

**Das Photoreaktionszentrum aus *Rhodobacter sphaeroides* als Modellmembranprotein
zur Reinigung, Rekonstitution in Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden,
Charakterisierung und heterologen Expression**

Von der Bio- und Geowissenschaftlichen Fakultät der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Heinz Peters

aus

Wittmund

Hauptberichter: Prof. Dr. R.D. Schmid

Mitberichter: Prof. Dr. R. Ghosh

eingereicht am: 20.06.2000

mündliche Prüfung am: 16.07.2001

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2001

Kurzfassung

Seit über 30 Jahren werden Liposomen als Modellsysteme für komplexe Zellmembranen eingesetzt¹. Sie bringen Einblicke in verschiedene Aspekte der Zellphysiologie und können zur Aufklärung von Strukturen, Dynamiken und Funktionen biologischer Membranen beitragen.

Bisher wurden zumeist gewöhnliche Phospholipide zur Liposomen- und Proteoliposomenpräparation sowie zu ihrer anschließenden Charakterisierung verwendet.

In dieser Arbeit wurden dagegen erstmals Modellsysteme mit ungewöhnlichen, acetylenischen Phospholipiden², die einen T_m -Wert im physiologischen Temperaturbereich aufwiesen, studiert. Mit diesen (1,2)-Diacyl-phosphatidylipiden isomerer Octadecensäuren, die unterschiedliche Kopfgruppen (Ethanolamin, L-Serin, Glycerol, Cholin, Phosphatidat) trugen, konnten Liposomen und Proteoliposomen präpariert und anschließend ihre Teilchengröße, Homogenität und Detergenzstabilität definiert werden.

Für die Proteoliposomenpräparation wurde als Membranprotein das bakterielle Photoreaktionszentrum (RC) aus *Rhodobacter sphaeroides* gewählt. Dieses ist bereits umfangreich molekularbiologisch, photochemisch und biochemisch charakterisiert³, und seine dreidimensionale Struktur ist bekannt⁴. Auch wurde das RC schon mehrfach für Rekonstitutionen in Liposomen angewendet^{5 6}.

Vor der Rekonstitution erfolgte die Isolierung und Reinigung des aktiven, integralen Membranproteins unter Verwendung von Detergenzien. Hierbei zeigten erstmals synthetische Zuckerester wie 6-*O*-Octanoyl- β -glucose und 6-*O*-Octanoyl- β -mannose⁷ gute solubilisierende Eigenschaften für RC. Unter Verwendung dieser Zuckerester wurde auch eine neue Liposomenpräparationsmethode etabliert. Dabei wurden in Gegenwart von Phospholipiden und Proteinen die Zuckerester von einer Monoglycerid-Lipase aus *Bacillus species* lipolytisch gespalten und es wurden spontan Liposomen gebildet. Proteoliposomen, die aus den negativ geladenen acetylenischen Phospholipiden PG und PS präpariert wurden, zeigten eine deutliche Orientierung des RCs.

¹ Bangham, A.D., Standish, M.M. & Watkins, J.C. (1965) *J. Mol. Biol.* 13, 238-243

² Pisch, S., Bornscheuer, U.T., Meyer, H.H. & Schmid, R.D. (1997) *Tetrahedron* 53, 14627-14634

³ Okamura, M.Y., Feher, G. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* 61, 861-896

⁴ Deisenhofer, J., Epp, O., Huber, R., Michel, H. (1985) *Nature* 318, 618-629

⁵ Crielaard, W., Hellingwerf, K., Konings, W.N. (1989) *Biochim. et Biophys. Acta* 973, 205-211

⁶ Hara, M., Ueno, T., Fuji, T., Yang, Q., Asada, Y., Miyake, J., (1997) *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 1577-1579

⁷ Cao, L., Bornscheuer, U.T., Schmid, R.D. (1996) *Fett/Lipid* 98 332-335

Abstract

The photoreaction center of *Rhodobacter sphaeroides* as a model protein for purification, reconstitution into liposomes of unusual phospholipids, characterization and heterologous expression

As a relatively simple replacement for large biological membranes, liposomes have been used extensively in basic research as well as in technical applications (e.g. drug transport) during the past 30 years. Typically, liposomes made up of natural lipids are used. When investigating physical properties of membrane proteins it turned out frequently that many desirable experiments cannot be carried out in liposomes of natural lipids due to their limited stability. In order to overcome these experimental problems, liposomes containing artificial lipids with triple bond fatty acids were investigated.

In this work the application of novel phospholipids containing unusual fatty acids for liposome preparation, protein reconstitution and further investigation of protein and liposome stability is described. These unusual phosphatidylcholines bearing fatty acids such as 14-octadecynoic acid and 4-octadecynoic acid have various head groups like choline (PC), glycerol (PG), ethanolamine (PE), *L*-serine (PS) and the free acid (PA). The synthesis of phospholipids started from the corresponding 1,2-di-(octadecanol)-*sn*-glycero-3-phosphocholines (Pisch et al., 1997).

For protein reconstitution the photoreaction center (RC) of *Rhodobacter sphaeroides* was applied. Before its reconstitution, the active membrane protein was isolated and purified by detergent mediated methods. For the first time synthetic sugar esters like 6-O-octanoyl- β -D-glucose and 6-O-octanoyl- β -D-mannose showed good solubilization properties for RC and were used for a new established liposome preparation method. In the presence of phospholipids and proteins, sugar esters were cleaved lipolytically by a monoglycerid lipase of *Bacillus species* and liposomes were build spontaneously.

Liposome stability against the action of Triton X-100, one of the most used detergent in membrane research field (Paternostre et al., 1988; Levy et al., 1990; Lin and Carman, 1990), was determined by fluorescence of released calcein. Compared with DPPC-liposomes, liposomes of unusual phospholipids showed a 1.4 – 2.6 fold higher stability against the detergent Triton X-100.

In order to investigate the temperature stability of RCs, the protein was heated for one hour at various temperatures. As a measure for protein stability the preservation of BChl dimers was used. Dimer concentration was determined spectrophotometrically at 865 nm. After heating, less BChl was denatured when RC was reconstituted in liposomes of unusual lipids as compared to native RC. Furthermore proteoliposomes composed of unusual phospholipids showed a more effective heat protection at 40 and 50 °C than DMPC does.

Reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* were reconstituted into liposomes of unusual phospholipids by the detergent dialysis method. Transmembrane orientation of RC was measured by photometric determination of the electron transfer efficiency from ferrocyanide to RC. It was reported that RC can accept an electron from cytochrome *c* on the periplasmic surface of the M- or L-subunit in the native intracytoplasmic membrane (Rosen et al., 1983). When reduced cytochrome *c* was externally added to the proteoliposome suspension, light-induced oxidation of cytochrome *c* occurred at 550 nm only if the cytochrome *c* binding site was exposed to the outer surface of proteoliposomes, whereas the RC moiety cannot accept an electron from reduced cytochrome *c* when RC showed the right-site-in orientation.

31-44 % of the L, M-subunit was exposed to the outer surface of DMPC- and DPPC-liposomes. About 65 % of RCs showed the right-site-out orientation in liposomes of PC4. 76-93 % of RCs were oriented in PC14 and PG4 liposomes and completely uniform orientation of RCs was found in negatively charged liposomes of PA4.

A fusion protein of the L-subunit of RC and the alkaline phosphatase should be expressed in *E. coli*. Therefore the gene of the L-subunit was isolated and amplified out of the plasmid pRK5,3. The alkaline phosphatase gene was obtained from the genomic DNA of *E.coli JM105*. Several cloning strategies did not lead to the fusion protein L-phoA. Expressed proteins with molecular weights of 30-100 kDA could not be verified as the fusion protein. Based on these results *E.coli* seems not suitable for heterologous expression of L-phoA.

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Peters, H., Schmidt-Dannert, C., & Schmid, R. D.: The photoreaction center of *Rhodobacter sphaeroides*: a 'biosensor protein' for the determination of photosystem-II herbicides? (1997) *Mat. Sci. Eng. C4*, 227-232.

Peters H, Schmidt-Dannert C, Cao L, Bornscheuer UT, Schmid R. D.: Purification and reconstitution of an integral membrane protein, the photoreaction center of *Rhodobacter sphaeroides*, using synthetic sugar esters. (2000) *Biotechniques* 28(6), 1214-1219

Tagungsbeiträge:

Jüptner, O., Peters, H., Pisch, S., Bornscheuer, U., Schmid, R.D.: Unusual phospholipids and their potential for the reconstitution of membrane proteins. (Poster) Bionic Design Workshop 96, Tsukuba (1996)

Peters, H., Schmidt-Dannert, C., Schmid, R.D.: Rekonstitution des bakteriellen Photoreaktionszentrums aus *Rhodobacter sphaeroides* in Phospholipidmembranen und seine Anwendung zur Herbiziddetektion. (Poster) DECHEMA Biotechnology Conference 14, Wiesbaden (1996)

Erklärung:

Die Dissertation wurde abgesehen von den bezeichneten Hilfsmitteln und von Ratschlägen der namentlich aufgeführten Personen selbständig verfaßt.

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom April 1995 bis Oktober 1998 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart angefertigt. Die Arbeit wurde finanziell von der "Research Association for Biotechnology" im Rahme des Forschungs- und Entwicklungsprojektes "Molecular Assemblies for a Functional Protein System (Unusual fatty acids and their derivatives)" unterstützt.

Teile der Arbeit wurden am National Institute for Advanced and Interdisciplinary Research, Bionic Design Group, Tsukuba, Japan unter der Leitung von Herrn Dr. Jun Miyake durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die Überlassung des Themas, für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und für seine hilfreiche Unterstützung der Arbeit.

Bei Frau Dr. C. Schmidt-Dannert möchte ich mich ganz herzlich bedanken für ihre fachliche Unterstützung sowie für die zahlreichen kritischen Diskussionen und Anregungen. Ihre Hilfe bei allen auftretenden Problemen hat mich ermutigt, meinen Weg konsequent fortzusetzen.

Herrn Dr. J. Miyake, Herrn Dr. M. Hara und allen anderen Mitarbeitern der "Bionic Design Group" in Tsukuba, Japan danke ich für die an ihrem Institut gewährte Gastfreundschaft und Hilfsbereitschaft sowie für die vielen wertvollen Diskussionen zum Fortgang der Arbeit.

Frau Dipl.-Chem. S. Pisch gilt mein besonderer Dank für die freundliche Bereitstellung der ungewöhnlichen Phospholipide und Herrn Dr. L. Ciao für die Synthese der Zuckerester. Herrn Prof. D. Oesterhelt danke ich für die unkomplizierte Bereitstellung von Bakteriorhodopsin und seine Diskussionsbereitschaft.

Bei Frau Dipl.-Biotech. G. Neumann und Herrn Dipl.-Chem. F. Igney bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten. Frau Dipl.-Chem. M. Brettschneider danke ich für die Anleitung zur Bedienung des Elektronenmikroskops.

Allen Mitgliedern des Institutes für Technische Biochemie sei gedankt für die vielen interessanten Gespräche und Anregungen sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere gilt mein Dank Frau Dr. N. Mionetto, Frau Dipl.-Chem. E. Catoni, Frau Dr. S. Brocca, Herrn Dipl.-Biol. S. Lange für ihre wissenschaftliche Unterstützung und persönliche Anteilnahme der Arbeit.

Frau Dr. J. Schmidt und Herrn Dr. U. Bornscheuer sei gedankt für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

INHALTSVERZEICHNIS

LISTE DER ABKÜRZUNGEN	XIV
------------------------------------	------------

1 EINLEITUNG	1
1.1 Biologische Membranen.....	1
1.2 Membranlipide	2
1.2.1 Selbstorganisation der Phospholipide	4
1.2.2 Liposomen	5
1.2.3 Thermotropes Phasenverhalten	7
1.2.4 Lipide mit ungewöhnlicher Struktur	10
1.3 Anforderungen an eine Modellmembran	11
1.4 Das Photoreaktionszentrum als Modellmembranprotein	13
1.4.1 Struktur und Elektronentransport	13
1.4.2 Die Photosynthese phototropher Bakterien (Rhodospirillaceae)	16
1.5 Bakteriorhodopsin	19
1.6 Problemstellung.....	22
2 MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1 Material	24
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmittel	24
2.1.2 Ungewöhnliche Phospholipide.....	26
2.1.3 Geräte	27
2.2 Proteinchemische, immunologische und analytische Methoden.....	28

2.2.1	Photoreaktionszentrum aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	28
2.2.1.1	Kultivierung von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	28
2.2.1.2	Zellaufschluß.....	28
2.2.1.3	Fraktionierte Extraktion.....	29
2.2.1.4	Reinigung des Photoreaktionszentrums.....	30
2.2.2	Bakteriorhodopsin aus <i>Halobacterium salinarium</i>	31
2.2.2.1	Kultivierung von <i>Halobacterium salinarium</i>	31
2.2.2.2	Isolierung und Reinigung des Bakteriorhodopsins.....	31
2.2.3	Detergenzaustausch.....	32
2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.2.5	Immunoblot.....	35
2.2.6	Phosphorbestimmung.....	36
2.2.7	Dünnschichtchromatographie (DC).....	36
2.2.8	HPLC Analytik.....	36
2.2.9	Elektronenmikroskopie an Liposomen.....	37
2.2.10	Gelfiltration.....	37
2.2.10.1	Trennung von Proteoliposomen und nicht rekonstituiertem Protein.....	38
2.2.10.2	Trennung von Calcein-Liposomen und freiem Calcein.....	38
2.2.10.3	Reinigung von reduziertem Cytochrom c.....	38
2.2.11	Cytochrom c Assay zur Aktivitätsbestimmung von RC.....	39
2.2.12	Cytochrom c Assay zur Bestimmung der RC-Orientierung.....	40
2.2.13	ELISA zur Bestimmung der RC-Orientierung in Liposomen.....	41
2.2.14	Immobilisierung einer Lipase auf aktiviertem Silicagel.....	42
2.3	Liposomenpräparationen.....	44
2.3.1	Detergenz-Dialyse-Methode.....	44
2.3.2	Detergenz-Dialyse-Methode mit synthetischen Zuckerestern.....	44
2.3.3	Rekonstitution des Photoreaktionszentrums aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	45
2.3.4	Liposomenpräparation mit Bakteriorhodopsin.....	46
2.3.5	Thiolgruppennachweis mit Fluorescein-5-maleimid (FLM).....	47
2.3.6	"Freeze-Thaw"-Technik.....	50
2.3.7	Sephadex-G50-Filtration zur Liposomenpräparation.....	50
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	51
2.4.1	Stämme und Klonierungsvektoren.....	51
2.4.2	Agarose Gelelektrophorese.....	51

2.4.3	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	51
2.4.4	Plasmidpräparation	52
2.4.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	53
2.4.6	Enzymatische DNA-Modifikationen: Restriktionsverdauung, Ligationen, Phosphatase- und Klenow Behandlungen	53
2.4.7	Transformation von Plasmid DNA in <i>E. coli</i>	53
2.4.8	Medien und Kultivierungsbedingungen	54
2.4.9	Isolierung genomischer DNA	54
2.4.10	Expression des Fusionsproteins L-phoA	55
2.4.11	Detergenzextraktion des Fusionsproteins L-phoA aus der Zellmembran	56
2.4.12	Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase	57
2.4.12.1	Aktivitätstest mit <i>p</i> -Nitrophenylphosphat (pNPP)	57
2.4.12.2	Aktivitätstest mit 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat	58
2.4.12.3	Aktivitätstest mit 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Galaktosid	59
2.4.13	PCR-Reaktion	60
2.4.14	DNA-Sequenzierung	61
3	ERGEBNISSE	63
3.1	Reinigung und Solubilisierung des RC aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> in Gegenwart von Detergenzien	63
3.1.1	Ionenaustauschchromatographie zur Reinigung des RC mit LDAO	63
3.1.2	RC-Reinigung mit synthetischen Zuckerestern	69
3.2	Cytochrom c Assay zur Bestimmung der photochemischen Aktivität von RC	72
3.2.1	Cytochrom c Assay in Gegenwart von PS-II-Herbiziden	76
3.3	Herstellung von Liposomen	78
3.3.1	Detergenz-Dialyse-Technik	80
3.3.1.1	Dialysetechnik zur Liposomenpräparation mit OGP	81
3.3.1.2	Dialysetechnik mit synthetischen Zuckerestern	84
3.3.2	"Freeze-Thaw"-Methode zur Präparation von Calcein-Liposomen	85
3.3.2.1	Gelfiltration von Calcein-Liposomen	85
3.3.2.2	Phosphatbestimmung bei Calcein-Liposomen	86
3.3.3	Liposomenpräparationstechnik unter Verwendung synthetischer Zuckerester und einer immobilisierten Lipase	89

3.3.3.1	Lipasenscreening	89
3.3.3.2	Dünnschichtchromatographie.....	91
3.3.3.3	HPLC.....	91
3.4	Herstellung von Proteoliposomen	93
3.4.1	RC-Rekonstitution.....	94
3.4.1.1	Detergenz-Dialyse mit OGP.....	94
3.4.1.2	Detergenz-Dialyse unter Verwendung synthetischer Zuckerester	97
3.4.1.3	RC-Rekonstitution durch Zuckeresterhydrolyse.....	98
3.4.2	Rekonstitution von Bakteriorhodopsin.....	99
3.5	Physikochemische Charakterisierung der hergestellten Liposomen und Proteoliposomen.....	100
3.5.1	Elektronenmikroskopie	100
3.5.1.1	EM von Liposomen und Proteoliposomen nach Detergenz-Dialyse	100
3.5.1.2	EM von Liposomen nach Zuckeresterhydrolyse.....	103
3.5.2	Lichtstreuungsuntersuchungen.....	104
3.6	Stabilitätsuntersuchungen von Liposomen.....	107
3.6.1	Detergenzstabilität von Calcein-Liposomen	107
3.6.2	Temperaturstabilität von RC-Proteoliposomen.....	114
3.7	Orientierung integraler Membranproteine in den hergestellten Liposomen	117
3.7.1	Photoreaktionszentrum.....	117
3.7.1.1	Lichtinduziertes Absorptionsspektrum von Cytochrom c.....	117
3.7.1.2	Immunoassay zur Bestimmung der RC-Orientierung	122
3.7.1.3	Photochemische Bakteriochlorophyllausbleichung	125
3.7.2	Orientierung von Bakteriorhodopsin.....	128
3.8	Klonierung des Fusionsproteins L-phoA	131
3.8.1	Isolierung des Gens für die L-Untereinheit und Klonierung in pUC19	131
3.8.2	Isolierung des Gens für die alkalische Phosphatase und Klonierung in pUC19	132
3.8.3	Fusion der Gene in pUC19.....	133
3.8.4	Expressionsversuch von pUC-L-phoA.....	135
3.8.5	Fusionsgen über rekombinante PCR - "Splicing by Overlap Extension" ...	136
3.8.6	Expression von L-phoA.....	140

4	DISKUSSION	141
4.1	Kultivierung von <i>Rhodobacter sphaeroides</i> , Isolierung und Reinigung der Reaktionszentren	143
4.2	Herstellung von Liposomen und Proteoliposomen	146
4.2.1	Detergenz-Dialyse	147
4.2.2	"Freeze-Thaw"-Methode	147
4.2.3	Etablierung einer neuen Methode zur Liposomenpräparation	148
4.2.4	Rekonstitution von RC	150
4.2.5	Rekonstitution von BR	152
4.3	Physikochemische Charakterisierung der hergestellten Liposomen und Proteoliposomen	152
4.3.1	Größenbestimmung von Liposomen	152
4.3.2	Detergenzstabilität der Liposomen	154
4.3.3	Temperaturstabilität von RC-Liposomen	157
4.4	Orientierung integraler Modellmembranproteine in den Liposomen	158
4.4.1	Reaktionszentrum	158
4.4.2	Bakteriorhodopsin	160
4.5	Konstruktion des Fusionsproteins L-phoA	163
4.6	Ausblick	165
5	ZUSAMMENFASSUNG	166
6	LITERATURVERZEICHNIS	168

Liste der Abkürzungen

Abs	Absorption
AK	Antikörper
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninicacid
BChl	Bakteriochlorophyll
bp	Basenpaare
BR	Bakteriorhodopsin
BSA	Rinderserumalbumin
BSL	Lipase von <i>Bacillus species</i>
CAL-A, B	Lipasen von <i>Candida antarctica</i>
CMC	kritische Mizellkonzentration
DEAE	Diethylaminoethyl
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent assay
FLM	Fluorescein-5-maleimid
FPLC	fast protein liquid chromatography
IUV	intermediate-sized unilamellar vesicles
HPLC	high pressure liquid chromatography
K	Affinitätskonstante
kDa	Kilo Dalton
LDAO	N, N-Dimethyldodecylaminoxid
LHP	light harvesting protein

Lipase OF	Lipase von <i>Candida rugosa</i>
LMW	low molecular weight
LUV	large unilamellar vesicles
min	Minute(n)
MLV	multilamellar vesicles
OG	6- <i>O</i> -Octanoyl- β -D-glucose
OGP	n-Octyl- β -D-glucopyranosid
OD	Optische Dichte
OM	6- <i>O</i> -Octanoyl- β -D-mannose
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	L- α -Phosphatidylcholin
PE	L- α -Phosphatidylethanolamin
PG	L- α -Phosphatidyl-D-L-glycerol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase aus Meerrettich
PS	Photosystem
PS-II	Photosystem-II
RC	(Photo-)Reaktionszentrum
rpm	rotations per minute
SUV	small unilamellar vesicles
Tab.	Tabelle
Tris	Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN20	Poly-oxy-ethylensorbitan-mono-laureat
UQ	Ubichinon

1 Einleitung

1.1 Biologische Membranen

Biologische Membranen sind organisierte, flächige Aggregate, die hauptsächlich aus Proteinen und Lipiden bestehen. Ihre Funktionen sind für das Leben unerlässlich, denn Plasmamembranen verleihen Zellen Individualität, indem sie von der Umgebung abgrenzen. Membranen wirken nicht nur als schwer passierbarer Schutzwall, sondern sie sind hochselektive Permeabilitätsschranken, die mit spezifischen Pumpen und Kanälen die Molekül- und Ionenzusammensetzung des intrazellulären Mediums regulieren (Lehninger, 1985, Stryer, 1987).

Plasmamembranen bestimmen weiterhin den Stofftransport, die Biosynthese und den Informationsfluß zwischen Zellen und ihrer Umgebung. Die Membran setzt sich zusammen aus einem Grundgerüst, der Lipid-Doppelschicht, in der Proteine eingebettet sind. Das von Singer und Nicolson entworfene Modell des „flüssigen Mosaiks“ (Singer & Nicolson, 1972) stellt die dynamische Struktur einer Membran als zweidimensionale fluide Lipid-Matrix dar (s. Abbildung 1.1).

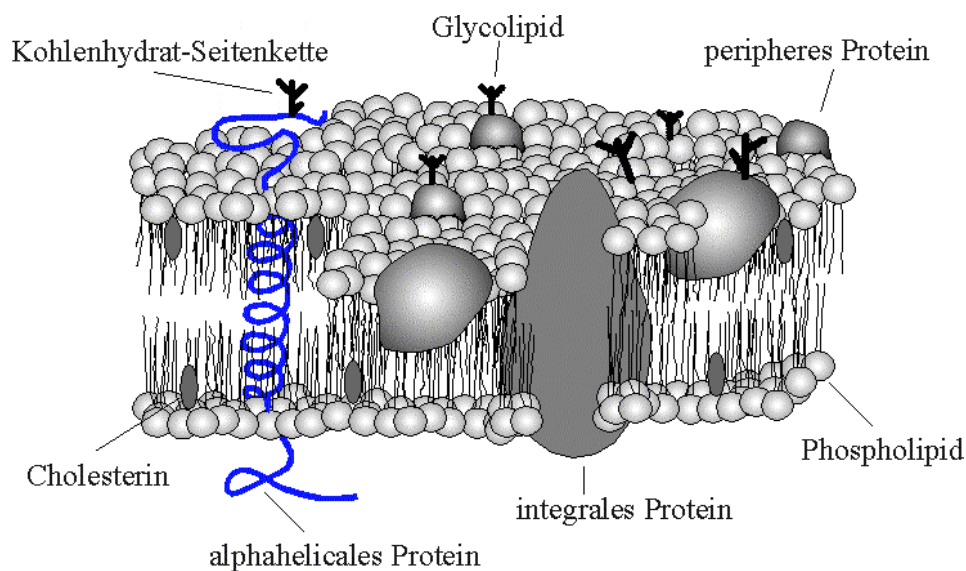


Abbildung 1.1: Das flüssige Mosaik als Modell für die Organisation biologischer Membranen (nach Bretscher, 1986).

1.2 Membranlipide

In der Literatur werden unter der Bezeichnung Lipid (griech.: lipos = Speck) diejenigen Stoffe verstanden, die in allen Zellen enthalten, wasserunlöslich und in apolaren organischen Solventien löslich sind. Dabei ist die Unterteilung dieser sehr großen Substanzklasse meist nach der Anzahl der Hydrolyseprodukte in einfache Lipide mit maximal zwei und in komplexe Lipide mit mehr als zwei Hydrolyseprodukte üblich.

Glycerophospholipide oder Phospholipide werden zu den komplexen Lipiden gezählt. Sie stellen den Hauptbestandteil der Plasmamembranen dar (Voet & Voet, 1992). Die Nomenklatur der Phospholipide bezieht sich auf einen Vorschlag von Hirschmann (Hirschmann, 1960; IUPAC-IUB CBN, 1977). Am häufigsten anzutreffen sind die 1,2-Diacyl-phospholipide, deren gemeinsames Strukturelement das Glycerin ist (Phillips & Chapman, 1968). Die Substituenten in Position 1 und 2 sind von langkettigen Fettsäuren abgeleitet. Der prinzipielle Aufbau dieser amphiphilen, aus einem GlycerinGrundgerüst, zwei apolaren hydrophoben langkettigen Fettsäuren und einer polaren hydrophilen phosphathaltigen Kopfgruppe bestehenden Substanzklasse ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Durch Veresterung der Hydroxylgruppe an Kohlenstoff C3 mit Orthophosphorsäure entsteht Phosphatidsäure (PA). Chiralität wird durch die selektive, nicht statistische Verteilung der Substituenten über die drei Positionen des Glycerinmoleküls bewirkt. Fast alle natürlichen Phospholipide sind gemischt strukturiert. Sie weisen an Positionen 1 und 2 des Glycerin-Grundgerüsts verschiedene Fettsäureketten auf, die mit unterschiedlichem Sättigungsgrad in der Regel eine Länge zwischen 14 und 24 Kohlenstoffatomen besitzen (Hoppe et al., 1982).

Nach dem strukturellen Aufbau des polaren Bereichs unterscheidet man zwischen zwitterionischen und negativ geladenen Lipiden. Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) entstehen durch die Veresterung der Phosphatgruppe mit den Alkoholen Cholin bzw. Ethanolamin. Diese Phospholipide sind bei pH-Werten um 7 neutral und gehören zu den zwitterionischen Lipiden. Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylserin (PS) weisen negative Ladungen auf und werden zur zweiten Gruppe gezählt (Eibl, 1984).

Zur Bezeichnung von Diacyl-phospholipiden werden in der Regel Abkürzungen verwendet, die die Kopfgruppen, Kettenlängen und die Anzahl der ungesättigten

Verbindungen angeben. So wird z.B. als PC (16:0) das zwei gesättigte Acylketten mit 16 C-Atomen besitzende Dipalmitoylphosphocholin (DPPC) gekennzeichnet.

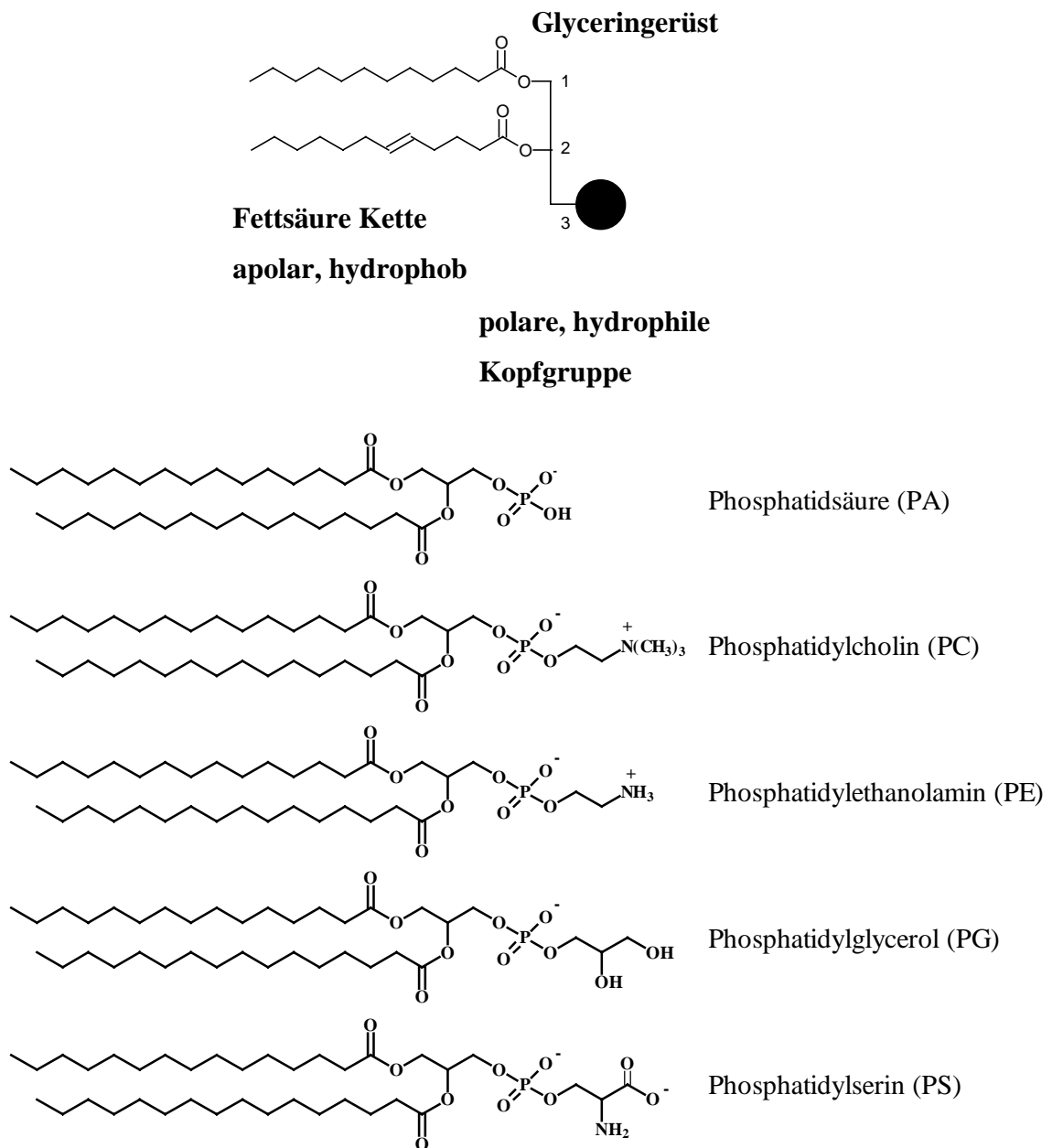


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau von Phosphoglycerolipiden; durch Veresterung der Hydroxylgruppen am C₃ mit Orthophosphorsäure wird Phosphatidsäure gebildet; die Phosphatgruppe ist z.B. mit Cholin, Ethanolamin, Glycerin oder Serin verestert. Ladungen der Kopfgruppe bei pH 7 (Eibl, 1984) (hier: Acylkettenlänge = 16 C-Atome).

1.2.1 Selbstorganisation der Phospholipide

Bei Erreichen einer bestimmten Konzentration, der kritischen Mizellkonzentration (CMC), bilden Phospholipide in Wasser spontan höhermolekulare Aggregate (s. Abbildung 1.3). Die CMC-Werte liegen für typische Membranlipide unter 10^{-10} mol/l, d.h. die Konzentration der Lipide in wässriger Lösung ist vernachlässigbar klein. Die Motivation der amphiphilen Phospholipidmoleküle für diese Selbstorganisation liegt in ihren Strukturelementen begründet. Im gleichen Molekül existieren lipidlösliche, lipophile oder apolare sowie wasserlösliche, hydrophile oder polare Bereiche (Eibl, 1984). Indem sich diese apolaren und polaren Bereiche der amphiphilen Moleküle aneinander lagern, bilden sie Molekülsysteme von großer Stabilität. Von Tanford (1973) wird die treibende Kraft der Aggregation als hydrophober Effekt bezeichnet.

Informationen über solche höhermolekularen Organisationsformen von Phospholipiden erhält man durch einfache geometrische Betrachtungen über die Grenzflächenbeanspruchung von Einzelmolekülen. Daten hierfür lassen sich über die Auswertung von Druck-Flächen-Diagrammen monomolekularer Filme im Langmuir-Trog (Gros et al., 1981) oder aus Röntgendaten von Einkristallen (Harlos et al., 1983) ableiten. Abbildung 1.3 belegt, daß, je nachdem, ob die Grenzflächenbeanspruchung des apolaren oder polaren Teilbereiches überwiegt, die Bildung von Mizellen, lamellaren Doppelschichten, Vesikeln oder hexagonalen Strukturen begünstigt wird. Beträgt das Grenzflächenverhältnis zwischen apolarem (a) und polarem (p) Bereich eins, wie im Fall der Phosphatidylcholine (Lecithine), bilden sich ausgedehnte lamellare Doppelschichten mit einer Dicke von 6-7 nm. Diese können sich auch zu Kugeln mit wässrigem Innenvolumen, sogenannte Vesikel oder Liposomen (s. Kap. 1.2.2) zusammenschließen (Eibl, 1984). Mono-acyl-phosphatidylcholine (Lysolecithine) sind dafür ein charakteristisches Beispiel. Bei einem Grenzflächenverhältnis kleiner als 0,7 entstehen Mizellen, die sich von Vesikeln dadurch unterscheiden, daß ihre großflächigen polaren Bereiche nach außen, d.h. gegen Wasser, und die Fettsäureketten nach innen orientiert sind. Das Innenvolumen ist apolar und enthält kein Wasser (Eibl, 1984). Dominiert, wie im Fall der Phosphatidylethanolamine (PE), der apolare Bereich ($a/p > 1,3$) entstehen „invertierte Mizellen“ und inverse hexagonale Strukturen (Eibl, 1984).

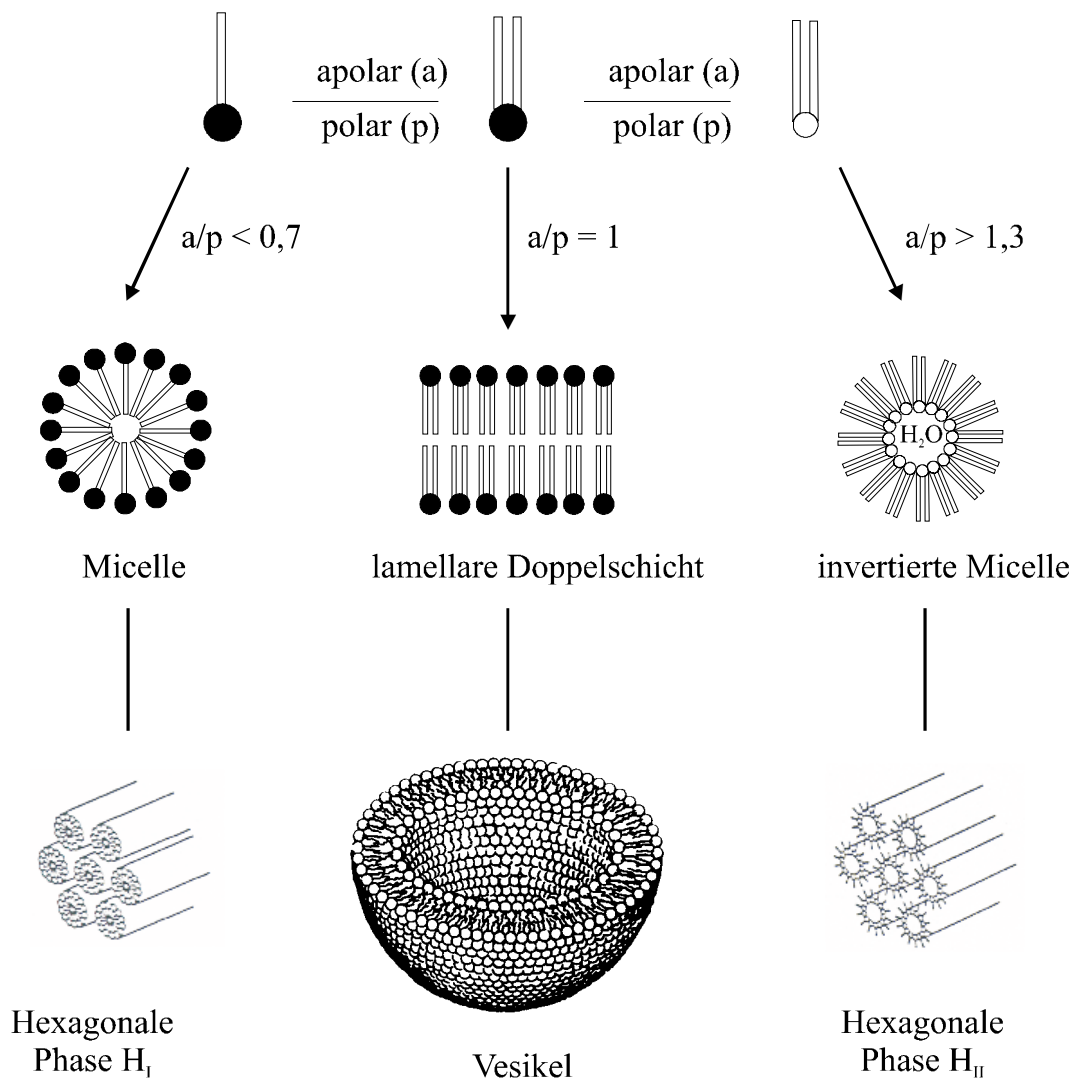


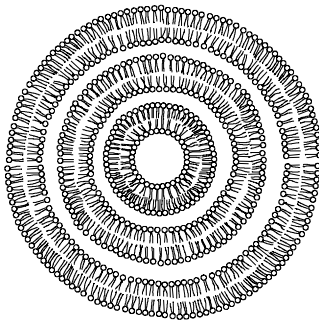
Abbildung 1.3: Darstellung verschiedener Phospholipidüberstrukturen in Abhängigkeit vom molekularen Aufbau der Moleküle (Eibl, 1984). a/p = Grenzflächenverhältnis.

1.2.2 Liposomen

Zur Rekonstitution von membrangebundenen Proteinen (Woodle et al., 1989), zum Studium von Oberflächenerkennungsreaktionen (Ahlers et al., 1990) sowie in der Pharmazie (Talsma et al., 1992 a; Talsma et al., 1992 b) werden häufig Liposomen verwendet.

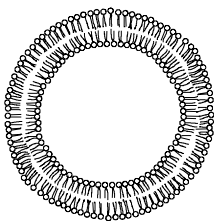
Liposomen (Vesikel) sind sphärisch geschlossene Lipiddoppelschichten, die in Analogie zur Zellmembran ein wäßriges Kompartiment umschließen (s. Abbildung 1.3). Liposomen setzen sich wie ihr natürliches Vorbild – die Zelle – aus Phospholipiden zusammen, die sich als wasserunlösliche amphiphile Moleküle im Kontakt mit Wasser spontan selbst organisieren (Ahlers et al., 1990).

Der chemische Aufbau der Liposomen bedingt solche Eigenschaften wie Membranfluidität, Ladungsdichte und Permeabilität. Liposomen können aber auch durch ihre Größe und Gestalt charakterisiert werden. Gerade die Größenbestimmung ist eine der am häufigsten anzutreffenden Charakterisierungsmethoden, sind Liposomen verschiedener Größen doch auch oft auf sehr unterschiedliche Präparationen zurückzuführen und für die vielseitige Anwendung von wesentlicher Bedeutung. Liposomendurchmesser reichen von den theoretisch kleinstmöglichen 25 nm bis zu lichtmikroskopisch sichtbaren 1 μm . Sie können aus einem einzigen Bilayer oder aus vielen konzentrischen Membranlamellen bestehen. Man unterscheidet:



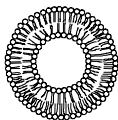
multilamellar vesicles (MLV):

die Vesikel bestehen aus 5 oder mehr konzentrischen Lamellen; ihr Durchmesser liegt in einem weiten Bereich von 100 bis 1000 nm



large unilamellar vesicles (LUV):

sie bestehen aus einem Bilayer und sind sehr homogen in der Größenverteilung (bis 1000 nm)



small unilamellar vesicles (SUV):

sie haben einen Durchmesser von 25 bis 100 nm

intermediate-sized unilamellar vesicles (IUV):

es sind Bilayer-Liposomen, die in der Größenordnung zwischen SUV und LUV liegen

Desweiteren sprechen für die Anwendung des liposomalen Systems folgende Punkte:

1. Liposomen kennzeichnen ein definiertes biochemisches System. Die Vielzahl der Funktionen natürlicher Membranen wie auch die Komplexität der Struktur verhindern es normalerweise, durch ein Studium von Membranfragmenten Erkenntnisse über spezifische Wechselwirkungen sowie über andere molekulare Details zu gewinnen. Daraus folgt, daß deshalb für das Verständnis auf molekularer Ebene biologische Funktionseinheiten aus der natürlichen Umgebung gelöst und in künstlichen Systemen wieder aufgebaut werden sollten, die chemisch und physikalisch definiert sind (Eibl, 1984).
2. Im Vergleich zu natürlichen Membransystemen ist die Stabilität von rekonstituierten Proteinen in Liposomen höher, vor allem deshalb, weil das System nicht durch zelluläre Proteasen und Abbauprozesse anderer Proteine beeinflusst wird.
3. Verschiedenartige Substanzen (Farbstoffe, Fluorochrome, elektrochemische Substanzen) können in das wäßrige Kompartiment von Liposomen eingeschlossen werden. (Ishimore et al., 1993; Gregoriadis et al., 1993; Locascio-Brown et al., 1990; Stelze et al., 1993). Dies bedingt bei Anwendung von Liposomen in der Analytik eine außerordentliche Erweiterung an Detektionsmöglichkeiten, wenngleich auch über indirekte Nachweise.

1.2.3 Thermotropes Phasenverhalten

Phospholipide weisen ein temperaturabhängiges Phasenverhalten (thermotroper Polymorphismus) in wäßrigen Dispersionen auf. Nach Tardieu et al. (1973) zeigt bei Erwärmung in wäßriger Dispersion bei einer sehr genau definierten und jeweils charakteristischen Temperatur eine künstliche, nur von einer Sorte von Phospholipid aufgebaute Membran drei thermische Umwandlungen (s. Abbildung 1.4):

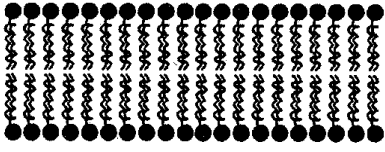
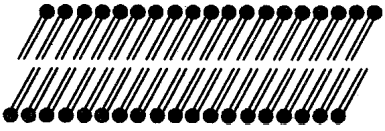
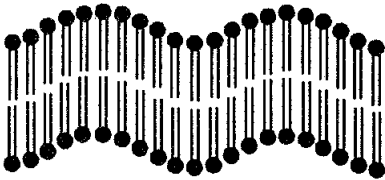
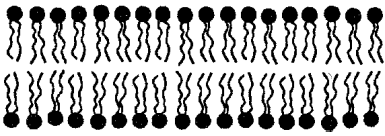
1. Subumwandlung 1 (Phasenumwandlungstemperatur T_c)
2. Vorumwandlung (Phasenumwandlungstemperatur T_p)
3. Hauptumwandlung (Phasenumwandlungstemperatur T_m)

Aus der Gelphase 1 (L_c), die nur nach längerer Inkubationszeit wahrgenommen wird (Lewis et al., 1987), geht die Doppelschicht bei T_c in die Gelphase 2 (L_β') über. Dabei ergeben die erstarrten Ketten eine Neigung von 30° zur Membranebene (New, 1990). Diese Vorumwandlung bei der Vorübergangstemperatur (T_p) in die Ripple-Phase (P_β) bedingt die periodisch gewellte Überstruktur (Winter, 1990b) der Lipiddoppelschicht. Die dominierende Methode für die Charakterisierung der Phasentransitionstemperatur (T_m) ist die Mikrokolorimetrie (Lee, 1977; Dörfler, et al., 1983). Der Zustand unterhalb der Hauptumwandlungstemperatur wird als geordnete, auch kristalline Phase oder Gel-Phase (P_β), der Zustand oberhalb T_m als fluide, auch fluid-kristalline oder ungeordnete Phase (L_α) bezeichnet. Dieser als endothermer Phasenübergang bezeichnete Hauptübergang (engl.: main transition) führt somit zu einer strukturellen Veränderung der Lipidmoleküle, das sogenannte „Schmelzen“ der Ketten. Der T_m -Wert wird dabei bestimmt durch die Kopfgruppe, die Länge und den Sättigungsgrad der Kohlenwasserstoffketten (Phillips & Chapman, 1968). Während die geordnete Phase P_β dicht gepackt (all-trans-Konformation der Kohlenwasserstoffketten) ist, entspricht die fluide Phase L_α einer aufgelockerten Packung (gauche-Konformation) (Winter, 1990).

In der Regel erfolgt in der Vorumwandlung (T_p) ein Orientierungswechsel der Kopfgruppe. Durch Laser-Raman-Spektroskopie können diese Konformationsänderungen direkt belegt werden (Lippert, 1971). So wiesen Keough et al. (1979) folgende Änderungen bei der Hauptumwandlung von geordneter (P_β) zu fluider Phase (L_α) aus:

1. Vergrößerung der Oberflächenbeanspruchung
2. Verkürzung der Kohlenwasserstoffketten
3. Ausdehnung des Doppelschichtvolumens
4. Einsetzen einer raschen lateralen Diffusion
5. Verringerung der Van der Waals Wechselwirkungen

Verallgemeinernd ist zu konstatieren: Mit Erhöhung der Kettenlänge oder des Sättigungsgrades nimmt die Phasenumwandlungstemperatur (T_m) zu (Keough et al., 1979).

Phase	Struktur der Doppelschicht	Gitter/Packung
L_C		Gelphase1: orthorombisch
$L_{\beta'}$		Gelphase2: all-trans, Neigungswinkel 30°
P_{β}		Gelphase 3: Ripple-Phase hexagonal, periodisch gewellt
L_{α}		flüssigkristalline Phase

$$L_c \xrightleftharpoons{T_c} L_{\beta'} \xrightleftharpoons{T_p} P_{\beta} \xrightleftharpoons{T_m} L_{\alpha}$$

Abbildung 1.4: Darstellung der thermotropen Phasenzustände von Lipid-doppelschichten aus 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholinen (Lecithinen) (Eibl, 1984; New, 1990; Winter, 1990b).

Lateinische Buchstaben bezeichnen die Fernordnung: L = lamellar (eindimensional); P = (zweidimensional); C = kristallin (dreidimensional). Griechische Buchstaben stehen für die Nahordnung: α = ungeordnet, fluid; β = all-trans, gel; β' = all-trans, geneigt, gel.

Phasenumwandlungstemperaturen: c = cristalline-transition; p = pre-transition; m = main transition.

Die Phasentransition und Fluidität von Phospholipidmembranen bestimmt solche Eigenschaften wie Permeabilität, Fusion, Aggregation und Proteinbindung. All jene

Faktoren können die Stabilität von Liposomen und ihr Verhalten in biologischen Systemen wesentlich beeinflussen (New, 1990). Schon allein die Variation der Oberflächenladung kann tiefgreifende Eigenschaftsänderungen in planaren Doppelschichten auslösen, was sich besonders auf die Hauptumwandlung auswirken kann.

1.2.4 Lipide mit ungewöhnlicher Struktur

Ungewöhnliche Fettsäuren sind solche, deren Kohlenstoffgerüste Oxo-, Hydroxy- oder Epoxygruppen, *trans*-konfigurierte Doppelbindungen, Dreifachbindungen, Cyclen oder Verzweigungen aufweisen. Ihre Anzahl liegt weit über Eintausend (Schmid, 1987). Im Vergleich dazu sind geradkettige gesättigte und *cis*-konfigurierte ungesättigte Fettsäuren gewöhnlich.

Die Kenntnisse über die biologischen Funktionen ungewöhnlicher Fettsäuren und ihrer Derivate, zu denen Wachsester, Triglyceride und Phospholipide gehören, sind trotz dieses großen Potentials noch sehr gering, und auch ihre ökonomische Anwendung ist beschränkt.

Infolge ihrer neuen physikochemischen Eigenschaften sind es aber gerade diese Verbindungen, die Impulse und Lösungsvarianten für technische Problemlösungen durch die Fettchemie geben können (Schmid & Werdelmann, 1982).

Wichtige natürliche Vorkommen besitzen Fettsäuren mit Dreifachbindungen. Acetylenverbindungen finden in der Pflanzenwelt eine ganz erhebliche Verbreitung. Sie werden meist aus Angiospermen der Familie Compositae als Bestandteile ätherischer Öle isoliert (Bu'Lock, 1956, Wailes, 1956).

Gemische von antibiotisch wirksamen Acetylenen wurden aus der Kulturflüssigkeit von Mikroorganismen und niederen Pflanzen sowie verschiedenen Basidomyceten isoliert (Bu'Lock et al., 1955). Als Beispiel ist Nemotinsäure (5,6-Dien-8,10-dien-4-hydroxyundecansäure) zu nennen.

Als erste natürliche Fettsäure wurde Taririnsäure (6-Octadecinsäure) gefunden, ein Isomer der Stearolsäure (9-Octadecinsäure). Sie wurde 1892 von Arnaud im Samenöl des mittelamerikanischen Baumes *Picramnia tariri* entdeckt (Arnaud, 1892).

Technisch interessant sind Fettsäuren mit konjugierten Dreifachbindungen, wie z.B. Isansäure (17-Octadecan-9,11-diinsäure), weil diese zur Polymerisation neigen (Steger & Loon, 1937). Auch wird ein Zusammenhang der Kälteadaptation von Membranlipiden in Moosen mit den in ihnen gefundenen Acetylenfettsäuren vermutet (Gellermann, 1975). Hinsichtlich dieser z.T. außergewöhnlichen Eigenschaften von Fettsäuren ist es interessant zu erfahren, welche Wechselwirkungen zwischen Struktur und Funktion von Phospholipidbilayern bestehen (Grainger, 1990).

1.3 Anforderungen an eine Modellmembran

Energie- und Dichtefluktuations sind im Bereich der Phasenumwandlung erheblich. Damit wird auch die passive Durchlässigkeit der Membran und die Wahrscheinlichkeit der Porenbildung verstärkt (Hoppe et al., 1982).

Von lebensnotwendiger Bedeutung und für viele enzymatische Transportvorgänge Voraussetzung ist die Fluidität der Plasmamembran. Aufgrund der Tatsache, daß in biologischen Membranen gesättigte und ungesättigte Fettsäureketten in der Regel in einem Lipidmolekül vorkommen, wird eine eindeutige Phasentrennung bei einer bestimmten Temperatur nicht beobachtet (Winter, 1990b).

Die Fluidität wird des weiteren wesentlich durch Cholesterol bestimmt, das die mechanische Stabilität der Membran erhöht. Eukaryontische Plasmamembranen zeichnen sich durch einen hohen Anteil an diesem Steroid aus (Winter, 1990a). Darüber hinaus weisen sie eine Vielzahl von Phospholipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen auf, in deren Gegenwart einige Membranproteine ausschließlich aktiv sind. Belege hierfür konnten in Experimenten mit rekonstituierten Systemen und synthetischen Phospholipiden erbracht werden (Kurrle, 1989). Die asymmetrische Verteilung von Lipiden in der Doppelschicht erfüllt eine Funktion bei der richtigen Orientierung der Membranproteine, die in der Vielzahl der Matrixmoleküle eine charakteristische Mikroumgebung besitzen (Marsh, 1987).

Bevorzugt lagern sich Phospholipide am hydrophoben Kontaktbereich des Proteins an. Sie werden dadurch in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt. Es bildet sich ein Verband aus Molekülen, die in starker Wechselwirkung zueinander stehen. Das Vorhandensein von Lipid ist für den Erhalt der Aktivität membrangebundener Enzyme zwar notwendig, doch

ist bisher die Frage nach einer spezifischen Abhängigkeit noch unbeantwortet geblieben (Warncke, 1990).

Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß allein die Verfügbarkeit einer hydrophoben Umgebung entscheidend ist. Untersuchungen an Modellsystemen werden daher auf eine wohldefinierte Anzahl von Lipidspezies und einem einzelnen Typ von Protein beschränkt (Seelig, 1981). Als Modellmembranen für Rekonstitutionsexperimente haben sich unilamellare Vesikel vielfach bewährt (Racker, 1985, Razin, 1971).

1.4 Das Photoreaktionszentrum als Modellmembranprotein

1.4.1 Struktur und Elektronentransport

Die Röntgenkristall-Struktur-Analyse des kristallinen Reaktionszentrums aus Purpurbakterien durch Deisenhofer et al. (Allen et al., 1988, Deisenhofer et al., 1985, Ermler et al., 1994) bedeutete einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Struktur des Reaktionszentrums (RC) und des lichtgetriebenen Elektronentransportes. Die nach Einbindung von QSAR-Studien (Quantitative-Struktur-Aktivitäts-Beziehungen) erfolgte Diskussion der drei-dimensionalen Faltung der Proteine (Draber et al., 1991) war durch die Nutzung von Inhibitoren (Herbiziden) und dem damit verbundenen detaillierten Verständnis des Photosystems (radioaktiv markierte Herbizide, Sequenzierung des *psbA* Gens von herbizidtoleranten Mutanten) gegeben.

Das Reaktionszentrum bildet einen integralen Membran-Protein-Pigment-Komplex. Dieser ist es, der den primären Prozeß der Photosynthese – den lichtinduzierten Elektronentransfer von einem Donor zu einer Serie von Akzeptoren – bedingt (Allen et al., 1988). Die Darstellung des Aminosäurerückgrates der drei Untereinheiten des RC und der darin eingebetteten Pigmente in einer Biomembran wird in Abbildung 1.5 gezeigt.

Das aus *Rhodobacter sphaeroides* stammende Reaktionszentrum setzt sich aus drei Proteinuntereinheiten zusammen, die entsprechend ihrem relativen Molekulargewicht als L (light), M (medium), und H (heavy) bezeichnet werden (Michel et al., 1986) und den folgenden Kofaktoren: 4 Bakteriochlorophylle, 2 Bakteriophäophytine (BPhe), 2 Chinone und ein nicht-Haem-Eisenion (Feher et al., 1989). Dabei ist zu beachten, daß die Redoxcarrier an der L- und M-Untereinheit gebunden sind. Diese beiden, symmetrisch zu einer zweizähligen und senkrecht zur Membran stehenden Rotationsachse angeordneten Pigmentzweige, bilden sich durch die Bakteriochlorophyll-Monomere, die den „special pair“ nahe der periplasmatischen Seite der Membran bis zum nicht-Haem-Eisenion nahe der cytoplasmatischen Seite der Membran ausmachen (Michel et al., 1986). Die Existenz von 11 α -Helices mit jeweils 20 bis 30 Aminosäuren begründet die Röntgen-Struktur des Photosystems von *R. sphaeroides*. Sie bilden einen hydrophoben Bereich mit einer Länge

von 35 Å. Jeweils fünf transmembrane Helices ergeben die zwei Polypeptide L und M, nur eine Helix die H-Untereinheit. Eindeutig kommt die Orientierung und Bindung zu spezifischen Aminosäuren der prosthetischen Gruppen zu diesen Helices zum Ausdruck (Draber et al., 1991).

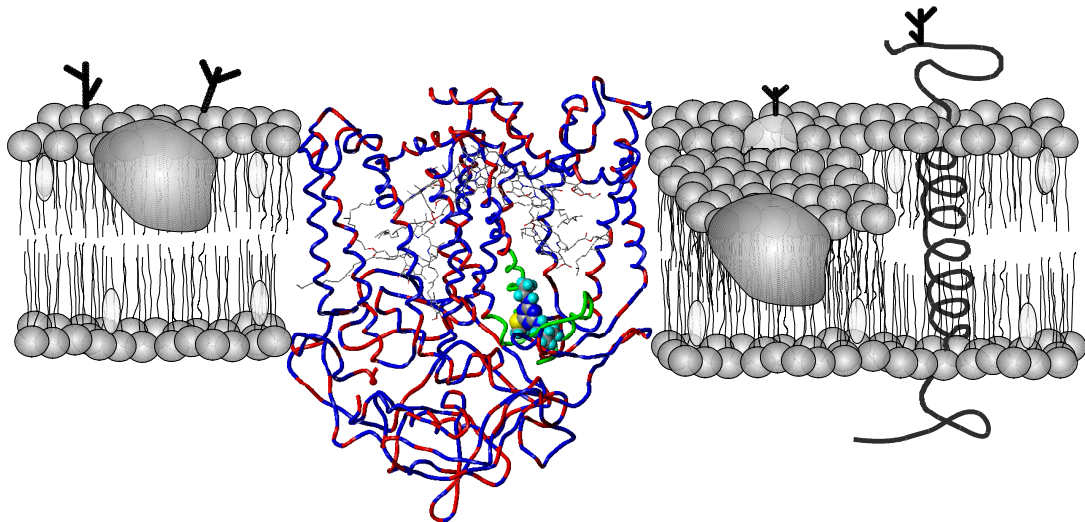


Abbildung 1.5: Molekulare Struktur des Reaktionszentrums und der Pigmente aus *Rhodobacter sphaeroides*, eingebettet in eine schematisch dargestellte Biomembran. In der Q_B -Bindungsstelle des Reaktionszentrums liegt das Herbizid Terbutylazin.

Durch EPR- (electron paramagnetic resonance) und ENDOR-Techniken (electron-nuclear double resonance) sowie optische Spektroskopie konnten die Reaktanten sowie deren Sequenz aufgeklärt werden (Feher et al., 1989). So konnte gezeigt werden, daß zwei BChl-Moleküle durch Überlappung an der Pyrrolring-1-Position ein Dimer P870 bilden, das durch Lichtenergie in den angeregten Zustand überführt wird. Das Dimer P870 wirkt dabei als primärer Elektronendonator, der durch Abgabe eines Elektrons den Prozeß der Ladungstrennung induziert und das Elektron entlang der L-Untereinheit zum BPhe transferiert. Nach Arlt et al. gilt als wahrscheinlich, daß eines der beiden zusätzlichen BChl-Moleküle als erster Elektronenakzeptor fungiert (Arlt et al., 1993). Der Elektronentransport zum Ubichinon der Q_A -Bindungsstelle und ferner über das Eisenatom auf das Ubichinon der Q_B -Bindungsstelle erfolgt innerhalb von 220 ps. Die Q_B -Bindungsstelle des RC ist dabei auf der L-Untereinheit in der Verbindungsschleife der 4. und 5. transmembranen Helix lokalisiert (Holzapfel et al., 1990). Bevor das nun erzeugte, relativ langlebige Semichinonradikal zerfällt, kann im selben Reaktionszentrum

eine zweite Ladungstrennung erfolgen. Daher wird ein zweites Elektron auf das Semichinonradikal der Q_B -Bindungsstelle übertragen und nach Aufnahme von zwei Protonen vollständig reduziertes Ubihydrochinon gebildet (McPherson et al., 1990). Die schwächere Affinität des Ubihydrochinons zum Q_B -Bindungsprotein bewirkt den Austausch gegen ein oxidiertes Ubichinon. Abbildung 1.6 zeigt den Weg der Ladungstrennung im bakteriellen Reaktionszentrum.

Hervorzuheben ist die spiegelsymmetrische Struktur der M- und L-Untereinheit. Interessanterweise nehmen Elektronen trotz identischer Proteinausstattung und –lage nur den Weg über die L-Untereinheit. Ursache dieses asymmetrischen Elektronentransportes, von Steffen *et al.* untersucht, ist eine höhere effektive dielektrische Konstante für die L-Untereinheit. Daraus wurde für die M-Untereinheit ein ungerichteter Elektronentransport geschlossen (Steffen et al., 1994). Darüber hinaus wurde eine asymmetrische Polarität der Aminosäuren zwischen der L- und M-Untereinheit in der Nähe der BPhe und des „special pair“ festgestellt, was für eine dielektrische Asymmetrie spricht.

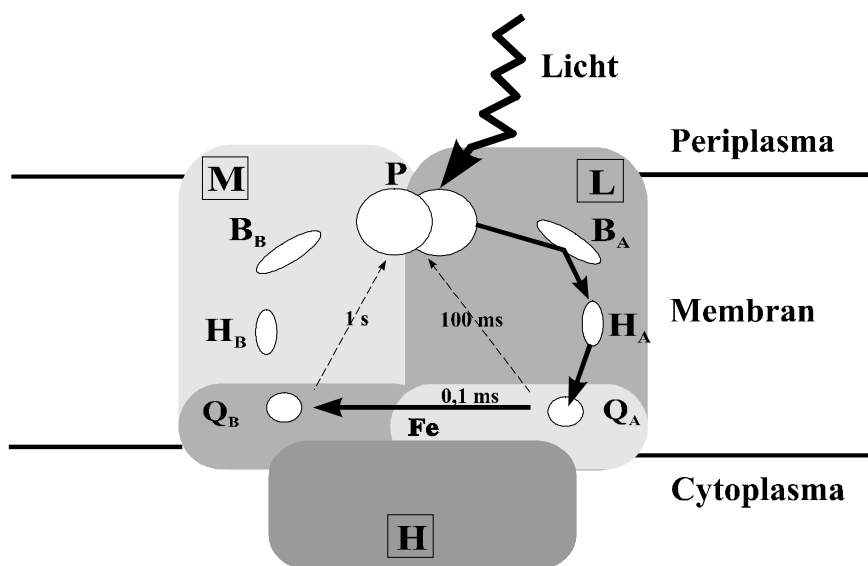


Abbildung 1.6: Pigmentanordnung und Schema der photochemischen Prozesse im RC von *Rhodobacter sphaeroides*.

H, L, M: Proteinuntereinheiten, **P:** Bakteriochlorophyllidimer, **H_A:** Bakteriophäophytin, **Q_A, Q_B:** Chinonbindungsstellen, **Fe:** Eisenatom

1.4.2 Die Photosynthese phototropher Bakterien (Rhodospirillaceae)

Unter der Photosynthese wird jener Prozeß verstanden, mit dem lebende Organismen Lichtenergie in chemische Energie (ATP) umwandeln. Indem die sich vollziehende photochemische Reaktion die gesamte freie Energie der Organismen vergrößert, liefert sie damit direkt oder indirekt die Energie für die gesamte Natur (Lawlor, 1990).

Zu unterscheiden ist dabei zwischen der pflanzlichen (Holzenburg et al., 1993) und der bakteriellen Photosynthese. Bei der bakteriellen Photosynthese verläuft diese ohne Sauerstoffentwicklung (Wollmann, 1991). Um die für die CO₂-Assimilierung erforderliche Reduktionsenergie zu erzeugen, oxidieren hier Bakterien andere organische und anorganische Verbindungen wie z.B. Succinat. Bakterien verfügen über nur ein in vielen Eigenschaften dem PS-II der Pflanzen analoges Photosystem (s. Tabelle 1.1), (Nitschke & Rutherford, 1991), während die höheren Pflanzen zwei in Reihe geschaltete Photosysteme (Lyon et al., 1993; Yruela et al., 1994) aufweisen. Elektronendonator im bakteriellen Reaktionszentrum (RC) ist Cytochrom c₂, nicht Wasser bzw. ein Mangankomplex. Übereinstimmungen zwischen der D1- und D2-Untereinheit des pflanzlichen RC und der L- und M-Untereinheit des bakteriellen RC, die zu ähnlichen Tertiärstrukturen und Pigmentausstattungen führen (Trebst, 1986), wurden durch DNA- und Aminosäuresequenzanalysen nachgewiesen. Homologien sind auch in bezug auf den Elektronentransportmechanismus festzustellen, der durch Photosystem-II-Herbizide gehemmt werden kann (Draber et al., 1991). Der Tabelle 1.1 sind weitere Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen bakterieller und pflanzlicher Photosynthese zu entnehmen.

Das in Chromatophoren integrierte Photosystem von *R. sphaeroides*, (Braun & Scherz, 1991) setzt sich zusammen aus den Komponenten der Lichtabsorption mit den Lichtsammelkomplexen (LHC I, LHC II), (Lang & Hunter, 1994), den Reaktionszentren (RC), den Komponenten des Elektronentransportes mit Ubichinon (UQ10), dem Cytochrom c₂ und dem Cytochrom b-c1-Komplex (Gennis et al., 1993) sowie der ATP-Synthase.

Tabelle 1.1: Proteinuntereinheiten, Pigmente und Redoxcarrier des pflanzlichen und bakteriellen Photosystems. Darstellung aus Draber et al., 1991; (B)Chl: (Bakterio)chlorophyll.

	pflanzliches Photosystem II	bakterielles Photosystem aus <i>R. sphaeroides</i>
Protein-Untereinheiten	D1, D2 43-, 47-kDa Proteine (core Antennen) Produkte der Gene psbH-psbN 2 Cytochrome b559 3 Proteine zur Mn-Stabilisierung	L, M H
Elektronencarrier	P680 Chl-Dimer 2 monomere Chl 2 Phäophytine 2 Plastochinone	P870 BChl-Dimer 2 monomere BChl 2 Bakteriophäophytine 2 Ubichinone
Metall-Ionen	1 x Fe, 4 x Mn, 1 x Ca	1 x Fe
O ₂ -Entwicklung	ja	nein
Elektronendonator	H ₂ O	Cytochrom c2
Bindg. v. PS-II-Herbizid	ja	ja

Für die Ladungstrennung im Reaktionszentrum über die Membran und den vektoriellen Elektronentransport ist Lichtenergie die treibende Kraft. Dabei erfolgt die Energieumsetzung wie folgt:

Besonders von den Antennenpigmenten werden Photonen absorbiert und die Energie von Bakteriochlorophyll (BChl) zum Reaktionszentrum geleitet. Von der Außenseite der Membran wird im RC ein Elektron aus dem besonderen Pigmentpaar P870 auf ein membrangebundenes Chinonmolekül (UQ) übertragen. Das nun durch zwei Elektronen reduzierte Chinon nimmt nach der Absorption eines weiteren Photons zwei Protonen von der cytoplasmatischen Seite der Membran auf und diffundiert zum Cytochrom b-c₁-Komplex, wo es die Elektronen an diesen abgibt und zugleich die Protonen in das Periplasma entläßt. Dieser Zyklus wird abgeschlossen, indem der Cytochrom b-c₁-Komplex letztlich durch ein Elektron Cytochrom c2 reduziert und dieses das vorher im

Licht oxidierte P870. Im Gegensatz hierzu wird das andere Elektron auf der cytoplasmatischen Seite wieder auf ein Chinon übertragen. Dies hat zur Folge, daß pro Elektron, das vom RC auf Cytochrom c_2 übertragen wird, zwei Protonen aus dem Cytoplasma in das Periplasma weitergeleitet werden. Es kommt hierbei zu einem Protonengradienten quer zur Membran, welcher anschließend den Protonenrückfluß durch die ATP-Synthase treibt (Gosh & Bachofen, 1989). Die Abbildung 1.7 stellt den Ablauf der bakteriellen Photosynthese im Schema dar.

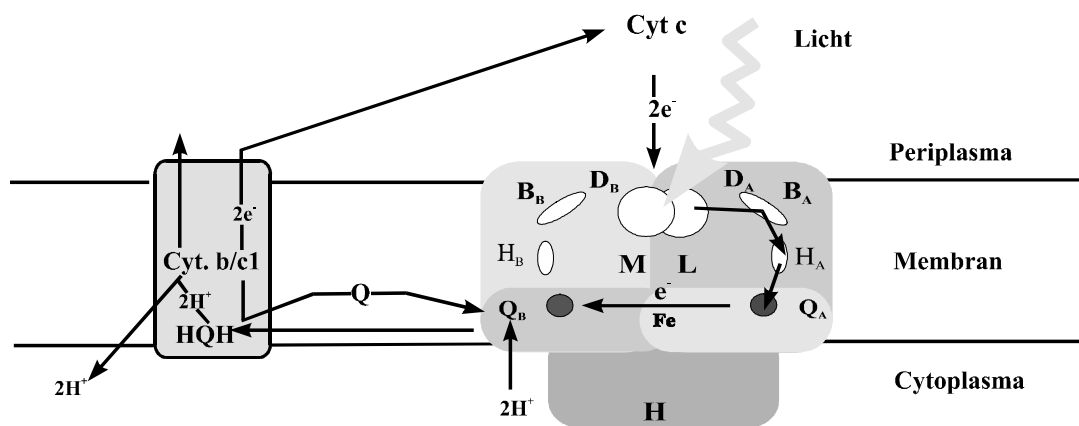


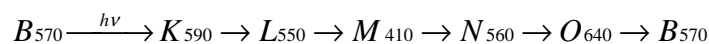
Abbildung 1.7: Darstellung der bakteriellen Photosynthese. Durch Lichtenergie wird der cyclische Elektronentransport durch das Reaktionszentrum, den Chinonpool, über den Cytochrom bc_1 -Komplex und das lösliche Cytochrom c_2 angeregt.

1.5 Bakteriorhodopsin

Das integrale Membranprotein Bakteriorhodopsin (BR) setzt sich aus einer Polypeptidkette (248 Aminosäuren, 26783.6 Da, sieben transmembrane α -Helices) und einem Retinalmolekül zusammen. Dieses ist als Schiffische Base an einen Lysinrest (K216⁸) der Kette gebunden. Als chromophore Gruppe des Proteins stellt es das zentrale Element dieser lichtgetriebenen Protonenpumpe dar (Abbildung 1.8).

BR bildet in der Cytoplasmamembran von *Halobacterium salinarium* zwei-dimensional-kristalline Bereiche von bis zu einem Mikrometer Durchmesser aus, die sogenannte Purpurmembran (PM). Das Kristallgitter der PM ist hexagonal (P3), dabei ist jeder Gitterpunkt von einem BR-Trimeren besetzt. Die BR-Moleküle sind wie folgt angeordnet: der Aminoterminus auf der extrazellulären Seite (EC), der Carboxyterminus auf der cytoplasmatischen Seite (CP) der Membran. Des Weiteren sind Lipidmoleküle (Verhältnis Lipid/BR molar: 10/1, Masse: 25/75) Bestandteil der Membran.

Nach Absorption von Licht durchläuft BR eine zyklische Serie von Reaktionen. Diese sind von zeitlichen Änderungen des Absorptionsspektrums begleitet (Lozier et al., 1975). Im allgemeinen werden die in diesem sogenannten Photozyklus auftretenden Intermediate mit einem Buchstaben und der Angabe ihres Absorptionsmaximums im Differenzspektrum gegen den Ausgangszustand (B₅₇₀) bezeichnet:



Gegenüber den übrigen Formen weist das Intermediat M₄₁₀ eine stark hypsochrom verschobene Absorptionsbande auf. Es ist das einzige Intermediat des Photozyklus, in dem die Schiffische Base deprotoniert ist.

Relevant für den Translokationsmechanismus sind insbesondere drei funktionelle Gruppen: die Schiffische Base (im Ausgangszustand protoniert, -C=NH⁺-), die

⁸ Die Aminosäurereste der Polypeptidkette werden mit dem Einbuchstabencode, gefolgt von ihrer Position nach der durchlaufenden Nummerierung bezeichnet.

Carboxylgruppe von D85 (im Ausgangszustand deprotoniert, $-\text{COO}^-$) und die Carboxylgruppe von D96 (im Ausgangszustand protoniert, $-\text{COOH}$).

Die Reaktion von L_{550} nach M_{410} ist durch den Übergang eines Protons von der Schiffsbasis auf die Carboxylgruppe von D85 gekennzeichnet. Dabei wird von M_{410} nach N_{560} ein Proton von D96 auf die Schiffsbasis übertragen. Zu einem späteren Zeitpunkt des Photozyklus wird D96 reprotoniert – das hierfür erforderliche Proton kommt von der cytoplasmatischen Seite der Membran. Im Schritt O_{640} nach B_{570} gibt D85 ein Proton ab, das das Protein schließlich zur extrazellulären Seite der Membran verläßt. Nach Absorption eines Photons wird somit insgesamt ein Proton von CP nach EP transportiert.

Begleitet von einer Verschiebung des absoluten Absorptionsmaximums um 30 nm ist die Deprotonierung von D85 im Schritt O_{640} nach B_{570} . Dies wird von der negativen Ladung der deprotonierten Carboxylgruppe verursacht, die mit dem delokalisierten π -Elektronensystem der chromophoren Gruppe wechselwirkt. Die Wirkung dieser negativen Ladung auf das Absorptionsmaximum von BR wird durch die Bildung der "Blauen Membran" demonstriert (Hufnagel, 1997).

Während des Photozyklus ist die zentrale Strukturveränderung die des Retinals, dessen Doppelbindung zwischen den Kohlenwasserstoffatomen C13 und C14 nach Absorption eines Photons von *trans* nach *cis* und im Schritt N_{560} nach O_{640} wieder nach *trans* isomerisiert.

Einen Überblick über den Photozyklus und den Translokationsmechanismus bei BR (und anderen halobakteriellen Retinalproteinen) vermittelt Mathies et al., 1991. Eine übergreifende Beschreibung der Funktionsweisen der halobakteriellen Retinalproteine Bakteriorhodopsin (Protonenpumpe) und Halorhodopsin (Chloridpumpe) wird von Oesterhelt et al., 1992 vorgenommen.

Auf einen Aminosäurerest wird in dieser Arbeit näher eingegangen, da er für chemische Reaktionen besonders zugänglich ist. In der BR-Mutante D36C handelt es sich dabei um den Rest C36 (CP) (vgl. Abbildung 1.8). Dieser ist an der Membranoberfläche lokalisiert und von „großen“ und polaren Reagentien aus der wässrigen Phase heraus erreichbar.

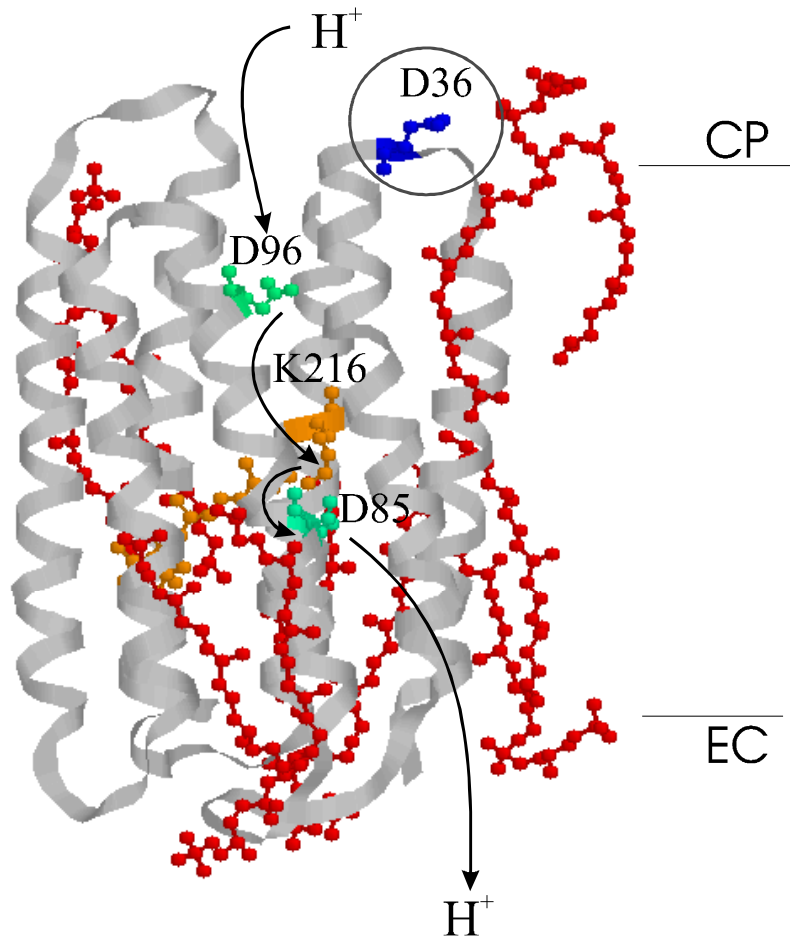


Abbildung 1.8: Strukturmodell von Bakteriorhodopsin. Alle Strukturdaten stammen aus Grigorieff et al., 1996. Gezeigt ist ein BR-Molekül in der Purpurmembran. Die extrazelluläre (EC) und die cytoplasmatische (CP) Membranoberfläche sind durch Linien angedeutet. Von den zehn Lipidmolekülen, die in der PM ein BR-Molekül umgeben, sind diejenigen dargestellt, die mit mindestens einer Kohlenwasserstoffkette in der Elektronendichteverteilung sichtbar sind. Der Übersichtlichkeit halber wurden alle Lipide als Phosphatidylglycerinphosphate gezeichnet. Die polaren Kopfgruppen sind jedoch aus der Elektronendichteverteilung nicht zuzuordnen. Die Pfeile deuten den Weg an, den ein Proton von der Schiffsbasis über D85 in den extrazellulären Raum, ein weiteres von D96 zur Schiffsbasis und ein drittes vom Cytoplasma zu D96 nimmt. Das in dem mutierten BR D36C an der Position von D36 sitzende Cystein ist der Ansatzpunkt für die in dieser Arbeit durchgeführten Rekonstitutionsexperimente.

1.6 Problemstellung

Liposomen werden seit über 30 Jahren als Modellsysteme für komplexe Zellmembranen eingesetzt (Bangham et al., 1965). Als künstliche Membranvesikel bringen sie Einblicke in verschiedene Aspekte der Zellphysiologie und können zur Aufklärung von Strukturen, Dynamiken und Funktionen biologischer Membranen beitragen. Mit ihnen können z.B. Permeabilitäts- und Fusionseigenschaften untersucht werden oder membrangebundene Enzyme näher charakterisiert werden. Weiterhin werden Liposomen auch im medizinischen und kosmetischen Bereich zum Transport von Arzneistoffen verwendet. Diese werden in die Vesikel eingeschlossen und unter definierten Voraussetzungen gezielt abgegeben (Gregoriadis, 1985, Hockertz, 1996, Sessa & Weissmann, 1970).

Bisher wurden zumeist gewöhnliche Phospholipide zur Liposomen- und Proteoliposomenpräparation sowie zu ihrer anschließenden Charakterisierung verwendet. In dieser Arbeit sollten zunächst Modellsysteme mit ungewöhnlichen Phospholipiden studiert werden. Dabei war die Phasenübergangstemperatur (T_m) ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl dieser untypischen Lipide und für die späteren Eigenschaften der Vesikel mit verantwortlich. Da Rekonstitutionen bei Temperaturen oberhalb von T_m durchgeführt werden (Woodle & Papahadjopoulos, 1989), waren Phospholipide mit einem physiologischen T_m erforderlich, um Proteine während des Rekonstitutionsvorganges nicht zu denaturieren. Somit mußten die Länge der Fettsäureketten, die Anzahl der ungesättigten Bindungen und die Art der Kopfgruppen berücksichtigt werden, da diese Parameter den T_m -Wert der Phospholipide bestimmen (Phillips & Chapman, 1968). Entsprechende Phospholipide wurden von Pisch *et al.* synthetisiert und standen für Rekonstitutionsstudien zur Verfügung (Pisch et al., 1997). Zunächst sollte versucht werden, mit den synthetischen Phospholipiden Liposomen zu präparieren, um anschließend ihre Eigenschaften bezüglich Teilchengröße, Homogenität der Präparationen und Detergenzstabilitäten zu definieren.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Proteoliposomenpräparation unter Verwendung synthetischer Lipide. Als Membranprotein wurde das bakterielle Photoreaktionszentrum gewählt. Dieses ist bereits umfangreich molekularbiologisch, photochemisch und biochemisch charakterisiert (Okamura & Feher, 1992), und seine dreidimensionale Struktur ist bekannt (Deisenhofer et al., 1985). Auch wurde das

Photoreaktionszentrum (RC) aus *Rhodobacter sphaeroides* schon mehrfach für die Rekonstitution in Liposomen angewendet (Crielaard et al., 1989, Crielaard et al., 1992b, Hara et al., 1997b, Hellingwerf, 1987, Rich & Heathcote, 1983).

Vor der Rekonstitution erwies sich die Isolierung und Reinigung des integralen Membranproteins als notwendig. Dabei sollen Detergenzien zur Proteinsolubilisierung verwendet werden. Erstmals standen dafür auch synthetische Zuckerester zur Verfügung, die lösungsvermittelnde Eigenschaften aufweisen (Cao et al., 1996). Diese Tenside müssen nach New bei einer anschließenden, erfolgreichen Liposomenpräparation wieder entfernt werden, weshalb die Suche nach einem geeigneten Verfahren erforderlich wurde (New, 1990). Nach einer allgemeinen Charakterisierung der Proteoliposomen sollen auch die spezifischen Lipid-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der schon von Oettmeier & Preuße beschriebenen Affinität der Q_B-Bindungsstelle des Reaktionszentrums zu PS-II-Herbiziden (Oettmeier & Preuße, 1987, Peters et al., 1997). Bisherige Untersuchungsergebnisse weisen aus, daß Herbizide an der Q_B-Bindungsstelle in der L-Untereinheit angreifen, das Chinon verdrängen und den Elektronentransport blockieren (Tietjen et al., 1993). Diese Eigenschaft wurde in der Vergangenheit bereits angewendet, um mit Reaktionszentren phototropher Bakterien Biosensoren zur PS-II-Herbizid-Detektion zu entwickeln (Jockers et al., 1993b, Jockers et al., 1993c, Jockers & Schmid, 1993, Schnieder, 1995). Mit diesen Systemen konnte jedoch die erforderliche Nachweisgrenze für Herbizide nicht erreicht werden.

Es wurde nun angenommen, daß eine der Ursachen für die geringe Empfindlichkeit der Formate in der Komplexität des Reaktionszentrums liegt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit das Membranprotein auf das für die Herbizidbindung verantwortliche Segment, die L-Untereinheit, reduziert werden, um die notwendige Sensitivität zu erhalten. Durch die Kopplung dieser Proteinuntereinheit mit einem Markerprotein sollte eine spätere Detektion der Herbizide ermöglicht werden. Als Markerprotein wurde die alkalische Phosphatase gewählt, da diese umfangreiche Detektionsmöglichkeiten bietet. Das neu konstruierte Fusionsprotein war in *E.coli* heterolog zu exprimieren, wodurch eine spätere Bereitstellung der biologischen Komponente erleichtert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmittel

ARK Scientific GmbH Biosystems, Dieburg

Sequenzierprimer für pUC-L-phoA

Bio-Rad, München

PVDF-Membran, TEMED, Acrylamid, TEMED, Acrylamid

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

DNase I, Schaf-anti-Maus-Peroxidase, Restriktionsenzyme und entsprechende Puffer, Alkalische Phosphatase (CIAP)

Difco Laboratories, Detroit, USA

Agar Agar, Hefeextrakt

Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

Dimethylformamid, N,N-Dimethyldoecylaminoxid (LDAO), n-Octyl- β -glucopyranosid, Triton X-100, Ubichinon-0, Ampicillin Na-Salz

GIBCO BRL, Eggenstein

DNA-Größenstandards 1 kb, Ethidiumbromid, Taq-Polymerase

Lipoid

DMPC, DPPC

Merck, Darmstadt

Coomassie Brilliant Blue, Kieselgel 60, reinst, 63-200 μ m Partikelgröße, Kieselgeldünnschichtchromatographieplatten 60 F₂₅₄

Oxoid Limited, Basingstoke, England

Pepton

Pharmacia, Freiburg

CNBr-aktivierte Sepharose 4B, Q-Sepharose, Sephadex G-50 medium, S-Sepharose, Gele für die native PAGE (8-25% Gradient), Pufferstreifen für SDS und native PAGE, Standards für die Gelelektrophorese: LMW, HMW, diverse Chromatographie-Leersäulen.

Pierce

Coomassie Protein Assay Reagent

Qiagen, Hilden

DNA Gel Extraction Kit, PCR Purification Kit, Midi Plasmid Kit, PrepSpin Plasmid Kit

Riedel de Haën, Hannover

Atrazin, Terbutylazin, Terbutryn

Roth GmbH, Karlsruhe

Dialysemembran Spectra Por MWCO: 6-8000

Sigma Chemie, München

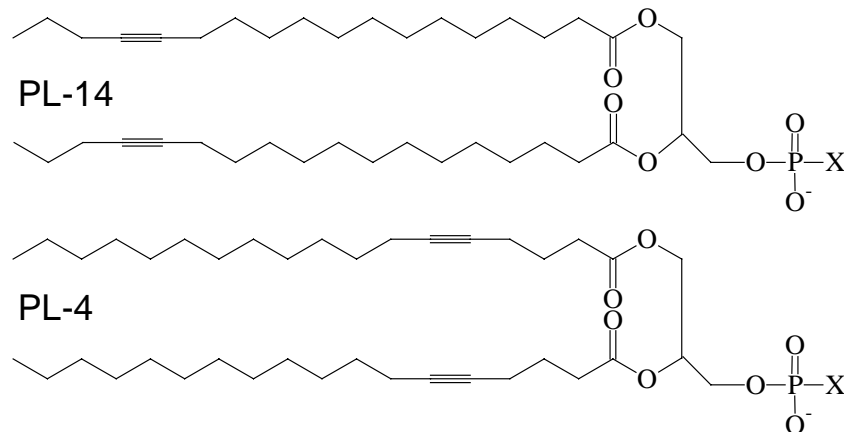
Cytochrom c vom Pferdeherz, DEAE-Sephacel, Dithiothreitol, PMSF, EDTA, SDS, Bromphenolblau, 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-Phosphat, IPTG

Mikrotiterplatten (Nunc F96 MaxisorpNunc-Immuno-Platten, 12 x 8 Kavitäten)

Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel wurden bei Sigma, Fluka, Boehringer Mannheim und Riedel de Haen bestellt.

2.1.2 Ungewöhnliche Phospholipide

Bereits gereinigte ungewöhnliche Phospholipide wurden von Frau Sandra Pisch am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, synthetisiert und in größerer Menge zur Verfügung gestellt. Folgende Phospholipide wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht:



Phospholipid [Abkürzung]	Kopfgruppen- name	Kopfgruppen- struktur	Menge [mg]	T _M [°C]
PC-14	Cholin	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$	200	23,2
PC-4			100	20,5 26,5
PE-14	Ethanolamin	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	80	39,0
PE-4			40	36,0
PS-14	Serin	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_3^+)(\text{COO}^-)$	180	32,6
PS-4			100	33,7
PG-14	Glycerol	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2(\text{OH})$	100	23,8
PG-4			100	31,8
PA-14	Säure	$\text{O}-\text{H}$	100	ca. 39,0
PA-4			80	44,6

2.1.3 Geräte

FPLC (Pharmacia): LKG-Pump P-500, Controller LCC-501 Plus, UV-Zelle LKB-UV-MII, Schreiber LKB-Rec 102, Mixer 24 V 50-60 Hz 5 MPA, Fraktionssammler LKB-Frac-200

ELISA: Titertek Microplate Washer M96 V, Titertek Microplate Stacker, Titertek Plus MS 212 ELISA Reader (ICN)

HPLC: Nucleosil 100 C18-Säule 5 µm, 250x4,6 mm, S2000 HPLC Controller, S1100 Solvent Delivery System, S8110 Low Pressure Gradient Mixer, S5110 Injector Valve Bracket, Linear UVis 200-Detektor (Sykam)

Hochleistungszentrifuge KR 22 i (Jouan)

Ultrazentrifuge mit Rotor TFT 70.38 (Beckmann)

Eppendorf Zentrifuge 5412 (Eppendorf)

Branson Sonifier 250 (Branson)

Ultra Turrax, Typ 18/10 Jahnke & Kunkel (IKA)

Centricon- und Minicon-Mikrokonzentratoren, 10000 MW-cut-off (Amicon)

Novacell-Ultrafiltrationsanlage (Filtron GmbH, Karlstein)

Phast-Anlage für Gelelektrophoresen (Pharmacia)

Pharmacia LKB Biochrom 4060 Photometer (Pharmacia)

Shimadzu UV-1200 UV-VIS Spektrophotometer (Shimadzu)

SDS-PAGE Controller Bio Rad Power PAC 300 (Biorad)

Rotationsverdampfer R-134 (Büchi)

Vakuumpumpe B-172 (Büchi)

Wasserbad B-480 (Büchi)

Minilipoprep (Dianorm)

Extruder (Avestin)

Dynamische Lichtstreuendetektoren Zetasizer 3 (Malvern Instruments GmbH) und DLS-7000 (Otsuka Electronics Co., Ltd., Japan)

Elektronenmikroskop (Zeiss)

Spectrofluorimeter (Shimadzu)

373A DNA-Sequencer (Applied Biosystems)

2.2 Proteinchemische, immunologische und analytische Methoden

2.2.1 Photoreaktionszentrum aus *Rhodobacter sphaeroides*

2.2.1.1 Kultivierung von *Rhodobacter sphaeroides*

2 ml einer Glycerinkultur von *Rhodobacter sphaeroides* (Wildtyp, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSM 158)) wurden in 200 ml des in Tabelle 2.1 aufgeführten Kulturmediums resuspendiert. Die Kultivierung nach Gray et al. erfolgte zunächst für 24 h bei 27-30 °C, 120 rpm, im Dunkeln, damit sich semianaerobe Bedingungen einstellen (Gray et al., 1990). Anschließend erfolgte die Lichtbestrahlung mit 4 x 75 W Pflanzenleuchten für weitere 24 h. Mit der Vorkultur wurden 1 l Erlenmeyerkolben 2 %ig angeimpft. Nach Erreichen anaerober Bedingungen durch Begasen der Kultur mit Stickstoff und einer vorgeschalteten Dunkelphase von ca. 12 h wurden die Schüttelkulturen wiederum mit 4 x 75 W + 2 x 100 W bestrahlt.

Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 rpm, 4°C, Rotor AK 500-11 geerntet, in 0,2 M Tris/HCl Puffer, pH 8, resuspendiert und bei -70 °C eingefroren.

2.2.1.2 Zellaufschluß

100 mg *Rhodobacter sphaeroides* Zellen wurden in 200 ml 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 (Puffer A) aufgenommen und mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Nach Zugabe von einer Spatelspitze Lysozym und 1 mg DNase erfolgte der enzymatische Zellaufschluß für 45 min im Dunkeln unter Rühren. Anschließend wurde die Suspension mit Ultraschall (Branson Sonifier 250, Stufe 9, 50 % diskontinuierlich) für 60 min auf Eis behandelt, und die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10.000 rpm, 30 min) abgetrennt. Der Überstand wurde bei 200.000 x g (45.000 rpm, TFT 70.38 Rotor) für 2 Stunden bei 4 °C zentrifugiert und das chromatophorenhaltende Pellet in Puffer A homogenisiert (Ultra-Turrax) (Gray et al., 1990).

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung von *Rhodobacter sphaeroides*.

Spurenelementlösung	ZnSO ₄ (7H ₂ O)	10,95 g
	EDTA Na ₂ (2H ₂ O)	2,77 g
	FeSO ₄ (7H ₂ O)	5,0 g
	MnSO ₄ (H ₂ O)	1,08 g
	CuSO ₄ (5H ₂ O)	392 mg
	CoCl ₂ (6H ₂ O)	174 mg
	H ₃ BO ₃	114 mg
Lösung C	Nitrilo-Tri-essigsäure	10,0 g
	MgSO ₃ (7H ₂ O)	29,5 g
	CaCl ₂ (2H ₂ O)	3,3 g
	FeSO ₄ (7H ₂ O)	10 mg
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	9 mg
	Spurenelementlösung	50 ml
		ad 1 Liter mit H ₂ O
Kulturmedium	K-Phosphat	20 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
	Acetat oder Succinat	2,0 g
	Lösung C	20 ml
	NaCl	0,5 g
	Hefeextrakt	2,0 g
		ad 1 Liter mit H ₂ O pH auf 6,8 einstellen

2.2.1.3 Fraktionierte Extraktion

LDAO-Extraktion (Gray et al., 1990):

Die Chromatophorensuspension wurde auf eine OD₈₅₀ = 50 eingestellt. Für die erste LDAO-Extraktion des Reaktionszentrums aus der Chromatophorenmembran wurden 50 mM NaCl, 0,5 mM PMSF (Stocklösung 100 mM in Methanol) und 0,08 % bzw. 0,25 % LDAO zugegeben und 45 min im Dunkeln bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Extrakt 2 h bei 200.000 x g (TFT 70.38 Rotor) und 4 °C ultrazentrifugiert und

das Pellet in 200 ml Puffer A homogenisiert. Für die zweite LDAO-Extraktion wurden 50 mM NaCl und 0,08 % bzw. 0,25% LDAO zum homogenisierten Pellet zugegeben und nochmals 45 min im Dunkeln gerührt sowie ultrazentrifugiert. Der Überstand, welcher die isolierten Proteine enthielt, wurde für die Ionenaustauschchromatographie verwendet.

Extraktion mit synthetischen Zuckerestern:

Anstelle des Detergenzes LDAO wurden synthetische Zuckerester (Cao et al., 1997) zur Extraktion des Photoreaktionszentrums verwendet.

Nach mechanischem und enzymatischem Zellaufschluß sowie Chromatophorenisolation durch Ultrazentrifugation erfolgte die Extraktion des Membranproteins mit den synthetischen Zuckerestern 6-*O*-Octanoyl- β -D-glucose und 6-*O*-Octanoyl- β -D-mannose. Hierzu wurde die Chromatophorenlösung mit 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,5 mM PMSF bis zu einer $OD_{850} = 50$ verdünnt und bei Raumtemperatur mit 8 mg/ml des Zuckeresters für 1 h unter Schütteln inkubiert. Nach einer Ultrazentrifugation (2 h, 200.000 x g) erfolgte ein weiterer Extraktions- und Zentrifugationsschritt.

2.2.1.4 Reinigung des Photoreaktionszentrums

Die Reinigung des Photoreaktionszentrums wurde mittels FPLC-Technik (fast-protein-liquid-chromatography) bei 4 °C im Dunkeln durchgeführt. Für die chromatographische Trennung wurde eine Säulenkombination aus S-Sepharose und nachgeschalteter Q-Sepharose (je 125 ml, 30 x 2 cm) verwendet. Nach der Äquilibration mit 5 Säulenvolumen Puffer A wurde der proteinhaltige Extrakt der zweiten LDAO-Extraktion (175 ml) mit 4 ml/min auf die S-Sepharose aufgetragen. Nach der Probenbeladung wurde mit ca. 2 Säulenvolumen Puffer A + 50 mM NaCl + 0,08 % LDAO gewaschen. Sobald die gesamte vorgereinigte RC-Menge auf der Q-Sepharose gebunden hatte, wurde die S-Sepharose abgekoppelt und die Q-Sepharose mit einem linear steigenden Salzgradienten über 1,9 Liter von Puffer A + 50 mM NaCl + 0,08 % LDAO zu Puffer A + 1 M NaCl + 0,08 % LDAO gewaschen. Die Elution der RC-Fractionen wurde über einen UV-Detektor verfolgt und die reaktionszentrenhaltigen Fractionen durch Aufnahme der Absorptionsspektren (200-900 nm) identifiziert. Die Reinheit der Reaktionszentren wurde durch den Quotienten OD_{280}/OD_{803} bestimmt. Fractionen, die RC enthielten,

wurden gepoolt, über Nacht gegen Puffer A + 0,08 % LDAO bei 4 °C im Dunkeln dialysiert und bei -70 °C gelagert.

2.2.2 Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium*

2.2.2.1 Kultivierung von *Halobacterium salinarium*

Die Anzucht von Halobakterien und die Isolation von Purpurmembran erfolgte nach etablierten Protokollen (Oesterhelt & Krippahl, 1983, Oesterhelt & Stoeckenius, 1971, Oesterhelt & Stoeckenius, 1974). Halobakterien wurden aerob in Flüssigkultur bei 42 °C vermehrt. Das Kulturmedium bestand aus 4,3 M NaCl, 81 mM MgSO₄, 27 mM KCl, 10 mM Natriumcitrat und 1 % (w/v) Pepton (Oxoid). Der pH-Wert wurde mit 4 M NaOH auf 7 eingestellt. Von einer Agarplatte oder mit 0,5 ml Flüssigkultur wurden 35 ml Kulturmedium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und fünf Tage auf einem Rotationsschüttler mit 100 Upm bewegt. Mit dieser Kultur wurden 700 ml Kulturmedium in einem 2 l Erlenmeyerkolben angeimpft und fünf Tage bei 100 Upm bewegt. Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Kultur bei 9000 x g zentrifugiert.

2.2.2.2 Isolierung und Reinigung des Bakteriorhodopsins

Das Pellet wurde in 150 ml Basalsalz (Kulturmedium ohne Pepton) unter Zusatz einer Spatelspitze DNaseI resuspendiert. Nach Dialyse gegen 10 l Wasser (bei D36C 2-Mercaptoethanol 5 mM) bei 4 °C über Nacht wurde 10 min bei 9000 g, anschließend der Überstand 1 h bei 42000 x g ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde in Wasser (D36C: 2-Mercaptoethanol 5 mM) resuspendiert, gepottert und auf einen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen (kontinuierlicher Gradient 25 % bis 45 % (w/w), 50 bis 100 OD/ml auf einen Gradienten, bei D36C 2-Mercaptoethanol 5 mM). Nach Zentrifugation (14 h, 9 °C, Kontron, TFT 70.38-Rotor, 23000 rpm, 70.000g) wurde die intensiv gefärbte Purpurmembran (Schwimmdichte um 1,18 gml⁻¹) abgenommen und dreimal mit Wasser (D36C: 2-Mercaptoethanol 5 mM) gewaschen (jeweils Zentrifugation 1 h bei 40000 rpm, Kontron TFT 70.38-Rotor, 150000 g, Resuspension, Potttern).

Die Lagerung der Purpurmembran erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. PM D36C wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Zusatz eines mindestens fünfzigfachen molaren Überschusses (bezüglich Bakteriorhodopsin) 2-Mercaptoethanol gelagert.

2.2.3 Detergenzaustausch

Photoreaktionszentrum:

Der Detergenzaustausch von in 0.08 %igem LDAO solubilisierten Reaktionszentren gegen *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid (OGP) erfolgte mit Centricon- und Minicon-Mikrokonzentratoren sowie durch Ultrafiltration.

Centricon-Mikrokonzentratoren:

Die Reaktionszentren wurden mit einem Centricon-Mikrokonzentrator (10000 MW-cutoff, Fa. Amicon GmbH, Witten) in einer Heraeus-Zentrifuge bei 5000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ konzentriert. Das restliche Konzentrat von 100 bis 200 μl wurde mit 1 ml 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8.0, der eine entsprechende Konzentration an OGP enthielt, konzentriert. Nach dreimaligem Wiederholen des Vorganges war LDAO nahezu vollständig gegen OGP ausgetauscht.

Minicon-Mikrokonzentrator

Die Reaktionszentren wurden in einer Minicon-Mikrokonzentrator Zelle B15 (15000 MW cutoff, Fa. Amicon GmbH, Witten) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis auf etwa 100 bis 200 μl konzentriert. Nach Zugabe von 5 ml 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, mit 20 mM OGP erfolgte eine weitere Konzentration. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt, bis LDAO nahezu vollständig gegen OGP ausgetauscht war.

Ultrafiltration

In 0,08 % LDAO solubilisierte Reaktionszentren wurden in einem Ultrafiltrationsgefäß (30000 MW-cutoff, Novacell-Ultrafiltrator, Filtron GmbH, Karlstein) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln unter Stickstoff (1 bar) bis auf wenige 100 bis 200 μl eingengt. Dann wurde sechsmal mit je 10 ml 20 mM Tris-Puffer pH 8,0, 1 % OGP gewaschen und jedesmal wieder bis auf wenige μl konzentriert. Die letzten 2 ml Rückstand wurden in ein Eppendorf-Hütchen überführt und nach Schockgefrieren bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Tiefkühlschrank gelagert.

Bakteriorhodopsin:

Der Detergenzaustausch von in Triton X-100 solubilisiertem Bakteriorhodopsin Wildtyp (BR WT) und der Bakteriorhodopsin Mutante D36C erfolgte durch Chromatographie an DEAE Sephacel. Dazu wurde eine DEAE Sephacel-Säule zunächst mit 1% Triton X-100 in 10 mM NaPO₄-Puffer, pH 5,6 äquilibriert und mit 1 ml BR WT bzw. D36C beladen. Nach dem Waschen der Chromatographiesäule mit 75 ml 10 mM NaPO₄-Puffer, pH 5,6, dem 0,5 % OGP zugesetzt war, erfolgte die Elution des Bakteriorhodopsins mit 25 ml 500 mM NaPO₄-Puffer, pH 5,6, 0,5% OGP.

2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-Elektrophorese (SDS: Natriumdodecylsulfat) können auf einfache Art die Molekulargewichte von Makromolekülen bestimmt werden. Die Methode wurde von Shapiro *et. al.* eingeführt und basiert auf dem Prinzip der Molekularsiebung (Shapiro *et al.*, 1967). Durch die Beladung mit dem anionischen Detergenz SDS werden die Eigenladungen von Proteinen so überdeckt, daß Anionen mit konstanter Nettoladung entstehen. Zudem werden die unterschiedlichen Molekular-Formen ausgeglichen, indem die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst werden. Die Schwefelbrückenbindungen werden durch die Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung (β -Mercaptoethanol) aufgespalten. Bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen den relativen Wanderungstrecken der SDS-Protein-Mizellen und dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte.

Im Gegensatz zu nativen Elektrophoresen, bei denen die Konformation und die biologische Aktivität der Proteine intakt bleiben (NATIVE PAGE), ist die SDS-Elektrophorese aufgrund der stark geladenen SDS-Protein-Mizellen erheblich schneller. Die SDS-Elektrophorese stellt somit eine Standardmethode zur Reinheitskontrolle für Protein- und Enzym-Isolierungen dar.

Pharmacia Phast System

Es wurden lineare Gradientengele mit einem Gehalt an Acrylamid von 8-25 % und 0,45 mm Geldicke, SDS-Pufferstreifen und Probenkämme 8/1, oder 8/0,5 entsprechend der

Vorschrift No.110 (Phast-Gele; Phast System Separation Technique File, Pharmacia) verwendet. Die Elektrophorese der Gradientengele wurde nach 67 Vh beendet.

2 μ l der zu analysierenden Proteinprobe wurden zunächst mit 8 μ l SDS-Puffer, der als Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol enthielt, versetzt und anschließend für 5 min bei 95 °C inkubiert. Mit Hilfe der Probenkämme wurden jeweils 1 μ l Probe auf die Gele aufgetragen. Als Proteinstandard diente ein Gemisch verschiedener Proteine definierter Größe (Lysozym 14,4 kDa, Trypsin-Inhibitor-Sojabohnen 21,5 kDa, Carboanhydrase 31 kDa, Ovalbumin 45 kDa, Rinderserumalbumin 66,2 kDa, Phosphorylase b 97,4 kDa). Die Färbung der Proteinbanden erfolgte mittels Silberfärbung (Butcher & Tomkins, 1985), wobei die Nachweisgrenze bei 0,3 bis 0,5 ng Protein pro Bande lag.

12,5 %iges SDS-Gel

Gelelektrophoresen mit 12,5 %igen SDS-Gelen wurden nach der Methode von Lämmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Trenn- und Sammelgellösungen wurden entsprechend der in Tabelle 2.2 angeführten Lösungen angesetzt. Durch Zugabe von je 4 μ l TEMED erfolgte die Polymerisation der Gele für jeweils 30 Minuten zwischen zwei Glasplatten. Eine scharfe obere Kante des Trenngels wurde durch Überschichten der Trenngellösung mit Isopropanol erhalten.

Tabelle 2.2: Lösungen zur Durchführung der SDS-PAGE

Trenngel	2,0 ml 4 x Lower Tris (1,5 M Tris/HCl, 4 % (m/v) SDS pH 8,0), 3,33 ml Acrylamid (30 % (m/v)), 2,67 ml H ₂ O, 40 μ l 10 % (m/v) APS
Sammelgel	1,0 ml 4 x Upper Tris (0,5 M Tris/HCl, 4 % (m/v) SDS pH 6,8), 0,52 ml Acrylamid (30 % (m/v)), 2,47 ml H ₂ O, 40 μ l 10 % (m/v) APS
SDS-Probenpuffer	20 % (v/v) Glycin, 10 % (v/v) 2-Mercapthoethanol, 6 % (m/v) SDS, 0,0025 % (m/v) Bromphenolblau in 1 x Upper Tris
Elektrodenpuffer	25 mM Tris/HCl, 0,192 M Glycin, 0,1 % (m/v) SDS pH 8,4

Die Proteinproben (mit einem Gesamtproteingehalt von 10-20 μ g) wurden 1:1 mit SDS-Probenpuffer vermischt, 5 min zur Denaturierung der Proteine auf 95 °C erhitzt und neben dem Proteinstandard (s. Pharmacia Phast System) auf das Sammelgel aufgetragen.

Nach einer 60-90 minütigen Elektrophorese bei 25 mA konnten die Proteine mit Coomassie Blue-Lösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250, 10 % Essigsäure, 30 % Methanol) angefärbt werden.

2.2.5 Immunoblot

Der Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose wurde in Anlehnung an Anderson (1984) mit einer SemiDry-Blot Apparatur (Bio-Rad) durchgeführt. Dazu wurde sowohl das Gel nach abgeschlossener SDS-PAGE in Towbin-Transfer-Puffer (20% Methanol, 192 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl pH 8,3) äquilibriert (15 min) als auch die auf Gelgröße geschnittene Nitrozellulose (30 min). Nach Tränken von 4 zusätzlich notwendigen Filterpapieren im o.g. Puffer erfolgte der Aufbau des Blots. Auf dem als Plus-Elektrode dienenden Boden der Apparatur wurden zunächst 2 Filterpapiere blasenfrei aufgelegt. Anschließend folgte die Nitrozellulose, dann das Gel. Abgeschlossen wurde der Blot durch die übrigen 2 Filterpapiere, bevor die Apparatur durch den als Minus-Elektrode fungierenden Deckel geschlossen wurde. Der Transfer der durch das gebundene SDS negativ geladenen Proteine in Richtung Pluspol auf die Membran erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 15 V für 30 min.

Für Immunofärbungen wurde der Blot zunächst 30 min in mit 1 % (m/v) BSA versetzten TS-Puffer (0,85 % (m/v) NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5) zur Absättigung unspezifischer Bindungen inkubiert. Die Reaktion mit dem in TS-Puffer entsprechend verdünnten, durch Immunisierung von Kaninchen erhaltenen Antiserum erfolgte über Nacht bei 4 °C. Zweimaliges Waschen mit TS für 10 min folgten. Anschließend wurde mit einem Schaf-anti-Maus-IgG-Antikörper, an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase (POD) gekoppelt war, für eine Stunde bei RT inkubiert (0,5 U/ml Lösung). Nach dreimaligem Spülen der Membran für 10 min mit TS-Puffer wurden die mit dem spezifischen Antiserum reagierenden Proteine durch Einlegen der Membran in Färbelösung (5,6 mM 4-Chlor-1-Naphthol (in wenig Methanol gelöst) in 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl) unter Bildung eines blauschwarzen Produkts sichtbar gemacht.

2.2.6 Phosphorbestimmung

Um den Phospholipidgehalt in Liposomen zu quantifizieren, wurde die Phosphorkonzentration nach einer modifizierten Methode von Barlett ermittelt (Barlett, 1959).

Hierzu wurden Aliquots der Liposomenprobe (0-1ml) in ein Reagenzglas überführt. Für die Kalibrierkurve wurden je 0, 10, 30, 50, 75, 100, 125, 150 μl Phosphorstandard verwendet. Nach Zugabe von 0,3 ml 5 M H_2SO_4 wurden die Proben für 3 h bei 160 °C erhitzt, wieder abgekühlt, mit 100 μl H_2O_2 versetzt und erneut für mindestens 3 h bei 160 °C erhitzt. Anschließend wurde 2,3 ml Ammoniummolybdatlösung und 0,1 ml Fiske-SubbaRow-Reagenz hinzugegeben, gevortext und für 7 Minuten in kochendes Wasser gehalten. Innerhalb von 60 Minuten wurde die Absorption bei 830 nm gemessen.

2.2.7 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Dünnschichtchromatographie wurden kieselgelbeschichtete Alufolien, 40 x 80 mm, Schichtdicke 0,2 mm, der Firma *Merck*, Darmstadt, Art. 1.05554, Kieselgel 60 F₂₅₄ verwendet. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus Essigsäureethylester:Methanol:H₂O 80:20:5 (v/v/v) verwendet. Die Färbung mit Vanillin/H₂SO₄ (0,5 g Vanillin in 20 ml Methanol und 80 ml H₂SO₄ gelöst und auf 120 °C erhitzt) erfolgte durch Besprühen der entwickelten und getrockneten Kieselgelplatten. Nach kurzem Erhitzen mit einem Heißluftfön wurden gesättigte und ungesättigte Lipide sichtbar.

2.2.8 HPLC Analytik

Phospholipide aus der Liposomenpräparation wurden mittels HPLC-Analyse auf einer Nucleosil 100 Si Säule untersucht. Dazu wurden Lipidproben aus dem Reaktionsgemisch entnommen, mit Chloroform:Methanol (2:1) extrahiert und mit Natriumhydrogencarbonat sowie Wasser gewaschen. Die mobile Phase bestand aus dem Gemisch Isopropanol:n-Hexan:Wasser (8:6:5, v/v/v).

Für die Analytik von 6-*O*-Octanoyl- β -D-glucose wurde das HPLC-System mit einer Nucleosil 120-5C₁₈ Säule ausgestattet. Die mobile Phase setzte sich aus Methanol:Acetonitril: Wasser (50:30:20) zusammen.

Die Trennung der einzelnen Reaktionspartner erfolgte jeweils bei einer Flußrate von 1 ml/min und einer Temperatur von 40 °C. Nachgewiesen wurden die Komponenten im Lichtstreuendetektor bei 2,5 bar.

2.2.9 Elektronenmikroskopie an Liposomen

Zur Überprüfung der Liposomenpräparation und um einen schnellen Überblick über die Größenverteilung und die Uni- oder Multilamellarität der Vesikel zu bekommen, wurde eine Negativkontrastierung mit Uranylacetat vorgenommen.

Dazu wurden 5 μ l einer Proteoliposomenprobe auf ein mit Pioloform beschichtetes Kupfernetzchen (Grid) pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde der Tropfen mit Hilfe eines Filterpapiers abgezogen. Schließlich wurde das Grid auf einen Tropfen 4 %igen Uranylacetats gelegt, 2 min inkubiert mit einem Filterpapier von der überschüssigen Flüssigkeit befreit und im Elektronenmikroskop (EM) betrachtet. Aufnahmen bei 20000-140000 facher Vergrößerung wurden angefertigt.

2.2.10 Gelfiltration

In dieser Chromatographiemethode werden Moleküle mittels Gelen, die eine kontrollierte Porengröße besitzen, nach ihrer unterschiedlichen Größe getrennt.

Die Poren der Gelmatrix, welche mit der flüssigen Phase gefüllt sind, sind vergleichbar mit der Größe der Moleküle, die getrennt werden sollen. Kleine Moleküle diffundieren leicht aus der umgebenden Flüssigkeit in die Poren, während dies für größere Moleküle aufgrund von Diffusionseinschränkungen nicht im gleichen Maße möglich ist. Bei sehr großen Molekülen liegt schließlich überhaupt keine Diffusion in das Gel vor, so daß sie in der matrixumgebenden Lösung bleiben.

In Gelfiltrationssäulen bilden kugelförmige Gelpartikel das Trennbett, durch das ein Elutionspuffer fließen kann. Die zu trennende Probe wird als Zone oben auf die Matrix

aufgegeben. Während der Elution wandert diese Probenzone nach unten, wobei die Elution kleinerer Moleküle, die in die Poren diffundieren können, verzögert wird und große Moleküle, die nicht in das Gel diffundieren, kontinuierlich mit dem Eluenten durch die Chromatographiesäule fließen.

2.2.10.1 Trennung von Proteoliposomen und nicht rekonstituiertem Protein

Die Gelfiltration wurde mit verschiedenen Gelfiltrationsmatrizes (Superose 6, Sephacryl 200 HR, Sepharose 4B, Superdex-200) durchgeführt, um eine Trennung von Proteoliposomen und nicht rekonstituiertem Photoreaktionszentrum zu erreichen.

2.2.10.2 Trennung von Calcein-Liposomen und freiem Calcein

Liposomen mit dem eingeschlossenem Fluoreszenzmarker Calcein wurden mittels Chromatographie an Sephacryl S300 von freiem Farbstoff getrennt. Dazu wurde die Sephacryl S300 (Pharmacia) Säule (2 x 40 cm) mit einem 10 mM HEPES-Puffer + 150 mM NaCl + 0,1 mM EDTA, pH 7,5, äquilibriert. 2 ml der frisch präparierten Liposomenlösung wurde auf die Säule aufgegeben. Die anschließende Elution der Calcein-Liposomen und des freien Fluoreszenzmarkers erfolgte durch Waschen der Säule mit 10 mM HEPES-Puffer (Flußrate: 0,5 ml/min). Die Elution wurde sowohl visuell als auch spektrophotometrisch bei 280 nm verfolgt.

2.2.10.3 Reinigung von reduziertem Cytochrom c

Zur Durchführung der Gelfiltration (bei 4°C) wurde eine Sephadex G-50 (Pharmacia) Säule (1,5 x 15 cm) mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,2 äquilibriert. Es wurden 5 ml einer Lösung aus 0,1 g Cytochrom c und 0,1 g Natrium-Dithionit in 10 mM Tris/HCl, pH 8,2 auf die Säule aufgetragen. Die anschließende Elution des reduzierten Cytochrom c erfolgte durch Waschen der Säule mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,2 (Flußrate: 0,5 ml/min). Der Reduktionszustand von den Cytochrom c enthaltenen Fraktionen wurde durch Messung der Extinktion bei 550 nm überprüft.

2.2.11 Cytochrom c Assay zur Aktivitätsbestimmung von RC

Von Oettmeier et al. wurde ein Turn-over Assay zur Bestimmung der Inhibitor-konstanten von PS-II-Herbiziden in isolierten Reaktionszentren beschrieben (Oettmeier & Preuße, 1987). Dieser Assay sollte in abgewandelter Form angewendet werden, um die photochemische Aktivität des Photoreaktionszentrums zu bestimmen. Dabei wird die Oxidation von reduziertem Cytochrom c durch das Reaktionszentrum anhand der Absorptionsänderung des Cytochroms bei 550 nm verfolgt. Hierzu mußte in einem Winkel von 90° zur Absorptionsmesslichtachse die photosynthetische Reaktion durch Querbelichtung bei > 600 nm angeregt werden. Dazu diente eine Pflanzenleuchte, die über einem Photometer mit offenem Küvettenhalter angebracht wurde. Neben Cytochrom c und Reaktionszentren ist noch die Anwesenheit eines Elektronenakzeptors notwendig. Bei Ottmeier et al. übernimmt Ubichinon-6 standardmäßig diese Rolle. Hier wurde das von Jockers untersuchte photosynthetisch aktive Ubichinon-0 eingesetzt (Jockers, 1992).

Cytochrom c (10 mg/ml) in H₂O wurde durch Natrium-Dithionit (0,1 mg/ml) reduziert. Es mußte darauf geachtet werden, daß die rote Lösung nicht ins Hellrote umschlägt, da sonst ein Überschuß an Natrium-Dithionit vorliegt und eine Querbelichtung des reduzierten Cytochroms unmöglich wird. Die Oxidation des reduzierten Cytochrom c durch das Photoreaktionszentrum wurde durch die Absorptionsänderung bei 550 nm mit einem Spektralphotometer mit einem offenen Küvettenraum (Pharmacia) verfolgt. Um Oxidation des Cytochroms durch Luftsauerstoff auszuschließen, wurde die Küvette kurz vor Meßbeginn mit Stickstoff begast.

1 ml 50 mM Tris, pH 7,2 enthielt 10-20 µM Ubichinon (Coenzym Q₀ in 10 µl Ethanol), 7,2-15 nM RC und 16-32 µM Cytochrom c_{red}. Die Reduktion des Cytochrom c erfolgte durch Zugabe von 10-20 µl einer Natrium-Dithionit-Lösung (1 mg/ml). Die Oxidation des Cytochrom c durch das Photoreaktionszentrum wurde über eine Dauer von 20-45 Minuten verfolgt.

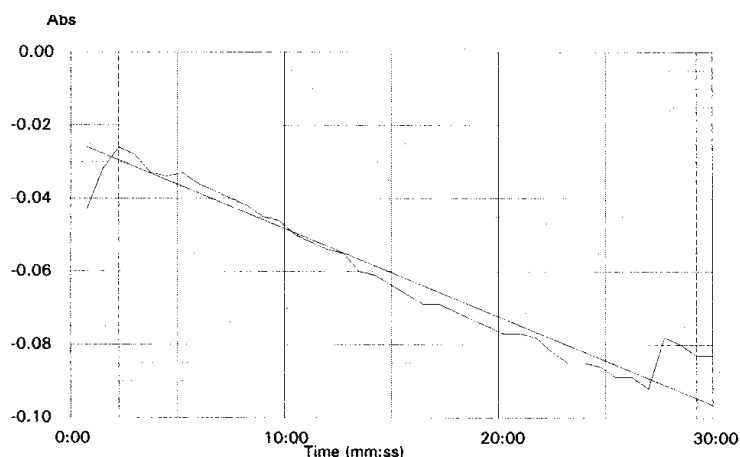


Abbildung 2.1: Beispiel einer Cytochrom c Reduktion durch das Photoreaktionszentrum mit 16 μM Cytochrom c, 10 μM Ubichinon, 10 μl Natrium-Dithionit (1 mg/ml) und 53 nM RC.

2.2.12 Cytochrom c Assay zur Bestimmung der RC-Orientierung

Die Orientierung der rekonstituierten Reaktionszentren wurde mit einem Cytochrom c Assay untersucht. Dazu wurde mit einem UV/VIS Spektrophotometer (UV-160/VIS Shimadzu Co. Ltd., Japan) ein Referenzspektrum von RC-Liposomen gemessen.

In die Meß- und Referenzküvette wurden jeweils 600 μl Proteoliposomen (mit 1,3 μM RC), 20 μl einer 500 μM Cytochrom c Stocklösung und 5 μl einer 100 mM Ubichinon-0 Stammlösung gegeben. Anschließend wurde die Meßküvette mit einem 50 W Halogenlicht über eine Glasfaser (Luminar ace, Hayashi Tokei Co. Ltd.) bestrahlt. Dabei wurde das Bestrahlungsspektrum mit einem Infrarotfilter (Fuji Film Co. Ltd. SC 60 Filter, cut-off Wellenlänge von 600 nm) vor der Meßprobe gefiltert

Nach Aktivierung der Reaktionszentren für 30 sec wurde ein Absorptionsspektrum von 600 - 500 nm aufgenommen. Schließlich wurden die Liposomen mit 30 μl einer 3 %igen (w/v) Triton X-100 Lösung zerstört und erneut das Wellenlängenspektrum gemessen. Aus der Differenz der beiden Spektren konnte die RC-Orientierung in den Proteoliposomen berechnet werden.

2.2.13 ELISA zur Bestimmung der RC-Orientierung in Liposomen

Immunoassays, bei denen einer der Immunreaktionspartner (Antikörper oder Antigen) auf einer festen Oberfläche immobilisiert sind, werden ELISA genannt. Als feste Substrate werden in der Regel Mikrotiterplatten aus Polystyrol verwendet. Einen Überblick über die gebräuchlichsten ELISA-Formate und deren Unterteilung in kompetitive und nicht kompetitive sowie direkte und indirekte Formen geben Marco et al. (Marco et al., 1995).

Zur Bestimmung der RC-Orientierung wird ein nicht kompetitiver Sandwich-ELISA durchgeführt. Dazu wird der Analyt, in diesem Fall die RC-Liposomen, auf der Festphase immobilisiert und mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Im Anschluß daran wird der gebundene Antikörper mit einem Überschuß eines zweiten spezifischen Antikörpers, der mit einem Enzym markiert ist, nachgewiesen. Durch Messung der Enzymaktivität kann die Konzentration des ersten Antikörpers bestimmt werden, wobei eine geringe Enzymaktivität einer geringen Antikörperkonzentration entspricht.

Durchführung:

1. Immobilisierung

100 µl RC-Proteoliposomen (in 20 mM Tris/HCl, pH 8,0) wurden für 12-16 h bei 4 °C auf Mikrotiterplatten "CovaLink[®] NH" der Fa. Nunc (Dänemark) immobilisiert. Die Aminogruppen der CovaLink-Platten ermöglichen die Kopplung von Proteinen oder Haptenen über ihre funktionellen Gruppen. Danach wurde dreimal mit Waschpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0) gewaschen.

2. Absättigen

Die Absättigung freier Bindungsplätze mit 200 µl einer 0,5 %igen BSA-Lösung (in 20 mM Tris/HCl, pH 8,0) je Kavität erforderte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Platten wurden danach dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

3. Immunreaktion

Für die erste Immunreaktion wurden 100 µl der Anti-RC-Antikörperseren (verdünnt in 20 mM Tris/HCl, pH 8,0) pro Kavität hinzugegeben und für eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Nichtgebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt.

4. Immunreaktion mit sekundärem Antikörper

Pro Kavität wurden 100 µl RAM-POD (1:4000 in 20 mM Tris/HCl, pH 8.0) hinzupipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Abtrennung von überschüssigem Antikörper erfolgte durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer.

5. Enzymreaktion

100 µl Substratlösung (400 µl Tetramethylbenzidin (6 mg TMB in 1 ml DMSO lösen) + 100 µl 1 % (v/v) H₂O₂ auf 25 ml mit Substratpuffer auffüllen) wurde zugegeben. Der Substratpuffer bestand dabei aus 100 mM Na-Acetat, der mit 1 M Zitronensäure auf pH 5,5 eingestellt wurde. Nach 2 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 N H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion des entstandenen Diimin-Derivates im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

2.2.14 Immobilisierung einer Lipase auf aktiviertem Silicagel

Die Immobilisierung einer Lipase auf aktiviertem Silicagel wurde nach einer modifizierten Methode von Weetal durchgeführt (Weetal, 1976).

Zu 250 ml *p*-Aminopropyl-triethoxysilan in Aceton (1 % v/v) wurde 10 g Silicagel (80-800 mesh) gegeben. Das Aceton wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und die Mischung für 12-14 h auf 110 °C erhitzt. 4 g des so aktivierten Silicagels wurden mit 40 ml 2,5 %igem Glutaraldehyd vermischt und bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt. Nach Waschen mit Wasser wurden 40 ml einer 1 %igen (w/v) BSL- oder OF-Lipaselösung (in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,0) zugegeben und weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die immobilisierte Lipase wurde filtriert und mehrmals mit destilliertem Wasser und 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 gewaschen. Das unter Vakuum getrocknete immobilisierte Enzym wurde für das Screening nach einer geeigneten Lipase und für die Liposomenpräparation verwendet.

Zur Immobilisierung der Lipase auf den Anionenaustauschern Q-Sepharose oder Octylsepharose wurde das Gel zunächst abwechselnd mit 0,5 M NaOH, destilliertem

Wasser, 0,5 M HCl und 0,5 M NaOH gewaschen. Schließlich wurde die Matrix mit destilliertem Wasser neutralisiert und mit 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 äquilibriert.

Zu 10 ml einer OF-Lipaselösung (1 % w/w) wurde 1 g des Anionenaustauschers gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gemischt. Die immobilisierte Lipase wurde filtriert, mit 50 mM Phosphatpuffer gewaschen und bei 4 °C gelagert.

2.3 Liposomenpräparationen

2.3.1 Detergenz-Dialyse-Methode

Mit der Detergenz-Dialyse-Methode können große unilamellare Vesikel (LUV) erzeugt werden. Dazu wurden zunächst 5 mg (1,2)-Diacyl-phosphatidylcholin in einem 25 ml Spitzkolben in 10 ml Chloroform gelöst. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei 340 mbar und 40 °C am Rotationsverdampfer langsam abgezogen. Dabei wurde an der Wandung des Spitzkolbens ein dünner Lipidfilm erzeugt, der anschließend im Hochvakuum getrocknet wurde. Ein 20facher Überschuß an *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid (OGP), bezogen auf die molare Menge an Phospholipid, und 1,5 ml 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 wurde zugegeben. Die sich bildende Detergenz-Lipid-Mizell-Suspension löste sich in einem Wasserbad oberhalb der Hauptumwandlungstemperatur T_m .

Anschließend fand die Dialyse im Dialyseschlauch (Spectra/Por, Cellulose, Ausschlußvolumen: MW12000-14000) oder in der Dialysekammer „Mini-Lipoprep“ (Fa. Dianorm, München, Dialysemembran mit Ausschlußvolumen: MW 10000) statt. Die Dialyse erfolgte für 48 h gegen das 1000fache Volumen Puffer (20 mM Tris, pH 8,0) bei einer Temperatur von 4 °C.

Zur Herstellung der Liposomen fanden sämtliche ungewöhnliche Phospholipide (vgl. Kap.2.1.2) Verwendung. Um homogene Vesikel zu erhalten, wurden die Proben nach der Dialyse durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 200 nm extrudiert.

2.3.2 Detergenz-Dialyse-Methode mit synthetischen Zuckerestern

Für diese Liposomenpräparation wurden die synthetischen Zuckerester 6-*O*-Octanoyl- β -Glucose und 6-*O*-Octanoyl- β -Mannose verwendet (s. Abbildung 2.2). Die Lipase-katalysierte Synthese dieser Zuckerester wird von Cao beschrieben (Cao et al., 1996; Cao et al., 1997; Cao et al., 1998a; Cao et al., 1998b).

Die Herstellung der Liposomen erfolgte analog der Detergenz-Dialyse-Methode unter Verwendung der Mini-Lipoprep (vgl. Kap. 2.3.1). Dazu wurden die Phospholipide mit 8 mg/ml Zuckerester in 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 solubilisiert und für 24-48 h gegen das 1000 fache Volumen des Puffers bei einer Temperatur über dem T_m -Wert des Phospholipids dialysiert.

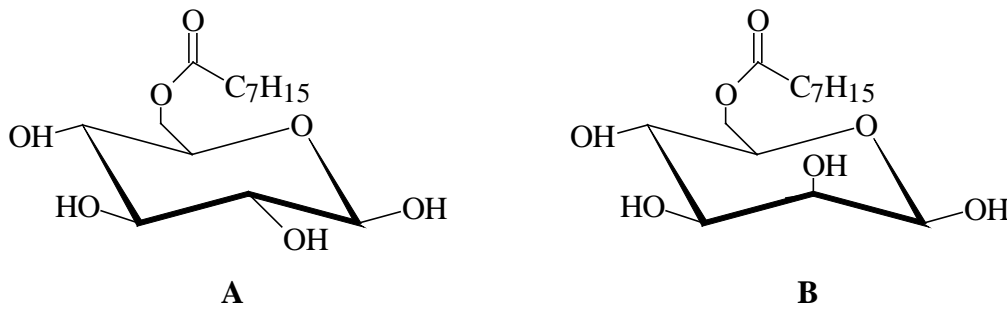


Abbildung 2.2: Strukturformeln der für die Rekonstitution verwendeten Zuckerester 6-*O*-Octanoyl-β-D-Glucose (A) und 6-*O*-Octanoyl-β-D-Mannose (B).

2.3.3 Rekonstitution des Photoreaktionszentrums aus *Rhodobacter sphaeroides*

Detergenz-Dialyse-Methode:

Für die Rekonstitution wurde solubilisiertes Photoreaktionszentrum verwendet, welches nach der Aufreinigung und Detergenzaustausch in 20 mM Tris, 1 % OGP vorlag. Zur Bestimmung der RC-Konzentration wurden Absorptionsspektren aufgenommen. Aus der Extinktion bei 802 nm (Bakteriochlorophyll) wurde die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt.

Nach Erzeugung eines dünnen Lipidfilms in einem Spitzkolben wurden 5 ml RC-Lösung in 20 mM Tris, pH 8,0, zugegeben, in der so viel Protein enthalten war, daß das molare Verhältnis von Phospholipid zu Protein 1000 betrug. Die Suspension wurde im Ultraschallbad für 2-3 s homogenisiert, wobei sich Phospholipid-Protein-Detergenz-Mizellen bildeten. 1 ml der Lösung wurde bei 30 °C zweimal gegen das 1000 fache Volumen detergenzfreien Puffer in der Dialysekammer der „Mini-Lipoprep“ oder in Dialyseschläuchen unter Lichtausschluß bei einer Temperatur oberhalb des T_m dialysiert.

Nach der Dialyse wurden die Liposomen in der Eppendorffzentrifuge bei 14000 rpm für 30 min zentrifugiert und in 2 ml 20 mM Tris-Puffer pH 8,0 resuspendiert. Zur Überprüfung der Proteinrekonstitution wurden Absorptionsspektren aufgenommen. Zur Erzeugung einer homogenen Partikelgrößenverteilung wurde die Liposomenlösung durch eine 200 nm Membran 10 x extrudiert.

Lipase-/Zuckerester-Methode:

In einer neu entwickelten Methode zur Liposomenpräparation fanden eine immobilisierte Lipase von *Bacillus sp.* und synthetische Zuckerester Verwendung. Hierbei wurden sowohl das Photoreaktionszentrum als auch das Phospholipid mittels Zuckerestern in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 solubilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation dieser Lösung zusammen mit einer immobilisierten Lipase bei 40 °C für 0,5-1 h unter Schütteln. Nach Hydrolyse der Zuckerester wurde die Liposomenlösung von der Matrix getrennt, und die Liposomen 10mal durch eine 200 nm Membran extrudiert.

2.3.4 Liposomenpräparation mit Bakteriorhodopsin

Detergenz-Dialyse-Methode:

Für die Liposomenpräparationen wurde das nach dem Detergenzaustausch gewonnene Bakteriorhodopsin herangezogen. Die Liposomen wurden mit der Dialysemethode unter Verwendung der Mini-Lipoprep-Geräte hergestellt. Die Dialyse von 1 ml der Lösung aus 1 mg Phospholipid, 8 mg OGP und des in OGP solubilisierten Bakteriorhodopsins wurde in 20 h gegen 2 l 10 mM NaPO₄, pH 5,6 durchgeführt. Nach der Dialyse wurden die Liposomen für 30 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und in 10 mM NaPO₄, pH 5,6, resuspendiert.

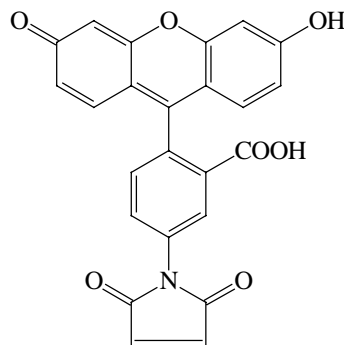
Von den Liposomen wurde ein UV/VIS-Spektrum aufgenommen, und sie wurden für die Thiolgruppenbestimmung mit Fluorescein-5-maleimid verwendet.

Lipase/Zuckerester-Methode:

Entsprechend der Proteoliposomenpräparation mit dem Photoreaktionszentrum wurde die neu entwickelte Methode, bei der eine immobilisierte Lipase und synthetische Zuckerester Verwendung fanden, auch zur Herstellung von BR-Liposomen angewendet.

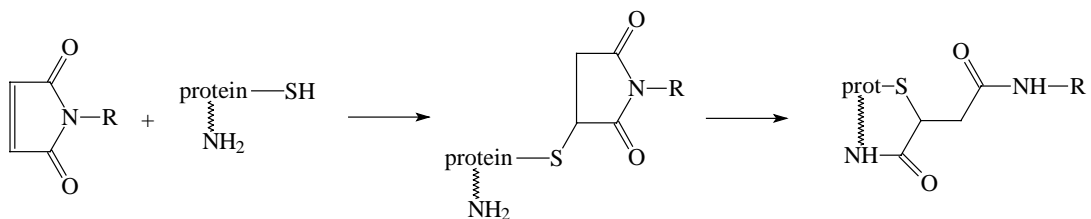
Das gereinigte BR wurde in Gegenwart von 1 mg Phospholipid und 8 mg Zuckerester mit der immobilisierten Lipase von *Bacillus species* bei 40 °C unter Schütteln für 0,5-1 h inkubiert. Die Liposomen wurden von der Matrix getrennt und 10mal durch eine 200 nm Membran extrudiert.

2.3.5 Thiolgruppennachweis mit Fluorescein-5-maleimid (FLM)



Aufgrund seines relativ hohen Extinktionskoeffizienten eignet sich Fluorescein sehr gut für den Einsatz als Markierung für die Absorptionsspektroskopie. Von Molecular Probes wird der Extinktionskoeffizient von mit 2-Mercaptoethanol modifiziertem Fluorescein-5-maleimid mit $\epsilon = 83000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angegeben (Haugland, 1992). Da das Fluorescein-5-maleimid in dieser Arbeit jedoch gebunden und partiell hydrolysiert ist, wird nach Hufnagel der Extinktionskoeffizient mit $\epsilon = 75000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angenommen (Hufnagel, 1997).

Mit dem Fluoreszenzmarker Fluorescein-5-maleimid $\text{C}_{24}\text{H}_{13}\text{HO}_7$, MW: 427,37 (Pierce), wurden die Thiolgruppen der Bakteriorhodopsinmutante D36C nachgewiesen. Dabei reagiert das Molekül mit der freien SH-Gruppe nach folgendem Reaktionsmechanismus:



Durchführung:

Für die Markierung der Thiolgruppe wurden 5 nmol BR in 50 µl Succinatpuffer (10 mM, pH 6,5, 1 mM EDTA) gegeben. Nach Zugabe von 2,5 µl Fluorescein-5-maleimid (Stammlösung 100 mM DMSO) wurde die Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Sobald die Inkubation beendet war, wurde der Reaktionsansatz mit 10 mM Carbonatpuffer, pH 10, dreimal gewaschen, in 1 ml Carbonatpuffer aufgenommen und schließlich wurde ein Absorptionsspektrum gemessen.

Die Quantifizierung erfolgte nach Anpassung eines Absorptionsspektrums von unmodifizierter Purpurmembran (PM) an das gemessene Spektrum (Abbildung 2.3 und Abbildung 2.4). Gegebenenfalls wurde dieses Spektrum durch Subtraktion einer angepaßten Streukurve modifiziert. Aus der Extinktion bei 568 nm konnte die BR-Menge errechnet werden, und aus der Extinktionsdifferenz bei 503 nm ergab sich die Menge der gebundenen Markierung.

Zur Messung der Orientierung von BR in Proteoliposomen wurde die Methode analog durchgeführt. Als Referenz für die FLM markierten BR-Proteoliposomen dienten dabei unmodifizierte BR-Proteoliposomen.

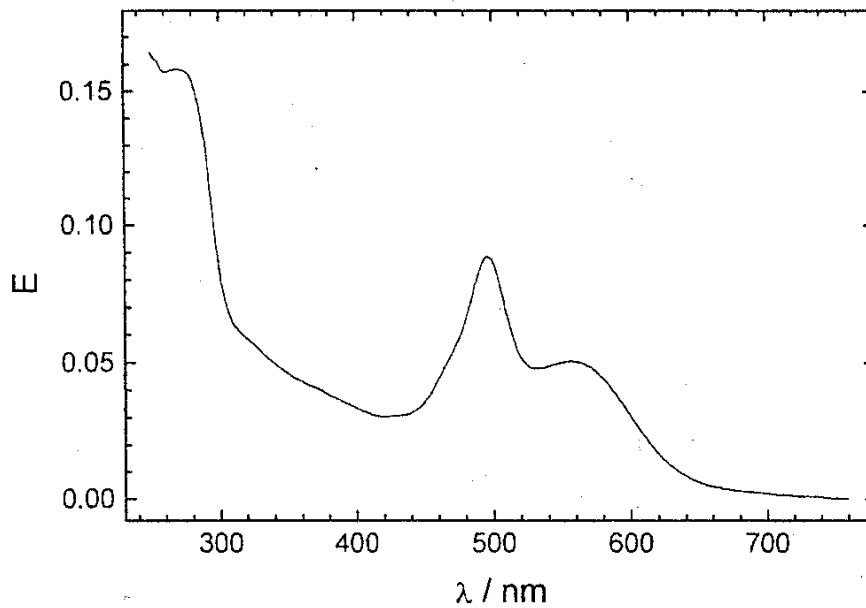


Abbildung 2.3: Absorptionsspektrum von PM D36 C, modifiziert mit Fluorescein-5-maleimid (Hufnagel, 1997).

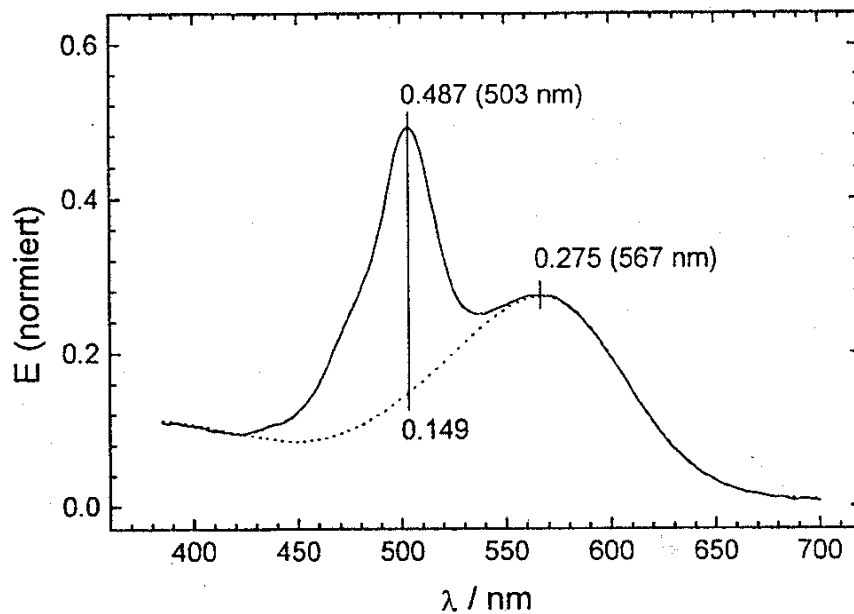


Abbildung 2.4: Mit FLM modifizierte PM: Bestimmung des Markierungsgrades. Gepunktet dargestellt ist das Spektrum einer Suspension von PM Wildtyp, die durch Normierung an das Spektrum von mit FLM modifizierter PM D36C (nach Subtraktion einer Streukurve, durchgezogene Linie) angepaßt worden ist. Nach $\Phi = \frac{\Delta E_{503}}{E_{567}} \frac{\varepsilon(BR,567)}{\varepsilon(FLM,503)}$ resultiert in diesem Fall ein Markierungsgrad von $\Phi = 1.03$ (Hufnagel, 1997).

2.3.6 "Freeze-Thaw"-Technik

Zur Präparation von unilamellaren Liposomen und Liposomen mit eingeschlossenem Fluoreszenzmarker wurde die "Freeze-Thaw"-Technik angewendet. Hierbei handelt es sich um eine schonende Rekonstitutionsmethode, da auf den Einsatz von Detergenzien verzichtet wird.

Die Herstellung eines Lipidfilmes erfolgte analog Kap. 2.3.1. Danach wird 3 ml 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 oder eine 100 mM Calcein-Lösung, pH 7,4, hinzupipettiert und in einem Ultraschallbad (Branson) beschallt, wobei die Temperatur oberhalb der Hauptumwandlungstemperatur liegen muß. Nach etwa 5-10 min erscheint die Probe klar bzw. nur noch leicht opaleszent. Anschließend wird die Suspension in flüssigem N₂ eingefroren. Nach langsamen Auftauen bei RT wird der "Freeze-Thaw"-Zyklus noch 4 mal wiederholt.

Zuletzt werden die Liposomen durch einen Polycarbonatfilter extrudiert (Porendurchmesser 200 nm, $T > T_m$)

2.3.7 Sephadex-G50-Filtration zur Liposomenpräparation

Eine weitere Möglichkeit zur Rekonstitution von Proteinen in Liposomen stellt die Gelfiltration mit Sephadex-G50 dar. Für die Präparation der Liposomen wurden mit 2 mg DMPC, 16,8 mg n-Octyl- β -glucopyranosid als Detergenz und 1,44 μ M Photoreaktionszentrum eingesetzt. Das molare Verhältnis von Phospholipid zu Detergenz betrug 20, das des Phospholipids zum Photoreaktionszentrum 1000. Für die Entfernung des Detergenz wurde eine Sephadex-G50 Säule verwendet (64 x 1,6 cm), die zunächst mit 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 äquilibriert wurde. Injiziert wurden 100 μ l des Gemisches aus DMPC und RC. Eine Trennung des Detergenz von den sich gebildeten Proteoliposomen erfolgt bei einer Flußrate von 2,5 ml/min bei RT.

Die Detektion der eluierten Proteoliposomen wurde bei 280 nm verfolgt. Nach ca. 20 ml wurden die Proteoliposomen in 3-4 ml eluiert. Einzelne Fraktionen wurden spektrophotometrisch untersucht.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Stämme und Klonierungsvektoren

Klonierungsarbeiten wurden mit den *E.coli*-Stämmen DH5 α (Hanahan, 1983) und BL21DE3 (Studier & Moffat, 1986) (bezogen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSMZ) in Braunschweig) und den Klonierungsvektoren pUC18 (Yanisch-Perron et al., 1985, Sigma) sowie pET20b (Dekker et al., 1993, Sigma) durchgeführt.

2.4.2 Agarose Gelelektrophorese

Horizontal-Gelelektrophoresen nach Sharp et al. wurden mit DNA-Sub CellTM Kammern (Biorad) und einem Netzgerät Power Pac 300 (Biorad) durchgeführt (Sharp et al., 1973). Als Elektrophoresepuffer wurde ein TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3) benutzt. Je nach dem Molekulargewicht der DNA-Moleküle wurden 0,8-2 %ige (w/v) Agarosegele (Serva) eingesetzt. Die Elektrophoresen wurden bei einer konstanten Spannung von 112 V und einer Stromstärke von ca. 50 mA durchgeführt. Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ wurde zur Anfärbung der DNA dem Agarosegel zugesetzt. Im UV-Durchlicht eines Transilluminators wurde die DNA visualisiert und fotografisch dokumentiert. Die Größe der aufgetragenen DNA-Fragmente wurde mit einem DNA-Molekulargewichtsstandard (1kb, Gibco BRL) bestimmt.

2.4.3 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA anschließend nach Anweisung des Herstellers mit dem QIAquick Gel Extraktions System (Qiagen) aus dem Agarosegel isoliert. Dabei wird die DNA durch Binden an eine Silika-Gel enthaltene Säule immobilisiert und mittels verschiedener Waschschriffe von Verunreinigungen befreit. Durch anschließende

Elution mit H₂O können mit dieser Methode bis zu 8 µg DNA (100 bp - 10 kb) erhalten werden.

2.4.4 Plasmidpräparation

Für routinemäßige Untersuchungen von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*, z.B. für Restriktionsanalysen, erfolgte die Schnellisolierung durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Bis zu 5 µg Plasmid DNA können durch diese Plasmid-DNA Minipräparationen isoliert werden.

Dazu wurden die Zellen einer 2 ml Übernachtskultur (LB-Medium) abzentrifugiert und in 150 µl Puffer (25 mM Tris/HCl pH 8,0, 40 mM Glukose, 10 mM EDTA) resuspendiert. 200 µl Lysepuffer (0,2 M NaOH, 1 % SDS) wurden zugesetzt, sanft gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl 3 M Na-Acetat pH 5,3 wurden die Proteine präzipitiert (5 min auf Eis) und zusammen mit den Zelltrümmern durch Zentrifugation (5 min, 20000 x g, 4 °C) abgetrennt. Der klare Überstand wurde abgenommen, und die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe eines Zehntel Volumens 3 M Na-Acetat pH 5,3 und dem 2,5-fachen Volumen an 100 %igem Ethanol bei -70 °C für 20 min präzipitiert und anschließend zentrifugiert (20 min, 20000 x g, 4 °C). Das erhaltene Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, die Plasmid-DNA getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst. Für Restriktionsverdau wurden 5 µl der Plasmid-Lösung eingesetzt.

Sehr saubere Plasmid-DNA, wie sie für Sequenzierungsreaktionen benötigt wurde, wurde nach Anweisung des Herstellers mit dem Qiagen-Kit "Prep spin Plasmid Purification" isoliert. Hierbei wurde die DNA ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert, jedoch durch anschließende Chromatographie an Anionenaustauscher-Säulen gereinigt. Die Plasmid-DNA war frei von chromosomaler DNA und RNA und konnte sowohl zum Klonieren als auch zum Sequenzieren eingesetzt werden.

Größere Mengen sauberer Plasmid DNA (Isolation bis zu 100 µg Plasmid DNA) wurden nach Anweisung des Herstellers mit dem Midi Plasmid Purification Kit (Qiagen) isoliert.

2.4.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte über die Messung der Absorption einer DNA-Lösung bei 260 nm. Eine OD von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA-Lösung wurde durch die Bestimmung des Quotienten der Absorption der DNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) ermittelt. Eine DNA-Lösung mit einem Wert unter 2,0 wurde als ausreichend sauber für weitere Arbeiten angesehen (Ausubel et al., 1993).

2.4.6 Enzymatische DNA-Modifikationen: Restriktionsverdau, Ligationen, Phosphatase- und Klenow Behandlungen

Die Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *SmaI*, *PstI* sowie die entsprechenden 10 x Reaktionspuffer wurden von BioLabs New England, USA bezogen und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. T4-DNA-Ligase und alkalische Phosphatase (CIAP), wie die dazugehörenden 10 x Reaktionspuffer, stammen von Boehringer Mannheim und wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Durch den Einsatz von alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen von nur mit einem Restriktionsenzym geschnittenen Vektoren entfernt und die Selbstligation der zu konstruierenden rekombinanten Plasmiden verhindert. Um überstehende Enden von Restriktionsfragmenten in glatte Enden zu überführen, wurde das Klenow-Enzym eingesetzt. Zur Inaktivierung von Enzymen wie Restriktionsendonukleasen oder alkalischen Phosphatasen wurde die DNA nach der Enzymbehandlung aus einem Agarosegel isoliert (Ausubel et al., 1993).

2.4.7 Transformation von Plasmid DNA in *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* DH5α Zellen wurde 50 ml Medium (Luria Bertani Medium, s. Abschnitt 2.4.8) mit 0,5 ml einer frischen über Nacht-Kultur angeimpft und bei 190 rpm und 37 °C bis zu einer OD ($A_{578\text{nm}}$) von 0,4-0,7 kultiviert. Die Zellen wurden dann durch 2minütige Zentrifugation bei 4000 x g und 4 °C geerntet und in 2 ml vorgekühlte TSS Lösung resuspendiert (Chung et al., 1989). Nach Inkubation der Zellen

für 5 Minuten auf Eis wurden 200 µl Zellen mit 0,5-2 µl des zu transformierenden Ligationsansatzes vermischt und nochmals 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 sec bei 42 °C inkubiert und sofort mit 0,8 ml LB-Medium versetzt. Nach Inkubation für eine Stunde bei 37 °C wurden Aliquots der Kultur auf Selektivagarplatten ausplattiert.

2.4.8 Medien und Kultivierungsbedingungen

E. coli wurde in LB-Medium (Luria Bertani: 10 g/l Trypton (Oxoid), 5 g/l Hefeextrakt (Difco), 5 g/l NaCl) bei 30 °C und 180 rpm ü.N. kultiviert. LB-Agarplatten, bestehend aus LB-Medium und 1,5 % (w/v) Agar Agar (Difco), wurden bei 37 °C inkubiert.

Zur Selektion von *E. coli* DH5α Zellen mit pUC18 Plasmid wurde LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (Sigma) verwendet. Zum Screening auf *E. coli* DH5α Klone mit rekombinantem pUC18 Plasmid wurden 20 µl einer X-Gal-Lösung (2% (m/v) X-Gal in Dimethylformamid) auf LB-Selektivagarplatten (s.o.) ausplattiert.

2.4.9 Isolierung genomischer DNA

E. coli JM105 wurde 16 h in 400 ml LB-Medium bei 30 °C und 220 rpm kultiviert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 x g und 4 °C geerntet, in 20 ml Lysozylösung (30 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1 mg/ml Lysozym (Boehringer Mannheim), pH 8,0) resuspendiert und 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 2 ml SDS-Lösung (10% (M/V) SDS in destilliertem Wasser) zugegeben und nochmals 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K Lösung (30 mg/ml Proteinase K (Boehringer Mannheim) in destilliertem Wasser) wurde nochmals 1 h unter Schütteln inkubiert.

Dieser Zellaufschluß wurde dann je dreimal mit Phenol und Chloroform extrahiert und die DNA mit Isopropanol gefällt. Die gefällte DNA wurde anschließend in einer Konzentration von 4,8 mg/ml in TE-Puffer resuspendiert. Diese DNA wurde für weitere Klonierungsexperimente eingesetzt, und das Gen der alkalischen Phosphatase wurde aus ihr isoliert.

2.4.10 Expression des Fusionsproteins L-phoA

Zur Expression des Fusionsproteins L-phoA wurde ein *lacI*-Promotor- und ein T7-RNA-Polymerase-Promotor-Expressionssystem verwendet.

Das *lac*-Promotor-Expressionssystem

Der *lac*-Promotor befindet sich in dem Expressionsvektor pUC19 und wird vom *lacI*^q-Repressor Protein kontrolliert. Durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) wird der Repressor inaktiviert und kann nicht mehr mit dem *lacZ* Promotor in Wechselwirkung treten. Der Start der Transkription beginnt.

Für die Durchführung der Expression wurden die *Escherichia coli* DH5 α -Klone bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ = 0,6 - 1,0 in LB-Medium (100 μ g/ml Ampicillin) kultiviert. Durch Zugabe von IPTG aus einer Stammlösung zu einer Endkonzentration von 1-5 mM erfolgte die Induktion. Vor Induktion und nach definierten Zeitabständen nach Induktion wurden Aliquots entnommen, abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE (vgl. Kap. 2.2.4) analysiert.

Das T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem

Besonders geeignet zur Überexpression von Genen in *Escherichia coli* ist das T7-RNA-Polymerase-Promotor-System (Tabor & Richardson, 1985). T7-RNA-Polymerase selbst ist ein äußerst aktives Enzym und sehr selektiv für ihren eigenen Promotor. Unter Verwendung des pET20b(+)-Vektors wird das zu exprimierende Gen in Transskriptionsrichtung zum T7-Promotor inseriert. Die Induktion der Expression erfolgt durch Zugabe von IPTG (Studier & Moffat, 1996). Das Gen für die T7-RNA-Polymerase steht unter der Kontrolle des *lac*-Repressors und des *lacUV5*-Promotors. Mit dem lysogenen Bakteriophagen DE3 trägt der verwendete *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) das *lacI*-Gen, den *lacUV5*-Promotor und das Gen für die T7-RNA-Polymerase auf dem Chromosom. Durch IPTG wird der *Lac*-Repressor inaktiviert und die Transkription der T7-RNA-Polymerase ermöglicht, die nun ihrerseits mit der Transkription des heterologen Gens beginnt.

Da dieses System ebenfalls durch IPTG induzierbar ist, wurde die Expression analog der Expression mit dem *lac*-Promotor durchgeführt, wobei die Endkonzentration der zur Induktion zugegebenen IPTG Lösung in diesem Fall 0,4 mM betrug.

2.4.11 Detergenzextraktion des Fusionsproteins L-phoA aus der Zellmembran

Nach Expression des Fusionsproteins L-phoA in *Escherichia coli* sollte es im ersten Aufreinigungsschritt aus der Zellmembran isoliert werden. Dies konnte mit Detergenzien erreicht werden, die zu den aufgeschlossenen Zellen gegeben wurden und aufgrund der hydrophoben Eigenschaften das Membranprotein solubilisieren.

Extraktion mit N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid (LDAO)

Nach einer analogen Methode von Gray *et al.* für *Rhodobacter sphaeroides* wurden 2 g *E. coli*-Zellen nach der Expression (vgl. Kap. 2.4.10) mit 5 ml 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 resuspendiert (Gray *et al.*, 1990). Der Zellaufschluß erfolgte zuerst mit je einer Spatelspitze Lysozym und DNaseI für 45 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für 30 Minuten mit Ultraschall. Dann wurde 2 Stunden bei 4 °C und 200.000 x g ultrazentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet erneut in 10 ml des oben angeführten Puffers resuspendiert. Die Extraktion erfolgte unter Zugabe von 125 mM NaCl, 0,5 mM PMSF und 2 % LDAO im Dunkeln unter Rühren. Nach erneuter Ultrazentrifugation für 45 Minuten wurde der Überstand für die Aktivitätsmessungen verwendet.

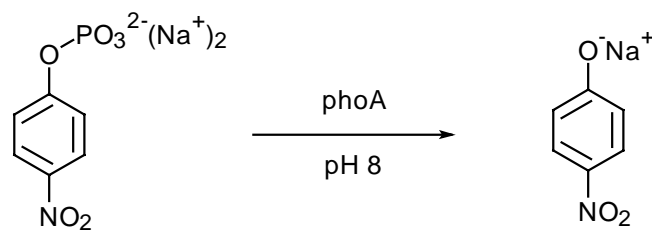
Extraktion mit Triton X-114 (Polyethylenglykol-*t*-octylphenylether) (Pryde, 1986, Wall & Patel, 1989)

Die Extraktion erfolgte entweder direkt nach dem Zellaufschluß oder aus dem Überstand der Zentrifugation oder aus dem Pellet, das in 3-5 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8 resuspendiert wurde. Nach Zugabe eines fünftel Volumens an Triton X-114 wurde 30 Minuten auf Eis gerührt, anschließend 15 Minuten bei 4000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Trübung auf über 30 °C erwärmt und dann erneut bei 4000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die untere der beiden gebildeten Phasen enthielt die lipophilen Proteine.

2.4.12 Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase

2.4.12.1 Aktivitätstest mit *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP)

Nach der von Brickman und Beckwith entwickelten Methode von 1979 wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (phoA) quantitativ bestimmt (Brickman & Beckwith, 1979). Der Nachweis basiert auf der Hydrolyse des Dinatriumsalzes von *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) durch die alkalische Phosphatase bei pH 8.



Über das dabei entstehende gelbe Natriumsalz von *p*-Nitrophenol kann die Enzymaktivität durch Messung der Extinktion bei 410 nm in Abhängigkeit von der Zeit quantitativ bestimmt werden.

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E: Extinktion

d: Schichtdicke der Küvetten

c: Konzentration

e: molarer Extinktionskoeffizient

ergibt sich die pro Zeiteinheit umgesetzte Konzentration nach:

$$U = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{E}{\varepsilon \cdot d \cdot \Delta t}$$

U: Enzymaktivität [M/s]

E: Extinktion

Δc : Konzentrationsänderung [M] im Zeitintervall Δt [s]

ε : molarer Extinktionskoeffizient des Produktes $\varepsilon = 18,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

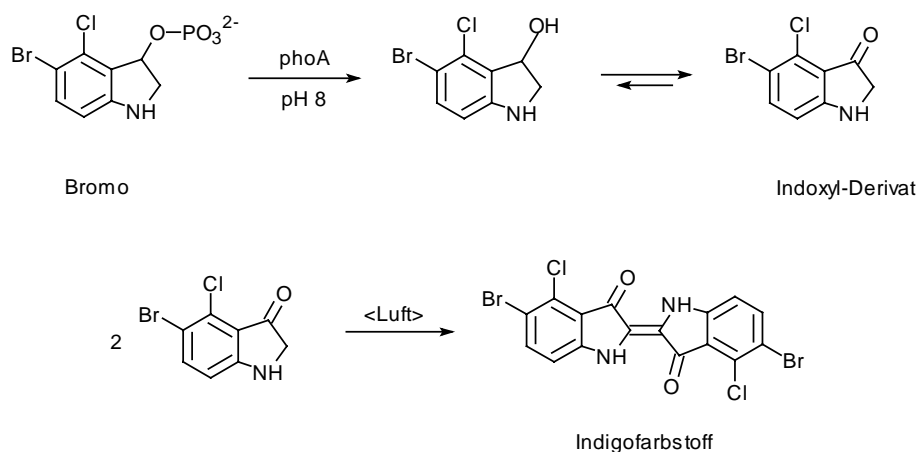
d: Schichtdicke der Küvette $d = 1 \text{ cm}$

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte mit *Escherichia coli* Zellen, die für die Expressionsversuche verwendet wurden. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2 min, 20000 x g), in 5 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8 resuspendiert und 20 Minuten mit dem Sonifier aufgeschlossen. Nach erneuter 5minütiger Zentrifugation bei 4000 x g wurde die Aktivität im Überstand und im Zellpellet bestimmt.

Pro Messung wurden 900-990 µl einer frisch angesetzten 5 mM pNPP-Lösung (gelöst in 100 mM Tris/HCl, pH 8) auf 37 °C temperiert. Durch Zugabe von 10-100 µl Probe und Inkubation bei 37 °C wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach exakt einer Minute wurde eine gleiche Probe in ein zweites Reaktionsgefäß gegeben und der Nullabgleich durchgeführt. Schließlich erfolgte zwei Minuten später die Messung der ersten Probe.

2.4.12.2 Aktivitätstest mit 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat

In einer weiteren Methode zur qualitativen Enzymaktivitätsmessung der alkalischen Phosphatase wird 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat (Bromo) verwendet. Diese Substanz wird im Alkalischen (pH 8) durch die alkalische Phosphatase hydrolysiert (Froshauer, 1988). Das dabei entstehende Indoxyl-Derivat wird durch Luftsauerstoff leicht zu einem blauen Indigofarbstoff oxidiert.



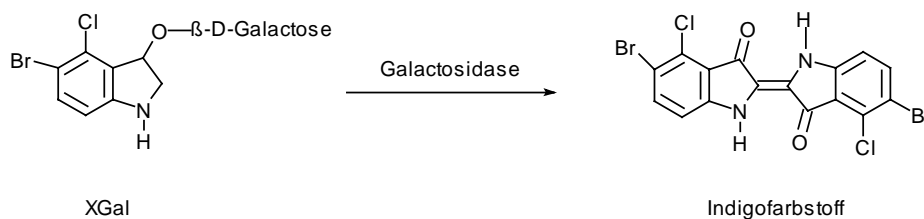
Dieser Test konnte sowohl für die Aktivitätsbestimmung von *E. coli*-Zellen nach den Expressionsversuchen als auch für ein Screening von Zellen als Plattenassay eingesetzt werden.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität nach der Expression wurden 890 μl 100 mM Tris/HCl, pH 8, mit 10 μl 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat (4 mg/ml in DMF) versetzt. 100 μl *Escherichia coli* Zellen oder Überstand (vgl. Kap. 2.4.12.1) wurden zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase konnte durch Blaufärbung der Lösung festgestellt werden.

Für einen Plattenassay wurden 30 μl der Bromo-Lösung (4 mg/ml in DMF) auf eine LB-Agar-Platte verteilt. Dieser Assay diente als Transformationskontrolle. Die Platten wurden direkt nach der Transformation mit den Zellen beimpft und bei 37 °C inkubiert. Wurde die alkalische Phosphatase exprimiert, so färbten sich die Kolonien blau. Kolonien ohne Expression des Enzyms blieben farblos.

2.4.12.3 Aktivitätstest mit 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Galaktosid

Das Plasmid pUC19 trägt das *lacZ*-Gen für die Expression der β -Galaktosidase. Dieses Enzym kann neben dem natürlichen Substrat β -Galactose auch 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Galaktosid (XGal) umsetzen. In einer dem 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat (Bromo) analogen Reaktion wird durch die β -Galaktosidase ein blauer Indigofarbstoff gebildet.



Innerhalb des *lacZ*-Gens von pUC19 befindet sich zudem eine Polylinker Site, die zum Einfügen neuer Gene herangezogen wird. Wird das Plasmid an dieser Stelle modifiziert, so kann keine β -Galaktosidase gebildet und kein Substrat umgesetzt werden.

Zur Durchführung des Assays wurden 100 μl einer 2 %igen Lösung von 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Galaktosid in DMF auf einer LB-Agar-Platte verteilt. Die Platten wurden mit Zellen einer Übernachtskultur oder direkt nach der Transformation beimpft

und für 14-16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Trug das pUC19-Plasmid kein Insert, so färbten sich die Kolonien blau, die übrigen weiß.

2.4.13 PCR-Reaktion

Mitte der achtziger Jahre wurde die Methode, mit der die enzymatische Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragmentes möglich ist, von Mullis et al. entwickelt (Mullis et al., 1986). Die "polymerase-chain-reaction" (PCR) ermöglicht die enzymatische Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragmentes, und sie setzte sich erst nach Ersatz des Klenow-Fragments der *Escherichia coli* DNA-Polymerase I durch die thermophile *Taq* DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* durch (Saiki et al., 1988). Das DNA-Fragment, das die zu amplifizierende Sequenz enthält, wird zusammen mit zwei Primern durch Hitze denaturiert. Die beiden Primer bilden das 5'- und 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz und sind jeweils komplementär zu einem der beiden Stränge der als Matrize dienenden Doppelstrang-DNA. Mit Hilfe der Primer können für eine bestimmte Klonierungsstrategie geeignete Restriktionsschnittstellen in das Amplifikationsprodukt eingeführt werden. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes hybridisieren die Primer an die beiden Stränge der Matrize. In Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und der DNA-Polymerase erfolgt die Verlängerung der Primer. Die Schritte Denaturierung, Primer-Hybridisierung ("annealing") und DNA-Synthese bilden einen Zyklus. Bereits nach dem zweiten Zyklus liegt das gewünschte DNA-Fragment in der richtigen Länge vor und wird während der weiteren Zyklen exponentiell akkumuliert. In der Regel reichen 30 Zyklen, um, ausgehend von wenigen Matrizen-Molekülen, genügend DNA für Klonierungsexperimente zu erhalten.

Die in dieser Arbeit eingesetzte Methode folgte dem Standardprotokoll von Coen & Scharf, 1990. Der Reaktionsansatz bestand aus den in nachfolgender Tabelle angegebenen Bestandteilen:

Tabelle 2.3: PCR-Protokoll mit den Bestandteilen für einen 100 µl Reaktionsansatz.

Reihenfolge der Bestandteil	Volumen bzw. Konzentration
H ₂ O	100 - X µl
10 x ThermoPol-Reaktions-Puffer (100 mM KCl, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 200 mM Tris/HCl pH 8,8, 20 mM MgSO ₄ , 1 % Triton X-100)	10 µl
DMSO	7,5 µl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 0,25 mM
Matrizen-DNA	ca. 0,1 µg
beide PCR-Primer	je 100 pmol
Taq-Polymerase	1-2 Units
leichtes Mineralöl zum Überschichten des Reaktionsansatzes	40 µl

PCR-Reaktionen wurden mit einem Thermocycler (DNA Thermo Cycler Hybaid Omnigene, MWG Biotech) mit einer Denaturierungstemperatur von 95 °C (Dauer 1,5 min), einer Annealingstemperatur von 55 °C (Dauer: 60 sec) sowie einer Extensionstemperatur von 72 °C (Dauer: 40 sec) über 30 Zyklen durchgeführt. Zur Durchführung der PCR-Reaktion wurde ein GeneAmp^R PCR Reaction Kit mit AmpliTaq^R Polymerase (Perkin Elmer) nach Anweisung des Herstellers verwendet.

2.4.14 DNA-Sequenzierung

Die DNA wurde nach der Methode des "Fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing" nach Sanger (Sanger et al., 1977) sequenziert, wobei nicht radioaktiv-, sondern fluoreszenzmarkierte ddNTPs eingesetzt werden (Ansorge et al., 1986), die im Verlauf einer PCR ähnlichen Reaktion (vgl. 2.4.13) in die amplifizierten DNA-Fragmente eingebaut werden. Daher wurde der Taq Dye DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) mit AmpliTaq-DNA-Polymerase nach Anweisung des Herstellers verwendet. In einem 20 µl Reaktionsvolumen befanden sich H₂O, 8 µl Terminator Ready Reaction Mix, 3,2 pmol Primer sowie 300-500 nm DNA.

Die Amplifikationsprodukte wurden zunächst mit 100%igem Ethanol (-20 °C) gefällt. Die DNA wurde getrocknet und in je 4 µl einer 5:1 Mischung aus Formamid und 25 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert. Anschließend erfolgt die Denaturierung bei 95 °C für 5 min und sofortige Überführung der Proben auf Eis.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit einer Annealingtemperatur der Primer von 55 °C und einer Reaktionstemperatur von 60 °C über 25 Zyklen durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzierungsprodukte erfolgte nach Anweisung der Hersteller mit einem 373A DNA Sequencing System (Applied Biosystems).

Für die Sequenzierung rekombinanter pUC18 Plasmide wurden als Primer der pUC/M13 Forward Sequencing Primer (17mer) und der pUC/M13 Reverse Sequencing Primer (17mer) von Promega verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Reinigung und Solubilisierung des RC aus *Rhodobacter sphaeroides* in Gegenwart von Detergenzien

3.1.1 Ionenaustauschchromatographie zur Reinigung des RC mit LDAO

Die Reinigung der aus Zellen isolierten und solubilisierten Reaktionszentren erfolgte auf schnelle Weise mittels Ionenaustauschchromatographie (vgl. Kap. 2.2.1.4). Dabei erwies sich eine Kopplung aus einer Säule mit dem Ionenaustauscher S-Sepharose und einer nachgeschalteten Q-Sepharose-Säule als vorteilhaft.

Q-Sepharose, die auf einer Agarose-Matrix basiert, ist ein starker Anionenaustauscher mit der funktionellen Gruppe $-\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ und verbindet gleichzeitig Eigenschaften der Ionenaustauschchromatographie mit denen der Gelfiltration. Aufgrund der negativen Ladung des Reaktionszentrums im Auftragungspuffer bindet das RC an die Q-Sepharose. Durch Vorschalten des Kationenaustauschers S-Sepharose (funktionelle Gruppe $-\text{CH}_2\text{-SO}_3^-$) konnte eine Vorreinigung erzielt werden, da Reaktionszentren nicht an diese Matrix binden, jedoch Restproteine.

Nach Auftragen der Probe auf die S-Sepharose wurde mit 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 (Puffer A) + 0,08 % LDAO + 125 mM NaCl gewaschen, bis die gesamte nun vorgereinigte RC-Menge auf der Q-Sepharose gebunden war. Durch das Salz im Puffer wurde dabei die Bindung eines Teiles an Verunreinigungen auf der Q-Sepharose verhindert. Nachdem die S-Sepharose abgekoppelt war, erfolgte die sequentielle Ablösung der Proteine entsprechend ihrer Affinität zur Q-Sepharose durch die kontinuierliche Erhöhung der Salzkonzentration (NaCl). Bei diesem stufenlosen linear steigenden Salzgradienten über 2 l zu Puffer A + 0,08 % LDAO + 1 M NaCl wurde RC bei einer NaCl-Konzentration von 400 mM eluiert.

Nachfolgende Abbildung 3.1 dokumentiert den Ablauf der Ionenaustauschchromatographie, die mit einem UV-Monitor bei 280 nm verfolgt wurde.

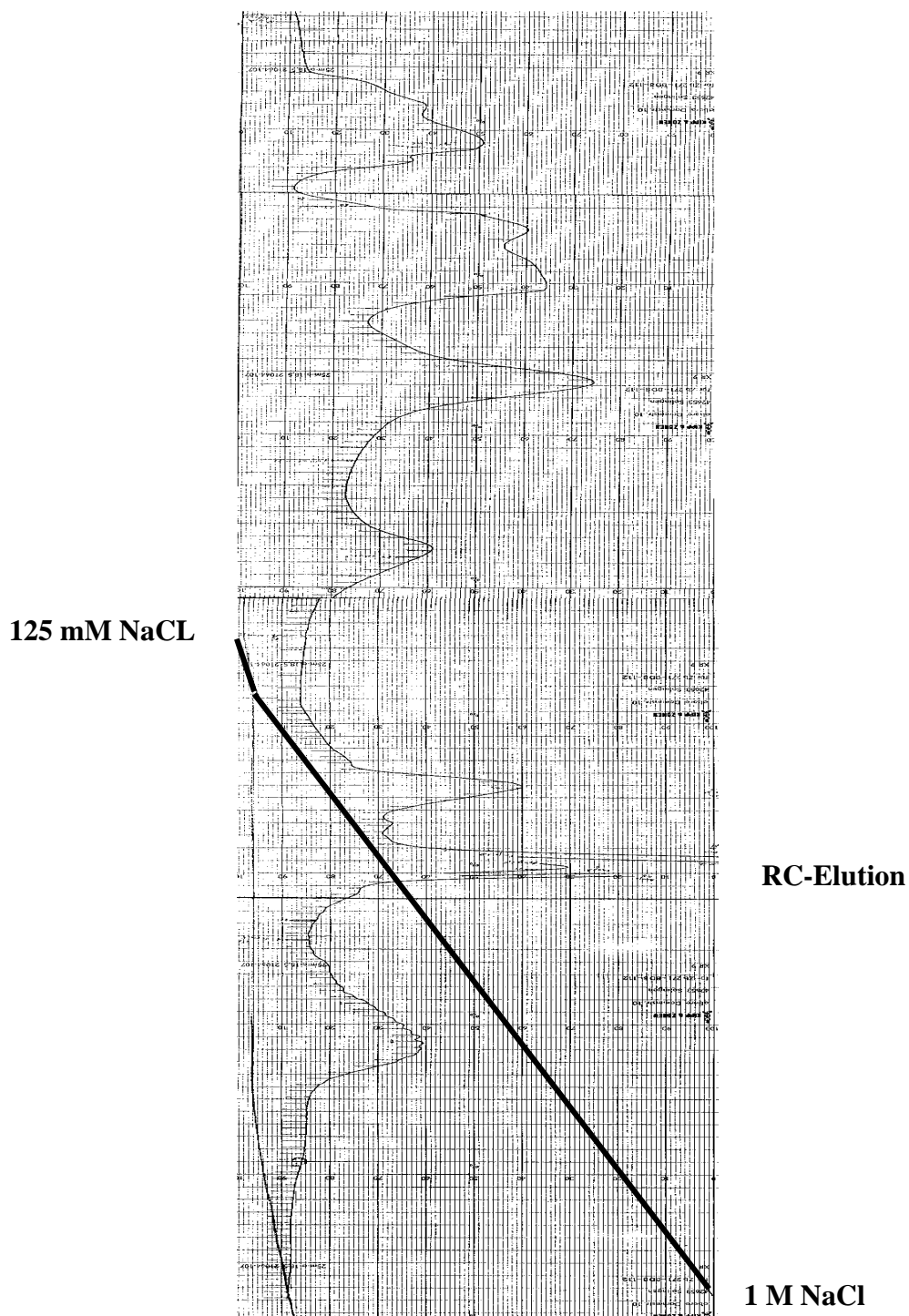


Abbildung 3.1: Elutionsprofil der RC-Aufreinigung mit einer Q-Sepharose nach Vorreinigung der solubilisierten Proteine mit S-Sepharose. Säulenvolumen 100 ml; Probenvolumen 50 ml; Fließgeschwindigkeit des Eluenten 4 ml/min; Gradientenvolumen 2 l, Puffergradient: von oben 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 + 0,08 % LDAO +125 mM NaCl auf 1 M NaCl.

Durch die Aufnahme von Absorptionsspektren konnten die Fraktionen mit dem Photoreaktionszentrum identifiziert und die RC-Konzentration bestimmt werden (s. Abbildung 3.2). Die Elution des Photoreaktionszentrums erfolgte bei einer NaCl-Konzentration von ca. 400 mM. Deutlich sichtbar sind die Elutionen der Verunreinigungen, die zum großen Teil bereits vor dem Anlegen des Salzgradienten erfolgen.

Der Reinheitsgrad der Reaktionszentren ließ sich aus den Quotienten der Extinktionen bei 280 und 802 nm berechnen, d.h. dem Verhältnis von Restproteinen zu Bakteriochlorophyll. RC-Reinheitsgrade von $OD_{280nm}/OD_{802nm} = 1,2 - 1,5$ konnten mit dieser Methode erzielt werden.

Die Präparation lieferte Reaktionszentren mit folgenden Merkmalen: $\epsilon_{759nm} = 129000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Bakteriophäophytin), $\epsilon_{803nm} = 288000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Bakteriochlorophyll), $\epsilon_{866nm} = 129000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Bakteriochlorophylldimer) (Straley et al., 1973).

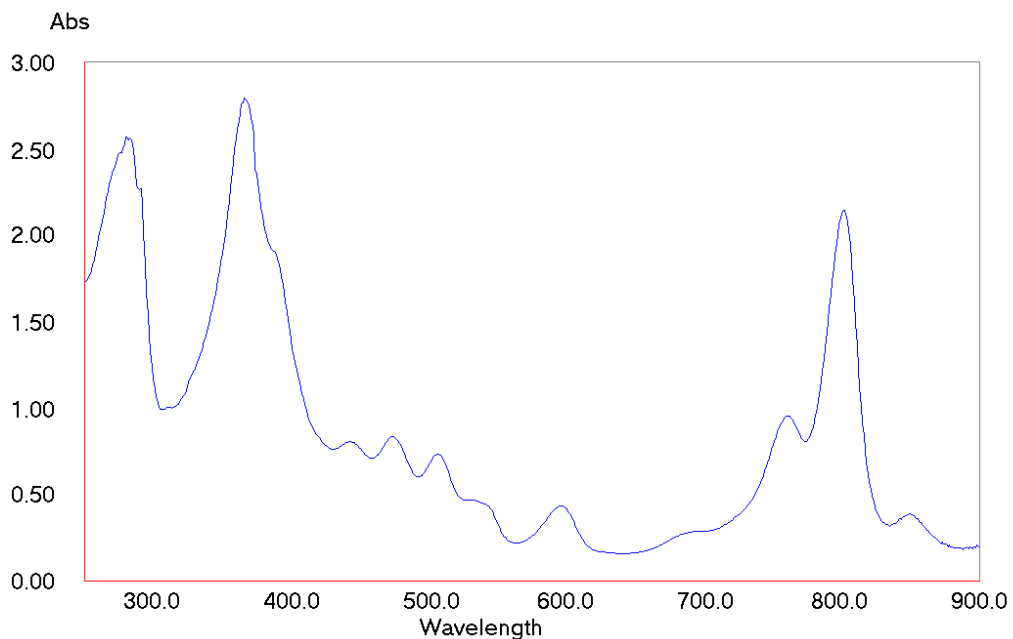


Abbildung 3.2: Absorptionsspektrum von 200-900 nm von Reaktionszentren aus *Rhodobacter sphaeroides* nach Ionenaustauschchromatographie mittels gekoppelter S- und Q-Sepharose; Maxima: 365 nm = Soret-Bande, 449-533 nm = Carotinoid; 598 nm = Qx-Bande vom special pair; 759 nm = Bakteriophäophytin; 803 nm = Bakteriochlorophyll; 866 nm = Qy-Bande vom special pair.

Der Reinigungsprozess des Reaktionszentrums wurde zusätzlich mittels SDS-Gelelektrophorese verfolgt. Dabei konnte gleichzeitig das Vorhandensein der drei Proteinuntereinheiten überprüft werden (Lauffermair & Oesterhelt, 1992). Die Banden der drei Untereinheiten L (26,0 kDa), M (30,7 kDa) und H (28,1 kDa) sind auf dem SDS-PAGE-Gel in Abbildung 3.3 (Spur 2) deutlich zu erkennen.

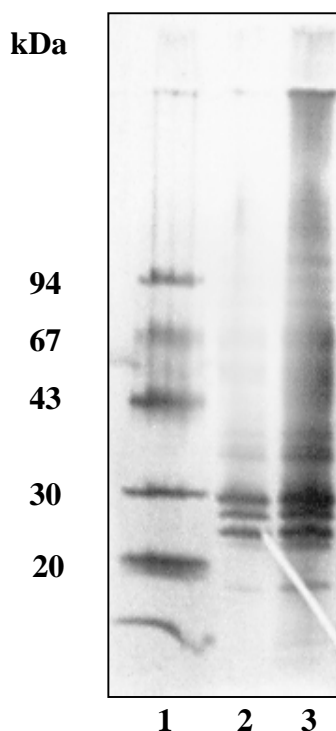


Abbildung 3.3: SDS-PAGE von Photoreaktionszentren aus *Rhodobacter sphaeroides*:

Spur 1: LMW-Marker, **Spur 2:** gereinigtes RC nach S- und Q-Sepharose, **Spur 3:** RC-Säulenauftrag vor der chromatographischen Reinigung.

Eine zusammenfassende Darstellung der Isolierungs- und Reinigungsergebnisse des Reaktionszentrums aus *Rhodobacter sphaeroides* findet sich in Tabelle 3.1. In dieser Tabelle sind ebenfalls die Ergebnisse der Proteinextraktionen und -reinigungen berücksichtigt, die mit einer höheren Detergenzkonzentration durchgeführt wurden. Die Reaktionszentren wurden dabei nach der Methode von Gray et al. (1990) aus der Zelle isoliert und mit LDAO solubilisiert (vgl. Kap. 2.2.1).

Demzufolge konnten in den isolierten Chromatophoren noch etwa 50 % der ursprünglich im Zellaufschluß enthaltenen Reaktionszentren gefunden werden. Gleichzeitig wurde mit der Chromatophorenisolierung eine mehr als 4fache Aufreinigung des Membranproteins erreicht. Mit 0,08 % des Detergenz LDAO konnten 31,5 % der Reaktionszentren aus den Chromatophoren extrahiert und der Reinheitsgrad um den Faktor 1,5 erhöht werden.

Entsprechend wurden nach Extraktion mit 0,1 % und 0,25 % LDAO, 37,4 % bzw. 47,8 % RC aus den Chromatophoren isoliert. Der Reinheitsgrad konnte aber nur geringfügig verbessert werden (1,2 bzw. 1,1 fach). Nach der anschließenden Reinigung des RC mittels Ionenaustauschchromatographie an S- und Q-Sepharose wurden im Fall von 0,08 % LDAO 80 % des aufgetragenen Proteins wiedergefunden. Das Verhältnis von Gesamtprotein zu Photoreaktionszentrum stieg nach diesem Schritt auf den Wert 1,2. Die Chromatographie mit 0,1 bzw. 0,25 % LDAO führte zu einer Ausbeute von 82 bzw. 84,4 % RC. Der Reinheitsgrad verschlechterte sich aber im Vergleich zu RC, welches mit 0,08 % LDAO gereinigt wurde, auf Werte von 1,8 - 2,2.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Isolierung und Reinigung des Reaktionszentrums aus *Rhodobacter sphaeroides* unter Verwendung von 0,08 % LDAO zur Proteinextraktion und -reinigung.

Reinigungsschritt	Ausbeute [%]	Reinheitsgrad [OD ₂₈₀ /OD ₈₀₂]
Zellaufschluß	100	20
Chromatophoren	47	4,5
LDAO-Extraktionen		
0,08 % LDAO	14,8	3,1
0,1 % LDAO	17,6	3,7
0,25 % LDAO	22,5	4,1
Ionenaustauschchromatographie		
0,08 % LDAO	11,8	1,2
0,1 % LDAO	14,4	1,8
0,25 % LDAO	19,0	2,2

Die Absorptionsspektren der jeweils mit unterschiedlichen Detergenzkonzentrationen gereinigten Reaktionszentren sind in Abbildung 3.4 dargestellt. In den Spektren der verschiedenen RC-Chargen ist dabei eine unterschiedliche Wirkung der Detergenzienkonzentrationen auf die Isolierung der RC-Kofaktoren im Wellenlängenbereich zwischen 758-865 nm zu verzeichnen.

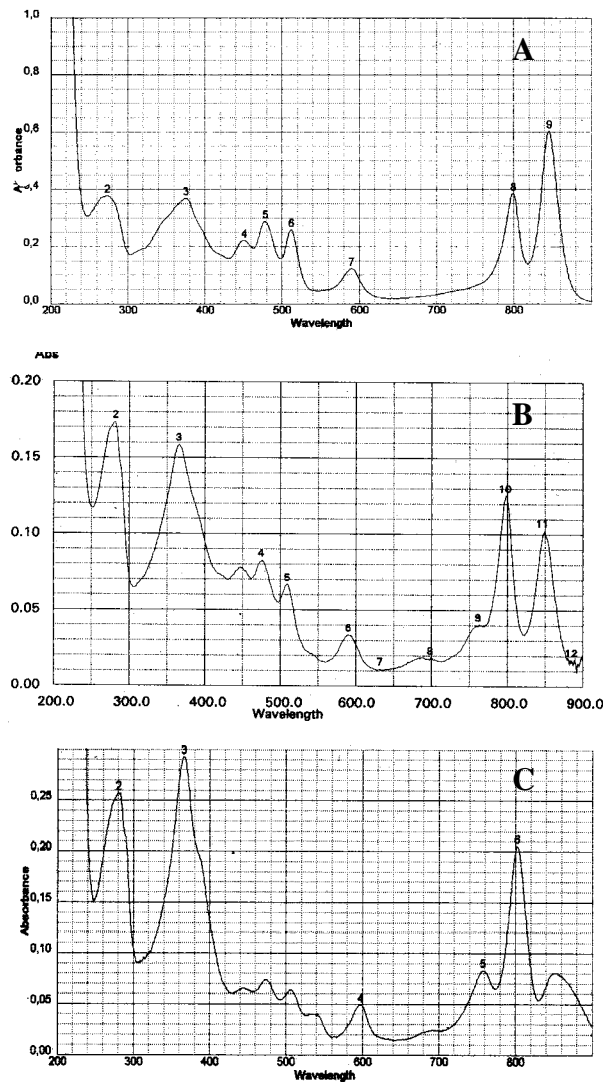


Abbildung 3.4: Spektralphotometrische Untersuchung von Reaktionszentren aus *Rhodospirillum rubrum*, die mit unterschiedlichen LDAO-Konzentrationen isoliert und gereinigt wurden. RC-Absorptionsspektren von 200-900 nm nach Reinigung mit 0,08 % LDAO (A), 0,1 % LDAO (B) und 0,25 % LDAO (C).

Insbesondere das Bakteriophäophytin ist bei Verwendung des Detergenz LDAO betroffen. Wird eine Konzentration von nur 0,08 % LDAO zur Isolation und Reinigung des RC benutzt, kann kein Bakteriophäophytin nachgewiesen werden, jedoch wird ein guter Reinheitsgrad der RC-Charge erreicht (s. Abbildung 3.4 A). Bei ansteigender LDAO-Konzentration auf 0,1-0,25 %, kann Bakteriophäophytin im Absorptionsspektrum bei einer Wellenlänge von 758 nm nachgewiesen werden. Gleichzeitig wird deutlich, daß mehr Gesamtprotein isoliert wird und der RC-Reinheitsgrad sinkt (s. Abbildung 3.4 B und C).

Für die Isolierung von vollständigem RC scheint eine höhere Detergenzkonzentration notwendig zu sein. Da für die Funktion des RC das Vorhandensein des Kofaktors Bakteriophäophytin für den Elektronentransport essentiell ist, kann mit der alleinigen Aufnahme eines Wellenlängenspektrum vermutlich keine Aussage über die Aktivität des Proteins gemacht werden. Um die Proteinaktivität zu bestimmen, bedarf es einer Methode, die den Elektronentransport im Membranprotein untersucht. Hierzu wurde ein Verfahren entwickelt, das die Oxidation des Elektronendonators Cytochrom c verfolgt (siehe Kap. 3.2.).

3.1.2 RC-Reinigung mit synthetischen Zuckerestern

Die synthetischen Zuckerester 6-*O*-Octanoyl- β -D-Glucose (OG) und 6-*O*-Octanoyl- β -D-Mannose (OM) wurden in einer Konzentration von 8 mg/ml anstelle des zuvor verwendeten Detergenz LDAO zur Extraktion und Reinigung des Reaktionszentrums eingesetzt. Die Methode, die bereits erfolgreich mit dem Detergenz LDAO durchgeführt wurde (vgl. Kap. 2.2.1.4), konnte analog eingesetzt werden, um das Membranprotein mit den synthetischen Zuckerestern zu isolieren. Wie in Tabelle 3.2 dargestellt, wurde das Membranprotein mit beiden synthetischen Zuckerestern erfolgreich aus den Chromatophoren isoliert. Nach der anschließenden Ionenaustauschchromatographie mit S- und Q-Sepharose (s. Methode 2.2.1.4) wurden gereinigte Reaktionszentren erhalten. Diese weisen auf dem Gel nach der SDS-PAGE die charakteristischen 3 Untereinheiten auf (s. Abbildung 3.5).

Tabelle 3.2: Isolierung und Reinigung des Photoreaktionszentrums aus *Rhodobacter sphaeroides* mit jeweils 8 mg/ml der Zuckerester 6-*O*-Octanoyl- β -D-glucose (OG) und 6-*O*-Octanoyl- β -D-mannose (OM).

Reinigungsschritt	Ausbeute [%]	Reinigungsgrad [OD ₂₈₀ /OD ₈₀₂]
Zellaufschluß	100	20
Chromatophoren	47	3,1
Extraktionen		
0,08 % LDAO	14,8	1,7
OG	12,9	2,4
OM	7,6	2,6
Ionenaustausch- chromatographie		
LDAO	11,8	1,2
OG	10,2	1,7
OM	5,2	1,9

Im Gegensatz zur Extraktions- und Reinigungsmethode mit 0,08 % LDAO war die Reaktionszentrenausbeute und der Reinigungsgrad bei Verwendung der Zuckerester jedoch wenig geringer. Wurde OG zur Extraktion des RC verwendet, konnten 27 % aus den Chromatophoren isoliert werden, im Falle von OM nur 16 % (31,5 % RC mit 0,08 % LDAO). Verglichen mit LDAO und OG, war die RC-Ausbeute nach Reinigung des Proteins mit OM ebenfalls geringer. Konnten noch etwa 80 % des in LDAO bzw. OG solubilisierten Membranproteins nach der Chromatographie wiedergewonnen werden, so waren es bei OM 68 %. Bezüglich der ursprünglichen RC-Konzentration bedeutet dies für den Zuckerester OM eine Ausbeute von knapp 50 %, verglichen mit OG. Dieses Resultat ist auch nach SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie in den deutlich schwächeren Proteinbanden zu erkennen (s. Abbildung 3.5).

Aufgrund der höheren RC-Ausbeute wurden daher für die nachfolgenden Rekonstitutionsexperimente nur Reaktionszentren verwendet, die mit dem Zuckerester OG solubilisiert und gereinigt wurden.

Reinigungsfaktoren von 1,7-1,9, die nach der chromatographischen Reinigung der Proteine erzielt wurden, sprechen für einen guten Reinheitsgrad.

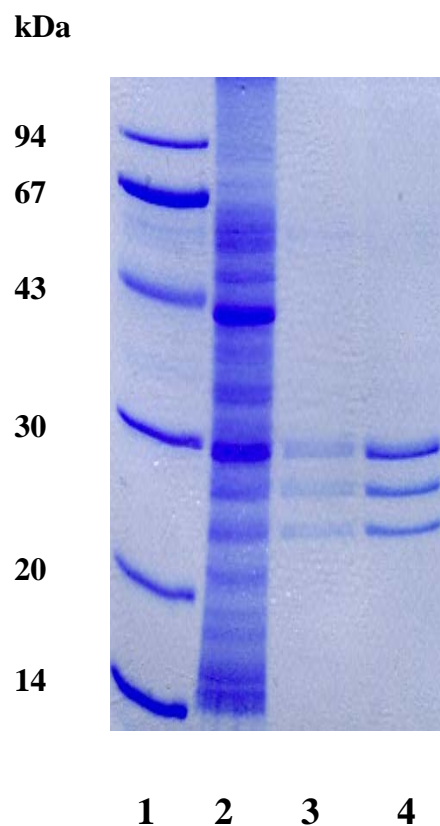


Abbildung 3.5: SDS-PAGE von solubiliertem und gereinigtem RC nach Ionenaustauschchromatographie. **Spur 1:** LMW, **Spur 2:** mit OG solubiliertes RC vor der Reinigung, **Spur 3** und **4:** gereinigtes und mit OM bzw. OG solubiliertes RC mit den drei Untereinheiten H (28,1 kDa), M (30,7 kDa), L (26,0 kDa).

3.2 Cytochrom c Assay zur Bestimmung der photochemischen Aktivität von RC

Zur Bestimmung der photochemischen Aktivität des nativen Photoreaktionszentrums wurde ein Cytochrom c Assay entwickelt (vgl. Kap. 2.2.11). Diese Methode wurde von einem Turn-over Assay abgeleitet, der bei Oettmeier et al. (1987) zur Bestimmung der Inhibitorkonstanten von PS-II-Herbiziden in isolierten Reaktionszentren eingesetzt wurde.

Die Funktionsweise des nun modifizierten Cytochrom c Assays wird in Abbildung 3.6 dargestellt. Zunächst wird das im Reaktionszentrum vorhandene Bakteriochlorophyll dimer durch Licht aktiviert, wodurch es zur anschließenden Oxidation des Kofaktors kommt. Der Elektronentransport in der L-Untereinheit des Reaktionszentrums (A-branch) verläuft vom Bakteriochlorophyll dimer über Bakteriophäophytin zum Bakteriochlorophyll und weiter zum Ubichinon in der Q_A -Bindungsstelle. Da das natürliche vorkommende Ubichinon während der Isolation und Reinigung verloren geht, wird die Aufgabe des Elektronenakzeptors von extern hinzugegebenem Ubichinon-0 übernommen (Jockers, 1992).

Die Photooxidation des Bakteriochlorophylls ist reversibel, d.h. zum Assayansatz gegebenes reduziertes Cytochrom c sorgt für die erneute Oxidation vom Bakteriochlorophyll dimer. Solange das Ubichinon-0 reduziert wird und genügend Cytochrom c in ausreichendem Maße vorhanden ist, wird der Elektronenfluß aufrecht erhalten.

Cytochrom c, welches ebenso wie das Ubichinon extern hinzugegeben wird, muß zuvor reduziert werden. Dies erfolgt mit Natriumdithionit (Abbildung 3.6, Schritt 1). Der in natürlichen Membranen vorkommende Cytochrom b/c Komplex ist in den isolierten Reaktionszentren nicht mehr vorhanden, daher kann oxidiertes Cytochrom c nicht wieder reduziert werden. Gemessen wird in diesem Assay die Absorption von Cytochrom c bei 550 nm (reduziertes Cytochrom c hat ein Absorptionsmaximum bei 550 nm). Für die Absorptionmessungen wird ein Photometer mit offenem Küvettenraum verwendet, wodurch die Beleuchtung der Reaktionszentren ermöglicht und der Start der photosynthetischen Reaktion gewährleistet ist.

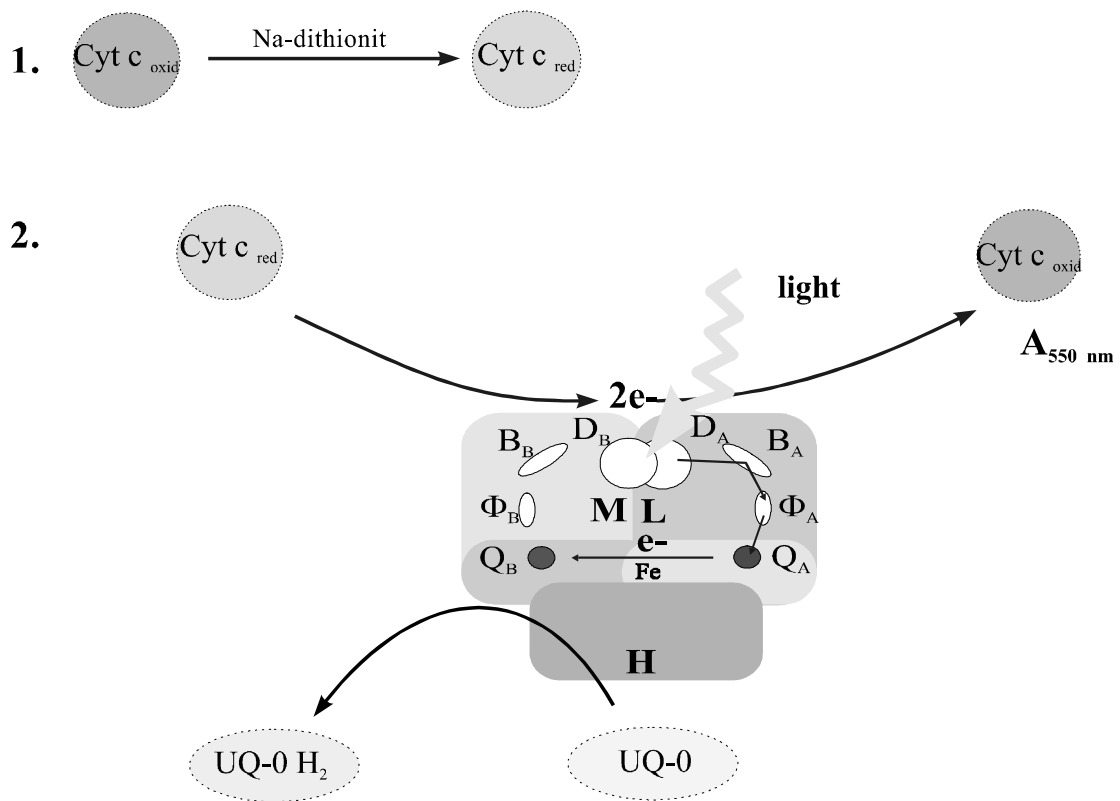


Abbildung 3.6: Prinzip des entwickelten Cytochrom c Assays zur Aktivitätsbestimmung von nativem Photoreaktionszentrum. Zuvor mit Natriumdithionit reduziertes Cytochrom c (Schritt 1) wird von lichtaktiviertem Reaktionszentrum oxidiert (Schritt 2). **D**: Bakteriochlorophylldimer, **B**: Bakteriopheophytin, **Φ**: Bakteriochlorophyll.

Es wurden bakterielle Photoreaktionszentren, die aus drei verschiedenen Reinigungen gewonnen wurden, für den Cytochrom c Assay verwendet. Die Reinigungen unterschieden sich in der Detergenzkonzentration, die während der Extraktion des Photoreaktionszentrums aus den Chromatophoren verwendet wurde (s. Kap. 3.1.2).

In der RC-Isolierung wurde eine LDAO-Konzentration von 0,25 %, 0,1 % und 0,08 % verwendet.

Mit Photoreaktionszentren, die aus der Reinigung mit 0,25 % LDAO gewonnen wurden, konnte der Cytochrom c Assay erfolgreich durchgeführt werden. In nachfolgender Abbildung 3.7 ist eine typische Reaktionskinetik für das Reaktionszentrum dargestellt.

Die Zugabe von Reaktionszentrum bewirkt eine sofortige Oxidation des Cytochrom c, bis nach ca. 60 Minuten ein Plateau erreicht wurde, das das Ende der Reaktion anzeigt. An diesem Punkt wird kein weiteres Cytochrom c oxidiert, da es entweder vollständig umgesetzt wurde oder kein Ubichinon-0 mehr vorhanden ist, auf den das RC Elektronen übertragen kann.

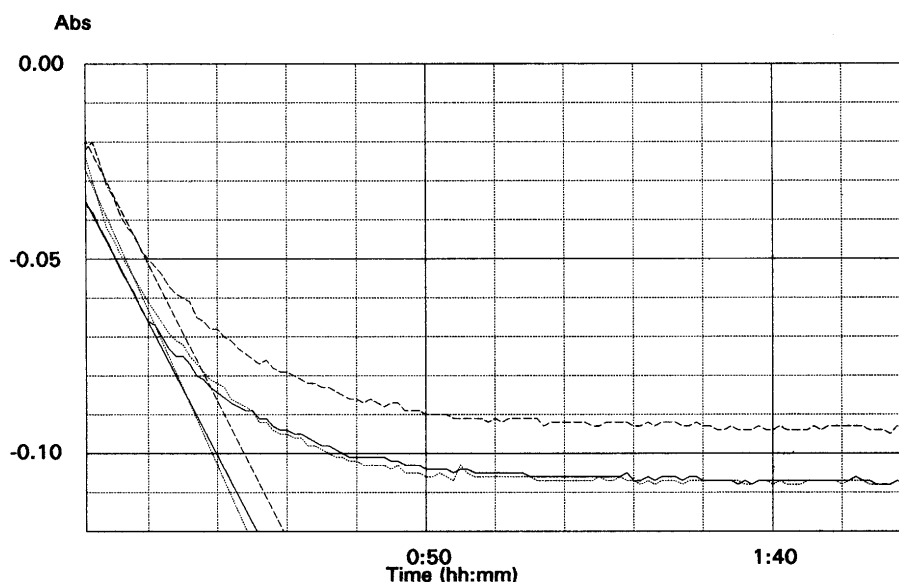


Abbildung 3.7: Cytochrom c Assay zur Bestimmung der photochemischen Aktivität von RC, mit 16 μM Cytochrom c, 29 μM Natriumdithionit, 10 μM Ubiquinon-0 und 47 nM RC.

Durch die Erhöhung der Ubichinon-0 Konzentration ließ sich eine Verstärkung der Cytochrom c - Oxidation erzielen (s. Abbildung 3.8). Diese wird dadurch hervorgerufen, daß zusätzliches Cytochrom c oxidiert wird. Der Verlauf der Cytochrom c Oxidation belegt deutlich die von Okamura (1992) beschriebene schnelle Reaktionskinetik des Elektronentransportes in Reaktionszentren (Okamura & Feher, 1992).

Die Aktivität der Reaktionszentren, die mit einer LDAO-Konzentration von 0,08 und 0,1 % LDAO gewonnen wurden, konnte nicht zufriedenstellend bestimmt werden. Die Oxidation des Cytochroms lief in einem 50 - 80 fach geringen Maße ab, so daß auch aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit die exakte Bestimmung der RC-Aktivität in diesen Fällen nicht möglich war.

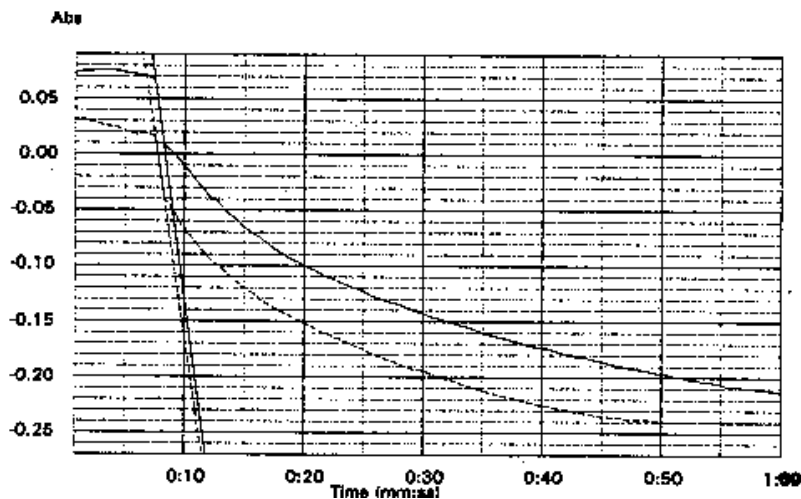


Abbildung 3.8: Cytochrom c Assay mit erhöhter Ubichinon Konzentration. Mit 30 μM Ubichinon-0, 16 μM Cytochrom c, 29 μM Na-dithionit und 47 nM RC.

Die erfolgreiche Durchführung des Cytochrom c Assays ist von intaktem RC abhängig. Reaktionszentren, die mit geringer Detergenzkonzentration isoliert und gereinigt wurden, zeigten im Wellenlängenspektrum keine Absorption des Kofaktors Bakteriophäophytin (s. Abbildung 3.4). Da Bakteriophäophytin für den Elektronentransport essentiell ist, kann der Cytochrom c Assay nicht funktionell ablaufen, wenn dieser Kofaktor fehlt.

Als wichtiges Resultat bleibt festzuhalten, daß die Beurteilung der photochemischen RC-Aktivität nur durch den Nachweis des Elektronentransportes erfolgen kann. Die alleinige Aufnahme des Absorptionsspektrums, wie sie von Rürup (1994) und Schnieder (1995) beschrieben wurde, läßt keine Aussage über die RC-Aktivität zu.

3.2.1 Cytochrom c Assay in Gegenwart von PS-II-Herbiziden

Die Durchführung dieses Assays ist in Kap. 2.2.11 beschrieben worden. Die Messung der Cytochrom c Rückoxidation durch das Reaktionszentrum wurde in Gegenwart von Photosystem-II (PS-II) Inhibitoren, wie Terbutryn (41 nM), Terbuthylazin (43 nM) und Atrazin (46 nM) durchgeführt. In Abbildung 3.9 sind die Reaktionskinetiken für die Cytochrom c Oxidation dargestellt, jeweils durch natives oder inhibiertes Reaktionszentrum. Läuft der Aktivitätsassay in Gegenwart von Herbiziden ab, so kann eine geringere Oxidationsrate beobachtet werden. Im Falle des Terbuthylazins erfolgte die Anfangsreaktion sehr langsam, und im Vergleich zur Kinetik mit dem nativen Reaktionszentrum ist nach einer Stunde nur etwa 53 % des Cytochroms rückoxidiert. Ähnlich verhält sich die Reaktion in Gegenwart des Herbizids Atrazin. Auch hier wurde eine langsamere Rückoxidation beobachtet. Nach einer Reaktionsdauer von einer Stunde lagen nur etwa 80 % des in der gleichen Zeit vom nativen Reaktionszentrum rückoxidierten Cytochrom c vor.

Durch Aufnahme von Wellenlängenspektren nach dem Cytochrom c Assay konnte die Bindung der PS-II Inhibitoren an das RC nachgewiesen werden. Cytochrom c hat im reduzierten Zustand ein Absorptionsmaximum bei 550 nm. Nach dem Kompetitionsassay mit Pestiziden wie Terbuthylazin und Atrazin konnte diese Absorption weiterhin gemessen werden.

Nach Durchführung des Cytochrom c Assays wurde ein Wellenlängenspektrum der Reaktionsansätze aufgenommen (s. Abbildung 3.10). Hierin zeigte sich, daß Terbuthylazin das RC am stärksten inhibierte. Reduziertes Cytochrom c hat bei einer Wellenlänge von 550 nm ein Absorptionsmaximum. Nach Rückoxidation nimmt dieses Maximum ab. Je höher also die Absorption bei 550 nm nach dem Aktivitätsassay, desto stärker wurde das Protein inhibiert. Im Falle der hier verwendeten PS-II Herbizide stellte sich eine abnehmende Inhibitorwirkung vom Terbuthylazin über Atrazin und Terbutryn heraus.

Die Inhibierung des Reaktionszentrums läßt sich mit der Bindung der PS-II Herbizide an die Q_B -Bindungsstelle erklären. Sobald die Q_B -Bindungsstelle durch die Pestizide blockiert ist, kann kein weiterer Elektronentransport im RC und somit die Oxidation des Cytochrom c erfolgen (Stein et al., 1984).

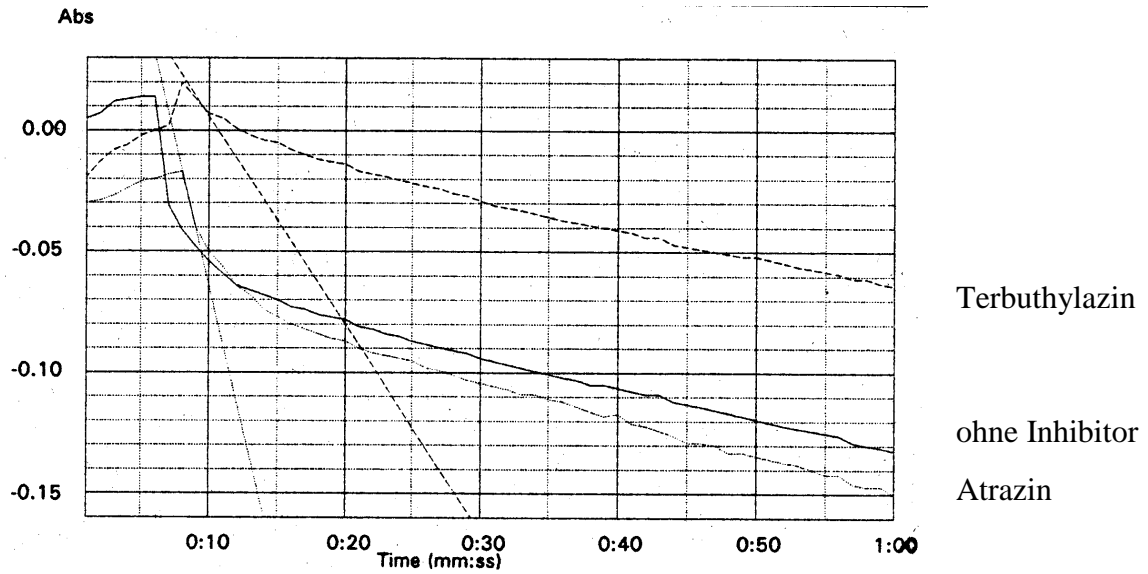


Abbildung 3.9: Cytochrom c Assay zur Bestimmung der RC-Inhibierung durch s-Triazine. Im Assay wurden 30 μM Ubichinon-0, 16 μM Cytochrom c, 47 nM RC und 46 nM Atrazin sowie 44 nM Terbutylazin eingesetzt.

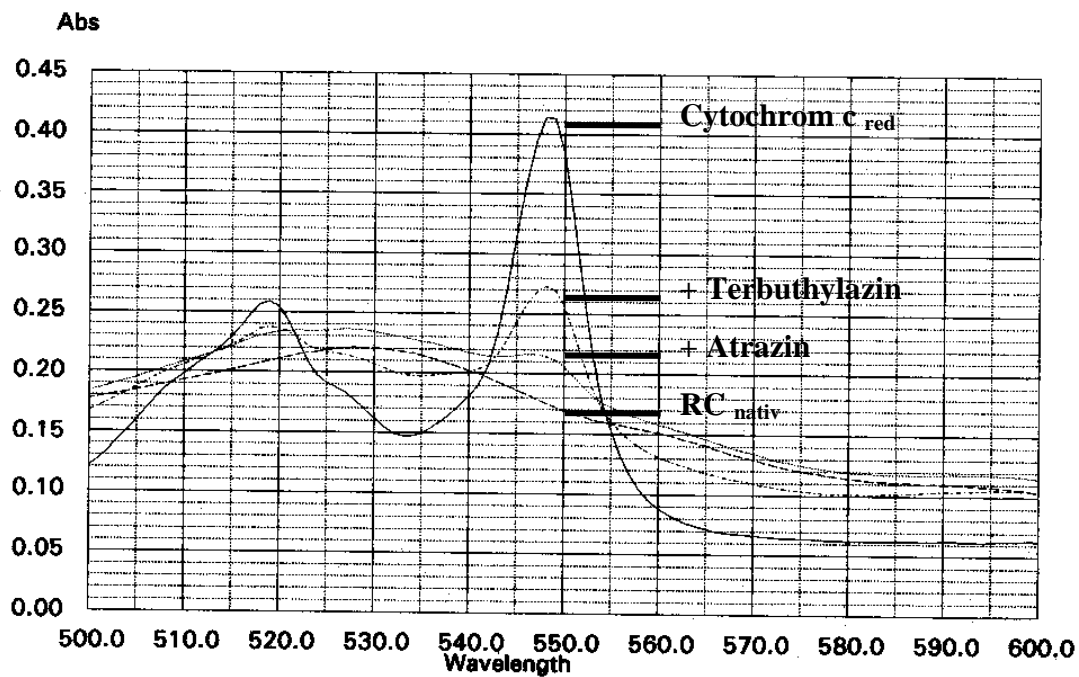


Abbildung 3.10: Absorptionsspektrum von 500 - 600 nm des Cytochrom c vor und nach der Rückoxidation durch Reaktionszentren. Von oben nach unten: reduziertes Cytochrom c, Cytochrom c nach Rückoxidation in Gegenwart von Terbutylazin, Atrazin und nativem Reaktionszentrum.

3.3 Herstellung von Liposomen

Liposomen sind durch verschiedene Methoden herstellbar (s. Abbildung 3.11). So unterscheidet man zwischen Präparationen, die die mechanische Dispersion ausnutzen („hand-shaken-vesicles“, Gefriertrocknung, Sonification, pH-induziert Vesikulation u.a.), oder solchen, die die Dispersion durch Lösungsmittel erreichen (Ethanol-Injektion, Ether-Injektion) bzw. die Detergenz-Solubilisierung (Detergenz-Dialyse). Je nach verwendeter Präparationstechnik bilden sich die unterschiedlichen Liposomenarten.

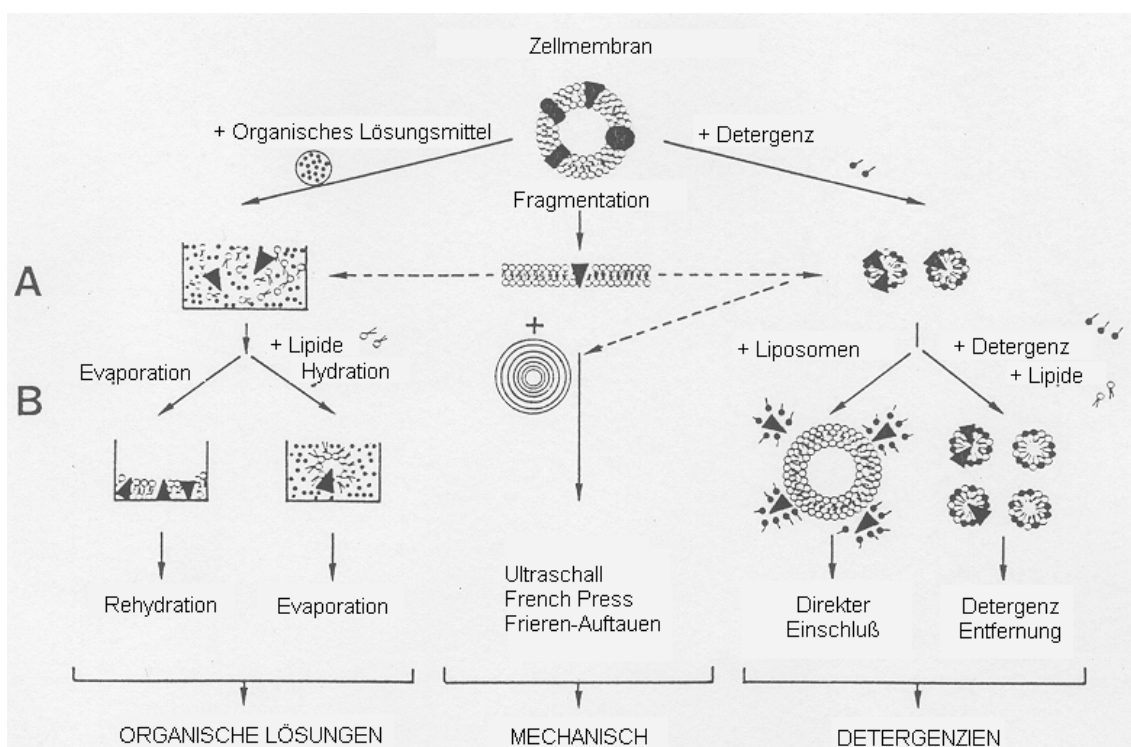


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung verschiedener Strategien zur funktionellen Überführung von Membranproteinen in Liposomen (Rigaud et al., 1995).

Aus gereinigten zellulären Membranen von eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen können Membranproteine als gemischte Mizelle mit Detergenzien isoliert werden, in organischen Lösungsmitteln gelöst sein oder als Aggregate und Membranfragmente in wässriger Umgebung vorliegen (Abbildung 3.11 A). Sobald die Membranproteine isoliert und gereinigt sind, können sie mit einem Überschuss an Phospholipiden versetzt werden

und in Liposomen rekonstituiert werden. Drei Hauptstrategien werden dabei unterschieden (Abbildung 3.11 B): Rekonstitutionen vermittelt durch organische Lösungsmittel ("reverse-phase evaporation", Rehydration der Lipid-Protein Filme), mechanische Methoden (Ultraschall, French Press, Einfrieren/Auftauen), Detergenzien vermittelte Rekonstitution (Detergenz Entfernung, Verdünnung oder direkte Inkorporation)

Ein Ziel in der Liposomenpräparation bestand in der möglichst einfachen, schnellen und reproduzierbaren Herstellung von Vesikeln. Dabei wurden Einflüsse auf die Liposomenbildung untersucht, die nach Präparationsmethoden von Gabellini et al., (1989), Jockers (1992), und Schnieder (1995) erhalten wurden.

In Anlehnung an weitere zukünftige Anwendungsgebiete der Liposomen wurde dabei großer Wert auf die Präparation von mechanisch und zeitstabilen Vesikeln gelegt.

Diesen Anforderungen entsprechen MLV, in die sehr effektiv lipidlösliche Verbindungen oder Membranproteine direkt in die Bilayer eingebaut werden können. Die Zugänglichkeit und damit der Nachweis der in die Membranen eingebauten Proteine beschränkt sich allerdings nur auf den äußeren Bilayer. Quantifizierungen und Bestimmungen von Protein-Lipid-Wechselwirkungen gestalten sich daher problematisch. Vorteilhaft erweist sich die Multilamellarität andererseits für eingeschlossenes wäßriges Material (z.B. Markersubstanzen), da diese Substanzen nur sehr langsam und gleichmäßig freigesetzt werden. MLVs besitzen gegenüber LUVs und IUVs jedoch nur ein kleines Innenvolumen und schließen somit ein geringes wäßriges Kompartiment ein. Dieses läßt sich aber durch die Verwendung von Phospholipidgemischen vergrößern, wobei eine Komponente ein negativ geladenes Phospholipid sein muß. Dies hat zur Folge, daß die angrenzenden Membranschichten voneinander abgestoßen werden. (Zumbuehl et al., 1981).

Von Phillipott et al., 1983, wird die Herstellung von IUV und LUV mittels Detergenz-Dialyse-Technik beschrieben. Diese eignen sich sehr gut für den Einbau speziell von Membranproteinen, deren biologische Aktivität nicht eingeschränkt wird. Im Vergleich zu IUV und LUV ist das Innenvolumen wesentlich größer. Dabei ist jedoch zu beachten, daß die mechanische Stabilität und das Vermögen, wäßrige Substanzen während der Dialyse zurückzuhalten, aufgrund des einzelnen Bilayers stark eingeschränkt sind.

Die Detergenz-Dialyse-Technik erschien im Vergleich von Liposomenarten und Präparationsmethoden als geeignete Präparationsmethode, denn das gereinigte Reaktionszentrum lag bereits in Detergenz vor, welches in anderen Präparationen die Bildung von Liposomen beeinträchtigen könnte.

Nicht zuletzt muß als weiterer Vorteil für die Reproduzierbarkeit die Möglichkeit gesehen werden, über Art und Konzentration des Detergenz sowie Dialysevolumens die Größe von Liposomen einzustellen, was eine höhere Größenhomogenität bewirkt.

Aufgrund dieser Tatsache wurde für die Liposomenherstellung die Dialysetechnik angewandt. Erläuterungen zum Prinzip der Dialysetechnik sollen daher im folgenden dargelegt werden.

3.3.1 Detergenz-Dialyse-Technik

Über Vermittlung durch Detergenz werden Phospholipide in engen Kontakt zur wäßrigen Phase gebracht, was bedingt, daß sich die Phospholipidmoleküle mit dem Detergenz assoziieren. Dies bewirkt die Abschirmung der hydrophoben Teile der Moleküle von Wasser. Die sich bildenden Strukturen werden als Mizellen bezeichnet. Gestalt und Größe der Mizellen werden von der chemischen Natur des Detergenz, seiner Konzentration und der Lipidkomposition beeinflusst (Straley et al. 1973).

Detergenzien bilden in Abwesenheit von Lipiden in Wasser Mizellen. Voraussetzung hierfür ist jedoch eine entsprechend hohe Konzentration, die als kritische Mizellkonzentration (CMC) bezeichnet wird. Die CMC ist für unterschiedliche Detergenzien sehr verschieden. So beträgt sie z.B. für n-Heptylglucopyranosid 70 mM, für n-Octylglucopyranosid 23 mM, für Triton X-100 0,24 mM und für Natriumcholat 14 mM (Calbiochem, 1988). Detergenzien sind im Gegensatz zu Phospholipiden sowohl in Wasser als auch in organischem Medium gut löslich. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Detergenzmolekül der wäßrigen Phase und der Lipidumgebung der Mizelle. Anhand der CMC ist die Position des Gleichgewichtes zu erkennen, woraus sich ableiten läßt, welches Detergenz mit Dialyse durch Verringerung der Detergenzkonzentration in der wäßrigen Phase leicht aus den gemischten Mizellen entfernt werden kann. Hohe CMC-Werte weisen eine Verschiebung des Gleichgewichtes zur Lösung hin aus und bedeuten somit, daß sich das Detergenz leicht aus der Lipidmembran durch Dialyse herauslösen läßt.

Es ist jedoch zu konstatieren, daß membransolubilisierende Detergenzien eine höhere Affinität zu Phospholipidmembranen aufweisen als zu reinen Detergenzmizellen. Daraus folgt, daß bei steigender Zugabe von Detergenz mehr und mehr Detergenz in die Mizelle bis zu dem Punkt eingebaut wird, wo aus der Lamelle eine sphärische mizellare-Phase entsteht. Eine weitere Zugabe bedingt eine Reduktion der Mizellengröße.

Weil Detergenzien mit geringerer CMC eine höhere Affinität zu Phospholipidmembranen aufweisen, wird in der Literatur die Verwendung von Detergenzien mit hoher CMC empfohlen, da kinetische Faktoren eine sehr wichtige Rolle spielen. Aufgrund der höheren Konzentration des Anteils in der wäßrigen Phase bauen sich Detergenzien mit hoher CMC weitaus zügiger in die Membran ein (New, 1990).

Gemeinsam ist allen Methoden, die Detergenzien für die Liposomenpräparation verwenden, der Detergenzaustausch aus der vorgebildeten gemischten Mizelle, die Phospholipide enthält, währenddessen sich spontan unilamellare Vesikel bilden (Kagawa et al., 1971).

3.3.1.1 Dialysetechnik zur Liposomenpräparation mit OGP

Nach der hier eingesetzten Detergenz-Dialyse-Technik läuft die Präparation der Liposomen in folgenden Schritten ab: Lösung der Phospholipide, Trocknung und Filmbildung der Phospholipide, Dispersion mittels Detergenz, Ultraschall, Dialyse zur Vesikelbildung und Zentrifugation der entstandenen Liposomen.

Phospholipidsuspension in organischem Lösungsmittel

Durch das Lösen der Phospholipide in einem organischen Lösungsmittel lassen sich vor allem bei Phospholipidgemischen die verschiedenen Komponenten komplett und homogen mischen.

Als Lösungsmittel für die Phospholipide eignete sich am besten Chloroform. Es wurde im Verhältnis 1:1 (Lösungsmittel/Phospholipid) zur vollständigen Lösung eingesetzt.

Trocknung und Filmbildung der Phospholipide

Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bei einer Temperatur oberhalb des T_m abgezogen. Dabei bildete sich ein sehr dünner Lipidfilm. Dieser Prozeß wurde durch hohe Rotationsgeschwindigkeit, großes Gefäßvolumen und langsame Erzeugung des Vakuums (Abdampfen erfolgte zwischen 600 - 10 mbar) unterstützt. Lösungsmittelreste konnten über Nacht in einer Hochvakuumanlage oder innerhalb von 2 bis 3 Stunden unter N_2 -Gas komplett entfernt werden.

Die passive Durchlässigkeit der Membran und die Wahrscheinlichkeit der Porenbildung ist wegen der verstärkten Energie- und Dichtefluktuatation bei Temperaturen über dem T_m -Wert des Phospholipids heraufgesetzt. Deshalb wird die Liposomenbildung und Rekonstitution in der Regel über dem T_m -Wert durchgeführt (Rieger et al., 1986).

Dispersion mit Detergenz

Die mixed-mizelle-Bildung erfolgte durch anschließendes Ablösen des Lipidfilmes mit Detergenz und Puffer (Lipidisierung). Tris/HCl wurde als Puffer gewählt, da dieser schon zum Lösen des RC verwendet wurde.

Das für die Solubilisierung notwendige Detergenz sollte die Stabilität des einzubauenden RC nicht beeinträchtigen, und die Größe der Liposomen sollte nicht vom Verhältnis Detergenz/Phospholipid abhängig sein, da das RC bereits in detergenzhaltigem Puffer vorlag. Nach Berücksichtigung dieser Aspekte wurde das nichtionische Detergenz *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid (OGP) gewählt, denn nach Jockers (1992) verschlechtert das Detergenz Triton X-100 die Stabilität des Reaktionszentrums, und Cholat bildet die Liposomen in Abhängigkeit vom Verhältnis Detergenz/Phospholipid (Calbiochem. Biochemicals, 1988). Die durch Dialyse von Alkylglucosid-mixed-mizellen gebildete Größe der Liposomen ist abhängig von der Kettenlänge des individuellen Detergenzmoleküls (New, 1990). Das Glycopyranosid OGP hat einen hohen CMC Wert (23 mM) und ermöglicht dadurch eine rasche Dialyse. Die sich bildenden Liposomen sollen einen Durchmesser von etwa 200 nm aufweisen. Doch bei Gebrauch eines Detergenzgemisches aus OGP und Heptylglucosid (CMC = 65 mM), das zur Bildung sehr kleiner Vesikel neigt, verringert sich die Größe um ca. 100 nm (Dianorm, Produktbeschreibung).

Mit dem zur Solubilisierung von Phospholipiden von Gabellini et al. (1989) angegebenen Verhältnis Detergenz/Lipid von 5:1 konnten keine klaren mixed-mizelle-Lösungen erhalten werden. Erst durch die 10- bis 15fache molare Masse an Detergenz wurden völlig klare Suspensionen erzeugt. Bei Verwendung geringerer Detergenzkonzentrationen aggregieren die Liposomen (Schnieder, 1995), und sie müssen durch Zentrifugation abgetrennt werden.

Dialyse zur Liposomenbildung

Zur Entfernung des Detergenz und zur Bildung des Bilayers mußte die mixed-mizell-Lösung dialysiert werden. Die Dialyse kann dabei die Liposomengröße und Lamellarität stark beeinflussen. Um daher eine kontrollierte Dialyse durchzuführen, müssen die Dialysebedingungen wie Puffer, Volumen, Durchmischung und Temperatur konstant gehalten werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Liposomen wurden mittels verschiedener Dialysemethoden hergestellt. Das Detergenz wurde zum einen mittels Dialyseschlauch, zum anderen mit einem Minilipoprepgerät (Dianorm, München) aus der mixed-mizell Suspension entfernt. Das Verhältnis von Dialysevolumen zu dialysierender Lösung lag bei 100:1. Das Minilipoprepgerät weist ein konstantes Innenvolumen auf, und die Dialysekammer rotiert während der Dialyse gleichmäßig im Puffer (s. Abbildung 3.12). Die Dialyse zur Liposomenpräparation konnte aufgrund des großen Pufferverhältnisses erfolgreich auf eine Zeit von 15 Stunden verkürzt werden.

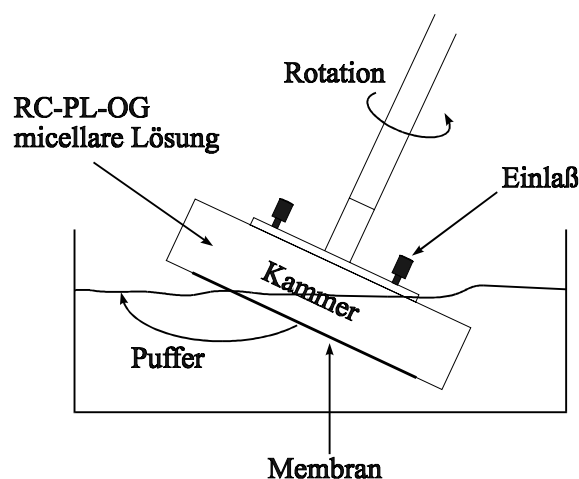


Abbildung 3.12: Rotierende Dialysezelle (Mini-Lipoprep der Fa. Dianorm) zur kontrollierten Dialyse wäßriger Lösungen von Phospholipid-Detergenz-Mischmizellen.

3.3.1.2 Dialysetechnik zur Liposomenpräparation mit synthetischen Zuckerestern

Die synthetischen Zuckerester 6-*O*-Octanoyl- β -Glucose (OG) und 6-*O*-Octanoyl- β -Mannose (OM) konnten erstmals anstelle des zuvor verwendeten kommerziellen Detergenz *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid (OGP) erfolgreich für die Liposomenpräparation mittels Detergenz-Dialyse-Technik (s. Kap. 2.3.2) eingesetzt werden. Sie wiesen dabei die besonderen Vorzüge eines Zuckertensids auf. Diese bestehen in der guten Solubilisationswirkung und der leichten Abtrennbarkeit aus Solubilisaten durch z.B. Dialyse oder Chromatographie.

Liposomenherstellung:

Zur Liposomenpräparation mußten die Lipide zunächst mit OG oder OM solubilisiert werden. Hierzu eignete sich ein molares Verhältnis von Zuckerester zu Lipid von 20 : 1. Nachdem die Lipide bei einer Temperatur von 40 °C vollständig solubilisiert waren und die Lösung klar erschien, wurde das Zuckertensid durch Dialyse entfernt. Die Dialyse erfolgte gegen einen 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8.0 für 24 h und RT in einem Minilipoprepperät.

Die Liposomen konnten schließlich mit Hilfe einer Extrudierungseinheit auf eine homogene Größenpopulation mit Vesikeldurchmessern zwischen 150 und 200 nm eingestellt werden.

3.3.2 "Freeze-Thaw"-Methode zur Präparation von Calcein-Liposomen

Zur Untersuchung der Liposomenstabilität wurden Vesikel mit einer eingeschlossenen Markierungssubstanz benötigt. In diesem Falle wurde Calcein (3,6-Dihydroxy-2,3-bis[N,N'-di(carboxymethyl)-aminomethyl]fluoran) als Fluoreszenzmarker verwendet. Als geeignete Methode zur schnellen Liposomenpräparation erwies sich das "Freeze-Thaw"-Verfahren (vgl. Kap. 2.3.6). Neben den Lipiden DMPC und DPPC wurden alle ungewöhnlichen Phospholipide zur Liposomenherstellung herangezogen. Der dünne Lipidfilm ließ sich nach der in Kap. 2.3.1 beschriebenen Methode herstellen. Eine schnellere Präparation dieses Lipidfilmes wurde durch das Lösen von zunächst 1 mg des jeweiligen Phospholipids in 500 μ l Chloroform und durch anschließendes Trocknen mit Stickstoff und mindestens vierstündigem Trocknen im Gefriertrockner erreicht. Schließlich wurde der Phospholipidfilm in einer Lösung von 100 mM HEPES/NaCl, pH 7,5 und 100 mM Calcein gelöst und zur vollständigen Homogenisierung in einem Ultraschallbad beschallt.

Die Suspension wurde 5 mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei Temperaturen über der Hauptumwandlungstemperatur wieder aufgetaut, bevor sie durch einen Polycarbonatfilter mit einem Porendurchmesser von 200 nm bei $T > T_m$ extrudiert wurde.

3.3.2.1 Gelfiltration von Calcein-Liposomen

Im Anschluß an die Liposomenpräparation mußten die Calcein-Vesikel von nicht eingeschlossenem Fluoreszenzmarker gereinigt werden. Hierzu erwies sich die Gelfiltration über eine Sephacryl S-300 Säule als erfolgreich. In Abbildung 3.13 ist das Elutionsprofil bei $\lambda = 280$ nm einer Säulenchromatographie von PC-14-Calcein-Liposomen gezeigt. Die Gelfiltrationssäule wurde mit 2 ml der frisch extrudierten Vesikelsuspension beladen. Während Liposomen mit eingeschlossenem Calcein aufgrund ihrer Größe schon im Säulenausschlußvolumen eluiert wurden, wird der freie Fluoreszenzmarker erst viel später von der Säule gespült.

Die Qualität der Gelfiltration und die damit verbundenen unterschiedlichen Reinigungsausbeuten scheinen abhängig zu sein von den jeweils verwendeten

Phospholipiden. Einen eindeutigen Elutionspeak der Calcein Liposomen und eine deutliche Trennung von dem freien Fluoreszenzmarker war im Falle der Phospholipide PC-14, PE-4, PG-14, PG-4, PA-4 und DPPC zu erkennen. Die aus den Phospholipiden PE-14, PS-14, PS-4 und PA-14 bestehenden Calcein-Liposomen zeigten einen deutlich geringeren Elutionspeak der Liposomen. Exakte Aufschlüsse über die Phospholipidausbeuten der Gelfiltration von Calcein-Liposomen erbrachte die anschließend durchgeführte Phosphatbestimmung (s. Kap. 3.3.2.2).

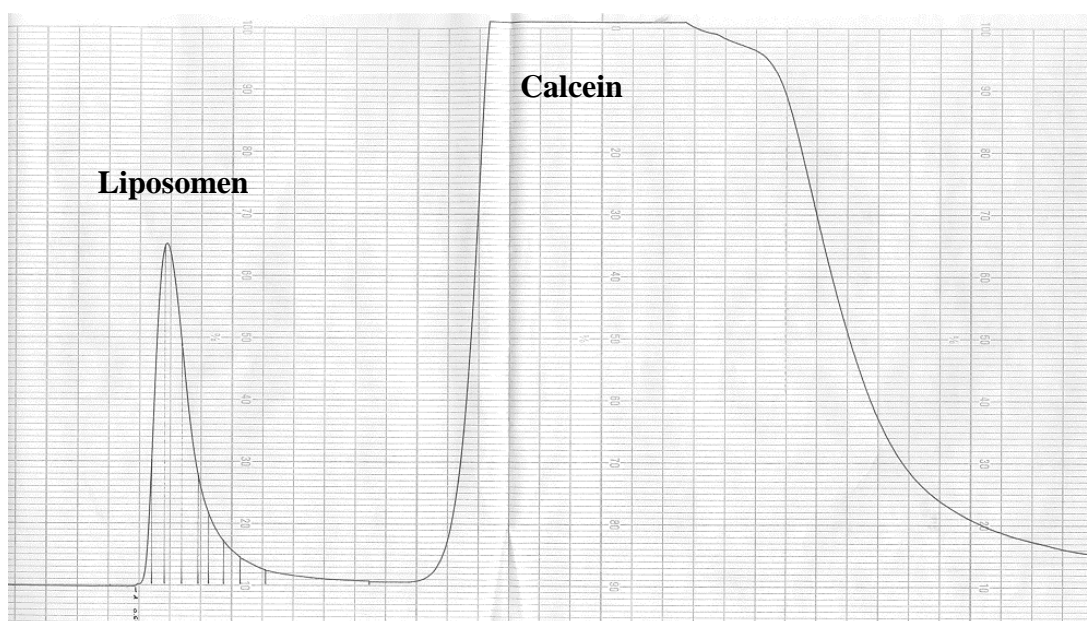


Abbildung 3.13: Elutionsprofil einer Gelfiltration (Sephacryl S-300) von 2 ml einer PC14-Liposomenlösung (1 mg Lipid/ml) mit Calceineinschluß. Flußrate: 0,5 ml/min, Absorptionsmessung im Durchflußphotometer bei $\lambda = 280$ nm.

3.3.2.2 Phosphatbestimmung bei Calcein-Liposomen

Zur Bestimmung der Phospholipidkonzentration in Liposomen wurde eine Phosphatanalyse nach einer modifizierten Methode von Barlett (1959) durchgeführt (s. 2.2.6.). Durch diese Untersuchung konnte zum einen gezeigt werden, wieviel des eingesetzten Phospholipids in die Liposomen eingebaut wurde, zum anderen konnte gewährleistet werden, daß gleiche Liposomenkonzentrationen für die weiteren Analysen, wie z.B. die Stabilitätsuntersuchung, verwendet wurden.

Für die quantitative Auswertung wurde zunächst eine Kalibrierkurve mit Phosphor-Standard suspensionen angefertigt (s. Abbildung 3.14). Die Berechnung der Lipidkonzentrationen erfolgte über die Regressionsgeradengleichung der Standardkurve.

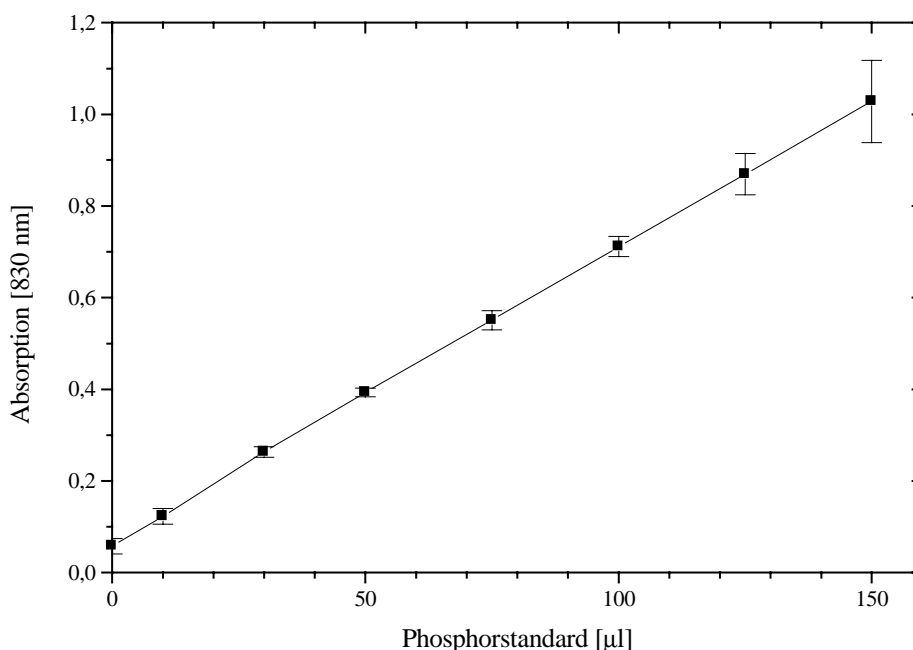


Abbildung 3.14: Kalibrierkurve für die Phospholipidbestimmung in den Liposomen.

Nach der Liposomenreinigung über Sephacryl S-300 (s. Kap.3.3.2.1) wurden in PC-14, PE-4, PG-14 und PG-4-Liposomen zwischen 22,4 und 26,8 % des in der Präparation eingesetzten Phospholipids wiedergefunden (Tabelle 3.3). Etwas geringer war die Ausbeute mit 16,8 bzw. 16,4 % bei PA-4- und DPPC- Vesikeln. Die Calcein-Liposomen, die mit den o.g. Phospholipiden hergestellt wurden, ließen sich auch gut mittels Gelfiltration reinigen und zeigten einen eindeutigen Elutionspeak.

Im Falle der Phospholipide PS-14, PS-4, PC-4 und PA-14 konnten nach der Gelfiltration nur geringe Phospholipidausbeuten (zwischen 2,4 und 7,2 %) ermittelt werden (Tabelle 3.3). Die geringen Ausbeuten korrespondieren mit dem Reinigungsverlauf der Gelfiltration, da im Elutionsprofil nur ein niedriger Calcein-Liposomen Peak beobachtet wurde. Eine mögliche Ursache für die hohen Phospholipidverluste könnte in der Extrudierung der Calcein-Liposomen durch die Polycarbonatmembran liegen. Es ist

anzunehmen, daß sich während dieses Vorganges Liposomen auf der Membran abgelagert haben bzw. an ihr gebunden wurden. Dafür spricht die deutliche Verfärbung der Filtermembran nach der Extrudierung.

Tabelle 3.3: Zusammenstellung der Ergebnisse für die Phospholipidbestimmung. Eingesetzt waren jeweils 1 mg/ml Phospholipid für die Liposomenpräparation mittels "Freeze-Thaw"-Methode. Nach Extrudierung erfolgte die Gelfiltration der Calcein-Liposomen an Sephacryl S-300. Die positiven (+) und negativen (-) Symbole beurteilen den Elutionsverlauf der Gelfiltration.

Lipide	Phospholipid-Konzentrationen			
	[mM]	[mg/ml]	Einbaurate [%]	Gelfiltration
PC-14	0,328	0,256	25,6	++
PC-4	0,092	0,072	7,2	++
PE-14	0,16	0,118	11,8	++
PE-4	0,324	0,239	23,9	++
PS-14	0,031	0,024	2,4	--
PS-4	0,074	0,057	5,7	+-
PG-14	0,363	0,268	26,8	++
PG-4	0,304	0,224	22,4	++
PA-14	0,052	0,036	3,6	--
PA-4	0,241	0,168	16,8	++
DPPC	0,222	0,164	16,4	++

3.3.3 Liposomenpräparationstechnik unter Verwendung synthetischer Zuckerester und einer immobilisierten Lipase

Während dieser Liposomenpräparation wird der Zuckerester 6-*O*-Octanoyl- β -glucose in sehr kurzer Zeit durch eine immobilisierte Lipase komplett hydrolysiert, und es kommt zur spontanen Bildung von Liposomen. Ein Vorteil der Methode besteht in der kurzen Präparationszeit. Langwierige Dialysen zur Entfernung des Detergenzes sind nicht mehr notwendig, so daß die Vesikel schon nach wenigen Stunden gewonnen und durch einfache Sedimentation oder Zentrifugation von der Matrix mit der immobilisierten Lipase getrennt werden können. Ein weiterer Vorteil ist die Verwendung der Lipase, die den Zuckerester unter milden Reaktionsbedingungen in den Zucker und die freie Fettsäure spaltet. Der Zuckerester verliert dadurch seine Eigenschaft als Detergenz, und es wird eine detergenzfreie Liposomensuspension erhalten. Durch die Extrudierung dieser Suspension kann eine homogene Größenverteilung der Liposomen eingestellt werden. Mit dieser Methode lassen sich Membranproteine bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C und in einem 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 Puffer innerhalb von nur zwei Stunden schonend in Liposomen rekonstituieren.

3.3.3.1 Lipasenscreening

Die Vorstudien zur Etablierung dieses Systems beinhalteten die Suche nach einer geeigneten Lipase und einer Matrix, auf welcher das Enzym immobilisiert werden konnte.

Nach Betrachtung der Umsatzrate und der Reaktionszeit stellten sich die auf Octyl-Sepharose immobilisierte Lipase OF aus *Candida rugosa* und die auf aktiviertem Silicagel immobilisierte BSL-Lipase aus *Bacillus species* als ideales Enzym für die Anwendung in der Rekonstitution heraus (s. Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Hydrolyse von 6-*O*-Octanoyl- β -Glucose (OG) durch immobilisierte Lipasen.

Lipase	Matrix	Umsatz (%)		
		1h	2h	3h
Lipase OF ^a	Octyl-Sepharose	85	100	-
Lipase OF ^a	Q-Sepharose	3	7	10
Lipase OF ^a	Silica-Gel	40	75	90
BSL ^a	Silica-Gel	80	100	-
CAL-B-SP435 ^b	Polyacrylharz	38	77	80
CAL-A,B-SP382 ^b	Polyacrylharz	30	62	76
Lipozyme ^b	Doulite 568	47	60	74

Zugabe von ^a100 mg/ml feuchter immobilisierter oder ^b20 mg/ml trockener immobilisierter Lipase. Reaktionsbedingungen: 9.2 mg/ml OG in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 bei 40 °C.

Die Lipasen SP485, SP382, Lipozym, OF-Octyl-Sepharose, OF-Q-Sepharose konnten jedoch wegen der Hydrophobizität der Matrix nicht für die Liposomen- und Proteoliposomenpräparation verwendet werden. Da Liposomen und Membranproteine an die Matrix adsorbierten, konnten sie nach der Zuckeresterhydrolyse nicht mehr vom Träger der Lipase abgetrennt werden. Für die Liposomenpräparationsmethode mittels Lipase und synthetischen Zuckerestern eignete sich ausschließlich die BSL-Lipase auf aktiviertem Silicagel. Nach Inkubation der Reaktionslösung konnten Liposomen und Proteoliposomen schon nach kurzer Zentrifugation von der Säulenmatrix isoliert werden.

3.3.3.2 Dünnschichtchromatographie

Den Nachweis für die Hydrolyse des Zuckeresters erbrachte die Dünnschichtchromatographie (s. Kap. 2.2.7). Neben einem OG-Standard wurden während der Reaktion Proben auf die DC-Platten aufgetragen und in einer Lösung aus Essigsäureethylester:Methanol:H₂O 80:20:5 (v/v/v) entwickelt. Durch Besprühen der entwickelten DC-Platten mit einer H₂SO₄/Vanillin-Lösung und Erhitzen auf 120 °C konnten die Edukte und Produkte sichtbar gemacht werden (s. Abbildung 3.15). In der Abbildung ist die Kontrolle der Zuckeresterlipolyse mittels DC dargestellt. Die Lipase aus *Bacillus sp.* konnte dabei 6-*O*-Octanoyl- β -glucose innerhalb von 1 Stunde komplett in die freie Fettsäure und den Zucker spalten.



1 2 3

Abbildung 3.15: Dünnschichtchromatographie der Zuckeresterlipolyse von 6-*O*-Octanoyl- β -Glucose. Standard (1), vor (2) und nach einstündiger Hydrolyse durch die Lipase von *Bacillus sp.*(3).

3.3.3.3 HPLC

Um zu überprüfen, ob während der Zuckeresterhydrolyse eine Reaktion zwischen der Lipase aus *Bacillus sp.* und dem Phospholipid stattfindet, wurde eine HPLC durchgeführt (s. Kap. 2.2.8).

Die Analyse des Lipids DMPC und die der DMPC-Liposomen erfolgte dabei auf einer Nucleosil 100 Si Säule. Nach der HPLC-Analytik wurde das Elutionsprofil eines DMPC Standard Phosphatidylcholins mit dem der DMPC-Liposomen, die nach der Liposomenpräparation erhalten wurden, verglichen. Die DMPC-Liposomenprobe mußte

dabei zunächst für die HPLC vorbereitet werden. Nach der Extraktion des Phospholipids mit Chloroform:Methanol (2:1) wurde einige Male mit Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen und schließlich 20 µl des extrahierten und konzentrierten Phospholipids auf die HPLC aufgetragen. Als mobile Phase erwies sich eine Mischung aus Isopropanol:n-Hexan:Wasser (8:6:5, v/v/v) als geeignet. Abbildung 3.16 zeigt die HPLC-Chromatogramme des DMPC Standards (A) und der DMPC-Liposomen (B). Da die Retentionszeiten der Phospholipide identisch sind, kann davon ausgegangen werden, daß keine Reaktion zwischen der Lipase und den Lipiden stattfand.

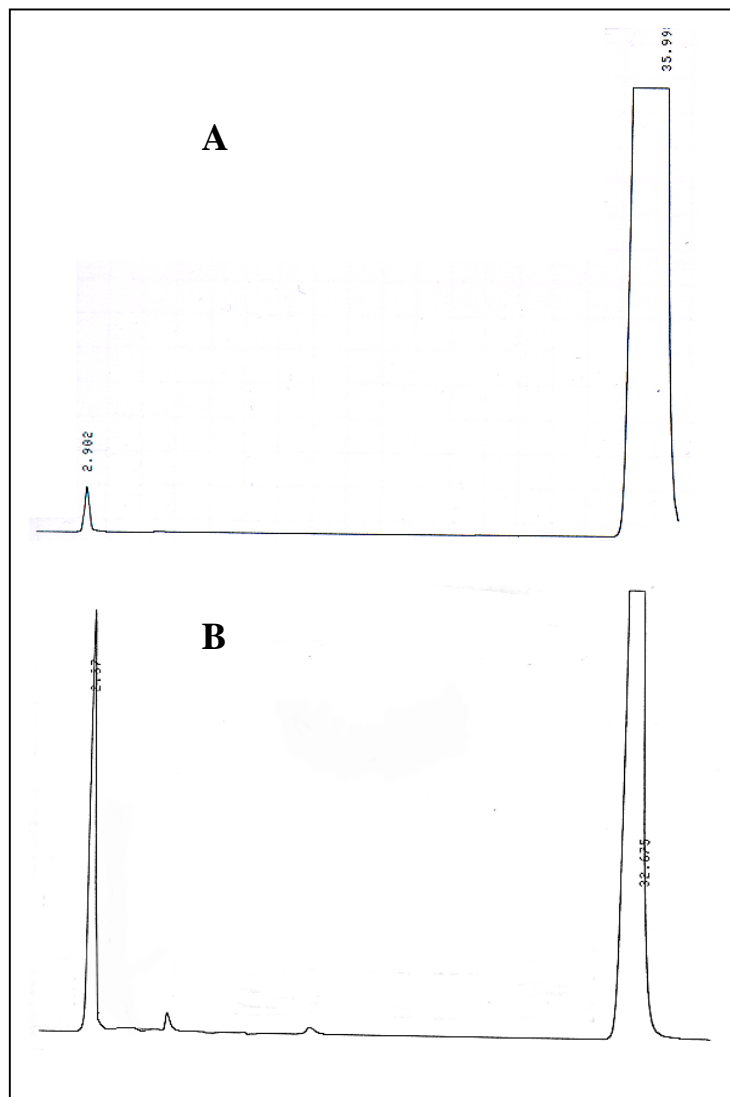


Abbildung 3.16: HPLC-Chromatogramm des Phospholipids DMPC (A) und von DMPC-Liposomen nach der Präparation mittels Zuckeresterhydrolyse (B).

3.4 Herstellung von Proteoliposomen

Biologische Funktionseinheiten der Membran werden bei Rekonstitutionsexperimenten aus ihrer natürlichen Umgebung gelöst und in chemisch und physikalisch definierte Systeme wieder aufgebaut. Als solche können sie schließlich einzeln untersucht werden (Eibl, 1984; Racker & Kagawa, 1979; Zakim & Scotto, 1989).

Der durch die Proteinisolierung und die anschließende Rekonstitution in Membranen entstehende experimentelle Mehraufwand wurde im konkreten Falle durch die Vorteile des liposomalen Systems kompensiert:

1. Das Photoreaktionszentrum erweist sich als ein intrinsisches Membranprotein. Weil aber in zytoplasmatischen Membranen eine Vielzahl wichtiger Stoffwechselprozesse lokalisiert sind, enthalten Zellmembranen weitere Proteinkomponenten wie Lipoproteine und Enzymproteine. Als Ergebnis der Herstellung von Liposomen erhält man artifizielle Membranen, die als einzige Proteinkomponente das Reaktionszentrum enthalten. Damit gehen alle anderen in der natürlichen Membran sich befindenden spezifischen proteinogenen Chinonbindungsstellen verloren. Sowohl der Chinonpool in der Membran als auch das Ubichinon direkt in der Q_B -Bindungsstelle, welches im Zuge der Proteinisolierung wegfällt, sind nicht mehr vorhanden. Damit sind auch Störungen der Messungen ausgeschaltet (Jockers, 1992). Des weiteren fungieren Liposomen, die kein Reaktionszentrum enthalten, als Blindwert, so daß die RC-spezifischen Effekte eindeutig herausgearbeitet werden können.
2. Im Vergleich zu natürlichen Photomembransystemen (Chromophoren, Thylakoiden) ist die Stabilität von rekonstituierten RC höher, vor allem deshalb, weil das System nicht durch zelluläre Proteasen und Abbauprozesse anderer Proteine beeinflusst wird. Das Reaktionszentrum selbst weist eine Stabilität von mehreren Monaten bei 4 °C auf.

Die o.g. Vorzüge von Liposomen sprachen für die Rekonstitution des Photoreaktionszentrums in Vesikel. Das Protein sollte zum einen durch die Rekonstitution für weitere Untersuchungen stabilisiert werden, zum anderen sollte die Möglichkeit geschaffen werden, spezifische Wechselwirkungen von Lipiden und Proteinen in dieser

Modellmembran zu studieren. Neben den Eigenschaften des Membranproteins konnten auch die für die Rekonstitution verwendeten Phospholipide näher charakterisiert werden, z.B. den Einfluß des verwendeten Phospholipids auf die Inkorporationsrate des RC sowie die Proteinorientierung.

3.4.1 RC-Rekonstitution

3.4.1.1 Detergenz-Dialyse mit OGP

Durch die Zugabe der solubilisierten Reaktionszentren zu der Detergenz-Phospholipid-Puffer-Lösung zum Zeitpunkt der mixed-mizell-Bildung erfolgte die Rekonstitution des Membranproteins. Die anschließende Dialyse verdünnte das Detergenz so weit, daß die Lipide Liposomen bildeten, in deren Bilayer das RC integriert war. Es bildete sich ein in starker Wechselwirkung miteinander befindlicher Verband aus Molekülen heraus, der durch die eingeschränkte Beweglichkeit der Phospholipide gekennzeichnet war, was dadurch bedingt ist, daß sich diese bevorzugt am hydrophoben Kontaktbereich des Proteins anlagern.

Zur Rekonstitution des Photoreaktionszentrums in DMPC-Vesikel wurde ein molares Verhältnis von Detergenz OGP zu Lipid von 20:1 gewählt. Zur vollständigen Hydratisierung wurde 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 zugegeben und bei einer Temperatur oberhalb vom T_m inkubiert. In OGP solubilisiertes RC wurde in einer Menge zupipettiert, so daß das molare Verhältnis von Lipid/Protein = 1000 betrug und sich nach völliger Homogenisierung Lipid-Protein-Detergenz-Mizellen bildeten.

Die Dialyse erfolgte im Dialyseschlauch und in der Zelle der Mini-Lipoprep für zweimal 24 h bei einer Temperatur oberhalb vom T_m (DMPC: 30 °C) und bei 4 °C sowie bei absoluter Dunkelheit. Während die Konzentration an OGP abnahm, bildeten sich Proteoliposomen, die durch Zentrifugation bei 14000 rpm zum Teil pelletiert und anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen beobachtet werden konnten (vgl. Kap. 3.5.1).

Der Einbau des Reaktionszentrums konnte anhand eines Absorptionsspektrums gezeigt werden. Im Proteoliposomenspektrum bewirkt die Lichtstreuung an den Vesikeln eine konstante Absorptionzunahme vom langwelligen zum kurzwelligen Licht. Über dieses

Streuspektrum hinaus, erhebt sich jedoch das charakteristische Spektrum des Reaktionszentrums. Die Lage und das Verhältnis der Absorptionmaxima von den Kofaktoren (Bakteriophäophytin bei 758 nm, Bakteriochlorophyll bei 805 nm und das special pair bei 865 nm) sowie die Tatsache, daß in den Überständen kein RC nachweisbar war, weisen auf die Integration des RC hin (s. Abbildung 3.17).

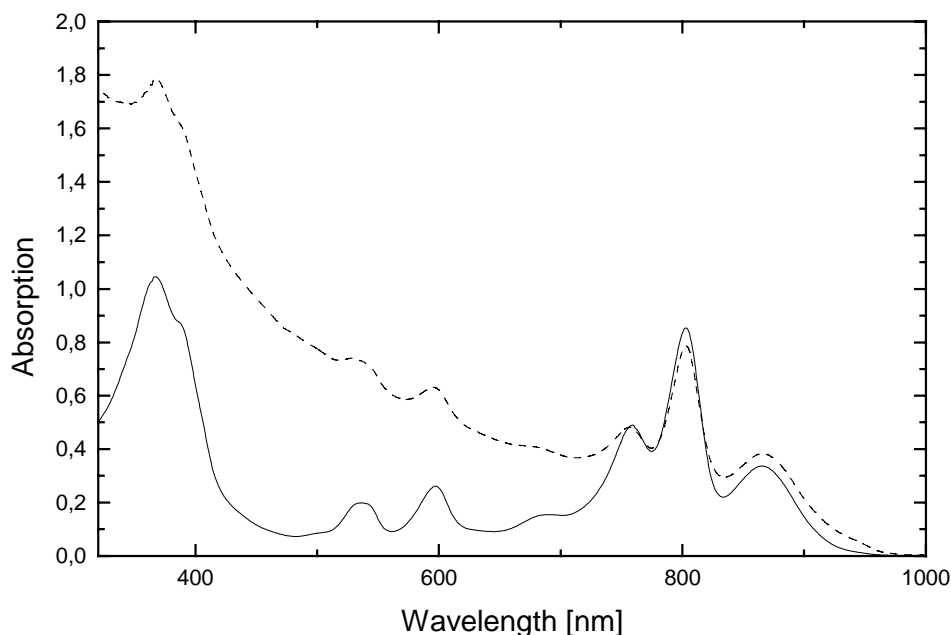


Abbildung 3.17: Absorptionsspektrum (320-1000 nm) von Detergenz-solubilisiertem RC (—) und RC-DMPC-Liposomen (---) nach der Detergenzdialyse.

Werden die Absorptionsspektren des in LDAO solubilisierten Reaktionszentrums vor der Liposomenpräparation und die der RC-Liposomen verglichen, können die Einbauraten der Proteine in den Liposomen bestimmt werden. Aus dem Vergleich der Absorptionsspektren des in LDAO solubilisierten Reaktionszentrums vor der Liposomenpräparation und denen der RC-Liposomen konnten die Einbauraten der Reaktionszentren in den Liposomen bestimmt werden. Dabei entsprach die Einbaurate der prozentualen RC-Konzentration in den Liposomen, wenn die eingesetzte RC-Menge gleich 100% gesetzt wurde. Die RC-Konzentration berechnete sich nach folgender Formel:

$$C_{\text{RC}} = \frac{E_{803\text{nm}}}{(\epsilon \times d)}$$

C = RC-Konzentration [M]

E = Extinktion bei 803 nm

ϵ = Extinktionskoeffizient ($288000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Bei einem molaren Verhältnis von RC zu Lipid = 1:1000 betrug die Einbaurrate zwischen 25-57 % für das Lipid DMPC und 20-30 % für DPPC (s. Tabelle 3.5). Von Riegler & Möhwald wurde eine 20%ige Einbaurrate angegeben (Riegler & Möhwald, 1986).

Tabelle 3.5: Rekonstitution des Reaktionszentrums in Liposomen nach der Detergenz-Dialyse-Methode.

Lipid	Detergenz	Dialyse- temperatur [°C]	RC- Konzentration [M]	Einbaurrate [%]
DMPC	OGP	33	$1,4 \times 10^{-6}$	25-57
DPPC	OGP	45	$1-2,6 \times 10^{-6}$	20-30

3.4.1.2 Detergenz-Dialyse unter Verwendung synthetischer Zuckerester

Aufgrund des niedrigen CMC-Wertes von LDAO mußte für die Präparation von Proteoliposomen mit Reaktionszentrum ein Detergenzaustausch durchgeführt werden. Dieser Detergenzaustausch konnte mit der Amicon-Zelle als auch durch ein Dialyseverfahren erfolgen (vgl. Kap. 2.2.3). Während dieses Verfahrens wurde das LDAO gegen die Zuckerester ausgetauscht.

Für die Liposomenpräparation wurde das molare Verhältnis von Detergenz zu Phospholipid von 20 und von Lipid zu Protein von 1000 gewählt. Nach Dialyse im Minilipoprep-Gerät für 24 h bei einer Temperatur oberhalb des T_m -Wertes vom Phospholipid wurden die Liposomen durch eine Membran mit einem Porendurchmesser von 200 nm extrudiert. Anhand der Wellenlängenspektren konnten Aussagen über die Einbaurate des Reaktionszentrums in die Liposomen getroffen werden (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Inkorporation von Reaktionszentrum in Liposomen nach Anwendung der Detergenz-Dialyse-Methode und unter Verwendung von synthetischen Zuckerestern. Rekonstitutionsbedingungen: molare Verhältnisse Detergenz/Phospholipid 20 und Phospholipid/Protein 1000.

Phospholipid	Detergenz	Dialyse	Einbaurate
		Temperatur [°C]	[%]
DMPC	OG	33	32-48
DPPC	OG	45	21-29
DMPC	OM	33	34-45
DPPC	OM	45	17-22

Auffällig in der oben dargestellten Tabelle ist die höhere Einbaurate des Photoreaktionszentrums in Liposomen bei Verwendung des DMPC, verglichen mit dem Phospholipid DPPC. Dies hängt sehr wahrscheinlich mit der geringeren

Hauptphasenübergangstemperatur (T_m -Wert) des Phospholipids zusammen. Der T_m -Wert für DMPC liegt bei 30 °C, der des DPPC bei 42 °C. Demzufolge mußte die Dialyse zur Liposomenpräparation bei unterschiedlichen Temperaturen, je nach verwendetem Lipid, durchgeführt werden. Eine niedrigere Dialysetemperatur war für das RC vermutlich schonender, während die erhöhte Temperatur zur Denaturierung eines Teils des Proteins geführt haben könnte.

3.4.1.3 RC-Rekonstitution durch Zuckeresterhydrolyse

Durch die in Kap. 2.3.3 und 3.3.3 beschriebene Methode konnten Reaktionszentren in Liposomen integriert werden. Hierbei fanden eine Lipase aus *Bacillus sp.* und synthetische Zuckerester Verwendung. Das bereits mit dem Zuckerester OG solubilisierte und gereinigte Membranprotein (vgl. Kap. 3.1.2) wurde in 1 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 bei 40 °C für 0,5-1 h unter Schütteln inkubiert. In dieser Lösung befand sich zudem 1 mg des mit dem gleichen Zuckerester gelösten Phospholipids. Zur Solubilisierung von 1 mg/ml Phospholipid eignete sich eine Konzentration von 8 mg/ml Zuckerester.

Nach Hydrolyse der Zuckerester wurde die Liposomenlösung von der Matrix getrennt, und die Liposomen wurden 10mal durch eine 200 nm Membran extrudiert.

Durch diese neue Methode zur Rekonstitution von Reaktionszentren konnten Einbauraten zwischen 36 und 44 % für Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden, 34-39 % für DMPC- sowie 28-33 % für DPPC-Liposomen erzielt werden (vgl. Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: RC-Einbauraten in Liposomen nach Durchführung der Zuckeresterhydrolyse-Methode.

Phospholipidmatrix	RC-Einbaurate [%]
PC-14, PC-4, PE-14, PE-4, PS-14, PS-4,	
PG-14, PG-4, PA-14, PA-4	36-44
DMPC	34-39
DPPC	28-33

3.4.2 Rekonstitution von Bakteriorhodopsin

Das Bakteriorhodopsin (BR) wurde zum einen nach der Detergenz-Dialyse-Methode, zum anderen durch die Zuckeresterhydrolyse-Methode in Liposomen rekonstituiert (vgl. Kap. 2.3.4). Nach der Dialyse von 1 ml einer Lösung aus 1 mg Phospholipid, 8 mg OGP und des in OGP solubisierten BR für 20 h gegen 2 l 10 mM NaPO₄, pH 5,6, wurden die Liposomen abzentrifugiert und in 1 ml 10 mM NaPO₄, pH 5,6 resuspendiert. Ein UV/VIS-Spektrum wurde zur Bestimmung der Einbauraten aufgenommen.

Bei der neu entwickelten Methode, bei der eine immobilisierte Lipase und synthetische Zuckerester Verwendung fanden, wurde das gereinigte BR in Gegenwart von 1 mg Phospholipid und 8 mg des Zuckeresters OG mit der immobilisierten Lipase von *Bacillus species* bei 40 °C unter Schütteln für 0,5-1 h inkubiert. Nach Trennung der Liposomen von der Matrix und 10maliger Extrudierung durch eine 200 nm Membran wurde ein UV/VIS-Spektrum gemessen. Die Ergebnisse der BR-Einbauraten sind der Tabelle 3.8 zu entnehmen. Für die Proteoliposomenpräparation wurden die ungewöhnlichen Phospholipide PC14, PG14 und PA4 sowie das kommerziell erhältliche DMPC verwendet. Beide Präparationsmethoden lieferten ähnlich hohe Insertionsraten von 80 - 90 %, die denen in der Literatur von Rigaud et al., 1983, angegebenen Werten entsprachen. Sie führten die "reverse phase evaporation"-Methode zur BR-Rekonstitution durch.

Tabelle 3.8: Einbauraten für BR nach Rekonstitution in Liposomen.

Phospholipidmatrix	BR-Einbauraten [%]	
	Detergenz-Dialyse	Zuckeresterhydrolyse
DMPC	90	88
PC14	86	85
PG14	80	81
PA4	89	88

3.5 Physikochemische Charakterisierung der hergestellten Liposomen und Proteoliposomen

3.5.1 Elektronenmikroskopie

3.5.1.1 EM von Liposomen und Proteoliposomen nach Detergenz-Dialyse

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Liposomen, die nach den in Kap. 3.3.1.1. beschriebenen Methoden hergestellt wurden, zeigen gute Resultate (Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19). Nach der Dialyse mittels Dialyseschlauch sind allerdings vereinzelt Liposomenaggregate festzustellen (Abbildung 3.18). Diese Aggregate sind womöglich auf die weniger homogene Durchmischung der mixed-mizell-Suspension im Dialyseschlauch zurückzuführen. Das Minilipoprepperät gewährleistet dagegen stabilere Bedingungen und zugleich eine bessere Reproduzierbarkeit der Liposomenpräparation. Daher können Liposomen mit einheitlicher Größenverteilung im Elektronenmikroskop erkannt werden. Es wurden keine Liposomenaggregate beobachtet (Abbildung 3.19). Zwar wirkt sich das kleine Dialysevolumen nachteilig aus, doch durch die gleichmäßige Durchmischung im Mini-Lipoprep lassen sich konstantere Dialysebedingungen einstellen.

RC-Liposomen konnten sowohl nach der Dialyse im Dialyseschlauch als auch in der Mini-Lipoprep-Zelle hergestellt werden (vgl. Kap. 3.4.1). Ferner wurde deutlich, daß die Dialysetemperatur zur Präparation von Liposomen bei einer Temperatur oberhalb des T_m -Wertes und bei 4 °C durchgeführt werden konnte, ohne auf die Liposomenbildung Einfluß zu nehmen. RC-Proteoliposomen, die nach der Dialyse im Dialyseschlauch gewonnen wurden, wiesen im Elektronenmikroskop wiederum Aggregate auf (Abbildung 3.20). Eine homogenere Größenverteilung und somit besser reproduzierbare Dialysebedingungen wurden nach der Detergenzentfernung mit dem Minilipoprepperät erhalten (Abbildung 3.21).

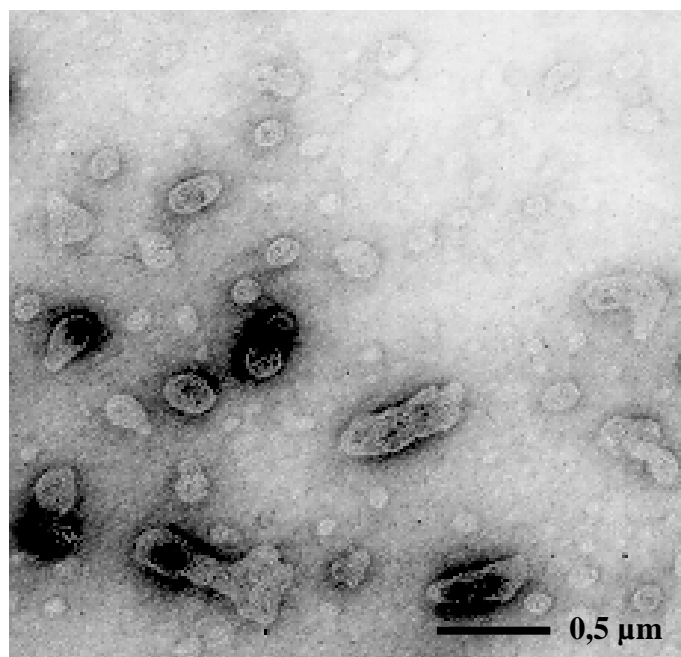


Abbildung 3.18: Elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ kontrastierten DMPC-Liposomen. Molares Verhältnis DMPC/OGP = 1:20, dialysiert im Dialyseschlauch bei 4 °C.

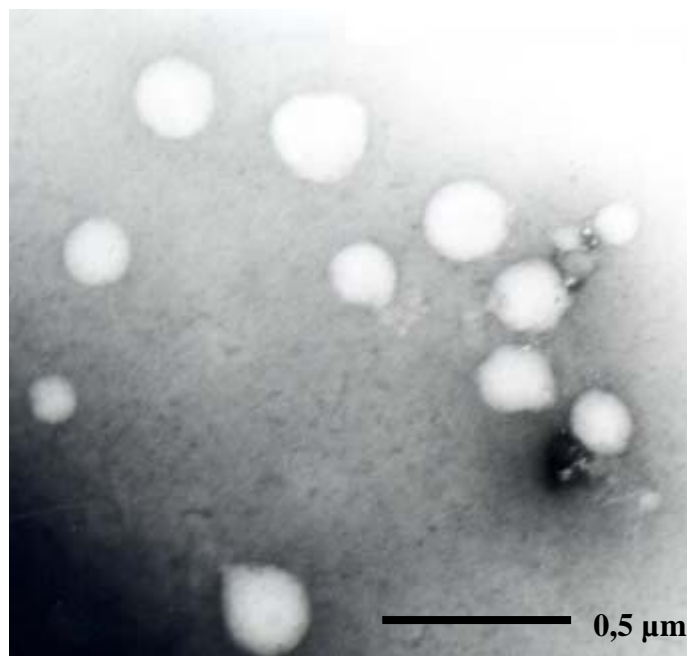


Abbildung 3.19: Elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ kontrastierten DMPC-Liposomen. Molares Verhältnis DMPC/OGP = 1:20, dialysiert im Mini-Lipoprep bei 4 °C.

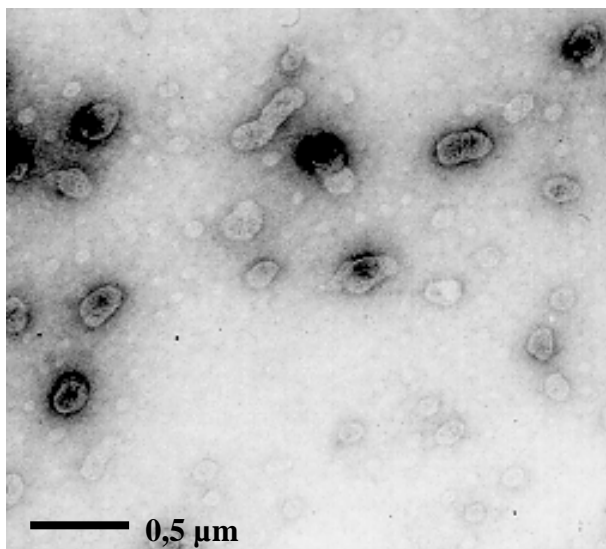


Abbildung 3.20: Elektronenmikroskopische Aufnahme (20000 fache Vergrößerung) von negativ kontrastierten Proteoliposomen. Präparationsbedingungen: molare Verhältnisse DMPC/RC = 1000, OGP/DMPC = 20, in 20 mM Tris/HCl-Puffer bei 4 °C dialysiert im Dialyseschlauch.

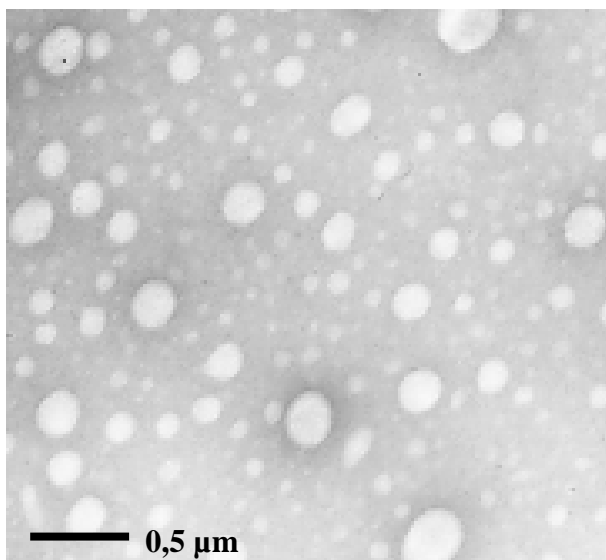


Abbildung 3.21: Elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ kontrastierten Proteoliposomen. Präparationsbedingungen: molare Verhältnisse DMPC/ RC = 1000, OGP/DMPC = 15, in 20 mM Tris/HCl bei 4 °C dialysiert im Mini-Lipoprep.

3.5.1.2 EM von Liposomen nach Zuckeresterhydrolyse

Die nach Abschluß der Zuckeresterhydrolyse gewonnene Lösung wurde zunächst spektralphotometrisch untersucht. Dabei deutete das charakteristische Aussehen des Wellenlängenspektrums, eine zunehmende Absorption zu kleiner werdenden Wellenlängen, auf das Vorhandensein von Vesikeln hin.

Diese Liposomen konnten durch Anwendung der Elektronenmikroskopie und durch Lichtstreuuntersuchungen näher charakterisiert werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen ermöglichten eine gleichzeitige Visualisierung der Vesikel und deren Größenbestimmung. Die Größenverteilung der Partikel ließ sich ebenfalls durch Lichtstremessungen definieren (vgl. Kap. 3.5.2).

In Abbildung 3.22 werden zwei Beispiele der elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt. Es war zu erkennen, daß Liposomen, die direkt nach der Präparation mikroskopiert wurden, teilweise einen sehr großen Durchmesser aufwiesen (bis zu 700 nm) und Aggregate bildeten (Abbildung 3.22 A). Erst die Extrudierung der Liposomenlösung durch eine Membran mit einem Porendurchmesser von 200 nm erbrachte eine homogene Vesikelpopulation (Abbildung 3.22 B).

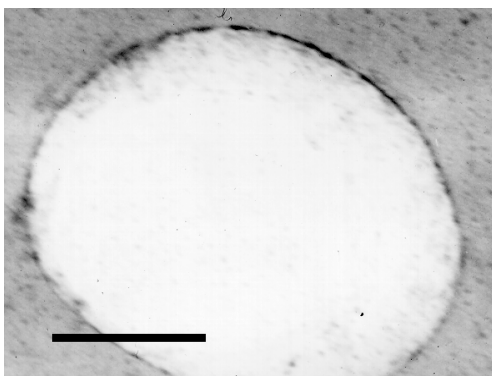
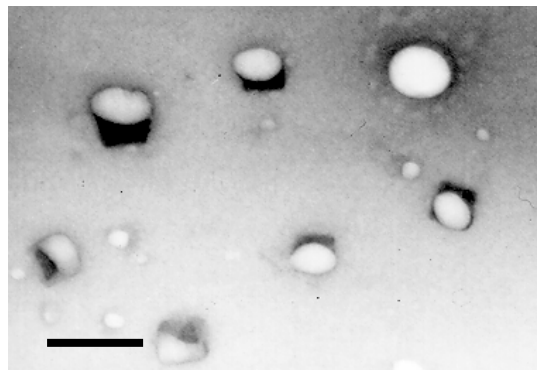
**A****B**

Abbildung 3.22: Elektronenmikroskopische Aufnahme von DMPC-Liposomen vor (A) und nach 10maliger Extrudierung durch einen Polycarbonatfilter mit 200 nm Porendurchmesser (B). Die Liposomen formten sich spontan nach der Hydrolyse des Zuckerfettsäureesters OG durch die Lipase von *Bacillus species*. Der Balken symbolisiert jeweils 250 nm.

3.5.2 Lichtstreuungsuntersuchungen

Die dynamische Lichtstreuung wurde für Liposomen, die nach den unterschiedlichen Präparationsmethoden wie der Detergenz-Dialyse-Methode oder Zuckeresterlipolyse-Methode (vgl. Kap. 2.3.1 und 2.3.3) erhalten wurden, angewandt. Dazu wurden die Liposomen mit 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 1:10-1:100 verdünnt. Es wurden Vesikel untersucht, die direkt nach der Präparation oder nach der Extrudierung durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 200 nm erhalten wurden. Vor der Homogenisierung hatten die Liposomen eine uneinheitliche Größenverteilung. Nach einer Präparation von DMPC-Liposomen mit der Zuckeresterhydrolyse wurden gleichzeitig sehr große Vesikel mit einem Durchmesser zwischen 400 und 900 nm sowie kleinere Liposomen mit einer Größe zwischen 100 und 300 nm gefunden (s. Abbildung 3.23). Die 10malige Extrudierung durch einen Polycarbonatfilter ergab hingegen eine einheitliche Größenpopulation, die mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 150 nm der EM-Aufnahme entsprach.

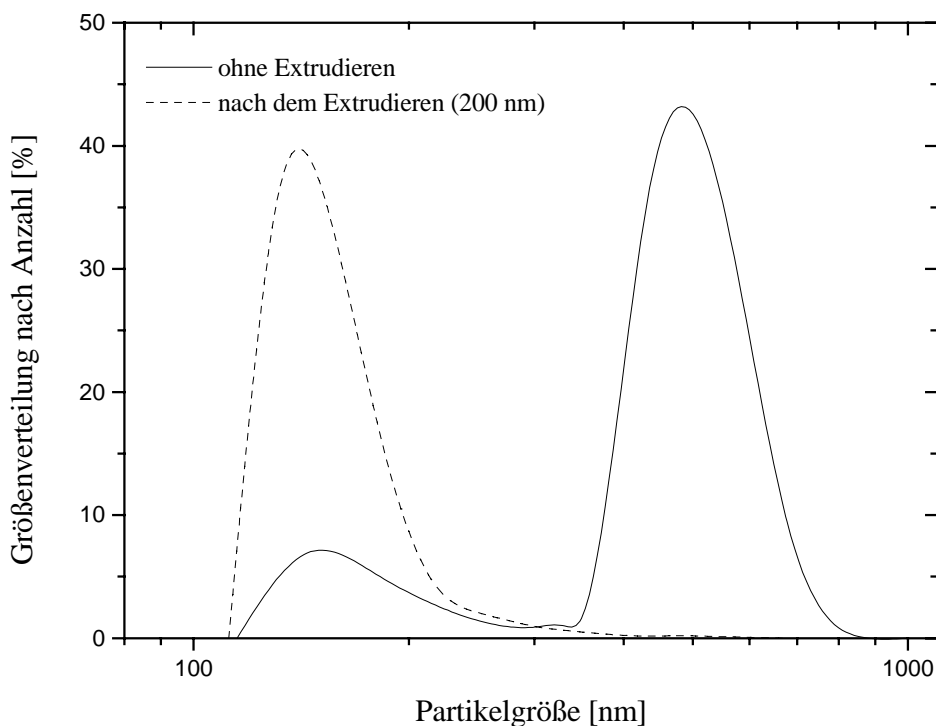


Abbildung 3.23: Dynamische Lichtstreuung von DMPC-Liposomen, die nach der Zuckeresterhydrolyse erhalten wurden.

Eine zusammenfassende Darstellung der Lichtstreuungsuntersuchungen findet sich in Tabelle 3.9. Die Liposomen wurden dabei sowohl nach der Detergenz-Dialyse-Methode (vgl. Kap. 2.3.1) als auch mittels "Freeze-Thaw"-Technik (vgl. Kap. 2.3.6) hergestellt. Sämtliche zur Verfügung gestandenen ungewöhnlichen Phospholipide wurden für die Liposomenpräparation verwendet. Nach dem 10-maligen Extrudieren der Liposomen durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 200 nm wiesen alle Vesikel einen mittleren Durchmesser zwischen 100 und 200 nm auf. Aufgrund der einheitlichen Größenpopulation von Liposomen mit eingeschlossenem Calcein-Marker konnten diese Vesikel in anschließenden Stabilitätsmessungen gegen das Detergenz TritonX-100 gut miteinander verglichen werden.

Tabelle 3.9: Lichtstreuungsmessungen von Liposomen und Calcein-Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden. Angegeben ist jeweils der durchschnittliche Durchmesser verschiedener Präparationen nach Extrudierung der Liposomen.

Lipid	Liposomen [nm]	Calcein-Liposomen [nm]
PC-14	127, 125	133, 117, 120, 111
PC-4	164,156,140	141,143,137
PE-14	123,122	138,138,136
PE-4	134,128	(441)
PS-14	128, 135	149,145,136
PS-4	123-183	139, 142
PG-14	122, 134	112,113
PG-4	104	131,123,137,136
PA-14	115, 141	152, 143
PA-4	155	140, 133
DPPC	135	124,117,122

Eine vergleichende Betrachtung der Liposomengrößenbestimmung durch die Elektronenmikroskopie und der dynamischen Lichtstreuung ermöglicht Tabelle 3.10. DMPC und DPPC-Liposomen sowie RC-Proteoliposomen wurden nach der Zuckeresterhydrolyse von OG oder OM erhalten. Vor der Extrudierung der Liposomen wurden sowohl im Elektronenmikroskop als auch nach der dynamischen Lichtstreuung große Vesikel bis zu einem Durchmesser von etwa 1000 nm als auch Aggregate beobachtet. Eine homogene Größenpopulation wurde nach der 10maligen Extrudierung durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 200 nm erhalten. Gleichzeitig wurde dadurch die Auflösung der Aggregate erzielt. Alle Liposomendurchmesser waren nach dieser Behandlung kleiner als 200 nm.

Für DMPC-Liposomen, die nach der Detergenz-Dialyse Technik präpariert wurden, war keine Extrudierung erforderlich. Bei ihnen war keine Aggregatbildung zu verzeichnen, und sie zeigten eine Größe von 30-102 nm.

Tabelle 3.10: Liposomengrößenbestimmung durch Elektronenmikroskopie und Lichtstreuuntersuchungen, vor und nach 10maliger Extrudierung durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 200 nm gemessen. Zum Vergleich wurden DMPC-Liposomen nach der Detergenz-Dialyse-Methode hergestellt, wobei OGP als Detergenz verwendet wurde.

Zuckerester	Phospholipid	Extrusion (200 nm)	Liposomengröße [nm]	
			Elektronen- mikroskopie	Lichtstreuungs- untersuchungen
	DMPC	--	170 – 650	110-850
6-O-Octanoyl-	DMPC	10 x	105 – 220	167-177
β-D-glucose	DMPC+ RC	10 x	< 200	130- 225
	DPPC	10 x	130 – 173	145-210
	DMPC	--	145 – 710	125-970
6-O-Octanoyl-	DMPC	10 x	110 – 215	118-221
β-D-mannose	DMPC+ RC	10 x	< 200	165-197
	DPPC	10 x	120 - 190	135 - 168
OGP	DMPC, (Dialyse)	--	30 - 102	203

3.6 Stabilitätsuntersuchungen von Liposomen

3.6.1 Detergenzstabilität von Calcein-Liposomen

Die nach Anwendung der "Freeze-Thaw"-Methode (Kap. 2.3.6) hergestellten und durch Gelfiltration (Kap. 2.2.10.2) gereinigten Calcein-Liposomen aus den jeweiligen ungewöhnlichen Phospholipiden mit ihren unterschiedlichen Kopfgruppen wurden auf ihre Detergenzstabilität hin untersucht (siehe Kap. 2.1.2).

In diesem Experiment wurde die Freisetzung eines in die Liposomen integrierten Fluoreszenzfarbstoffes fluoreszenzspektrophotometrisch gemessen.

Zu der Liposomenlösung wurde ein membransolubilisierendes Detergenz mit einer definierten Konzentration gegeben. Dadurch wurde die Liposomenmembran permeabel für die eingeschlossenen Farbstoffmoleküle. Als Detergenz kam Triton X-100 zum Einsatz, das zu den am häufigsten verwendeten Tensiden für die Isolierung, Reinigung und Analytik von Membranbestandteilen gehört (Levy et al., 1990, Lin & Carman, 1990, Paternostre et al., 1988). Das Niotensid besitzt ein großes Solubilitätsvermögen und erhält in vielen Fällen die maximalen biologischen Eigenschaften.

Nach Titration der Calcein-Liposomen mit einer bestimmten Detergenzmenge wurde die Fluoreszenz des austretenden Calceins bestimmt. Dazu mußte die Probe mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission des Calceins bei 517 nm gemessen werden. Es wurde so lange Triton X-100 zur Probe gegeben, bis keine weitere Erhöhung der Fluoreszenz meßbar war. An diesem Punkt war sämtliches Calcein aus den Liposomen ausgetreten, und die Lipide waren durch das Detergenz teilweise solubilisiert.

In der graphischen Darstellung wurde die Triton X-100 Konzentration über der Fluoreszenz des Calceins aufgetragen. In der Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25 sind Beispiele für die Stabilitätsmessungen mit Calcein-Liposomen, die aus den ungewöhnlichen Phospholipiden PC-4 und PC-14 sowie PE-4 und PE-14 gebildet wurden, dargestellt.

Abbildung 3.26 zeigt die gleiche Messung mit DPPC-Calcein-Liposomen, und eine Zusammenstellung sämtlicher Stabilitätsstudien ist in Abbildung 3.27 zu finden.

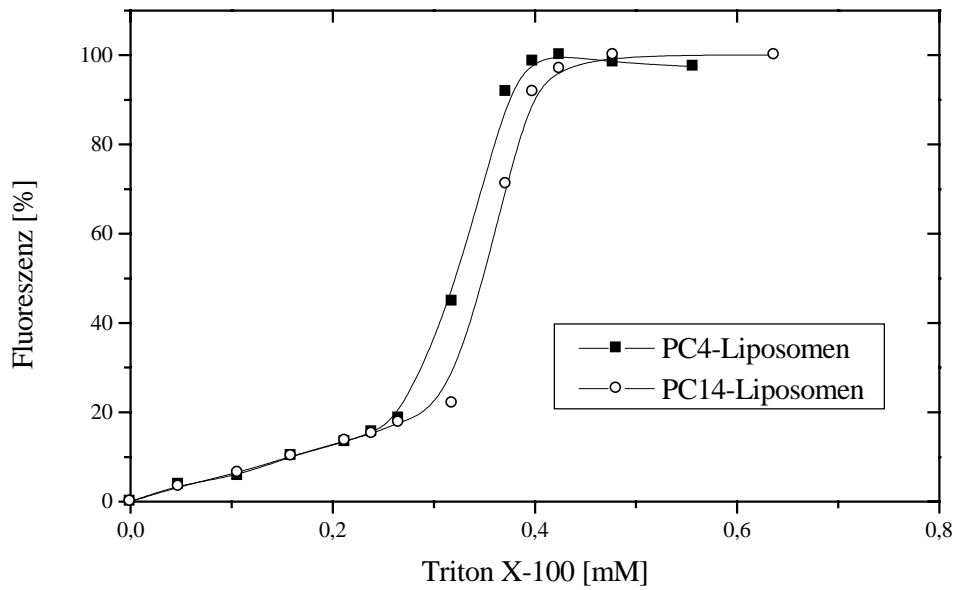


Abbildung 3.24: Titration von PC-4- und PC-14-Calcein-Liposomen mit Triton X-100. Calcein-Liposomen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von Triton X-100 versetzt, Calcein wurde mit 488 nm angeregt, und die Calcein Freisetzung wurde bei 517 nm fluoreszenzspektrophotometrisch verfolgt.

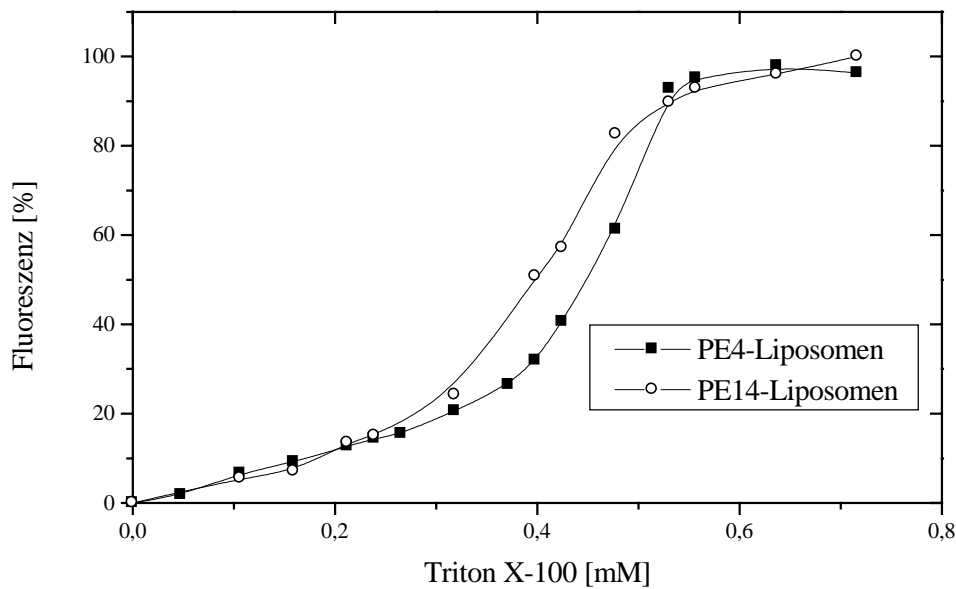


Abbildung 3.25: Titration von PE-4- und PE-14- Calcein-Liposomen mit Triton X-100. Die Emission von angeregtem Calcein (Anregungswellenlänge 488 nm) wurde bei 517 nm bestimmt und über die Triton X-100 Konzentration aufgetragen.

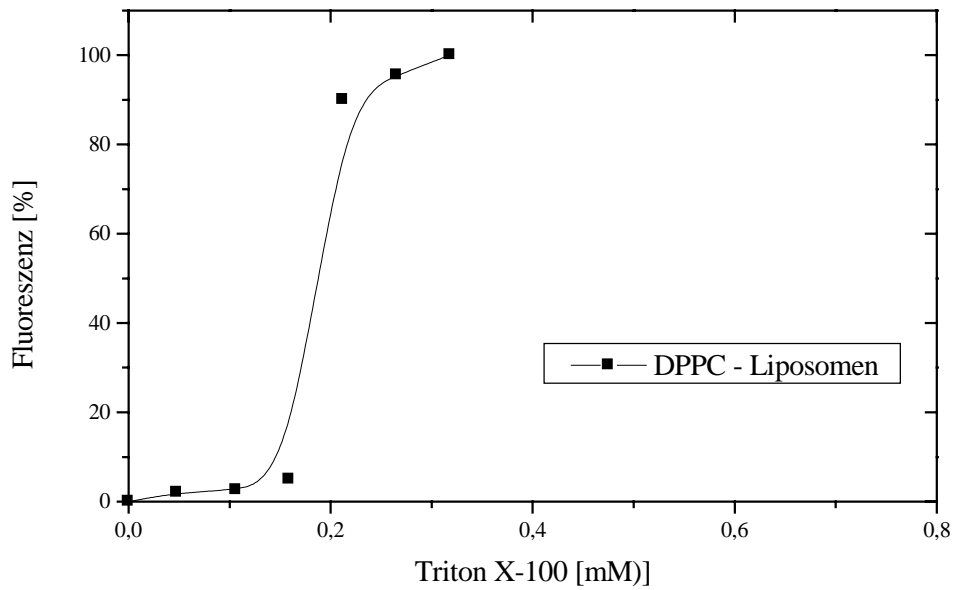


Abbildung 3.26: Titration von DPPC-Calcein-Liposomen mit Triton X-100. Nach Solubilisierung der Liposomen durch ansteigende Triton X-100 Mengen wurde jeweils die Calcein Freisetzung nach Aufnahme eines Fluoreszenzemissionsspektrums bei 517 nm bestimmt.

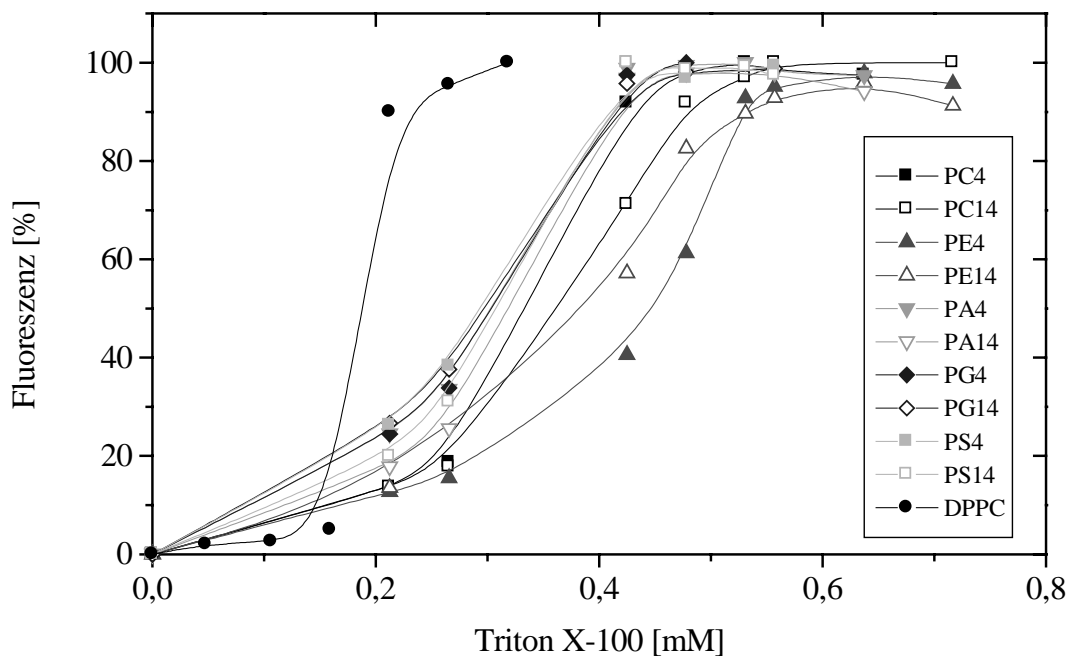


Abbildung 3.27: Zusammenfassung der Detergenzstabilitätsuntersuchungen von Calcein-Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden. Ergebnisse für PC-4, PC-14, PE-4, PE-14 und DPPC-Calcein-Liposomen wurden bereits in Abb. 3.24-3.26 gezeigt.

Zum besseren Vergleich der einzelnen Resultate wurden die Fluoreszenzsignale normiert. Dabei wurde zu Beginn der Messungen die Fluoreszenz als 0 % und nach völliger Freisetzung des Calceins durch Triton X-100 als 100 % angenommen. Die Titrationsexperimente der Calcein-Liposomen mit Triton X-100 zeigen, daß mit zunehmender Detergenzkonzentration die Fluoreszenz durch das freigesetzte Calcein zunimmt, bis eine Sättigung erreicht wird. Im Vergleich von Calcein-Liposomen aus DPPC und ungewöhnlichen Phospholipiden kann festgestellt werden, daß diese sogenannte Endfluoreszenz bei DPPC-Liposomen bei einer geringeren Detergenzkonzentration erreicht wird (Abbildung 3.27). Die in Tabelle 3.11 ermittelten 50 % Werte der Fluoreszenz, d.h. die Triton X-100 Konzentration, bei der 50 % des Calceins aus den Liposomen freigesetzt wurde, belegen eine 1,4 - 2,6fach höhere Detergenzstabilität der Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden gegenüber den DPPC-Vesikeln.

Tabelle 3.11: Vergleich der Triton X-100 Konzentrationen bei 50 % Calcein-Freisetzung aus den Liposomen.

Phospholipid	T_m	Triton X-100 bei 50% Fluoreszenz
	[°C]	[x 10⁻² mM]
PC-14	23,2	35,9
PC-4	20,5/26,5	33,2
PE-14	39	38,5
PE-4	36,0	44,5
PS-14	32,6	30,7
PS-4	33,7	29,2
PG-14	23,8	29,7
PG-4	31,8	30,2
PA-14	~ 39,0	31,7
PA-4	44,6	30,2
DPPC	42	18,7

Werden die Ergebnisse der Tabelle 3.11 betrachtet, so kann folgende Reihe für die zunehmende Detergenzstabilität der Liposomen postuliert werden:

DPPC <PS-4 <PG-14 <PG-4 <PA-4 <PS-14 <PA-14 <PC-4 <PC-14 <PE-14 <PE-4

Bei DPPC-Liposomen lag die Triton X-100 Konzentration, die zur Freisetzung des Fluoreszenzmarkers führte, in Höhe der Kritischen Mizellbildungskonzentration von 0,3 mM. Im Falle der Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden wurde der Marker erst bei einer doppelt so hohen Triton X-100 Konzentration detektiert. PE-4-Calcein-Liposomen zeigten die höchste Stabilität gegenüber dem Detergenz Triton X-100.

Unabhängigkeit der Fluoreszenzmessung von der Liposomenkonzentration

Den Nachweis über die Unabhängigkeit der Fluoreszenzmessung von der Lipidkonzentration erbrachte die Messung von unterschiedlichen Calcein-Liposomen-Chargen. Nach Quantifizierung der Liposomen über die Phosphorbestimmung (s. Kap. 2.2.6) erfolgte die Titration mit Triton X-100. Als Beispiel wird in Abbildung 3.28 die Stabilitätsuntersuchung von PC-4 Calcein-Liposomen dargestellt. Bei Betrachtung der realen Fluoreszenzsignale wird mit zunehmender Lipidkonzentration eine verstärkte Fluoreszenz gemessen (Abbildung 3.28 A). Nach Normierung der Meßdaten ist jedoch zu erkennen, daß der 50 % Wert, bei dem die Hälfte des Calceins aus den Liposomen ausgetreten ist, in allen drei Fällen gleich hoch liegt (Abbildung 3.28 B). Insofern kann mit diesem Nachweis bestätigt werden, daß die Normierung den Vergleich von unterschiedlichen Calcein-Liposomen-Proben erlaubt.

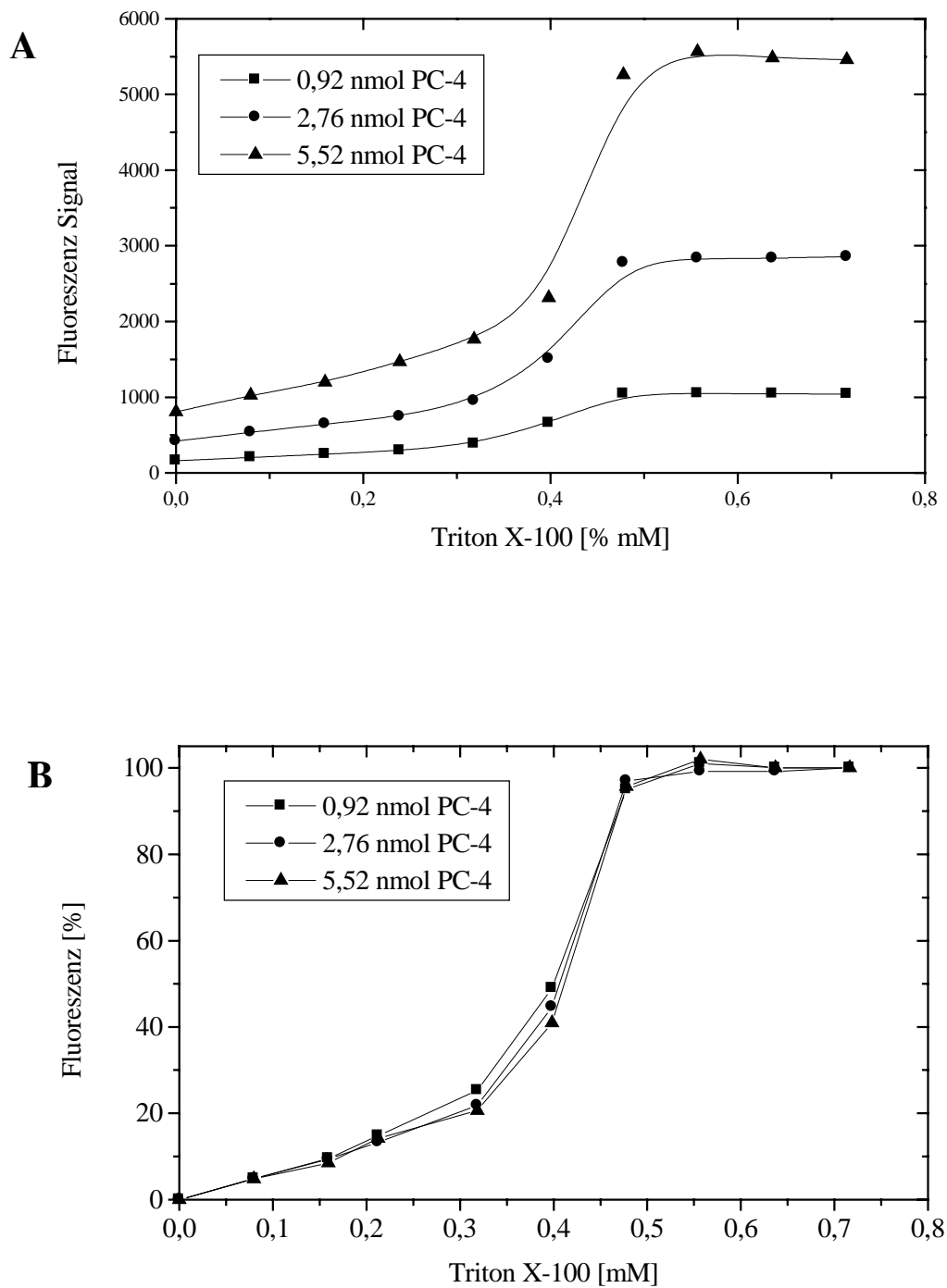


Abbildung 3.28: Titration von PC-4-Calcein Liposomen mit Triton X-100. Darstellung der realen Fluoreszenz (A) und Normierung der Meßdaten (B). Die Calcein-Liposomen wurden mit Triton X-100 solubilisiert, das freigesetzte Calcein wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission bei 517 nm gemessen.

3.6.2 Temperaturstabilität von RC-Proteoliposomen

Zur Darstellung der Temperaturstabilität des Reaktionszentrums wurde die Denaturierung des Bakteriochlorophylldimers bestimmt. Als Meßgröße diente die Absorption des Kofaktors bei 865 nm. Die Membranproteine bzw. die Proteoliposomen wurden zunächst für eine Stunde bei Temperaturen von 4, 40, 50, 65 und 80 °C inkubiert, danach wurden die Wellenlängenspektren aufgenommen. In Abbildung 3.29 sind die unterschiedlichen Absorptionsspektren des mit LDAO solubilisierten Reaktionszentrums nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß mit zunehmender Inkubationstemperatur die Absorption des Bakteriochlorophylldimers sinkt. Nach einer einstündigen Inkubation des RCs bei 65 °C scheint sämtliches Bakteriochlorophylldimer denaturiert. Mit steigenden Temperaturen kann zudem eine Verschiebung der Absorptionsmaxima des Reaktionszentrums zu niedrigeren Wellenlängen verzeichnet werden.

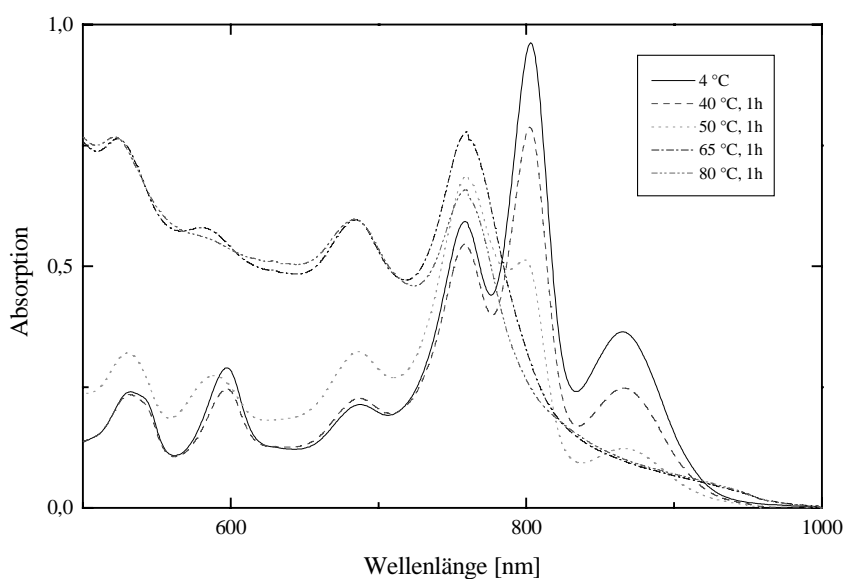


Abbildung 3.29: Einfluß der Temperatur auf das Absorptionsspektrum der Reaktionszentren aus *Rhodobacter sphaeroides*.

Nach Erhitzen von RC-Proteoliposomen ist der gleiche Effekt zu beobachten. Aufgrund der Denaturierung nimmt die Absorption des Bakteriochlorophylldimers bei 865 nm mit

steigender Temperatur ab, und der Absorptionspeak bei 750 nm steigt infolge des oxidierten Bakteriochlorophylls an (Thornber et al., 1978). Dieser Spektrenverlauf konnte in allen Proteoliposomen festgestellt werden. In Abbildung 3.30 ist stellvertretend die Temperaturstabilität der RC-PC14-Liposomen dargestellt.

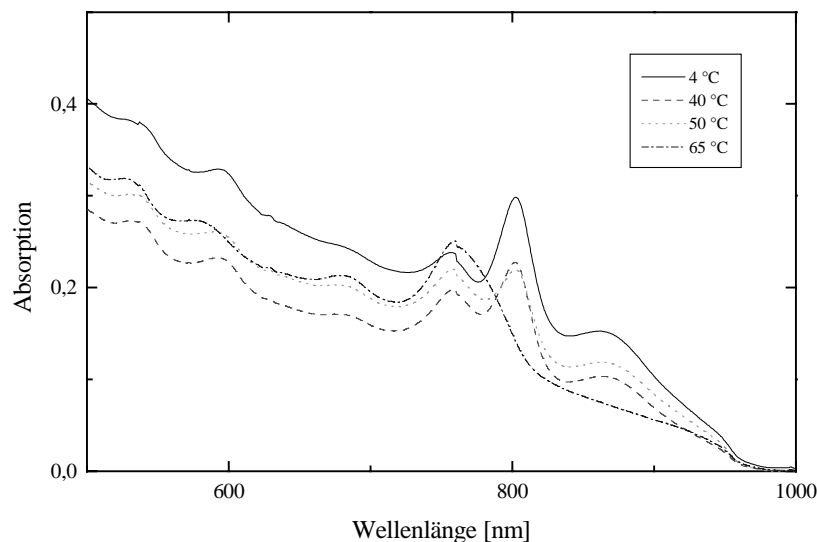


Abbildung 3.30: Temperatureinfluss auf das Absorptionsspektrum von rekonstituierten Reaktionszentren in PC14-Liposomen.

Die Temperatureinflüsse auf Reaktionszentren in Liposomen aus unterschiedlichen Phospholipiden werden in Abbildung 3.31 gezeigt. Die Restabsorption des Bakteriochlorophylldimers wurde über der Inkubationstemperatur aufgetragen.

Die Bakteriochlorophyllabsorption bei einer Temperatur von 22 °C entsprach 100 %. Nach einer einstündigen Hitzebehandlung bei 80 °C war der Kofaktor des nativen RCs wie auch der RC-Proteoliposomen in allen Fällen komplett denaturiert. Unterschiede waren jedoch nach Inkubation der Liposomen bei 40 °C festzustellen. Während die Restaktivität des Bakteriochlorophylls vom nativen RC bei 40,8 % lag, war die Aktivität deutlich höher in Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden. In PG14-Liposomen konnten beispielsweise noch 60 % des Kofaktors nachgewiesen werden. Wurden die Phospholipide PC14, PC4, PG4 oder PA4 für die Vesikelbildung verwendet, waren noch etwa 50 % des Bakteriochlorophylls intakt. Ähnliche Temperatureinflüsse waren nach

Inkubation des Reaktionszentrums bei 50 und 65 °C festzustellen. Wiederum erwies sich das Phospholipid PG14 als stabilitätsfördernd für das Membranprotein. 23,3 % weniger Bakteriochlorophyll wurden im Vergleich zum nativen RC denaturiert und 16,4 % weniger als in RC-DMPC-Liposomen. Wurde das Protein einer Temperatur von 65 °C ausgesetzt, so konnten noch 19,1 % des BChl in PC4-Liposomen nachgewiesen werden, respektive nur 5,2 % im nativen RC.

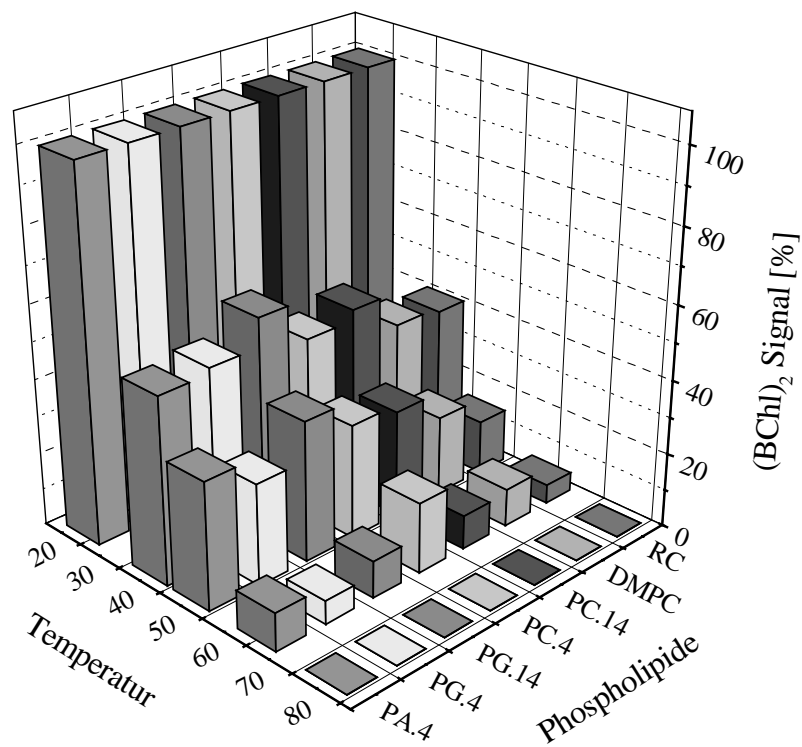


Abbildung 3.31: Darstellung der Temperaturstabilität des nativen und rekonstituierten Reaktionszentrums in Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden. Die Proben wurden für 1 h bei 40, 50, 65 und 80 °C inkubiert und die Denaturierung durch Messung der Restabsorption des Bakteriochlorophylldimers bei 865 nm bestimmt.

3.7 Orientierung integraler Membranproteine in den hergestellten Liposomen

3.7.1 Photoreaktionszentrum

3.7.1.1 Lichtinduziertes Absorptionsspektrum von Cytochrom c

Zur Bestimmung der Orientierung von Reaktionszentren in Liposomen wurde ein lichtinduziertes Wellenlängenspektrum von Cytochrom c zwischen 500 und 600 nm aufgenommen (s. Kap. 2.2.12). Dazu wurden zunächst Proteoliposomen nach der Detergenz-Dialyse-Methode hergestellt und durch eine Polycarbonatmembran extrudiert (s. Kap. 2.3.3). Zudem mußte Cytochrom c mit Natriumdithionit reduziert und überschüssiges Natriumdithionit durch eine Gelfiltration mit Sephadex G-50 abgetrennt werden (s. Kap. 2.2.10.3). Nach Zugabe von reduziertem Cytochrom c zu den RC-Liposomen und Aktivierung des Reaktionszentrums mit Licht wurde Cytochrom c oxidiert. Da reduziertem Cytochrom c ein Absorptionsmaximum bei 550 nm hat, mußte die Oxidation bei dieser Wellenlänge gemessen werden.

Anschließend wurden die RC-Liposomen mit Triton X-100 zerstört und ein erneutes Absorptionsspektrum gemessen. Weil nun sämtliches rekonstituiertes RC mit dem Elektronendonator reagieren konnte, ließ sich somit die absolute Oxidation des Cytochrom c ermitteln.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Messung der photosynthetischen Reaktion in rekonstituierten Reaktionszentren. Wie in natürlichen Membranen wird das Bakteriochlorophyll dimer im Reaktionszentrum durch Lichtenergie angeregt und induziert den Prozeß der Ladungstrennung durch Abgabe eines Elektrons an das Bakteriophäophytin. Da jedoch in den Proteoliposomen die Bestandteile der Chromatophoren (Ubichinon-10, Cytochrom b-c1-Komplex, ATP-Synthase) fehlen, kann das zuvor oxidierte BChl-Dimer nicht mehr reduziert und der Zyklus nicht mehr geschlossen werden.

In diesem Assay muß daher ein Elektronendonator in Form von reduziertem Cytochrom c angeboten werden, um den weiteren Elektronentransport im RC zu ermöglichen. Dieses Cytochrom c kann aber nur dann Elektronen an das Membranprotein abgeben, wenn das

Protein eine bestimmte Orientierung in den Liposomen aufweist (s. Abbildung 3.32). Entscheidend dafür ist die Lage des P870 BChl-Dimers im Reaktionszentrum. Der Kofaktor liegt im Bereich der L- und M-Untereinheit und kann nur dann erneut reduziert werden, wenn diese beiden Untereinheiten im Liposom nach außen ("right-site-out") gerichtet sind (Abbildung 3.32 oben).

Sollte das Reaktionszentrum eine entgegengesetzte Orientierung ("inside-out") im Liposom aufweisen, findet keine weitere Reduktion des P870 und keine Oxidation des Cytochrom c statt (Abbildung 3.32 unten).

Folglich kann der Elektronentransport in sämtlichen Reaktionszentren nur dann ablaufen, wenn die L- und M-Untereinheiten des Membranproteins für das Cytochrom c frei zugänglich sind. Dies ist der Fall bei einer 100 %igen Orientierung des RC bei solubilisierten Protein nach Zerstörung der Liposomen.

Um eine Verstärkung der Cytochrom c Oxidation zu erzielen, wurde Ubichinon-0 als externer Elektronenakzeptor hinzugegeben.

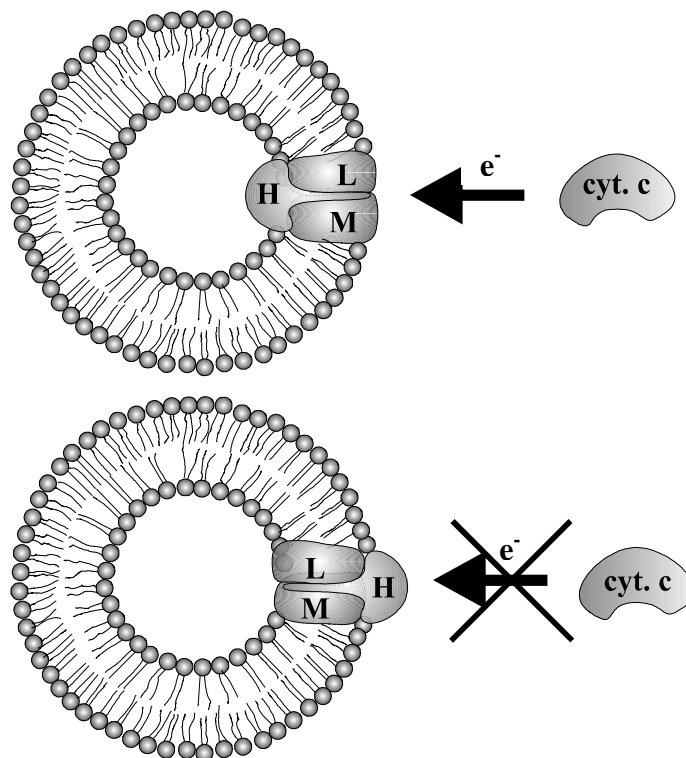


Abbildung 3.32: Schematische Darstellung der RC-Orientierungsmessung in Liposomen. L- und M-Untereinheit des Reaktionszentrums sind nach außen präsentiert und können das reduzierte Cytochrom c oxidieren (A). H-Untereinheit zeigt nach außen, kann aber das Cytochrom c nicht oxidieren (B).

Die nachfolgenden Abbildungen stellen die lichtinduzierten Absorptionsspektren von Cytochrom c dar. Die in Liposomen rekonstituierten Reaktionszentren wurden jeweils exakt für 30 sec mit Licht angeregt und die Oxidation des Cytochrom c durch Aufnahme eines Wellenlängenspektrums gemessen. Diese Spektren werden in den Graphiken als durchgezogene Linie gezeigt. Nach Zerstörung der RC-Proteoliposomen mit Triton X-100 und erneuter Beleuchtung der Probe erfolgte eine zweite Messung (gestrichelte Linien in den Spektren). Durch die Solubilisierung der Liposomen wurden sämtliche Reaktionszentren frei zugänglich und konnten vom Cytochrom c reduziert werden.

Die für die Untersuchungen verwendeten Proteoliposomen bestanden aus unterschiedlichen Phospholipiden.

In Abbildung 3.34 ist deutlich zu erkennen, daß Proteoliposomen, die aus den Phospholipiden DMPC und DPPC gebildet wurden, weniger als 50% des reduzierten Cytochrom c oxidieren. Erst nach der Detergenzsolubilisierung der Liposomen wird sämtliches Cytochrom c reoxidiert, was sich in der Signalerhöhung bei 550 nm auswirkt.

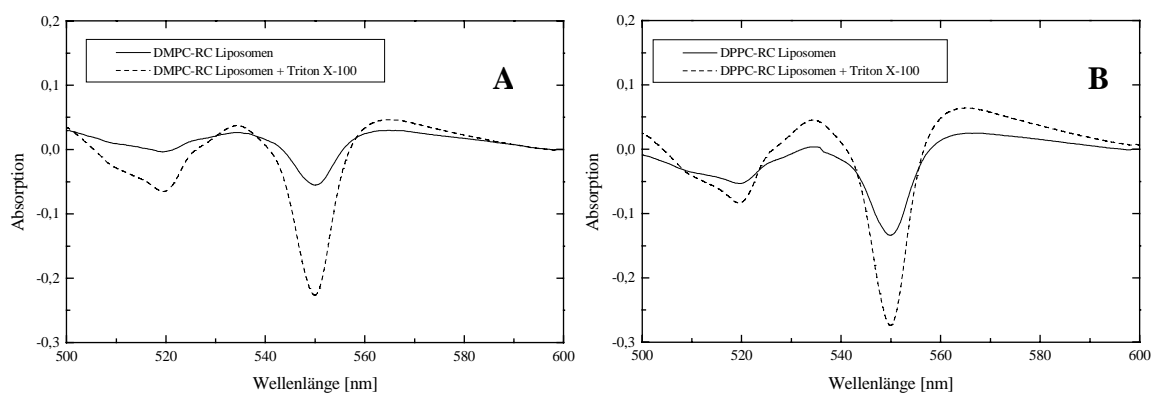


Abbildung 3.33: Lichtinduzierte Absorptionsspektren von Cytochrom c zur Bestimmung der RC-Orientierung in DMPC-RC Liposomen (A) und DPPC-RC-Liposomen (B). Spektrenaufnahme jeweils vor (—) und nach Zugabe von Triton X-100 (---).

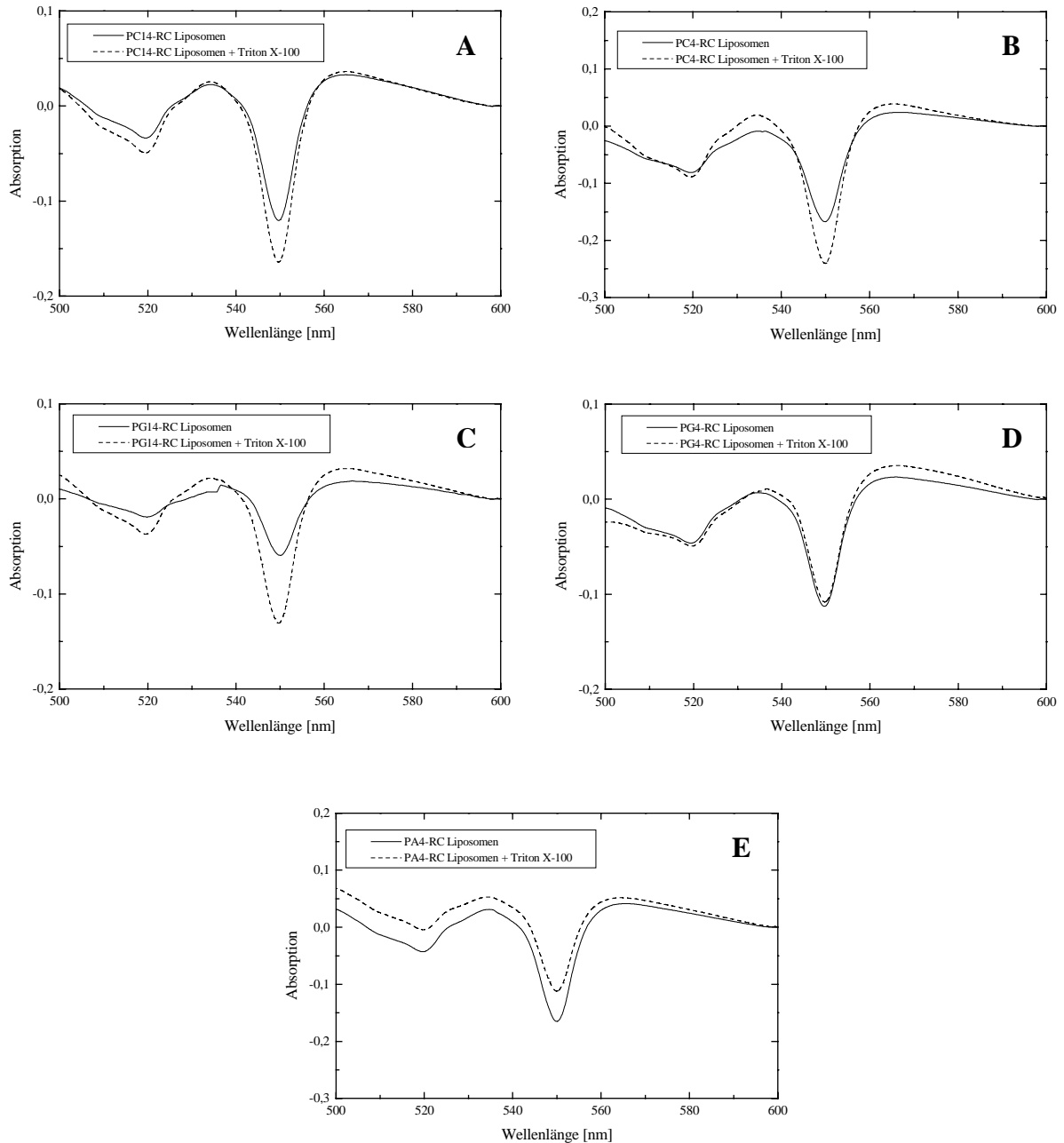


Abbildung 3.34: Lichtinduzierte Absorptionsspektren von Cytochrom c zur Bestimmung der RC-Orientierung in A: PC14-RC-, B: PC4-RC- C: PG14-RC, D: PG4-RC, E: PA4-RC-Liposomen vor (—) und nach Zugabe von Triton X-100 (---).

Die Bestimmung der RC-Orientierung erfolgte ebenfalls mit Proteoliposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden (s. Abbildung 3.34). Die gemessenen Spektren ließen eine Orientierung des Membranproteins in Liposomen erkennen. War noch ein eindeutiger Unterschied beider Spektren im Fall der RC-DMPC- und RC-DPPC-

Liposomen zu verzeichnen, so wird eine Annäherung der Kurven bei Liposomen aus ungewöhnlichen PL festgestellt. Besonders bei PG-4- und PA-4-Proteoliposomen scheinen sich die Spektren vor und nach Detergenzbehandlung zu entsprechen. Des weiteren wird keine wesentlich stärkere Cytochrom c Oxidation nach Zugabe von Triton X-100 zu PC-14-, PC-4- und PG-14-Liposomen erhalten.

Nach erfolgreicher Reproduktion der lichtinduzierten Absorptionsspektren wurde die RC-Orientierung, wie in Tabelle 3.12 dargestellt, gefunden.

Werte, die eine mehr als 100 %ige Orientierung des RCs in Liposomen beschreiben, lassen sich vermutlich auf eine geringfügige Störung durch Triton X-100 zurückführen. Das Detergenz könnte sich auf die Lichtstreuung von solubilisierten Vesikeln ausgewirkt haben. Weiterhin können die Ergebnisse nur dann verfälscht werden, wenn die exakten Anregungs- und Meßzeiten nicht eingehalten werden. Schon bei einer nur wenig abweichenden Beleuchtungszeit wird jeweils mehr oder weniger Cytochrom c oxidiert.

Das Reaktionszentrum war zu 100 % in Proteoliposomen aus PA-4 und PG-4 orientiert. Dabei wiesen die L- und M-Untereinheiten nach außen. In PC-14- und PG-14-Liposomen wurde eine 96 bzw. 92 %ige Orientierung gefunden. Nur 70 % der gesamten Membranproteine waren im Fall der PC-4-Liposomen für das Cytochrom c frei zugänglich. Bei den kommerziellen Phospholipiden DMPC und DPPC konnte keine RC-Orientierung gefunden werden.

Tabelle 3.12: Orientierung des Reaktionszentrums in Proteoliposomen aus unterschiedlichen Phospholipiden.

Phospholipide	L/M-UE außen ("right-site-out"-Orientierung)	
	Meßwerte [%]	Mittelwert [%]
PA-4	118, 126	122
PG-4	79, 102, 112, 116	102
PC-14	80, 126, 102, 76	96
PG-14	84, 98, 94	92
PC-4	77, 68, 63	70
DMPC	31, 44, 26	34
DPPC	47, 63	55

3.7.1.2 Immunoassay zur Bestimmung der RC-Orientierung

Eine Bestätigung der RC-Orientierung, wie sie nach Durchführung des lichtinduzierten Absorptionsspektrums von Cytochrom C gefunden wurde (vgl. Kap. 3.7.1), konnte ein Immunoassay mit RC-spezifischen Antikörpern liefern.

Dazu wurde ein nicht-kompetitiver Sandwich-ELISA entwickelt (s. Abbildung 3.35). In diesem Testformat wurden zunächst RC-Liposomen, die nach der Detergenz-Dialyse-Methode präpariert wurden (vgl. Kap. 2.3.3), auf einer Mikrotiterplatte adsorptiv gebunden. Freie Bindungsplätze wurden mit 0,5 % BSA abgesättigt. Um den ELISA möglichst schonend durchzuführen und um milde Reaktionsbedingungen für die Proteoliposomen zu schaffen, wurde stets der gleiche Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0) für die erforderlichen Verdünnungen im Assay als auch für die wiederholten Waschschrte verwendet.

In der ersten Immunreaktion reagierte der spezifische Antikörper mit dem rekonstituierten Membranprotein. Drei unterschiedliche polyklonale Antikörper (gewonnen nach Immunisierung von Kaninchen, Dr. M. Hara, Tsukuba, Japan) standen zur Verfügung, die jeweils für eine Untereinheit des Reaktionszentrums spezifisch waren. War beispielsweise die H-Untereinheit des RC zur Außenseite des Liposoms orientiert, konnte nur der spezifische Antikörper gegen die H-Untereinheit binden. Je mehr Antikörper schließlich gebunden haben, um so mehr entsprechende Proteinuntereinheiten wiesen zur Membranaußenseite.

Nach der Entfernung von nichtgebundenem Immunglobulin durch dreimaliges Waschen folgte die zweite Immunreaktion. Ein mit einer Peroxidase (POD) markierter Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline band an den primären Antikörper. Nichtgebundene Anti-Kaninchen-POD-Antikörper wurden nach der Inkubation durch Waschen entfernt. Die Quantifizierung der verbliebenen Antikörper erfolgte durch eine Enzymreaktion des POD mit Tetramethylbenzidin (TMB). Die POD katalysiert die radikalische Oxidation von TMB als Wasserstoffdonator zu einem blauen Charge-Transfer-Komplex, wobei Wasserstoff reduziert wird. Durch Zugabe von Schwefelsäure und Absenken des pH auf < 1 entsteht ein stabiles gelbes Diimin-Derivat. Die Absorption des entstandenen Diimin-Derivates wurde bei 450 nm am ELISA-Reader gemessen und war proportional zur Menge an gebundenem spezifischen Antikörper.

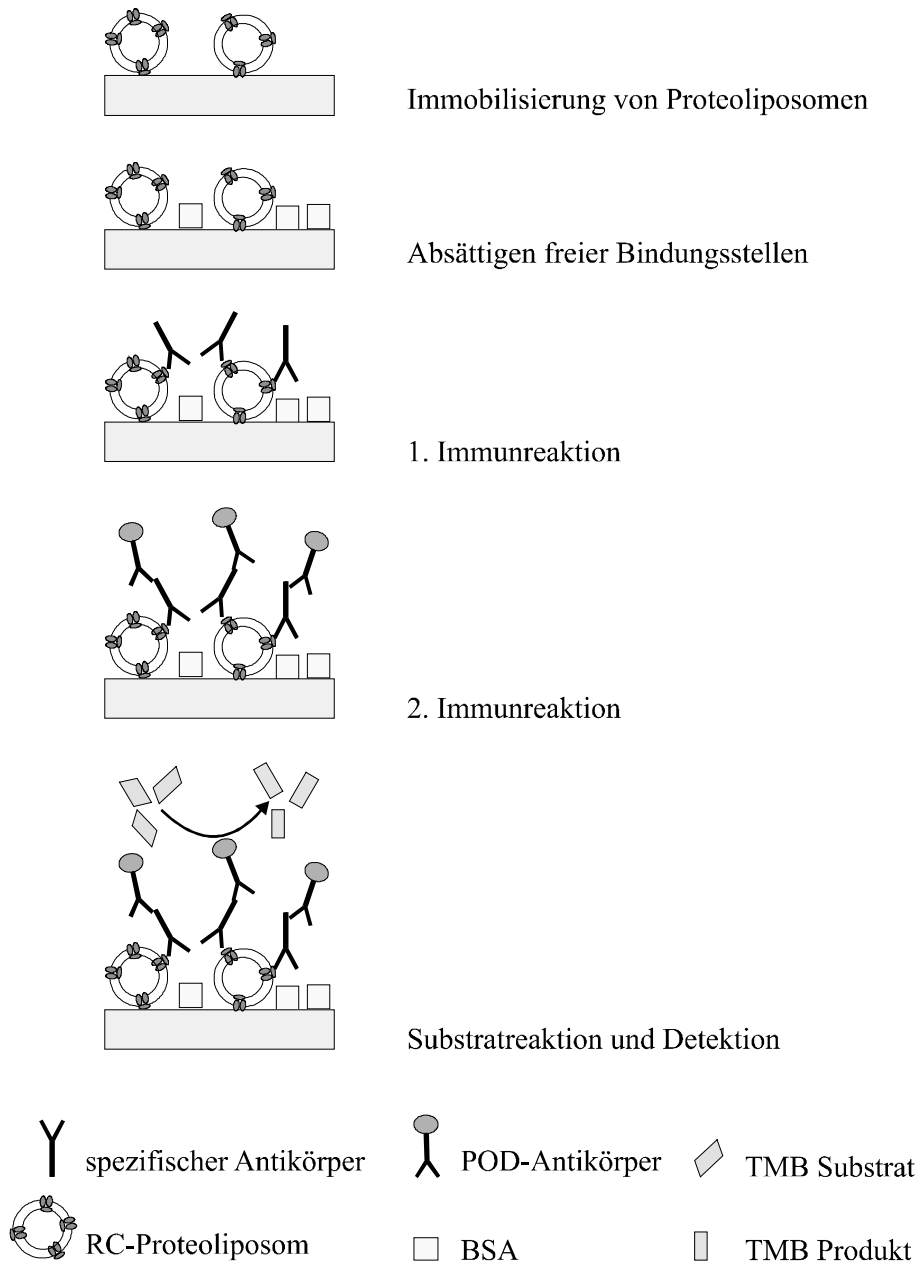


Abbildung 3.35: ELISA-Prinzip zur Detektion der RC-Orientierung in Liposomen.

In Abbildung 3.36 und Abbildung 3.37 sind die Ergebnisse des Sandwich-ELISA zur Bestimmung der RC-Orientierung in RC-Proteoliposomen dargestellt. RC-Liposomen, die aus den Phospholipiden DMPC und PC-14 bestanden, wurden untersucht. Diese Liposomen wiesen nach Durchführung der lichtinduzierten Absorptionsspektroskopie bei RC-PC14-Liposomen eine Orientierung der Reaktionszentren auf, bei RC-DMPC-Liposomen jedoch keine.

Der ELISA von RC-DMPC-Liposomen zeigte für die drei spezifischen Antikörper ähnliche Kurvenverläufe (s. Abbildung 3.36). Somit haben unter der Voraussetzung, daß die Antikörper jeweils die gleiche Affinität zum Antigen besaßen und die gleiche Konzentration im Assay aufwiesen, die gleichen Immunglobulinmengen an das rekonstituierte RC gebunden. Damit konnte eine ungerichtete Orientierung des RCs in DMPC-Liposomen gezeigt werden.

Ein Unterschied im Kurvenverlauf der spezifischen Antikörper ist im ELISA, der mit RC-PC14-Liposomen durchgeführt wurde, zu erkennen. Bei einer konstanten Antiserumkonzentration sind die Extinktionen von Anti-H-UE-Antikörper geringer, verglichen mit Anti-L- und Anti-M-Antikörpern. In diesem Fall haben weniger Anti-H-, aber mehr Anti-L- und Anti-M-Antikörper an die immobilisierten RC-Liposomen gebunden. Die H-Proteinuntereinheit des Reaktionszentrums ist in das Innere des Liposoms gerichtet. Das Membranproteins liegt orientiert in den Vesikeln vor.

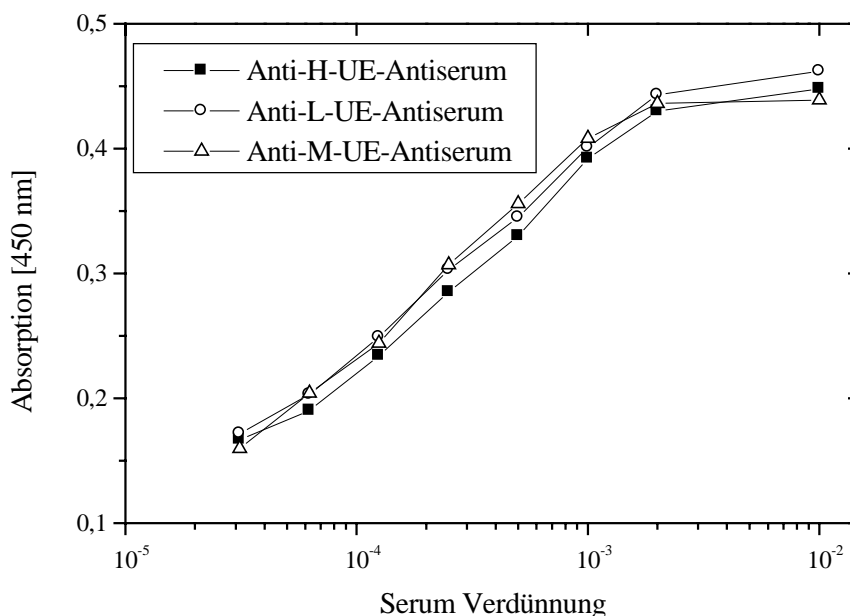


Abbildung 3.36: ELISA zur Bestimmung der RC-Orientierung in RC-DMPC-Liposomen. ELISA-Bedingungen: Proteoliposomenimmobilisierung 1 h in 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, Absättigung mit 0,5 % BSA 1 h bei RT, AK-Inkubationszeit 1 h bei RT, Nachweis mit Anti-Kaninchen-POD 1:4000 1 h bei RT.

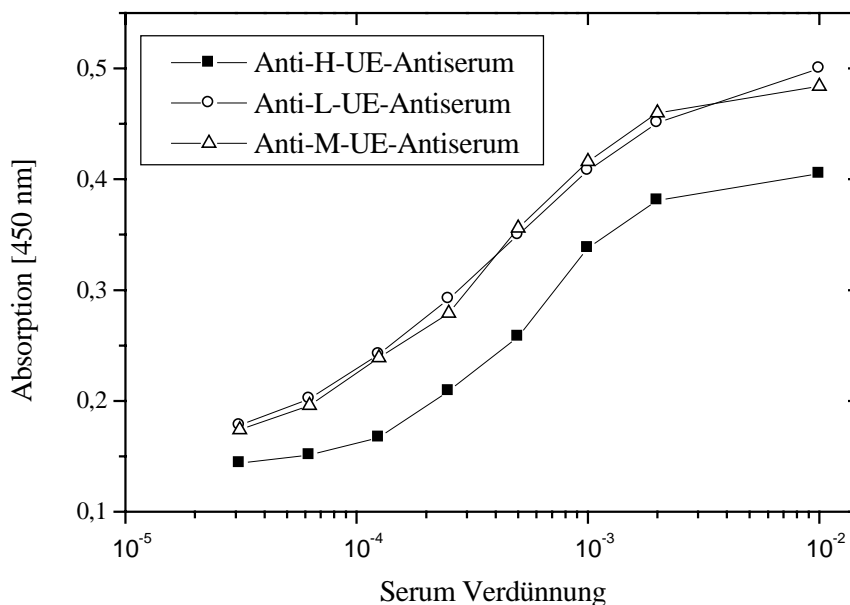


Abbildung 3.37: ELISA zur Bestimmung der RC-Orientierung in RC-PC14-Lipsomen. Bedingungen des ELISAs wurden bereits in Abb. 3.36 beschrieben.

3.7.1.3 Photochemische Bakteriochlorophyllausbleichung

Das als Kofaktor im Reaktionszentrum von *Rhodobacter sphaeroides* befindliche Bakteriochlorophyll dimer fungiert als erster photochemischer Elektronendonator und wird nach Lichtanregung oxidiert. Die Oxidation des Bakteriochlorophylls (auch P870 genannt nach seinem Absorptionsmaximum im Langwellenbereich) wird durch den Verlust des Absorptionsmaximums signalisiert (s. Abbildung 3.39). Dieser Prozeß wird als Bakteriochlorophyllausbleichung ("bleaching") bezeichnet und verläuft reversibel (Clayton & Wang, 1971).

Die Ausbleichung des Kofaktors konnte zur Aufklärung der photosynthetischen Aktivität von rekonstituierten Reaktionszentren beitragen. Dafür war die Messung eines Differenzspektrums erforderlich. Nach Vorschalten eines Glasfilters (Corning Colorfilter C. S. 4-76) wurde die Proteoliposomenprobe für 10 Sekunden beleuchtet und das Absorptionsspektrum des oxidierten P870 gemessen. Durch einen Rotfilter im Meßlichtstrahl konnte der Detektor vor der Lichtstreuung von blauem Anregungslicht geschützt werden.

Im Absorptionsspektrum ist neben dem Verlust des Peaks bei 870 nm auch eine Blauverschiebung der Bande bei 800 nm und eine Absorptionzunahme bei 758 nm zu erkennen (s. Abbildung 3.38). Diese Eigenschaften werden jeweils von einem anderen speziellen BChl, dem P800, hervorgerufen.

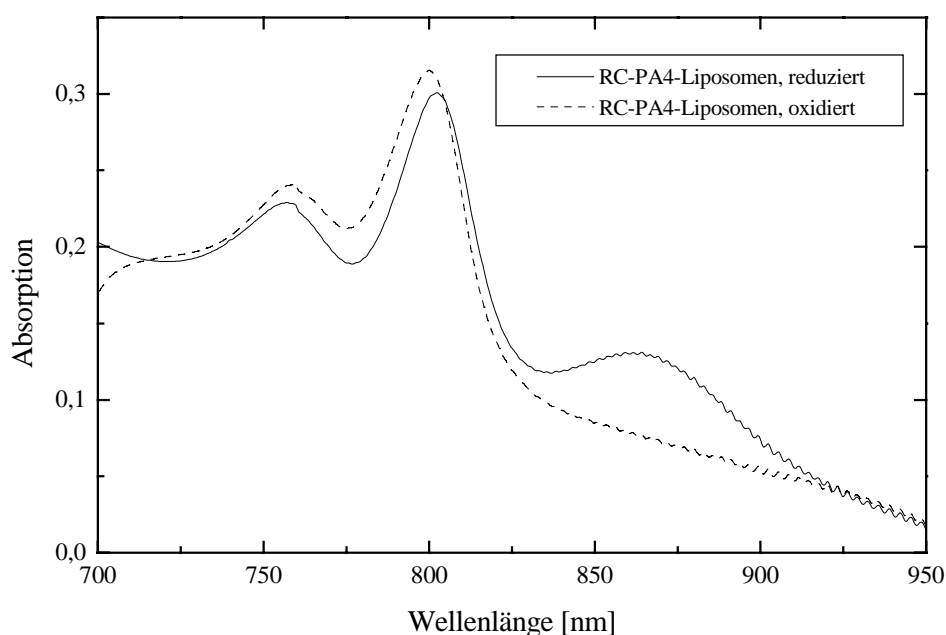


Abbildung 3.38: Absorptionsspektrum von RC-PA4-Liposomen im Bereich von 700-950 nm. Die Oxidation erfolgte über Beleuchtung der Proteoliposomen während der Messung.

Zur Bestimmung der Bakteriochlorophyllbleichung wurde ein Differenzspektrum mit nichtangeregten Proteoliposomen als Referenz durchgeführt (s. Abbildung 3.39). Aus diesem Spektrum ließ sich dann die Oxidationsrate des P870 ermitteln und die RC-Aktivität in Liposomen unterschiedlicher Phospholipidzusammensetzung bestimmen. Zur besseren Übersichtbarkeit sind in Abbildung 3.39 nur die Differenzspektren der RC-DMPC- und RC-PA4-Liposomen dargestellt. Reaktionszentren in Liposomen aus dem Phospholipid PA4 zeigten dabei die höchste Oxidationsrate von Bakteriochlorophyll. Eine 15 % geringere Aktivität wiesen RC-PC14-Liposomen auf und etwa 30 % weniger P870 wurde in PG4-, DPPC- und PC4- Vesikeln oxidiert. DMPC- und PG14-Liposomen zeigten eine 40 % geringere Aktivität.

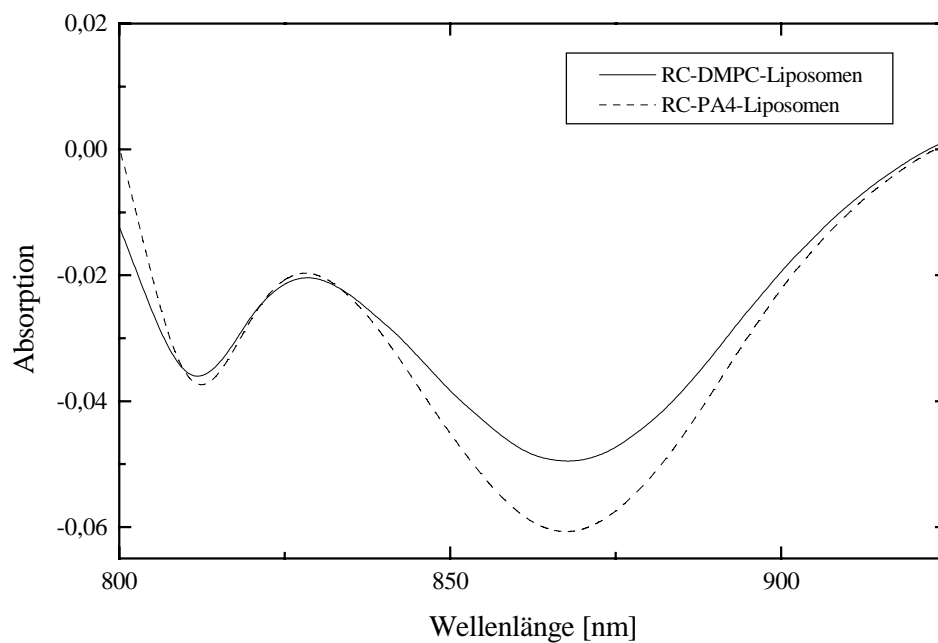


Abbildung 3.39: Differenzspektren von Proteoliposomen nach lichtinduzierter Oxidation des Bakteriochlorophylls P870 am Beispiel von RC-DMPC- und RC-PA4-Liposomen. Als Referenz dienten Proteoliposomen, die nicht beleuchtet wurden.

3.7.2 Orientierung von Bakteriorhodopsin

Zur Untersuchung der Proteinorientierung in Liposomen wurde als weiteres integrales Membranprotein Bakteriorhodopsin D36C (BR D36C) rekonstituiert. Proteoliposomen konnten nach der Lipase-Zuckerestermethode hergestellt werden (s. Kap. 2.3.4). Dabei wurden 80 - 90 % des BR in Liposomen eingebaut. Um Aufschluß über eine mögliche Orientierung des Proteins in den Liposomen zu erhalten, erfolgte eine Thiolgruppenbestimmung mit Fluorescein-5-maleimid (vgl. Kap.2.3.5).

Die Absorptionsspektren der markierten BR D36C-Liposomen und der angepaßten Spektren von nicht markiertem BR sind in Abbildung 3.40 bis Abbildung 3.43 dargestellt. Nach Markierung des BR D36C mit dem Fluoreszenzmarker FLM war im Absorptionsspektrum ein zusätzlicher Peak bei 503 nm zu erkennen. Durch die Anpassung eines Absorptionsspektrums von unmodifiziertem BR konnte eine Quantifizierung der markierten BR D36C vorgenommen werden. Die Berechnung des Markierungsgrades Φ und der Proteinorientierung erfolgte gemäß Kapitel 2.3.5, Abbildung 2.4. In Tabelle 3.13 sind die Ergebnisse für die untersuchten BR-D36C-Liposomen dargestellt.

Bei PA4-BR-Liposomen wurden 52 % des BR D36C mit dem Fluoreszenzmarker markiert. Somit zeigt das Protein keine Orientierung in den Liposomen. Weniger D36C wurde bei PC14-BR-, PG14-BR- und DMPC-BR-Liposomen markiert. Weil sich D36C im Organismus auf der cytoplasmatischen Membranseite befindet, kann eine "right-site-out"-Orientierung des BR in diesen Proteoliposomen angenommen werden.

Tabelle 3.13: Bestimmung der Markierungsgrade Φ und der Orientierung von BR-D36C-Liposomen.

PL-Matrix der BR-Liposomen	Markierungsgrad [Φ]	"right-site-out"- Orientierung [%]
PA4	0,52	48
PC14	0,40	60
PG14	0,28	72
DMPC	0,14	86

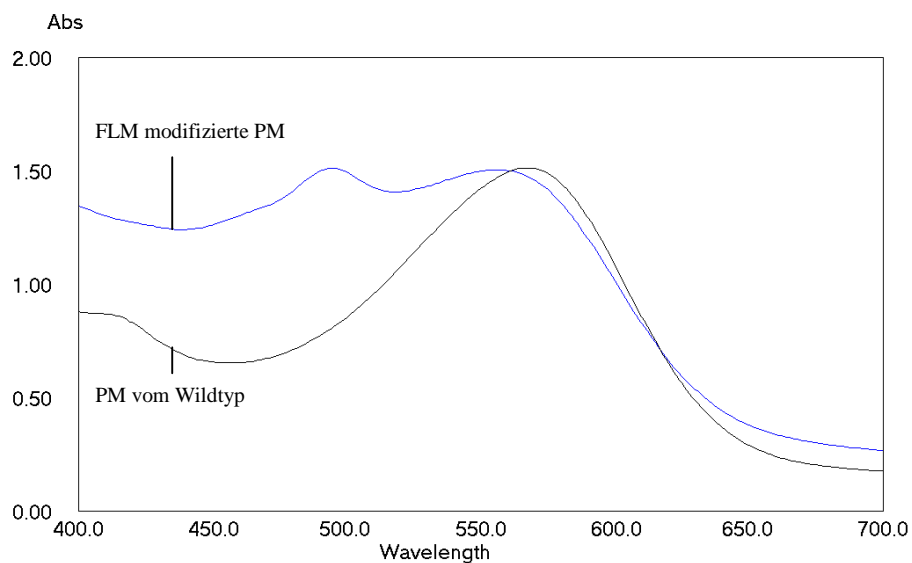


Abbildung 3.40: Bestimmung des FLM-Markierungsgrades bei PC14-BR Liposomen mit $\Phi = 0,397$. Die Berechnung des Markierungsgrades wurde wie in Abb. 2.3 und 2.4 beschrieben, durchgeführt.

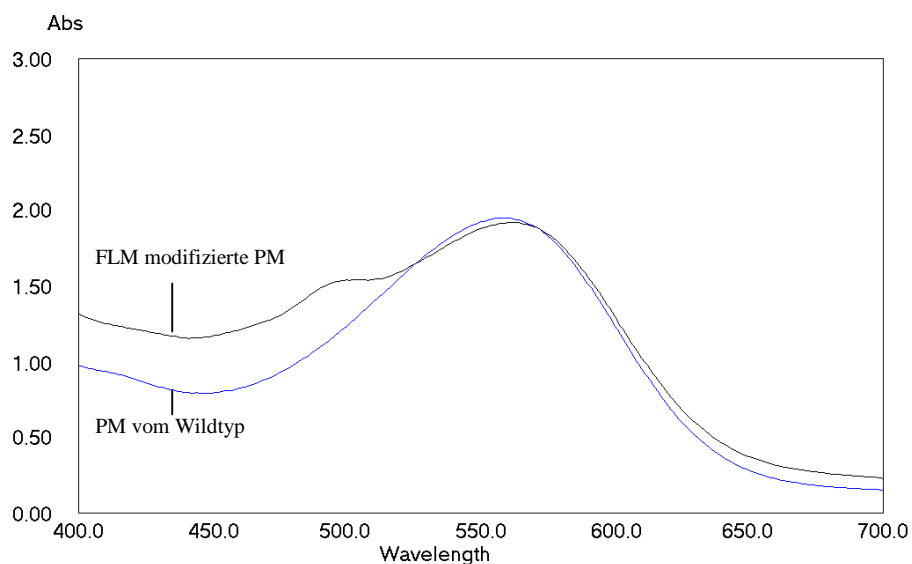


Abbildung 3.41: Bestimmung des FLM-Markierungsgrades bei DMPC-BR Liposomen mit $\Phi = 0,137$, wie in Abb. 2.3 und 2.4 beschrieben.

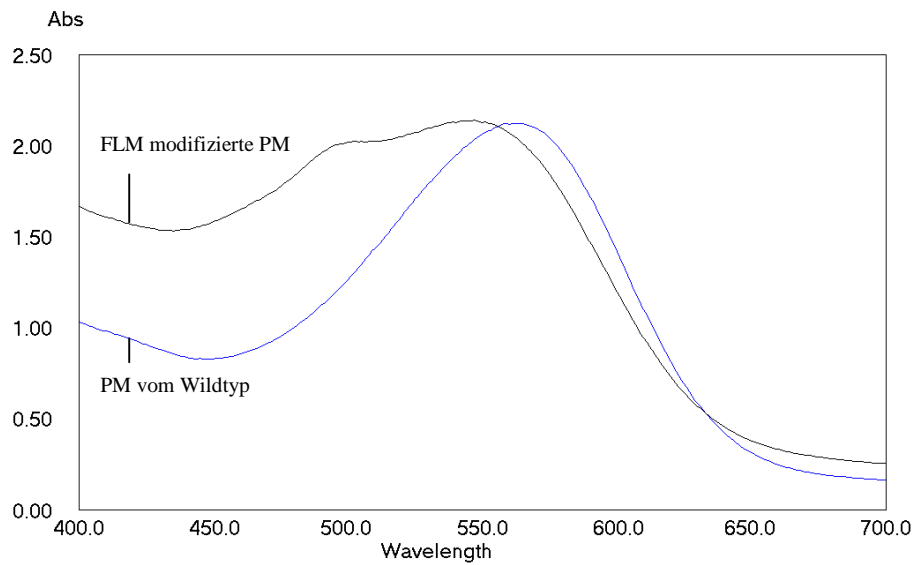


Abbildung 3.42: Bestimmung des FLM-Markierungsgrades bei PA4-BR Liposomen mit $\Phi = 0,519$ erfolgte nach der in Abb. 2.3 und 2.4 beschriebenen Methode.

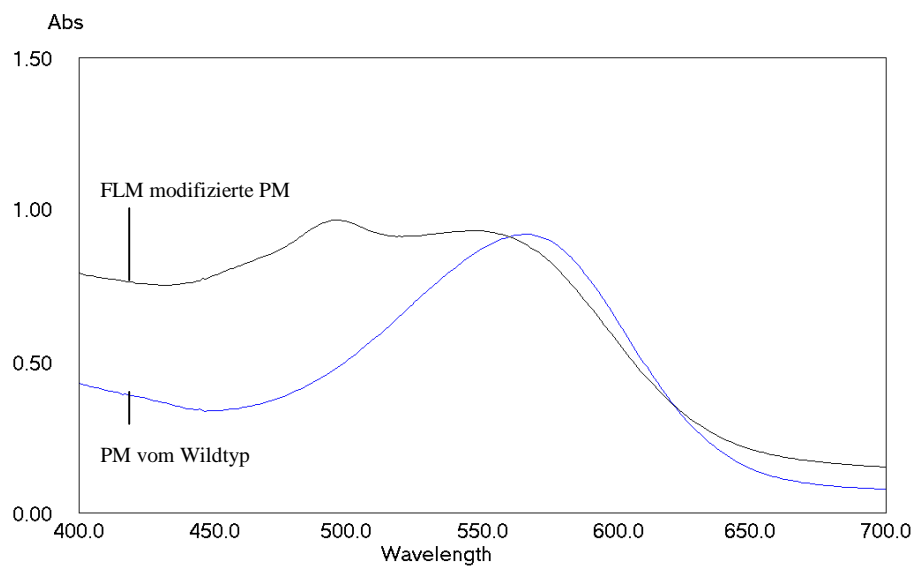


Abbildung 3.43: Bestimmung des FLM-Markierungsgrades bei PG14-BR Liposomen mit $\Phi = 0,275$, siehe Abb. 2.3 und 2.4 für die Berechnung des Markierungsgrades.

3.8 Klonierung des Fusionsproteins L-phoA

3.8.1 Isolierung des Gens für die L-Untereinheit und Klonierung in pUC19

Für die Konstruktion des für das Fusionsprotein L-phoA codierenden Gens mußten zunächst die Gene für die alkalische Phosphatase und für die L-Untereinheit des Photoreaktionszentrums isoliert und amplifiziert werden.

Die L-Untereinheit des Photoreaktionszentrums von *Rhodobacter sphaeroides* wurde bereits im puf-Operon des Shuttlevektors pRK5,3 in *E. coli* kloniert (Farchaus et al., 1990). Das Gen für die L-Untereinheit wurde durch Verwendung der Primer NTRCL und CTRCL sowohl 5'- als auch am 3'-Ende modifiziert.

N-terminaler Primer NTRCL:

DNA 5'... AGC GGA GAG GGA AGC ATG GCA CTG CTC AGC TTC GAG ...3'
 3'... TCG CCT CTC CCT TCG TAC CGT GTC GAG TCG AAG CTC ...5'

Primer 5' GC GGA GAC **TGC AGC** ATG GCA CTG CTC AGC TTC G 3'

***Pst*I**

C-terminaler Primer CTRCL:

DNA 5'... CCG GGA GGC ATC AAT GGC TGA CTA TCA GAA CAT ...3'
 3'... GGC CCT CCG TAG TTA CCG ACT CAT AGT CTT GTA ...5'

Primer 3' GGC CCT CCG TAG TTA CCA **GAT CTT** AGT CTT GTA 5'

***Xba*I**

Somit konnten die für die Klonierung in den Expressionsvektor pUC19 geeigneten endständigen Restriktionsschnittstellen eingeführt werden. Der Klonierungsvektor pUC19 sowie das 0,8 kb große PCR-Produkt wurden anschließend mit den Enzymen *Pst*I und *Xba*I geschnitten und in einem Verhältnis von Vektor zu PCR-Produkt von 1:2 mit T4-DNA-Ligase ligiert. Der Ligationsansatz wurde für die Transformation in *E. coli* DH5 α TM verwendet, das resultierende Plasmid pUC-RCL genannt.

3.8.2 Isolierung des Gens für die alkalische Phosphatase und Klonierung in pUC19

Das Gen für die alkalische Phosphatase wurde aus der genomischen DNA von *E. coli* JM105 (K12-Stamm) (Chang et al., 1986) durch PCR isoliert. Für die folgende C-terminale "in frame" Klonierung mit dem Gen der L-Untereinheit mußten die PCR-Primer entsprechend gewählt werden. Daher enthielt der 5'-Primer eine *Xba*I-Restriktionsschnittstelle und beginnt mit dem Kodon für die erste Aminosäure des reifen Gens der alkalischen Phosphatase ohne die Signalsequenz. Der 3'-Primer erzeugt eine *Sac*I-Schnittstelle zur Klonierung in pUC19 und führt ein Stopcodon zur Transkriptionstermination ein.

N-terminaler Primer NTphoA:

DNA 5'... CTG TTT ACC CCT GTG ACA AAA GCC CGG ACA CCA GAA ...3'
 3'... GAC AAA TGG GGA CAC TGT TTT CGG GCC TGT GGT CTT ...5'

Primer 5' CTG TTT ACC CCT GTG ACT **CTA GAC** CGG ACA CCA G 3'
*Xba*I

C-terminaler Primer CTphoA:

DNA 5'... CTA CAC CAT GAA AGC CGC TCT GGG GCT GAA ATA A...3'
 3'... GAT GTG GTA CTT TCG GCG AGA CCC CGA CTT TAT T...5'

Primer 3' GAT GTG GTA CAT **TCG GCG** AGA **CCT CGA** GTT TAT T 5'
 Stop *Sac*I

Nach Durchführung der PCR und Agarosegel-Elektrophorese wurde das 1,4 kb große DNA-Fragment für die Klonierung in pUC19 eingesetzt. Dazu wurden der Klonierungsvektor pUC19 sowie das PCR-Produkt einem Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Sac*I unterworfen und die Ligation mit einem Verhältnis Vektor zu PCR-Produkt von 1:2 mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* DH5 α TM wurde der Expressionsvektor pUC-phoA gewonnen.

3.8.3 Fusion der Gene in pUC19

Nachdem die codierenden Gene für die L-Untereinheit des Photoreaktionszentrums von *Rhodobacter sphaeroides* und der alkalischen Phosphatase jeweils in den Vektor pUC19 kloniert wurden, mußten die Gene in einem Expressionsvektor fusioniert werden.

Dazu wurden zwei Klonierungsstrategien angewendet:

Strategie 1 (Abbildung 3.44)

Zunächst wurde der Vektor pUC19-RCL mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *XbaI* verdaut und das etwa 0,8 kb große Gen der L-Untereinheit isoliert. Mit dem Klonierungsvektor pUC19-phoA wurde ein analoger Restriktionsverdau durchgeführt, und zusätzlich erfolgte eine Behandlung mit CIAP zur Vermeidung einer Selbstligation. Der dephosphorylierte pUC19-phoA-Vektor wurde mit dem RCL-Gen ligiert und in *E. coli* DH5 α TM kloniert.

Strategie 2

Das Gen RCL wurde mit dem Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* aus dem Klonierungsvektor pUC19-RCL isoliert. Die *HindIII* und *XbaI* Schnittstellen liegen in der multiple-cloning-site des Vektors pUC19.

Nach dem analogen Restriktionsverdau von pUC19-phoA wurde der dephosphorylierte Vektor mit dem RCL-Gen ligiert und in *E. coli* DH5 α TM kloniert.

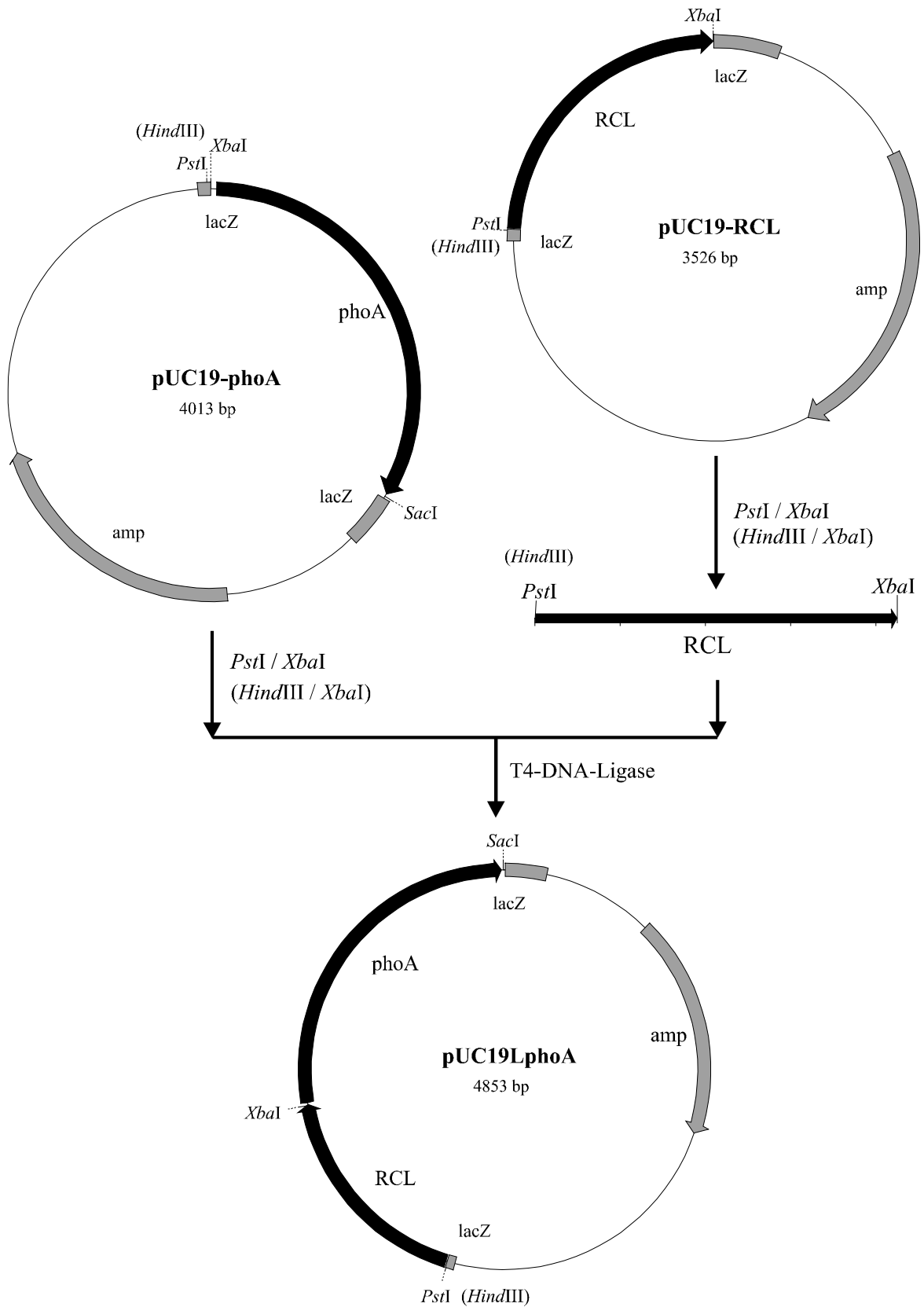


Abbildung 3.44: Klonierungsstrategien zur Konstruktion von pUC19-L-phoA über die Restriktionsschnittstellen *Pst*I bzw. *Hind*III und *Xba*I.

3.8.4 Expressionsversuch von pUC-L-phoA

Die Durchführung der Expressionsversuche (vgl. Kap. 2.4.10) des Fusionsproteins L-phoA erfolgte unter Verwendung des *E. coli*-Stammes DH5 α . Dazu wurden 100 ml LB-Amp-Medium mit einer Übernachtskultur 1:100 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ = 0,6 - 1 bei 37 °C geschüttelt. Durch Zugabe von 1 ml einer 100 mM IPTG-Stammlösung (Endkonzentration 1 mM) wurde die Expression induziert. Vor Induktion und 0,5, 1, 2, 3 und 4 h nach Induktion wurden 1 ml-Proben zur Untersuchung der Expression mittels SDS-PAGE entnommen. Nach 4stündiger Expression wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Aktivität der alkalischen Phosphatase mit 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat und p-Nitrophenylphosphat bestimmt (vgl. Kap. 2.4.12). Parallel wurde zur Kontrolle ein DH5 α -Stamm, der das reine pUC19-Plasmid trug, den gleichen Expressionsbedingungen unterworfen.

Da sich das Fusionsprotein L-phoA aus der alkalischen Phosphatase und der L-Untereinheit des Photoreaktionszentrums zusammensetzt, wurde auf dem SDS-PAGE eine zusätzliche Proteinbande von etwa 78 kDa erwartet. Wie Abbildung 3.45 jedoch zeigt, konnte nur eine neue Bande in der aufgetragenen Gesamtprotein-Probe (nach 4 h Induktion) bei 30 kDa festgestellt werden. Diese Bande konnte aufgrund des geringen Molekulargewichtes nicht eindeutig dem exprimierten Membranprotein zugeordnet werden. Eine Verlängerung der Induktionszeit führte ebenfalls zu keiner weiteren Expression des rekombinanten Proteins.

Die Aktivitätsteste zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase wurden sowohl mit dem Zellpellet, dem Aufschluß-Überstand und mit den Detergenz-Extrakten durchgeführt. Die Extrakte der Zellen mit pUC-RC-L-phoA zeigten in den Aktivitätsassays mit pNPP und Bromo keine signifikant höhere Enzymaktivität als die Kontrolle. Auch die Anwendung von Bromo-Agar-Platten ließ keine Aussage über die Aktivität des Wirtsstammes zu.

Die DNA-Sequenzierungen des Plasmids pUC-RC-L-phoA gestaltete sich bei 8 Klonen schwierig. So wurden in sämtlichen Plasmiden mehrere Deletionen und Punktmutationen gefunden. In einem Plasmid gab es einen Stopkodon im 8. Kodon des RCL-Gens. Die Mutationen traten vorwiegend im Übergangsbereich der beiden Gene RCL und phoA auf. Die neue Strategie zur Klonierung des Fusionsproteins bestand anschließend in der rekombinanten PCR.

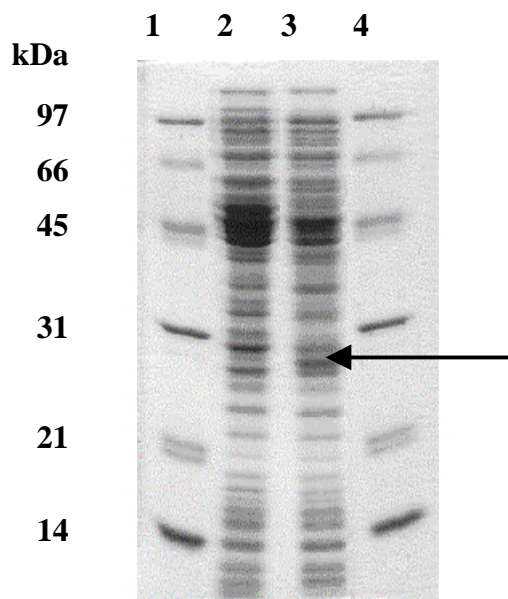


Abbildung 3.45: SDS-PAGE-Analyse der Expression von pUC-L-phoA in *E. coli* DH5 α TM. Spur 1 und 4: LMW-Proteinstandard, Spur 2: pUC19, Spur 3: pUC-L-phoA. Der Pfeil deutet auf die zusätzliche Proteinbande.

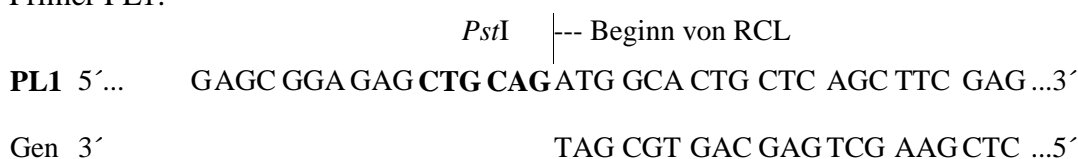
3.8.5 Fusionsgen über rekombinante PCR - "Splicing by Overlap Extension"

Mit der rekombinanten PCR können zwei DNA-Fragmente an einer genau definierten Stelle miteinander fusioniert werden. An der Ligationsstelle ist somit keine Restriktionsschnittstelle erforderlich. Die Methode besteht aus einer Folge von drei PCR-Reaktionen. In der ersten PCR wird das erste Gen mit Hilfe eines 5'-überhängenden Primers um den Anfang des zweiten Genes verlängert. Anschließend wird vor das zweite Gen mit Hilfe eines 5'-überhängenden Primers das Ende des ersten Genes gehängt. Schließlich dienen sich die Produkte der beiden PCR-Reaktionen in der letzten PCR gegenseitig als Primer. Die Ausbeute der dritten PCR-Reaktion wird dabei durch den Zusatz der randständigen Primer erhöht.

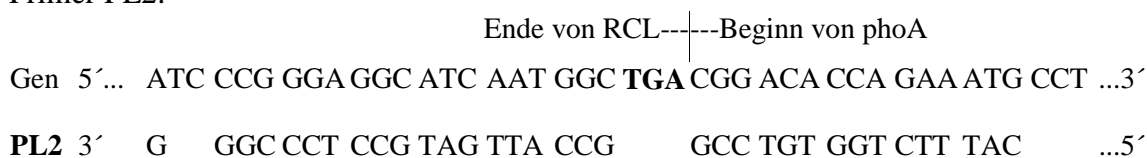
Die Klonierung des Fusionsproteins in pUC18 umfaßte folgende Schritte (s. Abbildung 3.46):

1. Amplifikation des Gens der L-Untereinheit des Photoreaktionszentrums von *Rhodobacter sphaeroides* (RCL) aus dem Plasmid pRK 5,3 mit den entsprechenden Amplifikationsprimern PL1 und PL2. Mit dem Primer PL1 wird vor dem RCL-Gen eine *Pst*I-Schnittstelle eingeführt. Durch den PL2-Primer wird das Gen um den Anfang des Gens der alkalischen Phosphatase verlängert. Dieser Primer enthält die letzten 19 komplementären Basen des RCL-Gens, wobei das Stopkodon von RCL fehlte, und die ersten 15 komplementären Basen von *phoA*.

Primer PL1:

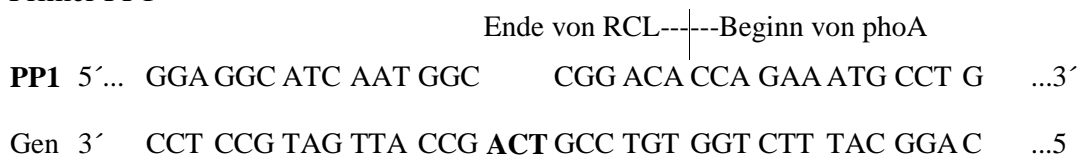


Primer PL2:

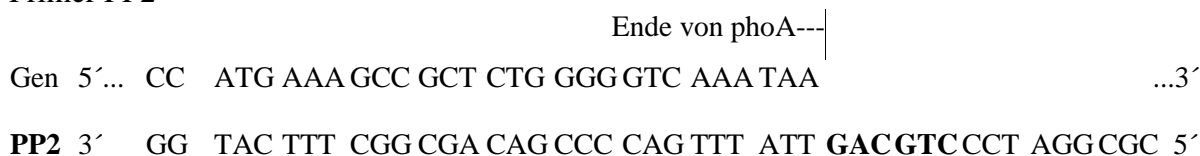


2. Amplifikation des Gens der alkalischen Phosphatase aus der genomischen DNA von *E. coli* JM105 (*phoA*) mit den Amplifikationsprimern PP1 und PP2 für die rekombinante PCR. Mit dem Primer PP1 wird vor dem *phoA*-Gen das Ende des Gens der L-Untereinheit eingeführt, mit Ausnahme des Stopkodons von RCL. Durch den PP2-Primer wird am Ende von *phoA* eine *Pst*I-Schnittstelle angehängt.

Primer PP1



Primer PP2



*Pst*I

3. Ligation der beiden Gene über rekombinante PCR.
4. Klonierung des Fusionsproteins in pUC18 über die *PstI*-Restriktionsstelle.

Für die Amplifikation des RCL-Gens wurde die Vent-Polymerase, die eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt, verwendet. Das Gen für die alkalische Phosphatase konnte hingegen nur mit der Taq-Polymerase erfolgreich amplifiziert werden. Nach der Reinigung der PCR-Fragmente wurde zur Ligation der amplifizierten Fragmente die Taq-Polymerase eingesetzt. Bei einer Annealingtemperatur von 57 °C dienten sich die Gene gegenseitig als Primer, und nach 30 Zyklen konnte ein 2,2 kb großes Fusionsgen isoliert werden.

Das mit *PstI* behandelte Gen wurde in den mit *PstI* verdauten Expressionsvektor pUC18 ligiert (s. Abbildung 3.46) und fehlerfrei sequenziert.

Umklonierung des Fusionsgens L-phoA aus pUC18-L-phoA in pET20b

Für die Expression des Fusionsgens wurde zusätzlich das T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem verwendet (s. Kap. 2.4.10). Dazu mußte das Gen L-phoA aus dem Vektor pUC18-L-phoA in das Plasmid pET20b umkloniert werden (s. Abbildung 3.46). Dies erfolgte nach Restriktionsverdau des Plasmids pUC18-L-phoA mit *BamHI* und *HindIII* und anschließender Ligation des Gens in den ebenfalls mit *BamHI* und *HindIII* behandelten Expressionsvektor pET20b. Der Expressionsvektor pET20b-L-phoA wurde schließlich in *E. coli* BL21DE3 transformiert.

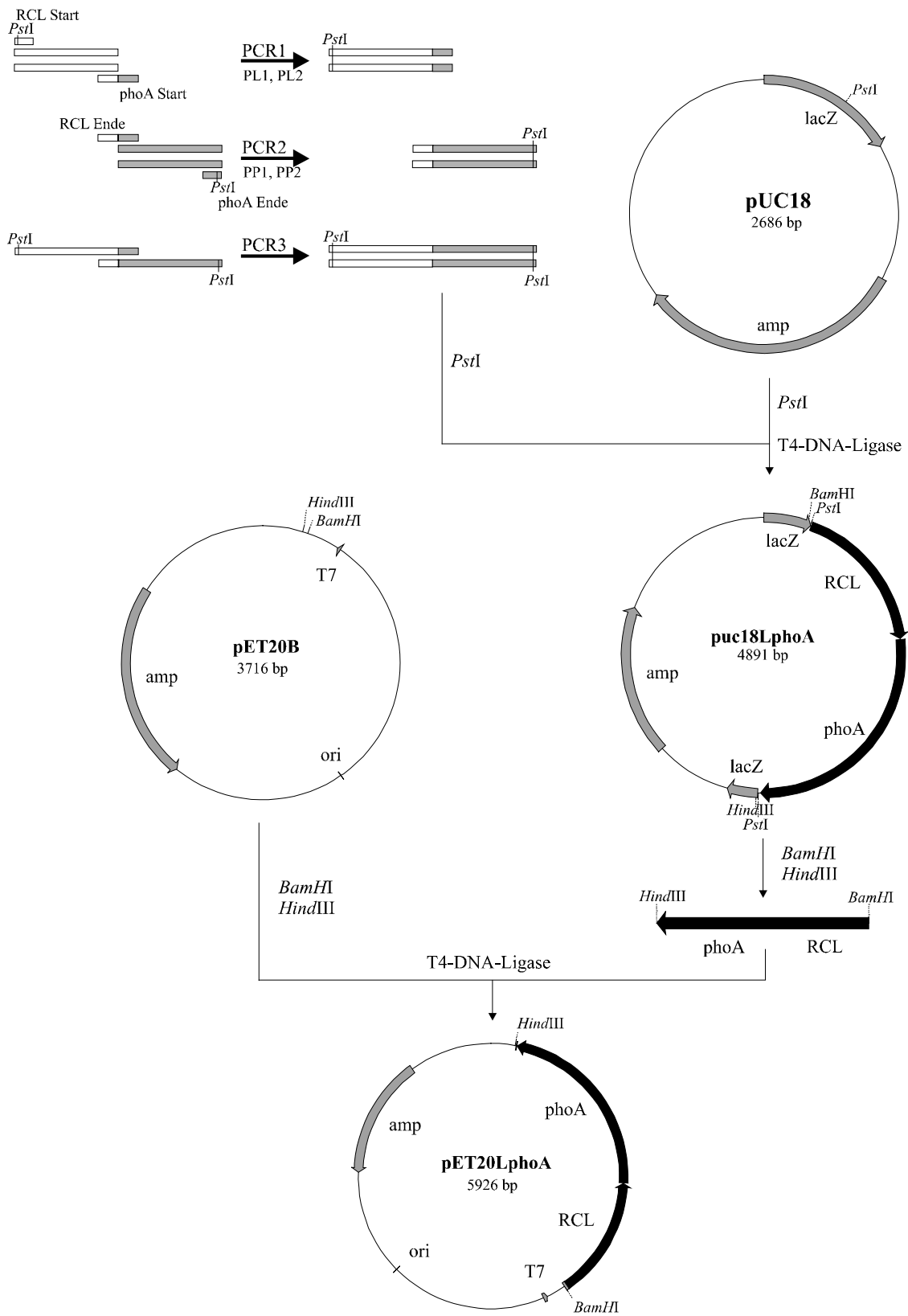


Abbildung 3.46: Klonierung des Fusionsproteins L-phoA über rekombinante PCR in pUC18 und Umklonierung in den Expressionsvektor pET20b(+).

3.8.6 Expression von L-phoA

Die Expression des Fusionsproteins vom Plasmid pUC18-L-phoA erfolgte unter Verwendung des *E. coli* Stammes DH5 α (s. Kap. 2.4.10). Der Expressionsvektor pET20b-L-phoA wurde hingegen in *E. coli* BL21DE3 transformiert. Nach jeweiligem Animpfen mit einer Vorkultur wurde ein 50 ml-Ansatz bis zum Erreichen einer optischen Dichte von je OD₅₇₈ = 1,0 bei 30 °C geschüttelt, und zur Induktion wurden 200 μ l einer 100 mM IPTG-Stammlösung (Endkonzentration 0,4 mM) hinzugegeben. Nach 3 h wurden die Zellen geerntet und per Ultraschall aufgeschlossen. Parallel wurde zur Kontrolle ein das reine Plasmid pET20b tragender BL21DE3-Stamm den gleichen Expressionsbedingungen unterworfen. Die Analyse der Expression erfolgte mittels SDS-PAGE durch Auftrennung der gesamten Proteine. Mit 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Gesamtprotein, im Überstand nach Zellaufschluß und Zentrifugation sowie in dem aus dem Aufschluß zurückbleibenden Pellet gemessen.

Da pUC18-L-phoA und pET20b-L-phoA für das aus 735 Aminosäuren bestehende Fusionsprotein L-phoA codieren, wurde in den Expressionsansätzen eine zusätzliche Proteinbande von 78 kDa erwartet. Mit *E. coli* DH5 α konnte kein Fusionsprotein exprimiert werden. Nach der Expression mit *E. coli* BL21DE3 konnte aber im Vergleich zur Kontrolle eine sehr schwache Bande um 100 kDa festgestellt werden. Ein Test auf Aktivität der alkalischen Phosphatase mit 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat fiel allerdings negativ aus.

Immunoblot:

Zum vollständigen Ausschluß, daß es sich bei dem schwach exprimierten Protein um das Fusionsprotein handelt, wurde ein Immunoblot durchgeführt. Dazu wurden die nach der Expression von BL21DE3-L-phoA erhaltenen Gesamtproteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Blotten auf Nitrocellulosemembran immobilisiert. Unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums, das gegen die L-Untereinheit des Photoreaktionszentrums aus *Rhodobacter sphaeroides* gerichtet ist, erfolgte die anschließende Analyse. Das Antiserum stellte sich dabei jedoch als zu unspezifisch heraus, denn neben dem schwach exprimierten 100 kDa Protein haben die Antikörper an zahlreiche andere Proteine gebunden.

4 Diskussion

Liposomen stellen ein definiertes biologisches System dar und sind genauso wie ihr natürliches Vorbild - die Zelle - aus Phospholipiden aufgebaut. Zelluläre Membranen enthalten aber eine Vielzahl verschiedenartiger Lipide, deren Art und Verhältnis zueinander wiederum spezifisch für unterschiedliche Membranen sind (Dohan, 1994; Evans & Graham, 1989). Dieses Verhältnis ist sehr genau ausbalanciert, und man weiß heute, daß viele - vor allem auch proteinvermittelte - physiologische Vorgänge empfindlich von der Lipidzusammensetzung abhängig sind (Chonn et al., 1994). In den meisten Fällen ist jedoch unklar, ob sich Lipide aktiv an solchen Prozessen beteiligen. Sie könnten z.B. in Form einer definierten Lipidumgebung Einfluß auf Proteinfunktionen nehmen oder die Konformation und damit auch Funktion eines Proteins unmittelbar, z.B. durch spezifische Assoziation, modulieren.

Um eine funktionelle Rekonstitution von Membranproteinen zu erzielen, werden daher häufig Lipidmischungen natürlichen Ursprungs bevorzugt. Diese können die Proteinumgebung am besten simulieren. Indem man dem Membranprotein einen Phospholipidauszug aus seiner natürlichen Membran zur Rekonstitution anbietet, können optimale Bedingungen geschaffen werden. Allerdings lassen sich an solchen "quasi-natürlichen" Systemen viele Meßmethoden, z.B. DSC, nicht anwenden (komplexe Lipidmischungen weisen keine oder nur sehr unscharfe Phasenübergänge auf) (Kurrle, 1989). Zudem ist das Erfassen spezifischer Wechselwirkungen des Proteins mit einzelnen Lipidkomponenten kaum möglich. Auf der anderen Seite steht der Versuch, ein Protein in eine einzige Lipidspezies zu rekonstituieren. Dieses Modellsystem ist aufgrund seiner Einheitlichkeit gut für physikalische Messungen geeignet, und die Wechselwirkungen zwischen Protein und Lipid können klar herausgearbeitet werden.

Zur Charakterisierung und zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Membranproteinen mit Phospholipiden wurden in dieser Arbeit ungewöhnliche Phospholipide eingesetzt. Dabei handelte es sich um die synthetisch hergestellten (1,2)-Diacyl-*sn*-glycero-3-phospholipide isomerer Octadecinsäuren, die Cholin, Ethanolamin, Serin, Glycerol oder die freie Säure als Kopfgruppe trugen. Weiterhin besaß die Octadecinsäure eine Dreifachbindung an Position 4 oder 14. Neben dem für die

Rekonstitution so wichtigen Kriterium einer geeigneten physiologischen Hauptphasenumwandlungstemperatur wurden folgende Parameter bei der Auswahl der Lipide berücksichtigt:

- | | |
|-----------------------------|--|
| 1. Kopfgruppe | elektrische Ladungen
Fähigkeit zu Wasserstoffbrücken-Bindung
Größe (sterische Einflüsse) |
| 2. Kohlenwasserstoff-Ketten | Länge
ungesättigte Bindungen und deren Position |

Die Auswahl dieser Parameter beruht u.a. auf den Vorstellungen zur selektiven Lipid-Protein-Wechselwirkung in Membranen. Viele Möglichkeiten einer solchen Wechselwirkung sind denkbar, wobei zwei Mechanismen als vorherrschend angesehen werden:

- 1) Die selektive elektrostatische Wechselwirkung, v.a. in Gegenwart von geladenen Lipiden, wie z.B. PS, PG (Maksymiwi et al., 1987).
- 2) Die sterisch elastische Wechselwirkung, die ihren Ursprung in unterschiedlich guter Anpassung der verschiedenen Lipid-Kettenlängen an den integralen Teil eines Membranproteines hat (Mouritsen & Bloom, 1984).

Zur Untersuchung der Lipid-Protein-Wechselwirkungen wurden das Photoreaktionszentrum aus *Rhodobacter sphaeroides* sowie das Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium* als Modellmembranproteine in Liposomen rekonstituiert.

4.1 Kultivierung von *Rhodobacter sphaeroides*, Isolierung und Reinigung der Reaktionszentren

Bevor die Isolierung und Reinigung des Photoreaktionszentrums aus *Rhodobacter sphaeroides* durchgeführt werden konnte, erfolgte die Fermentation der Mikroorganismen in Schüttelkolben. Diese Methode erwies sich als einfach durchführbar und erforderte keinen großen technischen Aufwand. Die Zellen wurden somit je nach Bedarf kultiviert und lieferten stets gleiche Ausbeuten. Der Organismus ist fähig, im Licht und unter anaeroben Bedingung Photosynthese zu betreiben. Daher wurde dem Medium Succinat beigefügt, das als organische Kohlenstoffverbindung assimiliert werden konnte.

Durch Bestrahlung mit Licht und der Sauerstoffabnahme wird in phototrophen Mikroorganismen die Bildung der intracytoplasmatischen Membran sowie die Protein- und Bakteriochlorophyllsynthese des Reaktionszentrums induziert. Bei allzu hoher Lichtintensität wird die Synthese des photosynthetischen Apparates allerdings inhibiert, während die Chlorophyllmenge bei geringer Lichtintensität steigt (Brock & Madigan, 1991). Die Zellen wurden aufgrund dieses Regulationsmechanismus mit einer relativ geringen Lichtintensität bestrahlt um eine hohe Ausbeute an Photoreaktionszentrum zu erhalten. Der Sauerstoffgehalt in der Kulturflüssigkeit wurde durch eine vorgeschaltete Dunkelphase reduziert. Während dieser Inkubation schlug die phototrophe Kultur den heterotrophen Stoffwechselweg ein (Schnieder, 1995). Das phototrophe Wachstum wurde durch Begasen des Mediums mit Stickstoff beschleunigt.

Nach Kultivierung und Ernten der Zellen von *Rhodobacter sphaeroides* wurden die Photoreaktionszentren nach einer Methode von Gray et al. isoliert und extrahiert (Gray et al., 1990). Die Membranproteine wurden nach mechanischem und enzymatischem Zellaufschluß mittels Detergenzien extrahiert. Anschließend konnten die solubilisierten Reaktionszentren durch Ionenaustauschchromatographie an einer FPLC-Anlage gereinigt werden. Die FPLC ermöglichte einen automatischen Ablauf der Proteinreinigung und die Elution der einzelnen Proteine in scharf getrennten Fraktionen durch einen stufenlosen Gradienten.

In der Vergangenheit wurden die Reinigungen oft im batch-Verfahren durchgeführt. Das Gelmaterial basierte dabei auf Cellulose und zeigte bei der Übertragung auf die FPLC einige Nachteile. Dazu gehörten laut Voet et al. die geringe Affinität der Anionen, die

geringe Beladungskapazität und die Komprimierung der Cellulose bei höheren Fließgeschwindigkeiten (Voet & Voet, 1992).

Durch die Kombination von einem Kationen- und einem Anionenaustauscher konnten Reaktionszentren mit einem Reinigungsgrad OD_{280nm}/OD_{800nm} von 1,2 - 1,5 bereitgestellt werden. Als Kationenaustauscher diente S-Sepharose. Q-Sepharose wurde als Anionenaustauscher verwendet. Die beiden Ionenaustauschersäulen wurden miteinander gekoppelt und die Proteinprobe auf die S-Sepharose aufgetragen. Der Kationenaustauscher diente dabei zur Vorreinigung der Reaktionszentren. Das RC band nicht an die Säulenmatrix und wurde gleich auf die angeschlossene Q-Sepharose übertragen bzw. eluiert. Restproteine, die im Auftragungspuffer als Kationen vorlagen, wurden zum großen Teil an den Kationenaustauscher fixiert. Die Elution des RCs von der Q-Sepharose wurde nach Entfernung der S-Sepharose durchgeführt. Durch Anlegen eines stufenlosen Salzgradienten konnte eine scharfe Trennung des Membranproteins bei 400 mM NaCl erzielt werden. Hierbei zeigte die Q-Sepharose eine gegenüber der bislang angewendeten DEAE-Cellulose-Säulen höhere Bindungsaffinität zum RC. Als eine weitere positive Folge der gekoppelten Säulenchromatographie ist die Zeiteinsparung zu sehen. Während die Vorreinigung und Aufreinigung des RCs bei Anwendung der Chromatographie mit DEAE-Cellulose wegen eines Dialyseschrittes zeitlich voneinander getrennt ist, konnte die Proteinreinigung nun in einem Schritt erfolgen. Der Reinigungsprozeß und die eluierten Reaktionszentren konnten anhand von SDS-PAGE überprüft werden. Gleichzeitig wurde damit das Vorhandensein der drei Untereinheiten des RC gezeigt (Laußermair & Oesterhelt, 1992).

Für die Extraktion und Reinigung des Membranproteins wurden unterschiedliche Detergenzien getestet. Zum einen wurde das bislang verwendete nichtionische LDAO in Konzentrationen von 0,08-0,5% genutzt (Goc et al., 1996; Yasuda et al., 1994; Gray et al., 1990). Außerdem wurden synthetische Zuckertenside für die Isolierung und Reinigung eingesetzt (Cao et al., 1997).

Im Falle des LDAO wurden mit zunehmender Tensidkonzentration mehr Proteine aus den aufgeschlossenen Zellen extrahiert, gleichzeitig wurde aber die Reinigung bezüglich des Reinigungsfaktors ineffektiver. Es konnte zudem beobachtet werden, daß eine 0,08 % LDAO-Konzentration sich auf die Extraktion des Bakteriophäophytins auswirkte. Offensichtlich scheint für die Isolierung des intakten/vollständigen RC eine

Mindestkonzentration erforderlich, weshalb eine 0,25 %ige Detergenzmenge am geeignetsten erschien.

Üblicherweise werden Detergenzien wie Triton X-100, OGP, Natriumcholat oder LDAO für die Membransolubilisation, Proteinisolation und Rekonstitution genutzt (Levy et al., 1992a; Gast, 1996; Paternostre et al., 1988; Scotto et al., 1987). Aber anstelle von LDAO konnten die synthetisch hergestellten Zuckerester 6-*O*-Octanoyl- β -glucose und 6-*O*-Octanoyl- β -mannose das erste Mal erfolgreich für die Extraktion und Reinigung des Reaktionszentrums verwendet werden. Diese Zuckerester können kostengünstig hergestellt werden, und sie weisen neben einem hohen CMC-Wert (20 mM) ein gutes Solubilisationsvermögen für RC auf. Schon Konzentrationen von 8 mg/ml sind zur Bildung von Protein-Detergenz-Mizellen ausreichend, und nach der chromatographischen Reinigung wird intaktes RC mit einer hohen Ausbeute gewonnen (s. Abbildung 3.5). Diese sind vergleichbar mit denen der LDAO-gereinigten Reaktionszentren (vgl. Tabelle 3.2). Ein weiterer enormer Vorteil der Anwendung von synthetischen Zuckerestern wird später klar ersichtlich, wenn die Rekonstitution des Proteins in Liposomen erfolgen soll.

Die Funktionalität der gereinigten Reaktionszentren wurde mit einem nach Jockers modifizierten Cytochrom c Assay gezeigt. Dieser Assay diente dabei zur Bestimmung der photochemischen Aktivität von Chinonaldehyden (Jockers, 1992). Oettmeier et al. verwendeten einen ähnlichen Turn-over Assay zur Bestimmung der Inhibitor konstante von PS-II-Herbiziden (Oettmeier & Preuß, 1987). In beiden Fällen wurde jeweils die Oxidation von Cytochrom c durch das Reaktionszentrum gemessen. Auch die eigenen Untersuchungen bewiesen die inhibitorische Eigenschaft von s-Triazinen auf das RC. Die Herbizide binden dabei an die Q_B -Bindungsstelle und inhibieren den Elektronentransport von Q_A nach Q_B (Stein et al., 1984), so daß eine weitere Oxidation von Cytochrom c unterbunden wird. Die Ergebnisse zeigten eine größere Inhibitoreigenschaft des Terbutylazins gegenüber Atrazin (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). Weiterhin war für die Durchführung des Cytochrom c Assays die Präparationsmethode des RC wichtig. Die Bestimmung der photochemischen Aktivität des RC war nur dann möglich, wenn alle Kofaktoren vorhanden waren. Wurde RC mit einer niedrigen LDAO-Konzentration (0,08 % v/v) extrahiert und gereinigt, so konnte das Bakteriophäophytins fehlen. Da dieser Kofaktor allerdings essentiell im Elektronentransport ist, konnte mit dieser RC-

Charge keine Cytochrom c Oxidation detektiert werden, jedoch mit höherer LDAO-Konzentration.

4.2 Herstellung von Liposomen und Proteoliposomen

Die Komplexität der Struktur und die Vielzahl von Funktionen natürlicher Membranen werden im liposomalen System stark vereinfacht (Eibl, 1984).

Liposomen als Modellsysteme biologischer Membranen dienen der Untersuchung von Protein-Rekonstitutionen und Lipid-Protein-Wechselwirkungen. Es wurde gezeigt, daß zum Aufbau dieser selbstorganisierenden Systeme neben den natürlichen Phospholipiden auch synthetische membranbildende Phospholipide eingesetzt werden können.

Für die Liposomenpräparation standen neben den kommerziellen Phospholipiden auch eine Vielzahl ungewöhnlicher Phospholipide zur Verfügung. Diese ungewöhnlichen Phospholipide wurden ausgehend von den (1,2)-Diacyl-*sn*-glycero-3-Phosphatidylcholinen isomerer Octadecinsäuren synthetisiert (Pisch et al., 1997). Die jeweiligen Octadecinsäuren der Phospholipide wiesen dabei entweder eine Dreifachbindung an der Position 4 oder 14 auf. Durch eine enzymatische Transphosphorylierung wurde die Cholinkopfgruppe gegen Ethanolamin, Glycerin oder Serin ausgetauscht (Pisch et al., 1997).

Liposomen dienen zum einen zur näheren Charakterisierung der unterschiedlichen ungewöhnlichen Phospholipide. In diese Liposomen konnten Modellmembranproteine wie das Photoreaktionszentrum aus *Rhodobacter sphaeroides* oder das Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium* rekonstituiert werden (vgl. Kap. 4.2.4). Somit war es zum anderen möglich, Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Proteinen zu studieren.

4.2.1 Detergenz-Dialyse

Zur Herstellung von Liposomen aus DMPC, DPPC und den ungewöhnlichen Phospholipiden (vgl. Kap. 2.1.2) wurde zunächst die Detergenz-Dialyse-Methode angewandt (Schnieder, 1995; Rürup, 1994). Diese Technik wurde gewählt, weil die später zu rekonstituierenden Proteine in Detergenz solubilisiert vorliegen und es sich um eine für Membranproteine schonende Methode handelt. Zudem ist es möglich, über die Art bzw. Konzentration des Detergenz sowie über die Dialysebedingungen die Größe und Lamellarität der Liposomen einzustellen (Phillipott et al., 1983).

Die Phospholipide wurden mit dem Zuckertensid OGP in einem molaren Verhältnis von 20:1 solubilisiert und die Dialyse in einem Minilipoprepperät durchgeführt. Die hohe Detergenzkonzentration ermöglichte den Verzicht auf die Homogenisierung mit Ultraschall, die aufgrund des hohen Energieeintrages zum Lipidabbau führen könnte. Die anschließende Dialyse im Minilipoprepperät ermöglichte eine gute Reproduzierbarkeit der Liposomenpräparationen aufgrund der konstanten Dialysebedingungen (homogene Durchmischung der gemischten Mizellen).

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß Liposomen auch mit den synthetischen Zuckerestern 6-*O*-Octanoyl- β -glucose (OG) und 6-*O*-Octanoyl- β -mannose (OM) präpariert werden können. Für die Solubilisierung von 1 mg/ml Phospholipid eignete sich dabei eine Konzentration von 8 mg/ml (27,2 mM) Zuckertensid. Dieses entspricht in etwa einem molaren Verhältnis von 1:20. Die Zuckerester lassen sich schließlich aufgrund ihres hohen CMC-Wertes von 20 mM leicht durch Dialyse aus den gemischten Mizellen entfernen. Somit stellen OG und OM eine preiswerte Alternative zu dem bisher üblichem OGP zur Liposomenpräparation durch die Detergenz-Dialyse dar.

4.2.2 "Freeze-Thaw"-Methode

Neben der Detergenz-Dialyse-Methode wurde auch die "Freeze-Thaw"-Technik zur Liposomenherstellung angewandt. Diese Methode bietet mehrere Vorteile. Liposomen können sehr schnell bereitgestellt werden, auf den Einsatz von Detergenzien kann verzichtet werden, und das Verfahren eignet sich besonders gut zum Einschließen von

Substanzen in Vesikel (New, 1990). Calcein-Liposomen konnten erfolgreich mit ungewöhnlichen Phospholipiden präpariert werden. Weil jedoch kein 100 %iger Einschluß der Substanzen in die Vesikel erfolgte, war eine Reinigung der nichteingeschlossenen Markermoleküle von den Calcein-Vesikeln durch Gelfiltration unabdingbar. Die gereinigten Calcein-Liposomen wurden zum Studium der Detergenzstabilität herangezogen (vgl. Kap. 4.3.2).

4.2.3 Etablierung einer neuen Methode zur Liposomenpräparation unter Verwendung von synthetischen Zuckerestern und einer immobilisierten Lipase

Die synthetischen Zuckerester 6-*O*-Octanoyl- β -glucose (OG) und 6-*O*-Octanoyl- β -mannose (OM) spielten bereits eine bedeutende Rolle bei der Isolierung und Reinigung von Photoreaktionszentren (vgl. Kap. 3.1.2). Dort konnte erstmals ihr hohes Solubilisationsvermögen für das Photoreaktionszentrum aus *Rhodobacter sphaeroides* gezeigt werden. Diese Zuckerester können heutzutage durch eine einfache schnelle und regioselektive Lipase-katalysierte Synthese gewonnen werden (Cao et al., 1996).

Aufgrund physikochemischer Ähnlichkeiten von Zuckerestern mit OGP (nicht-ionisches Tensid, hoher CMC-Wert von 20 mM (Cao, 1997)) konnte OGP bereits bei der Detergenz-Dialyse-Methode zur Liposomenpräparation gegen OG und OM ausgetauscht werden.

Die Anwendungsmöglichkeit der Zuckerester zur Liposomenpräparation ergab sich aus weiteren interessanten Charakteristiken: OG und OM werden innerhalb von 2 h bei einer Temperatur von 40 °C und in einem 100 mM Tris/HCl Puffer, pH 8,0 komplett lipolytisch gespalten (s. Tabelle 3.4). Dabei verlieren sie die Eigenschaften als Detergenz. In einem Lipid-Protein-Zuckerester-Gemisch können sich spontan Proteoliposomen bilden. Als vorteilhaft erwies sich in der neuen Präparationsmethode die Immobilisierung der Lipase auf einen festen Träger. Damit wurde einerseits die Rekonstitution von Lipase in die Liposomen vermieden, andererseits konnten Liposomen sehr einfach durch Filtration von der Matrix getrennt werden.

Die Überlegenheit dieser etablierten Methoden gegenüber Präparationstechniken, die ebenfalls Detergenzien benötigen, liegt in der kompletten Hydrolyse der Zuckerester, der Schnelligkeit und in den milden Reaktionsbedingungen. Übliche Methoden zur Detergenzentfernung sind die Dialyse (Racker, 1972), Säulenchromatographie (Allen et al., 1980, Brunner et al., 1976) und Adsorption (Kasahara & Hinkle, 1977, Rogner et al., 1979). Diese Methoden können aber auch andere kleine wasserlösliche Moleküle entfernen und somit die Einschlußeffektivität verringern. Außerdem können diese Methoden sehr arbeitsintensiv sein und aufwendige Apparaturen erfordern.

Bei Verwendung von Detergenzien mit hoher CMC und sehr gründlicher Dialyse verbleiben dennoch Detergenz-Moleküle in den Vesikeln (Krämer et al., 1981). Wendet man sehr empfindliche Meßmethoden an, wie die Mikrokalorimetrie, so können solche Detergenz-Reste (meist < 1 % der Ausgangsmenge) stören. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da Detergenzien in der Membran proteinvermittelte Effekte vortäuschen können, z.B. Wechselwirkungen mit den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten.

Weiterhin ist die effiziente Entfernung von Detergenz aus den rekonstituierten Proteoliposomen absolut wichtig, weil die Restdetergenzmengen die Enzymaktivität inhibieren und/oder die passive Permeabilität der Liposomen drastisch erhöhen können (Levy et al., 1990; Rigaud, 1995; Paternostre et al., 1988).

Die neue Technik ist zudem für die Präparation von detergenzfreien Proteoliposomen mit 28-39 % eingebautem RC und 81-88 % BR (vgl. Kap. 3.4.1.3 und 3.4.2) geeignet. Ein Lipase-Screening führte zur Monoglycerid-Lipase aus *Bacillus species*. Sie spaltete nur die hydrophoben Fettsäureesterbindungen der Zuckerester und reagierte nicht mit anwesenden Phospholipiden (vgl. Abbildung 3.16). Falls erforderlich, kann für die Rekonstitution von weniger stabilen Membranproteinen die optimale Reaktionstemperatur von 40 °C verringert werden. Diese Temperatur müßte in entsprechenden Versuchen bestimmt werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß diese neue Methode sanfter, schneller, weniger kostspielig und einfach durchführbar ist, verglichen mit gebräuchlichen Techniken zur Liposomenpräparation.

4.2.4 Rekonstitution von RC

Nach der Isolierung und Reinigung des Photoreaktionszentrums schloß sich die Rekonstitution des Membranproteins in Liposomen an. Das Modellsystem sollte zur weiteren Charakterisierung von ungewöhnlichen Phospholipiden beitragen.

Durch die Inkorporation des RC in Liposomen konnten die Eigenschaften des rekonstituierten Proteins klar herausgearbeitet werden, denn der Chinonpool der natürlichen Membranen war nicht mehr vorhanden und konnte die weiteren Messungen nicht beeinflussen. Verglichen mit natürlichen Membransystemen, war darüber hinaus die Stabilität des RC in Vesikeln stark erhöht, da keine Störungen durch zelluläre Proteasen oder andere Abbauprozesse von Proteinen auftreten konnten.

Das mit OGP solubilisierte Reaktionszentrum konnte in die Phospholipidbilayer aus DMPC und DPPC integriert werden. Durch kontrollierte Dialyse der Protein-Lipid-Tensid-Gemische wurden große unilamellare Vesikel hergestellt. Die RC-Einbauraten waren dabei abhängig vom verwendeten Lipid und dementsprechend von der Dialysetemperatur (vgl. Tabelle 3.5). Aufgrund der T_m -Werte von DMPC und DPPC mußte die Dialyse bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden. Im Falle der DPPC-Liposomenpräparation war jedoch die hohe Temperatur offensichtlich nicht schonend genug für das RC. Die Einbauraten für RC in DPPC-Liposomen lagen vermutlich aufgrund der Denaturierung eines Teiles der Proteine bis zu 27 % niedriger als bei DMPC-Liposomen. Nach neueren Studien von Hara et al. kann RC aber auch ohne nennenswerte Verluste bei einer Dialysetemperatur von 4 °C in Liposomen inkorporiert werden (Hara et al., 1997a).

Zum ersten Mal gelang es, die Zuckerester OG und OM für die Präparation von Proteoliposomen zu verwenden (vgl. Kap. 3.4.1.2). Aufgrund ihres hohen CMC-Wertes von 20 mM zeigen sie in der Detergenz-Dialyse-Methode die gleichen Eigenschaften wie das bisher verwendete OGP. Die Einbauraten für RC in die Liposomen waren wiederum abhängig vom verwendeten Phospholipid und der entsprechenden Dialysetemperatur. Sie lagen zwischen 17-48 % (vgl. Tabelle 3.6).

Die Zuckerester bieten darüber hinaus noch weitere Vorteile. Sie zeigen ein gutes Solubilisationsvermögen für das RC und nach erfolgreicher Extraktion und Reinigung, unter Verwendung von OG und OM, kann ein langwieriger Detergenzaustausch

entfallen. Durch die einfache Synthese mit hohen Ausbeuten sind Zuckerester auch in ökonomischer Hinsicht interessant (Cao, 1997).

Neben der bereits von Rürup (1994) beschriebenen Rekonstitution von RC in Proteoliposomen aus (1,2)-Diacyl-phosphatidylcholinen isomerer Octadecinsäuren ist erstmalig die Verwendung von weiteren (1,2)-Diacyl-phosphatidyllipiden isomerer Octadecinsäuren mit unterschiedlichen Kopfgruppen zur Proteoliposomenpräparation gelungen. Diese Phospholipide unterschieden sich dabei in der Struktur der Kopfgruppen. Bei den synthetischen Phospholipiden handelte sich um das zwitterionische PC und PE sowie um die negativ geladenen Phospholipide PS, PG und PA. Nach Herstellung der Proteoliposomen mittels Zuckeresterhydrolyse-Methode wurden hohe RC-Einbauraten in Liposomen erhalten (vgl. Tabelle 3.7). Der RC-Einbau wurde dabei durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums von 200 - 900 nm nachgewiesen. Zwischen 34 und 44 % des Proteins wurden in DMPC-Liposomen und Liposomen aus synthetischen Phospholipiden inkorporiert. Etwas geringer war die detektierte RC-Konzentration in DPPC-Liposomen (28-33 %). Die ähnlich hohen Inkorporationsraten lassen vermuten, daß die Art der Lipidmatrix für den RC-Einbau nicht ausschlaggebend ist. Als wichtiges Ergebnis bleibt festzuhalten, daß die acetylenischen Phospholipide somit günstige Bedingungen für eine RC-Integration aufweisen.

Auch in der vergangenen Zeit wurden bereits viele Untersuchungen hinsichtlich der Rekonstitution von Photoreaktionszentren durchgeführt. Dabei wurden die unterschiedlichsten Phospholipide und Präparationsmethoden eingesetzt.

Sojabohnen-Lecithin verwendeten Schönfeld et al. und Rich et al. zur Rekonstitution von RC. Rich et al. bedienten sich der Cholat-Dialyse-Technik und fügten ebenfalls noch den Cytochrom bc1-Komplex in die Vesikel ein (Schönfeld et al., 1979; Rich & Heathcote, 1983). Aus *Escherichia coli* isolierte Phospholipide wählten Crielaard et al. zur Inkorporation des photosynthetischen Elektronen-Transfer-Komplexes aus *R. sphaeroides* (Crielaard et al., 1989; Crielaard et al., 1992a). Ebenfalls Mischungen von Phospholipiden wurden von Packham et al. und Schnieder verwendet (Packham et al., 1980; Schnieder, 1995). Moser et al. rekonstituierten Reaktionszentren, Cytochrom c und c₂ in Vesikel aus Ei-Lecithin durch Dialyse mit OCG (Moser & Dutton, 1988).

4.2.5 Rekonstitution von BR

Erstmals konnte in dieser Arbeit die Rekonstitution von BR in Liposomen unter Verwendung einer neu etablierten Methode in Anwesenheit von Zuckerestern und einer Lipase durchgeführt werden (s. Kap. 3.4.2). Als Vergleichsmethode für die Inkorporation von BR wurde die Detergenz-Dialyse gewählt. Zur Solubilisierung der Phospholipide war in beiden Präparationsverfahren ein 20facher molarer Detergenzüberschuß erforderlich. Nach der Proteoliposomenherstellung wurde die BR-Einbaurate durch Aufnahme eines UV/VIS-Spektrum bestimmt.

Für die Rekonstitution wurden die ungewöhnlichen Phospholipide PC14, PG14 und PA4 sowie das kommerzielle DMPC ausgesucht, weil diese Phospholipide bereits bei RC-Liposomen eine Proteinorientierung zeigten. Spätere Untersuchungen sollten sich ebenfalls mit der Orientierung von BR in Liposomen beschäftigen.

Beide durchgeführten Methoden zur Herstellung von BR-Proteoliposomen lieferten Insertionsraten von 80 - 90 % (vgl. Tabelle 3.8). Ähnlich hohe Werte wurden bereits in der Literatur von Rigaud et al., 1983, angegeben, die BR durch die "reverse phase evaporation"-Methode rekonstituierten.

Durch die erfolgreiche Integration des BR in Liposomen wurde bewiesen, daß die neue Technik zur Liposomenpräparation nicht nur für RC als Membranprotein anwendbar ist.

4.3 Physikochemische Charakterisierung der hergestellten Liposomen und Proteoliposomen

4.3.1 Größenbestimmung von Liposomen

Mit Hilfe zweier Standardverfahren wurden Aussagen über die Größe und die Größenverteilung der Liposomen erhalten: Elektronenmikroskopie und dynamische Lichtstreuung. In der Literatur wird auf Vor- und Nachteile dieser Methoden hingewiesen.

Als eine sehr genaue Methode zur Überprüfung der Liposomenpräparation gilt die Elektronenmikroskopie (New, 1990). Mit der Elektronenmikroskopie (TEM) lassen sich

Aussagen hinsichtlich Größe, Gestalt, Größenhomogenität und Lamellarität treffen (Mayer & Rhode, 1988). Ein Nachteil kann aber in der Beeinflussung der Vesikelgröße durch die Präparation bestehen. Bei der Negativkontrastierung mit Uranylacetat trocknen wasserlösliche Schwermetallsalze in amorpher Form um das abzubildende Objekt auf der Trägerfolie ein. Dadurch bleibt das Objekt gut durchstrahlbar, während seine Umgebung dunkel erscheint. Es kann dabei nicht immer verhindert werden, daß sich das Kontrastierungssalz nicht auch an Objektkomponenten bindet sowie auch in Hohlräume eindringt oder feine Details durch zu große Schichtdicken verdeckt. Stärkere Verformungen oder der Zerfall der Vesikel können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Weitere Störungen durch Artefakte werden von Mayer & Rohde (1988) sowie Olson et al. (1979) beschrieben. Zudem ist die Methode gerätetechnisch aufwendig.

Die dynamische Lichtstreuung weist mehrere Vorteile auf. Die einfache und schnelle Durchführung der Messung liefert neben den Durchschnittswerten für die Größe einer Population auch mittels Polydispersionskoeffizient Aussagen über die Homogenität. Homogene Lösungen lassen sich gut reproduzierbar mit der gerätetechnisch günstigen Methode bestimmen. Die Nachteile bestehen in der Konzentrationsabhängigkeit und in der Unreproduzierbarkeit bei stark inhomogenen Lösungen (Siebert et al., 1995). Für eine eindeutige Charakterisierung der Liposomengröße ist nach Vergleich dieser Ergebnisse nur die Kombination beider Meßmethoden ratsam.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Liposomen und Proteoliposomen lieferten einen umfassenden Nachweis der Vesikelbildung. Es zeigte sich die Tendenz, LUV oder IUV im Minilipoprepperät herzustellen (Abbildung 3.20). Präparationen im Dialyseschlauch wiesen auch Aggregate und große Vesikel auf (Abbildung 3.21). Nach Extrudierung durch einen Filter mit einer definierten Porengröße von 200 nm konnten Aggregatbildungen und sehr große Vesikel aufgelöst werden. Homogene Vesikelsuspension mit mittleren Partikeldurchmessern kleiner als 200 nm wurden erhalten.

Dynamische Lichtstreuungen bestätigten die homogenen Partikeldurchmesser nach dem Extrudierungsprozeß (s. Abbildung 3.23). Nach der Extrudierung durch eine Polycarbonatmembran lagen die mittleren Durchmesser der Liposomen, unabhängig von der Präparationsmethode, im Bereich von 100 - 170 nm (s. Tabelle 3.9). Ein Einfluß der

ungewöhnlichen acetylenischen Phospholipide auf die Proteoliposomendurchmesser war nicht festzustellen.

Durch die Extrudierung wurde gewährleistet, daß in nachfolgenden Experimenten immer mit homogenen Liposomensuspensionen gearbeitet wurde und damit immer die gleiche Menge und Markermoleküle eingeschlossen oder Membranprotein rekonstituiert wurde.

4.3.2 Detergenzstabilität der Liposomen

In dieser Arbeit wurde Calcein (3,6-Dihydroxy-2,3-bis[N, N'-di(carboxymethyl)-aminomethyl]fluoran) als Farbstoff für fluoreszenzspektroskopische Studien an Liposomen eingesetzt. Calcein bietet den Vorteil, keine pH-Wert abhängige Fluoreszenz im physiologischen pH-Bereich von 6-8.5 zu zeigen, was eine Vereinfachung der experimentellen Durchführung zur Folge hatte. Oberhalb von pH 9 nimmt die Intensität ab, und ab einem pH-Wert von 12,5 ist Calcein nicht mehr fluoreszierend (Fluoreszenzlöschung). Für Calcein wird ein Anregungsmaximum [ExMax] bei 488 nm und ein Emissionsmaximum [EmMax] bei 517 nm angegeben (Allen, 1984).

Calcein zeigt selbstquenchende, d.h. fluoreszenzlöschende Eigenschaften bei hohen Konzentrationen. Deshalb wurden Liposomen mit einer hohen inkorporierten selbstquenchenden Calceinkonzentration von 100 mmol/l eingesetzt. Bevor die Calcein-gefüllten Liposomen untersucht werden konnten, wurden sie erfolgreich über eine Gelfiltration von nicht eingeschlossenem Calcein abgetrennt.

Aussagen zur Stabilität der Liposomen erfolgten über das Freisetzungsverhalten der Liposomen in Abhängigkeit von einem hinzugegebenen Tensid. Als Detergenz wurde das nichtionische Tensid Triton X-100 über einen Konzentrationsbereich von 0,05-0,75 mmol/l hinzugegeben und die Fluoreszenz des freigesetzten Calceins erfaßt (s. Abbildung 3.27).

Die sigmoidalen Kurvenverläufe der Calcein-Freisetzung lassen sich sowohl für die DPPC-Liposomen als auch für die Liposomen aus ungewöhnlichen PL in drei Bereiche einteilen. Nach einer langsamen Erhöhung der Calcein Fluoreszenz ist ein starker linearer Anstieg und schließlich wieder eine Abflachungskurve der Freisetzung zu erkennen. Hervorzuheben ist jedoch der unterschiedliche Beginn des Überganges vom linearen zum abflachenden Bereich der Calcein Freisetzung für die unterschiedlichen Phospholipide. Während dieser schon bei DPPC-Liposomen bei 0,2 mmol/l liegt, flacht die Kurve bei

Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden sehr viel später ab ($>0,4$ mmol/l). Dieser charakteristische Kurvenverlauf läßt sich unter Berücksichtigung folgender Punkte erklären:

- 1) kritische mizellare Konzentration CMC von Triton X-100
- 2) "Drei-Stufen-Modell" nach Lichtenberg et al. zur Klärung der Wechselwirkung zwischen Tensid und Liposom (Lichtenberg et al., 1983).

Die CMC von Triton X-100 hat einen Wert von $0,24$ mmol/l in Wasser. Eine CMC-Verschiebung in Puffermedien (Allen, 1984), bedingt durch die Ionenstärke, ist anzunehmen, was das "Abknicken" des Calcein-Freisetzungsverhaltens für DPPC-Liposomen bei geringeren Triton X-100 Konzentrationen erklären würde.

Triton X-100 hat die Eigenschaft, die Permeabilität der Liposomen in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration zu verändern. Der Verlust (Diffusion) an inkorporiertem Calcein aus Liposomen als Folge der Permeabilitätsänderung wird im Anstieg der Fluoreszenz erfaßt, bis schließlich das Liposom solubilisiert wird. An diesem Punkt tritt der Bruch der Liposomenmembran ein, und es kommt zur vollständigen Calcein-Freisetzung. Die Kinetik der durchgeführten Stabilitätsmessungen folgt dabei dem von Lichtenberg et al. postulierten Drei-Stufen-Modell zur Beschreibung der Wechselwirkung zwischen Liposomen und Tensidmolekülen (Lichtenberg et al., 1983):

Stufe I:

Unterhalb der CMC-Konzentration von Triton X-100 liegt das Detergenz ausschließlich in Form von Monomeren vor. Diese verändern anfänglich die Permeabilität der Liposomen. Tensidmonomere werden bis hin zur Sättigung der Bilayer-Lipid-Membran der Liposomen eingebaut, d.h. die Veränderung der Permeabilität wird durch die Änderung der Molekülorganisation im Bilayer hervorgerufen. Diese Stufe wird im langsamen Ansteigen der Calcein-Freisetzung erkennbar.

Stufe II:

Mit zunehmender Tensidkonzentration nimmt die Solubilisierung der Liposomen (lamellar-mizellarer Phasenübergang) zu, die zur Koexistenz von gemischten Tensid-Lipid-Mizellen und mit Tensid gesättigten Liposomen führt. Dies wird bei einer

Konzentration, die ca. der CMC von Triton X-100 entspricht, beobachtet. In Abbildung 3.27 ist sie durch den raschen Fluoreszenzanstieg gekennzeichnet.

Stufe III:

Oberhalb der CMC von Triton X-100 findet ein vollständiger Übergang der noch verbleibenden tensid-gesättigten Liposomen (lamellare Struktur) in die gemischten Tensid-Lipid-Mizellen (mizellare Struktur) statt. Dies hat eine komplette Freisetzung des inkorporierten Farbstoffes zur Folge.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die komplette Solubilisierung der Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden erst bei Triton X-100 Konzentrationen, die höher als der CMC-Wert (0,24 mmol/l) liegen, stattfindet (s. Abbildung 3.27). Die Titrationsexperimente der Calcein-Liposomen mit Triton X-100 demonstrierten, daß mit zunehmender Detergenzkonzentration die Fluoreszenz des freigesetzten Calceins zunimmt, bis eine Sättigung erreicht wird. Diese sogenannte Endfluoreszenz (Absolutwert der Fluoreszenz) wird im Vergleich von Calcein-Liposomen aus acetylenischen Phospholipiden zu Calcein-Liposomen aus DPPC erst bei einer höheren Detergenzkonzentration erreicht. So erfolgt die vollständige Freisetzung des Calcein-Farbstoffes bei PS-14-, PS-4-, PG-14-, PG-4-, PA-14-, PA-4- und PC-4-Liposomen bei etwa 0,4 mmol/l Triton X-100. Erst bei etwa 0,5 mmol/l Triton X-100 wird der Farbstoff bei Liposomen aus den acetylenischen Phospholipiden PE-14, PE-4, und PC-14 freigesetzt. Diese Ergebnisse sprechen für eine erhöhte Detergenzstabilität der Vesikel aus synthetischen Phospholipiden gegenüber DPPC-Liposomen. Nach der Normierung der Fluoreszenzsignale und Ermittlung der 50 % Werte der Fluoreszenz, d.h. der Triton X-100 Konzentration, bei der 50 % des Calceins aus den Liposomen freigesetzt wurde, konnte eine 1,4 - 2,6fach höhere Detergenzstabilität der Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden gegenüber den DPPC-Vesikeln belegt werden (s. Tabelle 3.11). Vermutlich ist die Stabilitätssteigerung auf die alleinige Anwesenheit ungesättigter Fettsäuren im PL zurückzuführen. Denn es konnte weder die Art der Kopfgruppe, noch die Position der Dreifachbindungen als Grund für die bemerkenswerte Stabilitätssteigerung bewiesen werden. Zur näheren Aufklärung der Detergenzstabilität würden sich weitere Untersuchungen mit ionischen Tensiden anbieten.

4.3.3 Temperaturstabilität von RC-Liposomen

Die Temperaturstabilität der Reaktionszentren wurde durch Aufnahme von Absorptionsspektren untersucht. Dazu wurden zunächst RC-Proteoliposomen bei Temperaturen von 40, 50, 65 und 80 °C für eine Stunde inkubiert. Die Proteindenaturierung konnte schließlich durch Messung der Absorption des Bakteriochlorophylldimers bestimmt werden. Gegenüber nativem, in LDAO solubilisiertem RC, zeigten rekonstituierte Membranproteine eine höhere Temperaturstabilität (s. Abbildung 3.31 und Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: RC-Denaturierung nach einstündiger Inkubation von nativem und rekonstituiertem Protein bei 40, 50 und 65 °C.

Temperatur [°C]	Bakteriochlorophyll-Absorption [%]						
	RC	DMPC	PC14	PC4	PG14	PG4	PA4
40	40,8	42,1	51,4	48,7	59,6	51,9	50,3
50	14,5	21,4	28,8	31,0	37,8	27,4	34,3
65	5,2	10,2	9,1	19,1	10,0	6,2	10,2

Im Vergleich zu nativem RC wurde nach Inkubation bei 40 °C etwa 8-19 % weniger RC denaturiert, wenn es in Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden rekonstituiert war. Dabei ließ sich in PG14-Liposomen die höchste Kofaktorkonzentration nachweisen. Auch nach Inkubation der Proteoliposomen bei 50 °C erwies sich das Phospholipid PG14 als stabilitätsfördernd für das Membranprotein. Im Vergleich zum nativen RC wurden 23,3 % weniger Bakteriochlorophyll denaturiert und 16,4 % weniger als in RC-DMPC-Liposomen. Wurde das Protein einer Temperatur von 65 °C ausgesetzt, so waren noch 19,1 % des BChl in PC4-Liposomen intakt, respektive nur 5,2 % im nativen RC.

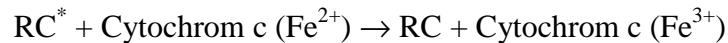
Somit scheinen die ungewöhnlichen Phospholipide das Reaktionszentrum bei erhöhten Temperaturen zu stabilisieren. Die möglichen Ursache für diesen Effekt sind jedoch nicht klar zu erkennen. Es könnten sowohl die Dreifachbindungen der Octadecinsäure als auch die Kopfgruppen verantwortlich sein. Mehrfach beschrieben wurden hingegen Effekte

von Detergenzien auf die Denaturierungstemperatur. Dabei führte vor allem Zucker zur Erhöhung der Temperaturstabilität (Ishimura et al, 1995, Gekko & Koga, 1983).

4.4 Orientierung integraler Modellmembranproteine in den hergestellten Liposomen

4.4.1 Reaktionszentrum

Das integrale Membranprotein RC konnte mittels schonender Detergenz-Dialyse-Methode in Liposomen aus ungewöhnlichen PL rekonstituiert werden. Durch Messung des lichtinduzierten Elektronentransfer von Ferrocytochrom c zum RC konnte die Proteinorientierung bestimmt werden. Ferrocytochrom c gibt dabei Elektronen an das photooxidierte Bakteriochlorophylldimer des RC-Komplexes an der periplasmatischen Seite (L, M-Untereinheit nach außen gerichtet) folgendermaßen ab (Moser & Dutton, 1988, Tiede et al., 1992):



Die Oxidation von Ferrocytochrom c wurde bei 550 nm gemessen, und die RC-Orientierung in Liposomen ist in Tabelle 3.12 dargestellt.

Bei den neutralen DMPC- und DPPC-Liposomen waren 50-65 % der H-Untereinheiten nach außen orientiert. Die negativ geladenen Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden und die neutralen PC14-Liposomen zeigten eine klare Proteinorientierung von 70-100 %. Der beachtliche Einbau von RC in nativer Orientierung läßt diese Modellsysteme für weitere Studien von großer biologischer Relevanz erscheinen.

Die Ursache für diesen gerichteten Einbau, der nicht von vornherein zu erwarten war, liegt wahrscheinlich im Zusammenspiel von Rekonstitutions-Prozeß, Lipideigenschaften und Proteinstruktur begründet. Die "right-side-out"-Orientierung ist möglicherweise sterisch begünstigt. Auch Ladungseffekte (elektrostatische Wechselwirkungen zwischen ungewöhnlichen PL und RC) können eine Rolle spielen.

In der Literatur können zahlreiche Studien über die gerichtete Proteinorientierung in Liposomen und über Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Proteinen gefunden werden. Bislang wurde jedoch noch nicht eindeutig die Ursache für die RC-Orientierung aufgeklärt.

So rekonstituierten Iba et al. das RC in Sojabohnen Phospholipiden mittels Cholat-Dialyse-Methode. Sie bestimmten die RC-Orientierung durch Reduktion von extern hinzugegebenem Cytochrom c nach der Photooxidation durch Blitzlicht. Als Ergebnis ihrer Untersuchungen stellten sie eine bis zu 85 %ige RC-Orientierung ("right-site-out") bei zunehmender Vesikelgröße fest. Gleichzeitig konnte sie eine Abhängigkeit von der Ionenkonzentration im Puffer zeigen (Iba et al., 1984).

Auf der anderen Seite wurde schon früher von weiteren Arbeitsgruppen eine mehr asymmetrische RC-Orientierung mit abnehmender Liposomengröße konstatiert (Berden et al., 1975, Massari et al., 1978). Somit kann vermutlich die Krümmung im Phospholipidbilayer nicht die Ursache für die RC-Orientierung sein.

Eytan und Broza formulierten einen anderen Gedankenansatz. Sie gehen davon aus, daß während der Dialyse zunächst Liposomen ohne Proteine gebildet werden. Die Proteine inserieren im weiteren Verlauf der Dialyse. Erst zu diesem Zeitpunkt wird die Orientierung der Proteine festgelegt. In diesem Fall wird die Proteinorientierung durch den zuerst eingefügten Proteinkopf und die Oberfläche der Vesikel bestimmt (Eytan & Broza, 1978). Daß die Proteininsertion durch die gleichzeitig im RC vorhandene hydrophobe und hydrophile Eigenschaft bestimmt wird, postulierte auch Hellingwerf. Da im RC die am stärksten hydrophobe Stelle auf der Chinonbindungsseite auftritt, wird diese Region zuerst an die vorgebildeten Vesikel binden und am Schluß im Inneren der Membran zu finden sein. Dieser Effekt tritt dabei verstärkt bei niedriger Ionenstärke auf (Hellingwerf, 1987).

Overfield und Wraight beobachteten die Abhängigkeit der RC-Orientierung von der Nettoladung der Lipide, die zur Rekonstitution verwendet wurden. Mit Phosphatidylserin erzielten sie eine 90 %ige *in vivo* Orientierung. Mit neutralem Lecithin war diese zufällig (Overfield & Wraight, 1980a, Overfield & Wraight, 1980b).

Von Kurrle wurde für einige Membranproteine bewiesen, daß durch Wahl geeigneter Lipidmischungen, die Komponenten mit negativ geladenen Kopfgruppen wie Phosphatidylglycerol und Phosphatidylserin enthielten, die Menge des zu

rekonstituierenden Proteins erhöht werden kann. Die Ursache wird mit Wechselwirkungen geladener Lipidkomponenten mit positiven Proteindomänen begründet, die auch zu einem gerichteten Einbau des Proteins führten (Kurrle, 1989).

Neueste Untersuchungen von Hara et al. belegen ebenfalls eine Orientierung von RC in neutral oder negativ geladenen Liposomen (Hara et al., 1997a).

Warum zeigt RC die Tendenzen, in positiv geladenen Liposomen seine H-Untereinheit nach außen zu präsentieren und in neutralen bzw. negativ geladenen Vesikeln in der "right-site-out" Orientierung vorzuliegen? Dieses Verhalten könnte mit der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen RC und Lipidbilayer erklärt werden. Das Membranprotein besitzt ein elektrostatisches Dipolmoment. Die hydrophile Oberfläche der H-Untereinheit (cytoplasmatische Seite) ist positiv geladen, während die hydrophile Oberfläche der L- und M-Untereinheit (periplasmatische Seite) negativ geladen ist (Tiede et al., 1992). Die Oberfläche der membrandurchspannenden Region ist extrem hydrophob und beinahe ungeladen. Werden die Proteoliposomen durch Detergenz-Dialyse hergestellt, interagiert die positiv geladene RC-Oberfläche mit den negativ geladenen Mizellen. Dieser Prozeß endet mit dem orientierten RC-Einschluß, wobei L- und M-Untereinheit nach außen gerichtet sind.

4.4.2 Bakteriorhodopsin

Weiterhin konnte mit der Bakteriorhodopsin-Mutante D36C aus *Halobacterium salinarium* die Proteinorientierung in Vesikeln mit homogener Größe untersucht werden. Es war möglich, eine außenständige Thiolgruppe des D36C mit einem Fluoreszenzmarker zu markieren und den Markierungsgrad zu bestimmen. Zur Proteoliposomenpräparation wurden zum einen markante ungewöhnliche Phospholipide gewählt, die im Falle der RC-Rekonstitution bereits zu einer Orientierung des Proteins geführt haben, zum anderen wurde DMPC verwendet.

In den ungeladenen DMPC-Vesikeln lagen überraschenderweise ca. 85% des BR in der richtigen ("right-site-in") Orientierung vor. Die zwitterionischen PC14-Liposomen wiesen einen gerichteten Einbau von 61 % und die negativ geladenen PG14-Liposomen von 73 % auf. Nur bei Verwendung von PA4 konnte keine Orientierung festgestellt werden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse und verglichen mit der RC-Rekonstitution stellt sich wiederum die Frage, warum BR teilweise bei einigen Lipiden mit hoher Orientierung in Liposomen eingebaut wird, bei anderen jedoch keine Orientierung beobachtet wird.

In der Literatur werden einige Studien über die Orientierung von BR in Liposomen beschrieben (Levy et al., 1990, Levy et al., 1992b, Paternostre et al., 1988, Rigaud et al., 1995). Diese Untersuchungen stützten sich auf die Idee der Proteinintegration in vorgeformte Liposomen. Im Gegensatz zur Dialyse von Phospholipid-Detergenz-Protein-Mizellen wurde eine bessere asymmetrische Insertion erreicht. So konnten 85-95 % BR in der "inside-out"-Orientierung gefunden werden, wenn das Protein direkt in OGP-gesättigte Liposomen inkorporiert wurde. 70-80 %ige Orientierung wurde noch bei TritonX-100 vermittelte Rekonstitutionen erreicht. Da die Proteine möglicherweise immer zuerst mit ihrem hydrophoben Bereich in die hydrophoben Domänen der Membran inserieren, könnte dieser Mechanismus die einheitliche Proteinorientierung erklären. Im Falle des BR ist das Carboxylende am stärksten hydrophil, da es mindestens fünf COOH-Gruppen aufweist, während die endständige NH₂-Region am stärksten hydrophob ist (Rigaud et al., 1995). Somit wird die letztgenannte Gruppe zuerst in die Membran eingeführt, was in einer "inside-out"-Orientierung des BR in den Proteoliposomen endet.

Bei der in dieser Arbeit angewendeten Methode muß jedoch zunächst von einer inhomogenen (bez. Mizellengröße und -komposition) Lipid-Protein-Detergenz Lösung ausgegangen werden. Binäre Lipid-Detergenz und tertiäre Lipid-Detergenz-Protein-Mizellen koexistieren. Daher sind zwei Rekonstitutionsmechanismen denkbar: (1) Das Protein nimmt sofort an der Membrantransformation von der mizellaren zur lamellaren Phase teil. Oder (2) Liposomen werden zunächst durch partielles Entfernen von Detergenz gebildet, und Proteine inserieren erst bei weiterer Detergenzentfernung in die vorgeformten Liposomen.

Bei diesen Mechanismen der Proteoliposomenbildung spielt auch die Geschwindigkeit der Detergenzentfernung eine entscheidende Rolle. Während bei langsamer Detergenzentfernung die Proteine in einen Lipidbilayer eingebaut werden, werden Proteine bei schneller Detergenzentfernung schon bei der Vesikelbildung inkorporiert (Eytan, 1982).

Zur Erklärung der eigenen Ergebnisse mögen diese Hypothesen hilfreich sein. Bei der verwendeten Methode wird der Zuckerester innerhalb von 2 Stunden komplett

hydrolysiert. Somit könnte man annehmen, daß die Detergenzentfernung sehr schnell abläuft. Damit läßt sich die zufällige BR-Orientierung im Falle der PA4-Vesikel und auch PC14-Liposomen deuten. Der gerichtete Einbau im Falle der DMPC und PG14-Liposomen kann allerdings nicht mit der Integration der Proteine in vorgeformte Liposomen interpretiert werden. Denn dann würde ein "inside-out"-Einbau aufgrund der hydrophoben Aminogruppe des BR auftreten (Rigaud et al., 1995).

Insofern müssen weitere Faktoren für die gerichtete Integration des BR in Liposomen verantwortlich sein. Neben der Ladung des Proteins und der Präparationsmethode müssen sicherlich auch die Ladungen der Phospholipide und sterische Faktoren berücksichtigt werden.

Zur genauen Abklärung des gerichteten Einbaus wäre es möglich, weitere Untersuchungen anzuschließen. Dazu könnten BR-Liposomen mit anderen Techniken hergestellt werden und die Orientierung durch Bestimmung der H⁺-Pumpaktivität oder durch Proteolyse von BR-Liposomen gezeigt werden (Rigaud et al., 1983; Scotto & Zakim, 1985).

4.5 Konstruktion des Fusionsproteins L-phoA

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Fusionsprotein aus der L-Untereinheit von *Rhodobacter sphaeroides* und der alkalischen Phosphatase aus *E. coli JM105* exprimiert werden. Dieses Fusionsprotein würde einen möglichen Rezeptor in der Biosensoranalytik von Trinkwasser zur Detektion von Herbiziden darstellen. Die Anwendung könnte analog zu einem Antikörper in einem ELISA-Testformat erfolgen.

Aufgrund der hohen Affinität des RC zu PS-II-Herbiziden wurden bereits in der Vergangenheit Untersuchungen zur Konstruktion eines Biosensors unter Verwendung des nativen Photoreaktionszentrums durchgeführt. Zur Bestimmung von PS-II-Herbiziden wurde von Jockers das RC in einem Luciferase-Assay (Jockers & Schmid, 1993) und im Gitterkopplerformat angewendet (Jockers et al., 1993b). Auch wurde die Ausbleichung des Bakteriochlorophylldimers in Anwesenheit von Herbiziden bestimmt (Jockers et al., 1993a). Schnieder untersuchte verschiedene ELISA-Formate zur Herbizidbestimmung (Schnieder, 1995). All diese Methoden litten jedoch unter der großen Unempfindlichkeit. Die nach der EU-Richtlinie festgelegten Grenzwerte für Pflanzenschutzmittel in Wasser konnten mit diesen Methoden nicht nachgewiesen werden (Trinkwasserverordnung, 1986).

Aus der Überlegung, daß die erforderlichen Nachweisempfindlichkeiten wegen der Komplexität des RC nicht erreicht wurden, entstand die Idee, ein weniger komplexes Molekül als Rezeptor einzusetzen. Da die Q_B -Bindungsstelle in der L-Untereinheit den Wirkort für Herbizide darstellt (Kless et al., 1993, Ohad & Hirschberg, 1992), kann das RC möglicherweise auf diese Untereinheit reduziert werden. Durch eine weitere Kopplung der L-Untereinheit mit einem Markerenzym kann die spätere Detektion erleichtert werden. Die heterologe Expression dieses Fusionsproteins im klassischen Expressionssystem *E. coli* hat entscheidende Vorteile. Zum einen sind, verglichen mit *Rhodobacter sphaeroides*, Kultivierung und Isolierung einfacher und schneller durchzuführen, zum anderen können in einer späteren großtechnischen Herstellung höhere Fusionsprotein-Mengen gewonnen werden.

Das Gen der L-Untereinheit war bereits als Teil des *puf*-Operons in dem Shuttlevektor pRK5,3 kloniert (Farchaus et al., 1990), die DNA der alkalische Phosphatase wurde aus der genomischen DNA von *E. coli JM105* über PCR isoliert. Nach Fusion der beiden Gene im Vektor pUC19 erfolgte die Expression des 2,2 kb großen Fusionsproteingens in

E. coli DH5 α . Die beiden unterschiedlichen Klonierungsstrategien (vgl. 3.8.3) führten in einem Fall zur Expression eines Proteins. Auf dem SDS-PAGE befand sich eine Bande bei einem Molekulargewicht von 30 kDa und nicht, wie erwartet, bei 78 kDa (Abbildung 3.45).

Eine mögliche Erklärung für das niedrige Molekulargewicht auf dem SDS-PAGE könnte die Beeinflussung des Proteinlaufverhaltens durch die Wechselwirkung von SDS mit der L-Untereinheit liefern. Ein Teil des Fusionsproteins, die L-Untereinheit, ist Bestandteil des RC-Membranproteins. Das integrale Membranprotein ist im Bereich der L-Untereinheit stark hydrophob und zeigt zu membrandenaturierenden Substanzen, z.B. Detergenzien, hohe Affinitäten. Das hat zur Folge, daß die L-Untereinheit überdurchschnittlich viel SDS binden kann und das Fusionsprotein aufgrund der hohen negativen Ladung eine stärkere Anziehung zur Anode erfährt. Dadurch erhöht sich die Laufgeschwindigkeit des Proteins, und das Molekulargewicht erscheint am Ende geringer, als es tatsächlich ist. Ähnliche Beobachtungen über das Laufverhalten von Fusionsproteinen, die aus RC-Einheiten bestanden, wurden von Blankenship und Miyake beschrieben (Blankenship, 1994).

Da anschließende Aktivitätstests jedoch negativ verliefen, wurde ein Translationsabbruch vermutet. Dieser könnte durch Punktmutationen und Deletionen verursacht worden sein. An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, daß nach Klonierung des Fusionsproteingens in pUC19 acht Klone untersucht wurden, in denen Mutationen auftraten, die durch DNA-Sequenzierungen festgestellt wurden. Ein Klon wies dabei einen Stopkodon auf, der zum Abbruch der Translation führte. Zudem zeigten sämtliche Klone jeweils mehrere mutierte Gensequenzen im Fusionsgen.

Einen weiteren Grund für die nicht gelungene Expression könnte der schwache *lac*-Promotor von pUC19 darstellen, weshalb das T7-RNA-Polymerase-Promotor-System im pET20b(+)-Vektor zur Expression von L-phoA verwendet wurde.

Durch die Fusion der einzelnen Gene mittels "splicing-by-overlap-extension"-Verfahren sollte die Mutationshäufigkeit durch weniger PCR-Schritte während der Klonierung verringert werden. Mit dieser rekombinanten PCR ließ sich erfolgreich ein fehlerfreies Gen konstruieren und in pET20b(+) klonieren. Damit konnte ein 100 kDa Protein exprimiert werden. Da das Fusionsprotein auf dem SDS-PAGE aber bei 78 kDa oder bei einem geringeren Molekulargewicht (s.o.) erwartet wurde, und aufgrund der mangelnden Phosphatase-Aktivität und des Immunoblots wurde dieses Protein nicht als L-phoA Fusionsprotein bestätigt.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurden die integralen Membranproteine RC aus *Rhodobacter sphaeroides* und BR aus *Halobacterium salinarium* nach Isolierung und Reinigung als Modellproteine für Rekonstitutionsexperimente eingesetzt. Zur Untersuchung der Lipid-Protein-Wechselwirkung standen ungewöhnliche Phospholipide mit einem physiologischen T_m -Wert zur Verfügung. Diese Phospholipide wiesen nach Präparation von Liposomen sehr bemerkenswerte Eigenschaften auf. So zeigten sie eine erhöhte Detergenzstabilität und bewirkten einen orientierten Proteineinbau in den Bilayer. In weiteren Untersuchungen sollten Effekte wie pH- und Temperatur-Stabilitäten sowie die Rekonstitution anderer Membranproteine charakterisiert werden. Ungewöhnliche Phospholipide, die zu stabilen Liposomen mit aktiven und orientierten Proteinen führen, würden besonders für technische Anwendungen, z.B. in der Biosensorik als Liposomen-Sensor (Haga et al., 1980; Hosoda et al., 1992), eine interessante Alternative zu kommerziellen Lipiden bieten.

Synthetische Zuckerester zeigten für das Reaktionszentrum ein hohes Solubilisationsvermögen. Ob dieses auch für andere Membranproteine zutrifft, muß durch entsprechende Versuche abgeklärt werden. Weil Zuckerester durch eine Lipase lipolytisch gespalten werden, war es möglich, detergenzfreie Liposomen in kurzer Zeit unter milden Reaktionsbedingungen herzustellen. Detergenzfreie Liposomen sind vor allem für Charakterisierungen von Lipid-Protein-Wechselwirkungen elementar. Bei DSC-Messungen müßten dann beispielsweise keine Effekte von Detergenzien berücksichtigt werden (Kurrle, 1989).

Für die heterologe Expression des Fusionsproteins L-phoA scheint das Expressionssystem *E. coli* nicht geeignet zu sein. Denkbar wären Unverträglichkeiten des Gens von *Rhodobacter sphaeroides* (L-Untereinheit) im Genom von *E. coli*. Diese toxische Wirkung könnte auch für die teilweise sehr niedrigen Transformationsraten sprechen. Für zukünftig vorgenommene Expressionsversuche von L-phoA ist die homologe Expression in *Rhodobacter sphaeroides* anzuraten. Dafür würden sich bereits vorhandene Deletionsstämme anbieten (Barz & Oesterhelt, 1994).

5 Zusammenfassung

Das Photoreaktionszentrum von *Rhodobacter sphaeroides* wurde als Modellprotein in Liposomen rekonstituiert. Das integrale Membranprotein wurde mittels enzymatischer und mechanischer Methoden isoliert und mit dem Detergenz LDAO extrahiert. Eine anschließende chromatographische Aufreinigung erfolgte mit einer Kombination aus S- und Q-Sepharose. Es konnten dabei Reaktionszentren mit einem hohen Reinheitsgrad von 1,2 - 1,5 (= OD_{280nm}/OD_{802nm}) gewonnen werden. Die drei Untereinheiten des Proteins wurden auf einem SDS-PAGE gezeigt. Ein Cytochrom c Assay ließ die RC-Aktivität und die Inhibitorwirkung von Herbiziden erkennen.

(1,2)-Diacyl-phosphatidylipide isomerer Octadecinsäuren mit unterschiedlichen Kopfgruppen wurden zur Liposomen- und Proteoliposomenpräparation mit RC verwendet. Die Octadecinsäuren wiesen jeweils eine Dreifachbindung am Kohlenstoffatom 4 bzw. 14 auf. Bei den Kopfgruppen handelte es sich um das zwitterionische PC und PE sowie um die negativ geladenen Phospholipide PS, PG und PA. Nach der Detergenz-Dialyse-Methode zur Liposomenherstellung wurde die Vesikelgröße elektronenmikroskopisch und über die dynamische Lichtstreuung bestimmt. Homogene LUVs mit einer Größe von 100 bis 170 nm wurden nach Extrudierung der Vesikel erhalten. Die acetylenischen Phospholipide zeigten keinen Einfluß auf die Proteoliposomendurchmesser.

20 - 57 % RC wurden in die Proteoliposomen eingebaut. Die Orientierung der aktiven Membranproteine wurde durch Messung des lichtinduzierten Elektronentransfer von Ferrocycytochrom c zum RC bestimmt. Bei neutralen DMPC- und DPPC-Liposomen wurde keine RC-Orientierung festgestellt. Die negativ geladenen Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden (PG und PS) und die neutralen PC14-Liposomen zeigten eine klare Proteinorientierung von 70-100 %.

Zudem waren Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden gegenüber dem Detergenz Triton X-100 stabiler als DPPC-Vesikel. Die vollständige Solubilisierung fand erst ab einer Triton X-100 Konzentration von 0,4 mmol/l statt.

Die synthetischen Zuckerester 6-*O*-Octanoyl- β -glucose und 6-*O*-Octanoyl- β -mannose vermochten das RC sehr gut zu solubilisieren und konnten bei der Isolierung und Reinigung des Membranproteins das bisher verwendete LDAO ersetzen.

Unter Verwendung dieser Zuckerester wurde eine neue Liposomenpräparationsmethode etabliert. In Gegenwart von Phospholipid und Proteinen wurden die Zuckerester lipolytisch innerhalb von 2 h bei 40 °C gespalten. Als geeignete Lipase stellte sich die Monoglycerid-Lipase aus *Bacillus species* heraus. Diese Lipase reagierte nicht mit den Phospholipiden und dem Membranprotein, sondern spaltete spezifisch nur Zuckerester. Neben dem Photoreaktionszentrum aus *Rhodobacter sphaeroides* wurde Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarium* in Liposomen integriert.

Ein Fusionsprotein aus der L-Untereinheit des RC und einer alkalischen Phosphatase sollte in *E. coli* exprimiert werden. Das Gen der L-Untereinheit wurde aus dem Plasmid pRK5,3, das Gen der alkalischen Phosphatase aus der genomischen DNA von *E. coli* JM105 isoliert und amplifiziert. Unterschiedliche Klonierungsstrategien führten nicht zur Expression des Fusionsproteins L-phoA. Exprimierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 und 100 kDa konnten nicht als Fusionsproteine verifiziert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen, muß festgestellt werden, daß sich *E. coli* als Expressionssystem für die heterologe Expression des Fusionsproteins nicht eignet.

6 Literaturverzeichnis

- Ahlers, M., Müller, W., Reicher, A., Ringsdorf, H., Venzmer, J. (1990) *Angew. Chemie* 102, 1310-1327
- Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiya, H., & Rees, D. C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8487-8491.
- Allen, T. M. (1984) *Liposome Technology*, Vol. III, CRC Press, Boca Raton.
- Allen, T. M., Romans, A. T., Kercret, H., & Segrest, J. P. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 601, 328-42.
- Ansorge, W., Sproat, B. S., Stegemann, J., & Schwager, C. (1986) *J. Biochem. Biophys. Meth.* 13, 315-323.
- Arlt, T., Schmidt, S., Kaiser, W., Lauterwasser, C., Meyer, M., Scheer, H., & Zinth, W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11757-11761.
- Arnaud, A. (1892) *Bull. Soc. Chim. France* 7, 233.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (1993) , John Wiley and Sons, New York.
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965) *J. Mol. Biol.* 13, 238-243.
- Barlett, G. R. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 466-468.
- Barz, W. P., & Oesterhelt, D. (1994) *Biochemistry* 33, 9741-9752.
- Berden, J. A., Barker, R. W., & Radda, G. K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 375, 186-206.
- Birnboim, H. C., & Doyl, J. (1979) *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Blankenship, R. E. (1994) *Antonie van Leeuwenhoek* 65, 311-329.
- Braun, P., & Scherz, A. (1991) *Biochemistry* 30, 5177-5184.
- Bretscher, M. S. (1986) *Die Moleküle des Lebens*, Spektrum der Wissenschaft, Verlagsgesellschaft, Heidelberg.
- Brickman, E., & Beckwith, J. (1979) *J. Mol. Biol.* 96, 307-316.
- Brock, T. D., & Madigan, M. T. (1991) *Biology of microorganism*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Brunner, J., Skrabal, P., & Hauser, H. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 455, 322-31.
- Bu'Lock, J. D. (1956) *Quart. Rev. Chem. Soc.* 10, 371-375.
- Bu'Lock, J. D., Jones, E. R. H., & Leeming, P. R. (1955) *J. Chem. Soc.*, 4270-4276.
- Butcher, L. A., & Tomkins, J. K. (1985) *Anal. Biochem.* 148, 348-388.

- Cao, L. (1997), Dissertation, Stuttgart.
- Cao, L., Bornscheuer, T. T., & Schmid, R. D. (1998a) *Biocatal. Biotransform.* 16, 249-257
- Cao, L., Bornscheuer, U. T., & Schmid, R. D. (1996) *Fett/Lipid* 98, 332-335.
- Cao, L., Bornscheuer, U. T., & Schmid, R. D. (1999) *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* 6, 279-285
- Cao, L., Fischer, A., Bornscheuer, U. T., & Schmid, R. D. (1997) *Biocatal. Biotransform.* 14, 269-283.
- Chang, C. N., Kuang, W.-J., & Chen, E. Y. (1986) *Gene* 44, 121-125.
- Chonn, A., Semple, S. C., & Cullis, P. R. (1994) in *Biological Membranes: Structure, Biogenesis and Dynamics* (Kamp, J. A. F. O. d., Ed.) pp 101-106, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2172-2175.
- Clayton, R. K., & Wang, R. T. (1971) *Methods in Enzymology*, 696-704.
- Coen, D. M., & Scharf, S. J. (1990) in *Current protocols in molecular biology* pp 15.0.1-15.1.7, John Wiley and Sons, New York.
- Crielaard, W., Hellingwerf, K. J., & Konings, W. N. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 973, 205-211.
- Crielaard, W., Mourik, F. v., Grondell, R. v., Konings, W. N., & Hellingwerf, K. J. (1992) *Biochim. et Biophys. Acta* 1100, 9-14.
- Deisenhofer, J., Epp, O., K, M., Huber, R., & Michel, H. (1985) *Nature* 318, 618-629.
- Dekker, N., Cox, M., Boelens, R., Verrijzer, C. P., Vliet, P. C. V. d., & Kaptein, R. (1993) *Nature* 362, 852-855.
- Dörfler, H.-D., Brezesinski, G. (1983) *Colloid and Polymer Sci.* 261, 286.
- Dohan, W. (1994) in *Biological Membranes: Structure, Biogenesis and Dynamics* (Kamp, J. A. F. O. d., Ed.) pp 1-23, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Draber, W., Tietjen, K., Kluth, J. F., & Trebst, A. (1991) *Angew. Chem Int. Ed. Engl.* 30, 1621-1633.
- Eibl, H. (1984) *Angew. Chem.* 96, 247-262.
- Ermler, U., Fritsch, G., Buchanan, S. K., & Michel, H. (1994) *Structure* 2, 925-936.
- Evans, W. H., & Graham, J. M. (1989) *Membrane structure and function*, IRL Press, Oxford.

- Eytan, G. D. (1982) *Biochim. et Biophys. Acta* 694, 185-202.
- Eytan, G. D., & Broza, R. (1978) *FEBS Lett.* 85, 175-178.
- Farchaus, J. W., Gruenberg, H., & Oesterhelt, D. (1990) *J. Bacteriology* 172, 977-985.
- Feher, G., Allen, J. P., Okamura, M. Y., & Rees, D. C. (1989) *Nature* 339, 111-116.
- Froshauer, S. (1988) *J. Mol. Biol.* 200, 501-507.
- Gellermann, J. L. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 388, 277-290.
- Gennis, R. B., Barquera, B., Hacker, B., Doren, S. R. V., Arnaud, S., Crofts, A. R., Davidson, E., Gray, K. A., & Daldal, F. (1993) *J. Bioeng. Biomembranes* 25, 195-210.
- Goc, R., Hara, M., Tateishi, T., & Miyake, J. (1996) *J. of Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 93, 137-144.
- Gosh, R., & Bachofen, R. (1989) *Forum Mikrobiologie* 12 /89.
- Grainger, D.W., Reichert, A., Ringsdorf, H., Salesse, C., Davies, D.E., Lloyd, J.B. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1022(2), 146-54.
- Gray, K. A., Farchaus, J. W., Wachtveitl, J., Breton, J., & Oesterhelt, D. (1990) *EMBO J.* 9, 2061-2070.
- Gregoriadis, G., Garcon, N., da Silva, H., Sternberg, B. (1993) *Biochim. et Biophys. Acta* 1147, 185-193.
- Gregoriadis, G. (1985) *Liposome technology*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton.
- Grigorieff, N., Ceska, T. A., Downing, K. H., Baldwin, J. M., & Henderson, R. (1996) *J. Mol. Biol.* 259, 393-421.
- Gros, L., Ringsdorf, H., Schupp, H. (1981), *Angew. Chem.* 93, 311-314.
- Haga, M., Itagaki, H., Sugawara, S., & Okano, T. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 95, 187-192.
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557.
- Hara, M., Ueno, T., Fujii, T., Yang, Q., Asada, Y., & Miyake, J. (1997a) *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 1577-1579.
- Harlos, K., Eibl, H., Pascher, I., Sundell, S. (1983) *Chem. Phys. Lipids* 34, 115.
- Haugland, R. P. (1992) *Molecular Probes, Inc., Eugene, Org, USA* 5, 14-16.
- Hellingwerf, K. J. (1987) *J. Bioenerg. Biomembranes* 19, 203-223.
- Hirschmann, H. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2762-2767.
- Hockertz, S. (1996) *Pharm. Ind.* 58, 153-160.
- Holzapfel, W., Finkele, U., Daiser, W., Oesterhelt, D., Scheer, H., Stilz, H. U., & Zinth, W. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5168-5172.

- Holzenburg, A., Bewley, M. C., Wilson, F. H., Nicholson, W. V., & Ford, R. C. (1993) *Nature* 363, 470-472.
- Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., & Ziegler, H. (1982) *Biophysik*, Vol. 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Hosoda, K., Suzuki, H., & Yasuda, T. (1992) pp 22.12.1992, United States Patent.
- Hufnagel, P. (1997), Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Iba, K., Takamiya, E.-I., Arata, H., Toh, Y., & Nishimura, M. (1984) *J. Biochem.* 96, 1823-1830.
- Ishimori, Y., Rokugawa, K., (1993) *Clin. Chem.* 39/7, 1439-1443
- Jockers, R. (1992), Dissertation, TU Braunschweig.
- Jockers, R., Bier, F. F., R, D. S., Wachtveitl, J., & Oesterhelt, D. (1993a) *Anal. Chim. Acta* 274, 185-190.
- Jockers, R., Bier, F. F., & Schmid, R. D. (1993b) *Anal. Chim. Acta* 280, 53-59.
- Jockers, R., Bier, F. F., Schmid, R. D., Wachtveitl, J., & Oesterhelt, D. (1993c) *Anal. Chim. Acta* 274, 185-190.
- Jockers, R., & Schmid, R. D. (1993) *Biosens. Bioelectr.* 8, 281-289.
- Kasahara, M., & Hinkle, P. C. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2793-2799.
- Keough, K.M.W., Davies, P.J. (1979) *Biochem.* 18, 1453-1461.
- Kless, H., Oren-Shamir, M., Ohad, I., Edelman, M., & Vermaas, W. (1993) *Z. Naturforsch.* 48, 185-190.
- Krämer, R. M., Hasselbach, H.-J., & Semenza, G. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 643, 233-242.
- Kurrle, A. (1989), Dissertation, Technische Universität München.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- Lang, P. H., & Hunter, C. N. (1994) *Biochem. J.* 298, 197-205.
- Lauffermair, E., & Oesterhelt, D. (1992) *EMBO J.* 11, 777-783.
- Lawlor, D. W. (1990) *Photosynthese Stoffwechsel-Kontrolle-Physiologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Lee, A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 472, 285-344.
- Lehninger, A. L. (1985) *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Levy, D., Bluzat, A., Seigneuret, M., & Rigaud, J.-L. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1025, 179-190.
- Levy, D., Gulik, A., Bluzat, A., & Rigaud, J.-L. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1107, 283-298.

- Lewis, R. N. A. H., Mak, N., & McElhaney, R. N. (1987) *Biochem.* 26, 6118-6126.
- Lichtenberg, D., Robson, R. J., & Dennis, E. A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 737, 285-295.
- Lin, Y. P., & Carman, G. M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 3364-3371.
- Lippert, J.L., Peticolas, W. I. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 1572-1579.
- Locascio-Brown, L., Plant, A.L., Horvat, V., Durst, R.A. (1990) *Anal. Chem.* 62, 2587-2593.
- Lozier, R. H., Bogomolni, R. A., & Stoeckenius, W. (1975) *Biophys. J.* 15, 955-962.
- Lyon, M. K., Marr, K. M., & Furcinitti, P. S. (1993) *J. Struct. Biol.* 110, 133-140.
- Maksymiwiw, R., Sui, S., Gaub, H., & Sackmann, E. (1987) *Biochem.* 26, 2983-2990.
- Marco, M.-P., Gee, S., & Hammock, B. D. (1995) *Trends. Anal. Chem.* 14, 341-350.
- Marsh, D. (1987) *J. Bioeng. Biomembr.* 19, 677-688.
- Massari, S., Pascolini, D., & Gradenigo, G. (1978) *Biochem.* 17, 4465-4469.
- Mathies, R. A., Lin, S. W., Ames, J. B., & Pollard, W. T. (1991) *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 20, 491-518.
- Mayer, F., & Rhode, M. (1988) *Meth. Microbiol.* 20, 284-292.
- McPherson, P. H., Okamura, M. Y., & Feher, G. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1016 ?, 289-292.
- Michel, H., Epp, O., & Deisenhofer, J. (1986) *EMBO J.* 5, 2445-2451.
- Moser, C. C., & Dutton, P. L. (1988) *Biochem.* 27, 2450-2461.
- Mouritsen, O. G., & Bloom, M. (1984) *Biophys. J.* 46, 141-153.
- Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Ehrlich, H. A. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273.
- New, R. R. C. (1990) *Liposomes: A practical approach*, Oxford University Press, Oxford.
- Nitschke, W., & Rutherford, A. W. (1991) *Trend. Biochem. Sci. TIBS* 16, 241-245.
- Oesterhelt, D., & Krippahl, G. (1983) *Ann. Microbiol.* 135, 137-150.
- Oesterhelt, D., & Stoeckenius, W. (1971) *Nature New Biol.* 233, 149-152.
- Oesterhelt, D., & Stoeckenius, W. (1974) *Meth. Enzymol.* 31, 667-678.
- Oesterhelt, D., Tittor, J., & Bamberg, E. (1992) *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, 181-191.
- Oettmeier, W., & Preuße, S. (1987) *Z. Naturforsch.* 42c.
- Ohad, N., & Hirschberg, J. (1992) *The Plant Cell* 4, 273-282.
- Okamura, M. Y., & Feher, G. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* 61, 861-896.

- Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J., & Papahadjopoulos, D. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 557, 9.
- Overfield, R. E., & Wraight, C. A. (1980a) *Biochem. J.* 19, 3322-3327.
- Overfield, R. E., & Wraight, C. A. (1980b) *Biochem. J.* 19, 3328-3334.
- Packham, N. K., Packham, C., Mueller, P., Tiede, D. M., & Dutton, P. L. (1980) *FEBS Letters* 110, 101-106.
- Paternostre, M.-T., Roux, M., & Rigaud, J.-L. (1988) *Biochem. J.* 27, 2668-2677.
- Peters, H., Schmidt-Dannert, C., & Schmid, R. D. (1997) *Mat. Sci. Eng. C4*, 227-232.
- Phillipott, J., Mutaftschiev, S., & Liautard, J. P. (1983) *J. Immunol. Meth.* 150, 5-21.
- Phillips, M. C., & Chapman, D. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 163, 301-313.
- Pisch, S., Bornscheuer, U. T., Meyer, H. H., & Schmid, R. D. (1997) *Tetrahedron* 53, 14627-14634.
- Pryde, J. G. (1986) *TIBS* 11, 160-163.
- Racker, E. (1972) *J. Membr. Biol.* 10, 221-235.
- Racker, E. (1985) *Reconstitutions of Transporters, Receptors and Pathological States*, Academic Press Inc., London.
- Racker, E., & Kagawa, Y. (1979), Vol. 55, Academic Press. Inc., New York.
- Razin, S. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 265, 241-296.
- Rich, P. R., & Heathcote, P. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 725, 332-340.
- Riegler, J., & Möhwald, H. (1986) *Biophys. J.* 49, 1111-1118.
- Rigaud, J. L., Bluzat, A., & Buschlein, S. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111, 373-382.
- Rigaud, J.-L., Pitard, B., & Levy, D. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1231, 223-246.
- Rogner, M., Ohno, K., Hamamoto, T., Sone, N., & Kagawa, Y. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 362-367.
- Rürup, J. (1994), Dissertation, TU Braunschweig.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Ehrlich, H. A. (1988) *Science* 239, 487-491.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schmid, R. D. (1987) *Fat. Sci. Technol.* 64, 582-585.
- Schmid, R. D., & Werdelmann, B. W. (1982) *JAOCS* 84, 563-570.
- Schnieder, I. (1995), Dissertation, TU Braunschweig.

- Schönfeld, M., Montal, M., & Feher, G. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 76, 6351-6355.
- Scotto, A. W., Goodwyn, D., & Zakim, D. (1987) *Biochem.* 26, 833-839.
- Scotto, A. W., & Zakim, D. (1985) *Biochem.* 24, 4066-4075.
- Seelig, J. (1981) , North-Holland, New York.
- Sessa, G., & Weissmann, G. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 3295-3301.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E., & Maizel, J. V. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815-822.
- Sharp, P. A., Sudgen, B., & Sambrook, J. (1973) *Biochem.* 12, 3055-3063.
- Siebert, S. T. A., Stuart, G., Reeves, S. G., Roberts, M., & Durst, R. A. (1995) *Anal. Chim. Acta* 311, 305-318.
- Singer, S. J., & Nicholson, G. L. (1972) *Science* 173, 720-731.
- Steffen, M. A., Lao, K., & Boxer, S. G. (1994) *Science* 264, 810-816.
- Steger, A., & Loon, J. v. (1937) *Fette und Seifen* 44, 243.
- Stein, R. R., Castellvi, A. L., Bogacz, J. P., & Wraight, C. A. (1984) *J. Cell. Biochem.* 24, 243-259.
- Straley, S. C., Parson, W. W., Mauzerall, D. C., & Clayton, R. K. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 305, 597-609.
- Stryer, L. (1987) *Biochemie*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg.
- Studier, F. W., & Moffat, B. A. (1996) *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- Tabor, S., & Richardson, C. C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1074-1078.
- Talsma, H., Crommelin, D.J.A. (1992a) *Pharm. Technol. Intern.* Nov., 1992
- Talsma, H., Crommelin, D.J.A. (1992b) *Pharm. Technol. Intern.* Nov., 1992
- Tanford, C. (1973) *The hydrophobic effect*, John Wiley, New York.
- Tardieu, A., Luzzati, V., Reman, F.C., (1973) *J. Mol. Biol.* 75, 711-733.
- Thornber, J. P., Trosper, T. L., & Strouse, C. E. (1978) (Clayton, R. K., & Siström, W. R., Eds.) pp 133, New York.
- Tiede, D. M., Vashishta, A.-C., & Gunnar, M. R. (1992) *Biochem.* 32, 4515-4531.
- Tietjen, K. G., Draber, W., Gossens, J., Jansen, J. R., Kluth, J. F., Schindler, M., & Wroblowsky, H.-J. (1993) *Z. Naturforsch.* 48c, 205-212.
- Trebst, A. (1986) *Z. Naturforsch.* 41, 240-245.

- Trinkwasserverordnung. (1986) *Verordnung über Trinkwasser und über Wasser in Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung vom 22. Mai 1986, BGBl, 1)*, 760-772.
- Voet, D., & Voet, J. G. (1992) *Biochemie*, VCH, Weinheim.
- Wailes, P. C. (1956) *Pure Appl. Chem.* 6, 61.
- Wall, D. A., & Patel, S. (1989) *J. Membran Biol.* 107, 189-201.
- Weetal, H. H. (1976) *Meth. Enzymol.* 44, 134-148.
- Winter, R. (1990) *Chemie in unserer Zeit* 24, 71-81.
- Wollmann, F. A. (1991) *The new biologist* 3, 1169-1176.
- Woodle, M. C., & Papahadjopoulos, D. (1989) *Liposome Preparation and Size Characterization*, Vol. 171.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985) *Gene* 33, 103-119.
- Yasuda, Y., Sugino, H., Toyotama, H., Hirata, Y., Hara, M., & Miyake, J. (1994) *Bioelectrochem. Bioenerget.* 34, 135-139.
- Yruela, I., Kan, P. J. M. V., Mueller, M. G., & Holzwarth, A. R. (1994) *FEBS* 339, 25-30.
- Zakim, D., & Scotto, A. W. (1989) *Meth. Enzymol.* 171, 253-264.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Heinz Peters
Merkurstr. 34, 70565 Stuttgart
geb. am 7.6.1967 in Wittmund

Schulbildung:

1973 - 1977 Grundschule Wiesede
1977 - 1983 Realschule Friedeburg
1983 - 1986 Gymnasium Alexander von Humboldt, Wittmund
1986 Schulabschluß mit der Höheren Reife

Wehrdienst:

Jul. 1986 - Okt. 87 Ableisten des Grundwehrdienstes

Hochschulstudium:

WS 87/88 - Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität
WS 94/95 Berlin
Studien- und Diplomarbeit an der Gesellschaft für Biotechnologische
Forschung (GBF) in Braunschweig unter der Leitung von
Prof. Dr. Rolf D. Schmid
Thema der Studienarbeit: FIIA zur On-line-Bestimmung von
monoklonalen Antikörpern
Thema der Diplomarbeit: Anwendung der Mikrokolorimetrie zur
Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern und Hapten-
konjugaten.
Feb. 91 Ablegen der Diplom-Vorprüfung
Jan. 95 Diplomhauptprüfung in den Fächern: Technische Biochemie,
Bioverfahrenstechnik, Angewandte Mikrobiologie, Genetik,
Chemisch-technische Analyse und Meß-und Regeltechnik
Apr. 95 - Okt.98 Anfertigung der Dissertation am Institut für Technische Biochemie
der Universtät Stuttgart unter der wissenschaftlichen Leitung von
Prof. Dr. Rolf D. Schmid
seit Nov. 99 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei m-phasys GmbH, Tübingen

Auslandsaufenthalt:

Mai 97 - Okt.97 National Institute for Advanced and Interdisciplinary Research
(NAIR), Bionic Design Group, Tsukuba (Japan)