

***Acetabularia*-Rhodopsin,
eine lichtgetriebene Protonenpumpe
aus einem autotrophen Eukaryoten**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von
David Ewers
aus Hannover**

Göttingen 2005

D7

Referent: Prof. Dr. D. Gradmann

Korreferent: Prof. Dr. R. Tischner

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2005

Abstract

A rhodopsin from *Acetabularia acetabulum* (AR) is characterized by molecular genetic and electrophysiological means. On the basis of a published, incomplete sequence, the whole transcript of an opsin was isolated and cloned as complementary deoxy ribonucleic acid (cDNA) by reverse transcription and polymerase chain reaction, and sequenced. Analysis of the deduced amino acid sequence reveals a hypothetical protein that shares the primary and secondary structure of type 1 rhodopsins. It shows 21% identity with and 38% similarity to bacteriorhodopsin (BR). In addition to the rhodopsins' common seven transmembrane helices, AR seems to have an eighth helix at the C-terminus. Judging from characteristic, conserved amino acids found in the active center of the protein, AR is expected to be a light-driven proton pump. To characterize the electrical properties of AR, it was functionally expressed in oocytes of *Xenopus laevis*. Under voltage clamp, AR is found to indeed mediate a light-driven transport of protons against their electrochemical gradient. The stationary, positive current shows a sigmoidal voltage dependence. AR is the first rhodopsin of a eukaryote autotroph that is shown to function as an active ion transporter. The light induced current through AR is reminiscent of the fast photoelectric effect in acetabularia, as it follows the onset of light after $< 50 \mu\text{s}$, is half maximal at a light intensity of $> 10^{20}$ photons per square meter and second, and has an action spectrum peaking at 520 nm (550 nm in vivo).

Kurzreferat

Ein Rhodopsin aus *Acetabularia acetabulum* (AR) wird mit molekulargenetischen und elektrophysiologischen Mitteln charakterisiert. Mithilfe der reversen Transkription und der Polymerasekettenreaktion wurde auf der Grundlage einer veröffentlichten, unvollständigen Sequenz, das gesamte Transkript eines Opsins in Form komplementärer Desoxyribonukleinsäure isoliert, kloniert und sequenziert. Das aus der abgeleitete Aminosäuresequenz resultierende hypothetische Protein hat eine mit den Rhodopsinen des Typs 1 übereinstimmende Primär- und Sekundärstruktur. Die Aminosäuresequenz von AR zeigt 21% Identität und 38% Ähnlichkeit mit Bacteriorhodopsin. Es scheint außer den für Rhodopsine typischen sieben transmembranen Helices noch ein weiteres Transmembransegment in Nähe des C-Terminus zu besitzen. Aufgrund charakteristischer konservierter Aminosäuren im aktiven Zentrum des Proteins wird in AR eine lichtgetriebene Protonenpumpe vermutet. Um AR elektrophysiologisch zu charakterisieren, wurde es in Oozyten von *Xenopus laevis* funktionell exprimiert. *Voltage-clamp*-Untersuchungen bestätigten den lichtgetriebenen Transport von Protonen durch AR gegen ihren elektrochemischen Gradienten. Der stationäre positive Strom ist spannungsabhängig mit einer sigmoiden $I(V)$ -Kurve. AR ist das erste in einem autotrophen Eukaryoten nachgewiesene Rhodopsin, das als aktiver Ionentransporter fungiert. Der lichtinduzierte Strom durch AR zeigt Ähnlichkeiten mit dem schnellen photoelektrischen Effekt in *Acetabularia*. So folgt die Antwort $< 50 \mu\text{s}$ auf „Licht an“, hat eine halbmaximale Lichtintensität von $> 10^{20}$ Photonen pro Quadratmeter und Sekunde, und das Maximum des Aktionsspektrums liegt bei 520 nm (550 nm in vivo).

*Alle Gestalten sind ähnlich, und keine gleicht der andern,
Und so deutet das Chor auf ein geheimes Gesetz,
Auf ein heiliges Rätsel.*

Johann Wolfgang von Goethe (Die Metamorphose der Pflanzen)

Diese Arbeit entstand in der Zeit von August 2002 bis September 2005 in der Abteilung Biophysik der Pflanze des Albrecht-von-Haller-Instituts.

Zuerst danke ich Herrn Prof. Dr. Dietrich Gradmann dafür, dass er mich auf das Thema gestoßen hat und dann bis zuletzt die Rahmenbedingungen für die Entstehung dieser Arbeit geschaffen hat. Seine Kritik war angemessen und hilfreich.

Herr Prof. Dr. Rudolph Tischner war so freundlich, das Korreferat zu übernehmen.

Für die Anleitung zunächst aus der Nähe und dann aus der Ferne bin ich Herrn Prof. Dr. Peter Hegemann zu Dank verpflichtet, der an den entscheidenden Stellen die Richtung vorgegeben hat. Ohne die Kooperation seiner Arbeitsgruppe wäre die Arbeit ohnehin nicht entstanden.

Ich danke Frau Prof. Dr. Anna Moroni und ihrer Arbeitsgruppe für ihre Hilfe mit der Expression und der Elektrophysiologie.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Satoshi Tsunoda für die Überlassung elektrophysiologischer Daten.

Dr. Mathias Schacht danke ich für seine Hilfe mit Unix-basierter Software.

Frau Hanna Bork danke ich für die Pflege der *Acetabularien* und für die die ausdauernde Ausübung ihrer Funktion als „Seele“ der alten Arbeitsgruppe. Ein Teil davon war das Freitagsfrühstück, das ohne sie leider ausfallen mußte.

Reiner Freter und Michael Koltermann haben mir bei unzähligen Gelegenheiten hilfreich zur Seite gestanden. Danke für die Jahre der guten Nachbarschaft.

Schließlich danke ich Dominika Mandrek-Ewers dafür, dass sie nicht nur mich, sondern auch meine Arbeit, die eigentlich keinem weiteren Zweck diente, über die Jahre begleitet hat.

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung.....	1
1.1 Rhodopsine.....	1
1.2 Alternative Photophosphorylierung.....	3
1.3 Rhodopsin in <i>Acetabularia</i> ?.....	3
1.4 Ziel dieser Arbeit.....	5
2 Material und Methoden.....	6
2.1 Organismen.....	6
2.1.1 <i>Acetabularia acetabulum</i>	6
2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	6
2.1.3 <i>Xenopus laevis</i>	7
2.2 Desoxyribonukleinsäuren (DNA).....	7
2.2.1 Plasmide.....	7
2.2.2 Oligonukleotide.....	8
2.3 Elektronische Verarbeitung von DNA-Sequenzen.....	8
2.4 Reinigung von Nukleinsäuren.....	9
2.4.1 Phenol/Chloroform-Extraktion.....	9
2.4.2 Fällung von Nukleinsäuren.....	10
2.4.3 Reinigung von DNA mithilfe von Silicagel-Membran-Säulen.....	11
2.5 Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in Lösungen.....	11
2.6 Auftrennung von Nukleinsäuren im elektrischen Feld.....	11
2.6.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	12
2.7 Enzymatische Spaltung und Verknüpfung von DNA.....	12
2.7.1 Fragmentierung von DNA mit Endonukleasen.....	12
2.7.2 Ligation von DNA-Fragmenten.....	13
2.8 Transformation von <i>E. coli</i>	13
2.8.1 blue-white-screening.....	13
2.9 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	14
2.10 Sequenzierung von DNA.....	14
2.11 Präparation von RNA.....	14
2.11.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus <i>A. acetabulum</i>	15
2.11.2 Isolierung von messenger-RNA (mRNA).....	15

2.12	Synthese komplementärer DNA (cDNA).....	16
2.13	Erzeugung homopolymerer DNA-Enden (homopolymeric tailing).....	17
2.14	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	17
2.14.1	Vervielfältigung unbekannter cDNA-Enden (Rapid Amplification of cDNA-Ends (RACE)).....	19
2.14.2	Erzeugung von Genklonen voller Länge	20
2.14.3	Mutagenese.....	20
2.15	Heterologe Expression in <i>X. laevis</i>	21
2.15.1	In-vitro-Transkription.....	21
2.15.2	Präparation und transiente Transformation der Oozyten.....	21
2.16	Elektrophysiologie.....	21
3	Ergebnisse.....	23
3.1	Nachweis eines Opsin-Transkripts in <i>Acetabularia acetabulum</i>	23
3.2	Klonierung von aop.....	24
3.2.1	RACE.....	24
3.2.2	Klonierung des vollständigen Transkripts.....	25
3.3	Sequenzanalyse von aop.....	26
3.3.1	Sequenz des vollständigen Transkripts.....	26
3.3.2	Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von AOP.....	30
3.3.2.1	Dotplots.....	30
3.3.2.2	Voraussage der Topologie.....	32
3.3.2.3	Multiple Sequence Alignment.....	33
3.3.3	Phylogenie.....	36
3.4	Heterologe Expression von AOP in Oozyten von <i>X. laevis</i>	37
3.4.1	Anpassung des genetischen Codes.....	37
3.4.1.1	Mutagenese.....	39
3.4.1.2	Klonierung in den Expressionsvektor pSGEM.....	39
3.4.2	Elektrische Eigenschaften von in <i>Xenopus</i> -Oozyten exprimiertem AR.....	40
3.4.2.1	Einfluss von Membranspannung und pH auf die lichtinduzierten Ströme durch AR.....	40
3.4.2.2	Einfluss anderer Ionen.....	41
3.4.2.3	Kinetik der Stromantwort.....	42
3.4.3	Aktionsspektrum.....	42
3.4.4	Lichttitration.....	43

4 Diskussion.....	44
4.1 Klassifizierung von AOP anhand von Sequenzvergleichen.....	44
4.1.1 Phylogenie.....	44
4.1.2 Ermittlung der Sequenz von aop.....	44
4.2 Voraussage der Topologie.....	45
4.3 Elektrophysiologie.....	45
4.4 Vergleich der lichtinduzierten Ströme durch AR mit dem schnellen photoelektrischen Effekt von Acetabularia.....	46
4.5 Ausblick.....	47
5 Zusammenfassung.....	48
Literaturverzeichnis.....	49

Verzeichnis der Abkürzungen

<i>aop</i>	Bezeichnung des Gens von <i>Acetabularia</i> -Rhodopsin
AOP	Bezeichnung des Apoproteins von <i>Acetabularia</i> -Rhodopsin, <i>Acetabularia</i> -Opsin
AP	Aktionspotential
AR	<i>Acetabularia</i> -Rhodopsin (= AOP + Retinal)
cDNA	<i>complementary</i> DNA, komplementäre DNA
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonukleinasen
ds DNA	<i>double stranded</i> , doppelsträngige DNA
EDTA	Etylendiamintetraacetat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
PCI	Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PP	Polypropylen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinase
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SB	Schiff'sche Base
TMH	transmembrane Helix
TMP	Transmembranprotein
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen

1 Einführung

1.1 Rhodopsine

Bis zu 30 % aller Proteine sind an oder in Biomembranen zu finden (BOYD et al., 1998). Das ist keine Überraschung, denn diese biotischen Fettfilme begrenzen nicht nur die Kompartimente, in denen sich Lebensvorgänge abspielen, vielmehr sind auch sie selbst ein solches Kompartiment. Die zentralen Vorgänge des Energiestoffwechsels und des Stoff- und Informationstransports werden von Proteinen getragen, die in Membranen eingebettet sind (integrale oder Transmembran-Proteine, TMPE) oder mit TMPen assoziiert sind.

Eine strukturelle und funktionelle Gruppe solcher TMPE, die in ihrer Funktion als Lichtrezeptoren an beiden zentralen Vorgängen beteiligt sind, bilden die Rhodopsine. Sie bestehen aus sieben α -Helices, welche die Membran in abwechselnden Richtungen durchspannen (transmembrane Helices, TMHs), verbunden durch cytoplasmatische oder extrazelluläre Schleifen (loops). An ein Lysin etwa in der Mitte der siebten Helix ist der Cofaktor Retinal in Form einer Schiff'schen Base (SB) kovalent gebunden (s. Abb. 1.1).

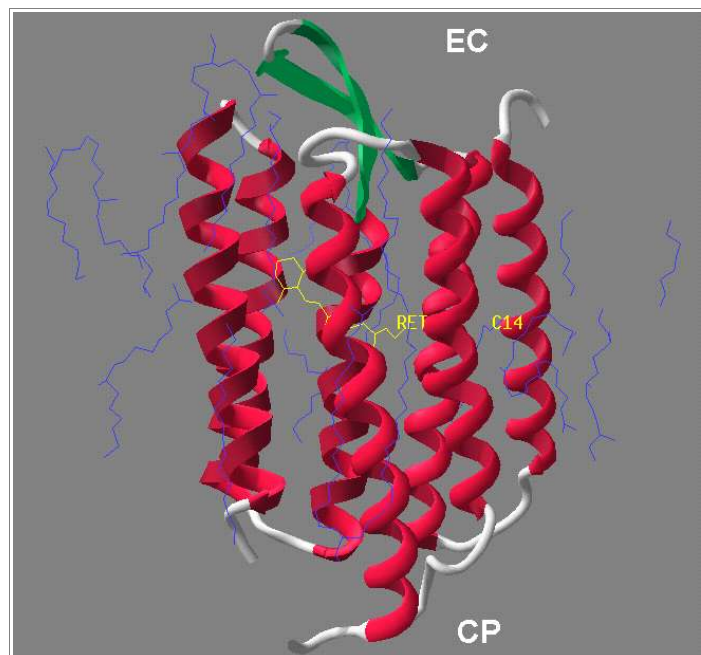
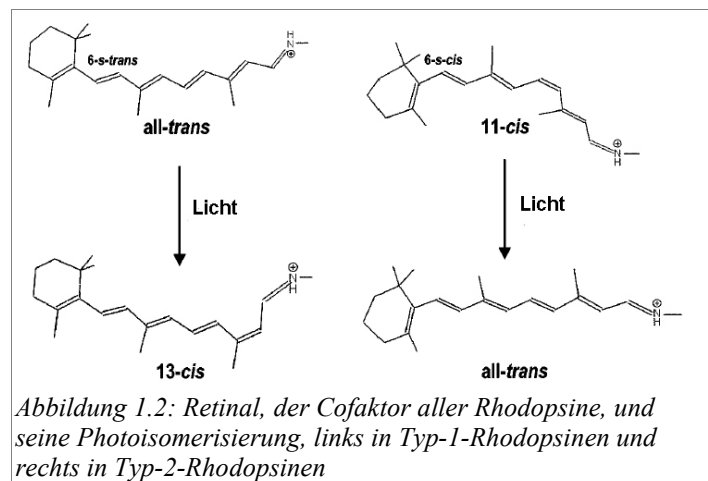


Abbildung 1.1: Tertiärstruktur von Bacteriorhodopsin, dem prominentesten Vertreter der Typ-1-Rhodopsine. Retinal, geordnete Lipide und Aminosäuren in TMHs, loops und β -sheets sind farblich gekennzeichnet; EC: extrazelluläre Seite, CP: cytoplasmatische Seite. Zur Modellierung wurden die Koordinaten 1C3W (LUECKE et al., 1999) der Protein Databank (BERNSTEIN et al., 1977) verwendet.

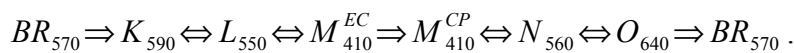
Man unterscheidet bei den Rhodopsinen zwei Familien, zwischen denen, besitzen sie auch eine ähnliche Tertiärstruktur, geringe Sequenzähnlichkeit besteht und deren

phylogenetische Beziehungen noch diskutiert werden (vgl. DEININGER et al., 2000). Rhodopsine vom Typ 1 waren lange Zeit nur in Archebakterien bekannt, kommen aber auch in den anderen Reichen des Lebens (Eubakterien, Eukaryoten) vor. Sie fungieren als lichtgetriebene Ionenpumpen (Bacteriorhodopsin, BR, STOEKENIUS & OESTERHELT, 1973; Halorhodopsin, HR, SCHOBERT & LANYI, 1982), lichtgesteuerte Ionenkanäle (Channelopsin, CHOP, SINESHCHEKOV et al., 2002, NAGEL et al., 2002) und *transducer*-gekoppelte Photorezeptoren (*Sensory Rhodopsin*, SR, BOGOMOLNI & SPUDICH, 1982). Rhodopsine vom Typ 2 sind die Photorezeptoren der visuellen Systeme der Metazoa, allesamt G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Übersicht über Rhodopsine: SPUDICH et al., 2000).

Die lichtinduzierte Konformationsänderung (Photoisomerisierung, s. Abb. 1.2) des Retinals von *all-trans* nach *13-cis* (Typ-1-Rhodopsine) oder *11-cis* nach *all-trans* (Typ-2-Rhodopsine) ist die Grundlage der Lichtempfindlichkeit der



Rhodopsine. Sie steht am Anfang einer Folge von photochemischen Reaktionen, die jeweils distinkte Konformationsänderungen im aktiven Zentrum (sog. *retinal-binding pocket*) nach sich ziehen. In Typ-1-Rhodopsinen wird diese Folge von Reaktionen mit ihren zunächst spektroskopisch nachgewiesenen Übergangszuständen (*photointermediates*) als *photocycle* bezeichnet (LOZIER et al., 1975), der für BR so aussieht (nach VARO & LANYI, 1991 und HAUPTS et al., 1999):



Die wichtigsten Schritte beinhalten die Photoisomerisierung des Retinals ($BR_{570} \Rightarrow K_{590}$), Deprotonierung der SB mit Asp⁸⁵ in der Nähe der extrazellulären (EC) Seite als Akzeptor ($L_{550} \Leftrightarrow M_{410}^{EC}$), Veränderung in der Zugänglichkeit (*access*) der SB für die an der Protonenleitung beteiligten Aminosäuren ($M_{410}^{EC} \Rightarrow M_{410}^{CP}$), Transport eines Protons von Asp⁸⁵ auf die EC-Seite und gleichzeitige Reprotonierung der SB durch Asp⁹⁵ in der Nähe der cytoplasmatischen (CP) Seite ($M_{410}^{CP} \Leftrightarrow N_{560}$), Transport

eines Protons von der EC zu Asp⁹⁵ und dessen Reprotonierung ($N_{560} \leftrightarrow O_{640}$), Re-Isomerisierung der SB ($N_{560} \leftrightarrow O_{640}$) und Rückkehr der Zugänglichkeit der SB in den Ausgangszustand ($O_{640} \Rightarrow BR$). Rhodopsine vom Typ 2 durchlaufen eine ähnliche Reaktionsfolge, allerdings wird dabei die kovalente Bindung des Retinals zerstört und das Pigment gebleicht (Übersicht: HOFMANN, 1999). Die Re-Isomerisierung des Retinals wird ebenfalls von retinalbindenden Proteinen katalysiert, den Retinochromen (PEPE & CUGNOLI, 1992).

1.2 Alternative Photophosphorylierung

Der am Besten untersuchte Vertreter der Typ-1-Rhodopsine, BR, erzeugt in dem halophilen Archebakterium *Halobacterium salinarium* einen elektrochemischen Gradienten und dient so zu einer von einer Elektronentransportkette unabhängigen Photophosphorylierung. Diese Alternative zur Lichtreaktion der Photosynthese der Pflanzen (Übersicht: OESTERHELT, 1999) wird wohl nicht nur von urtümlichen Extremophilen in isolierten Ökosystemen genutzt, sondern seit neueren Erkenntnissen auch in dem globalen Ökosystem des Oberflächenwassers der Weltmeere (BEJA et al., 2000), wo sie vielleicht für einen nicht unerheblichen Anteil der metabolischen Energiekonvertierung verantwortlich ist. Schließlich wurde der selbe Mechanismus in einem Eukaryoten, dem Pilz *Leptosphaeria maculans*, postuliert. Leptosphaeriarhodopsin (LR) ist eine lichtgetriebene Protonenpumpe (WASCHUK et al. (2005)). In autotrophen Eukaryoten wurde ein alternativer Weg der Photophosphorylierung bisher nicht vermutet, nutzen diese Organismen doch bereits die Lichtreaktion der Photosynthese.

1.3 Rhodopsin in *Acetabularia*?

Acetabularia (Abb. 1.3, Dasycladales) ist eine einzellige Meeresalge, die siphonal organisiert ist, d. h. sie besteht aus einer einzigen, langgestreckten Riesenzelle mit je nach Stadium der Ontogenese einem oder vielen Zellkernen. Einst ein viel beforschter Modellorganismus (vgl. GIBOR, 1966), wurde *Acetabularia* durch ihre Größe (mehrere cm Länge) bei Fehlen von Querwänden auch zu einem Objekt elektrophysiologischer Studien. SCHILDE entdeckte 1966 im Zuge elektrophysiologischer Messungen mit

intrazellulären Elektroden, dass Licht in *Acetabularia* Aktionspotentiale (AP) induziert, welche die Zelle, ähnlich einem Axon der Metazoa, entlanglaufen. Dabei findet auf „Licht an“ hin eine schnelle, transiente Depolarisation vom Ruhepotential (RP, -170 mV) statt, gefolgt von einer langsamen Hyperpolarisation (schneller und langsamer photoelektrischer An-Effekt). Auf „Licht aus“ hin ist zunächst eine schnelle Hyperpolarisation zu beobachten, dann eine langsame starke Depolarisation, woraufhin die Spannung nach Erreichen eines Maximums (-70 mV) wieder auf das RP zurückfällt (schneller und langsamer photoelektrischer Aus-Effekt).



Abbildung 1.3: *Acetabularia acetabulum* in Kultur.

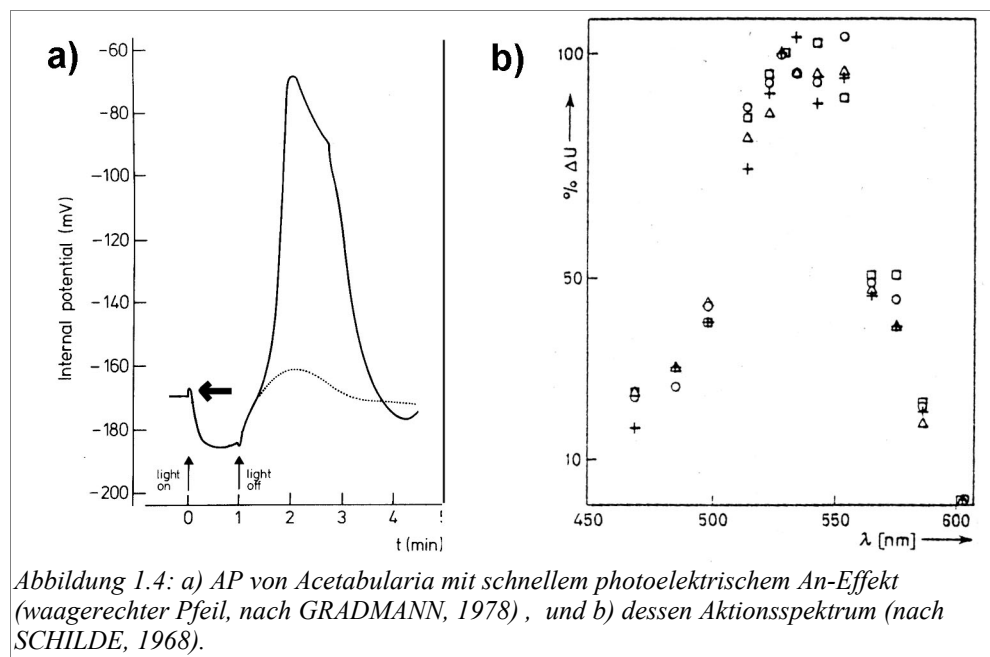


Abb. 1.4 zeigt den schnellen photoelektrischen An-Effekt am Beginn des APs. SCHILDE (1968) vermutete für dieses sensorische Phänomen ein Rhodopsin als Photorezeptor, da das Aktionsspektrum des schnellen photoelektrischen An-Effekts dem von visuellen Rhodopsinen der Metazoa entspricht (Abb. 1.4, rechts), jedoch zog er auch ein Cytochrom in Betracht. GRADMANN (1978) erklärte den Effekt mit einer Hemmung einer bisher nicht isolierten elektrogenen Cl^- -ATPase.

In jüngerer Zeit wurde vergeblich versucht, das postulierte Rhodopsin von *Acetabularia*

mit molekularbiologischen Methoden zu identifizieren (EWERS, 2002). HENRY et al. (2004) veröffentlichten jedoch vor kurzem die Sequenz eines mutmaßlichen Opsin-Transkripts aus einer *expressed-sequence-tag*(EST)-Bibliothek (*accession number* beim *National Center for Biotechnology Information*, NCBI: CF259014), für die sie Homologie mit *Leptosphaeria*-Opsin (LOP) feststellten.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Die von HENRY et al. (2004) als EST eines mutmaßlichen Opsingens veröffentlichte cDNA-Sequenz sollte neuer Ausgangspunkt zur Identifizierung eines Opsins in *Acetabularia* sein. Dafür sollte zunächst das Transkript als cDNA nachgewiesen, vervollständigt und kloniert werden. Heterologe Expression in Oozyten von *Xenopus laevis* sollte dann eine elektrophysiologische Charakterisierung ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 *Acetabularia acetabulum*

A. acetabulum wurde in Glasschalen mit künstlichem Meerwasser (PROVASOLI et al., 1957, modifiziert nach MÜLLER (1962): 475 mM NaCl, 9,8 mM KCl, 26,6 mM MgSO₄, 26 mM MgCl₂, 13,5 mM CaCl₂, 2,4 mM NaHCO₃, 1,18 µM NaNO₃, 14 µM Na₂HPO₄, 70 µM Na₂SiO₃, 14 µM ZnCl₂, 3,8 µM MnSO₄, 830 nM Na₂MoO₄, 40 nM CoCl₂, 8 nM CuSO₄, 57,3 µM Etylendiamintetraacetat (EDTA), 1,2 µM Fe-II-citrat, 32 µM Borsäure, 185 µM NaBr, 14 µM SrCl₂, 210 nM AlCl₃, 130 nM RbCl, 140 nM LiCl, 120 nM NaJ, 500 ng/l Vitamin B 12, 500 ng/l Biotin, 100 µg/l Thiamin; sterilfiltriert) nach SCHWEIGER et al. (1977) bei einem Licht:Dunkel-Zyklus von 14:10 h kultiviert.

2.1.2 *Escherichia coli*

Der Stamm **XL1-blue** (BULLOCK et al. 1987, Genotyp: *supE hsdR lac⁻ F' proAB⁺ lacI^q lacZΔM15*) diente als Wirt für Klonierungen, also zur Aufnahme und Vermehrung von Plasmiden, die durch Ligation von Produkten der Polymerasekettenreaktion (PCR, s. a. 2.14) oder Restriktionsfragmenten mit Vektoren entstanden. Aufgrund eines defekten *lacZ*-Gens ist der Stamm für die α -Komplementierung geeignet (ULLMANN et al., 1967, 2.2.1), welche ein sog. *blue-white-screening* zur Erkennung rekombinanter Klone ermöglicht (HORWITZ et al., 1978).

Die Bakterien wurden in Luria-Bertani(LB)-Medium (1 % Bacto-Trypton (DIFCO, USA), 0,5 % Hefe-Extrakt, 1 % NaCl, nach Bedarf 50 µg/ml Ampicilin) kultiviert. Stammkulturen wurden langfristig in 40 % Glycerin bei ≈ -70 °C gelagert. Für Zeiträume von Wochen wurden die Kulturen auch als einzelne Kolonien auf Agarplatten (80 ml LB-Medium mit 1% Agar-Agar in steriler Petri-Schale mit 100 mm Durchmesser) bei 4 °C verwahrt. Bereits als kompetent gelieferte Zellen wurden nach Herstellerangaben gelagert. Übernachtskulturen wurden durch Beimpfen von meist 2 ml LB-Medium in 15 ml Reagenzgläsern aus Borsilikat (Schott, Mainz) oder Polypropylen

(PP, Falcon, BD BIOSCIENCES, USA) mit einer Einzelkolonie und anschließender Inkubation bei 37 °C und 225 Upm in einem Schüttelinkubator für 12 – 16 h erzeugt.

2.1.3 *Xenopus laevis*

X. laevis (Anura) ist der in Südafrika beheimatete Krallenfrosch. Die Anzucht und die Präparation von Oozyten erfolgte nach GRYGORCZYK et al. (1989).

2.2 Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

2.2.1 Plasmide

pUC19

Für die Klonierung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten wurde der Klonierungsvektor pUC19 (MESSING, 1984, FERMENTAS GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Das Plasmid trägt eine *multiple cloning site* (MCS) innerhalb eines Teils von *lacZ*, einem Bestandteil des Lac-Operons von *E. coli*, dessen Translationsprodukt das α -Peptid ist. Wird ein solches Plasmid in einen Stamm (z.B. XL1-blue) mit einer Mutation im *lacZ*-Gen gebracht, stellt dieses α -Peptid die Funktion des Lac-Operons wieder her (α -Komplementierung, ULMANN et al., 1967). Ist das Gen allerdings durch eine Insertion in der MCS unterbrochen, bleibt die α -Komplementierung fast immer aus, was im Zuge des sog. *blue-white-screenings* (HORWITZ et al., 1978) eine Unterscheidung zwischen Klonen mit leerem Plasmid und Klonen mit Insert in der MCS des Plasmids ermöglicht.

pSGEM

Für die Expression in Oozyten von *X. laevis* wurde ein rekombinantes Opsin-Gen (*aopmut*, s. 3.4.1.2) in den dafür geeigneten Vektor pSGEM kloniert. pSGEM wurde von M. Hollmann (Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen) auf Grundlage von pGEM-HE konstruiert und großzügig zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Oligonukleotide

Aus 16-29 Nukleotiden bestehende Oligonukleotide dienen als Startmoleküle (*primer*) für die PCR und die reverse Transkription (RT). Mit der Herstellung von Oligonukleotiden wurden die Firmen Biometra (Göttingen), IBA GmbH (Göttingen), OPERON (Niederlande) und QIAGEN (Niederlande) betraut. Tabelle 1 zeigt die Nukleotidsequenzen der verwendeten Oligonukleotide.

Tabelle 1: Nukleotidsequenzen der verwendeten Oligonukleotide mit Verweis auf das jeweilige Kapitel

Bezeichnung	Sequenz	Kapitel
<i>paopr</i>	5 ' GCACGGCAAGCATGATGCAGCCGAC3 '	2.12
<i>paopdetfw</i>	5 ' CGGATGAGCGTGAAGTTA3 '	3.1
<i>paopdetrev</i>	5 ' TCAAGCAGTCAAAGGCTAAG3 '	3.1
<i>ppolytpcr</i>	5 ' GACTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTT3 '	3.2.1
<i>paop5rpcr</i>	5 ' CCGTCGACGGTGAATGCGCCGATGATAC3 '	3.2.1
<i>ppolycpcr</i>	5 ' CAAGGAATTCccccccccccccccc3 '	3.2.1
<i>paopfufw</i>	5 ' ACCTGCAGATCTCACGTTCTGTA3 '	3.2.2
<i>paopfurev</i>	5 ' AGTCTAGAAAGGATGCTTGCAATATCA3 '	3.2.2
<i>M13 forward (-21)</i>	5 ' TGTA AAAACGACGGCCAGT3 '	3.3.1
<i>M13 rev</i>	5 ' CAGGAAACAGCTATGACC3 '	3.3.1
<i>paopmutff</i>	5 ' CGCGGATCCATGTCAAACCCTAACCCCT3 '	2.14.3, 3.4.1.2
<i>paopmuta</i>	5 ' CGGCCGGAAC TGAACAGCGATGGAA3 '	2.14.3, 3.4.1.2
<i>paopmutsf</i>	5 ' TTCAAGCTTCCTCGAGCCCCAACTTTTCC3 '	2.14.3, 3.4.1.2

2.3 Elektronische Verarbeitung von DNA-Sequenzen

Zur Verarbeitung und virtuellen Repräsentation von DNA-Sequenzen dienen die Computerprogramme *Chromas Lite* (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) und *pDraw* (ACACLONE SOFTWARE).

Der softwaregestützte Vergleich von mehreren Aminosäuresequenzen (*multiple sequence alignment*) wurde mit den Programmen *BioEdit* (HALL, 1999), MEGA

(KUMAR et al., 2004) und *ClustalX* (THOMPSON et al., 1997) auf Grundlage von *Clustal* (HIGGINS & SHARP, 1988) ausgeführt.

Voraussagen der Topologie translatierter DNA entsprechende Proteine hinsichtlich der Ausbildung von TMHs wurden mithilfe des *Dense-Alignment-Surface*-Algorithmus (DAS, CSERZO et al (1997)) erzeugt, zugänglich auf dem *DAS-TMfilter-Server* (<http://www.enzim.hu/DAS/DAS.html>) und in Form des *DAS-TMfilter prediction tools* (Quellcode erhältlich unter <http://www.enzim.hu/DAS/dis.tar.nc>). Der *DAS*-Algorithmus geht von perfekten (also ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren bestehenden) TMHs aus und vergleicht anhand einer empirisch ermittelten Gewichtungstabelle (*scoring matrix*) die Eingabedaten mit einer Bibliothek von bekannten, nicht homologen TMPen. Resultat ist eine Wertung (*score*) für jede Aminosäure, ein Maß für ihre Wahrscheinlichkeit, an einer TMH beteiligt zu sein. Als Vergleichsbibliothek wurde die größte verfügbare Bibliothek mit 32 Einträgen gewählt.

Es wäre interessant gewesen, Voraussagen zur Topologie und *multiple sequence alignment* automatisiert zu kombinieren, um der fehlenden Anpassung der zum *multiple sequence alignment* verwendeten *scoring matrices* an Besonderheiten der Sekundärstruktur (in diesem Falle von TMPen) Rechnung zu tragen. SHAFRIR & GUY (2004) veröffentlichten eine solche Möglichkeit in Form des STAM-Algorithmus, der allerdings nicht verfügbar war.

Phylogenetische Zusammenhänge wurden mithilfe des Softwarepaketes MEGA (Version 1.3, KUMAR et al., 2004) untersucht.

Für Analysen der Codonverwendung (*Codon-Usage*) wurde der *Codon Usage Analyser* (SCHÖBEL B., www.gcu.de) herangezogen.

3D-Modelle von Proteinen wurden mithilfe des Programms DeepView/Swiss Pdb-Viewer (GUEX & PEITSCH, 1997, <http://www.expasy.org/spdbv/>) erstellt.

2.4 Reinigung von Nukleinsäuren

2.4.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung verschiedener organischer Moleküle aus wässrigen

Nukleinsäurelösungen wurden diese mit einem Gemisch aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (PCI, ROTH, Mannheim) in einem Volumenmischverhältnis von 25:24:1 behandelt. Für die Reinigung von DNA wurde der pH der Phenollösung vorher auf einen Wert von 8 gebracht. Dazu wurde sie mit 0,5 M Tris/HCl, pH 8 überschichtet, die beiden Phasen wurden für 15 min gemischt und die wässrige Phase nach erfolgter Phasentrennung entfernt. Das wurde noch zwei Mal wiederholt, bis der gewünschte pH erreicht war. Die äquilibrierte Lösung wurde für die Lagerung (4 °C) mit 0,1 Vol 0,1 M Tris/HCl, pH 8 überschichtet.

Für die Reinigung von Nukleinsäuren wurden je nach Maßstab 2 ml Reaktionsgefäße aus PP (EPPENDORF, Hamburg) oder 30 ml Zentrifugenbecher aus Polyethylen verwendet. Der die Nukleinsäuren enthaltenden wässrigen Lösung wurde 1 Vol der jeweiligen PCI-Lösung zugesetzt und die Phasen durch Schütteln für 15 min gemischt. Für RNA-Lösungen wurde dabei ein automatischer Schüttler verwendet, während Lösungen mit genomischer DNA zur Vermeidung einer Fraktionierung durch Scherkräfte vorsichtig um die Längsachse des Röhrchens manuell rotiert wurden. Die Phasentrennung wurde abhängig vom Maßstab durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (12.000 g, 10 min, Raumtemperatur (RT) oder 4 °C) oder einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge (Rotor SS34 oder HB4 in SORVALL RC-5B, 5.000 g, 10 min, 4 °C) erreicht. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die PCI-Phase mit der auf hohen Proteinanteil zurückzuführenden Zwischenphase verworfen. Generell wurde diese Prozedur bis zum Verschwinden der Zwischenphase wiederholt. Zur Entfernung von in der wässrigen Phase verbliebenem Phenol wurde abschließend 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol zugesetzt und im weiteren wie mit PCI verfahren.

2.4.2 Fällung von Nukleinsäuren

Ebenfalls zur Entfernung von verschiedenen organischen Molekülen und zur Konzentrierung von Nukleinsäurelösungen wurden Nukleinsäuren durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M NaAcetat, pH 5,3, und 2,5 Vol Ethanol, 97 %, und anschließende Inkubation (1 h, -20 °C) gefällt, je nach Maßstab in 1,5 oder 2 ml Reaktionsgefäßen oder in 15/50 ml Zentrifugenröhrchen aus PP (Falcon, BD BIOSCIENCES). Die Rückgewinnung der Nukleinsäuren erfolgte je nach Maßstab durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (12.000 g, 4 °C) oder einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge

(SORVALL GSA-Rotor in SORVALL RC-5B, 20 min, 5.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde mit 1,5 Ausgangsvolumen Ethanol, 70 %, gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde sehr sorgfältig abgenommen und das Pellet bei RT für 10 min – 2 h getrocknet. Danach wurde es je nach Verwendungszweck in H₂O bidest. oder TE-Puffer (10 mM Tris/HCL, pH 7,4, 1mM EDTA) gelöst. So spielt die Wirkung von EDTA als Chelator von zweiwertigen Kationen nur für DNA eine Rolle. DNasen sind ohne Mg²⁺ inaktiv, was in DNA-Lösungen erwünscht ist. RNasen sind in ihrer Aktivität Mg²⁺-unabhängig.

2.4.3 Reinigung von DNA mithilfe von Silicagel-Membran-Säulen

Die Standard-Reinigung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurde mit dem *QiaQuick PCR Purification Kit* oder im Fall kritischer Nukleinsäurekonzentration mit dem *MinElute PCR Purification Kit* (beide QIAGEN) vorgenommen.

2.5 Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde deren Absorption ultravioletten (UV) Lichts ausgenutzt, die mit einem Photometer (*Genequant II*, PHARMACIA, Freiburg) gemessen wurde. Eine optische Dichte bei 260 nm (OD₂₆₀) von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm wurde mit einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA (dsDNA) oder 40 µg/ml für Ribonukleinsäure (RNA) gleichgesetzt. Verunreinigung der Probe mit Proteinen wurden toleriert, wenn $OD_{260} / OD_{280} > 1.8$ (dsDNA) oder $> 2,0$ (RNA) gemessen wurde.

2.6 Auftrennung von Nukleinsäuren im elektrischen Feld

Gelelektrophorese wurde zur analytischen Auftrennung von RNA als auch von DNA sowohl zu analytischen als auch zu präparativen (2.6.1) Zwecken verwendet. Agarosegele wurden in Flachbettkammern aus Plexiglas (Schichtdicke 4 mm, Eigenbau;

Schichtdicke 15 mm, BIOMETRA, Göttingen) hergestellt. Dazu wurde Agarose (SEAKEM LE Agarose, CAMBREX, USA) in Konzentrationen von 0,8 – 2,0 % (w/v) in einem Mikrowellenofen bis zur vollständigen Solubilisierung in TBE-Puffer (45 mM Tris Base, 45 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8) oder TAE-Puffer (40 mM Tris Base, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8) erhitzt. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt und die Mischung in die Kammern gegossen. Das erstarrte Gel wurde mit TBE-Puffer bedeckt und die mit Auftragspuffer (FERMENTAS, 6 X) vermischten Proben in die Auftragstaschen (25 – 50 µl) pipettiert. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte dann im elektrischen Feld bei 6-8 V/cm. Als Längenstandard wurde *O'RangeRuler 500bp+1000bp DNA-Ladder* (FERMENTAS) oder *TriDye 100 bp ladder* (NEW ENGLAND BIOLABS, USA) verwendet.

Um den DNA- bzw. RNA-Ethidiumbromid-Komplex sichtbar zu machen, wurde das Agarosegel auf einem UV-Leuchttisch (PHARMACIA, Freiburg, LKB 2011 MACP Transillumin, 305 nm) durchstrahlt und gegebenenfalls zur Dokumentation fotografiert (DS-34 Direct Screen Instant Camera, POLAROID; Camedia 2000 Digitalkamera, OLYMPUS, Japan).

2.6.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die im Agarosegel lokalisierten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem *MinElute Gel Extraktion Kit* (QIAGEN) nach Herstellerangaben extrahiert.

2.7 Enzymatische Spaltung und Verknüpfung von DNA

2.7.1 Fragmentierung von DNA mit Endonukleasen

Im Rahmen von Klonierungen und zur Charakterisierung unbekannter DNA-Fragmente (Restriktionsanalysen) wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II der Fa. FERMENTAS nach deren Angaben verwendet. Standard-Spaltungen wurden mit 5-10 U des Enzyms pro µg DNA durchgeführt und dauerten 60 min. Die Reaktion wurde durch Hitzinektivierung bei für die jeweiligen Enzyme empfohlenen Temperaturen

zwischen 60 und 80 °C für 10 min unterbrochen. Zur weiteren enzymatischen Behandlung wurden die Reaktionsgemische einer Reinigung nach 2.4.3 unterzogen.

2.7.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Nach 2.7.1 gewonnene Restriktionsfragmente wurden mithilfe von T4-DNA-Ligase (FERMENTAS) mit ebenfalls durch Restriktionsenzyme verdauter Vektor-DNA in einem Volumen von 20 µl nach Maßgabe des Herstellers zu rekombinanten Plasmiden verknüpft, welche nach Transformation (2.8) beliebig vervielfältigt werden können (Klonierung). Die Ligation fand nach Maßgabe des Herstellers in einem Volumen von 20 µl statt. Es wurden 5 Weiss-*units* pro µg DNA eingesetzt.

2.8 Transformation von *E. coli*

Die Transformation bereits kompetenter Zellen des Stammes XL1-blue (XL1-Blue Supercompetent Cells, STRATAGENE) wurde nach dem jeweils mitgelieferten Protokoll durchgeführt. 10-100 ng experimenteller DNA wurden der Bakteriensuspension in einem Volumen von 10 µl zugefügt. Als Positivkontrolle dienten 50 ng pUC19-DNA in einem Volumen von 1 µl. Der sog. *heat shock* wurde den Zellen für 50 s bei 42 °C in einem temperaturgeregelten Wasserbad versetzt.

Zur Überführung gewöhnlicher Übernackulturen in den Zustand der Kompetenz und zur anschließender Transformation wurde das TransformAid Bacterial Transformation Kit der Fa. FERMENTAS verwendet. Statt der empfohlenen 1,5-ml-Reaktionsgefäße wurden wie für die kompetenten Zellen der Fa. STRATAGENE Reagenzgläser aus PP (15 ml, Falcon, BD BIOSCIENCES) verwendet.

2.8.1 blue-white-screening

War *blue-white-screening* auf Grundlage der α -Komplementierung (2.2.1) möglich, wurden zu diesem Zwecke geeignete Agarplatten mit sGAL und IPTG (sGAL-Agar, SIGMA-ALDRICH Inc., USA; 50 µg/ml Ampicilin) nach Angaben des Herstellers angefertigt und verwendet. Positive Klone wurden anhand fehlender Schwarzfärbung oder geringer Schwarzfärbung im Zentrum der Kolonie identifiziert, mithilfe einer

abgeflammten Impföse isoliert und als Übernachtskultur in Gegenwart von Ampicillin kultiviert.

2.9 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Präparation von Plasmiden aus *E. coli* wurde das *QiaPrep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.10 Sequenzierung von DNA

Die Fa. SEQLAB (Göttingen) führte die Sequenzierung von PCR-Produkten und *inserts* von Plasmiden durch. Die dazu nötigen *primer* waren bei SEQLAB vorrätig oder wurden vom Autor bereitgestellt.

2.11 Präparation von RNA

Für die Arbeiten mit RNA wurden zur Vermeidung einer Degradation durch RNasen besondere Maßnahmen ergriffen. So wurden Geräte aus Glas oder Stahl ü.N. bei 180 °C gehalten und solche aus Kunststoff in RNase-freiem Zustand erworben (Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, EPPENDORF; Zentrifugenröhrchen aus PP, 15 ml und 50 ml, Falcon, BD BIOSCIENCES). Alle anderen Materialien, die nicht in direkten Kontakt mit RNA, wohl aber in unmittelbare Nähe gerieten (Handschuhe, Mikroliterpipetten, Reaktionsgefäßständer, Arbeitsplatte), wurden regelmäßig mit einem RNase-Dekontaminationsmittel (RNase *AWAY*, NBP BIOPRODUCTS, USA) behandelt und verblieben an einem für Arbeiten mit RNA reservierten Arbeitsplatz. Wässrige Lösungen wurden, soweit sie keine Substanzen mit freien Aminogruppen enthielten (Tris), ü.N. mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, FEDORCSAK & EHRENBERG, 1966) behandelt (0,1 % (v/v)) und anschließend autoklaviert, enzymatische Reaktionsgemische enthielten zusätzlich einen RNase-Hemmstoff (RiboLock, FERMENTAS). RNA enthaltende Lösungen wurden bei ≈ -70 °C gelagert und, soweit sinnvoll, im Zuge experimenteller Handhabung bei Temperaturen um 0 °C gehalten.

2.11.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus *A. acetabulum*

Zellen von 5 – 12 mm Länge wurden geerntet, indem der Inhalt der Kulturschalen (2.1.1) über einem Nylonnetz entleert und die dort festgehaltenen Zellen mit 1 l künstlichem Meerwasser gewaschen wurden. Nach Entfernen eines Großteils der Flüssigkeit durch sanften Druck mit einer stumpfen Pinzette wurde das Frischgewicht der Zellen bestimmt. Die Zellen wurden in haselnußgroßen Portionen in flüssiges N₂ überführt und im Bedarfsfall bis zur Verwendung bei ≈ -70 °C gelagert.

Die gefrorenen Zellen wurden nach Zugabe von $\sim 1/10$ Vol gereinigtem, sterilisiertem Sand mit einem Stößel in einem Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben, welches in einem Reaktionsgefäß aus PP (EPPENDORF) mit 3 Vol Extraktionspuffer (100 mM LiCl, 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% β -Mercaptoethanol) vermischt wurde. Darauf folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (2.4.1). Die Extraktion mit CI wurde dabei durch 60 min langes Schwenken auf einer maschinellen Wippe statt durch Schütteln vorgenommen. Die wässrige Phase wurde mit $\frac{1}{4}$ Vol 8 M LiCl vermischt und die RNA ü.N. bei 4 °C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 4 °C) sedimentiert. Das Sediment wurde nacheinander mit 500 μ l 2 M LiCl und mit 500 μ l Ethanol gewaschen und jeweils unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach 15 – 30 min Lufttrocknung bei 0 °C wurde es in 20 μ l mit DEPC behandeltem H₂O gelöst.

2.11.2 Isolierung von *messenger-RNA* (mRNA)

Gelegentlich lieferten die unter 2.14 und 2.14.1 beschriebenen Methoden mit aus Gesamt-RNA erzeugter cDNA als *template* kein zufriedenstellendes Ergebnis. Mit dem Ziel der Konzentration des *targets* sollte deshalb die mRNA, als jenes enthaltene Fraktion der RNA, isoliert werden. Die mRNA unterscheidet sich auf struktureller Ebene von den übrigen RNA-Spezies unter anderem durch ihr uniformes 3'-Ende, das aus 60-200 Adenylaten besteht. Der Einsatz von kovalent an Cellulose gebundene Oligomere von Desoxytymidylat (Oligo-dT-Cellulose, BIOMOL, Hamburg) als Affinitätsagens nutzt diese Eigenschaft zur Trennung der polyA-RNA von den übrigen RNA-Spezies aus.

Die Oligo-dT-Cellulose wurde zunächst jeweils 2 h nacheinander in verschiedenen

Lösungen gewaschen (1mM EDTA pH 7,5; 0,1 M NaOH, 5 mM EDTA; 1 mM EDTA; TE-Puffer), abzentrifugiert (7000 Upm, 2 min) und schließlich in 10 Vol Bindungspuffer (BB, 40 mM Tris/HCl, 1M NaCl, 2 mM EDTA, 0,2% N-laurylsulfat (SDS), pH 7,5) wieder aufgenommen.

Zur Bindung der mRNA wurden 20 µl der zuvor gewonnenen RNA-Lösung (2.11.1) mit 20 µl der gewaschenen Oligo-dT-Cellulose und 40 µl BB vermischt und für 3 min bei 70 °C inkubiert, danach für 10 min geschüttelt (EPPENDORF Thermomixer Comfort) und zentrifugiert (7000 Upm, 2 min). Nach dreimaligem Waschen mit 0,5 X BB wurde das Pellet von restlicher Flüssigkeit befreit, in 20 µl 1mM EDTA resuspendiert und die mRNA 1 min bei 70 °C eluiert. Nach Zentrifugation (7000 Upm, 2 min) wurde der Überstand separiert und die Elution zwei Mal wiederholt. Die gereinigte mRNA wurde aus dem vereinigten Überstand wie beschrieben (2.4.2) gewonnen.

2.12 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Da für PCR verwendete DNA-Polymerasen keine RNA-abhängige Polymeraseaktivität besitzen, musste zur spezifischen Vervielfältigung von Transkripten die mRNA mithilfe reverser Transkriptase, einer von Retroviren kodierten, RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in komplementäre DNA (cDNA) übersetzt werden. Dazu wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (FERMENTAS) nach Herstellerangaben verwendet. Dieses Komplettpaket enthält eine reverse Transkriptase aus dem Molony Murine Leukemia Virus (M-MuLV). Für die Übersetzung des kompletten mRNA-Bestands in cDNA wurde wieder (s. 2.11.2) das poly-dA-Ende der mRNA ausgenutzt und ein Oligo-dT-*primer* eingesetzt (T_{16}), der mit den Adenylatresten des 3'-Endes der mRNA hybridisieren sollte. Für die Synthese sequenzspezifischer cDNA im Zuge der 5'-RACE wurde der spezifische *primer paopr*t verwendet.

Als *template* wurden 0,2-2 µg Gesamt-RNA oder die aus 2 µg Gesamt-RNA isolierte mRNA verwendet. Die Ausbeute konnte nicht bestimmt werden, der Erfolg wurde jedoch jeweils funktional anhand der nachfolgenden enzymatischen Vervielfältigung von Transkripten (2.14, 2.14.1) nachgewiesen.

2.13 Erzeugung homopolymerer DNA-Enden (*homopolymeric tailing*)

Um für 5'-RACE (2.14.1) auf der 3'-Seite der cDNA (entspricht der 5'-Seite der mRNA, s. ebd.) eine Sequenz zum Anheften (*annealing*) eines *primers* zu generieren, wurde ein Homopolymer von Cytosinen (*polyC-tail*) angehängt (ESCHENFELDT et. al, 1987). Dazu wurde terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT, FERMENTAS) nach Angaben des Herstellers verwendet. TdT ist eine *template*-unabhängige Polymerase, die in Anwesenheit von nur einem Mononukleotid (in diesem Falle Cytosin) ein Homopolymer an das 3'-Ende von DNA fügt. Als *primer* dient im vorliegenden Fall die komplementäre mRNA, welche zuvor als *template* zur cDNA-Synthese (2.12) diente. Nach einer Reinigung (2.4.3) wurde die gesamte nach 2.12 erzeugte cDNA und dCTP der Fa. ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim) als Substrat verwendet.

2.14 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR (SAIKI et al., 1985, MULLIS & FALOONA., 1987) wurde zur Vervielfältigung von Opsinsequenzen aus *A. Acetabulum* (2.14.1, 2.14.3) und für die Mutagenese bereits klonierter Gene (2.14.3) verwendet. PCR wurde in 0,2 ml-Gefäßen mithilfe eines Thermocyclers der Fa. BIOMETRA durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Maßnahmen zur Verhinderung von Kontaminationen der PCR-Reaktionen mit vorher erhaltenen PCR-Produkten ergriffen. So wurden alle Pipettierarbeiten innerhalb einer Sterilbank verrichtet, die Pipettenspitzen waren mit Aerosolfiltern versehen. Eine ausführliche Besprechung der Laborpraxis für die PCR ist bei ORREGO (1990) zu finden.

Je nach Anwendung wurden thermostabile Polymerasen (SAIKI et al., 1988) mit unterschiedlichen Eigenschaften bezüglich Fehlerrate (CLINE et al., 1996), Möglichkeit einer Hitzeaktivierung (*hot start*, D'AQUILA et al., 1991) und Arbeitsaufwand bei der Durchführung verwendet.

Die Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte folgte, wenn nicht anders angegeben, nachstehendem Schema:

1. Anfängliche Denaturierung bei 95 °C für 2 min

2. 25 – 35 Zyklen, bestehend aus

- a) Denaturierung bei 95 °C für 30 s
- b) *annealing* (Anheften der *primer*) für 30 s bei T_A
- c) Elongation bei 72 °C für 1 min/kb *target*-Länge

3. Abschließende Elongation für 10 min

Die *annealing*-Temperatur T_A wurde dabei 5 °C unter der Schmelztemperatur T_M der *primer* gewählt ($T_A = T_M - 5^\circ\text{C}$). Zur Ermittlung von T_M wurde von der empirischen Beziehung

$$T_M = 2(N_A + N_T) + 4(N_G + N_C)$$

mit N_X = Anzahl des jeweiligen Nukleotids im *primer* ausgegangen.

Für analytische Standardvervielfältigungen kam PCR Master Mix (PROMEGA, USA) zum Einsatz. 50 µl Ansatz enthielten 25 µl PCR Master Mix, jeweils 1 – 2 µM spezifische *primer* und 0,1 – 100 mM *template*.

Zum Zwecke der Ermittlung unbekannter Abschnitte von als cDNA vorliegender mRNA wurde *AmpliTaq-Gold-Polymerase* (APPLIED BIOSYSTEMS, USA) eingesetzt. *AmpliTaq-Gold-Polymerase* ist zunächst inaktiv und muß durch Wärmeeinwirkung aktiviert werden. Durch einen anfänglichen Aktivierungsschritt (10 min bei 95 °C) wird so ein automatischer *hot start* (D'AQUILA et al., 1991) zur Vermeidung unerwünschter unspezifischer Bindung der *primer* an das *template* (*mispriming*) und *primer*-Dimerisierung ermöglicht. Das vorstehende Schema änderte sich somit wie folgt:

1. Anfängliche Denaturierung/Aktivierung der Polymerase für 10 min

...

50 µl Reaktionsansatz enthielten 1 X *GeneAmp 10X PCR buffer II*, je 1 µM des *sense*- und des *antisense*-primers, 200 µM jedes Mononukleotids, 2 mM MgCl₂ und 1,5 U *AmpliTaq-Gold-Polymerase*. Das *template* wurde in einem Volumen zwischen 5 und 10 µl zugefügt und enthielt so jeweils die halbe bis komplette Ausbeute der nach 2.12 erhaltenen cDNA.

2.14.1 Vervielfältigung unbekannter cDNA-Enden (*Rapid Amplification of cDNA-Ends (RACE)*)

Die unbekanntes 3'- und 5-Enden einer mRNA wurde nach dem Prinzip von FROHMANN et al. (1988) ermittelt. Es handelt sich im Falle von 3'-RACE nicht um die Vervielfältigung des 3'-Endes, sondern des 5'-Endes der cDNA, die aber komplementär zu dem gesuchten 3'-Ende der jeweiligen mRNA ist. Der im Fachjargon übliche Begriff 3'-RACE und sein Analogon 5'-RACE sind somit irreführend, bezieht sich die Benennung der Enden doch auf die mRNA und nicht, wie der Name suggeriert, auf die cDNA, deren Enden tatsächlich vervielfältigt werden.

Zur Ermittlung des 3'-Endes einer mRNA wurde die mithilfe eines Oligo-dT-primers (FERMENTAS) synthetisierte cDNA (2.12) gereinigt (2.4.3, Elutionsvolumen 9 µl) und in einer nachfolgenden PCR als *template* eingesetzt. Zur Erhöhung der Spezifität wurde bei Bedarf im *touchdown*-Modus (DON et al., 1991) verfahren, d. h. T_A wurde von einem anfänglich höheren Wert schrittweise auf $T_M - 5^\circ\text{C}$ erniedrigt. Die Zeit- und Temperaturparameter waren wie folgt:

1. Anfängliche Denaturierung/Aktivierung der Polymerase bei 95 °C für 10 min
2. 34 Zyklen, bestehend aus
 - a) Denaturierung bei 95 °C für 1 min
 - b) *annealing* bei experimentell ermittelten Temperaturen für 1 min;
 $\Delta T/\Delta N = -1^\circ\text{C}$ (bedarfsweise)
 - c) Elongation bei 72 °C für 1 min 30 s
3. Abschließende Elongation bei 72 °C für 7 min

Die Vervielfältigung des 5'-Endes einer mRNA erfolgte analog, als *template* diente statt der mit einem Oligo-dT-*primer* erzeugten cDNA solche, deren Synthese mithilfe eines spezifischen *primers* stattfand (2.12) und deren 3'-Ende mit einem polyC-*tail* versehen wurde (2.13).

2.14.2 Erzeugung von Genklonen voller Länge

Wegen der größeren Länge der Amplicons (- 1 kb) und der damit verbundenen höheren Fehlerwahrscheinlichkeit wurde PfuUltra-Polymerase (STRATAGENE) als Polymerase mit der geringsten Fehlerrate (CLINE et al., 1996) für die Vervielfältigung vollständiger cDNAs und deren Mutagenese verwendet. Das Protokoll gab folgende Parameter vor:

1. Anfängliche Denaturierung und Aktivierung bei 95 °C für 8 min
2. 35 Zyklen, bestehend aus
 - a) Denaturierung bei 96,5 °C für 45 s
 - b) *annealing* (Anheften der *primer*) für 1 min 45 s
 - c) Elongation bei 72 °C für 3min 15 s
3. Terminale Elongation für 12 min

2.14.3 Mutagenese

Da *Acetabularia* einen genetischer Code benutzt, der von dem als Standard betrachteten Code abweicht (vgl. OSAWA et al. (1992)), musste vor einer heterologen Expression in Organismen, die den Standard-Code verwenden (in diesem Fall *X. laevis*), eine Mutagenese hinsichtlich der abweichenden Basen-Triplets stattfinden.

Die hier angewandte Methode der *Megaprimer*-PCR von KAMMANN et al. (1989) besteht im ersten Schritt in der Erzeugung eines sog. *megaprimers* durch eine PCR mit einem die zu vervielfältigende Sequenz flankierenden *primer* (erster flankierender *primer*, hier *paopmutff*) und einem mutagenen *primer* (hier: *paopmuta*). Dieser nun die gewünschte Mutation tragende *megaprimer* wird nach seiner Isolierung in einer zweiten PCR zusammen mit dem zweiten flankierenden *primer* (*paopmutfs*) zur Vervielfältigung der gesamten Sequenz verwendet.

Wegen des geringeren Arbeitsaufwandes kam das von TYAGI et al. (2004) vorgeschlagene Protokoll zum Einsatz, welches durch geschickte Vorgabe der *primer*-Konzentration eine Gelisolation des *megaprimers* überflüssig macht.

2.15 Heterologe Expression in *X. laevis*

2.15.1 In-vitro-Transkription

Um im heterologen System eine Expression eines Gens zu erhalten, wurde es mithilfe des *mMessage mMachin* T7 Ultra Kit (AMBION, USA) in vitro transkribiert. Als *template* für die Transkription diente pSGEM-*aopmut2* (3.4.1.2).

2.15.2 Präparation und transiente Transformation der Oozyten

Die Oozyten wurden nach GRYGORCZYK et al. (1989) präpariert. Pro Oozyte wurde 25 ng *aopmut*-cRNA injiziert. Anschließend wurden die Oozyten 4-6 Tage im Dunkeln bei 18 °C in OR1-Lösung (96 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5 mM MOPS-NaOH, pH 7.5; mit 1 mg/ml Penicillin, 1 mg/ml Streptomycin und 1 mM *all-trans*-Retinal) inkubiert.

2.16 Elektrophysiologie

Für die Durchführung von *Two electrode voltage clamp* wurden die Signalverstärker GeneClamp 500 (AXON INSTRUMENTS Inc., USA) oder Turbo-Tec-03X (NPI ELECTRONIC GmbH, Tamm) eingesetzt. Die Steuerung der Parameter und die Datenaufnahme (*sampling rate* = 50 kHz) und -verarbeitung übernahm das Computerprogramm pCLAMP 9.0 (AXON INSTRUMENTS Inc.). Als Lichtquelle diente eine Xenon-Lichtbogenlampe der Fa. OSRAM GmbH (München; Xenon short arc photo optic lamp, 1 x XBO 75 W/2 OFR). Zur Erzeugung monochromatischen Lichts wurden Interferenzfilter mit einer Bandbreite von 30 nm eingesetzt. Die verwendeten Mikroelektroden wurden mithilfe des *micropipette pullers* P-97 (SUTTER INSTRUMENTS, USA) aus Borosilikatkapillaren mit 1,5 mm Durchmesser hergestellt und mit 3 M KCl-Lösung gefüllt. Die Widerstände der Elektroden lagen zwischen 0,5 und 2 MΩ.

Für die *voltage-clamp*-Messungen lagen die Oozyten in OR1-Lösung. Zur Erniedrigung des pH im Innern der Oozyte (pH_i) von ursprünglich 7,3 auf 6,8 enthielt die Badlösung 40 mM Natriumbutyrat (STEWART et al., 2001). Die Lösung enthielt außerdem 56 mM

statt 96 mM NaCl. Hoher pH (pH_o 10) im Außenmedium wurde mit 5 mM Glycin gepuffert, niedriger pH_o (4;6) mit 5 mM Citrat. Zur Untersuchung des Einflusses der Na^+ -Konzentration enthielt die Badlösung N-Methyl-n-Glucamin-Cl (NMGCl) statt NaCl.

Zur Untersuchung des Einflusses der Cl^- -Konzentration enthielt die Badlösung Natriumacetat statt NaCl.

Zur Messung des elektrischen Stroms über die Oozytenmembran wurde nach Einstechen der Elektroden in die Oozyten eine Haltespannung von -40 mV vorgegeben. Haltespannungen der gewünschten Höhe wurden dann in 20-mV-Schritten angelegt. Es wurde gewöhnlich ein Mittelwert aus drei Experimenten verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis eines Opsin-Transkripts in *Acetabularia acetabulum*

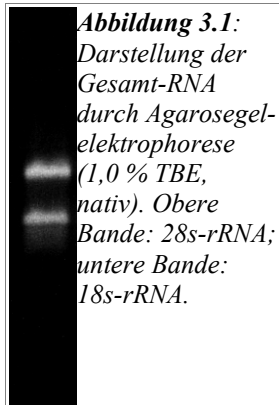


Abbildung 3.1:
Darstellung der
Gesamt-RNA
durch Agarosegel-
elektrophorese
(1,0 % TBE,
nativ). Obere
Bande: 28s-rRNA;
untere Bande:
18s-rRNA.

Abb. 3.1 zeigt die aus *A. acetabulum* isolierte Gesamt-RNA, welche nach Agarosegelelektrophorese das charakteristische Muster aus zwei primären Banden zeigt, welche 28s- und 18s-ribosomale-RNA (rRNA) repräsentieren. Das Fehlen eines diffusen Bereiches zwischen den beiden Hauptbanden und unter der 18s-

rRNA-Bande wurde als Indiz für den intakten Zustand der RNA ohne Kontamination durch RNAsen gewertet. Die RNA wurde für RT-PCR verwendet, um zunächst ein Teilstück der von HENRY et al. (2004) als Teil eines Opsin-Gen-Transkripts publizierten Sequenz zu vervielfältigen.

Das Ergebnis ist in Abb. 3.2 zu sehen. Die nach der bisherigen Sequenzinformation zu erwartende Bande bei ≈ 500 bp ist in Spur 1 zu finden, während die Negativkontrolle (Spur 2), bei der die reverse Transkription ausgelassen wurde, negativ ausfällt. Eine Bande in diesem Bereich hätte Kontamination der RNA-Probe mit genomischer DNA angezeigt. Das Amplifikat wäre in diesem Fall genomischen Ursprungs. So ist das Transkript eines möglichen Opsingens (*Acetabularia*-Opsin, im Weiteren *aop*) in juvenilen Zellen von *A. acetabulum* bestätigt.

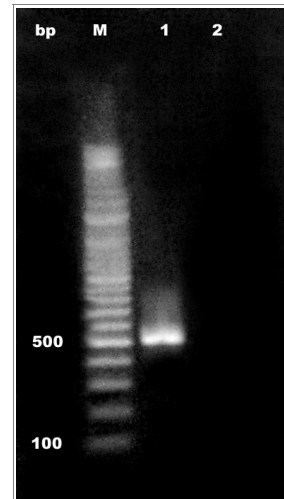


Abbildung 3.2:
Darstellung von RT-
PCR mit PCR-primern
paopdetfw und
paopdetrev und (1) aus
RNA juveniler Zellen
(Abb. 3.1) hergestellter
cDNA als template der
PCR und (2) RNA
juveniler Zellen statt
cDNA. M: Längen-
standard.

3.2 Klonierung von *aop*

3.2.1 RACE

Um die fehlende Sequenzinformation in 3'- und in 5'-Richtung von dem in Abb. 3.2

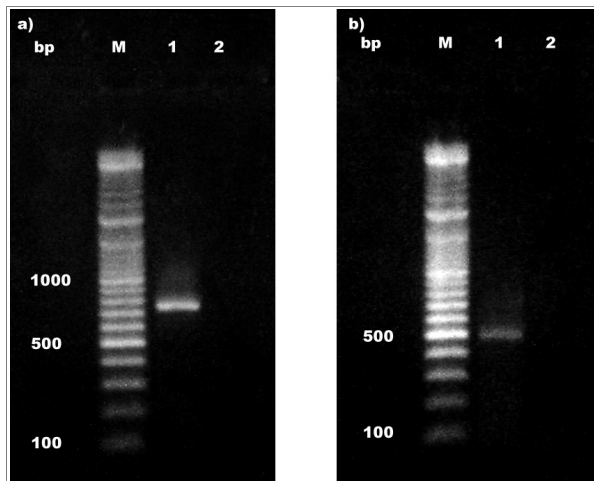


Abbildung 3.3: Darstellung von 3'-RACE und 5'-RACE von *aop*. M: Längenstandard. a) 3'RACE mit PCR-primern paopdetfw und ppolytpr; 1: Experiment mit Gesamt-RNA juveniler Zellen als template der RT-Reaktion; 2: Kontrolle ohne RNA. b) 5'RACE mit PCR-primern paop5rpr und ppolytpr; 1: Experiment mit polyA-RNA juveniler Zellen als template der RT-Reaktion; 2: Kontrolle ohne RNA.

gezeigten Teilstück zugänglich zu machen, wurden 3'- und 5'-RACE eingesetzt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 zu sehen. Die Banden wurden ausgeschnitten, die enthaltene DNA gereinigt und sequenziert. Abb. 3.4 zeigt die Sequenz des gesamten Transkripts. Sie enthält im Vergleich mit der Sequenz von HENRY et al. (2004) ein 300 bp langes 5'-Ende, welches sechs als Initiationssignal für die Translation in Betracht kommende Codons (ATG) enthält. Das 3'-Ende stimmt mit der schon bekannten

Sequenz bis auf einzelne Basen (776: A, Insertion; 840 u. 845: T für A; 1003: A, Insertion) überein, der polyA-tail folgt direkt auf die letzte publizierte Base, ein Detail, das von HENRY et al. nicht erwähnt wird.

EWERS et al.	-12	CCCCCCCC	CNCACTATCT	CACGTTCTGT	ATCCAGTTTT	GTTAGATCGA
	39	TCTCGGTATC	TCTTTTTAAA	ACGTATTGCA	GAAATGTCAA	ACCCTAACCC
	89	TTTCCAAACC	ACCTTGGGAA	CTGATGCTCA	ATGGGTAGTT	TTCGCCGTA
	139	TGGCTTTGGC	TGCCATTGTT	TTTTCCATCG	CTGTTTAATT	CCGTCCCTTT
	189	CCTCTAAGAT	TGACTTACTA	CGTCAACATA	GCCATCTGCA	CTATTGCAGC
	239	GACCGCTTAT	TATGCTATGG	CTGTTAACGG	AGGGGACAAC	AAGCCCACCG
	289	CCGGTACAGG	AGCGGATGAG	CGTCAAGTTA	TATACGCCAG	ATACATTGAT
HENRY et al.		AGG	AGCGGATGAG	CGTCAAGTTA	TATACGCCAG	ATACATTGAT
	339	TGGGTTTTCA	CCACACCCTT	GCTGTTATTA	GACCTTGTAT	TGCTAACATA
		TGGGTTTTCA	CCACACCCTT	GCTGTTATTA	GACCTTGTAT	TGCTAACATA
	389	CATGCCTGCC	ACCATGATCG	CCTGGATCAT	GGGAGCAGAC	ATTGCCATGA
		CATGCCTGCC	ACCATGATCG	CCTGGATCAT	GGGAGCAGAC	ATTGCCATGA
	439	TTGCATTCCG	TATCATCGGC	GCATTCACCG	TGGGAAGCTA	CAAGTGGTTC
		TTGCATTCCG	TATCATCGGC	GCATTCACCG	TGGGAAGCTA	CAAGTGGTTC
	489	TACTTTGTTG	TCGGCTGCAT	CATGCTTGCC	GTGCTAGCCT	GGGGAATGAT
		TACTTTGTTG	TCGGCTGCAT	CATGCTTGCC	GTGCTAGCCT	GGGGAATGAT
	539	CAACCCAATC	TTCAAGGAAG	AACTTCAAAA	GCACAAGGAA	TATACCGGAG
		CAACCCAATC	TTCAAGGAAG	AACTTCAAAA	GCACAAGGAA	TACACCGGAG

```

589 CTTACACCAC CCTTTTGATT TACTTGATCG TCTTGTGGGT TATCTACCCC
    CTTACACCAC CCTTTTGATT TACTTGATCG TCTTGTGGGT TATCTACCCC
639 ATCGTCTGGG GATTGGGTGC TGGCGGTCAC ATCATAGGGG TGGATGTTGA
    ATCGTTTGGG GATTGGGGGC TGGCGGTCAC ATCATAGGGG TGGATGTTGA
689 GATCATCGCG ATGGGAGTCT TGGACTTGTT GGCTAAGCCT CTATATGCCA
    GATCATCGCG ATGGGAATCT TGGACTTGTT GGCTAAGCCT CTATATGCCA
739 TCGGTGTGTT GATTACTGTG GAGGTTGTTT ACGGAAAAGT TGGGTAAGGA
    TCGGTGTGTT GATTACTGTG GAGGTTGTTT ACGGAAA GT TGGGTAAGGA
789 GGAAGCTTAG CCTTTGACTG CTTGAAAATT TTGAAGTGGT GGAAATTGTT
    GGAAGCTTAG CCTTTGACTG CTTGAAAATT TTGAAGTGGT GGAAATTGTT
839 GTGGTTTATAG TTAGTGTCTA TTCATTTTAG TCTTGTGTG TGTCGAGTTA
    GAGGTTATAG TTAGTGTCTA TTCATTTTAG TCTTGTGTG TGTCGAGTTA
889 CATCATACTT TTTATTAAAT TGAGTGTGGG TGGCTGCAAG ATATTTACTT
    CATCATACTT TTTATTAAAT TGAGTGTGGG TGGCTGCAAG ATATTTACTT
939 GCATTATTGT ATGTTGCTTA AATAAATTTT TGATTATTAT TTGACTATGT
    GCATTATTGT ATGTTGCTTA AATAAATTTT TGATTATTAT TTGACTATGT
989 AAAATGATAT TGCAAGCATC CTTTAAAAAA AAAAAAAA
    AAAATGATAT TGCA GCATC CTTT

```

Abbildung 3.4: Komplette, von Überschneidungen bereinigte Nukleinsäuresequenz der in Abb. 3.3 gezeigten PCR-Produkte im Vergleich mit der Ausgangssequenz von HENRY et al. Bis auf eine Base (871, hellgrau, endgültig doch ein Thymidin) stimmt die Sequenz mit der des vollständig vervielfältigten und klonierten Transkripts (s. Abb.3.6) überein.

Nummerierte Zeilen: Mithilfe der auch für die in Abb. 3.3 gezeigten PCR verwendeten primer ermittelte DNA-Sequenz. Im Vergleich mit der von HENRY et al. publizierten Sequenz neue Information ist in schwarz gehalten, alte Information in grau. Die von den äußeren primern herrührenden und damit nicht zur Sequenz gehörige bzw. nicht direkt ermittelte Sequenzabschnitte des Transkripts sind *konturiert*, die Basen an Position der inneren primer sind *hellgrau* unterlegt. Mögliche Translations-Startcodons am 5'-Ende sind *unterbrochen unterstrichen*.

Unnummerierte Zeilen: Von HENRY et al. (2004) publizierte Sequenz (NCBI accession number CF259014)

3.2.2 Klonierung des vollständigen Transkripts

Zum einen zur Verifizierung der Sequenz, zum anderen, um das Transkript in manipulierbare, in Bezug auf ihre Vervielfältigung von der PCR unabhängige Form zu bringen, sollte es nun in seiner ganzen Länge vervielfältigt und in einen Vektor kloniert werden. Dazu wurden auf Grundlage der in Abb. 3.4 gezeigten Sequenz neue *primer* zur Vervielfältigung des gesamten Transkripts entworfen. Sie enthalten Erkennungsstellen für PstI und XbaI zum Zwecke der Klonierung. (Abb. 3.5 a) zeigt das Amplifikat mit der erwarteten Länge von ≈ 1000 bp.

Die Bande wurde ausgeschnitten, extrahiert und gereinigt, mit PstI und XbaI verdaut und in den ebenfalls mit PstI und XbaI verdauten Vektor pUC19 (s. 2.2.1) ligiert. Nach erfolgter Ligation wurde XL1-blue mit dem Reaktionsansatz transformiert und im *blue-*

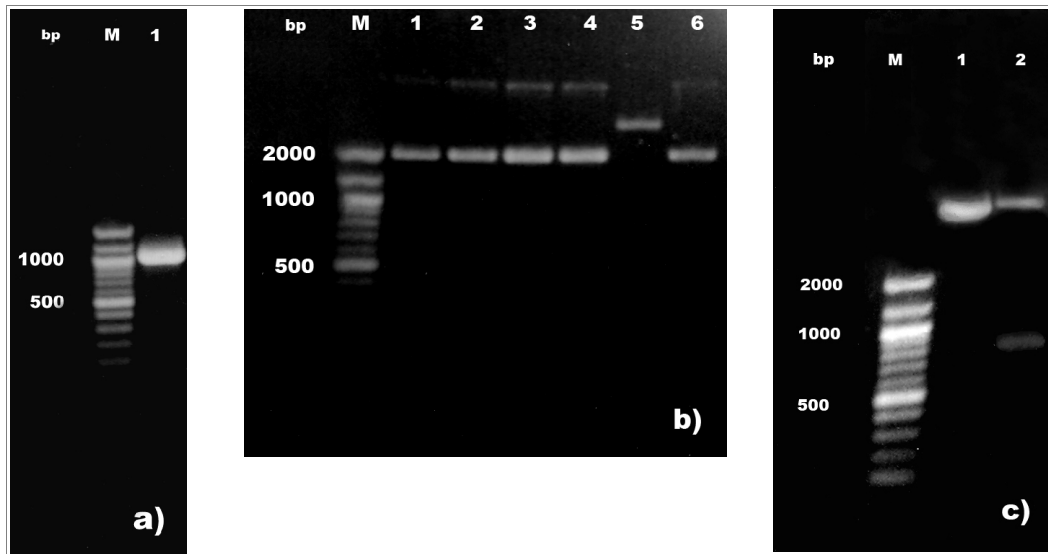


Abbildung 3.5: Generierung der kompletten cDNA von *aop* und deren Klonierung. *M*: Längenstandard. **a)** Darstellung des kompletten Transkripts von *aop*, amplifiziert mit den primern *paopfufw* und *paopfurev* (1). **b)** Darstellung der gepickten Klone nach der Transformation des Fragments aus a). 1-6: Klone *pUC19-aop-1-6*. **c)** Restriktionsspaltung von *pUC19* (1) und Klon *pUC19-aop-5* (2) mit *HindIII*.

white-screening sechs positive Klone isoliert. Aus den ÜNK wurde Plasmid-DNA isoliert und auf Agarosegelen analysiert (Abb. 3.5 b). Dabei stellten sich fünf Klone als falsch positiv heraus, nur ein Plasmide (*pUC19-aop-5*) hatte wie erwartet eine größere Länge als der leere *pUC19*-Vektor. Eine Verdau von *pUC19-aop-5* mit *HindIII*, das einmal in der MCS von *pUC19* und einmal innerhalb von *aop* schneidet, erbrachte die erwarteten Fragmentlängen von ≈ 800 bp und des leeren Vektors (Abb. 3.5 c).

3.3 Sequenzanalyse von *aop*

3.3.1 Sequenz des vollständigen Transkripts

Mithilfe von *primern*, die an vektoreigene Sequenzen binden (*M13 forward* (-21), *M13 rev*), wurde das Insert von (*pUC19-aop-5*) sequenziert. Die Sequenz ist in Abb. 3.6 zu sehen.

```

1  CACTATCTCA CGTTCTGTAT CCAGTTTTGT TAGATCGATC TCGGTATCTC
51  TTTTTTAAAC GTATTGCAGA AATGTCAAAC CCTAACCCCTT TCCAAACCAC
    M S N P N P F Q T T
101 CTTGGGAACT GATGCTCAAT GGGTAGTTTT CGCCGTAATG GCTTTGGCTG
    L G T D A Q W V V F A V M A L A A
  
```

```

151 CCATTGTTTT TTCCATCGCT GTTTAATTCC GTCCCCTTCC TCTAAGATTG
    I V F S I A V Q F R P L P L R L
201 ACTTACTACG TCAACATAGC CATCTGCACT ATTGCAGCGA CCGCTTATTA
    T Y Y V N I A I C T I A A T A Y Y
251 TGCTATGGCT GTTAACGGAG GGGACAACAA GCCCACC GCC GGTACAGGAG
    A M A V N G G D N K P T A G T G A
301 CGGATGAGCG TCAAGTTATA TACGCCAGAT ACATTGATTG GGTTTTCCAC
    D E R Q V I Y A R Y I D W V F T
351 ACACCCTTGC TGTTATTAGA CCTTGTATTG CTAAC TAACA TGCCTGCCAC
    T P L L L L D L V L L T N M P A T
401 CATGATCGCC TGGATCATGG GAGCAGACAT TGCCATGATT GCATTCCGTA
    M I A W I M G A D I A M I A F G I
451 TCATCGGCGC ATTCACCGTG GGAAGCTACA AGTGGTCTA CTTTGTGTGTC
    I G A F T V G S Y K W F Y F V V
501 GGCTGCATCA TGCTTGCCGT GCTAGCCTGG GGAATGATCA ACCCAATCTT
    G C I M L A V L A W G M I N P I F
551 CAAGGAAGAA CTTCAAAAAGC ACAAGGAATA TACCGGAGCT TACACCACCC
    K E E L Q K H K E Y T G A Y T T L
601 TTTTGATTTA CTTGATCGTC TTGTGGGTTA TCTACCCCAT CGTCTGGGGA
    L I Y L I V L W V I Y P I V W G
651 TTGGGTGCTG GCGGTCACAT CATAGGGGTG GATGTTGAGA TCATCGCGAT
    L G A G G H I I G V D V E I I A M
701 GGGAGTCTTG GACTTGTGG CTAAGCCTCT ATATGCCATC GGTGTGTTGA
    G V L D L L A K P L Y A I G V L I
751 TTA CTGTGGA GGTGTTTAC GGAAAAGTTG GGTAAGGAGG AAGCTTAGCC
    T V E V V Y G K V G Q G G S L A
801 TTTGACTGCT TGAAAATTTT GAAGTGGTGG AAATGTTGT GGTTTTAGTT
    F D C L K I L K W W K L L W F Q L
851 AGTGTCTATT CATTTTAGTC TTTGTGTGTG TCGAGTTACA TCATACTTTT
    V S I H F S L C V C R V T S Y F L
901 TATTAAATTG AGTGTGGGTG GCTGCAAGAT ATTTACTTGC ATTATTGTAT
    L N *
951 GTTGCTTAAA TAAATTTTTG ATTATTATTT GACTATGTAA AATGATATTG
1001 CAAGCATCCT TTAAAAAAA AAAAAA

```

Abbildung 3.6: Endgültige cDNA-Sequenz von *aop* nach der Sequenz von Klon pUC19-*aop-5* mit nach dem für *Acetabularia* gültigen genetischen Code (OSAWA et al., 1992) abgeleiteter Aminosäuresequenz für den ersten ORF.

DNA: Als Translations-Startcodon (unterbrochen unterstrichen) wurde das erste der in Tabelle 2 untersuchten angenommen. Die angenommene Polyadenylierungs-Signalsequenz ist invertiert dargestellt. Vom genetischen Standard-Code abweichende Codons (TAA, TAG → Gln) sind rot unterlegt (s. 3.4.1).

Aminosäuren: Aminosäuren werden im Ein-Buchstabencode dargestellt. Hypothetische Transmembransegmente (TMS, 3.3.2.2, 3.3.2.3) sind einfach unterstrichen. Mit den PROSITE-consensus-patterns der Typ-1-Rhodopsine (s. Abb. 3.11) übereinstimmende Sequenzen sind farblich gekennzeichnet.

Translationsinitiation

Von sechs in Nähe des 5'-Endes liegenden möglichen Initiationssignalen für die Translation der mRNA (AUG, s. Abb.) kommen nur drei in näheren Betracht, da nur sie am Beginn eines offenen Leserasters (*open reading frame*; ORF) stehen, während die von den Übrigen geöffneten Leseraster von Terminationssignalen (UGA) auf eine für ein funktionelles Protein zu kurze Länge begrenzt werden (maximale Länge: 61 Aminosäuren).

Die danach möglichen Startcodons sind in Tabelle 2 in Bezug auf ihre Umgebung im Vergleich mit Literaturdaten über den Kontext des Translations-Initiationssignals in mRNAs dargestellt. KOZAK (1986) ermittelte zuerst eine modulierende Wirkung der dem Startcodon vorgelagerten Basen auf die Translation der betroffenen mRNA. Aufgrund weiterer funktioneller und statistischer Untersuchungen über die Verteilung der Basen in der Umgebung funktioneller Startcodons (KOZAK, 1987) wurde eine *Consensus*-Sequenz für den Kontext gefunden, welche Abweichungen zwischen den einzelnen Phyla aufweist und deren Wirkung auf das Translationsniveau und damit auf die Expressionsstärke bis jetzt nicht geklärt ist. Als Hilfsmittel zur Identifikation funktioneller Startcodons scheinen solche *Consensus*-Sequenzen insbesondere vor dem Hintergrund verbesserter Datenlage für Pflanzen (JOSHI et al., 1997) jedoch geeignet. Speziell für *Acetabularia* gibt es noch keine Untersuchungen hinsichtlich des Kontextes des Translations-Initiationssignalen.

Tabelle 2: Relative Häufigkeiten der Basen und Consensus-Sequenz in Umgebung des Translationsinitiationssignals AUG in mRNAs verschiedener Phyla (JOSHI et al., 1997). Darunter die tatsächliche Umgebung der drei für *Acetabularia*-Opsin in Betracht kommenden Translationsstartcodons. Darin sind mit einem Literatur-Consensus übereinstimmenden Basen **fett** gedruckt, solche mit zwei Übereinstimmungen doppelt unterstrichen. Basen ohne Übereinstimmung sind in Kleinbuchstaben dargestellt, wenn keiner der Literaturwerte eine relative Häufigkeit von 15 % übersteigt.

Relative Position	-6	-5	-4	-3	-2	-1	AUG	+4	+5	+6
Pflanzen										
A%	33	28	44	55	42	42		15	21	19
C%	16	30	22	8	34	27		6	54	14
G%	25	17	18	26	9	20		68	15	35
U%	25	25	15	10	15	11		12	10	33
Consensus	a	c	a	A	A/C	a		G	C	g
Niedere Pflanzen										
A%	23	15	44	73	48	40		14	12	15
C%	16	39	35	8	31	34		20	57	29
G%	41	22	12	18	14	20		55	18	29
U%	20	23	9	2	7	6		10	12	27
Consensus	g	c	A/C	A	A/C	a		G	C	c/g
aop										
1. Startcodon	g	c	<u>A</u>	G	<u>A</u>	a		t	C	A
4. Startcodon	g	c	C	G	t	<u>a</u>		G	C	T
6. Startcodon	T	A	t	G	C	t		G	C	T

Der Kontext des ersten und vierten Startcodons zeigt einen sehr ähnlichen Grad der Übereinstimmung mit der *Consensus*-Sequenz für niedere Pflanzen, während das sechste Startcodon in einen stark abweichenden Kontext eingebettet ist und damit als untypisch für Pflanzen und niedere Pflanzen im Besonderen anzusprechen ist. Bei Betrachtung der Lage der erwarteten TMHs in der abgeleiteten Aminosäuren-Sequenz von AOP (Abb. 3.10) erscheint die Funktion des vierten Startcodons als Translations-Initiationssignal ebenfalls unwahrscheinlich, da das entsprechende Methionin inmitten eines solchen TMS läge. Deshalb wurde das erste AUG als Translations-Initiationssignal angenommen.

Weitere cis-Elemente

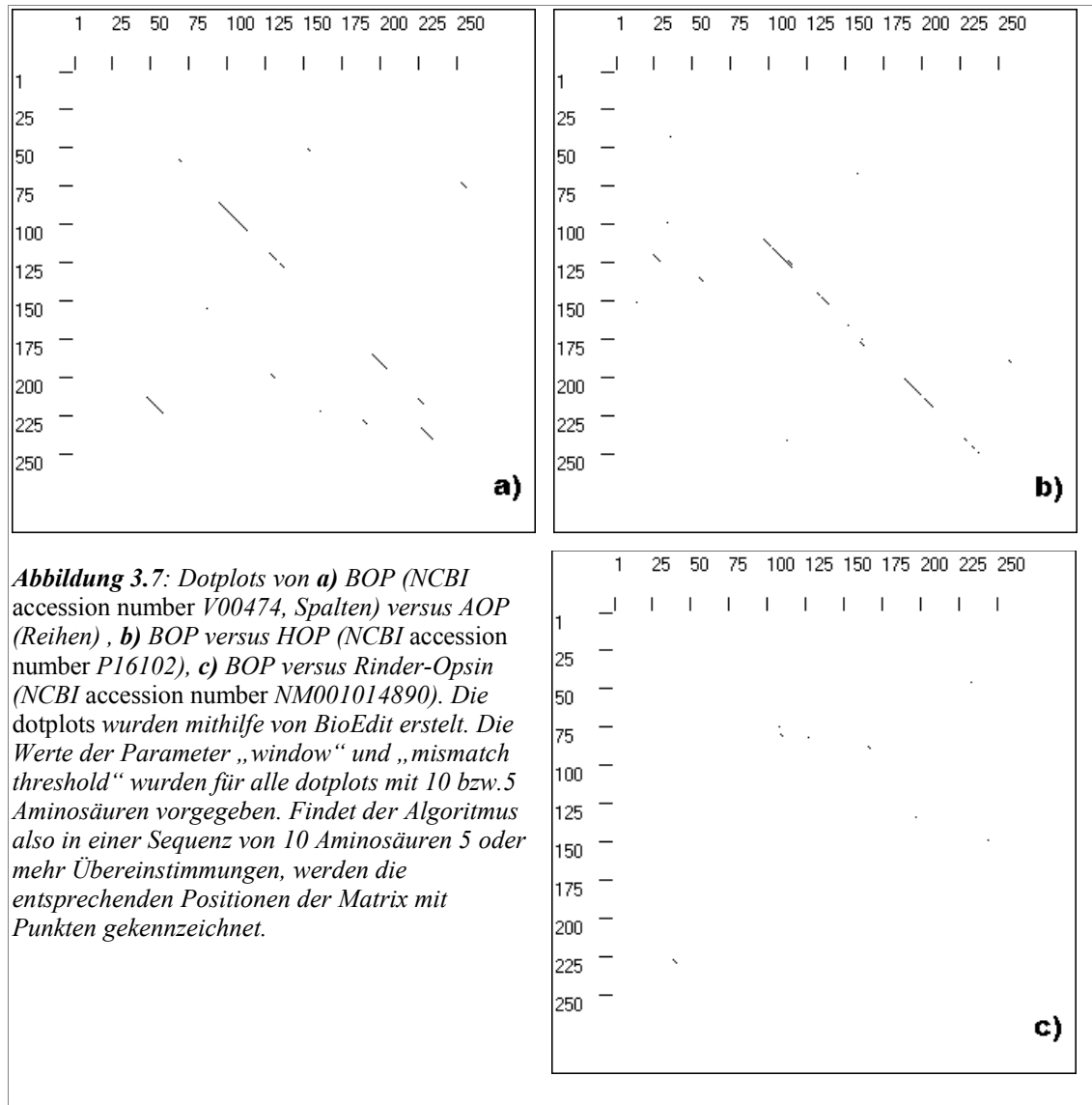
Als regulatives Element der mRNA-Prozessierung findet sich in der 3'-untranslatierten Region (3'-*untranslated* region, 3'-UTR) nach dem Translations-Terminationssignal (UGA) die für Eukaryoten beschriebene *Consensus*-Sequenz AAUAAA (PROUDFOOT & BROWNLEE, 1976), welche, für Pflanzen als *near upstream element* (NUE) bezeichnet, ein Bestandteil des Polyadenylierungssignals ist. Das NUE positioniert die Abspaltung des äußersten 3'-Endes der prä-mRNA und damit auch die Polyadenylierung, die daraufhin an der Spaltungsstelle katalysiert wird, welche deshalb auch *polyA-site* genannt wird (Übersichtsartikel: ZHAO et al. (1999), für Pflanzen:ROTHNIE (1996)). Auch in Genen von *A. acetabulum* sind solche NUEs bekannt (SERIKAWA & MANDOLI, 1999).

3.3.2 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von AOP

3.3.2.1 Dotplots

Ein erster Eindruck von der Ähnlichkeit von Sequenzen läßt sich mithilfe von *dotplots* (GIBBS & MCINTYRE, 1970) gewinnen. Ein *dotplot* entsteht, wenn die Elemente einer Sequenz in die Reihen und die Elemente einer zu vergleichenden Sequenz in die Spalten einer Matrix eingetragen werden. Nach Kennzeichnung der Übereinstimmungen durch Punkte werden für ähnliche Sequenzen diagonal verlaufende Linien sichtbar, unähnliche Sequenzen erzeugen lediglich durch zufällig verteilte Ähnlichkeit verursachte Streuung.

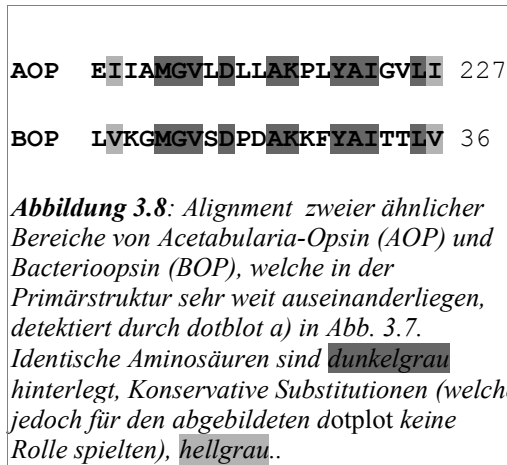
Abb. 3.7 a) zeigt BOP als Prototypen eines Typ-1-Opsins im Vergleich mit AOP. Wie für Opsine als vergleichsweise diverse Proteinfamilie (vgl. NAGEL et al., 2005) zu erwarten, zeigen sich nur wenige kurze Regionen mit Übereinstimmungen, welche miteinander verbunden jedoch in etwa die Diagonale der Matrix bilden, was die Ähnlichkeit von sich jeweils in ihrer Position in der Primärstruktur entsprechenden Regionen (Motiven) nahelegt. Der zum Vergleich für zwei typische Mitglieder dieser Familie herangezogene *dotplot* Bacterioopsin versus Haloopsin zeigt ein sehr ähnliches Bild, während der *dotplot* Bacterioopsin versus Rinder-Opsin das Fehlen von Übereinstimmungen illustriert. Das war ebenfalls zu erwarten, denn bei Rinder-Opsin handelt es sich um ein Opsin vom Typ 2, deren Homologie mit den Typ-1-Opsinen, wenn auch möglicherweise vorhanden, so doch bis heute unkenntlich ist



(HENDERSON & SCHERTLER, 1990) oder nur über den Weg einer Brücke über Opsine (COP1 aus *Chlamydomonas reinhardtii*) dargestellt werden kann (DEININGER et al., 2000). Ein *dotplot* Bacterioopsin versus Zufallssequenz zeigt ein vergleichbares Muster; es wird hier nicht gezeigt, um Redundanz zu vermeiden.

Neben den in den Bereich der Diagonale fallenden Übereinstimmungen sind in Abb 3.7 a) weitere in der Peripherie der Matrix gelegene Übereinstimmungen zu erkennen. Diese Beobachtung ist auch für homologe Proteine zunächst überraschend, denn sie bedeutet, daß Bereiche Ähnlichkeiten aufweisen, die sich nicht im gleichen Kontext befinden, für den Fall im linken unteren Bereich von des *dotblots* liegen sie 200 Aminosäuren voneinander entfernt (Abb. 3.8).

Als Grund könnte gemutmaßt werden, daß beide Bereiche ähnliche strukturelle Umgebungen haben. Sie kommen ihren intramolekularen Gegenstücken im nativen



Protein räumlich recht nahe und haben beide Kontakt mit dem Cofaktor Retinal (s. Abb. 3.9). In einem solchen Fall wäre in evolutionärer Hinsicht von einer Analogie auszugehen, die Ähnlichkeit wäre also nicht auf Verwandtschaft zurückzuführen, sondern auf Anpassung an ähnliche Funktion und Umgebung. Genetische Umordnungen durch mobile genetische Elemente (MGE, s.

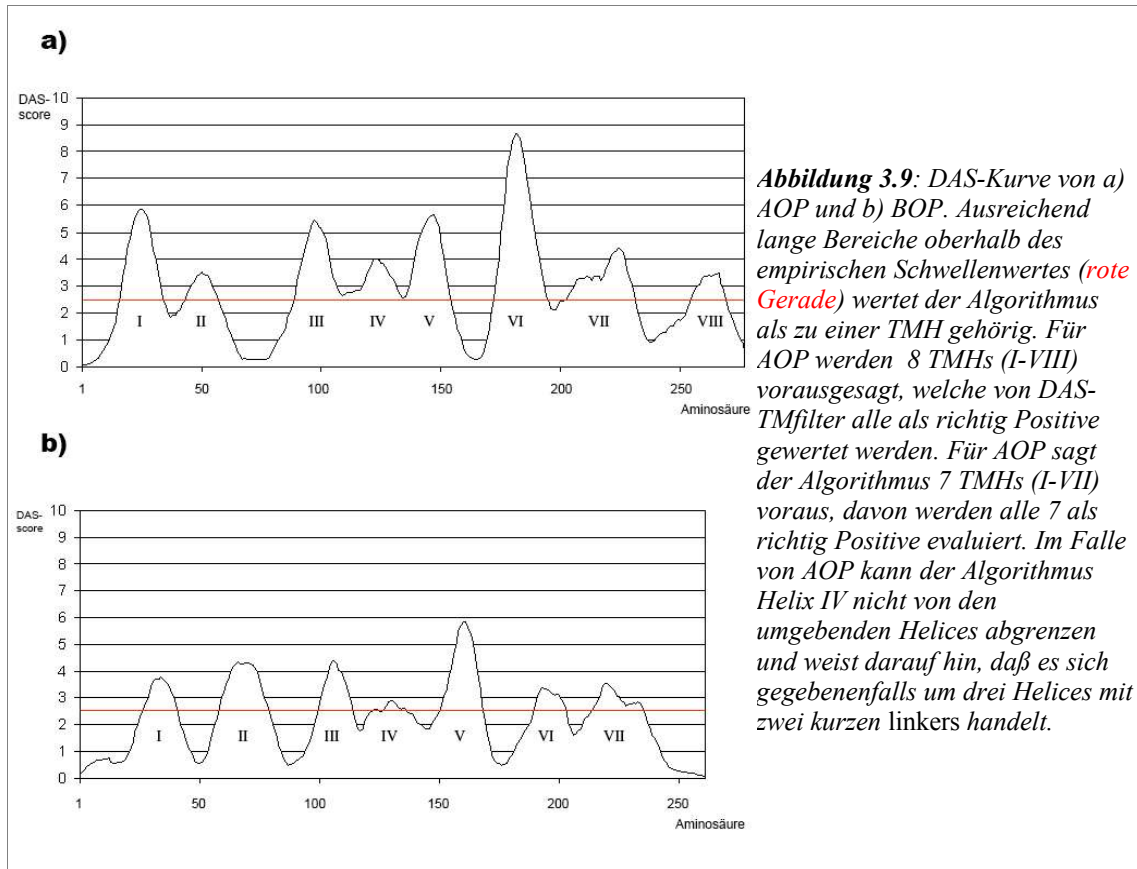
KAZAZIAN, 2004) können ebenfalls für ähnliche Bereiche außerhalb des sequenziellen Kontextes sorgen (vgl. BENNETZEN, 2000). In diesem Fall könnte von einer evolutionären Homologie gesprochen werden.

3.3.2.2 Voraussage der Topologie

Handelt es sich bei AOP um ein Opsin vom Typ 1, sollte es in nativer Umgebung sieben TMHs ausbilden. Abb. 3.9 zeigt das Ergebnis der Voraussage durch das *DAS-TMfilter prediction tool*. Der *DAS*-Algorithmus ist nicht geeignet, die Grenzen einer TMH vorauszusagen, reliabel sind lediglich Position des Zentrums einer TMH und die Zugehörigkeit der umgebenden Aminosäuren. Deshalb werden die positiv vorausgesagten Bereiche auch als *TM-core* bezeichnet.

BOP bildet wie erwartet (s. GRIGORIEFF et al., 1996) laut Voraussage sieben TMHs aus, während für AOP acht TMHs vorausgesagt werden. Wird die *leader*-Sequenz (DUNN et al., 1981) von BOP außer Betracht genommen, stimmen die ersten 7 vorausgesagten Helices in ihrer Lage mit denen von BOP überein, nur Helix II ist bei AOP gegenüber BOP leicht in Richtung des N-Terminus verschoben. Die im Falle von AOP unsichere Helix IV erscheint im Vergleich mit der Kurve von BOP ebenfalls als gesichert, ähneln sich die Kurvenverläufe gerade in dieser Region doch sehr. Helix VI zeigt bei AOP einen besonders hohen Gipfel, während der Gipfel für BOP nur auf Niveau der Übrigen ist. Die für AOP vorausgesagte Helix VIII hat von allen vorausgesagten Helices das schlechteste Evaluationsergebnis, also die höchste Wahrscheinlichkeit, eine falsch Positive zu sein.

Bis auf die letzte Helix zeigt AOP eine BOP ähnliche Topologie. AOP ist laut



Voraussage nach dem *DAS*-Algorithmus ein TMP, das außer der für Opsine erwarteten 7 TMHs noch eine weitere C-terminale TMH aufweist.

3.3.2.3 Multiple Sequence Alignment

Für den ersten Blick auf die Ähnlichkeit von *Acetabularia*-Opsin mit anderen Opsinen sind *dotplots* sehr nützlich, und die Erkenntnis, daß AOP und BOP eine ähnliche Topologie aufweisen, unterstützen die Einordnung von AOP als Typ-1-Opsin. Noch tiefere Einsicht können *multiple sequence alignments* gewähren (Übersicht: WALLACE et al., 2005). Abb. 3.10 zeigt ein solches *alignment* von AOP mit weiteren Mitgliedern der Opsine vom Typ 1. Es enthält zwei Protonenpumpen, mit BOP als Prototyp dieser Proteinfamilie eine aus dem Reich der Prokaryoten, und mit LOP eine aus dem der Eukaroten. HOP ist eine Chloridpumpe. Zwei sog. sensorische Opsine, die an der Phototaxis von Archaeen beteiligt sind, sind in Gestalt von SOPI und SOPII enthalten. CHOP1 spielt als Licht-aktivierter Protonenkanal ebenfalls eine sensorische Rolle bei der Phototaxis eines Eukaryoten.

```

LOP -----MIVDQFEVLMKTS*LFPLPTA+QSAQPTHVA~PV+FTVL 38
NOP1 -----MIHPEQVADMLRP+TSTTSSHVP+GPV+FTVV 30
CHOP1 MSRRPWLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVAT+QDGPDYVVFHRAHERMLFQTSY+TLEN 60
SOPII ----- 1
SOPI ----- 1
BOP -----MLELLE+TAV+ -5
HOP -----MTAVS+TATTVLQATQS+~ 17
AOP1 -----M 1

LOP PDPPIYETVGDSS+SKT+~LWVVFVLM+LIAS+~AA+~TALSW~KI~EVN+~R~RLY 83
NOP1 PTPTEYQILGET+CHR+~LWVTFALM+VLSSE+~T~ALLSWNV+~ETS+~K~RLF 75
CHOP1 NGSVICIPNNGQCFC+LA~WLKSNGTNAEK+LAA+NILQWIT+FALSALCLM+~S+~FY 109
SOPII -----MV+GLT+~LFWLGAIG+MLV+~S+~TLAPAW~A~GR~DAGS+GE+~RY+ 37
SOPI -----MDAVA~A~YLGG+AVAI+~VC+~VAFVWLLY+RS+LD+~GSE+HQSALA 39
BOP EGVSAQ+AIT+~S~RPEW+IW+LALGTA+MGL+~TLY+SLV+KGM+GVSD+FD~A~K~KE+Y 43
HOP DVLQEI+SNFLLNSS+~IWN+IAGLV+VI+~LL+V~AMGR+~L+ES+P+AKLI 62
AOP1 SNPNFF+OTT+~LS+~DAQ+WV+FV+MAL+~AA+~LV+STAV+QFR+~PL+~L+TY 46

LOP HVI+TIITL+TALS+FAMAT+GH+VALNK+I+VRT+QHDH+V+PD+TY+ET+VY+RQ+VY+YA+~XI+WAI 143
NOP1 HVI+TLITV+VASLS+FAMAT+GH+ATT+FNCD+TAW+DH+HK+HVP+DT+SH+QV+CR+QV+FW+G+V+WAL 135
CHOP1 GYQ+WKS+ICG+WE+EI+VA+~IEM+IK+FI+EY+FHE+FDE+PA+VI+SS+NG+NKT+V+WL+AE+WLL 166
SOPII ~VTLV+GIS+GI+AVA+V+MAL+~VGW+VPA+~ERT+FE+AP+Y+IF+WLL 79
SOPI PLAI+IPV+~FAG+LS+VGM+AY+DI+G~TVIV+NG+NI+VGL+Y+I+WLV 80
BOP ~AI+TLV+PATA+FT+MS+MLL+YGL+~TMV+PF+GE+ON+PLY+WA+AW+LF 89
HOP WVA+MLV+PLV+SIS+AGL+AS+LT+VGF+LQMP+~PGH+ALAG+Q+EVL+SP+GR+Y+LT+FT+S 115
AOP1 ~VNI+AIC+IA+~TA+YAMA+VNG+~DNK+P+TAG+TG+AD+ER+Q+LY+A+W+LV+F 93

LOP TPL+LL+~LGLLAG+MSGA+HIFMA+VAD+LI+MLV+LT+GLFA+FG+SEG+~TPQ+KW+GW+Y+~TIA+ 196
NOP1 TPL+LL+~LCLLAG+VGA+HTLMA+VAD+VMV+L+CG+FAAL+G+EGG+NTAQ+KW+GW+Y+~TIG+ 189
CHOP1 CFVIL+IHL+SN+TGLAN+DY+NK+RT+MGL+LS+DIG+T+VW+GTAA+LS+~K+~YV+~R+~VI+FLM+GL 221
SOPII TPL+IVY+F~LGLLAG+L+SREF+GIV+TLNT+VV+MLAG+FAG+AMVP+~G+~IERY+AL+~GMG+ 130
SOPI TPI+VGY+~VGYA+AGAS+RRS+TIG+VM+VADAL+MTAV+~AG+AVV+TDG+~TL+~K+WAL+~GVS+ 131
BOP TPL+LL+~LALL+VDA+OQT+LAL+VGAD+GM+GTG+VGAL+~TKV+YSY+~RFV+W+~AIS+ 141
HOP TFM+ILLA+~LGLL+ADT+IAS+LFTA+MDIG+CVT+GLAA+LIT+~S+SH+LRW+V+EY+~GIS+ 168
AOP1 TPL+LL+~LVLL+TN+MPAT+M+AWIM+GAD+IA+MA+FE+LI+GE+~TV+~SY+~KWE+Y+~VVG+ 144

LOP CINY+FVV+WH+LV+NGGAN+RVK+EK+LR+SFF+VAI+GAY+TLIL+~WTAY+PIV+WGLA+~D+ARK+IG 254
NOP1 CFSY+L+FVI+WH+VAL+HG+SRT+VTAK+GRG+VSR+LE+FTG+IAV+FALL+~WTAY+PI+ING+IAG+~SARR+TN 247
CHOP1 C~YGY+TFF+NAAK+VY+IEAY+H+TV+PKG+ICR+DL+VRY+LAW+LY+FCS+AMER+VLF+NL+GP+IFGH+IN 280
SOPII AV+EL+GLV+Y+LV+GP+MTES+AS+QRSS+G+IKS+LY+WR+IR+NL+T+WIL+~WAI+Y+FI+WIL+GP+PV+ALL+T 189
SOPI SIFH+LS+L+FAY+LV+IF+PR+~V+PDV+PE+QIG+LF+NL+KN+HIG+LL+~WLA+Y+PL+W+LF+GP+A+IG+EAT 189
BOP TAN+M+YIL+Y+LV+FFG+F+TSKA+ES+MRP+VAST+E+KV+IR+NV+TV+VL+~WSAY+Y+VW+LI+GS+GA+GIV+P 200
HOP CAFF+VAV+LV+Y+LV+QV+PADA+E+AAG+~TSE+IF+GT+L+KIL+TV+VL+~WLG+PI+L+WAL+GS+LV+ALL+S 225
AOP1 CIM+LAV+LAW+GM+IN+PI+E+KEEL+Q+HK+EY+TGAY+TT+L+IY+L+IY+L+~WY+PIV+WGLA+~GH+IT+G 202

LOP VDG+IIA+AV+LVLA+GV+GAW+LLV+TH+NLR+SDV+ELNG+FWAN+LNREG+AIR+IGEDD+GA 313
NOP1 VDT+IL+IY+TV+LLA+PV+GEW+LLLS+HRAMP+TNIDL+PGY+W+SH+LLTEGR+IRIGED+--- 304
CHOP1 QFNSA+IAHA+IL+LAS+NAWS+MMGH+FLRV+KI+HE+HILLY+GD+IR+KK+QK+VNV+Q+QEME+V+TMVH 340
SOPII PTY+VAL+IVY+LV+T+V+GF+GFIAL+DAA+TLRA+EHGES+LAGV+DTA+PAVAD+----- 239
SOPI AAG+VAL+T+V+FLA+VPY+VY+FFY+ARRR+VFMH+SES+PPAPE+QAT+VEATA+AD----- 239
BOP LNI+TLL+FM+VS+AV+GF+GLIL+LR+SR+IFG+AEAPE+PSAGD+GAAT+SD----- 249
HOP VGT+SWG+YSG+ILAY+VAF+LLLR+WV+ANEG+TV+SG+SGM+GIG+SGAAP+ADD----- 276
AOP1 VDVE+IIAM+GV+LLA+PLY+AIG+V+LIT+V~E+VVY+GK+V+QGG+SLAF+DC+LK+IL+KW+WKL+W 257

LOP
NOP1
CHOP1 EEDDETQKVPT 351
SOPII
SOPI
BOP
HOP
AOP1 FQLVSIHESLQVCRVTSYFLLN 279

```

Abbildung 3.10: Multiple alignment von AOP mit einer Auswahl weiterer Opsine vom Typ I. NOP1: Neurospora-Op sin 1 (NCBI accession number AF135863), CHOP1 Chlamydomonas-Channelopsin 1 (NCBI accession number: AF385748); SOPII: Natronomonas Sensory Op sin II (NCBI accession number: P42196); SOPI: Halobacterium Sensory Op sin I (NCBI accession number: P25964). Zu beachten ist, daß die Zählung der Aminosäuren von BOP nach der Leader-Sequence beginnt. Das alignment wurde mithilfe des Computerprogramms ClustalW erstellt und anschließend manuell editiert. Als Substitutionsmatrix wurde BLOSUM62 (HENIKOFF & HENIKOFF, 1992) verwendet. Gaps sind als - (vom Algorithmus errechnet) oder ~ (von Hand hinzugefügt) dargestellt. Der Farbcode ist im Wesentlichen von NAGEL et al., 2001 übernommen. Identische Aminosäuren sind dunkelblau hinterlegt, Konservative Substitutionen helblau. Als solche wurde dabei ein Wert von mindestens 1 Bit nach der verwendeten Matrix gewertet. Für alle Opsine identische Aminosäuren sind grün hinterlegt. An der Protonen-Translokation durch BR beteiligte Aminosäuren (LANYI, 2001) sind rot eingefärbt. Aminosäuren, die in BR erwiesenermaßen mit dem Cofaktor Retinal interagieren, sind mit einem * gekennzeichnet, die Retinal-Bindungsstelle selbst mit +. TMHs in BR (GRIGORIEFF et al., 1996) und entsprechende Bereiche in AOP sind durch fette Unterstrichungen gekennzeichnet. Diese Bereiche stimmen mit den durch von Sequenz-Homologie unabhängigen Struktur voraussagen (3.3.2.2) in ihrer Position überein. Gehen die in 3.3.2.2 ermittelten TM-cores in ihrer Ausdehnung über die anhand von Sequenz-Homologie bestimmten TMH hinaus, sind sie unterbrochen unterstrichen.

Die Primärstruktur von AOP hat fast auf ihrer gesamten Länge, außer den unmittelbaren N- und C-Termini, Ähnlichkeit zu den anderen Opsinen. Die Aminosäuresequenzen zeigen global, wie die Opsine des Typs 1 generell, einen niedrigen Grad der Konservierung (BOP vs. AOP: 21% Identität; 38% Ähnlichkeit). Lokal hingegen finden sich stark konservierte Bereiche (s. a. Abb. 3.11). AOP besitzt Entsprechungen von beiden für Typ-1-Opsine gefundenen *consensus patterns* in der PROSITE-Datenbank (BUCHER & BAIROCH, 1994).

PS00950	R-Y-x-[DT]-W-x-[LIVMF]-[ST]-[TV]-P-[LIVM]-[LIVMNQ]-[LIVM]
AOP	R Y I D W V F T T P L L L
	89
PS00327	[FYIV]-{ND}-[FYVG]-[LIVM]-D-[LIVMF]-x-[STA]-K-x-{K}-[FY]
AOP	M G V L D L L A K P L Y
	218

Abbildung 3.11: Consensus patterns PS00950 und PS00327 aus der PROSITE-Datenbank mit entsprechenden Sequenzen von AOP. Der hier verwendete Farbcode für den Grad der Konservierung ist bei Visualisierungen von PROSITE consensus patterns durch die PDBsum-Datenbank üblich. Je roter, desto stärker konserviert ist die jeweilige Aminosäure.

Die Abb.en 3.10 und 3.11 zeigen, dass Lys²¹⁸ die Retinal-Bindungsstelle in AR ist.

Die Aminosäure Asp⁸⁵ (BR) sorgt in archeellen Rhodopsinen für die Ionenselektivität und ist ausschließlich in Protonen translozierenden Rhodopsinen konserviert (CHOP1 und CHOP2 tragen an dieser Position Glu). Wird sie in BR durch *site directed mutagenesis* zu Thr (wie in HR) mutiert, fungiert BR als Chloridpumpe (SASAKI et al, 1995). In AOP ist die entsprechende Aminosäure Asp⁸⁹. AR sollte demnach ein Protonen translozierendes Rhodopsin sein.

Asp⁹⁶ fungiert in BR als Protonen-Donor bei der Reprotonierung der Schiff'schen Base zwischen Lys²¹⁶ und Retinal während des Überganges $M_{410}^{CP} \leftrightarrow N_{560}$ des *photocycles*. Sie ist den bisher identifizierten Protonenpumpen gemeinsam (Asp¹⁵⁰ in LR) und fehlt in anderen Opsinen. Die Konservierung dieser Aminosäure in AOP (Asp¹⁰⁰) läßt die Vermutung zu, es handele sich bei AR ebenfalls um eine Protonenpumpe.

3.3.3 Phylogenie

Nachdem Typ-1-Rhodopsine in unserer Erkenntnis lange Zeit auf das Reich der Archaeen beschränkt waren, wurde das Spektrum der bekannten Rhodopsine vom Typ1 in jüngerer Zeit beträchtlich erweitert (BIEZKE et al. (1999), BEJA et al. (2000), SINESHCHEKOV et al. (2002), NAGEL et al. (2002)). Abb. 3.12 zeigt einen phylogenetischen Baum der Typ-1-Opsine, ermittelt in Übereinstimmung mehrerer Methoden (s. Abbildungstext).

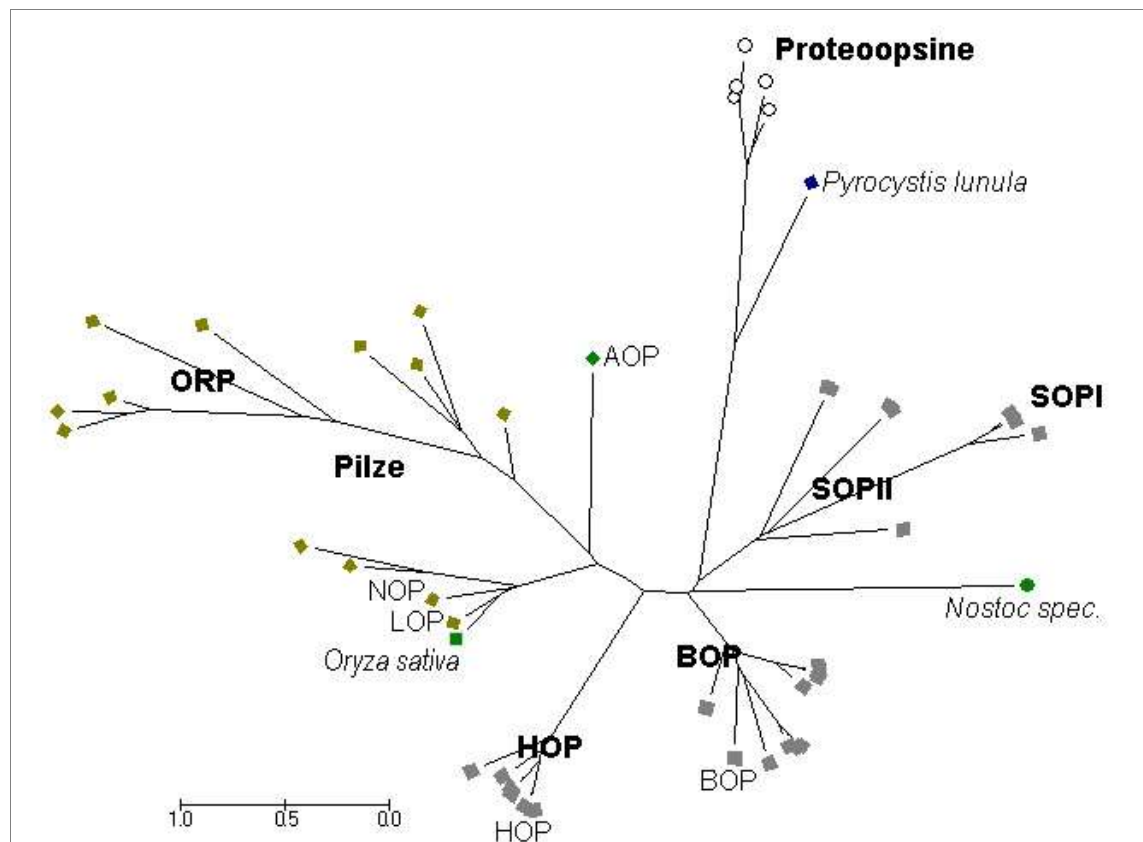


Abbildung 3.12: Phylogenetischer Baum der Typ-1-Opsine nach übereinstimmenden Analysen mithilfe der Methoden des Neighbor Joining (NJ, SAITOU & NEI (1987)) und der Minimal Evolution (ME).. Opsine archebakterieller (□), eubakterieller (○) und eukaryotischer (◇) Herkunft sind gekennzeichnet. Pflanzen sind grün, Pilze gelb und andere Eukaryoten blau gekennzeichnet. Funktionelle/Strukturelle Gruppen sind **fettgedruckt**: Das als Grundlage dienende multiple sequence alignment wurde mit ClustalW erstellt (Daten nicht gezeigt). Als Substitutionsmatrix diente BLOSUM62.

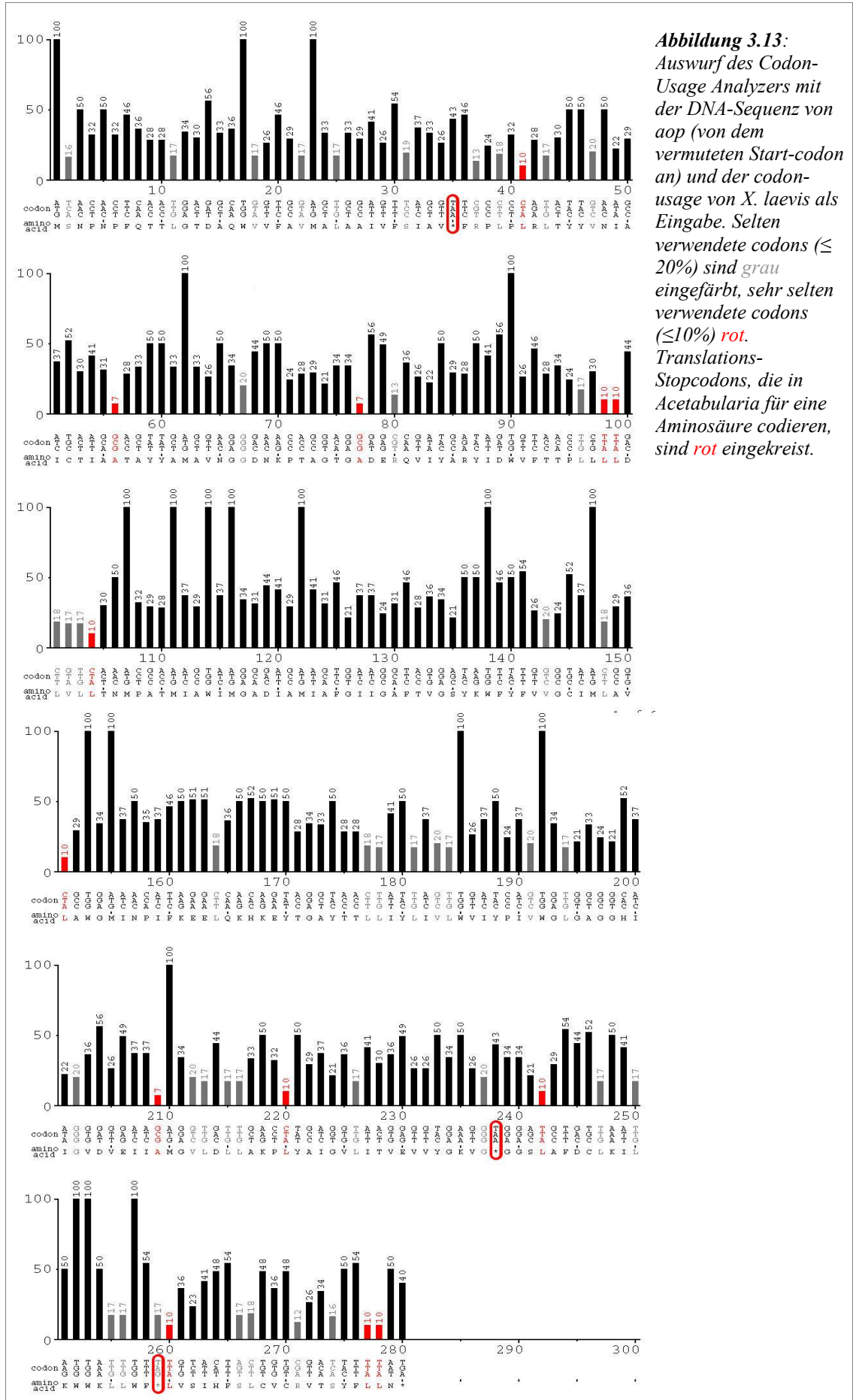
Der Stammbaum rekonstruiert den von RUIZ-GONZALEZ & MARIN (2004) ermittelten Stammbaum der Typ-1-Opsine recht gut. AOP steht zwischen den Opsinen der Pilze und den ebenfalls in Pilzen gefundenen *opsin related proteins* (ORP, BROWN, 2004).

3.4 Heterologe Expression von AOP in Oozyten von *X. laevis*

3.4.1 Anpassung des genetischen Codes

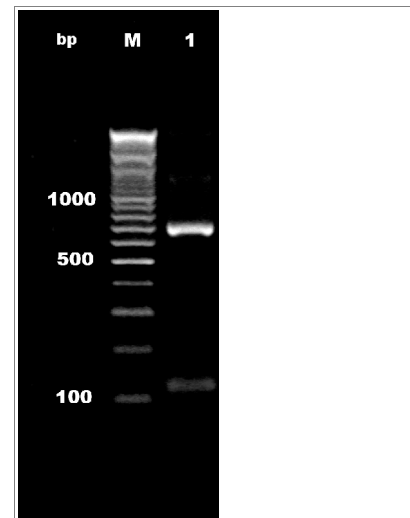
Um Acetabularia-Opsin auf eine mögliche Funktion als lichtgetriebene Protonenpumpe zu untersuchen, sollte es in Oozyten von *X. laevis* exprimiert und *voltage-clamp*-Experimenten unterzogen werden. Mit dem originären Gen von *Acetabularia* ergeben sich aufgrund des abweichenden genetischen Codes von *Acetabularia* (SCHNEIDER et al., 1989) Probleme. Würde es heterolog in einem Organismus (*X. laevis*) exprimiert, der den genetischen Standard-Code verwendet, würde die entsprechende mRNA nur bis zum ersten Translations-Stopcodon des Standard-Codes translatiert. Resultat wäre ein nur 34 Aminosäuren langes Polypeptid. Ein weiteres Problem, das Unterschiede in der *codon-usage* mit sich bringen, ist eine mögliche Unterbrechung der Translation durch mangelnde Verfügbarkeit der vom Zielorganismus selten verwendeter *transfer*-RNAs (tRNAs, GUSTAFSSON et al., 2004). In Abb. 3.13 ist die DNA-Sequenz von *aop* mit der Übersetzung nach dem genetischen Code von *X. laevis* und gegen dessen *codon-usage* aufgetragen.

Das erste Translations-Stopcodon nach Standard-Code liegt zwischen Helix I und II (s. Abb. 3.10). Ein bis zu dieser Stelle verkürztes Opsin wäre sicher funktionslos. Um *aop* funktional in Oozyten von *X. laevis* zu exprimieren, mußte also mindestens das erste Translations-Stopcodon ersetzt werden.



3.4.1.1 Mutagenese

Für die Mutagenese von *aop* zum Zwecke der heterologen Expression über das erste Stopcodon hinaus reicht die einfache Methode der *Megaprimer*-PCR (s. 2.14.3) aus. Erster und zweiter flankierender *primer* enthielten Erkennungsstellen für zur Klonierung in den Expressionsvektor passende Restriktionsenzyme (BamHI und XhoI). Der mutagene *primer* enthielt eine Korrektur von TAA (im genetischen Standard-Code „Stop“) nach CAG (im genetischen Standard-Code „Gln“). Die *megaprimer*-PCR resultierte in einem zu erwartenden Amplifikat von ≈ 700 bp. Auf dem Agarosegel (Abb. 3.14) ist außerdem der *megaprimer* mit etwa 120 bp zu sehen.



3.4.1.2 Klonierung in den Expressionsvektor pSGEM

Die in Abb. 3.14 bei ≈ 700 bp gelegene Bande wurde ausgeschnitten, extrahiert und gereinigt, mit BamHI und XhoI geschnitten und in den ebenfalls mit BamHI und XhoI geschnittenen Vektor pSGEM (s. 2.2.1) ligiert. Fünf im *blue-white-screening* positive Klone wurden isoliert. Wie in Abb. 3.15 zu sehen, enthielten von diesen vier Klone nur zwei ein Plasmid, und nur einer eines mit größerer Länge als der leere Vektor. Eine Sequenzierung ergab die Richtigkeit dieses Klons (pSGEMaopmut2).

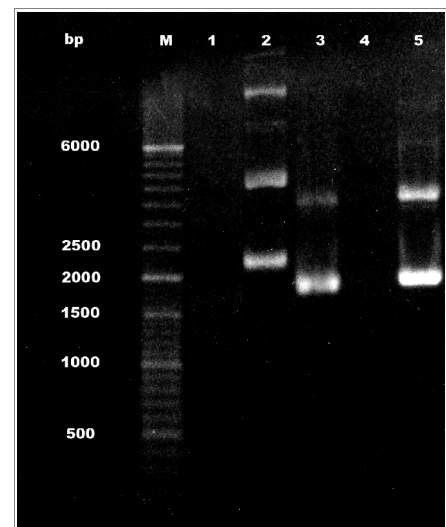


Abbildung 3.15: Darstellung der Klonierung von pSGEM-aopmut. M: Längenstandard; 1-4: pSGEMaopmut1-4; 5: pSGEM.

3.4.2 Elektrische Eigenschaften von in *Xenopus*-Oozyten exprimiertem AR

Abb. 3.16 zeigt die mit der *voltage-clamp*-Methode ermittelten grundlegenden elektrischen Phänomene nach heterologer Expression von *aop* in Oozyten von *X. laevis*. Auf die Beleuchtung mit Grünlicht hin wird über die Plasmamembran von Oozyten, denen pSGEM-*aop*mut injiziert wurde, ein elektrischer Auswärtsstrom gemessen, der nach Ausschalten des Lichts wieder abfällt. Bei Oozyten, denen nur H₂O injiziert wurde, ist keine Stromantwort zu erkennen. Rotlicht löst diese Antwort bei AR-exprimierenden Oozyten nicht aus. Die Expression von AR war erfolgreich und AR vermittelt einen Grünlicht-induzierten Ladungstransport.

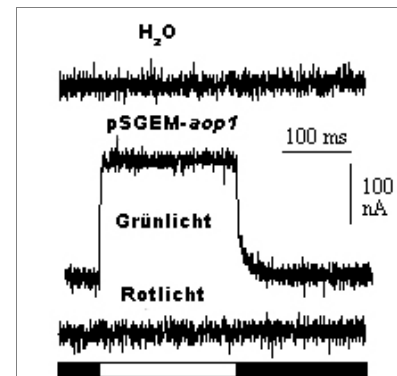


Abbildung 3.16: Lichtinduzierter Strom durch AR. Obere Spur: Negativkontrolle ohne heterologe Expression; Mittlere Spur: Expression von *aop*, Grünlichtpuls; Untere Spur: Rotlichtpuls. Die Dauer der Pulse zeigt der untere Balken an

3.4.2.1 Einfluss von Membranspannung und pH auf die lichtinduzierten Ströme durch AR

Der stationäre lichtinduzierte Strom ist sichtlich spannungsabhängig mit einer sigmoiden $I(V)$ -Kurve (Abb. 3.17), die im Sättigungsbereich bei hohen Spannungen stark positive Ströme, bei negativen Spannungen schwach positive Ströme wiedergibt. Sowohl pH_i als auch pH_o haben einen deutlichen Effekt auf den Strom, was auf Protonen als Träger der transportierten Ladung deutet. Das positive Vorzeichen der Ströme bei

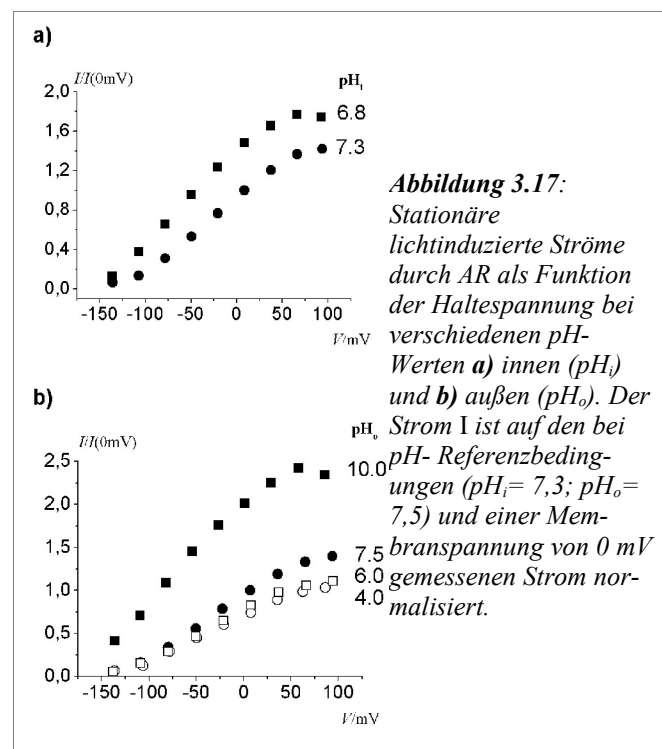


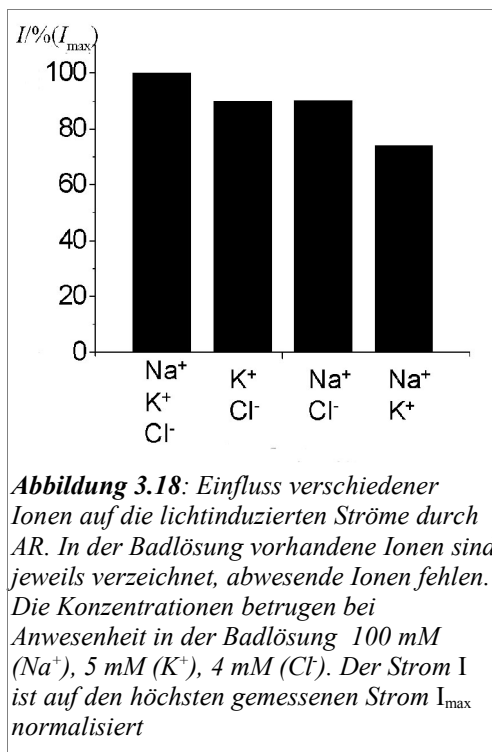
Abbildung 3.17: Stationäre lichtinduzierte Ströme durch AR als Funktion der Haltespannung bei verschiedenen pH-Werten **a)** innen (pH_i) und **b)** außen (pH_o). Der Strom I ist auf den bei pH -Referenzbedingungen ($pH_i = 7,3$; $pH_o = 7,5$) und einer Membranspannung von 0 mV gemessenen Strom normalisiert.

negativen Spannungen, die viel kleiner sind als das Nernst'sche Gleichgewichtspotential für Protonen

$$E_{H^+} = \frac{RT}{F} \cdot 2,303 \cdot (pH_i - pH_o)$$

mit $R = 8,32 \cdot 10^3 \text{ mV C mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $F = 9,65 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}$,

lässt vermuten, dass sie nicht passiv sind wie bei einem Ionenkanal, sondern den aktiven Ladungstransport einer Protonenpumpe widerspiegeln.



3.4.2.2 Einfluss anderer Ionen

Um den Effekt von Na⁺, K⁺ und Cl⁻ auf die lichtinduzierte Stromantwort zu überprüfen, wurde der Strom bei Fehlen jeweils eines dieser Ionen in der Badlösung gemessen. Abb. 3.18 zeigt für keines der Ionen einen deutlichen Effekt. Keines der vorgenannten Ionen ist demnach Träger des lichtinduzierten Stroms durch AR.

3.4.2.3 Kinetik der Stromantwort

In Abb. 3.19 ist eine typische Meßreihe zur Ermittlung der Spannungsabhängigkeit und der Dynamik der lichtinduzierten Ströme durch AR zu sehen. Auf Licht an erscheint ein Gipfel mit schneller Kinetik, worauf der Strom langsam auf das Niveau des stationären Stroms abfällt. Auf Licht aus fällt der Strom schnell ab, wovon ein darauf folgender Abfall auf 0 A mit langsamerer Kinetik zu unterscheiden ist.

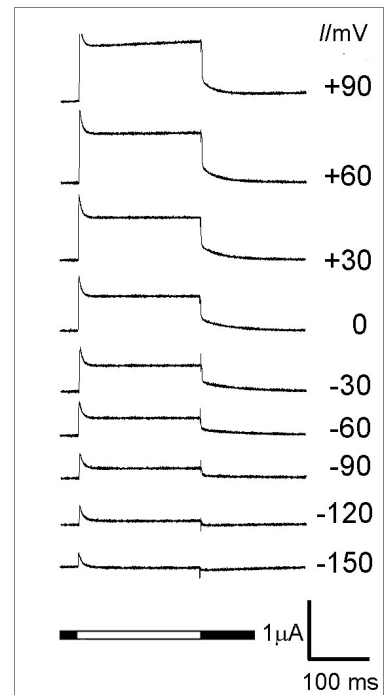


Abbildung 3.19: Verlauf des lichtinduzierten Stroms bei verschiedenen Haltespannungen während eines Lichtpulses (Balken unten).

3.4.3 Aktionsspektrum

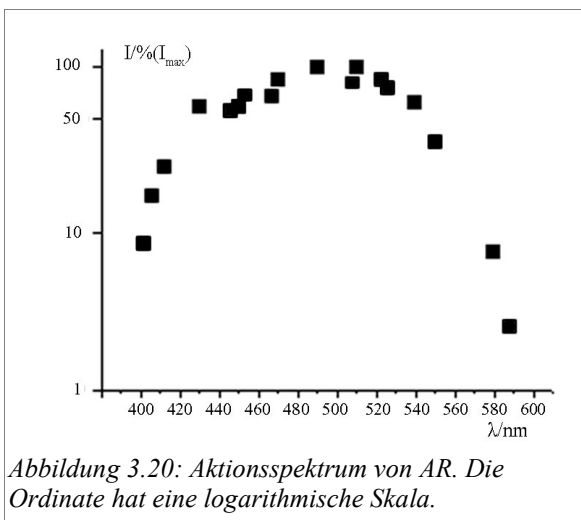


Abbildung 3.20: Aktionsspektrum von AR. Die Ordinate hat eine logarithmische Skala.

Abb. 3.20 zeigt ein Maximum von etwa 520 nm im Aktionsspektrum von AR. Das Aktionsspektrum gleicht in seiner Form den für visuelle Rhodopsine ermittelten Spektren (DARTNALL, 1972) und stimmt mit dem SCHILDE (1968) ermittelten und von GRADMANN (1978) reproduzierten Spektrum des schnellen photoelektrischen Effekts überein.

3.4.4 Lichttitration

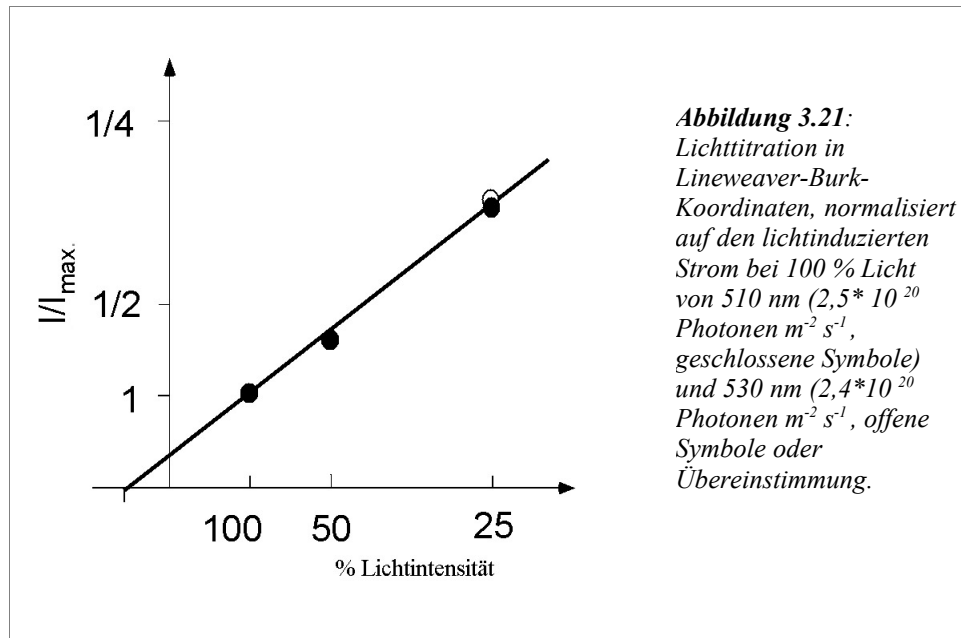


Abb. 3.21 zeigt die Lichttitration der lichtinduzierten Ströme durch AR. Das Ergebnis ist eine hohe halbmaximale Lichtintensität $J_{1/2} = 5 \cdot 10^{20} \text{ Photonen } m^{-2} s^{-1}$.

4 Diskussion

4.1 Klassifizierung von AOP anhand von Sequenzvergleichen

Aus der mRNA juveniler Zellen von *Acetabularia acetabulum* ein Transkript isoliert, das für ein Protein mit allen Kennzeichen eines Typ-1-Rhodopsins kodiert.

Es besitzt die in der Signatur der PROSITE-Datenbank für Rhodopsine des Typs 1 geforderten *consensus patterns* R-Y-x-[DT]-W-x-[LIVMF]-[ST]-[TV]-P-[LIVM]-[LIVMNQ]-[LIVM] und [FYIV]-{ND}-[FYVG]-[LIVM]-D-[LIVMF]-x-[STA]-K-x-{K}-[FY]. Lys²¹⁸ ist demnach die Retinal-Bindungsstelle. Die Aminosäuren Asp⁸⁹ und Asp¹⁰⁰ entsprechen den für Protonen pumpende Rhodopsine typischen Aminosäuren in Helix III von BR und LR.

4.1.1 Phylogenie

Der in Abb. 3.12 gezeigte Stammbaum weist AOP eine überraschende Stellung zwischen zwei Gruppen der Opsine der Pilze zu. Der *Acetabularia* phylogenetisch näher stehende Organismus *Pyrocystis* (ein Dinoflagellat) ist im Stammbaum entfernt, während ein hypothetisches Opsin, das *Oryza sativa* zugeordnet wird, näher zu *Oryza* entfernteren Verwandten steht als zu *Acetabularia*. RUIZ-GONZALEZ & MARIN (2004) bieten für dieses Phänomen mehrere alternative Erklärungen an, von denen einige horizontalen Gentransfer beinhalten. Um bessere Aussagen über die Evolution der Rhodopsine machen zu können, müssen weitere Gene aus anderen Organismen dem Vergleich hinzukommen

4.1.2 Ermittlung der Sequenz von *aop*

Vorherige Versuche, das Gen des in *Acetabularia* postulierten Rhodopsins zu isolieren, setzten einen Teil von *chop1* als Sonde zur Durchsuchung von cDNA-Bibliotheken ein (EWERS, 2002). Betrachtet man die geringe tatsächliche Übereinstimmung von *chop1* und *aop* (10% Identität, 21% Ähnlichkeit, errechnet aus dem *multiple sequence alignment* in Abb. 3.10), wird klar, dass dieser Ansatz schlechte Aussichten hatte. Nach

den Ergebnissen von HENRY et al. (2004) steht außerdem in Zweifel, ob das gesuchte Gen in den 2002 untersuchten Phagenbanken enthalten sein konnte, da es sich um ein ausschließlich in juvenilen Zellen exprimiertes Gen handeln soll.

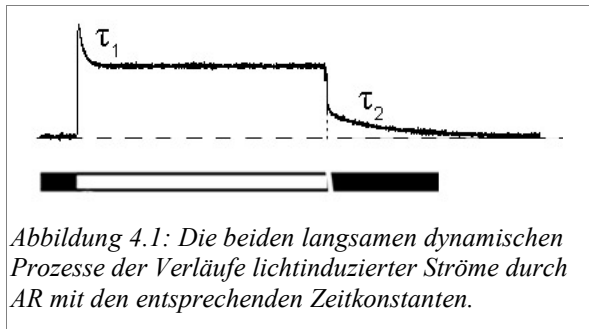
4.2 Voraussage der Topologie

Für AR wurde auf Basis der Aminosäuresequenz eine Topologie von acht TMHs vorausgesagt, von denen sieben in ihrer Position mit den für BR vorausgesagten und durch Strukturuntersuchungen belegt sind. Die für AR vorausgesagte achte TMH wäre eine strukturelle Besonderheit gegenüber den übrigen Rhodopsinen. Einige Typ-1-Rhodopsine aus *Chlamydomonas reinhardtii* besitzen außer der konservierten Architektur der sieben TMHs noch weitere Domänen in Nähe des C-Terminus (s. KATERIYA et al., 2004), die auch TMHs enthalten und teilweise Homologie zu archebakteriellen *transducern* (Htrs, FERRANDO-MAY et al., 1993) zeigen. Eine Datenbanksuche mit blastp (ALTSCHUL et al., 1990) nach solchen Homologien für AOP brachte jedoch keine Treffer (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.3 Elektrophysiologie

Die durchgeführten *voltage-clamp*-Untersuchungen charakterisieren AR als lichtgetriebene Protonenpumpe wie BR oder LR. Im Gegensatz zu BR (GEIBEL et al., 2001) besteht keine lineare Abhängigkeit zwischen Membranspannung und lichtinduziertem Auswärtsstrom, sondern der Strom sättigt deutlich sichtbar im positiven Spannungsbereich (ca. + 60 mV) und etwas weniger deutlich im negativen Bereich (ca. -130 mV). Da ein Wechsel des Vorzeichens des Stroms nicht beobachtet werden konnte und auf Grund der sigmoiden $I(V)$ -Kurve auch nicht extrapoliert werden konnte, herrscht keine Sicherheit über die Natur der transportierten Ladung. Die deutliche pH-Abhängigkeit der Stromantwort und die fehlende Abhängigkeit von der Anwesenheit von Na^+ , K^+ und Cl^- lassen jedoch auf einen Protonenstrom schließen. Der genannte Sättigungseffekt wird bei hohen und niedrigen Lichtdosen gleichermaßen beobachtet (Daten nicht gezeigt.)

Die Dynamik der lichtinduzierten Stromantwort (Abb. 4.1) ist der von BR (GEIBEL et al., 2001) ähnlich. Der transiente Gipfel auf Einschalten des Lichts hin wurde von



GEIBEL et al. auf eine Anreicherung von M_{410}^{EC} zurückgeführt.

Geht man in Analogie zu GEIBEL et al. (2001) davon aus, daß die zweite, langsame Komponente des Stromabfalls auf Ausschalten des

Lichts (Zeitkonstante τ_2) auf den Übergang $M_{410}^{CP} \Leftrightarrow N_{560}$ als geschwindigkeitbestimmenden Schritt zurückzuführen ist, welchen nahezu alle Rhodopsinmoleküle in der Membran noch durchmachen, ist die Anzahl der während dieses Schrittes transportierten Protonen gleich der Anzahl der angeregten Rhodopsinmoleküle in der Membran. Die transportierte Ladung Q des zweiten langsamen Abfalls ist das Integral des zeitabhängigen Stroms

$$\int_0^{\infty} I_0 \exp(-t/\tau_2) dt \quad \text{mit } I_0: \text{Strom zu Beginn des Abfalls.}$$

Explizit vereinfacht sich der Ausdruck zu $I_0 \tau_2$. Mit den aus Abb. 3.19 abgetragenen Zahlenwerten, der Elementarladung $e = 1,60 \cdot 10^{-19} C$ und einer angenommenen Oberfläche der Oozyte $A \approx 2 \cdot 10^7 \mu m^2$ ergibt sich eine Expressionsdichte von $2000/\mu m^2$, eine um ca. eine Größenordnung höhere Dichte als die von NAGEL et al. (1995) als Mindestwert angegebene Dichte von $130/\mu m^2$.

4.4 Vergleich der lichtinduzierten Ströme durch AR mit dem schnellen photoelektrischen Effekt von *Acetabularia*

Die zentrale Frage, zu deren Lösung diese Arbeit beitragen sollte, ist die nach der Natur des Photorezeptors, der in *Acetabularia* am Anfang des von SCHILDE (1968) erstmals beschriebenen schnellen photoelektrischen Effekt steht. Die lichtinduzierten Ströme durch AR haben ein Aktionsspektrum, das das von SCHILDE ermittelte Aktionsspektrum des schnellen photoelektrischen Effekts sehr gut wiedergibt. Eine weitere Übereinstimmung liegt in der Dynamik der Ströme. Wie die Depolarisation des schnellen photoelektrischen Effekts (GRADMANN, 1984) setzt der lichtinduzierte

Strom innerhalb von μs ein. Die von GRADMANN gemessene Verzögerung liegt bei unter $10 \mu\text{s}$. Im Falle von AR reicht die zeitliche Auflösung der bisher durchgeführten Messungen für eine exakte Bestimmung der Verzögerung nicht aus, sie liegt aber in jedem Fall im Bereich von einigen μs . Auch die Lichttitration zeigt Ähnlichkeit zwischen beiden Phänomenen. Beide Effekte haben eine hohe halbmaximale Lichtintensität.

AR wäre demnach ein guter Kandidat, der Träger des schnellen photoelektrischen Effekts zu sein. Während dieser jedoch in einer transienten Depolarisation der Zelle besteht, wurde in dieser Arbeit ein Auswärtsstrom durch AR demonstriert, der statt einer Depolarisation vielmehr eine Hyperpolarisation bewirkt. Dieser Widerspruch muss noch aufgeklärt werden.

4.5 Ausblick

AR sollte weiter charakterisiert werden. Hier wurde gezeigt, dass die Dynamik der lichtinduzierten Ströme durch AR ähnlich der von BR ist. Spektroskopische Analysen könnten helfen, den *photocycle* von AR aufzuklären, der den beobachteten Phänomenen zugrundeliegt. Um die Funktion von AR als Photorezeptor des schnellen photoelektrischen Effekts in *Acetabularia* zu verifizieren, sind weitere Experimente nötig. So wäre es wichtig zu erfahren, wo das Gen in welcher Entwicklungsphase exprimiert wird. Beiden Ansätzen müsste eine Überexpression in *E. coli* vorausgehen.

Es wäre weiterhin interessant, AR in *Acetabularia* auf seine Beteiligung am schnellen photoelektrischen Effekt zu untersuchen. Hierzu wäre es hilfreich, *Acetabularia* transformieren zu können, um die Expression des Proteins auszuschalten oder zu unterdrücken. Der Anteil von AR am schnellen photoelektrischen Effekt könnte so direkt überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Hier wurde die molekulargenetische und elektrophysiologische Charakterisierung von *Acetabularia*-Rhodopsin (AR) beschrieben, einer membranintegralen, lichtgetriebenen Protonenpumpe aus der Familie der Typ-1-Rhodopsine.

Mithilfe der reversen Transkription und der Polymerasekettenreaktion wurde auf der Grundlage einer kürzlich veröffentlichten, unvollständigen Sequenz, das gesamte Transkript eines Opsins in Form komplementärer Desoxyribonukleinsäure isoliert, kloniert und sequenziert. Das aus der abgeleitete Aminosäuresequenz resultierende hypothetische Protein hat eine mit den Rhodopsinen des Typs 1 übereinstimmende Primär- und Sekundärstruktur. Die Aminosäuresequenz von AR zeigt 21% Identität und 38% Ähnlichkeit mit Bacteriorhodopsin. Es scheint außer den für Rhodopsine typischen sieben transmembranen Helices noch ein weiteres Transmembransegment in Nähe des C-Terminus zu besitzen. Aufgrund charakteristischer konservierter Aminosäuren im aktiven Zentrum des Proteins wird in AR eine lichtgetriebene Protonenpumpe vermutet.

Um AR elektrophysiologisch zu charakterisieren, wurde es in Oozyten von *Xenopus laevis* funktionell exprimiert. *Voltage-clamp*-Untersuchungen bestätigten den lichtgetriebenen Transport von Protonen durch AR gegen ihren elektrochemischen Gradienten. Der stationäre positive Strom ist spannungsabhängig mit einer sigmoiden $I(V)$ -Kurve.

AR ist das erste in einem autotrophen Eukaryoten nachgewiesene Rhodopsin, das als aktiver Ionentransporter fungiert. Der lichtinduzierte Strom durch AR zeigt Ähnlichkeiten mit dem schnellen photoelektrischen Effekt in *Acetabularia*. So folgt die Antwort $< 50 \mu\text{s}$ auf „Licht an“, hat eine halbmaximale Lichtintensität von $> 10^{20}$ Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, und das Maximum des Aktionsspektrums liegt bei 520 nm (550 nm in vivo).

Literaturverzeichnis

ALTSCHUL S. F., GISH W., MILLER W., MYERS E. W., LIPMAN D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410

BEJA O., KOONIN E. V., SUZUKI M. T., HADD A., NGUYEN L. P. (2000) Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* **289**, 1902-1906

BENNETZEN J. L. (2000) Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol. Biol.* **42(1)**, 251-269

BERNSTEIN F. C., KOETZLE T. F., WILLIAMS G. J., MEYER E. F. Jr., BRICE M. D., RODGERS J. R., KENNARD O., SHIMANOUCI T., TASUMI M. (1977) The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **112(3)**, 535-542

BIEZKE J. A., BRAUN E. L., BEAN L. E., KANG S., NATVIG D. O., BORKOVICH K. O. (1999) The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8034-8039

BOGOMOLNI R. & SPUDICH J. (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6250-6254

BOYD D., SCHIERLE C., BECKWITH J. (1998) How many membrane proteins are there? *Prot. Sci.* **7** 201-205

BROWN L. S. (2004) Fungal rhodopsins and opsin-related proteins: eukaryotic homologues of bacteriorhodopsin with unknown functions. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3(6)**, 555-565

BUCHER P. & BAIROCH A. (1994) A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. In: *Proceedings 2nd International Conference on Intell* (Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls), 53-61, AAAIPress, Menlo Park

BULLOCK W. O., FERNANDEZ J. M., SHORT J. M. S. (1987) X11-Blue: A High Efficiency Plasmid Transforming *recA* *Escherichia coli* Strain With Beta-Galactosidase Selection. *BioTechniques* **5(4)**, 376-379

CLINE J., BRAMAN J. C., HOGREFE H. H. (1996) PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* **24**, 3546

CSERZO M., WALLIN E., SIMON I., von HEIJNE G., ELOFFSON A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.* **10**, 673-676

D'AQUILA R. T., BECHTEL L. J., VIDELER J. A., ERON J. J., GORCZYCA P., KAPLAN J. C. (1991) Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating. *Nucleic Acids Res.* **19(13)**, 3749

DARTNALL H. J. A. (1972) Photochemistry of visual pigments. In: *Handbook of sensory physiology* (DARTNALL H. J. A., ed.), 122-145, Springer, New York

DEININGER W., FUHRMANN M., HEGEMANN P. (2000) Opsin evolution: Out of wild green yonder? *Trends Gen.* **16 (4)**, 158-159

DON R. H., COX P. T., WAINWRIGHT B. J., BAKER K., MATTICK J. S. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* **19(14)**,

DUNN R., MCCOY J., SIMSEK M., MAJUMDAR A., CHANG S. H., RAJBHANDARY U. L., KHORANA H. G. (1981) The bacteriorhodopsin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78(11)**, 6744-6748

ESCHENFELDT W. H. (1983) Homopolimeric tailing. *Meth. Enzymol.* **100**, 96-116

EWERS D. (2002) Identifizierung von Rhodopsin aus *Acetabularia cliftonii* und *Dunaliella bioculata*. Diplomarbeit, Georg-August-Universität zu Göttingen

FEDORCSAK I., EHRENBERG L. (1966) Effects of diethylpyrocarbonate and methylmethanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem. Scand.* **20**, 107

FERRANDO-MAY E., KRAH M., MARWAN W., OESTERHELT, D. (1993) The methyl-accepting transducer protein HtrI is functionally associated with the photoreceptor sensory rhodopsin I in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J.* **12(8)**, 2999-3005

FROHMAN M. A., DUSH M. K., MARTIN G. R. (1988) Rapid production of fulllength cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002

GEIBEL S., FRIEDRICH T., ORMOS P., WOOD P. G., NAGEL G., BAMBERG E. (2001) The Voltage-Dependent Proton Pumping in Bacteriorhodopsin is Characterized by Optoelectric Behavior. *Biophys. J.* **81**, 2059-2068

GIBBS A. J., MCINTYRE G. A. (1970) The Diagram, a Method for Comparing Sequences - Its Use with Amino Acid and Nucleotide Sequences. *Eur. J. Biochem.* **16**, 1-11

GIBOR A. (1966) *Acetabularia*: a useful giant cell. *Sci. Am.* **215 (5)**, 118-124

GRADMANN D. (1978) Green light (550 nm) inhibits electrogenic Cl⁻ pump in the *Acetabularia* membrane by permeability increase for the carrier ion. *J. Membr. Biol.* **44 (1)**, 1-24

GRADMANN (1984) Electrogenic Cl⁻ pump in the marine alga *Acetabularia*. In:

Chloride Transport Coupling in Biological Membrane (Gerenser G. A., ed.) Elsevier Science Publishers B. V.14-52

GRIGORIEFF N., CESKA T. A., DOWNING K. H., BALDWIN J. M., HENDERSON R. (1996) Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **259**, 393-421

GRYGORCZYK R., HANKE-BAIER P., SCHWARZ W., PASSOW H. (1989) Measurement of erythroid band 3 protein-mediated anion transport in mRNA-injected oocytes of *Xenopus laevis*. *Methods Enzymol.* **173**:453-466. *Methods Enzymol.* **173**, 453-466

GUEx, N. & PEITSCH, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723

GUSTAFSSON C., GOVINDARAJAN S., MINSHULL J. (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends. Biotechnol.* **22(7)**, 346-353

HALL T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98

HAUPTS U., TITTOR J., OESTERHELT D. (1999) Closing in on Bacteriorhodopsin: Progress in Understanding the Molecule. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 367-399

HENDERSON R. & SCHERTLER G. F. X. (1990) the structure of bacteriorhodopsin and its relevance to the visual opsins and other seven-helix G-protein coupled receptors. *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B* **326**, 379-389

HENIKOFF S. & HENIKOFF J. (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10915-10919

HENRY I. M., WILKINSON M. D., HERNANDEZ J. M., SCHWARZ-SOMMER Z., GROTEWOLD E., MANDOLI D. F. (2004) Comparison of ESTs from juvenile and adult phases of the giant unicellular green alga *Acetabularia acetabulum*. *BMC Plant Biol.* **4**, 3-14

HIGGINS D.G. & SHARP P.M. (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**, 237-244

HOFMANN K. P. (1999) Signalling states of photoactivated rhodopsin. *Novartis Found. Symp.* **224**, 158-175

HORWITZ J. P., CHUA J., CURBY R. J., TOMSON A. J., DAROUGE M. A., FISHER B. E., MAURICIO J., KLUNDT I. (1978) Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indoyl-glycopyranosides. *J. Med. Chem.* **574**, 7

JOSHI C. P., ZHOU H., HUANG X., CHIANG V. L. (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol. Biol* **35**, 993-1001

- KAMMANN M., LAUFS J., SCHELL J., GRONENBORN B. (1989) Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids res.* **17**, 5404
- KATERIYA S., NAGEL G., BAMBERG E., HEGEMANN P. (2004) "Vision" in single-celled algae. *News. Physiol. Sci.* **19**, 133-137
- KAZAZIAN H. H. Jr. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* **303(5664)**, 1626-1632
- KOZAK M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292
- KOZAK M. (1987) An analysis of 50 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids res.* **15**, 8125-8148
- KUMAR S., TAMURA K., NEI M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* **5**, 150-163
- LANYI, J. K. (2001) X-Ray Crystallography of Bacteriorhodopsin and Its Photointermediates: Insights into the Mechanism of Proton Transport. *Biokhimiya* **66**, 1477-1482
- LOZIER R. H., BOGOMOLNI R. A., STOECKENIUS W. (1975) Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium Halobium*. *Biophys. J.* **15 (9)**, 955-962
- LUECKE H., SCHOBERT B., RICHTER H. T., CARTAILLER J. P., LANYI J. K. (1999) Structure of Bacteriorhodopsin at 1.55 Ångstrom Resolution. *J.Mol.Biol.* **291**, 899
- MESSING J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **101**, 20
- MÜLLER D. (1962) On year and lunar periodicity phenomenon in several brown algae. *Bot. Mar.* **4**, 140-155
- MULLIS K. B. & FALOONA F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enz.* **155**, 335-350
- NAGEL G., MOECKEL B., BÜLDT G., BAMBERG E. (1995) Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping. *FEBS Letters* **377**, 263-266
- NAGEL G., OLLIG D., FUHRMANN M., KATERIYA S., MUSTI A. M., BAMBERG E., HEGEMANN P. (2002) Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae. *Science* **296**, 2395-2398
- NAGEL G., SZELLAS T., KATERIYA S., ADEISHVILI N., HEGEMANN P., BAMBERG E. (2005) Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. *Biochem. Soc. Trans.* , 863-866

- OESTERHELT, D. (1999) Photosynthese der zweiten Art: Die halophilen Archaea. In: (D. Häder, ed.), 146-161, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- ORREGO C. (1990) Organising a laboratory for PCR work. In: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., eds.), 447-454, Academic, San Diego, CA
- OSAWA, S. JUKES, T. H. WATANABE K., MUTO A. (1992) Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol. Rev.* **56(1)**, 229-264.
- PEPE I. M., CUGNOLI C. (1992) Retinal photoisomerase: Role in invertebrate visual cells. *J. Photochem. Photobiol.* **B 13**, 5-17
- PROUDFOOT N. J., BROWNLEE, G. G. (1976) 39 non coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **263**, 211-214
- PROVASCOLI L., MCLAUGHLIN J. J. A., DROOP M. R. (1957) The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* **25**, 392
- ROTHNIE H. M. (1996) Plant mRNA 3'-end formation. *Plant Mol. Biol.* **32**, 43-61
- RUIZ-GONZALEZ M. X. & MARIN I. (2004) New Insights into the Evolutionary History of Type 1 Rhodopsins. *J. Mol. Evol.* **58**, 348-358
- SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K. B., EHRLICH H (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**, 487-91
- SAIKI R. K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K. B., HORN G. T., ERLICH H. A., ARNHEIM N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354
- SAITOU N., NEI M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **34**, 544-545
- SASAKI J., BROWN L. S., CHON Y. S., KANDORI H., MAEDA A. (1995) Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump. *Science* **269**, 73-75
- SCHILDE C. (1968) Schnelle photoelektrische Effekte der Alge *Acetabularia*. *Z. Naturforsch.* **23 (b)**, 1369
- SCHNEIDER S. U., LEIBLE M. B., YANG X.P. (1998) Strong homology between the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of two species of *Acetabularia* and the occurrence of unusual codon usage. *Mol. Gen. Genet.* **218**, 445-452
- SCHOBERT B. & LANYI J. K. (1982) Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J. Biol. Chem.* **257**, 10306-10313

- SCHWEIGER H. G., DEHM P., BERGER S. (1977) Culture conditions for *Acetabularia*. In: *Progress in Acetabularia research* (C.L.F. Woodstock, ed.), 319-330, Academic Press, New York
- SERIKAWA K. A. & MANDOLI, D. F. (1999) *Aaknox1*, a *kn1*-like homeobox gene in *Acetabularia acetabulum*, undergoes developmentally regulated subcellular localization. *Plant Mol. Biol.* **41**, 785-793
- SHAFRIR Y. & GUY H. R. (2004) STAM: Simple Transmembrane Alignment Method. *Bioinformatics* **20** (5), 758-769
- SINESHCHEKOV O. A., JUNG K. H., SPUDICH J. L. (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8689-8694
- SPUDICH J. L., YANG C. S., JUNG K. H., SPUDICH E. N. (2000) Retinylidene Proteins: Structures and Functions from Archaea to Humans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 365-392
- STEWART A. K., CHEMOVA M. N., KUNES Y. Z., ALPER S. L. (2001) Regulation of AE2 anion exchanger by intracellular pH: critical regions of the NH₂-terminal cytoplasmic domain. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281** (C), 1344
- STOEKENIUS D. & OESTERHELT W. (1973) Functions of a New Photoreceptor Membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70** (10), 2853-2857
- THOMPSON J. D., GIBSON T. J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F., HIGGINS D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4876-4882
- TYAGI R., LAI R., DUGGLEBY R.G. (2004) A new approach to 'megaprimer' polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. *BMC Biotech.* **4**, 1-4
- ULLMANN A., JACOB F., MONOD J. (1967) Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **24**, 339-343
- VARO G. & LANYI J. K. (1991) Thermodynamics and energy coupling in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochemistry* **30**, 5016-5022
- WALLACE I. M., BLACKSHIELDS G., HIGGINS D. G. (2005) Multiple sequence alignments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**(3), 261-266
- WASCHUK S. A., BEZERRA A. G. Jr., SHI L., BROWN L. S. (2005) *Leptosphaeria* rhodopsin: Bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **19**, 6879-6883
- ZHAO J., HYMAN L., MOORE C. (1999) Formation of mRNA 3' Ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationships with Other Steps in mRNA Synthesis.

Microb.Mol. Biol. Rev. **63**, 405-445

Lebenslauf

Persönliche Daten

David Ewers
Geboren am 21.08.1976 in Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

1983 – 1987	Grundschule Lauenförde
1987 – 1996	Städtisches Gymnasium Beverungen
Mai 1996	Abitur

Grundwehrdienst

September 1996 – Juni 1997

Hochschulstudium

WS 1997/1998 – SS 2002	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität zu Göttingen
WS 1999/2000	Vordiplom
WS 2001/2002 – SS 2002	Diplomarbeit in der Abteilung Biophysik der Pflanze (Prof. Dr. D. Gradmann)
SS 2002	Diplom; Titel der Diplomarbeit: „Identifizierung von Rhodopsin aus <i>Dunaliella bioculata</i> und <i>Acetabularia cliftonii</i> “
SS 2002 – WS 2005/2006	Dissertation in der Abteilung Biophysik der Pflanze
WS 2005/2006	Promotion; Titel der Dissertation: „ <i>Acetabularia</i> -Rhodopsin, eine lichtgetriebene Protonenpumpe aus einem autotrophen Eukaryoten“