Das Wolframat-Bindeprotein Tup
A aus Eubacterium acidaminophilum

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) vorgelegt der Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg von

David Rauh

geb. am 21. September 1975 in Halle (Saale)

Gutachter:1. Prof. Dr. J. R. Andreesen2. Prof. Dr. G. Sawers3. Prof. Dr. C. Kisker

Tag der Verteidigung: 15. Januar 2009

Inhaltsverzeichnis

In	halts	verzei	chnis		2
Ta	belle	enverze	eichnis		6
Al	obild	ungsve	erzeichni	S	7
Al	okürz	zungsv	erzeichn	is	9
1.	Einl	eitung			12
	1.1.	Wolfra	m als Bio	pelement	12
	1.2.	Wolfra	ımenzyme		13
	1.3.	ABC-	Fransport	er	18
	1.4.	Das ti	pABC-Op	peron aus Eubacterium acidaminophilum	20
	1.5.	Ziele d	ler Arbeit		22
2.	Mat	erial u	und Metl	hoden	23
	2.1.	Mater	al		23
		2.1.1.	Chemika	lien, Biochemikalien und Enzyme	23
		2.1.2.	Bakterie	nstämme	25
		2.1.3.	Template	e-DNA für die Klonierung von $tupA$	26
		2.1.4.	Plasmide	e	27
		2.1.5.	Primer .		28
		2.1.6.	Geräte, '	Verbrauchsmaterial, $kits$ und Software	31
		2.1.7.	Medien,	Puffer und Lösungen	34
	2.2.	Metho	den		38
		2.2.1.	Mikrobic	ologische Methoden	38
			2.2.1.1.	Kultivierung und Stammhaltung von Escherichia coli $\ .\ .\ .$	38
			2.2.1.2.	Kultivierung von Moorella thermoacetica	38
			2.2.1.3.	Zellernte	38
		2.2.2.	Molekula	arbiologische Methoden	39
			2.2.2.1.	Quantifizierung von DNA \ldots	39
			2.2.2.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39

	2.2.2.3.	Agarosegelelektrophorese	39
	2.2.2.4.	Fällung von Nukleinsäuren	40
	2.2.2.5.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit <i>kits</i>	40
	2.2.2.6.	Isolierung von Plasmid-DNA	40
	Se	chnellpräparation (modifiziert nach BIRNBOIM & DOLY 1979)	40
	P	räparation mit <i>QIAprep</i> -Säulen	40
	2.2.2.7.	Isolierung von Gesamt-DNA	41
	2.2.2.8.	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	41
	2.2.2.9.	Dephosphorylierung von Vektorplasmiden	41
	2.2.2.10.	Ligation	41
	2.2.2.11.	Mikrodialyse von Nukleinsäuren (MARUSYK & SERGEANT	
		1980)	41
	2.2.2.12.	Transformation von <i>E. coli</i>	42
	\mathbf{C}	aCl_2 -Transformation	42
	E	lektroporation	42
	2.2.2.13.	Sequenzierung von DNA	43
	2.2.2.14.	Einführung von Mutationen	43
2.2.3.	Überexp	ression von Fusionsproteinen	43
	2.2.3.1.	Expression von Fusionsproteinen mit dem IMPACT-System .	43
	2.2.3.2.	Expression von Fusionsproteinen mit dem Strep-tag II-System	44
	2.2.3.3.	Produktion einer TupA-Variante mit Selenomethionin	45
2.2.4.	Proteinc	hemische Methoden	45
	2.2.4.1.	Präparation zellfreier Extrakte aus ganzen Zellen	45
	Р	eriplasmatischer Aufschluss	45
	А	ufschluss durch Ultraschallbehandlung	46
	А	ufschluss mittels French Press	46
	2.2.4.2.	Chromatographische Methoden	46
	А	ffinitätschromatographie mit <i>Strep</i> -Tactin-Säulen	46
	А	ffinitätschromatographie an <i>Chitin beads</i>	46
	G	rößenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration)	47
	2.2.4.3.	Dialyse	47
	2.2.4.4.	Proteinkonzentrierung	47
	2.2.4.5.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	47
	SI	DS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
	Ν	ative Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
	$\mathbf{F}_{\mathbf{F}}$	ärbung der Gele	48
2.2.5.	Kristallis	sation und Strukturaufklärung	48
	2.2.5.1.	Screening und Kristallisation	48

			2.2.5.2.	Datensammlung, Integration und Prozessierung 49
			2.2.5.3.	Lösung des Phasenproblems durch MAD 49
			2.2.5.4.	Modellierung und Verfeinerung
			2.2.5.5.	Verfeinerung des NtrA-Modells
		2.2.6.	Abbildu	ngen
		2.2.7.	Analytil	k
			2.2.7.1.	Proteinbestimmung 50
			F	Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) $\ldots \ldots \ldots \ldots 50$
			F	Proteinbestimmung nach GILL & VON HIPPEL (1989) 51
			2.2.7.2.	Gelmobilitätsshift-Experimente
			2.2.7.3.	UV/VIS-Spektroskopie
			2.2.7.4.	Dynamic Light Scattering (DLS)
			2.2.7.5.	Fluoreszenzspektroskopie
			2.2.7.6.	Circular-Dichroismus (CD)
			2.2.7.7.	Massenspektrometrie 53
			2.2.7.8.	Isothermische Titrationskalorimetrie
3.	Exp	erime	nte und	Ergebnisse 54
	3.1.	Herste	ellung der	Expressionsstämme
		3.1.1.	Express	ion mit Strep-tag-II-Fusion
		3.1.2.	Express	ion mit dem IMPACT-System
	3.2.	Bioche	emische u	nd biophysikalische Charakterisierung von TupA aus E. acida-
		minop	hilum .	
		3.2.1.	Dynami	sche Lichtstreuung
		3.2.2.	Gel-Mol	pilitätsshift-Assay
		3.2.3.	Fluoresz	zenzspektroskopie
		3.2.4.	Circular	dichroismus-Spektroskopie
		3.2.5.	Isothern	nische Titrationskalorimetrie
		3.2.6.	Bindung	g von Thiowolframaten
		3.2.7.	Einfluss	von Aminosäureaustauschen auf die Anionenbindung 77
	3.3.	Die St	ruktur vo	on TupA
		3.3.1.	Kristalli	sation $\ldots \ldots 80$
		3.3.2.	Datenau	ıfnahme und Phasierung
		3.3.3.	Modellie	erung und Verfeinerung 83
		3.3.4.	Struktu	r des Monomers $\ldots \ldots $ 86
	3.4.	TupA	aus ande	ren Organismen
	3.5.	Seque	nzvergleio	ch von Tup A-Homologen aus verschieden en Organismen $\ .$ 94

INHALTSVERZEICHNIS

4.	\mathbf{Disl}	cussion	100
	4.1.	TupA bindet Wolframat mit hoher Affinität und Spezifität	100
	4.2.	TupA ist ein typisches Anionenbindeprotein	106
		4.2.1. Tup A ist nicht mit den Mod A- und Wtp A-Familien verwand t $\ .\ .\ .$	108
		4.2.2. In Domäne II haben TupA und die Phosphat-Bindeproteine ein ge-	
		meinsames Sequenzmotiv	113
		4.2.3. Die Bindetasche der Sulfat-Bindeproteine ist für kleinere Ionen optimiert	t115
		4.2.4. Das Nitrat-Bindeprotein NtrA besitzt wie TupA ein Histidin in der	
		Bindestelle	116
		4.2.5. Die Bindung von Wolframat an TupA	120
	4.3.	Regulation der Molybdat- und Wolframataufnahme	124
	4.4.	Ausblick	128
5.	Zus	ammenfassung	130
\mathbf{Li}	terat	urverzeichnis	132
A.	Glei	ichungen und Formeln	147
	A.1.	Fluoreszenztitration	147
	A.2.	Isothermische Titrationskalorimetrie	149
	A.3.	Gleichungen für die Kristallographie	150
в.	Tup	A-Homologe aus verschiedenen Bakterien.	151
	B.1.	Zugriffsnummern der Tup A-homologen Proteinsequenzen	151
	B.2.	Potentiell wolframhaltige Enzyme in Stämmen mit Tup A-Homologen \hdots	153

Tabellenverzeichnis

1.1.	Wolframenzyme
2.1.	Chemikalien und Biochemikalien 23
2.2.	Enzyme (inkl. Puffer)
2.3.	Größenstandards
2.4.	Verwendete Bakterienstämme
2.5.	Template-DNA
2.6.	Verwendete Plasmide
2.7.	Primer
2.8.	Geräte und Verbrauchsmaterialien
2.9.	Verwendete <i>kits</i>
2.10	. Software
3.1.	pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung
3.2.	CD-Auswertung
3.3.	ITC-Experimente
3.4.	ITC-Ergebnisse
3.5.	Fluoreszenz der TupA-Varianten
3.6.	Kristallisationsbedinungen
3.7.	Strukturdaten
3.8.	Verfeinerung der Modelle
3.9.	Potentielle Wasserstoffbrücken zwischen TupA und Citrat 90
4.1.	Dissoziationskonstanten
B.1.	TupA-Homologe

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Strukturen der Molybdän- und Wolframcofaktoren	15
1.2.	Mechanismus des Anionen-Transport-Zyklus eines ABC-Transporters	19
3.1.	N-terminale Sequenz von TupA	54
3.2.	Strep-TupA-Aufreinigung	57
3.3.	Spaltung von <i>Strep</i> -TupA mit Faktor Xa	58
3.4.	Produktion von TupA mit dem IMPACT-System	59
3.5.	Chromatographie von TupA an <i>chitin beads</i>	60
3.6.	TupA-Aufreinigung durch Gelfiltration	61
3.7.	Gel-Mobilitätsshift-Assay mit TupA	63
3.8.	Fluoreszenzspektren des Wildtyp-TupA	64
3.9.	Fluoreszenztitration von Wildtyp-TupA	66
3.10	. CD-Spektren 190 – 330 nm	69
3.11	. Fern-UV-CD-Spektrum von TupA	71
3.12	. Titrationsverfolgung im Nah-UV-CD-Spektrum	71
3.13	. ITC mit Na_2MoO_4	74
3.14	. ITC mit Na_2WO_4	74
3.15	. ITC — Verdrängungsexperiment von MoO_4^{2-} durch WO_4^{2-}	75
3.16	Thiowolframat-Spektren	77
3.17	. Fluoreszenztitration von $H^{94}K$ -TupA	80
3.18	. TupA-Kristalle	81
3.20	. Ramachandran-Diagramm von TupA	86
3.21	. Gesamtstruktur von TupA	88
3.22	. Sekundärstrukturen	89
3.23	. Proteinrückgrat aller TupA-Modelle	90
3.24	. Potentielle Anionenbindestelle mit Citrat	91
3.25	. Vergleich von TupA mit dem Phosphatbindeprotein aus <i>E. coli</i>	92
3.26	. Elektrostatisches Oberflächenpotential von TupA	93
3.27	. Fluoreszenzexperimente mit V. cholerae-TupA	95
3.28	. Sequenzvergleich des TupA-Proteins mit TupA-Homologen	97

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

4.1.	Bindestelle der extrazellulären Molybdat-Bindeproteine	109
4.2.	Bindestelle der Phosphat-Bindeproteine	114
4.3.	Elektrostatisches Oberflächenpotential von PBP	116
4.4.	Die Nitratbindestelle von NtrA	117
4.5.	Die potentielle Wolframat-Bindestelle von TupA	120

Abkürzungsverzeichnis

Chemische Symbole und Formeln, SI-Einheiten, allgemein gebräuchliche deutsche Abkürzungen und Gattungsbezeichnungen werden nicht aufgeführt. Letztere werden aber im jeweiligen Kontext mit dem vollständigen Namen eingeführt.

OD_n	Optische Dichte bei n nm
Å	Angström
$A_{ m r}$	relative Atommasse
$M_{ m r}$	relative Molekularmasse
AA	Acrylamid
ABC	ATP binding cassette (ATP-Bindemotiv)
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
AOR	Aldehyd-Oxidoreduktase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
BAA	Bisacrylamid
bp	base $pair(s)$ (Basenpaar(e))
Cam	Chloramphenicol
CBD	Chitin binding domain (Chitin-Bindedomäne))
CD	Circular dichroism (Circulardichroismus)
Da	Dalton $(1, 6605655 \cdot 10^{-27} \text{ kg})$
DLS	Dynamic Light Scattering (Dynamische Lichtstreuung)

DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N-tetraacetat
FDH	Formiat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
ID	Identification (code)
IMPACT	Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag (Inteinver- mittelte Reinigung mit einem Chitin-Bindepeptid)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITC	$Isothermic\ titration\ calorimetry\ (Isothermische\ Titrationskalorimetrie)$
kb	kiloBase(n)
LB	Lysogeny Broth
MAD	Muliple wavelength Anomalous Dispersion
MPT	metal binding pterin oder Molybdopterin
MR	molcular replacement (Molekularer Ersatz)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
РА	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBP	Phosphat-Bindeprotein
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglykol
SBP	Sulfat-Bindeprotein

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sec	Selenocystein
SeMet	Selenomethionin
SSM	secondary structure matching
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tuco	$Tungsten \ cofactor \ (Wolframcofaktor)$
Tup	Tungstate uptake (Wolframataufnahme)
U	(Enzyme) Unit (1 μ mol ·min ⁻¹)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VIS	Visible Light (sichtbares Licht)
Vol.	Volumen

1. Einleitung

Der Transport von Molekülen und Ionen über biologische Membranen ist für alle Zellen die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Lebensprozesse. Durch ihn werden der selektive Austausch von Stoffen zwischen dem Cytoplasma und dem extracytoplasmatischen Raum und die Kommunikation von Zellen untereinander ermöglicht. Dabei sind Transporter ein wesentlicher Bestandteil eines Systems von verschiedenen Komponenten, das für die Homöostase von Substanzen verantwortlich ist. Sie spielen eine besondere Rolle bei der Aufnahme von raren Spurenelementen, da deren Verfügbarkeit in der Zelle oft nur durch aktiven Transport sichergestellt werden kann. Das bakterielle Wolframat-Aufnahme-System Tup (*TUngstate UPtake*) ist ein solcher primär aktiver, ATP-spaltender Transporter mit hoher Spezifität und dient der Wolframataufnahme in die Zelle, wo Wolfram als funktionelles Element in das aktive Zentrum einiger Enzyme integriert wird. Die biochemische Charakterisierung des am ersten Schritt der Aufnahme beteiligten extrazellulären, hochaffinen Bindeproteins TupA ist eine Voraussetzung für das vollständige Verständnis dieses Aufnahmesystems und seiner Spezifität.

1.1. Wolfram als Bioelement

Obwohl schon vor über 30 Jahren gezeigt werden konnte, dass Wolfram einen stimulierenden Einfluss auf das Wachstum und die katalytische Aktivität einiger Enzyme bei thermophilen acetogenen *Bacteria* und methanogenen *Archaea* hat (ANDREESEN & LJUNGDAHL 1973, 1974; LJUNGDAHL 1976; JONES & STADTMAN 1977) und heute mehrere Wolframenzyme gut untersucht sind (vgl. Tab. 1.1 auf S. 17), ist bisher sehr wenig über die Aufnahme des schweren Elements in die Zelle und den selektiven Einbau in die Enzymsysteme bekannt. Da eine enge Verwandtschaft zwischen Wolfram- und Molybdänenzymen und deren Cofaktoren besteht (HILLE 2002a), kann zwar ein gemeinsamer Ursprung und eine Analogie ihrer Synthesewege angenommen werden, aber nur die vergleichende Untersuchung der am Wolframund Molybdän-Metabolismus beteiligten Systeme kann zur Aufklärung der für die Spezifität einzelner Proteine verantwortlichen Mechanismen führen.

Wolfram (W), ein Element der 6. Periode, ist das schwerste Element (Ordnungszahl 74, $A_{\rm r} = 183,84$), für das bislang eine positive biologische Funktion nachgewiesen wurde. Im Periodensystem der Elemente ist es zusammen mit dem in seinen physiko-chemischen Eigenschaften ähnlichen Molybdän (Mo) in der 6. Nebengruppe zu finden. Beide Elemente haben etwa den gleichen Kovalenzradius ($r_{\rm K}[{\rm W}] = 130 \text{ pm}, r_{\rm K}[{\rm Mo}] = 129 \text{ pm}$), wodurch sie und ihre Verbindungen als kompetitive Antagonisten auftreten können. Während sich die Chemie des ebenfalls in der der 6. Nebengruppe stehenden Elements Chrom wesentlich von der der anderen beiden Elemente unterscheidet, ist die von Vanadium (V) aus der 5. Nebengruppe aufgrund der Schrägbeziehung vergleichbar. Daher erfüllen Molybdän, Wolfram und Vanadium auch ähnliche biologische Funktionen.

Wolfram wurde in der Erdkruste mit ungefähr der gleichen Häufigkeit wie Molybdän nachgewiesen (1,55 mg·kg⁻¹) (KLETZIN & ADAMS 1996). Diese Gesamthäufigkeit sagt aber nichts über die biologische Verfügbarkeit der Elemente aus, da beide oft in schwer löslicher Form in Mineralien wie Wolframit und Scheelit enthalten sind. In den Weltmeeren ist die Konzentration des Molybdats wesentlich höher (100 nM) als die des Wolframats (0,5 nM) (STIEFEL 2002), wohingegen Wolframat in hydrothermalen Quellen der Tiefsee oft in höheren Konzentrationen vorliegt (0,5 – 315 nM) (HOLDEN & ADAMS 2003). Diese Verteilung spiegelt sich auch in der Verbreitung von Wolframenzymen wider, da diese oft in thermophilen Vertretern der Archaea und Bacteria nachgewiesen werden können (Tab. 1.1 auf S. 17).

Die Chemie von Wolfram in wässrigen Lösungen ist relativ komplex, wobei stets ein Gleichgewicht zwischen verschiedenen Ionen der Oxidationsstufe +6 zu beobachten ist. Bei pH-Werten über 6,0 liegt es überwiegend als WO₄²⁻ vor (p $K_{a1} = 3,62$, p $K_{a2} = 5,08$, XU *et al.* 2006). Bei niedrigeren pH-Werten kondensieren Wolframationen zu Isopolywolframaten. Bei weiterer Absenkung des pH-Wertes kristallisieren die schwer löslichen Hydrate des Wolframoxids WO₃ aus (BARRÉ *et al.* 2005).

Im Boden wird die Verfügbarkeit der beiden Elemente durch eine Reihe verschiedener Faktoren beeinflusst. Neben der Löslichkeit spielt hier auch die fast ubiquitäre Verbreitung von Molybdänenzymen und die damit verbundene Aufnahme von Molybdat durch viele Organismen eine Rolle. Dies kann, zusammen mit einer geringen Diffusionsgeschwindigkeit im Boden, lokal zu einer Molybdat-Verarmung führen. Dieser Umstand kann für Organismen mit wolframabhängigen (Iso-)Enzymsystemen einen Vorteil bedeuten (vgl. HOCHHEIMER *et al.* 1998).

1.2. Wolframenzyme

Während man die essentielle Funktion von Molybdän und Vanadium bei der Stickstofffixierung schon früh erkannt hat (BORTELS 1936), wurden Hinweise auf eine biologische Funktion von Wolfram erst etwa 40 Jahre später erhalten (ANDREESEN & LJUNGDAHL 1973). Aufgrund der großen Ähnlichkeiten zwischen Molybdän und Wolframat und deren Oxyanionen zeigen viele Organismen keine Spezifität bei der Aufnahme und Cofaktorsynthese. Da der Austausch von Molybdän gegen Wolfram meistens zu einer Verminderung der Aktivität führt, ist Wolfram oft ein wirksamer Inhibitor für molybdänabhängige Enzyme (GARNER & STEWART 2002). Die natürliche Selektion findet wahrscheinlich über die Verfügbarkeit statt, die für Molybdat in vielen Habitaten höher ist, sodass diese Inhibierung dort eine untergeordnete Rolle spielt, aber auch durch die Komplexierung bestimmter Anionen beeinflusst werden kann (BELLENGER *et al.* 2008; WICHARD *et al.* 2008).

Wolfram- und Molydänenzyme (Übersicht in SIGEL & SIGEL 2002) enthalten, mit Ausnahme der meisten Nitrogenasen, die ein multinukleares aktives Zentrum besitzen, einen Pyranopterin-Cofaktor (RAJAGOPALAN *et al.* 1993; SCHINDELIN *et al.* 2001), dessen metallfreie Form als *metal binding pterin* (MPT)¹ bezeichnet wird (Abb. 1.1f). Während im Eisen-Molybdän-Cofaktor einiger Nitrogenasen auch Vanadium oder Eisen die Stelle des Molybdäns einnehmen können (KRAHN *et al.* 2002; REHDER 2000), ist bisher kein aktives Enzym bekannt, bei dem MPT mit anderen Metallen komplexiert ist². Molybdän bzw. Wolfram werden über die beiden Thiolgruppen an MPT gebunden, wobei die anderen Koordinationsstellen des Metallatoms durch ein weiteres MPT, eine Seitenkette des Proteins und Schwefelbzw. Sauerstoffatome besetzt werden können (HILLE 2002a). Bei Prokaryoten ist MPT oft zu einer Dinukleotidform mit einem GMP, CMP oder AMP verbunden (Abb. 1.1c und 1.1d).

Die MPT-haltigen Molybdoenzyme können in Abhängigkeit von ihrer Struktur und der Koordination des Molybdäns in 3 Familien eingeordnet werden (Abb. 1.1a – 1.1c, HILLE 2002b; SIGEL & SIGEL 2002): die Familie der eukaryotischen Oxotransferasen (z. B. Sulfit-Oxidase und assimilatorische Nitrat-Reduktase) mit einem MPT und einem Seitenkettenliganden, die Mo-Hydroxylase-Familie (z. B. Xanthin-Oxidase, Aldehyd-Oxidase, Aldehyd-Oxidoreduktase und Kohlenmonoxid-Dehydrogenase) mit einem MPT und (meistens³) einem Schwefel-Liganden pro Mo-Atom und die Familie der prokaryotischen Oxotransferasen (z. B. DMSO-Reduktase, Formiat-Dehydrogenase, dissimilatorische Nitrat-Reduktase und Arsenit-Oxidase) mit einem bis(MPT)-Cofaktor, d. h. ein Molybdän wird durch zwei MPT komplexiert, und (meistens) einem Seitenkettenliganden (Cys, Sec oder Ser). Die Wolframenzyme werden in zwei Familien eingeordnet, da eine früher postulierte Acetylen-Hydratase-Familie mit der Formiat-Dehydrogenase-Familie zusammenfällt (HILLE 2002a, Abb. 1.1d – 1.1f, Tab. 1.1 auf S. 17): die Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase-Familie (bis(MPT) und kein Seitenkettenligand) und die Formiat-Dehydrogenase-Familie (bis(MPT) und Cys oder Sec als Ligand). Alle bekannten Wolframenzyme enthalten folglich einen bis(MPT)-Cofaktor, in dem das Wolframatom im aktiven Zentrum stets von zwei MPT koordiniert wird. Die Wolf-

¹In der Literatur wird auch noch die Bezeichnung *molybdopterin* verwendet, obwohl der Cofaktor auch für Wolframenzyme typisch ist.

²Wie durch die Kristallstruktur der G-Domäne des pflanzlichen Enzyms Cnx1, das für den Mo-Einbau in MPT verantwortlich ist, gezeigt wurde, kann Kupfer während der Cofaktorsynthese als Platzhalter für Molybdän dienen (KUPER *et al.* 2004). Allerdings konnte eine Kupfer-Abhängigkeit der bakteriellen Cofaktorsynthese nicht nachgewiesen werden (MORRISON *et al.* 2007).

³Eine Ausnahme könnte das Enzym 4-HBCR sein (UNCIULEAC *et al.* 2004).



Abbildung 1.1.: Strukturen der Molybdän- und Wolframcofaktoren.

(a) – (e) Röntgen-Kristallstrukturen von Pterincofaktoren aus Molybdän- und Wolframenzymen: (a) Sulfit-Oxidase aus Hühnerleber (*Gallus gallus*) (PDB-ID 1sox, KISKER *et al.* 1997), (b) Xanthin-Dehydrogenase aus *Rhodobacter capsulatus* (1jro, TRUGLIO *et al.* 2002), (c) DMSO-Reduktase aus *Rhodobacter sphaeroides* (1eu1, SCHINDELIN *et al.* 1996), (d) Formiat-Dehydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* (1h0h, RAAIJMAKERS *et al.* 2002), (e) Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Pyrococcus furiosus* (1aor, CHAN *et al.* 1995), (f) Strukturformel zu (e) ramenzyme katalysieren, mit Ausnahme der Acetylen-Hydratase, Redoxreaktionen mit einem niedrigen Potential (≤ -420 mV). Besonders bemerkenswert ist dabei die Reduktion nicht aktivierter Carbonsäuren bei niedrigem pH-Wert durch das Enzym Carbonsäure-Reduktase, ein Mitglied der AOR-Familie (WHITE *et al.* 1993). Wolfram- und Molybdänenzyme kommen in einigen Organismen auch nebeneinander vor, wobei es sich oft um Isoenzyme handelt (BURGDORF *et al.* 2001; HOCHHEIMER *et al.* 1998).

Wolframenzyme sind wahrscheinlich evolutionär älter als Molybdänenzyme. Die junge Erde (vor mehr als einer Milliarde Jahren) war durch anoxische Bedingungen und hohe Temperaturen gekennzeichnet (STIEFEL 2002), wie sie heute noch in hydrothermalen Tiefseequellen, dem Lebensraum vieler (hyper-)thermophiler Archaea, zu finden sind. Aufgrund des relativ hohen Sulfidgehalts, der die Bildung des schwer löslichen MoS₂ begünstigt, ist dort die Konzentration löslicher Molybdänverbindungen geringer als die der Wolframverbindungen, wie z. B. Wolframat (GARNER & STEWART 2002). Wolframkomplexe sind bei hohen Temperaturen oft stabiler als Molybdänkomplexe (JOHNSON et al. 1996). Deshalb enthielten die ersten MPT-Cofaktoren, wie die der evolutionär sehr alten Archaea, vermutlich dieses Metall (HOLDEN & ADAMS 2003). Die zunehmende Verfügbarkeit von MoO_4^{2-} unter oxischen Bedingungen hat später die Evolution von Molybdänenzymen begünstigt. Es sind Vertreter der Archaea bekannt, die auch heute noch ausschließlich Wolframenzyme besitzen (z. B. Pyrococcus furiosus, BEVERS et al. 2006). Es konnte aber auch für mesophile Bakterien, wie Eubacterium acidaminophilum und Pelobacter acetylenicus, der Nachweis erbracht werden, dass diese aktive Wolframenzyme enthalten (Tab. 1.1). Aufgrund der hohen Sauerstoffempfindlichkeit der Wolframenzymsysteme sind diese meistens bei (fakultativ) anaeroben Prokaryoten zu finden.

Viele der für die Synthese des Molybdäncofaktors notwendigen Enzyme sind gut charakterisiert. Der Biosyntheseweg ist sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten relativ konserviert (SCHWARZ & MENDEL 2006; MENDEL 2005). Über den Einbau von Wolfram in den Cofaktor ist nicht viel bekannt. Die Verwandtschaft von Molybdän- und Wolframcofaktoren und die Nachbarschaft von Genen für Wolframenzyme und solchen, denen aufgrund von Homologien eine Rolle in der Pterincofaktor-Synthese zugeschrieben werden kann, lässt auf die Analogie der Synthesewege schließen (vgl. GRAENTZDOERFFER *et al.* 2003). Da die Aktivität einiger Enzyme aber streng molybdänabhängig ist und durch Wolfram inhibiert wird (GARNER & STEWART 2002), ist es denkbar, dass für den Einbau von Molybdän bzw. Wolfram spezifische Enzyme existieren. Ein erster für den spezifischen Einbau entscheidender Schritt könnte auch die Aufnahme des entsprechenden Elements in Form des Oxyanions in die Zelle sein.

Tabelle 1.1. Abkürzung tase, FDH hyd-3-phoe	: Wolframenzyme (Auswahl). ;en: ADH Aldehyd-Dehydrogenase, AH Acetylenhydratas Formiat-Dehydrogenase, FMDH Formylmethanofuran-De phat-Dehydrogenase, WOR Wolfram-Oxidoreduktase.	e, AOR Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase, CAR Carbonsäure-Reduk- shydrogenase, FOR Formaldehyd-Dehydrogenase, GAPOR Glycerinalde-
Enzym	Organismus	Referenzen
	Formiat-Dehyd	rogenase-Familie
AH	Pelobacter acetylenicus	MECKENSTOCK et al. (1999); EINSLE et al. (2005)
FDH	Clostridium formicoaceticum	LEONHARDT & ANDREESEN (1977)
FDH	Cupriavidus necator ^a	BURGDORF et al. (2001)
FDH	$Eubacterium \ acidamin ophilum$	GRAENTZDOERFFER et al. (2003)
FDH	Desulfovibrio gigas	ALMENDRA et al. (1999); RAAIJMAKERS et al. (2002)
FDH	$Desulfovibrio\ simplex$	Zellner & Jargon (1997)
FDH	Methylobacterium extorquens AM1	LAUKEL et al. (2003)
FDH	Moorella thermoacetica ^b	LJUNGDAHL & ANDREESEN (1975); YAMAMOTO et al. (1983)
FDH	$My cobacterium\ vaccae$	KARZANOV et al. (1991)
FDH	$Syntrophobacter\ fumaroxidans$	DE BOK et al. (2003)
FMDH	$Methanothermobacter^{c}$ thermoautotrophicus	BERTRAM et al. $(1994b,a)$
FMDH	$Methanothermobacter^{c}$ wolfeii	SCHMITZ et al. $(1992c, a, b)$; BERTRAM et al. $(1994b)$
	Aldehyd-Oxidor	reduktase-Familie
ADH	Desulfouibrio gigas	HENSGENS et al. (1995)
AOR	$Eubacterium\ acidamin ophilum$	RAUH et al. (2004)
AOR	$Pyrobaculum\ aerophilum$	Hagedoorn <i>et al.</i> (2005)
AOR	$Pyrococcus \ furiosus$	MUKUND & ADAMS (1991); CHAN <i>et al.</i> (1995)
AOR	<i>Pyrococcus</i> sp. strain ES-4	JOHNSON et al. (1993)
AOR	Thermococcus sp. strain ES-1	HEIDER et al. (1995)
CAR	$Clostridium\ formicoaceticum$	WHITE $et al.$ (1991)
CAR	Moorella thermoacetica ^b	WHITE et al. (1989); STROBL et al. (1992)
FOR	Pyrococcus furiosus	Roy et al. (1999); Hu et al. (1999)
FOR	Thermococcus litoralis	MUKUND & ADAMS (1993); DHAWAN et al. (2000)
GAPOR	$Pyrococcus\ furiosus$	MUKUND & ADAMS (1995); VAN DER OOST et al. (1998)
WOR4	$Pyrococcus\ furiosus$	ROY & ADAMS (2002)
WOR5	$Pyrococcus\ furiosus$	BEVERS et al. (2005)
^a früher Ralst	onia eutropha	
^b früher Clost	ridium thermoaceticum	
^c früher Meth	anobacterium	

1. Einleitung

1.3. ABC-Transporter

Da über die cytoplasmatischen Membranen aller Organismen aufgrund ihrer hydrophoben Natur kein direkter Austausch von hydrophilen Molekülen, wie Ionen, möglich ist, war es eine evolutionäre Notwendigkeit, Transportsysteme zu entwickeln. Diese versorgen die Zellen mit organischen Nährstoffen, erhalten die Ionenhomöostase aufrecht und beseitigen Abfallprodukte und toxische Substanzen aus der Zelle, haben aber auch Aufgaben bei der Übertragung von Botenstoffen. Die heute bekannten Transportsysteme sind oft mehr oder weniger spezifisch für bestimmte Stoffe oder Stoffklassen und können auf unterschiedlichen Ebenen reguliert sein (DASSA & BOUIGE 2001).

Die für den aktiven Transport notwendige Energie kann auf mehrere Arten zur Verfügung gestellt werden (SAIER 2000). Häufig bildet die Hydrolyse von ATP die Energiequelle. So auch bei den so genannten ABC-(*ATP binding cassette*-)Transportern, die sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten verbreitet sind und eine der größten Familien homologer Proteine bilden. Vertreter dieser Familie dienen dem Import oder Export eines breiten Spektrums von Substraten über die Membranen der Zelle. Organismen können eine Vielzahl von ABC-Transportern besitzen, so sind für *Escherichia coli* 69 Transportsysteme dokumentiert, die zusammen einen Anteil von etwa 5% des Gesamtgenoms ausmachen (LINTON & HIGGINS 1998). Einen Überblick über die durch Genomsequenzierungen bekannten prokaryotischen ABC-Transporter-Gene bietet die *Archaeal and Bacterial ABC transporter database* (FICHANT *et al.* 2006).

Typische ABC-Transporter bestehen aus zwei bzw. drei Komponenten: einer membranspannenden Permease, einer intrazellulären ATPase und, in einigen prokaryotischen Systemen, einem extrazellulären, bei Gram-positiven Organismen in der Membran verankerten, bei Gram-negativen periplasmatischen Bindeprotein. Jede dieser verschiedenen Komponenten besteht aus zwei Domänen bzw. Untereinheiten. Diese können miteinander fusioniert sein, was vor allem bei Eukaryoten der Fall ist. Der Mechanismus des Transports ist teilweise aufgeklärt (Abb. 1.2, HIGGINS & LINTON 2004; LOCHER 2004; DAWSON & LOCHER 2006; HOLLENSTEIN *et al.* 2007). Bei bakteriellen Anionentransportern sind die Bindung des Substrats durch das extrazelluläre Bindeprotein und das Andocken des Substratbindeproteins an die zur Zellaußenseite geöffnete Permease wahrscheinlich die initialen Schritte. Durch die ATP-Bindung an die ATPase-Domänen auf der cytoplasmatischen Seite der Membran wird eine "gespannte" Konformation der Komponenten erzwungen, welche die Öffnung der transmembranen Permease-Domänen zum Cytoplasma und damit den Transport des Anions ermöglicht. Durch die ATP-Hydrolyse wird der Transporter wieder in die zur Membranaußenseite geöffnete Konformation versetzt.

Die extracytoplasmatischen Bindeproteine werden als Proproteine synthetisiert und anschließend über die Membran transportiert. Bei Gram-positiven *Bacteria* werden sie als





Abbildung 1.2.: Theoretischer Mechanismus des Substrat-Transport-Zyklus eines bakteriellen ABC-Transporters (nach HIGGINS & LINTON 2004; LOCHER 2004; DAWSON & LOCHER 2006; HOLLENSTEIN *et al.* 2007).

Die Darstellung entspricht dem möglichen Modell für einen Gram-positiven ABC-Anionen-Importer mit drei Proteinkomponenten (Substratbindeprotein, Permease-Dimer und ATPase-Dimer). Im Ausgangszustand hat die ABC-Domäne eine geringe Affinität zu ATP und die Permease ist zur Zellaußenseite hin geöffnet. In Schritt I wird das Substrat an das extracytoplasmatische Bindeprotein gebunden. Dieser Komplex dockt an der Permease an, was zur Erhöhung der ATP-Affinität der ATPase führt. Im zweiten Schritt werden 2 Moleküle ATP gebunden. Dadurch kommt es vermutlich zu einer Konformationsänderung im gesamten Komplex, in deren Folge sich die Permease in Richtung Cytoplasma öffnet und die Substrataffinität des Bindeproteins abnimmt, sodass das Substrat ins Zellinnere gelangen kann. Die Hydrolyse des ATP in Schritt III hebt den engen Kontakt der beiden ABC-Domänen wieder auf und macht so die Konformationsänderungen rückgängig. Die Freisetzung des ADP führt in Schritt IV zum Ausgangszustand.

Lipoproteine zusätzlich an der Außenseite der Membran verankert (DESVAUX *et al.* 2006; SUTCLIFFE & RUSSELL 1995). Alle bekannten Bindeproteine zeigen eine Zwei-Domänen-Struktur, in der englischsprachigen Literatur auch als *fly trap* (HEDDLE *et al.* 2003) oder *C-clamp* (KOROPATKIN *et al.* 2006) bezeichnet, die in der Interdomänen-Region einen Spalt besitzt, in dessen Zentrum die Substrat-Bindestelle lokalisiert ist. Die bakteriellen Bindeproteine werden nach der Zahl und Anordnung der β -Faltblätter in den beiden Domänen in zwei Klassen eingeteilt (DWYER & HELLINGA 2004). Die Anionenbindeproteine gehören alle in Klasse II mit fünf β -Strängen je Untereinheit — Klasse-I-Proteine haben sechs. Die Strukturen einiger Anionenbindeproteine sind aufgeklärt: die Phosphat-Bindeproteine PhoS aus E. coli (WANG et al. 1994), PstS-1 aus Mycobacterium tuberculosis (VYAS et al. 2003) und PstS aus Yersinia pestis (TANABE et al. 2007), das Sulfat-Bindeprotein SBP aus Salmonella enterica Typhimurium (PFLUGRATH & QUIOCHO 1988), die Molybdat/Wolframat-Bindeproteine ModA aus E. coli (HU et al. 1997), Azotobacter vinelandii (LAWSON et al. 1998), Xanthomonas axonopodis (BALAN et al. 2008) und Archaeoglobus fulgidus (HOLLENSTEIN et al. 2007), das Nitrat-Bindeprotein NtrA (KOROPATKIN et al. 2006) und das Hydrogencarbonat-Bindeprotein CmpA aus Synechocystis sp. PCC 6803 (KOROPATKIN et al. 2007). Bei dem mit ModA bezeichneten Protein aus A. fulgidus kann es sich aufgrund von hohen Sequenzhomologien auch um ein Wolframat-Bindeprotein der WtpA-Familie (s. u.) handeln (BEVERS et al. 2006). Aufgrund der Ergebnisse einer vergleichenden Analyse der Bindetaschen der verschiedenen Proteine lässt sich vermuten, dass Größe, Protonierung/Ladung und Solvatisierung der Anionen die ausschlaggebenden Merkmale für die Diskriminierung sein können (DUDEV & LIM 2004). Einige Anionenbindeproteine zeigen hohe Affinität bei zugleich relativ geringer Spezifität. So ist vor allem auch für die Molybdat-Bindeproteine eine Wolframatbindung gezeigt worden (BALAN et al. 2006; IMPERIAL et al. 1998).

Für die Aufnahme von Wolframat sind bisher zwei spezifische Transporter beschrieben worden: Tup (MAKDESSI *et al.* 2001) und Wtp (BEVERS *et al.* 2006). Während der erstgenannte überwiegend bei *Bacteria* zu finden ist, kommt der zweite oft bei *Archaea* vor. Die Bindeproteine der Transporter sind verschiedenen Proteinfamilien zuzuordnen (BEVERS *et al.* 2006). Die Aufnahme von Wolframat könnte aber auch weniger spezifisch über andere Transporter (z. B. (Thio-)Sulfat-Transporter, SELF *et al.* 2001; LINDBLOM *et al.* 2006) erfolgen.

1.4. Das tupABC-Operon aus Eubacterium acidaminophilum

Für die Untersuchung des Wolfram-Stoffwechsels hat sich unter anderem *Eubacterium acidaminophilum* (ZINDEL *et al.* 1988) als ein Modellorganismus etabliert. Es handelt sich dabei um ein Gram-positives stäbchenförmiges Bakterium, das phylogenetisch mittels 16S-Sequenzierung und -Analyse den Clostridien des Clusters XI zugeordnet werden kann (BAENA *et al.* 1999). Der Organismus ist in der Lage, verschiedene Aminosäuren in einer Stickland-Reaktion abzubauen. Neben der Kultivierung auf Glycin als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle ist es auch möglich, den Organismus auf anderen organischen Säuren und Aminosäuren, wie Sarkosin, Betain und Serin anzuziehen. Da Sarkosin und Betain nur als Elektronenakzeptor fungieren können, ist es notwendig, dann einen zusätzlichen Elektronendonator wie Formiat anzubieten.

Bisher konnten aus dem Organismus drei Wolframenzyme isoliert werden, während noch kein molybdänhaltiges Enzym nachgewiesen wurde. Zum einen handelt es sich um eine Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase, die eine hohe Homologie zu Aldehyd-Oxidoreduktasen aus hyperthermophilen Archaea zeigt (RAUH et al. 2004). Für dieses Enzym ist eine Rolle im Aminosäurestoffwechsel postuliert worden. Wahrscheinlich dient es als Entgiftungsenzym für während der Spaltung von Pyruvat und anderen 2-Ketosäuren entstehende Aldehyde (MA et al. 1997), was insbesondere durch eine hohe spezifische Aktivität auf serinhaltigen Medien unterstützt wird (RAUH et al. 2004). Desweiteren enthält der Organismus zwei selenocysteinhaltige Formiat-Dehydrogenasen, die ebenfalls gereinigt werden konnten (GRAENTZDOERFFER et al. 2003). Deren spezifische Rollen im Stoffwechsel sind jedoch noch ungeklärt. Alle drei Enzyme enthalten neben diversen Eisen-Schwefel-Clustern einen Tungstopterin-Cofaktor. Die Gene aller drei Enzyme sind bekannt.

Stromabwärts der *fdh*1-Gene wurden außerdem einige für Enzyme der Pterincofaktor-Synthese codierende Gene entdeckt (GRAENTZDOERFFER *et al.* 2003; MAKDESSI *et al.* 2001). Unter diesen Genen befanden sich auch drei Komponenten eines ABC-Transporters. Mittels Sequenzvergleichen konnte die Funktion dieses Operons nicht zugeordnet werden, da zu keinem bekannten ABC-Transporter ausreichende Homologien gefunden wurden. Aufgrund der Lage im Genom sowie geringer Ähnlichkeit zu sulfatbindenden Proteinen wurde postuliert, dass es sich bei diesem neuen Typ um einen wolframatspezifischen Transporter handelt. Nähere Untersuchungen des Bindeproteins mittels nativer PAGE erhärteten diese These (MAKDESSI *et al.* 2001), woraufhin der Name *tup* (*TUngstate UPtake*) für die Gene gewählt wurde. Der Transporter besteht aus dem extrazellulären Substratbindeprotein TupA (286 Aminosäuren, $M_r = 30,9$ kDa), der Permease TupB (228 AS, 24,5 kDa) und der ATPase TupC (214 AS, 23,6 kDa), wobei TupB und TupC wahrscheinlich als Homodimere vorliegen (MAKDESSI *et al.* 2001).

Das Bindeprotein TupA wird als Proprotein mit einer Signalsequenz für bakterielle Lipoproteine translatiert, über die Membran aus der Zelle transportiert und nach Abspaltung des Signalpeptids vermutlich über Cys^{21} als Thioether mit einem Lipidanker an der Außenseite der Membran angeheftet. Das Protein konnte als *Strep-tag*-Fusionsprotein in *E. coli* hergestellt und gereinigt werden. Es wurde gezeigt, dass das Protein Wolframat mit einer wesentlich höheren Affinität bindet als Molybdat und andere Anionen. Die beobachtete Dissoziationskonstante konnte auf ≤ 500 nM geschätzt werden (MAKDESSI *et al.* 2001).

Ein Sequenzvergleich von TupA mit anderen Proteinensequenzen aus Datenbanken zeigte, dass es eine Reihe Gene gibt, die für potentielle Proteine mit hoher Ähnlichkeit zu TupA kodieren. Die Sequenzen dieser Proteine zeigten auffallend konservierte Bereiche und geringe Ähnlichkeiten zu anderen Substratbindeproteinen, mit Ausnahme des kürzlich beschriebenen Vanadat-Bindeproteins aus *Anabaena variabilis* (PRATTE & THIEL 2006).

1.5. Ziele der Arbeit

Aufgrund der in früheren Arbeiten gewonnenen Erkenntnisse kann davon ausgegangen werden, dass TupA durch die selektive Bindung von Wolframat eine wesentliche Rolle in der Biogenese des Tungstopterin-Cofaktors in *E. acidaminophilum* spielt. Das Vorhandensein eines hochspezifischen Transporters für Wolframat würde eine Kompetition mit Molybdat bei den weiteren Syntheseschritten in der Zelle verringern. Außerdem kann durch eine hohe Affinität des Bindeproteins und aktiven Transport die Versorgung der Zelle mit Wolframat auch bei geringen Konzentrationen sichergestellt werden.

Das Ziel der Arbeit war es, die Bindung von Oxyanionen durch das extrazelluläre Bindeprotein TupA zu untersuchen. Der Schwerpunkt der Arbeit wurde dabei auf die Kristallisation und anschließende Aufklärung der Kristallstruktur durch Röntgen-Strukturanalyse des in *E. coli* überproduzierten Proteins gelegt. Mit Hilfe der Struktur in Verbindung mit anderen Methoden sollten der Aufbau des Bindungszentrums des Proteins sowie die physiko-chemischen Eigenschaften der Protein-Anion-Bindung charakterisiert werden. Durch Vergleich der Ergebnisse mit den aus der Literatur bekannten Daten und Strukturen anderer Anionenbindeproteine sollen Ursachen für die beobachtete Selektivität und hohe Affinität des Proteins postuliert werden. Über gerichtete Mutationen sollte die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Selektivität überprüft werden.

Da die physiologische Funktion von TupA noch nicht gezeigt wurde, durch Genomsequenzierungen aber eine Vielzahl von Genen, die für homologe Peptide codieren, bekannt ist, sollten im Rahmen dieser Arbeit auch die Gene einiger dieser putativen Proteine überexprimiert werden. Ziel war es zu überprüfen, ob die Eigenschaften der resultierenden Proteine denen von TupA aus *E. acidaminophilum* entsprechen, wobei es auch hier nahe lag, besonderen Wert auf die differenzierende Bindung verschiedener Anionen zu legen. Zusätzlich sollte geprüft werden, ob die Genome der Organismen mit TupA-homologen Gen-Sequenzen auch Gene für (potentiell) wolframabhängige Proteine enthalten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden in handelsüblichen Reinheitsgraden und, soweit sie nicht in der Tabelle aufgeführt sind, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), VWR (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

Produkt	Hersteller
Chemikalien	
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	Carl Roth (Karlsruhe)
(Rotiphorese Gel 40 $(29:1)$)	
Ammoniumpersulfat	Serva (Heidelberg)
$CaCl_2$	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Coomassie Brilliantblau G-250, R250	Serva
Dithiothreitol	Gerbu Biotechnik (Gaiberg)
EDTA	Gerbu Biotechnik
Ethanol	Carl Roth
Essigsäure	Carl Roth
Glycerol	Carl Roth
KCl	Carl Roth
K_2HPO_4	VWR (Darmstadt)
$\mathrm{KH}_{2}\mathrm{PO}_{4}$	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth
Natriumacetat	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
NaOH	Carl Roth
$\mathrm{Na_{2}HPO_{4}} \cdot 12\mathrm{H_{2}O}$	VWR
$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich

Tabelle 2.1.: Chemikalien und Biochemikalien

Produkt	Hersteller
$\mathrm{Na_2MoO_4} \cdot 2\mathrm{H_2O}$	Sigma-Aldrich
$\rm NH_4Cl$	Carl Roth
$(\mathrm{NH}_4)_2\mathrm{MoS}_4,(\mathrm{NH}_4)_2\mathrm{MoS}_3\mathrm{O},$	Partha Basu
$(\mathrm{NH}_4)_2\mathrm{MoS}_2\mathrm{O}_2,(\mathrm{NH}_4)_2\mathrm{WS}_4,$	(Duquesne University,
$(\mathrm{NH}_4)\mathrm{WS}_3\mathrm{O},(\mathrm{NH}_4)_2\mathrm{WS}_2\mathrm{O}_2$	Pittsburgh, PA, USA)
2-Propanol	Carl Roth
Rotisilon A, B	Carl Roth
Salzsäure	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich
(TEMED)	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth
(Tris-Base)	
Biochemikalien	
Difco Bacto-Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Agarose	PeqLab Biotechnologie (Erlangen)
Anhydrotetracyclin	IBA (Göttingen)
dNTP-Mix	Fermentas (St. Leon-Rot)
Hefeextrakt	Carl Roth
Nicotinamid	Serva
Pepton	Berlin Chemie (Berlin)
Pyridoxamin-HCl	Sigma-Aldrich
Riboflavin	Sigma-Aldrich
Saccharose	Carl Roth
Thiamin	Sigma-Aldrich
L-Aminosäuren	
Ala, Asn, Asp, His, Leu, Met, Thr, Val	VWR
Cys, Gly, Ser, Tyr	Carl Roth
Arg, Ile	Sigma-Aldrich
Gln, Glu, Lys, Trp	Serva
Phe	Roanal (Budapest, Hu)
Pro	Arcos
Seleno-L-Methionin	Sigma-Aldrich

 Tabelle 2.1.: Chemikalien und Biochemikalien. (Fortsetzung)

Produkt	Hersteller
Polymerasen	
Taq-DNA-Polymerase LC	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq-DNA-Polymerase	AG Makdessi (Mikrobiologie, MLU Halle)
Pfu-DNA-Polymerase	AG Makdessi
Pfu-DNA-Polymerase	Appligene
Restriktionsenzyme	
BsaI	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
EcoRI	Fermentas
Mva1269I (BsmI-Isoschizomer)	Fermentas
NdeI	Fermentas
PstI	Fermentas
SapI	New England Biolabs
XhoI	New England Biolabs
Andere DNA-aktive Enzyme	
Alkalische Phosphatase	Fermentas
(aus Krabben-Darm)	
T4-Ligase	Fermentas
DNase I	Roche Diagnostics (Mannheim)

Tabelle 2.2.: Enzyme (inkl. Puffer).

Tabelle 2.3.: Größenstandards.

Produkt	Hersteller
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas (St. Leon Rot)
Protein Marker Broad Range	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Smart Ladder (DNA-Standard)	Eurogentec (Mannheim)

2.1.2. Bakterienstämme

In dieser Arbeit verwendete Stämme, deren wichtigste Merkmale und Herkunft sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst. Für die heterologe Expression der *tupA*-Gene wurden die in Tabelle 2.6 auf S. 27 aufgeführten Plasmide in die Stämme *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (*Eubacterium acidaminophilum-tupA*) bzw. *E. coli* ER2566 (alle anderen) eingeführt. Die entstandenen Stämme sind in der Tabelle nicht einzeln aufgelistet.

Stamm	Genotyp	Herkunft
Escherichia coli		
XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)$ 183 $\Delta(mcrCBhsdSMRmrr)$ 173	Stratagene
	$endA1 \ supE44 \ thi-1 \ recA1 \ gyrA96 \ relA1 \ lac$	(La Jolla, USA)
	$[F' proAB \ lacI^{q}Z\Delta M15 \ Tn10 \ (Tet^{r})]$	
BL21-	$\mathrm{B}~\mathrm{F}^-~ompT~hsdS(\mathrm{r_B}^-~\mathrm{m_B}^-)~dcm^+~\mathrm{Tet^r}~gal$	Stratagene
CodonPlus(DE3)-	$\lambda(DE3) endA$ Hte $[argU ileY leuW Cam^{r}]$	(La Jolla, USA)
RIL		
$\mathrm{ER2566}$	${ m F}^- \; \lambda^- \; {\it fhuA2} \; [lon] \; omp T \; lacZ::{ m T7} \; {\it gene1} \; {\it gal}$	New England Biolabs
	sulA11 $\Delta(mcrCmrr)$ 114::IS10	(Frankfurt am Main)
	R(mcr-73::miniTn10-TetS)2	
	R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]	
B834 (DE3)	$\rm F^-$ ompT gal hsdSB $(r_B^- \; m_B^-)$ met dcm lon	Merck Biosciences
	$\lambda DE3$	(Bad Soden)
Moorella thermoacetica		
DSM 521	Wildtyp	DSMZ
		(Braunschweig)

Tabelle 2.4.: Verwendete Bakterienstämme.

2.1.3. Template-DNA für die Klonierung von tupA

Tabelle 2.5 listet die Stämme deren genomische DNA als template bei der Klonierung der entsprechenden tupA-Gene eingesetzt wurde und die Herkunft der DNA auf.

Organismus	Herkunft
Campylobacter jejuni subsp. jejuni	Medizinische Mikrobiologie, MLU
	Halle
Cupriavidus metallidurans CH34 (DSM 2839)	AG Nies (Mikrobiologie, MLU Halle)
Eubacterium acidaminophilum al-2 (DSM 3953)	AG Makdessi (Mikrobiologie, MLU
	Halle)
Moorella thermoacetica (DSM 521)	diese Arbeit
Methanothermobacter thermoautotrophicus $\Delta \mathbf{H}$	AG Pich (Mikrobiologie, MLU Halle)
$(DSM \ 1053)$	
Methansarcina mazei Gö1 (DSM 7222)	AG Pich (Mikrobiologie, MLU Halle)
Vibrio cholerae MAK 757 (ATCC 51352)	Medizinische Mikrobiologie, MLU
	Halle

2.1.4. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst. Die Lage der Klonierungsstelle und die genaue Größe der der tupA-Fragmente kann mit Hilfe der Primer (Tab. 2.7) und den Sequenzen abgeleitet werden (Anhang B.1 auf S. 151).

Plasmid	Merkmale	Herkunft
pTYB11	IMPACT-Expressions-Vektor (N-terminal)	New England
		Biolabs
		(Frankfurt am
		Main)
pTYB12	IMPACT-Expressions-Vektor (N-terminal)	New England
		Biolabs
pASK-IBA6	Strep-tag-II-Expressions-Vektor (N-terminal)	IBA (Göttingen)
pCjTA6	BsaI- $tupA$ -Fragment aus C . $jejuni$ in	diese Arbeit
	pASK-IBA6	
pCjTA11	SapI/PstI-tupA-Fragment aus C. jejuni in	diese Arbeit
	pTYB11	
pCmTA11	BsaI- $tupA$ -Fragment aus C . $metallidurans$ in	diese Arbeit
	pTYB11	
pEaTA6	BsaI- $tupA$ -Fragment aus E . $acidaminophilum$ in	diese Arbeit
	pASK-IBA6	
pEaTA12	${\rm BsmI/EcoRI}{\text{-}tupA}{\text{-}}{\rm Fragment ~aus}~E.$	diese Arbeit
	acidaminophilum in pTYB12	
pEaTA6-S47A	pEaTA6 mit Ser(aca)-Ala(gcc)-Austausch im	diese Arbeit
	$tupA\operatorname{-Fragment}$ (entspricht $\mathrm{S}^{47}\mathrm{A}$ in nativem	
	TupA)	
pEaTA6-H94Y	pEaTA6 mit $\operatorname{His}(\operatorname{cac})\operatorname{-Tyr}(\operatorname{tac})\operatorname{-Austausch}$ im	diese Arbeit
	tupA-Fragment (H ⁹⁴ Y)	
pEaTA6-H94K	$\rm pEaTA6$ mit $\rm His(cac)\text{-}Lys(aaa)\text{-}Austausch$ im	diese Arbeit
	tupA-Fragment (H ⁹⁴ K)	
pEaTA6-	$\rm pEaTA6~mit~Arg(agg)\mathcharg)\mathcharg\mathcharg)\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\$	diese Arbeit
R156K	$tupA$ -Fragment ($\mathbb{R}^{156}\mathbf{K}$)	
pEaTA6-R156L	$\rm pEaTA6~mit~Arg(agg)\mathcharg)\mathcharg\mathcharg)\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\mathcharg\$	diese Arbeit
	tupA-Fragment (R ¹⁵⁶ L)	

Tabelle 2.0 Ver wendete i lasiliu	Tabelle	2.6.:	Verwendete	Plasmide
-----------------------------------	---------	-------	------------	----------

Plasmid	Merkmale	Herkunft
pMmTA6	BsaI- $tupA$ -Fragment aus M . mazei in	diese Arbeit
	pASK-IBA6	
pMmTA11	SapI/XhoI- $tupA$ -Fragment aus M . mazei in	diese Arbeit
	pTYB11	
pMotTA11	SapI/PstI- $tupA$ -Fragment aus M . thermoacetica	diese Arbeit
	in pTYB11	
pMtTA6	BsaI- $tupA$ -Fragment aus M .	diese Arbeit
	thermoautotrophicus in pASK-IBA6	
pMtTA11	SapI/PstI- $tupA$ -Fragment aus M .	diese Arbeit
	thermoautotrophicus in pTYB11	
pVcTA6	BsaI- $tupA$ -Fragment aus V. cholerae in	diese Arbeit
	pASK-IBA6	
pVcTA11	SapI/PstI- $tupA$ -Fragment aus V. cholerae in	diese Arbeit
	pTYB11	
pVcTA12	BsmI/PstI-tupA-Fragment aus V. cholerae in	diese Arbeit
	pTYB12	

Tabelle 2.6.: Verwendete Plasmide. (Fortsetzung)

2.1.5. Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion International (Martinsried) synthetisiert, entsalzt und lyophilisiert. Sie wurden vor Gebrauch in H_2O dest. aufgenommen und anschließend bei -20°C gelagert. In Tabelle 2.7 sind die verwendeten Oligonukleotide zusammengestellt.

Tabelle 2.7.: Übersicht über die verwendeten Primer.

Klonierungsprimer sind mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen dargstellt. Die Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Name	Sequenz
Primer für die Seq	uenzierung von pASK-IBA6
Strep up	5'-gac gca gta gcg gta aac g-3'
Strep down	5'-aga gtt att tta cca ctc cct-3'
Primer für die Seq	uenzierung von pTYB11 und pTYB12
Intein Forward	5'-ccc gcc gct gct ttt gca cgt gag-3'
T7- $Term$ - $Reverse$	5'-tat gct agt tat tgc tca g-3'
	(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Name	Sequenz	
Primer für die Klo	nierung von <i>tupA</i> aus <i>C. jejuni</i>	
tupa-Cj-Bsaf	Arg Ala Glu Leu Lys Met Ala Thr 5'-gt gtg t <u>gg tct c</u> tg cgc gca gaa ctt aaa atg gca act-3'	
tupa-Cj-Bsar	5'-gtg tgt <u>ggt ctc</u> tta tca tta gtc ttt tct tgt ttt tgc-3' * Asp Lys Arg Thr Lys Ala	
CjTupA-f-SapI	Asn Ala Ala Glu Leu Lys Met Ala 5'-ggt ggt t <u>gc tct tc</u> c aac gca gca gaa ctt aaa atg gca-3'	
CjTupA-r-PstI	5'-ggt ggt <u>ctg cag</u> tca gtc ttt tct tgt ttt tgc atc-3' * Asp Lys Arg Thr Lys Ala Asp	
Primer für die Klo	nierung von tupA aus E. acidaminophilum	
tupA-BsaI-fwd	Arg Ala Ala Lys Gln Ser Pro 5'-gg tgg t <u>gg tct c</u> ag cgc gct gca aaa caa tca cca-3'	
tup A-BsaI-rev	5'-ggt ggt <u>ggt ctc</u> ata tca ttt tgc tgc gtt agg agt g-3' * Lys Ala Ala Asn Pro Thr	
tupA- $BsmI$ - fwd	Ala Ala Lys Gln Ser Pro 5'-ggt gg <u>t ggg aat gc</u> t gca aaa caa tca cca ga-3'	
tupa- $EcoRI$ - rev	5'-ggt ggt <u>gaa ttc</u> tca ttt tgc tgc gtt agg agt g-3' * Lys Ala Ala Asn Pro Thr	
Primer für die Mutation von tupA aus E. acidaminophilum		
EaTupA-S47A-f	Leu Ala Thr Thr Thr ALA Thr Ser Asp Ser Gly 5'-ctt gcg act aca acg GCC acc agt gac agc gga-3'	
EaTupA-S47A-r	5'-tcc gct gtc act ggt GGC cgt tgt agt cgc aag-3' Gly Ser Asp Ser Thr ALA Thr Thr Thr Ala Leu	
EaTupA-H94K-f	Val Leu Leu Val LYS Ser Lys Ala Ala Glu Glu 5'-gtg ctg ctt gta AAA tcc aag gct gca gag gag-3'	
EaTupA-H94K-r	5'-ctc tgc agc ctt gga TTT tac aag cag cac gtc-3' Glu Ala Ala Lys Ser LYS Val Leu Leu Val Asp	
EaTupA-H94Y-f	Val Leu Leu Val TYR Ser Lys Ala Ala Glu Glu 5'-gtg ctg ctt gta TAC tcc aag gct gca gag gag-3'	
EaTupA-H94Y-r	5'-ctc tgc agc ctt gga GTA tac aag cag cac gtc-3' Glu Ala Ala Lys Ser TYR Val Leu Leu Val Asp	
EaTupA-R156K-f	Lys Phe Ile Ser LYS Gly Asp Asp Ser 5'-c aag ttc ata tca AAG gga gat gat tct gg-3'	
EaTupA-R156K-r	5'-c aga atc atc tcc CTT tga tat gaa ctt g-3' Ser Asp Asp Gly LYS Ser Ile Phe Lys	
EaTupA-R156L-f	Lys Phe Ile Ser LEU Gly Asp Asp Ser 5'-c aag ttc ata tca CTG gga gat gat tct gg-3'	
EaTupA- $R156L$ - r	5'-c aga atc atc tcc CAG tga tat gaa ctt g -3' Ser Asp Asp Gly LEU Ser Ile Phe Lys	

Tabelle 2.7.: Primer. (Fortsetzung)

Name	Sequenz
Primer für die Klo	nierung von $tupA$ aus M . mazei
tupA-Mm-Bsaf-mut	Arg Ala Gln Ser Glu Thr Ser Lys 5'-gt gtg t <u>gg tct c</u> tg cgc gca cag tca gaa acc tca aag-3'
tupA- Mm - $Bsar$	5'-gtg tgt <u>ggt ctc</u> tta tca tca gga tgg caa acc ttc gga-3' * Ser Pro Leu Gly Glu Ser
MmTupA-f-SapI	Asn Ala Gln Ser Glu Thr Ser Lys 5'-ggt ggt t <u>gc tct tc</u> c aac gca cag tca gag acc tca aag-3'
MmTupA-r-XhoI	5'-ggt ggt <u>ctc gag</u> tca gga tgg caa acc ttc gga-3' * Ser Pro Leu Gly Glu Ser
Primer für die Klo	nierung von $tupA$ aus M . thermoacetica
MoThe-TupA-SapI-f	Asn Ala Ala Gly Pro Val Asn 5'-ggt ggt t <u>gc tct tc</u> c aac gcc gcc gga cct gtc aat-3'
MoThe-TupA-PstI-r	5'-ggt ggt <u>ctg cag</u> tca tta ctg ccc cag ggt att-3' * Gln Gly Leu Thr Asn
Primer für die Klo	nierung von $tupA$ aus M . thermoautotrophicus
tupa-Ma-Bsaf	Arg Ala Val Ile Ile Ala Ile 5'-gt gtg t <u>gg tct c</u> tg cgc gct gtc atc atc ata gca ata-3'
tupa-Ma-Bsar	5'-gtg tgt <u>ggt ctc</u> tta tca tta gct ttt tgg ttc ctc ccc-3' * Ser Lys Pro Glu Glu Gly
MtTupA-f-SapI	Asn Ala Ala Val Ile Ile Ala 5'-ggt ggt t <u>gc tct tc</u> c aac gca gct gtc atc atc ata gca-3'
MtTupA- r - $PstI$	5'-ggt ggt <u>ctg cag</u> tca gct ttt tgg ttc ctc ccc tcc-3' * Ser Lys Pro Glu Glu Gly Gly
Primer für die Klo	nierung von TupA aus <i>C. metallidurans</i>
Rmet-TupA-SapI-f	Asn Ala Asn Ala Asn Ala Asp Leu 5'-ggt ggt t <u>gc tct tc</u> c aac gcg aat gcc gcc gac ctg-3'
Rmet-TupA-PstI-r	5'-ggt ggt <u>ctg cag</u> tca tta ctt ggc ctt gta gtc-3' * Lys Ala Lys Tyr Asp
Primer für die Klo	nierung von TupA aus V. cholerae
tupa-Vc-Bsaf	Arg Ala Ser Leu Ile Leu Val Ser 5'-gt gtg t <u>gg tct c</u> tg cgc gct tcg tta att ttg gtc agt-3'
tupa-Vc-Bsar	5'-gtg tgt <u>ggt ctc</u> tta tca tta ctg ctt gtc cgc att ggc-3' * Gln Lys Asp Ala Asn Ala
VcTupA-f-BsmI	Ala Ala Ser Leu Ile Leu Val 5'-ggt ggt gg <u>g aat gc</u> t gct tcg tta att ttg gtc ag-3'
VcTupA-r-PstI-12	5'-ggt ggt <u>ctg cag</u> tca tta ctg ctt gtc cgc att gg-3' * Gln Lys Asp Ala Asn
VcTupA-f-SapI	Asn Ala Ala Ser Leu Ile Leu Val 5'-ggt ggt t <u>gc tct tc</u> c aac gcc gct tcg tta att ttg gtc-3'
	(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle 2.7.: Primer. (Fortsetzung)

30

Tabelle 2.7.: Primer. (Fortsetzung)

Name	Sequenz
VcTupA-r-PstI-11	5'-ggt ggt <u>ctg cag</u> tca ctg ctt gtc cgc att ggc cac-3' * Gln Lys Asp Ala Asn Ala Val

2.1.6. Geräte, Verbrauchsmaterial, kits und Software

Die in dieser Tabelle nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe) und Greiner Labortechnik (Frickenhausen) bezogen.

Produkt	Hersteller
Verbrauchsmaterial	
Konzentratoren Centricon, Microcon	Millipore (Schwalbach)
Membranfilter	Millipore
Sterilfilter Rotilabo	Carl Roth (Karlsruhe)
Dialyseschlauch Spectra/Por	Carl Roth
Elekroporationsküvetten	Biozym Scientific (Hess. Oldendorf),
	PEQLAB (Erlangen)
Dialysis Buttons	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Zellanzucht und -aufschluss	
Fermenter Biostat C-DCU (10 l)	B.Braun (Melsungen)
French Pressure Cell Press	SLM Instruments (Springfield Il, USA)
20-K- und 40-K-French-Press-Zelle	SLM Instruments
Ultraschallgerät UW60	UniEquip Laborgerätebau (Martinsried)
Schüttler	
Kreisschüttler KS 500	IKA-Werke (Staufen)
Reziprokschüttler HS 500	IKA-Werke
Laborwippe WT16	Whatman-Biometra (Göttingen)
Zentrifugen und Rotoren	
Hettich Universal 30 RF	Andreas Hettich (Tuttlingen)
Hettich EBA 12 R	Andreas Hettich
Rotoren 1424A, E1175, 1412	Andreas Hettich
Sorvall RC 5C Plus	Thermo Electron (Langenselbold)
Rotoren SLA-1500, SLA-3000, SS-34	Thermo Electron
Heraeus Biofuge 28RS	Thermo Electron

Tabelle 2.8.: Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
Durchflußrotor Heraeus 8575	Thermo Electron
Savant SpeedVac SVC100	Thermo Electron
Molekularbiologie	
PCR-Gerät Trio Thermoblock	Whatman-Biometra
Sequenzer ABI Prism 377 Ver. 4D	Applied Biosystems (Langen)
Horizontale Elektrophorese-Kammern	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Image Master TFX-20.M	MWG Biotech (Ebersberg)
Gene Pulser	Bio-Rad Laboratories (München)
Polyacrylamid-Elektrophorese	
Spannungsquelle PHERO-stab 500	BIOTEC-FISCHER (Reiskirchen)
Spannungsquelle Consort E835	Consort (Turnhout, B)
Kammer Hoefer Mighty Small II SE260	GE Healthcare (Freiburg)
Spacer, Kämme etc.	GE Healthcare
Glasplatten	Techne (Jahnsdorf)
Pumpe P1	GE Healthcare
$\mathbf{UV}/\mathbf{VIS} ext{-}\mathbf{Spektroskopie}$	
UVIKON Spectrophotometer 930	Tresser Instruments (Kontron)
	(Groß-Zimmern)
UV-1202-Photometer	Shimadzu (Jena)
Glasküvetten (verschiedene Größen)	Hellma (Müllheim)
Plastikküvetten	Greiner Labortechnik (Frickenhausen)
Fluoreszenzspektroskopie	
Spektrometer Kontron SFM 25	Tresser Instruments
Thermostat Biometra KH-3	Whatman-Biometra
Quarzglasküvetten (10 \times 10 mm)	Hellma (Müllheim)
CD-Spektroskopie	
Spektropolarimeter J-710 CD	JASCO Labor- und Datentechnik
	(Groß-Umstadt)
Isothermische Titrationskalorimetrie	
Mikrokalorimeter-System VP-ITC	MicroCal (Northhampton, MA, USA)
DLS	
Dynapro (Protein Solutions)	Wyatt Technology Corp. (Santa Barbara,
	CA, USA)

 Tabelle 2.8.: Geräte und Verbrauchsmaterialien. (Fortsetzung)

Produkt	Hersteller
Chromatographie	
Strep-tactin	IBA GmbH (Göttingen)
Chitin beads	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Superdex 200 HR $10/30$	GE Healthcare
Sephacryl S100 HR $26/100$	GE Healthcare
FPLC-Anlage(Pumpe P-500, UV-Einheit	GE Healthcare
UV-1, Fraktionssammler Frac-100)	

Tabelle 2.8.:	Geräte und	Verbrauchsmaterialien.	(Fortsetzung)
---------------	------------	------------------------	---------------

Tabelle 2.9.: Verwendete kits.

Produkt	Hersteller
Strep-tag Detection Kit	IBA (Göttingen)
ABI A Terminator Dye Reaction Mix	GE Healthcare (Freiburg)
Nucleobond AX	MACHEREY-NAGEL (Düren)
QIAquick Gel extraction Kit	QIAGEN, (Hilden)
QIAquick PCR purification Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
Site Directed Mutagenesis-Kit	Bioline (Luckenwalde)
Crystal Screen 1-2	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Additive Screen 1-3	Hampton Research
Detergent Screen 1	Hampton Research
Clear Strategy Screen 1,2	Molecular Dimensions (Apopka, FL, USA)

Tabelle 2.10.: Software.

Die Tabelle führt die bei der Erstellung dieser Arbeit verwendete wissenschaftliche Software auf. Außerdem wurde freie (Standard-)Software benutzt, die nicht in die Tabelle aufgenommen wurde. Als Quellcode erhältliche Software wurde mit Hilfe der Distribution Gentoo-Linux (http://www.gentoo.org) kompiliert.

Programm	$\mathbf{Referenz}/\mathbf{URL}$
Amore	NAVAZA (1994)
APBS	Baker <i>et al.</i> (2001)
Artemis	RUTHERFORD et al. (2000)
CCP4	Collaborative Computational Project (1994)
CCP4i	Potterton et al. (2003)
	(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Programm	${f Referenz}/{f URL}$
Chromas	http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html
CNS	Brünger et al. (1998)
Coot, inkl. SSM	Emsley & Cowtan (2004); Krissinel & Henrick (2004)
$\mathbf{EMBOSS}/\mathbf{Jemboss}$	RICE <i>et al.</i> (2000)
ExPASy-System	GASTEIGER et al. (2003)
FinchTV	http://www.geospiza.com/finchtv/
HKL	Otwinowski & Minor (1997)
MicroCal Origin	MicroCal (Northhampton, MA, USA)
MOLEMAN2	Kleywegt & Jones (2002)
Muscle	Edgar (2004)
0	JONES <i>et al.</i> (1991)
PMB	Scott et al. (2004); Singh et al. (2006); Russo et al. (2006)
PROCHECK	LASKOWSKI et al. (1993)
Pymol	Delano (2002)
R	http://www.r-project.org/
Refmac 5	MURSHUDOV et al. (1997)
SFCHECK	VAGUINE et al. (1999)
Shelx	Sheldrick (2002, 1990)
STRIDE	Heinig & Frishman (2004)
WIND 25	Tresser Instruments (Kontron) (Groß-Zimmern)
X-Plor	Brünger (1992)

Tabelle 2.10.: Software. (Fortsetzung)

2.1.7. Medien, Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegben wurden die Puffer und Stammlösungen in ${\rm H}_2{\rm O}~dest.$ hergestellt.

Nährmedien

- **LB-Medium** (SAMBROOK *et al.* 1989): 10 g Pepton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; *ad* 1000 ml H₂O *dest.*
- **LB-Agar-Platten:** LB-Medium; 1,5% (w/v) Agar
- Terrific Broth (TARTOF & HOBBS 1987): 12 g Pepton; 24 g Hefeextrakt; 4 ml Glycerol; ad 900 ml H₂O dest.; Nach dem Autklavieren: + 100 ml Kaliumphosphatpuffer (0,17 M KH₂PO₄; 0,72 M K₂HPO₄

- **SOC-Medium:** 20 g Pepton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl; 2,5 ml 1 M KCl; *ad* 1000 ml H₂O *dest.*; Nach dem Autklavieren: + 20 ml 1 M Glucose (sterilfiltriert).
- **20**×**M9-Salze:** 10 g NH₄Cl; 30 g KH₂PO₄; 171 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O; *ad* 500 ml H₂O *dest.*
- Aminosäuremix I: je 4 mg·ml⁻¹ Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Pro, Ser, Thr und Val ; sterilfiltriert
- **Aminosäuremix II:** je 4 mg·ml⁻¹ Tyr, Trp und Phe; pH 8,0 (mit NaOH eingstellt); sterilfiltriert
- Selenomethionin-Inhibierungs-Mix (200x) (DOUBLIÉ 1997): je 20 mg·ml⁻¹ Lys, Phe, Thr; je 10 mg·ml⁻¹ Ile, Leu, Val; sterilfiltriert
- **Vitaminlösung:** je 1 mg·ml⁻¹ Riboflavin, Nicotinamid, Pyridoxamin-HCl und Thiamin; sterilfiltriert
- 2×M9-Medium (mit Selenomethionin): 2 ml 1 M MgSO₄; 100 ml 20×M9-Salze; 2 ml FeSO₄ · 7 H₂O (12,5 mg·ml⁻¹); 10 ml 40% Glucose; 10 ml Aminosäuremix I; 10 ml Aminosäuremix II; 1 ml Vitaminlösung; 4 ml Seleno-L-Methionin (10 mg·ml⁻¹, sterilfiltriert); ad 1000 ml H₂O dest.
- Antibiotika-Stammlösungen:

Ampicillin: 100 mg·ml⁻¹ in H₂O *dest.* Chloramphenicol: 50 mg·ml⁻¹ in Ethanol Kanamycin: 20 mg·ml⁻¹ in H₂O *dest.* Tetracyclin: 12,5 mg·ml⁻¹ in 50% Ethanol

Stammlösungen für andere Zusätze:

Anhydrotetracyclin: 20 mg·ml⁻¹ DMF IPTG: 1 M in H_2O dest.

Transformation

MgSO₄/CaCl₂: 1 ml 1 M MgSO₄; 3,5 ml 1 M CaCl₂; 45,5 ml H₂O dest.

Molekularbiologie

50×TAE-Puffer: 2 M Tris-Base; 1 M Eisessig; 50 mM EDTA pH 8,0

DNA-Probenpuffer: 50% (v/v) Glycerin, 0,2 M EDTA, 0,2% (w/v) Bromphenolblau

Puffer P1: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg·ml⁻¹ RNase A

Puffer P2: 1% (w/v) SDS; 200 mM NaOH

Puffer P3: 2,55 M K-Acetat pH 4,8

Proteinaufreinigung und -analytik

TupA-Aufschlusspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA

TupA-Aufbewahrungspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0

TupA-Messpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM NaCl

Puffer P: 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 500 mM Saccharose; 1 mM EDTA;

Puffer W: 100 mm Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA;

Puffer E: Puffer W + 2.5 mM Desthiobiotin

Puffer R: Puffer W + 1 mM Hydroxy-azophenyl-benzoesäure (HABA)

IMPACT-Waschpuffer: TupA-Aufschlusspuffer; 1% Tween20

IMPACT-Spaltpuffer: TupA-Aufschlusspuffer; 50 mM DTT

Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0; 200 mM NaCl

${\bf SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese}$

Probenpuffer (5×): 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 10% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerol; 20% (v/v) 2-Mercaptoethanol; 0.02% (w/v) Bromphenolblau

Trenngelpuffer (8×): 3 M Tris/HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer (4×): 0,5 M Tris/HCl pH 6,8

Trenngel (10%)(6 ml): 1,5 ml AA/BAA (40% 29 : 1); 750 μl Trenngelpuffer; 60 μl SDS (10% (w/v)); 3,69 ml H₂O; 40 μl APS (10% (w/v)); 5 μl TEMED

Trenngel (12%)(6 ml): 1,8 ml AA/BAA (40% 29 : 1); 750 μl Trenngelpuffer; 60 μl SDS (10% (w/v)); 3,39 ml H₂O; 40 μl APS (10% (w/v)); 5 μl TEMED

Sammelgel (3,76%)(2 ml): 188 μl AA/BAA (40% 29 : 1); 500 μl Sammelgelpuffer; 20 μl SDS (10% (w/v)); 1,292 ml H₂O; 13,3 μl APS (10% (w/v)); 1,7 μl TEMED

Elektrodenpuffer (10×): 250 mM Tris-Base; 1,92 M Glycin; 2% (w/v) SDS

Native Polyacrylamid-Elektrophorese

Beschwererlösung (5×): 20% Saccharose; 0,02% (w/v) Bromphenolblau

Gelpuffer (10×): 2,5 M Tris/HCl pH 8,5
Trenngel (7 ml): x ml AA/BAA (40% 29 : 1); 0,7 ml Gelpuffer; y ml H₂O; 47 μl APS (10% (w/v)); 6 μl TEMED

AA (% T)	5%	10%	12%	15%	$\mathbf{29\%}$
x	0,875	1,750	$2,\!100$	$2,\!625$	5,075
У	5,250	4,500	$4,\!150$	$3,\!622$	$1,\!050$

Sammelgel (3,76%)(2 ml): 188 μl AA/BAA (40% 29 : 1); 500 μl Gelpuffer; 1,312 ml H₂O; 13,3 μl APS (10% (w/v)); 1,7 μl TEMED

Elektrodenpuffer: 0,1 M Tris-Base; 0,1 M Glycin

Färbung von Polyacrylamidgelen

Färbelösung: 2 g Coomassie Brilliantblau R-250; 0,5 g Coomassie Brilliantblau G-250; 425 ml Ethanol; 50 ml Methanol; 100 ml Essigsäure; *ad* 1000 ml H_2O *dest.*

Entfärber: 20% Methanol; 10% Essigsäure

Proteinkonzentrationsbestimmung

Bradford-Reagenz: 50 ml Ethanol (96% (v/v)); 70 mg Coomassie Brilliantblau G-250; 100 ml H_3PO_4 (85% (v/v)); ad 1000 ml H_2O dest.

Die Lösung wurde nach der Herstellung filtriert und vor Licht geschützt aufbewahrt.

Denaturierungspuffer: 6 M Guanidiniumchlorid; 20 mM K-Phosphatpuffer pH 6,5

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung und Stammhaltung von Escherichia coli

Alle verwendeten Nährmedien und deren Zusätze wurden — wenn nicht anders angegeben — 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzeempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert und erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf unter 50 °C zugegeben.

Kleinere *E. coli*-Kulturen (3 - 5 ml) wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und in Kulturröhrchen angezogen, während größere Kulturen (50 - 1000 ml) in Erlenmeyerkolben 2 – 5%ig (v/v) aus einer Vorkultur inokuliert wurden. Das Wachstum erfolgte bis zum Erreichen der gewünschten optischen Dichte schüttelnd bei ca. 120 Upm und 30 °C oder 37 °C. Soweit nicht anders angegeben, wurde LB-Medium mit den erforderlichen Antibiotika und Zusätzen für die Anzucht verwendet. Die Produktion rekombinanter Proteine durch induzierte Überexpression erfolgte in *Terrific Broth* bzw. 2×M9-Medium (SeMet-TupA). Das Wachstum wurde über die Messung der optischen Dichte bei 600 nm in Kunststoffküvetten gegen unbeimpftes Nährmedium verfolgt.

Stammkulturen wurden hergestellt, indem 0,75 – 1,5 ml einer Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase mit 0,25 Vol. Glycerol versetzt und gemischt wurden. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C in 2 ml-Kryogefäßen. Die kurzfristige Lagerung von Zellen erfolgte auf LB-Agar-Platten im Kühlschrank.

2.2.1.2. Kultivierung von Moorella thermoacetica

Für die Isolierung von genomischer DNA wurde Moorella thermoacetica angezogen. Die Anzucht erfolgte in Medium 60 der DSMZ (*M. thermoacetica*-Medium). Die Vorkultur wurde in 16-ml-Schraubdeckelgefäßen mit Septum (*Hungate*-Röhrchen) unter CO_2 -Atmosphäre, die Hauptkultur unter CO_2 -Begasung in Serumflaschen bei 55 °C inkubiert.

2.2.1.3. Zellernte

Kulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, durch 10 min Zentrifugation bei $4.000 \times \text{g}$ bis $5.000 \times \text{g}$ und 4 °C geerntet. Die Zellen wurden direkt verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

Die Fermenterkultur (siehe 2.2.3.1 auf S. 43) wurde vor der Ernte auf 4 °C gekühlt und dann im Durchflußrotor RS 28 bei 17.000 Upm (Fluss ca. 500 ml·min⁻¹) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Quantifizierung von DNA

DNA wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm und Raumtemperatur in TE-Puffer quantifiziert, wobei angenommen wurde, dass $E_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 µg·ml⁻¹ doppelsträngiger DNA entspricht. Zur Reinheitsprüfung wurde ggf. auch die Extinktion bei 280 nm gemessen und der Quotient E_{260} : E_{280} bestimmt, der für reine DNA zwei betragen sollte. Eine weniger genaue Konzentrationsbestimmung erfolgte durch visuellen Vergleich mit einem Standard im Agarosegel.

2.2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion verwendet. Für die Reaktion wurden Primer eingesetzt, die einen mindestens 18 Nukleotide langen spezifisch bindenden Teil enthielten (siehe Tab. 2.7 auf S. 28). Die Ansatzgröße lag für präparative Amplifizierungen bei 100 μ l, analytische PCRs wurden in 20 – 50 μ l durchgeführt. Die Temperatur für die Anlagerung der Primer wurde so gewählt, dass sie 5 K unter der Schmelztemperatur der Sequenz der spezifisch bindenden Region lag (BERTRAM & GASSEN 1991). Diese wurde bei kurzen Oligos (bis 15 bp) nach der GC-Methode berechnet:

 $T_m = (4(n_G + n_C) + 2(n_A + n_T))$ °C

Dabei steht n_X für die Zahl der jeweiligen Base im Primer. Bei längeren Primern wurden Online-Rechner wie OligoCalc (KIBBE 2007) verwendet.

Als Polymerasen wurden für die analytische PCR die *Taq*-Polymerase (optimale Temperatur bei 72 °C) und für die präparative PCR die *Pfu*-Polymerase (68 °C) verwendet. Bei der Berechnung der Verlängerungszeiten wurde eine Geschwindigkeit von etwa 1 kb·min⁻¹ zugrundegelegt.

Es wurden folgende Ansätze und Programme verwendet:

$1-2~\mu{ m M}$	Forward primer		90 s	$95~^{\circ}\mathrm{C}$	(Denaturierung)
$1-2~\mu{ m M}$	Reverse primer		$30 \ s$	$95~^{\circ}\mathrm{C}$	(Denaturierung)
400 μм	dNTP-Mix	$29 \times$	$30 \mathrm{\ s}$	$45-60~^{\circ}\mathrm{C}$	(Anlagerung)
50-500 ng	template-DNA		$30-120~{\rm s}$	68/72 °C	(Verlängerung)
$1 \times$	Reaktionspuffer		$10 \min$	$68/72~^{\circ}\mathrm{C}$	(Verlängerung)
$1-5~{ m U}$	Polymerase		Pause	$4 \ ^{\circ}\mathrm{C}$	

2.2.2.3. Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1% igen (w/v) Agarosegelen in $0.5 \times \text{TAE-Puffer}$. Vor dem Auftragen wurde die Probe mit einem Drittel ihres Volumens DNA-Probenpuffer versetzt. Die Trennung erfolgte bei 50 – 100 V in horizontalen Gelkammern und wurde abgebrochen, wenn die Bromphenolblau-Bande 80 – 100% der Gellänge durchlaufen hatte. Die Gele wurden in Ethidiumbromidlösung (2 μ g·ml⁻¹ in H₂O) gefärbt, kurz mit Wasser gewaschen und im UV-Durchlicht mit dem Videodokumentationssystem fotografiert. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein kommerziell erhältlicher Standard mitgeführt.

2.2.2.4. Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden zur Konzentrierung und Reinigung durch die Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 3 Vol. eiskaltem Ethanol gefällt. Bei größeren Volumina (> 500 μ l) wurden statt Ethanol 0,7 Vol. Isopropanol verwendet. Nach 20 min Zentrifugation bei 20.000×g und 4 °C wurde die DNA mit 500 μ l 70% Ethanol gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert und anschließend an der Luft oder in der SpeedVac getrocknet.

2.2.2.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit kits

Zur Abtrennung von Verunreinigungen und Primern aus PCR-Produkten wurde der *QIAquick PCR Purification Kit* verwendet. Wenn ein einzelnes Fragment aus einem Fragmentgemisch isoliert werden musste, wurde das Gemisch im Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte Fragment aus dem Gel ausgeschnitten. Die auszuschneidende Bande wurde durch kurzes Färben in Ethidiumbromidlösung oder durch den Vergleich mit einem gefärbten Standard bestimmt (s. 2.2.2.3). Das Fragment wurde dann mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* extrahiert. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 – 50 µl H₂O dest..

2.2.2.6. Isolierung von Plasmid-DNA

Schnellpräparation (modifiziert nach BIRNBOIM & DOLY 1979)

Diese Methode wurde zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke angewendet. Die Zentrifugationsschritte wurden alle bei $20.000 \times g$ und 4 °C durchgeführt. Die Zellen einer Übernachtkultur (5 ml) wurden in 0,3 ml Puffer P1 suspendiert und anschließend mit 0,3 ml Puffer P2 versetzt, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,3 ml Puffer P3, vorsichtiger Durchmischung und 5 min Inkubation auf Eis folgten 15 min Zentrifugation. Aus dem Überstand wurde die DNA mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt (s. 2.2.2.4). Nach dem Trocknen wurde die DNA in 30 – 50 μ l H₂O dest. aufgenommen.

Präparation mit QIA prep-Säulen

Für Sequenzierungen und Transformationen wurde Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* aus 5 ml-Übernacht-Kulturen isoliert. Die Elution der an die *QIAprep*-Säulen gebundenen Plasmide erfolgte mit 50 μ l H₂O dest..

2.2.2.7. Isolierung von Gesamt-DNA

Die Isolierung der Gesamt-DNA aus *M. thermoacetica* erfolgte mit Hilfe der Nucleobond-AX-G-Säulen von Macherey-Nagel, wobei dem Protokoll für die Aufreinigung von genomischer DNA aus Prokaryoten gefolgt wurde.

2.2.2.8. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA erfolgte in Ansätzen von mindestens 10 μ l· μ g⁻¹ DNA für 1 – 15 h. Die Reaktion wurde mit 1 – 10 U Restriktionsenzym in den vom Hersteller mitgelieferten Puffersystemen bei der jeweils optimalen Temperatur durchgeführt und das Enzym anschließend durch Erhitzen auf die vom Hersteller empfohlene Temperatur inaktiviert (Hitzeinaktivierung). Bei Mehrfachverdau mit verschiedenen Enzymen wurde ein kompatibles Puffersystem gewählt oder, wenn dies nicht möglich war, der zweite Restriktionsschritt nach einer Fällung der DNA (s. 2.2.2.4) und Resuspension in H₂O durchgeführt.

2.2.2.9. Dephosphorylierung von Vektorplasmiden

Zur Verringerung der Selbstligationsrate linearisierter Vektorplasmide wurden nach oder während der Spaltung mit Restriktionsenzymen die Phosphodiestergruppen von den Enden abgespalten. Dafür wurde 1 μ l (1 U) alkalische Phosphatase aus Krabben direkt in den Spaltungsansatz gegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 30 min wurde das Enzym bei 65 °C inaktiviert.

2.2.2.10. Ligation

Die Ligation von Vektorplasmiden und DNA-Fragmenten erfolgte in 10 μ l-Ansätzen. Das molare Vektor : Fragment-Verhältnis wurde auf etwa 1 : 3 eingestellt. Der Ligationsansatz mit Ligase-Puffer und T4-DNA-Ligase (1 U) wurde über Nacht bei 4 °C oder 16 °C inkubiert. Nach einer Dialyse (s. 2.2.2.11) konnte der Ansatz direkt zur Transformation eingesetzt werden.

2.2.2.11. Mikrodialyse von Nukleinsäuren (MARUSYK & SERGEANT 1980)

Die Mikrodialyse diente der Entsalzung von Nukleinsäuren aus Ligationsansätzen, um z. B. eine anschließende Elektroporation zu ermöglichen. Die DNA-Lösung wurde vorsichtig auf Membranfilter (0,025 µm Porengröße) pipettiert und mindestens eine Stunde gegen H_2O dest. dialysiert.

2.2.2.12. Transformation von E. coli

Bei kommerziell erworbenen kompetenten Zellen wurde bei der Transformation dem Protokoll des Herstellers gefolgt.

Von einigen Stämmen wurden selbst kompetente Zellen hergestellt. Dazu kamen die im Folgenden dargestellten Verfahren zum Einsatz. $CaCl_2$ -kompetente Zellen wurden hauptsächlich für die Transformation mit Ligationsprodukten verwendet, während elektrokompetente Zellen bei der Transformation mit aufgereinigten Plasmiden Verwendung fanden.

$CaCl_2$ -Transformation

- Herstellung kompetenter Zellen. Zur Herstellung $CaCl_2$ -kompetenter Zellen wurden 70 ml LB-Medium aus einer Übernachtkultur 10% ig angeimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,3 – 0,5 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei $4.000 \times g$ geerntet und in 21 ml MgSO₄/CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach 2 h Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und anschließend in 7 ml eiskalter MgSO₄/CaCl₂-Lösung aufgenommen und mindestens weitere 3 h auf Eis inkubiert. Diese Lösung wurde mit 1,75 ml Glycerol versetzt. Die kompetenten Zellen wurden in Aliquots zu 200 µl bei -80 °C aufbewahrt.
- Transformation. Zur Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut, mit DNA (max. 5 μl) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 60 90 s bei 42 °C wurden die Zellen auf Eis wieder abgekühlt und dann mit 900 ml SOC- oder LB-Medium (42 °C) versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen auf LB-Platten mit dem/den entsprechenden Antibiotikum/-a ausplattiert.

Elektroporation

- Herstellung kompetenter Zellen Elektrokompetente Zellen wurden hergestellt, indem 100 ml LB-Medium 10% ig mit einer Übernachtkultur angeimpft und anschließend bis zum Erreichen einer OD_{600} zwischen 0,5 und 0,8 bei 37 °C schüttelnd inkubiert wurde. Die Kultur wurde für 10 20 min auf Eis gestellt und dann 10 min bei $4.000 \times \text{g}$ und 4 °C geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit je einem Kulturvolumen eiskaltem H₂O *dest.* gewaschen und erneut 10 min zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit 0,12 Kulturvolumen 10% igem Glycerol wurden die Zellen in 500 750 µl 10% igen Glycerols aufgenommen und als 40-µl-Aliquots bei -80 °C eingefroren.
- **Transformation** Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und zusammen mit 1 – 5 μ l DNA (in H₂O) in eine vorgekühlte 1 mm-Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 25 μ F und 200 Ω . Die Zeitkonstante lag bei 4,7 – 4,8 ms. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml SOC- oder LB-Medium

aufgenommen und 45 - 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden sie auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

2.2.2.13. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren (SANGER *et al.* 1977), wobei fluoreszenzfarbstoffmarkierte Didesoxynukleotide verwendet wurden. Für die Sequenzierung wurde mit entsprechenden *kits* aufgereinigte Plasmid-DNA als *template* eingesetzt.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden im Thermocycler mit dem im Folgenden angegebenem Ansatz und Programm durchgeführt:

$2-6\ \mu l$	DNA in H_2O		$30 \mathrm{~s}$	$95~^{\circ}\mathrm{C}$	(Denaturierung)
$2 \ \mu l$	Primer (5 pmol· μ l ⁻¹)		$30 \ s$	$95~^{\circ}\mathrm{C}$	(Denaturierung)
4 µl	Terminator Ready Reaction Mix	$16 \times$	$60 \mathrm{~s}$	$55-58~^{\circ}\mathrm{C}$	(Anlagerung)
ad 10 µl	H_2O		$60 \mathrm{~s}$	$68~^{\circ}\mathrm{C}$	(Verlängerung)

Die Reaktionsprodukte wurden mit Ethanol gefällt (s. 2.2.2.4 auf S. 40) und getrocknet. Die elektrophoretische Trennung und Datenaufnahme erfolgte durch Frau U. Lindenstrauß. Die Daten wurden mit den Programmen Chromas und FinchTV ausgewertet.

2.2.2.14. Einführung von Mutationen

Mutationen wurden mit dem Site-Directed Mutagenesis Kit (Bioline) eingeführt. Die Primer wurden so ausgewählt, dass 1 - 3 Basen in der zu mutierenden Region ausgetauscht werden konnten (Tab. 2.7 auf S. 28). Als template diente der Vektor pEaTA6 (Tab. 2.6 auf S. 27). Bei der Mutagenese wurde der dem Produkt beiliegenden Anleitung gefolgt. Positive Klone wurden durch Sequenzierung kontrolliert. Zur Expression der mutierten Gene wurden die Expressionsstämme mit dem Vektor transformiert (s. 2.2.2.12).

2.2.3. Überexpression von Fusionsproteinen

2.2.3.1. Expression von Fusionsproteinen mit dem IMPACT-System

Für die heterologe Expression von TupA wurde das IMPACT-CN-System verwendet. Mit diesem System können N- oder C-terminale Fusionsproteine hergestellt werden, deren *tag* neben einer Chitin-Binde-Domäne auch ein Intein enthält. Da dieses Intein nach Zugabe von reduzierenden Agenzien zur Selbst-Spaltung befähigt ist, kann das Protein an einer einzigen Affinitätssäule sowohl von anderen Proteinen als auch von seinem *tag* getrennt werden. In dieser Arbeit wurden die Vektoren pTyb11 und pTyb12, welche Fusionen am N-Terminus des Proteins ermöglichen, verwendet. Zur Herstellung der Vektoren wurden die *tupA*-Gene ohne die Signalsequenz und das Nterminale Cystein mit Hilfe von spezifischen Primern (Tab. 2.7 auf S. 28) von chromosomaler *template*-DNA (Tab. 2.5 auf S. 26) amplifiziert. Die gereinigten PCR-Produkte und die Vektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und nach Dephosphorylierung der Vektoren miteinander ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* XL1 Blue MRF' transformiert. Mittels Ampicillin-Resistenz, Kolonie-PCR und Sequenzierung konnten die positiven Klone für die weiteren Arbeiten selektiert werden.

Aus den ausgewählten Klonen wurden die Plasmide für die anschließende Transformation der Expressionsstämme isoliert. Für die Expression wurden 5 – 50 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des so erhaltenen Stammes angeimpft und über Nacht bei 30 – 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur wurde zur 5 – 10% igen Inokulation einer weiteren Vorkultur oder der Hauptkultur in *Terrific Broth* verwendet.

Die Hauptkultur wurde bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0.5 - 0.8 schüttelnd bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Expression mit 0.5 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte über Nacht, ebenfalls schüttelnd, bei 15 °C. Danach wurden die Zellen geerntet und entweder sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

Um eine größere Menge Protein für die Kristallisation zu erhalten, wurde eine Fermentation im 10 l-Bioreaktor durchgeführt. Dazu wurde aus einer ersten Vorkultur (50 ml LB-Medium) eine zweite Vorkultur (500 ml LB-Medium) 2% ig angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde der Fermenter 2% ig angeimpft. Die Durchführung der Expression erfolgte wie oben beschrieben in *Terrific Broth*, wobei der Sollwert der Sauerstoffsättigung (pO_2) auf 20% eingestellt und der pH-Wert konstant bei 7,0 gehalten wurde. Die Zellen wurden abschließend mit der Durchlaufzentrifuge geerntet (s. 2.2.1.3 auf S. 38).

2.2.3.2. Expression von Fusionsproteinen mit dem Strep-tag II-System

Mit dem *Strep*-tag II System (SCHMIDT & SKERRA 1994) ist es möglich, periplasmatische Proteine zu produzieren und mit Hilfe einer Einschritt-Affinitätschromatographie zu reinigen, wobei die Bindung des *Strep*-tag an Streptavidin ausgenutzt wird. Es wurden mit Hilfe des Vektors pASK-IBA-6 Proteine mit N-terminaler Fusion und OmpA-Signalsequenz hergestellt.

Zur Herstellung der Expressionsplasmide wurden die Primer mit Restriktionsschnittstellen (meist BsaI) zur Amplifikation des Zielgens verwendet (Tab. 2.7 auf S. 28) und die entstandenen PCR-Produkte mit den entsprechenden Enzymen geschnitten und anschließend in den ebenfalls durch Schneiden mit den entsprechenden Restriktasen linearisierten Vektor ligiert. Mit dem Ligationsprodukt wurde *E. coli* XL1-Blue transformiert. Positive Klone wurden aufgrund ihrer Amp-Resistenz selektiert. Die Kontrolle erfolgte durch PCR mit den Primern *strep-up* und *strep-down* und durch Sequenzierung des Inserts. Mit den korrekten Plasmiden wurden geeignete Expressionsstämme transformiert. Positive Klone wurden durch Sequenzierung des Inserts und eine Expression in 5 ml-Kulturen überprüft.

Für die Expression des Proteins wurde *Terrific Broth* 5% ig aus einer über Nacht (30 °C) gewachsenen Vorkultur angeimpft und bei 30 °C bis zu zum Erreichen einer OD_{600} zwischen 0,5 und 0,8 inkubiert. Nach der Induktion mit 0,2 µg·ml⁻¹ Anhydrotretracyclin erfolgte die Expression in 3 – 4 h bei 30 °C oder über Nacht bei 15 °C. Die Zellen wurden geerntet und bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverwendet.

Während der Expression und der Aufreinigung der Proteine wurden Proben entnommen, die eine Kontrolle des gesamten Prozesses durch SDS-PAGE ermöglichten.

2.2.3.3. Produktion einer TupA-Variante mit Selenomethionin

Für die Expression von Selenomethionyl-TupA wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) Codon-Plus RIL/pEaTA12 in 1 l LB-Amp-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen und bei $5.000 \times g$ geerntet. Die Zellen wurden in 1 l $2 \times M9$ -Medium mit allen Aminosäuren (Mix I und II), Selenomethionin und Selenomethionin-Inhibierungs-Mix (DOUBLIÉ 1997) resuspendiert und 15 min schüttelnd bei 15 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion mit 0,3 mM IPTG. Zur Expression wurden die Zellen über Nacht (16 h) schüttelnd bei 15 °C inkubiert, anschließend geerntet und für die Proteinaufreinigung aufgeschlossen.

2.2.4. Proteinchemische Methoden

2.2.4.1. Präparation zellfreier Extrakte aus ganzen Zellen

Bei allen Methoden wurde ca. 0,1 mg·ml⁻¹ DNase I während des Zellaufschlusses zugegeben.

Periplasmatischer Aufschluss

Für die Aufreinigung der *Strep*-tag-Fusionsproteine wurden zwei Methoden des periplasmatischen Aufschlusses durchgeführt.

- Aufschluss nach IBA-Handbuch (IBA 2003). Dafür wurden die Zellen aus 100 ml Kultur in 2 ml Puffer P (4 °C) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (5 min, 20.000×g). Im Überstand sollten sich die löslichen Proteine des Periplasmas befinden.
- Modifizierter periplasmatischer Aufschluss. Bei dieser Methode wurden die Zellen in 2 ml 20% Saccharose aufgenommen und mit 1 mg·ml⁻¹ Lysozym versetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur (dabei wurde die Supension mehrfach gemischt) wurden die Zellen 10 min bei 4 °C und 20.000×g zentrifugiert, anschließend in 2 ml Puffer W aufgenommen und, nach 10 min Inkubation auf Eis, erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Aufreinigung verwendet.

Aufschluss durch Ultraschallbehandlung

Der Aufschluss kleiner Zellmengen (bis 2 ml Suspension) wurde mechanisch durch Ultraschall erreicht. Dazu wurden die Zellen in etwa 1-2 ml TupA-Aufschlusspuffer aufgenommen und anschließend auf Eis gekühlt. Der Aufschluss erfolgte mit einer Ultraschallsonde UW60 in drei mal 20 Zyklen von je 10 s mit einer Stärke von 60 W. Nach je 20 Zyklen wurde eine Pause von 1 min eingefügt. Während der gesamten Behandlung wurde die Probe auf Eis gekühlt. Nach dem Aufschluss wurden die Zelltrümmer bei 20.000×g und 4 °C sedimentiert.

Aufschluss mittels French Press

Zum Aufschluss größerer Zellmengen wurde die Hochdruckdispersion (*French Press*) verwendet. Die Zellen wurden in 1 – 2 Vol. Aufschlusspuffer aufgenommen und anschließend durch 2 – 3 Durchgänge in einer vorgekühlten Druckzelle (20-K oder 40-K) bei einem Druck von 140 MPa aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden Zelltrümmer bei 20.000×g und 4 °C vom Überstand (Rohextrakt) abgetrennt.

2.2.4.2. Chromatographische Methoden

Affinitätschromatographie mit Strep-Tactin-Säulen

Für die Aufreinigung des Proteins wurde das Periplasma-Fraktion des Expressionsstammes eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte an mit 2 ml Puffer W äquilibrierter *Strep*-Tactin-Sepharose (Säulenvolumen 1 ml). Zur Bindung wurde das Proteinextrakt auf die Säule gegeben und anschließend fünf mal mit 1 ml Puffer W gewaschen. Die Elution erfolgte in sechs Fraktionen mit je 0,5 ml Puffer E. Die Säule wurde danach mit Puffer R regeneriert und konnte nach der Äquilibrierung wiederverwendet werden. Das Protein wurde anschließend analysiert und für weitere Arbeiten verwendet.

Affinitätschromatographie an Chitin beads

Die Aufreinigung der mit dem IMPACT-System hergestellten Proteine erfolgte mit *Chitin beads*. Die Zellen wurden in IMPACT-Waschpuffer aufgeschlossen und der entstandene Rohextrakt konnte direkt auf die Säulen aufgetragen werden. Kleine Mengen (bis 300 ml Kultur) wurden in 5-ml-Schwerkraftsäulen und größere Mengen in einer 50-ml-Säule an einer FPLC-Anlage gereinigt. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen IMPACT-Säulenpuffer äquilibriert, anschließend wurde der Rohextrakt auf die Säule gegeben. Es folgte ein Waschschritt mit sechs Säulenvolumen. Danach wurde die Säule mit zwei Volumen Spaltpuffer gespült und 12 - 16 h bei 4 °C oder Raumtemperatur inkubiert. Die Elution erfolgte mit IMPACT-Elutionspuffer. Zur weiteren Verwendung wurde das Protein dialysiert und eingeengt und,

wenn notwendig, in einem Gelfiltrationsschritt weiter gereinigt, um DTT und ungespaltenes Protein zu entfernen.

Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration)

Die Trennung mittels Gelfiltration, sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke, wurde an der FPLC-Anlage durchgeführt. Als Säulen kamen eine Superdex-200 (1×30 cm²) und eine Sephacryl-S-100-HR-Säule (2,6×100 cm²) zum Einsatz. Die Säulen wurden vor der Benutzung mit mindestens zwei Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer äquilibriert. Es wurden maximal 200 μ l bzw. 5 ml Proteinsuspension über eine Probenschleife auf die Säulen aufgetragen. Die Flussraten betrugen 0,5 ml·min⁻¹ (Superdex 200) bzw. 3 ml·min⁻¹ (S-100-HR). Es wurden Fraktionen zu je 0,5 bzw. 4 ml gesammelt.

2.2.4.3. Dialyse

Die Dialyse von Proteinen erfolgte in Dialyseschläuchen oder mit *Dialysis Buttons* gegen das 50- bis 1000fache Volumen der Proteinsuspension. Die Dauer wurde in Abhängigkeit vom Verwendungszweck des Proteins und Konzentrationsunterschieden zwischen beiden Lösungen festgelegt und lag zwischen 3 und 16 h. Der Dialysepuffer wurde wenn notwendig erneuert.

2.2.4.4. Proteinkonzentrierung

Zum Einengen kleinerer Volumina von Proteinsuspensionen dienten kommerziell erhältliche Konzentratoren verschiedener Größe (Tab. 2.8 auf S. 31), bei deren Verwendung den Gebrauchsanleitungen gefolgt wurde. Größere Volumina wurden im Dialyseschlauch, ggf. direkt im Anschluss an die Dialyse, auf festem trockenen PEG 20.000 auf das gewünschte Volumen konzentriert.

2.2.4.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinenpräparationen und Zellextrakten wurde die SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970) eingesetzt.

Dazu wurden 1 – 10 µl der Proteinsuspension mit einem Drittel des Volumens $5 \times \text{SDS}$ -Probenpuffer versetzt, homogenisiert und anschließend zur Denaturierung für 10 min auf 95 °C erhitzt. Zur Trennung wurden 1 mm starke, diskontinuierliche 10- oder 12% ige Polyacrylamidgele mit 6 oder 10 cm Trenngellänge verwendet. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA je Gel bis die Bromphenolblau-Bande die Unterkante des Trenngels erreichte. Als Referenz wurde ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt.

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die native PAGE wurde in erster Linie während der Gelmobilitätsshift-Experimente verwendet (s. 2.2.7.2 auf S. 51). Es wurden sowohl kontinuierliche Gele mit 10 bis 15% Acrylamid als auch Gradientengele (5 – 29%) hergestellt. Die Gradientengele wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers aus je 2,5 ml 5- und 29% igem Trenngelgemisch erzeugt und durch ein 3,76%iges Gel abgeschlossen.

Vor dem Beladen des Gels wurde die Proteinsuspension im Verhältnis 4 : 1 mit Beschwererlösung vermischt. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung (100 V bis 200 V) im Kühlraum (ca. 7 °C). Gradientengele liefen über Nacht, während bei anderen Gele der Abbruch in Abhängigkeit vom erwarteten Laufverhalten der aufgetragenen Proben erfolgte.

Färbung der Gele

Zum Nachweis der Proteine in den Gelen wurden diese nach der PAGE mit Coomassie Brilliantblau angefärbt. Dazu wurde das Gel in Färbelösung transferiert und danach mindestens 30 min auf einer Laborwippe inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff mit Entfärber ausgewaschen, wobei zur Beschleunigung etwas Zellstoff in die Schale gelegt wurde.

2.2.5. Kristallisation und Strukturaufklärung

Die kristallographischen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Stubbs (Institut für Biotechnologie, MLU Halle) und Prof. Dr. C. Kisker (Rudolf-Virchow-Zentrum, Universität Würzburg) durchgeführt.

2.2.5.1. Screening und Kristallisation

Die Kristallisation von TupA wurde — wenn nicht anders angegeben — nach der Methode des hängenden Tropfens durch Gasphasendiffusion durchgeführt. Dazu wurden 24-Loch-Platten (Linbro) mit jeweils 0,5 - 1 ml Kristallisationspuffer befüllt. Aus diesem Reservoir wurde jeweils 0,5 - 2 µl Lösung entnommen und auf einem Deckgläschen mit 0,5 - 4 µl Proteinsuspension gemischt — die Tropfengrößen und Proteinkonzentrationen wurden dadurch in den einzelnen Versuchen variiert. Die Deckgläschen wurden auf die Reservoire gelegt, die mit einer Mischung aus Rotisilon A und B luftdicht abgeschlossen waren. Während des *screenings* wurden auch andere Methoden getestet, die aber zu keinem besseren Ergebnis führten als die hier beschriebene. Bei der Suche nach den optimalen Kristallisationsbedingungen wurden verschiedene *kits* eingesetzt (Tab. 2.9 auf S. 33).

Nach der Optimierung der Kristallisationsbedingungen konnte TupA, mit einer Ausgangskonzentration von $10 - 20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in TupA-Aufbewahrungspuffer, nach der Methode des hän-

genden Tropfens erfolgreich kristallisiert werden. Dazu wurden über einem Reservoir (1 ml) Tropfen aus 0,5 – 2 µl Proteinsuspension und 0,5 – 2 µl Reservoirlösung (100 mM Natriumcitrat; pH $\approx 5,0$; $\approx 30\%$ PEG 3350; 0 – 15% Glycerol; 0 – 1 mM Na₂WO₄) gemischt. Das Protein kristallisierte innerhalb von zwei bis sieben Tagen bei 20 °C in der Dunkelheit. Aufgrund der geringen Größe und Stabilität der erhaltenen Kristalle und Schwierigkeiten beim Einfrieren wurde zusätzlich ein *screening* mit verschiedenen Additiven und Detergenzien durchgeführt.

2.2.5.2. Datensammlung, Integration und Prozessierung

Zur Datensammlung wurde die Kryokristallographie bei 100 K angewendet. Der Kristall wurde kurz (1 - 2 min) in der Reservoirlösung mit 15 - 20% Glycerol (bei einigen Kristallen schon enthalten, s. 2.2.5.1) inkubiert und anschließend im Stickstoffstrom schockgefroren. Die Messungen erfolgten an der *Beamline* BL14 am BESSY Berlin-Adlershof und an *Beamline* BW6 an der Außenstelle des EMBL am DESY Hamburg. Für die Aufnahme der Datensätze TupAW1, TupASe1 und TupASe2 wurden die Wellenlängen für *peak-*, *high remote-* und *inflection point-*Messungen aus den Fluoreszenzsignalen für W bzw. Se bestimmt. Die Rohdaten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Stubbs (Institut für Biotechnologie, MLU Halle) gesammelt (Tab. 3.7 auf S. 84).

Die Integration und Skalierung der Rohdaten erfolgte mit den Programmen DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Paket.

2.2.5.3. Lösung des Phasenproblems durch MAD

Da sich das Phasenproblem nicht durch molekularen Ersatz lösen ließ, wurde eine Variante des Proteins mit Selenomethionin anstelle von Methionin hergestellt (s. 2.2.3.3 auf S. 45) und kristallisiert. Von dem Kristall TupASe2 wurden Datensätze bei verschiedenen Wellenlängen (*peak* 0.97908 Å, *inflection point* 0.97935 Å und *high remote* 0.95000 Å) aufgenommen. Diese Datensätze dienten zur Bestimmung der Position der 24 Selenatome (vier TupA-Moleküle mit je sechs Selenomethionyl-Resten) in der assymetrischen Einheit durch *Multiple wavelength Anomalous Dispersion* (MAD) mit dem Programmpaket SHELX durch Prof. Dr. M. Stubbs (Institut für Biotechnologie, MLU Halle). Mit Hilfe dieser Positionen konnten die initialen Phasen bestimmt werden.

2.2.5.4. Modellierung und Verfeinerung

Die Modellierung erfolgte mit den Programmen O und Coot, zur Verfeinerung kamen die Programme Refmac 5, x-plor, CNS und das Kommandozeileninterface PMB zum Einsatz. Bei der Modellierung und Verfeinerung des initialen Modells mit Hilfe der experimentellen Phasen aus der MAD-Phasierung wurde die nicht-kristallographische Symmetrie der vier Moleküle in der assymetrischen Einheit des Kristalls TupASe2 berücksichtigt. Das Molekül wurde so weit modelliert, dass es möglich war, die Programme aus dem CCP4-Paket zu benutzen, um die Phasen des Datensatzes TupAW1 zu bestimmen, der nur ein Molekül TupA in der assymetrischen Einheit enthielt und für die weitere Modellierung verwendet wurde. Die ersten Modellierungsschritte wurden ohne Lösungsmittelmoleküle durchgeführt. Gegen Ende der Verfeinerung wurden Citrat und Wasser hinzugefügt.

Die Phasen der weiteren Datensätze wurden durch die Methode des molekularen Ersatzes (*molecular replacement*) mit Hilfe des aus dem Datensatz TupAW1 erstellten Modells und dem Programm AMORE bestimmt. Die Validierung der Strukturen erfolgte mit Hilfe der Programme SFCHECK und PROCHECK aus dem CCP4-Paket und durch Prüfung der Plausibilität der Ergebnisse.

2.2.5.5. Verfeinerung des NtrA-Modells

Für die Verfeinerung der NtrA-Struktur wurden das Modell (PDB-ID 1g29) und die Strukturfaktoren aus der RCBS-PDB (http://www.rcsb.org/) heruntergeladen. Das Modell wurde mit dem Programm Coot modifiziert und mit dem Programm Refmac 5 verfeinert (fünf Zyklen, Standardeinstellungen, inkl. Modifikation der individuellen isotropen *B*-Faktoren). Die Originalstruktur wurde zum Vergleich unter den gleichen Bedingungen verfeinert.

2.2.6. Abbildungen

Die Abbildungen zu den Strukturen wurden mit PyMOL erstellt. Abbildungen mit Originalmaterial (Fotos, gescannte Gele) sind teilweise zur besseren Darstellung eines Sachverhaltes mit The GIMP nachbearbeitet worden. Zur Zusammenstellung, Verarbeitung und Konvertierung der Abbildungen kamen die freien Programme Inkscape, Scribus und The GIMP zum Einsatz. Diagramme wurden mit R und GnuPlot aus Originaldaten erzeugt.

2.2.7. Analytik

2.2.7.1. Proteinbestimmung

Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Für die Proteinbestimmung mittels Coomassie Brilliantblau wurden 1 – 20 μ l Proteinsuspension mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 10 min wurde in einer Plastikküvette die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert (Puffer in Bradford-Reagenz) gemessen. Die Konzentration wurde anhand einer BSA-Eichkurve ermittelt.

Proteinbestimmung nach GILL & VON HIPPEL (1989)

Zur genaueren Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine direkte spektroskopische Methode verwendet. Die theoretischen Extinktionskoeffizienten des denaturierten Proteins wurden mit Hilfe des Programms ProtParam des ExPASy-Systems bestimmt, welches mit nach PACE *et al.* (1995) korrigierten Extinktionskoeffizienten rechnet.

Die Extinktion des Proteins wurde sowohl unter denaturierenden Bedingungen (4 - 6 M Guanidiniumchlorid, 20 mM K-Phosphat pH 6,5) als auch im TupA-Messpuffer bestimmt, um einen Extinktionskoeffizienten des nativen Proteins zu erhalten. Es wurden folgende Werte berechnet und für die Proteinbestimmung verwendet:

 $\epsilon_{280}(Strep-TupA) = 24460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{280}(TupA) = 18470 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

2.2.7.2. Gelmobilitätsshift-Experimente

Gel Shift-Experimente sind vor allem bei der Untersuchung von Protein-DNA/RNA-Wechselwirkungen etabliert, können aber auch bei anderen Bindungsstudien verwendet werden. Sie beruhen auf der Veränderung des Laufverhaltens von Proteinen während der PAGE nach Bindung von Liganden. Die Ursachen können sowohl Ladungs- als auch Konformationsänderungen im Protein sein. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dieser Methode die Bindung von Oxyanionen an die Bindeproteine untersucht. Die Experimente erfolgten in Anlehnung an die Arbeiten von RECH *et al.* (1996) und MAKDESSI *et al.* (2001). Dazu wurden Aliquots der Proteinsuspension $(1 - 10 \ \mu g)$ mit Anionen-Stammlösung definierter Konzentration (in 50 mM Tris/HCl pH 8,0) versetzt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente eine nur mit Puffer inkubierte Probe. Die Trennung erfolgte in nativen Polyacrylamidgelen (s. 2.2.4.5 auf S. 48). Die Gele konnten nach dem Färben mit Coomassie Brilliantblau ausgewertet werden (s. 2.2.4.5 auf S. 48).

2.2.7.3. UV/VIS-Spektroskopie

Zur näheren Charakterisierung und Reinheitsbestimmung von Proteinen sowie zur Messung der gefärbten Thiowolframate wurde die UV/VIS-Spektroskopie verwendet. Die Aufnahme von Spektren erfolgte in Quarzglasküvetten bei 25 °C im Bereich von 250 – 400 nm. Bei Bindungsstudien wurde die Temperatur auf 10 °C abgesenkt. Die Messung erfolgte gegen den entsprechenden Puffer ohne Protein als Referenz.

2.2.7.4. Dynamic Light Scattering (DLS)

Mit Hilfe der Messung der dynamischen Lichtstreuung in kolloidalen Lösungen, z. B. Proteinsuspensionen, können Aussagen über die Größen der Partikel gemacht werden. Die DLS-Experimente wurden in Stony Brook (NY, USA) bei Prof. Dr. C. Kisker durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 25 °C in einem DynaPro-Gerät. Es wurden verschiedene Puffer- und Proteinkonzentrationen getestet.

2.2.7.5. Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzmessungen erfolgten am Spektrometer SFM 25 und wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 10 °C in Quarzglasküvetten von $1 \times 1 \text{ cm}^2$ Seitenlänge mit einem Probenvolumen von 2 ml durchgeführt. Emissionsspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm (Tryptophan-Absorption) aufgenommen, wobei Proteinkonzentrationen zwischen 10 und 200 nM eingesetzt wurden. Vor der eigentlichen Messung wurde die relative Fluoreszenz des Proteins bei 320 nm auf 100% festgelegt. Als Leerwert wurde der Messpuffer verwendet. Die Spektren wurden jeweils in Abwesenheit und Anwesenheit von verschiedenen zweiwertigen Anionen (Endkonzentration 1 μ M bis 1 mM) aufgenommen.

Zur Aufnahme von Titrationskurven wurde die Emissionswellenlänge auf das anhand der Spektren bestimmte Maximum festgelegt. In jedem Schritt wurde etwa 2 μ l Anionenstammlösung (1 μ M – 100 mM) zum Ansatz gegeben. Die Emission wurde nach 0,5 – 2 min Inkubationszeit über 8 s akkumuliert gemessen. Die Auswertung erfolgte auf der Grundlage eines Modells für eine Bindestelle am Protein (Anhang A.1 auf S. 147).

2.2.7.6. Circular-Dichroismus (CD)

Bei der CD-Spektroskopie wird die Differenz der Absorption von rechts und links zirkular polarisiertem Licht gemessen. Dazu ist es notwendig, dass die Probe chirale Moleküle enthält. Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte bei Frau Dr. C. Schiene-Fischer (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle). Die Messungen wurden in einer 1 mm-Quarzglasküvette an einem Jasco J-710 CD-Spektrometer durchgeführt. Es wurden sowohl für den Fern-UV- ($\lambda = 250 - 190$ nm) als auch für den Nah-UV-Bereich ($\lambda = 330 - 240$ nm) Spektren aufgenommen. Die Messung erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 50 nm·min⁻¹, einer Empfindlichkeit von 50 mdeg und einer Auflösung von 0,5 nm. Es wurden jeweils 16 Spektren akkumuliert und gemittelt, und anschließend durch Abzug des Pufferspektrums korrigiert. Wenn nicht anders angegeben, wurde Protein in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 mit einer Konzentration von 5 – 100 µM verwendet. Die Temperatur wurde bei allen Messungen konstant auf 10 °C gehalten.

Zur Titration der Probe mit Anionen wurde diese in jedem Schritt vollständig aus der Küvette entfernt, in einem Reaktionsgefäß mit der Anionenstammlösung gemischt und anschließend wieder in die Messküvette überführt, wobei diese mehrmals mit der Probe gespült wurde.

2.2.7.7. Massenspektrometrie

Zur Größenbestimmung der gereinigten Proteine wurde die Massenspektrometrie verwendet. Als Probe wurde TupA in TupA-Aufbewahrungspuffer eingesetzt. Die Messung wurde an einem ESI-Q-TOF Massenspektrometer Q-TOF 2 (Micromass, Manchester, UK) von Frau Dr. A. Schierhorn (Institut für Biochemie/Biotechnologie, MLU Halle) durchgeführt.

2.2.7.8. Isothermische Titrationskalorimetrie

Durch Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC) kann die bei einer Protein-Ligand-Interaktion umgesetzte Wärme direkt quantitativ bestimmt werden. Die ITC-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit C. Schwieger (Institut für Physikalische Chemie, MLU Halle) durchgeführt. Da die Methode sehr empfindlich ist, wurde für die Messung der TupA-Aufbewahrungspuffer verwendet. Das Protein wurde vor der Messung gegen den Puffer dialysiert, die Anionen wurden im Dialysepuffer gelöst und auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Alle Messungen erfolgten bei 10 °C. Es wurden jeweils ca. 1,5 ml Proteinsuspension (8 – 33 μ M Protein) mit ca. 280 μ l Anionenstammlösung titriert. Die Titration erfolgte in 28 oder 56 Schritten zu je 10 bzw. 5 μ l. Die Auswertung erfolgte nach Pufferkorrektur mit den Programmen Microcal-Origin, R und Sedphat. Es wurde dabei ein Modell mit einer Bindestelle im Protein zugrundegelegt. Mit Hilfe der gemessenen Wärmeänderung konnten weitere thermodynamische Größen berechnet werden (Anhang A.2 auf S. 149).

3. Experimente und Ergebnisse

Im vorliegenden Kapitel wird zunächst auf die Charakterisierung des Wolframatbindeproteins TupA aus *Eubacterium acidaminophilum* eingegangen. Dabei wird zu Beginn die Herstellung der Expressionsstämme, die heterologe Expression und die chromatographische Reinigung des Proteins beschrieben. Anschließend werden die Experimente zur biochemischen Charakterisierung der Anionenbindung durch TupA dargestellt. Darauf folgt ein Kapitel zur Struktur des Proteins. Abschließend wird auf die TupA-Homologen aus anderen Organismen eingegangen.

3.1. Herstellung der Expressionsstämme

Der vorhandene Stamm für die heterologe Expression von TupA mit einer *Strep*-tag-Fusion erwies sich für die geplante Kristallisation als unzureichend, da das Protein zwar erfolgreich periplasmatisch in *Escherichia coli* überexprimiert werden konnte, die Abspaltung des Signalpeptids durch die Signalpeptidase aber unvollständig war, sodass Proteine unterschiedlicher Länge entstanden (MAKDESSI *et al.* 2001). Es wurde deshalb versucht, die Expression dahingehend zu verbessern, dass ein homogenes Protein mit einer möglichst hohen Ausbeute erhalten werden kann. Außerdem sollte das Protein ohne Signalsequenz und zusätzliche Fusion kristallisiert werden (Abb. 3.1).



Abbildung 3.1.: N-terminale Sequenz von TupA aus E. acidaminophilum.

Die Signalsequenz ist grau unterlegt, die für Membran-Lipoproteine typische konservierte Sequenz ist dunkelgrau schattiert, Cys^{21} (Rahmen) ist Teil des postulierten Membranankers (MAKDESSI *et al.* 2001). Für die hergestellten Fusionsproteine wurde Ala²² als Fusionsstelle gewählt, sodass diese Aminosäure nach der Abspaltung des *tags* den N-Terminus bildet.

3.1.1. Expression mit Strep-tag-II-Fusion

Der erste Ansatz sah vor, eine um das Signalpeptid verkürzte Form des Proteins (Abb. 3.1) mit dem *Strep*-tag-System herzustellen. Dazu sollte die entsprechende *tupA*-Genregion in den Vektor pASK-IBA6 kloniert werden, mit dessen Hilfe sich N-terminale *Strep*-tag-Fusionsproteine mit dem OmpA-Signalpeptid zur periplasmatischen Expression und einer Faktor-Xa-Spaltstelle herstellen lassen. Letztere bietet die Möglichkeit, den *Strep*-tag nach der Aufreinigung des überproduzierten Proteins durch Inkubation mit der Protease Faktor Xa abzuspalten.

Das verkürzte tupA-Gen wurde durch PCR mit den Primern tupA-BsaI-fwd und tupA-BsaI-rev amplifiziert, wobei chromosomale DNA aus E. acidaminophilum als template diente. Das 830 bp große Produkt wurde aufgereinigt und in die BsaI-Schnittstelle des Vektors kloniert. Positive Klone wurden durch Sequenzierung des einklonierten Bereichs auf Vollständigkeit und Richtigkeit geprüft. Zur Expression wurde der Stamm E. coli BL21 CodonPlus RIL, welcher durch zusätzliche t-RNAs die heterologe Expression von Proteinen aus Grampositiven Organismen erleichtert, mit dem Vektor transformiert.

Die Bildung des Fusionsproteins erfolgte in LB-Medium. Die Induktion mit Anhydrotetracyclin wurde bei einer OD_{600} von ca. 0,6 gestartet. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Induktionsdauer von ca. 3 h (30 °C) oder 16 h (15 °C) die Menge an rekombinantem Protein im Rohextrakt ein Maximum erreichte (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden Kulturen für die Proteinaufreinigung nach dieser Zeit geerntet.

Für die Aufreinigung von *Strep*-TupA wurden verschiedene Aufschlussmethoden getestet (jeweils 50-ml-Kulturen). Der Nachweis des Proteins in den verschiedenen Fraktionen erfolgte nach einer SDS-PAGE mit dem *Strep*-tag-Detection-Kit (Daten nicht gezeigt).

- 1. Mit der von IBA vorgeschlagene Methode des periplasmatischen Aufschlusses durch Aufnahme der Zellen in Puffer P (enthält 500 mM Saccharose) und anschließende Inkubation der Zellen auf Eis konnte das Protein nicht in die lösliche Fraktion (Überstand) überführt werden. Fast das gesamte Protein befand sich nach der Zentrifugation in der "Sphäroplasten"-Fraktion (fester Rückstand). Die verwendeten Bedingungen waren entweder nicht ausreichend um den Periplasma-Inhalt freizusetzen oder das rekombinante Protein befand sich im Cytoplasma der Zelle.
- 2. Es wurde eine weitere Osmoschockmethode verwendet, bei der der Periplasma-Inhalt in einem zweistufigen Prozess freigesetzt werden sollte. Dazu wurden im ersten Schritt die Zellen in 20% Saccharose mit Lysozym aufgenommen und 10 min inkubiert, in einem zweiten Schritt wurden die Zellen dann 10 min in Puffer W inkubiert. Das Protein konnte danach (fast) vollständig im Überstand nachgewiesen werden, während in den unlöslichen Rückständen kein Strep-tag nachweisbar war. Die Konsistenz die-

ser Rückstände (schleimig) ließ auf DNA und damit einen (partiellen) Aufschluss der Sphäroplasten schließen.

3. Neben den Methoden zur Freisetzung des Periplasma-Inhalts wurde der Aufschluss durch Ultraschall verwendet, wobei die Zellen so weit zerstört werden, dass das gesamte Cytoplasma freigesetzt wird. Es zeigte sich, dass das Strep-TupA sowohl im Überstand als auch in der Zelltrümmer-Fraktion zu finden war. Beim Ultraschallaufschluss erwärmt sich die Probe und es kann schnell zu einer Denaturierung von Proteinen durch mechanische Kräfte kommen. Für größere Zellmengen hätten die Parameter (Zeitintervalle, Ultraschallstärke) deshalb neu optimiert werden müssen, um die Proteine thermisch und mechanisch nicht zu stark zu beanspruchen.

Für die weiteren Versuche wurden 100-ml-Kulturen verwendet. Die Zellen wurden nach der Ernte in 1,5 ml Puffer W resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte nach Methode 2, da diese schnell und bei geringer mechanischer Beanspruchung der Proteine zu einer sehr guten *Strep*-TupA-Ausbeute in der löslichen Fraktion führte. Der Überstand konnte direkt für die Affinitätsreinigung über eine *Strep*-Tactin-Säule eingesetzt werden. Das Eluat wurde fraktioniert gesammelt. Bei der Aufreinigung wurde eine Ausbeute von 17 – 20 mg Protein je Liter Kultur erzielt. Das durch Reinigung über *Strep*-Tactin gewonnene Protein war nicht homogen. Bei der Kontrolle durch SDS-PAGE waren mehrere Banden bei einer Größe um 30 kDa (theoretisch 30,3 kDa ohne Signalpeptid) im Gel zu sehen (Abb. 3.2). Die Ursache ist wahrscheinlich eine unvollständige Abspaltung des OmpA-Signalpeptides, wie sie auch von MAKDESSI *et al.* (2001) beobachtet wurde.

Im nächsten Schritt wurde der *Strep*-tag mit der Protease Faktor Xa vom Protein abgespalten. Nach der Spaltung wurde eine einzige Bande bei ca. 30 kDa (theoretisch 28,6 kDa) im SDS-PA-Gel erhalten (Abb. 3.3a auf S. 58). Um zu überprüfen, ob die Fähigkeit, Wolframat zu binden, während der Proteasereaktion erhalten geblieben ist, wurde ein Protein-Gelmobilitätsshift-Experiment durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit Wolframat- bzw. Molybdat-Ionen zu einer Veränderung des Laufverhaltens führt (Abb. 3.3b auf S. 58). Schwache Banden auf der Höhe des anionengebundenen Proteins bei der Inkubation mit Sulfat bzw. ohne Anion sind wahrscheinlich auf ein Überlaufen bzw. eine Diffusion von Molybdat bzw. Wolframat in die benachbarte Spur zurückzuführen und konnten mit größeren Abständen zwischen den Spuren nicht reproduziert werden.

Für die Kristallisation hätten der *Strep*-tag und Faktor Xa wieder aus der Proteinsuspension entfernt und der Faktor-Xa-Spaltpuffer durch TupA-Kristallisationspuffer ersetzt werden müssen. Da Faktor Xa ein Molekulargewicht von 28,7 kDa und damit etwa die gleiche Größe wie TupA besitzt, kam eine Gelfiltration nicht in Frage, sodass noch weitere Schritte, wie eine Benzamidin-Sepharose-Chromatographie, hätten angewendet werden müssen. Um dies zu vermeiden, wurde zur Expression von TupA das IMPACT-System als Alternative verwendet.





Abbildung 3.2.: Aufreinigung von TupA mit Strep-tag-Fusion.

12%
iges SDS-PA-Gel nach Coomassie-Färbung mit Proben von verschiedenen Fraktionen der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie in einer 1-ml-Säule. M
 Molekulargewichtsstandard, RE Rohextrakt (Überstand nach Zellaufschluss, 5 µl), D
 Durchlauf (10 µl), 1 – 6 Elutionsfraktionen (je 10 µl). Die Größe des Fusionsproteins ist durch einen Pfeil markiert.

3.1.2. Expression mit dem IMPACT-System

Um die mit dem *Strep*-tag II aufgekommenen Probleme zu umgehen, wurde das Protein mit dem IMPACT-System überproduziert. Der wesentliche Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sich das Intein unter reduzierten Bedingungen autokatalytisch vom Zielprotein abspaltet, sodass keine Protease eingesetzt werden muss. Die Aufreinigung erfolgt über eine Affinitätsäule, die das Intein über eine Chitin-Bindedomäne (CBD) während der Spaltung und Elution immobilisiert. So kann das Zielprotein in einem Chromatographieschritt *tag*frei und sauber erhalten werden. Da sich das Intein, das Zielprotein und das Fusionsprotein deutlich in ihrer Größe unterschieden, war es möglich, nach der Affinitätsreinigung einen Gelfiltrationsschritt anzuschließen, um die Reinheit des Zielproteins zu erhöhen.

Ziel war es, nach der Aufreinigung TupA ohne Signalpeptid, im Folgenden nur noch TupA genannt, zu erhalten (Abb. 3.1 auf S. 54). Zur Herstellung des Stammes wurde eine PCR mit den Primern *tupA-BsmI-fwd* und *tupA-EcoRI-rev* durchgeführt, als *template* diente chromosomale DNA aus *E. acidaminophilum*. Das 822 bp große Produkt wurde in den Vektor pTyb12 kloniert, um eine N-terminale Fusion mit dem Intein-CBD-Peptid zu erhalten. Positive Klone wurden durch Sequenzierung auf Richtigkeit und Vollständigkeit überprüft. Der Vektor wurde durch Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 CodonPlus RIL eingeführt.



Abbildung 3.3.: Spaltung von Strep-TupA mit Faktor Xa.

(a) 12%
iges SDS-PA-Gel nach Coomassie-Färbung. Auf das Gel wurden vor und nach der Abspaltung der Strep-Fusion entnommene Proben (je 10 µl, ca. 5 µg Protein) aufgetragen. M
 Molekulargewichtsstandard, Strep Strep-TupA, Strep
(dl) Strep-TupA nach der Dialyse gegen Faktor-Xa-Puffer, FXa
 Protein nach der Spaltung mit Faktor Xa. Das gespaltene Protein hat eine um den Strep-tag geringere Größe (B) als die ungespaltenen Proteinvarianten (A). (b) 12%
iges natives PA-Gel nach Coomassie-Färbung. Vor der Trennung wurden jeweils 5 µg Strep-TupA und gespaltenes TupA in 10 µl 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) 30 min auf Eis ohne Anion (0) bzw. mit 1 mM
Na₂WO₄ (W), Na₂MoO₄ (Mo) oder Na₂SO₄ (S) inkubiert. M Molekulargewichtsstandard. Mit
WO₄²⁻ bzw. MoO₄²⁻ inkubierte Proteine (D) liefen schneller als die anderen Proben (C).

Da TupA für die Kristallisation mehrfach angereichert wurde, wird im Folgenden eine Anreicherung als Beispiel dargestellt. Bei dieser Präparation war allen Puffern 1 mM Na₂WO₄ zugesetzt, um die Stabilität des Proteins zu verbessern (s. 3.2.1 auf S. 61). Es zeigte sich aber das Aufreinigungen ohne WO₄²⁻ ähnlich verliefen und zu einer vergleichbaren Ausbeute führten. Da das Protein aus der Anreicherung mit WO₄²⁻ nicht mehr für die Charakterisierung der Bindung verwendet werden konnte, wurde bei den meisten Anreicherungen kein Wolframat zugegeben.

Die Überproduktion des Fusionsproteins erfolgte in *Terrific Broth*. Die Induktion wurde bei einer OD_{600} von ca. 0,5 durch Zugabe von IPTG gestartet. Testexpressionen zeigten, dass mit einer Expressionstemperatur von 15 °C und einer Induktionsdauer von ca. 16 h sehr gute Ausbeuten erzielt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Im SDS-PA-Gel ist die Bande des Fusionsproteins deutlich bei ca. 80 kDa (theoretisch 87,0 kDa) zu sehen (Abb. 3.4).

Die Aufreinigung erfolgte über eine 50-ml-*chitin-beads*-Säule. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit 500 ml IMPACT-Wasch-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Rohextrakt-Bestandteile zu entfernen, und anschließend mit 150 ml DTT-haltigem Spaltpuf-



3. Experimente und Ergebnisse

Abbildung 3.4.: Produktion von TupA mit N-terminaler Intein-CBD-Fusion.

10%
iges SDS-PA-Gel nach Coomassie-Färbung mit Zelle
extrakten von nicht induzierten Zellen (15 µl Kultur) und nach 16 h
 Induktion bei 15 °C (5 µl). Die Zellextrakte wurden durch Erhitzen der Proben im SDS-Proben
puffer (10 min bei 95 °C) erhalten. Das Größe des Fusionsproteins ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. M
 Molekulargewichtsstandard.

fer gespült. Im Elutionsprofil (Abb. 3.5a) ist zu erkennen, dass während des Umpufferns auf den Spaltpuffer kaum Protein eluiert wurde, da die Spaltungsreaktion sehr langsam verläuft. Um eine möglichst große Ausbeute zu erzielen, wurde die Säule 16 h bei 10 °C inkubiert. Bei der anschließenden Elution mit 100 ml Puffer wurde das Protein fraktioniert gesammelt (je 10 ml). Im SDS-PA-Gel (Abb. 3.5b) sieht man, dass TupA ohne Intein (ca. 29 kDa, theore-tisch 28,6 kDa) den größten Anteil am Gesamtprotein im Eluat hat. Vor allem in den ersten Fraktionen ist aber zusätzlich eine Bande bei ca. 80 kDa zu sehen, welche dem ungespaltenen Fusionsprotein entspricht.

Um die beiden Proteine voneinander zu trennen, wurde ein Gelfiltrationsschritt angeschlossen. Dafür war es notwendig, zuerst das DTT durch Dialyse aus den vereinigten Fraktionen 1 - 8 zu entfernen, da dieses sonst bei der Konzentrierung zu einem Niederschlag führte, und die Proteinsuspension anschließend auf ca. 5 ml einzuengen. Das Elutionsprofil der Gelfitration ist in Abb. 3.6a auf S. 61 dargestellt. Es sind drei Hauptmaxima zu erkennen. Während die Fraktionen des ersten Maximums (um 160 ml) nur wenig Protein (wahrscheinlich Aggregate) und die des dritten kaum Protein enthielten (um 500 ml), konnte TupA in den Fraktionen des zweiten Maximums (um 220 ml) nachgewiesen werden (Abb. 3.6b auf S. 61). Das ungespaltene Fusionsprotein befand sich in den Fraktionen 16 - 22 (180 - 210 ml), während die TupA-Konzentration ein Maximum in der Fraktion 28 erreichte. Im Gel sieht man außerdem Banden unterhalb von TupA, die wahrscheinlich auf einen Abbau des Proteins zurückzuführen sind. Diese konnten in anderen Aufreinigungen nicht reproduziert werden (Daten nicht



Abbildung 3.5.: Affinitätschromatographie des TupA-Intein-CBD-Fusionsproteins an *chitin beads*.

(a) Chromatogramm. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm am Ausgang der Säule. Die einzelnen Chromatographieschritte sind gekennzeichnet, wobei der Waschschritt nicht vollständig abgebildet ist. Das Maximum der Elution von TupA ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (b) 12% iges SDS-PA-Gel nach Coomassie-Färbung mit Proben aus den Fraktionen der TupA-Trennung an *chitin beads* (je 10 μ l). D: Durchlauf, WS Waschen/Spaltung, 1 – 10 Elutionsfraktionen, M Molekulargewichtsstandard. Die Größen des Fusionsproteins (A) und des gespaltenen TupA (B) sind durch Pfeile markiert.

gezeigt). Die Fraktionen 24 - 28 (220 - 240 ml) wurden vereinigt, auf ca. 4 ml konzentriert und gegen TupA-Lagerpuffer dialysiert.

Es wurde eine Ausbeute von ca. 30 mg TupA je Liter Kultur erhalten. Für die Kristallisation konnte eine Proteinkonzentration von etwa 15 mg·ml⁻¹ erreicht werden, höhere Konzentrationen führten zu einem Niederschlag.

Das IMPACT-System erwies sich nach der Optimierung als das am besten geeignete System zur Expression und Aufreinigung von TupA. Deshalb wurde für alle weiteren Arbeiten, wenn nicht anders angegeben, TupA verwendet, das mit Hilfe dieses Systems gewonnen worden ist.

3.2. Biochemische und biophysikalische Charakterisierung von TupA aus *E. acidaminophilum*

Bei der Charakterisierung der Anionenbindung durch TupA wurde versucht, trotz verschiedener Methoden, vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Deshalb wurden alle Experimente, wenn nicht anders angegeben, bei 10 °C und pH 8,0 durchgeführt. Obwohl physiologischen Bedingungen eine etwas höhere Temperatur und ein niedrigerer pH-Wert entsprochen hätten, wurden diese Bedingungen gewählt, da sie eine hohe Stabilität des Proteins und der



Abbildung 3.6.: Gelfiltration von TupA über die Säule S-100-HR.

(a) Chromatogramm. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm am Ausgang der Säule. Das Maximum der TupA-Konzentration ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (b) 12% iges SDS-PA-Gel nach Coomassie-Färbung mit Proben aus den Fraktionen der Gelfiltration (12 – 40, je 5 μl) und einem Molekulargewichtsstandard (M). Die Größen des Fusionsproteins (A) und des gespaltenen TupA (B) sind durch Pfeile markiert.

Anionen — einige Anionen wie Wolframat und Molybdat neigen bei niedrigen pH-Werten zur Polyanionenbildung — auch über mehrere Stunden gewährleisten.

3.2.1. Dynamische Lichtstreuung

Mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (*Dynamic Light Scattering, DLS*) sollten die Lagerungsbedingungen des zu kristallisierenden Proteins TupA optimiert werden. Das DLS wird verwendet, um die Dispersität von Proteinen zu messen. Für die Kristallisation ist es wünschenswert, monodisperse Proteine vorliegen zu haben, da auftretende Aggregate und Oligomere die Kristallgitter-Bildung stören können. In den DLS-Experimenten wurde beobachtet, dass in der konzentrierten TupA-Suspension nach der Aufreinigung neben dem Monomer des Proteins (ca. 30 kDa) auch Partikel mit einem größeren Molekulargewicht (> 100 kDa) vorhanden waren (Daten nicht gezeigt). Diese konnten durch eine Filtration durch einen 100-kDa-Konzentrator abgetrennt werden, wurden jedoch bei Lagerung auf Eis wieder gebildet. Daher wurde angenommen, dass es sich dabei um Aggregate von TupA handelte.

Durch Zusatz von 50 mM NaCl und 1 mM Natriumwolframat zum Puffer konnte die Neubildung von Aggregaten wesentlich verringert werden. Aus diesem Grund wurde anfangs allen Puffern zur Aufreinigung und Lagerung von TupA Wolframat zugesetzt. Da sich später zeigte, dass Wolframat bei der Kristallisation störend wirkt, wurde das Anion nur noch bei Bedarf zugegeben. Außerdem war es nicht möglich, mit Wolframat gelagertes Protein für Bindungsstudien zu verwenden, da Wolframat durch Dialyse gegen wolframatfreien Puffer nicht wieder vom Protein getrennt werden konnte. Die Konzentration der Aggregate war relativ gering, sodass sie bei Berechnungen nicht berücksichtigt wurden. Bei einigen Experimenten wurde aber eine Bindungs-Stöchiometrie von weniger als 1 : 1 (Anion : TupA) bestimmt (siehe unten), die ein Hinweis auf das Vorhandensein von nicht aktivem TupA sein könnte.

Es wurde zusätzlich geprüft, welchen Einfluss der pH-Wert des Puffers auf die Dispersität hat. Der bei der Aufreinigung verwendete Puffer (Tris/HCl, pH 8,0) erwies sich als einer der am besten geeigneten (Daten nicht gezeigt), sodass er auch in weiteren Experimenten verwendet wurde.

3.2.2. Gel-Mobilitätsshift-Assay

Gel-Mobilitätsshift-Experimente zur Untersuchung der Anionenbindung von TupA wurden von MAKDESSI *et al.* (2001) etabliert. Die Bindung von Anionen führt zu einer Ladungsänderung am Protein und damit zur einer Veränderung des Laufverhaltens im nativen Polyacrylamidgel. Da auch die Anionen aufgrund ihrer Ladung im elektrischen Feld bewegt werden, kann die Methode nur zur qualitativen Kontrolle der Bindungseigenschaften eingesetzt werden. Durch die elektrophoretische Trennung im nativen Polyacrylamidgel konnte neben der Anionen-Bindungseigenschaften auch die strukturelle Homogenität des Protein-Monomers vor der Kristallisation geprüft werden. Multimere bzw. Aggregate bewegen sich im Gel langsamer als das Monomer, und nicht "korrekt" gefaltetes Protein zeigt im Allgemeinen auch ein anderes Laufverhalten.

Ohne Wolframat aufgereinigtes TupA konnte im Assay mit verschiedenen Oxyanionen getestet werden. Dazu wurde das Protein (in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0) vor der Elektrophorese mit den Natriumsalzen der Anionen inkubiert. Neben Wolframat und Molybdat wurden Perchlorat, Chromat, Hydrogenphosphat, Sulfat, Selenat und Vanadat¹ eingesetzt (Abb. 3.7). Nur Wolframat führte zu einer Erhöhung der Laufgeschwindigkeit, alle anderen Anionen verändern das Laufverhalten bei einer Konzentration von bis zu 10 mM nicht.

Wenn den Puffern während der Reinigung von TupA Wolframat zugesetzt war, konnte durch Vergleich mit wolframatfreiem TupA gezeigt werden, dass das Anion noch an TupA gebunden blieb. Es war nicht möglich, Wolframat durch Dialyse gegen einen Puffer, dem kein Wolframat zugesetzt worden war, wieder vom Protein zu trennen.

In Abb. 3.7 ist außerdem zu sehen, dass das eingesetzte Protein sehr homogen in Bezug auf das Laufverhalten ist. Es waren kaum durch Abbauprodukte verursachte Banden unterhalb von TupA vorhanden, und es gab auch keine Proteinbanden oberhalb von TupA, wodurch

¹In den Gel-Mobilitätsshift-Experimenten wurde Natriummetavanadat (NaVO₃) eingesetzt, um die Ergebnisse von MAKDESSI *et al.* (2001) reproduzieren zu können. In anderen Experimenten wurde dann Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) verwendet. Da bei pH 8,0 Vanadat in abgestandenen Lösungen als eine Mischung von verschiedenen Formen vorliegt (GARNER *et al.* 1997), sollten die Ergebnisse vergleichbar sein.



Abbildung 3.7.: Gel-Mobilitätsshift-Assay mit TupA und verschiedenen Anionen.

12% iges natives PA-Gel nach Coomassie-Färbung. Vor der Trennung wurden jeweils 15 µg TupA in 10 µl 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) 30 min auf Eis ohne Anion (–) bzw. mit 1 mM Na₂ClO₄ (Cl), Na₂CrO₄ (Cr), Na₂MoO₄ (Mo), Na₂HPO₄ (P), Na₂SO₄ (S), Na₂SeO₃ (Se), NaVO₃ (V) und Na₂WO₄ (W) inkubiert. Die Größen von freiem TupA (A) und TupA mit gebundenem Anion (B) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

gezeigt werden konnte, dass TupA auch bei hohen Konzentrationen (> $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) im nativen Gel keine Oligomere bildete.

3.2.3. Fluoreszenzspektroskopie

Der Gel-Mobilitätsshift-Assay konnte nur für qualitative Bindungsstudien verwendet werden, sodass die Methode nur zur Qualitätskontrolle und als Aktivitätstest nach der Aufreinigung des überproduzierten Proteins Verwendung fand. Um die Bestimmung von Dissoziationskonstanten zu ermöglichen, wurde versucht, andere Methoden zur Untersuchung der Protein-Anion-Wechselwirkungen zu etablieren. Da TupA aus *E. acidaminophilum* zwei Tryptophanyl-, acht Phenylalanyl- und neun Tyrosyl-Reste besitzt und auch bei anderen Anionenbindeproteinen die Bindung über eine Fluoreszenzveränderung verfolgt werden konnte (IMPERIAL *et al.* 1998; GRUNDEN *et al.* 1999), sollte versucht werden, die intrinsische Fluoreszenz von TupA für Bindungsstudien zu verwenden.

Die Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm (in 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl). Das Maximum des Emissionsspektrums von TupA ohne Anion befindet sich bei etwa 321 nm (Abb. 3.8). Bei Zugabe von Wolframat kam es zu einer Fluoreszenzminderung um maximal 12% im Emissionsmaxium. Diese maximale Löschung wurde bereits bei Zugabe einer äquimolaren Menge WO_4^{2-} zum Protein erreicht. Molybdat führte ebenfalls zu einer Verringerung der Fluoreszenz (bei Sättigung ca. 30%). Um die maximale Löschung zu erreichen, musste Molybdat etwa 1 mM zugesetzt werden (Proteinkonzentration ca. 100 nM). Bei beiden Ionen kam es zu einer leichten Rotverschiebung



Abbildung 3.8.: Fluoreszenzspektren von Wildtyp-TupA. 10 nM TupA in 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl pH 8,0 wurde mit den Natriumsalzen von Sulfat, Molybdat und Wolframat inkubiert. Die Emission wurde bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm gemessen. Die Endkonzentrationen sind der Legende zu entnehmen.

des Emissionsmaximums um 2 nm (auf 323 nm). Die Differenzspektren zwischen freiem TupA und TupA mit gebundenem Anion haben ein Maximum bei etwa 322 nm und weisen keine anderen Extrema oder Nullstellen auf. Bei sehr hohen Konzentrationen (> 1 mM) führte Molybdat wieder zu einer Zunahme der Fluoreszenz. Die Ursache ist unbekannt. Es könnte sich z. B. um Wolframatspuren in der Molybdatlösung handeln. Es wurden weitere Spektren mit anderen Oxyanionen aufgenommen, aber diese zeigten, bis auf Phosphat, Chromat und Vanadat, nur eine sehr geringe Fluoreszenzlöschung (bis zu 2%, vgl. Tab. 3.5 auf S. 78), die auf eine Verdünnung des Proteins zurückgeführt werden kann. Es ist daher nicht möglich, für diese Ionen aufgrund der Fluoreszenzlöschungsexperimente eine Aussage über eine Bindung an TupA zu treffen.

Vanadat und Chromat zeigten einen sehr starken Effekt, der aber wahrscheinlich nicht auf eine Veränderung der intrinsischen Fluoreszenz des Proteins zurückzuführen ist, sondern durch eine dynamische Löschung hervorgerufen wurde. Diese war relativ unabhängig vom Protein-Ligand-Verhältnis und proportional zur Ionenkonzentration. Außerdem kam es nicht zu einer Sättigung. Beide Ionen absorbieren im UV/Vis-Bereich zwischen 280 und 400 nm (Daten nicht gezeigt, vgl. SCHILLER & THILO 1961), wodurch diese These unterstützt wurde.

Phosphat hatte ebenfalls einen Effekt auf die Fluoreszenz (ca. 8% Löschung bei Zugabe von 300 μ M HPO₄²⁻ zu 100 nM TupA). Es konnte nicht gezeigt werden, dass dieser Effekt

eine Sättigung erreicht. Wenn die Löschung auf eine Bindung zurückzuführen ist, liegt die Dissoziationskonstante über 2 mM.

Neben den Oxyanionen wurde auch getestet, ob eine Fluoreszenzlöschung bei Zugabe von geringen Citrat-Konzentrationen zu beobachten ist, da Citrat als Kristallisationspuffer eingesetzt wurde (vgl. 2.2.5.1 auf S. 48). Die Anwesenheit von Citrat (bis 200 μ M) führte aber zu keiner Veränderung der intrinsischen Fluoreszenz von TupA. Es wurde auch kein Effekt von Citrat auf die Wolframatbindung an TupA beobachtet.

Die Zugabe einer im Verhältnis zum Protein mindestens äquimolaren Menge Wolframat führte unabhängig von den in der Lösung außerdem enthaltenen Anionen (mit Ausnahme von $\operatorname{CrO}_4^{2-}$ und VO_4^{3-} aufgrund der oben genannten Absorption) zum gleichen Spektrum wie bei Einzelgabe von WO_4^{2-} (Abb. 3.8). Daraus lässt sich schließen, dass die Bindung von Wolframat durch andere Ionen nicht behindert wird. Da bei molybdatgebundenem TupA die Fluoreszenzlöschung bei der Zugabe von Wolframat von 30% auf 12% zurückging und umgekehrt Molybdat bei Anwesenheit von Wolframat keinen Einfluss auf die Fluoreszenz von TupA hatte, kann man davon ausgehen, dass Wolframat Molybdat vom Protein verdrängt und wahrscheinlich beide Anionen an der gleichen Bindestelle binden, sich aber in ihrem Effekt auf die beobachteten aromatischen Aminosäuren unterscheiden.

Mit Wolframat und Molybdat, die zu einer Löschung der intrinsischen Fluoreszenz von TupA führten, wurden Gleichgewichts-Titrationskurven aufgenommen. Dabei wurde 10 – 100 nM TupA eingesetzt und schrittweise Anionen-Stammlösung hinzutitriert. Bei jedem Schritt erfolgte nach Erreichen des Gleichgewichts (konstante Fluoreszenz) die Messung der Emission bei einer Wellenlänge von 320 nm (Abb. 3.9). Es konnte gezeigt werden, dass Wolframat zu einer tight-binding-Kurve führte, d. h. die Fluoreszenzintensität nahm linear zur Wolframatkonzentration ab, bis eine molare Stöchiometrie von 0.7 - 1 (WO₄²⁻ : TupA-Monomer) erreicht war. Bei höheren Wolframatkonzentrationen wurde kein weiterer Effekt beobachtet. Für die Bindung von Molybdat ergab die Auswertung Kurven mit hyperbolem Verlauf. Die Fluoreszenzlöschung war bei kleinen Konzentrationen wesentlich geringer als mit Wolframat, und eine Sättigung wurde erst viel später erreicht. Dass oftmals keine Stöchiometrie von 1:1 bei der Titration erreicht wurde, ist entweder auf einen systematischen Fehler bei der Proteinbestimmung (s. 2.2.7.1 auf S. 50) oder auf Spuren von Wolframat in den verwendeten Chemikalien zurückzuführen. Letzteres würde dazu führen, dass ein Teil des Proteins schon während der Aufreinigung Wolframat bindet. Weitere Ursachen könnten in der bei den DLS-Experimenten beobachteten Aggregatbildung (s. 3.2.1 auf S. 61) oder im Vorliegen von denaturiertem, nicht mehr bindenden TupA zu finden sein.

Die Titrations-Kurven führten zu einer scheinbar größeren Fluoreszenzlöschung als bei der Aufnahme der Spektren (s. o.) angegeben. Dies ist auf die Verdünnung der Probe zurückzuführen, da die intrinsische Fluoreszenz von TupA konzentrationsabhängig ist. Bei der



Abbildung 3.9.: Fluoreszenztitration von TupA mit Wolframat und Molybdat. Titrationskurven ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 320 \text{ nm}$) von TupA und *Strep*-TupA mit Na₂WO₄ und Na₂MoO₄ (in 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl). Die Proteinkonzentration betrug 286 nM (TupA) bzw. 100 nM (*Strep*-TupA). Die Zugabe der Anionenstammlösung (ca. 1 : 1000) erfolgte schrittweise, die Messung wurde 30 – 60 s nach der Zugabe durchgeführt. Jeweils 2 Wiederholungen eines Experiments sind dargestellt. Die Linien stellen die angepassten Bindungs-Kurven dar, die Symbole geben die experimentellen Daten wieder. — TupA, … *Strep*-TupA, \diamond Na₂WO₄, + Na₂MoO₄. Das eingefügte Diagramm zeigt den Kurvenverlauf bei hohen Anionenkonzentrationen.

Berechnung von Dissoziationskonstanten wurde diese Verdünnung einbezogen, indem jedem Punkt die tatsächliche Proteinkonzentration zugeordnet worden ist.

Durch die Titrationskurven konnte auch gezeigt werden, dass sich *Strep*-TupA und das verkürzte TupA aus der Aufreinigung mit dem IMPACT-System in ihrem Fluoreszenzverhalten nicht unterscheiden (Abb. 3.8 auf S. 64). Die Abweichungen der Kurven sind auf die genannte Verdünnung und die unterschiedliche Konzentration des Proteins zurückzuführen.

Mit Hilfe der Titrationskurven konnten die Gleichgewichts- bzw. Dissoziationskonstanten berechnet werden (Anhang A.1 auf S. 147). Für Molybdat wurde eine Dissoziationskonstante von ca. 1,3 μ M bestimmt. Die Dissoziationskonstante für Wolframat ist kleiner als < 1 nM. Ein genauerer Wert ließ sich aus der Titrationskurve nicht ermitteln, da die eingesetzte Proteinkonzentration (> 10 nM) relativ hoch war und das Signal-Rauschverhältnis die Messung bei geringeren Konzentrationen nicht ermöglichte. Um den Wert zu erhalten, wäre es notwendig, entweder kompetitive Experimente mit Molybdat in der Lösung durchzuführen oder ein Fluoreszenzspektrometer mit größerer Empfindlichkeit zu verwenden. Es wurde die erste Möglichkeit gewählt. Dabei wurde TupA mit bis zu 1 mM Molybdat präinkubiert, erst dann erfolgte die Titration mit Wolframat, aber auch hier wurde nur eine *tight binding*-Kurve erhalten. Unter Einbeziehung der Dissoziationskonstanten von Molybdat ist die Dissoziationskonstante für Wolframat auf $\leq 1,3$ pM zu schätzen (Formel A.21 auf S. 150). Da der Unterschied zwischen den Dissoziationskonstanten von Wolframat und Molybdat sehr groß ist (Faktor 10⁶), lässt sich kein genauer Wert für Wolframat berechnen.

Um die Bindung von Vanadat messen zu können, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem Vanadat gegen TupA ohne Anion und gegen wolframatgebundenes TupA titriert wurde. Falls ausschließlich eine dynamische Löschung beobachtet wird, sollten beide Kurven etwa die gleiche Form haben, wobei die Kurve des wolframatgebundenen TupA um ca. 12% nach unten verschoben ist. Wenn Vanadat in der gleichen Bindestelle wie Wolframat, aber mit einer größeren Dissoziationskonstante an TupA bindet und dabei eine Veränderung der Fluoreszenz von aromatischen Aminosäuren bewirkt, dann wäre die Kurve mit wolframatgebundenem TupA in ihrem Anstieg flacher als die ohne WO_4^{2-} . Da beide Kurven die gleiche Form hatten (Daten nicht gezeigt), konnte nicht nachgewiesen werden, ob Vanadat gebunden wird (vgl. dagegen 3.2.7 auf S. 77). Um eine Vanadatbindung nachweisen zu können, müssten andere Methoden, wie die isothermische Titrationskalorimetrie, mit dem Anion durchgeführt werden.

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Bindung von unterschiedlichen Anionen bei verschiedenen pH-Werten getestet. Die Messung erfolgte nur qualitativ, weil für Wolframat bei pH 8,0 kein genauer Vergleichswert für die Dissoziationskonstante bestimmt werden konnte. Außerdem ist bekannt, dass einige der verwendeten Oxyanionen (z. B. MoO_4^{2-} und WO_4^{2-}) in Abhängigkeit vom pH-Wert polymerisieren (BARRÉ *et al.* 2005). Quantitative Unterschiede bei der Fluoreszenzlöschung würden daher keine Rückschlüsse auf ein verändertes Bindungsverhalten gegenüber einer Anionenspezies zulassen. Der Messung müsste eine genaue Analyse der vorhandenen Anionen vorausgehen, um verlässliche Ergebnisse zu liefern. Es konnten keine Puffer verwendet werden, deren Anionen mit der Bindestelle wechselwirken können (wie Phosphat oder Citrat). Um eine Denaturierung zu erkennen, wurde vor der Zugabe von Anionen überprüft, ob das Protein im jeweiligen Puffer eine über mehrere Minuten konstante Fluoreszenz zeigt. Es wurden Spektren mit Wolframat, Molybdat und Citrat aufgenommen. Letzteres wurde getestet, da es bei der Kristallisation als Puffer Verwendung fand. Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse zusammen.

Das TupA-Spektrum war relativ unabhängig vom pH-Wert, es hatte stets ein Maximum bei etwa 320 nm, dass bei geringeren pH-Werten eine Rotverschiebung um 1 nm zeigte. Mit Wolframat und Molybdat wurde eine Fluoreszenzlöschung beobachtet, während Citrat keinen Einfluss auf das Spektrum hatte. Das Verhalten mit WO_4^{2-} und MoO_4^{2-} war sich sehr ähnlich: beide Ionen führten bei niedrigeren pH-Werten zu einer stärkeren Fluoreszenzlöschung, die auch gesättigt werden konnte (mit 100 μ M Anion war noch keine Sättigung erreicht). Molybdat zeigte bei pH 5 – 8 einen stärkeren Effekt auf die Fluoreszenz als Wolframat, konnte aber durch dieses verdrängt werden, d. h. die Löschung verringerte sich bei Zugabe von Wolframat. Im Unterschied zu den bei pH 8,0 durchgeführten Experimenten, hatte aber

pH-Wert (Puffer)	λ_{\max}	${ m WO_4^{2-}}$ ${ m MoO_4^{2-}}$		Citrat		
	[nm]	Fluoreszenzlöschung [%]				
8,0 (Tris)	320	11,2	32,2	0,6		
7,0 (Bis-Tris)	319	14,2	34,1	0,8		
6,0 (Bis-Tris)	319	13,8	44,4	-0, 11		
5,0 (Propionat)	319	20,8	34,0	$1,\!0$		

Tabelle 3.1.: Fluoreszenzexperimente mit TupA in verschiedenen Puffern.

Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung vom pH-Wert bei Zugabe von jeweils 100 μ M Anion (100 nM TupA in jeweils 100 mM Puffer, 100 mM NaCl,). Der Wert wurde jeweils im Emissionsmaxium (λ_{\max}) des Spektrums bestimmt.

Molybdat, besonders bei pH 5 und 6 einen Einfluss auf die Fluoreszenz, auch wenn 100 μ M Wolframat in der Lösung vorlagen. Es ist also möglich, dass bei diesen pH-Werten die Dissoziationskonstanten für beide Anionen höher liegen als bei pH 8,0 und sie deshalb um die Bindestelle konkurrieren müssen. Wie oben erwähnt, sind aber quantitative Aussagen nicht möglich, ohne die vorhandenen Anionenspezies und deren Wechselwirkungen untereinander zu kennen.

3.2.4. Circulardichroismus-Spektroskopie

Circulardichroismus (CD) ist eine spektroskopische Methode, bei der die Differenz der Absorption von rechts- und linkszirkulär polarisiertem Licht gemessen wird. Da die molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\rm R}$ und $\epsilon_{\rm L}$ sich nur bei chiralen Molekülen unterscheiden, besitzt die Methode eine größere Selektivität als die einfache Absorptions-Messung. Die Methode wird besonders häufig verwendet, um Sekundärstrukturen durch Messung der an der Peptidbindung beteiligten Orbitale in Proteinen zu bestimmen und deren Veränderung bei der Faltung bzw. Entfaltung zu beobachten. Dazu wird polarisiertes Licht kürzerer Wellenlängen (190 – 240 nm) verwendet. Außerdem können mit Hilfe der CD-Spektroskopie im Bereich 240 – 300 nm auch Veränderungen in der Umgebung von aromatischen Aminosäuren gemessen werden. CD im Bereich des sichtbaren Lichtes kann auch genutzt werden, um die Bindung von Übergangsmetallen an Proteine zu messen (KLEWPATINOND & VILES 2007).

Die Untersuchung von TupA mittels CD wurde aus verschiedenen Gründen durchgeführt. Zum einen sollte mit dem Spektrum überprüft werden, ob die Sekundärstrukturen des Proteins in Lösung denen im Kristall entsprechen, zum anderen wurde die CD-Spektroskopie als eine weitere Methode zur Untersuchung der Bindung zwischen Protein und den anionischen Liganden eingesetzt. Außerdem sollte die CD-Spektroskopie als Qualitätskontrolle dienen, um bei weiteren Aufreinigungen eine "korrekte" Faltung sicherzustellen.



Abbildung 3.10.: Circulardichroismus-Spektren von TupA.

Die Spektren wurden aufgenommen mit 7 μ M (190 – 250 nm) bzw. 97 μ M (250 – 330 nm) Protein in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 und 100 mM NaCl. Dargestellt sind jeweils die Spektren ohne zugesetztes Anion (— \diamond —), mit Wolframat($\cdots \Box \cdots$) und mit Molybdat (– – + – –). Die Anionen wurden in den Konzentration 10 μ M (Fern-UV) bzw. 100 μ M (Nah-UV) zugesetzt.

Es wurden sowohl Spektren im Fern-UV-Bereich (190 – 250 nm), als auch im Nah-UV-Bereich (250 – 330 nm) aufgenommen. Für die Messung wurden 7 μ M (Fern-UV) bzw. 97 μ M (Nah-UV) TupA eingesetzt. Die Spektren wurden einmal ohne Zusatz von Anionen, und dann in Gegenwart von Wolframat und von Molybdat aufgezeichnet (Abb. 3.10). Während die in den Fern-UV-Spektren beobachteten Signale auf die Peptidbindung, und damit indirekt auf Sekundärstrukturen, zurückzuführen sind, sollten im Nah-UV-Bereich die Signale der aromatischen Aminosäuren dominieren (vgl. Fluoreszenz, 3.2.3 auf S. 63).

Das TupA-Spektrum im Fern-UV-Bereich (Abb. 3.10) zeigt deutlich Minima bei 210 nm und 220 nm, die ihre Ursache in α -Helices haben können — theoretisch liegen diese Minima bei 208 und 220 nm (BULHELLER *et al.* 2007). Es wäre noch ein Maximum bei 192 nm zu erwarten, das aber wahrscheinlich durch die Überlagerung mit einem β -Faltblatt-Spektrum (theoretisches Maximum bei ca. 196 nm und Minimum bei 217 nm) auf 200 nm verschoben ist. Es wurde versucht, den Anteil der Sekundärstrukturen mit Hilfe von verschiedenen Dekonvolutionsverfahren zu berechnen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die aus den Daten berechneten Spektren sind in Abb. 3.11 auf S. 71 zusammen mit einem experimentellen Spektrum dargestellt.

Das vom Bestimmtheitsmaß beste Ergebnis lieferte der CDSSTR-Algorithmus ($R^2 = 99,9$). Der Vergleich der berechneten Werte dieses Programms mit den aus der Struktur gewonnenen Daten zeigte, dass sie etwa den erwarteten entsprechen. Andere Berechnungsverfahren

Tabelle 3.2.: Auswertung der Fern-UV-CD-Spektren.

Mit Hilfe verschiedener Programme durch Dekonvolution berechnete Anteile der einzelnen Sekundärstrukturen an der Struktur von TupA in wässriger Lösung. Zur Berechnung wurden 5 Spektren von TupA zusammengefasst. (Spektrenaufnahme wie in Abb. 3.10). Die letzte Zeile gibt die aus der Kristallstruktur (s. 3.3 auf S. 80) berechneten Sekundärstruktur-Anteile wieder.

Programm	α-Helix	β -Faltblatt	β- <i>Turn</i>	Sonstige	R^2
			[%]		
$CDSSTR^{a}$	$50,\!6$	17,2	13,2	18,5	$99,\!9$
$\operatorname{CONTIN}^{b}$	22	24	17	34	$99,\!4$
$\mathbf{CONTINLL}^{c}$	81	18	0	1	$98,\! 6$
GF^d	18,2	$20,\!3$	32,2	29,3	$95,\!0$
$LINCOMB^{e}$	26,7	$18,\! 6$	28,2	26,5	$94,\!1$
$\mathrm{K2D}^{f}$	63	6		31	$97,\!4$
MLR^g	$25,\!9$	$10,\!3$	$31,\!9$	$31,\!9$	$94,\!5$
$SELCON3^{h}$	81,5	0	4,7	15,2	92,0
$\operatorname{Struktur}^{i}$	40,4	21,5	12,5	$25,\!6$	

^aJOHNSON (1999) und SREERAMA & WOODY (2000) mit Referenzdatensatz SP43

^bProvencher & Glöckner (1981) mit Referenz inkl. SW17(Sreerama & Woody 1993)

^cProvencher & Glöckner (1981) und (Sreerama & Woody 2000) mit SP43

^dGreenfield & Fasman (1969) mit SW17(Sreerama & Woody 1993)

^ePERCZEL et al. (1992) mit Referenz von YANG et al. (1986)

^fANDRADE *et al.* (1993)

 g Brahms & Brahms (1980)

^hSreerama & Woody (2000) mit SP43

 i Zuordnung mit STRIDE (FRISHMAN & ARGOS 1995) und dem Modell TupAW1 als Eingabedatei

lieferten weniger hohe Werte für R^2 , was neben den Algorithmen auch der Auswahl der Referenzdatensätze und strukturellen Eigenheiten des Proteins zur Last gelegt werden kann.

Bei der Zugabe von Wolframat und Molybdat wurde das Fern-UV-Spektrum nur im Bereich zwischen 208 und 220 nm geringfügig verändert, d. h. die Minima wurden flacher und das Spektrum wurde negativer. Dieser Effekt kann auf eine Veränderung im Protein, in diesem Falle eine Veränderung im Bereich der β -Faltblatt-Anteile zurückgeführt werden. Auch durch Fluoreszenzspektroskopie wurde gezeigt, dass aromatische Aminosäuren durch die Anionenbindung in ihrem Spektrum beeinflusst wurden (vgl. 3.2.3 auf S. 63). Dass dabei auch im Proteinrückgrat kleine Veränderungen stattfinden, ist nicht unwahrscheinlich.

Im Nah-UV-Spektrum ist deutlich ein breites Maximum um 280 nm zu erkennen (Abb. 3.10). Dieses ist auf das Vorhandensein von Tryptophan und anderen aromatischen Aminosäuren, besonders Tyrosin, im Protein zurückzuführen. Bei Zugabe von Wolframat bzw. Molybdat ist deutlich eine Aufspaltung und Verstärkung dieses Maximums zu sehen.



Abbildung 3.11.: Fern-UV-CD-Spektrum (190 – 240 nm) von TupA. Neben dem experimentellen Spektrum sind die mit Hilfe der Daten aus Tab. 3.2 berechneten Spektren dargestellt. Die Referenzen für die einzelnen Programme sind ebenfalls in dieser Tabelle aufgelistet. Das experimentelle Spektrum wurde unter den in Abb. 3.10 auf S. 69 genannten Bedingungen aufgenommen.



Abbildung 3.12.: CD-Spektroskopie — Titration von TupA mit Wolframat. Die Aufnahme der Spektren erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie für den Nah-UV-Bereich in Abb. 3.10 auf S. 69 angegeben (Proteinkonzentration 97 μM). Die Spektren sind (von unten nach oben) mit 0, 20, 40, 60, 80 und 100 μM Na₂WO₄ in der Lösung aufgenommen worden. In der kleinen Abbildung ist das "Differenz-CD-Signal" (Fläche der Differenzspektren, TupA ohne Na₂WO₄ als Referenz) gegen die Wolframatkonzentration aufgetragen.

Der beobachtete Effekt hat seine Ursache, wie auch die Veränderung des Fluoreszenzpektrums, wahrscheinlich in einer Verschiebung von aromatischen Aminosäuren während der Bindung. Die Aufspaltung des Maximums deutet darauf hin, dass wahrscheinlich mindestens zwei verschiedene, in dem Bereich zwischen 270 und 290 nm absorbierende Seitenketten durch die Zugabe von Wolframat bzw. Molybdat beeinflusst werden. Allerdings gibt das Spektrum die Summe aller Effekte wieder, so dass die Zuordnung einzelner Maxima schwierig ist. Es lässt sich auch nicht vorhersagen, ob es sich um Tyrosin- oder Tryptophanreste handelt, da diese zwar im freien Zustand sich im Absorptionsmaximum unterscheiden (Tyr 274 nm, Trp 278 nm), dieses aber im Protein aufgrund der Polarität in der unmittelbaren Umgebung verschoben sein kann und das Verhalten im CD-Spektrum nicht unbedingt mit dem Absorptionsspektrum korrelieren muss.

Trägt man die bei der Titration von TupA mit Wolframat (Abb. 3.12) unter den Differenzspektren (TupA ohne Wolframat als Referenz) entstehenden Flächen gegen die Wolframatkonzentration auf, so erhält man eine hyperbole Kurve (Abb. 3.12, kleines Diagramm), wobei durch das relativ kleine Signal-Rauschverhältnis die Genauigkeit der Messwerte gering ist. Die Sättigung des Effekts ist ein Hinweis darauf, dass er durch die Bindung des Anions verursacht ist. Da die Proteinkonzentration im Experiment wesentlich höher als die durch andere Methoden berechnete Dissoziationskonstante ist und die Spektren ein starkes Rauschen aufweisen, ist die Methode zur genauen Berechnung von Bindungskonstanten ungeeignet.

3.2.5. Isothermische Titrationskalorimetrie

Da sowohl bei der Fluoreszenzspektroskopie als auch Nah-UV-CD-Spektroskopie nur der Einfluss der Bindung auf die Umgebung der aromatischen Aminosäuren in die Messung einbezogen wird, wurde die Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC) als weitere Methode zur Untersuchung der Bindung von Anionen an TupA aus *E. acidaminophilum* herangezogen. Dabei wird die bei der Bindung umgesetzte Wärme direkt kalorimetrisch gemessen. Die Messung erfolgte durch Titration des Proteins mit den Anionen. Für die Auswertung wurde ein Modell mit einer Anionenbindestelle am Protein herangezogen. Die Verdünnungs- und Lösungsenthalpien wurden in Experimenten ohne Protein bestimmt und vor der Berechnung abgezogen.

Tabelle 3.3 fasst die durchgeführten Experimente und die dabei gemessenen Werte zusammen. Um die Unabhängigkeit der Ergebnisse von den Konzentrationen nachzuprüfen, wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen eingesetzt. Bei allen Experimenten wurde, wie auch bei den Fluoreszenz- und CD-Experimenten, eine Stöchiometrie von Anion : TupA von ca. 0,7 : 1 bestimmt. Da die verschiedenen Experimente mit Protein aus mehreren voneinander unabhängigen Aufreinigungen durchgeführt wurden, ist die Ursache nicht nur im Verlust des Bindungsvermögens des Proteins, bedingt durch schon besetzte Bindestellen oder
Tabelle 3.3.: ITC-Experimente.

Die Tabelle listet die jeweils eingesetzte Proteinkonzentration in der Messzelle (c_{Prot}) und die Anionenkonzentration in der Spritze (c_{Anion}), sowie die bei der Auswertung der Einzelexperimente bestimmten Werte für die Stöchiometrie (n, Anion : Protein), die gemessene Enthalpie (ΔH_{cal}) und die Gleichgewichtskonstante der Bindung (K_{a}) auf.

Anion	$c_{\mathbf{Prot}}$	$c_{\mathbf{Anion}}$	n	$\Delta H_{\mathbf{cal}}$	$K_{\mathbf{a}}$
	[µM]	[µM]		$[\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}]$	[M ⁻¹]
MoO_4^{2-}	33	0,25	0,72	-5,03	$1,64\cdot 10^6$
MoO_4^{2-}	8	$0,\!35$	0,70	-7,42	$4,59\cdot 10^5$
MoO_4^{2-}	16	$0,\!5$	$0,\!61$	-5,33	$1,36\cdot 10^6$
MoO_4^{2-}	8	1	$0,\!69$	-6,95	$5,87\cdot 10^5$
WO_4^{2-}	33	$0,\!3$	$0,\!69$	-15,30	$> 10^{10}$
WO_4^{2-}	8	$0,\!05$	$0,\!69$	-15,87	$> 10^{10}$
WO_4^{2-}	$6,\!6^{a}$	0,1	0,75	-15,06	$> 10^{10}$
SO_4^{2-}	16	10	b	b	_b

^{*a*}Verdrängungsexperiment mit 172 μ M MoO₄²⁻ in der Messzelle. Die Werte für ΔH_{cal} und K_a sind für WO₄²⁻ berechnet. ΔH_{cal} lag für die Verdrängung bei ca. 8 kcal·mol⁻¹ (Abb. 3.15 auf S. 75) ^{*b*} nicht messbar

anderweitig inaktiviertes TupA, zu suchen. Möglicherweise liegt der Fehler bei der Proteinbestimmung (Abschnitt 2.2.7.1 auf S. 50). Um dies zu überprüfen, müsste eine andere Methode als die verwendete photometrische Bestimmung zur Proteinbestimmung eingesetzt werden.

Wenn TupA mit Na₂MoO₄ titriert wurde, konnte reproduzierbar eine Wärmeabgabe ΔH_{cal} zwischen -5 und -7, 5 kcal·mol⁻¹ und eine Gleichgewichtskonstante K_a um 1 μ M⁻¹ berechnet werden. Die Bindungskurve zeigte eine für die Messung von einem Protein mit einer Bindestelle typische Form (Abb. 3.13).

Die Titration von TupA mit Na_2WO_4 führte zu einer *tight-binding*-Kurve (Abb. 3.14). Der genaue Wert für die Gleichgewichtskonstante konnte daher nicht bestimmt werden. Die gemessene Enthalpieveränderung lag zwischen -15 und -16 kcal·mol⁻¹ und ist damit ca. doppelt so hoch wie die für die Bindung von MoO_4^{2-} .

Es konnte in einem weiteren Experiment gezeigt werden, dass Molybdat durch Wolframat verdrängt wird. Die dabei frei werdende Wärme entspricht der Differenz zwischen der bei der Wolframatbindung und der Molybdatbindung frei werdenden Wärmeenergie von ca. 8 kcal·mol⁻¹ (Tab. 3.3). Auch durch dieses Experiment konnte die Gleichgewichtskonstante für Wolframat nicht exakt bestimmt werden, da die Kurvenform wieder der schon nur mit Wolframat erhaltenen entsprach (Abb. 3.15 auf S. 75). Für eine genaue Berechnung müssten Experimente mit höheren Molybdatkonzentrationen in der Lösung durchgeführt werden.



Abbildung 3.13.: ITC mit Natriummolybdat.

Titration von 8 μ M TupA mit 350 μ M Na₂MoO₄ in 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl. Die Titration erfolgte in 56 Schritten zu je 5 μ l bei 10 °C mit einer Zeit von jeweils 250 s. Die rechte Abbildung zeigt die integrierten Daten. Die Linie entspricht der angepassten Kurve für eine Bindestelle am Protein.



Abbildung 3.14.: ITC mit Natriumwolframat.

Titration von 8 $\mu\rm M$ Tup
A mit 50 $\mu\rm M$ Na $_2\rm WO_4$ in 10 m
M Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl. Die Titration erfolgte in 56 Schritten zu je 5
 $\mu\rm l$ bei 10 °C mit einer Zeit von jeweils 250 s. Die rechte Abbildung zeigt die integrierten Daten. Die Linie entspricht der angepassten Kurve für eine Bindestelle am Protein.



Abbildung 3.15.: ITC — Verdrängung von MoO_4^{2-} durch WO_4^{2-} .

Titration von 6,6 μ M TupA und 172 μ M Na₂MoO₄ mit 100 μ M Na₂WO₄ in 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl. Die Titration erfolgte in 56 Schritten zu je 5 μ l bei 10 °C mit einer Zeit von jeweils 250 s. Die rechte Abbildung stellt die integrierten Daten dar. Die Linie entspricht der angepassten Kurve für eine Bindestelle am Protein.

Tabelle 3.4 fasst die Ergebnisse der ITC zusammen. Die Berechnung dieser Werte erfolgte unter Einbeziehung aller in Tab. 3.3 auf S. 73 aufgeführten Experimente. Die Dissoziationskonstante von Molybdat beträgt nach dieser Berechnung 2,08 μ M, die für Wolframat konnte nicht genau bestimmt werden, da sie kleiner als 1 nM und somit unter der Nachweisgrenze der Methode liegt. Es ist aber möglich die Dissoziationskonstante aufgrund des Verdrängungsexperiments abzuschätzen. Mit Hilfe von Gleichung A.21 auf S. 150 kann für Wolframat eine obere Grenze von 1,2 pM bestimmt werden. Die in der Tabelle angegebenen Standardabweichungen sind sehr klein, da ein Großteil der Messpunkte unabhängig von K_a und ΔH_{cal} ist,

		WO_4^{2-}	${ m MoO}_4^{2-}$
$K_{\rm a}$	[µM ⁻¹]	$> 10^4$	$0,\!48~\pm~0,01$
$\Delta H_{\rm cal}$	$[\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}]$	$-15,72 \pm 0,05$	$-7,\!20~\pm~0,07$
$K_{\rm d}$	[µM]	$< 1,2 \cdot 10^{-6}$	$2,\!08$
ΔG°	$[\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}]$	< -12,96	-7,36
ΔS	$[cal \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}]$	> -9,78	$0,\!58$

Tabelle 3.4.: Zusammenfassung der Ergebnisse der ITC-Experimente.

Die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten K_a und der umgesetzten Wärme erfolgte mit dem Programm Sedphat. Die anderen Werte wurden mit Hilfe der thermodynamischen Gleichungen (Anhang A.2 auf S. 149) berechnet.

d. h. sich auf der Grundlinie befindet. Die Genauigkeit der berechneten Werte für die freie Energie und die Entropieänderung der Bindung kann deshalb nicht abgeschätzt werden.

3.2.6. Bindung von Thiowolframaten

Da angenommen wird, dass aufgrund des großen Schwefelgehaltes während der Entwicklung des Lebens in der erdgeschichtlichen Frühzeit mehr Thiowolframate und Thiomolybdate auf der Erde vorhanden waren als heute, wurde auch getestet, ob TupA in der Lage ist diese Verbindungen zu binden.

Für die Experimente standen Ammoniumsalze folgender Thiowolframate zur Verfügung: Dithiowolframat $((NH_4)_2WO_2S_2)$, Trithiowolframat $((NH_4)_2WOS_3)$ und Tetrathiowolframat $((NH_4)_2WS_4)$. Eine Untersuchung mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie war nicht möglich, da die Thiowolframate wie auch die Thiomolybdate farbig sind und im für die Fluoreszenz wichtigen Bereich zwischen 280 nm und 330 nm absorbieren. Es wurde deshalb zuerst im Gelmobilitätsshift-Assay geprüft, ob die Ionen einen Einfluss auf das Laufverhalten des Proteins haben. Es zeigte sich, dass nach Inkubation mit je 10 mM Anion TupA im nativen Gel keine Bindung beobachtet werden konnte bzw. nur ein sehr geringer Anteil des Proteins (< 5%) sein Laufverhalten änderte.

Da die Ionen alle im sichtbaren Bereich des Lichts absorbieren, wurden Versuche unternommen, die Bindung von Thiowolframaten im UV/Vis-Spektrum zu untersuchen. Es kann angenommen werden, dass die Spektren der Anionen sich durch Bindung an TupA verändern, da in der Bindungstasche andere Bedingungen vorzufinden sind als im Lösungsmittel.

Zuerst wurden Spektren der freien Thiowolframate aufgenommen. Die Maxima liegen bei 327 nm $((NH_4)_2WO_2S_2)$, 336 nm $((NH_4)_2WOS_3)$ und 393 nm $((NH_4)_2WS_4)$. Die Intensität der Banden nimmt mit zunehmendem S-Gehalt der Anionen zu (Abb. 3.16). Anschließend wurden zu den Anionenlösungen 36,6 µM TupA gegeben und ein weiterer Satz Spektren aufgenommen. Als Referenz wurde eine TupA-Suspension der gleichen Konzentration verwendet, da nur die Spektren der (möglicherweise gebundenen) Anionen aufgenommen werden sollten.

Um zu überprüfen, ob sich die Spektren durch eine mögliche Bindung verändert haben, wurden Differenzspektren aus den Spektren in An- und Abwesenheit von TupA berechnet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Differenzspektrum beobachtet werden, die Veränderung der Absorption lag im Wellenlängenbereich zwischen 320 nm und 450 nm bei unter 3%. Es konnte auch keine Verschiebung der Extrema beobachtet werden. Bei Wellenlängen unterhalb von 320 nm war die Veränderung etwas größer, was wahrscheinlich auf die Absorption des Proteins und geringe Konzentrationsunterschiede zwischen Mess- und Referenzküvette zurückzuführen ist.

Die Versuche wurden nicht weiterverfolgt, da die eingesetzte Anionen- und Proteinkonzentration sehr hoch war und daher bei der Auswertung ähnliche Probleme wie bei der



Abbildung 3.16.: Thiowolframat-Spektren. Es wurden jeweils 30 μM Thiowolframat eingesetzt. Die Messung erfolgte im Protein-Messpuffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl), der auch als Referenz diente.

Fluoreszenzspektroskopie aufgetreten wären. Bei geringeren Konzentrationen wäre das Signal-Rausch-Verhältnis entsprechend kleiner gewesen. Außerdem bestand keine Möglichkeit eventuell vorhandenes Wolframat in der Lösung neben den Thiowolframaten nachzuweisen.

Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Methoden konnte die Bindung von Thiowolframaten an TupA nicht nachgewiesen werden. Es müssten andere Techniken wie die ITC für die Messung verwendet werden. Dabei ist aber sicherzustellen, dass die Thiowolframate über den langen Messzeitraum stabil sind bzw. der Anteil von WO_4^{2-} vor, während und nach der Messung bestimmt werden kann.

3.2.7. Einfluss von Aminosäureaustauschen auf die Anionenbindung

Zur weiteren Untersuchung der Bindung wurden Messungen mit *Strep*-TupA, bei dem jeweils eine Aminosäure ausgetauscht war, durchgeführt. Es wurden drei hochkonservierte Aminosäuren, für die eine Funktion bei der Bindung des Anions postuliert werden konnte, zum Austausch ausgewählt (s. 3.3.4 auf S. 86). Zum einen wurde Serin⁴⁷ gegen Alanin ausgetauscht, um zu sehen, ob die Hydroxylgruppe eine Rolle spielt. Außerdem wurde das in die Bindetasche hineinragende konservierte Histidin⁹⁴ gegen Lysin bzw. Tyrosin ausgetauscht. Arginin¹⁵⁶, das nicht nur bei den TupA-Homologen sondern auch bei Phosphatbindeproteinen konserviert ist und dort auch eine Funktion bei der Bindung übernimmt (WANG *et al.* 1997), wurde gegen Lysin bzw. Leucin ausgetauscht. Die Messung des Bindungsverhaltens Fluoreszenzlöschung in % für den "Wildtyp" und fünf *Strep*-TupA-Varianten, bei denen jeweils eine Aminosäure ausgetauscht war, bei Zugabe von jeweils 200 µM Anion zu 100 nM Protein (in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl). Der Wert wurde jeweils im Maximum des Emissionspektrums gemessen (ca. 321 nm). Eine negative Zahl bedeutet eine Erhöhung der Fluoreszenz bei Zugabe

Protein	WO_4^{2-}	MoO_4^{2-}	SO_4^{2-}	SeO_3^{2-}	PO_4^{3-}	ClO_4^{-}	Citrat	VO_4^{3-}
			Fluo	reszenzlö	öschung	[%]		
WT	12,0	$_{30,5}$	2,0	0,8	7,8	2,0	$1,\!3$	> 58
$S^{47}A$	11,5	2,5	$_{3,8}$	2,0	1,1	5,0	1,6	_
$\mathrm{H}^{94}\mathrm{K}$	30,0	1,5	$2,\!0$	$1,\!6$	1,5	2,0	0,4	$> 60^{a}$
$\mathrm{H}^{94}\mathrm{Y}$	-3, 5	-3,9	$0,\!8$	$1,\!0$	2,1	0,7	0,8	_
$\mathrm{R}^{156}\mathrm{K}$	6,0	2,3	2,1	—	2,5	$1,\!8$	$1,\!2$	—
$R^{156}L$	$1,\!3$	$1,\!0$	$1,\!0$	0,0	2,5	0,6	$1,\!2$	> 42

Tabelle 0.0 I ladieszenzekpeimente mit solep i apri varianten	Tabelle 3	3.5.:	Fluoreszenzex	perimente i	\mathbf{mit}	Strep-7	TupA-	Varianten.
---------------------------------------------------------------	-----------	-------	---------------	-------------	----------------	---------	-------	------------

 $^a\mathrm{Zugabe}$ von $\mathrm{WO_4^{\,2-}}$ ohne Effekt

des Anions.

der Proteine gegenüber verschiedenen Anionen sollte mit Hilfe der intrinsischen Fluoreszenz durchgeführt werden (vgl. 3.2.3 auf S. 63).

Die Proteine wurden rekombinant als *Strep*-Fusionsproteine hergestellt und analog zu *Strep*-TupA aufgereinigt (s. 3.1.1 auf S. 55), wobei für alle Proteine eine ähnliche Ausbeute wie für das Protein ohne Aminosäureaustausch erzielt wurde. Der *Strep*-tag wurde nach der Reinigung nicht vom Protein abgespalten. Die Reinheit wurde im Hilfe der SDS-PAGE und der nativen PAGE überprüft. Das Signalpeptid wurde ähnlich wie auch bei *Strep*-TupA nicht immer vollständig abgetrennt. Durch Vergleich von *Strep*-TupA mit dem mit Hilfe des IM-PACT-Systems hergestellten TupA konnte aber nachgewiesen werden, dass weder die *Strep*-Fusion noch das Signalpeptid einen Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten und die Bindung hatte.

Es wurden von allen hergestellten Proteinen Fluoreszenz-Emissionsspektren in Abwesenheit und in Gegenwart von verschiedenen Anionen aufgenommen. Wie in Tab. 3.5 zu sehen ist, hatten nur MoO_4^{2-} und WO_4^{2-} (zu PO_4^{3-} s. 3.2.3 auf S. 63) einen Einfluss auf die Fluoreszenz der Proteine. Andere Anionen zeigten keinen bzw. nur einen geringen Effekt. Die Aminosäureaustausche werden im Folgenden einzeln besprochen.

Serin⁴⁷. Ser⁴⁷ liegt in der Nähe der Bindetasche (s. 3.3.4 auf S. 86) und ist wahrscheinlich mit der Hydroxylgruppe der Seitenkette an der Bindung der Anionen beteiligt. Bei Austausch gegen Alanin konnte weiterhin eine Wolframatbindung beobachtet werden. Molybdat hatte keinen Effekt auf die Fluoreszenz ($K_d(MoO_4^{2-}) > 2 \text{ mM}$). Die Dissoziationskonstante für Wolframat lag für diesen Austausch bei ca. 4 µM. Das lässt darauf schließen, dass zumindest die Bindungsstärke durch Ser⁴⁷ beeinflusst wird. Da kein anderes Anion gebunden wurde, konnten keine kompetitiven Experimente durchgeführt werden.

Histidin⁹⁴. Die Aminosäure His⁹⁴ wurde gegen Lysin ausgetauscht, wobei eine potentiell vorhandene positive Ladung erhalten bleiben sollte. In einer weiteren Mutante wurde es gegen Tyrosin ausgetauscht, das ungefähr die gleiche Größe wie Histidin haben sollte, aber nur wenig polar ist.

Bei der Mutante H⁹⁴Y wurde eine Fluoreszenzerhöhung um bis zu 4% bei Zugabe von Wolframat und Molybdat beobachtet. Diese war bei beiden Anionen etwa gleich und konnte gesättigt werden, was auf einen Protein-Anion-Komplex schließen lässt. Eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums konnte nicht gemessen werden. Die Ursache der Erhöhung liegt wahrscheinlich in einer Veränderung der Position des eingeführten Tyrosin, dessen Fluoreszenz durch die Bindung beeinflusst wird. Andere Anionen hatten kaum einen Einfluss auf die Fluoreszenz. Titrationskurven wurden nicht aufgenommen, da die Veränderung zu gering war, um verwertbare Ergebnisse zu erzielen.

Das Protein mit dem H⁹⁴K-Austausch zeigte eine große Fluoreszenzlöschung durch Wolframat (30%, $K_d(WO_4^{2-}) = 1,2$ mM), aber nicht durch Molybdat. Auffällig war, dass Vanadat wie bei anderen Versuchen auch eine dynamische Fluoreszenzlöschung verursachte, aber Wolframat nach der Zugabe von Vanadat keinen Effekt auf die Fluoreszenz hatte. Es wurden deshalb Titrationskurven mit Vanadat und Wolframat in An- und Abwesenheit des jeweils anderen Ions aufgenommen. Es zeigte sich, dass in Abwesenheit von Wolframat die Fluoreszenzlöschung durch Vanadat bei niedrigeren Vanadatkonzentrationen (bis 10 μ M) stärker ist als in Anwesenheit von Wolframat (Abb. 3.17), während Wolframat kaum einen Einfluss auf die Fluoreszenz von Vanadat-H⁹⁴K-TupA hatte, was aber auf die geringe Fluoreszenz des Proteins in Anwesenheit von Vanadat zurückzuführen sein kann. Leider ist nicht bekannt, wie hoch der Grad der Verunreinigung durch Wolframat im Vanadat war. Es müssten weitere Experimente durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob Vanadat tatsächlich an diese Mutante bindet.

Arginin¹⁵⁶. An der Position Arginin¹⁵⁶ wurden zwei Aminosäurenaustausche durchgeführt. Zum einen wurde das Arginin zu der ebenfalls positiv geladenen Aminosäure Lysin mutiert, zum anderen wurde es gegen die hydrophobe Aminosäure Leucin ausgetauscht. Der Austausch R¹⁵⁶L führte zu einem Protein bei dem keine Fluoreszenzänderung durch Zugabe von Anionen messbar war. R¹⁵⁶K dagegen wurde sowohl durch Wolframat als auch durch Molybdat in seiner Fluoreszenz beeinflusst. Es konnten für beide Anionen Dissoziationskonstanten bestimmt werden ($K_d(WO_4^{2-}) = 400$ nM, $K_d(MoO_4^{2-}) = 23 \mu$ M). Diese sind deutlich größer als die des Wildtyps, somit scheint der Arginyl-Rest eine wichtige Rolle für die Bindung dieser Anionen zu haben.



Abbildung 3.17.: Titration von Strep-H⁹⁴K-TupA mit Vanadat.

Fluoreszenzveränderung ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 320 \text{ nm}$) von *Strep*-H⁹⁴K-TupA bei Titration mit Na₃VO₃ ($-\Diamond$ -), Na₂WO₄ in Anwesenheit von 100 µM Na₃VO₃ ($-\Box$ -) und Na₃VO₃ in Anwesenheit von 100 µM Na₂WO₄ (\cdots + \cdots). Die Proteinkonzentration betrug 100 nM (in 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl). Die Zugabe der Anionenstammlösung erfolgte schrittweise, die Messung wurde 30 – 60 s nach der Zugabe durchgeführt.

3.3. Die Struktur von TupA

3.3.1. Kristallisation

Für die Kristallisation wurde mit dem IMPACT-System überproduziertes und gereinigtes TupA verwendet. Es wurde vorher durch verschiedene Methoden (s. o.) auf Homogenität und Aktivität, d. h. die Fähigkeit Wolframat zu binden, getestet. In den ersten Versuchen wurde als Aufbewahrungspuffer der mit Hilfe des DLS (s. 3.2.1 auf S. 61) optimierte Puffer verwendet. Da in diesem Wolframat enthalten war, dessen Anwesenheit oft zu Niederschlägen in den Kristallisationspuffern führte, wurde bei den weiteren Versuchen Wolframat nur noch bei Bedarf den Kristallisationansätzen zugesetzt.

Zur Kristallisation wurde die Methode der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen verwendet. Das *screening* mit verschiedenen *kits* (Tab. 2.9 auf S. 33) führte zu ersten Kristallen. Diese waren sehr klein und weit verzweigt, so dass sie eine sphärolithähnliche Struktur aufwiesen. Die die besten Erfolge versprechenden Kristallisationsbedingungen hatten einen pH-Wert um 5,0 (MES-Puffer), als Präzipitant waren PEG oder Ammoniumsulfat geeignet, es zeigte sich aber, dass Letzteres oft zu unerwünschten Salzkristallen bzw. Niederschlägen führte, da es in relativ hohen Konzentrationen (> 500 mM) eingesetzt werden musste.



Abbildung 3.18.: TupA-Kristalle.

Heterolog in *E. coli* produziertes *E. acidaminophilum*-TupA kristallisiert in 100 mM Citratpuffer (pH ca. 5,0) mit ca. 30% Polyethylenglycol 3350. (a) natives TupA ohne Wolframat, (b) Seleno-methionin-TupA, (c) wie (b), aber in Gegenwart von Wolframat.

Es wurde versucht, durch Variation des Puffers, pH-Wertes, PEG-Molekulargewichts und der PEG-Konzentration weniger verzweigte Kristalle zu erhalten. Durch Verwendung von Citrat-Puffer (pH ca. 5.0) mit hohen Ammoniumsulfatkonzentrationen und PEG wurden sehr lange, fragile Kristalle erhalten, die oft dendritisch verzweigt waren. Bei diesen Experimenten war stets ein störender Einfluss von Wolframat zu beobachten, d. h. es führte zu sehr kleinen oder stark verzweigten Kristallen bzw. Niederschlägen. Deshalb wurde Wolframat bei den weiteren Experimenten maximal im Verhältnis zum Protein in äquimolaren Mengen zugegeben. In den ersten Kristallisationsansätzen war neben Citrat und PEG auch Ammoniumsulfat enthalten. Erst die völlige Eliminierung dieses Salzes führte zu langen (einige > 500 µm), nur wenig verzweigten Kristallen, die für Messungen am Synchroton geeignet waren (Abb. 3.18a).

Zum Zeitpunkt der Messung war noch keine Struktur eines Wolframatbindeproteins bekannt. Aufgrund der relativ schwachen Homologien von TupA zu anderen Anionenbindeproteinen, deren Struktur bekannt war, konnte nicht davon ausgegangen werden, dass Molekularer Ersatz (molcular replacement, MR) zum Erfolg führt. Es sollte daher eine experimentelle Phasenbestimmung durchgeführt werden. In einem ersten Ansatz sollte die anomale Streuung des enthaltenen Schwermetalls Wolfram (Kristall TupAW1 in Tab. 3.6) zur Bestimmung der Phasen mittels SAD (Single-wavelength Anomalous Dispersion) bzw. MAD (Multi-wavelength Anomalous Dispersion) verwendet werden. Da aber die Auswertung der Daten (s. 3.3.2 auf S. 83) nicht zum erwünschten Ergebnis führte, musste eine andere Methode verwendet werden.

Zur Lösung des Phasenproblems wurden selenhaltige Proteinkristalle hergestellt (s. 3.3.2 auf S. 83). Leider konnten die unter den gleichen Bedingungen wie TupAW1 erhaltenen Kristalle nicht für die Messung schockgefroren werden, da sie sich beim *soaking* mit glycerolhaltigem Puffer zersetzten. Deshalb erfolgte ein *screening* nach geeigneten Cryoprotektanten. Die Kristallisation mit 15% Glycerol im Puffer stellte die beste Alternative zu einem nachträglichen *soaking* dar.

Tabelle 3.6.: Kristallisationsbedingungen.

Puffer-Zusammensetzung der Kristallisationansätze der für die Aufnahme der Datensätze in Tab. 3.7 auf S. 84 verwendeten Kristalle. Die Kristallisation erfolgte im hängenden Tropfen bei Raumtemperatur. Die Tropfen entstanden durch Mischen von Reservoir-Lösung mit Proteinsuspension (Konzentration siehe Tabelle). Kristalle entstanden nach wenigen Tagen. Der pH-Wert der Kristallisationspuffer lag bei ca. 5,0. Abkürzungen: Puf. Puffer, Prot. Protein, Konz. Konzentration; Das Protein lag in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 vor.

Kristall	${f Kristallisations beding ungen}$	$\mathbf{Puf.}/\mathbf{Prot.}$	ProtKonz.
		$[\mu l/\mu l]$	${ m mg}{ m \cdot ml}^{-1}$
TupAW1	$30/70~\mathrm{mm}$ Citronensäure/Na_3Citrat	2/2	$15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$
	30% PEG 3350		
	$0,75~\mathrm{mm}~\mathrm{Na_2WO_4}$		
TupASe1	$30/70~\mathrm{mm}$ Citronensäure/Na_3Citrat	1/4	10
	37% PEG 3350		
TupANat1	$30/70~\mathrm{mm}$ Citronensäure/Na_3Citrat	2/2	15
	33,5% PEG 3350		
TupASe2	$27/73~\mathrm{mm}$ Citronensäure/Na_3Citrat	1/2	10
	30,5% PEG 3350		
	15% Glycerol		

Die Kristallisationsbedingungen für die Kristalle, mit denen die in dieser Arbeit aufgeführten Datensätze aufgenommen wurden, sind in Tab. 3.6 zusammengefasst. Die Tabelle enthält außerdem den entsprechenden Proteinpuffer und die Tropfengrößen bei der Kristallisation.

Da unter den verwendeten Kristallisationsbedingungen kein Datensatz mit Wolframat in der Bindestelle erhalten werden konnte, wurde versucht, dieses durch nachträgliches *soaking* mit wolframathaltigem Kristallisationspuffer in den Kristall einzuführen. Der Kontakt mit geringen Wolframat-Konzentrationen im Puffer führte aber bei ohne dieses Anion gewachsenen Kristallen sofort zur vollständigen Auflösung der Kristalle.

3.3.2. Datenaufnahme und Phasierung

Die Aufnahme der Datensätze erfolgte am BESSY (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung) und am DESY Hamburg (Deutsches Elektronen-Synchrotron) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Stubbs (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle). Bei den für die Phasenbestimmung verwendeten Kristallen handelt es sich um Nadeln mit einer Länge von ca. 0,3 mm, die Breite war wesentlich geringer. Da die Kristalle oft verzweigt waren, wurden für die Messungen möglichst große Stücke von längeren Nadeln verwendet. Es konnten Datensätze zu vier Kristallen des Proteins TupA gesammelt werden, wobei je einmal Daten für TupA mit und ohne Wolframat und zwei Datensätze von Selenomethionin-TupA aufgenommen wurden (Tab. 3.7). Es wurden Kristalle der Raumgruppen P2₁ und P2₁2₁2₁ erhalten. Die maximale Auflösung lag bei 1,83 Å für den Kristall TupAW1. Viele der vor der Aufnahme der Datensätze untersuchten Kristalle zeigten eine hohe Mosaizität, d. h. es handelte sich oft nicht um Einkristalle.

Die experimentelle Phasenbestimmung sollte mit Hilfe des im Protein enthaltenem Wolframat erfolgen. Es zeigte sich auch, dass der Kristall TupAW1 eine Wolfram-Fluoreszenz im Bereich der Röntgenstrahlung hatte. Leider konnten aber die Phasen mit den aufgenommen Datensätzen nicht durch SAD gelöst werden.

Daher wurde TupA hergestellt, bei dem die sechs Methionyl-Reste des Proteins durch Selenomethionin substituiert waren. Die Überprüfung des Seleneinbaus erfolgte mit Hilfe der Massenspektrometrie. Es konnte gezeigt werden, dass die Differenz der Molekularmasse des selenhaltigen Proteins zum Nicht-Se-haltigen bei 278,8 Da lag, dies entspricht etwa der sechsfachen Massendifferenz des Schwefel- und Selenatoms (berechnet 281,4 Da). Bei beiden Proteinen wurde eine um 16 Da höhere als die erwartete Masse gemessen, was auf eine Oxidation am Protein zurückgeführt werden könnte. Es wurde versucht, dieser Differenz durch tryptischen Verdau und Massenspektrometrie nachzugehen, aber die identifizierbaren Fragmente entsprachen jeweils den aus der Sequenz erwarteten. Mit dem SeMet-Kristall TupASe2 wurden Datensätze bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommen (*peak* 0,97908 Å, *inflection point* 0,97935 Å und *high remote* 0,95000 Å), um eine Phasierung durch MAD durchführen zu können. Mit Hilfe dieser Datensätze konnten die Positionen der 24 in der assymetrischen Einheit (mit vier TupA-Molekülen) enthaltenen Selenatome bestimmt und experimentelle Phasen erhalten werden, die für die Modellierung verwendet wurden.

3.3.3. Modellierung und Verfeinerung

Die mit Hilfe des selenderivatisierten Proteins erhaltenen Phasen wurden verwendet, um das Protein zu modellieren. Außerdem wurden die Strukturen von ModA aus *E. coli* (PDB-ID 1amf, HU *et al.* 1997) und dem Phosphat-Bindeprotein (1pdb, WANG *et al.* 1994) verwendet, um in schwierig zu modellierenden Regionen Anhaltspunkte für den Verlauf der Hauptkette zu haben. Mit Hilfe des Datensatzes TupASe2 wurde ein Teil der Hauptkette modelliert. Dann wurden einige leicht zu identifizierende Seitenketten, wie die Selenomethionin- und Tryptophan-Reste hinzugefügt. Dabei wurde die nicht-kristallographische Symmetrie der vier TupA-Moleküle in der assymetrischen Einheit berücksichtigt.

Anschließend wurden die durch dieses Modell erhaltenen Phasen mit Hilfe des Programms Phaser durch Molekularen Ersatz in den Datensatz TupAW1 übertragen. Durch *simulated*

Tabelle 3.7.: Strukturdaten.

Die Tabelle führt einige kristallographische Kenndaten zu den einzelnen Kristallen und Modellen auf. Die Werte wurden mit den Programmen SFCHECK und MOLEMAN2 berechnet. In Klammern sind jeweils die Werte für die höchste Auflösung angegeben.

	TupAW1	TupASe1	TupANat1	TupASe2
Datensatz				
Aufgenommen	BESSY	DESY	DESY	DESY
Raumgruppe	$p2_12_12_1$	$p2_1$	$p2_12_12_1$	$p2_1$
	orthorhombisch	$\operatorname{monoklin}$	orthorhombisch	$\operatorname{monoklin}$
a [Å]	$53,\!675$	$54,\!536$	54,184	84,961
b [Å]	$59,\!141$	70,258	59,120	70,263
c [Å]	68,519	68,771	69,071	$93,\!044$
α [°]	90,000	90,000	90,000	90,000
β [°]	90,000	$97,\!654$	90,000	$104,\!413$
γ [°]	90,000	90,000	90,000	90,000
Auflösung [Å]	$42,\!25-1,\!83$	$19,\!07-2,\!80$	$19,\!97-2,\!30$	$20,\!03-2,\!09$
	$(1,\!92-1,\!83)$	$(2,\!92-2,\!80)$	$(2,\!41-2,\!30)$	$(2,\!19-2,\!09)$
Vollständigkeit $[\%]$	$95,7 \ (87,9)$	$96,8 \ (96,1)$	$96,9 \ (97,8)$	$96,\! 6 \ (92,\! 6)$
Reflexe (Einmalig)	19015 (2354)	$12402 \ (1523)$	9978~(1249)	$60739\ (7451)$
$R_{\rm stand(F)}$ [%]	2,9(7,9)	6,1(17,4)	8,6(17,2)	2,9 (9,5)
B_{overall} [Å ²]	$23,\!8$	43,1	29,7	33,1
Modell				
<i>R</i> [%]	17,2(18,1)	31,0 (37,2)	$22,5\ (25,5)$	28,4 (33,4)
$N_{\rm free}~(5\%)$	914	497	464	2733
$R_{\rm free}$ [%]	$18,0\ (19,0)$	$33,\!8\;(37,\!0)$	25,4 (30,0)	31,7 (39,0)
Atome	2167	3792	2093	7782
Wassermoleküle	230	0	110	186
B-Faktoren [Å ²]				
Gesamt	22,7	48,9	21,4	$33,\!3$
Protein (Hauptkette)	$20,9\ (19,5)$		21,3(20,9)	33,2 (32,27)
Citrat	$27,\!6$		25,3	46,23
Wasser	37,0		22,4	$32,\!80$

Tabelle 3.8.: Modellverfeinerung.

Die Tabelle gibt die Werte für R und R_{free} während der Verfeinerung wieder. Die für die einzelnen Verfeinerungsschritte verwendeten Programme sind in Klammern angegeben.

	$R/R_{\mathbf{free}}$					
	TupAW1	TupASe1	TupANat1	TupASe2		
SeMet (ShelX)				$54,\!3/53,\!5$		
Proteinrückgrat (Refmac)				$44,\!1/48,\!5$		
MR (Phaser)	$45,\!4/51,\!1$					
Protein (x-plor)	$25,\!1/25,\!4$					
Citrat (x-plor)	$24,\!3/25,\!0$					
MR (AMORE)		$31,\!7/29,\!1$	$30,\!4/28,\!9$	$37,\!7/36,\!8$		
Verfeinerung und $\mathrm{H_{2}O}~(\mathrm{CNS})$	$17,\!2/18,\!0$	$31,\!0/33,\!8$	$22,\!5/25,\!4$	$28,\!4/31,\!7$		

annealing mit den Programmen x-plor und CNS wurde das Modell schrittweise verfeinert, so dass alle Aminosäuren ab Gly^{38} modelliert werden konnten.

In der Bindestelle wurde eine Elektronendichte sichtbar, die aufgrund ihrer Form und Größe einem, aus dem Kristallisationspuffer stammenden, Citrat zugeordnet werden konnte (Abb. 3.19). Eine Verringerung von $R/R_{\rm free}$ und die Abnahme der Differenzdichte nach dem Einbringen des Liganden in das Modell spricht für die Richtigkeit dieser Annahme. Abschließend wurden dem Modell mit Hilfe der Funktion *findwaters* aus dem Programm Coot noch 230 Wassermoleküle hinzugefügt und auf ihre Stimmigkeit geprüft. Durch Einführung von



Abbildung 3.19.: Differenzelektronendichte von TupA.

Die Differenzdichtekarte $(3, 0\sigma, blau positiv, rot negativ)$ in der Umgebung der Bindestelle von TupA während der Verfeinerung und vor dem Hinzufügen des Citrats und der Wassermoleküle. Beides ist in in der Abbildung mit dargestellt.



Abbildung 3.20.: Ramachandran-Diagramm von TupA.

Das Diagramm wurde mit dem Modell des Datensatzes TupAW1 erstellt. Glycyl-Reste sind durch das Symbol ▲ gekennzeichnet, alle anderen durch ■. Die bevorzugten Regionen sind rot, die zusätzlich erlaubten gelb dargestellt.

alternativen Konformationen für 6 Seitenketten (Ser⁴⁷, Asp¹⁸⁰, Phe²³⁰, Tyr²³³, Glu²⁴⁹ und Ser²⁶⁵) konnte nach der Verfeinerung mit CNS bei einer Auflösung von 1,83 Å ein kristallographischer *R*-Faktor von 17,3% ($R_{\rm free} = 18,0\%$) erreicht werden. Einige elektronendichte Regionen in der Peripherie des TupA-Moleküls konnten nicht interpretiert werden. Es könnte sich aufgrund der Größe und Lage um Glycerol oder Teile des N-Terminus von TupA handeln, eine Modellierung führte aber zu keiner Verbesserung von $R/R_{\rm free}$.

Das Modell wurde mit dem Programm PROCHECK auf seine Richtigkeit geprüft. Im Ramachandran-Plot, der die Diederwinkel ϕ und ψ des Proteinrückgrates gegeneinander aufträgt, liegen 87,4% aller Aminosäuren (mit Ausnahme von Glycin und Prolin) in den bevorzugten Regionen, die restlichen 12,6% befinden sich in den zusätzlich erlaubten Bereichen (Abb. 3.20).

Die Modelle für die anderen Datensätze wurden durch MR erstellt und nur soweit verfeinert, bis erkannt wurde, dass diese die gleiche Konformation wie das für den Datensatz TupAW1 erhaltene Modell haben und sich Citrat in der Bindestelle befindet (Tab. 3.8, vgl. Abb. 3.23 auf S. 90).

3.3.4. Struktur des Monomers

Es konnte die 1,83-Å-Kristall-Struktur der Aminosäuren 38 – 286 von TupA aus *Eubacterium acidaminophilum* modelliert werden. Die im kristallisierten Protein ebenfalls enthaltenen N-terminalen Aminosäuren 22 – 37 sind wahrscheinlich sehr flexibel, sodass sie sich nicht in die Kristallstruktur einfügen. Sie bilden vermutlich eine bewegliche Verbindung zum an Cys²¹ postulierten Membrananker. TupA kristallisierte als Monomer und ist ein α/β -Protein bestehend aus zwei ähnlich aufgebauten Domänen (I und II, Abb. 3.21). Domäne I besteht aus den Aminosäuren 38 – 117 und 232 – 286, Domäne II aus den Aminosäuren 118 – 231. Die Domänen sind also durch zwei antiparallele Peptidstränge verbunden und sowohl der Nwie auch der C-Terminus liegen in Domäne I. Zwischen den Domänen entsteht dadurch eine Spalte, in der die potentielle Anionenbindestelle liegt.

Domäne I setzt sich aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt (Reihenfolge 21394, Abb. 3.22 auf S. 89) und sechs darum angeordneten α -Helices ($\alpha 1 - \alpha 4$, $\alpha 10$ und $\alpha 11$) zusammen. Domäne II besteht ebenfalls aus einem zentralen β -Faltblatt mit fünf Strängen (65748) und fünf Helices ($\alpha 5 - \alpha 9$). Das Protein gehört damit, wie auch die alle anderen anionenspezifischen bakteriellen Bindeproteine zur Klasse II (DWYER & HELLINGA 2004). In den β -Faltblättern laufen alle Stränge, mit Ausnahme der beiden die Domänen verbindenden ($\beta 9$ bzw. $\beta 4$), parallel. Dabei ist der C-terminale Teil jeweils zur Interdomänenregion gerichtet, die meisten Helices sind in ihrer Polarität entsprechend entgegengesetzt, sie haben ihren positiveren N-Pol gegen die Interdomänenregion und damit gegen die Bindungstelle gerichtet (Abb. 3.21).

Alle vier aus den Datensätzen erhaltenen Modelle haben die gleiche Konformation. Die Abweichung (*rmsd*, *root mean squared deviation*) für das Rückgrat des Gesamtproteins beträgt weniger als 1 Å. Unterschiede im Proteinrückgrat sind nur in der in der Nähe des C-Terminus liegenden Schleife (Aminosäuren 272 – 277) zu erkennen. Diese weist auch relativ hohe *B*-Faktoren auf und ist wahrscheinlich sehr flexibel (Abb. 3.23 auf S. 90).

Die potentielle Anionenbindestelle ist in dem Modell durch ein Citrat-Molekül besetzt. Leider war es nicht möglich einen Kristall mit Wolframat zu erhalten, was wahrscheinlich auf den geringen pH-Wert im Kristallisationspuffer (5,0) zurückzuführen ist. Wie oben schon erwähnt, führten Wolframatkonzentration von über 500 µM im Kristallisationspuffer zu einem Niederschlag im Tropfen.

Das Citrat wird durch elf Wasserstoffbrücken an das Protein gebunden (Tab. 3.9 auf S. 90), vier davon werden durch Amid-NH-Gruppen des Proteinrückgrats, vier von Threonin- und Serin-Hydroxylgruppen und drei durch die basischen Seitenketten eines Histidin und eines Arginin-Restes gebildet. Bei pH 5,0 sollten diese beiden Reste protoniert (p $K_a(\text{Arg}) = 12,0$ und p $K_a(\text{His}) = 6,5$), d. h. positiv geladen sein. Das Protein ist also wahrscheinlich stets der Wasserstoffdonor. Citrat ist bei pH 5,0 theoretisch zweifach negativ geladen (p $K_{a1} = 3,14$, p $K_{a2} = 4,76$ und p $K_{a3} = 6,39$), könnte aber in der vorliegenden Struktur auch vollständig deprotoniert vorliegen. Das Citrat-Molekül weist relativ hohe *B*-Faktoren (25 – 35 Å²) auf, was für eine hohe Beweglichkeit innerhalb der Bindestelle oder alternative Konformationen sprechen kann. Die Ursache könnte eine abweichende Protonierung der einzelnen Carboxylgruppen sein, was auch erklären würde, warum für Ser⁴⁷ zwei verschiedene Konformationen, einmal eine H-brückenbildende und einmal eine dem Citrat abgewandte, modelliert werden mussten. Probleme ergaben sich auch bei der Modellierung von His⁹⁴. Das ε^2 N-Atom hat einen höheren *B*-Faktor (24,3 Å²), während das ε^1 C-Atom einen geringeren *B*-Faktor (19,5 Å²) als 3. Experimente und Ergebnisse



(a)



(b)





(f)



Abbildung 3.21.: Gesamtstruktur von TupA.

Modell der Tup AW1-Struktur in Cartoon-Darstellung und als Oberflächenstruktur ohne Lösungsmittel-Moleküle und Citrat. Die Domänen sind blau (Domäne I) und grün (Domäne II) gefärbt. (a) Stereobild (c) – (f) Einzelbilder jeweils in 90°-Schritten gedreht. Die Legende zeigt die Blickrichtung für die einzelnen Bilder an.



Abbildung 3.22.: Sekundärstrukturen des TupA-Modells.

Die Farben der Sequenz entsprechen der Hydrophobizität der Aminosäure-Seitenketten: grün – hydrophob, gelb – polar, rot – negativ geladen und blau – positiv geladen. Oberhalb der Sequenz sind die aus der Struktur mit dem Programm STRIDE berechneten Sekundärstrukturen angegeben: rot – β -Faltblatt, grün – α -Helix und schwarz – 3_{10} -Helix. Unter der Sequenz sind die Signalsequenz, der N-Terminus des reifen Proteins, die Linkerregion und die an der Bindung des Citrats beteiligten Aminosäuren (\mathbf{v}) gekennzeichnet.

der Rest der Seitenkette (ca. 21 Å²) hat, bei der Drehung der Seitenkette um 180° kehrt sich dieses Verhältnis um. Möglicherweise liegt auch hier eine alternative, um 180° gedrehte, Konformation vor, die dann keine Wasserstoffbrücke zur β -Carboxylgruppe des Citrats bilden könnte, aber als Akzeptor für den Hydroxyl-Wasserstoff des Citrats fungieren kann (Distanz 2,88 Å). Die Qualität des Modells um die Bindestelle lässt aber eine exakte Bestimmung von Bindungslängen und Abständen und eine Voraussage von Wasserstoffpositionen nicht zu.

Eine zweifach negative Ladung des Citrats würde etwa dem Protonierungsgrad von Wolframat bei einem pH-Wert um 7,0 entsprechen. Alle an der Bindung von Citrat beteiligten Aminosäuren sind in den TupA-homologen Proteinen hoch konserviert. Dies spricht dafür, dass es sich bei der von Citrat okkupierten Region um die Anionen-Bindestelle des Proteins handelt.

Die Aminosäuren der Bindestelle werden durch ein Netzwerk von potentiellen Wasserstoffbrücken in ihren Positionen fixiert. So wird die Seitenkette von Thr⁴⁵ durch eine zusätzliche



Abbildung 3.23.: Proteinrückgrat aller TupA-Modelle (Tab. 3.7 auf S. 84).

Stereodarstellung der Modelle TupAW1 (grün), TupANat1 (blau), 2 Moleküle aus TupASe1 (rot) und 4 Moleküle aus TupASe2 (orange). Die Modelle wurden durch die SSM-Funktion von Coot übereinandergelagert (KRISSINEL & HENRICK 2004). Die Termini des Proteins sind durch N und C gekennzeichnet, der Pfeil markiert die variable Schleife in der Nähe des C-Terminus.

Tabelle 3.9.: Potentielle Wasserstoffbrücken zwischen TupA und Citrat.

Bei allen Wasserstoffbrücken ist das Protein der H-Donor, während die Carboxylat-Gruppen die H-Akzeptoren sind. Die C-Atome der Propionyl-Hauptkette des Citrats wurden mit α , β und γ bezeichnet, die beiden O-Atome der Carboxylat-Gruppen wurden zur Unterscheidung nummeriert.

Domäne	$\mathbf{Protein}$	Citrat	Abstand
			[Å]
Ι	$\mathrm{Thr}^{45}\text{-}\gamma\mathrm{O}$	β -COO ¹	2,51
Ι	Thr^{45} -N	β -COO ²	$3,\!00$
Ι	$\mathrm{Ser}^{47}\text{-}\gamma\mathrm{O}$	β -COO ¹	$2,\!58$
Ι	$\mathrm{Thr}^{76}\text{-}\mathrm{N}$	α -COO ²	$3,\!18$
Ι	$\rm Thr^{76}\text{-}\gamma O$	α -COO ²	$2,\!82$
Ι	$\mathrm{His}^{94}\text{-}\epsilon\mathrm{N}$	β -COO ¹	$2,\!65$
II	$Arg^{156}\text{-}\eta^1N$	γ -COO ²	$2,\!87$
II	$Arg^{156}\text{-}\eta^2N$	γ -COO ²	2,73
II	$\mathrm{Gly^{16}1}\text{-}\mathrm{N}$	α -COO ¹	2,89
II	Thr^{162} -N	$\gamma\text{-}\mathrm{COO}^1$	$3,\!03$
II	$\rm Thr^{16}2\text{-}\gamma O$	$\gamma\text{-}\mathrm{COO}^1$	2,91



Abbildung 3.24.: Potentielle Anionenbindestelle von TupA mit Citrat. Stereodarstellung der potentiellen Anionenbindestelle von TupA mit gebundenem Citrat. Die gestrichelten Linien verbinden Atome, die durch Wasserstoffbrücken verbunden sein könnten, die Zahlen geben den Abstand der Atome in Å wieder.

Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe von Thr⁴⁸ fixiert. Arg¹⁵⁶- ε N¹ bildet eine Brücke zum Amid-O von Arg¹⁸⁷ und das an der Citrat-Bindung beteiligte Arg¹⁵⁶- η N² interagiert mit Asp¹⁵⁸- δ O², wodurch die Ladung neutralisiert wird, während das δ O¹-Atom dieses Rests eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoff und zur Hydroxylgruppe von Ser¹⁶⁰ bildet.

Es ist anzunehmen, dass das kristallisierte Protein in einer mehr oder weniger offenen Konformation vorliegt. Zum einen handelt es sich bei dem gebundenen Citrat um ein im Verhältnis zu WO_4^{2-} relativ großes Molekül (Abstand O–O im Citrat bis zu 6,3 Å und in WO_4^{2-} 3,3 Å), zum anderen ist die Ähnlichkeit zur offenen Form des *E. coli*-Phosphatbindeproteins, d. h. zur T¹⁴¹D-Mutante dieses Proteins (YAO *et al.* 1996), größer ist als die zur geschlossenen Form (Abb. 3.25, *rmsd* 2,68 bzw. 3.11 Å).

Das elektrostatische Oberflächenpotential von TupA wurde mit dem Programm APBS in Abwesenheit von Wasser und Citrat für die lösungsmittelzugänglichen Bereiche berechnet (Abb. 3.26 auf S. 93). Fast die gesamte Oberfläche des Proteins weist ein negatives Potential auf. Nur im Bereich der Spalte zwischen den Domänen, wo auch die potentielle Anionenbindestelle liegt, ist das Potential deutlich positiv. Dies ist vor allem auf das in der Spalte liegende His⁹⁴ und die an den negativen Polen von Helices liegenden N-Atome des Proteinrückgrats zurückzuführen. Dabei ist die Oberfläche des in Domäne I liegenden Bereichs elektropositiver als der Bereich der Bindestelle, der der Domäne II zuzuordnen ist. Außerhalb der Bindungsspalte befinden sich nur wenige Bereiche mit positivem Potential auf der "Rückseite" des Proteins, d. h. auf der Seite, die keinen Zugang zur Bindestelle gewährt.



Abbildung 3.25.: Vergleich von TupA mit dem Phosphatbindeprotein aus *E. coli*. Stereo-Darstellung des Proteinrückgrats von TupA (grün) in Vergleich mit der geschlossenen Form (PDB-ID 1pbp, blau) und der offenen T¹⁴¹D-Mutante (PDB 10ib, rot, YAO *et al.* 1996) des Phosphatbindeproteins. Die Proteine wurden durch *secondary structure matching* (SSM) überlagert.

3.4. TupA aus anderen Organismen

Um zu überprüfen ob, die Eigenschaften für TupA aus *E. acidaminophilum* mit denen der bisher nur aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit als TupA-Homologe bezeichneten Proteine übereinstimmen, wurden einige dieser Gene in Vektoren für die heterologe Expression in *E. coli* kloniert. Um aus möglichst vielen Bakteriengruppen Vertreter zu haben, wurden die *tupA*homologen Sequenzen aus folgenden Arten ausgewählt: *Vibrio cholerae* (γ -Proteobakterium), *Campylobacter jejuni* (ε -Proteobakterium), *Methanothermobacter thermoautotrophicum* (Archaeum), *Methanosarcina mazei* (Archaeum), *Moorella thermoacetica* (Firmicutes) und *Cupriavidus metallidurans* (β -Proteobakterium) (Stämme in Tab. 2.5 auf S. 26). Die Primer waren so konstruiert, dass die Fusionsproteine jeweils das um die Signalsequenz gekürzte Protein enthielten (s. 2.7 auf S. 28). Es wurden die in Tab. 2.6 auf S. 27 aufgeführten Plasmide hergestellt und zur Expression in den *E. coli*-Stamm ER2566 überführt. Alle genannten Proteine konnten als *Strep*-tag- bzw. CBD-Intein-Fusionsproteine unter den im Methodenteil genannten Bedingungen überproduziert werden.

Das Protein aus *M. thermoautotrophicum* konnte nicht in einer für eine Messung ausreichenden Menge aufgereinigt werden und wurde deshalb nicht weiter untersucht. Um dieses Protein für weitere Experimente verwenden zu können, ist eine Optimierung der Expression und Aufreinigung notwendig.

Die TupA-Homologen aus *Cupriavidus metallidurans*, *Moorella thermoacetica* und *M. mazei* wurden von Anett Heinrich in ihrer Diplomarbeit untersucht (HEINRICH 2006). Bei allen drei Proteinen konnte ein Einfluss der Bindung von Wolframat und Molybdat auf die Fluoreszenz beobachtet werden. Wie bei *E. acidaminophilum*-TupA wurden bei der Titration mit



Abbildung 3.26.: Elektrostatisches Oberflächenpotential von TupA.

Stereodarstellung des Elektrostatischen Potentials der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche von *E. acidaminophilum*-TupA im Bereich von -5 (rot) bis +5 kT (blau). Die Abbildung wurde mit dem APBS-Plugin in PyMol erstellt. Es wurden bei der Berechnung des Potentials die Standardeinstellungen verwendet. Die Konzentration der einwertigen Kationen und Anionen war auf 0,14 M eingestellt (a) Blick in die potentielle Bindungstasche, zur Orientierung ist das Citrat-Molekül eingezeichnet. (b) wie (a), aber um die y-Achse 180 ° gedreht.

Wolframat sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Molybdat *tight-binding*-Kurven erhalten. Daher kann angenommen werden, dass die Dissoziationskonstanten für Wolframat im picomolaren Bereich liegen. Für Molybdat lagen die Dissoziationskonstanten bei 430 nM (*C. metallidurans*) bzw. ca. 1 μ M (*M. thermoacetica* und *M. mazei*). Auch diese Werte liegen in der gleichen Größenordung wie die von *E. acidaminophilum*-TupA.

Mit dem Protein aus *C. jejuni* wurden erste Versuche im Gel-Mobilitätsshift-Assay durchgeführt. Es gelang aber nicht, das Protein unter den Standardbedingungen (pH 8,0) in das native Gel hineinlaufen zu lassen. Das Protein hat einen relativ hohen theoretischen isoelektrischen Punkt (pI = 9,17) und ist deshalb wahrscheinlich bei pH 8,0 nicht negativ geladen. Auch Versuche den Assay unter anderen Bedingungen (Pol-Umkehr, veränderte pH-Werte) durchzuführen, waren nicht erfolgreich. Es ist daher notwendig, das Protein mit anderen Methoden zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protein aus V. cholerae näher untersucht. Die Produktion des Proteins erfolgte als CBD-Intein-Fusionsprotein mit dem IMPACT-System. Dafür wurde E. coli ER2566 mit dem Plasmid pVCTA11 transformiert. Die Induktion der Expression und die Aufreinigung des Proteins erfolgten analog zu E. acidaminophilum-TupA (s. 3.1.2 auf S. 57). V. cholerae-TupA wurde mit einer vergleichbaren Ausbeute und Reinheit wie E. acidaminophilum-TupA erhalten.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde durch die Messung der Fluoreszenz durchgeführt. Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm lag das Fluoreszenzmaximum des Proteins bei ca. 322 nm. Die Zugabe Molybdat führte bei Sättigung zu einer Verringerung der Fluoreszenz um ca. 25% im Maximum, während sich bei der Zugabe von Wolframat die Fluoreszenz um ca. 20% erhöhte. Die Lage dieses Maximums wurde weder durch Wolframat noch durch Molybdat verschoben. Für Molybdat konnte durch Titration eine Dissoziationskonstante von ca. 300 nM bestimmt werden. Für Wolframat war eine exakte Bestimmung von $K_{\rm d}$ mit Hilfe der Fluoreszenz nicht möglich, da der Wert kleiner ist als die Nachweisgrenze der Methode ($K_{\rm dW} < 1$ nM). Da, auch wenn Molybdat vorgelegt wurde, mit Wolframat eine *tight binding*-Kurve entstand, liegt die Dissoziationskonstante für Wolframat wahrscheinlich etwa in der gleichen Größenordnung, wie für *E. acidaminophilum*-TupA und die anderen TupA-Homologen, also im picomolaren Bereich. Für eine genauere Bestimmung wäre auch hier eine andere Methode notwendig.

3.5. Sequenzvergleich von TupA-Homologen aus verschiedenen Organismen

Da die Bindestelle von TupA durch die Kristallstruktur nicht genau charakterisiert werden konnte, sollte anhand eines Sequenzvergleichs von TupA-homologen Proteinsequenzen aus verschiedenen Organismen der Konservierungsgrad einzelner Aminosäurereste festgestellt werden. Aufgrund ihrer Position innerhalb der Tertiärstruktur von *E. acidaminophilum*-TupA können dann Rückschlüsse auf die Bedeutung und Funktion hochkonservierter Aminosäuren gezogen werden.

Durch Suche in der NCBI-Datenbank mit TupA aus *E. acidaminophilum* als Suchmuster wurden 177 vollständige Sequenzen gefunden, die aufgrund Ihrer Ähnlichkeit als TupA-Homologe bezeichnet werden können (Anhang B.1 auf S. 151). Abb. 3.28 auf S. 97 zeigt einen





Alle Messungen wurden mit 342 nM V. cholerae-TupA in 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl pH 8,0 durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. (a) Emissionsspektren von V. cholerae-TupA ohne Anion und in Gegenwart von Sulfat, Molybdat und Wolframat. Die Konzentrationen der Anionen sind der Legende zu entnehmen. (b) Titration von 342 nM V. cholerae-TupA mit Natriumwolframat ($-\times-$) bzw. Natriummolybdat (-+-). Das kleine Diagramm zeigt den Kurvenverlauf bis zu einer Konzentration von 100 μ M.

Sequenzvergleich einiger Sequenzen und den Grad der Konservierung für alle 177 Sequenzen. Sie zeigt auch die Sequenz des Vanadat-Bindeprotein VupA aus Anabaena variabilis, da dieses aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu den TupA-Homologen, wenn auch nicht zu den Orthologen, gezählt werden muss. Obwohl bekannt ist, dass dieses Protein kein Wolframat-Bindeprotein ist (PRATTE & THIEL 2006), wurde es in den folgenden Vergleichen stets als Kontrolle mitgeführt — für wolframatbindende Proteine der TupA-Familie typische Eigenschaften sollten für dieses Protein nicht zutreffen. Leider kann das alignment nicht als repräsentativ gelten, da unter den sequenzierten Organismen (potentiell) pathogene Arten wie Vibrio sp. und Campylobacter sp. überwiegen. Da in den meisten dieser Organismen weder ein Wolframenzym nachgewiesen noch ein Wolframat-Transport gemessen wurde, wäre eine Auswahl bestimmter Sequenzen willkürlich gewesen. Möglicherweise codieren nicht alle Gene für funktionale Proteine. Um die Variabilität einzelner Aminosäure-Positionen analysieren zu können, wurden trotzdem alle vorhandenen Sequenzen, und damit auch die größtmögliche Stichprobe verwendet, da die Grundgesamtheit der TupA-Sequenzen und die Verteilung auf die einzelnen Bakteriengruppen nicht bekannt ist und aus den bisher bekannten Daten auch kaum geschätzt werden kann.

Im Folgenden werden die Aminosäurepositionen von *E. acidaminophilum*-TupA als Referenz verwendet. In Abb. 3.28 fällt auf, dass die Konservierung in Domäne II und im C-terminalen Teil geringer ist als in Domäne I. Besonders die Länge von die Sekundärstrukturen verbindenden Schleifen variiert sehr stark bei den einzelnen Bakteriengruppen. Sehr schwach konservierte Aminosäure-Seitenketten liegen oft an der Proteinaußenseite, sind polar und mit ihren Seitenketten zum Lösungsmittel gerichtet.

Die stärker konservierten Aminosäuren lassen sich in zwei Gruppen aufteilen. In die erste Gruppe fallen Glycyl- und Prolyl-Reste, die meistens in den die Sekundärstruktur-Elemente verbindenden Schleifen liegen, und aromatische und hydrophobe Aminosäuren im Inneren der beiden Domänen. Die Aminosäuren dieser Gruppe sind im wesentlichen für die Tertiärstruktur des Proteins verantwortlich. Eine ähnliche Funktion haben wahrscheinlich auch einige stark konservierte saure Reste: Glu⁸⁷, Asp⁸⁹, Glu⁹⁹ und Glu¹⁶⁶. Deren Seitenketten weisen ebenfalls ins Proteininnere und gehen dort Wechselwirkungen mit N-Atomen des Proteinrückgrats ein.

Die zweite Gruppe bilden die Aminosäuren, welche die Bindestelle umgeben. Diese sind oft stärker konserviert, teilweise sogar bei allen Sequenzen identisch. Das sind vor allem die Motive $(T/S)^{44}TTST^{48}$, $GT^{76}G$ und $S^{155}RGDxSGT^{162}$. Außerdem ist die Aminosäure His⁹⁴ in fast allen TupA-Homologen identisch, mit Ausnahme des Vanadat-Bindeproteins aus *Anabaena variabilis*, das an dieser Stelle einen Asparagyl-Rest trägt. Zu dieser Gruppe zählen aber auch die Aminosäuren Asn¹¹⁷, Phe¹¹⁹ und Asn²³¹, die in den die beiden Domänen verbindenden Strängen liegen. Beide Asparagyl-Reste sind in die Spalte zwischen den Domänen gerichtet und könnten eine Rolle bei der Anionenbindung bzw. beim Aufbau eines Dipol-



Abbildung 3.28.: Sequenzvergleich der in dieser Arbeit besprochenen TupA-Homologen.

Für den Sequenzvergleich und die Berechnung der Konsensussequenz wurden 177 Sequenzen, inklusive des Vanadat-Bindeproteins VupA aus Anabaena variabilis (PRATTE & THIEL 2006), verwendet (Anhang B.1 auf S. 151) von denen hier nur einige dargestellt sind. Die in allen TupA-Homologen identischen Aminosäuren sind grau hinterlegt, in *E. acidaminophilum*-TupA an der Bindung beteiligte Aminosäuren bzw. Sequenzmotive sind blau schattiert. Lücken sind durch Linien gekennzeichnet. Leere Spalten ergeben sich, da nicht alle Sequenzen dargestellt sind. Im oberen Teil ist die Konsensussequenz als Logos dargestellt (SCHNEIDER & STEPHENS 1990). Die Farben geben die Aminosäurefunktion wieder und die Größe der Logos die Häufigkeit. Im unteren Teil ist die Konservierung an den einzelnen Positionen farbig dargestellt (Spektrum von blau – variabel bis rot – hochkonserviert) Netzwerkes um die Bindestelle eine Rolle spielen. Die Seitenketten der ebenfalls konservierten Reste Asp²⁰⁶ und Thr²⁰⁹ weisen ebenfalls in Richtung der Interdomänen-Spalte.

Der Sequenzvergleich zeigte, dass nicht nur direkt an der Bindung beteiligte Aminosäuren hochkonserviert sind, sondern auch einige Reste in deren unmittelbarer Umgebung eine essentielle Rolle für TupA spielen. Außerdem wurde festgestellt, dass sich das Vanadat-Bindeprotein nur im Austausch His⁹⁶Asn von den Wolframat-Bindeproteinen deutlich unterscheidet.

Da für viele der Organismen mit einem TupA-Homologen noch kein wolframabhängiges Enzym nachgewiesen wurde, stellt sich die Frage, ob diese Bakterien und Archaeen tatsächlich Wolframenzyme haben. Einige der Organismen, für die der Nachweis von Wolframenzymen veröffentlicht ist, sind in der Einleitung genannt (Tab. 1.1 auf S. 17). In unserem Labor wurde der Stamm *Ralstonia eutropha* H16 untersucht, der ebenfalls ein Wolframataufnahmesystem Tup besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass der Organismus über eine wolframabhängige FDH verfügt (RICHTER 2008).

Um zu überprüfen, ob auch die Organismen, für die bisher keine Wolframenzyme nachgewiesen worden sind, Gene für wolframabhängige Enzyme besitzen, wurde die NCBI-Datenbank nach (meistens putativen) Proteinen mit Homologien zur AOR bzw. zu FdhA aus E. acidaminophilum durchsucht. Es wurden potentielle *aor*-Gene aus 133 und *fdhA*-Gene aus 460 Stämmen für die Auswertung verwendet. Die Auswertung erfolgte in dem die Namen der Stämme aus den Datensätzen extrahiert wurden, und anschließend ein Vergleich der drei Listen (je eine für TupA, AOR und FdhA) durchgeführt wurde (Tab. B.1 auf S. 153). Fast alle Organismen, die ein Gen für ein TupA-homologes Protein besitzen, haben auch ein fdhA- oder aor-homologes Gen, mit nur zwei Ausnahmen. Das ist zum einen Anabaena variabilis, dessen TupA-homologes ein Vanadat-Transporter ist (PRATTE & THIEL 2006), und zum anderen Campylobacter coli. Da andere Vertreter der Gattung Campylobacter, wie C. *jejuni*, eine FDH besitzen, ist es möglich, dass das Gen sekundär verlorengegangen ist oder nicht das gesamte Genom in der Datenbank vorhanden ist. Dieses Ergebnis zeigt deutlich eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein eines TupA-Homologen und wenigstens eines potentiellen Wolframenzyms. Viele der Organismen haben, wie auch E. acidaminophilum, sogar beide Gene.

Umgekehrt lassen sich aus dem Vorhandensein eines *fdhA*-ähnlichen Gens keine Rückschlüsse auf die Wolfram-Abhängigkeit eines Organismus ziehen, da sich aufgrund der Sequenzen nicht eindeutig vorhersagen lässt, welche Enzyme wolfram- und welche molybdänabhängig sind. Dagegen sind in der AOR-Familie bisher nur Wolframenzyme bekannt, so dass das Vorhandensein eines *aor*-Gens auch das Vorhandensein einer Möglichkeit der gezielten Wolframaufnahme in die Zelle voraussetzen sollte. In zwei kürzlich erschienenen Publikationen wurde dieser Zusammenhang schon untersucht (BEVERS *et al.* 2006; ZHANG & GLADYSHEV 2008). Deshalb werden hier nur die Organismen betrachtet, die ein *aor*-Gen, aber offensichtlich keinen Wolframat-Transporter (WtpA oder TupA) besitzen. Bei den Archaea sind dies Thermoproteus pernix, Thermoproteus ternax und Thermococcus litoralis, allerdings sind die Genome der beiden letztgenannten noch nicht veröffentlicht. Bei den Bacteria fällt vor allem eine Gruppe Gram-negativer Organismen der Gattungen Escherichia, Shigella, und Citrobacter auf. Diese besitzen Gene, die für Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase codieren können, aber weder tupA noch wtpA. Da es sich um Vertreter der Enterobakterien handelt, wird der Lebensraum dieser Organismen normalerweise nicht mit Wolfram in Verbindung gebracht. Die Proteinsequenzen dieser aor-Gene bilden in einem phylogenetischen Baum ein eigenes Cluster (Daten nicht gezeigt), allerdings ist die Anzahl der vorhandenen Sequenzen bei Enterobakerien überdurchschnittlich hoch. Andere (potentiell) pathogene Bakterien, wie C. jejuni und V. cholerae besitzen dagegen keine AOR, dafür aber ein TupA und möglicherweise eine W-FDH. Es wäre interessant zu untersuchen, welche Rolle Wolfram in diesen Organismen spielt.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wolframat-Bindeprotein TupA aus *Eubacterium acidaminophilum* untersucht. Die Experimente schließen sich an vorangegangene Arbeiten von MAKDESSI *et al.* (2001) an. Im Folgenden werden zuerst die Eigenschaften des Proteins und der Protein-Anionen-Bindung diskutiert. Im zweiten Teil wird auf die Struktur von TupA und der potentiellen Wolframat-Bindestelle, besonders im Vergleich mit anderen Anionen-Bindeproteinen, eingegangen. Im dritten Teil werden die Bedeutung des Wolframattransports im Kontext des Wolfram-Stoffwechsels und die Regulation der Wolframat- und Molybdat-Transporter bei Prokaryoten betrachtet.

4.1. TupA bindet Wolframat mit hoher Affinität und Spezifität

Durch verschiedene Methoden wurde die Bindung von Anionen an rekombinant hergestelltes TupA in vitro untersucht. Die Messung der dynamischen Lichtstreuung (DLS) von TupA zeigte, dass TupA sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Wolframat als Monomer vorliegt und erst bei hohen Proteinkonzentrationen aggregiert. Diskrete Multimere konnten nicht beobachtet werden. Die Aggregation ist wahrscheinlich ein nur in vitro auftretendes Artefakt, da das Protein in vivo vermutlich in der Membran verankert ist (MAKDESSI et al. 2001) und TupA-Moleküle daher nur in einer zweidimensionalen Ebene miteinander interagieren können. Auch in den Modellen der Kristallstrukturen mit Citrat in der Bindestelle liegt das Protein als Monomer vor. Die Stöchiometrie von Ligand zu Bindeprotein sollte bei einem Monomer stets eine ganze Zahl ergeben. Trotzdem wurden für E. acidaminophilum-TupA in fast allen durchgeführten Experimenten Werte um 0,7 (Anion : TupA) bestimmt. Dieser Wert entspricht auch dem von MAKDESSI (2001) für Strep-TupA gemessenen. Da mit einigen rekombinant hergestellten TupA-Homologen aus anderen Organismen auch Werte von ca. 1,0 gemessen wurden, kann es sich nicht um einen systematischen Fehler bei den Bindungsexperimenten handeln. Die Ursache könnte ein Fehler bei der Proteinkonzentrationsbestimmung sein. Es wurde eine photometrische Methode verwendet, bei der für das denaturierte Protein ein Extinktionskoeffizient berechnet (GILL & VON HIPPEL 1989) und dieser anschließend ins Verhältnis zu dem des nativen Proteins gesetzt wurde (s. 2.2.7.1 auf S. 50). Das Protein hat neben zwei Tryptophanyl-Resten neun Tyrosyl-Reste, die ca. 50% zur Extinktion bei 280 nm beitragen. Da die Tyrosin-Absorption empfindlich auf Veränderungen der Umgebung reagiert, können nicht vollständig entfaltete Bereiche im denaturierten Protein zur Verfälschung des Ergebnisses beitragen.

Die Abweichung der Stöchiometrie kann auch darauf zurückgeführt werden, dass nicht das gesamte Protein für die Bindung zur Verfügung steht. Dies müsste aber auch im Gel-Mobilitätsshift-Assay zu beobachten sein, d. h. ein Anteil von 30% des Proteins dürfte das Laufverhalten nicht verändern, weil er z. B. schon Wolframat gebunden hat bzw. kein Anion binden kann. Es konnten in den nativen Gelen keine auffälligen Banden beobachtet werden, es ist aber möglich, dass inaktives Protein aufgrund von Aggregation nicht in das Gel läuft. Für die Gel-Mobilitätsshift-Assays wurden hochkonzentrierte ProteinStammlösungen ohne zugesetztes Wolframat eingesetzt (> 10 mg·ml⁻¹). Durch die DLS-Experimente konnte gezeigt werden, dass TupA unter diesen Bedingungen Aggregate bilden kann, die dann auch bei Verdünnung als inaktiver Anteil des Gesamtproteins in der Suspension zu beobachten sind.

Für die Berechnung von Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten sollte die tatsächliche Proteinkonzentration eine untergeordnete Rolle spielen, solange diese viel kleiner ist, als die zu bestimmende Dissoziationskonstante selbst. Dies war für die Messung der Wolframat-Bindung nicht der Fall. Hier waren bei allen Experimenten die Proteinkonzentrationen so hoch, dass keine exakten Werte für die Dissoziationskonstante berechnet werden konnten. Bei den meisten durchgeführten Experimenten hatten Fehler aus anderen Quellen, wie die nicht exakt bestimmten Anionenkonzentration, vermutlich einen größeren Einfluss auf das Ergebnis.

Durch verschiedene Methoden konnte gezeigt werden, dass TupA eine sehr hohe Affinität zu Wolframat besitzt, die Dissoziationskonstante für Molybdat dagegen im mikromolaren Bereich liegt. Eine Bindung von anderen Anionen konnte unter den getesteten Bedingungen nicht nachgewiesen werden, d. h. die Dissoziationskonstanten liegen wahrscheinlich über 2 mM. Leider sind viele der in der Literatur angegebenen Dissoziationskonstanten für andere Anionen-Bindeproteine nicht direkt mit den für TupA bestimmten vergleichbar, da sie sich in den verwendeten Methoden unterscheiden (Tabelle 4.1). So geben die angegebenen Werte oft wahrscheinlich nur die Nachweisgrenzen der verwendeten Methoden wieder, die je nach Empfindlichkeit der Methode bei ca. 10 - 50% der eingesetzten Proteinkonzentration liegen (z. B. RECH *et al.* 1996; MAKDESSI *et al.* 2001; BALAN *et al.* 2006).

Gel-Mobilitätsshift-Assays eignen sich nur bedingt zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten, obwohl es eine der ersten eingesetzten Methoden bei der Charakterisierung von Molybdat-Bindeproteinen war (RECH *et al.* 1996). Zwar wurden auch für TupA erste Schätzungen von K_d mit dieser Methode durchgeführt (MAKDESSI *et al.* 2001), in dieser Arbeit wurde sie aber nur zur qualitativen Analyse eingesetzt (s. 3.2.2 auf S. 62). Probleme ergaben sich vor allem aufgrund der hohen Proteinkonzentration und der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit von freien Oxyanionen und Protein.

Da die meisten Anionen-Bindeproteine über aromatische Aminosäuren verfügen und diese ihre Lage im Protein während der Bindung leicht verändern, konnten UV/Vis- bzw. fluo-

Tabelle 4.1.: Dissoziationskonstanten von verschiedenen wolframat- und molybdatbindenden Proteinen.

Die Tabelle fasst aus der Literatur bekannte Dissoziationskonstanten von wolframat- und molybdatbindenden Proteinen zusammen. Ein Strich (-) bedeutet, dass das entsprechende Experiment nicht durchgeführt wurde. Abkürzungen: A.v. Azotobacter vinelandii, C.p. Clostridium pasteurianum, E.a. Eubacterium acidaminophilum, E.c. Escherichia coli, H.i. Haemophilus influenzae, P.f. Pyrococcus furiosus, V.c. Vibrio cholerae, X.a. Xanthomonas axonopodis pv. citri; Fluor. Fluoreszenz-Titration, ITC Isothermische Titrationskalorimetrie; n.m. nicht messbar; PP Periplasma.

Protein	WO_4^{2-}	MoO_4^{2}	Referenz	Methode
TupA aus $E.a.$	$<=\!1,\!2~\mathrm{pm}$	2 μΜ	diese Arbeit	ITC
	500 nm	n.m.	Makdessi et al. (2001)	gel shift
TupA aus V.c.	<=10 pm	0,3 μм	diese Arbeit	Fluor.
WtpA aus <i>P.f.</i>	17 рм	11 nm	Bevers et al. (2006)	ITC
ModA aus $E.c.$	7 μм	3 μΜ	RECH et al. (1996)	$\mathrm{UV}/\mathrm{Vis}\ (\mathrm{pH}\ 5{,}0)$
	20 nm	20 nm	IMPERIAL et al. (1998)	99 Mo
PP-Extrakt von $E.c.$	-	9 nm	Corcuera et al. (1993)	99 Mo
ModA aus $X.a.$	0.58 μм	0.29 μм	BALAN et al. (2006)	Fluor.
ModE aus $E.c.$	-	0.8 μм	ANDERSON et al. (1997)	Fluor.
Dimop-ModE aus $E.c.$	-	0.5 μм	GOURLEY et al. (2001)	Fluor.
Mop aus <i>H.i.</i>	-	Тур1 11,8 пм	MASTERS et al. (2005)	ITC
		Typ2 27 nm $$		
MopII aus $C.p.$	-	Тур1 0,16 µм	Schüttelkopf et al. (2002)	ITC
		Тур2 4,7 µм		

reszenzspektroskopische Methoden erfolgreich bei der Charakterisierung der Molybdat- bzw. Wolframatbindung eingesetzt werden (Tab. 4.1). Auch bei TupA zeigt die Anionenbindung einen deutlichen Effekt auf die Fluoreszenz. Das Emissionsmaximum liegt bei 320 nm und damit zwischen den Maxima der Tyr- und Trp-Fluoreszenz (304 bzw. 355 nm, SCHMID 1997). Für kompetitive Experimente ließ sich der Umstand ausnutzen, dass Wolframat und Molybdat zu einer unterschiedlich starken Löschung der Fluoreszenz führten (bei pH 8,0 12% bzw. 30%), während bei den ModA-Proteinen beide Anionen ungefähr den gleichen Effekt haben (BALAN et al. 2006). Dieses Ergebnis deckt sich gut mit der unterschiedlich ausgeprägten Spezifität der Bindeproteine, ist aber in Bezug auf die Bindung schwer zu interpretieren. Das Fluoreszenzspektrum von TupA ist relativ unabhängig vom pH-Wert. Während bei Escheri*chia coli*-ModA die Bindung von MoO_4^{2-} bei pH 7,8 zu einer Fluoreszenzerhöhung und bei pH 5,0 zu einer Löschung führt (IMPERIAL et al. 1998), kam es bei TupA zwischen pH 5,0 und 8,0 stets zu einer Löschung, die bei der Bindung von Molybdat stärker ausgeprägt war als bei der Wolframatbindung. Die Quantität der Löschung war vom pH-Wert abhängig, was aber auch auf die unterschiedlichen Puffer zurückgeführt werden kann. Das TupA-Spektrum zeigt bei der Anionen-Bindung außerdem eine Rotverschiebung um ca. 2 nm. Das könnte darauf hindeuten, dass sich aromatische Aminosäuren in eine hydrophilere Umgebung bewegen. Da das Fluoreszenzspektrum aber die Summe der Fluoreszenzen aller aromatischen Aminosäuren, insbesondere der zwei Trp- und neun Tyr-Seitenketten, abbildet, können über die tatsächliche Bewegung einzelner aromatischer Ringe keine Aussagen getroffen werden. Die durch Fluoreszenz bestimmte Dissoziationskonstante für Molybdat liegt bei 1,3 μ M und damit in der gleichen Größenordnung, wie die durch Fluoreszenz-Titration gemessenen K_d -Werte der Molybdat-Bindeproteine. Es fällt auf, dass die mit anderen Methoden bestimmten Werte oft kleiner sind (vgl. IMPERIAL *et al.* 1998; RECH *et al.* 1996). Ob es sich dabei um einen Zufall handelt, oder ob diese Werte tatsächlich richtig sind, müssten weitere Messungen zeigen. Für das Wolframat-Bindeprotein WtpA konnte keine Änderung des UV/Vis- bzw. Fluoreszenz-Spektrums in Gegenwart von Anionen nachgewiesen werden (BEVERS *et al.* 2006).

Die in dieser Arbeit ebenfalls verwendete CD-Spektroskopie im Nah-UV-Bereich konnte aufgrund der hohen Proteinkonzentration nicht für die Berechnung von Dissoziationskonstanten eingesetzt werden. Allerdings wurde bei der Anionenbindung ein Effekt auf das Spektrum beobachtet: Es kam zu einer Zunahme des Signals und einer Aufspaltung des Maximums. Wie auch bei der Fluoreszenzspektroskopie sind für diesen Effekt Veränderungen in der Umgebung von aromatischen Aminosäuren verantwortlich. Der Beitrag einzelner Seitenketten zum Spektrum kann aus den Daten nicht abgeschätzt werden, könnte aber durch Mutationen näher untersucht werden (vgl. HAMZA *et al.* 2007). Im Bereich des sichtbaren Lichtes können mittels CD auch Heteroatome beobachtet werden, die sich in einer chiralen Umgebung befinden (KLEWPATINOND *et al.* 2008; KLEWPATINOND & VILES 2007). Da einige der Anionen, wie Vanadat, auch im sichtbaren Bereich absorbieren, aber aufgrund von fehlenden Chiralität kein CD-Spektrum haben, könnte versucht werden, die Bindung dieser Ionen über das CD-Spektrum im Bereich des sichtbaren Licht zu verfolgen. Wolframat absorbiert nur sehr schwach um 280 nm (s. 3.2.6 auf S. 76), sodass die beobachtete Veränderung des Nah-UV-CD-Spektrums wahrscheinlich nicht auf das Anion zurückgeführt werden kann.

Die genausten Werte für die Dissoziationskonstanten konnten mit der Isothermischen Titrationskalorimetrie (ITC) gemessen werden. Der für die Molybdatbindung an TupA berechnete Wert von 2 μ M stimmt gut mit den durch andere Methoden berechneten überein, während für Wolframat mit Hilfe der Methode nur eine Obergrenze von ca. 1,2 pM bestimmt wurde. Für WtpA konnte ein K_d von ca. 17 pM für Wolframat und 11 nM für Molybdat bestimmt werden (BEVERS *et al.* 2006). Damit liegt der Wert für die Wolframatbindung an WtpA etwas über dem in dieser Arbeit für TupA bestimmten. Der für Molybdat liegt dagegen weit unter dem für TupA. Der große Unterschied zwischen den beiden Dissoziationskonstanten von TupA machte die Berechnung eines genauen Wertes für Wolframat unmöglich.

Radioaktive Assays sind in ihrer Empfindlichkeit mit der ITC vergleichbar und wurden auch für die Messung von K_d -Werten für Molybdat-Bindeproteine verwendet (IMPERIAL *et al.* 1998). Sie eignen sich besonders für Versuche *in vivo* und wurden sowohl zur Untersuchung

der Molybdat- (CORCUERA *et al.* 1993) als auch der Wolframat-Aufnahme (MAKDESSI *et al.* 2001) eingesetzt. Durch die Methode konnte für das Molybdat-Aufnahmesystem von *E. coli* ein $K_{\rm m}$ von 26 nM bestimmt werden (CORCUERA *et al.* 1993). Dieser liegt etwa in der Größenordnung der Dissoziationskonstanten der Molybdatbindung an ModA (Tab. 4.1 auf S. 102).

Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Obergrenze von 1,2 pM für die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Wolframat-Bindung an TupA aus E. acidaminophilum ist im Vergleich mit anderen Bindeproteinen relativ klein. Der Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der von WtpA aus P. furiosus (BEVERS et al. 2006). Auch für die untersuchten TupA-Homologen konnten ähnliche Obergrenzen für K_d berechnet werden. Damit gehören die Wolframat-Bindeproteine zu den empfindlichsten bisher beschriebenen Anionenbindeproteinen. Viele der charakterisierten extrazellulären Anionen-Bindeproteine haben $K_{\rm d}$ -Werte, die über 0,5 µM liegen. Neben den molybdatbindenden Proteinen der ModA-Familie (Tab. 4.1 auf S. 102) ist vor allem das Phosphat-Bindeprotein aus E. coli gut charakterisiert, dessen $K_{\rm d}$ für Phosphat 0,31 µM (pH 8,5) beträgt (WANG et al. 1997). Dissoziationskonstanten unter 1 nM findet man z. B. bei intrazellulären Rezeptoren, die an der Regulation beteiligt sind. Ein Beispiel für einen sehr empfindlichen Rezeptor ist CueR, das für Cu^+ eine zeptomolare (10⁻²¹ M) Empfindlichkeit haben soll (CHANGELA et al. 2003). Für den molybdatbindende Regulator ModE wurde ein relativ hoher Wert von 0,8 µM bestimmt (ANDERSON et al. 1997), der aber über die Fluoreszenz-Veränderung gemessen wurde und zu hoch geschätzt sein könnte (s. o.).

Diese kleine Dissoziationskonstante von TupA ist wahrscheinlich notwendig, da Wolframat oft nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden ist (s. 1.1 auf S. 12). Da die Verteilung von Wolframat nicht homogen ist und lokale Konzentrationen noch geringer sein können, ist ein empfindlicher Rezeptor für die Aufnahme von WO_4^{2-} von besonderer Bedeutung, so dass eine Dissoziationskonstante von 1,2 pM in diesem Zusammenhang nicht ungewöhnlich ist.

Die Wolframat-Bindeproteine TupA und WtpA haben nicht nur eine hohe Affinität zu Wolframat, sondern auch eine hohe Spezifität. Die Dissoziationskonstanten für Molybdat sind um den Faktor 10^3 (WtpA, BEVERS *et al.* 2006) bzw. 10^6 (TupA, diese Arbeit) höher als die für Wolframat, während beide Werte bei den Molybdat-Bindeproteinen etwa gleich sind. Bei der Regulation der Aufnahme von Molybdat in Gegenwart von Wolframat müssen daher andere Faktoren eine Rolle spielen als bei der Wolframat-Aufnahme (s. 4.3 auf S. 124).

Durch ITC konnten nicht nur die Dissoziationskonstanten bestimmt werden, sondern auch die bei der Bindung stattfindende Enthalpieveränderung $\Delta H_{\rm cal}$. Diese beträgt für die Wolframatbindung etwa -15,7 kcal·mol⁻¹ und für Molybdat -7,2 kcal·mol⁻¹, d. h. sie verläuft in beiden Fällen exotherm. Vergleicht man diese Werte mit denen von WtpA aus *P. furiosus*, den einzigen bekannten gemessenen Enthalpien für die Bindung von Wolframat und Molybdat an ein extrazelluläres Bindeprotein, so stellt man fest, dass für dieses Protein eine Wärmeaufnahme gemessen wurde, d. h. die Bindung verlief endotherm. Für Wolframat wurde ein Wert von +5,3 kcal·mol⁻¹ bestimmt, während der für Molybdat gemessene Wert von +9,9 kcal·mol⁻¹ fast doppelt so hoch war (BEVERS *et al.* 2006). Leider lassen sich die absoluten Zahlen nicht direkt miteinander vergleichen, da sie unter verschiedenen Bedingungen gemessen wurden, wobei besonders der Temperaturunterschied zu berücksichtigen ist (10 °C für TupA und 25 °C für WtpA), aber bei beiden Proteinen ist die Enthalpieveränderung der Wolframatbindung kleiner, d. h. es wird mehr Wärme abgegeben bzw. weniger aufgenommen. WtpA wurde aus einem hyperthermophilen Organismus isoliert, so dass die bei 25 °C endotherme Bindung bei höheren Temperaturen thermodynamisch günstiger ist.

Nimmt man Standardbedingungen an und berechnet die freie Standardenthalpie ΔG° aus den Gleichgewichtskonstanten und daraus die Entropieänderung ΔS , so erhält man für TupA relativ geringe Entropie-Änderungen (Tab. 3.4 auf S. 75). Da die Anionenbindung an WtpA endotherm verläuft, muss die treibende Kraft dort die Entropieänderung sein, diese liegt daher auch für Wolframat und Molybdat bei ca. 70 cal·mol⁻¹·K⁻¹. Nimmt man an, dass die Struktur von ModA aus Archaeglobus fulgidus die WtpA-Struktur darstellt (s. 4.2.1 auf S. 108, HOLLENSTEIN et al. 2007; BEVERS et al. 2006), dann kann man davon ausgehen, dass bei fast identischer Struktur und fast identischer Solvatisierungsenergie der freien Anionen (berechnet von DUDEV & LIM 2004) auch die Entropieänderung bei der Wolframat- und Molybdat-Bindung vergleichbar ist. Dies ist für WtpA auch der Fall. Wie aus Tabelle 3.4 auf S. 75 ersichtlich ist, trifft das für TupA scheinbar nicht zu, obwohl auch hier wahrscheinlich Wolframat und Molybdat in ähnlicher Weise an das Protein binden. Allerdings gibt die Entropieveränderung der Wolframatbindung nur eine Obergrenze wieder, weil man keinen exakten Wert für $K_{\rm a}$, und damit ΔG° , hat. Geht man jetzt also umgekehrt davon aus, dass sich die Entropieänderungen von Wolframat- und Molybdatbindung an TupA nicht unterscheiden, dann kann man mit dem Wert von ΔS der Molybdatbindung und ΔH_{cal} der Wolframatbindung die freie Energie ΔG° und daraus $K_{\rm d}({\rm WO}_4^{2-})$ für TupA berechnen. Man bekommt als realistischen Schätzwert $K_{\rm d}({\rm WO}_4^{2-}) = 0.54$ pM.

Die Molybdat-Bindeproteine weisen eine hohe Temperaturstabiliät auf, *E. coli*-ModA bindet Molybdat bei bis zu 80 °C (IMPERIAL *et al.* 1998). Diese kann durch die Bindung eines Anions verstärkt werden: Die Denaturierungstemperatur von *X. axonopodis*-ModA steigt in Gegenwart von Molybdat von 50,2 °C auf 65,8 °C (BALAN *et al.* 2006). Da Wolframat-Transporter oft in thermophilen Organismen vorkommen, muss besonders bei ihnen eine hohe Stabilität der Bindungen innerhalb des Proteins, aber auch zwischen Protein und Anion gegeben sein. Die Temperaturabhängigkeit der Wolframatbindung an TupA und WtpA wurde noch nicht näher untersucht.

Aus den Gleichgewichtskonstanten ergibt sich während der Wolframatbindung sowohl für TupA als auch für WtpA eine Änderung der Gibbs-Energie von fast -15 kcal·mol⁻¹. Aufgrund von theoretischen Betrachtungen und empirischen Daten wurde dieser Betrag als das theoretische Maximum einer Ligandenbindung erkannt (KUNTZ *et al.* 1999). Es wurde in der gleichen Veröffentlichung eine Regel aufgestellt, dass jedes Nicht-H-Atom eines Liganden etwa -1,5 kcal·mol⁻¹ zur Bindung beiträgt, d.h. die Bindungsenergie für WO₄²⁻ oder MoO₄²⁻ müsste bei etwa -7,5 kcal·mol⁻¹ liegen ($K_d \approx 2,5 \mu$ M). Die Wolframatbindung setzt den doppelten Betrag frei, während z.B. die Bindung von Molybdat an das intrazelluläre MopII aus *Clostridium pasteurianum* etwa die erwartete Energie hat (SCHÜTTELKOPF *et al.* 2002). Darin spiegelt sich auch die unterschiedliche Funktion der Proteine wieder. Die extrazellulären Bindeproteine sollten möglichst auch bei geringen Konzentrationen ihren Liganden binden und zur Permease transportieren. Die Freisetzung des Liganden für den Transport in die Zelle ist an die ATP-Hydrolyse am Transporter gebunden. Mop dagegen dient wahrscheinlich zur Speicherung von Molybdat bzw. Wolframat und zur Aufrechterhaltung einer konstanten Konzentration des freien Anions in der Zelle (MASTERS *et al.* 2005; SCHÜTTELKOPF *et al.* 2002). Die Freisetzung erfolgt durch das passive Einstellen eines Gleichgewichts.

Wenn man für die Hydrolyse von ATP zu ADP unter physiologischen Bedingungen eine freie Enthalpie von etwa $\Delta G'_{\rm ATP} = -12 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ annimmt (QIAN 2007), dann entspricht die bei der Bindung von Wolframat an TupA freiwerdende Energie der Hydrolyse von mehr als einem ATP. Durch den ABC-Transporter werden während des Transports wahrscheinlich zwei ATP hydrolysiert (HOLLENSTEIN *et al.* 2007; LOCHER 2004). Für die Gesamtenergie des Transports spielen weitere Energieterme eine Rolle. Dabei wirkt sich wahrscheinlich der Konzentrationsgradient zwischen Cytoplasma und Periplasma positiv aus, da in der Zelle das Wolframat/Molybdat von regulierend wirkenden Molbindinen wie Mop aufgenommen (MAKDESSI *et al.* 2004) oder durch das Protein MoeA, für das *E. acidaminophilum* zwei Gene hat (MAKDESSI *et al.* 2001), bei der Cofaktor-Synthese eingesetzt wird (SANDU & BRANDSCH 2002). Das Membranpotential wirkt sich wahrscheinlich eher negativ aus, da das Wolframat als negativ geladenes Ion ins Zellinnere transportiert werden muss. Allerdings ist nicht bekannt, ob Protonen zusammen mit Wolframat transportiert werden.

Die Ursachen für die unterschiedliche Affinität der wolframat- und molybdatbindenden Proteinen sollen im folgenden Abschnitt anhand der Struktur geklärt werden.

4.2. TupA ist ein typisches Anionenbindeprotein

Die Struktur von TupA aus *E. acidaminophilum* konnte gelöst werden. In keinem der Kristalle konnte aber Wolframat in der Bindungsstelle identifiziert werden. Die Hauptursache dafür liegt wahrscheinlich in den Kristallisationsbedingungen. Schon bei der Kristallisation traten verschiedene Probleme auf. Zum einen war es von Nachteil, dass das Protein nur bei pH-Werten um 5,0 Kristalle bildete. Diese Tatsache deckt sich gut mit der Erkenntnis, dass Proteine sich besonders gut in der Nähe ihres isoelektrischen Punktes kristallisieren lassen. Dieser liegt für das verkürzte Protein bei ca. 4,6 (berechnet mit ExPASy Compute pI/Mw). Leider ist aber auch bekannt, dass Wolframat bei pH-Werten unterhalb von 6,0 neben schwer löslicher Wolframsäure auch Polywolframate bilden kann (BARRÉ *et al.* 2005). Allerdings wurden die Molybdat-Bindeproteine ModA aus *E. coli* und *Azotobacter vinelandii* bei ähnlichen pH-Werten wie TupA kristallisiert (Na-Acetat pH 4,7 bzw. pH 4,0), wobei sowohl Kristalle mit Molybdat als auch mit Wolframat erhalten wurden (LAWSON *et al.* 1998; HU *et al.* 1997).

Bei der Kristallisation von TupA kam es bei höheren Wolframatkonzentrationen, wie auch bei hohen Salzkonzentrationen, zur Präzipitation im Kristallisationsansatz, weshalb nur sehr geringe Wolframatkonzentrationen in den Puffer gegeben werden konnten. Die Wahl des Puffers war neben dem pH-Wert für die Kristallbildung entscheidend. Citrat wirkte sich stabilisierend auf den Kristall aus, da es das Protein in der im Modell erhaltenen, offenen Konformation fixierte. Andere Puffer, wie z. B. MES, hätten, bei gleichem pH-Wert, nicht diesen Effekt gehabt und führten deshalb zu Kristallen, die qualitativ sehr schlecht waren. Da die *apo*-Form des Proteins normalerweise sehr flexibel ist, ist sie schwierig zu kristallisieren und konnte z. B. beim Phosphat-Bindeprotein aus *E. coli* nur durch Einführung einer Mutation erhalten werden (LEDVINA *et al.* 1996). Weil die in den TupA-Kristallen vorhandene Konformation nicht der geschlossenen Konformation des Proteins entspricht, konnte Wolframat auch nicht durch *soaking* im Cryopuffer in den Kristall gebracht werden, da dieses wahrscheinlich sofort zur Konformationsänderung und damit zur Auflösung der Kristalle führte.

Das elektrostatische Oberflächenpotential von TupA zeigt eine deutlich negative Oberfläche über fast das gesamte Protein (Abb. 3.26 auf S. 93), was hauptsächlich auf saure Aminosäurereste zurückgeführt werden kann. Da die Kristallisation bei relativ geringen Salzkonzentrationen durchgeführt wurde, konnten diese Ladungen wahrscheinlich nicht ausreichend durch Gegenionen kompensiert werden, so dass es bei hohen pH-Werten zu einer Abstoßung der einzelnen TupA-Moleküle gekommen wäre. Der niedrige pH-Wert im Kristallisationspuffer begünstigte die Kristallisation und Aggregation des Proteins, da die Oberfläche durch Protonierung (p K_a (Glu,Asp) = 4,4) teilweise neutralisiert wurde.

Die Kristallstruktur des Proteins zeigt die für Anionenbindeproteine typischen zwei Domänen, die jeweils aus einem fünfsträngigen gemischten β -Faltblatt im Zentrum und den umgebenden Helices bestehen. TupA gehört damit zur gleichen Superfamilie wie die bakteriellen Anionenbindeproteine der Transporter für Phosphat, Sulfat, Molybdat und Nitrat (QUIOCHO & LEDVINA 1996; DWYER & HELLINGA 2004; KOROPATKIN *et al.* 2006).

Von den im kristallisierten Protein vorhandenen Aminosäuren konnten die ersten 16 Aminosäuren (22 - 37) nicht modelliert werden. Diese bilden wahrscheinlich eine flexible Linkerregion, die die Domäne I des Proteins mit dem an Cys²¹ postulierten Lipidanker (MAKDESSI *et al.* 2001) verbindet. Die Aminosäuren dieses *linkers* sind überwiegend polar bzw. geladen und können sich so im umgebenden Lösungsmittel bewegen. Das Protein ist so frei über der Membran beweglich und kann vorhandenes Wolframat "einfangen" und dieses dann zur Permease-Komponente "bringen". Ein ähnlicher Linker ist auch in anderen Anionen-Bindeproteinen aus Gram-positiven bzw. Cyanobakterien vorhanden (KOROPATKIN *et al.* 2006; VYAS *et al.* 2003).

In der Nähe des C-Terminus von TupA gibt es eine bewegliche Schleife und daran anschließend einen mehr oder weniger ungeordneten Strang. Ähnliches ist auch beim Wolframat-/ Molybdat-Bindeprotein ModA aus *Archaeoglobus fulgidus* zu beobachten: der C-Terminus von ModA befindet sich in der ModABC-Gesamtstruktur auf der membranabgewandten Seite, während sich das Bindeprotein zur Permease hin öffnen kann (HOLLENSTEIN *et al.* 2007). Er ist nicht direkt an der Anionenbindung oder der Interaktion mit der Permease beteiligt. Diese Region könnte dazu dienen, die *hinge*-Region von der Umgebung abzuschirmen und beim Öffnen und Schließen des Proteins eine Rolle spielen.

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der Gesamtstruktur gehört TupA keiner der Familien der bisher aufklärten Proteine an. Während die Tertiärstruktur von Domäne I in allen Anionentransportern konserviert ist, unterscheidet sich Domäne II bei den einzelnen Bindeproteinfamilien oft stärker.

Die Tatsache, dass das Protein kein Wolframat enthielt, macht es schwierig, die Bindungsstelle zu identifizieren. Dabei kann nur der direkte Vergleich mit anderen Anionenbindeproteinen helfen. Wie schon festgestellt wurde (s. 3.3.4 auf S. 86), hat die potentielle Anionenbindestelle von TupA nur geringe Ähnlichkeit zu der anderer Bindeproteine.

4.2.1. TupA ist nicht mit den ModA- und WtpA-Familien verwandt

Es sind bisher vier Kristallstrukturen molybdat- und wolframatbindender Proteine aufgeklärt worden. Zum einen sind es drei bakterielle extrazelluläre Bindeproteine von Molybdat-Transportern: ModA aus *Escherichia coli* (PDB-IDs 1amf und 1wod, Auflösung 1,75 Å, Hu et al. 1997), ModA2 aus *Azotobacter vinelandii* (PDB 1atg, 1,20 Å, LAWSON et al. 1998) und ModA aus *Xanthomonas axonopodis* (PDB 1h5y, 1,70 Å, BALAN et al. 2008). Ein verwandtes Protein ist das ebenfalls als ModA bezeichnete Bindeprotein aus dem Archaeon *Archaeglobus fulgidus* (PDB 2onr und 2ons, 1,60 bzw. 1,55 Å, HOLLENSTEIN et al. 2007), welches aber aufgrund seiner Sequenzhomologie zu den Wolframat-bindeproteinen der WtpA-Familie gehört (BEVERS et al. 2006). Im Folgenden wird das Protein aber weiterhin als ModA bezeichnet, da die Funktion des Proteins noch unbekannt ist, weil bisher weder die Anionenbindung dieses Proteins noch der Molybdat-/Wolframat-Transport in *A. fulgidus* untersucht wurden. BALAN et al. (2008) teilt diese Bindeproteine phylogenetisch in drei Unterfamilien ein. Die Zuordnung von *E. coli*-ModA und *A. vinelandii*-ModA in verschiedene Unterfamilien wurde schon früher vorgenommen (LAWSON et al. 1998), die Einordnung von *A. fulgidus* und *A. vinelandii*-ModA in die gleiche Unterfamilie widerspricht aber anderen Ergebnissen (BEVERS


Abbildung 4.1.: Bindestelle der extrazellulären Molybdat-/Wolframat-Bindeproteine ModA bzw. WtpA.

Stereodarstellung der Bindestellen der ModA-Proteine aus *E. coli* (PDB-ID 1amf, grün), *X. axonopodis* (2h5y, magenta), *A. vinelandii* (1atg, blau) und *A. fulgidus* (2onr, orange). Die Beschriftung der Aminosäuren von *E. coli* und *X. axonopodis* ist zusammengefasst (grün), da sie für beide identisch ist. Die Wasserstoffbrücken sind nicht dargestellt, werden aber im Text erläutert.

et al. 2006) und ist auch nicht durch die Struktur begründbar. Beim Vergleich der Bindestellen sollen deshalb im Folgenden nur zwei Familien unterschieden werden: ModA- und WtpA-Homologe. Aufgrund der vorhandenen Daten kann man vermuten, dass die Vertreter der ersten Familie überwiegend Funktionen bei der Molybdat-Aufnahme und die der zweiten bei der Wolframat-Aufnahme erfüllen. Allen ist die typische Struktur der extrazellulären Anionenbindeproteine mit zwei Domänen gemein.

Die drei bakteriellen Proteine binden das tetrahedrale Anion über sieben Wasserstoffbrücken (Abb. 4.1), wobei vier durch Amidogruppen der Hauptkette und drei durch Seitenketten gebildet werden. Die Modelle wurden aus Datensätzen mit unterschiedlichen Anionen $(WO_4^{2-} und MoO_4^{2-})$ im Kristall erstellt. Da die Affinität der ModA-Proteine für Wolframat sich nicht signifikant von der für Molybdat unterschiedet (Tab. 4.1 auf S. 102), kann angenommen werden, dass die Modelle der Bindungsstelle vergleichbar sind. Bei den an der Bindung beteiligten Seitenketten handelt es sich um Hydroxylgruppen von Seryl-, Threonylund Tyrosyl-Resten, mit Ausnahme des A. vinelandii-ModA, bei dem auch eine Amidgruppe (Asn¹⁰) an der Bindung beteiligt ist. Alle drei Proteine binden die tetrahedralen Anionen in der vollständig deprotonierten Form, da das Protein bei allen postulierten H-Brücken als Wasserstoff-Donor fungiert. In der Bindetasche sind keine Seitenketten vorhanden, die die negative Ladung des Anions kompensieren könnten. Die Geometrie der Bindung ist in allen drei Proteinen ähnlich. Die vier an der Bindung beteiligten Amid-Stickstoff-Atome nehmen in den Modellen die gleiche Position ein, während nur zwei der Seitenketten-Positionen in den Strukturen konserviert sind. Dabei handelt es sich zum einen um die Position eines Seryl-Rests (Ser³⁷ bzw. Ser³⁹) und die Position Ser¹² (bzw. Asn¹⁰). Anstelle von Tyr¹⁷⁰ ist in *A. vinelandii*-ModA ein Alanyl-Rest vorhanden, der nicht an der Bindung beteiligt ist¹. Die "fehlende" Wasserstoffbrücke wird in diesem Protein dann durch Thr⁹ gebildet.

Die Geometrie der Bindung ist dadurch in allen drei Proteinen gleich: Es werden zu drei der vier Sauerstoffatome des Oxyanions zwei Wasserstoffbrücken, jeweils mit einem Amid-Stickstoffatom und einem Seitenkettenatom gebunden, und ein Sauerstoffatom dient als Wasserstoffakzeptor für ein Amid-Stickstoff der Hauptkette.

Im Bindeprotein des Wolframat-/Molybdat-Transporters aus A. fulgidus ist das zentrale Metallatom octahedral koordiniert (Abb. 4.1, HOLLENSTEIN et al. 2007). Die Bindung der vier Sauerstoffatome des Anions erfolgt über ähnliche Wasserstoffbrücken wie bei den anderen Proteinen des ModA-Typs: durch die Hydroxylgruppen zweier Seryl-Reste (Ser⁴² und Ser⁷⁰) und eines Tyrosyl-Restes (Tyr²³⁶), die an den gleichen Positionen liegen wie die entsprechenden Reste von E. coli-ModA, und vier Amidgruppen des Proteinrückgrats, von denen sich auch drei an den gleichen Positionen wie in den anderen ModA-Proteinen befinden. Zusätzlich dienen aber die zwei Carboxyl-Gruppen der Seitenketten Glu²¹⁸ und Asp¹⁵³ als Sauerstoff-Donor für das zentrale Molybdän- bzw. Wolfram-Atom des Anions, sodass dieses 6-fach koordiniert ist. Die Gesamtladung der Bindungsstelle mit dem Anion beträgt im vorliegenden Modell -3, da angenommen wird, dass das Anion einfach protoniert ist und dieses Proton durch das zweite Carboxyl-Sauerstoffatom des Restes Glu²¹⁸ gebunden wird. Die Wasserstoff-Brücken im Modell sind um ca. 0,2 – 0,3 Å (Abstand H-Donor—H-Akzeptor) kürzer als im E. coli-ModA-Modell. Dies kann zum einen auf die veränderte Geometrie des Anions, zum anderen aber auch auf die erhöhte Ladung und Elektronendichte in der Umgebung des zentralen Metallatoms zurückgeführt werden.

Für A. fulgidus-ModA wurden mehrere Datensätze ausgewertet, die in Gegenwart von unterschiedlichen Anionen aufgenommen wurden (HOLLENSTEIN *et al.* 2007). Es wurden zwei Modelle veröffentlicht, von denen eins Molybdat, das andere Wolframat in der Bindungsstelle hat. Es ist kein struktureller Unterschied zwischen beiden zu erkennen, d. h. die Lage aller Atome und damit die Bindungslängen sind in den vorliegenden Modellen (Auflösung 1,55 Å mit WO_4^{2-} bzw. 1.60 Å mit MoO_4^{2-}) gleich.

Leider wurde die Anionen-Bindung des Proteins bzw. der Transport durch *A. fulgidus*-ModABC nicht charakterisiert. Es ist nicht bekannt, ob dieses Protein eine unterschiedliche Affinität für Wolframat und Molybdat hat. Da bei der Kristallisation des Proteins sehr hohe Wolframat- bzw. Molybdat-Konzentrationen eingesetzt wurden, kann aus den vorhandenen Daten auch kein Rückschluss auf die Dissoziationskonstanten von *A. fulgidus*-ModA mit die-

¹Um die strukturelle Integrität des Proteins beizubehalten, wird die Stelle des aromatischen Ringes durch Tyr¹¹⁸ eingenommen, dessen Hydroxylgruppe aber von der Bindungsstelle abgewandt ist.

sen und anderen Oxyanionen gezogen werden, außer dass diese für Wolframat und Molybdat wahrscheinlich unter 1 mM liegen. Aufgrund der großen Sequenzhomologie zum Wolframat-Bindeprotein WtpA aus *Pyrococcus furiosus* kann aber davon ausgegangen werden, dass der Aufbau der Bindungstelle in WtpA aus *P. furiosus* dem von *A. fulgidus* gleicht. Die an der Bindung des Anions beteiligten Seitenketten wie auch die entsprechenden Sequenzmotive, in die diese eingebettet sind, sind in beiden Proteinen konserviert. Wie von BEVERS *et al.* (2006) richtig postuliert worden ist, wären in *P. furiosus* die Aminosäuren Ser⁴² und Ser⁷⁵ an der Anionenbindung beteiligt, ebenso ein Tyrosyl-Rest, aber nicht wie postuliert Tyr¹⁶⁴, sondern Tyr²³⁶, welches auch im *alignment* an der Position von Tyr²³⁶ aus *A. fulgidus*-ModA steht. Ebenfalls aus dem *alignment* lässt sich die Funktion von Cys¹⁶² als Entsprechung für Cys¹⁵⁵ des *A. fulgidus*-ModA ableiten.

In den bakteriellen ModA-Proteinen wird eine weitere Wasserstoffbrücke durch einen Rest in Domäne II (Val¹⁵² in *E. coli*-ModA) gebildet. Die entsprechende Amidgruppe kann aufgrund der veränderten Geometrie und Protonierung des Anions im *A. fulgidus*-ModA nicht an der Bindung beteiligt sein, wird aber durch Gly⁴¹ ersetzt. Dieser Glycyl-Rest ist zusammen mit Ser⁴² in einem Motiv mit der Konsensussequenz AGSL in allen WtpA-Homologen konserviert.

P. furiosus-WtpA besitzt ebenfalls die beiden sauren Aminosäurereste, die in A. fulgidus an der Koordinierung des zentralen Metallatoms beteiligt sind (BEVERS *et al.* 2006). Asp 153 ist im Motiv DPXGYR in allen WtpA-Homologen konserviert, wobei X der Position von Cvs¹⁵⁵ in A. fulgidus-ModA entspricht. Die Aminosäure in der Glu²¹⁸ entsprechenden Position ist weniger stark konserviert. Es befindet sich zwar in allen WtpA-Homologen aus den Archaea an der entsprechenden Position ein Glutamat, aber die Proteine aus der Domäne der Bacteria (Pelobacter carbinolicus, Syntrophus aciditrophicus und Desulfotalea psychrophila), die von BEVERS et al. (2006) ebenfalls zu den WtpA-Homologen gerechnet wurden, weisen an der entsprechenden Position einen Seryl-Rest auf. Dieser Austausch würde dazu führen, dass die für A. fulgidus-ModA postulierte octahedrale Struktur in diesen Proteinen nicht realisierbar wäre, da gerade diese beiden sauren Aminosäure-Reste als Sauerstoffdonatoren essentiell sind. Da die Einordnung der WtpA-Homologen in die Gruppe der Wolframat-Bindeproteine nur aufgrund von Sequenzhomologien erfolgte, lässt sich über die Konsequenzen eines solchen Aminosäure-Austauschs wenig aussagen. Weder ist bekannt, ob es sich tatsächlich um funktionale Bindeproteine handelt, noch kann aufgrund der vorhandenen Daten über die Affinität zu und Spezifität für bestimmte Substrate etwas ausgesagt werden.

Das in dieser Arbeit beschriebene Wolframat-Bindeprotein TupA kann aufgrund der Struktur der Bindestelle weder in die Familie Molybdat-Bindeproteine ModA noch in die der Wolframat-Bindeproteine WtpA eingeordnet werden. Ser⁴⁷, Thr⁷⁶ und Thr¹⁶² übernehmen in TupA wahrscheinlich die Rolle von Ser¹², Ser³⁹ und Ala¹²⁵ in *E. coli*-ModA. Die anderen beiden an der Anionenbindung in ModA beteiligten Reste haben keine direkte Entsprechung in TupA. Es gibt zwar auch in TupA die Helix, an deren N-terminalen Pol der Rest Met¹⁸⁹ Val¹⁵² aus ModA entsprechen würde, aber in der Struktur liegt dieser sehr weit von dem gebundenen Citrat entfernt (5,26 Å). Auch in der Position von *E.coli*-Tyr¹⁷⁰ ist in TupA keine an der Bindung beteiligte Aminosäure vorhanden.

Im Unterschied zu den WtpA-Proteinen kommen in der Bindetasche von TupA keine Seitenketten vor, die als Wasserstoff-Akzeptor (mit Ausnahme von His⁹⁶, siehe unten) für ein protoniertes Anion oder als Sauerstoff-Donor für das zentrale Metallatom dienen können. Das spricht dafür, dass das Protein nur die unprotonierte Form des Anions binden kann und würde auch erklären, warum sich im Kristall kein Wolframat in der Bindetasche befindet: die Kristallisation erfolgte in Citrat-Puffer mit einem pH-Wert von rund 5,0, der etwa dem p $K_{\rm a}$ -Wert von Wolframat entspricht (p $K_{\rm a1} = 3,62$, p $K_{\rm a2} = 5,08$, XU et al. 2006). Citrat hat p $K_{\rm a}$ -Werte von 3,13, 4,76 und 6,4 und sollte daher im Kristallisationspuffer ein Proton tragen. Da sowohl His⁹⁶ als auch Arg¹⁵⁶ mit dem Citrat interagieren, könnte eine zweifach negative Ladung des Liganden vollständig kompensiert werden. Allerdings wird die Ladung von Arg¹⁵⁶ durch Asp¹⁵⁸ neutralisiert. Bei einem physiologischen pH-Wert um 7,0 ist auch Wolframat zweifach negativ geladen, sodass auch das ε N-Atom von His⁹⁶ protoniert sein sollte, falls es mit einem O-Atom von WO₄²⁻ interagiert.

Neben den extrazellulären Bindeproteinen der Transporter sind auch intrazelluläre molybdat/wolframatbindende Proteine bekannt, die als Molbindine bezeichnet werden. MopII aus C. pasteurianum, ein Dimer aus zwei Trimeren, hat acht Bindestellen für Molybdat (SCHÜTTELKOPF et al. 2002). Zwei Typ-1-Bindestellen liegen in der kristallographischen 3-fach-Achse der Trimere. In ihnen wird das Oxyanion durch zwölf H-Bindungen, an einem Sauerstoff von drei Hydroxylgruppen (Thr²²) der drei Monomere des Trimers und die anderen drei Sauerstoffatome durch jeweils drei Rückgrat-N-Atome (Val²⁰, Val²¹ und Thr²²), gebunden. Die sechs Typ-2-Bindestellen liegen zwischen den Trimeren. Das Anion in ihnen ist durch acht H-Bindungen gebunden. Zwei Wasserstoffbrücken werden durch die Seitenketten Lys⁶⁰ und Ser⁴⁰ mit jeweils einem Sauerstoffatom gebildet. Die anderen beiden Sauerstoffatome werden durch Ser⁶¹-OH, Ser⁶¹-Rückgrat-N und Arg⁶-N bzw. Ser⁴⁰-OH und -N und Ser⁴³-OH gebildet. In den apo-Strukturen sind diese Bindestellen unverändert. Die Bindestellen werden durch Wassermoleküle in ähnlichen Positionen wie die Sauerstoffatome der Oxyanionen gefüllt. Die Untereinheiten werden durch Kationen $(Ca^{2+}, Na^+ oder Mg^{2+})$ zusammengehalten, die in einer zentralen Kammer unter anderem von den Seitenketten der Asp⁶³-Reste gebunden sind.

Es sind weitere Strukturen von Vertretern der Molbindine bekannt. Sie unterscheiden sich in der Anzahl der Mop-Domänen, haben aber ähnliche Anionenbindestellen. Da sich die Anionenbindestellen stets zwischen zwei Mop-Domänen befinden, bestehen diese Proteine aus mindestens zwei Domänen. Das Protein Mop aus *Sporomusa ovata* ist ähnlich aufgebaut wie MopII und besitzt ebenfalls zwei Bindungsstellentypen (WAGNER *et al.* 2000). Das Protein ModG aus *A. vinelandii*, ein Trimer, ist eng verwandt mit Mop und MopII, es kann ebenfalls acht Molybdat binden und hat zwei Typen von Bindungstellen (DELARBRE *et al.* 2001). Das Protein ModE aus *E. coli*, ein molybdatabhängiger Regulator, besteht aus einer DNA-bindenden Domäne und der diMop-Domäne, die eine Fusion von zwei Mop-Untereinheiten darstellt. Das Protein besitzt nur zwei Typ-2-Anionenbindestellen zwischen den Mop-Domänen. Mop-Domänen sind auch in der kürzlich veröffentlichten Struktur eines ModBC-Komplexes aus *Methanosarcina acetivorans* für die Bindung von Wolframat/Molybdat verantwortlich (GERBER *et al.* 2008). Auch hier erfüllt die Bindung eine regulatorische Funktion beim Transport der Anionen (s. 4.3 auf S. 124).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in allen Molybdat-/Wolframat-Bindeproteinen, mit Ausnahme von ModA aus A. fulgidus, das Anion in deprotonierter Form gebunden ist. Leider lassen sich daraus keine Rückschlüsse für TupA ziehen, da das A. fulgidus-Protein als Vertreter der WtpA-Familie wahrscheinlich das einzige wolframatspezifische Protein ist, für das eine Struktur mit Wolframat bekannt ist. Schon MAKDESSI et al. (2001) hat vorgeschlagen, dass die Spezifität von TupA auf die unterschiedlichen p K_a -Werte von Wolframat und Molybdat zurückzuführen sein könnte (p $K_{a2}(WO_4^{2-}) = 5,08$, p $K_{a2}(MOO_4^{2-}) = 4,24$, XU et al. 2006). Aus den vorhandenen Daten kann aber nicht der Schluss gezogen werden, dass wolframatspezifische Bindeproteine bevorzugt die protonierte Form (HWO₄⁻) binden, da sich die Strukturen von A. fulgidus-ModA mit WO₄²⁻ (PDB-ID 2ons) und MoO₄²⁻ (2onr) nicht signifikant unterscheiden und keine Daten zur Affinität dieses Proteins bekannt sind.

4.2.2. In Domäne II haben TupA und die Phosphat-Bindeproteine ein gemeinsames Sequenzmotiv

Wolframat und Phosphat haben eine ähnliche Struktur und Größe. Daher wird Wolframat oft als Inhibitor in phosphatbindenden Enzymen bei der Kristallisation verwendet. Es kann nicht als Substrat der Enzyme umgesetzt werden, wie z. B. Phosphatase (z.B. FAUMAN *et al.* 1996), und fixiert so einen Übergangszustand.

Wie ModA aus A. fulgidus haben auch Phosphat-Bindeproteine, die protonierte Anionen binden, in der Bindetasche oft saure Reste, die als Wasserstoffakzeptoren dienen können (Abb. 4.2). Da Phosphat unter physiologischen Bedingungen überwiegend als Hydrogenphosphat oder Dihydrogenphosphat (p $K_{a1} = 2,15$, p $K_{a2} = 7,2$ und p $K_{a3} = 12,33$) vorliegt, findet man in den Phosphat-Bindeproteinen (PBP) aus E. coli (PDB-IDs 2abh und 1ixh, LUECKE & QUIOCHO 1990; WANG et al. 1994; YAO et al. 1996; WANG et al. 1997) und Yersinia pestis (2z22, TANABE et al. 2007) einen Aspartyl-Rest, der sich das Proton mit gebundenem Hydrogenphosphat teilt, d. h., dass eine sehr kurze H-Bindung (2,45 Å) gebildet wird. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Dissoziationskonstante für Phosphat beim Wildtyp E. coli-PBP unterhalb von pH 5,5 abnimmt (WANG et al. 1994). Nach Einführung eines



Abbildung 4.2.: Bindestelle der Phosphat-Bindeproteine. Stereodarstellung der Bindestelle der extrazellulären Bindeproteine aus *E. coli* (PDB-ID 1ixh, grau) und *M. tuberculosis* (1pc3, grün). Das zentrale Hydrogenphosphat- bzw. Dihydrogenphosphat-Ion ist durch Punkte dargestellt.

zweiten sauren Restes in die Bindestelle durch die Mutation Thr¹⁴¹Asp konnte am *E. coli*-Phosphat-Bindeprotein eine Spezifität für Dihydrogenphosphat beobachtet werden, d. h. die Dissoziationskonstante oberhalb von pH 7,5 nahm zu, während sie darunter konstant blieb (WANG *et al.* 1994). Die hochaufgelösten Strukturen (Auflösung ca. 1,0 Å) von Wildtyp-PBP und Thr¹⁴¹Asp-PBP zeigen, dass die Bindungslängen trotz der unterschiedlich protonierten Anionen, in den beiden Strukturen fast identisch sind (WANG *et al.* 1997, PDB-Codes 1ixh und 1ixg). Die Aspartyl-Reste tragen zwar zur Spezifität des Proteins bei, durch den Austausch Asp⁵⁶Asn im *E. coli*-PBP konnte aber gezeigt werden, dass der Einfluss der kurzen H-Bindung an diesem Rest auf die Bindungsstärke nicht so groß ist, wie man erwartet hätte (WANG *et al.* 1997).

Im phosphatbindenden *Mycobacterium tuberculosis*-PstS-1 sind, ähnlich wie in Thr¹⁴¹Asp-PBP, zwei Aspartyl-Reste an der Bindung beteiligt (Abb. 4.2, PDB-ID 1pc3, VYAS *et al.* 2003). Das Protein ist in der Lage sowohl Hydrogenphosphat als auch Dihydrogenphosphat zu binden, was auf eine Carboxyl-Carboxyl-Wechselwirkung und die daraus resultierende teilweise Ladungskompensation des an der Dihydrogenphosphat-Bindung beteiligten Asp⁸³ mit Glu²⁹² zurückzuführen ist.

Die Modelle der Phosphat-Bindeproteine PBP und PstS-1 enthalten in der Bindetasche ausschließlich Dipol-Ionen-Wechselwirkungen, d. h. es werden keine Salzbrücken zwischen Protein und Anion ausgebildet. Die Ladung des an der Bindung beteiligten Arginyl-Restes wird bei beiden Proteinen durch einen Aspartyl-Rest (Asp¹³⁷ bzw. Asp¹⁶¹) ausgeglichen

(VYAS *et al.* 2003). Durch Mutation dieses Aspartyl-Restes zu Asn zeigte sich, dass die Entfernung dieser Ladung kaum einen Einfluss auf die Struktur und die Bindung von Phosphat hat (YAO *et al.* 1996, PDB 1quk). Wird dieser Rest gegen Gly oder Thr ausgetauscht, dann wird die Ladung des Arginins durch ein zusätzlich gebundenes Anion (Cl⁻ oder Br⁻) kompensiert (YAO *et al.* 1996, PDB 1qui, 1quj und 1qul).

Die Reste Arg¹³⁵, Asp¹³⁷ und Thr¹⁴¹ liegen in einem in den Phosphat-Bindeproteinen konserviertem Motiv (RGDXSG[T/D]), wobei die letzte Aminosäuren in Abhängigkeit von der Fähigkeit $H_2PO_4^-$ zu binden variiert (s. o.). Der Sequenzvergleich von TupA-Homologen (s. 3.5 auf S. 94) zeigt, dass dieses Bindemotiv in ähnlicher Form auch hier konserviert ist (SRGDXSGT). Sowohl das Arginin als auch das die Ladung kompensierende Aspartat sind in den Proteinen der TupA-Familie vorhanden (Arg¹⁵⁶ und Asp¹⁵⁸). Die letzte Position ist in TupA, wie auch in PBP, durch ein Thr besetzt, das Motiv bindet also wahrscheinlich ein nicht protoniertes O-Atom des Anions.

Die Thr¹⁴¹Asp-Variante des Phosphat-Bindeproteins konnte in einer offenen *apo*-Form kristallisiert werden. Es zeigte sich, dass diese in der Bindetasche ein deutlich negatives elektrostatisches Potential hat (Abb. 4.3, LEDVINA *et al.* 1996). Ähnliches konnte auch für PstS-1 und das Sulfat-Bindeprotein beobachtet werden (LEDVINA *et al.* 1996). Im Gegensatz dazu ist an der Bindestelle von TupA ein positives, und damit zur Ladung des Anions komplementäres, Oberflächenpotential in der Bindestelle zu erkennen (Abb. 3.26 auf S. 93), was auf das Fehlen der sauren Reste und das Vorhandensein eines Histidyl-Restes (His⁹⁶) zurückzuführen ist. Dadurch wird wahrscheinlich eine stärkere Bindung des Anion und eine geringere Dissoziationskonstante des Komplexes erreicht.

Die Bindung von Phosphat an die *E.coli*-PBP-Variante $A^{197}W$ findet in zwei Schritten statt: zuerst wird das Substrat an die offene Form des Proteins gebunden, dann schließt sich das Protein (LEDVINA *et al.* 1998). Die Autoren gehen davon aus, dass das Anion zuerst an Domäne II bindet, da die Affinität mit steigender Salzkonzentration sinkt. Inwieweit diese Bindung einen Einfluss auf die Spezifität des Proteins hat, muss noch geklärt werden. Aufgrund der Ähnlichkeit der Bindemotive von TupA und PBP in dieser Domäne könnten beide sowohl HPO_4^{2-} als auch WO_4^{2-} im ersten Schritt binden. Die Anionen müssten dann durch die Aminosäuren der Domäne I beim Schließen diskriminiert werden.

4.2.3. Die Bindetasche der Sulfat-Bindeproteine ist für kleinere Ionen optimiert

Die 1,7-Å-Struktur des Sulfat-Bindeproteins aus *Salmonella enterica* Typhimurium zeigt ebenfalls die typische Struktur der Bindeproteine (PDB-ID 1sbp HE & QUIOCHO 1993; PFLUGRATH & QUIOCHO 1988). Das Protein besteht, wie die anderen extrazellulären Anionenbindeproteine aus zwei Domänen, wobei sowohl der N- als auch der C-Terminus in



Abbildung 4.3.: Elektrostatisches Oberflächenpotential von T^{141} D-PBP aus *E. coli*. Stereodarstellung des Elektrostatischen Potentials der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche des Phosphat-Bindeproteins aus *E. coli* (PDB-ID 10ib, YAO *et al.* 1996) im Bereich von -5 (rot) bis +5 kT (blau). Die Abbildung zeigt einen Blick in die Bindungsstelle und wurde analog zu Abb. 3.26 auf S. 93 erstellt.

Domäne I liegen. Die Domänen dieses Proteins werden in der geschlossenen Form von Salzbrücken zusammengehalten (zwischen Glu¹⁵ und Arg¹⁷⁵ bzw. Asp⁶⁸ und Arg¹³⁴). Die Bindung des Sulfats erfolgt über sieben Wasserstoffbrücken, wobei 5 von N-Atomen der Hauptkette gebildet werden und nur zwei von Seitenketten (Ser¹³⁰ und Trp¹⁹²). Die N-Atome des Proteinrückgrats liegen alle an N-terminalen Enden von α -Helices. Da dies ein verbreitetes Motiv bei den Anionenbindeproteinen ist, wurde postuliert, dass nicht nur die lokalen Dipole der Amidgruppen zur Bindung beitragen, sondern auch die Makrodipole der Helices (AQVIST et al. 1991). Durch Mutationen konnte aber gezeigt werden, dass diese nur eine untergeordnete Rolle bei der Bindung spielen (HE & QUIOCHO 1993). Da Sulfat kleiner ist als Molybdat und Wolframat, ist die Bindetasche auch entsprechend kleiner. Während das Volumen bei den Molybdat-Bindeproteinen ModA 74 Å³ (A. vinelandii) bzw. 72 Å³ (E. coli) beträgt, hat die Sulfatbindetasche nur ein Volumen von 59 Å³ (LAWSON et al. 1998). Allerdings können Sulfattransporter trotz dieser Unterschiede bei hohen Anionenkonzentrationen auch Molybdat oder Wolframat transportieren (GRUNDEN & SHANMUGAM 1997). Die Bindestelle von TupA hat wenig Ähnlichkeit zu der des Sulfatproteins, außer dass allgemeine Prinzipien, wie die Bindung durch lokale Dipole, auch hier anzutreffen sind.

4.2.4. Das Nitrat-Bindeprotein NtrA besitzt wie TupA ein Histidin in der Bindestelle

Im Struktur-Modell des Nitrat-/Nitrit-Bindeproteins NtrA aus *Synechocystis* sp. befinden sich positiv geladene Seitenketten in der Bindungsstelle (KOROPATKIN *et al.* 2006). Dies ist



Abbildung 4.4.: Die Nitratbindestelle von NtrA aus Synechocystis sp.. Stereodarstellung der Anionenbindestelle des Nitrat-Bindeproteins NtrA. Die von KOROPATKIN et al. (2006) veröffentlichte Struktur (PDB-ID 2g29) wurde verändert (s. Text): die Seitenketten der Reste His196 und Gln¹⁵⁵ wurden um jeweils 180° gedreht. Die gestrichelten Linien stellen potentielle Wasserstoffbrücken dar.

zum einen Lys²⁶⁹, dessen Ladung, ähnlich wie die des Arginins in den Phosphat-Bindeproteinen und in TupA, durch einen sauren Rest (Asp⁷³) kompensiert wird. Außerdem ist im NtrA ein protoniertes Histidin an der Bindung des Anions beteiligt. Das ε^2 N-Atom His¹⁹⁶ bildet in der vorgeschlagenen Struktur (PDB-ID 2g29) zwei Wasserstoffbrücken zu Sauerstoffatomen des Nitrats.

Leider ist die vorliegende Struktur von NtrA in sich nicht logisch, was einen Vergleich mit TupA unmöglich macht. Ich möchte daher die Struktur der Bindungsstelle, soweit möglich, berichtigen (Abb. 4.4). Die Histidyl¹⁹⁶-Seitenkette kann in der publizierten Version keine anderen Wasserstoffbindungen eingehen und würde mit der positiven Ladung in der Bindestelle "hängen". Dreht man den Imidazol-Ring allerdings um 180°, dann könnte das δ^1 N-Atom eine Wasserstoffbrücke zum Thr¹⁹⁰-OH (Abstand $\varepsilon^2 C$ — γO 2,76 Å) aufbauen, während das ε^2 N-Atom dann einen Abstand von nur ca. 2,75 Å zu einem an der Bindung beteiligtem ϵ -Atom von Gln¹⁵⁵ hat. Diese Abstände sind sind wesentlich kleiner als die von KOROPAT-KIN et al. (2006) vorgeschlagenen Wasserstoffbrücken zwischen His¹⁹⁶ und dem Nitrat (ca. 3,0 Å), weil sie eine ungefähr lineare Struktur (N—H—X) ermöglichten, während die veröffentlichten Wasserstoffbrücken einen Winkel von ca. 100 – 110° hätten. Aus der Drehung des Imidazolringes ergibt sich eine weitere Konsequenz: Nur unter der Voraussetzung, dass His¹⁹⁶ nicht protoniert ist, wäre eine fast lineare N-H-N-Brücke zwischen His- δ^1 N und Gln¹⁵⁵- ϵ N möglich. Allerdings treten in der Struktur weitere Probleme auf: das ist vor allem die Nähe von Gln¹⁵⁵-εN zu Lys-ζN (3,02 Å) und von Gln¹⁵⁵-εO zu Asp⁷³-δO (3,03 Å) und Asn¹⁵³-O (3,07 Å). Hier stoßen also jeweils zwei Wasserstoffdonatoren bzw. -akzeptoren aufeinander. Eine Drehung der Amidgruppe von Gln^{155} um 180° würde hier dagegen die Ausbildung von vier Wasserstoffbrücken begünstigen, wobei His¹⁹⁶- $\delta^1 N$ protoniert sein muss.

Die isotropen *B*-Faktoren (Gleichung A.23 auf S. 150), oft fälschlicherweise als Temperatur-Faktoren bezeichnet², des 1,5-Å-Modells sprechen auch für Richtigkeit dieser These. Die meisten Atome der Seitenketten in der Bindungstelle haben *B*-Faktoren zwischen 9 und 10 Å². Für die beiden C-Atome in der δ - bzw. ε -Position des Imidazol-Ringes von His¹⁹⁶ liegen diese allerdings bei 5,77 bzw. 7,08 Å², während sie für die N-Atome 11,45 und 12,61 Å² betragen. Auch die Atome von Gln¹⁵⁵ haben voneinander abweichende *B*-Faktoren, während das δ C-Atom einen Wert von 10,19 Å² aufweist, hat das benachbarte O-Atom einen Wert von 12,46 Å², das N-Atom hat einen *B*-Faktor von 8,73 Å². Unter der Voraussetzung, dass die Disposition der Atome den *B*-Faktor wesentlich beeinflusst, würde man erwarten, dass benachbarte Atome ähnliche *B*-Faktoren haben, da sie sich nur gekoppelt bewegen können.

Um die vorgeschlagenen Veränderungen zu überprüfen wurde je eine Verfeinerung (s. 2.2.5.4 auf S. 50) der veröffentlichten und der veränderten Struktur durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass nach dem Drehen alle Atome des Imidazolringes einen *B*-Faktor zwischen 8,47 Å² und 8,8 Å² hatten und die *B*-Faktoren für die ε -Atome von Gln¹⁵⁵ mit 10,33 Å² (ε O) und 8,79 Å² (ε N) näher an dem des δ C-Atoms lagen als in der Struktur von KOROPATKIN *et al.* (2006). Der höhere *B*-Faktor des O-Atoms lässt sich dadurch erklären, dass dieses mit zwei geladenen Seitenketten interagiert und in der Nähe zu einem Nitrat-O-Atom liegt (2,97 Å). Dadurch nimmt die Elektronendichte um den Kern ab, was einen höheren *B*-Faktor, der hier ein Maß für die Verteilung der Elektronendichte darstellt, zur Folge hat.

Für die Orientierung einiger anderer Histidyl- und Glutaminyl-Reste des Modells ist auch eine Drehung vorzuschlagen (His¹²², His²⁶⁶, Gln¹⁵⁸, Gln²⁵⁵ Gln²⁶¹ und His³⁶³), da in der veröffentlichten Struktur potentielle Wasserstoffbrücken nicht gebildet werden können. Eine eingehende Analyse würde aber den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Es bleibt zu wünschen, dass in Zukunft vor der Veröffentlichung einer Struktur zum einen geprüft wird, ob wesentliche strukturbestimmende Elemente, wie Wasserstoffbrücken, so angeordnet werden können, dass biochemische Grundprinzipien nicht verletzt werden, zum anderen dass auch Instrumente zur Qualitätskontrolle eines Modells, wie *B*-Faktoren, von den Autoren genutzt werden.

Durch die Veränderungen im NtrA-Modell ergibt sich eine Struktur der Bindestelle, die in einigen Punkten von der von KOROPATKIN *et al.* (2006) vorgeschlagenen abweicht. Das Nitrat wird weiterhin mit den N-Atomen der Trp¹⁰²-Seitenkette, der Lys²⁶⁹-Seitenkette und von Gly²⁴⁰ durch H-Brücken an das Protein gebunden. Alle drei Atome befinden etwa in der gleichen Ebene wie das Nitrat. Die Ladung des Lysins wird wahrscheinlich durch Asp⁷³ kompensiert. "Unterhalb" dieser Ebene befindet sich eine hydrophobe Region mit Leu⁷¹ und

²Wie sich im Folgenden zeigen wird, können B-Faktoren nicht nur zur Analyse der Beweglichkeit eines Atoms dienen, da sie allgemein ein Maß für die Unschärfe der Elektronendichte eines Atoms im Kristall sind.

Pro²²², während sich "oberhalb" das His¹⁹⁶ befindet. Es ist leider nicht möglich eindeutig etwas über die Protonierung dieses Restes zu sagen, da Thr¹⁹⁰-γ-O im vorliegenden Fall als H-Akzeptor oder -Donor fungieren kann. Dadurch, dass das Histidin in ein Netzwerk von Dipolen eingebunden ist, kann eine mögliche Ladung aber so weit "verteilt" werden, dass sie bei der Anionen-Bindung eine untergeordnete Rolle spielt. Die fast parallele Anordnung des Imidazol-Ringes zur Nitrat-Ebene machen eine H-Bindung trotz des Abstands von nur etwa 3 Å unmöglich. Wie auch bei den anderen Anionenbindeproteinen sind in NtrA also keine Salzbrücken an der Bindung des Substrats beteiligt. Die Glutaminyl¹⁵⁵-Seitenkette ist, obwohl sie wahrscheinlich nicht wie im Modell von KOROPATKIN *et al.* (2006) an der Bindung beteiligt ist, ein zentraler Bestandteil bei der Vernetzung der die Bindungsstelle umgebenden Seitenketten, da sie über H-Brücken mit His¹⁹⁶, Lys²⁶⁹ und Asp⁷³ verbunden ist. Die Bedeutung solcher Netzwerke für die Funktion der Bindeproteine wurde unter anderem für PstS-1 gezeigt (VYAS *et al.* 2003).

Warum ist nun aber die Struktur der NtrA-Bindestelle für das Verständnis der Wolframatbindung relevant? Die Bindestelle von TupA wird vor allem durch einen Histidyl-Rest (His^{94}) ausgezeichnet, dessen εN im vorliegenden Modell durch eine Wasserstoffbrücke an der Bindung des Citrats beteiligt ist. In den bekannten Strukturen der Molybdat-/Wolframat-, Sulfat- und Phosphat-Bindeproteine ist kein Histidin an der Bindestelle vorhanden, während für NtrA eine Beteiligung von His¹⁹⁶ an der Nitratbindung postuliert wurde (KOROPATKIN et al. 2006). Wie oben gezeigt werden konnte, spielt dieser Rest für die Bindung allerdings nur eine untergeordnete Rolle. Eine ähnliche Funktion bei der Vernetzung der Aminosäuren um die Bindestelle wäre auch für TupA-His⁹⁴ denkbar. Obwohl im vorliegenden Modell nur H-Bindungen des Imidazolringes zum Citrat vorliegen, ist nach einer Drehung des Rings um 90° eine H-Brücke zwischen δ^1 N und einem δ -Atom von Asn²³¹, einem hochkonservierten Rest in einem der die Domänen verbindenden Stränge, möglich (Abstand ca. 3,1 Å). Das ε^2 N-Atom könnte in der geschlossenen Konformation von TupA sich an die OH-Gruppe von Thr⁴⁵ annähern, sodass eine ähnliche Konstellation wie in NtrA entstünde, bei der der Histidyl-Rest Teil eines Netzwerkes von Dipolen wäre. Ein Wasserstoffatom an His 94 - ϵ^2 N würde dann weiterhin in die Bindungsstelle gerichtet sein und kann direkt an der Bindung beteiligt sein. Im vorliegenden Modell von TupA sind die B-Faktoren nicht eindeutig. Daher ist es wahrscheinlich, dass beide Möglichkeiten der Drehung als alternative Konformationen vorliegen.

Das von der Struktur dem NtrA ähnliche Hydrogencarbonat-Bindeprotein CmpA aus Synechocystis PCC 6803 hat an Stelle des Histidins einen Glutaminyl-Rest (KOROPATKIN et al. 2007). Die Bindungsstelle unterscheidet sich erheblich von der der anderen beschriebenen Anionenbindeproteine, da zusammen mit dem Bicarbonat- auch ein Calciumion gebunden wird. Die Bindetasche wird durch drei saure Reste und zwei Amidgruppen dominiert. Außerdem befinden sich in der Umgebung des Hydrogencarbonats Wassermoleküle, während



Abbildung 4.5.: Die Wolframat-Bindestelle von TupA aus *E. acidaminophilum*. Die Abbildung zeigt eine Stereodarstellung der Struktur der potentiellen Wolframatbindestelle von TupA. Das Modell ist anhand der Struktur des citratgebundenen TupA und durch Vergleich mit anderen Anionenbindeproteinen entstanden. Wasserstoffbrücken sind nicht eingezeichnet, da es sich nur um hypothetisches Modell handelt.

die Bindung in allen anderen Anionen-Bindeproteinen unter Ausschluss des Lösungsmittels erfolgt.

Ein Histidin ist im betainbindenden Protein OpuAC an der Bindung von Glycinbetain beteiligt, während es bei der Prolinbetainbindung aufgrund der unterschiedlichen Geometrie der Liganden außerhalb der Reichweite liegt (HORN *et al.* 2006). Die Abwesenheit dieser Bindung trägt nach Meinung der Autoren wesentlich zur 17-fach höheren Affinität des Protein gegenüber Glycinbetain bei ($K_{dGlyB} = 17 \ \mu M$, $K_{dProB} = 295 \ \mu M$).

Eine besondere Rolle spielt ein Histidin in den Enzymen der Histidin-Phosphatase-Familie. Dieses ist in der εN^2 -Postion nicht protoniert und greift das zentrale Phosphoratom während der Reaktion nucleophil an (RIGDEN 2008). Die Umgebung des Phosphations erleichtert diesen Angriff durch drei positiv geladene Aminosäuren, die das Zentralatom deutlich elektrophiler machen. In ähnlicher Weise könnte auch His⁹⁴ das zentrale Wolframatom in TupA koordinieren, was zu einer veränderten Geometrie des Wolframats führen würde. Um, wie in ModA aus *A. fulgidus* (s. 4.2.1 auf S. 108) eine octahedrale Struktur zu erreichen, müsste ein weiterer Elektronendonor an der Bindung beteiligt sein, der aber nicht identifiziert werden konnte. In der vorliegenden Struktur ist eine Wasserstoffbrücke zu einem Sauerstoffatom des Wolframats wahrscheinlicher.

4.2.5. Die Bindung von Wolframat an TupA

Durch den vorausgegangenen Vergleich mit den anderen Anionenbindeproteinen kann ein Modell für die Bindung von Wolframat an TupA postuliert werden. Das Sauerstoffatom O^1

des Wolframations wird in Domäne I wahrscheinlich durch die OH-Gruppe von Ser⁴⁷ und das N-Atom des gleichen Rests gebunden. O² würde H-Brücken mit der OH-Gruppe und dem N-Atom von Thr⁷⁶ bilden können. Diese Bindungen würden denen von Ser¹² und Ser³⁹ in *E. coli*-ModA entsprechen. Zusätzlich würde eine Wasserstoffbrücke zwischen O² und dem N-Atom des Restes Gly¹⁶¹ gebildet werden. O³ könnte, ähnlich wie im Phosphat-Bindeprotein mit der OH-Gruppe von Ser¹⁶⁰, dem N-Atom von Thr¹⁶² und dem η N¹ von Arg¹⁵⁶, Wasserstoffbrücken bilden. Das η N²-Atom von Arg¹⁵⁶ könnte zusammen mit Thr⁴⁶-N und möglicherweise Thr⁴⁵-OH an O⁴ binden. Da Wolframat größer ist als Phosphat, ist es auch möglich, dass beide η N-Atome von Arg¹⁵⁶ am gleichen O-Atom von Wolframat binden. Dieser Rest würde den im Phosphat-Bindeprotein aus *E. coli* vorhandenen sauren Rest ersetzen und könnte je nach Protonierung als Wasserstoffakzeptor oder Wasserstoffdonor dienen, wobei letztere Funktion wahrscheinlicher ist, da Wolframat bei physiologischen pH-Werten (um 7,0) nicht protoniert vorliegen sollte. Die meisten in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden sogar bei pH 8,0 durchgeführt.

Für die These, dass His⁹⁴ für die Wolfram-Spezifität von TupA mitverantwortlich ist spricht auch, dass der Aminosäureaustausch H⁹⁴K wahrscheinlich eine Veränderung der Affinität gegenüber Vanadat hervorruft (s. 3.2.7 auf S. 77), auch wenn dies mit der verwendeten Methode nicht eindeutig war. Hier könnten andere Techniken wie die ITC bessere Ergebnisse liefern, da diese unabhängig vom Vanadat-Spektrum einsetzbar ist. Nur eins der TupA-homologen Proteine hatte im Sequenzvergleich kein Histidin an der His⁹⁴ entsprechenden Position: bei diesem handelt es sich um das Vanadat-Bindeprotein aus *Anabeana variabilis*, welches ein Asparagin an dieser Position besitzt (PRATTE & THIEL 2006). Dieses Protein wurde noch nicht näher untersucht, allerdings konnte gezeigt werden, dass die Aufnahmerate für Vanadat in *A. variabilis* viel größer ist ($K_m = 2,8$ nM PRATTE & THIEL 2006) als bei einer mit TupA vergleichbaren Substrataffinät des Proteins zu erwarten wäre. Dies spricht dafür, dass His⁹⁴ nicht nur einen Einfluss auf die Spezifität des Proteins hat, sondern auch die Stärke der Bindung beeinflusst.

Die Spezifität und Affinität bei der Anionenbindung an TupA werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst, die im Einzelnen diskutiert werden sollen:

• Protonierung. Da Wolframat unter physiologischen Bedingungen nicht protoniert vorliegt, sollte auch die Bindetasche keine Wasserstoffakzeptoren enthalten. Die postulierte Bindetasche enthält keine Reste, die ausschließlich Akzeptoren sind. Überwiegend handelt es sich um N-Atome die, mit Ausnahme der Atome des Imidazolringes von Histidin⁹⁴, nicht als Akzeptoren dienen und um Hydroxylgruppen, die sowohl Donor als auch Akzeptor sein können. Für Enzyme wurde postuliert, dass sie die stabilsten Übergangszustände bilden, wenn die p K_a -Werte von Donor und Akzeptor ähn-

lich sind (SHAN et al. 1996). Falls His⁹⁴ für die Spezifität (mit-)verantwortlich ist, liegt der p K_a -Wert der Seitenkette (p K_a (His) = 6,5) näher an dem von Wolframat (p $K_{a2} = 5,08$) als an dem von Molybdat (p $K_a = 4,00$) (XU et al. 2006), was zu einer größeren Stabilität des Wolframat-TupA-Komplexes führen könnte. MAKDESSI et al. (2001) diskutiert auch eine mögliche Bindung von HWO₄²⁻ an TupA. Für diese These würde die Abnahme der Spezifität bei niedrigeren pH-Werten sprechen (s. 3.2.3 auf S. 63), dagegen spricht allerdings die Kristallstruktur, die kein Wolframat enthält. Unabhängig von der Herkunft des Protons, ist es wahrscheinlich, dass zwischen dem Histidin und dem Wolframat eine Wasserstoffbrücke gebildet wird. Der Unterschied zwischen den p K_a -Werten der Anionen könnte eine Ursache der höheren Affinität des Proteins und der höheren Bindungsenergie gegenüber Wolframat sein. Dies muss aber durch weitere Experimente gezeigt werden. Wenn Hydrogenwolframat das Substrat ist, könnte dies auch zum Ausschluss anderer nicht protonierter Ionen, wie Sulfat führen.

- Elektrostatisches Potential der Bindetasche. Das elektrostatische Oberflächenpotential der Binderegion spielt bei den Phosphat- und Sulfat-Bindeproteinen eine untergeordnete Rolle für die Bindung (LEDVINA *et al.* 1996). Im Gegensatz zu TupA haben diese Proteine ein negatives Potential, obwohl sie auch Anionen binden. Das positive Potential in der Bindetasche von TupA könnte einen Beitrag zu der höheren Bindungsenergie und Affinität von TupA zu seinem Liganden leisten. Die Dissoziationskonstante für die Phosphatbindung an PBP ($K_{d|pH} = 4.5 = 3.8 \ \mu\text{M}, K_{d|pH} = 8.5 = 0.31 \ \mu\text{M},$ WANG *et al.* 1997) liegt wesentlich höher als die für die Wolframatbindung an TupA (< 1,2 pM, diese Arbeit). Die für die Wolframatbindung an TupA (diese Arbeit) und WtpA (BEVERS *et al.* 2006) bestimmten K_d -Werte sind die kleinsten bisher für ein Bindeprotein eines ABC-Transporters gemessenen. Die Dissoziationskonstante für die Molybdat-/Wolframatbindung an ModA liegt um Größenordnungen über diesen Werten. Dies könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass die Bindung von Molybdat in einer stärker apolaren Umgebung stattfindet (HU *et al.* 1997).
- Größe der Bindetasche. Es konnte gezeigt werden, dass sich der Größe der Bindetaschen zwischen molybdat- und sulfatbindenden Proteinen, wie auch die Größe der gebundenen Anionen selbst, deutlich unterscheidet (HU *et al.* 1997; DUDEV & LIM 2004). Dies ist vor allem für die Stabilität der Bindung entscheidend, da Liganden in einer Bindetasche, die nicht die passende Größe hat, nicht alle bzw. nur schwache Wasserstoffbrücken ausbilden können. Da TupA nicht in der geschlossenen Form kristallisiert werden konnte, können keine Aussagen über die Größe der Bindetasche gemacht werden.

- Geometrie der Bindung. Die Geometrie der Bindestelle muss der Geometrie des Liganden angepasst sein. Während Phosphat und Sulfat stets tetrahedral vorliegen, können Molybdän und Wolfram auch 6-fach koordiniert sein, was zu einer octahedralen Form führt. Diese Koordinierung wird in vielen Enzymen bevorzugt (s. 1.2), ist aber auch im Wolframat-Bindeprotein ModA aus Archaeoglobus fulgidus realisiert (HOLLENSTEIN et al. 2007). Die Bindetasche des Nitrat- und Hydrogencarbonat-Bindeproteine ist dagegen für planare Liganden ausgelegt (KOROPATKIN et al. 2007, 2006). Die Bindestelle von TupA weist Homologien zu Phosphat- und Molybdat-Bindeproteinen auf, welche tetrahedrale Liganden binden. Daher kann angenommen werden, dass ein tetrahedrales Wolframat-Ion gebunden wird, obwohl dies durch die Struktur von TupA mit seinem Substrat gezeigt werden muss.
- Solvatisierung. In den meisten Bindeproteinen liegt das Substrat in einer lösungsmittelfreien Umgebung vor (s. o.). Die Solvatisierung spielt bei der Unterscheidung sehr unterschiedlicher Anionen wie Sulfat und Molybdat eine Rolle, kann aber nicht die Diskriminierung von Molybdat und Wolframat erklären, da die Solvatisierungsenergien der beiden Anionen ähnlich sind (DUDEV & LIM 2004).
- Stärke der Anion-Dipol-Wechselwirkung. Die Stärke der Wechselwirkungen zwischen dem Anion und den durch das Proteine bereitgestellten Dipolen wird durch die oben genannten Punkte beeinflusst. Die Stabilität des Komplexes sollte eine hohe Affinität bei möglichst geringer Energiebarriere für die Auflösung des Komplexes beim Transport gewährleisten. Die Dissoziationskonstanten für den Komplex sollten daher in der Größenordnung der in der Umgebung vorhandenen Konzentration liegen. Da die Wolframatkonzentrationen in der Regel geringer sind als die anderer Anionen (s. 1.1 auf S. 12), sind die Dissoziationskonstanten entsprechend geringer (diese Arbeit und BEVERS et al. 2006).

Salzbrücken zwischen Ion und Protein erhöhen die Stabilität der Komplexe, können aber nicht zu einer höheren Spezifität führen (DUDEV & LIM 2004). Daher sind in den Bindungsstellen von Anionentransportern positive Seitenketten-Ladungen durch negative kompensiert. Lokale Ladungen werden abgeschwächt indem sie über ein Netzwerk von Dipolen über die Bindetasche verteilt werden (HE & QUIOCHO 1993). Es wurde gezeigt, dass diese Eigenschaften auch in TupA vorzufinden sind (s. 3.3 auf S. 80). Eine besondere Rolle bei der Anionenbindung könnten die Makrodipole der Helices spielen (AQVIST *et al.* 1991). In den Anionenbindeproteinen, wie auch in TupA, liegen die an der Bindung beteiligten Aminosäuren oft am N-terminalen Ende von α -Helices. Allerdings ist der Einfluss der lokalen Dipole wesentlich größer (NICHOLSON *et al.* 1991; HE & QUIOCHO 1993). Die meisten Bindungen zwischen dem Anion und dem Bindeprotein werden durch Wasserstoffbrücken gebildet, die in ihrem Energiegehalt in Abhängigkeit von Abstand, Winkel und Polarität der Bindungspartner variieren können. Auch für TupA sind ausschließlich Wasserstoffbrücken postuliert worden (s. .o.). Andere Arten der Bindung sind in Bindeproteinen nur selten anzutreffen. Auch hier bildet ModA aus *A. fulgidus* eine Ausnahme (HOLLENSTEIN *et al.* 2007), da das Zentralatom durch zwei Sauerstoffatome saurer Reste koordiniert wird. Auf die Verwandtschaft dieses Proteins mit WtpA wurde schon hingewiesen (s. o.). Inwieweit diese Art der Bindung auch die Affinität zu Wolframat und Molybdat beeinflusst, muss noch geklärt werden.

• Zahl der Ionen-Dipol-Wechselwirkungen. Die Zahl der Ionen-Dipol-Wechselwirkungen sollte eine untergeordnete Rolle für die Spezifität und Affinität spielen, da die anderen Parameter einen größeren Einfluss haben. Sie wird im wesentlichen durch die Größe des Liganden begrenzt. So sind an der Bindung von Sulfat im SBP nur sieben Wasserstoffbrücken beteiligt, das Protein wird aber durch zusätzliche Salzbrücken zwischen den Domänen in der geschlossenen Konformation fixiert (PFLUGRATH & QUIO-CHO 1988). Dagegen wird Hydrogenphosphat im PBP von zwölf Wasserstoffbrücken gebunden (WANG *et al.* 1997). Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für ihr jeweiliges Substrat sind trotzdem bei beiden Proteinen ähnlich ($K_{dSBP} = 0.12 \mu M$, $K_{dPBP} = 0.31 \mu M$, JACOBSON & QUIOCHO 1988; WANG *et al.* 1997). In TupA erfolgt die Bindung des Anions wahrscheinlich ebenfalls über zwölf Wasserstoffbrücken (s. o.), wobei die Dissoziationskonstante für Wolframat weit unter dem für die Phosphatbindung an PBP gemessenen Werten liegt.

4.3. Regulation der Molybdat- und Wolframataufnahme

Molybdän- bzw. wolframabhängige Enzyme sind in vielen Organismengruppen vorhanden — fast drei Viertel der sequenzierten bakteriellen und 95% archaealen Genome enthalten Gene für die Moco-Synthese (ZHANG & GLADYSHEV 2008). Die Wolframat- und Molybdataufnahme kann bei diesen Organismen auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Dies ist besonders wichtig, wenn beide Ionen nebeneinander und/oder in hoher Konzentration vorliegen, da Enzyme durch den Einbau des "falschen" Metalls inaktiviert werden können.

Die Voraussetzung für eine Regulation der Aufnahme ist das Vorhandensein von mehr oder weniger spezifischen Transportern. Hochspezifische und hochaffine, für den Wolframattransport relevante, Anionentransporter sind, neben Tup, nach dem bisherigen Kenntnisstand der Wolframattransporter Wtp (BEVERS *et al.* 2006) und der Vanadattransporter Vup (PRATTE & THIEL 2006). Dagegen kann der hochaffine Molybdattransporter Mod auch Wolframat transportieren (MOUNCEY *et al.* 1996). Wolframat und Molybdat können ebenfalls durch die Sulfattransporter in die Zelle gelangen, die K_m -Werte und Aufnahmeraten sind allerdings sehr gering, so dass hohe Konzentrationen notwendig sind (ZAHALAK *et al.* 2004). Weitere noch nicht näher charakterisierte Transportwege können bei hohen Konzentrationen ebenfalls relevant sein (PAU & LAWSON 2002). Falls Isoenzyme mit verschiedenen Heteroatomen im aktiven Zentrum vorhanden sind, kann schon während der Aufnahme eine Präferenz für ein Metall bestehen. So hat das stickstofffixierende Bakterium *Anabaena variabilis* eine Mo- und eine V-Nitrogenase und neben einem Molybdattransporter (THIEL *et al.* 2002) auch einen Vanadattransporter, dessen Gen aber in Anwesenheit von Molybdat nicht exprimiert wird (PRATTE & THIEL 2006).

Die Verfügbarkeit von aufnahmefähigen Wolfram und Molybdän wird nicht durch die in einem Lebensraum herrschenden Bedingungen bestimmt, sondern kann auch durch die Bindung an von Bakterien gebildete Siderophore beeinflusst werden (Übersicht in PAU & LAWSON 2002, S. 34 – 38). Zum einen können die entstehenden Ion-Siderophor-Komplexe direkt durch Proteine transportiert werden, wie es bei der Eisen(III)-Aufnahme der Fall ist, zum anderen können sie aber auch dadurch regulierend wirken, dass sie ein Substrat eines Transporters binden und damit verhindern, dass dieses aufgenommen werden kann.

Die Rolle von Catecholen bei der Molybdat-Aufnahme wurde besonders in Azotobacter vinelandii untersucht (KHODR et al. 2002; CORNISH & PAGE 2000). A. vinelandii ist ein stickstofffixierendes Bakterium, das drei Nitrogenasen mit Molybdän, Vanadium bzw. nur Eisen (PAU 1989), aber weder ein Wolframenzym noch TupA, besitzt. Die Anwesenheit von Wolframat hemmt das Wachstum in stickstofffreiem Medium (PREMAKUMAR et al. 1996), da es zur Inhibierung des Molybdat-Transports und zur Repression der nicht-Mo-Nitrogenasen führt. Das von diesem Organismus gebildete Catechol Azotochelin wurde in vitro untersucht und kann sowohl Molybdat als auch Wolframat und Vanadat komplexieren. Die Stabilität des Wolframat- und Vanadatkomplexe ist höher als die des Molybdatkomplexes (BELLENGER et al. 2007). Durch in vivo-Experimente konnte gezeigt werden, dass bei hohen Wolframatkonzentrationen hauptsächlich das Siderophor Protochelin produziert wird, welches die Aufnahmerate des toxischen Wolframs stark verringert, da es Wolframat schon im extrazellulären Raum bindet (WICHARD et al. 2008). Trotzdem wirken sich bei A. vinelandii Wolframatkonzentrationen im mikromolaren Bereich schon hemmend aus. Höhere Konzentrationen können nur von Mutanten mit einem Defekt in der Regulation der verschiedenen Nitrogenasen toleriert werden (PREMAKUMAR *et al.* 1996).

Bei vielen Bakterien ist ein molybdatbindender Regulator, ModE in *E. coli* (SELF *et al.* 1999) oder MopA und MopB in *Rhodobacter capsulatus* (WIETHAUS *et al.* 2006), für die Steuerung der Expression verschiedener Gene verantwortlich. Das Protein ModE besteht aus zwei Domänen: einer anionenbindenden, die mit den Mop-Proteinen verwandt ist, und einer an den entsprechenden DNA-Sequenzen bindenden. Die Toxizität von Wolframat beruht oft auf der geringen Spezifität dieses Proteins. Nach der Bindung von Molybdat oder Wolframat fungiert es unter anderem als Repressor für die Gene des Molybdattransporters ModABC (ANDERSON *et al.* 1997; GRUNDEN *et al.* 1996) und als Aktivator für verschieden Gene der

Cofaktor-Synthese, wie das moa-Operon oder die Gene für Molybdänenzyme, wie die narund nap-Operons (Nitrat-Reduktasen) und hyc (Hydrogenase, als Teil der FDH) in *E. coli* (TAO *et al.* 2005). In *A. vinelandii* werden durch ModE das modEABC-Operon und das Speicherprotein ModG reprimiert, wobei neben Wolframat auch Vanadat einen Einfluss auf die Repression hatte (MOUNCEY *et al.* 1996).

Wenn ein Überschuss an Wolframat vorhanden ist, wird dieses durch ModABC transportiert und führt dann zur Repression der Expression des Transporters. Andererseits wird in *A. vinelandii* aber durch ModE auch die Expression der *nif*-Gene stimuliert und die der anderen Nitrogenasen reprimiert (PREMAKUMAR *et al.* 1996). Auch wenn das Protein keine Spezifität bei der Bindung des Anions zeigt, kann die Affinität zur DNA durch das Oxyanion beeinflusst werden, wie es für für *E. coli*-ModE gezeigt wurde (GRUNDEN *et al.* 1999). Eine Regulation von im Wolframstoffwechsel involvierten Genen durch einen ModE-ähnlichen Regulator konnte noch nicht nachgewiesen werden, es gibt aber Anhaltspunkte für diese Möglichkeit (ZHANG & GLADYSHEV 2008). Auf Transkriptionsebene konnte keine Regulation der Expression der *tup*-Gene bzw. des *mop*-Gens aus *E. acidaminophilum* festgestellt werden (MAKDESSI *et al.* 2001, 2004).

Die Expression molybdän- und wolframabhängiger Gene kann nicht nur durch den Regulator ModE erfolgen, sondern auch direkt auf an der Ebene der Ribonukleinsäure durch einen so genannten *riboswitch*. Es handelt sich dabei um eine Sekundär-Struktur in der mRNA, die wahrscheinlich in der Lage ist, den Molybdän- oder Wolframcofaktor zu binden und dadurch die Translation zu verhindern (REGULSKI *et al.* 2008). Solche Sekundärstrukturen wurden meistens vor Genen der Moco-/Tuco-Synthese, aber auch vor dem *mod*-Operon und *tup*homologen Transportern entdeckt (REGULSKI *et al.* 2008), konnten aber nicht vor bekannten Genen aus *E. acidaminophilum* nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung). Es wurde auch gezeigt, dass das in den Cofaktor eingebaute Metall eine für die Funktion des entscheidende Rolle bei der Repression spielt: in Anwesenheit von hohen Wolframat-Konzentrationen kann der an die *E. coli-moeA-riboswitch*-Region bindende Ligand nicht synthetisiert werden, d. h. Moco, aber nicht Tuco, ist hier wahrscheinlich der Ligand (REGULSKI *et al.* 2008). Die Autoren beschreiben zwei Klassen, die sich in der Anwesenheit einer *stem*-Struktur (P3) unterscheiden, wobei die Klasse ohne P3 oft in Organismen mit Wolframenzymen vorkommt und daher als Tuco-Sensor dienen kann.

Da die Regulation auf Transkriptionsebene und Translationsebene relativ langsam ist, existiert ein weiterer Mechanismus um Molybdat-Transporter zu regulieren. Die ATPase-Untereinheit vieler ABC-Transporter hat am C-Terminus eine Domäne, die an der Regulation des Transporters beteiligt ist. Dadurch ist es möglich, den Transporter durch trans-Inhibierung zu deaktivieren. Eine solche Domäne kann auch bei Wolframat- und Molybdat-Transportern Tup, Wtp und Mod gefunden werden. Diese hat Ähnlichkeit zu den Molbindinen und bindet zwei Anionen zwischen den Untereinheiten. Die Kristallstruktur des Molybdattransporters ModBC aus *Methanosarcina acetivorans* im Komplex mit Wolframat wurde aufgeklärt (GERBER *et al.* 2008). Durch die Anionenbindung an die Mop-Domänen wird der Transporter in seiner nach innen geöffneten Struktur fixiert, so dass keine ATP-Hydrolyse stattfinden kann (GERBER *et al.* 2008). TupC aus *E. acidaminophilum* gehört zu den Wolframat-Transportern ohne diese regulatorische Domäne und ist daher um ca. 120 Aminosäuren kürzer als andere ATPase-Untereinheiten von ABC-Transportern. Der Transport kann daher nicht durch trans-Inhibierung reguliert werden bzw. es müsste ein weiteres Protein (Molbindin) an dieser Art der Regulation beteiligt sein.

Die Homöostase von Molybdat und Wolframat wird nicht nur durch den Transport gesteuert sondern kann auch durch die Speicherung und gezielte Freisetzung der Anionen erreicht werden. Zur Speicherung von Wolframat und Molybdat könnten die Mop-Proteine dienen. Sie bilden Hexamere, die bis zu 8 Anionen-Moleküle aufnehmen können (SCHÜTTELKOPF *et al.* 2002). Ein solches Protein konnte auch in *E. acidaminophilum* nachgewiesen werden (MAKDESSI *et al.* 2004). Die Mop-Proteine haben oft höhere Dissoziationskonstanten als die extrazellulären Bindeproteine (Tab. 4.1 auf S. 102), da sie durch die Einstellung eines Gleichgewichts Ionen aufnehmen und abgeben.

ModG ist ein Molybdat-Bindeprotein aus Azotobacter vinelandii, das wie Mop und ModE zur Klasse der Molbindine gehört. Das Protein bildet Trimere und kann acht Molybdat-Moleküle binden. Es hat wahrscheinlich ähnlich wie ModA eine Speicherfunktion (DELARBRE et al. 2001). Ein weiteres Mo-Speicherprotein aus Azotobacter vinelandii kann bis zu 90 Molybdänatome als Mo-Oxid binden. Es ist nicht verwandt mit anderen Mo-Bindeproteinen (FENSKE et al. 2005).

Molybdoenzyme sind ubiquitär in allen Organismengruppen verbreitet (s. 1.2 auf S. 13). Molybdat-Transporter aus Eukaryoten wurden aber erst vor kurzem entdeckt und sind weit weniger gut untersucht als die der Prokaryoten. Der Molybdattransporter MOT1 aus Arabidopsis thaliana wird von einem einzigen Gen codiert und hat einen K_m von 20 nM für die Molybdataufnahme (TOMATSU et al. 2007). MOT1 aus der Grünalge Chlamydomonas reinhardtii hat für den Molybdat-Transport einen K_m -Wert von 6,7 nM (TEJADA-JIMÉNEZ et al. 2007). Die beiden kinetischen Konstanten liegen damit in der gleichen Größenordnung wie die Dissoziationskonstanten der prokaryotischen Bindeproteine. Die MOT-Transporter bilden eine eigene Protein-Familie und sind nicht mit den prokaryotischen ABC-Transportern verwandt, es sind aber Mitglieder der MOT-Familien in Bakterien zu finden (TEJADA-JIMÉNEZ et al. 2007). Die Aufnahme von Wolframat und damit die Spezifität der MOT1-Transporter wurde nicht bestimmt.

4.4. Ausblick

Bei einer erneuten Kristallisation von TupA sollte ein neutraler pH-Wert angestrebt werden. Als Liganden könnten, in Abhängigkeit vom pH-Wert, außer Wolframat auch Vanadat, Molybdat oder Phosphat benutzt werden. Um die sauren Aminosäurereste auf der Oberfläche des Proteins durch Gegenionen zu sättigen, sollte die Kristallisation in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration erfolgen. Parallel dazu können Kristallisationsversuche mit einigen TupA-Homologen durchgeführt werden. Erste Versuche dazu wurden schon unternommen (HEINRICH 2006). Erst die Aufklärung der Struktur im Komplex mit einem Anion, möglichst Wolframat, kann die in dieser Arbeit aufgestellten Thesen bestätigen oder widerlegen und zum vollständigen Verständnis der Bindung beitragen.

Es wurden erste Versuche unternommen, um die Bindung durch Molekulardynamik-Simulationen *in silico* zu untersuchen (Daten nicht gezeigt). Nach Optimierung der Parameter könnte eine solche Simulation beim Verständnis der Vorgänge bei der Anionenbindung helfen und die experimentellen Ergebnisse unterstützten.

Für das Protein TupA aus *E. acidaminophilum* wurden CD-Spektren aufgenommen. Diese Methode eignet sich gut um die Denaturierung (und ggf. Renaturierung) bei Temperaturveränderungen zu verfolgen. Die thermische Stabilität von TupA wurde in ersten Versuchen schon von HEINRICH (2006) untersucht. Bei weiteren Versuchen sollte vor allem der Einfluss der Anionenbindung auf die Stabilität überprüft werden.

Es wurde gezeigt, dass sich Methoden wie die Isothermische Titrationskalorimetrie gut eignen, um die Anionenbindung an TupA zu untersuchen. Da im Rahmen dieser Arbeit überwiegend die Fluoreszenzspektroskopie für die Bindungsstudien verwendet wurde, kam es bei Substraten mit einer Absorption im Bereich zwischen 280 nm und 320 nm, wie Vanadat, Chromat und Thiowolframat, zu Problemen bei der Messung. Da die ITC unabhängig vom Spektrum der Substrate und des Proteins und empfindlicher ist, sollte diese Methode bei weiteren Versuchen den spektroskopischen Methoden vorgezogen werden. Durch ITC-Messungen können vor allem die Thesen zur Vanadat-Bindung der Mutante His⁹⁴Lys überprüft werden. Um eine größere Genauigkeit der Ergebnisse zu erreichen, sollte die Konzentration von Anionenstammlösungen durch eine der zur Verfügung stehenden Methoden vor der Messung überprüft werden (HAGEDOORN *et al.* 2001; HAGEN & ARENDSEN 1998; TAKAYANAGI *et al.* 1998).

Um die These zu überprüfen, dass der Austausch His⁹⁴Asn aus dem wolframatspezifischen Bindeprotein ein Vanadat-spezifisches macht, sollte dieser Austausch eingeführt werden. Falls die These nicht zutrifft, wäre es wünschenswert, wenn mit Hilfe von weiteren Experimenten die Bindestelle gezielt so verändert werden kann, dass sie andere Anionen erkennt und bindet. Es sollte auch über die Einführung von sauren Resten in die Bindetasche nachgedacht werden, um z.B. eine Spezifität für Hydrogenphosphat zu erhalten. Das Bindeprotein ist nur ein Teil des TupABC-Transporters. In weiteren Versuchen können die anderen Komponenten dieses Transporters und ihr Zusammenwirken charakterisiert werden. Ziel sollte es sein, zu überprüfen, inwieweit diese Komponenten für die Spezifität des Gesamtsystems mitverantwortlich sind.

Da die meisten Versuche bisher nur *in vitro* durchgeführt wurden, wäre es wichtig Experimente durchzuführen, die die Funktion von TupA, und möglicherweise auch von TupA-Varianten mit gezielten Aminosäureaustauschen, im Gesamtkontext des Wolframstoffwechsels betrachten. Mit dem in unserem Labor entwickelten Reporterstamm (MöGEL 2007) steht ein erstes Werkzeug zur Verfügung, welches theoretisch eine *in vivo*-Messung des Transports ermöglicht. Ein ähnliches System wurde auch schon bei der Charakterisierung der Molybdatbindung durch heterolog exprimierte Proteine in *E. coli* verwendet (KUPER *et al.* 2003).

.

5. Zusammenfassung

- Das extrazelluläre Wolframat-Bindeprotein TupA des Gram-positiven Bakteriums *Eubacterium acidaminophilum* wurde heterolog in *E. coli* mit dem IMPACT-System produziert. Das Protein konnte *tag*-frei zur Homogenität aufgereinigt und für die weitere Charakterisierung und die Kristallisation verwendet werden.
- Durch spektroskopische und kalorimetrische Methoden konnte gezeigt werden, dass TupA ein hochaffines und hochspezifisches Wolframat-Bindeprotein ist, welches Wolframat und Molybdat mit einer Stöchiometrie von ca. 1 : 1 bindet. Die Dissoziationskonstante für den TupA-Wolframat-Komplex liegt im picomolaren Bereich, experimentell konnte eine obere Grenze von 1,2 pM bestimmt werden, durch theoretische Auswertung wurde ein Wert von 0,54 pM ermittelt. Für die Molybdatbindung an TupA wurde eine Dissoziationskonstante von 2,08 µM bestimmt. Andere Anionen binden mit einer Dissoziationskonstante über 2 mM an TupA.
- Im Rahmen dieser Arbeit wurden TupA-Homologe aus verschiedenen Organismengruppen heterolog exprimiert und charakterisiert. Sie alle zeigten *in vitro* ähnliche Bindungseigenschaften wie TupA aus *E. acidaminophilum*. Sie haben eine hohe Affinität zu Wolframat (K_d im picomolaren Bereich), Molybdat wird mit geringerer Affinität ($K_d > 100$ nM) gebunden. Die Bindung anderer Anionen konnte nicht nachgewiesen werden.
- Durch isothermische Titrationskalorimetrie konnten die bei der Bindung freiwerdenden Enthalpien gemessen werden. Bei der Wolframatbindung wurden ca. 15 kcal·mol⁻¹ frei, bei der Molybdatbindung nur ca. 7 kcal·mol⁻¹. Durch kompetitive Experimente wurde auch gezeigt, dass Wolframat und Molybdat um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren und Molybdat durch Wolframat verdrängt werden kann.
- Die 1,83-Å-Struktur von TupA konnte gelöst werden. TupA ist ein monomeres α/β-Protein, das aus zwei ähnlichen Domänen besteht, die jeweils ein zentrales β-Faltblatt besitzen, um das mehrere Helices angeordnet sind. Zwischen den Domänen liegt eine Spalte, in der die potentielle Anionenbindestelle lokalisiert ist. Das Protein ist strukturell mit anderen Anionen-Bindeproteinen verwandt, muss aber aufgrund seiner Bin-

dungsstelle einer eigenen Proteinfamilie zugeordnet werden. Das Protein lag in einer offenen Form vor, in der Bindestelle konnte ein Citrat-Molekül modelliert werden.

- Die potentielle Wolframat-Bindestelle hat Ähnlichkeit zu denen von Molybdat- und Phosphat-Bindeproteinen. Wolframat wird wahrscheinlich durch zwölf Wasserstoffbrücken an das Protein gebunden: vier Hydroxylgruppen von Seryl- und Threonyl-Resten, fünf Amidstickstoffatomen des Peptidrückgrates, zwei εN-Atomen von Arg¹⁵⁶ und einem N-Atom der His⁹⁴-Seitenkette.
- Ein Sequenzvergleich zeigte, dass die an der Bindung beteiligten Aminosäuren in TupA-Homologen Proteinen hochkonserviert sind. In Domäne I ist vor allem die Sequenzmotive TTTST und GTG typisch für die TupA-Familie, in Domäne II ist es das Motiv SRGDXSGT, das in ähnlicher Form auch Phosphat-Bindeproteinen vorkommt. Für die Spezifität ist vor allem der die Seitenkette von His⁹⁴ von Bedeutung. Die Bindestelle des Vanadat-Bindeproteins VupA unterscheidet sich wahrscheinlich nur durch einen Austausch dieses Restes gegen Asn von der in TupA.
- Aminosäureaustausche an den Positionen Ser⁴⁷, His⁹⁴ und Arg¹⁵⁶ wurden genutzt, um die Funktion dieser Reste bei der Anionenbindung zu überprüfen. Alle Austausche wirkten sich negativ auf das Bindungsverhalten gegenüber Molybdat und Wolframat aus. Nach dem Austausch His⁹⁴Lys konnte eine Vanadatbindung beobachtet werden.

Literaturverzeichnis

- ALMENDRA, M. J., BRONDINO, C. D., GAVEL, O., PEREIRA, A. S., TAVARES, P., BURSAKOV, S., DUARTE, R., CALDEIRA, J., MOURA, J. J. & MOURA, I. (1999). Purification and characterization of a tungstencontaining formate dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Biochemistry*, 38(49): 16.366–16.372.
- ANDERSON, L. A., PALMER, T., PRICE, N. C., BORNEMANN, S., BOXER, D. H. & PAU, R. N. (1997). Characterisation of the molybdenum-responsive ModE regulatory protein and its binding to the promoter region of the modABCD (molybdenum transport) operon of Escherichia coli. Eur J Biochem, 246(1): 119–126.
- ANDRADE, M. A., CHACÓN, P., MERELO, J. J. & MORÁN, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng*, 6(4): 383–390.
- ANDREESEN, J. R. & LJUNGDAHL, L. G. (1973). Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. J Bacteriol, 116(2): 867–873.
- ANDREESEN, J. R. & LJUNGDAHL, L. G. (1974). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*: purification and properties. *J Bacteriol*, 120(1): 6–14.
- AQVIST, J., LUECKE, H., QUIOCHO, F. A. & WARSHEL, A. (1991). Dipoles localized at helix termini of proteins stabilize charges. Proc Natl Acad Sci U S A, 88(5): 2026–2030.
- BAENA, S., FARDEAU, M. L., WOO, T. H., OLLIVIER, B., LABAT, M. & PATEL, B. K. (1999). Phylogenetic relationships of three amino-acid-utilizing anaerobes, *Selenomonas acidaminovorans*, 'Selenomonas acidaminophila' and Eubacterium acidaminophilum, as inferred from partial 16S rDNA nucleotide sequences and proposal of *Thermanaerovibrio acidaminovorans* gen. nov., comb. nov. and *Anaeromusa acidaminophila* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Bacteriol, 49 Pt 3: 969–974.
- BAKER, N. A., SEPT, D., JOSEPH, S., HOLST, M. J. & MCCAMMON, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(18): 10.037– 10.041.
- BALAN, A., SANTACRUZ, C. P., MOUTRAN, A., FERREIRA, R. C. C., MEDRANO, F. J., PÉREZ, C. A., RAMOS, C. H. I. & FERREIRA, L. C. S. (2006). The molybdate-binding protein (ModA) of the plant pathogen Xanthomonas axonopodis pv. citri. Protein Expr Purif, 50: 215–222.
- BALAN, A., SANTACRUZ-PÉREZ, C., MOUTRAN, A., FERREIRA, L. C. S., NESHICH, G. & BARBOSA, J. A. R. G. (2008). Crystallographic structure and substrate-binding interactions of the molybdate-binding protein of the phytopathogen Xanthomonas axonopodis pv. citri. Biochim Biophys Acta, 1784: 393–399.

- BARRÉ, T., ARURAULT, L. & SAUVAGE, F. X. (2005). Chemical behavior of tungstate solutions. Part 1. A spectroscopic survey of the species involved. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 61(4): 551–557.
- BELLENGER, J.-P., ARNAUD-NEU, F., ASFARI, Z., MYNENI, S. C. B., STIEFEL, E. I. & KRAEPIEL, A. M. L. (2007). Complexation of oxoanions and cationic metals by the biscatecholate siderophore azotochelin. J Biol Inorg Chem, 12(3): 367–376.
- BELLENGER, J. P., WICHARD, T. & KRAEPIEL, A. M. L. (2008). Vanadium requirements and uptake kinetics in the dinitrogen-fixing bacterium Azotobacter vinelandii. Appl Environ Microbiol, 74(5): 1478– 1484.
- BERTRAM, P., SCHMITZ, R., LINDER, D. & THAUER, R. (1994a). Tungstate can substitute for molybdate in sustaining growth of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Identification and characterization of a tungsten isoenzyme of formylmethanofuran dehydrogenase. *Arch Microbiol*, 161(3): 220–228.
- BERTRAM, P. A., KARRASCH, M., SCHMITZ, R. A., BÖCHER, R., ALBRACHT, S. P. & THAUER, R. K. (1994b). Formylmethanofuran dehydrogenases from methanogenic Archaea. Substrate specificity, EPR properties and reversible inactivation by cyanide of the molybdenum or tungsten iron-sulfur proteins. *Eur J Biochem*, 220(2): 477–484.
- BERTRAM, S. & GASSEN, H. G. (1991). Gentechnische Methoden. Gustav Fischer Verlag.
- BEVERS, L. E., BOL, E., HAGEDOORN, P.-L. & HAGEN, W. R. (2005). WOR5, a novel tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus* with a broad substrate specificity. *J Bacteriol*, 187(20): 7056–7061.
- BEVERS, L. E., HAGEDOORN, P.-L., KRIJGER, G. C. & HAGEN, W. R. (2006). Tungsten transport protein A (WtpA) in *Pyrococcus furiosus*: the first member of a new class of tungstate and molybdate transporters. J Bacteriol, 188(18): 6498–6505.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6): 1513–1523.
- DE BOK, F. A. M., HAGEDOORN, P.-L., SILVA, P. J., HAGEN, W. R., SCHILTZ, E., FRITSCHE, K. & STAMS, A. J. M. (2003). Two W-containing formate dehydrogenases (CO2-reductases) involved in syntrophic propionate oxidation by *Syntrophobacter fumaroxidans. Eur J Biochem*, 270(11): 2476–2485.
- BORTELS, H. (1936). Weitere Unthersuchungen ueber die Bedeutung von Molybdaen, Vanadium, Wolfram und anderen Erdascenstoffen fuer stickstoffbindende und andere Mikroorganismen. Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, 95: 193–218.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248–254.
- BRAHMS, S. & BRAHMS, J. (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol*, 138(2): 149–178.
- BRÜNGER, A. T. (1992). X-PLOR, version 3.1. A system for X-ray crystallography and NMR. Yale University Press, New Haven, CT.

- BRÜNGER, A. T., ADAMS, P. D., CLORE, G. M., DELANO, W. L., GROS, P., GROSSE-KUNSTLEVE, R. W., JIANG, J. S., KUSZEWSKI, J., NILGES, M., PANNU, N. S., READ, R. J., RICE, L. M., SIMONSON, T. & WARREN, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 54(Pt 5): 905–921.
- BULHELLER, B. M., RODGER, A. & HIRST, J. D. (2007). Circular and linear dichroism of proteins. Phys. Chem Chem Phys, 9(17): 2020–2035.
- BURGDORF, T., BOEMMER, D. & BOWIEN, B. (2001). Involvement of an unusual mol operon in molybdopterin cofactor biosynthesis in *Ralstonia eutropha*. J Mol Microbiol Biotechnol, 3(4): 619–629.
- CHAN, M., MUKUND, S., KLETZIN, A., ADAMS, M. & REES, D. (1995). Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase. *Science*, 267(5203): 1463–1469.
- CHANGELA, A., CHEN, K., XUE, Y., HOLSCHEN, J., OUTTEN, C. E., O'HALLORAN, T. V. & MONDRAGÓN, A. (2003). Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science*, 301(5638): 1383–1387.
- COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N. . (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Cryst, D50: 760–763.
- CORCUERA, G. L., BASTIDAS, M. & DUBOURDIEU, M. (1993). Molybdenum uptake in *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol*, 139(8): 1869–1875.
- CORNISH, A. S. & PAGE, W. J. (2000). Role of molybdate and other transition metals in the accumulation of protochelin by *Azotobacter vinelandii*. Appl Environ Microbiol, 66(4): 1580–1586.
- DASSA, E. & BOUIGE, P. (2001). The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol*, 152(3-4): 211–229.
- DAWSON, R. J. P. & LOCHER, K. P. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. Nature, 443(7108): 180–185.
- DELANO, W. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA on the World Wide Web, http://www.pymol.org.
- DELARBRE, L., STEVENSON, C. E., WHITE, D. J., MITCHENALL, L. A., PAU, R. N. & LAWSON, D. M. (2001). Two crystal structures of the cytoplasmic molybdate-binding protein ModG suggest a novel cooperative binding mechanism and provide insights into ligand-binding specificity. J Mol Biol, 308(5): 1063–1079.
- DESVAUX, M., DUMAS, E., CHAFSEY, I. & HÉBRAUD, M. (2006). Protein cell surface display in Grampositive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol Lett*, 256(1): 1–15.
- DHAWAN, I. K., ROY, R., KOEHLER, B. P., MUKUND, S., ADAMS, M. W. & JOHNSON, M. K. (2000). Spectroscopic studies of the tungsten-containing formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. J Biol Inorg Chem, 5(3): 313–327.
- DOUBLIÉ, S. (1997). Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods Enzymol*, 276: 523–530.

- DUDEV, T. & LIM, C. (2004). Oxyanion selectivity in sulfate and molybdate transport proteins: an ab initio/CDM study. J Am Chem Soc, 126(33): 10.296–10.305.
- DWYER, M. A. & HELLINGA, H. W. (2004). Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering. *Curr Opin Struct Biol*, 14(4): 495–504.
- EDGAR, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res, 32(5): 1792–1797.
- EINSLE, O., NIESSEN, H., ABT, D. J., SEIFFERT, G., SCHINK, B., HUBER, R., MESSERSCHMIDT, A. & KRONECK, P. M. H. (2005). Crystallization and preliminary x-ray analysis of the tungsten-dependent acetylene hydratase from *Pelobacter acetylenicus*. Acta Crystallogr Sect F, 61(3): 299–301.
- EMSLEY, P. & COWTAN, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 60(Pt 12 Pt 1): 2126–2132.
- FAUMAN, E. B., YUVANIYAMA, C., SCHUBERT, H. L., STUCKEY, J. A. & SAPER, M. A. (1996). The X-ray crystal structures of *Yersinia* tyrosine phosphatase with bound tungstate and nitrate. Mechanistic implications. *J Biol Chem*, 271(31): 18.780–18.788.
- FENSKE, D., GNIDA, M., SCHNEIDER, K., MEYER-KLAUCKE, W., SCHEMBERG, J., HENSCHEL, V., MEYER, A.-K., KNÖCHEL, A. & MÜLLER, A. (2005). A new type of metalloprotein: The Mo storage protein from *Azotobacter vinelandii* contains a polynuclear molybdenum-oxide cluster. *Chembiochem*, 6(2): 405–413.
- FICHANT, G., BASSE, M.-J. & QUENTIN, Y. (2006). ABCdb: an online resource for ABC transporter repertories from sequenced archaeal and bacterial genomes. *FEMS Microbiol Lett*, 256(2): 333–339.
- FRISHMAN, D. & ARGOS, P. (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment. Proteins, 23(4): 566–579.
- GARNER, C. D. & STEWART, L. J. (2002). Tungsten-substituted molybdenum enzymes. *Met Ions Biol Syst*, 39: 699–726.
- GARNER, M., REGLINSKI, J., SMITH, W. E., MCMURRAY, J., ABDULLAH, I. & WILSON, R. (1997). A1 H spin echo and 51V NMR study of the interaction of vanadate with intact erythrocytes. *J Biol Inorg Chem*, 2(2): 235–241.
- GASTEIGER, E., GATTIKER, A., HOOGLAND, C., IVANYI, I., APPEL, R. D. & BAIROCH, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31(13): 3784–3788.
- GERBER, S., COMELLAS-BIGLER, M., GOETZ, B. A. & LOCHER, K. P. (2008). Structural basis of transinhibition in a molybdate/tungstate ABC transporter. *Science*, 321(5886): 246–250.
- GILL, S. & VON HIPPEL, P. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal Biochem, 182: 319–326.
- GOURLEY, D. G., SCHUTTELKOPF, A. W., ANDERSON, L. A., PRICE, N. C., BOXER, D. H. & HUNTER, W. N. (2001). Oxyanion binding alters conformation and quaternary structure of the C-terminal domain of the transcriptional regulator mode. Implications for molybdate-dependent regulation, signaling, storage, and transport. J Biol Chem, 276(23): 20.641–20.647.

- GRAENTZDOERFFER, A., RAUH, D., PICH, A. & ANDREESEN, J. R. (2003). Molecular and biochemical characterization of two tungsten- and selenium-containing formate dehydrogenases from *Eubacterium acidaminophilum* that are associated with components of an iron-only hydrogenase. Arch Microbiol, 179(2): 116–130.
- GREENFIELD, N. & FASMAN, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 8(10): 4108–4116.
- GRUNDEN, A. M., RAY, R. M., ROSENTEL, J. K., HEALY, F. G. & SHANMUGAM, K. T. (1996). Repression of the *Escherichia coli modABCD* (molybdate transport) operon by ModE. *J Bacteriol*, 178(3): 735–744.
- GRUNDEN, A. M., SELF, W. T., VILLAIN, M., BLALOCK, J. E. & SHANMUGAM, K. T. (1999). An analysis of the binding of repressor protein ModE to modABCD (molybdate transport) operator/promoter DNA of Escherichia coli. J Biol Chem, 274(34): 24.308–24.315.
- GRUNDEN, A. M. & SHANMUGAM, K. T. (1997). Molybdate transport and regulation in bacteria. Arch Microbiol, 168(5): 345–354.
- HAGEDOORN, P. L., CHEN, T., SCHRÖDER, I., PIERSMA, S. R., DE VRIES, S. & HAGEN, W. R. (2005). Purification and characterization of the tungsten enzyme aldehyde:ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic denitrifier *Pyrobaculum aerophilum*. J Biol Inorg Chem, 10(3): 259–269.
- HAGEDOORN, P. L., VAN'T SLOT, P., VAN LEEUWEN, H. P. & HAGEN, W. R. (2001). Electroanalytical determination of tungsten and molybdenum in proteins. *Anal Biochem*, 297(1): 71–78.
- HAGEN, W. & ARENDSEN, A. (1998). The bioinorganic chemistry of tungsten. Structure and Bonding, 90: 161–192.
- HAMZA, M. A., MARTIN, S. R. & ENGEL, P. C. (2007). The contribution of tryptophan residues to conformational changes in clostridial glutamate dehydrogenase–W64 and W449 as mediators of the cooperative response to glutamate. *FEBS J*, 274(16): 4126–4134.
- HE, J. J. & QUIOCHO, F. A. (1993). Dominant role of local dipoles in stabilizing uncompensated charges on a sulfate sequestered in a periplasmic active transport protein. *Protein Sci*, 2(10): 1643–1647.
- HEDDLE, J., SCOTT, D. J., UNZAI, S., PARK, S.-Y. & TAME, J. R. H. (2003). Crystal structures of the liganded and unliganded nickel-binding protein NikA from *Escherichia coli*. J Biol Chem, 278(50): 50.322–50.329.
- HEIDER, J., MA, K. & ADAMS, M. W. (1995). Purification, characterization, and metabolic function of tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic and proteolytic archaeon *Thermococcus* strain ES-1. J Bacteriol, 177(16): 4757–4764.
- HEINIG, M. & FRISHMAN, D. (2004). STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucleic Acids Res*, 32(Web Server issue): W500–W502.
- HEINRICH, A. (2006). Untersuchungen zum Wolframat-Aufnahmesystem in Prokaryoten. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- HENSGENS, C. M., HAGEN, W. R. & HANSEN, T. A. (1995). Purification and characterization of a benzylviologen-linked, tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas*. J Bacteriol, 177(21): 6195–6200.

- HIGGINS, C. F. & LINTON, K. J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. Nat Struct Mol Biol, 11(10): 918–926.
- HILLE, R. (2002a). Molybdenum and tungsten in biology. Trends Biochem Sci, 27(7): 360-367.
- HILLE, R. (2002b). Molybdenum enzymes containing the pyranopterin cofactor: an overview. Met Ions Biol Syst, 39: 187–226.
- HOCHHEIMER, A., HEDDERICH, R. & THAUER, R. K. (1998). The formylmethanofuran dehydrogenase isoenzymes in Methanobacterium wolfei and Methanobacterium thermoautotrophicum: induction of the molybdenum isoenzyme by molybdate and constitutive synthesis of the tungsten isoenzyme. Arch Microbiol, 170(5): 389–393.
- HOLDEN, J. F. & ADAMS, M. W. W. (2003). Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments. Curr Opin Chem Biol, 7(2): 160–165.
- HOLLENSTEIN, K., FREI, D. C. & LOCHER, K. P. (2007). Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*, 446(7132): 213–216.
- HORN, C., SOHN-BÖSSER, L., BREED, J., WELTE, W., SCHMITT, L. & BREMER, E. (2006). Molecular determinants for substrate specificity of the ligand-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis* for the compatible solutes glycine betaine and proline betaine. J Mol Biol, 357(2): 592–606.
- HU, Y., FAHAM, S., ROY, R., ADAMS, M. W. & REES, D. C. (1999). Formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus*: the 1.85 A resolution crystal structure and its mechanistic implications. J Mol Biol, 286(3): 899–914.
- HU, Y., RECH, S., GUNSALUS, R. P. & REES, D. C. (1997). Crystal structure of the molybdate binding protein ModA. *Nat Struct Biol*, 4(9): 703–707.
- IBA (2003). Expression and purification Strep-tag and/or 6xHis-tag of proteins using Strep-tag and/or 6xHistag. A comprehensive manual. IBA GmbH, Rudolf-Wissel-Str. 28 37079 Göttingen Germany.
- IMPERIAL, J., HADI, M. & AMY, N. K. (1998). Molybdate binding by ModA, the periplasmic component of the *Escherichia coli* mod molybdate transport system. *Biochim Biophys Acta*, 1370(2): 337–346.
- JACOBSON, B. L. & QUIOCHO, F. A. (1988). Sulfate-binding protein dislikes protonated oxyacids. A molecular explanation. J Mol Biol, 204(3): 783–787.
- JOHNSON, J., RAJAGOPALAN, K., MUKUND, S. & ADAMS, M. (1993). Identification of molybdopterin as the organic component of the tungsten cofactor in four enzymes from hyperthermophilic Archaea. *J Biol Chem*, 268(7): 4848–52.
- JOHNSON, M., REES, D. & ADAMS, M. (1996). Tungstoenzymes. Chem Rev, 96(7): 2817–2840.
- JOHNSON, W. C. (1999). Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. Proteins, 35(3): 307–312.
- JONES, J. B. & STADTMAN, T. C. (1977). Methanococcus vannielii: culture and effects of selenium and tungsten on growth. J Bacteriol, 130(3): 1404–1406.

- JONES, T. A., ZOU, J. Y., COWAN, S. W. & KJELDGAARD, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. Acta Crystallogr A, 47 (Pt 2): 110–119.
- KARZANOV, V. V., CORREA, C. M., BOGATSKY, Y. G. & NETRUSOV, A. I. (1991). Alternative NAD(+)dependent formate dehydrogenases in the facultative methylotroph *Mycobacterium vaccae* 10. *FEMS Microbiol Lett*, 65(1): 95–99.
- KHODR, H. H., HIDER, R. C. & DUHME-KLAIR, A.-K. (2002). The iron-binding properties of aminochelin, the mono(catecholamide) siderophore of *Azotobacter vinelandii*. J Biol Inorg Chem, 7(7-8): 891–896.
- KIBBE, W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. Nucleic Acids Res, 35: W43–W46.
- KISKER, C., SCHINDELIN, H., PACHECO, A., WEHBI, W. A., GARRETT, R. M., RAJAGOPALAN, K. V., ENEMARK, J. H. & REES, D. C. (1997). Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell*, 91(7): 973–983.
- KLETZIN, A. & ADAMS, M. W. (1996). Tungsten in biological systems. FEMS Microbiol Rev, 18(1): 5-63.
- KLEWPATINOND, M., DAVIES, P., BOWEN, S., BROWN, D. R. & VILES, J. H. (2008). Deconvoluting the Cu2+ binding modes of full-length prion protein. J Biol Chem, 283(4): 1870–1881.
- KLEWPATINOND, M. & VILES, J. H. (2007). Empirical rules for rationalising visible circular dichroism of Cu2+ and Ni2+ histidine complexes: applications to the prion protein. *FEBS Lett*, 581(7): 1430–1434.
- KLEYWEGT, G. J. & JONES, T. A. (2002). Homo crystallographicus-quo vadis? Structure, 10(4): 465-472.
- KOROPATKIN, N. M., KOPPENAAL, D. W., PAKRASI, H. B. & SMITH, T. J. (2007). The structure of a cyanobacterial bicarbonate transport protein, CmpA. J Biol Chem, 282(4): 2606–2614.
- KOROPATKIN, N. M., PAKRASI, H. B. & SMITH, T. J. (2006). Atomic structure of a nitrate-binding protein crucial for photosynthetic productivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(26): 9820–9825.
- KRAHN, E., WEISS, R., KRÖCKEL, M., GROPPE, J., HENKEL, G., CRAMER, P., TRAUTWEIN, X., SCHNEI-DER, K. & MÜLLER, A. (2002). The Fe-only nitrogenase from *Rhodobacter capsulatus*: identification of the cofactor, an unusual, high-nuclearity iron-sulfur cluster, by Fe K-edge EXAFS and 57Fe Mössbauer spectroscopy. J Biol Inorg Chem, 7(1-2): 37–45.
- KRISSINEL, E. & HENRICK, K. (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 60(Pt 12 Pt 1): 2256–2268.
- KUNTZ, I. D., CHEN, K., SHARP, K. A. & KOLLMAN, P. A. (1999). The maximal affinity of ligands. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(18): 9997–10.002.
- KUPER, J., ZU BERSTENHORST, S. M., VÖDISCH, B., MENDEL, R. R., SCHWARZ, G. & BOXER, D. H. (2003). In vivo detection of molybdate-binding proteins using a competition assay with ModE in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 218(1): 187–193.
- KUPER, J., LLAMAS, A., HECHT, H.-J., MENDEL, R. R. & SCHWARZ, G. (2004). Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature*, 430(7001): 803– 806.

- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259): 680–685.
- LASKOWSKI, R., MACARTHUR, M., MOSS, D. & THORNTON, J. (1993). PROCHECK: a program to check the sterochemical quality of protein structures. J Appl Cryst, 26: 283–291.
- LAUKEL, M., CHISTOSERDOVA, L., LIDSTROM, M. E. & VORHOLT, J. A. (2003). The tungsten-containing formate dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1: purification and properties. *Eur J Biochem*, 270(2): 325–333.
- LAWSON, D. M., WILLIAMS, C. E., MITCHENALL, L. A. & PAU, R. N. (1998). Ligand size is a major determinant of specificity in periplasmic oxyanion-binding proteins: the 1.2 A resolution crystal structure of Azotobacter vinelandii ModA. Structure, 6(12): 1529–1539.
- LEDVINA, P. S., TSAI, A. L., WANG, Z., KOEHL, E. & QUIOCHO, F. A. (1998). Dominant role of local dipolar interactions in phosphate binding to a receptor cleft with an electronegative charge surface: equilibrium, kinetic, and crystallographic studies. *Protein Sci*, 7(12): 2550–2559.
- LEDVINA, P. S., YAO, N., CHOUDHARY, A. & QUIOCHO, F. A. (1996). Negative electrostatic surface potential of protein sites specific for anionic ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(13): 6786–6791.
- LEONHARDT, U. & ANDREESEN, J. R. (1977). Some properties of formate dehydrogenase, accumulation and incorporation of 185W-tungsten into proteins of *Clostridium formicoaceticum*. Arch Microbiol, 115(3): 277–284.
- LINDBLOM, S. D., ABDEL-GHANY, S., HANSON, B. R., HWANG, S., TERRY, N. & PILON-SMITS, E. A. H. (2006). Constitutive expression of a high-affinity sulfate transporter in Indian mustard affects metal tolerance and accumulation. *J Environ Qual*, 35(3): 726–733.
- LINTON, K. J. & HIGGINS, C. F. (1998). The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. Mol Microbiol, 28(1): 5–13.
- LJUNGDAHL, L. & ANDREESEN, J. (1975). Tungsten, a component of active formate dehydrogenase from Clostridium thermoacetium. FEBS Lett, 54(2): 279–82.
- LJUNGDAHL, L. G. (1976). Tungsten, a biologically active metal. Trends Biochem Sci, 1: 63-65.
- LOCHER, K. P. (2004). Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol*, 14(4): 426–431.
- LUECKE, H. & QUIOCHO, F. A. (1990). High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds. *Nature*, 347(6291): 402–406.
- MA, K., HUTCHINS, A., SUNG, S.-H. S. & ADAMS, M. W. W. (1997). Pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*, functions as a coenzyme A-dependent pyruvate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 9608–9613.
- MAKDESSI, K. (2001). Identifizierung und Charakterisierung eines wolframatspezifischen ABC-Transporters und des Mop-Proteins aus Eubacterium acidaminophilum. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- MAKDESSI, K., ANDREESEN, J. R. & PICH, A. (2001). Tungstate Uptake by a highly specific ABC transporter in *Eubacterium acidaminophilum*. J Biol Chem, 276(27): 24.557–24.564.
- MAKDESSI, K., FRITSCHE, K., PICH, A. & ANDREESEN, J. R. (2004). Identification and characterization of the cytoplasmic tungstate/molybdate-binding protein (Mop) from *Eubacterium acidaminophilum*. Arch Microbiol, 181(1): 45–51.
- MARUSYK, R. & SERGEANT, A. (1980). A simple method for dialysis of small-volume samples. Anal Biochem, 105(2): 403–404.
- MASTERS, S. L., HOWLETT, G. J. & PAU, R. N. (2005). The molybdate binding protein Mop from Haemophilus influenzae – biochemical and thermodynamic characterisation. Arch Biochem Biophys, 439(1): 105–112.
- MECKENSTOCK, R. U., KRIEGER, R., ENSIGN, S., KRONECK, P. M. & SCHINK, B. (1999). Acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*. Molecular and spectroscopic properties of the tungsten iron-sulfur enzyme. *Eur J Biochem*, 264(1): 176–182.
- MENDEL, R. R. (2005). Molybdenum: biological activity and metabolism. Dalton Trans, 2005(21): 3404–3409.
- MORRISON, M. S., COBINE, P. A. & HEGG, E. L. (2007). Probing the role of copper in the biosynthesis of the molybdenum cofactor in *Escherichia coli* and *Rhodobacter sphaeroides*. J Biol Inorg Chem, 12(8): 1129–1139.
- MOUNCEY, N. J., MITCHENALL, L. A. & PAU, R. N. (1996). The *modE* gene product mediates molybdenumdependent expression of genes for the high-affinity molybdate transporter and *modG* in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 142 (Pt 8): 1997–2004.
- MUKUND, S. & ADAMS, M. (1993). Characterization of a novel tungsten-containing formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. A role for tungsten in peptide catabolism. J Biol Chem, 268(18): 13.592–600.
- MUKUND, S. & ADAMS, M. W. (1991). The novel tungsten-iron-sulfur protein of the hyperthermophilic archaebacterium, *Pyrococcus furiosus*, is an aldehyde ferredoxin oxidoreductase. Evidence for its participation in a unique glycolytic pathway. *J Biol Chem*, 266(22): 14.208–14.216.
- MUKUND, S. & ADAMS, M. W. (1995). Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase, a novel tungsten-containing enzyme with a potential glycolytic role in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J Biol Chem, 270(15): 8389–8392.
- MURSHUDOV, G. N., VAGIN, A. A. & DODSON, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystr*, D53: 240–255.
- MÖGEL, I. (2007). Untersuchungen zu den Wolframat-Transportern TupABC aus R. eutropha H16 und E. acidaminophilum. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- NAVAZA, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. Acta Cryst, D50: 760-763.
- NICHOLSON, H., ANDERSON, D. E., DAO-PIN, S. & MATTHEWS, B. W. (1991). Analysis of the interaction between charged side chains and the alpha-helix dipole using designed thermostable mutants of phage T4 lysozyme. *Biochemistry*, 30(41): 9816–9828.

- VAN DER OOST, J., SCHUT, G., KENGEN, S. W., HAGEN, W. R., THOMM, M. & DE VOS, W. M. (1998). The ferredoxin-dependent conversion of glyceraldehyde-3-phosphate in the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus represents a novel site of glycolytic regulation. J Biol Chem, 273(43): 28.149–28.154.
- OTWINOWSKI, Z. & MINOR, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. Methods Enzymol, 276: 307–326.
- PACE, C. N., VAJDOS, F., FEE, L., GRIMSLEY, G. & GRAY, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, 4(11): 2411–2423.
- PAU, R. N. (1989). Nitrogenases without molybdenum. Trends Biochem Sci, 14(5): 183-186.
- PAU, R. N. & LAWSON, D. M. (2002). Transport, homeostasis, regulation, and binding of molybdate and tungstate to proteins. *Met Ions Biol Syst*, 39: 31–74.
- PERCZEL, A., PARK, K. & FASMAN, G. D. (1992). Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide. *Anal Biochem*, 203(1): 83–93.
- PFLUGRATH, J. W. & QUIOCHO, F. A. (1988). The 2 A resolution structure of the sulfate-binding protein involved in active transport in *Salmonella typhimurium*. J Mol Biol, 200(1): 163–180.
- POTTERTON, E., BRIGGS, P., TURKENBURG, M. & DODSON, E. (2003). A graphical user interface to the CCP4 program suite. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 59(Pt 7): 1131–1137.
- PRATTE, B. S. & THIEL, T. (2006). High-affinity vanadate transport system in the cyanobacterium Anabaena variabilis ATCC 29413. J Bacteriol, 188(2): 464–468.
- PREMAKUMAR, R., JACOBITZ, S., RICKE, S. C. & BISHOP, P. E. (1996). Phenotypic characterization of a tungsten-tolerant mutant of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol, 178(3): 691–696.
- PROVENCHER, S. W. & GLÖCKNER, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, 20(1): 33–37.
- QIAN, H. (2007). Phosphorylation energy hypothesis: open chemical systems and their biological functions. Annu Rev Phys Chem, 58: 113–142.
- QUIOCHO, F. A. & LEDVINA, P. S. (1996). Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol Microbiol*, 20(1): 17–25.
- RAAIJMAKERS, H., MACIEIRA, S., DIAS, J. M., TEIXEIRA, S., BURSAKOV, S., HUBER, R., MOURA, J. J. G., MOURA, I. & ROMÃO, M. J. (2002). Gene sequence and the 1.8 A crystal structure of the tungsten-containing formate dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas. Structure*, 10(9): 1261–1272.
- RAJAGOPALAN, K. V., JOHNSON, J. L., WUEBBENS, M. M., PITTERLE, D. M., HILTON, J. C., ZURICK, T. R. & GARRETT, R. M. (1993). Chemistry and biology of the molybdenum cofactors. Adv Exp Med Biol, 338: 355–362.
- RAUH, D., GRAENTZDOERFFER, A., GRANDERATH, K., ANDREESEN, J. R. & PICH, A. (2004). Tungstencontaining aldehyde oxidoreductase of *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur J Biochem*, 271(1): 212–219.
- RECH, S., WOLIN, C. & GUNSALUS, R. P. (1996). Properties of the periplasmic ModA molybdate-binding protein of *Escherichia coli*. J Biol Chem, 271(5): 2557–2562.

- REGULSKI, E. E., MOY, R. H., WEINBERG, Z., BARRICK, J. E., YAO, Z., RUZZO, W. L. & BREAKER, R. R. (2008). A widespread riboswitch candidate that controls bacterial genes involved in molybdenum cofactor and tungsten cofactor metabolism. *Mol Microbiol*, 68(4): 918–932.
- REHDER, D. (2000). Vanadium nitrogenase. J Inorg Biochem, 80(1-2): 133-136.
- RICE, P., LONGDEN, I. & BLEASBY, A. (2000). EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. Trends Genet, 16(6): 276–277.
- RICHTER, J. (2008). Identifizierung einer wolframabhängigen Formiat-Dehydrogenase aus Ralstonia eutropha H16. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- RIGDEN, D. J. (2008). The histidine phosphatase superfamily: structure and function. *Biochem J*, 409(2): 333–348.
- ROY, R. & ADAMS, M. W. (2002). Characterization of a fourth tungsten-containing enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J Bacteriol, 184(24): 6952–6956.
- ROY, R., MUKUND, S., SCHUT, G. J., DUNN, D. M., WEISS, R. & ADAMS, M. W. (1999). Purification and molecular characterization of the tungsten-containing formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: the third of a putative five-member tungstoenzyme family. J Bacteriol, 181(4): 1171–1180.
- RUSSO, A. T., WHITE, M. A. & WATOWICH, S. J. (2006). The crystal structure of the Venezuelan equine encephalitis alphavirus nsP2 protease. *Structure*, 14(9): 1449–1458.
- RUTHERFORD, K., PARKHILL, J., CROOK, J., HORSNELL, T., RICE, P., RAJANDREAM, M. A. & BARRELL, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16(10): 944–945.
- SAIER, M. H. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. Microbiol Mol Biol Rev, 64(2): 354–411.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2. Auflage.
- SANDU, C. & BRANDSCH, R. (2002). Evidence for Moea-dependent formation of the molybdenum cofactor from molybdate and molybdopterin in *Escherichia coli. Arch Microbiol*, 178(6): 465–470.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, 74(12): 5463–5467.
- SCHILLER, K. & THILO, E. (1961). Spektrophotometrische Untersuchung von Vanadatgleichgewichten in verdünnten wäßrigen Lösungen. Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie, 310(4-6): 261–285.
- SCHINDELIN, H., KISKER, C., HILTON, J., RAJAGOPALAN, K. V. & REES, D. C. (1996). Crystal structure of DMSO reductase: redox-linked changes in molybdopterin coordination. *Science*, 272(5268): 1615–1621.
- SCHINDELIN, H., KISKER, C. & RAJAGOPALAN, K. V. (2001). Molybdopterin from molybdenum and tungsten enzymes. Adv Protein Chem, 58: 47–94.
- SCHMID, F. (1997). Protein structure, a practical approach, Kapitel Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes, 299–321. Oxford University Press, Oxford, 2. Auflage.

- SCHMIDT, T. G. & SKERRA, A. (1994). One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. J Chromatogr A, 676(2): 337–345.
- SCHMITZ, R., ALBRACHT, S. & THAUER, R. (1992a). A molybdenum and a tungsten isoenzyme of formylmethanofuran dehydrogenase in the thermophilic archaeon *Methanobacterium wolfei*. Eur J Biochem, 209(3): 1013–8.
- SCHMITZ, R., RICHTER, M., LINDER, D. & THAUER, R. (1992b). A tungsten-containing active formylmethanofuran dehydrogenase in the thermophilic archaeon *Methanobacterium wolfei*. Eur J Biochem, 207(2): 559–65.
- SCHMITZ, R. A., ALBRACHT, S. P. & THAUER, R. K. (1992c). Properties of the tungsten-substituted molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanobacterium wolfei*. *FEBS Lett*, 309(1): 78– 81.
- SCHNEIDER, T. D. & STEPHENS, R. M. (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. Nucleic Acids Res, 18(20): 6097–6100.
- SCHWARZ, G. & MENDEL, R. R. (2006). Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. Annu Rev Plant Biol, 57: 623–647.
- SCHÜTTELKOPF, A. W., HARRISON, J. A., BOXER, D. H. & HUNTER, W. N. (2002). Passive acquisition of ligand by the MopII molbindin from *Clostridium pasteurianum*: structures of apo and oxyanion-bound forms. J Biol Chem, 277(17): 15.013–15.020.
- SCOTT, E. E., WHITE, M. A., HE, Y. A., JOHNSON, E. F., STOUT, C. D. & HALPERT, J. R. (2004). Structure of mammalian cytochrome P450 2B4 complexed with 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 1.9-A resolution: insight into the range of P450 conformations and the coordination of redox partner binding. J Biol Chem, 279(26): 27.294–27.301.
- SELF, W. T., GRUNDEN, A. M., HASONA, A. & SHANMUGAM, K. T. (1999). Transcriptional regulation of molybdoenzyme synthesis in *Escherichia coli* in response to molybdenum: ModE-molybdate, a repressor of the *modABCD* (molybdate transport) operon is a secondary transcriptional activator for the *hyc* and *nar* operons. *Microbiology*, 145 (Pt 1): 41–55.
- SELF, W. T., GRUNDEN, A. M., HASONA, A. & SHANMUGAM, K. T. (2001). Molybdate transport. Res Microbiol, 152(3-4): 311–321.
- SHAN, S. O., LOH, S. & HERSCHLAG, D. (1996). The energetics of hydrogen bonds in model systems: implications for enzymatic catalysis. *Science*, 272(5258): 97–101.
- SHELDRICK, G. (1990). Phase-annealing in SHELX-90: Direct methods for larger structures. Acta Cryst, A46: 467–473.
- SHELDRICK, G. (2002). Macromolecular phasing with SHELXE. Z Kristallogr, 217: 644-650.
- SIGEL, A. & SIGEL, H. (Hg.) (2002). Molybdenum and Tungsten: Their Roles in Biological Processes, Metals Ions in Biological Systems, Band 39. Marcel Dekker, New York, 1. Auflage.
- SIGURSKJOLD, B. W. (2000). Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem*, 277(2): 260–266.

- SINGH, R., WHITE, M. A., RAMANA, K. V., PETRASH, J. M., WATOWICH, S. J., BHATNAGAR, A. & SRIVASTAVA, S. K. (2006). Structure of a glutathione conjugate bound to the active site of aldose reductase. *Proteins*, 64(1): 101–110.
- SREERAMA, N. & WOODY, R. W. (1993). A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. Anal Biochem, 209(1): 32–44.
- SREERAMA, N. & WOODY, R. W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. Anal Biochem, 287(2): 252–260.
- STIEFEL, E. I. (2002). The biogeochemistry of molybdenum and tungsten. Met Ions Biol Syst, 39: 1–29.
- STROBL, G., FEICHT, R., WHITE, H., LOTTSPEICH, F. & SIMON, H. (1992). The tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Clostridium thermoaceticum* and its complex with a viologen-accepting NADPH oxidoreductase. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 373(3): 123–132.
- SUTCLIFFE, I. C. & RUSSELL, R. R. (1995). Lipoproteins of gram-positive bacteria. J Bacteriol, 177(5): 1123–1128.
- TAKAYANAGI, T., WADA, E. & MOTOMIZU, S. (1998). Direct photometric determination of tungstate ion in the etching solutions by capillary zone electrophoresis. *Anal Sci*, 14(6): 1181–1183.
- TANABE, M., MIRZA, O., BERTRAND, T., ATKINS, H. S., TITBALL, R. W., IWATA, S., BROWN, K. A. & BYRNE, B. (2007). Structures of OppA and PstS from *Yersinia pestis* indicate variability of interactions with transmembrane domains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 63(Pt 11): 1185–1193.
- TAO, H., HASONA, A., DO, P. M., INGRAM, L. O. & SHANMUGAM, K. T. (2005). Global gene expression analysis revealed an unsuspected *deo* operon under the control of molybdate sensor, ModE protein, in *Escherichia coli. Arch Microbiol*, 184(4): 225–233.
- TARTOF, K. & HOBBS, C. (1987). Improved media for growing plasmid and cosmid clones. Bethesda Res Lab Focus, 9: 12–14.
- TEJADA-JIMÉNEZ, M., LLAMAS, A., SANZ-LUQUE, E., GALVÁN, A. & FERNÁNDEZ, E. (2007). A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(50): 20.126–20.130.
- THIEL, T., PRATTE, B. & ZAHALAK, M. (2002). Transport of molybdate in the cyanobacterium Anabaena variabilis ATCC 29413. Arch Microbiol, 179(1): 50–56.
- TOMATSU, H., TAKANO, J., TAKAHASHI, H., WATANABE-TAKAHASHI, A., SHIBAGAKI, N. & FUJIWARA, T. (2007). An Arabidopsis thaliana high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(47): 18.807–18.812.
- TRUGLIO, J. J., THEIS, K., LEIMKÜHLER, S., RAPPA, R., RAJAGOPALAN, K. V. & KISKER, C. (2002). Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter* capsulatus. Structure, 10(1): 115–125.
- UNCIULEAC, M., WARKENTIN, E., PAGE, C. C., BOLL, M. & ERMLER, U. (2004). Structure of a xanthine oxidase-related 4-hydroxybenzoyl-coa reductase with an additional [4fe-4s] cluster and an inverted electron flow. *Structure*, 12(12): 2249–2256.
- VAGUINE, A., RICHELLE, J. & WODAK, S. (1999). SFCHECK: A unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Cryst*, D55: 191–205.
- VYAS, N. K., VYAS, M. N. & QUIOCHO, F. A. (2003). Crystal structure of *M. tuberculosis* ABC phosphate transport receptor: specificity and charge compensation dominated by ion-dipole interactions. *Structure*, 11(7): 765–774.
- WAGNER, U. G., STUPPERICH, E. & KRATKY, C. (2000). Structure of the molybdate/tungstate binding protein mop from *Sporomusa ovata*. Structure Fold Des, 8(11): 1127–1136.
- WANG, Z., CHOUDHARY, A., LEDVINA, P. S. & QUIOCHO, F. A. (1994). Fine tuning the specificity of the periplasmic phosphate transport receptor. Site-directed mutagenesis, ligand binding, and crystallographic studies. J Biol Chem, 269(40): 25.091–25.094.
- WANG, Z., LUECKE, H., YAO, N. & QUIOCHO, F. A. (1997). A low energy short hydrogen bond in very high resolution structures of protein receptor-phosphate complexes. *Nat Struct Biol*, 4(7): 519–522.
- WHITE, H., FEICHT, R., HUBER, C., LOTTSPEICH, F. & SIMON, H. (1991). Purification and some properties of the tungsten-containing carboxylic acid reductase from *Clostridium formicoaceticum*. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 372(11): 999–1005.
- WHITE, H., HUBER, C., FEICHT, R. & SIMON, H. (1993). On a reversible molybdenum-containing aldehyde oxidoreductase from *Clostridium formicoaceticum*. Arch Microbiol, 159(3): 244–249.
- WHITE, H., STROBL, G., FEICHT, R. & SIMON, H. (1989). Carboxylic acid reductase: a new tungsten enzyme catalyses the reduction of non-activated carboxylic acids to aldehydes. *Eur J Biochem*, 184(1): 89–96.
- WICHARD, T., BELLENGER, J.-P., LOISON, A. & KRAEPIEL, A. M. L. (2008). Catechol siderophores control tungsten uptake and toxicity in the nitrogen-fixing bacterium Azotobacter vinelandii. Environ Sci Technol, 42(7): 2408–2413.
- WIETHAUS, J., WIRSING, A., NARBERHAUS, F. & MASEPOHL, B. (2006). Overlapping and specialized functions of the molybdenum-dependent regulators MopA and MopB in *Rhodobacter capsulatus*. J Bacteriol, 188(24): 8441–8451.
- Xu, N., CHRISTODOULATOS, C. & BRAIDA, W. (2006). Modeling the competitive effect of phosphate, sulfate, silicate, and tungstate anions on the adsorption of molybdate onto goethite. *Chemosphere*, 64(8): 1325–1333.
- YAMAMOTO, I., SAIKI, T., LIU, S. M. & LJUNGDAHL, L. G. (1983). Purification and properties of NADPdependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein. J Biol Chem, 258(3): 1826–1832.
- YANG, J. T., WU, C. S. & MARTINEZ, H. M. (1986). Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol*, 130: 208–269.
- YAO, N., LEDVINA, P. S., CHOUDHARY, A. & QUIOCHO, F. A. (1996). Modulation of a salt link does not affect binding of phosphate to its specific active transport receptor. *Biochemistry*, 35(7): 2079–2085.

- ZAHALAK, M., PRATTE, B., WERTH, K. J. & THIEL, T. (2004). Molybdate transport and its effect on nitrogen utilization in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Mol Microbiol*, 51(2): 539– 549.
- ZELLNER, G. & JARGON, A. (1997). Evidence for a tungsten-stimulated aldehyde dehydrogenase activity of *Desulfovibrio simplex* that oxidizes aliphatic and aromatic aldehydes with flavins as coenzymes. *Arch Microbiol*, 168(6): 480–485.
- ZHANG, Y. & GLADYSHEV, V. N. (2008). Molybdoproteomes and evolution of molybdenum utilization. J Mol Biol, 379(4): 881–899.
- ZINDEL, U., FREUDENBERG, W., RIETH, M., ANDREESEN, J. R., SCHNELL, J. & WIDDEL, F. (1988). Eubacterium acidaminophilum sp. nov., a versatile amino acid-degrading anaerobe producing or utilizing H₂ or formate. Arch Microbiol, 150(3): 254–266.

Anhang A. Gleichungen und Formeln

A.1. Fluoreszenztitration

Die Bindung eines Anions (A) an das Bindeprotein (P) verläuft nach der folgender Gleichung:

$$P + A \Longrightarrow PA$$
 (A.1)

Die Dissoziationskonstante K_d ist dabei definiert als

$$K_d = \frac{[P][A]}{[PA]} \tag{A.2}$$

mit [P] Konzentration des freien Proteins,

[A] Konzentration des freien Anions,

[PA] Konzentration des Protein-Anion-Komplexes.

Die Gesamtkonzenztrationen von Protein und Anion sind

$$[P]_0 = [P] + [PA] \tag{A.3}$$

und

$$[A]_0 = [A] + [PA]. \tag{A.4}$$

Wenn man diese umstellt und in Gleichung A.2 einsetzt, um [P] und [A] zu eliminieren erhält man

$$K_d = \frac{([P]_0 - [PA])([A]_0 - [PA])}{[PA]}$$
(A.5)

und nach dem Umstellen

$$0 = ([P]_0 - [PA])([A_0] - [PA]) - K_d[PA]$$
(A.6)

Die Gleichung kann auch in der Form

$$0 = [PA]^{2} - ([P]_{0} + [A]_{0} + K_{d})[PA] + [P]_{0}[A]_{0}$$
(A.7)

dargestellt werden. Da es sich um die Normalform einer einfachen quadratischen Gleichung handelt, lässt nach wie folgt lösen:

$$PA_{1/2} = \frac{[P]_0 + [A]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\frac{([P_0] + [A_0] + K_d)^2}{4} - [P_0][A_0]}$$
(A.8)

Die Gesamtfluoreszenz F setzt sich aus der Summe der Fluoreszenzen der fluoreszierenden Moleküle zusammen. Es wird angenommen, dass sich das freie Protein und der Protein-Anion-Komplex in ihrem Fluoreszenz-Verhalten unterscheiden, nicht gegenseitig beeinflussen und keine anderen Fluorophore vorhanden sind. Die Fluoreszenz ist bei geringen Konzentrationen proportional zur Konzentration des Fluorophors (Lambert-Beer'sches Gesetz). Um diese Proportionalität zu beschreiben werden zwei Faktoren k_P und k_{PA} eingeführt.

$$F = f_P[P] + f_{PA}[PA] \tag{A.9}$$

Wenn kein Anion vorhanden ist, liegt das gesamte Protein frei vor. Die Fluoreszenz beträgt dann

$$F_0 = f_P[P]_0. (A.10)$$

Wenn das gesamte Protein mit Anion gesättigt ist, dann ist die Fluoreszenz

$$F_S = f_{PA}[P_0] \tag{A.11}$$

Nach dem Umstellen dieser Gleichgungen kann man die Faktoren in Gleichung A.9 ersetzen. Zusätzlich wird [P] mit Hilfe von Gleichung A.3 eliminiert. Man erhält

$$F = \frac{F_0}{[P_0]}([P_0] - [PA]) + \frac{F_S}{[P_0]}[PA]$$
(A.12)

und nach dem Umstellen:

$$F = [F_0] + \frac{(F_S - F_0)[PA]}{[P_0]}$$
(A.13)

Man kann jetzt für [PA] Gleichung A.8 einsetzen. Die Gleichung enthält dann neben der Dissoziationskonstanten nur noch die Gesamtkonzentrationen und die beiden Fluoreszenz-Extrema F_0 und F_S . Die Konzentrationen sind bekannt und die Extrema lassen bei der Titration bestimmen bzw. schätzen. Die Lösung der Gleichung erfolgte numerisch unter Berücksichtigung von Verdünnungseffekten während der Titration.

A.2. Isothermische Titrationskalorimetrie

Die bei der Bindung eines Liganden (L) an ein Protein (P) in der ITC-Zelle umgesetzte Wärme beträgt

$$Q = \frac{V_0 \Delta H_b[P]_t K_a[L]}{1 + K_a[L]}$$
(A.14)

 mit

Q Wärme

 V_0 Zellvolumen

 ΔH_b Bindungs-Enthalpie je Mol

- $[P]_t$ Protein-Gesamtkonzentration
- K_a Gleichgewichtskonstante
- [L] freier Ligand

Der Erste Hauptsatz der Thermodynamik lautet:

$$dH = dU + p \ dV + V \ dp \tag{A.15}$$

 mit

- H Enthalpie
- U innere Energie
- V Volumen und
- p Druck

bei isobaren Vorgängen ist die Änderung der Enthalpie gleich der ausgetauschten Wärmemenge:

$$dH_{|p=const} = dQ = dU + p \ dV \tag{A.16}$$

Die Gibbs-Energie ist definiert als:

$$G = H - T \cdot S \tag{A.17}$$

 mit

- S Entropie und
- T Temperatur

Die freie Standardenthalpie ist definiert durch

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \cdot \Delta S^{\circ} \tag{A.18}$$

Für eine Reaktion gilt dann:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \cdot \ln \prod_{i} a_{i}^{\nu_{i}} \tag{A.19}$$

 mit

a Aktivität eines Reaktanten

 $\nu~$ Stoffmenge

 ${\cal R}$ die allgemeine Gaskonstante

Daraus folgt im Gleichgewicht ($\Delta G = 0$):

$$\Delta G^{\circ} = -RT \cdot \ln \prod_{i} a_{i}^{\nu_{i}} = -RT \cdot \ln K \tag{A.20}$$

Für die Berechnung der Dissoziationskonstanten bei den kompetetiven Experimenten wurde folgende Gleichung verwendet (SIGURSKJOLD 2000):

$$K_{app} = \frac{K_a}{1 + K_b[B]}.\tag{A.21}$$

A.3. Gleichungen für die Kristallographie

Der R-Faktor ist definiert als

$$R = \frac{\sum |F_{obs}(h,k,l)| - |F_{calc}(h,k,l)|}{\sum |F_{obs}(h,k,l)|}.$$
 (A.22)

Dabei sind

 F_{obs} die experimentellen Strukturfaktoren F_{calc} die aus dem Modell berechneten Strukturfaktoren und h, k, l die Miller-Indices.

Der isotrope B-Faktor oder Debye-Waller-Faktor ist definiert als

$$B_i = 8\pi^2 U_i^2 \tag{A.23}$$

Dabei ist U_i die durchschnittliche Ortsabweichung eines Atomes.

Anhang B.

TupA-Homologe aus verschiedenen Bakterien.

B.1. Zugriffsnummern der TupA-homologen Proteinsequenzen

Für das Alignment der TupA-homologen Proteine wurden die folgenden Sequenzen eingesetzt. Es ist jeweils die Zugriffsnummer mit Version und der Stamm angegeben. Die Stämme sind alphabetisch geordnet.

YP 987328.1 - Acidovorax sp. JS42, YP 857576.1 - Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila ATCC 7966, YP 001142830.1 – Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida A449, YP 743568.1 – Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1, YP 001318898.1 - Alkaliphilus metalliredigens QYMF, ZP 01446989.1 - alpha proteobacterium HTCC2255, YP 324540.1 - Anabaena variabilis ATCC 29413, ZP 01226363.1 - Aurantimonas sp. SI85-9A1, YP 935334.1 - Azoarcus sp. BH72, YP 159058.1 - Azoarcus sp. EbN1, NP 884202.1 - Bordetella parapertussis 12822, NP 880217.1 - Bordetella pertussis Tohama I, NP 768946.1 - Bradyrhizobium japonicum US-DA 110, NP 772867.1 - Bradyrhizobium japonicum USDA 110, YP 001179777.1 - Caldicellulosiruptor saccharolyticus DSM 8903, ZP 00370836.1 - Campylobacter coli RM2228, YP 179689.1 - Campylobacter jejuni RM1221, YP 001398833.1 - Campylobacter jejuni subsp. doylei 269.97, ZP 01070208.1 - Campylobacter *jejuni* subsp. jejuni 260.94, **YP_001483014.1** – Campylobacter jejuni subsp. jejuni 81116, **ZP_01809381.1** – Campylobacter jejuni subsp. jejuni CG8486, ZP 01070959.1 - Campylobacter jejuni subsp. jejuni HB93-13, NP 282671.1 - Campylobacter jejuni subsp. jejuni NCTC 11168, ZP 00370344.1 - Campylobacter upsaliensis RM3195, ZP 01674553.1 - Candidatus Desulfococcus oleovorans Hxd3, YP 359238.1 - Carboxydothermus hydrogenoformans Z-2901, YP 574134.1 - Chromohalobacter salexigens DSM 3043, YP 001254449.1 - Clostridium botulinum A str. ATCC 3502, YP 001391271.1 - Clostridium botulinum F str. Langeland, ZP 01360242.1 -Clostridium sp. OhILAs, YP 064067.1 - Desulfotalea psychrophila LSv54, YP 001113636.1 - Desulfotomaculum reducens MI-1, YP 386730.1 - Desulfovibrio desulfuricans G20, YP 389798.1 - Desulfovibrio desulfuricans G20, YP 967453.1 - Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris DP4, YP 967668.1 - Desulfovi $brio\ vulgaris\ {\rm subsp.\ vulgaris\ str.\ Hildenborough,}\ \mathbf{P4,\ YP_009966.1}\ -\ Desulfovibrio\ vulgaris\ {\rm subsp.\ vulgaris\ str.\ Hildenborough,}\ \mathbf{P4,\ YP_009966.1}\ -\ Desulfovibrio\ vulgaris\ subsp.\ vulgaris\ str.\ Hildenborough,}\ \mathbf{P4,\ YP_009966.1}\ -\ Desulfovibrio\ vulgaris\ subsp.\ vulgaris\ str.\ Hildenborough,}\ \mathbf{P4,\ YP_009966.1}\ -\ Desulfovibrio\ vulgaris\ subsp.\ vulgaris\ str.\ Hildenborough,}\ \mathbf{P4,\ YP_009966.1}\ -\ Desulfovibrio\ vulgaris\ subsp.\ vulgaris\ str.\ Hildenborough,}\ \mathbf{P4,\ YP_009966.1}\ -\ Desulfovibrio\ vulgaris\ subsp.\ vulgaris\ subsp\$ $\label{eq: product} \mathbf{YP_010199.1} \ - \ Desulfovibrio \ vulgaris \ \mathrm{subsp. \ vulgaris \ str. \ Hildenborough, \ \mathbf{ZP_01312667.1} \ - \ Desulfuromonas \ \mathbf{ZP_01312$ minophilum, ZP 01439629.1 - Fulvimarina pelagi HTCC2506, ZP 01775695.1 - Geobacter bemidjiensis Bem, **YP_384006.1** – Geobacter metallireducens GS-15, **ZP_01389284.1** – Geobacter sp. FRC-32, **NP_953745.1** – Geobacter sulfurreducens PCA, YP 001232272.1 - Geobacter uraniumreducens Rf4, YP 137669.1 - Haloarcula marismortui ATCC 43049, ZP 02015092.1 - Halorubrum lacusprofundi ATCC 49239, ZP 02017175.1 - Halorubrum lacusprofundi ATCC 49239, YP 001101650.1 – Herminiimonas arsenicoxydans, YP 001012552.1 – Hyperthermus butylicus DSM 5456, YP 001435062.1 – Ignicoccus hospitalis KIN4/I, YP 001355339.1 – Janthinobacterium sp. Marseille, ZP 01916652.1 - Limnobacter sp. MED105, ZP 01004348.1 - Loktanella vestfoldensis SKA53, YP 422406.1 - Magnetospirillum magneticum AMB-1, YP 422407.1 - Magnetospirillum magneticum AMB-1, ZP 00050351.2 - Magnetospirillum magnetotacticum MS-1, ZP 00208444.1 - Magnetospi $rillum \ magnetotacticum \ \mathrm{MS-1}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{00208445.1} - Magnetospirillum \ magnetotacticum \ \mathrm{MS-1}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01893650.1} - Magnetospirillum \ magnetotacticum \ \mathrm{MS-1}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01893650.1} - Magnetospirillum \ magnetotacticum \ \mathrm{MS-1}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01893650.1} - Magnetospirillum \ magnetotacticum \ \mathrm{MS-1}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01893650.1} - Magnetospirillum \ magnetotacticum \ \mathrm{MS-1}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01893650.1} - Magnetospirillum \ magnetotacticum \ \mathrm{MS-1}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01893650.1} - Magnetospirillum \ \mathrm{MS-1}, \ \mathbf{UP} \quad \mathbf{UP}$

Marinobacter algicola DG893, ZP 01735779.1 - Marinobacter sp. ELB17, YP 674984.1 - Mesorhizobium sp. BNC1, $\mathbf{YP}_\mathbf{001324671.1}$ – Methanococcus aeolicus Nankai-3, $\mathbf{YP}_\mathbf{001029906.1}$ – Methanocorpusculum Nankai-3, $\mathbf{YP}_\mathbf{001029006.1}$ – Methanocorpusculum Nankai-3, $\mathbf{YP}_\mathbf{001029006.1}$ – Methanocorpusculum Nankai-3, $\mathbf{YP}_\mathbf{001029006.1}$ – Methanocorpusculum Nankai-3, $\mathbf{YP}_\mathbf{001029006.1}$ – Methanoc $labreanum ~Z,~\mathbf{YP_001047785.1} ~ \textit{Methanoculleus marisnigri JR1},~\mathbf{YP_001047800.1} ~ \textit{Methanoculleus marisnigri Methanoculleus mar$ risnigri JR1, YP 843625.1 - Methanosaeta thermophila PT, NP 633585.1 - Methanosarcina mazei Go1, $\mathbf{YP} \quad \mathbf{502000.1} - \textit{Methanospirillum hungatei JF-1, NP} \quad \mathbf{275622.1} - \textit{Methanothermobacter thermautotrophicus str.}$ Delta H, YP 001021412.1 - Methylibium petroleiphilum PM1, ZP 02055717.1 - Methylobacterium chloromethanicum CM4, ZP 02018285.1 - Methylobacterium extorquens PA1, ED074177.1 - Methylobacterium populi BJ001, ZP 01850354.1 – Methylobacterium sp. 4-46, YP 428949.1 – Moorella thermoacetica ATCC 39073, ZP 01897456.1 - Moritella sp. PE36, YP 327168.1 - Natronomonas pharaonis DSM 2160, ZP 01155593.1 -Oceanicola granulosus HTCC2516, ZP 01165773.1 - Oceanospirillum sp. MED92, YP 356104.1 - Pelobacter carbinolicus DSM 2380, YP 901125.1 - Pelobacter propionicus DSM 2379, YP 901215.1 - Pelobacter propionicus DSM 2379, YP 901216.1 - Pelobacter propionicus DSM 2379, YP 001211152.1 - Pelotomaculum thermopropionicum SI, YP 001211153.1 - Pelotomaculum thermopropionicum SI, ZP 01221811.1 - Photob $acterium \ profundum \ \mathrm{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathrm{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01161343.1} - \ Photobacterium \ profundum \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{SS9}, \ \mathbf{SS9}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{SS9}, \ \mathbf{SS9}, \$ um sp. SKA34, YP 981746.1 – Polaromonas naphthalenivorans CJ2, YP 548594.1 – Polaromonas sp. JS666, YP 001156114.1 - Polynucleobacter sp. QLW-P1DMWA-1, NP 558325.1 - Pyrobaculum aerophilum str. IM2, YP 001152888.1 - Pyrobaculum arsenaticum DSM 13514, YP 929573.1 - Pyrobaculum islandicum DSM 4184, YP 725529.1 - Ralstonia eutropha H16, YP 295154.1 - Ralstonia eutropha JMP134, YP 583050.1 - Ralstonia metallidurans CH34, ZP 02009722.1 – Ralstonia pickettii 12D, ZP 01660870.1 – Ralstonia pickettii 12J, NP 520214.1 - Ralstonia solanacearum GMI1000, ZP 00943321.1 - Ralstonia solanacearum UW551, **ZP_01742119.1** – Rhodobacterales bacterium HTCC2150, **ZP_01743204.1** – Rhodobacterales bacterium HT- $\label{eq:cc2150} {\bf CC2150}, \ {\bf YP_524109.1} \ - \ {\it Rhodoferax} \ ferrireducens \ {\bf T118}, \ {\bf YP_683119.1} \ - \ {\it Roseobacter} \ denitrificans \ {\bf OCh} \ 114, \ {\bf T118}, \$ $\mathbf{ZP} \quad \mathbf{01901111.1} - \textit{Roseobacter sp. AzwK-3b, } \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01749980.1} - \textit{Roseobacter sp. CCS2, } \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01054537.1} - \textit{Roseobacter sp.$ $\mathbf{ZP}_01036927.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01442722.1-\textit{Roseovarius sp. HTCC2601, } \mathbf{ZP}_01881202.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01442722.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01881202.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01442722.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01442722.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01442722.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01881202.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01881202.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01881202.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01881202.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01442722.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01881202.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01442722.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_01881202.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_0181202.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_0181200.1-\textit{Roseovarius sp. 217, } \mathbf{ZP}_0181200.1-\textit{Roseovarius sp. 217,$ seovarius sp. TM1035, ZP 01748698.1 – Sagittula stellata E-37, YP 926006.1 – Shewanella amazonensis SB2B, YP 001048486.1 - Shewanella baltica OS155, ZP 01434965.1 - Shewanella baltica OS195, YP 752581.1 -Shewanella frigidimarina NCIMB 400, YP 001095808.1 - Shewanella loihica PV-4, NP 720235.1 - Shewanella oneidensis MR-1, ZP 01602720.1 - Shewanella pealeana ATCC 700345, YP 001185384.1 - Shewanella putrefaciens CN-32, YP 001471865.1 - Shewanella sediminis HAW-EB3, YP 735994.1 - Shewanella sp. MR-4, YP 740001.1 - Shewanella sp. MR-7, YP 961481.1 - Shewanella sp. W3-18-1, ZP 01540571.1 -Shewanella woodyi ATCC 51908, YP 167028.1 - Silicibacter pomeroyi DSS-3, YP 611268.1 - Silicibacter sp. TM1040, YP 001314192.1 - Sinorhizobium medicae WSM419, ZP 01549163.1 - Stappia aggregata IAM 12614, **ZP 00954216.1** – Sulfitobacter sp. EE-36, **ZP 00948762.1** – Sulfitobacter sp. NAS-14.1, YP 074213.1 - Symbiobacterium thermophilum IAM 14863, YP 074214.1 - Symbiobacterium thermophilum $\mathrm{IAM}\ 14863, \mathbf{YP}\ \mathbf{844165.1} - Syntrophobacter\ fumaroxidans\ \mathrm{MPOB}, \mathbf{YP}\ \mathbf{844177.1} - Syntrophobacter\ fumaroxidans\ \mathrm{MPOB}, \mathbf{YP}\ \mathbf{844177.$ MPOB, YP 754300.1 - Syntrophomonas wolfei subsp. wolfei str. Goettingen, YP 460210.1 - Syntrophus aciditrophicus SB, **YP** 460211.1 – Syntrophus aciditrophicus SB, **ZP** 00777666.1 – Thermoanaerobacter ethanolicus AT-CC 33223, YP 921191.1 - Thermofilum pendens Hrk 5, ZP 01666381.1 - Thermosinus carboxydivorans Nor1, YP 001470469.1 - Thermotoga lettingae TMO, YP 005905.1 - Thermus thermophilus HB27, YP 143335.1 -Thermus thermophilus HB8, AAY82810.1 – uncultured bacterium MedeBAC46A06, ABL60957.1 – uncultured marine bacterium HF10 19P19, YP 684632.1 - uncultured methanogenic archaeon RC-I, ABB82991.1 - uncultured $organism \ \mathrm{HF10_3D09}, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01258999.1} - \ Vibrio \ alginolyticus \ 12G01, \ \mathbf{ZP} \quad \mathbf{01234363.1} - \ Vibrio \ angustum \ \mathrm{S14},$ $cholerae \ \mathrm{MO10}, \ \mathbf{ZP} _ \mathbf{01955764.1} - \textit{Vibrio cholerae} \ \mathrm{MZO-3}, \ \mathbf{NP} _ \mathbf{231163.1} - \textit{Vibrio cholerae} \ \mathrm{O1} \ \mathrm{biovar \ eltor \ str.}$ N16961, EDN12044.1 – Vibrio cholerae RC385, ZP 01482769.1 – Vibrio cholerae RC385, EAZ49265.1 – Vibrio $cholerae \ \mathrm{V51}, \mathbf{ZP}_\mathbf{01485919.1} - \textit{Vibrio} \ cholerae \ \mathrm{V51}, \mathbf{YP}_\mathbf{204785.1} - \textit{Vibrio} \ fischeri \ \mathrm{ES114}, \mathbf{YP}_\mathbf{001445453.1} - \textit{Vibrio} \ \mathrm{Fischeri} \ \mathrm{V51}, \mathbf{YP}_\mathbf{001445453.1} - \textit{Vibrio} \ \mathrm{Fischeri} \ \mathrm{V51}, \mathbf{YP}_\mathbf{001445453.1} - \textit{Vibrio} \ \mathrm{V51}, \mathbf{VI}=\mathbf{001445453.1} - \textit{VI}=\mathbf{001445453.1} - \textit{VI}=\mathbf{00144545453.1} - \textit{VI}=\mathbf{0014454553.1} - \textit{VI}=\mathbf{001445555.1} - \textit{VI}=\mathbf{0014455555.1} - \textit{VI}=\mathbf{0014$ Vibrio harveyi ATCC BAA-1116, **ZP** 01985081.1 – Vibrio harveyi HY01, **ZP** 01812902.1 – Vibrionales bacterium SWAT-3, **ZP** 01990449.1 – Vibrio parahaemolyticus AQ3810, NP 797879.1 – Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633, **ZP** 01867716.1 – Vibrio shilonii AK1, EDN56756.1 – Vibrio sp. Ex25, **ZP** 01474735.1 – Vibrio sp. $Ex 25, \ \textbf{ZP} _ \textbf{00988537.1} - \textit{Vibrio splendidus 12B01}, \ \textbf{ZP} _ \textbf{01064338.1} - \textit{Vibrio sp. MED222}, \ \textbf{NP} \quad \textbf{761400.1} - \textit{Vibrio sp. MED222}, \ \textbf{NP} = \textbf{761400.1} - \textbf$ vulnificus CMCP6, NP 907537.1 - Wolinella succinogenes DSM 1740

B.2. Potentiell wolframhaltige Enzyme in Stämmen mit TupA-Homologen

Tabelle B.1.: TupA-Homologe, *aor-* und *fdhA-*Gene.

In der ersten Spalte sind alle Stämme, die ein *tupA*-homologes Gen besitzen aufgeführt. Ein Kreuz in der zweiten oder dritten Spalte bedeutet, dass dieser Stamm ebenfalls putative Gene für eine wolframhaltige AOR und/oder FdhA besitzt.

Stamm	aor	fdhA
Acidovorax sp. JS42 Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila ATCC 7966 Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida 4449	Х	X X X
Alkalibinicola ehrlichei MLHE-1 Alkaliphilus metalliredigens QYMF Anabaena variabilis ATCC 29413	X X	X X
Aurantimonas sp. SI85-9A1 Azoarcus sp. BH72 Azoarcus sp. EbN1	X X	X X X
Bordetella parapertussis 12822 Bordetella pertussis Tohama I Bradyrhizobium japonicum USDA 110 Cirkling internet persekund trime DCM 2002	V	X X X
Campylobacter coli RM2228 Campylobacter jejuni RM1221 Campylobacter jejuni subsp. dovlej 269 97	л	Х
Campylobacter jejuni subsp. jejuni 260.94 Campylobacter jejuni subsp. jejuni 81116 Campylobacter jejuni subsp. jejuni CG8486		Х
Campylobacter jejuni subsp. jejuni HB93-13 Campylobacter jejuni subsp. jejuni NCTC 11168 Candidatus Desulfococcus oleovorans Hxd3		X X
Carboxydothermus hydrogenoformans Z-2901 Chromohalobacter salexigens DSM 3043 Clostridium botulinum A str. ATCC 3502 Clostridium botulinum B str. ATCC 3502	X X X	X X
Clostridium bottinium F str. Langeland Clostridium sp. OhILAs Desulfotalea psychrophila LSv54	X	X
Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris DP4 Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris str. Hildenborough	X X X X	X X X X
Desulfuromonas acetoxidans DSM 684 Dinoroseobacter shibae DFL 12 Eubacterium acidaminophilum	x x	X X X
Fulvimarina pelagi HTCC2506 Geobacter bemidjiensis Bem Geobacter metallireducens GS-15	X X	X X X
Geobacter sp. FRC-32 Geobacter sulfurreducens PCA Geobacter uraniumreducens Rf4	X X	X X
Haloarcula marismortui ATCC 43049 Halorubrum lacusprofundi ATCC 49239 Herminiimonas arsenicoxydans	X X	X X X
Hyperthermus butylicus DSM 5456 Ignicoccus hospitalis KIN4/I Janthinobacterium sp. Marseille	X X	X X X
Limnobacter sp. MED105 Loktanella vestfoldensis SKA53 Magnetospirillum magneticum AMB-1 Magnetospirillum magneticum MS 1	X X X	X X X X
Marinobacter algicola DG893 Marinobacter sp. ELB17 Mesorhizobium sp. BNC1	Λ	X X X X

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Stamm	aor	fdhA
Methanococcus aeolicus Nankai-3		х
Methanocorpusculum labreanum Z	Х	Х
Methanoculleus marisnigri JR1	Х	Х
Methanosaeta thermophila PT	Х	Х
Methanosarcina mazei Gol	X	v
Methanospirillum hungatei JF-1 Methanothermehaeter thermeutetrophicus etr. Delte H	А	A V
Methylibium petroleiphilum PM1	x	X
Methylobacterium chloromethanicum CM4	21	X
Methylobacterium extorguens PA1		X
Methylobacterium populi BJ001		Х
Methylobacterium sp. 4-46		Х
Moorella thermoacetica ATCC 39073	Х	X
Aoritella sp. PE36		X
atronomonas pharaonis DSM 2160	Х	X
Jceanicola granulosus H1CC2516		A V
Pelobacter carbinolicus DSM 2380	x	л
Pelobacter propionicus DSM 2379	X	х
Pelotomaculum thermopropionicum SI	X	X
Photobacterium profundum 3TCK		X
hotobacterium profundum SS9		Х
hotobacterium sp. SKA34		Х
Polaromonas naphthalenivorans CJ2	Х	Х
Polaromonas sp. JS666		X
'olynucleobacter sp. QLW-P1DMWA-1	v	X
yrobaculum aerophilum str. IM2	A V	A V
Pyrobaculum islandicum DSM 4184	X	X
Ralstonia eutropha H16		X
alstonia eutropha JMP134		Х
alstonia metallidurans CH34		Х
talstonia pickettii 12D		Х
alstonia pickettii 12J		X
Calstonia solanacearum GMI1000		X
hadabaataralaa baatariym UTCC2150		A V
Rhodoferay ferrireducens T118	x	X
Roseobacter denitrificans OCh 114	1	X
Roseobacter sp. AzwK-3b		x
Roseobacter sp. CCS2		X
Roseobacter sp. MED193		Х
Roseobacter sp. SK209-2-6		X
Roseovarius nubinhibens ISM		X
Roseovarius sp. 217		X
toseovarius sp. HTCC2001		X v
noseovarius sp. 1 M1030 Sagittula stallata E_37		A V
Shewanella amazonensis SB2B		X X
Shewanella baltica OS155	х	X
shewanella baltica OS195	X	X
shewanella frigidimarina NCIMB 400		X
shewanella loihica PV-4		Х
Shewanella oneidensis MR-1		Х
shewanella pealeana ATCC 700345	Х	X
shewanella putrefaciens CN-32		X
Shewanella sediminis HAW-EB3	Х	X
shewanella sp. MR-4		X
bewanella sp. WR-1	v	A V
shewanella woodyi ATCC 51008	Λ	A V
Silicibacter pomerovi DSS-3		X X
Silicibacter sp. TM1040		X
Sinorhizobium medicae WSM419		x
Stappia aggregata IAM 12614		X
11 00 00 0		

Tabelle B.1.: TupA-Homologe, aor- und fdhA-Gene. (Fortsetzung)

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle B.1.: TupA-Homologe, aor- und fdhA-Gene. (Fortsetzung)

Stamm	aor	fdhA
Stamm Sulfitobacter sp. EE-36 Sulfitobacter sp. NAS-14.1 Symbiobacterium thermophilum IAM 14863 Syntrophobacter fumaroxidans MPOB Syntrophomonas wolfei subsp. wolfei str. Goettingen Syntrophus aciditrophicus SB Thermoanaerobacter ethanolicus ATCC 33223 Thermofilum pendens Hrk 5 Thermosinus carboxydivorans Nor1 Thermotoga lettingae TMO Thermus thermophilus HB27 Thermus thermophilus HB27 Thermus thermophilus HB8 Vibrio alginolyticus 12G01 Vibrio angustum S14 Vibrio cholerae 1587 Vibrio cholerae 623-39 Vibrio cholerae MZO-3 Vibrio cholerae MZO-3 Vibrio cholerae RC385 Vibrio cholerae V51 Vibrio fascheri ES114 Vibrio harveyi ATCC BAA-1116 Vibrio parahaemolyticus AQ3810 Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633 Vibrio shilonii AK1 Vibrio sp. Ex25 Vibrio sp. Ex25 Vibrio sp. MED222	aor X X X X X X X X X X	fdhA X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
Vibrio splendidus 12B01 Vibrio vulnificus CMCP6 Vibrionales bacterium SWAT-3 Wolinella succinogenes DSM 1740	х	X X X X X

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. em. Dr. Jan R. Andreesen für die Überlassung des interessanten Themas, für das Vertrauen, das er in mich gesetzt hat, für die Unterstützung und Motivation während der Arbeit, für die konstruktive Kritik und für die viele Geduld, die er mir entgegengebracht hat.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Kathrin Makdessi bedanken, die meine Arbeit stets unterstützt hat und immer für kritische Diskussionen und für praktische Hilfe zur Verfügung stand und einen wichtigen Beitrag zur angenehmen Atmosphäre in der Arbeitsgruppe geleistet hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Labors 205/206 (bzw. 308/311) für das immer gute Arbeitsklima und die Zusammenarbeit, besonders danke ich Ute, Thomas, Frau Otto, Anett, Jessica und Brit.

Prof. Milton Stubbs und seinen Mitarbeitern möchte ich für die freundliche Zusammenarbeit bei Kristallisation und Strukturaufklärung und die gute Atmosphäre während der Messzeit in Berlin und Hamburg danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Caroline Kisker, Prof. Dr.Hermann Schindelin und ihren Mitarbeitern, besonders Dr. James Truglio, für die freundliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima in Stony Brook und die Unterstützung bei der Kristallisation.

Außerdem möchte ich PD Dr. R. König, der die ersten Kristallisationsversuche unterstützt hat, Dr. C. Schiene-Fischer für die Zusammenarbeit bei der CD-Spektroskopie, Christian Schwieger für die Hilfe bei den ITC-Experimenten und Dr. A. Schierhorn für die massenspektrometrischen Analysen danken.

Bei PD Dr. Andreas Pich möchte ich mich für den großen Einsatz für meine Person, für sein motivierendes Zureden bei seinem Ausscheiden aus dem Institut und das weiterhin an meiner Arbeit bestehende Interesse bedanken.

Weiterhin möchte allen anderen Mitarbeitern des Institutsbereichs Mikrobiologie, besonders der 2. Etage, und der umliegenden Institute für die Hilfe durch Rat und Tat während der täglichen Arbeit danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen Freunden für die Unterstützung und die Hilfsbereitschaft, besonders in der letzten Phase der Arbeit, bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre an Eides statt, dass ich, gemäß § 5 Abs. 2b der Promotionsordnung, die vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, 25. August 2008

David Rauh

Lebenslauf

Zur Person

geboren am	21. September 1975
in	Halle (Saale)

Bildungsweg

8/2006 - 8/2008	Anfertigung einer Dissertation zum Thema "Das Wolframatbindeprotein TupA aus <i>Eubacterium acidaminophilum</i> "
8/2000 - 7/2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie der Martin- Luther-Universität Halle-Wittenberg
8/2001 - 10/2001	Forschungsaufenthalt an der State University New York in Stony Brook (USA)
8/1996 - 9/1996	Praktikum am Institut für Bioanalytik Umwelttoxikologie und Biotechnolo- gie Halle-Lettin
7/1996 - 8/1996	Praktikum am Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben
10/1995 - 7/2000	Studium der Biochemie an der MLU Halle-Wittenberg
	Abschluss: Diplom (Note: "Gut") Thema der Diplomarbeit: "Isolierung, Charakterisierung und Molekulare Analyse der wolframhaltigen Aldehyd-Oxidoreduktase aus Eubacterium acid- aminophilum" (Note: "Sehr gut")
10/1994 - 12/1995	Zivildienst Kinderheim "Sternchen" in Merseburg
9/1982 - 7/1994	Erich-Weinert-OS, Sekundarschule Süd und JGHerder-Gymnasium in Merseburg Abschluss: Abitur (Note: 1,4)