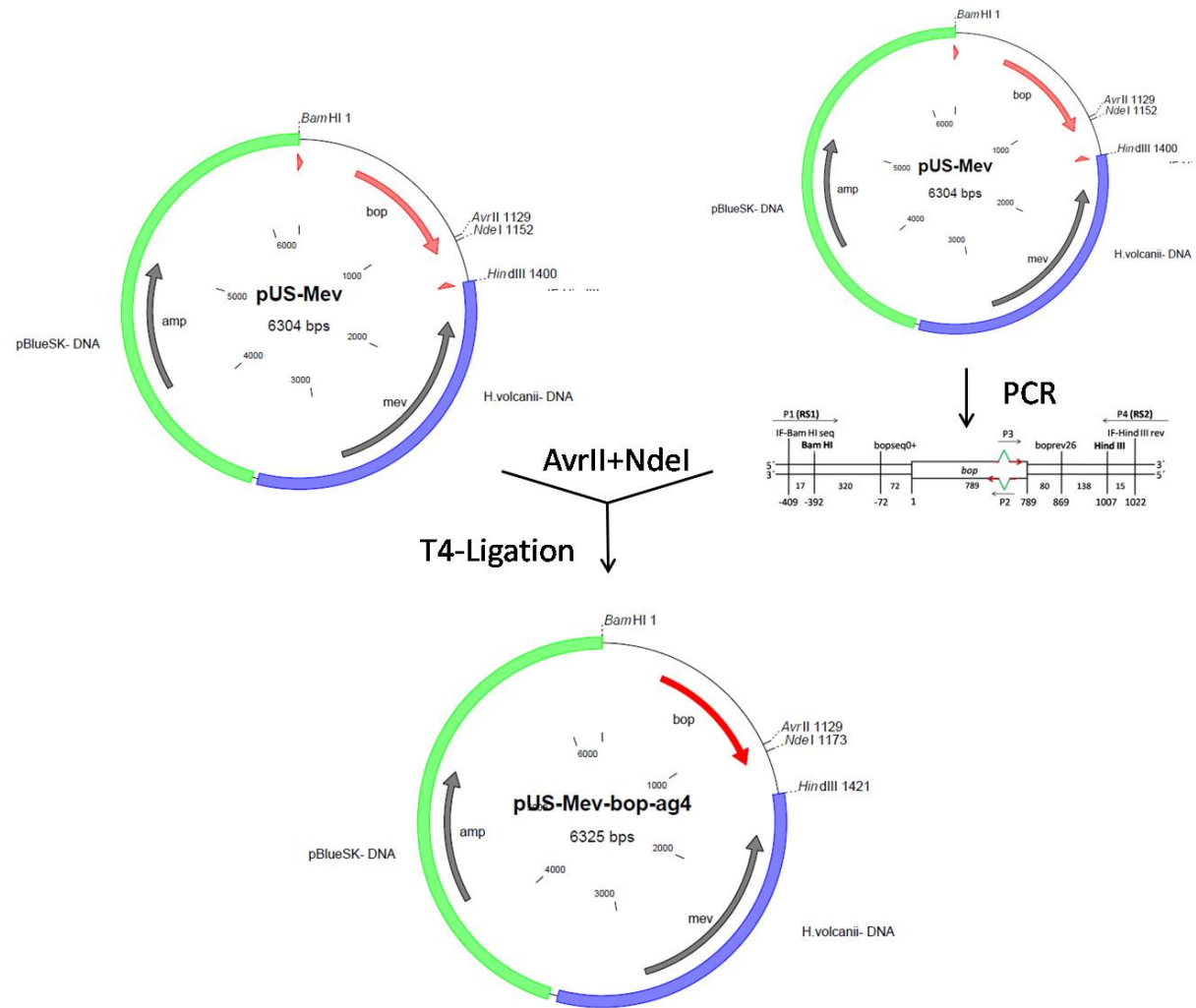


Abb. 44-2: Konstruktionsschema von *pUS-Mev-bop-ag4*.

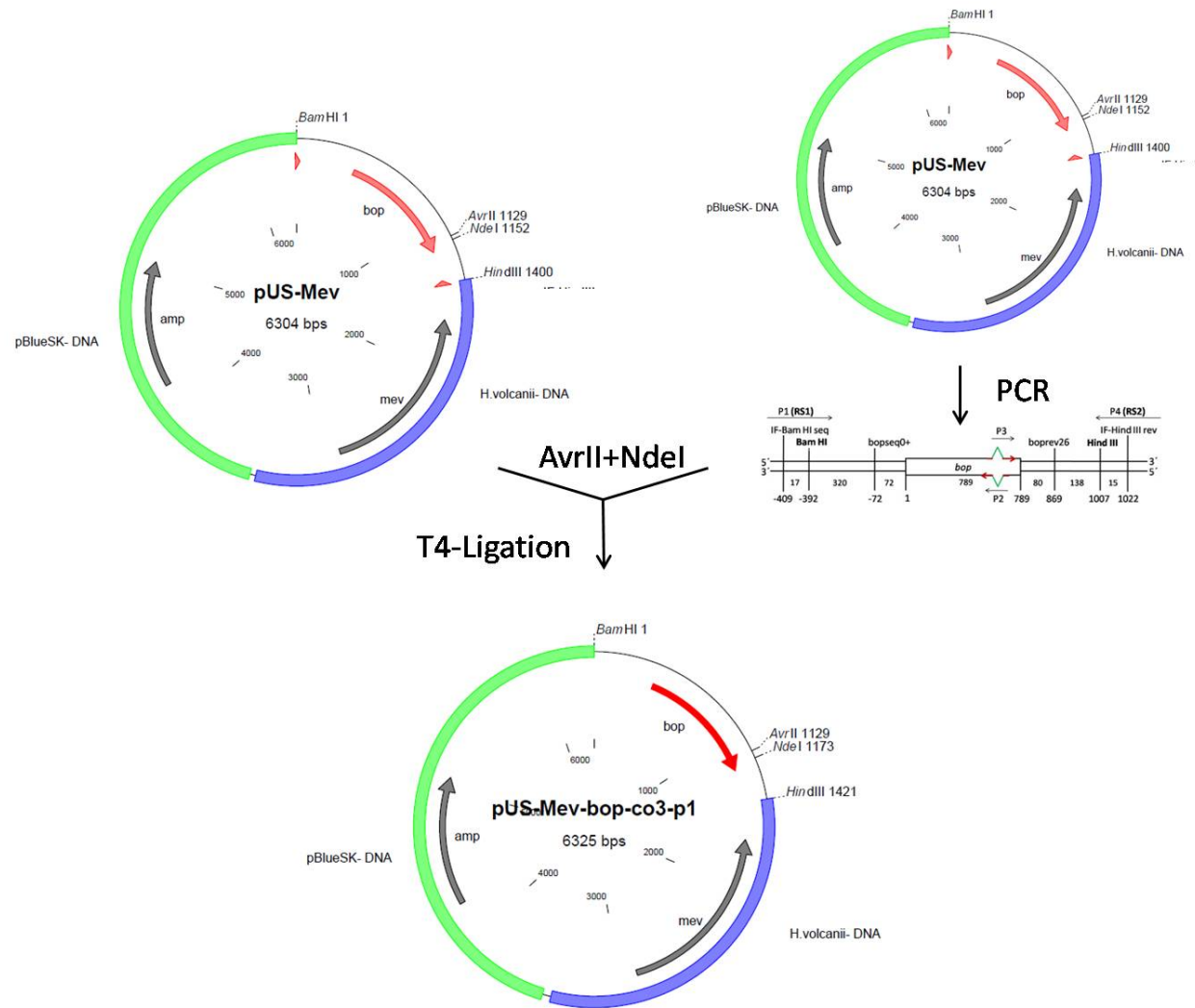


Abb. 44-3: Konstruktionsschema von *pMKK100-Mev-bop-co3-p1*.

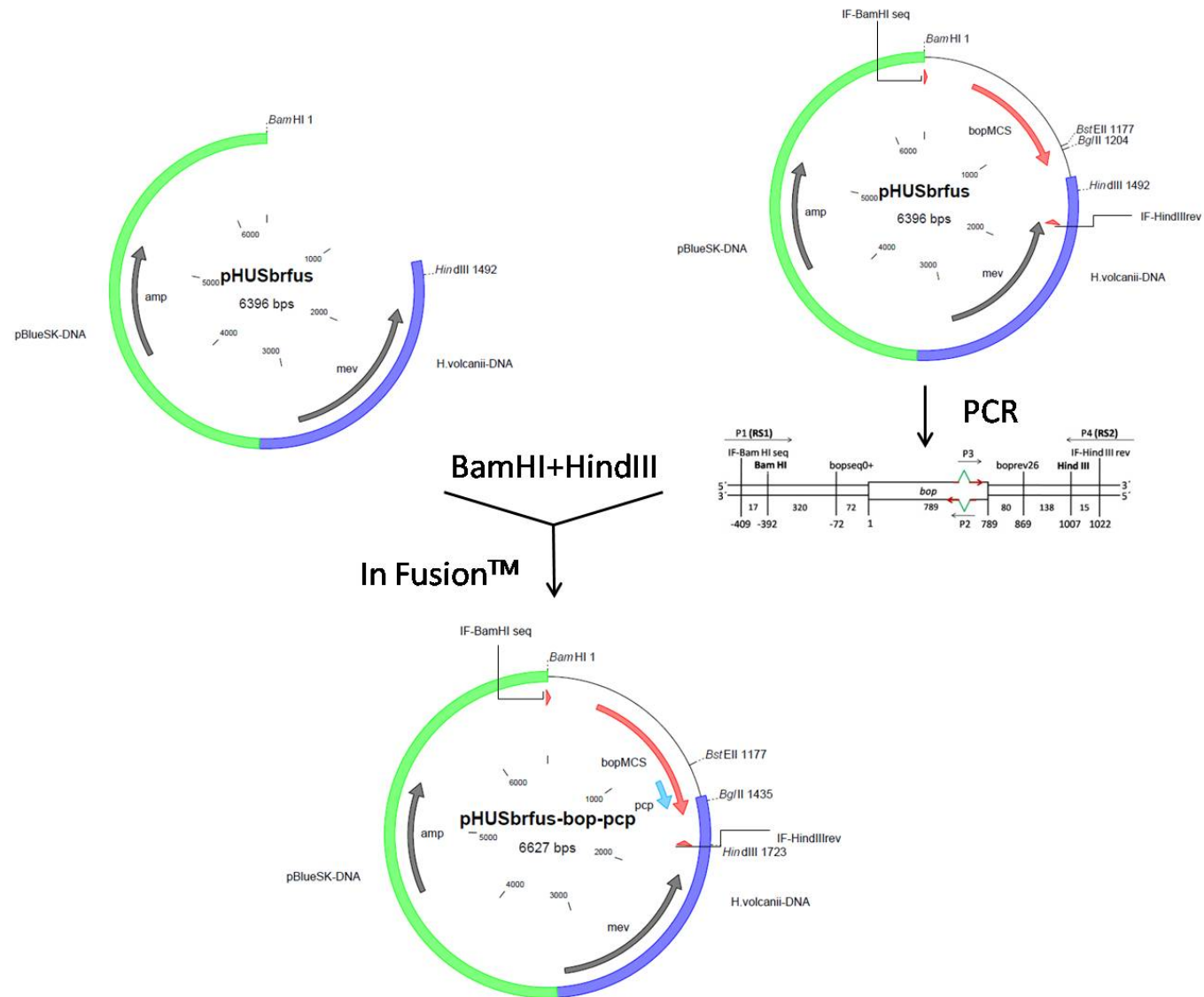


Abb. 44-4: Konstruktionsschema von *pHUS-brfus-bop-pcp*.

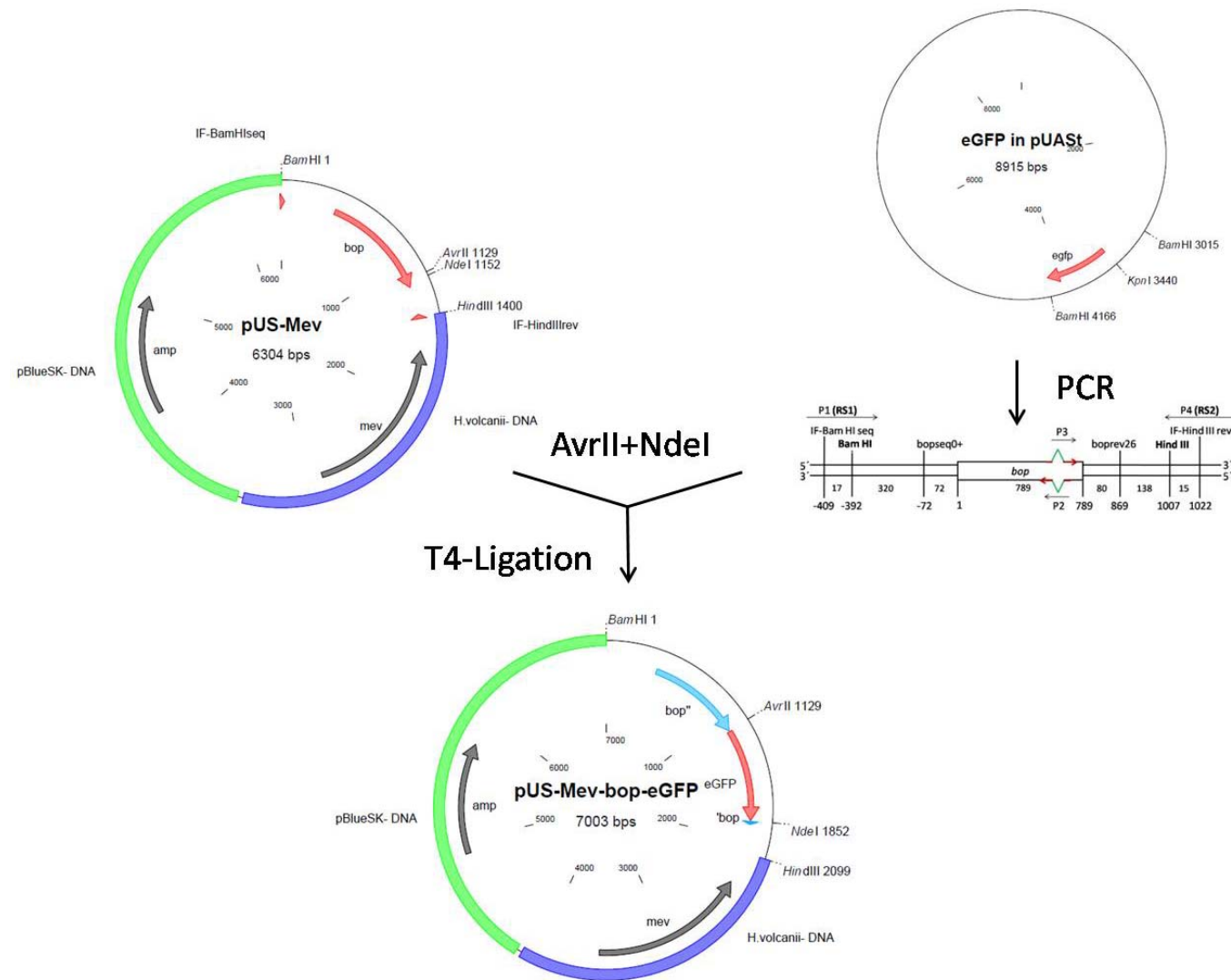


Abb. 44-5: Konstruktionsschema von *pUS-Mev-bop-egfp*.

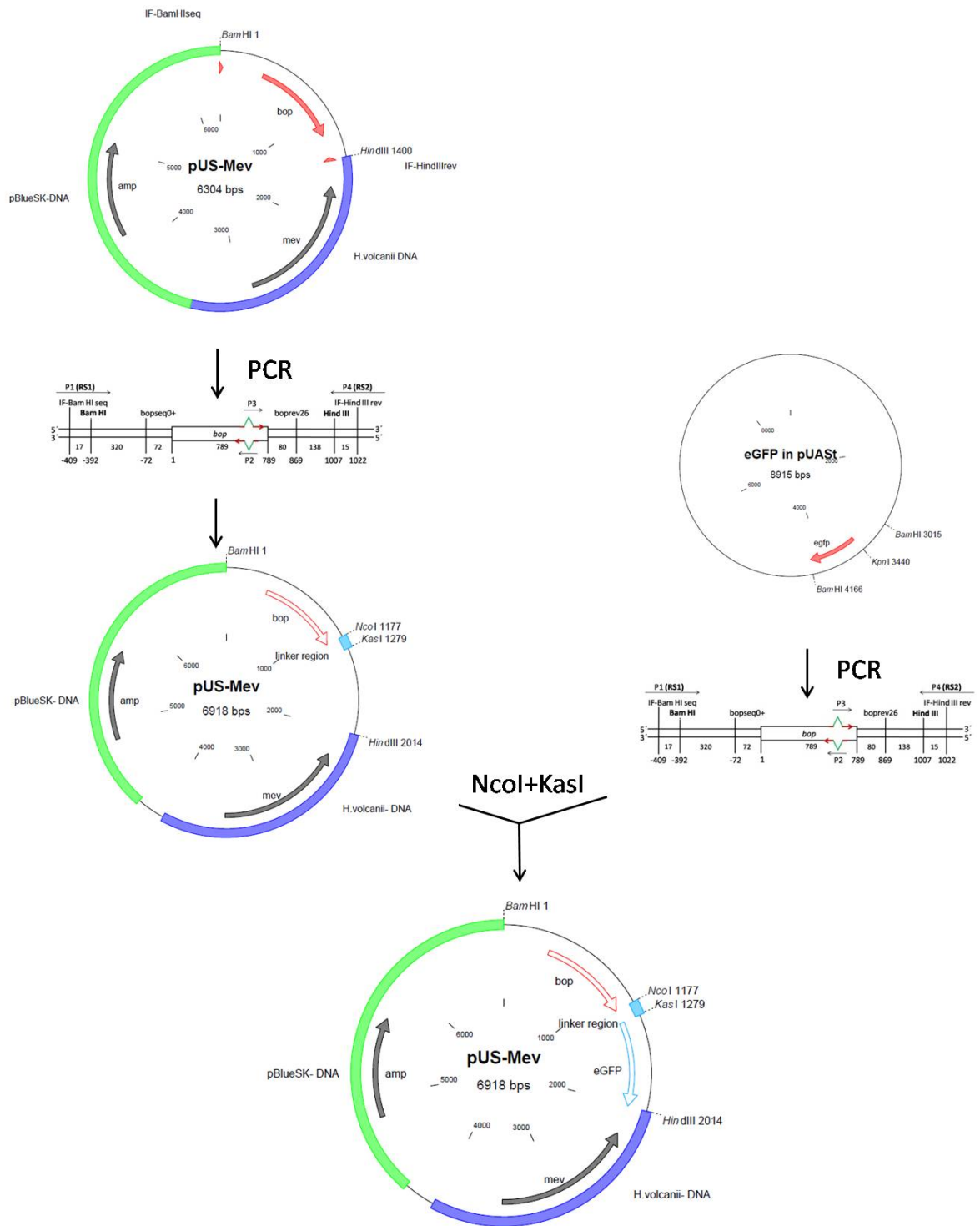


Abb. 44-6: Konstruktionsschema von *pUS-Mev-bop-linker-egfp*.

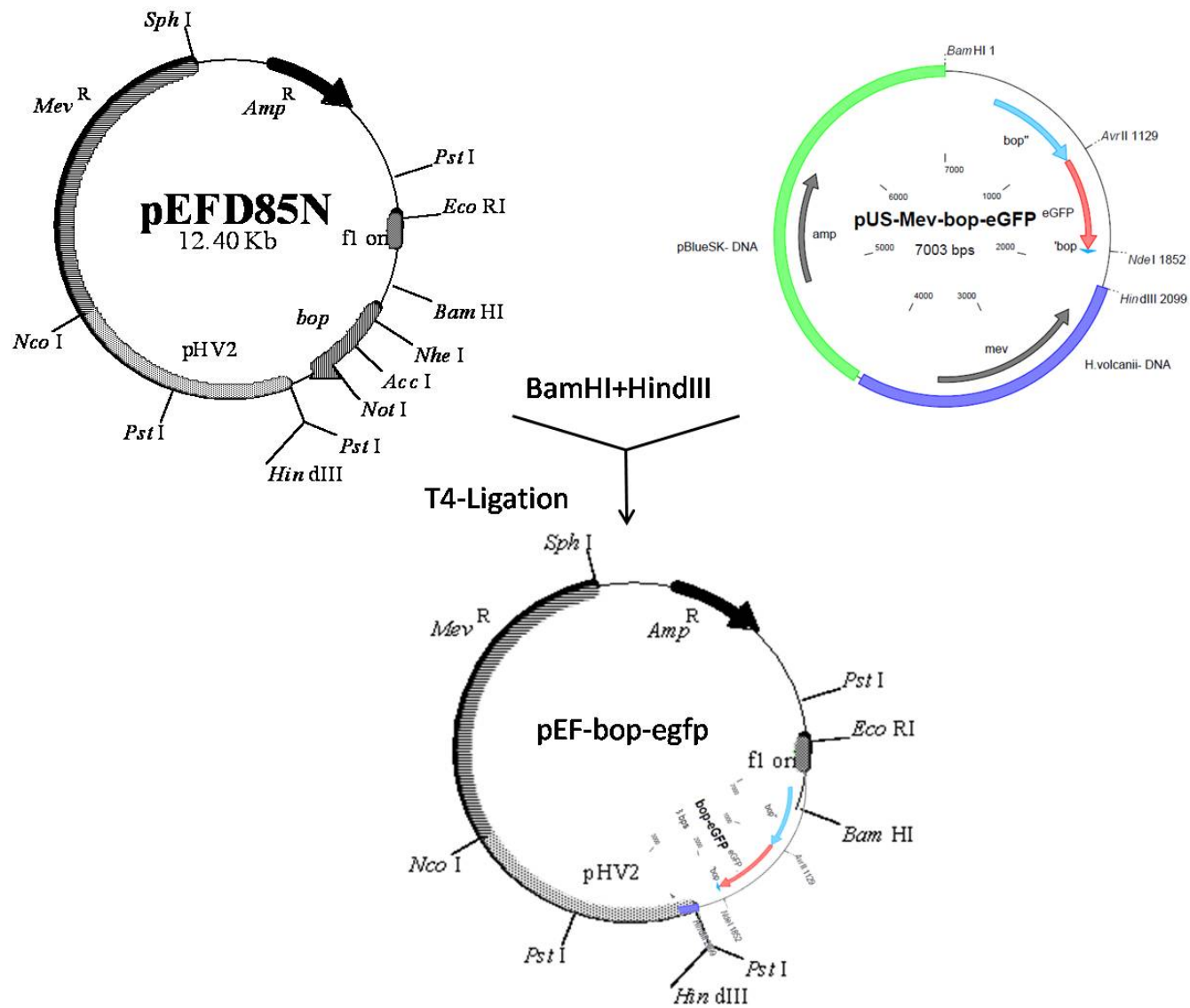


Abb. 44-7: Konstruktionsschema von *pEF-bop-egfp*.

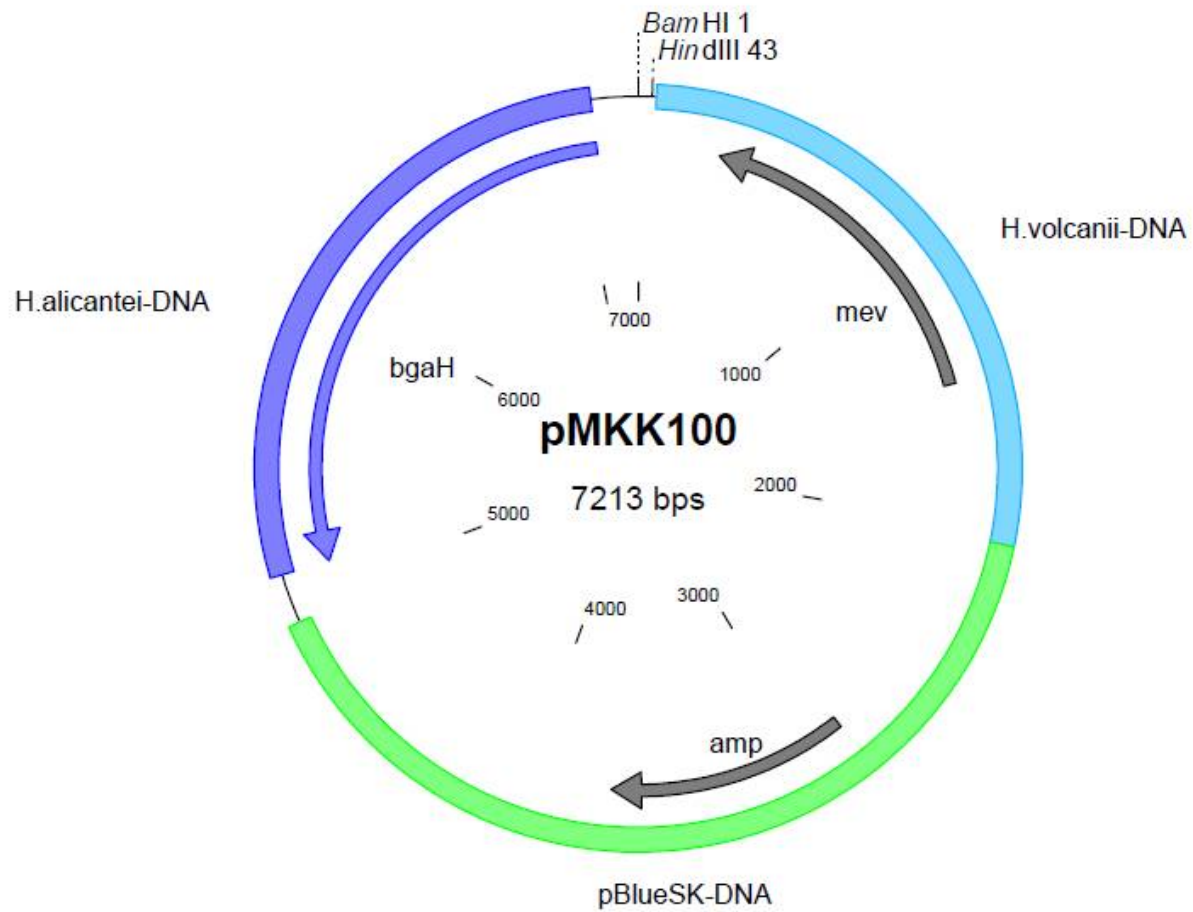


Abb. 44-8: Vektor *pMKK100* mit erweiterter „Blau-Rot“-Selektion durch die halohile β -Galaktosidaseaktivitat (*bgaH*-Gen aus *Haloferax alicantei*).

45. Referenzen

1. Grant, W.D. and Larsen, H. (1989). Extremely halophilic archaeobacteria. Order Halobacteriales red. nov., *In Bergey's manual of systematic bacteriology*, (ed. N. Pfennig), Williams and Wilkins, Baltimore, 2216-2233.
2. Woese, C.R. and Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5088–5090.
3. Allers, T. and Mevarech, M. (2005), Archaeal Genetics The Third Way, *Nature Reviews Genetics*, **6**, 53-73.
4. Robinson, J.L., Pyzyra, B., Atrasz, R.G., Henderson, C.A., Morrill, K.L., Burd, A.M., DeSoucy, E., Fogleman III, R.E., Naylor, J.B., Steele, S.M., Elliott, D.R., Leyva, K., J. and Shand, R.F. (2005), Growth Kinetics of Extremely Halophilic Archaea. (Family Halobacteriaceae) as Revealed by Arrhenius Plots, *Journal of Bacteriology*, **187**, 923-929.
5. Kempf, B. and Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.*, **170**, 319-330.
6. Martin, D.D., Ciulla, R.A., and Roberts, M.F. (1999). Osmoadaptation in Archaea, *Appl. Env. Microbiol.*, **65**, 1815-1825.
7. Ruepp, A. and Soppa, J. (1996). Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarium* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the arcRACB gene cluster. *J Bacteriol*, **178**, 4942–4947.
8. Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius (1971), Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nat. New Biol.*, **233**, 149-152.
9. Hartmann, R., Sickinger, H. D. and Oesterhelt, D. (1980), Anaerobic growth of halobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A Biochemistry*, **6**, 3821 3825.

10. Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1973), Functions of a new photoreceptor membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.*, **70**, 2853-2857.
11. Eichler, J. and Moll, R. (2001), The signal recognition particle of Archaea, *TRENDS in Microbiology*, **9**, 130-136.
12. Pohlschröder, M., Dilks, K., Hand J.N. and Wesley Rose, R. (2004), Translocation of proteins across archaeal cytoplasmic membranes, *FEMS Microbiology Reviews*, **28**, 3-24.
13. Pohlschröder, M., Giménez, M.I. and Jarell, K.F. (2005), Protein transport in Archaea Sec and twin arginine, *Current Opinion in Microbiology*, **8**, 713-719.
14. Gerber, G.E., Gray, C.P., Wildenauer, D. and Khorana, H.G. (1977), Orientation of bacteriorhodopsin in *Halobacterium halobium* as studied by selective proteolysis, *Biochemistry*, **74**, 5426-5430.
15. Wallace, B.R. and Henderson, R. (1982), LOCATION OF THE CARBOXYL TERMINUS OF BACTERIORHODOPSIN IN PURPLE MEMBRANE, *Biophys. J.*, **39**, 233-239.
16. Madern, D., Pfister, C. and Zaccai, G. (1995), Mutation at a single acidic Amino-Acid enhances the halophilic Behavior of Malate-Dehydrogenase from *Haloarcula Marismortui* in physiological Salts, *Eur J. Biochem.*, **230**, 1088-1095.
17. Pundak, S. and Eisenberg, H. (1981), Structure and Activity of Malate-Dehydrogenase from the extreme halophilic Bacteria of the Dead-Sea .1. Conformation and Interaction with Water and Salt between 5M And 1M NaCl Concentration, *Eur. J. Biochem.*, **118**, 463-470.
18. Bonneté, F., Ebel, C., Zaccai, G. and Eisenberg, H. (1993), Biophysical Study of halophilic Malate-Dehydrogenase in Solution - Revised Subunit Structure and Solvent Interactions of native and recombinant Enzyme, *J. Chem. Soc. Faraday. T.*, **89**, 2659-2666.

19. Patzelt, H., Simon, B., terLaak, A., Kessler, B., Kühne, R., Schmieder, P., Oesterhelt, D. and Oschkinat, H. (2002), The structures of the active center in dark adapted bacteriorhodopsin by solution state NMR spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9765-9770.
20. Sumper, M., Reitmeier, H., Oesterhelt, D. (1976), Biosynthesis of the Purple Membrane of Halobacteria, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **15**, 187-194.
21. Danon, A., Brith Lindner, M. and Caplan, S., R. (1977), Biogenesis of the Purple Membrane of Halobacterium Halobium, *Biophys. Struct. Mechanism*, **3**, 1-17.
22. Kates, M., Kushwaha, S.C., and Sprott, G.D. (1982), Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria, *Methods in Enzymology*, **88**, 98-111.
23. Grigorieff, N., Beckmann, E. and Zmelin F. (1995), Lipid Location in Deoxycholate treated Purple Membrane at 2,6 Å, *J. Mol. Biol.*, **254**, 404-415.
24. Weik, M., Patzelt, H., Zaccai, G. and Oesterhelt, D. (1998), Localization of Glycolipids in Membranes by In Vivo Labeling and Neutron Diffraction, *Molecular Cell*, **1**, 411-419.
25. Klöppel, K.D. and Fredrickson, H.L. (1991), Fast atom bombardment mass spectrometry as a rapid means of screening mixtures of ether linked polar lipids from extremely halophilic archaeobacteria for the presence of novel chemical structures, *J. Chromato. Biomed. Appl.*, **562**, 369-376.
26. Nishihara, M., Morll, H. and Koga, Y. (1987), Structure Determination of Quartet of Novel Tetraether Lipids from Methanobacterium thermoautotrophicum, *J. Biochem.*, **101**, 1007-1015.
27. Henderson, R., Jubb, J.S. and Whytock, S. (1978), Specific Labelling of the Protein and Lipid on the Extracellular Surface of Purple Membrane, *J. Mol. Biol.*, **123**, 259-274.
28. Koltover, I. Raedler, J.O., Salditt, T., Rothschild, K.J. and Safinya, C.R. (1999), Phase Behavior and Interactions of the Membrane Protein Bacteriorhodopsin, *Physical Review Letters*, **82**, 3184-3187.

29. Stoeckenius, W. and Rowen, R. (1967), A morphological study of halobacterium halobium and its lysis in media of low salt concentration, *J. Biol.*, **34**, 365-393.
30. Blaurock, A.E., Stoeckenius, W. (1971), Structure of the purple membrane. *Nature*, **233**, 152-155.
31. Henderson, R. (1977), THE PURPLE MEMBRANE FROM HALOBACTERIUM HALOBIUM, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **6**, 87-109.
32. Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E. and Downing, K.H. (1990), Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high resolution electron cryo microscopy. *J. Mol. Biol.*, **213**, 899-929.
33. Grigorieff, N., Ceska, T.A., Downing, K.H., Baldwin, J.M. and Henderson, R. (1996), Electroncrystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin, *J. Mol. Biol.*, **259**, 393-42.
34. Kimura, Y., Vassylyev, D.G., Miyazawa, A., Kidera, A., Matsishima, M., Mitsuoka, K., Murata, K., Hirai and Fujiyoshi (1997), Surface of bacteriorhodopsin revealed by high resolution electron cristallography, *Nature*, **389**, 206-211.
35. Michel, H. and Oesterhelt, D. (1980), Three dimensional crystals of membrane proteins: Bacteriorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1283-1285.
36. Essen, L. O., Siegert, R., Lehmann, W.D. and Oesterhelt, D. (1998), Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin lipid complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11673-11678.
37. Luecke, H., Richter, H. T. and Lanyi, J.K. (1998), Proton Transfer Pathways in Bacteriorhodopsin at 2.3 Angström Resolution, *Science*, **280**, 1934-1937.
38. Luecke, H., Schobert, B., Richter, H. T., Cartailler, J. P. and Lanyi, J.K. (1999), Structure of Bacteriorhodopsin at 1,55 Å Resolution, *J. Mol. Biol.*, **291**, 899-911.
39. Henderson, R. and Unwin, P.N.T. (1975), Three dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, *Nature*, **257**, 28-32.

40. Kessler, M., Gottschalk, E.K., Janovjak, H., Müller, D.J. and Gaub, H.E. (2006), Bacteriorhodopsin Folds into the Membrane against an External Force, *J. Mol. Biol.*, **357**, 644-654.
41. Schranz, M., Noll, F. and Hampp, N. (2007), Oriented Purple Membrane Monolayers Covalently Attached to Gold by Multiple Thiole Linkages Analyzed by Single Molecule Force Spectroscopy, *Langmuir*, **23**, 11134-11138.
42. Müller, D.J., Büldt, G. and Engel, A. (1995), Force induced Conformational Change of Bacteriorhodopsin, *J. Mol. Biol.*, **249**, 239-243.
43. Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1974), Isolation of the Cell Membrane of Halobacterium halobium and Its Fractionation into Red and Purple Membrane, *Methods Enzymol.*, **31**, 667-678.
44. Fisher, A.K. and Stoeckenius, W. (1977), Freeze Fractured Purple Membrane Particles: Protein Content, *Science*, **197**, 72-74.
45. Bibikov, S.I., Grishani, R.N., Marwan, W., Oesterhelt, D. and Skulachev, V.P. (1991), The proton pump bacteriorhodopsin is a photoreceptor for signal transduction in Halobacterium halobium, *FEBS*, **295**, 223-226.
46. Oesterhelt, D. (1998), The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr. Op. Struc. Biol.*, **8**, 489-500.
47. Spudich, J. L., Yang C-S, Jung K-H and Spudich, E. N. (2000), RETINYLIDENE PROTEINS: Structures and Functions from Archaea to Humans, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 365-392.
48. Spudich, J.L. (2006), The multitalented microbial sensory rhodopsins, *Trends in Microbiology*, **14**, 480-487.
49. Stockenius, W., Lozier, R.H. and Bogomolni, R.A. (1979), Bacteriorhodopsin and the purple membrane of Halobacteria, *Biochimica et Biophysica Acta*, **505**, 215-278.
50. Tsuda, M., Glaccum, M., Nelson, B., and Ebrey T. G. (1980), Light isomerizes the chromophore of bacteriorhodopsin, *Nature*, **287**, 351-353.

51. Lozier, R.H., Bogomolni, R.A. and Stoeckenius (1975), BACTERIORHODOPSIN: A LIGHT DRIVEN PROTON PUMP IN HALOBACTERIUM HALOBIUM, *Biophysical J.*, **15**, 955-962.
52. Haupts, U., Tittor, J., Bamberg E. and Oesterhelt, D. (1997), General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer (IST) Model, *Biochemistry*, **36**, 2-7.
53. Subramaniam, S., Gerstein, M., Oesterhelt, D. and Henderson, R. (1993), Electron diffraction analysis of structural changes in the photocycle of bacteriorhodopsin, *EMBO J.*, **12**, 1-8.
54. Lanyi, J. K. (1993), Pathways of proton transfer in the light driven pump bacteriorhodopsin, *Experientia*, **49**, 514-517.
55. Gerwert, K., Hess, B., Soppa, J. and Oesterhelt, D. (1989), Role of aspartate 96 in proton translocation by bacteriorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biophysics*, **86**, 4943-4947.
56. Gerwert, K., Souvignier, G. and Hess, B. (1990), Simultaneous monitoring of light induced changes in protein side group protonation, chromophore isomerization, and backbone motion of bacteriorhodopsin by time resolved . *Fourier transform infrared spectroscopy*, **87**, 9774-9778.
57. Rammelsberg, R., Huhn, G., Lübben, M. and Gerwert, K. (1998), Bacteriorhodopsin's Intramolecular Proton Release Pathway Hydrogen Bonded Network, *Biochemistry*, **37**, 5001-5009.
58. Spassov V. Z., Luecke, H., Gerwert and Bashford, D. (2001), pKa Calculations Suggest Storage of an Excess Proton in a Hydrogen bonded Water Network in Bacteriorhodopsin, *J. Mol. Biol.*, **312**, 203-219.
59. Heßling, B., Souvignier, G. and Gerwert, K. (1993), A Model Independent Approach to Assigning Bacteriorhodopsin's Intramolecular Reactions to Photocycle Intermediates, *Biophysical J.*, **65**, 1929-1941.

60. Gerwert, K. (1999), Molecular Reaction Mechanisms of Proteins Monitored by Time-Resolved FTIR-Spectroscopy, *Biol. Chem.*, **380**, 931-935.
61. Shen, Y., C. R. Safinya, K. S. Liang, A. F. Ruppert and K. J. Rothschild (1993): "Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140 °C in two-dimensional films" *Nature*, **366**, 48-50.
62. Neebe, M.; Rhinow, D.; Schromczyk, N. and Hampp, N. (2008), *J. Phys. Chem. B*, **112**, 6946-6951.
63. Fischer, T. and Hampp, N. (2005), Two Photon Absorption of Bacteriorhodopsin: Formation of a Red Shifted Thermally Stable Photoproduct F620, *Biophysical Journal*, **89**, 1175-1182.
64. Birge, R. (1990), Photophysics and molecular electronic applications of the rodopsins, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **41**, 683-733.
65. Hampp, N. (2000), Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories, *Chem. Rev.*, **100**, 1755-1776.
66. Hampp, N. (2000), Linkerfreie kovalente Kopplung von Bacteriorhodopsin in Purpurmembran Form, Patentschrift WO 00/58450.
67. Hampp, N. and Oesterhelt, D. (2004), Bacteriorhodopsin and its Potential in Technical Applications, *Wiley VCH*, **11**, 146-167.
68. Fischer, T. and Hampp, N.A. (2007), Purple membranes as microscaled nanopatterned biosubstrates for reversible attachment of biocomponents, *Soft Matter*, **3**, 707-712.
69. Schönafinger, A., Müller S., Noll, F. and Hampp, N. (2008), Bioinspired nanoencapsulation of purple membranes, *Soft Matter*, **4**, 1249-1254.
70. Sigrist, H. Allegrini, P.R., Stauffer, K., Schaller, J., Abdulaev, N.G., Rickli, E.E. and Zahler, P.(1984), Group directed Modification of Bacteriorhodopsin by Arylisothonocyanates, *J. Mol. Biol.*, **175**, 93-108.

71. Takeda et al. (1993), Patentschrift US005252719A.
72. Seitz, A., Schneider, F., Pasternack R., Fuchsbauer, H. L. and Hampp N. (2001), Enzymatic Cross-Linking of Purple Membrans Catalyzed by Bacterial Transglutaminase, *Biomacromolecules*, **2**, 233-238.
73. Sharma, M. K., Jattani, H. and Gilchrist, M. L. (2004), Bacteriorhodopsin Conjugates as Anchors for Supported Membranes, *Bioconjugate Chem.*, **15**, 942-947.
74. Koyama, K., Yamaguchi, N. and Miyasaka, T. (1994), Antibody Mediated Bacteriorhodopsin Orientation for Molecular Device Architectures, *SCIENCE*, **265**, 762-765.
75. Soppa, J. (2006), From genomes to fuction: haloarchaea as model organisms, *Microbiology*, **152**, 585-590.
76. Soppa, J. (1999), Transcription initiation in Archaea facts, factors and future aspects, *Molecular Microbiology*, **31**, 1295-1305.
77. Soppa, J., (2005), From replication to cultivation hot news from Haloarchaea, *Current Opinion in Microbiology*, **8**, 8737–744.
78. Ng, W.V., Kennedy, S.P., Mahairas, G.G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H.D., Lasky, S.R., Baliga, N.S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T.A., Welti, R., Goo, Y.A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M.J., Hough, D.W., Maddocks, D.G., Jablonski, P.E., Krebs, M.P., Angevine, C.M, Dale, H., Isenbarger, T.A., Peck, R.F., Pohlschroder, M., Spudich, J.L., Jung, K.H., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C.J., Dennis, P.P., Omer, A.D., Ehardt, H., Lowe, T.M., : s.n., Liang, P., Riley, M., Hood, L., DasSarma, S. (2000) Genome sequence of Halobacterium species NRC-1, *PNAS*, **97**, 12176-12181.
79. Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Viles, J., Glasner, J. D., Rode, C.K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Wayne Davis, N., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of Escherichia coli K-12, *Nature*, **277**, 1453-1462.

80. Link, A.J., Robinson, K., Church, G.M. (1997) Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genom of Escherichia coli K-12, *Electrophoresis*, **18**, 1259-1313.
81. Seehra, J. S. and Khorana, H. G. (1984) Bacteriorhodopsin precursor. Characterization and its integration into the purple membrane, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4187-4193.
82. Dunn, R., McCoy, J., Simsek, M., Majumdar, A., Chang, H. S., RajBhandary, U. L. and Khorana, H., G. (1981), The bacteriorhodopsin gene, *Proc. Natl .Acad. Sci. USA*, **78**, 6744-6748.
83. Wölfer, U., Dencher, N. A., Büldt, G. and Wrede, P. (1988), Bacteriorhodopsin precursor is processed in two steps, *Eur. J. Biochem.*, **174**, 51-57.
84. Gerber, G. E., Anderegg, R. J., Herlihy, W. C., Gray, C. P., Biemann, K. and Khorana, G. (1979), Partial primay structure of bacteriorhodopsin: Sequencing methods for membrane proteins, *PNAS Biochemistry*, **76**, 227-231.
85. Khorana, H. G., Gerber, G. E., Herlihy, W. C., Gray, C. P., Anderegg, R. J., Nihei, K. and Biemann, K. (1979), Amino acid sequence of bacteriorhodopsin, *PNAS*, **76**, 5046-5050.
86. Shand, R. F. and Betlach, M. C. (1991), Expression of the bop Gene Cluster of Halobacterium halobium Is Induced by Low Oxygen Tension and by Light, *Journal of Bacteriology*, **173**, 4692-4699.
87. Tarasov, V.Y., Besir, H., Schwaiger, R., Klee, K., Furtwängler, K., Pfeiffer, F. and Oesterhelt, D. (2008), A small protein from the bop-brp intergenic region of Halobacterium salinarum, a zinc finger motif and regulates bop and crtB1 transcription, *Molecular Microbiology*, **67**, 772-780.
88. Rogers P. J. und Morris, C. A. (1978), Regulation of Bacteriorhodopsin Synthesis by Growth Rate in continious Cultures of Halobacterium halobium, *Arch. Microbiol.*, **119**, 323-325.

89. Sapienza, C. and Doolittle, W.F. (1982), Unusual physical organization of the Halobacterium genome, *Nature (London)*, **295**, 384-389.
90. DasSarma, S., RajBhandary, U., L. and Khorana, H., G. (1983), High frequency spontaneous mutation in the bacterio opsin gene in Halobacterium halobium is mediated by transposable elements, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2201-2205.
91. Pfeifer, F. and Blaseio, U. (1990), Transposition burst of the ISH insertion element family in Halobacterium halobium, *Nucleic Acids Research*, **18**, 6921-6925.
92. Simsek, M., DasSarma, S., RajBhandary, U., L. and Khorna, H. G. (1982), A transposable element from Halobacterium halobium, which inactivate the bacteriorhodopsin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7268-7272.
93. Pfeifer, F. A., Boyer, H. W. and Betlach, M. C. (1985), Restoration of Bacterioopsin Gene Expression in a Revertant of Halobacterium halobium, *Journal of Bacteriology*, **164**, 414-420.
94. Soppa, J. and Oesterhelt, D. (1989), Bacteriorhodopsin Mutants of Halobacterium sp. GRB I. The 5 BROMO 2' DEOXYURIDINE SELECTION AS A METHOD TO ISOLATE POINT MUTANTS IN HALOBACTERIA, *J. Biol. Chem*, **264**, 13043-13048.
95. Soppa, J. and Oesterhelt, D. (1989), Bacteriorhodopsin Mutants of Halobacterium sp. GRB II. CHARACTERIZATION OF MUTANTS, *J. Biol. Chem*, **264**, 1049-13056.
96. Miercke, L. J. W., Betlach, M. C., Mitra, A. K., Shand, R. F., Fong, S., K. and Stroud, R. M. (1991), Wild Type and Mutant Bacteriorhodopsins D85N, D96N and R82Q: Purification to Homogeneity, pH Dependence of Pumping and Electron Diffraction, *Biochemistry*, **30**, 3088-3098.
97. Krebs, M., Mollaaghababa, R. and Khorana, H.G. (1993), Gene replacement in Halobacterium halobium and expression of bacteriorhodopsin mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1987-1991.

98. Pfeiffer, M., Rink, T., Gerwert, K., Oesterhelt, D. and Steinhoff H.-J. (1999), Site-directed Spin-labeling Reveals the Orientation of the Amino Acid Side-chains in the E-F Loop of Bacteriorhodopsin, *J.Mol.Biol.*, **287**, 163-171.
99. Heymann, J.B., Pfeiffer, M., Hildebrandt, V., Kaback, R.H., Fotiadis, D., de Groot, B., Engel, A., Oesterhelt, D., Müller, D.J. (2000), Conformations of the rhodopsin third cytoplasmatic loop grafted onto bacteriorhodopsin, *Structure*, **8**, 643-653.
100. Geiser, A. H., Sievert, M. K., Guo, L. W., Grant, J. E., Krebs, M. P., Fotiadis, D., Engel, A. and Ruoho, A. E. (2006), Bacteriorhodopsin chimeras containing the third cytoplasmic loop of bovine rhodopsin activate transducin for GTP/GDP exchange, *Protein Science*, **15**, 1680-1690.
101. Nomura, S., Kajimura, N., Matoba, K., Miyata, T., Ortenberg, R., Mevarech, M., Kamikubo, H., Kataoka, M. and Harada, Y. (1999), Ordered Structure Formation of Bacteriorhodopsin-hDHFR in a Plasma Membrane, *Langmuir*, **15**, 214-220.
102. Besir, H. (2001), Untersuchung der lipidvermittelten Kristallisation der Ionenpumpen Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin aus Halobacterium salinarum, Dissertation, MPI für Biochemie Martinsried.
103. Hohenfeld, I.P., Wegener, A.A. and Engelhard, M. (1999), Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in Escherichia coli, *FEBS Letters*, **442**, 198-202.
104. Turner, G.J., Miercke, L.J.W., Mitra, A.K., Stroud, R.M., Betlach, M.C. and Winter-Vann, A., Expression, Purification, and Structural Characterization of the Bacteriorhodopsin-Aspartyl Transcarbamylase Fusion Protein, *Protein Expression and Purification*, **17**, 324-338.
105. Nomura, S. and Harada, Y. (1998), Functional expression of green fluorescent protein derivatives in Halobacterium salinarum, *FEMS Microbiology Letters*, **167**, 287-293.
106. Ferrando, E., Schweiger, U. and Oesterhelt, D. (1993), Homologous bacteriorhodopsin-encoding gene expression via sitespecific vector integration, *Gene*, **125**, 41-47.

107. Pfeiffer, M. (2000), Studies on dynamics and function of Bacteriorhodopsin from, *Halobacterium salinarum*, *Dissertation*, MPI für Biochemie Martinsried.
108. Sandler (1996), *recA*-like genes from three archaean species with putative protein products similar to Rad51 and Dmc1 proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Research*, **24**, 2125-2132.
109. Woods, W.G. and Dyll-Smith, M.L. (1997), Construction and analysis of a recombination-deficient (*radA*) mutant of *Haloferax volcanii*, *Molecular Microbiology*, **23**, 791-797.
110. Stoeckenius, W. and Kunau, W.H. (1968), FURTHER CHARACTERIZATION OF PARTICULATE FRACTIONS FROM LYSED CELL ENVELOPES OF HALOBACTERIUM HALOBIUM AND ISOLATION OF GAS VACUOLE MEMBRANES, *J. Cell. Biol.*, **38**, 337-357.
111. Lam, W.L. and Doolittle, W.F. (1989), Shuttle vectors for the archaebacterium *Halobacterium volcanii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5478-5482.
112. Holmes, M.L., Scopes, R.K., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Englert, C., Pfeifer, F. and Dyll Smith, M.L. (1997), Purification and analysis of an extremely halophilic β galactosidase from *Haloferax alicantei*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1337**, 276-286.
113. Holmes, M. L. and Dyll-Smith, M. L. (2000), Sequence and expression of a halobacterial β -galactosidase gene, *Molecular Microbiology*, **36**, 114-122.
114. Gauglitz, G., Brecht, A., Kraus, G. and Nahm, W. (1993), Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers, *Sensors and Actuators B*, **11**, 21-27.
115. Karlson, R., Michaelson, A. and Mattson, L. (1991), Kinetic Analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system, *Journal of Immunological methods*, **145**, 229-240.

116. Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. and Urbaniczky, C. (1991), Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance by using radiolabelled proteins, *J. Colloid Interface Sci.*, **143**, 513.
117. O`Shannessy, D.J., Brigham-Burke, Soneson, K.K., Hensley, Preston and Ian Brooks (1993), Determination of Rate and Equilibrium Binding Constants for Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance: Use of Nonlinear Least Squares Analysis Methods, *Analytical Biochemistry*, **212**, 457-468.
118. O`Shannessy, D.J. and Winzor, D.J. (1996), Interpretation of Deviations from Pseudo-First-Order Kinetic Behavior in the Characterization of Ligand Binding by Biosensor Technology, *Analytical Biochemistry*, **236**, 275-283.
119. Schrader, T. (1997), Strong Binding of Alkylguanidium Ions by Molecular Tweezers: An Artificial Selective Arginine Receptor Molecule with a Biomimetic Recognition Pattern, *Chem. Eur. J.*, **3**, 1537-1541.
120. Calnan, B.J., Tidor, B., Biancalana, S., Hudson, D., Frankel, A.D. (1991), Arginine-Mediated RNA Recognition: The Arginine Fork, *SCIENCE*, **252**, 1167-1170.
121. Frankel, A.D. (1992) Activation of HIV transcription by Tat, *Current Opinion in Genetics and Development*, **2**, 293-298.
122. Schrader, T. (1999), Chelate Complexes with the P=O Double Bond - a New Concept for Molecular Recognition, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **34**, 117-129.
123. Naik, R.R., Jones, S.E., Murray, C.J., McAuliffe, J.C., Vaia, R.A., Stone, M.O., (2004), Peptide Teplates for Nanoparticle Synthesis Derived from Polymerase Chain Reaction-Driven Phage Display, *Adv. Funct. Mater.*, **14**, 25-30.
124. Sieber, S.A. and Marahiel, M.A., Molecular Mechanisms Underlying Nonribosomal Peptide Synthesis: Approaches to New Antibiotics, *Chem. Rev.*, **105**, 715-738.

125. Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y. (1962), Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*, *Science*, 223-239.
126. Schweiger, U.(1996). Funktionelle Charakterisierung der Retinalbindungstasche von Bakteriorhodopsin durch spezifische Mutagenese. PhD thesis, Leopold-Franzens-Universität, Innsbruck, Austria.
127. Patenge, N. Haase, A., Bolhuis, H. and Oesterhelt, D. (2000), The gene for a halophilic β -galactosidase (bgaH) of *Haloferax alcaleni* as a reporter gene for promoter analyses in *Halobacterium salinarum*, **36**, 105-113.
128. Fisher, A.K., Yanagimoto, K. and Stoeckenius, W. (1978), ORIENTED ADSORPTION OF PURPLE MEMBRANE TO CATIONIC SURFACES, *J. Cell Biology*, **77**, 611-621.
129. Hufnagel, P., Schweiger, U., Eckerskorn and Oesterhelt, D. (1996), Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Genetically and Chemically Modified Bacteriorhodopsins, *Analytical Biochemistry*, **243**, 46-54.
130. Kessler, M. and Gaub, H.E (2006), Unfolding Barriers in Bacteriorhodopsin Probed from the Cytoplasmic and the Extracellular Side by AFM, *Structure*, **14**, 521-527.
131. Oesterhelt, D., Schuhmann, L. and Gruber, H. (1974), LIGHT DEPENDENT REACTION OF BACTERIORHODOPSIN WITH HYDROXYLAMINE IN CELL SUSPENSIONS OF *HALOBACTERIUM HALOBIIUM*: DEMONSTRATION OF AN APO-MEMBRANE, *FEBS letters*, **44**, 257-261.
132. Ovchinnikov, Y.A. (1987), Structure of rhodopsin and bacteriorhodopsin, *Photochem. Photobiol.*, **45**, 909-914.
133. O`Shannessy (1994), Determination of kinetic rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions: a critique of the surface plasmon resonance literature, *Current Opinion in Biotechnology*, **5**, 65-71.

134. Quinn, J.G., O'Neill, S., Doyle, A., McAtemney, D., MacCraith, B.D. and O'Kennedy, R. (2000), Development and Application of Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors for the Detection of Cell-Ligand Interactions, *Analytical Biochemistry*, **281**, 135-143.
135. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory press*.
136. Cline, S.W., LamW.L., Charlebois, R.L., Schalkwyk, L.C. and Doolittle W.F. (1989), Transformation methods for halophilic achaeobacteria, **35**, 148-152.
137. Kibbe, W.A. (2007), OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator, *Nucleic Acids Research*, **35**, Web Server issue W43-W46.
138. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 2000-2001.
139. Kyhse Andersen, J. (1984), Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **10**, 203-209.

Abkürzungen und Symbole

2D, 3D	zweidimensional, dreidimensional
AFM	Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy)
Amp	Ampicillin
AMPS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
a_w	Wasseraktivität
BIA	Biomolekulare Interaktionsanalyse
<i>bop</i>	Bakterioopsingen
BOP	Bakterioopsin
bp	Basenpaare
BR	Bakteriorhodopsin
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CP	cytoplasmatisch
cps	Zerfälle pro Sekunde
DA	dunkeladaptiert
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat (mit N= A, C, G, I und U)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	extrazellulär
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>Hbt.salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
ISH	Insertionselement 2 in <i>Hbt.salinarum</i>
LA	lichtadaptiert
Mev	Mevinolin (Lovastatin)
MS	Massenspektrometrie
nm	Nanometer
NRPS	Nicht Ribosomale Protein Synthese

OD _x	optische Dichte bei λ=x nm
PCR	Polymerase-Ketten-reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG _x	Polyethylenglykol (x: mittlere Molekülmasse)
PG	Phosphatidylglycerol
PGP-ME	Phosphatidylglycerolphosphatmethylester
PGS	Phosphatidylglycerolphosphat
PM	Purpormembran
RIfS	Reflektometrische Interferenz Spektroskopie
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanz Einheiten (<i>resonance units</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPH	Sphäroblastenlösung
SR I, II	Sensorrhodopsin I und II
S-TGA1	Sulfatisiertes Triglycosylachaeol 1
SVL	Sphäroblastenverdünnungslösung
T	Temperatur
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-ethylendiamin (1,2-Bis(dimethylamino)- ethan)
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
T _M	Schmelzzeit eines Oligonucleotides
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3- propandiol (Tris(hydroxymethyl)- aminomethan)
UV-VIS	Ultraviolett-Sichtbar (<i>Ultraviolet-Visible</i>)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
WT	Wildtyp

Für Aminosäuren wird der Ein- oder Dreibuchstabencode verwendet.