

**Biochemische Charakterisierung und Untersuchungen  
der Röntgenstruktur am Molybdänspeicherprotein aus  
*Azotobacter Vinelandii***

Inaugural - Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades der Fakultät Chemie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Jörg Schemberg**  
aus Karlsruhe

Bielefeld 2006

*Zwei Dinge sind unendlich, das Universum und die menschliche Dummheit, aber bei dem Universum bin ich mir noch nicht ganz sicher.*

*Albert Einstein*

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. hc. mult. A. Müller für die Bereitstellung des Themas und die anregenden Seminare,

Herrn Dr. Klaus Schneider für das sehr interessante und herausfordernde Thema, die während meiner Einarbeitungszeit und sehr gute und intensive Betreuung, das mir entgegengebrachte Vertrauen, die eingeräumten Freiheiten, die zusammen erarbeiteten Strategien, die hervorragende Arbeitsatmosphäre am Institut, die mir einen sehr innovativen und kreativen Spielraum eröffnete und nicht zuletzt die netten Fußballabende,

Herrn Dr. Uli Ermler für die Bereitstellung des Koreferats,

Herrn Dr. Uli Ermler und Herrn Dr. Eberhard Warkentin für die ausgezeichnete Kooperation mit dem Max-Planck Institut für Biophysik in Frankfurt am Main, die geduldige Betreuung bei den Röntgenmessungen an den dortigen Anlagen und die großzügige Bereitstellung der Chemikalien und Geräte,

Herrn Dr. Dirk Fenske für die Einführung in die Welt der Speicherproteine und die zahlreichen Hilfestellungen bei Computerproblemen und die nette Unterbringung während meiner Umzugsphase.

Herrn Volker Henschel für die wissenschaftlichen und sportlichen Diskussionsrunden, sowie die Mithilfe bei der Aufklärung des Einbau- und Freisetzungsmechanismus von Molybdän im Speicherprotein,

Herrn Dr. Uli Ermler für die ausgezeichnete Kooperation mit dem Max-Planck Institut für Biophysik in Frankfurt am Main, die geduldige Betreuung bei den Röntgenmessungen an den dortigen Anlagen und die großzügige Bereitstellung der Chemikalien und Geräte,

Herrn Jörg Knapp für die massenspektroskopischen Messungen (MALDI) und Auswertungen des nativen und mit Selenomethionin-derivatisierten Molybdän-speicherproteins,

Frau Ursula Stuphorn und Gabrielle Heinze-Brückner für die nette Unterstützung während des Praktikums,

der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung meiner Arbeit,

meiner Freundin Svetlana, die mir bei vielen Problemen während meiner Arbeit zur Seite stand und

meiner Eltern, die mich während meiner gesamten Ausbildungszeit unterstützt haben.

Allen vielen Dank!

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>3-Buchstaben und 1-Buchstabencode der Aminosäuren .....</b>	<b>XI</b>
<b>Sonstige Abkürzungen .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Molybdän und Wolfram : Eine Gegenüberstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Der Organismus <i>Azotobacter vinelandii</i> .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Die Molybdoproteinfamilie .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Das Molybdänspeicherprotein (MoSto).....</b>	<b>6</b>
1.4.1 Bisheriger Forschungsstand.....	6
<b>1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Organismen .....</b>	<b>13</b>
2.1.1 Langzeitlagerung der Organismen und Dauerkulturen .....	13
<b>2.2 Zellanzucht .....</b>	<b>13</b>
2.2.1 Nährmedien .....	13
2.2.2 Nährmedien unter Mo-verarmten Bedingungen .....	14
2.2.3 Zellkultivierung.....	16
2.2.3.1 Stammhaltung von <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	16
2.2.3.2 Messung der Zelldichte .....	17
2.2.3.3 Vorkulturen.....	18
2.2.3.4 Hauptanzucht für Speicherprotein-Anreicherungen .....	19
2.2.4 Zellernte .....	19
2.2.5 Zellaufschluss.....	20
2.2.5.1 Enzymatischer Zellaufschluss .....	20
2.2.5.2 Der saure Aufschluss .....	21
2.2.5.3 Zellaufschluss mittels Frenchpresse .....	21

<b>2.3 .....</b>	<b>Reinigungsmethoden des Speicherproteins</b>	<b>22</b>
2.3.1	DEAE-Anionenaustauscherchromatographie .....	22
2.3.2	Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie .....	22
2.3.3	Metallionen-Affinitätschromatographie .....	23
2.3.4	Ammoniumsulfat-Fraktionierung .....	24
2.3.5	Gelfiltration .....	25
2.3.5.1	Probenpräparation der Freisetzungs- und Einbauversuche .....	26
2.3.6	Konzentrierung der gereinigten Proteinproben .....	27
<b>2.4</b>	<b>Analytische Verfahren .....</b>	<b>27</b>
2.4.1	Katalytische Molybdän- und Wolfram- Bestimmung .....	27
2.4.2	Proteinbestimmung .....	28
2.4.2.1	Bestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA-assay) .....	28
2.4.2.2	Bestimmung nach Bradford .....	29
2.4.2.3	Messung der Absorption bei $\lambda_{280\text{ nm}}$ .....	30
2.4.3	Analytische SDS- und native Polyacrylamidgelelektrophorese .....	30
2.4.3.1	Proteinmarker zur Molekulargewichtsbestimmung .....	30
2.4.3.2	Probenvorbereitung .....	31
2.4.3.3	Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	31
2.4.3.4	Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	33
2.4.3.5	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	35
2.4.3.6	Die Färbung der Proteinbanden .....	35
2.4.4	Immunologische Methoden .....	37
2.4.4.1	Ouchterlony-Doppelimmundiffusionstest .....	37
2.4.4.2	Analytischer Immunoblot (Western Blot) .....	38
2.4.5	Molmassenbestimmung durch Gelfiltration .....	42
2.4.5.1	Aktivitätstest für $\beta$ -Amylase .....	43
2.4.5.2	Alkoholdehydrogenase-Aktivitätstest .....	45
2.4.5.3	Carboanhydrase-Aktivitätstest .....	46
2.4.6	Molmassenbestimmung durch analytische Ultrazentrifugation (AUZ) .....	46
2.4.7	Molmassenbestimmung durch MALDI-TOF- Massenspektrometrie .....	48
<b>2.5</b>	<b>Röntgenstrukturanalyse von Proteinen .....</b>	<b>49</b>
2.5.1	Theoretische Einführung .....	49
2.5.2	Praktische Durchführung .....	51

2.5.3 Proteinkristallisation.....	51
2.5.3.1 Allgemein .....	51
2.5.3.2 Impfkristallisation .....	53
2.5.4 Kristallmontage.....	54
2.5.5 Datensammlung und Datenreduktion .....	54
2.5.6 Phasenbestimmung und – verbesserung .....	55
2.5.7 Modellbau, Verfeinerung und Qualitätsanalyse der Struktur .....	55
<b>2.6 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV-Systeme .....</b>	<b>56</b>
2.6.1 Chemikalien.....	56
2.6.2 Materialien, Geräte und EDV-Systeme.....	56
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 Optimierung der Anreicherung des MoSto und WSto .....</b>	<b>59</b>
<b>3.2 Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie.....</b>	<b>59</b>
3.2.1 Fazit zu den Ergebnissen der Octylsepharose-Chromatographie .....	61
<b>3.3 Metallionen-Affinitätschromatographie.....</b>	<b>62</b>
3.3.1 Affinitätschromatographie mit Ni <sup>2+</sup> und Zn <sup>2+</sup> als Metallionen .....	63
3.3.2 Affinitätschromatographie mit Cu <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> und Cd <sup>2+</sup> als Metallionen.....	64
<b>3.4 Gelfiltration .....</b>	<b>66</b>
3.4.1 Vorversuche .....	66
3.4.2 Optimierungsversuche.....	66
3.4.3 Isolierung des Molybdän- und Wolfram-Speicherproteins .....	68
<b>3.5 Molmassenbestimmung von MoSto und WSto.....</b>	<b>70</b>
3.5.1 Gelfiltration .....	70
3.5.2 Bestimmung der Molmasse durch analytische Ultrazentrifugation (AUZ). 71	
3.5.3 Bestimmung der Molmasse durch native Elektrophorese.....	73
3.5.4 Massenspektrum des nativen und Se-Methionin-haltigen Speicherproteins .....	75
<b>3.6 Immunologische Untersuchungen zur Regulation des MoSto.....</b>	<b>76</b>
3.6.1 Vorversuche mit Hilfe des Doppelimmundiffusionstests (Ouchterlony) ....	77
3.6.2 Untersuchungen mit Hilfe des Westernblots.....	79
3.6.3 Immunologischer Nachweis der Mo-abhängigen Induktion von MoSto ....	81

<b>3.7</b>	<b>Freisetzungsmechanismus von <math>\text{MoO}_4^{2-}</math> und <math>\text{WO}_4^{2-}</math> im Speicherprotein .</b>	<b>83</b>
	.....	
3.7.1	Die pH-regulierte Freisetzung des Molybdäns im Speicherprotein.....	83
3.7.2	Temperatur und Inkubationszeit .....	86
3.7.3	Proteinkonzentration.....	87
<b>3.8</b>	<b>Untersuchungen zur Stabilität des Apoproteins von MoSto.....</b>	<b>87</b>
<b>3.9</b>	<b>Mechanismus des Einbaus von <math>\text{MoO}_4^{2-}</math> und <math>\text{WO}_4^{2-}</math> im Speicherprotein ..</b>	<b>88</b>
	.....	
3.9.1	Abhängigkeit des Mo-Einbaus von der ATP-Konzentration.....	88
3.9.2	Austausch von ATP durch andere Nukleotide .....	90
<b>3.10</b>	<b>Mo-Bindungskapazität- und Metallaustausch-Studien.....</b>	<b>91</b>
3.10.1	Ermittlung maximaler Mo-Bindungskapazität .....	91
3.10.2	<i>In vivo</i> - und <i>in vitro</i> - Einbau von Wolfram in das Speicherprotein.....	93
<b>3.11</b>	<b>Strukturbestimmung des Speicherproteins.....</b>	<b>95</b>
3.11.1	Kristallisation .....	95
3.11.1.1	Das Mo-Speicherprotein (MoSto).....	95
3.11.1.2	Das W-enthaltende Speicherprotein (WSto) .....	99
3.11.2	Röntgendiffraktionsmessung .....	100
3.11.2.1	Kristallmontage .....	100
3.11.2.2	Datensätze des nativen und Se-Methionin-haltigen Speicherproteins und die Bestimmung der Raumgruppen von MoSto.....	101
3.11.2.3	Datensätze des nativen und Selenomethionin-haltigen WSto und dessen Bestimmung der Raumgruppen.....	102
3.11.2.4	Kristallpackungen.....	104
3.11.2.5	Strukturlösung des Selenomethionin-haltigen MoSto und WSto.....	105
3.11.3	MAD-Experimente mit der MoSto- und WSto-Kristallform .....	106
3.11.3.1	MoSto-(P2 <sub>1</sub> )-Kristallform .....	106
3.11.3.2	Die WSto-(P6 <sub>3</sub> 22)-Kristallform .....	106
3.11.4	Die Bestimmung der Se-Substruktur und der Phase .....	108
<b>3.12</b>	<b>Strukturbeschreibung des Speicherproteins.....</b>	<b>109</b>
3.12.1	Verfeinerung und Qualität des Strukturmodells .....	109
3.12.2	Die Struktur der $\alpha$ - und $\beta$ - Monomere .....	114
3.12.3	Die Struktur des Hexamers .....	122

3.12.4 ATP-Bindung und Wechselwirkungen im Speicherprotein .....	124
3.12.5 Die Struktur und Lokalisierung der W-Cluster (siehe auch Anhang A1)	129
3.12.6 Vergleich der WSto-Struktur mit denen möglicher homologer Proteine.	130

<b>4 Diskussion .....</b>	<b>131</b>
<b>4.1 Der oligomere Zustand des Speicherproteins .....</b>	<b>131</b>
4.1.1 Die Molmasse des Speicherproteins .....	131
<b>4.2 Der Freisetzungs- und Einbaumechanismus des Speicherproteins ..</b>	<b>132</b>
4.2.1 Der Freisetzungsmechanismus .....	132
4.2.2 Der Einbaumechanismus .....	134
<b>4.3 Wichtige Strukturmerkmale des Speicherproteins und der Vergleich mit anderen ähnlichen Proteinen.....</b>	<b>135</b>
4.3.1 Typ1-Insertionsbereich .....	135
4.3.2 Typ 2-Insertionsbereich .....	137
4.3.3 Kontaktbereich zwischen den Untereinheiten ( $\alpha_1$ , $\alpha_2$ , $\alpha_3$ ; $\beta_1$ , $\beta_2$ , $\beta_3$ )....	139
4.3.4 Vergleich des Speicherproteins mit ähnlichen Proteinen.....	141
<b>4.4 Polyoxometallatcluster in wässriger und in Protein gebundener Form (Verweis auf Anhang A1) .....</b>	<b>148</b>
<b>4.5 Mutmaßliche Funktion des ATP im Speicherprotein.....</b>	<b>149</b>
<b>4.6 Biologische Relevanz des Speicherproteins .....</b>	<b>152</b>
4.6.1 Regulation der MoSto Biosynthese .....	153
4.6.2 Aspekte des Mo-/W-Transports und deren Speicherung in der Zelle .....	153
4.6.3 Mögliche Relevanz für den Cu-Mo-Antagonismus.....	157

<b>5 Fazit und Ausblick.....</b>	<b>158</b>
5.1    Fazit .....	158
5.2    Ausblick .....	160
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>162</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>175</b>
A.1    Veröffentlichung der Röntgenstruktur des Speicherproteins und dessen W-Clustereinheiten im Metall-Proteinkomplex .....	175
A.2    Zusammenfassung.....	187
A.3    Abstract.....	189
A.4    Lebenslauf .....	191

# Abkürzungsverzeichnis

## 3-Buchstaben und 1-Buchstabencode der Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Cystein	Csy	C
Aspartat	Asp	D
Glutamat	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Iso	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Try	W
Tyrosin	Tyr	Y

## Sonstige Abkürzungen

Å	Angström (1 Å = 0,1 nm)
a, b, c	Gitterachsen im realen Raum
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	Winkel zwischen den Gitterachsen
ABC	ATP-binding cassette (Familie von Enzymsystemen für den aktiven Transport von Stoffen in eine Zelle)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
<i>A.v.</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
EDTA	Ethylendiamin Tetraessigsäure
EXAFS	Extendend X-Ray absorption fine structure
GTP	Guanosintriphosphat
MAD	Multiple anomale Dispersion
Mo	Molybdän
Molbindin	Molybdän bindendes bakterielles Protein
Mop	Einfachstes Molbindin
MOPS	N-Morpholino-propan-3-sulfonsäure
MoSto	Molybdän-Speicherprotein aus <i>Azotobacter vinelandii</i>
NAGK	N-Acetylglutamat-Kinase
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PDB	Brookhaven protein structure data bank
PEG	Polyethylenglykol
pH	pondus Hydrogenii
POM	Polyoxometallat
$R_{\text{free}}$	freier R-Wert
$R_{\text{work}}$	R-Wert des Arbeitsdatensatzes
RMS	Standardabweichung (root mean square)
RSA	Rinderserumalbumin
SAXS	Small angle X-ray scattering (Röntgen-Kleinwinkelstreuung)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)

Se-Met	Seleno-Methionin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TOPS	Topology of protein structure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tricin	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
UMPk	Uridinmonophosphat-Kinase
$V_M$	Matthews-Koeffizient
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
WSto	Wolfram-haltiges Speicherprotein aus <i>Azotobacter vinelandii</i>



## 1 Einleitung

### 1.1 Molybdän und Wolfram : Eine Gegenüberstellung

Das Schwermetall, das im Fokus meiner Forschung stand war das Molybdän, welches nach dem aktuellen Kenntnisstand das einzige Element aus der zweiten (4d-) Übergangsreihe des Periodensystems ist, dem wichtige biologische Bedeutsamkeit zukommt. Trotz seines recht seltenen Vorkommens in der Erdkruste (W. Kaim, B. Schwederski et al., 1995) besitzt das Molybdän durch seine besondere Chemie in wässrigen Lösungen bei physiologischem pH-Wert eine hohe Bioverfügbarkeit. Es zeichnet sich unter aeroben Bedingungen in wässrigen Lösungen durch hohe Oxidationsstufen, hohe Koordinationszahlen und durch die Bevorzugung „harter“ Liganden, insbesondere negativ geladener Sauerstoffliganden, aus. Daraus resultiert in seiner stabilsten, sechswertigen Form als  $\text{MoO}_4^{2-}$  die recht gute Löslichkeit von 10  $\mu\text{g/L}$  im Meerwasser bei pH 7. Dies entspricht dem 20-fachen von Zn und dem 100-fachen von Cu. Zusätzlich findet man Mo in colloidalen oder suspendierten Partikeln, sowie in sulfidreichen Sedimentablagerungen [Bagg et al., 1987; Paulsen, et al., 1991].

Molybdän ist auch in allen Lebewesen von vitaler Bedeutung. Der Mensch benötigt Molybdän als essentielles Spurenelement und nimmt es in Form von  $\text{MoO}_4^{2-}$  mit einer hohen Effizienz von 70 - 80% auf. Lokalisiert ist das Molybdän im menschlichen Körper vor allem im Skelett, sowie in den inneren Organen und in der Haut. Darüber hinaus ist Molybdän Bestandteil der Zähne und ist neben seiner bakteriostatischen Wirkung auch am Einbau von Fluor in die Zähne beteiligt. Ein möglicher Auslöser von Karies kann deshalb ein Mangel an Molybdän sein. Im Stoffwechsel ist Molybdän als Bestandteil des Molybdopterin-Kofaktors in einer Reihe wichtiger Enzyme wie z.B. Xanthin- und Aldehydoxidase von grundsätzlicher Bedeutung. Für enzymatische Prozesse ist Mo deswegen so interessant, weil es sowohl die Fähigkeit zu Zwei-Elektronen-Übertragungsreaktionen als auch die Übertragung von Sauerstoffatomen auf Substrate besitzt.

Die biologische Relevanz von Wolfram, die allerdings auf wenige Metabolismen begrenzt ist, wurde vor 25 Jahren bekannt (Paulsen, et al, 1991, Pateman et al., 1964) und im Jahre 1983 erstmals in der Formiat ( $\text{HCOO}^-$ )- Dehydrogenase aus

*Clostridium thermoaceticum* beschrieben [Yamamoto et al., 1983]. Jedoch gewinnt Wolfram, vor allem unter anaeroben Bedingungen und speziell auch unter hohen Sulfidkonzentrationen an Bedeutung. Unter diesen Bedingungen, die vor allem in hydrothermalen Quellen der Tiefsee vorliegen, wird Molybdän im Gegensatz zu W in die Oxidationsstufe +V bzw. +IV reduziert und liegt verbreitet als unlösliches  $\text{MoS}_2$  oder als Mo-Organoschwefel-Verbindung vor.

Die Ähnlichkeiten der beiden d-Übergangsmetalle zeigen sich einerseits in den Atom- und Ionenradien andererseits in den chemischen Eigenschaften und der Koordinationschemie. Dabei reicht der Bereich der Oxidationsstufen von –II bis +VI, obgleich die biologische Relevanz nur die Stufen von +IV bis +VI betrifft. Im Gegensatz zum Molybdat (VI) sind die Oxometallate  $\text{MO}_n^{m-}$  des Wolframs bei pH 7 kaum löslich und nur in niedrigen Konzentrationen im Meerwasser ( $0,1 \mu\text{g/L}$ ) enthalten. Weitere deutliche Unterschiede stellt man in den Redoxpotentialen fest. Der wesentlich höhere Wert des Molybdats im Vergleich zu dem des Wolframats zeigt, dass Wolframkomplexe wesentlich stabiler als die entsprechenden Komplexe des Molybdats sind. Dies bestätigt sich auch bei der Komplexbildung mit Dithiolenen, welche als analytisches Reagenz fungieren. Dabei weichen die Redoxpotentiale beider Komplexe bis zu 225 mV voneinander ab (Johnson et al., 1996).

Allerdings bleibt festzustellen, dass W als Kofaktor-Komponente nur für einige primitive Organismen (*Archaea*, frühere „Archaeobakterien“) identifiziert wurde (Hagen et al., 1989) und offenbar nur an Reaktionen beteiligt ist, die unter extremen Bedingungen (hohe Temperatur, tiefes Redoxpotential) ablaufen, während sich Mo an einer großen Anzahl von Umwandlungen und metabolischen Prozessen beteiligt. Darüber hinaus ist Mo ein wichtiger Baustein im globalen Stickstoffzyklus, sowohl in der  $\text{N}_2$  Fixierung, als auch beim ersten Schritt der Stickstoffassimilation, der Nitrat Reduktase.

### **1.2 Der Organismus „Azotobacter vinelandii“**

Die Proteinbiosynthese des Speicherproteins wurde im Organismus *Azotobacter vinelandii* (*A.v.*) ausschließlich unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Dieses in Böden, Gewässern und auf Pflanzen zu findende Bakterium gehört zur gram-negativen, keine Sporen bildenden Familie der *Azotobacteriaceae*.



**Abb. 1.1:** Der *Azotobacter vinelandii* Organismus. Quelle aus <http://ava.biosci.arizona.edu> ([www.azotobacter.org](http://www.azotobacter.org)).

Morphologisch bildet *A.v.* Stäbchen und Kokken, die einen relativ großen Durchmesser ( $>2\mu\text{m}$ ) bilden. Die bekannten sechs Arten sind teils peritrich begeißelt, teils unbeweglich (Hendrick (1992) & Buchanan et al., 1974). Dieser obligat aerobe Organismus zeichnet sich durch dickwandige, 5-Alkylresorcinol enthaltene Mikrozysten aus, die den Organismus vor Austrocknung und Nahrungsmangel schützen. *A. v.* nutzt dabei eine große Anzahl an Kohlenstoffquellen, wie Kohlenhydrate, Alkohole und organischen Säure, und ist zudem in der Lage, daraus Kohlenstoffspeichermoleküle, wie Alginate, Poly-B-Hydroxybuttersäure und L-Rhamnose zu synthetisieren.

Aufgrund seiner genetischen Ausstattung hat *A. v.* einen großen Bereich an metabolischen Fähigkeiten und nimmt bei der Stickstofffixierung eine Sonderstellung ein. Die Fähigkeit zur Fixierung elementaren Stickstoffs ist für das Bakterium essentiell, da er Aminosäuren, die eine wichtige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle darstellen, nicht transportieren kann (<http://genome.jgi-psf.org>).

Die Umwandlung von elementarem  $\text{N}_2$  in Ammoniak bzw. Ammoniumsalz erfolgt dabei in einem nicht symbiotischen System (frei lebender Zustand). Das obligate aerobe Bakterium wächst unter niedrigem Sauerstoffdruck. Es entwickelte einen aeroben Stickstofffixierungsmechanismus trotz der vorhandenen Sensibilität der Nitrogenasen für Sauerstoff und ist in der Lage eine sauerstofffreie Umgebung zu gewährleisten. Neben 2Fe-2S-Proteinen sind vor allem Cytochrome (Atmungskette) nur bei *A.v.* in der Lage, die Konzentration an elementarem Sauerstoff fast auf Null zu stabilisieren. Diese „Sauerstofffänger“ dienen zum Schutz vor der Inaktivierung der Nitrogenase. Neben der molybdänhaltigen Nitrogenase hat *A. v.* die Fähigkeit

noch zwei weitere alternative Typen von Nitrogenasen zu synthetisieren, wobei beim 1. Typ das Molybdän durch Vanadium, beim 2. Typ sowohl Vanadium als auch Molybdän durch Eisen ersetzt wird. Die Synthese des Nitrogenase-Typs in der Zelle wird durch die Verfügbarkeit des entsprechenden Metalls in der Umgebung bestimmt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass diese Vorteile den Umgang mit *A. v.*-Stämmen sehr erleichtern. Positiv hervorzuheben ist auch das schnelle Zellwachstum, die gute Ausbeute und die unproblematische Verarbeitung der Zellen unter Luftsauerstoff. Die Fähigkeit, DNA einer anderen Bakterienart durch direkten Transfer entweder eines Plasmids oder einer linearen DNA in die Zellen einzubauen, macht das Bakterium zur Entschlüsselung des biochemischen Stoffwechselweges dieses oder anderer Organismen zum gefragten Objekt der Forschung.

### **1.3 Die Molybdoproteinfamilie**

Je nach Funktion des Molybdäns, der strukturellen Eigenschaft des Proteins oder Art der molybdänhaltigen Komponente im Protein unterscheidet man fünf Klassen molybdänhaltiger Proteine.

Die bereits im letzten Abschnitt erwähnten Mo-Nitrogenasen enthalten einen Eisen-Molybdän-Kofaktor (FeMoCo). Der Kofaktor, der das Zentrum der Stickstoffreduktion darstellt, enthält zwei Cluster der formalen Zusammensetzung  $\text{Fe}_4\text{-S}_3$  und  $\text{Mo-Fe}_3\text{-S}_3$ , die mit 3 Sulfid-Liganden überbrückt sind (Gangeswaran et al., 1993). Daraus ergibt sich ein  $\text{MoFe}_7\text{S}_9$  Clusterkern, in dem das Molybdän außerdem noch koordinativ über ein Hydroxyl- und Carboxyl-Sauerstoff an Homocitrat gebunden ist.

Die eisenfreien Molybdän-Kofaktoren (Moco), die aus einer organischen Pterin-Komponente und einem Molybdänoxid-Fragment zusammengesetzt sind, stellen eine weitere Gruppe molybdänhaltiger Proteine dar. Darüber hinaus wurden Anfang der neunziger Jahre auch Wolfram-Kofaktor-Strukturen entdeckt (Kletzin et al., 1995, Hochheimer et al., 1995).

Im Allgemeinen dient der Kofaktor der kontrollierten Mehrelektronenübertragung und dem Oxotransfer vom oder zum Substrat. Man unterscheidet dabei die Kofaktoren in Eukaryonten als Molydopterin und Pyranopterine, während sie in Prokaryonten noch

zusätzlich einen Dinukleotidanteil besitzen. Einen speziellen Typ von Moco-Enzymen, die in zahlreichen Oxidasen, Dehydrogenasen und Hydroxylasen enthalten sind, stellt die Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase dar. Sie besteht aus einem zweikernigen [CuSMo(=O<sub>2</sub>)] Cluster, in dem das Molybdänatom des Moco mit einem Kupfer über eine Sulfidbrücke verbunden ist (Dobbeck et al., 2002).

Eine weitere große Familie bilden die Molybdat-bindenden Proteine (Mod/Mop Proteine), die auch Molbindine genannt werden und hauptsächlich am Mo-Transport, dem intrazellulären Transfer und der Genregulation beteiligt sind. Anionen, wie das Molybdat oder Wolframat werden ausschließlich in Prokaryonten mit einem äußerst hoch affinen Transportsystem vom Typ der so genannten „ATP-binding cassette“ (kurz: ABC) in die Zelle bewegt. Die drei Hauptproteinkomponenten werden nach den entsprechenden Genloci der codierten Proteine mit ModA, ModB und ModC benannt (Mouncey et al., 1995; Maupin-Furlow et al., 1995; Wang et al., 1993). Der Mo-Gehalt im Protein schwankt zwischen einem Mo-Atom im ModA und acht Mo-Atomen im ModG Protein von *A. vinelandii* (Duhme et al., 1999).

Einen Sonderfall stellt das aufgrund seiner Färbung so bezeichnete „orangefarbene Protein“ (ORP) dar. Die Funktion dieses monomeren löslichen Proteins (11,8 kDa) ist bislang unbekannt. Entdeckt wurde das Protein in *Desulfovibrio gigas*, einem Organismus, der Sulfate reduziert. Aufgrund der Ergebnisse von Elementaranalysen sowie ESR- und XAS- Untersuchungen wurde ein Pterin-freier Molybdän-Kupfer-Sulfid-Cluster mit einer linearen Anordnung [S<sub>2</sub>MoS<sub>2</sub>CuS<sub>2</sub>MoS<sub>2</sub>] postuliert (Bursakov et al., 2004).

Das Hauptaugenmerk meiner Forschung richtete sich aber auf ein in *A. v.* identifiziertes Molybdänspeicherprotein, dem bisher wohl auch durch seine vermeintliche Instabilität wenig Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Eingehende Untersuchungen (Fenske et al., 2005) zeigten aber, dass das Protein besondere Eigenschaften besitzt und sich grundlegend von allen bisher bekannten Mo-haltigen Proteinen unterscheidet.

## 1.4 Das Molybdänspeicherprotein (MoSto)

Funktionell ist das Protein sehr eng verknüpft mit der Stickstofffixierung, obgleich es im Gegensatz zu den *nif* Genprodukten von Ammonium nicht reprimiert wird. Dies ermöglicht dem Speicherprotein, unabhängig von der Stickstoffquelle, eine große Menge an Molybdän in der Zelle anzusammeln und der Mo-Nitrogenase Stickstofffixierung auch bei extrem Molybdän-verarmten Bedingungen zuzuführen.

Die Kombination des Speicherproteins mit den „high affinity“ ABC-Molybdän-Transport-Proteinen, die für die Aufnahme des Mo in die Zelle verantwortlich sind, führt zu einem System, das der Umgebung außerhalb der Zelle sehr effektiv das Molybdän entzieht. Dies verschafft *A. v.* einen selektiven Vorteil im natürlichen Lebensraum, in dem auch andere Organismen um Molybdän-Ionen konkurrieren.

### 1.4.1 Bisheriger Forschungsstand

Trotz dieser wichtigen physiologischen und ökologischen Bedeutung liegt die erste Isolierung und wesentliche Charakterisierung durch Pienkos und Brill schon 24 Jahre zurück.

Die Autoren beschreiben MoSto strukturell als ein  $\alpha_2\beta_2$ - Tetramer mit den Massen von 21 und 24 kDa für die entsprechenden Untereinheiten. Der Mo-Gehalt betrug 16 Mo-Atome pro Proteinmolekül. Allerdings vermuteten die Forscher schon damals aufgrund des hohen Molybdänverlustes während der Proteinreinigung einen höheren Gehalt *in vivo*. Ihre Schätzung der molekularen Masse von MoSto betrug 90 kDa, obwohl sie vorher eine Masse im Bereich von 200 kDa vermuteten (Pienkos et al., 1981).

SDS-PAGE Ergebnisse neuerer Untersuchungen (Fenske et al., 2005) bestätigten, dass MoSto aus zwei gleichen Anteilen zweier verschiedener Untereinheiten besteht. Es wurde mittels Gelfiltration eine molekulare Masse von 240 kDa erhalten. Die Bestimmung der Molmassen durch MALDI-TOF ergab für die  $\alpha$ - Untereinheit 28.15 und für die  $\beta$ -Untereinheit 29.12 kDa. Dies weist strukturell auf ein  $\alpha_4\beta_4$ - Oktamer hin. Die Betrachtung des Molybdänzentrums ergab einen Gehalt von 30 Atomen nach zwei Reinigungsschritten, der jedoch sehr variabel war. Nach Anwendung eines signifikant verbesserten Chromatographie-Säulenmaterials (Superdex) konnten wir das Maximum auf 70 Atome pro Molekül erhöhen. Weitere Versuche ergaben noch höhere Werte (siehe Ergebnisse und Diskussion).

Aufbauend auf den Ergebnissen der ansequenzierten Untereinheiten des Speicherproteins wurde die Datenbank des „*Azotobacter* Genome Project“ (<http://www.azotobacter.org/blast.html>) untersucht. Die Genabschnitte *or5807* und *or5808*, welche entsprechende Proteine kodieren, entsprachen sehr gut den molekularen Massen der beiden Untereinheiten des MoSto. Es wurden die Namen *mosA* und entsprechend *mosB* für die Genabschnitte, die die MoSto-Untereinheiten codieren, vorgeschlagen. Die Untereinheiten (Abb. 1.2) zeigten sehr große sequenzielle Ähnlichkeiten untereinander. Dies lässt vermuten, dass sich beide Untereinheiten durch Duplikation eines einzelnen ursprünglichen Gens gebildet haben. Sequenzvergleiche mit verschiedenen Protein-Datenbanken zeigten gewisse Ähnlichkeiten des MoSto mit Uridin- Monophosphat- Kinasen, welche die Reaktion  $ATP+UMP \rightarrow ADP+UDP$  katalysiert (Altschul et al., 1997).

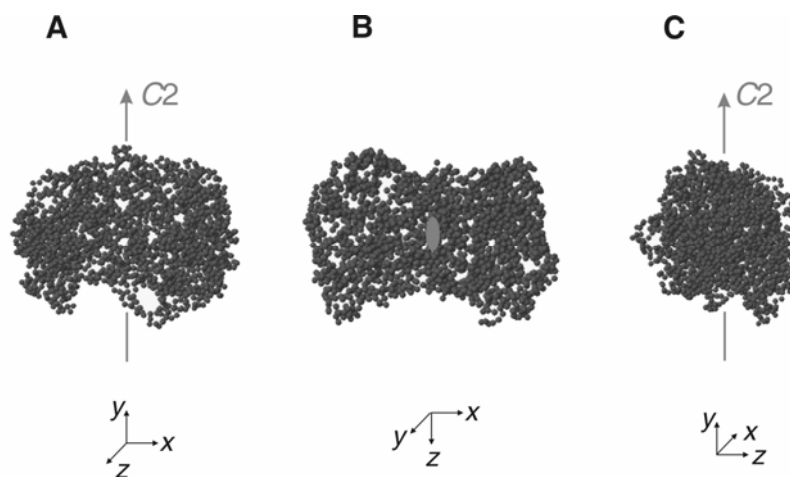
α-UH	1	M T D T T N S I K H V I S P L A R Q T L Q D R D L T R P V A G K R P I R L L P W L Q V V K I G G R V M D R G A
β-UH	1	· · · M A N S T A E L E E L L M Q R S L T D P Q L O A A A A A A A D F R I L P D A T V I K I G G Q S V I D R G R
α-UH	56	D A I L P L V E E L R K L L P E H R L L I L T G A G V R R A R H V F S V G L D L G L P V G S L A P L A A S E A G Q
β-UH	54	A A V Y P L L D E I V A A R K N H K L L I G T G A G T R A R H L Y S I A A G L G L P A G V L A Q L G S S V A D Q
α-UH	112	N G H I L A A M L A S E G V S Y V E H P T V A D Q L A I H L S A T R A V V G S A F P P Y H H E F P · · G S R I
β-UH	110	N A A M L G Q L L A K H G I P V V G G A G L S · A V P L S L A E V N A V V F S G M P P Y K L W M R P A A E G V I
α-UH	166	P P H R A D T G A F L L A D A F G A A G L T I V E N V D G I Y T A D P N G P D R G Q A R F L P E T S A T D L · A
β-UH	165	P P Y R T D A G C F L L A E Q F G C K Q M I F V K D E D G L Y T A N P · · K T S K D A T F I P R I S V D E M K A
α-UH	221	K S E G P L P V D R A L L D V M A T A R H I E R V Q V V N G L V P G R L T A A L R G E H V G T L I R T G V R P A
β-UH	219	K G L H D S I L E F P V L D L L Q S A Q H V R E V Q V V N G L V P G N L T R A L A G E H V G T I I T A S · · ·

**Abb.1.2:** Sequenzvergleich zwischen der α- und β- Untereinheit von MoSto, übersetzt aus dem *Azotobacter* Genom. Rote Boxen deuten identische Aminosäurereste an, während blaue Boxen chemisch ähnliche Aminosäuren bezeichnen, die vergleichbare Funktionen im Protein erfüllen. Das Start-Methionin an Position 1 ist allerdings im funktionsfähigen Protein nicht anwesend (Fenske et al., 2005).

Die so genannte Mop-Untereinheit wurde in der MoSto-Sequenz nicht entdeckt. Der Vergleich von MoSto mit den Mop-Domänen der 13 verschiedenen Molybdat-bindenden Proteine (siehe Abbildung 1.6) ergab keine zufriedenstellende Anpassung an die Untereinheiten von MoSto. Bei weiterer genauer Betrachtung ähneln die Aminosäuren 77-82 der α-Untereinheit sowie 75-80 der β-Untereinheit einem P-Loop-Motiv einer ATP-Bindungsstelle (Saraste, et al., 1990). Dies stützt die in vitro-Experimente, dass die Nukleotide (ADP oder ATP) notwendig sind für den Einbau

von Molybdat in MoSto. Einzigartig ist das Speicherprotein allerdings nicht, da durch Datenbankenuntersuchungen des sequenzierten Genoms von *Rhodospseudomonas palustris* zwei benachbarte Gene (*rpa1441* und *rpa1442*) lokalisiert wurden, die Peptidketten mit einer Länge von 273 bzw. 270 Aminosäuren codieren. Diese sind zu 80 % identisch mit entsprechenden Untereinheiten des A.v.-MoSto. Ein anderes sehr ähnliches Peptid mit einer Länge von 318 Aminosäuren wird codiert durch ein Plasmid-Gen (*pRhico094*) des Organismus *Azospirillum brasilense* und ergibt 86 % Identität mit der  $\beta$ -Untereinheit von A.v. MoSto in einer 251 Aminosäuren langen Überlappung (Larimer et al.; Vanbleu et al., 2004).

Um etwas über die Oberflächengestalt des MoSto zu erfahren wurde eine Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS) vorgenommen. Die aus der Berechnung ermittelten Modelle zeigten eine zweizählige Symmetrie (Abb. 1.3). Zusätzlich lieferte die Messung einen neuen unabhängig bestimmten Wert für die Molmasse des MoSto von 247 kDa.



**Abb. 1.3:** Form des MoSto-Moleküls, ermittelt anhand von SAXS-Daten mit Hilfe von ab initio-Simulationsrechnungen in drei unterschiedlichen Ansichten (A-C). Wie zu sehen ist, hat das Protein eine zweizählige Symmetrie (Fenske et al., 2005).

Die Ergebnisse lieferten den Hinweis für ein Dimer des MoSto mit einer  $(\alpha_2\beta_2)_2$ -Anordnung der beiden Untereinheiten. Allerdings war dieses vorläufige Modell rein spekulativer Natur und bedurfe weiterer ergänzender Strukturuntersuchungen.

Neben den strukturellen Untersuchungen des Speicherproteins, stand vor allem die Identifizierung der Mo-Komponente von MoSto im Vordergrund.

Frühere Messungen in unserer Arbeitsgruppe mittels  $^{99}\text{Mo}$ -TDPAC an ganzen A.v.-Zellen und einem mit Sephadex G-25 gefilterte zellfreie Extrakt führten zu Spektren, die denen von Heptamolybdat ähnelten, wenn die Zellen unter Nitrogenase-reprimierenden Bedingungen wuchsen (Müller et al., 1997). Diese TDPAC-Ergebnisse gaben uns den ersten Hinweis über die Molybdän-Komponente im MoSto als mögliches Polyoxometallat. Dies ließ auch erste Rückschlüsse über ein eventuelles Strukturanalogon zu Ferritin zu, welches zu jener Zeit der einzige bekannte Metallspeicher mit einem polynuklearen Oxometallatkern war.

Zur strukturellen Charakterisierung der Molybdänkomponente im Protein wurde an der Mo-K-Kante ein EXAFS-Spektrum mit einer eingefrorenen MoSto-Lösung aufgenommen. Einerseits wurden verschiedene Modell-Komponenten als Referenzproben zum MoSto benutzt (Dissertation Dirk Fenske, 2004), deren Resultate die Anwesenheit eines mehrkernigen Molybdän-Oxo-Clusters beweisen. Zum Zweiten wurde mittels eines Kontroll-experiments mit monomolekularem Molybdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) nachgewiesen, dass der Polyoxometallat-Cluster am Protein gebunden sein muss (Fenske et al., 2005). Darüber hinaus steht fest, dass sich in der leicht sauren Lösung (pH 6.5) keine spontane Clusterbildung in Form eines „self assembly“ Mechanismus ereignen kann. Somit spielt sich die Clusterbildung ausschließlich im Speicherprotein ab.

Einen weiteren sehr wichtigen Stellenwert meiner Arbeit nahmen, neben der Aufklärung der Röntgenstruktur, die Untersuchungen zur Regulation der in vivo-Biosynthese von MoSto, sowie detaillierte Studien zu den bisher noch nicht geklärten Freisetzungs- und Einbaumechanismus des Molybdäns in das Speicherprotein ein.

Die ersten Studien, die die notwendigen Reaktionsbedingungen für die Prozesse der Freisetzung und den anschließenden Wiedereinbau des Molybdäns beschreiben, lieferten Hinweise für einen biologisch einzigartigen Mechanismus (Fenske et al., 2005). Die Zellen wurden dabei unter strikter Repression *nif*-codierenden Proteinen kultiviert, um die Bildung der ebenfalls Mo-haltigen und damit die Analysen störende Nitrogenase zu vermeiden. Die Untersuchungen deuteten einen pH-regulierten Mo-Freisetzungsprozess an, der in einem leicht alkalischen und sehr engen pH-Bereich (7.1-7.6) stattfindet („switch on“-Mechanismus). Diese Ergebnisse stimmen mit

Untersuchungen in der Polyoxometallatchemie überein. In wässrigen molybdänhaltigen Lösungen führt ein Anstieg des pH-Werts zu einem Abbau größerer Mo-Einheiten in kleinere Bruchstücke (Pope & Müller, 1991). Die Mo-Freisetzung aus dem Speicherprotein ist durch eine einfache Herabsetzung des pH-Werts unter 7.1 nicht umkehrbar. Auch die Anwesenheit von Mo-Akzeptor- und Transferproteinen, sowie Proteine mit Insertase- oder Chaperonfunktion, die möglicherweise am Freisetzungs- und Einbauprozess beteiligt sind, wurden nicht bestätigt.

Im Gegensatz zur Mo-Freisetzung benötigt der Mo-Einbauprozess ATP als Energielieferant. Die signifikante Rolle des ATP wird einerseits durch die in der Aminosäuresequenz ermittelte ATP-Bindungsstelle (siehe oben) und auf der anderen Seite durch ATP und ADP-abhängige Austauschstudien zwischen MoSto-gebundenem Wolfram und freiem Molybdat untermauert (Allen et al., 1999).

### **1.5 Zielsetzung dieser Arbeit**

Aufbauend auf den bisher erzielten Ergebnissen ergaben sich weitere Fragestellungen bezüglich des Verständnisses und der Aufklärung des Freisetzung- und Einbaumechanismus. So blieben die Fragen offen, in welchem Maße neben dem „pH-shift“ die anderen Parameter (Temperatur, Inkubationszeit, Proteinkonzentration, Grad der Reinheit des Proteins) entscheidenden Einfluss auf den Mo-Freisetzungprozess hatten. Zusätzliche Überlegungen hinsichtlich einer kontinuierlichen Mo-Freisetzung oder eines mehrstufigen Prozesses spielten eine genauso wichtige Rolle wie die Frage, ob der ATP-abhängige Mo-Einbau auch durch andere Nukleotide ermöglicht wird. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit des Mo-Einbau von der ATP-Konzentration untersucht, um Hinweise über das Einbaumuster von Molybdän durch ATP zu erhalten. Dies sollte zeigen, ob der Einbau ein kontinuierlicher oder beschleunigter (kooperativer) Effekt ist und ob durch den Ersatz des ATP durch andere Nukleotide signifikante Änderungen der Abhängigkeiten im Einbauprozess stattfinden. Auch die Untersuchung der optimalen experimentellen Bedingungen, die die Messung der maximalen Bindungskapazität erlaubten und die Möglichkeit, Molybdän durch das Metall Wolfram zu ersetzen, stellten weitere wichtige Aspekte meiner Arbeit dar. Aus einem möglichen Metalltransfer ließen sich auf der einen Seite Aussagen über die Möglichkeit einer in-vitro Synthese von W-haltigem MoSto machen. Andererseits war dadurch die Untersuchung von Unterschieden der Stabilität und der Bindungsaffinitäten zwischen den verschiedenen Metallen (Mo, W) und dem Speicherprotein möglich.

Neben den Untersuchungen am Holoprotein waren allerdings auch Stabilitätsversuche mit dem Apoprotein für spätere Kristallisationsversuche und zum Verständnis der Funktion und Struktur des MoSto unerlässlich.

Die Weiterentwicklung der bereits im Vorfeld meiner Arbeit entdeckten Methode zur Herstellung eines Wolfram-haltigen MoSto diente als Grundlage zur in-vivo-Herstellung von WSto.

Weitere immunologische Untersuchungen der Regulation des Molybdänspeicherproteins sollten die Aussage von Pienkos & Brill über eine konstitutive in-vivo Bildung von MoSto bestätigen oder widerlegen.

Ein weiterer wichtiger Hauptbestandteil dieser Arbeit bestand darin, röntgentaugliche Proteinkristalle herzustellen, um erste Einblicke in die Struktur des Speicherproteins zu erhalten. Dies setzte eine hohe Reinheit und Qualität des Proteins voraus und

bedurfte einer Verbesserung der Reinigungsmethoden. In parallelen Ansätzen sollte die strukturelle Charakterisierung sowohl des MoSto als auch seines Wolfram-äquivalenten Proteins (WSto) untersucht werden, um eventuelle Unterschiede in der Quartärstruktur des Proteins und dem Bindungsverhalten von Wolfram und Molybdän festzustellen. Auch die Anzahl und Lokalisation der Molybdän- und Wolframatome war dahingehend ein wichtiger Aspekt. Eine sich anschließende Röntgenstrukturuntersuchung von MoSto in Anwesenheit von ATP und  $MgCl_2$  zur Untersuchung des Einbaumechanismus wurde ebenfalls in Betracht gezogen.

Neben der Entschlüsselung der Proteinstruktur beschäftigte ich mich auch mit der Frage der Clusterstruktur und Clusteranordnung im Proteininneren, also konkret auch mit der Frage, ob ein großer oder eher mehrere kleine Polyoxometallat-Cluster im MoSto vorliegen. Damit war auch ein Vergleich der bereits gemachten Strukturvorhersagen durch die EXAFS- und SAXS-Messungen des Speicherproteins möglich.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen

Der Bakterienstamm *Azotobacter vinelandii* (DSMZ 366, ATCC 13705) wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) zu Verfügung gestellt. Die Lagerung wurde in Kryokulturen (siehe Abschnitt 2.1.1.1) durchgeführt.

#### 2.1.1 Langzeitlagerung der Organismen und Dauerkulturen

Die vorher auf der Platte gewachsenen Zellen wurden mit zwei vollen Impfösen (Durchmesser: 3mm) in ein Kryoröhrchen (Volumen 1,5 ml) überführt. Die Zellen wurden im Röhrchen in einer autoklavierten Lösung im Volumenverhältnis 1:1 bestehend aus:

- 5ml Nährlösung (siehe Abschnitt 2.2, allerdings ohne Sucrose, NH<sub>4</sub>Ac und Molybdat bzw. Wolframat)
- 5ml Glycerin (87%)

aufgeschlämmt und zuerst 1 ml-Aliquote bei -4°C im Gefrierschrank 3 Stunden aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen ebenfalls in 3 Stunden-Intervallen bei -20°C und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert. Der Grund dieser stufenweisen Herabsetzung der Temperatur liegt in der schonenden Behandlung der Zellpellets. Die Lagerung kann über mehrere Jahre erfolgen (Maniatis et al., 1982).

### 2.2 Zellanzucht

#### 2.2.1 Nährmedien

##### Standardnährmedium

Die Zellanzucht erfolgte unter aeroben Bedingungen mittels des modifizierten Burk'schen Mediums folgender Zusammensetzung (Strandberg & Wilson, 1968):

NL-Bestandteile	Konzentrationen	
	g/L	mmol/L
Saccharose	20	58,4
Bestandteile der Minerallösung (werden als 10fach konzentrierte Lösung zugegeben)		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2	0,811
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,09	0,612
NaCl	0,2	3,42
Eisen(III)-citrat · H <sub>2</sub> O	0,025	0,095
Bestandteile des Phosphatpuffer (100-fach konzentrierte Lösung)		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,026	0,105
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	2,812	16,1
Weitere Bestandteile		
10 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,1 mL/L	0,01
100 mM Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	1 mL/L	0,1
NH <sub>4</sub> Ac	10 mL/L	20

Zur Herstellung von molybdänhaltigen Zellen unter Stickstoffierungs-Bedingungen wurde zur Minerallösung Natriummolybdat zugesetzt. Die Zugabe von Ammoniumacetat diente zur Nitrogenase-Repression. Die Minerallösung, Phosphatpufferlösung, Saccharoselösung und Molybdat- oder Wolframatlösung wurden in separaten Glasgefäßen bei 121°C sterilisiert und dann zur fertigen Nährlösung vereint. Dies sollte die Karamellisierung des Zuckers und die Bildung von unlöslichem Calciumphosphat verhindern. Das Nährmedium wurde in gleicher Zusammensetzung für alle Vor- und Hauptkulturen verwendet. Zur Stammhaltung der Zellen auf Agarplatten wurden zusätzlich 15 g/l Agar zugegeben.

### 2.2.2 Nährmedien unter Mo-verarmten Bedingungen

Die Anzucht von wolframhaltigen Zellen wurde unter Mo-defizienten Bedingungen durchgeführt. Hierzu musste die Mo-Kontamination von Gefäßen, sowie der Gehalt an Mo-Spuren in Zellen, Nährlösungen und Nährmedien möglichst minimal gehalten werden.

Zur Entfernung von Mo-Verunreinigungen wurden in erster Linie sämtliche Glasgefäße sowie alle Kulturgefäße vor Gebrauch und nach Anzucht in metallhaltigen Nährlösungen über Nacht in eine 0,1 M HNO<sub>3</sub>-Lösung eingelegt und nach mehrfachem Spülen mit bidestilliertem Wasser in eine 1 mM EDTA-Lösung über Nacht erneut eingelegt und anschließend wieder mit bidestilliertem Wasser gründlich gespült.

### Aktivkohlebehandlung

Auch die Eisen (III)-Citrat-Stammlösung enthält Spuren von Molybdat. Um eine selektive Adsorption von Molybdänverbindungen zu erreichen, wird die Lösung mittels Aktivkohlesuspension behandelt (Schneider et. al., 1991). Diese Suspension (50 g/l) wird 48 h bei Raumtemperatur und anschließend 10 min bei 100°C gerührt. 200 mL der abgekühlten Suspension werden mit 400 mL Eisen(III)-Citrat-Lösung (38 mmol/L, pH 2,3) versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration wird das Filtrat als Nährlösungsbestandteil eingesetzt.

### Reinigung der Nährlösung von Molybdänspuren mit A.v.-Zellen

Da *Azotobacter vinelandii*-Zellen in der Lage sind, größere Mengen an Molybdat zu speichern, entwickelte ich, basierend auf früheren Ergebnissen (Schneider et. al., 1991), ein eigenes Verfahren zur Reinigung der Nährlösung. Folgende Schritte wurden beachtet:

- Schritt 1:  
Zuerst wurde eine normale A.v.-Anzucht vorgenommen (siehe Abschnitt 2.2.). Das Zellwachstum wurde in der logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>436</sub> ~ 8) beendet und das Pellet mittels einer Ultrazentrifuge bei 13000 Upm 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit einem minimalen Volumen an Standardpuffer (50 mM MOPS, pH 6,5) aufgenommen.
  
- Schritt 2:  
Die Herstellung einer 10-fach konzentrierten Nährlösung erfolgte unter Abwesenheit von Ammonium-, Stickstoff- und Kohlenstoffquellen sowie ohne Na-Molybdat Zusatz, da keinerlei Wachstum gewährleistet werden sollte. Saccharose, Eisen(III)-Citrat und Ammoniumacetat werden in 1,5-fach

höheren Konzentrationen eingesetzt. Daraus ergibt sich folgende Zusammensetzung des modifizierten Burk'schen Mediums:

NL-Bestandteile	Konzentrationen	
	g/L	mmol/L
Saccharose	30	87,6
Bestandteile der Minerallösung (werden als 10fach konzentrierte Lösung zugegeben)		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2	0,811
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,09	0,612
NaCl	0,2	3,42
Eisen(III)-citrat · H <sub>2</sub> O	0,0375	0,1425
Bestandteile des Phosphatpuffer (100-fach konzentrierte Lösung)		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,026	0,105
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	2,812	16,1

Das Gesamtvolumen des Zellextrakts betrug 500 mL, von denen 300 mL in einer Vakuumflasche mit den *A.v.*-Zellen aufgeschlämmt wurde. Die optische Dichte (OD<sub>436</sub>) betrug zu diesem Zeitpunkt 5-6. Anschließend rührte ich den Zellextrakt 2 Stunden bei Raumtemperatur in einem Erlenmeyerkolben, der zu 75% gefüllt war. Dies sollte nur die Zellatmung und den Stoffwechsel, nicht aber das Wachstum beeinflussen. Anschließend wurden die Zellen bei 13000 Upm und 4 °C eine halbe Stunde zentrifugiert, die Proben in 10 mL Röhrchen portioniert und eingefroren.

- Schritt 3:

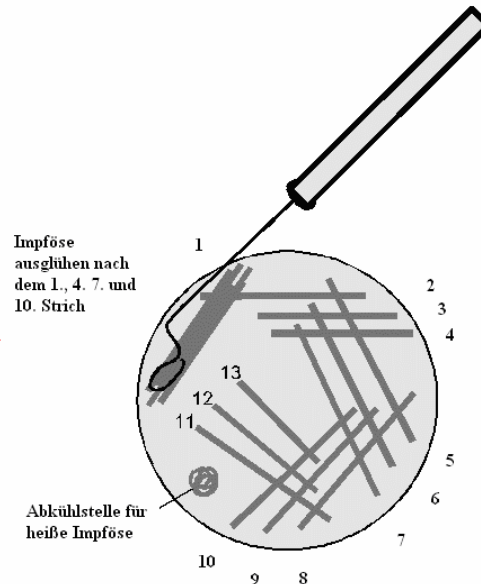
Vor der Verwendung der gereinigten Nährlösung wurde diese mit Wasser auf 1:10 verdünnt und auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt. Das steril filtrierte Calciumchlorid und Natriummolybdat wurde erst kurz vor dem Einsatz der Nährlösung zugesetzt.

### 2.2.3 Zellkultivierung

#### 2.2.3.1 Stammhaltung von *Azotobacter vinelandii*

Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten wie bereits schon erwähnt unter Stickstoffixierungs-Bedingungen (Nährboden mit Ammoniumsalz ohne Molybdat), um das Wachstum von Fremdkeimen möglichst zu unterbinden. In Abständen von sechs

Wochen wurde auf frische Platten überimpft. Dazu wurden die Zellen einer Einzelkolonie entnommen und als Verdünnungsausstrich auf eine neue Platte ausgebracht. Bei der Vereinzelung von Zellen verwendeten wir die so genannte Dreizehn-Strich-Methode, indem wir eine Verdünnungsreihe direkt auf der Agarplatte anlegten (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Vereinzelung von Zellen auf einer Agarplatte durch Ausstreichen mit der Drei-zehn-Strich-Methode (aus Cypionka, Grundlagen der Mikrobiologie, 1999).

Dabei überstrichen wir die Impfstriche mit zwischenzeitlich ausgeglühter und abgekühlter Impföse aus Platindraht. Das Wachstum wurde nach 72 Stunden bei 30 °C beendet und die Kulturen wurden anschließend bei 4 °C kühl gelagert.

### 2.2.3.2 Messung der Zelldichte

Das Zellwachstum wurde durch Messung der Trübung mit zwei unterschiedlichen Verfahren verfolgt:

- A) Die Messung der Absorption (OD) mit Hilfe eines UV-VIS Spektrometers bei einer Wellenlänge von 436 nm in 1 cm-Küvetten. Die Proben wurden entsprechend verdünnt, um einen Messbereich von 0,1-0,6 zu erhalten, in dem die optische Dichte linear von der Zelldichte abhängt. Nach Umrechnung auf die unverdünnte Suspension wurde noch der zu Beginn für die unbeimpfte Nährlösung gemessene Blindwert abgezogen.

- B) Die Bestimmung der OD durch Messung in einem Klett-Summerson „Photoelectric Colorimeter“ mit Filter No. 42 (blau). Da man den Kulturkolben mit angesetzter Küvette direkt in das Photometer setzen kann, entfällt die sterile Probenentnahme. Die Kalibrierung der Werte zur Umrechnung der Klett (KS)- in OD-Werte und eine anschließende gemittelte Regressionsrechnung ergab einen Fehler von  $\pm 20\%$  (Dissertation Dirk Fenske, 2004):

$$OD_{436} = 1,5 \cdot 10^4 \cdot KS^{1,86} \quad (2.1)$$

### 2.2.3.3 Vorkulturen

Die Vorkulturen zur Anreicherung der Speicherproteine (MoSto) enthielten im 100 ml Erlenmeyerkolben folgende Zusammensetzung:

- 10 mL Minerallösung
- 1 mL Ammoniumacetat (2M)
- 1 mL Natriummolybdat (10 mM)
- 1 mL Phosphatpuffer
- 50 mL 4 % ige Saccharoselösung

Die Saccharoselösung, die Minerallösung und der Phosphatpuffer wurden wie bereits erwähnt (siehe Abschnitt 2.1.2.1) separat voneinander autoklaviert. Vorkulturen, die im Hinblick auf Isolierung des Wolframspeicherproteins (WSto) und die in-vitro Untersuchung der Mo-Regulation angesetzt wurden, enthielten kein Molybdat oder Wolframat.

Weitere Parameter waren zu beachten:

- Schüttelfrequenz            150 Upm für 100 ml Kolben
- Temperatur                    30°C
- Wachstumszeit                24 h

Für die Versuche zum Regulationsverhalten des MoSto wurden acht weitere Kulturen angezogen. Für 100 mL-Erlenmeyerkolben wurden unterschiedlichen Mo-Konzentrationen im  $\mu\text{M}$ -Bereich (0; 0,005; 0,007; 0,01; 0,2; 0,04; 0,07; 0,6) verwendet und

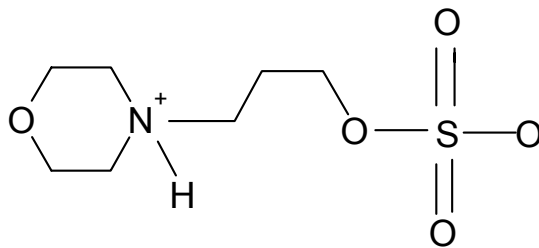
mit 2 ml der Mo-verarmten zweiten Vorkultur angeimpft. Die übrige Zusammensetzung der Nährlösung und die Bedingungen entsprachen denen der Vorkulturen.

#### 2.2.3.4 Hauptanzucht für Speicherprotein-Anreicherungen

Es wurden in 2L-Erlenmeyer-Schikanenkolben 600 mL Nährlösung mit 12 mL der entsprechenden Vorkultur (siehe 2.3.1.2) beimpft. Es wurde nur die Schüttelfrequenz (115 Upm) erniedrigt.

Zur Gewinnung von Selenomethionin enthaltendem MoSto/WSto wurde dem Zell-extrakt in der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{436} = 6$ ) 50 mg/L enantiomeren-reines L-Selenomethionin zugegeben (Doublet, 1997).

Als Standardpuffer verwendete ich bei den Proteinreinigungen (siehe Abschnitt 2.3) ausschließlich MOPS als Standardpuffer bei einem pH von 6,5.



**Abb. 2.2:** Darstellung von N-Morpholino-propan-3-sulfonsäure (MOPS).

MOPS (N-Morpholino-propan-3-sulfonsäure) ist eine speziell für die Biochemie entwickelte Good'schen Puffersubstanz, bei der störende Wechselwirkungen mit den zu untersuchenden Substanzen weitgehend ausgeschlossen sind (Pingoud, 1997). Der Pufferbereich von MOPS ( $pK_s = 7,2$ ) reicht im Extrembereich von pH 6,2 bis 8,5.

#### 2.2.4 Zellernte

Die Zellernte wurde unter aeroben Bedingungen in folgenden Schritten durchgeführt:

1. die bis zum Ende der log-Phase gewachsenen Kulturen ( $OD_{436} \approx 15$ ) wurden in 500 mL-Zentrifugenbecher überführt und bei 4°C, 9000 Upm 30 Minuten zentrifugiert.
2. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 50 mM MOPS Puffer mit 50 mM NaCl pH 6,5 resuspendiert und unter denselben Bedingungen wie beim 1.

Schritt zentrifugiert. Nach dem Abdekantieren und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet bei -20°C eingefroren.

Die unterschiedlich gewachsenen Kulturen des Regulationsversuchs ( $OD_{436} \sim 6-8$ ) wurden in 250 mL-Zentrifugenbecher überführt und mit der Ultrazentrifuge (Ultra Pro 80 Sorvall®) bei 8000 Upm zentrifugiert. Die Resuspension der Pellets wurde mit 50 mM Tris/HCl Puffer bei pH 8 durchgeführt. Alle anderen Bedingungen und Präparationsschritte waren identisch mit den obigen beiden Schritten.

### 2.2.5 Zellaufschluss

#### 2.2.5.1 Enzymatischer Zellaufschluss

Um kleine Extraktmengen möglichst schonend und ohne Beimengungen unlöslicher Zellbestandteile herzustellen, wurde vor allem für die Regulationsversuche der Zellaufschluss mit Lysozym verwendet.

Die Bestandteile des „Aufschlusscocktails“ machen einerseits durch EDTA und das Polypeptidantibiotikum Polymyxin B die Mureinschicht für das Lysozym zugänglich. Andererseits trägt die Verwendung des Proteaseinhibitors PMSF (Schutz vor proteolytischen Abbau), als auch der Zusatz von Superoxiddismutase (Schutz vor Sauerstoff) zur Gewinnung intakter Proteine bei (Gollan et al., 1993).

Der „Aufschlußpuffer“ setzt sich folgendermaßen zusammen:

Tris/HCl; pH 8,0	50 mM
EDTA	50 µM
PMSF	1 mM
Lysozym (Hühnerei)	2 mg/ml
DNase I (Rinderpankreas)	0,2 mg/mL
Polymyxin B-Sulfat	0,4 mg/mL
Superoxiddismutase (Rindererythrocyten)	0,2 mg/mL

Die Zellpellets wurden in 1000 µl Aufschlußpuffer aufgenommen und unter Rühren 45 Minuten bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Um Membranpartikel und Zelltrümmer

zu entfernen, zentrifugierte ich den Rohextrakt bei 4°C und 35000 Upm 30 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und als Rohextrakt weiterverarbeitet.

### **2.2.5.2 Der saure Aufschluss**

Der saure Aufschluss ist im Vergleich zum Lysozymbaufschluss eine schnellere und unkompliziertere Methode um kleine Zellextraktmengen zu behandeln. Die Methode nimmt jedoch die Inaktivierung bzw. Denaturierung von Proteinen in Kauf und ist daher nicht für die Untersuchung und Charakterisierung von Proteinen geeignet, sie ist jedoch ausreichend, um Metallgehalte von Zellenextrakten zu bestimmen

Bei diesem Verfahren werden je 1ml Zellen mit 150 µL 40%igem NaOH versetzt und 30 min gekocht. Nach dieser Behandlung sind die Zellen komplett lysiert und alle Proteine sind nach dieser Prozedur vollständig denaturiert. Die Eppis werden zum Abkühlen in ein Eisbad gestellt und anschließend mit 30%iger Salzsäure neutralisiert oder leicht angesäuert, da die anschließende Mo-Analyse (siehe Abschnitt 2.3.1) im sauren Bereich gemessen wird [Dissertation Stefan Siemann, 2000; Siemann et al., 2003).

### **2.2.5.3 Zellaufschluss mittels Frenchpresse**

Alternativ zum enzymatischen und sauren Aufschluss ist dieses Verfahren für größere und unempfindlichere Zellextrakte geeignet. Bei diesem Verfahren werden die Zellen unter Hochdruck (über 100 MPa) gesetzt. Anschließend strömt die Zellsuspension durch eine enge Düse. Die Scherkräfte, sowie der plötzliche Druckabfall zerreißen die Bakterienzellen.

Die zum Aufschluss notwendigen Substanzen verhindern einerseits das Verkleben freigesetzter Bakterien-DNA durch die Zugabe von DNase I (eine Spatelspitze). Andererseits werden durch die Zugabe von 0,1 M ethanolischen Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF-) Lösung proteolytisch wirkende Enzyme inaktiviert. Zur Abtrennung von Zell- und Membranbruchstücken vom Rohextrakt wurde der dunkelbraune Rohextrakt in 25 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt und anschließend bei 30000 Upm und 4°C 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und für den weiteren Einsatz der Standard-Anreicherungsprozedur eingesetzt.

## **2.3 Reinigungsmethoden des Speicherproteins**

### **2.3.1 DEAE-Anionenaustauscherchromatographie**

Beim ersten wichtigen Anreicherungsschritt zur Gewinnung des Mo/W-Speicherproteins wurde der Rohextrakt durch French<sup>®</sup>-pressing aufgeschlossen (siehe Abschnitt 2.2.5.3) und mittels einer Schlauchpumpe über einen Flow-Adapter auf die Geloberfläche aufgetragen. Durch einen Kühlmantel wurde das DEAE-Sephacel-Säulenmaterial (Säulenmaße:  $\varnothing$  26 • 160 mm) auf eine Temperatur von  $\sim 15^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Die Durchflussgeschwindigkeit beim Äquilibrieren mit dem Standardpuffer betrug 1-1,5 mL/min und bei der Elution 2 mL/min. Nach dem Auftragen wurde zuerst mit 50 mL einer 50 mM NaCl Lösung des Standardpuffers die Säule gespült, um feine Partikel und nicht gebundene Proteine auszuwaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit Hilfe eines kontinuierlichen NaCl- Gradienten (50-250 mM NaCl im Standardpuffer). Mit einem Fraktionssammler wurden die einzelnen Fraktionen (8mL) in Röhrchen aufgefangen. Analytische Untersuchungen des Elutionsprofils zeigten, dass die MoSto-/WSto-Hauptfraktion unmittelbar hinter einem lachsfarbenen, chromophoren Protein eluierte. Das lachsfarbene Protein diente im Verlauf unserer Anreicherung als Orientierungsprotein (Marker).

### **2.3.2 Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie**

Um die Natur der Proteinzusammensetzung genauer zu untersuchen und die Reinheit des Proteins zu erhöhen, testeten wir mit Hilfe der hydrophoben Wechselwirkungschromatographie die Anwesenheit von lipophilen Aminosäurebereichen (LA) auf der Proteinoberfläche. Die LA-Bereiche neigen im Allgemeinen zu intermolekularen Aggregaten oder intramolekularen Wechselwirkungen in der wässrigen Umgebung.

Das Prinzip der hydrophoben Wechselwirkung beruht auf dem entropischen Effekt bei der Strukturänderung des Wassers, welche die untereinander wechselwirkenden hydrophoben Gruppen der Proteine als Hydrathülle umgibt. In diesen Bereichen zwischen den hydrophoben Komponenten hat das Wasser eine höhere Ordnung als in ausschließlich wässriger Umgebung. Dieser Effekt kann durch die Zugabe von Salzen, die nach Pearson aus weichen Kationen und Anionen aufgebaut sind, verringert werden. Dabei entzieht das Salz den hydrophoben Gruppen das Wasser, so dass die lokale Löslichkeit der hydrophoben Gruppen stark vermindert wird.

Dieser „Aussalzeffekt“ verringert die abschirmende Wirkung des Wassers im Bereich zwischen dem hydrophoben Liganden und löslichem Protein und erhöht die van der Waals-Anziehungskräfte zwischen Liganden, die an der polymeren Säulenmatrix als stationäre Phase gebunden sind, und den hydrophoben Stellen der Protein-oberfläche (Von der Haar, 1976; Melander, 1977).

Ich beschränkte mich bei den Reinigungsversuchen auf die Änderung der Salzkonzentration und verwendete für unsere Versuche das Natrium- und Ammoniumsulfat. Diese beiden Salze besitzen im Gegensatz zu den anderen Salzen der Hofmeister-Serie einen hohen Aussalzeffekt ohne dabei jedoch das Protein irreversibel zu schädigen. Ich verwendete Octylsepharose als Säulenmaterial (Säulenmaße:  $\varnothing$  26 • 100 mm). Glycerin diente zur Stabilisierung des Proteinmaterials.

### **2.3.3 Metallionen-Affinitätschromatographie**

Als weitere Methode zur Reinigung des Molybdänspeicherproteins (MoSto) wurde die Metallionen-Affinitätschromatographie angewandt. Es sollte neben Molybdän und Wolfram die Möglichkeit der Affinität weiterer Übergangsmetalle an die eingesetzte Gelmatrix getestet werden.

Bei dieser Methode wurden zuerst Übergangsmetalle (Ni, Co, Zn, Cu) mit dem Säulenmaterial (NTA-Agarose) beladen. Generell binden Proteine, die eine Affinität zu diesen Metallen besitzen, direkt an die Säule und werden anschließend durch die Änderung der Bedingungen eluiert. Da nur wenige natürlich vorkommende Proteine eine Affinität zu Metallen ausbilden, wird diese Technik meistens zur Reinigung rekombinanter Proteine mit einem His-tag angewendet. Ein His-tag besteht aus mindestens sechs Histidresten, die sich am C- oder N-terminus des Proteins befinden. Die Gesamtzahl der Histidinreste kann allerdings variieren.

Die Erhöhung der Bindungsaffinität zwischen der chelatisierten Metall- Polymermatrix und der Proteinoberfläche kann erzeugt werden durch:

- Bindungspuffer mit neutralem oder leicht alkalischem pH.
- Eine hohe Salzkonzentration, die eine hohe Ionenstärke und Ionenaustausch- effekte verhindern.

- Einen Elutionspuffer (Imidazol, Ammoniumchlorid), der eine gute Affinität zum chelatisierten Metall besitzt.

Zur Entwicklung eines Aufreinigungsprotokolls, variierte ich die Metallionen, sowie den Bindungs- und Elutionspuffer. Zusätzlich benutzte ich einen kontinuierlichen Gradienten für den Elutionspuffer.

### 2.3.4 Ammoniumsulfat-Fraktionierung

Das älteste Verfahren zum schonenden Konzentrieren und Vorreinigen eines Proteins beinhaltet das Aussalzen, dessen Zusammenhänge schon im vorletzten Abschnitt (2.3.2) erläutert wurden.

Die Fraktionen der durch die DEAE-Chromatographie vorgereinigten MoSto und WSto-Proteine wurden in einem 250 mL-Messzylinder vereinigt und mit Hilfe eines Eisbads auf 0°C gekühlt. Die erforderliche Ammoniumsulfatmenge wurde durch die Formel von Warburg bestimmt:

$$m = \frac{1,77 \cdot V \cdot (S - s)}{3,54 - S} \quad (2.2)$$

m: Masse an zugegebenem Ammoniumsulfat

V: Volumen der Proteinlösung

S: Endsättigungsgrad in %

s: Ausgangssättigungsgrad in %

Das fein gemörserte Ammoniumsulfat wurde unter ständigem Rühren im Eisbad in kleinen Portionen (jeweils 3-4 Spatelspitzen) zugegeben, um eine vollständige Lösung des Salzes im Rohextrakt zu erreichen. Nach Beendigung der Zugabe wurde 15 Minuten weiter gerührt und anschließend der entstandene Niederschlag mit der Ultrazentrifuge bei 28000 Upm und 0°C 30 Minuten zentrifugiert. Eine möglichst vollständige Präzipitation des gewünschten Speicherproteins wurde durch einen Ausgangssättigungsgrad von 38 % erzielt, während der Endsättigungsgrad 51% betrug. Der Niederschlag der zweiten Fällung wurde in einem kleinen Volumen (2mL)

mit Standardpuffer aufgenommen und für den nächsten Anreicherungsschritt weiter verarbeitet.

### 2.3.5 Gelfiltration

Diese Größenausschlußchromatographie trennt die Proteine nach Ihrer Größe. Das Trennprinzip führt im Vergleich zur DEAE-Chromatographie zu einem inversen Elutionsprofil, indem die großen Proteine vor den kleinen Molekülen eluiert werden. Das aus quervernetztem Dextran (Sephadex) oder aus Dextransketten mit einer quervernetzten Agarosematrix (Superdex) bestehende dreidimensionale Netzwerk sorgt dafür, dass kleine Moleküle oder Proteine zunächst in den Poren der Gelmatrix festgehalten werden. Dabei ist zu beachten, dass die Porengröße den zu trennenden Komponenten entspricht. Je nach Anwendung Gele wurde eine unterschiedliche Porengröße verwendet. Die Ausschlussgröße der G25-Säule von 5000 kDa war für Umpufferungs- und Mechanismusuntersuchungen geeignet, während sich die G200- (300 kDa) und S200-Säule (600 kDa) für die Endreinigung des nativen MoSto und WSto als wichtig erwies. Die folgende Tabelle fasst noch einmal die wichtigsten Parameter zusammen:

Säulenmaterial	Säulenmaße [mm]	Elutionsgeschwindigkeit [mL/min]	Temperatur [°C]	Fraktionsmenge [mL]
Sephadex G-200	Ø 26 • 800	0,25 – 0,3	4	4 - 5
Superdex S- 200	Ø 26 • 800	2,5 – 3	4	4
Sephadex G-25	Ø 16 • 60	1	4	1 – 1,1

Zur Bestimmung des Ausschlußvolumens der G200- und der S200- Säule lief Dextranblau als Referenz vor der Proteinbande. Nach dem Auftragen der Proteinlösung (3-4 mL) wurden 90 % des Ausschlußvolumens im Messzylinder gesammelt und die folgenden Proben im Fraktionssammler aufgefangen. Auf die Probenpräparation der G-25- Säule für die zahlreichen Versuche zum Freisetzungs- und Rekonstitutionsmechanismus der beiden Speicherproteine werde ich im nächsten Abschnitt (siehe Abschnitt 2.3.5.1) genauer eingehen. Die Kalibrierung der G-25-Säule erfolgte durch die Zugabe eines Gemischs aus Dextranblau (90µL) und 10 µL Natriummolybdat bzw. Natriumwolframat (10 mM).

Die Reinheit der Proben und weitere Untersuchungen wurden mit Hilfe analytischer Verfahren, die im Abschnitt 2.4 beschrieben werden, bestimmt.

### **2.3.5.1 Probenpräparation der Freisetzungs- und Einbauversuche**

MoSto wurde sowohl aus „NH<sub>4</sub>-Zellen“, als auch aus „N<sub>2</sub>-Zellen“ isoliert und angereichert. Die durch die Reinigungsverfahren sehr sauberen MoSto/WSto-Präparate waren ebenfalls ein wichtiger Bestandteil dieser Untersuchungen.

Zur Einstellung der Temperatur wurde die Probe (1 mL) in einen Thermostaten überführt. Die pH-Werte der Lösungen wurden durch Zugabe von 10 µL 2% (w/v) NaOH (Freisetzungspuffer) im alkalischen und durch Zugabe von 30 µL 1 M MOPS (Einbaupuffer) im sauren Bereich direkt im Eppi eingestellt.

Zur intensiven Untersuchung der beiden Mechanismen wurden die folgenden Parameter variiert:

- Temperatur (12-30°C)
- Inkubationszeit (5-120 Minuten)
- pH-Wert (6,5-8,2)
- Proteinkonzentration (0,25-4 mg/mL)
- ATP-Konzentration (0,5-2 mM)
- Andere Nukleotide: AMP (1 mM), ADP(1-5 mM), GTP (1-5 mM)

Alle Proben wurden in Eppendorfgläsern angesetzt. Konzentrationen der Proteinlösungen nach dem G-25-Säulenlauf wurden ausschließlich mit einer Amicon B15- Stehkammer (siehe Abschnitt 2.2.6.) durchgeführt.

### **2.3.6 Konzentrierung der gereinigten Proteinproben**

Die gesammelten Proben wurden je nach Reinheit zuerst durch Ultrafiltration mittels einer Rührzelle (siehe Abbildung 2.4) bis auf ein Volumen von 5 mL und anschließend mit einer Amicon B15 Stehkammer auf 0,4 mL aufkonzentriert.

Zusätzlich benutzte ich Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 20, Sartorius®) mit einem Fassungsvermögen von 5 und 10 mL und einer Ausschlussgröße von 100 kDa zur Konzentrierung der beiden Speicherproteine bis auf eine Konzentration von 30 mg/mL.

## 2.4 Analytische Verfahren

### 2.4.1 Katalytische Molybdän- und Wolfram- Bestimmung

Bei dieser zeitabhängigen colorimetrischen Methode benötigt man Dithioamid (Dithiooxalsäurediamid, Rubeanwasserstoffsäure) als Reagenz, welches in saurer Lösung und Anwesenheit von Wasserstoffperoxid ein intensiv gelbes Oxidationsprodukt bisher noch unbekannter Struktur bildet. Die Reaktion wird durch Metallionen, die den Oxo-Komplex bilden, katalysiert. Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich bei niedriger Wasserstoffperoxid- und Säurekonzentration sehr kleine Metallstoffmengen (wenige nmol) bestimmen. Da unter diesen Bedingungen die Geschwindigkeit zeitlich konstant ist (Geschwindigkeitsgesetz nullter Ordnung) hängt die Geschwindigkeit nur von der Dithioamidkonzentration ab (Pantaler, 1963).

Die benötigten Chemikalien sind:

- Salzsäure p.a., 250 mM
- Dithioamid.Lösung, 10 mM in Ethanol p.a.
- Frisch angesetztes  $H_2O_2$ , 50 mM (0,5 mL  $H_2O_2$  30%ig in 100 mL).
- Molybdän- bzw. Wolframatlösungen (1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M).

Die Probenvorbereitung erfolgte nach folgendem Schema:

- I. Die Proben (50-100  $\mu$ L) wurden mit bidestilliertem Wasser auf 800  $\mu$ L verdünnt und in einem dicht schließenden Gefäß für 15 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt.
- II. Alle verwendeten Lösungen und Geräte wurden auf Raumtemperatur vortemperiert.
- III. Die denaturierten Proben wurden anschließend mit einer Tischzentrifuge (Biofuge A) bei 13000 Upm und 15 Minuten zentrifugiert und in eine 3 mL Küvette überführt und mit bidest. Wasser auf 1,3 mL aufgefüllt. Anschließend erfolgte die weitere Zugabe von 1 mL 250 mM HCl und 100  $\mu$ L Dithioamid.
- IV. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ L 50 mM  $H_2O_2$ - Lösung gestartet und durch Kippen der Küvette durchmischt. Daraufhin wurde die Küvette in einen mit 25 °C vortemperierten Halter im Photometer gestellt und die Änderung der Absorption bei 400 nm in einem Zeitintervall von 3 Minuten gemessen.

- V. Die Steigung aus den Größen Absorption und Zeit ergaben den eigentlichen Messwert.
- VI. Zur Bestimmung der Molybdat/Wolframat-Stoffmengen aus den Messwerten der Steigung erstellten wir eine Eichgerade, die eine Messreihe von 6 Messungen im Stoffmengenbereich von 0,03 - 5 nmol  $\text{MoO}_4^{2-}$  oder  $\text{WO}_4^{2-}$  umfasste.

Unterschiede zwischen Molybdat- und Wolframat-Messungen waren nur durch die höhere Wolframaktivität zu erkennen.

### 2.4.2 Proteinbestimmung

Wir benutzten drei verschiedene Verfahren, von denen die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm nur qualitative Aussagen zuließ, während die beiden anderen sehr empfindliche Verfahren sind. Die Bestimmung von Proteinen mit Hilfe des BCA-assay ist schon ab einer Konzentration 0,5 mg/mL möglich.

#### 2.4.2.1 Bestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA-assay)

Folgende Chemikalien wurden benötigt:

- Kupfersulfat Pentahydrat 4%(w/v)
- Bicinchoninsäure
- 1g/L Rinderserumalbumin als Protein-Standardlösung.

Die BCA- Lösung hat folgende Zusammensetzung:

- 10 g/L  $\text{Na}_2$ -Bicinchoninat
- 20 g/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 9,5 g/L  $\text{NaHCO}_3$
- 4 g/L NaOH
- 1,6 g/L  $\text{Na}_2$ -Tartrat

Hier wurde mit der Probenpräparation folgendermaßen verfahren:

- I. Eine Probe von 50  $\mu\text{L}$ , die zwischen 2 und 30  $\mu\text{g}$  Protein enthielt, wurde in ein Eppendorfgefäß gegeben.

- II. Störende reduzierende Substanzen (Dithionit, Zucker, EDTA, Ammoniumsalze) wurden durch Proteinfällung entfernt, indem man die Probe mit Wasser auf 200  $\mu\text{L}$  auffüllte und mit 50  $\mu\text{L}$  3 M Trichloressigsäure versetzte. Die Probe wurde danach auf dem Vortex durchmischt und bei 13000 Upm 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Spritze abgehoben und das Pellet weiterverarbeitet.
- III. 20  $\mu\text{L}$  einer Kupfersulfatlösung und 1mL der BCA-Lösung wurden zum Pellet zugegeben, der Ansatz auf einem Schüttler durchmischt und im Wasserbad bei 50°C 30 Minuten inkuiert.
- IV. Nach Abkühlung wurde die Absorption bei 562 nm gegen einen Reagenzleerwert gemessen.

Zur Bestimmung der Eichgerade wurden parallel zu jeder Messreihe sechs mit der Rinderserumalbumin- Lösung hergestellten Standards im Bereich von 2 bis 30  $\mu\text{g}$  Protein auf gleiche Art wie die Proben behandelt und vermessen.

### 2.4.2.2 Bestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehalts von verdünnten Proteinlösungen, wie sie z. B. nach der Eluierung von Chromatographiesäulen anfallen, wurde die von Bradford beschriebene Methode angewendet (Bradford, 1976). Dazu wurden 100  $\mu\text{l}$  Proteinlösung benötigt, deren Proteingehalt nicht höher als 1 g/l war. Diese wurde mit 5 ml Farbreagenz folgender Zusammensetzung versetzt:

Coomassie Brilliant Blue G250	0,01% (w/v)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 %)	10 % (v/v)
Ethanol (96 %)	5 % (v/v)

Anschließend erfolgte das Durchmischen der Lösung und das Inkubieren im Dunkeln für 10 min bei Raumtemperatur. Die Extinktion der Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen Wasser bestimmt. Zur Ermittlung des Proteingehalts aus der Extinktion wurde eine Kalibrierkurve mit Rinderserumalbumin als Proteinstandard (0,1 - 1 g/l) erstellt.

### **2.4.2.3 Messung der Absorption bei $\lambda_{280\text{ nm}}$**

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem UV/VIS-Spektralphotometer (Lambda 2, Bodenseewerk Perkin Elmer, Düsseldorf).

Durch die UV-Absorption lassen sich die aromatischen Seitenketten von Tyrosin und Tryptophan erfassen. Die Absorptionskoeffizienten verschiedener Proteine sind entsprechend ihrem Gehalt an diesen Aminosäuren sehr verschieden. Messungen bei 280 nm wurden daher nur zur qualitativen Bestimmung von Proteinpeaks in Säulen-Eluaten verwendet und nach der Bestimmung des Absorptionskoeffizienten von MoSto/WSto auch zur Abschätzung der absoluten Konzentration in vollständig aufgereinigten Proben. Ganz versagte die Methode bei der Messung in Anwesenheit von ATP, da das Nukleotid durch seine Eigenabsorption in diesem Bereich die Proteinpeaks überlagert.

### **2.4.3 Analytische SDS- und native Polyacrylamidgelelektrophorese**

Polyacrylamidgelelektrophoresen zur Reinheitskontrolle und zur Molekulargewichtsbestimmung wurden unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) durchgeführt. Zur Untersuchung des nativen Proteins in den einzelnen Reinigungsschritten wurde parallel zur SDS-PAGE eine native Gelelektrophorese durchgeführt. Für die als vertikale Plattenelektrophorese durchgeführten Polyacrylamidgelelektrophoresen wurde eine Mini-Gelkammer (Biometra, Göttingen) mit den Abmessungen 105 x 85 x 1 mm verwendet. Die Gelelektrophoresen wurden entweder als Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (modifiziert nach Laemmli, 1970) oder als Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt (Schägger & Jagow, 1987).

#### **2.4.3.1 Proteinmarker zur Molekulargewichtsbestimmung**

Für die Molekulargewichtsbestimmung der Proteine wurde eine Markerlösung mit folgenden Referenzproteinen verwendet:

Eichproteine	Molekulargewicht (kDa)	eingesetzte Menge (mg)
Rinderserumalbumin	66,0	1,5
Ovalbumin	45,0	1,5
Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase	36,0	1,5
Carboanhydrase	29,0	1,0
Sojabohnentrypsininhibitor	20,1	2,0
$\alpha$ -Lactalbumin	14,2	1,0

Die Markerproteine wurden in 700  $\mu$ l Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,8) gelöst und mit jeweils 100  $\mu$ l SDS (350 mM) und Dithiothreitol (200 mM) versetzt. Die Lösung wurde für 5 min auf 100 °C erhitzt und mit 100  $\mu$ l Bromphenolblaulösung (0,75 mM) sowie ca. 20 % (w/v) Saccharose versetzt. Der Proteinmarker wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei - 20 °C gelagert.

### 2.4.3.2 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der SDS-Proteinproben wurden 100  $\mu$ l Proteinlösung mit Dithiothreitol (Endkonz.: 20 mM) und SDS (Endkonz.: 35 mM) versetzt und für 10 min im Wasserbad bei 100 °C denaturiert. Vor dem Auftragen beschwerte ich die Proben mit Saccharose (ca. 20 % (w/v)) und versetzte sie mit 10  $\mu$ l einer Bromphenolblaulösung (0,75 mM). Die nativen Proben versetzte ich nur mit Saccharose und der Bromphenollösung ohne Erwärmung und vortexte sie vor dem Auftragen auf das Gel kräftig.

### 2.4.3.3 Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde modifiziert nach der Methode von Laemmli durchgeführt. Um eine möglichst scharfe Bandierung der Proteine zu erzielen, überschichtete ich das Trenngel (Acrylamidkonzentration 12,5 % (w/v)) mit einem Sammelgel (Acrylamidkonzentration 4,8 % (w/v)). Die für die Elektrophorese verwendeten Gele setzten sich wie folgt zusammen:

### Trenngel

Acrylamid	12,5% (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,33 % (w/v)
Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
SDS	3,5 mM
TEMED	0,2 % (v/v)
Ammoniumperoxodisulfat	0,9 mM

### Sammelgel

Acrylamid	4,8 % (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,13 % (w/v)
Tris/HCl, pH 6,8	60 mM
SDS	3,5 mM
TEMED	0,4 % (v/v)
Ammoniumperoxodisulfat	1,9 mM

Die Polymerisation des Trenngels wurde durch den Zusatz von Ammoniumperoxodisulfat gestartet. Das noch flüssige Gel wurde bis ca. 2 cm unter den oberen Rand der Gelkammer gegossen und mit 200 µl Wasser überschichtet, um ein Austrocknen des oberen Trenngelrandes während der Polymerisation zu vermeiden. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels entfernte ich das Wasser und goss anschließend das Sammelgel über das Trenngel. Die Polymerisation des Sammelgels wurde ebenfalls durch den Zusatz von Ammoniumperoxodisulfat initiiert. In das noch flüssige Sammelgel setzte ich einen Teflonkamm, der für die Ausbildung von zehn voneinander getrennten Geltaschen sorgte, ein.

Nach der vollständigen Polymerisation des Sammelgels wurde die Elektrophoresekammer zusammengebaut und mit Elektrophorese-Puffer folgender Zusammensetzung befüllt:

Tris	100 mM
Glycin	100 mM
SDS	3,5 mM

Anschließend trug ich die vorbereiteten Proteinproben (max. 10 µl pro Geltasche) auf das Gel auf und startete die als vertikale Plattenelektrophorese durchgeführte Elektrophorese. Zu Beginn wurden die Proteine im Sammelgel bei einer Stromstärke von 10 mA konzentriert, bis sie die Grenze zum Trenngel erreichten. Zur eigentlichen Trennung der Proteine im Trenngel erhöhte ich die Stromstärke auf 20 mA. Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde beendet nachdem die Bromphenolblau-Frontbande das Trenngel gerade verlassen hatte (Dauer ca. 45 min).

#### **2.4.3.4 Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mithilfe von Tricin anstatt Glycin als Folge-Ion beschrieb erstmals Schägger. Der Einsatz von Tricin bei der Elektrophorese gewährleistet im Allgemeinen eine bessere Auflösung bei der Trennung kleinerer Proteine (1 - 100 kDa). Mithilfe dieser Methode können vor allem Proteine im Bereich von 5 - 20 kDa besonders effektiv aufgetrennt werden.

In dieser Arbeit diente die Tris-Tricin-SDS-PAGE vor allem zur besseren Trennung der beiden Untereinheiten in Zusammenhang mit den Mo-Regulationsuntersuchungen.

Es wurde ein Trenngel (10 % (w/v) Acrylamid) mit überschichtetem Sammelgel (4 % (w/v) Acrylamid) eingesetzt. Die Polymerisation der Gele wurde ebenfalls mit Ammoniumperoxodisulfat gestartet, und die Gele wie oben beschrieben gegossen. Die verwendeten Gele setzten sich wie folgt zusammen:

### Trenngel

Acrylamid	10 % (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,27 % (w/v)
Tris/HCl, pH 8,45	1 M
Glycerin	13 % (w/v)
SDS	3,5 M
TEMED	0,1 % (w/v)
Ammoniumperoxodisulfat	2,2 M

### Sammelgel

Acrylamid	6,7 % (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,18 % (w/v)
Tris/HCl, pH 8,45	1 M
SDS	3,5 mM
TEMED	0,1 % (w/v)
Ammoniumperoxodisulfat	2,9 mM

Nach der vollständigen Polymerisation des Trenn- und Sammelgels wurde die Elektrophoresekammer zusammengesetzt und mit Elektrophoresepuffer befüllt. Im Unterschied zur Elektrophorese mit Glycin wurden bei der Elektrophorese mit Tricin Kathoden- und Anodenpuffer unterschiedlicher Zusammensetzung benutzt. Während als Anodenpuffer Tris/HCl-Puffer (200 mM, pH 8,9) eingesetzt wurde, setzte sich der Kathodenpuffer wie folgt zusammen:

Tris	100 mM
Tricin	100 mM
SDS	3,5 mM

Nach dem Auftragen der vorbereiteten Proteinproben (max. 10 µl pro Tasche) wurde die Elektrophorese gestartet. Die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel wurde bei einer Stromstärke von 10 mA durchgeführt. Zur anschließenden Trennung der Proteine im Trenngel wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Die Beendigung der elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte nachdem die Bromphenolblau-

Frontbande das Trenngel gerade verlassen hatte. Die gesamte Elektrophorese dauerte ca. drei Stunden und wurde bei Raumtemperatur ohne zusätzliche Kühlung durchgeführt.

#### 2.4.3.5 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Vorteil dieser Methode, die Proteine in ihrem nicht denaturierten Zustand auftrennt, beruht auf dem Nachweis intakter Proteine (u.U. mit Kofaktoren oder Metallionen). Zudem sind native Proteine für andere Detektions- und Identifikationsmöglichkeiten besser geeignet. Da sich die Proteine sowohl nach Größe als auch nach Netto-Ladung im elektrischen Feld bewegen können, sind nur begrenzte Aussagen über Ladung und Größe des betrachteten Proteins möglich (Görg & Westermeier, 1998).

Bei der Zusammensetzung des Gels ist darauf zu achten,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (15mg/15mL Gel) zuzusetzen. Dieses Reduktionsmittel fängt die im Gel oder in der Gellösung frei gelösten Sauerstoffradikale ab. Weitere unterstützende Wirkung zur Polymerisation zeigt die Bestrahlung des Gels mit UV- Licht.

Es wurden folgende Gelkomponenten für das System benötigt:

Acrylamid	6,7 % (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,18 % (w/v)
Tris/Glycin, pH 8,8	1 M
TEMED	0,1 % (v/v)
Ammoniumperoxodisulfat	2,2 mM

#### 2.4.3.6 Die Färbung der Proteinbanden

##### *Coomassie-Färbung*

Zur Anfärbung der aufgetrennten Proteinbanden behandelte ich die Gele nach der Elektrophorese 15 min mit einer Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung. Anschließend wurden sie so lange mit Entfärberlösung entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar angefärbt und der Gelhintergrund fast farblos war. Eine vollständige Entfärbung des

## Material und Methoden

---

Gelhintergrunds, bei gleichbleibender Schärfe der Proteinbanden, erzielte ich durch Inkubation der Gele für ca. 16 h in Essigsäure (7,5 % (v/v)) bei 4 °C. Zur begrenzten Aufbewahrung (ca. 1 - 2 Wochen) wurden die Gele bei 4 °C in Essigsäure (7,5 % (v/v)) gelagert.

Die Färbelösung sowie der Entfärber setzten sich wie folgt zusammen:

### Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R-250	2,4	mM
Ethanol	45,5	% (v/v)
Essigsäure	9,1	% (v/v)

### Entfärbelösung

Ethanol	45,5	% (v/v)
Essigsäure	9,1	% (v/v)

### Silberfärbung

Die Färbung der Proteingele erfolgte nach einer modifizierten Methode (Damerval, et al., 1987) und erforderte folgende Lösungen:

Farmers Reducer	Kaliumhexacyanoferrat-(III)	30 mM
	Natriumthiosulfat	32 mM
Entwickler	Natriumcarbonat-Lösung	23 mM
	Silbernitrat	1 % (w/w)
	Formaldehyd	0,1 % (w/v)
Fixierer	Essigsäure	7,5 % (v/v)

Nach der Proteintrennung wurde das Gel vorsichtig von der Trägerplatte abgelöst, für 15 Minuten in Entfärberlösung gelegt und anschließend für 2 Minuten mit Farmers Reducer inkubiert. Nach vollständiger Entfärbung durch mehrere Waschschriffe mit Wasser fixierte ich das Gel für 30 Minuten in Silbernitratlösung und behandelte das Gel anschließend für jeweils 30 Sekunden mit Wasser und Natriumcarbonat-Lösung.

Nach Überführen des Gels in die Entwicklerlösung wurde bei gewünschter Bandenintensität die Reaktion durch einen Waschschriff mit Essigsäuresäurelösung (10%) abgestoppt.

### 2.4.4 Immunologische Methoden

Zum immunologischen Nachweis von MoSto wurden polyklonale Kaninchenantikörper verwendet, die gegen das gereinigte Molybdän-Speicherprotein gebildet worden waren (anti-MoSto-IgG). Um die Immunisierung zu initiieren, wurde ein Teil des Speicherproteinkonzentrats (1,5 mg/mL) einem Kaninchen subkutan injiziert. Nach 21 Tagen erfolgte eine weitere Injektion mit der gleichen Proteinmenge. Die Injektionen sowie die Gewinnung der Antisera wurden von Herrn Dr. Radunz, Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld, durchgeführt. Zum qualitativen Nachweis von MoSto setzte ich den Ouchterlony-Doppelimmundiffusionstest ein. Dazu wurde das Protein mit Hilfe von 1 % SDS denaturiert, um anschließend eine homogene Immunpräzipitation mit nur einer Präzipitationsbande zu gewährleisten. Zur Entfernung des überschüssigen SDS, das zur Präparation der Proteinlösung eingesetzt wurde und bei der Immundiffusion stört, wurde eine Dialyse durchgeführt. Der Dialyseschlauch wurde zuerst in 10 mM EDTA-Lösung 10 Minuten gekocht und anschließend einseitig verschlossen. Die 3 mL Proteinlösung (1 mg/mL) wurden mit Hilfe einer Pipette langsam in den Schlauch gefüllt und in eine 1mM SDS/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Tris-Pufferlösung überführt, mit einer Wäscheklammer befestigt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

#### 2.4.4.1 Ouchterlony-Doppelimmundiffusionstest

Zur Detektierung von MoSto wurden Immundiffusionstests nach einer erstmals von Ouchterlony beschriebenen Methode (Ouchterlony, 1971), modifiziert nach Oakley, durchgeführt (Oakley, 1971). Als Gelgrundlage diente ein Veronal-Puffer (50 mM, pH 8,2) der folgenden Zusammensetzung:

5,5-Diethylbarbitursäure (Na-Salz)	21,6 mM
Natriumacetat	21,6 mM
NaN <sub>3</sub>	6,8 mM

### Gelherstellung

Der Puffer wurde in einem Erlenmeyerkolben mit 1 % (w/v) Agarose versetzt und bis zur Klärung erhitzt. Nach dem Zusatz von 3 % (w/v) Polyethylenglykol-6000 und vorsichtiger Durchmischung wurden jeweils 3 ml des Gelmaterials auf zuvor mit Ethanol gereinigte Objektträger (7,5 x 2,5 cm) pipettiert. Nach Verfestigung des Gels nach ca. 1 h wurden rosettenförmig angeordnete Löcher (Durchmesser: 3 mm) ausgestanzt und das Gelmaterial im Innern des Lochs mithilfe eines Wasserstrahlvakuums abgesaugt. Die gestanzten Gele konnten bis zu einer Woche in einer Feuchtkammer bei 4 °C gelagert werden.

### Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Proteinproben für die Ouchterlony-Immundiffusionstests wurden diese mit SDS (Endkonz.: 35 mM) und für 10 min im Wasserbad bei 100 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt und mit Triton X-100 (2 % (v/v)) versetzt.

### Durchführung der Immundiffusion

Nach dem Auftragen der vorbereiteten Proben und Antikörperlösungen in die ausgestanzten Löcher (max. 4 µl) wurden die Gele in einer Feuchtkammer bei 4 °C für 24 - 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Gele mit einer NaCl-Lösung (0,85 % (w/v)) für ca. 24 h bei Raumtemperatur behandelt, um nicht präzipitiertes Protein zu entfernen. Die Gele wurden zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Präzipitate für 10 min mit der Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung angefärbt, welche auch für die Entwicklung von SDS-Gelelektrophorese verwendet wurde (siehe Abschnitt 2.3.3.). Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte, wie bei der SDS-Gelelektrophorese, mit Entfärbelösung. Anschließend wurden die entwickelten Gele zur Lagerung auf Gel-Fix für Agarose (Serva, Heidelberg) fixiert.

#### **2.4.4.2 Analytischer Immunoblot (Western Blot)**

Zur eindeutigen Identifizierung von MoSto und möglicher Protein-Fragmente, die durch proteolytischen Abbau gebildet werden, wurden Western Immunoblots, modifiziert nach der von Towbin (Towbin et al., 1979) beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu wurden vor dem eigentlichen Blot die Proteine der zu untersuchenden Proben mittels SDS-Gelelektrophorese (Tris-Glycin- oder Tris-Tricin-Polyacrylamid-gelelektrophorese) getrennt. Als Proteinmarker zur Molekulargewichtsbestimmung

wurden 8 µl eines vorgefärbten SDS-PAGE-Standards folgender Zusammensetzung verwendet:

<b>Markerproteine</b>	<b>Kalibriertes Molekulargewicht [kDa]</b>
Phosphorylase B	102,0
Rinderserumalbumin	81,0
Ovalbumin	46,9
Carboanhydrase	32,7
Sojabohnentrypsininhibitor	30,2
Lysozym	24,0

Die Markerproteine sind mit Farbstoffmolekülen kovalent verknüpft, so dass die Proteinbanden bereits während der Elektrophorese und des Proteintransfers sichtbar sind. Durch die kovalente Anbindung des Farbstoffs verändert sich das apparente Molekulargewicht der Proteine in der in der Tabelle angegebenen Weise.

### Durchführung des Proteintransfers

Der Immunoblot wurde als Druckblot durchgeführt. Der Proteintransfer erfolgte auf Nitrocellulose-Membranen (Protran BA85, Schleicher & Schuell, Dassel) mit einer Porengröße von 0,45 µm. Diese Membranen wurden zusammen mit einem 3-mm-Blot-Filterpapier (Sigma, Deisenhofen) vor Beendigung der Gelelektrophorese in Trenngelgröße geschnitten und für ca. 10 min in frisch vorbereitetem Transferpuffer folgender Zusammensetzung getränkt:

Tris/HCl (pH 8,8)	10 mM
NaCl	2 mM
EDTA	2 mM
Dithiothreitol	0,1mM

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel dreimal für 10 min in Transferpuffer gewaschen und anschließend wie folgt weiterbehandelt:

Zwei bis drei Blätter des mit Transferpuffer getränkten Filterpapiers wurden auf eine ebene Glasplatte gelegt und ein Blatt Nitrocellulose auf das obere Filterpapier aufgeklebt. Direkt auf die Nitrocellulose-Membran wurde anschließend das Gel luftblasenfrei platziert und eine weitere Nitrocellulose-Membran (ebenfalls luftblasenfrei) auf das Gel gelegt. Danach wurden zwei bis drei Filterpapiere auf die oberste Nitrocellulose-Membran platziert und abschließend eine zweite Glasplatte aufgelegt. Das „Sandwich“ wurde in eine verschließbare Plastiktüte gegeben und mit einem Gewicht von ca. 2 kg beschwert. Der Proteintransfer erfolgte über einen Zeitraum von ca. 16 - 20 h bei Raumtemperatur.

### Immunologische Detektion der Proteine

Die Visualisierung des geblotteten Proteins erfolgte nach Inkubation mit anti-MoSto-IgG durch enzymatisch induzierte Farbreaktion mithilfe eines Peroxidase-konjugierten Antikörpers (Ziege-anti-Kaninchen-IgG).

#### a) Absättigung

Zur Absättigung der Nitrocellulose-Membran wurde die Membran nach erfolgtem Blot dreimal für 10 min in CMF-PBS-Puffer gewaschen und anschließend für 1 h in Absättigungspuffer (5 % (w/v) Magermilchpulver in CMF-PBS-Puffer) bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Nach der Absättigung wurde die Nitrocellulose zweimal für 10 min in Waschpuffer unter langsamem Schütteln inkubiert.

Zusammensetzung des CMF-PBS-Puffers (calcium-magnesium-free phosphate-buffered-saline):

NaCl	140	mM
KCl	3	mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	mM

Zusammensetzung des Waschpuffers (modifiziert nach De Blas und Cherwinski, 1983):

Magermilchpulver	0,5	% (w/v)
Tween 20	0,05	% (v/v)
in CMF-PBS-Puffer		

### b) Inkubation mit primärem Antikörper

Nach Entfernung des Waschpuffers wurde die Nitrocellulose-Membran mit dem gegen das zu detektierende Protein gerichteten Antikörper anti-MoSto-IgG inkubiert. Dazu setzte ich den Antikörper in geeigneter Verdünnung (1:500) in Inkubationspuffer (0,5 % (w/v) Magermilchpulver in CMF-PBS-Puffer) an. Die Nitrocellulose-Membran wurde in diesem Puffer für ca. 2 h bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Anschließend inkubierte ich die Membran dreimal für je 10 min in Waschpuffer.

### c) Inkubation mit sekundärem Antikörper und Visualisierung

Zur letztendlichen Detektion der an das Zielprotein gekoppelten primären Antikörper wurde die Nitrocellulose-Membran mit einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG (sekundärer Antikörper) behandelt, der an den primären Antikörper (Kaninchen-IgG) bindet. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper mithilfe einer durch die gekoppelte Peroxidase katalysierten Farbreaktion (Entwicklung) sichtbar gemacht.

Die Nitrocellulose-Membran wurde mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:1500 in Inkubationspuffer) für ca. 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss und langsamem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran, ebenfalls unter Lichtausschluss, dreimal in Waschpuffer, einmal in CMF-PBS-Puffer und abschließend einmal in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,35) für je 10 min gewaschen. Die Visualisierung der geblotteten Proteine erfolgte, modifiziert nach Hawkes (1982), mithilfe einer frisch bereiteten Entwickler-Lösung, bestehend aus 4-Chloro-1-naphthol (2,8 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,005 % (v/v)), Methanol (17 % (v/v)) in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,35) unter Lichtausschluss. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestartet. Die Entwicklung wurde solange durchgeführt, bis die erwünschten Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Nach 5 bis maximal 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von CMF-PBS-Puffer gestoppt. Die Nitrocellulose-Membran wurde anschließend kurz mit CMF-PBS-Puffer gewaschen und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Die entwickelten Membranen bewahrte ich im Dunkeln bei Raumtemperatur auf.

#### 2.4.5 Molmassenbestimmung durch Gelfiltration

Unter der Annahme, dass ein annähernd zu Kugelform gefaltetes Molekül vorliegt, lässt sich durch eine Gelfiltration die molekulare Masse der Proteine bestimmen. Allerdings muss die Gelfiltrationssäule durch einen Lauf mit Proteinen bekannter Masse kalibriert werden. Die Bestimmung wurde mit einer Superdex S 200-Säule durchgeführt. Folgende Markersubstanzen wurden als Gemisch auf die Säule aufgetragen:

Markersubstanz	Molmasse [kDa]	Menge	Analytische Bestimmung
Ferritin	443	5 mg 100 µL 5% (w/v)	Absorption bei 425 nm
β-Amylase	200	7,5 mg	spezifischer Aktivitätstest
Alkohol- Dehydrogenase (ADH)	150	7,5 mg	spezifischer Aktivitätstest
Rinderserumalbumin	66	20 mg	Absorption bei 280 nm
Carboanhydrase	29	7,5 mg	spezifischer Aktivitätstest
Cytochrom C	12	5 mg	Absorption bei 550 nm

---

Na <sub>2</sub> -Molybdat	pH-abhängig	150 µL 10 mM	colorimetrische Bestimmung (siehe Mo-Analyse)
Bromphenolblau	0,0067	200 µL 0,25 %(w/v)	Absorption bei 595 nm

---

Die nicht enzymatischen Proteine (RSA, Cyt-c) wurden am Tag vor dem Lauf in jeweils 200 µL 50 mM MOPS Puffer, pH=6,5 gelöst. Die Lösungen der Enzyme (Amylase, ADH, CA) wurden vor dem Lauf auf Aktivität geprüft. Dabei wurden die Amylase und ADH auf 1:1000 und die Carboanhydrase auf 1:500 verdünnt.

Unmittelbar vor dem Auftragen auf die Säule wurden die Komponenten mit Ausnahme des Molybdats, das ich 4 mL später auftrug, vereint. Nach einem Säulendurchlauf des Eluats von 110 mL wurden Fraktionen gesammelt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 2 mL/min und die Fraktionsmenge 6mL.

Da die ADH in verdünnter Lösung sehr schnell an Aktivität verliert, wurde der Aktivitätstest unmittelbar nach Auffangen der Fraktionen durchgeführt. Die beiden anderen Enzymaktivitäten ( $\beta$ -Amylase und Carboanhydrase), sowie die Molybdän-Analyse und die Absorptionen der Markersubstanzen wurden im Laufe der darauf folgenden Tage bestimmt.

### 2.4.5.1 Aktivitätstest für $\beta$ -Amylase

Ich benötigte folgende Reagentien:

#### A. Puffer-Stärke-Lösung:

131,2 mg Natriumacetatpuffer (16 mM), wasserfrei, wurden in 100 mL Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 4,8 eingestellt.

250 mg Stärke wurden in 25 mL des Acetatpuffers aufgeschlämmt, im Becherglas auf einer Heizplatte unter Rühren zum Sieden erhitzt und 15 Minuten gekocht. Nach Abkühlen wurde die eingeeengte Flüssigkeit wieder auf 25 mL aufgefüllt. Vor Gebrauch wurde der Stärke-Bodensatz aufgeschüttelt.

B. Farb-Reagenz:

Zur Herstellung von Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung wurden 12 g K-Na-Tartrat unter Erwärmen (nicht kochen) in 8 mL 2 M NaOH gelöst.

Für die 3,5-Dinitrosalicylsäure- Lösung benötigte ich 438 mg (96 mM) 3,5-DNSS, die unter Erwärmen (nicht kochen) in 20 mL Wasser gelöst wurden.

Unter Rühren wurde die Tartratlösung langsam zur 3,5-DNSS-Lösung zugegeben und anschließend mit Wasser auf 40 mL aufgefüllt.

C. Enzymlösung:

Die Probenlösung wurde mit Wasser auf ca. 1,5 µg Enzym/mL verdünnt. Die Fraktionen vom Molmassen-Marker-Gelfiltrationslaufs wurden auf 1:5 verdünnt.

In Reagenzgläser, die ich mit einem Stopfen verschloss, wurden folgende Lösungen gefüllt:

	<b>Test</b>	<b>Blindprobe</b>
A (Stärkelösung)	1 mL	1 mL
C (Enzymlösung)	1 mL	-

Die Lösungen wurden auf dem Vortex durchmischt, genau 3 Minuten unter Raumtemperatur inkubiert und daraufhin folgende Komponenten zugegeben:

	<b>Test</b>	<b>Blindprobe</b>
B (Farb-Reagenz)	1 mL	1 mL
Wasser	-	1 mL

Die im zweiten Schritt zur Blindprobe zugegebene Enzymlösung konnte durch Wasser ersetzt werden, da nur relative und nicht absolute Aktivitäten bestimmt wurden.

Die Proben wurden sofort in ein kochendes Wasserbad gestellt und darin 15 Minuten „entwickelt“, anschließend in einem Eisbad abgekühlt, mit jeweils 9 mL Wasser verdünnt und die Absorptionen bei 540 nm gegen die Blindprobe gemessen.

### 2.4.5.2 Alkoholdehydrogenase-Aktivitätstest

Folgende Reagentien werden hier benötigt:

- A. 50 mM Tris-HCl-Pufferlösung, pH 8,8
- B. Ethanol p.a.
- C. 15 mM NAD Lösung (frisch angesetzt)
- D. 10 mM Na-Phosphatpuffer zur Verdünnung der Enzymlösung (zusammengesetzt aus 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung und 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung bei pH 7,5). Anschließend wurde 0,1% (w/v) Rinderserumalbumin als Enzymstabilisator zugesetzt.
- E. Die Probenlösung wird mit dem Puffer D auf 3  $\mu\text{g}$  ADH/mL verdünnt. Die Fraktionen vom Molmassen-Marker-Lauf mussten auf 1:10 verdünnt werden.

Die 1 mL-Küvetten wurden mit folgenden Lösungen versetzt und mit einem Stopfen verschlossen:

Reagenz	Test	Blindprobe
A (Puffer)	433 $\mu\text{L}$	433 $\mu\text{L}$
B (EtOH)	33 $\mu\text{L}$	33 $\mu\text{L}$
C (NAD)	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
D (Verdünnungspuffer)	-	33 $\mu\text{L}$

Der Ansatz wurde durch Kippen vermischt und die Absorption der Testlösung bei 345 nm gegen die Blindprobe gemessen. Nach Einstellung eines konstanten Absorptionswertes wurden 33  $\mu\text{L}$  der passend verdünnten Enzymlösung zugegeben, die Zeitmessung gestartet, der Ansatz durch nochmaliges Kippen durchmischt und die Absorption für etwa 6 Minuten aufgezeichnet.

In der grafischen Auswertung wurde die Absorption gegen die Zeit aufgetragen, die Steigung entsprach dem eigentlichen Messwert.

### 2.4.5.3 Carboanhydrase-Aktivitätstest

Eingesetzt wurden:

Tris-Sulfat-Puffer aus 15 mM Tris, pH 7,6, mit 1M Schwefelsäure eingestellt.

13,6 mg (3 mM) frisch angesetzte p-Nitrophenyl-Essigsäureester-Lösung (p-NPA) wurde in 1 mL Aceton p.a. gelöst und mit Wasser auf 25 mL aufgefüllt.

Die Probelösung wurde mit Puffer A auf 60 µg Carboanhydrase/mL gebracht. Die Fraktionen vom Molmassen-Marker-Gelfiltrationslauf konnten unverdünnt eingesetzt werden.

In 1 mL-Küvetten, welche ich mit Stopfen verschloss, wurden folgende Lösungen einpipettiert:

Reagenz	Test	Blindprobe
A (Puffer)	633 µL	666 µL
B (p-NPA)	333 µL	333 µL

Der Ansatz wurde durch Kippen vermischt und versetzt mit:

C (Enzymlösung)	33 µL	-
-----------------	-------	---

Die Messung wurde gestartet und der Ansatz abermals durch Kippen durchmischt und die Absorption gegen die Blindprobe 6 Minuten aufgezeichnet.

Die Auswertung erfolgte, wie bei der ADH-Aktivität, durch die Auftragung von Absorption gegen die Zeit  $t$ , wobei die Steigung der eigentliche Messwert ist. Allerdings verändert sich hier die Absorption der Blindprobe zeitlich, so dass für jede Messung jeweils eine neue Blindprobe angesetzt wurde.

### 2.4.6 Molmassenbestimmung durch analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Im Gegensatz zur Gelfiltration ist die AUZ eine Absolutmethode, die keine Kalibrierung benötigt. Außerdem treten keine Wechselwirkungen mit einer

stationären Phase auf. Neben den beliebig einsetzbaren Lösemitteln benötigt man auch nur sehr kleine Probenmengen.

In der AUZ finden die Transportprozesse Sedimentation und Diffusion statt. Die Sedimentation wird durch die Partikeldichte und Partikelreibung bestimmt, während die Diffusion von der Partikeldichte unabhängig ist. Die Grundlage für die meisten Auswertungen von AUZ-Experimenten stellt die Svedberg-Gleichung (siehe Gleichung 2.1) dar, in der die Transportgrößen der Sedimentationskonstanten  $s$  und der Diffusionskonstanten  $D$  mit den Partikeleigenschaften der Masse und Dichte verknüpft sind:

$$M = \frac{sRT}{D(1 - \bar{v}\rho)} \quad (2.3)$$

M: Masse des Partikels

R: allgemeine Gaskonstante ( $R = 8,314 \frac{J}{K \cdot mol}$ )

s: Sedimentationskonstante

T: Temperatur

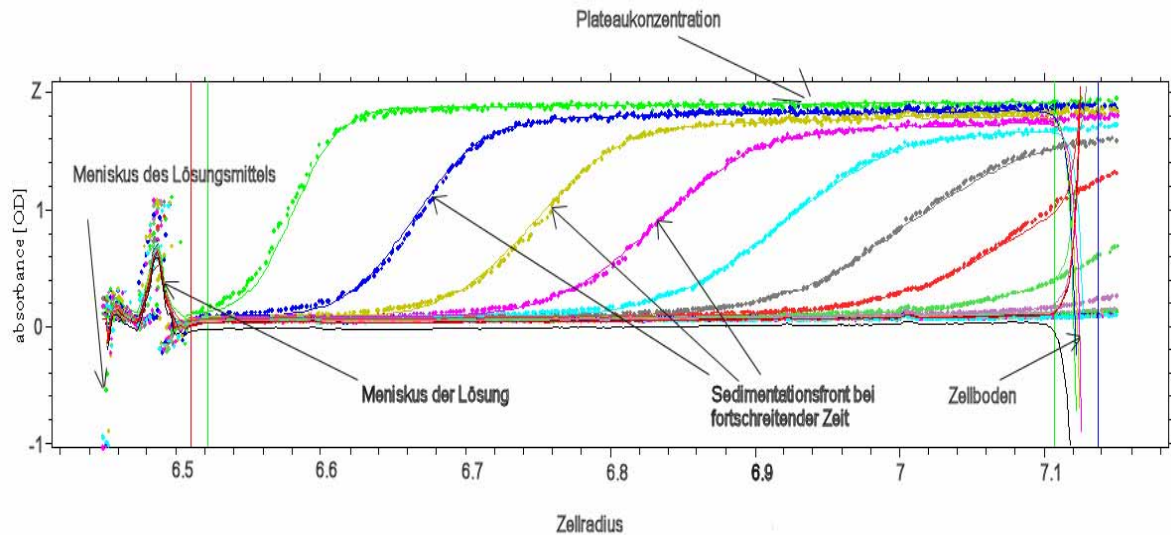
D: Diffusionskonstante

$\rho$ : Dichte des Mediums

$\bar{v}$ : mittlere Partikelgeschwindigkeit

Wichtig ist dabei, dass die Reibungseigenschaften des Partikels im Diffusionskoeffizienten enthalten sind.

Wertet man die Daten aus, erhält man ein orts aufgelöstes Konzentrationsprofil (siehe Abbildung 2.3) über den radialen Verlauf der Messzelle; diese Messung wird während des Experiments wiederholt, wodurch eine zeitaufgelöste Information erhalten wird. Im zeitlichen Verlauf wandert die Sedimentationsfront zum Zellboden; aus der Geschwindigkeit dieser Wanderung sind Partikeleigenschaften zugänglich. Bei Anwesenheit mehrerer Partikelsorten werden ebenso viele Sedimentationsfronten beobachtet.



**Abb. 2.3:** Die Darstellung zeigt orts aufgelöste Konzentrationsprofile einer WSto-Probe mit einer Konzentration von 0,5 mg/mL, die innerhalb einer Messzelle detektiert wurden. Vom Meniskus her verarmt die Lösung an Partikeln, während sie sich am Zellboden anreichern. An der so genannten Sedimentationsfront steigt die Konzentration an Partikeln stark an.

Außer der Sedimentation sind die Teilchen auch der Diffusion ausgesetzt. Mit der Anreicherung des Materials am Zellboden wird diese Rückdiffusion stärker, so dass sich am Ende des Experiments ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion einstellt. Dieses Sedimentations-Diffusions-Gleichgewicht nutzt man bei der Bestimmung der gewichtsgemittelten Molmassen, da bei diesem stationären Zustand die Molmasse unabhängig von der Sedimentations- und Diffusionskonstanten sehr genau (Fehler unter 3%) bestimmt werden kann (Balbo et al., 2004).

Die Messung der Protein- und Proteinpufferproben führte ich bei einer Drehzahl 30000 rpm und 4°C in Doppelsektormesszellen der Ultrazentrifuge (Optima XL-A der Fa. Beckman Coulter) durch. Die Messzellen sind Bestandteil des „analytischen“ Rotors der AUZ. Es wurden jeweils 300 µL (0,5 mg/mL) Protein und Standardpuffer in verschließbare Bohrungen an der Innenseite des Zellgehäuses eingefüllt.

### 2.4.7 Molmassenbestimmung durch MALDI-TOF- Massenspektrometrie

Die Massen der nativen und Selenomethionin enthaltenen MoSto-Untereinheiten wurden mithilfe der massenspektrometrischen Methode MALDI-TOF zur Ermittlung

der Anzahl, der in-vivo eingebauten Selenatome im Speicherprotein (siehe Abschnitt 2.2.3.4) bestimmt.

Zunächst wurde die Matrix (60 % (w/v) Indolacrylsäure; 0,1 % (w/v) TFA) und die Proteinprobe (3mg/mL) direkt auf dem Probenhalter gemischt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe (je halbierte Verdünnung der Probe in der Matrix in den aufeinander folgenden Spots) angesetzt. Anschließend wurde auf den Spots des MALDI Probenhalters 0,5 µl Indolacrylsäure als Dünnschicht präpariert. Nach dem Trocknen der Dünnschicht trug man die Verdünnungen des Protein/Matrix-Gemischs auf die einzelnen Spots auf und trockneten sie unter einem Luftzug. Anschließend wurden die Proben mit dem Gerät Voyager DE RP (Fa. AppliedBiosystems, früher: PerSeptive Biosystems) vermessen. Mit Laserlicht einer Wellenlänge im Bereich des Absorptionsmaximums der Matrixsubstanz wurde die Probe mit Laserlicht unter Hochvakuum bestrahlt (MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption) (Karas & Hillenkamp, 1988). Dadurch wurde die Proteinprobe zusammen mit der Matrix in die Gasphase gerissen und anschließend in Abhängigkeit von Masse und Ladung ( $m/z$ ) in

## **2.5 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen**

### **2.5.1 Theoretische Einführung**

Die Röntgenstrukturanalyse von Molekülen basiert auf zwei physikalischen Effekten:

- der Streuung von Strahlung an den Elektronen jedes Atoms.
- der anschließenden Interferenz der Streustrahlung aller Atome.

Dies führt je nach Abstrahlrichtung zu einer unterschiedlichen Streuintensität. Die Notwendigkeit von Röntgenstrahlung ergibt sich daraus, dass die Abstände zwischen Atomen im Molekül bei etwa 1.5 Å liegen und nur aufgelöst werden können, wenn die gewählte Wellenlänge in der gleichen Größenordnung liegt.

Die Streuintensität eines einzelnen Moleküls ist für eine Detektion viel zu gering. Daraus folgt die Verwendung von Kristallen, da dort die regelmäßige Anordnung vieler Moleküle in bestimmten Richtungen zu einer Verstärkung der Streustrahlung führt und ihre Detektion z.B. als schwarze Punkte auf einem Film ermöglicht. In welche Richtungen die Strahlung verstärkt wird, beschreibt das Bragg'sche Gesetz.

Den Zusammenhang zwischen der Art bzw. dem Ort der Streuzentren und den Eigenschaften (Amplitude, Phase, Ort auf dem Detektor) der resultierenden Strahlung, dem sog. Strukturfaktor, ist durch folgende Beziehung gegeben.

$$F(hkl) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(x,y,z) e^{2\pi i(hx + ky + lz)} dx dy dz$$

Der Strukturfaktor ist demgemäß die Fouriertransformation der Struktur. Dann gilt auch umgekehrt, dass die Struktur der Fouriertransformation des Strukturfaktors entspricht.

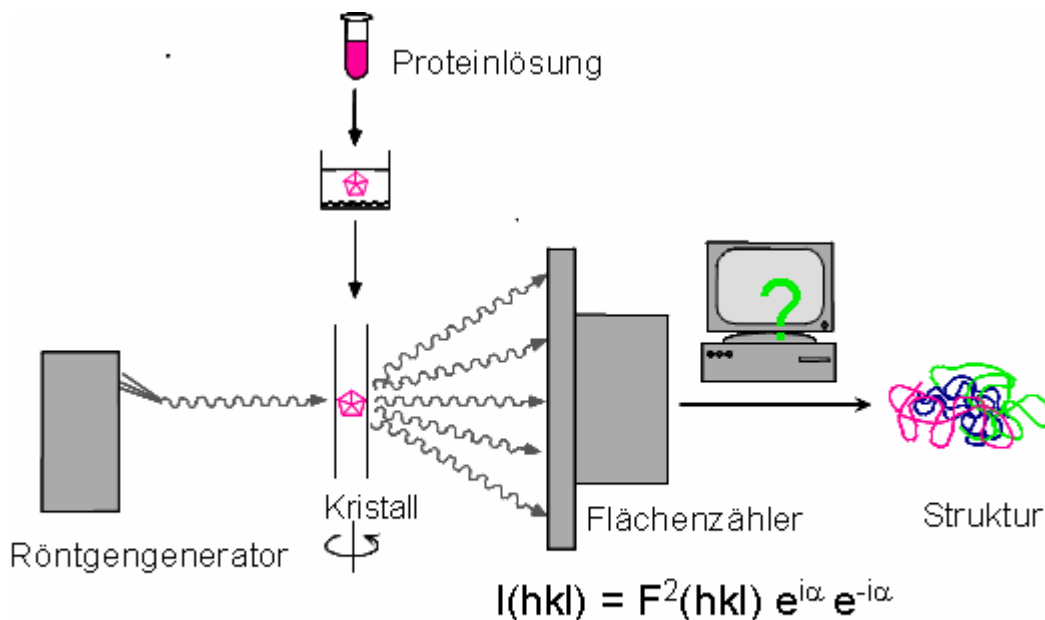
$$\rho(x,y,z) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| e^{i\alpha(hkl)} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Man kann also die Elektronendichteverteilung und damit die Struktur bestimmen, wenn man die Strukturfaktoren kennt. Das Problem besteht jedoch darin, dass der Detektor nicht den Strukturfaktor aufzeichnet, sondern das Quadrat des Strukturfaktors, die Intensität ( $F e^{i\varphi} F^* e^{-i\varphi} = F^2 = I$ ). Die Folge davon ist, dass die Phasenbeziehung zwischen den Streuwellen verloren geht, d.h. die Phasen sind in der Regel nicht direkt zugänglich und müssen durch zusätzliche Experimente auf kompliziertem Wege indirekt ermittelt werden. Die Phasenbestimmung beruht nun auf der Anwesenheit schwerer Atome im Protein, welche entweder im nativen Protein bereits präsent waren oder ins Molekül nach Tränkungsexperimenten gebunden wurden. Bei der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes wird der Unterschied zwischen dem Strukturfaktor des nativen Proteins und derjenigen des mit Schweratomen getränkten Proteins zur Detektion der Schweratomposition genutzt. Bei der Methode des multiplen anomalen Ersatzes wird die Anomalie des Streuverhaltens von Atomen an der Absorptionskante, die zu einem Zusammenbruch des Friedelgesetzes [ $F(hkl) \neq F(-h-k-l)$ ] führt, zur Detektion der Position des Streuers benutzt. Aus der Substruktur des Schweratoms lassen sich die Phasen berechnen.

Die Qualität einer Struktur wird durch die Auflösung und durch den sog. R-Faktor bestimmt, wobei der sog. freie R-Faktor ( $R_{\text{free}}$ ) nicht vom Modell beeinflusst wird und damit noch aussagekräftiger ist. Der  $R_{\text{free}}$  basiert auf dem Prinzip der Kreuzvalidierung, d. h. aus einem Teil der Daten, der bei der Verfeinerung unberücksichtigt bleibt, wird der freie  $R_{\text{free}}$  berechnet.

### 2.5.2 Praktische Durchführung

Die praktische Strukturanalyse umfasst die Kristallisation, die Vorbereitung des Kristalls für den Messvorgang, die Datensammlung, die Phasenbestimmung, den Modellbau, die Verfeinerung und die Qualitätsanalyse der Struktur (siehe Abbildung 2.4).



**Abb. 2.4:** Schema über die praktische Durchführung einer Röntgenstrukturanalyse.

### 2.5.3 Proteinkristallisation

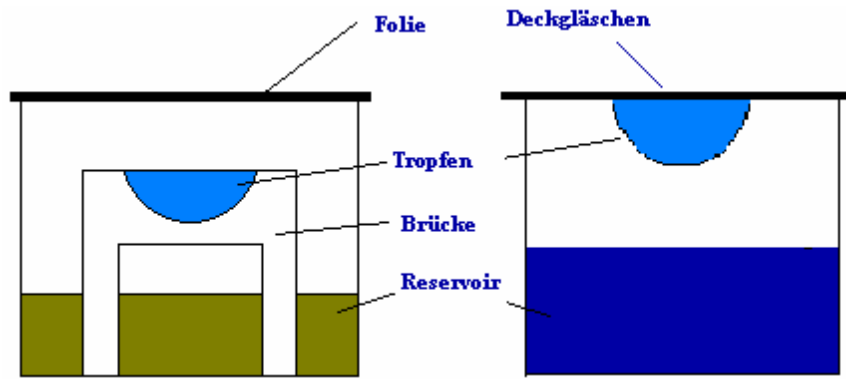
#### 2.5.3.1 Allgemein

Regelmäßige und kompakte Proteineinkristalle sind eine Voraussetzung für die röntgenkristallographische Strukturlösung von Proteinen (McPherson, 1990). Proteine in der kristallinen Form kommen *in vivo* normalerweise nicht vor, da in der

Zelle Bedingungen herrschen, welche das Protein in Lösung und damit funktionell halten. Unter den Bedingungen der Präzipitation jedoch ist die Kristallisation der thermodynamisch günstigere, während die Ausfällung der kinetisch günstigere Vorgang ist. Die Bedingungen, unter denen der thermodynamisch bevorzugte Kristallzustand entsteht, sind allerdings nicht vorhersagbar und müssen empirisch ermittelt werden.

Der Erfolg der Proteinkristallisation ist von einer Reihe von Faktoren beeinflusst. Der wichtigste Faktor ist das Protein selbst. Es sollte über mehrere Wochen hinweg stabil, hochkonzentriert, rein und homogen (keine Aggregate, gleiche Konformation jedes Partikels) sein sowie in großen Mengen verfügbar sein. Die äußeren Faktoren sind die gleichen, mit denen man das Protein in einen Zustand geringerer Löslichkeit versetzt bzw. zur Ausfällung zwingt. Dazu gehört insbesondere das Fällungsmittel (seine Art, seine Konzentration), und der Puffer (seine Art, seine Ionenstärke, sein pH-Wert). Additive, Detergentien und spezifische Bindungspartner (z. B. Substrate, Inhibitoren und Metallionen) üben zusätzlich Einfluss auf die Kristallisation aus. Darüberhinaus spielen auch die Temperatur oder die Kristallisationstechnik eine wichtige Rolle. Durch Variation dieser Parameter wird nun versucht, ein Protein zu kristallisieren.

Die thermodynamisch bevorzugte Kristallbildung wird in der Regel nur dann erreicht, wenn der Vorgang sehr langsam vonstatten geht. Diesem Umstand tragen die entwickelten Kristallisationsmethoden Rechnung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die sog. Dampfdiffusionsmethode gewählt, wobei die Variante des „hängenden Tropfens“ als auch die des „sitzenden Tropfens“ verwendet wurde (siehe Abbildung 2.5). Bei dieser Methode besteht das Reservoir aus einer Lösung, die das Protein gerade zur Ausfällung bringt und der Tropfen aus gleichen Volumina an Protein- und Reservoirlösung. In dem verschlossenen System erfolgt ein H<sub>2</sub>O-Austausch über die Gasphase, wobei die mit Fällungsmittel versetzte Reservoirlösung dem Tropfen H<sub>2</sub>O entzieht und somit sehr langsam dort die Konzentration des Fällungsmittels und Proteins bis zur Kristallisation erhöht.



**Abb. 2.5:** Dampfdiffusionsmethode mit hängendem (rechte Abbildung) und sitzendem (linke Abbildung) Tropfen.

In dem verwendeten System wurden in Vertiefungen von Linbro-Platten (Firma Hampton Research), auf Deckgläschen von Hand oder mit einem Pipettierautomat (Cartesian Technologies) die Tropfen- bzw. Reservoirösungen pipettiert. Nach dem luftdichten Verschließen der einzelnen Kristallisationsansätze mit Deckgläschen oder Klebeband wurden die Ansätze bei konstanter Temperatur (4°C und 18°C) und erschütterungsfrei gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde das Aussehen der Kristallisationstropfen unter dem Mikroskop überprüft.

Eine Proteinprobe unbekanntes Kristallisationsverhaltens, wie das WSto oder MoSto, wurde zunächst einem grobmaschigen Kristallisations-*Screening* unterworfen. Die *Screenings*, ursprünglich entworfen von Jancarik & Kim (1991) und Cudney et al. (1994), enthalten eine große Breite an Fällungsmitteln, Zusätzen und pH-Bereichen. Wir verwendeten die Schnelltestscreens von JenaBioscience ([www.jena-bioscience.com](http://www.jena-bioscience.com)) und der Firma Molecular Dimensions ([www.m-d-l.demon.co.uk](http://www.m-d-l.demon.co.uk)).

### 2.5.3.2 Impfkristallisation

Ist die Größe der Kristalle oder ihre Reproduzierbarkeit sehr gering, verwendet man häufig die Methode der Impfkristallisation. Dabei gibt man dem Kristallisationstropfen einen Mikrokristall als Keim zu. Wichtig ist, dass der Impfkristall zuvor gewaschen wird. Dazu wurden Kristalle in die Reservoirösung überführt, mit Hilfe eines Glaskügelchens 2 Minuten gerührt, und die Lösung anschließend auf 500 µl aufgefüllt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe ausgehend von einer 1:10 verdünnten Stammlösung erstellt. Nach einer Vor-

aquilibrierungszeit der Kristallansätze von 2 Tagen, wurde den Ansätzen je 0,5  $\mu\text{L}$  der Impflösung zugesetzt.

### **2.5.4 Kristallmontage**

Alle Kristalle wurden vor der Röntgenmessung in einem  $\text{N}_2$ -Strom bei 100 K gefroren, um den durch die energiereiche Röntgenstrahlung erzeugten Strahlenschaden gering zu halten. Dazu muss der Kristalllösung Frostschutzmittel wie z.B. Glycerin zugesetzt werden, welches zum einen die Kristalle nicht schädigt und zum anderen eine „Glasbildung“ der Lösung gewährleistet. Die einzelnen mit Frostschutzmittel angereicherten Kristallisationslösungen (Cryolösungen) wurden zuerst auf Eisingbildung getestet. Für die Messung wurden die Kristalle mit einer Nylonschleife (Fa. Hampton Research) aus der Cryolösung entfernt und möglichst schnell in einem  $\text{N}_2$ -Strom von 100 K schockgefroren. Anschließend wurde der Kristall so justiert, dass er zu jedem Zeitpunkt der Messung in der Strahlenebene lag.

### **2.5.5 Datensammlung und Datenreduktion**

Die Kristalle von MoSto und WSto wurden an der Drehanode des Instituts (Rigaku-Microfocus) mit  $\text{Cu-K}_\alpha$ -Strahlung, am European Source of Radiation Facility (ESRF) in Grenoble (Frankreich) und am Swiss Light Source (SLS) in Villigen (Schweiz) vermessen. Die Röntgendiffraktionsanlage des Max-Planck Instituts in Frankfurt ist mit einem „Imaging plate“ – Detektor von MSC (Molecular Structure Cooperation) und einer Kryoanlage von Rigaku ausgestattet. Die PXI- und PXII- Meßstationen am SLS, an der die wichtigsten Messungen durchgeführt wurden haben einen CCD-Detektor Mar225 von MarResearch und eine Kryoanlage der Firma Oxford Instruments. Zur Überprüfung der Kristallqualität und der Streukraft der Kristalle wurden an der Röntgendiffraktionsanlage am Max-Planck-Institut in Frankfurt Probemessungen durchgeführt. Die besten Kristalle wurden daraufhin in flüssigem Stickstoff gefroren und gelagert und standen für Messungen am Synchrotron zur Verfügung.

Die Röntgendiffraktionsbilder aller gemessenen Datensätze wurden mit den Programmpaketen HKL (Otwinowski & Minor, 1997) und/oder XDS (Kabsch, 1993) indiziert, integriert und skaliert. Die MAD-Daten wurden anormal skaliert, das heißt die Friedelspaare wurden bei der Skalierung als verschieden angenommen. Die Strukturfaktoramplituden wurden mit TRUNCATE (CCP4, 1994) oder XDSCONV aus

den gemessenen Intensitäten berechnet. Für alle Kristallformen wurde die Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit bzw. die Packungsdichte im Kristall mit Hilfe des Matthews-Parameters abgeschätzt (Matthews, 1968).

### **2.5.6 Phasenbestimmung und –verbesserung**

Für die Phasenbestimmung von MoSto und WSto kam die MAD-Methode mit dem Selenatom von Selenomethionin als anomalen Streuer zur Anwendung. Der Datensatz des Selenomethionin-Derivats, der zur Strukturlösung führte, wurde an der PX-I und ID23-1 Meßstation, an der die Wellenlänge modulierbar war, vermessen. Vor Beginn der Messung wurde ein Röntgenfluoreszenzspektrum des Se-Met-Kristalls in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgezeichnet. Daraus ergaben sich die Wellenlängen für den „Peak“, die „Inflektion“ und den „Remote“, an denen jeweils ein Datensatz gesammelt wurde.

Die Selensubstruktur des „Peak“-Datensatzes von Se-Met-WSto wurde mit Hilfe von SHELXD gelöst. Die gewählten Auflösungsbereiche waren 3-10 Å, 4-10 Å und 6-10Å. Die erhaltenen Positionen wurden mit Hilfe des Programms SHARP verfeinert und anschließend die Phasen bestimmt. Die anomalen Streufaktoren  $f'$  und  $f''$  wurden dabei nicht verfeinert. Die so erhaltenen Phasen wurden innerhalb von SHARP mit dem Programm verbessert und aus den erhaltenen Phasen die Elektronendichte mit Programmen aus dem CCP4-Paket (CCP4, 1994) berechnet.

### **2.5.7 Modellbau, Verfeinerung und Qualitätsanalyse der Struktur**

Eine manuelle Inspektion der Elektronendichte zeigte sofort die Anwesenheit von  $\beta$ -Strängen und  $\alpha$ -Helices. Ein automatischer Modellbau innerhalb von RESOLVE lieferte über 50% des Strukturmodells. Der überwiegende Teil des Restes konnte manuell mit Hilfe des Programms „O“ (Jones et al., 1991) in die Dichte eingepaßt werden. Die Verfeinerung des Modells wurde mit CNS (Brunger & Adams, 1997) durchgeführt. Die Wassersuche wurde mit der ARP/wARP-Routine durchgeführt, die in der REFMAC5-Version von CCP4i implementiert ist. Während der Verfeinerung wurde die Qualität der Modelle mit PROCHECK (Laskowski et al., 1985) und den Routinen in REFMAC (Murshudov et al., 1997) auf ihre stereochemische Plausibilität geprüft. Ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung des Verfeinerungsprozesses war die Beobachtung der R-Werte.

## **2.6 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV-Systeme**

### **2.6.1 Chemikalien**

Die verwendeten Chemikalien hatten p.a. Qualität und wurden von den Herstellern Boehringer, Calbiochem, Fluka, J. T. Baker, Merck, Riedel de Hën, Roche, Roth, Serva und Sigma. Das Wasser wurde in einer Reinstwasseranlage aufbereitet und hatte eine Leitfähigkeit von  $\Omega \leq 50 \mu\text{m cm}^{-1}$ .

### **2.6.2 Materialien, Geräte und EDV-Systeme**

Die wichtigsten Geräte, Materialien und EDV-Systeme in einer Tabelle:

<p><b>Chromatographie-Säulen und –materialien</b></p> <p>Chelating Sepharose® Fast Flow  DEAE Sephacel  Sephadex G25/G200  Octyl Sepharose CL-4B  Superdex 200 HR 26/80</p> <p>Cryostat  Cryoloops, Cryowerkzeuge</p> <p><b>Massenspektrometer</b></p> <p>MALDI MS Voyager DE RP (TOF)</p> <p><b>Analytische Ultrazentrifuge</b></p> <p>Optima XL-A</p> <p><b>Pipettierautomat</b></p> <p>MicroSys SynQuad  pH-Elektrode  Rührzelle (450 mm)</p> <p><b>Ultrafiltration</b></p> <p>Minicon B15- Stehkammern  Diaflo-Rührzellen (YM 100, PM30)  Vivaspin 20</p> <p><b>Waagen</b></p> <p>Analysenwaage: Gold  Laborwaage: 1201 MP2</p> <p><b>Zentrifugen</b></p> <p>Tischzentrifuge</p>	<p>Amersham-Bioscience  Amersham-Bioscience  Amersham-Bioscience  Amersham-Bioscience  Amersham-Bioscience</p> <p>Lauda  Hampton Research, Laguna Niguel CA,  USA</p> <p>AppliedBiosystems</p> <p>Fa. Beckman Coulter</p> <p>Cartesian Technologies, Inc.(Irvine, CA)  Orion® 7110SC  Amicon®</p> <p>Amicon, Witten  Amicon Witten  Sartorius®</p> <p>Sartorius®  Sartorius®</p> <p>Biofuge A</p>
--	---

<p><b>Röntgendiffraktometer</b></p> <p>Cryostream Cooler</p> <p>Drehanode:</p> <p>Rotaflex RU-200B</p> <p>EDV-Systeme:</p> <p>Indigo2 mit Irix 6.5</p> <p>Octane mit Irix 6.5</p> <p>O2 mit Irix 6.5</p> <p>Flächenzähler:</p> <p>MAR 300 und 345</p> <p>Sorvall® Ultra Pro 80</p> <p>Sorvall® RC-5b Refrigerated Superspeed</p> <p><b>Sonstige Geräte</b></p> <p>Autoklav 3870</p> <p>Clean Bench MSC 12</p> <p>Schlauchpumpe Meredos SP-GLV</p> <p>Spektrometer UV/Vis, Lambda2</p> <p>Taumelschüttler IKA</p> <p>Vortex Gerät VF2</p>	<p>Oxford Cryosystems, Oxford, England</p> <p>Rigaku-Microfocus, Düsseldorf</p> <p>Silicon Graphics, München</p> <p>Silicon Graphics, München</p> <p>Silicon Graphics, München</p> <p>MAR Research, Norderstedt</p> <p>Du Pont</p> <p>Du Pont</p> <p>Tuttnauer Systec</p> <p>Jouan</p> <p>Biometra</p> <p>Perkin Elmer</p> <p>Vibrax VXR</p> <p>Jancke&amp;Kunkel IKA Labortechnik</p>
--	--

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Optimierung der Anreicherung des MoSto und WSto

Aufbauend auf die bereits durchgeführten Optimierungsversuche mit MoSto (Fenske et. al., 2005) wurde versucht, den Verlust an Molybdat nach jedem Reinigungsschritt zu minimieren und die Reinheit und Proteinqualität für die anschließende Kristallisation des Proteins zu maximieren. Hierzu wurden verschiedene Chromatographieverfahren (Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie, Metallionen-Affinitätschromatographie und Gelfiltration) zuerst einzeln in Vorversuchen getestet und anschließend miteinander kombiniert, um die entsprechenden Ergebnisse untereinander zu vergleichen.

#### 3.2 Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie

Als hydrophobes Säulenmaterial wurde Octylsepharose eingesetzt. Das in bereits zwei Schritten (DEAE und Gelfiltration) vorgereinigte MoSto wurde mit Hilfe eines kontinuierlich linear abnehmenden Ammoniumsulfat-Gradienten (800-0 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) (siehe Abschnitt 2.2.2) eluiert. Die maximale Ammoniumsulfat-Konzentration wurde im Laufe der Vorversuche in 100 mM-Schritten von 800 mM auf 100 mM herabgesetzt. Zuvor wurde MoSto auf die Äquilibrierungslösung umgepuffert, um eine Proteininstabilität zu vermeiden. Folgende Pufferlösungen wurden verwendet:

**Table 3.1:** Notwendige Puffer für die entsprechenden Reinigungsschritte

Äquilibrierungspuffer	Elutionspuffer	Waschpuffer
800 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	800-0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$
2 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$	2 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$	5 g/L Triton X-100
50 mM Tris/HCl	50 mM Tris/HCl	50 mM Tris/HCl
pH = 7,6	pH = 7,6	pH = 7,6

Das Fraktionsvolumen betrug 3 mL. Die Geschwindigkeit der Proteinauftragung und der anschließenden Elution betrug 0,5 mL/min. Zur vollständigen Entfernung des Proteins von der Säule wurde Triton X-100 als Additiv beim Waschvorgang eingesetzt. Um eventuelle störende Wechselwirkungen des Tritons mit dem

Speicherprotein zu verhindern sowie die Stabilität des MoSto zu erhöhen, erfolgte nach dem Octylsepharoselauf eine Umpufferung durch einen G-25-Lauf unter Standardpuffer-Bedingungen (50 mM MOPS, pH = 6,5) und damit die Abtrennung des Tritons vom Speicherprotein.

Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Elution unter Kühlung (4°C) ablief. Die qualitative Bestimmung der Proteinkonzentration ( $OD_{280}$ ) ergab eine Abtrennung der noch vorhandenen Verunreinigungen. Allerdings wurde durch Mo-Analyse in den Protein-Peaks kein Molybdat nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.3.1).

Zusammenfassend kann man hier also von einer Methode zur Isolierung und Reinigung des MoSto-Apoproteins sprechen. Die eigentlich beabsichtigte Reinigung des Holoпротеins schlug fehl. Allerdings trug der hohe pH-Wert der Pufferlösung von 7.6 während des Octylsepharoselaufs auch erheblich zur Apoproteinbildung bei.

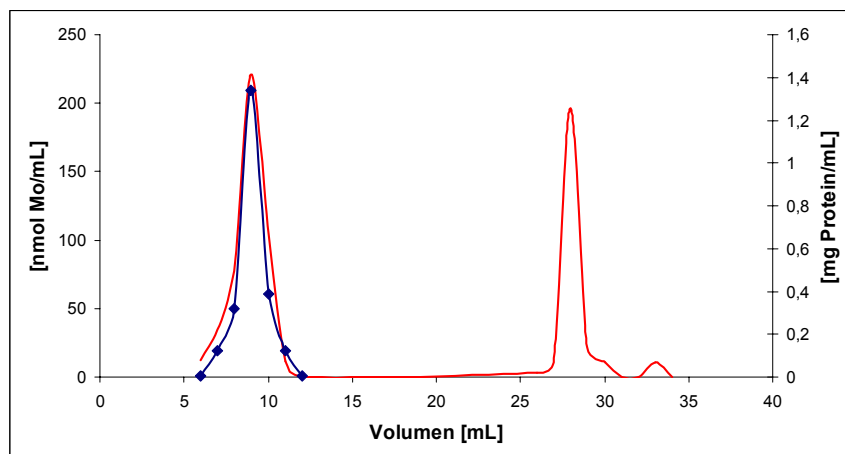
Bei weiteren Tests mit einem diskontinuierlichen Salzgradienten wurde während des Säulenlaufs das aufgetragene Protein zunächst mit 400 mM  $(NH_4)_2SO_4$  und anschließend mit 300, 200 und 100 mM Ammoniumsulfat eluiert. Nach dem das MoSto bei 200 mM  $(NH_4)_2SO_4$  von der Säule gewaschen wurde konnte weder die Freisetzung des Molybdats noch eine Destabilisierung des Speicherproteins beobachtet werden. Allerdings war die Proteinreinigungswirkung sehr gering.

Anschließend wurde als Pufferlösung statt Tris/HCl- MOPS-Puffer getestet, dessen pH-Wert (pH 6.5) eine höhere Stabilität des Proteins gewährleistet. Die zusätzliche Verwendung von 10% Glycerin diente als Zusatz zur Verstärkung der hydrophoben Affinität zwischen Säulenmaterial und Protein. Dadurch wurde die Zugabe von Triton X-100 zum Waschen der Octylsepharose-Säule vermieden. Es wurden folgende Puffer verwendet (siehe Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2:** Benötigte Puffer für die MoSto-Reinigung mit Hilfe einer Octylsepharose-Säule.

Äquilibrationpuffer	Elutionspuffer
50 mM MOPS pH 6,5	50 mM MOPS pH 6,5
800 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$
2 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$	10 % Glycerin
10 % Glycerin	

Die Verwendung eines diskontinuierlichen Salzgradienten mit DEAE-vorgereinigtem MoSto, wie schon zu Anfang der Vorversuche, zeigte trotz der günstigeren Stabilitätsbedingungen einen Molybdat-Freisetzunganteil von 50% (siehe Abbildung 3.1).



**Abb.3.1:** Elutionsprofil von Protein (blaue Kurve mit Rauten) und Mo (rote Kurven) eines Octylsepharose-Säulenlaufs (CL-4B).

### 3.2.1 Fazit zu den Ergebnissen der Octylsepharose-Chromatographie

Die Ergebnisse zeigen trotz der überwiegend hydrophilen Proteinoberfläche eine gute Trennung des Speicherproteins von den anderen niedermolekularen Proteinbestandteilen des DEAE-Rohextrakts. Allerdings ist die Reinigung mit einer hohen Mo-Freisetzung verbunden und führt zu einer erhöhten Instabilität des Proteins, welche durch starkes Ausflocken der Proteinfractionen erkennbar war. Die Methode ist also kaum für eine Anreicherung über mehrere Reinigungsschritte geeignet und wurde daher nicht weiter in Betracht gezogen. Trotz alledem bietet

dieses Verfahren trotz der eingeschränkten Stabilität eine gute Methode zur Gewinnung von Apoprotein.

### 3.3 Metallionen-Affinitätschromatographie

Abgesehen davon, dass sie als Reinigungsverfahren für das MoSto getestet wurde, sollte dieses Verfahren außerdem Hinweise im Bezug auf die Affinität des Speicherproteins zu anderen Metallen neben Molybdän und Wolfram liefern. Für jeden Säulenlauf wurde sowohl einen Bindungs- (zum Beladen des Gelmaterials mit Metallionen), sowie Wasch- und Elutionspuffer benötigt. Um die Affinität zwischen den Metallionen der Säulen und dem Protein herabzusetzen wurde zur Elution ein kontinuierlich linear zunehmender Gradient einer Metallionen komplexierenden Verbindung (0-150mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder 10-250mM Imidazol) verwendet. Dabei zeigte Imidazol, im Gegensatz zu Ammoniumchlorid, eine schonende Wirkung bei der Elution des Proteins und wurde fast ausschließlich als Zusatz zum Elutionspuffer verwendet. Die Beladung der Säule erfolgte mit unterschiedlichen Kationen ( $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ),  $\text{Ni}^{2+}$  ( $\text{NiSO}_4$ ),  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) und  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{CdSO}_4$ )), die dem entsprechenden Puffer zugesetzt wurden. Tabelle 3.3 zeigt die getesteten Puffer-Metall-Kombinationen.

**Tabelle 3.3:** Übersicht der unterschiedlichen Puffer und der entsprechenden Metallionen für die Affinitätschromatographie.

Metallion	Bindungspuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
$\text{Ca}^{2+}$	0,1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	20 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
	20 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	500 mM NaCl	500 mM NaCl
	500 mM NaCl	10 mM Imidazol	250 mM Imidazol
	pH = 7,2	pH = 7,2	pH = 7,2
$\text{Cd}^{2+}$	0,1 M $\text{CdSO}_4$	20 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	20 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
	20 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	500 mM NaCl	500 mM NaCl
	500 mM NaCl	10 mM Imidazol	250 mM Imidazol
	pH = 7,2	pH = 7,2	pH = 7,2

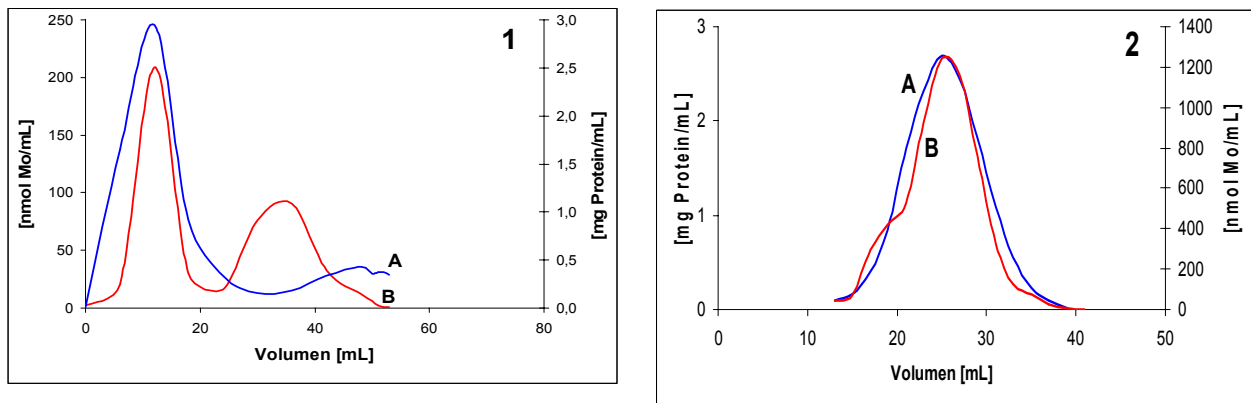
Cu <sup>2+</sup>	0,1 M CuSO <sub>4</sub>	20 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	20 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O
	20 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	500 mM NaCl	500 mM NaCl
	500 mM NaCl	10 mM Imidazol	250 mM Imidazol
	pH = 7,2	pH = 7,2	pH = 7,2
Zn <sup>2+</sup>	0,1 M ZnSO <sub>4</sub>	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 mM NaCl	500 mM NaCl
	500 mM NaCl	pH = 6,5	150 mM NH <sub>4</sub> Cl
	pH = 6,5		pH = 6,5
Zn <sup>2+</sup>	0,1 M ZnSO <sub>4</sub>	50 mM MOPS	50 mM MOPS
	50 mM MOPS	500 mM NaCl	500 mM NaCl
	500 mM NaCl	10 mM Imidazol	250 mM Imidazol
	pH = 6,5	pH = 6,5	pH = 6,5
Ni <sup>2+</sup>	0,1 M NiSO <sub>4</sub>	50 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	50 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O
	50 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	500 mM NaCl	500 mM NaCl
	500 mM NaCl	10 mM Imidazol	250 mM Imidazol
	10 mM Imidazol	pH = 7,2	pH = 7,2
	pH = 7,2		

Wie bei den Versuchen mit der Octylsepharose-Säule (siehe Abschnitt 3.2.1) wurde DEAE vorgereinigtes MoSto verwendet. Die Auftrags- und Elutionsgeschwindigkeit betrug 1 mL/min und das Fraktionsvolumen 1mL.

### 3.3.1 Affinitätschromatographie mit Ni<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> als Metallionen

Die mit Zn<sup>2+</sup> Ionen beladene Säule lieferte im Vergleich zu den Elutionsversuchen mit der Octylsepharose-Chromatographie einen höheren Mo-Gehalt des MoSto, allerdings wurden 30 % Molybdat freigesetzt. Ein entsprechender Kurvenverlauf (siehe Abbildung 3.2) war sowohl beim Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer mit dem NH<sub>4</sub>Cl-Gradienten, als auch beim MOPS-Puffer mit Imidazol als Gradientenkomponente zu beobachten.

## Ergebnisse



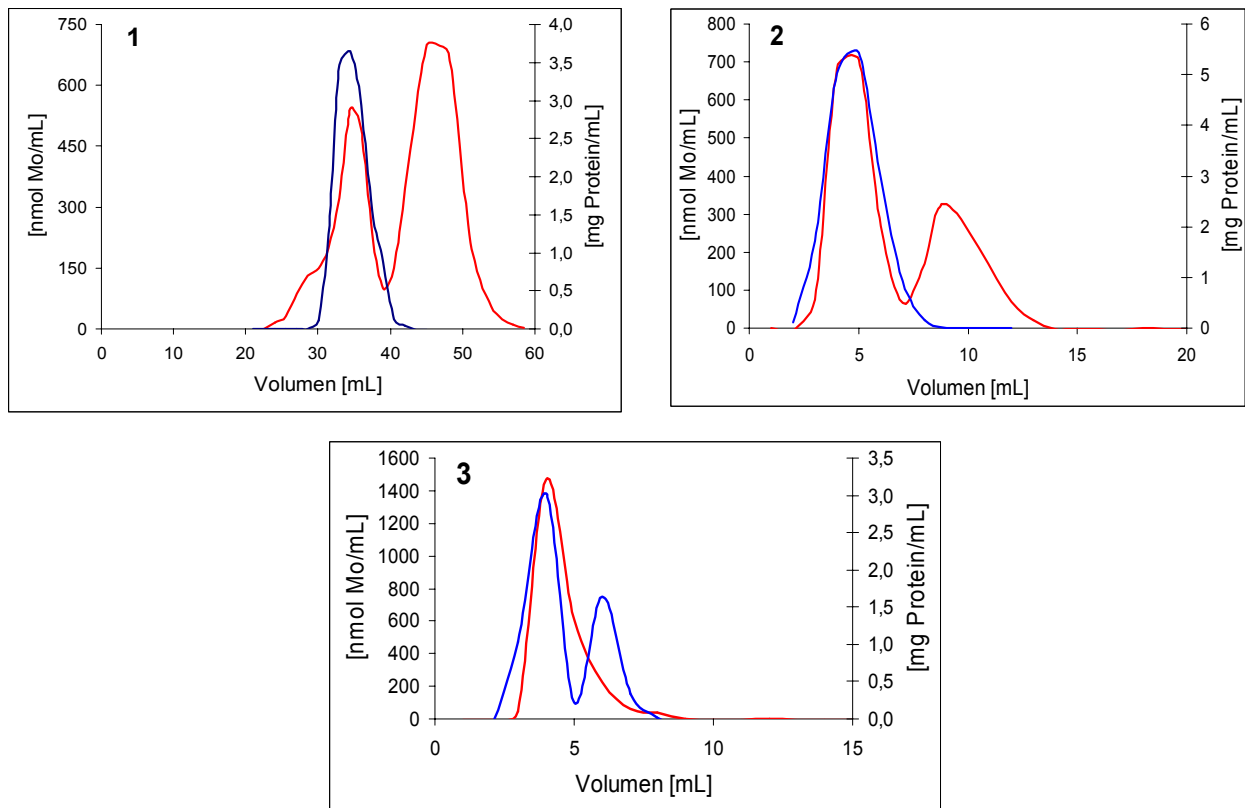
**Abb. 3.2:** Metallaffinitätssäulenläufe im Vergleich: Links, das Elutionsprofil der mit  $Zn^{2+}$  beladenen Säule (1) und rechts der Verlauf nach der  $Ni^{2+}$  beladenen Säule (2). Der Mo-Gehalt ist in der rot markierten (B), die Proteinkonzentration in der blau gekennzeichneten Kurve (A) dargestellt.

Ganz anders gestaltet sich das Kurvenprofil mit einer  $Ni^{2+}$ -beladenen Affinitätsäule (siehe Abbildung 3.2, B). Man beobachtet einerseits eine verzögerte Elution, die auf eine bessere Trennung schließen lässt. Andererseits bleibt das Mo komplett im Protein gebunden, was dafür spricht, dass es keine wesentliche Konfigurationsänderung des Proteins bei der Wechselwirkung mit  $Ni^{2+}$  an der hydrophilen Oberfläche des MoSto gibt. Nach der Konzentrierung des Proteins auf 3mg/mL ergab die Analyse des SDS-Gels eine Reinheit von ~ 60 %, es lag also noch kein homogenes Präparat vor.

### 3.3.2 Affinitätschromatographie mit $Cu^{2+}$ , $Ca^{2+}$ und $Cd^{2+}$ als Metallionen

Der Elutionsverlauf im Falle des Kupfers (Kurve 1, siehe auch Abbildung 3.3) zeigt eine gute Affinität zwischen Säulenmaterial und MoSto (späte Elution), die in den beiden anderen Fällen nicht zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu führt die Wechselwirkung zwischen dem  $Cu^{2+}$ -Kation und dem MoSto zu einem hohen Anstieg freigesetzten Molybdats.

Hier wiederum zeigten die Kationen  $Ca^{2+}$  mit 20 % freigesetztem  $MoO_4^{2-}$  und  $Cd^{2+}$  wesentlich bessere Werte hinsichtlich des Anteils an unverändertem Holoprotein. Einen ganz anderen Effekt wurde beim Säulenlauf mit  $Cd^{2+}$  als Metallion festgestellt. Hier war die Stabilität des Apoproteins eingeschränkt, so dass sich im Kurvenverlauf neben der Proteinhauptbande auch noch ein fragmentierter Anteil in der verzögerten Elution des MoSto zeigte (siehe Abbildung 3.3, Kurve 3).



**Abb. 3.3:** Metallaffinitätssäulenläufe im Vergleich: Oben links, das Elutionsprofil der mit  $\text{Cu}^{2+}$  beladenen Säule (1) und oben rechts der Verlauf nach der  $\text{Ca}^{2+}$  beladenen Säule (2). Kurve (3) zeigt das Elutionsprofil der mit  $\text{Cd}^{2+}$  beladenen Säule. Der Mo-Gehalt ist in der rot markierten, die Proteinkonzentration in der blau gekennzeichneten Kurve dargestellt.

Fasst man die Ergebnisse hinsichtlich des Trenn- bzw. Affinitätsvermögens und der Stabilität des Holo Proteins zusammen, so stellt man fest, dass die  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätssäule die besten Voraussetzungen für einen weiteren Reinigungsschritt nach der DEAE-Vorreinigung erfüllt. Der weiterhin nachteilige Effekt blieb das Umpuffern vom ursprünglichen MOPS-Puffer als Standardpuffer auf den Phosphatpuffer, da eine vernünftige Vorreinigung über eine DEAE-Säule mit dem Phosphatpuffer ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ) scheiterte.

### **3.4 Gelfiltration**

#### **3.4.1 Vorversuche**

Eigene Anreicherungsversuche mit dem Säulenmaterial Sephadex G200 bestätigten die bereits gewonnenen Erkenntnisse (Fenske et al., 2005). Durch die geringe mechanische Belastbarkeit des Säulenmaterials und die damit verbundene geringe Strömungsgeschwindigkeit resultierte ein Mo-Gehalt von ~ 150 µg je g Protein. Die lange Elutionszeit und die starke Verdünnung des Proteins in der Säule führten zu einer recht hohen Instabilität, die eine geeignete Präparation für Kristallisationsversuche zunächst fast unmöglich machte. Erst der Einsatz von Superdex 200 (S200) mit einer zehnmal höheren Flussrate (3mL/min) und einer wesentlich höheren Säulenbeständigkeit ermöglichte eine bessere Auftrennung und geringere Verdünnung des MoSto. Der Mo-Gehalt im Protein erhöhte sich um das Doppelte auf einen Gehalt von ~ 300 µg/g Protein und zeigte die wesentlich höhere Stabilität von MoSto. Die zuvor festgestellten nachweisbaren Mo-Verluste im niedermolekularen Bereich (Dissertation Dirk Fenske, 2004) zeigten sich nicht. Ein Grund dafür könnte die Verwendung des Standardpuffers (50 mM MOPS) ohne den Zusatz von NaCl (50 mM) sein, da ein geringer Salzanteil im Puffer für eine bessere Bindungsaffinität zwischen dem Säulenmaterial und dem zu reinigenden Protein sorgt. Um eine Überladung der Superdex-Säule zu vermeiden wurde ein geringes Volumen (2 mL) des vorgereinigten Proteins aufgetragen. Das Fraktionsvolumen betrug 4 mL.

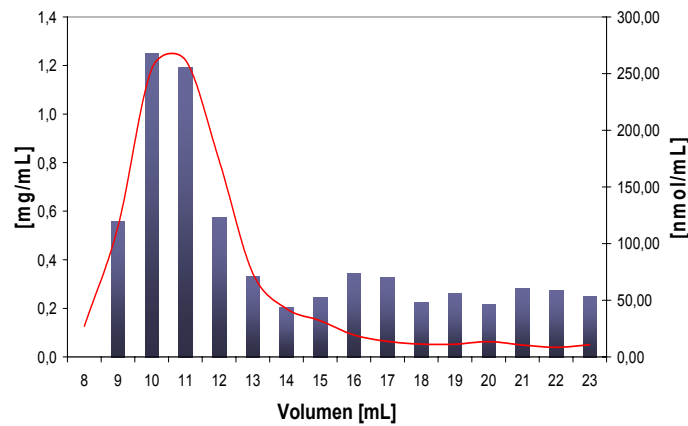
#### **3.4.2 Optimierungsversuche**

Der erste Schritt der MoSto-Reinigung, die Anionenaustauschchromatographie (DEAE), wurde schon detailliert beschrieben (Fenske et al., 2005). Die optimierten Bedingungen wurden direkt übernommen. Zu beachten war bei der Herstellung des W-äquivalenten Molybdänspeicherproteins (WSto), dass die Zellanzucht unter annähernd Mo-freien Bedingungen durchgeführt wurde. Dies setzte Mo-gereinigte Glasgeräte und Mo-verarmte Vorkulturen zur Beimpfung der Hauptkultur voraus. Ansonsten entsprach der Ablauf dem der Mo-haltigen MoSto-Präparation.

Nach der Portionierung des vorgereinigtes Proteinextrakts wurden verschiedene Reinigungsschritte durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Ni<sup>2+</sup>- Affinitätschromatographie gefolgt von einer Gelfiltration. Anschließend wurden die bereits durchgeführten Reinigungsschritte (1. Schritt: DEAE, 2. Schritt: Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie und 1. Schritt: DEAE, 2. Schritt: Gelfiltration) reproduziert. Die

## Ergebnisse

Abbildung 3.4 zeigt den Elutionsverlauf nach der Gelfiltration, dem ein DEAE-Säulenlauf vorausging.



**Abb. 3.4:** Kurvenverlauf des Mo-Gehalts (rot) und der Proteinkonzentration (blau) nach der Gelfiltration als zweitem Anreicherungsschritt.

Wir ermittelten die Qualität an MoSto bzw. WSto über den Mo-Gehalt in einem Gramm Protein und erhielten laut Tabelle 3.4 folgende Werte.

**Tabelle 3.4:** Zusammenfassung des W-/Mo-Gehalts nach den einzelnen Schritten der Wolfram (WSto)- bzw. Molybdän-Speicherprotein (MoSto)-Reinigung.

Protein	1. Reinigungsschritt	2. Reinigungsschritt	3. Reinigungsschritt	Metallgehalt je g Protein
MoSto	DEAE	Ni <sup>2+</sup> - Affinitätschrom.	Gelfiltration	260 µmol Mo
MoSto	DEAE	Gelfiltration	-	284 µmol Mo
WSto	DEAE	Gelfiltration	-	360 µmol W

Ein Vergleich der Mo-Gehalte zeigt eine wesentliche günstigere Endreinigung mit der Gelfiltrationssäule, die für eine sehr gute Proteinqualität sorgt. Der Gehalt an Mo im MoSto konnte durch Versetzen des Standardpuffers mit ATP und MgCl<sub>2</sub> (jeweils 1 mM) sogar auf 290 µmol/g erhöht werden. Die Verluste bei der dreistufigen Reinigung kommen vor allem durch die notwendige Umpufferung und der damit

verbundenen Verdünnung der Proteinlösung zustande. Diese Verdünnung sorgt wiederum für eine erhöhte Instabilität. Bei weiteren Untersuchungen wurde auch ein wesentlich höherer Wo-Gehalt im Speicherprotein festgestellt. Allgemein scheint die Bindungsaffinität von W im Speicherprotein etwas höher zu sein als von Mo im MoSto. Diese Eigenschaften werden vor allem noch in den Abschnitten über Einbau und Freisetzung der Metalle in das bzw. aus dem Speicherprotein eine wichtige Rolle spielen.

Ein nach der Gelfiltration vorgenommener zweiter Gelfiltrationsschritt erbrachte nicht den gewünschten größeren Reinigungserfolg, verursachte aber Proteinverluste von ungefähr 10%. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass eine zweistufige Reinigung hinsichtlich des Metallgehalts und der entsprechenden Reinheit, die durch SDS-PAGE ermittelt wurden, für ein sehr gutes Proteinpräparat sorgt.

### **3.4.3 Isolierung des Molybdän- und Wolfram-Speicherproteins**

Ausgehend von den vorherigen Optimierungsversuchen entschied ich mich für ein dreistufiges Reinigungsverfahren, das folgende Schritte beinhaltet:

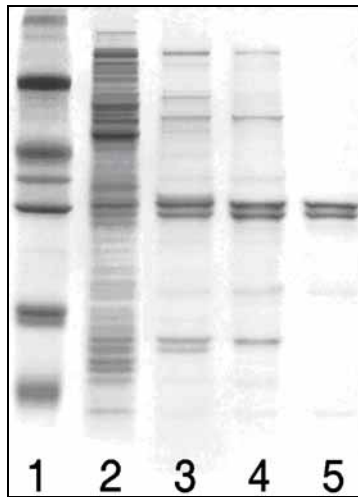
1. Stufe: Anionenaustauscherchromatographie (DEAE) des Proteinrohextrakts
2. Stufe: Aussalzen der DEAE gereinigten Proteinhauptfraktionen mit Ammoniumsulfat
3. Stufe: Gelfiltration

Die Verwendung der Ammoniumsulfat-Fraktionierung als mittlerer Schritt der Proteinreinigung diente einerseits zur Abtrennung niedermolekularer Spezies und andererseits zur Konzentrierung und Stabilisierung des Proteinextraktes. Entsprechende Vorversuche zur Ermittlung der benötigten Sättigungskonzentration von Ammoniumsulfat (Dissertation Dirk Fenske, 2004) ergaben einen Fällungsbereich bei 38%—51% Sättigung, da in diesem Bereich Proteinverluste ausgeschlossen werden konnten und Analysen der Fraktionen nicht notwendig waren. Zur Wiederaufnahme des Protein-Niederschlags nach der zweiten Fällungsstufe wurde ein Volumen von 2 mL Standardpuffer (50 mM MOPS, 50 mM NaCl, pH 6,5) gewählt um eine möglichst rasche Lösung des Zellpellets und ein geringes Auftragungsvolumen auf die Gelfiltrationssäule zu gewährleisten.

## Ergebnisse

---

Eine mögliche Alternative zum Aussalzen stellte die Ultrafiltration in einer Rührkammer (siehe Abschnitt 2.2.6) dar. Die Verwendung einer Amicon YM100 Membran (Ausschlussgröße 100 kDa) ließ eine Konzentrierung auf ein Restvolumen von 1mL zu. Allerdings war bei dieser Methode kein Reinigungseffekt zu beobachten. Die zu starke mechanische Beanspruchung der Proteine in der Lösung durch die Rührblätter und das Anhaften von Proteinbestandteilen an der Membran führten zu einem hohen Proteinverlust. Dieser bewog mich, die Ultrafiltration nach einigen Anreicherungen wieder aufzugeben und durch die ursprüngliche Ammoniumsulfat-Fraktionierung zu ersetzen. Die Reinigung des Speicherproteins konnte mittels SDS-PAGE (siehe Abbildung 3.5) sehr gut verfolgt werden.



**Abb. 3.5:** SDS-PAGE (Tris-Glycin-Puffersystem, Coomassie-Färbung) von Lösungen unterschiedlicher MoSto-Aufreinigungsschritte. Bahn 1: Molekulargewicht-Marker mit Banden (von oben nach unten) bei 66, 45, 36, 29, 20 und 14 kDa. Bahn 2: Zellfreier Rohextrakt. Bahnen 3-5: Proteinlösung nach DEAE-Chromatographie (3), Ammoniumsulfat-Fraktionierung (4) und Gelfiltration (5). MoSto zeigt eine charakteristische Doppelbande bei ungefähr 29 kDa (Fenske et al., 2005).

### 3.5 Molmassenbestimmung von MoSto und WSto

Frühere Untersuchungen zur Aufklärung der Untereinheitenstruktur und der Molmasse von MoSto mit Hilfe von SDS-PAGE, Gelfiltration und Massenspektrometrie waren die Grundlagen für weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Molmasse von WSto und des Gehalts an Mo in MoSto und W in WSto in unterschiedlichen Pufferlösungen.

#### 3.5.1 Gelfiltration

Die Größenausschlusschromatographie wurde nicht nur für präparative Zwecke benutzt, sondern auch zur Bestimmung der Molmasse, sowohl für MoSto als auch für das W-äquivalente Speicherprotein (WSto). Dabei wurden, wie schon im Abschnitt 2.3.5 erwähnt verschiedene Proteine als Eichsubstanzen verwendet. Zusätzlich wurden in den Gelfiltrationsläufen dem Standardpuffer auch ATP und  $MgCl_2$  (jeweils 1 mM) als Kosubstrate zugesetzt, um eine eventuelle Erhöhung oder Erniedrigung des Wolfram- und Molybdänanteils im Protein festzustellen. Durch die Eichgerade, die sich aus den einzelnen Retentionsvolumina (Tabelle 3.5) der Proteine zusammensetzt, ergeben sich die abgeleiteten Molekulargewichte (Tabelle 3.6).

**Tabelle 3.5:** Retentionsvolumina der S200-Gelfiltrationssäule.

Protein [kDa]	Retentionsvolumen [mL]
Dextranblau (2000 kDa)	116
Ferritin (443 kDa)	144
$\beta$ -Amylase (200 kDa)	164
ADH (150 kDa)	172
BSA (66 kDa)	196
Carboanhydrase (29 kDa)	212
Cytochrom C (12,4 kDa)	248
Natives MoSto	165
Natives WSto	162

**Tabelle 3.6:** Zusammenfassung der abgeleiteten Molekularmassen.

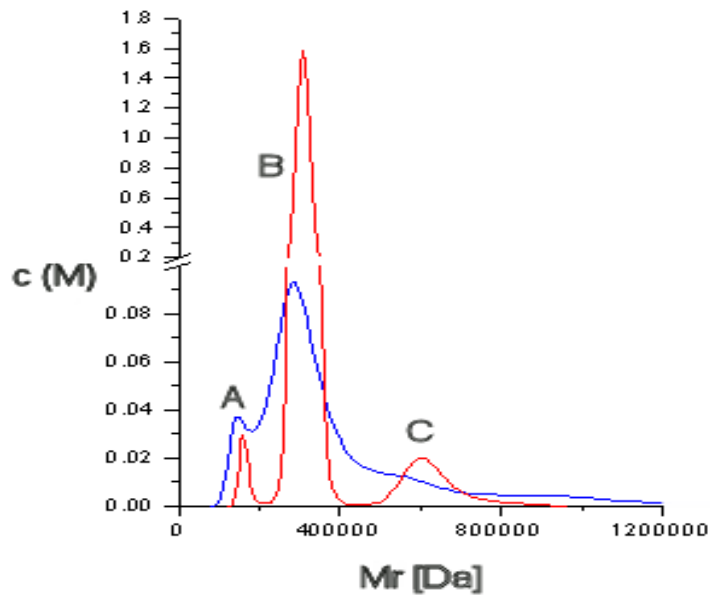
	Molekulargewicht [kDa]	Untereinheitenstruktur	Anzahl Mo-/W- Atome je Proteinmolekül
MoSto			
-ATP/MgCl <sub>2</sub>	248,263	$\alpha_4\beta_4$	58
+ATP/MgCl <sub>2</sub>	248,956	$\alpha_4\beta_4$	80
WSto			
-ATP/MgCl <sub>2</sub>	241,745	$\alpha_4\beta_4$	80
+ATP/MgCl <sub>2</sub>	226,215	$\alpha_4\beta_4$	106

Die analytische Gelfiltration lieferte somit Hinweise auf eine oktamere Struktur für MoSto und dem W-enhaltenen Speicherprotein (WSto) in Lösung. Man beobachtet auch eine erhebliche Zunahme des Mo- bzw. W-Gehalts in den entsprechenden Speicherproteinen, wenn die Säule mit ATP/MgCl<sub>2</sub>-haltigem Puffer äquilibriert und eluiert wurde.

### 3.5.2 Bestimmung der Molmasse durch analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Da durch die Gelfiltrationsmethode mögliche Komplikationen durch unkontrollierte Wechselwirkung mit dem Gelmaterial auftreten können, verwendete ich als ergänzende Messmethode zur Bestimmung der Molmasse des Speicherproteins (MoSto, WSto) die AUZ (siehe Abschnitt 2.3.6).

Die aus der Sedimentationskoeffizientenverteilung (s-Verteilung) ermittelte Teilchengrößenverteilung zeigte sowohl für das MoSto als auch für das W-haltige Speicherprotein (WSto) wesentlich höhere Molekularmassen für die Hauptpeaks als bei den Gelfiltrationsläufen (siehe Abbildung 3.6).



**Abb. 3.6:** Darstellung der Teilchengrößenverteilung (ausgehend von der s-Verteilung) nach Ultrazentrifugation einer gereinigten WSto- und MoSto-Probe. Aufgetragen wird die Verteilung des Sedimentationskoeffizienten der molaren Komponenten ( $c(M)$ ) gegen die Molmasse der Bestandteile ( $M_r$ ) in der Lösung. Man erkennt drei signifikante Peaks für MoSto (rot) und zwei für WSto (blau).

Neben einer höheren Proteinkonzentration von MoSto gegenüber WSto ( $\sim 1\text{mg/mL}$ ) sind drei verschiedene MoSto-Peaks, die unterschiedlichen Massen zugeordnet werden können, zu erkennen. Beim WSto ist nur ein kleiner Peak, der durch den WSto-Hauptpeak zum Teil überlagert wird, zu beobachten. Die Molmassen der Speicherprotein-Hauptpeaks liegen in der gleichen Größenordnung und stellen den Hauptbestandteil des Proteinpräparats dar.

**Tabelle 3.7:** Ermittelte Molmassen und Untereinheitenstrukturen von MoSto- und WSto.

Protein	Peak	Molmasse [kDa]	Untereinheitenstruktur
MoSto	A	170	$(\alpha\beta)_3$
	B	314	$((\alpha\beta)_3)_2$
	C	600	$((\alpha\beta)_3)_4$
WSto	A	168	$(\alpha\beta)_3$
	B	286	$((\alpha\beta)_3)_2$

Vergleicht man nun in der Tabelle 3.7 die Molmassen der Peaks A mit der mutmaßlichen Untereinheitenstruktur des Speicherproteins, so ergibt sich für die kleinste mögliche Untereinheit des nativen Speicherproteins im Gegensatz zur Gelfiltration ein Hexamer (172 kDa). Der Hauptproteinbestandteil setzt sich vermutlich aus einem Dodekamer (315 kDa) zusammen, da die Differenz der verschiedenen Peaks annähernd den Faktor 2 besitzen. Dieser Aufbau lässt sich auch beim Peak C als Tetracosamer (600 kDa) fortsetzen. Trotz alledem zeigen die Zahlen der Peaks B und C Abweichungen, die jedoch im Fehlerbereich von  $\leq 3\%$  liegen (siehe Abschnitt 2.3.6).

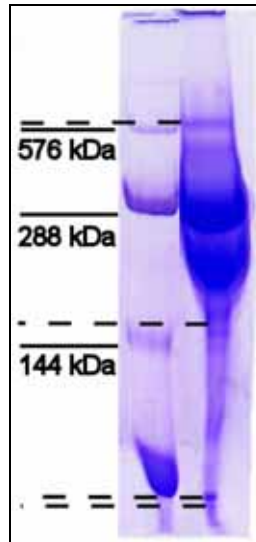
Unabhängig der bisherigen Ergebnisse lieferten die früheren Messungen der Molmasse von MoSto mit Hilfe der Kleinwinkelstreuung (SAXS) sehr gute Übereinstimmungen mit den Molmassenbestimmungen der Gelfiltrationsläufe (Fenske et al., 2005).

Berechnet man den Mittelwert der Molmassen zwischen den Peaks der Hauptproteinbestandteile (B) und den kleinen Anfangspeaks (A) von MSto und WSto der AUZ, entsprechen die Werte den Ergebnissen der Gelfiltration und SAXS ( $\sim 247$  kDa). Beide Methoden zeigen aufgrund Ihrer Methodik für den Fall des Speicherproteins nur eine gemittelte Molmasse, so dass die Annahme einer oktameren Untereinheitenstruktur für das MoSto und WSto im flüssigen Medium unter Vorbehalt angesehen werden muss.

Letztendlich lassen diese Ergebnisse keine endgültigen Schlüsse über die Proteinstruktur zu, sie ermöglichen aber einen ersten Einblick in die Zusammensetzung der Proteine von MoSto und WSto.

### **3.5.3 Bestimmung der Molmasse durch native Elektrophorese**

Die Ergebnisse der AUZ wurden durch die Molmassenbestimmung des W-enthaltenen Speicherproteins (WSto) zum Teil bestätigt (siehe Abbildung 3.7).



**Abb. 3.7:** Molmassenbestimmung der Proteinbestandteile des WSto (Konzentration: 10mg/mL) durch native Elektrophorese. Als Markermix (linke Bahn) wurde Ferritin (Konzentration:10mg/mL) als Monomer (144 kDa), Dimer (288 kDa) und Tetramer (576 kDa) aufgetragen. Die gestrichelten Linien heben die Proteinbanden auf der rechten Seite hervor und deuten die beiden  $\alpha$ -und $\beta$ -Untereinheiten (~30 kDa), die hexamere (~170 kDa), dodekamere (~285 kDa) und tetracosamere (~600 kDa) Form (von unten nach oben) an. Die Zwischenbanden im Speicherprotein stammen vermutlich von nicht identifizierten Proteinfragmenten.

Die teilweise kaum zu differenzierenden Banden erschwerten allerdings eine genauere Interpretation der Proteinbestandteile. Die folgende Tabelle 3.8 stellt die erhaltenen Ergebnisse der nativen Elektrophorese zusammen.

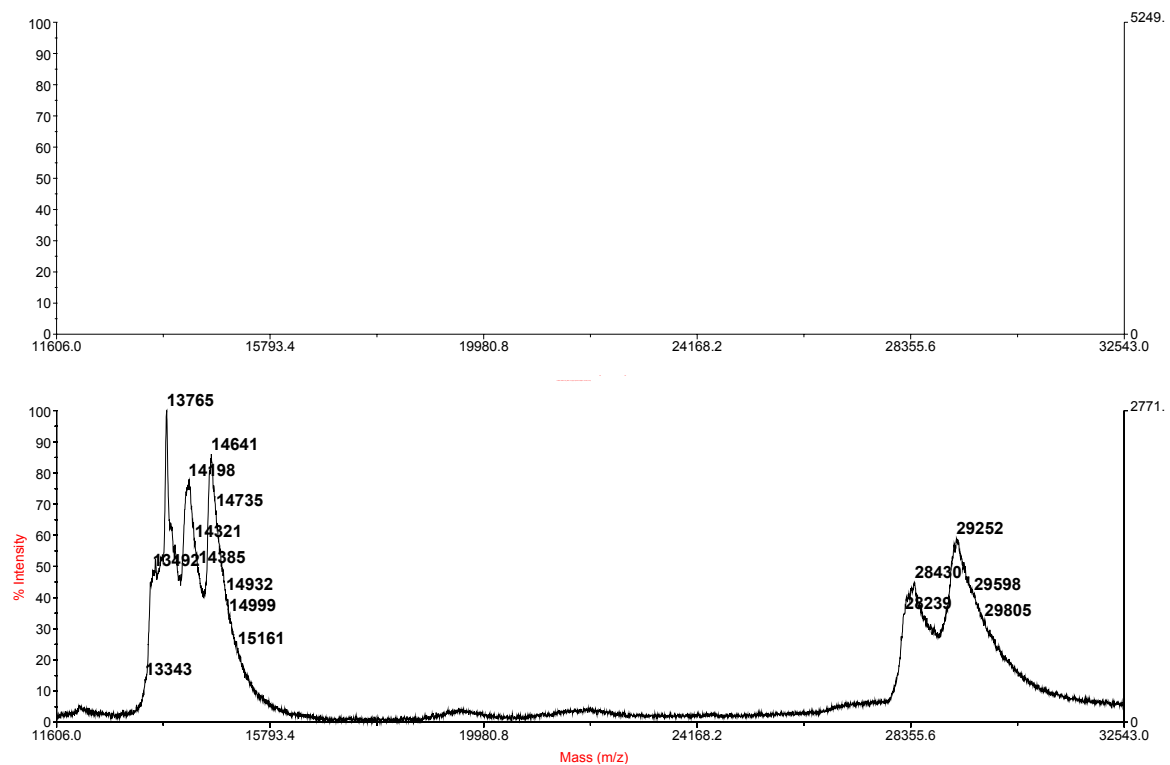
**Tabelle 3.8:** Ergebnisse der Molmassenuntersuchung von WSto durch native Elektrophorese.

Molmassen (kDa)	Untereinheitenstruktur
~30	$\alpha$ -und $\beta$ -Untereinheit
~170	Hexamer ( $\alpha_3\beta_3$ )
~285	Dodekamer ( $\alpha_3\beta_3$ ) <sub>2</sub>
~600	Tetracosamer ( $\alpha_3\beta_3$ ) <sub>4</sub>
~170	Hexamer ( $\alpha_3\beta_3$ )

### 3.5.4 Massenspektrum des nativen und Se-Methionin-haltigen Speicherproteins

Die für die Röntgenstrukturbestimmung notwendige Elektronendichte benötigte neben den direkt aus den Diffraktionsmessungen erhaltenen Strukturfaktor-amplituden ( $F_{hkl}$ ) auch die Phaseninformation, die wir durch die Methode der multiplen anomalen Streuung (MAD) erhielten. Anomale Streuung tritt bei Kristallen dann auf, wenn die Energie der Röntgenstrahlung in der Nähe der Absorptionskanten der im Kristall vorhandenen anomalen Streuer liegt (siehe Abschnitt 2.4.1). Gerade Selen ist trotz relativ schwacher anomaler und dispersiver Streubeiträge ( $\Delta f'_{\max} = 7,5e^-$  und  $\Delta f'' = 6,0e^-$ , K-Kante bei 0,979 Å) der beliebteste anomale Streuer (Ogata, 1998; Walsh et al., 1999). Durch Proteinexpression in methionin-auxotrophen Organismen oder durch Inhibition des Methionin-Anabolismus unter Zugabe von Seleno-Methionin lassen sich gezielt Seleno-Methionin-Derivate produzieren (Hendrickson et al., 1989; Doublet, 1997). Ein Vorteil der MAD-Methode ergibt sich aus der Tatsache, dass alle für die Phasierung notwendigen Daten mit Hilfe eines Kristalls erhalten werden können. Im Vergleich zur Methode des multiplen isomorphen Ersatz (MIR), ist die Qualität der Anfangsphasen in der Regel höher.

Der vollständige Einbau von Selenomethionin in das Molybdänspeicherprotein wurde mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie kontrolliert. Die gemessene Differenz in der schweren  $\alpha$ -Untereinheit betrug 257 Da, während sie in der leichteren  $\beta$ -Untereinheit nur 98 Da aufwies (siehe Abbildung 3.8). Da nun die Differenz zwischen Seleno-Methionin und Methionin 47 kDa beträgt, ergibt sich für die leichte Untereinheit ein Einbau von 78% und für die schwere Untereinheit von 52%. Die das W-enthaltende Speicherprotein (WSto) betreffenden Ergebnisse entsprachen im Fehlerbereich von 10 Da den Massen der Untereinheiten vom MoSto.



**Abb. 3.8:** MALDI-TOF-Massenspektrum der nativen (oben) und Se-Met-Form (unten) des MoSto. Die Kalibrierung erfolgte mit RSA  $[M+2H]^{2+}$ .

### 3.6 Immunologische Untersuchungen zur Regulation des MoSto

Frühere Untersuchungen zur Aufklärung der Rolle von Molybdän in der Stickstofffixierung zeigten, dass Molybdän in *Azotobacter vinelandii* akkumuliert wird, ungeachtet der entsprechenden Stickstoffquelle (Keeler et al., 1958). Dies zeigt, dass die Molybdänspeicherung in diesem Organismus nicht mit der Synthese der Nitrogenase koreguliert wird. Weitere Untersuchungen zeigten, dass das MoSto allerdings mit der konventionellen Mo-Nitrogenase koreguliert wird (Fenske et al., 2005).

Ein wichtiger Aspekt war die Fragestellung der Abhängigkeit zwischen Molybdänkonzentration und der MoSto-Synthese innerhalb der Zelle. Durch die Vermutung, dass die Mo-Regulation in einem extrem niedrigen (nanomolaren) Konzentrationsbereich stattfindet, wurden Molybdän-verarmte Nährlösungen, sowie Molybdän-freie Glasgeräte benötigt (siehe Abschnitt 2.2.2).

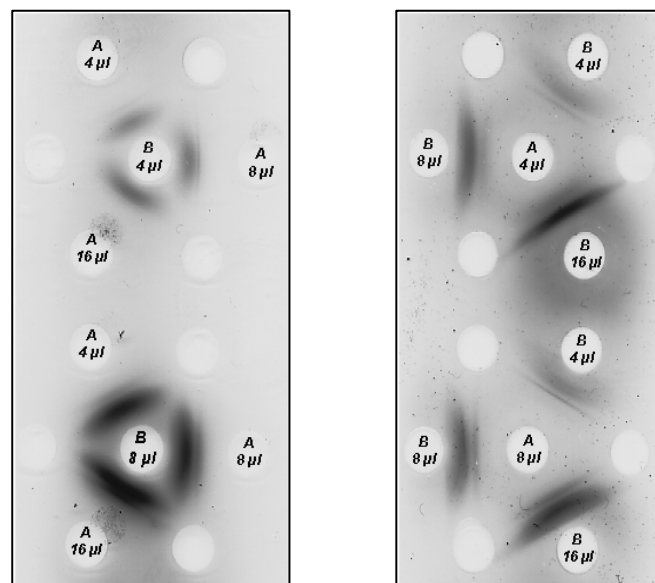
### 3.6.1 Vorversuche mit Hilfe des Doppelimmundiffusionstests (Ouchterlony)

Mit Hilfe des Ouchterlony-Doppelimmundiffusionstests wurde das optimale Verhältnis zwischen der Antikörper (AK)- und Antigenkonzentration (AG) ermittelt. Als Antikörper wurden polyklonale, monospezifische Kaninchenantikörper (anti-MoSto-IgG) eingesetzt, das Antigen repräsentierte das aufgereinigte Molybdänspeicherprotein (MoSto). Es wurden zunächst die Antikörper verschiedener Seren getestet.

Um andere eventuell störende Proteine zu identifizieren, wurden „Nullseren“ mit zellfreiem Proteinrohextrakt durchgeführt. Die ersten Versuche mit Nullseren (78s<sub>0</sub>) zeigten keine Präzipitation.

Alle Banden waren in den ersten Vorversuchen mit isoliertem Protein (siehe Abschnitt 2.3.4) noch sehr schwach, so dass eine Nachimmunisierung notwendig wurde. Die aufgereinigten Proteinlösungen wurden auf ein Fünftel mit einem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Tris-Puffer, pH 7,6, verdünnt.

Die darauf folgenden Seren erzeugten Präzipitationen (78s<sub>1</sub>-78s<sub>3</sub>) mit Doppelbanden (siehe Abbildung 3.9).



**Abb.3.9:** Ouchterlony-Tests (I) zur Optimierung des AK:AG-Verhältnisses mit dem Serum 78S<sub>2</sub>. Dabei entspricht 78 der Kaninchenummer und S<sub>x</sub> dem nach x Wochen entnommenen und aus dem Blut isolierten Antikörpern. A: Antigen (MoSto) und B: Antikörper.

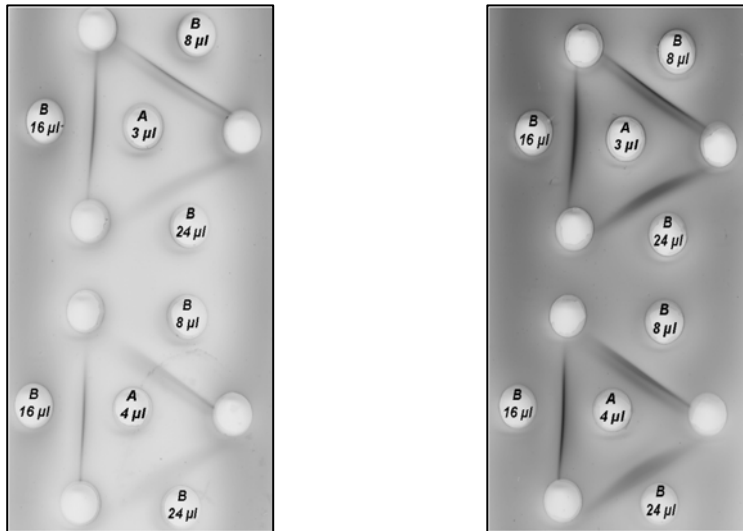
## Ergebnisse

---

Zur Optimierung der AK:AG-Verhältnisse mit den Antikörperseren (78s<sub>1</sub>-78s<sub>6</sub>) wurden folgende Volumina eingesetzt (µL):

<b>AK</b>	<b>AG</b>
1	1
1	2
1	4
2	1
4	1
8	3
16	3
24	3

Die Abbildungen zeigen, dass die Antikörperkonzentration im Vergleich zur Proteinkonzentration zu hoch war. Deshalb traten sehr intensive aber auch diffuse Banden auf. Die Doppelbanden deuteten eine unspezifische Bandentrennung der beiden Untereinheiten des Proteins an. Die stufenweise Erhöhung der Proteinkonzentration ergab bei einer Konzentration von 3mg/mL optimale Immunodiffusionsbanden, wenn das AK:AG-Verhältnis von 1:4 betrug (siehe Abbildung 3.10). Die Präzipitationsbande zog bei diesen Konzentrationsverhältnissen eine gerade Linie genau in der Mitte zwischen den beiden runden Vertiefungen, in denen sich das Antikörperserum (randständige Vertiefungen) und MoSto (zentrale Vertiefung) befand.



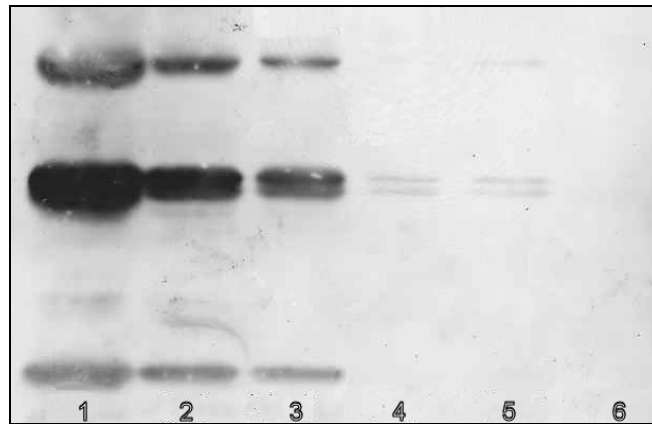
**Abb.3.10:** Ouchterlony-Tests (II) mit den Antikörperseren (78s<sub>4</sub>, 78s<sub>6</sub>) zur Optimierung des AK:AG-Verhältnisses. 78s<sub>4</sub>: linkes Gel; 78s<sub>6</sub>:rechtes Gel.

### 3.6.2 Untersuchungen mit Hilfe des Westernblots

Nach den erfolgreichen Ouchterlony-Tests untersuchte ich mit Hilfe eines Western Immunoblots zunächst die Konzentrationsverhältnisse zwischen MoSto und Antikörper (78s<sub>6</sub>). Dabei verwendete ich zunächst (siehe Tabelle 3.9) verschiedene Verdünnungsfaktoren.

**Tabelle 3.9:** Verdünnungsreihe zur Ermittlung der optimalen Proteinkonzentration (2mg/mL) für die anschließenden Regulationsversuche.

Probe	Verhältnis Protein : Puffer	Proteinmenge [µl]	Puffermenge [µl]
1	0	70	0
2	1:5	14	56
3	1:10	7	63
4	1:100	7	693
5	1:500	10	4990
6	1:1000	10	9990

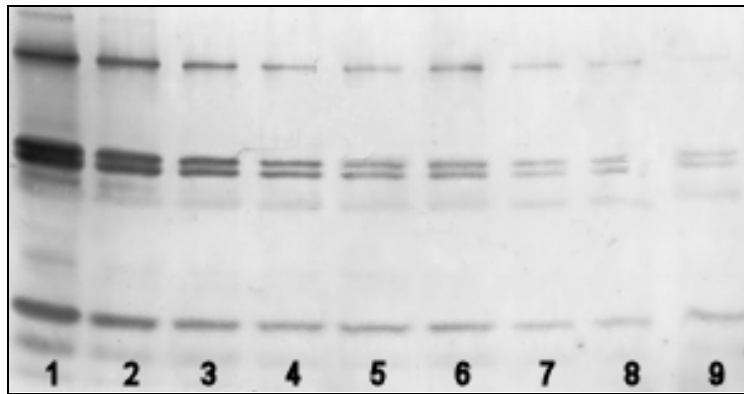


**Abb.3.11:** Western Blot mit unterschiedlichen Protein/Puffer-Verhältnissen (bis 1:1000-Verdünnung). Die Probennummern der Verdünnungsreihe entsprechen den Mengen, die in obiger Tabelle angegeben wurden. Die eingesetzte AK-Menge wurde in allen Proben konstant gehalten. Die zu erkennende Doppelbande repräsentiert die beiden Untereinheiten des MoSto.

Der Westernblot (siehe Abbildung 3.11) zeigte, dass sich das optimale Verhältnis zwischen MoSto und Antikörper zwischen 1:10 und 1:100 befand. Ich untersuchte diesen Bereich durch einen erneuten Western Immunoblot und verwendete (siehe Tabelle 3.10) folgende Protein/Puffer-Verhältnisse:

**Tabelle 3.10:** Verfeinerte Verdünnungsreihe für die Regulationsversuche mit MoSto.

Probe	Verhältnis Protein : Puffer	Proteinmenge [µl]	Puffermenge [µl]
1	1:10	7	63
2	1:20	7	133
3	1:30	7	203
4	1:40	7	273
5	1:50	7	343
6	1:60	7	413
7	1:70	7	483
8	1:80	7	553
9	1:90	7	623



**Abb. 3.12:** Western Blot der zweiten Protein/Puffer-Verdünnungsreihe (bis 1:90 Verdünnung). Die Probennummern in der Abbildung entsprechen wieder den Mengenverhältnissen in obiger Tabelle.

Das optimale Verdünnungsverhältnis zwischen Protein/Puffer (siehe Abbildung 3.12) betrug schließlich 1:20.

### 3.6.3 Immunologischer Nachweis der Mo- abhängigen Induktion von MoSto

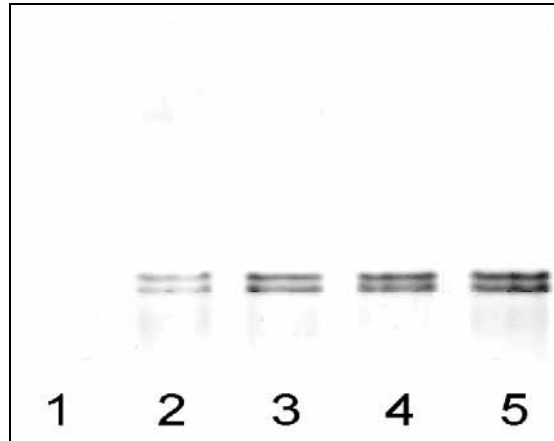
Um nun die Abhängigkeit der Molybdänkonzentration von der MoSto Synthese untersuchen zu können wurden, wie bereits im Abschnitt 2.1.2.1.1 beschrieben, Molybdän-defiziente *Azotobacter vinelandii* (*A.v.*)-Nährlösung hergestellt. Zu jeweils 10 mL dieser Nährlösung (siehe Abschnitt 2.1.2.1.3) wurden mit 1 mL einer 1,6 M Phosphatpufferlösung und eine genau definierte Menge Molybdatlösung zugegeben und dann mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 mL aufgefüllt. Auf diese Weise wurden 5 verschiedene Mo-Konzentrationen (0, 1, 2, 10, 50 nM) für fünf verschiedene Anzuchten eingestellt. Daraufhin wurde bei einem pH-Wert von 8,3 pro Anzucht 1,8 mL einer 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben. Die Nährlösung wurde zum Abschluss steril filtriert. Zur Herstellung einer Mo-verarmten Vorkultur wurde zunächst eine Vorkultur mit Zellen, die Ammonium als Stickstoffquelle, aber kein Molybdät enthielten beimpft und anschließend eine weitere Vorkultur mit Zellen (OD<sub>436</sub>~9) der vorherigen Vorkultur angeimpft. Schließlich wurden noch fünf verschiedene für die Hauptkulturen vorbereitete *A.v.*-Nährlösungen mit der Mo-verarmten Vorkultur (jeweils 2 mL) angeimpft (siehe Abschnitt 2.1.3.3).

Entsprechend den oben dargestellten Ergebnissen der Vorversuche wurde nach Zellernte und -aufschluss die Proteinkonzentration auf ein zwanzigstel (0,4 mg/mL)

## Ergebnisse

---

mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ /Tris-Puffer verdünnt. Der anschließende Westernblot (siehe Abbildung 3.13) zeigte einen deutlichen Einfluss der Molybdänkonzentration auf die Bildung des Molybdänspeicherproteins.



**Abb.3.13:** Westernblot-Analyse der Abhängigkeit der MoSto-Expression vom Molybdätkonzentration der Nährlösung. Folgende Mo-Konzentrationen wurden in den Kulturen benutzt: ohne zugesetztes  $\text{MoO}_4^{2-}$  (Bahn 1); 1 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  (Bahn 2); 2 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  (Bahn 3); 10 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  (Bahn 4); 50 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  (Bahn 5).

Während nach Anzucht der Zellen in Abwesenheit von zugesetztem Molybdat kein MoSto nachweisbar war, zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 1 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  schon recht deutlich ein Nachweis feiner MoSto-Banden ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten). Der Anstieg des MoSto-Gehalts setzte sich bis zu einer Konzentration von 10 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  kontinuierlich fort. Zwischen 10 und 50 nM war keine nennenswerte Änderung zu beobachten, was ich auf eine Sättigung der MoSto-Bildung schloß. Weitere Versuche, eine noch genauere Mo-Abhängigkeit (0-1 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ ) der MoSto-Bildung zu ermitteln, scheiterten aufgrund der schlechten Interpretierbarkeit der Ergebnisse und der in diesen Bereichen wohl zu unempfindlichen Methode. Eindeutig fest steht allerdings, dass sich MoSto nur in Anwesenheit von  $\text{MoO}_4^{2-}$  bildet. Die Ergebnisse wurden auch beim nativen Westernblotting bestätigt, so dass damit auch feststeht, dass intaktes Holoprotein exprimiert wird.

### **3.7 Freisetzungsmechanismus von $\text{MoO}_4^{2-}$ und $\text{WO}_4^{2-}$ im Speicherprotein**

Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Funktion des Speicherproteins in der Zelle sind Experimente, die einerseits die Freisetzung des Molybdäns und des Wolframs, und andererseits den Wiedereinbau der beiden Elemente zur Rekonstitution des Holo-Proteins beschreiben. Dieser Abschnitt befasst sich mit dem Freisetzungsmechanismus während im Abschnitt 3.9 die Untersuchung des Mo-Einbaus den Schwerpunkt bildet.

Als Grundlage der folgenden Untersuchungen dienten frühere Tests mit vorgereinigtem zellfreiem Extrakt (durch Ammoniumsulfat-Fällung von niedermolekularen Substanzen befreit); im Folgenden als Protein-Rohextrakt bezeichnet. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde die Stabilität der Mo-Bindung in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht (Diplomarbeit Volker Henschel, 2003). Dabei wurde ein Stabilitätsbereich von pH 7,0 bis 6,5 ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung in hohem Maße vom pH-Wert abhängig ist und bei einem pH-Wert von 7,5 die Mo-Freisetzung quantitativ verläuft. Versuche, bei denen Wolfram im Speicherprotein gegen Molybdän ausgetauscht wurde (Allen et al., 1999), zeigten, dass ATP zur Stabilität des Holo-Proteins auch bei pH-Werten im alkalischen Bereich beiträgt.

Die grundlegenden Bedingungen und die einzelnen Schritte der Probenvorbereitung wurden bereits beschrieben. Für die folgenden Versuche wurden jeder der einzelnen Parameter, pH-Wert, Temperatur und Inkubationszeit einzeln variiert (siehe Abschnitt 2.2.5.1).

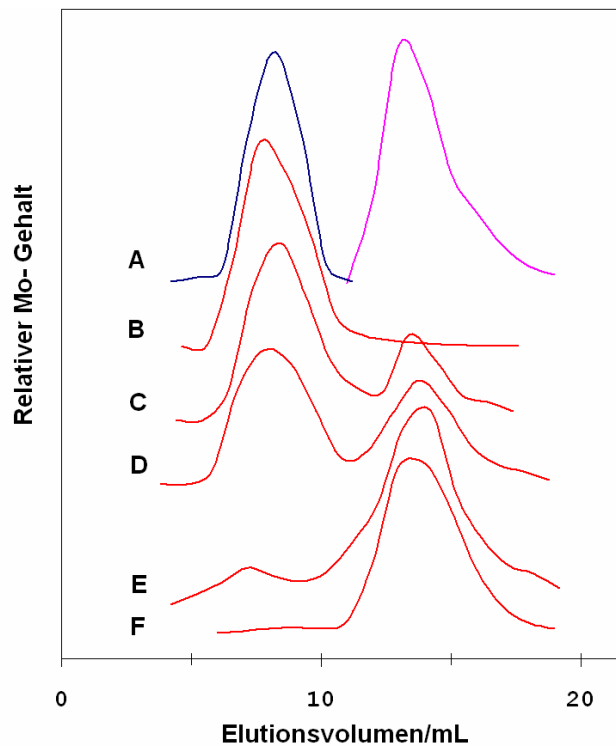
Voruntersuchungen zeigten, dass der Protein-Rohextrakt eine geringere Neigung zur Mo-Freisetzung hat als aufgereinigtes Protein. Allerdings bestehen beim Einbau von Molybdän keine Unterschiede, so dass man davon ausgehen kann, dass die Anwesenheit anderer Proteine sich stabilisierend auf das Holo-MoSto auswirkt.

#### **3.7.1 Die pH-regulierte Freisetzung des Molybdäns im Speicherprotein**

Neben Faktoren wie Temperatur, Inkubationszeit, Proteinkonzentration und Qualität der Präparation (Reinheit, Stabilität), die die Mo-Freisetzung beeinflussen, gilt vor allem die Veränderung des pH-Werts innerhalb des Bereichs von 6,5 bis 7,6 als Hauptauslöser des Molybdän-Freisetzungsmechanismus.

Bei den Studien wurde isoliertes Protein mit einer hohen Homogenität sowie Stabilität und einer Konzentration von  $\sim 1,5$  mg Protein/mL verwendet. Die Messung

ergab allerdings immer einen geringen Gehalt an freiem Molybdat (5-8% des Protein-gebundenen Molybdäns). Weitere Schwierigkeiten eine recht störungsfreie Betrachtung der unterschiedlichen pH-Bereiche zu gewährleisten waren unter anderem die Temperatureinflüsse, die u. a. schon bei oder über 20°C eine bedeutende Zunahme der Mo-Freisetzung verzeichneten. So betrug die Mo-Freisetzung selbst bei dem pH-Wert von 6,5 und einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 20°C 25%, und bei 30°C sogar ~40%. Um die wirkliche Beziehung zwischen dem pH-Wert und dem Mo-Freisetzungsprozess zu charakterisieren, wurde eine detaillierte pH-Abhängigkeitsstudie bei 12°C durchgeführt um Temperatur bedingte störenden Einflüsse zu minimieren (siehe Abbildung 3.14).

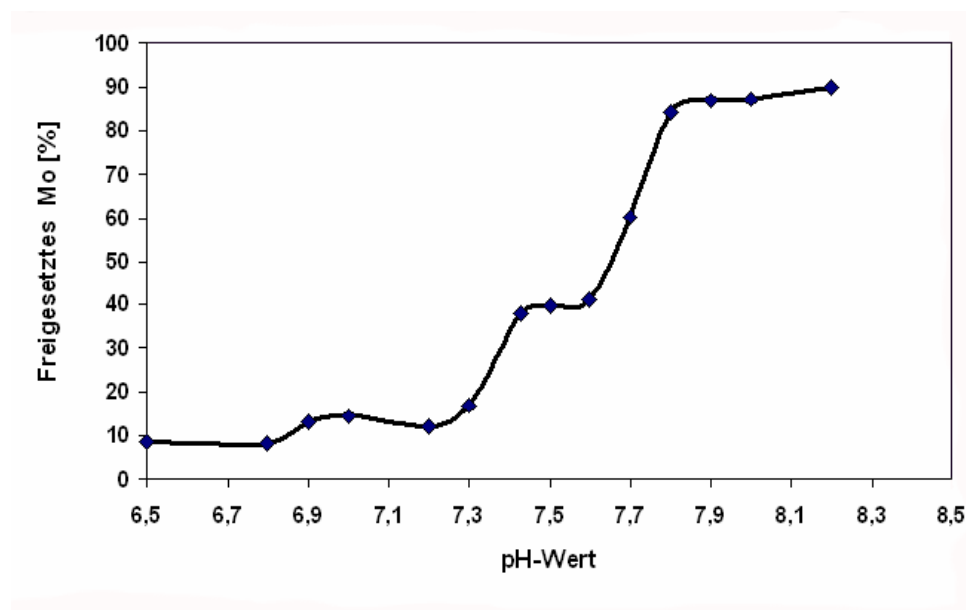


**Abb. 3.14:** Die Darstellung zeigt eine Auswahl von Molybdän-Elutionsprofilen nach dem Sephadex G-25-Säulenlauf bei verschiedenen pH-Werten. A: Referenzlauf, Proteinpeak (blau) und freies Molybdat (magenta). B-E: Mo-Elutionsprofile des Speicherproteins (1h Inkubation bei 12 °C), die durch die Vorbehandlung des Speicherproteins (1h; Inkubation bei 12°C) und den Säulenlauf bei unterschiedlichen pH-Werten zustande kommen. B: pH 6.5; C: pH 7.3; D: pH 7.5; E: 7.8; F: pH 7.6 (1h bei 30°C).

## Ergebnisse

Nach einer Standard-Inkubationszeit von 1 Stunde bei 12°C war keine messbare Mo-Freisetzung zwischen pH 6,5 und 6,8 zu beobachten. Im weiteren Verlauf der pH-Titration stellte sich heraus, dass die Schlussfolgerungen vorausgehender Arbeiten (Fenske et al., 2005), die ausschließlich bei 30°C durchgeführt wurden und einen so genannten „switch on“-Mechanismus in einem engen pH-Bereich oberhalb 7,1 postulierten, nicht korrekt waren.

Die Freisetzung verläuft nämlich in drei Schritten. Der erste sehr schwache Anstieg des freigesetzten Molybdäts wurde im Bereich zwischen pH 6,8 – 7,0 beobachtet, gefolgt vom erheblich stärkeren Anstieg (ca. 40%) zwischen 7,2-7,5. Der dritte Schritt beinhaltete den schnellsten und stärksten Anstieg der Mo-Freisetzung. Man erkennt in der Abbildung 3.15, dass die pH-Regionen zwischen den Freisetzungsstufen (7,0-7,2; 7,5-7,6; >7,8) durch kleine Phasen stabilen MoSto-Proteins charakterisiert werden, in denen keine zusätzliche Mengen an Molybdän freigesetzt werden. Diese Plateaus signalisieren vermutlich Gleichgewichtszustände von Deprotonierungsreaktionen zwischen basischen Aminosäuren und dem Molybdän- bzw. Wolframcluster. Innerhalb des physiologischen akzeptablen pH-Bereichs findet bei 12°C keine vollständige Freisetzung statt. Dies bedarf schon einer Temperaturerhöhung auf 16°C oder mehr.



**Abb 3.15:** Die pH-Abhängigkeit des freigesetzten Molybdäns bei 12°C. Die einzelnen Messpunkte sind durch Quadrate gekennzeichnet.

### 3.7.2 Temperatur und Inkubationszeit

Wie bereits erwähnt, gibt es neben dem pH-Wert einen weiteren wichtigen, die Mo-Freisetzung beeinflussenden Faktor, die Inkubationstemperatur. Besonders deutlich wird der Temperatureinfluss bei unterschiedlichen pH-Werten in der folgenden Tabelle 3.11.

**Tabelle 3.11:** Einfluss der Temperatur und Inkubationszeit auf die Freisetzung von Molybdän in MoSto.

Bedingungen		Mo-Freisetzung
Konstant	Variabel	[%]
pH 6,5 1h Inkubationszeit	12°C	Spuren ≤ 1%
	16°C	26
	30°C	56
pH 7,6 1h Inkubationszeit	12°C	41
	20°C	92
	30°C	~ 100
pH 7,6 30°C	15 min. Inkubationszeit	55
	30 min. Inkubationszeit	76
	60 min. Inkubationszeit	~ 100

Bereits ein pH-Wert von 6,5, der bei 12°C noch keine messbare pH- abhängige Mo-Freisetzung zeigt, führt bei einer Temperatur von 30°C und einer Inkubationszeit von 1 Stunde zur Freisetzung von 56% des MoSto gebundenen Molybdäns. Bei einem pH-Wert von 7,6 (dem Standard-pH-Wert für „Freisetzungsexperimente“) ist die Freisetzung quantitativ. Man kann die Einflüsse von pH-Änderung und Temperatur vergleichen, indem man Werte heranzieht, bei denen entweder die Temperatur oder der pH-Wert ohne wesentlichen Einfluss auf die Mo-Freisetzung sind.

- pH 8,0, 12°C → ~ 90% Mo-Freisetzung
- 30°C, pH 6,5 → ~ 55% Mo-Freisetzung

Die beiden obigen exemplarischen Beispiele, deren Inkubationszeit jeweils 1 Stunde betrug, zeigten bei einem hohen pH-Wert in Kombination mit einer sehr niedrigen Temperatur eine fast quantitative Freisetzung, während bei einer hohen Temperatur und niedrigem pH-Wert eine wesentlich geringere Freisetzungseigung zu

beobachten war. Diese Untersuchungen bestätigten die frühere Annahme (Fenske et al., 2005), dass der ausschlaggebende Effekt die pH-Änderung ist. Offensichtlich ist die Mo-Freisetzung keine sehr schnelle Reaktion, so dass die Reaktionsrate merklich gesteigert werden kann durch die Verlängerung der Inkubationszeit. Bei pH 7,6 und 30°C liefert eine einstündige Inkubationszeit eine komplette Freisetzung von Mo aus MoSto ohne die begleitenden Effekte wie Inaktivierung oder gar Denaturierung des entstandenen Apoproteins.

### **3.7.3 Proteinkonzentration**

Wie schon bei den Versuchen mit Protein-Rohextrakt feststellte wurde, spielt die Proteinkonzentration auch eine Rolle bei der Stabilität der Mo-Bindung im Holoprotein, wenngleich keine so entscheidende, wie dies bei der Protonenkonzentration (pH-Wert), der Temperatur und der Inkubationszeit der Fall ist. Eine Verringerung der Proteinkonzentration unterstützt die Mo-Freisetzung, während ein Anstieg umgekehrt einen offensichtlichen Schutzeffekt auf das Mo-Bindungszentrum zur Folge hat. Einige Messreihen bestätigten diese Annahme. Durch Inkubation der Proben bei 20°C für 30 Minuten (pH 7,6) ergab sich bei einer Proteinkonzentration von 0,25 mg/mL eine 70%ige, bei 1mg/mL eine 42%ige und bei 4mg/mL nur eine 36%ige Mo-Freisetzung.

### **3.8 Untersuchungen zur Stabilität des Apoproteins von MoSto**

Um ein homogenes, 100 % Mo-freies Apoprotein zu erzeugen, sind, wie bereits festgestellt wurde, ziemlich drastische Bedingungen (1h Inkubation bei 30°C) notwendig. Diese können zu einer teilweisen Schädigung des Speicherproteins führen. Es wurden Untersuchungen hinsichtlich der Stabilität und der molekularen Eigenschaften (Größe, Zusammensetzung der Untereinheit) durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Verlust oder Mangel an Mo-O-Clustern zu einer Destabilisierung und einem Verlust der kompakten Proteinstruktur führt.

Es wurde darüber hinaus beobachtet, dass eine verdünnte Apoprotein-Lösung (< 2mg/mL) nach einigen Stunden Lagerung bei Raumtemperatur sowie bei 4°C präzipitierte. Die einzige Möglichkeit, ein Ausflocken des Proteins zu verhindern und das Apo-MoSto zu stabilisieren, war die Konzentrierung der Proteinlösung mit Hilfe einer Ultrafiltration oder durch Ammoniumsulfat-Fällung unmittelbar nach seiner Bildung.

Weitere Gelfiltrations-Experimente (Superdex 200) konnten eindeutig zeigen, dass trotz der höheren Instabilität des Apoproteins im Vergleich zum Holoprotein keine Dissoziation in Untereinheiten, Untereinheiten-Dimere oder Tetramere stattfindet, sondern die native Struktur intakt bleibt. Gelelektrophorese-Untersuchungen untermauerten dieses Ergebnis.

### **3.9 Mechanismus des Einbaus von $\text{MoO}_4^{2-}$ und $\text{WO}_4^{2-}$ im Speicherprotein**

Aus früheren Untersuchungen (Fenske et al., 2005) wurde bereits ersichtlich, dass die pH-abhängige Freisetzung des Molybdäns im MoSto irreversibel verläuft. Wurde der pH-Wert nach der Freisetzung wieder auf 6,5 herabgesetzt, erfolgte ungeachtet der Temperatur und Inkubationszeit, kein Wiedereinbau von Molybdän in das Protein.

Der Mo-Bindungsprozess beinhaltet die Bindung des Molybdäns am Protein und die Biosynthese der postulierten Mo-oxid-Cluster aus Molybdaten im Protein. Die Experimente zeigten, dass der Einbau sehr stark abhängig ist von der Anwesenheit eines Nukleotids (vorzugsweise ATP) und  $\text{MgCl}_2$ .

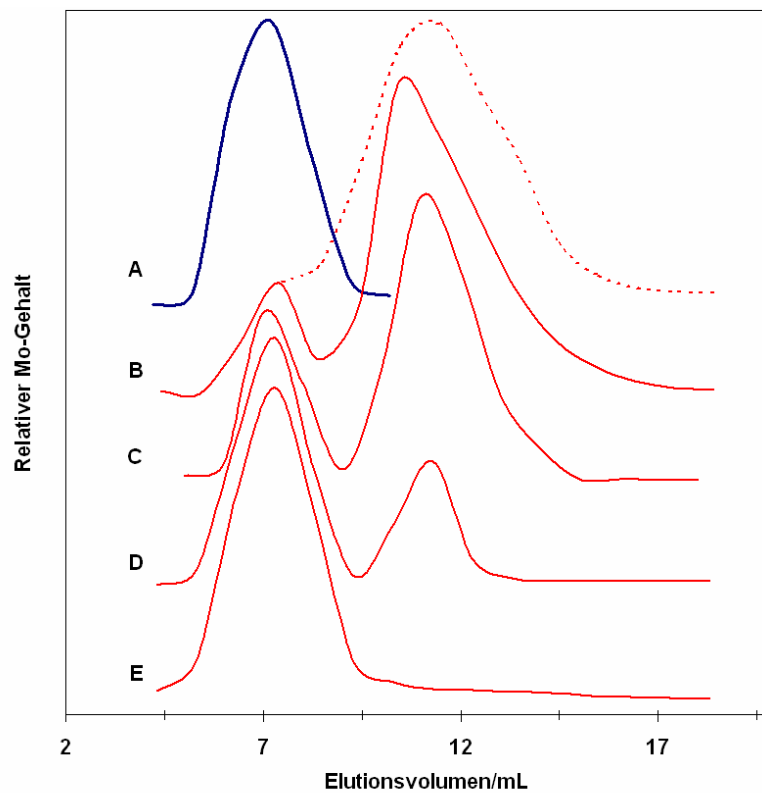
#### **3.9.1 Abhängigkeit des Mo-Einbaus von der ATP-Konzentration**

Die Abbildung 3.16 zeigt die Abhängigkeit des Grades der Mo-Bindung von der ATP-Konzentration. Bei Konzentrationen, die kleiner als 0,05 mM waren, konnte ich nur eine geringfügige Menge an wieder eingebautem Mo in das Apoprotein beobachten. Bei 0,5 mM ATP war der Anteil von wieder eingebautem Mo auf 40%, bei 0,7 mM auf ~ 60% gestiegen und bei 1mM oder höheren ATP-Konzentrationen war der Mo-Wiedereinbau und die Rekonstitution des Holoproteins quantitativ (siehe auch Tabelle 3.2).

Weitere Messungen zur Abhängigkeit der Holoproteinbildung (prozentualer Mo-Einbau) von der ATP-Konzentration ergaben eine sigmoide Kurve, die eine positiv-kooperative Bindung des ATP-Kosubstrats am Mo-Cluster-Protein-Komplex vermuten lässt.

Neben dem 100%igen Mo-Einbau unter Standardbedingungen (1 Stunde bei 30°C) beobachtete ich einen 90%igen Mo-Einbau bei wesentlich moderateren Bedingungen

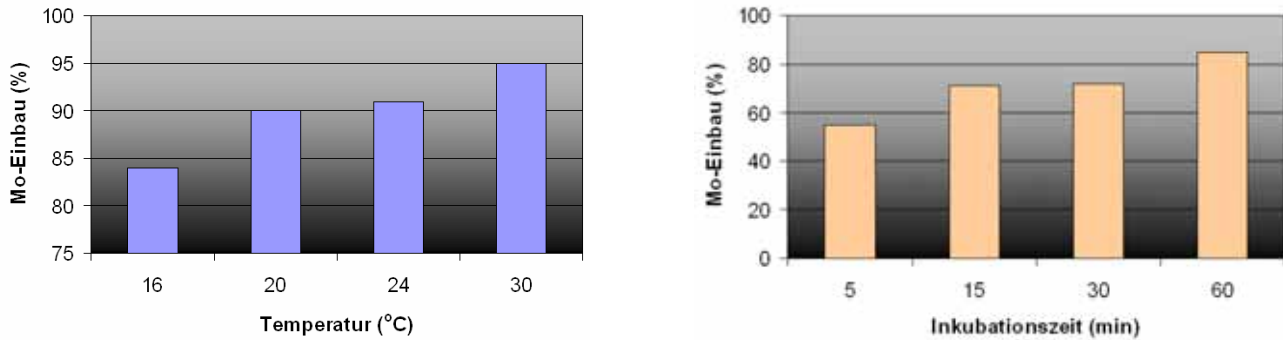
(15 Minuten bei Raumtemperatur). Leider ließ sich der Mo-Einbau aufgrund des präparativen Ablaufs nicht über sehr kurze Zeiträume ( $\leq 5$  Minuten) messen.



**Abb. 3.16:** Darstellung der Elutionsprofile des ATP-abhängigen Einbaus in das Apo-Protein in vitro nach dem Sephadex G -25-Säulenlauf. Die zuerst durchgeführte Mo-Freisetzung fand unter Standardbedingungen (30°C, 1h, pH 7,6) statt. Für den anschließenden Mo-Wiedereinbau wurde neben ATP, Standardpuffer (50 mM MOPS, pH 6,5) und 1 mM MgCl<sub>2</sub> verwendet. A: Referenz des Proteins (blau) und des monomolekularen Molybdat (rot gestrichelt). B: 0,1 mM ATP; C: 0,5 mM ATP; D: 0,7 mM ATP; E: 1 mM ATP.

Ein weiteres sehr bemerkenswertes Ergebnis ist, dass, im Gegensatz zur Mo-Freisetzung, der Mo-Bindungsprozess im Bereich von 6,5-8,0 vollkommen vom pH-Wert unabhängig ist. Versuche mit verschiedenen Temperaturen (16-30°C) und Inkubationszeiten (5-60 Minuten) erbrachten dagegen eine, wenn auch nur unerhebliche Abhängigkeit (siehe Abbildung 3.17).

## Ergebnisse



**Abb. 3.17:** Das linke Balkendiagramm stellt die Abhängigkeit des Mo-Einbaus von der Temperatur bei konstanter Inkubationszeit (15 Minuten) dar. Das Balkendiagramm auf der rechten Seite zeigt die Abhängigkeit des Mo-Einbaus von der Inkubationszeit bei 20°C. In beiden Fällen verwendete ich eine Proteinkonzentration von 1mg/mL, sowie 1mM ATP und 1mM MgCl<sub>2</sub> bei einem pH-Wert von 6,5.

### 3.9.2 Austausch von ATP durch andere Nukleotide

Um nun zu überprüfen, ob die Mo-Bindung in MoSto spezifisch abhängig ist von ATP, oder ATP durch andere Nukleotide ersetzt werden kann, wurden analoge Experimente mit AMP, ADP und GTP durchgeführt. Im Gegensatz zu ADP und GTP, die ATP zum Teil ersetzen können, ist AMP nicht in der Lage, Molybdän in das Apo-MoSto einzubauen. Tabelle 3.12 zeigt, dass die Anwesenheit der beiden ATP-äquivalenten Nukleotide dem Apoprotein auch den Wiedereinbau von Molybdän ermöglicht. Allerdings ist deren Effektivität sehr viel geringer als die des ATP. Während im Fall des ADP eine 5-fach höhere Konzentration (5mM) benötigt wird, um eine annähernd komplette Mo-Aufnahme zu erzielen, besitzt GTP nur bei geringeren Konzentrationen eine vergleichbare Effektivität wie ATP (45% Mo-Bindung bei 0.5 mM GTP). Bei 1 mM oder höheren Konzentrationen hat GTP eine hemmende Wirkung auf die Mo-Bindung.

**Tabelle 3.12:** Vergleich der Effektivität von ATP, ADP und GTP bezogen auf den Mo-Wiedereinbau in das Apo-MoSto. Die Proben wurden 1h bei 30°C und unter Anwesenheit verschieden konzentrierter Nukleotide inkubiert. Alle Proben enthielten zusätzlich 1 mM MgCl<sub>2</sub>.

<b>Nukleotide</b>	<b>Mo-Wiedereinbau</b>
	[%]
0,5 mM ATP	40
0,7 mM ATP	62
1 mM ATP	~ 100
1 mM ADP	34
5 mM ADP	97
0,5 mM GTP	45
1 mM GTP	36
5 mM GTP	9

### 3.10 Mo-Bindungskapazität- und Metallaustausch-Studien

Ein weiterer wichtiger Punkt waren die experimentell besten Bedingungen, die es erlaubten, die maximale Mo-Bindungskapazität des Speicherproteins zu ermitteln. Die bisherigen Ergebnisse der MoSto-Anreicherungen (nach DEAE und Gelfiltration) ergaben einen durchschnittlichen Mo-Gehalt von 40, bei WSto gar von 70 Atomen. Allerdings waren die Methoden leider auch mit Mo-Verlusten verbunden. Zusätzlich galt es zu überprüfen, ob das Speicherprotein in der Lage ist, dem Molybdän verwandte Metalle, wie Wolfram, Vanadium oder Rhenium einzubauen. Zellanzuchten unter Mo-defizienten Bedingungen zeigten bereits, dass der in-vivo-Einbau von Wolfram in das Speicherprotein im Verlauf der Protein-Biosynthese erfolgreich war.

#### 3.10.1 Ermittlung maximaler Mo-Bindungskapazität

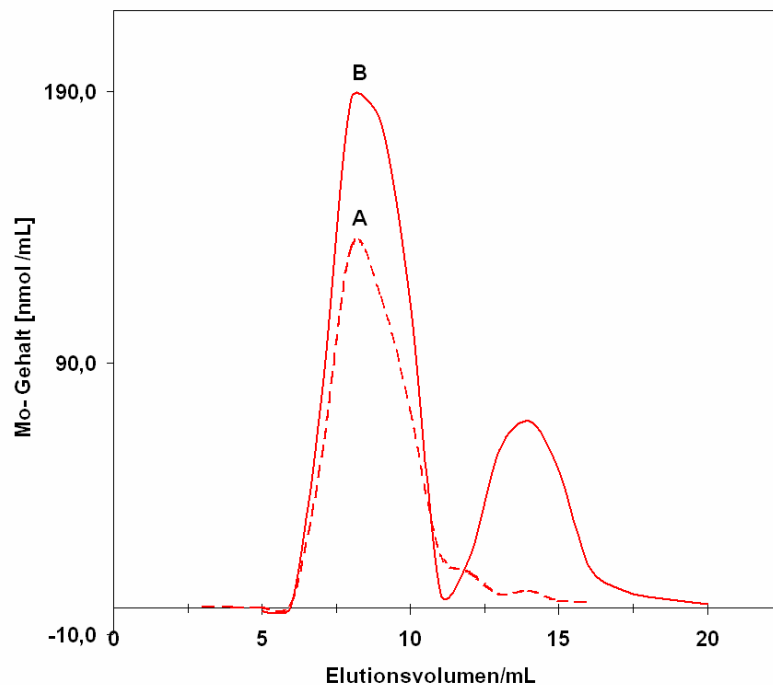
Zur Bestimmung der maximalen Bindungskapazität wurden zwei verschiedene Präparationswege untersucht.

Zum einen wurde bereits vor der Aufreinigung des MoSto (siehe Abschnitt 3.4.3) der Zellsuspension und im Verlauf der Präparationsschritte dem MOPS-Puffer kontinuierlich 1mM ATP und 1mM MgCl<sub>2</sub> zugegeben. Die Zugabe sollte einen stabilisierenden Einfluss auf die Clusterbindung im Protein haben und eine Mo-Freisetzung verhindern oder minimieren.

Im anderen Fall wurde das endgereinigte Proteinpräparat behandelt. Zuerst wurde das Apoprotein durch die Mo-Freisetzung unter den gängigen Standardbedingungen (30°C, 1h, pH 7.6) erzeugt. Die anschließende Rekonstitution des Holoproteins fand unter Zugabe von 1mM ATP, 1mM MgCl<sub>2</sub> und überschüssigen Mo-Konzentrationen (1-20mM) zu dem „gestrippten“ MoSto statt. Die Behandlung erfolgte bei einem pH-Wert von 6,5. Als weitere Parameter wurden der Temperaturbereich (12-30°C) und die Inkubationszeit (30-60min) variiert.

Zur quantitativen Abtrennung überschüssigen Molybdats, das keine Bindung mit dem MoSto einging, wurden die Proben mithilfe einer Sephadex G-25-Säule (4°C, pH 6.5) gefiltriert. Die erhaltenen Proteinfractionen wurden dann einer Mo-Analyse unterzogen.

Im Fall des rekonstituierten MoSto wurde ein maximaler Gehalt von 110 Mo-Atomen pro Speicherprotein erhalten. Die Abbildung 3.20 zeigt, dass nach der kompletten Freisetzung des Molybdäns und anschließender Wiederbeladung des Apoproteins mit 2 mM Molybdat ein Überschuss an freiem nicht eingebautem Molybdat vorlag (kleinerer Peak im niedermolekularen Bereich, siehe Abbildung 3.18).



**Abb. 3.18:** In vivo- und in vitro-Bindungsstudien des Molybdäns am MoSto-Protein. Die Mo-Profile stellen die Elutionsläufe der angewandten G-25-Gelfiltration dar. Das Profil **A** zeigt die Elution des MoSto nach der Anreicherung

(in Gegenwart von ATP und  $MgCl_2$ ) ohne nachträgliche Behandlung (siehe Abschnitt 3.4.2), wohingegen das Profil **B** die Elution des rekonstituierten MoSto (siehe Abschnitt 3.11.1) darstellt.

Im Gegensatz dazu scheiterte der Versuch, die Mo-Kapazität des ohne Vorbehandlung aufgereinigten MoSto durch eine zusätzliche Beladung mit Molybdat (4 mM) bei milden Inkubationsbedingungen (12 °C, 1h) zu erhöhen. Dieses Ergebnis lässt Rückschlüsse auf die strukturellen Gegebenheiten des Speicherproteins bezüglich des Wiedereinbaus von Molybdat zu, auf die ich in der Diskussion näher eingehen werde.

### **3.10.2 *In vivo*- und *in vitro*- Einbau von Wolfram in das Speicherprotein**

Zur Substitution des proteingebundenen Molybdäns durch Wolfram wurden folgende Schritte vollzogen:

Zur Herstellung des MoSto-Apoproteins (2mg in einer 1mL Probe), wurde Mo unter den entsprechenden Bedingungen (30°C; 1 Stunde Inkubation; pH 7.6) quantitativ freigesetzt und zur Entfernung des Molybdats ein Sephadex G-25-Säulenlauf durchgeführt.

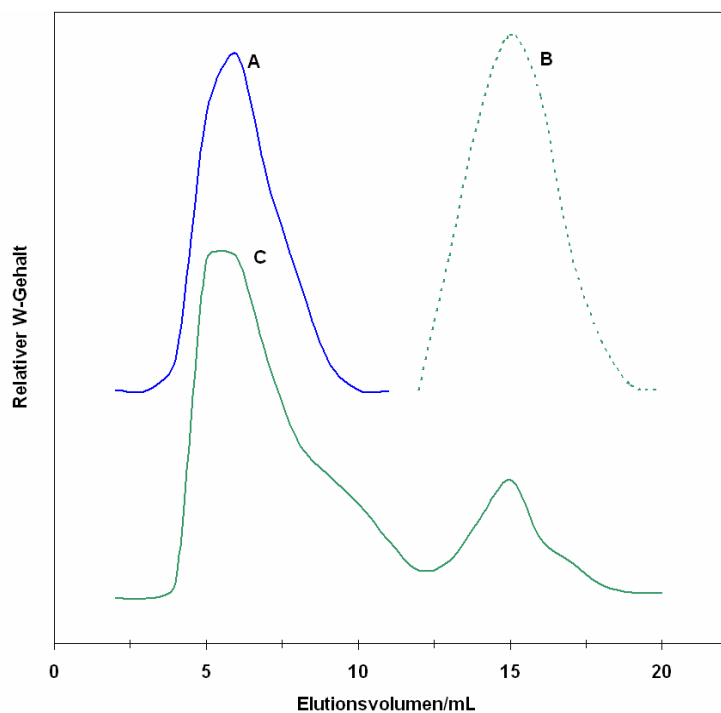
Das Apoprotein (0,4 mg/mL) wurde durch Ultrafiltration in einer B15-Amicon Stehkammer bei 4°C fünffach aufkonzentriert, wobei das Endvolumen 1mL betrug. Zur Stabilisierung des MoSto-Apoproteins und zum möglichen Einbau des Wolframs in das Speicherprotein wurden bereits während der Ultrafiltration wieder entsprechende Mengen an ATP und  $MgCl_2$  (jeweils 1 mM) und 2 mM Na-Wolframat hinzugesetzt. Zur Durchführung der quantitativen W-Bindung inkubierte ich die konzentrierte Proteinlösung anschließend bei 30 °C für 1 Stunde. Danach unterzog ich die Probe wieder einer Gelfiltration mit Sephadex G-25 Material. Es wurde darauf geachtet, dass der Elutionspuffer (50 mM MOPS, 50 mM, pH 6.5) immer die gleiche Menge an ATP und  $MgCl_2$  enthielt wie die eingesetzte Probe. Die aufgefangenen Fraktionen wurden einer W-Analyse unterworfen, um zu ermitteln, ob ein erfolgreicher W-Einbau vorlag.

Die Abbildung 3.19 zeigt die Substitution des Molybdäns durch das Wolfram im Speicherprotein. Die anschließenden Freisetzungsversuche mit dem rekonstituierten W-haltigen MoSto (WSto) werden in der Abbildung 3.19 dargestellt.

## Ergebnisse

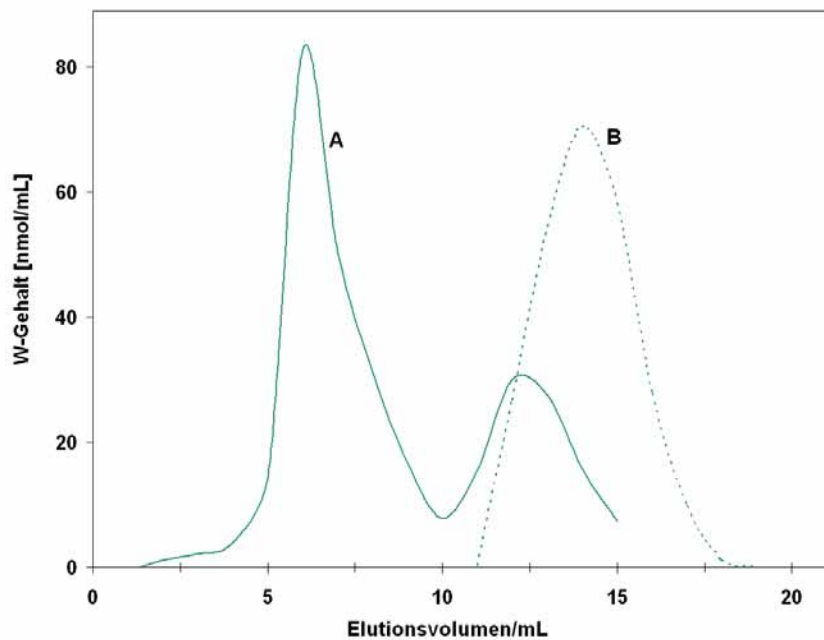
Der kleine Nebenpeak im Elutionsverlauf C (Abbildung 3.20), der das überschüssige freie Wolframat darstellt, diente als Nachweis der W-Sättigung des Speicherproteins. In diesem Fall konnte auch ein höherer Metallgehalt für das W-haltige Speicherprotein (~ 80 Atome) als für das konventionelle MoSto nachgewiesen werden.

Zusätzliche Untersuchungen zur Stabilität der W-Bindung unter Anwendung der Standardfreisetzungsbedingungen (30 °C, 1h) zeigten dass die W-Verbindung im Speicherprotein eine deutlich höhere Stabilität aufweist als die Mo-O-Clusterverbindungen im konventionellen MoSto. Dies spiegelte sich in einer wesentlich niedrigeren Freisetzungsrate des Wolframs (30%) im Vergleich zu der des Molybdäns (100%) wider. Zusätzlich stellte ich fest, dass der Freisetzungspeak nicht dem Elutionsverhalten eines monomolekularen Wolframats entsprach (leichter shift in den höhermolekularen Bereich).



**Abb. 3.19:** *In vitro*-Bildung nach des WSto-Proteins durch die Freisetzung des Molybdäns aus MoSto mit Hilfe der Standardfreisetzungsbedingungen (Abschnitt 3.10.1) und anschließendem Wolframeinbau (Abschnitt 3.11.2). Kurve (A) zeigt das Profil des Proteingehalts, (B) das monomolekulare Wolframat (2mM) und (C) die Verteilung des Wolframgehalts an Protein gebundenem und freiem

monomolekularem Wolframat nach Inkubation und anschließendem G-25-Lauf.



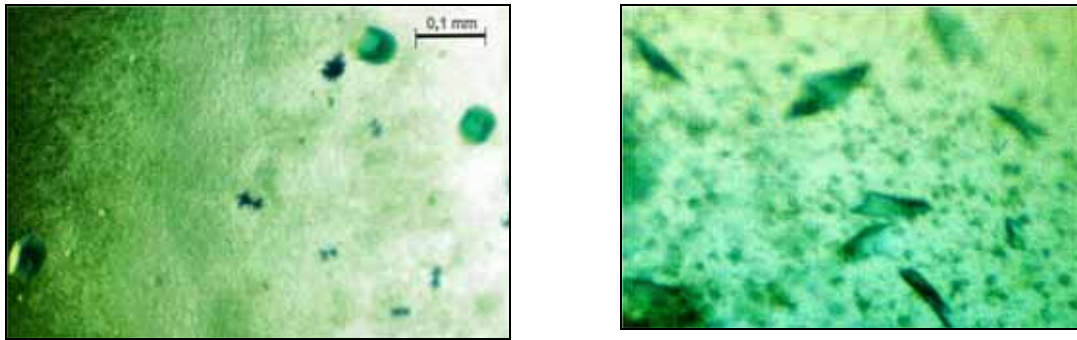
**Abb. 3.20:** Wolfram-Freisetzungsexperimente mit WSto. Die Bedingungen (1 Stunde Inkubation bei 30 °C and pH 7,6) für die W-Freisetzung wurden den Mo-Standard-Freisetzungsbedingungen des MoSto entnommen. Das Elutionsprofil (A) zeigt die Verteilung des Wolframgehalts nach dem Inkubations- und Gelfiltrationsschritt (G-25-Lauf), die Kurve (B) stellt das monomolekulare Wolframat dar.

### 3.11 Strukturbestimmung des Speicherproteins

#### 3.11.1 Kristallisation

##### 3.11.1.1 Das Mo-Speicherprotein (MoSto)

Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen zur Einkristallbildung wurden die Kristallisationsversuche mit Hilfe eines so genannten *sparse matrix screens* der Firma Molecular Dimensions durchgeführt. Die Proteinkonzentration des MoSto betrug 10 mg/ml. Die nach zwei Wochen erhaltenen Kristallformen (siehe Abbildung 3.21) wurden durch die „*sitting drop*“-Methode bei 4°C erhalten.



**Abb. 3.21 :** Die verschiedenen Kristallformen des MoSto. Links eine kubische Kristallform und rechts nadelförmig verwachsene Kristalle. Beide Aufnahmen wurden unter polarisiertem Licht aufgenommen.

Allerdings waren die beiden Kristallformen unter den gleichen Bedingungen (siehe Tabelle 3.13) nicht reproduzierbar.

**Tabelle 3.13:** Zusammenfassung der ausgewählten Kristallisationsbedingungen von MoSto.

Kristallform	Puffer	Präzipitationslösung	Salz
Hexagonal	0,1 M MES; pH 6,5	30% (v/v) Jeffamine	0,05 M CsCl
Nadeln	0,1 M HEPES; 1 M NaAc; pH 7,5	-	0,05 M CdSO <sub>4</sub> · 8H <sub>2</sub> O

Zum qualitativen Nachweis der Proteinkristalle wurde der Kristallisationstropfen mit einem speziellen Farbstoff (Izit) versetzt. Die Farbstoffmoleküle sammeln sich hauptsächlich in den Lösungsmittelkanälen der Proteinkristalle. In beiden Fällen sprach die deutliche Blaufärbung für Proteinkristalle und damit für MoSto. Die mit SDS-PAGE durchgeführten Untersuchungen zur Identifizierung der Kristalle ergab nach der Coomassiefärbung eine schwache Bande, die jedoch keinen eindeutigen Hinweis auf die Anwesenheit des Mo-Speicherproteins lieferte.

Weitere Screeningversuche mit dem Jenascreen (JBS) führten zunächst bei zwei der angewandten Bedingungen (10% PEG 8000, 0,05 M Mg-Acetat, 0,1 M Na-Acetat

## Ergebnisse

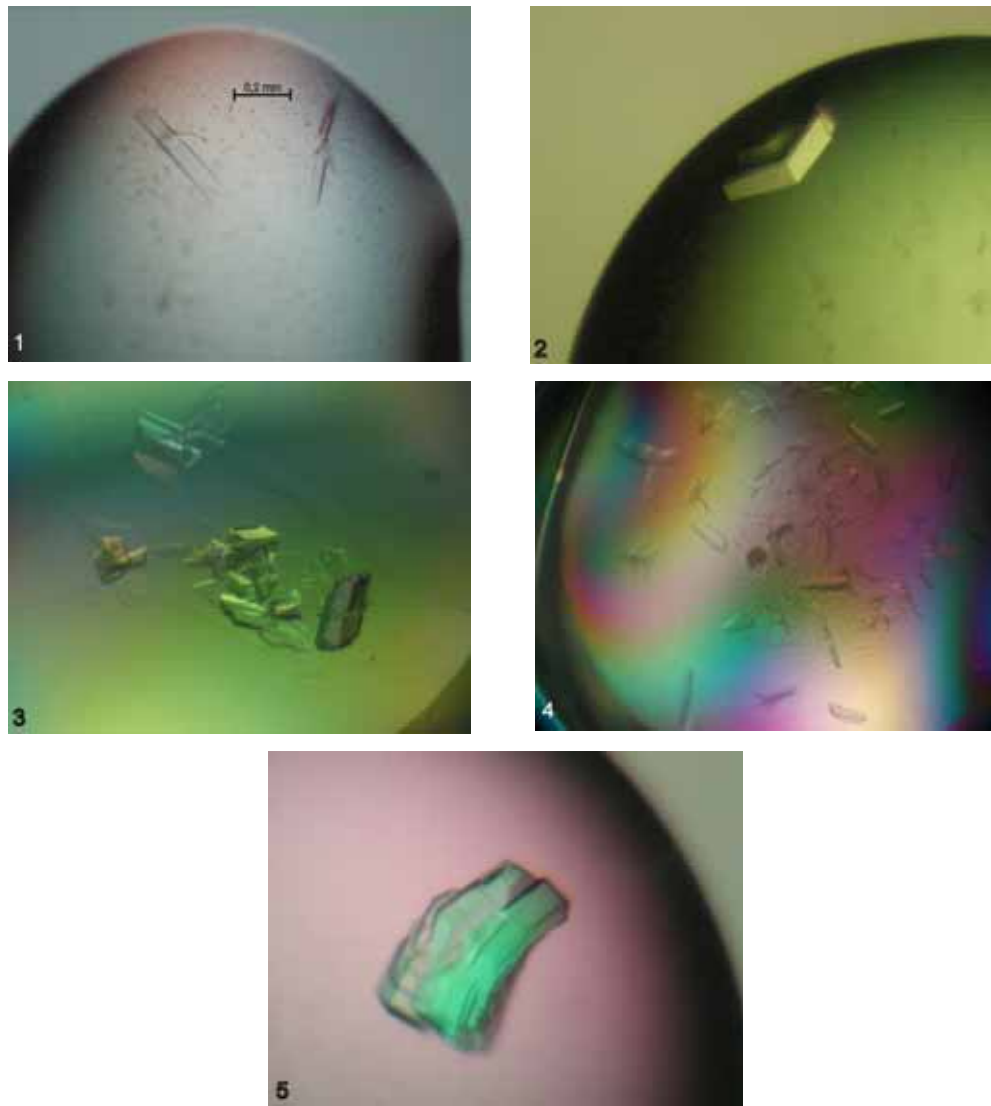
und 10% PEG 8000, 0,2 M Mg-Acetat) zur Bildung von Kristallen, die reproduzierbar waren. Untersuchungen mit den PEG-Screens von Jena Bioscience® zeigten eine Reihe weiterer, erfolgreich angewandter Kristallisationsbedingungen (siehe Tabelle 3.14).

**Tabelle 3.14:** Reproduzierbare Kristallisationsbedingungen aus dem PEG-Screen von

Puffer	Präzipitationslösung	Salz	Additiv
0,1 M TRIS pH 8,5	25% PEG 10000	0,1 M NaCl	10% (v/v) Glycerin
0,1 M MES pH 6,5	25% PEG 20000	0,1 M NaCl	-
0,1 M TRIS pH 8,5	12% PEG 4000	0,2 M NaAc	-
0,1 M TRIS pH 8,5	12% PEG 4000	0,2 M NaAc; 0,2 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-
0,1 M HEPES pH 7,5	8% PEG 4000	0,2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10% (v/v) i-Prop.

Jena Bioscience® (JBS) bei 18°C.

Die Wachstumszeit der Kristalle von ungefähr 5 Tagen ermöglichte eine rasche Optimierung der Bedingungen bei 18°C. Es wurden schließlich 5 alternative Kristallformen mit Raumgruppen von C<sub>2</sub> und P<sub>2</sub><sub>1</sub> erhalten (siehe Abbildung 3.22). Allerdings ergaben sich durch die dünne und längliche Form der Kristalle Probleme bei der Montage auf die Röntgenanlage. Ein anderes Problem entstand bei der Anwesenheit von Isopropanol, dessen starke Verdunstung ein unkontrolliertes Schlingern der Kristalle in der Lösung zur Folge hatte und die Überführung auf den Loop sehr erschwerte. Für die Impfkristallisation (Mikroseeding) bei der monoklinen bzw. orthorhombischen Kristallform von MoSto wurden die Einkristalle (10 % (w/v) PEG 8000, 0,2 M MgAc<sub>2</sub>), die einer Größe von ungefähr 0,02 mm in Länge und Breite entsprachen, mit Hilfe eines „Cryo-Loops“ in eine Lösung von PEG 8000 10% und 0,2 M MgAc<sub>2</sub> überführt und darin zweimal gewaschen. Danach überführte ich drei Kristalle in 50 µl der Lösung (A) und vortexte (Speed 3) diese in einem Eppendorfgefäß (Eppi) mit Hilfe eines Glaskügelchens innerhalb von zwei Minuten. Eine Verbesserung der Kristallqualität war allerdings nicht zu beobachten.



**Abb. 3.22:** Kristallbildung bei fünf unterschiedlichen Bedingungen (1-5), die in der Tabelle 3.15 zusammengefasst sind.

**Tabelle 3.15:** Eine Auswahl der Bedingungen zur Einkristallbildung für MoSto.

Bild	Puffer	Präzipitatlösung	Salz	Additiv
1	0,1 M MES pH 6,5	8% PEG 20000	0,1 M NaCl	-
2	0,1 M Hepes pH 7,5	11% PEG 4000	0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10 % i-Prop.
3	0,1 M Hepes pH 7,5	10 % PEG 8000	0,05 M $\text{Mg}(\text{Ac})_2$	-
4	-	10 % PEG 8000	0,15 M NaAc 0,05 M $\text{Mg}(\text{Ac})_2$	-
5	0,1 M Tris pH 8,5	16 % PEG 4000	0,2 M $\text{LiSO}_4$	-

Ich erhielt die Kristalle bei einer Proteinkonzentration von 15 mg/mL und einer Temperatur von 18°C. Ähnliche Versuche bei 4°C blieben leider ohne Erfolg.

Zur Identifikation der Phaseninformation (siehe Abschnitt 2.4.1) aus den MoSto-Röntgendaten wurden Einkristalle des Se-Methionin-haltigen Mo-Speicherproteins benötigt. Die Einkristallbildung zeigte hinsichtlich der Kristallisationsbedingungen, des Kristallwachstums, der Qualität und Größe der Kristalle keine signifikanten Unterschiede zur nativen Form.

### **3.11.1.2 Das W-enthaltende Speicherprotein (WSto)**

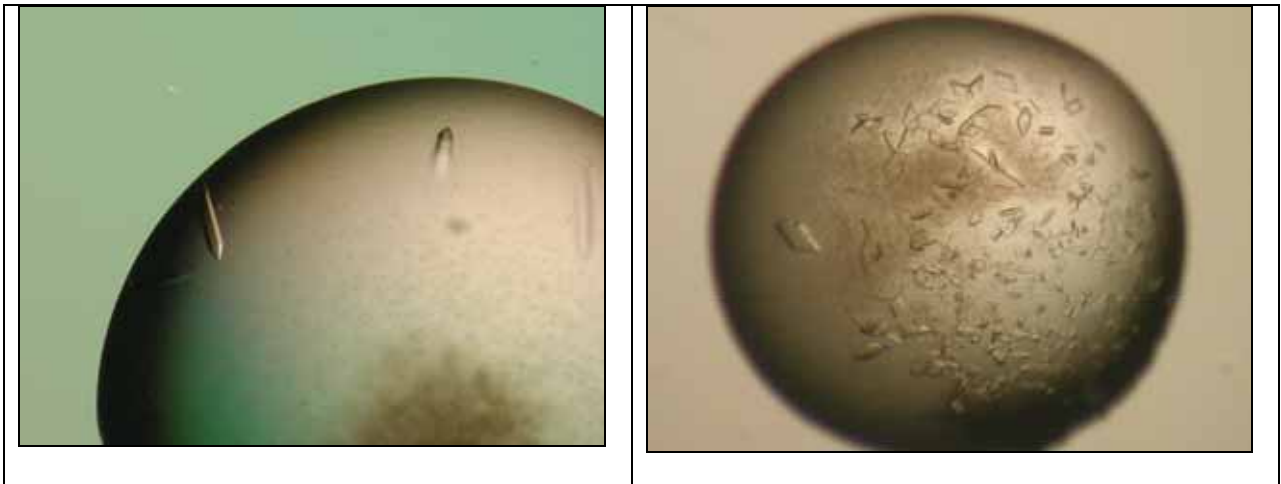
Neben der Kristallisation des Molybdänspeicherproteins (MoSto) gelang auch die erfolgreiche Einkristallbildung des gereinigten WSto. Durch die erneute Verwendung des Jena-Screens wurden zwei reproduzierbare Bedingungen erhalten, die anschließend im Hinblick auf die Bildung einer Einkristallform optimiert werden konnten (siehe Abbildung 3.23). Form und Bedingungen der bereits nach 3 Tagen bei 18°C gewachsenen Einkristalle zeigten hinsichtlich ihrer Form und Elementarzelle im Vergleich zu den MoSto-Einkristallformen deutliche Unterschiede.

Zur Bestimmung der Phaseninformation des W-haltigen Speicherproteins wurden Einkristalle des Se-Methionin<sup>1</sup>-Derivats von WSto benötigt (siehe Abschnitt 3.12.1). Auch hier zeigte die Einkristallbildung keine signifikanten Unterschiede zur Kristallbildung des nativen Speicherproteins. Allerdings konnte ich eine schnelle Alterung der Kristalle nach 8 Wochen beobachten, die einherging mit dem vollständigen Verlust des Streuverhaltens. Vergleiche mit dem unveränderten nativen WSto zeigten, dass vermutlich Se-Methionin durch Luftoxidation mit dem Protein einen destabilisierenden Faktor bei längerer Kristalllagerung hervorruft.

Die sehr gute Qualität der nativen und Se-Methionin-enthaltenen hexagonalen Kristalle des WSto mussten keiner weiteren Behandlung hinsichtlich einer Impfkristallisation unterzogen werden.

---

<sup>1</sup> Se-Methionin entspricht Seleno-Methionin



**Abb. 3.23:** Rechts, hexagonale Kristallform mit 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M Citrat pH 5,6. Links, orthorhombische Kristallform mit PEG 4000 (10%), 13% Isopropanol, 0.1 M Citrat pH 5,6.

Die Mo- bzw. W-Einbauversuche in das Speicherprotein, sowie die Identifizierung einer ATP-Bindungsstelle im Protein durch Sequenzalignments mit verschiedenen Kinasen ließen vermuten, dass ATP im Speicherprotein als Kosubstrat fungiert. Zur Charakterisierung des WSto-ATP-Komplexes wurden native WSto-Kristalle schrittweise in ATP-,  $\gamma$ -imido-ATP- (AMPPNP) und ( $\beta$ ,  $\gamma$ -Methylen-ATP (AMP-PCP)-Lösungen überführt. Die Anfangskonzentration betrug 0,5 mM und die für den letzten Tränkungsschritt 2mM. Die Kristalle wurden ca. 2 Stunden getränkt und anschließend tiefgefroren. Die ATP-analogen AMPPNP und [beta], [gamma]-Methylen-ATP (AMP-PCP) sind nicht in der Lage zu ADP und  $\text{P}_i$  zu hydrolysieren (Atkinson & Murray, 1967). Längere Tränkzeiten mit ATP und den entsprechenden Analoga führten zu einer leichten Verschlechterung der Diffraktionseigenschaften der Kristalle.

### 3.11.2 Röntgendiffraktionsmessung

#### 3.11.2.1 Kristallmontage

Für die Tieftemperaturmessungen mussten den Kristalllösungen der MoSto-Kristallformen 15-25% Glycerin oder eine Mischung aus Isopropanol und Glycerin hinzugefügt werden. Dabei erwiesen sich die monoklinen und orthorhombischen MoSto-Kristalle gegenüber Veränderung der Lösungsumgebung als nicht besonders sensitiv. Das anschließende direkte Überführen der beiden Kristallformen

aus der Lösung in den Cryopuffer war unproblematisch. Bei den Messungen mit der hexagonalen WSto-Kristallform wurde ausschließlich 35% Glycerin in der Kristallisationslösung verwendet. Zu Beeinträchtigungen der Kristalle führte die Glycerinkonzentration nicht.

### 3.11.2.2 Datensätze des nativen und Se-Methionin-haltigen Speicherproteins und die Bestimmung der Raumgruppen von MoSto

Die Messung des nativen und des Se-Methionin-haltigen MoSto wurde am Synchrotron in Grenoble durchgeführt. Die Messungen des nativen MoSto-Einkristalls ergaben eine Auflösung von 2,5 Å, während die Einkristalle des Se-Methionin-haltigen MoSto bis zu einer Auflösung von 2,6 Å streuten. Die Indizierung und Skalierung der Daten mit DENZO und SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) führten bei der nativen Kristallform je nach Kristallisationsbedingung zu einer Raumgruppe  $P2_12_12_1$  (PEG 6000) und C2 (MPD), während bei der Se-Methionin-haltigen Kristallform ausschließlich die Raumgruppe C2 vorlag. Die entsprechenden Gitterparameter sind in der Tabelle 3.15 zusammengestellt.

**Tabelle 3.16:** Ausgewählte kristallographische Parameter der nativen und Se-Methionin Datensätze von MoSto.

Parameter	MoSto (nativ) <sup>2</sup>		MoSto (Se-Met)
Wellenlänge (Å)	0,979	0,979	0,979
Gitterkonstanten (Å)			
a	261,8	148,2	192,2
b	149,0	168,3	280,3
c	129,7	217,7	131,5
$\beta$ (°)			116,4
$\alpha=\gamma$ (°)	90	90	90
Raumgruppe	$P2_12_12_1$	C2	C2
Oszillationswinkel pro Aufnahme (°)	0,5	0,5	0,5
Anzahl der Bilder	160	150	360
Temperatur der Datensammlung (K)	100	100	100
Auflösung (Å)	2,85	2,5	2,6
Anzahl der gemessenen Reflexe	267385	316322	1415460
Anzahl der zurückgewiesenen Reflexe			324
Anzahl der unabhängigen Reflexe	85775	115449	375753
Vollständigkeit (%)	73,9	94,8	99,2
Redundanz	3,1	2,7	3,8
$R_{\text{merge}}$ (%)	11,0	12,4	11,8
$R_{\text{meas}}$ (%)	13,5	15,2	13,7
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$	7,1	6,6	9,1

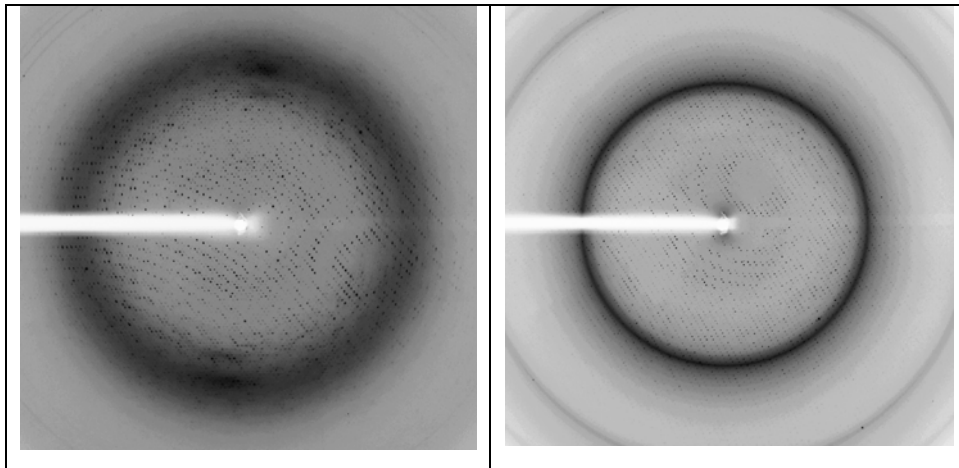
<sup>2</sup> Die verschiedenen Parameter des nativen Datensatzes von MoSto kommen durch unterschiedliche Additive in den Kristallisationsansätzen (links, MPD und rechts, PEG 6000) zustande.

Wilson B-Factor	65,0	48,0	46,7
-----------------	------	------	------

$$R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl) - \langle I_i(hkl) \rangle}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)} \quad (3.1)$$

$$R_{meas} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{n(hkl)}{n(hkl)-1}} \sum_i I_i(hkl) - \langle I_i(hkl) \rangle}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)} \quad (3.2)$$

Die Abbildung 3.24 zeigt eine Auswahl zweier Röntgendiffraktionsaufnahmen mit einem nativen und Selenomethionin-enhaltenen MoSto-Einkristall.



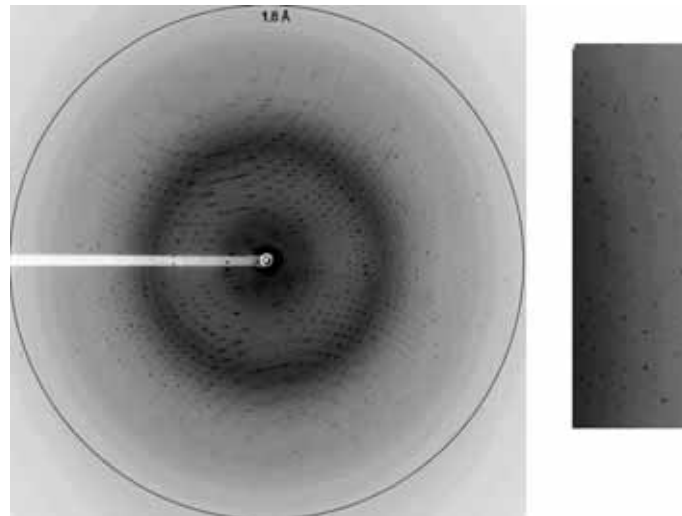
**Abb. 3.24:** Zwei Röntgendiffraktionsaufnahmen mit einem nativen (rechts) und einem Selenomethionin-haltigen MoSto-Einkristall (links). Beide Aufnahmen wurden am European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble bei einer Auflösung von 2.6 Å für das Seleno-methionin-Derivat des MoSto und mit 2,5 Å für das native MoSto (Raumgruppe C2) durchgeführt.

### 3.11.2.3 Datensätze des nativen und Se-Methionin-haltigen WSto und dessen Bestimmung der Raumgruppen

Die Messung des Se-Methionin-haltigen WSto und des nativen WSto wurde am Synchrotron des Swiss Light Source (SLS) in der Schweiz durchgeführt. Die besten Einkristalle der Se-Methionin-Derivate wurden bei einer Auflösung von 1,6 Å, die des nativen WSto bei 1,7Å erhalten. Weitere Daten sind in der folgenden Tabelle 3.17 zusammengefasst:

**Tabelle 3.17:** Ausgewählte kristallographische Parameter des Se-Methionin-Datensatzes von WSto.

Parameter	WSto (Se-Met)	WSto (nativ)
Wellenlänge (Å)	1,1	0,9782
Gitterkonstanten (Å)		
a	116,47	115,0
b	116,47	115,0
c	237,11	234,2
$\alpha=\beta$ (°)	90	90
$\gamma$ (°)	120	120
Raumgruppe	P6 <sub>3</sub> 22	P6 <sub>3</sub> 22
Anzahl Monomere in der asym. Einheit		
$V_m$ (Å <sup>3</sup> Da <sup>-1</sup> )	2	
Oszillationswinkel pro Aufnahme (°)	0,3	0,3
Anzahl der Bilder	170	171
Temperatur der Datensammlung (K)	100	100
Auflösung (Å)	1,6	1,7
Anzahl der gemessenen Reflexe	663624	89586
Anzahl der zurückgewiesenen Reflexe		
Anzahl der unabhängigen Reflexe	224039	32168
Vollständigkeit ( %)	95,4	96,2
Redundanz	2,9	2,8
<sup>1</sup> R <sub>merge</sub> (%)	6,5	7,2
<sup>2</sup> R <sub>meas</sub> (%)	7,8	8,6
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$	10,3	9,5
Wilson B-Factor	28,6	29,5



**Abb. 3.25:** Diffraktionsbild eines Selenomethionin-haltigen WSto-Einkristalls der Raumgruppe  $P6_322$  bei einer Auflösung von 1.6 Å. Der vergrößerte Ausschnitt (rechts) zeigt auch in der äußeren Auflösungsschale (1,6Å-1,5Å) noch deutliche Reflexe, die die sehr gute Kristallqualität bestätigen.

### 3.11.2.4 Kristallpackungen

Die Anzahl der Proteinmonomere pro asymmetrischer Einheit lässt sich unter Verwendung der Kristallparameter aus der Indizierung, des Molekulargewichts des Proteins (240 kDa) und der Annahme einer für Proteinkristalle typischen Proteindichte von 1.22 mg/mL (Andersson und Hovmoller, 2000) berechnen. Die Werte für die Packungsdichte, die geschätzte Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit und dem entsprechenden Lösungsmittelanteil sind der Tabelle 3.18 zu entnehmen (Matthews, 1968). Die Packungsdichte ( $V_M$ ) und der Lösungsmittelanteil  $\rho_L$  setzen sich folgendermaßen zusammen:

$$V_M = \frac{V_g}{M_r \cdot n \cdot z} \quad (3.3)$$

$$\rho_L = 1 - \frac{1,23}{V_M} \quad (3.4)$$

$V_g$ : Volumen, das sich aus den Gitterkonstanten a, b und c zusammensetzt in (Å<sup>3</sup>).

$M_r$ : Molmasse des Proteins in (kDa).

n: Anzahl Moleküle in der asymmetrischen Einheit.

## Ergebnisse

z: Anzahl der asymmetrischen Einheiten in der Elementarzelle (Anzahl der Symmetriepoperatoren in einer Raumgruppe).

**Tabelle 3.18:** Übersicht der einzelnen Packungsdichten von nativem und Selenomethioninhaltigem MoSto sowie dem Selenomethionin-Derivat des WSto.

Protein	Raumgruppe	$\alpha\beta$ -Einheiten in der asymmetrischen Einheit	$V_m$ -Wert ( $\text{\AA}^3\text{Da}^{-1}$ )	Lösungsmittelanteil (%)	z
MoSto	C2	$(\alpha\beta)_3$	2,5	51	4
MoSto	P2 <sub>1</sub>	$(\alpha\beta)_3$	2,5	51	2
MoSto	P222	$\alpha\beta_3$	3,6	66	4
Wsto	P6 <sub>3</sub> 22	$\alpha\beta$	3,3	63	12

Die vorliegenden Informationen waren für die primitiv monoklinen Kristallformen (siehe Tabelle 3.18) des MoSto nicht ausreichend, um zwischen einem oder zwei Oktameren (in vorangegangener Arbeit postulierte Untereinheitenstruktur) in der asymmetrischen Einheit der Kristalle unterscheiden zu können. Eindeutigere Ergebnisse lieferten hingegen die Kristallpackungen der hexagonalen Einkristalle des Se-Methionin-enthaltenen WSto, die ein Hexamer in der asymmetrischen Einheit zeigten.

### 3.11.2.5 Strukturlösung des Se-Methionin-haltigen MoSto und WSto

Die Phasenbestimmung wurde mit Hilfe der MAD-Methode (Multiple Anomale Dispersion) gewonnen. Dazu wurde das Se-Methionin-Derivat von MoSto und WSto kristallisiert (siehe Abschnitt 3.12) und anschließend bei drei verschiedenen Wellenlängen, klassischerweise *peak*, *inflection* und *remote* gemessen. Allerdings entfiel die Messung der *remote* Wellenlänge beim Se-Methionin-haltigen MoSto aufgrund des großen Strahlenschadens des Kristalls während der Messung. Das inkorporierte Selen zeigte in Abhängigkeit von der Wellenlänge anomale Streubeiträge, über die eine Lösung der Se-Substruktur möglich ist (siehe Abschnitt 2.4.1).

Der Vergleich der Kristallformen unter besonderer Berücksichtigung der Eignung für die anschließende Se-Met-MAD-Phasierung (Hendrickson und Ogata, 1997) zeigte

deutliche Unterschiede zwischen den beiden Kristallformen. Bei der monoklinen Kristallform ( $P2_1$ ) mit 3 Molekülen in der asymmetrischen Einheit bestand die zu bestimmende Se-Substruktur aus 44 Positionen pro Hexamer (5 Methionine pro Monomer in der Sequenz). Die Kristalle waren aufgrund der großen asymmetrischen Einheit, der niedrigen Raumgruppensymmetrie und des begrenzten Diffraktionsvermögens für die Se-Met-MAD Phasierungsmethode weniger gut geeignet. Bei den hexagonalen WSto-Kristallen ( $P6_322$ ) waren durch die hohe Symmetrie, die kleinere asymmetrische Einheit und das gute Diffraktionsvermögen gute Voraussetzungen für eine erfolgreiche Phasierung gegeben. Zu Beginn der Arbeit waren allerdings nur die Kristallisationsbedingungen für die primitiv monokline Kristallform des MoSto bekannt, so dass die ersten MAD-Phasierungsversuche mit dem Derivat dieser Kristallform durchgeführt wurden.

### **3.11.3 MAD-Experimente mit der MoSto- und WSto-Kristallform**

#### **3.11.3.1 MoSto-( $P2_1$ )-Kristallform**

Die Statistiken der MAD-Daten des Se-Methionin-haltigen MoSto, die am Synchrotron in Grenoble mit dem primitiv-monoklinen Kristall durchgeführt wurden, sind in Tabelle 3.19 aufgeführt. Dabei wurde in der Regel nur mit den Daten der Peak-Wellenlängen gerechnet, die - zur Verbesserung der Datenqualität - mit einer höheren Redundanz gemessen wurden.

#### **3.11.3.2 Die WSto-( $P6_322$ )-Kristallform**

Die entsprechenden Messungen der MAD-Daten des Seleno-Methionin-haltigen WSto mit dem hexagonalen Kristall wurden am SLS durchgeführt (Tabelle 3.20).

**Tabelle 3.19:** Datenstatistiken der Seleno-Methionin-MAD Experimente mit der Raumgruppe P2<sub>1</sub> des MoSto.

Parameter	Se-Met-MAD	
	<i>peak</i>	<i>inflection</i>
Wellenlänge	0,9794	0,9795
Temperatur der Datensammlung (K)	100	100
Auflösung (Å)	2,6	2,6
Anzahl der gemessenen Reflexe	1415460	1038186
Anzahl der unabhängigen Reflexe	375753	374430
Vollständigkeit (%)	99,2	98,3
R <sub>merge</sub> (%)	11,8	12,3
R <sub>merge</sub> (%) höchste Auflösungsschale	50,4	63,2
I/(σ)I	9,1	6,3
I/(σ)I höchste Auflösungsschale	2,8	1,8

**Tabelle 3.20:** Datenstatistiken der P2<sub>1</sub> und P6<sub>3</sub>22 Se-Met-MAD Experimente

Parameter	Se-Met-MAD		
	<i>peak</i>	<i>inflection</i>	<i>remote</i>
Wellenlänge	0,9789	0,9789	0,9762
Temperatur der Datensammlung (K)	100	100	100
Auflösung (Å)	1,8	1,8	1,8
Anzahl der gemessenen Reflexe	953704	573400	169052
Anzahl der unabhängigen Reflexe	152622	152273	58173
Vollständigkeit (%)	97,0	96,7	98,9
R <sub>merge</sub> (%)	7,2	7,3	5,2
R <sub>merge</sub> (%) höchste Auflösungsschale	45,8	72,1	31,2
I/(σ)I	15,9	12,5	15,1
I/(σ)I höchste Auflösungsschale	4,3	2,1	4,2

### 3.11.4 Die Bestimmung der Se-Substruktur und der Phase

Für die Bestimmung der Se-Positionen der Se-Substruktur wurde SHELXD (Schneider und Sheldrick, 2002) verwendet. Für die Se-Substruktur der P2<sub>1</sub>-Kristallform gelang es nicht, die Selenpositionen zu lokalisieren und damit signifikante Lösungen zur Berechnung einer interpretierbaren Elektronendichte zu erhalten. Im Fall der Se-Substruktur der WSto-Kristallform konnten die Selenpositionen bestimmt werden. Für die Berechnungen wurden nur die Diffraktionsdaten der Peak-Wellenlänge in einem Auflösungsbereich von (50-2,5) Å verwendet. Das Programm SHELXD berechnete eine signifikante Lösung für die Schwermetall-Substruktur. Die enthaltenen Selenomethionin-Koordinaten wurden mit dem Programm SHARP (De la Fortelle & Bricogne, 1997) verfeinert und unter Einbeziehung der *peak*-, *inflection*- und *remote*-Datensätze die Phase bestimmt. Einen Überblick über die Phasenbestimmungsstatistiken zeigt die Tabelle 3.21. Die erhaltene Phase wurde mit Hilfe des iterativen Solvensglättungsverfahrens SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) weiter verbessert und anschließend eine Elektronendichte berechnet. Die Qualität der Messung eines Derivats wird gewöhnlich als *phasing power* und  $R_{cullis}$  als ein Maß für die Güte der Lage der Schweratome bezeichnet. Die *phasing power* beschreibt die Schärfe der Phasenverteilung (Beitrag des Derivats zur Phaseninformation im Verhältnis zum Untergrundrauschen). Die Qualität der Phasierung wird eingeteilt in ausgezeichnet (>1,5), gut (>1) und brauchbar (>0,5), wohin gegen  $R_{cullis}$  sehr gute (>1,5), gute (>1) oder brauchbare (>0,5) Werte liefern kann.

**Tabelle 3.21:** Statistiken zur Phasenbestimmung durch MAD

	<i>Peak</i>	<i>Inflection</i>	<i>Remote</i>
Auflösung	2,5 Å	2,7 Å	3,3 Å
phasing power	3,5	1,5	2,1
$R_{cullis}$	0,4	0,62	0,6

Die Qualität der Anfangsphasen und die der Elektronendichtefunktion nach der Dichtemodifikation war nach der MAD-Phasierung signifikant hoch (siehe Tabelle 3.22).

**Tabelle 3.22:** Zusammenstellung des Gütefaktors (FOM) nach der MAD-Phasierung und der Dichtemodifikation.

Figure of Merit (FOM) <sup>3</sup>	SHARP
FOM <sub>acen</sub>	0,61
FOM <sub>cen</sub>	0,22

Die errechnete Elektronendichte zeigte eine eindeutige Unterscheidung zwischen Bereichen hoher (Protein) und niedriger (Lösungsmittel) Dichte. Zu diesem Zeitpunkt des Modellbaus waren bereits Sekundärstrukturen wie Helices und Faltblätter zu erkennen. Aufgrund dessen wurde das Programm RESOLVE (Terwilliger, 2001) verwendet, um automatisch die Sequenz in die Dichte zu integrieren.

### 3.12 Strukturbeschreibung des Speicherproteins

#### 3.12.1 Verfeinerung und Qualität des Strukturmodells

Das unvollständige Strukturmodell der Proteinhauptkette wurde mit Hilfe eines sogenannten „tracer“-Peptidgerüsts vervollständigt. Anschließend wurden die Seitenketten mit Hilfe des „side-chain docking“ Algorithmus eingebaut und mit dem Programm „O“ manuell in die Elektronendichte angepasst. Dabei konnte außer den ersten 30 Aminosäuren der  $\alpha$ -Untereinheit des Speicherproteins fast alle fehlenden Aminosäuren vervollständigt werden. Nach der lokalen Fehlersuche mit SFCHECK (Berechnung der Elektronendichte-Korrelationskoeffizienten für alle Haupt- und Seitenkettenatome jeder einzelnen Aminosäure) erfolgte der Einbau von Wasser und das anschließende Entfernen von Wasser mit hohem B-Faktor ( $\geq 50$ ). Die beobachtete Fremdelektronendichte konnte als ATP identifiziert und manuell eingebaut werden. Die Strukturverfeinerungsschritte, die mit Hilfe von REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) und CNS (Brunger et al., 1998) durchgeführt wurden, führten zur schrittweisen Verringerung der R-Werte, die in der Tabelle 3.23 zusammengestellt sind.

<sup>3</sup> Die Auflösung für die FOM-Werte betrug 2,5 Å.

**Tabelle 3.23:** Vergleich der R-Werte mit den entsprechenden Verfeinerungsmethoden

Verfeinerungsmethode	$R_{\text{work}}$	$R_{\text{free}}$
CNS	19,8	21,3
REFMAC5 (mit TLS <sup>4</sup> )	19,3 (18,9)	21,0 (20,6)

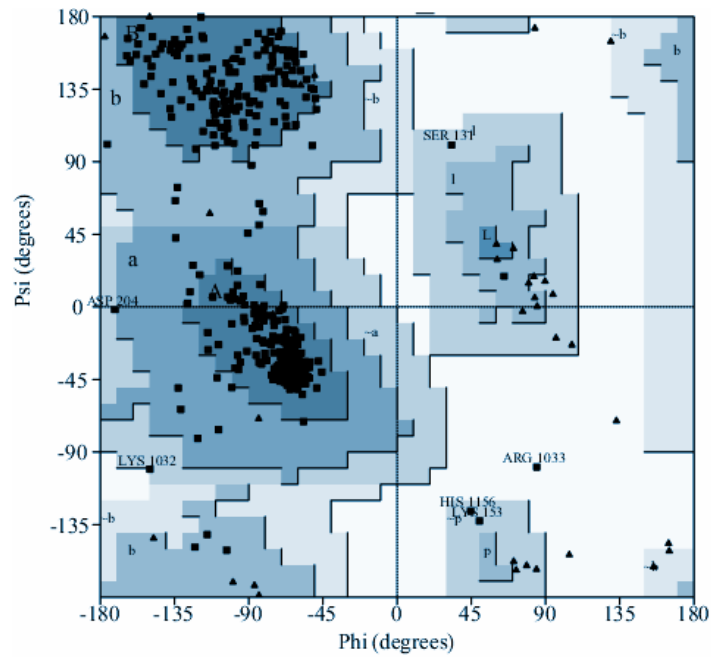
Eine anisotrope Verfeinerung erbrachte allerdings nicht den gewünschten Erfolg.

Die Qualität des verfeinerten Strukturmodells konnte durch den Ramachandran-Pot (Verteilung der Hauptkettentorsionswinkel  $\Phi$  und  $\Psi$ ) beschrieben werden. 92% der Aminosäurereste befinden sich in den bevorzugten (most favored regions) und 6,5% in den zusätzlich erlaubten Bereichen (additional allowed regions). Die restlichen Aminosäuren verteilen sich zu 1,2% auf die großzügig erlaubten (generously allowed regions), und 0,5% auf die verbotenen Bereiche (disallowed regions).

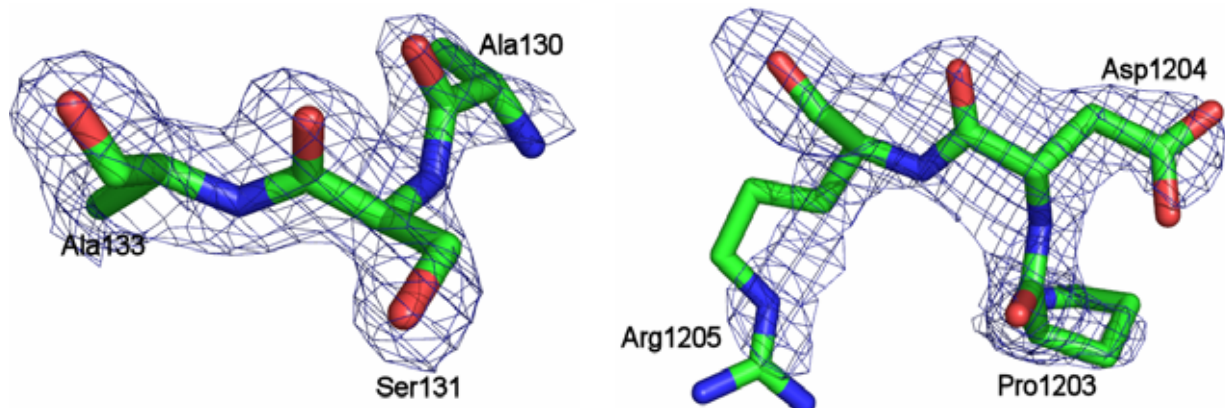
Der Ramachandran-Plot (siehe Abbildung 3.26) zeigt vier Aminosäuren (Lys32<sup>5</sup>, Ser137 und Asp1204<sup>6</sup>, Arg1033), die durch Ihre Randlage in der Dimerstruktur des WSto eine hohe Beweglichkeit besitzen. Im Gegensatz zu Lys32 zeigen die Aminosäuren Ser137, Asp1204 und das im verbotenen Bereich liegende Arg1033 eine gut definierte Elektronendichte (siehe Abbildung 3.27).

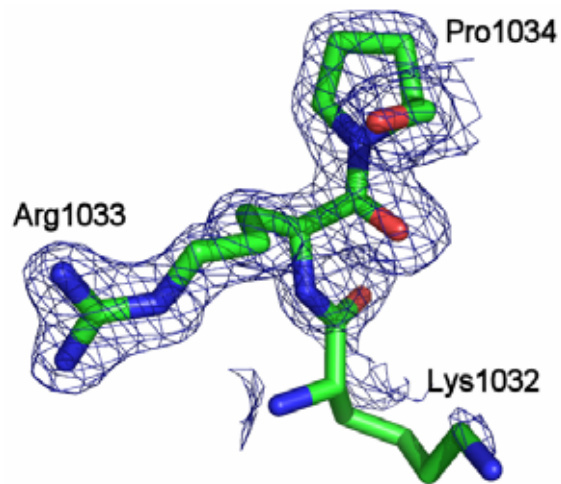
<sup>4</sup> Allgemein beschreibt die TLS-Parameter-Verfeinerung eine Methode, die eine anisotrope Verschiebung von starren Körpern (Atomgruppen) innerhalb des Proteinmodells integriert ohne eine große Anzahl von Parametern, die für eine vollständige anisotrope Verfeinerung notwendig sind, zu verwenden. Detailliert beschrieben wird die Parametrisierung durch Schomaker, Trueblood (Schomaker & Trueblood, 1968; 1998) und Howlin (Howlin et al., 1989).

<sup>5, 6</sup> Zur Unterscheidung wurden die Aminosäuren in der  $\beta$ -Untereinheit von 1-271 und die Aminosäuren der  $\alpha$ -Untereinheit von 1031-1276 durchnummeriert.



**Abb. 3.26:** Ramachandran-Plot des Seleno-Methionin-derivatisierten WSto mit Hilfe des Programms PROCHECK (Laskowski et al., 1993). Die Aminosäure (ARG 1033), die im verbotenen Bereich (weiß, *disallowed regions*) liegt, ist in beiden Ketten des WSto-Dimers in diesen Bereichen des Plots zu finden. Die dunkelblauen Bereiche definieren die bevorzugten (*most allowed regions*), während die hellblauen Abstufungen von innen nach außen in zusätzlich (*additional allowed*) und großzügig erlaubte (*generously allowed regions*) Bereiche der Hauptkettentorsionswinkel eingeteilt sind. Glycine sind als Dreiecke, alle anderen Aminosäuren als Quadrate dargestellt.





**Abb. 3.27:** Repräsentative Ausschnitte der  $2DF_o-mF_c$  gewichteten Elektronendichte des Se-Methionin-derivatisierten WSto bei einer Auflösung von 1,6 Å. Die gezeigte Elektronendichte ist bei  $2.0\sigma$  kontouriert. Die Darstellung zeigt das Ser131 (links oben), Asp1204 (rechts oben) und Arg1033 (unten) und deren unmittelbar benachbarten Aminosäuren. Die beiden ersten Aminosäurereste liegen im Ramachandran-Plot in den großzügig erlaubten, das Arginin hingegen im verbotenen Bereich. Die Atome der Aminosäureseitenketten sind blau (Stickstoff), rot (Sauerstoff) und grün (Kohlenstoff). Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMol (DeLano, 2002) erstellt.

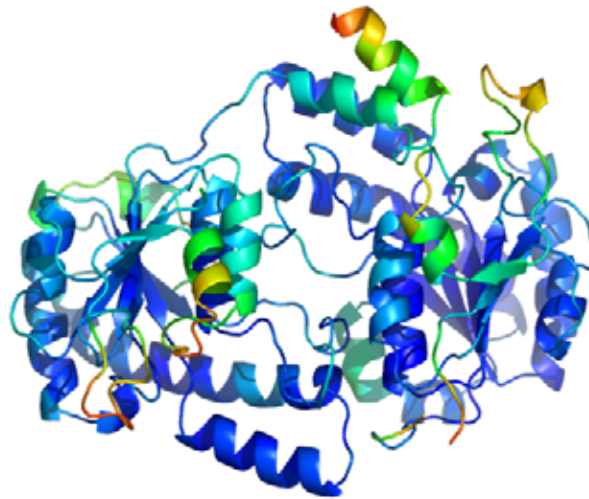
Nicht erfasst vom Programm PROCHECK wurden die durch Se-Methionin derivatisierten Aminosäurereste. In der folgenden Tabelle (Tabelle 3.24) werden die wichtigsten Kenngrößen der Struktur zusammengefasst:

**Tabelle 3.24:** Inhalt und Qualität des verfeinerten Modells. Die Parameter wurden mit REFMAC5 (RMS-Werte) oder SFCHECK (DPI, Luzatti-Plot) berechnet (Vaguine, et al., 1999). Zur unabhängigen Kontrolle der Verfeinerung wurden 5 % der Daten ausgewählt und von der Verfeinerung ausgeschlossen. Mit diesen Daten wurde der freie R-Wert berechnet. Die B-Faktoren wurden mit dem CCP4-Programm BAVERAGE ermittelt. Die Werte der Verfeinerung in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

<b>Inhalt des Modells</b>	
Residuen ( $\alpha$ -und $\beta$ -Kette)	905
Wolfram-Positionen (teilweise besetzt)	17
Wasser	312
<b>Verfeinerung<sup>7</sup></b>	
Auflösungsbereich (Å)	42-1,6 (1,65-1,60)
R <sub>work</sub> (%)	19,3 (27,4)
R <sub>free</sub> (%)	21,0 (30,1)
<b>RMS-Abweichungen</b>	
DPI (Å)	0,066
Bindungslängen (Å)	0,011
Bindungswinkel (°)	1,4
chirale Volumen (Å <sup>3</sup> )	0,09
Luzatti plot (Å)	0,201
<b>B-Faktoren</b>	
Alle Proteinatome (Å <sup>2</sup> )	25,1
Atome der Hauptkette (Å <sup>2</sup> ), Kette A/B	26,0/21,9
Atome der Seitenkette (Å <sup>2</sup> ), Kette A/B	28,4/24,6
Wasser (Å <sup>2</sup> )	33,0

<sup>7</sup> Die Ergebnisse wurden ohne TLS-Verfeinerung erhalten.

Eine wichtige Kenngröße, die auch die Qualität der Daten beschreibt, ist der Temperatur- oder B-Faktor. Im Allgemeinen zeigen niedrige B-Werte eine gut geordnete Struktur während relativ dazu erhöhte B-Werte von Atomen oder Bereichen der Proteinkette eine hohe Flexibilität oder Fehlordnung besitzen. Die Abbildung 3.28 zeigt die Unterschiede in den entsprechenden Regionen des WSto-Dimers.



**Abb. 3.28:** Bänderstruktur des WSto-Dimers ohne die Berücksichtigung der W-Cluster mit Darstellung der entsprechenden Temperaturfaktoren, die blau ( $B < 10\text{\AA}^2$ ), hellblau ( $B < 20\text{\AA}^2$ ), grün ( $B < 30\text{\AA}^2$ ), gelb bzw. rot ( $B > 30\text{\AA}^2$ ) gefärbt sind. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol (DeLano, 2002) erstellt.

### 3.12.2 Die Struktur der $\alpha$ - und $\beta$ - Monomere

Die in früheren Untersuchungen ermittelte Sequenzhomologie spiegelt den nahezu identischen Aufbau der beiden Untereinheiten des Speicherproteins wider (Fenske et al., 2005). Die beiden Monomere stellen eine offene  $\alpha\beta$ -Struktur dar. Diese besteht aus sieben in sich gekrümmten, stark verdrehten Faltblättern, die beidseitig von drei bzw. vier Helices umgeben sind. Diese „Rossmann-Fold“-ähnliche Domäne setzt sich aus einem  $\alpha\beta$ -Kern zusammen. Dieser besteht aus fünf parallel angeordneten Faltblättern ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ,  $\beta 6$ ) deren konkave Vorderseite ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 9$ ) und Rückseite ( $\alpha 5$ - $\alpha 7$ ) mit jeweils drei Helices flankiert ist. Diese Kerntopologie der  $\alpha\beta$ -Schichtenstruktur wird ergänzt durch zwei zusätzliche Flügelanordnungen. Die beiden Flügel, die so genannte Insertionsregionen bilden, befinden sich an den

Rändern des zentralen  $\beta$ -Faltblatts und verlängern dieses in Richtung der konkaven Vorderseite (siehe Abbildung 3.29). Sie bilden mit dem C-terminalen Ende der  $\alpha$ -Stränge ( $\beta 5$  und  $\beta 7$ ) eine Spalte, in welche ATP bindet.

Die strukturelle Anordnung der Insertionsregion I besteht aus zwei antiparallelen, Helices ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ), wobei  $\alpha 3$  den Strang  $\beta 2$  tangential fortsetzt. Die  $\alpha 4$ -Helix ist nur zur Hälfte beteiligt und läuft in die N-terminale Richtung des  $\beta 2$ -Faltblatts zurück. Beide Helices sind umgeben von einem 20 Aminosäurereste langen unregelmäßig geformten Abschnitt, der das  $\beta 4$ -Faltblatt und die  $\alpha 4$ -Helix miteinander verbindet. Der helikale Bereich ( $\alpha 5$ ) unterscheidet durch seine unterschiedliche Länge (13 Reste in der  $\alpha$ - und 4 Reste in der  $\beta$ -Kette) beide Monomere voneinander.

Die zweite Insertionsregion erstreckt sich vom  $\beta$ -Faltblatt bis zur  $\alpha 7$ -Helix und enthält 26 Aminosäurereste. Trotz der unregelmäßigen strukturellen Gestalt enthält diese Region einen helikalen Abschnitt ( $\alpha 6$ ) und ein kleines  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta 5$ ). Dieses bildet mit dem C-terminalen  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta 7$ ) ein paralleles  $\beta$ -Faltblatt, das gegenüber dem zentral gelegenen Faltblatt antiparallele Anordnung besitzt. Die topologische Zusammensetzung der Faltblätter mit Hilfe des Programms TOPS (Michalopoulos et al., 2004) folgt der Sequenz 57-64321. Dies beinhaltet zwischen den Faltblättern  $\beta 1$  und  $\beta 4$  eine funktionell wichtige Region. Die Klassifikation der Domänenstruktur des Speicherproteins wurden mit dem Programm CATH (Pearl et al., 2005) durchgeführt. In der Tabelle 3.25 sind die Aminosäurereste den entsprechenden Sekundärstrukturen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit zugeordnet.

**Tabelle 3.25:** Zusammenstellung der den Sekundärstrukturen der  $\alpha$ -Untereinheit **(A)** und  $\beta$ -Untereinheit **(B)** zugeordneten Nummern der Aminosäurereste. N1 entspricht dem N-terminus der Untereinheit.

(A)

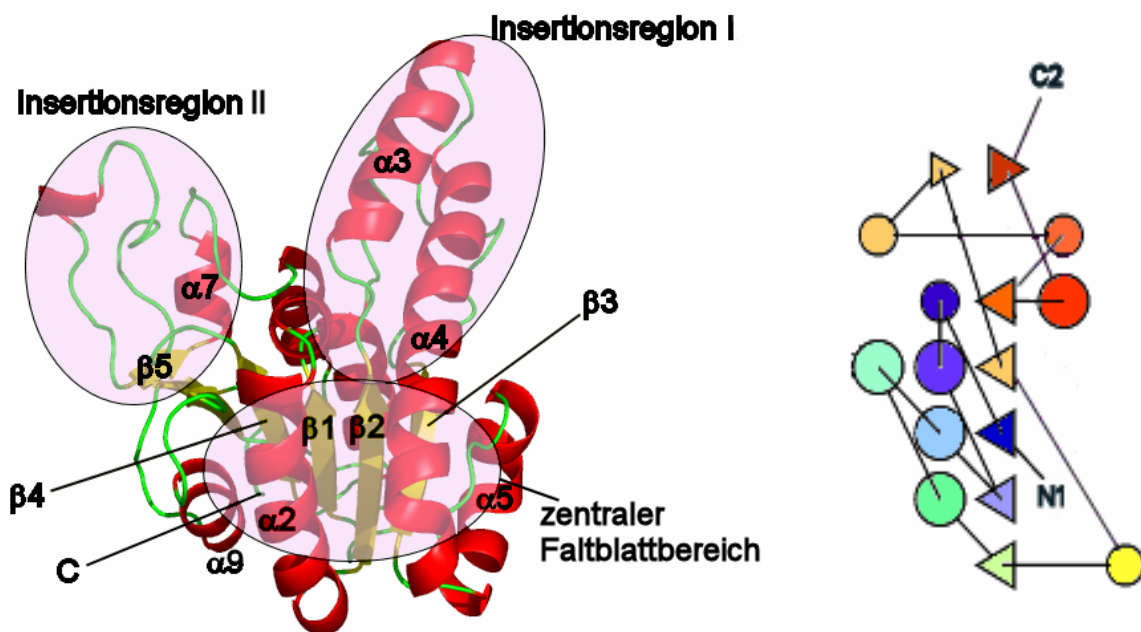
Sekundärstruktur	N1	$\beta 1$	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\beta 3$	$\alpha 6$
Aminosäurereste	31	41- 46	48- 53	55- 71	73- 78	82- 93	97- 122	131- 142	146- 150	170- 181

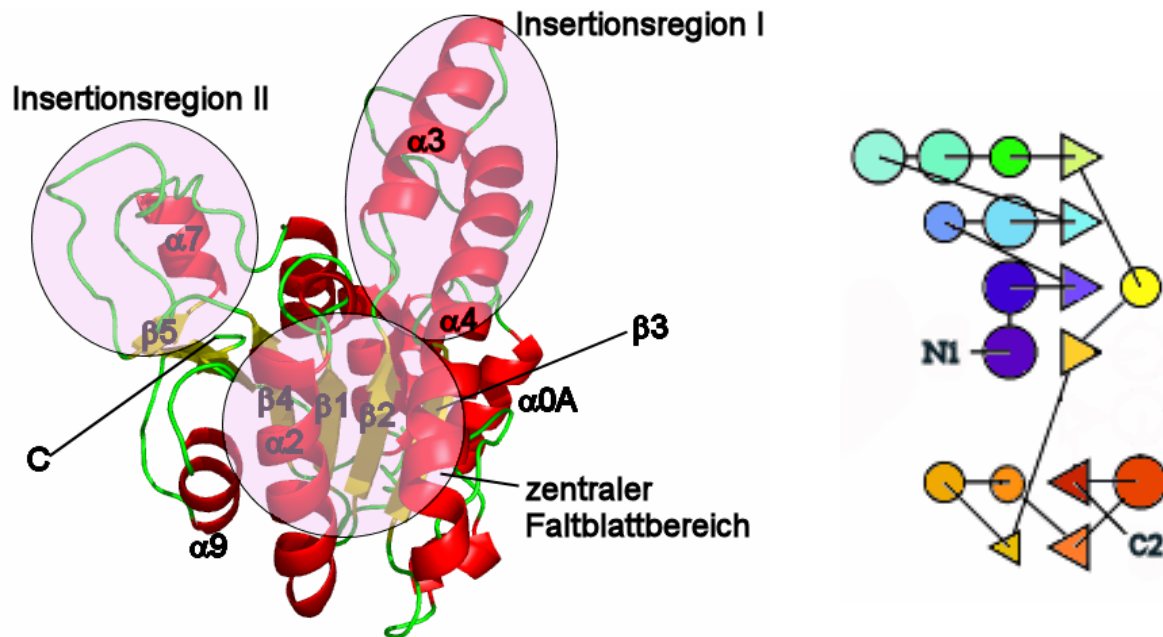
Sekundärstruktur	$\beta 4$	$\beta 5$	$\alpha 7$	$\alpha 8$	$\beta 6$	$\alpha 9$	$\beta 7$
Aminosäurereste	184- 190	213- 215	216- 221	230- 236	244- 249	255- 260	257- 270

(B)

Sekundärstruktur	N1	$\alpha 0A$	$\alpha 0B$	$\beta 1$	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$
Aminosäurereste	3	5- 14	20- 28	39- 43	49- 51	53- 69	72- 76	80- 92	95- 121	133- 137

Sekundärstruktur	$\beta 3$	$\alpha 6$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\alpha 7$	$\alpha 8$	$\beta 6$	$\alpha 9$	$\beta 7$
Aminosäurereste	143- 147	169- 179	184- 189	210- 212	213- 219	228 - 236	242 - 247	253 - 259	264 - 268

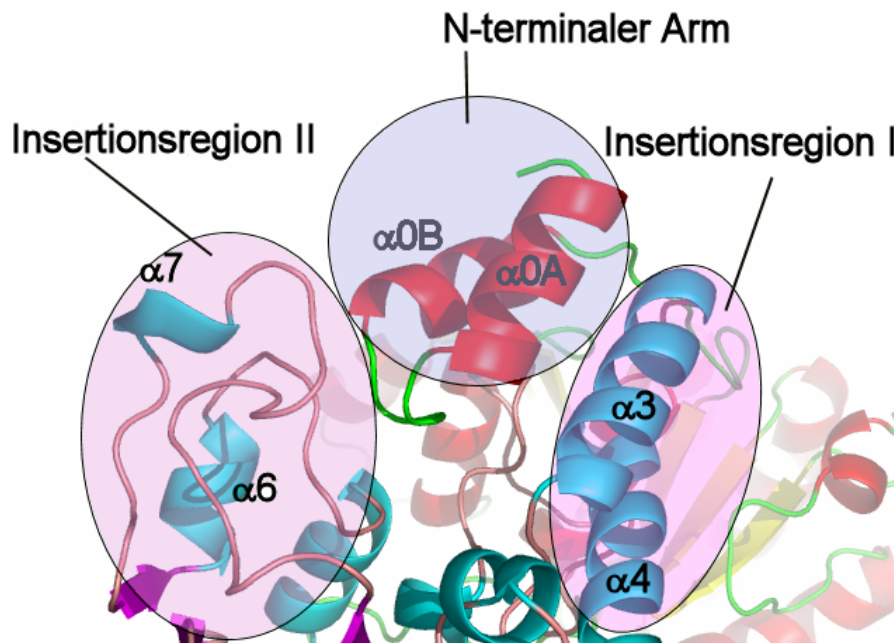




**Abb. 3.29:** Beide Monomere im Vergleich. Die oberen Abbildungen zeigen die Faltung (links) und Topologie (rechts) der Sekundärstrukturen im  $\alpha$ -Monomer, die unteren Modelle die in der  $\beta$ -Untereinheit. Die einzelnen Bereiche der Topologiedarstellung sind entsprechend der Farbskala, N-terminus (Blau) und C-terminus (rot), voneinander zu unterscheiden. Die Dreiecke kennzeichnen Faltsblätter, die Kreise Helices. Die Strukturen der Monomere, die durch gelbe Pfeile (Faltsblätter), rote Helices und grüne Loop-Bereiche zu unterscheiden sind, zeigen die zentral gelagerten Faltsblätter und die beiden Insertionsregionen der Monomere. Die beiden Untereinheiten wurden mit dem Programm PyMol (Delano, 2002) und die Topologie-Darstellungen mit dem Programm TOPS (Michalopoulos et al., 2004) erstellt.

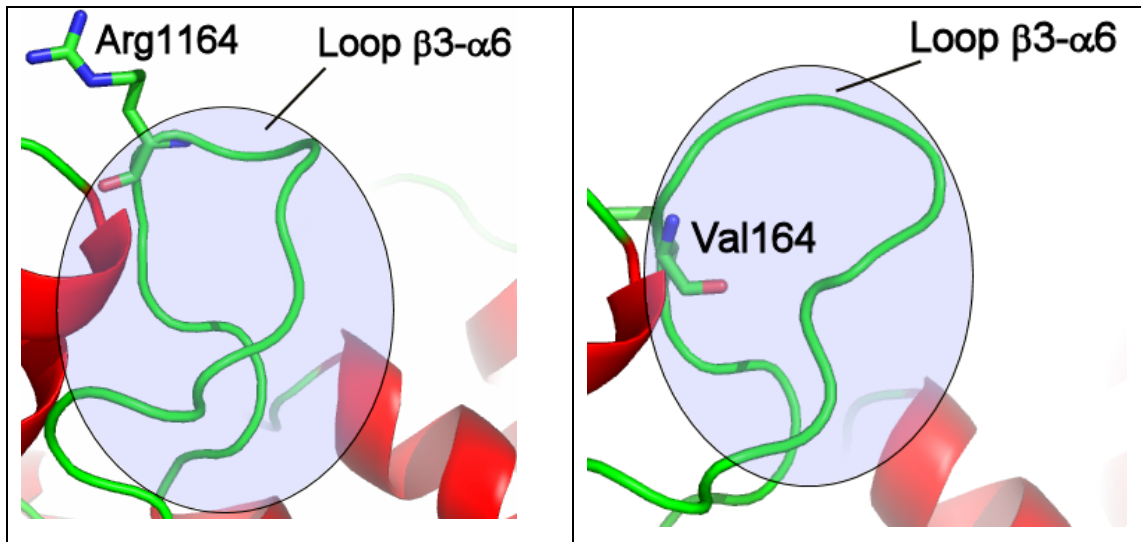
Trotz der im Wesentlichen identischen Faltung der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheit sind einige spezifische und funktionell wichtige Unterschiede vorhanden. Diese spiegeln sich in den rms-Abweichungen (1.6 Å) der beiden Untereinheiten wider. Für die Berechnungen wurden 90% der  $C\alpha$ -Koordinaten verwendet. Besonders auffällig sind die ersten 30 Aminosäurereste, die in der  $\alpha$ -Untereinheit aufgrund ihres ungeordneten Verhaltens im Kristall nicht zu identifizieren sind. In der  $\beta$ -Untereinheit hingegen bilden sie am N-terminalen Ende einen 10Å langen Arm mit zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices. Diese N-terminale Region umschließt die Insertionsregion I

der  $\alpha$ -Untereinheit, und die N-terminalen  $\alpha$ -Helices, die zwischen den beiden Insertionsregionen der  $\alpha$ -Untereinheit eingebettet sind (siehe Abbildung 3.30).



**Abb. 3.30:** Seitlicher Blick auf die beiden Insertionsregionen (violett markierter Bereich) der  $\alpha$ -Untereinheit. Der N-terminale Arm (blau markierter Bereich) der  $\beta$ -Untereinheit ragt in die Öffnung, die sich zwischen den beiden Flügeln befindet.

Die an die  $\beta$ - Untereinheit verankerten zwei N-terminalen Helices ( $\alpha 0A$  und  $\alpha 0B$ ) bilden einen hydrophoben Cluster mit der  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$ -Helix der Insertionsregion I. Interessanterweise enthält der N-terminale Arm der  $\beta$ -Untereinheit sieben aufeinander folgende Alanine. Durch diese Konstellation ist ein enger Kontakt mit dem Insertionsbereich I der  $\alpha$ -Untereinheit gewährleistet. Aufgrund der optimierten Wechselwirkung mit dem N-terminalen Arm nimmt der Loop zwischen  $\beta 3$  und  $\alpha 6$  der  $\alpha$ -Untereinheit innerhalb des Dimers eine andere Konformation als in der  $\beta$ -Untereinheit ein (siehe Abbildung 3.31). So sind die Imido- und Aminbestandteile der Guanidino-Gruppe des Arg1164, dessen Position in der  $\beta$ - Untereinheit ein Valin einnimmt, durch eine H-Brücke mit den Carbonyl-O-Atom des Ala29 und Ala30 bzw. über ein Wassermolekül mit Ala27 verbunden.



**Abb. 3.31:** Unterschiedliche Konformationen des Loops  $\beta 3\text{-}\alpha 6$  (blaue Markierung) zwischen der  $\alpha$ - (links) und der  $\beta$ - Untereinheit (rechts). Die Atome der Aminosäureseitenketten sind blau (Stickstoff), rot (Sauerstoff) und grün (Kohlenstoff). Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMol (DeLano, 2002) erstellt.

Zusätzlich zu dem bereits angesprochenen Loop-Bereich zwischen  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  unterscheiden sich die beiden Untereinheiten durch den Verbindungsabschnitt zwischen dem  $\beta 1$ -Faltblatt und dem helikalen  $\alpha 1$ -Bereich, der in der  $\alpha$ -Untereinheit ein  $\alpha 1a$  und in der  $\beta$ - Untereinheit ein stark verdrehter helikaler Abschnitt ist.

Neben diesen eher geringfügigen Unterschieden in der Sekundärstruktur bestehen in der Loop-Region zwischen dem  $\alpha\beta$ -Zentrum und der Insertionsregion II kleine aber weit reichende Umlagerungen. So dreht sich diese Region II in der  $\beta$ -Untereinheit im Bezug auf den starren  $\alpha\beta$ -Kern in Richtung der Vertiefung zwischen den beiden Flügelbereichen und führt zu einer geschlossenen Konformation der Untereinheiten. In der Tabelle 3.26 sind alle Sekundärstrukturelemente, die in Wechselwirkung mit den entsprechenden Loop-Bereichen stehen, zusammengefasst:

**Tabelle 3.26:** Zusammenstellung der wichtigsten Sekundärelemente.

$\alpha$ -Untereinheit		$\beta$ -Untereinheit	
Helices	Loops	Helices	Loops
$\alpha 1, \alpha 3, \alpha 4, (\text{N-terminal}), \alpha 5, \alpha 6$ und $\alpha 8$	Loop1 (N-terminal), Loop9	$\alpha 1-\alpha 2$ (N-terminal), $\alpha 4, \alpha 6$ und $\alpha 7$	Loop1, Loop2 und 10

Die Kontaktfläche des  $\alpha\beta$ -Dimers, die sich überwiegend durch hydrophobe Wechselwirkungen auszeichnet wurde mit Hilfe des Programms NACCESS (Hubbard & Thornton, 1993) berechnet. Die Tabelle 3.27 zeigt, dass der N-terminale Arm der  $\beta$ -Untereinheit die Kontaktfläche zwischen den beiden Untereinheiten des Speicherproteins entscheidend erhöht und dadurch einen wichtigen Einfluss auf die Stabilität beider Untereinheiten hat.

**Tabelle 3.27:** Zusammenfassung der berechneten Oberflächen und der Kontaktfläche zwischen den beiden Untereinheiten.

	mit N-terminalen Arm (Aminosäure 3-30)	ohne N-terminalen Arm
Kontaktfläche zwischen der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit ( $\text{\AA}^2$ )	2233	1439
Mittlere Oberfläche der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit ( $\text{\AA}^2$ )	12190	11137
Anteil Kontaktfläche und mittleren Oberfläche (%)	18,3	12,9
Oberfläche des Dimers ( $\text{\AA}^2$ )	19914	19396

Das Zentrum der Kontaktfläche liegt auf einer pseudosymmetrischen zweizähligen Drehachse. Dies führt zu einem ausgedehnten Kontakt zwischen den Loops welche durch die  $\beta 2$ -Faltblätter und die  $\alpha 4$ -Helices im Dimer miteinander verbunden sind. Vor allem die Aminosäuren Phe1160, His1168 der  $\alpha$ -, Tyr167 und Tyr152 der  $\beta$ -Untereinheit sind hier hervorzuheben. Die helikalen Bereiche  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  der Insertionsregion I einer Untereinheit, die den Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 6$  der anderen Untereinheit gegenüberliegen, bilden eine weitere ausgedehnte Kontaktfläche.

## Ergebnisse

Die entsprechenden Aminosäuren, die in den beiden Untereinheiten miteinander wechselwirken wurden in der folgenden Tabelle 3.28 zusammengefasst:

**Tabelle 3.28:** Aminosäuren, die für die Stabilität des Dimers durch H-Brücken und hydrophoben Wechselwirkungen verantwortlich sind.

$\beta$ -Untereinheit	$\alpha$ -Untereinheit	Wechselwirkung	Abstand (Å)
Arg157	His168	H-Brücke	3,04
Gln23	Ser163	H-Brücke	2,6
Gln101	Asp135	H-Brücke	2,7
Gln179	Ser100	H-Brücke	2,87
Glu238	Gly162	H-Brücke	4,55
Gly29	Arg164	H-Brücke	3,1
Gly30	Arg164	H-Brücke	2,84
Gly93	Pro34	H-Brücke	2,79
Leu12	Arg85	H-Brücke	2,77
Phe32	Gly95	H-Brücke	2,84
Pro158	Thr238	H-Brücke	4,13
Ser16	Pro226	H-Brücke	3,02
Ser236	Gly162	H-Brücke	3,44
SeMet13	Arg49	H-Brücke	3,22
Thr18	Leu225	H-Brücke	2,84
Trp155	Tyr155	H-Brücke	2,65
Trp155	Gly173	H-Brücke	4,67
Tyr152	His158	H-Brücke	2,5
Ala26	Ileu165	Hydrophobe-WW	3,85
Ileu34	Pro97	Hydrophobe-WW	3,93
Ileu94	Ileu35	Hydrophobe-WW	4,10

Den höchsten Aminosäureanteil an Wasserstoffbrücken in der  $\alpha$ -Untereinheit bilden Arginin (26%) gefolgt vom Glycin (17%). In der  $\beta$ -Untereinheit dominieren vor allem H-Brücken mit Glutamin und Glutaminsäuren (26%) und Glycin (13%), während das Arginin (0,4%) hier nur eine untergeordnete Rolle spielt.

### 3.12.3 Die Struktur des Hexamers

Im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen (Fenske et al., 2005), die eine heterooktamere Oligomerisation für das Speicherprotein postulierten, zeigt die Elektronendichte der Röntgenstruktur eindeutig eine heterohexamere Struktur der Untereinheiten ( $(\alpha\beta)_3$ ). Der kompakt gebaute Proteinkomplex ( $100 \times 100 \times 70 \text{ \AA}^3$ ) besitzt eine 32 pseudosymmetrische Anordnung, die auch in anderen Proteinen gefunden wurde. Während die beiden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des Speicherproteins eine annähernd 2-zählige Drehachse in der asymmetrischen Einheit ausbilden, ist die trimere Anordnung der Monomere  $\alpha_1$ - $\alpha_3$  und  $\beta_1$ - $\beta_3$  zu jeder Seite des Heterohexamers durch eine 3-zählige kristallographische Drehachse definiert. Die hohe Stabilität dieses Aufbaus kommt durch die Wechselwirkung eines jeden Monomers mit vier weiteren Untereinheiten zustande. Die Abbildung 3.31 zeigt, dass Interaktionen zwischen den Monomeren  $\beta_1$  und  $\alpha_2$ ;  $\beta_2$  und  $\alpha_3$ ;  $\alpha_1$  und  $\beta_3$  sowie die Kontakte zwischen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ ;  $\alpha_1$  und  $\beta_3$ ;  $\beta_1$  und  $\beta_2$ ;  $\alpha_1$  und  $\alpha_3$  aufgrund der Symmetrie identisch sind. Ein ausschließlich hydrophober Bereich befindet sich zwischen den Helices der Monomere  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$ .

In der Tabelle 3.29 werden die Aminosäuren und deren Wechselwirkungen des Kontaktbereichs zwischen der Kette der Monomere  $\beta_2/\alpha_1$ ,  $\alpha_1/\alpha_2$  und den Helices der Monomere  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  zusammengefasst:

**Tabelle 3.29:** Aminosäuren und ihre Wechselwirkungen zur Stabilisierung des Hexamers mit Hilfe von H-Brücken und hydrophobe Wechselwirkungen.

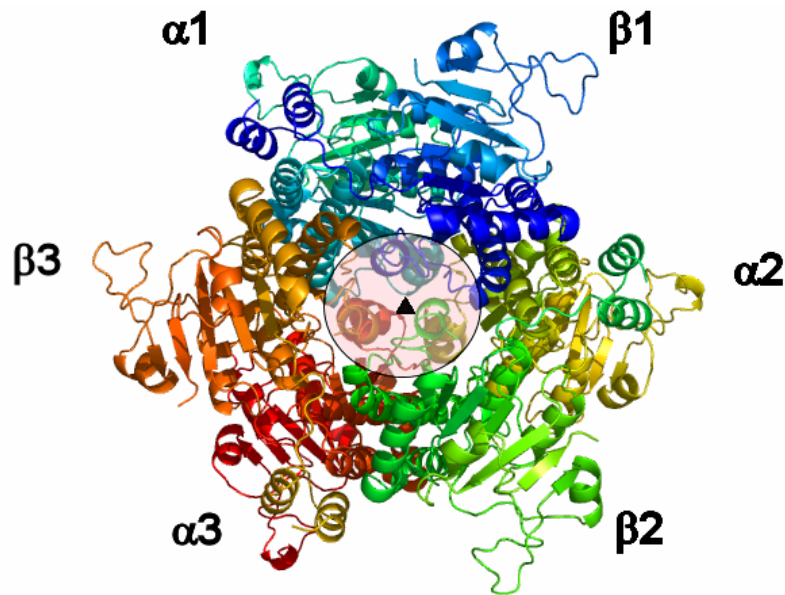
Monomer		Wechselwirkung	Abstand ( $\text{\AA}$ )
$\beta_1$	$\alpha_2$		
Glu108	Gln109	H-Brücke	3,2
Glu116	Ser100	H-Brücke	2,4
His84	Arg83	H-Brücke	2,9
Ser107	Glu109	H-Brücke	2,7
$\alpha_1$	$\alpha_2$		
Leu37	Ser121	H-Brücke	3,2
$\alpha_1$	$\beta_3$		

## Ergebnisse

Asp93	Arg52	H-Brücke	2,7
Asp93	Arg52	H-Brücke	3,6
$\beta 2$	$\beta 3$		
Leu138	Val234	Hydrophobe WW	4,2

Auffällig ist, dass im  $\alpha 2$ -Monomer der Wechselwirkungsanteil an Serin (38%) am größten ist, während im  $\beta 1$ -Monomer die Glutaminsäure (42%) die meisten Wechselwirkungen eingeht. Eine zusätzliche Stabilitätserhöhung erzeugen H-Brücken zwischen Amid- und Carboxylgruppen der  $C\alpha$ -Hauptkette (-C=O---H-N-). Als Beispiel dienen Ser100 und Glu116. Ein ähnliches Phänomen beobachten wir auch bei den Interaktionen zwischen Asp193 und Arg52. Hier bilden sowohl die Amidbindung des basischen Arginins mit der Carbonylgruppe der sauren Asparaginsäure, als auch die Carboxylgruppe der Asp mit der Iminogruppe des Arginin eine H-Brücke.

Die Zusammenlagerung der Heterodimeren um die 3-zählige Achse zum Heterohexamer (Kontaktfläche: 5697 Å<sup>2</sup>) macht 28% der Heterodimeroberfläche unzugänglich. Die Kontaktbereiche werden in den meisten Fällen zwischen  $\alpha 3$ - $\alpha 5$  und den Helices der vorausgehenden und nachfolgenden Loops gebildet. Die Ausbildung einer Pore in der Mitte des Hexamers wird durch die Stellung der  $\alpha 5$ -Helices und des folgenden Loops ( $\alpha 5$ - $\beta 3$ ) verhindert. Die Segmente aller drei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten stehen miteinander im Kontakt und sind um die 3-zählige Drehachse angeordnet (siehe Abbildung 3.32).



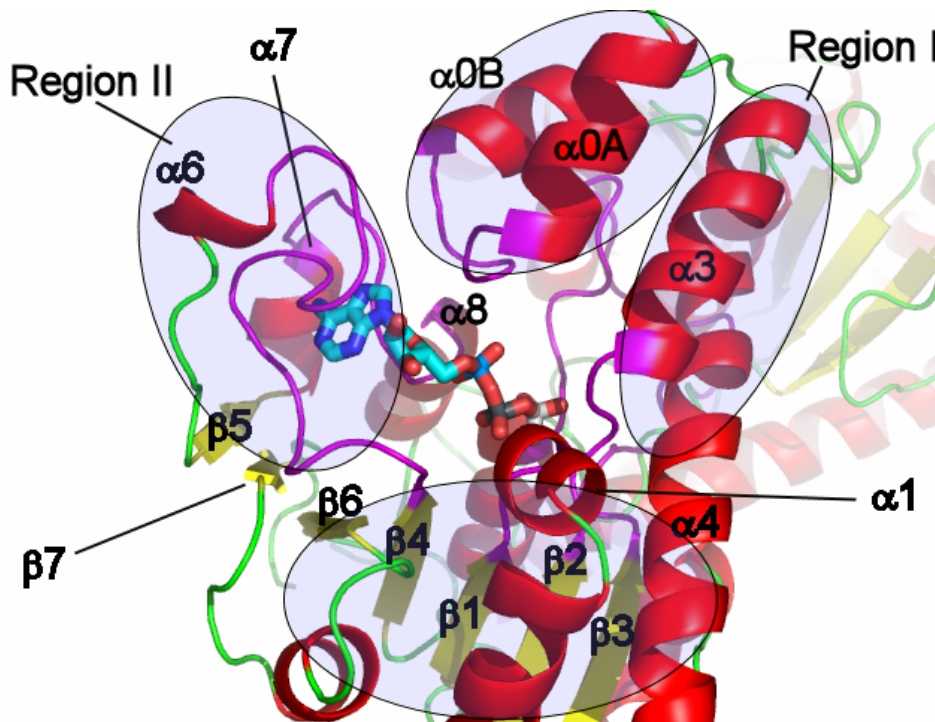
**Abb. 3.32:** Das hexamere WSto in der hexagonalen Kristallform. Die Monomere  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ;  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$ ;  $\alpha_3$  und  $\beta_3$  sind entsprechend ihrer Untereinheiten gefärbt. Die Ketten  $\alpha_1/\beta_1$ ,  $\alpha_2/\beta_2$  und  $\alpha_3/\beta_3$  bilden jeweils eine dimere Struktur. Der farblich markierte Bereich beschreibt die Anordnung der Untereinheiten entlang der 3-zähligen Drehachse (Dreieck) in der Porenregion.

Das Heterohexamer besteht aus einem großen Hohlraum ( $30 \times 30 \times 20 \text{ \AA}^3$ ), der zu gleichen Teilen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten besteht und in dem zu einem Großteil Lösungsmittelmoleküle vollständig eingeschlossen sind. Vor allem die sechs langen  $\alpha_4$ - Helices, die  $\beta_3$ -Faltblätter und die folgende helikale Region tragen zum Aufbau des Hohlraums bei. Die Oberfläche ist überwiegend durch polare Reste wie Histidine, Aspartate, Glutamate und einigen Prolinen bedeckt. Hier befindet sich auch die Bindungsstelle der Wolframoxid-Cluster.

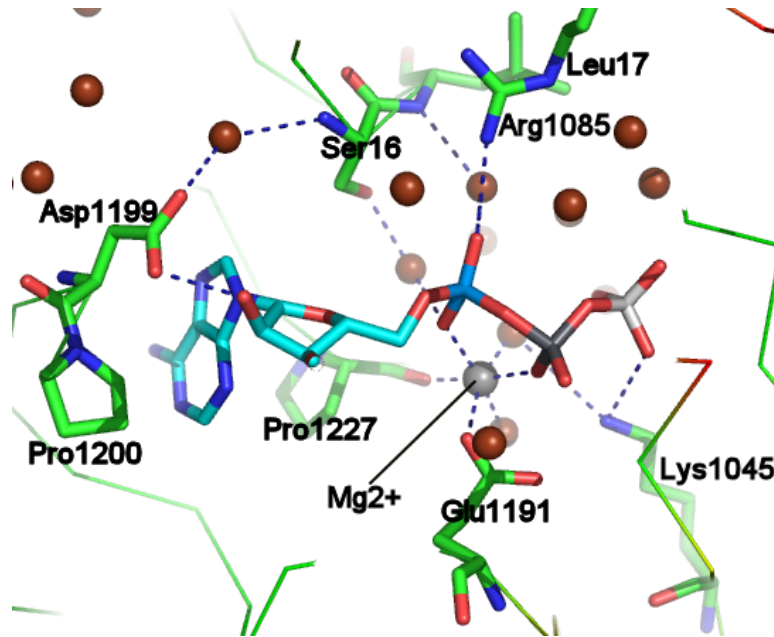
#### 3.12.4 ATP-Bindung und Wechselwirkungen im Speicherprotein

Auch ohne die zusätzliche Zugabe von ATP während der Proteinisolierung und des Kristallisationsprozesses zeigte sich in der Elektronendichte ein vollständig besetztes ATP-Molekül in jeder  $\alpha$ -, aber in keiner  $\beta$ -Untereinheit. Das Kosubstrat liegt in einer Bindungstasche, dessen Seiten die beiden Insertionsregionen bilden (siehe Abbildung 3.33). Der Boden dieser Tasche wird durch Loops gebildet, die sich an der C-terminalen Seite der zentralen Faltblätter befinden. Bedeckt wird die Stelle durch den N-terminalen Arm der  $\beta$ - Untereinheit.

Mit Ausnahme des Riboserings ist das ATP im Protein eingeschlossen und bildet meistens mehrere Wasserstoffbrücken mit der Proteinmatrix entlang des Kosubstratmoleküls (siehe Abbildung 3.34). Der Adenosinrest liegt in einer Spalte, die aus der Insertionsregion II gebildet wird. Der Adeninring wird seitlich durch zwei Proline (Pro1200, Pro1227), ein Asparagin (Asn1201) und eine Asparaginsäure (Asp1199) stabilisiert.



**Abb. 3.33:** Blick auf die ATP-Bindungsstelle der  $\alpha$ -Untereinheit des Heterodimers. Die blau markierten Regionen zeigen den N-terminalen Arm (oben) als eine Art Deckel und den zentralen Faltblattbereich (unten) deren C-terminales Ende den Boden der hydrophoben Tasche bildet, die von den beiden Insertionsregionen seitlich umgeben ist. Die Loops, die an der Bildung der hydrophoben Tasche beteiligt sind, sind gegenüber den anderen Loop-Regionen (grün) magenta gefärbt. Der helikale Anteil in der Bänderdarstellung ist rot, die Faltblätter gelb gefärbt.



**Abb. 3.34:** „Ball and stick“-Darstellung der Proteinumgebung um die ATP-Bindungsstelle. Zur Unterscheidung sind die Kohlenstoffatome des ATP in blau und die der Aminosäurereste in grün gefärbt. Stickstoff ist blau, Sauerstoff rot und die Wassermoleküle braun, wohingegen das  $Mg^{2+}$  grau gefärbt ist.

Die Proline liegen dabei im vorderen, die beiden anderen Aminosäuren im hinteren Bereich des aromatischen Rings. Die beiden Aminosäuren Asn1201 und Asp1199 fixieren durch H-Brücken-Bindung mit den Hydroxylgruppen (OH1- bzw. OH2) die Riboseeinheit des ATP. Zusätzlich sorgt eine H-Brücke des Asp1199 mit der Amidgruppe der Serinseitenkette (Ser16) über ein Wassermolekül für eine Verstärkung der Verbindung zwischen der Insertionsregion II und dem N-terminalen Arm der  $\beta$ -Untereinheit. Die hydrophile Tasche, die die Phosphatgruppen des ATP umgibt, wird durch insgesamt fünf Loops ( $\beta 1-\alpha 1$ ;  $\beta 2-\alpha 3$ ;  $\beta 3-\alpha 6$ ;  $\alpha 7-\alpha 8$  und  $\alpha 0A-\alpha 0B$ ) gebildet. Die  $\beta$ -Untereinheit, die mit einem Loop an der Bildung der hydrophilen Tasche beteiligt ist, steht nicht in direktem van der Waals-Kontakt mit dem Kosubstrat. Der  $\alpha$ -Phosphatrest ist über ein Wassermolekül mit den Seitenketten von Ser16 und über die Aminogruppe des Leu17 mit dem  $\beta$ -Monomer verknüpft. Die negativen Ladungen, die die Sauerstoffatome des Phosphats abschirmen, werden auf der einen Seite durch die basischen Aminosäuren (Lys1045, Arg1049 und Arg 1085) und auf der anderen Seite durch das mit den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphaten koordinierte  $Mg^{2+}$ -Ion kompensiert. Die oktaedrische Umgebung des  $Mg^{2+}$  besteht

aus O-Atom-Liganden der beiden Phosphatgruppen, zwei Aminosäureresten (Glu1191, Pro1227) und zwei Wassermolekülen.

Die  $\gamma$ -Phosphatgruppe spielt bei der Ligandenkoordination des  $Mg^{2+}$  keine Rolle. Allerdings wird die negative Ladung des  $\gamma$ -Phosphats durch die positiv geladenen N-terminalen Enden helikaler Dipole ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$ ) neutralisiert. Die Loop-Regionen der ersten beiden Helices sind durch ein glycinreiches Sequenzmuster ( $^{43}VKIGGR^{48}$  und  $^{77}TGAGVR^{82}$ ) charakterisiert. Diese konservierten Sequenzmotive sind sowohl im MoSto als auch bei anderen Mitgliedern der Aminosäure-Kinase-Familie bekannt (siehe Abschnitt 4.3.4). Bleibt festzuhalten, dass  $\gamma$ -Phosphat durch ein Netzwerk von Wechselwirkungen von 14 direkten oder Wasser- vermittelten H-Brückenbindungen sehr stark an die Proteinmatrix gebunden ist. Ein Beispiel ist das Lys1045, das einerseits eine H-Brücke mit dem  $\gamma$ -Phosphat des ATP bildet und andererseits über ein  $Mg^{2+}$ -bindendes Wassermolekül mit den Seitenketten des Asp1171 und Glu1191 wechselwirkt. Diese beiden Aminosäuren sind wiederum am  $Mg^{2+}$  -Ion koordiniert.

In der folgenden Tabelle werden die wichtigsten Aminosäurereste, die sich an der Kobsstrat-Bindung beteiligen, zusammengestellt:

## Ergebnisse

**Tabelle 3.30:** Wechselwirkungen (H-Brückenbindungen) der funktionellen Gruppen des eingebauten ATP mit den Aminosäureresten des Speicherproteins, den Wassermolekülen und mit dem komplexierten  $Mg^{2+}$  in der Kristallstruktur.

	ATP	WSto	H <sub>2</sub> O	Mg <sup>2+</sup>	Abstand
<i>Funktionelle Gruppe</i>	<i>Atom (PDB-Nummer)</i>	<i>AS-Seitenkette (PDB-Nummer)</i>	<i>PDB-Nummer</i>	<i>PDB-Nummer</i>	<i>(Å)</i>
γ-Phosphat	O11 (2020)	Lys (1045)	-	-	2,8
	O12 (2020)	Gly (1081)	-	-	2,9
	O13 (2020)	-	S3036	-	2,6
β-Phosphat	-	-	S3080	2019	2,1
	-	-	S3097	2019	2,2
	O22 (2020)	-	-	2019	2,1
	O21 (2020)	Arg (1049)	-	-	2,75
		Pro (1227)	-	2019	2,9
		Glu (1190)	-	2019	2,15
α-Phosphat	O31 (2020)	Arg (1085)	-	-	2,9
	O32 (2020)	-	-	2019	2,2
Ribose	OH1-	Asn (1201)	-	-	3,0
	OH2-	Asn (1199)	-	-	2,7

Beim Vergleich der entsprechenden ATP-Bindungsstelle in der β-Untereinheit wurde kein ATP entdeckt. Vielmehr konnte an den β- und γ-Phosphatpositionen der β-Untereinheit ein Elektronendichteprofil ähnlich dem eines 3-Phosphoglycerat beobachtet werden.

Trotz der strukturell ähnlichen Faltung der ATP-Bindungsstelle unterscheiden sich die α- und β-Untereinheiten in drei wichtigen Punkten. Einerseits ist der N-terminale Arm der α-Untereinheit ungeordnet, so dass ein Fixieren des ATP-Moleküls durch das Bedecken der hydrophoben Tasche nicht erfolgt. Andererseits ist das Asp223 durch ein Prolin in der α-Untereinheit ersetzt worden und sorgt für eine

eingeschränkte Beweglichkeit des ATP durch seine Ausrichtung auf dessen Bindungsstelle. Zusätzlich nimmt ein Glu150 der  $\beta$ -Untereinheit die Position des Lys1189 in der  $\alpha$ -Untereinheit ein, so dass die  $Mg^{2+}$ -Bindungsstelle und damit das Netzwerk aus Protein-ATP-Wechselwirkungen zerstört wird. Diese Beobachtungen sind ein wesentlicher Grund für die Abwesenheit der  $Mg^{2+}$ -Ionen in der  $\beta$ -Untereinheit.

### 3.12.5 Die Struktur und Lokalisierung der W-Cluster<sup>8,9</sup>

Ein weiterer Hauptbestandteil zur Strukturlösung des Speicherproteins stellte die Identifizierung des anorganischen Bestandteils dar. Frühere Untersuchungen stellten bereits zweifelsfrei die Existenz einer vielkernigen Molybdän-Sauerstoff-Spezies im MoSto fest (Fenske, et al., 2005). Neben dem genauen strukturellen Aufbau des Polyoxomolybdat-Clusters beschäftigte mich auch die Frage nach der Lokalisation des Clusters im Protein. Frühere Annahmen gingen auch von einem Metallzentrum, das dem von Ferritin ähnelt, aus (Harrison & Arosio, 1996). Allerdings zeigten unsere Untersuchungen zum Freisetzungs- und Einbaumechanismus (siehe Abschnitt 3.7 und 3.8) eine kontinuierliche Aufnahme und Abgabe des Molybdäns, die ein großes Cluster-Kompartiment weniger favorisiert. Außerdem sprechen die EXAFS-Ergebnisse für eine wohl definierte molekulare Spezies, die die Annahme einer größeren Zahl kleinerer Cluster wahrscheinlich machen.

Im Rahmen der Untersuchungen der WSto-Struktur zeigten Messungen des anomalen Signals an der Selen- und der Wolframkante einen Gehalt von 57 Wolframatom pro Hexamer. Neben geringer besetzten Wolfram-Clustern konnten an sieben verschiedenen Positionen fünf unterschiedliche Clusterarten identifiziert werden. Es wurden sechs W2-, jeweils drei W6- und W7-Cluster, jeweils ein W3- und ein Clustertyp mit unbekannter stöchiometrischer Zusammensetzung entdeckt. Eine genaue strukturelle Beschreibung dieser Cluster wird einerseits durch einen relativ geringen Besetzungsgrad des Wolframs verhindert, andererseits durch das starke Streuverhalten des Wolframs und die hohe Beweglichkeit der Oxo-Liganden erschwert. Dies führt einerseits zur Überlagerung der Elektronendichtekarte des

---

<sup>8</sup> Definitionsgemäß besteht ein Metallcluster aus mindestens zwei Metallatomen, die durch Metall-Metall-Bindungen miteinander verknüpft sind (Haberland, 1994).

<sup>9</sup> Die Resultate zum strukturellen Aufbau der Cluster-Einheiten innerhalb des Metall-Protein-Komplexes, sowie deren Lage und Wechselwirkungen im Proteininneren werden in der entsprechenden Veröffentlichung der Speicherproteinstruktur (siehe Abschnitt A1) detailliert beschrieben.

Sauerstoffs und andererseits zu Fehlordnungen innerhalb der Clustereinheiten. Fest steht allerdings, dass sich alle Cluster innerhalb des Hohlraums befinden und mit der Oberflächeninnenseite des Speicherproteins verknüpft sind.

### 3.12.6 Vergleich der WSto-Struktur mit denen möglicher homologer Proteine

Nach der Lösung der dreidimensionalen Struktur des WSto wurde mit dem Programm DALI (Holm, L. & Sander, C, 1996) durch Vergleich der Sekundärstrukturelemente der beiden Untereinheiten des Speicherproteins nach strukturhomologen Proteinen in der PDB-Datenbank gesucht. Diese Suche ergab für beide Untereinheiten mit ATP-abhängigen Transferasen und Kinasen die höchste Strukturhomologie. Allerdings gab es in der Sequenzidentität mit den verglichenen Proteinen geringfügige Abweichungen. Das Ergebnis des Strukturalignment für einige ausgewählte Proteine aus der DALI-Suche ist in der nachfolgenden Tabelle 3.31 zusammengestellt:

**Tabelle 3.31:** Ergebnisse des Strukturvergleiches mit Standardeinstellungen anhand der Sekundärstrukturelemente mit dem DALI-Server. Dabei sind die PDB-Kürzel der Strukturen, die Länge der Aminosäuresequenz, die Anzahl alignierter Aminosäurereste, die sich daraus ergebende RMS-Abweichung der C $\alpha$ -Atome und die Sequenzidentität aufgeführt. Die Sequenzidentität für die  $\alpha$ -Untereinheit wurde in Klammern angegeben.

Name	PDB-ID	Länge	Align	RMS	Seq.Id:(%)	Familie
Uridylat-Kinase	1ybd	225	199	2,3	22 (20)	UK (Uridinmonophoshat)
Acetylglutamat-Kinase	1gs5	258	200	2,9	17 (18)	NAGK (NAG-Kinase)
Glutamat 5-Kinase	2ako	237	186	3,8	16 (15)	Gamma-Glutamyl Kinase
Carbamat-Kinase	1b7b	307	187	4,2	16 (16)	cbk ( <i>Enterococcus faecum</i> )

## 4 Diskussion

### 4.1 Der oligomere Zustand des Speicherproteins

#### 4.1.1 Die Molmasse des Speicherproteins

Trotz bisher umfangreicher Untersuchungen mit unterschiedlichen Methoden ist die Molmasse des Speicherproteins noch nicht zweifelsfrei bestimmt.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mittels Kleinwinkelstreuung (SAXS) und Gelfiltration (siehe Abschnitt 3.5.1), ergaben zusätzliche Untersuchungen durch analytische Ultrazentrifugation (UZ) von MoSto und WSto und nativer Elektrophorese (siehe Abschnitt 3.5.2 und 3.5.3) des W-enthaltenen Speicherproteins keine oktamere Einheit aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette ( $\alpha_4\beta_4$ ), sondern zwei (WSto) bzw. drei (MoSto) Strukturhomologe, die aus der Molmasse abgeleitet wurden. Neben einem hexameren ( $\alpha_3\beta_3$ ) und dodekameren ( $\alpha_3\beta_3$ )<sub>2</sub> Strukturanteil finden sich im MoSto auch nachweisbare Mengen des hochmolekularen Tetracosamers ( $\alpha_3\beta_3$ )<sub>4</sub> (siehe Abbildung 3.6).

Gute Übereinstimmungen der Molmassen beim Vergleich der Ergebnisse der UZ und der nativen Elektrophorese bestätigen und unterstützen die Röntgenstrukturuntersuchungen, die für MoSto und WSto ein Trimer von Dimeren ergeben (siehe Abschnitt 3.14.3). Die Ergebnisse der UZ zeigen auch, dass der hexamere  $\{(\alpha\beta)_3\}$  Anteil beim WSto nur etwa 30 % und beim MoSto gar nur 10 % des Proteinbestandteils darstellt (siehe Abbildung 3.6).

Somit steht fest, dass das Speicherprotein in gelöster Form hauptsächlich als Dodekamer vorliegt und die kleinste Einheit, aus der sich die dimere  $\alpha\beta$ -Untereinheit zusammensetzt, ein Hexamer ist. Dies erklärt auch den großen präzipitierten Anteil bei hohen Proteinkonzentrationen ( $\geq 15$  mg/ml) während des Kristallisationsvorgangs. Zudem bestätigen die Untersuchungen eine mögliche dodekamere Kristallstruktur, die sich aus zwei hexameren Einheiten zusammensetzt. Die entsprechenden Ergebnisse der UZ und der nativen Elektrophorese sind in der Tabelle 4.1 zusammengestellt:

**Tabelle 4.1:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Molmassenuntersuchungen

Molmassen (kDa)			Untereinheitenstruktur
UZ		native Elektrophorese	
MoSto	WSto	WSto	
		~30	$\alpha$ -und $\beta$ -Untereinheit
170	168	~170	Hexamer ( $\alpha_3\beta_3$ )
314	286	~285	Dodekamer ( $\alpha_3\beta_3$ ) <sub>2</sub>
600	-	~600	Tetracosamer ( $\alpha_3\beta_3$ ) <sub>4</sub>
170	168	~170	Hexamer ( $\alpha_3\beta_3$ )

## 4.2 Der Freisetzungs- und Einbaumechanismus des Speicherproteins

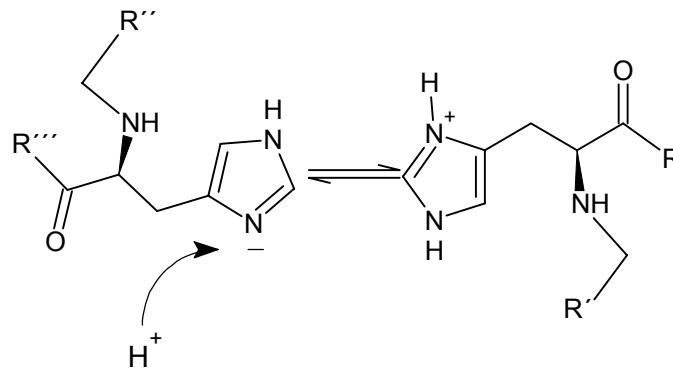
### 4.2.1 Der Freisetzungsmechanismus

Die früheren Untersuchungen zur Freisetzung, die den Freisetzungsprozess als pH-regulierten Effekt in einem engen pH-Bereich (oberhalb von 7,1) sahen, konnten durch unsere detaillierten Studien diesbezüglich nur zum Teil bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.7). Da auch die Parameter Temperatur, Zeit, Proteinkonzentration, sowie die Qualität der Präparation (Reinheit, Stabilität) eine entscheidende Rolle bei den Untersuchungen spielten, beschränkte ich mich auf Experimente, bei denen von den vier Parametern (pH-Wert, Temperatur, Inkubationszeit und Proteinkonzentration) jeweils nur einer variiert wurde, während die drei anderen auf feste Werte eingestellt waren.

Die Ergebnisse der pH-Wert kontrollierten Mo-Freisetzung zeigten einen dreistufigen Prozess, der einen pH-Bereich von 6.8 bis 8.0 abdeckte. Besonders gegenüber der pH-Änderung erwies sich der Polymolybdatcluster als sehr labil. Die Erklärung für die stufenweise Mo-Freisetzung mit ansteigendem pH-Wert liefern elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Protein und den Histidin-Seitenketten, deren pKs-Wert von der Umgebung beeinflusst wird. Histidin nimmt aufgrund seiner Fähigkeit als Protonendonator und Protonenakzeptor zu fungieren eine Sonderstellung bei der Freisetzung und dem Einbau von Oxometallaten ein. Von den insgesamt das Hexamer enthaltenden 51 Histidinatome stehen 20 davon in direkter Wechselwirkung mit den Clustern. Neben dem Vergleich des berechneten isoelektrischen Punktes

des Speicherproteins ( $pI=7,26$ ) mit Histidin ( $pI=7,47$ ) bekräftigten vor allem die Ergebnisse der Röntgenstruktur unsere Untersuchungen. Sie zeigten, dass Histidine einerseits über H-Brücken mit den Oxo-Liganden der entsprechenden Cluster wechselwirken und andererseits sogar als Donatoren für Clusterliganden, wie im Fall des W3-Clusters bereits beschrieben wurde (siehe Abschnitt 3.12.5), fungieren.

Dabei kommt der für die Freisetzung wichtige Deprotonierungsprozess des Histidylrests erst im physiologischen Bereich zum Tragen. Dabei wird vermutlich am N1-Atom des Imidazolrings ein Proton abstrahiert und zuerst die Cluster mit geringerer Wechselwirkung zu den Histidin-Atomen freigesetzt.



**Abb. 4.1:** Schema des Protonierungs- bzw. Deprotonierungsmechanismus des Histidylrests bei physiologischem pH. Die benachbarten Aminosäureketten des Speicherproteins werden mit R, R', R'' und R''' abgekürzt.

Oberhalb des pH-Werts von 8 werden auch die als Liganden an den Clustern koordinierten Histidyl- und die übrigen Aminosäurereste (z.B. Glu1129) abgetrennt.

Neben dem Histidin, das für die stufenweise Freisetzung des Molybdäns verantwortlich ist, leisten auch andere Aminosäuren einen entscheidenden Beitrag zur Stabilisierung des Protein-Cluster-Komplexes. Dies zeigten in der Röntgenstruktur zum Einen Amid-NH-Brückenwechselwirkungen zwischen Asparagin (Asn136, Asn1111) und Glutamin (Gln1136) mit den Oxometallaten der Cluster und zum anderen saure Aminosäuren wie Glutamin- und Asparaginsäuren als Sauerstoff-Donatoren für Clusterliganden (siehe Abschnitt 3.12.5).

Der weitere Verlauf der Messungen ließ den Schluss zu, dass die Temperatur als Freisetzungsfaktor nur eine indirekte Rolle spielt und lediglich den Ablauf der Protonierung beschleunigt, aber deren Grad nicht entscheidend verändert. Aus den Ergebnissen der Studien mit verschiedenen Inkubationszeiten ergibt sich, dass die Mo-Freisetzung wohl keine sehr schnelle Reaktion ist, da die Freisetzungsrates durch eine verlängerte Inkubationszeit erhöht werden kann. Außerdem hat auch noch die Proteinkonzentration entscheidenden Einfluss auf die Stabilität des Holo-Proteins und gewährleistet damit einen Schutz des Molybdän- bzw. Wolfram-Bindungs-zentrums. Ein Grund könnte in der konzentrationsabhängigen Aggregation von Speicherprotein-Hexameren liegen. Diese konnten sowohl bei Gelfiltrationsläufen als auch bei der analytischen Ultrazentrifugation im Bereich von 300 und 600 kDa beobachtet werden.

Ein weiterer Faktor, der die Freisetzung entscheidend beeinflusst, ist die zelluläre Mg-ATP-Konzentration, die durch das Zellwachstum beeinflusst wird. Untersuchungen zeigten (siehe Abschnitt 3.9), dass die Anwesenheit von Mg-ATP nicht nur wichtig für den Einbau von Mo oder W ist, sondern im Umkehrschluss auch den Grad der Freisetzung reduziert. Unter Freisetzungsbedingungen (siehe Abschnitt 3.7) kann dieser Effekt oberhalb von 0,1 mM Mg-ATP beobachtet werden. Durch diesen Einfluss lassen sich auch die nicht kontrollierbaren Mo bzw. W-Verluste während der Herstellung von zellfreien Proteinpräparaten erklären, da die Zellwachstumsbedingungen, die intrazellulär schwanken können, natürlich auch die ATP-Bildung und damit die Konzentration an ATP in der Zelle beeinflussen.

Sicherlich ist es schwer oder sogar unmöglich die intrazellulären Bedingungen eines isolierten Proteins in einer wässrigen Pufferlösung zu simulieren. Unklar sind neben der tatsächlichen intrazellulären Proteinkonzentration auch die Anwesenheit, der Aufbau und die Konzentration anderer Substanzen und Faktoren, die möglicherweise einen Einfluss auf den Mo-Freisetzungsmechanismus haben. Weitere Einblicke in den Zusammenhang zwischen Mo-Freisetzung/Einbau und dem ATP werden Untersuchungen liefern, die den Konzentrationsverlauf des ATP im zellfreien Proteinpräparat detektieren, um zu überprüfen, ob der Clusterabbau bei den entsprechenden Bedingungen auch eine ATP-Freisetzung aus dem Speicherprotein zur Folge hat. Allerdings sind sie nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit.

### **4.2.2 Der Einbaumechanismus**

Der energieverbrauchende, ATP-abhängige Einbauprozess von Mo und W in MoSto

zeigt, dass er über die Nukleotidkomponente mit dem Freisetzungsmechanismus verknüpft ist, allerdings im Gegensatz zur Freisetzung pH-Wert-unabhängig ist. Die Rolle, die das ATP beim Einbau möglicherweise spielt ist eine Modifizierung der Proteinkonformation, die einen Einbau der Wolframate bzw. Molybdate ins Proteininnere erlaubt. Denkbar wäre bei einer Bindung (oder Hydrolyse) von ATP an die erste  $\alpha$ -Untereinheit eine konformative Beeinflussung der benachbarten  $\alpha$ -oder  $\beta$ -Untereinheit innerhalb des Hexamers. Diese würde dann zu einer erhöhten Bindungsaffinität für ATP der noch unbesetzten ATP-Bindungsstellen führen. Dies würde eine Art von Liganden-induzierter Kooperativität voraussetzen und bedarf weiterer Untersuchungen. Einbaustudien mit anderen Nukleotiden zeigten, dass der Bindungsprozess durch die Anwesenheit aller drei Phosphatgruppen und des Adenosins sehr stark beeinflusst wird.

Wichtig bei der Betrachtung des Einbaumechanismus ist die Zugabe äquimolarer Mengen von  $MgCl_2$ , die notwendig ist, um den nukleophilen Charakter der Sauerstoffatome des Phosphats durch das  $Mg^{2+}$  herabzusetzen. Messungen zeigten, dass trotz ATP-Zugabe ohne den Zusatz des Magnesiums keinerlei Einbau stattfindet. Allerdings kann ein ATP/Mg/Oxometallat-Komplex aufgrund der Beobachtungen in der Röntgenstruktur ausgeschlossen werden, da der Abstand zwischen den Phosphat-Gruppen und den entsprechenden Clustern ( $\sim 13\text{\AA}$ ) zu groß für eine direkte Wechselwirkung ist.

### **4.3 Wichtige Strukturmerkmale des Speicherproteins und der Vergleich mit anderen ähnlichen Proteinen**

Aufbauend auf den Resultaten, die wir im letzten Abschnitt diskutierten, zeigten die Untersuchungen der Röntgenstrukturanalyse (siehe Abschnitt 3.13.2 und 3.13.3) wichtige strukturelle Eigenschaften, die einerseits eine entscheidende Rolle beim Einbau- und Freisetzungsmechanismus der Oxometallate und des Kosubstrats ATP spielen und andererseits die Stabilität des Speicherproteins gewährleisten.

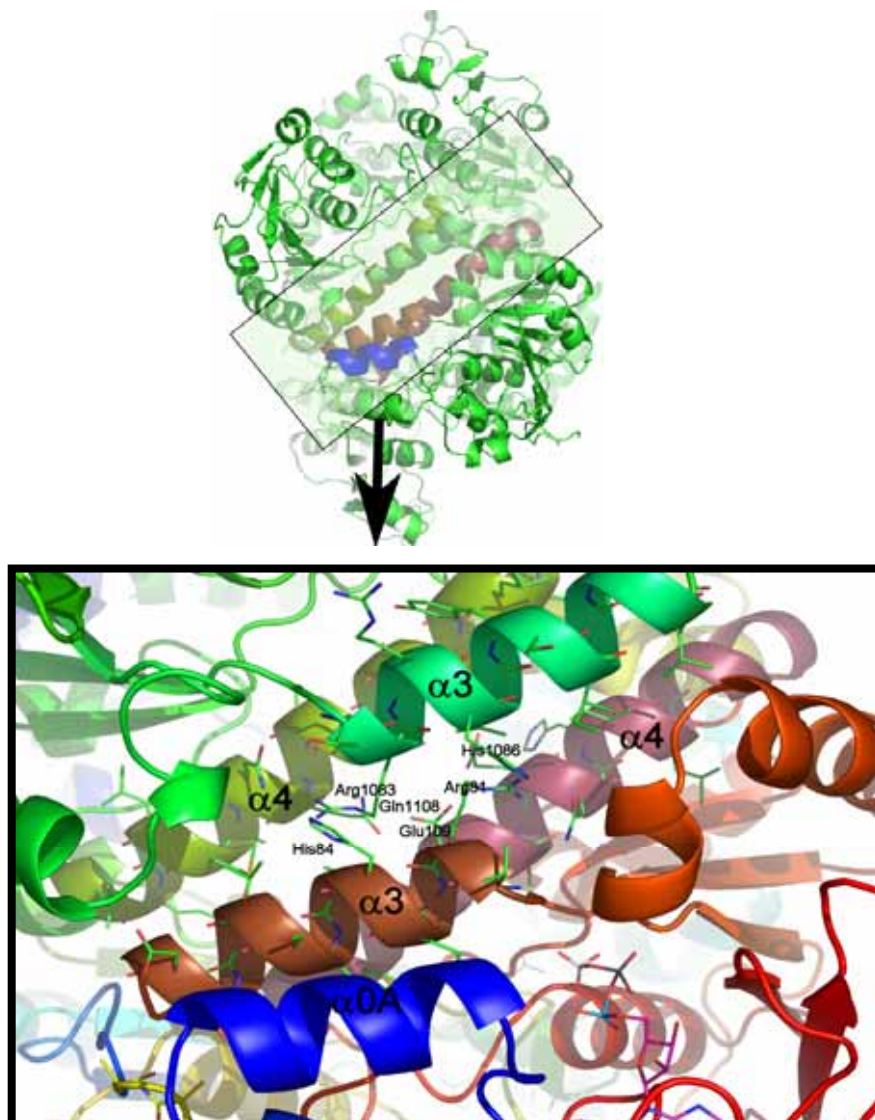
Die Strukturmerkmale, die für das Dimer der beiden  $\alpha$ -und  $\beta$ -Untereinheiten bereits beschrieben wurden, kommen aufgrund des entsprechenden pseudo-symmetrischen trimeren Aufbaus der Dimere auch im Hexamer zum Tragen.

#### **4.3.1 Typ1-Insertionsbereich**

Eine wichtige Strukturkomponente, die sich vom Dimer ableitet (siehe Abschnitt 3.13.2), sind die Insertionsregionen, die sich aus einem Typ I mit hohem helikalen

und Typ II mit hohem Loop-Anteil zusammensetzen. Ein wichtiges Unterscheidungskriterium ist die Lokalisierung der beiden Regionen im Hexamer. Im Gegensatz zum Typ II im peripheren Bereich des Proteins, befindet sich Typ I oberhalb der C-terminalen Region des sechs-strängigen parallelen  $\beta$ -Faltblatts (siehe Abbildung 4.2). Die Überlagerung der einzelnen Insertionsregionen der Untereinheiten aus den entsprechenden Dimeren bilden die Ecken einer Vertiefung mit einer Größe von (36 X 8,5) Å. Durch die symmetrische Anordnung der Dimere im Hexamer um eine dreizählige Achse zu einem Trimer, überlagern sich je zwei Typ I-Regionen folgender Untereinheiten zu drei übergeordneten Typ I Regionen:

- $\alpha$ -Untereinheit (Dimer 1)  $\rightarrow$   $\beta$ -Untereinheit (Dimer 3)
- $\alpha$ -Untereinheit (Dimer 2)  $\rightarrow$   $\beta$ -Untereinheit (Dimer 1)
- $\alpha$ -Untereinheit (Dimer 3)  $\rightarrow$   $\beta$ -Untereinheit (Dimer 2)



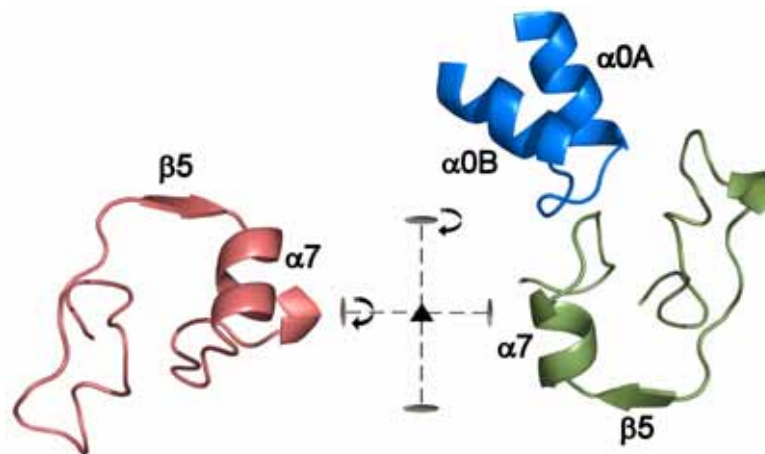
**Abb. 4.2:** Darstellung der Insertionsregion I im Hexamer (oben) und im Detail (unten). Die helikalen Bereiche der  $\alpha$ -Untereinheit sind grün, die der  $\beta$ -Untereinheit braun ( $\alpha 3$ ) und violett ( $\alpha 4$ ). Ein Teil des N-terminalen Arms ist blau gefärbt.

Aus der Abbildung wird auch ersichtlich, dass die helikalen Bereiche  $\alpha 3$  (Ala1080-Asp1093 der  $\alpha$ -, Thr80-Gly93 der  $\beta$ -Untereinheit) und  $\alpha 4$  (Val1098-Ser1122 der  $\alpha$ -, Ala96-Val122 der  $\beta$ -Untereinheit) der Insertionsregion den Kontakt zwischen beiden Untereinheiten ausbilden. Hervorzuheben sind die beiden Aminosäuren His1086 ( $\alpha 3$  der  $\alpha$ -Untereinheit), His84 ( $\alpha 3$  der  $\beta$ -Untereinheit), die durch H-Brückenbildung ihrer NH-Gruppen des Imidazolrings mit der Guanidiniumgruppe des Arg81 ( $\alpha 3$  der  $\beta$ -Untereinheit) und Arg1083 ( $\alpha 3$  der  $\alpha$ -Untereinheit) verknüpft sind, und die neben der Stabilität der Insertionsregion noch Protonierungs- und Deprotonierungsaufgaben für den Molybdat- bzw. Wolframtransport übernehmen. Neben der weiteren H-Brückenbindung zwischen Gln1108 ( $\alpha 4$  der  $\alpha$ -Untereinheit) und Glu109 ( $\alpha 4$  der  $\beta$ -Untereinheit) sind auch hydrophobe und polare Wechselwirkungen mit dem N-terminalen 2-fach helikalen Arm der  $\beta$ -Untereinheit ( $\alpha 0A$ ,  $\alpha 0B$ ) des entsprechenden Dimers an der Bindung der Untereinheit beteiligt. Die Aminosäuren Leu9, Leu12 der  $\alpha 0A$ -Helix bilden mit Phe1088 und Leu1092 ( $\alpha 3$  der  $\alpha$ -Untereinheit) die wichtigsten Bestandteile der hydrophoben Wechselwirkung. Zudem findet eine Verknüpfung zwischen Thr5 und Asp1093 über ein Wassermolekül statt. Viel wichtiger ist aber in diesem Zusammenhang die Wechselwirkung zwischen Glu9 und His1086, welches wie bereits oben beschrieben mit Arg81 auch wechselwirkt. Diese drei Aminosäuren könnten ein Protonenübertragungssystem darstellen mit Glutaminsäure als Akzeptor, Arginin als Donator und Histidin als Protonenübertragungszentrum. Ich werde diese Thematik im letzten Abschnitt der Diskussion noch einmal genauer aufgreifen

### 4.3.2 Typ 2-Insertionsbereich

Das besondere Strukturmerkmal der Insertionsregion II (siehe Abschnitt 3.13.2) ist der hohe Loop-Anteil, der für eine sehr hohe Beweglichkeit in dieser Region sorgt. Allerdings gibt es Unterschiede zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit in einem Dimer. Die überwiegend hydrophobe Tasche, die durch den Loop-Bereich zwischen  $\beta 5$ ,  $\beta 6$  und  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  gebildet wird, besitzt aufgrund der unterschiedlichen Faltung in der  $\beta$ -Untereinheit einen engeren Eingang ( $\sim 4,5\text{\AA}$ ) als in der  $\alpha$ -Untereinheit ( $\sim 7\text{\AA}$ ). Zudem

sorgt in der  $\alpha$ -Untereinheit die Interaktion des Loops zwischen dem N-terminalen Arm der  $\beta$ -Untereinheit für eine räumliche Abgrenzung dieser Region und bildet den Raum für das Kosubstrat (ATP). Zusätzlich ändert sich die Konformation der hydrophoben Tasche durch die Anwesenheit des N-terminalen Arms, so dass man bei der Insertionsregion der  $\beta$ -Untereinheit von einer geschlossenen und im  $\alpha$ -Monomer von einer offenen Konformation sprechen kann, obwohl so durch den N-terminalen Bereich die  $\alpha$ -Untereinheit bedeckt wird (siehe Abbildung 4.3).



**Abb. 4.3:** Struktureller Vergleich der Insertionsregionen II der Untereinheiten im Heterodimer des Speicherproteins. Die Region der  $\beta$ -Untereinheit (rot) ist gegenüber der  $\alpha$ -Untereinheit (grün) durch eine senkrechte und waagerechte Drehung um  $180^\circ$  (2-zählige Drehachse) im Uhrzeigersinn zur Deckung zu bringen. Durch die Interaktion des helikalen N-terminalen Arms der  $\beta$ -Untereinheit (blau) mit der Insertionsregion des  $\alpha$ -Monomers ist die Konformation des Loops zwischen  $\beta 5$  und  $\beta 6$  der  $\alpha$ -Untereinheit gegenüber der  $\beta$ -Untereinheit länger und erzeugt eine offene Form der Insertionsregion II.

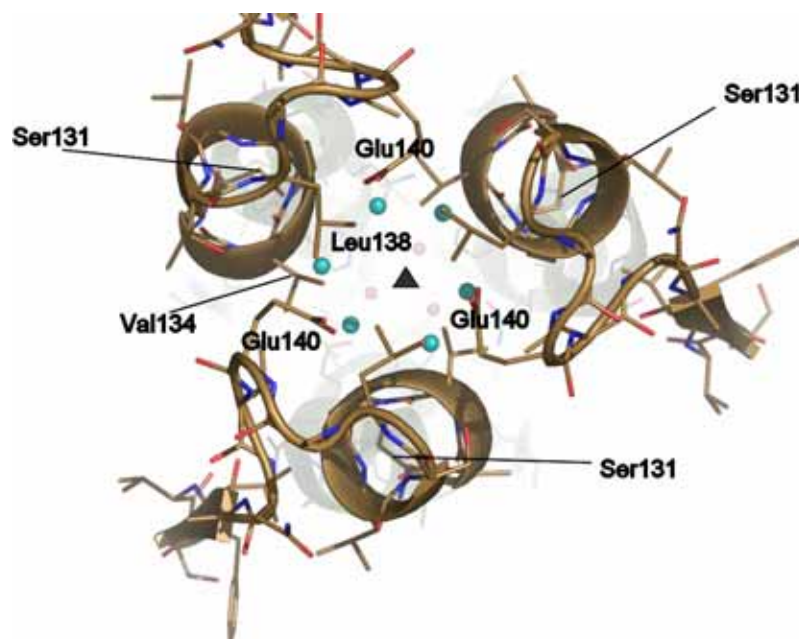
Die hydrophoben Reste dieser amphiphilen Region setzen sich aus Isoleucin und Leucin zusammen und füllen den engeren Innenraum in der  $\beta$ -Untereinheit stärker aus als in der entsprechenden  $\alpha$ -Untereinheit. Somit besitzen also nur drei der insgesamt sechs Insertionsregionen II eine ATP-Bindungsmöglichkeit.

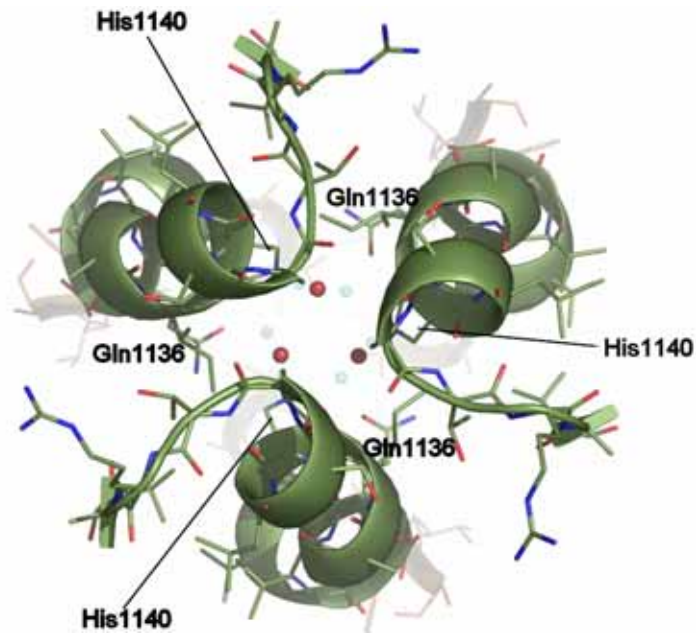
Die Aufgaben der Insertionsregionen innerhalb des Speicherproteins sind unterschiedlicher Natur. So sorgt die Region I für die Bindung und zum Teil für den Transport der Oxometallat-Cluster sowohl ins Proteininnere als auch nach außen

durch Protonierungs- bzw. Deprotonierungsreaktionen. Der Region II obliegt die Bindung des ATP, das vor allem für den Einbau der Clusterbausteine  $\text{MoO}_4^{2-}$  und  $\text{WO}_4^{2-}$  ins Protein notwendig ist.

#### 4.3.3 Kontaktbereich zwischen je drei Untereinheiten ( $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ ; $\beta 1, \beta 2, \beta 3$ )

Neben diesen wichtigen Strukturbestandteilen besitzt das Hexamer des Speicherproteins zwei Kontaktbereiche, durch deren Mittelpunkt die 3-zählige kristallographische Achse des Speicherproteins verläuft (siehe Abbildung 4.4). Aufgrund der Gruppierung unterschiedlicher Untereinheiten um beide Kontaktbereiche, die bereits im Ergebnissteil beschrieben wurden, resultieren Unterschiede in der Faltung und der Größe. Dies hat womöglich eine Auswirkung auf die Gestalt und Zusammensetzung der in den Eingängen der beiden Hohlräume befindlichen Wolframoxid-Cluster. Wie Abbildung 4.6 zeigt setzt sich ein Kontaktbereich aus drei  $\alpha 5$ -Helices der  $\beta$ -Untereinheit (Typ  $\beta$ ) zusammen während sich die gegenüberliegende Öffnung aus den entsprechenden Helices der  $\alpha$ -Untereinheit zusammensetzt (Typ  $\alpha$ ).





**Abb. 4.4:** Ausschnitt der Umgebung der beiden Eingänge der Kontaktbereiche des Typs  $\beta$  (obere Abbildung) und des Typs  $\alpha$  (untere Darstellung) mit Blick auf die dreizählige kristallographische Achse (schwarzes Dreieck) des Hexamers. Farblich sind die Wolframatome des W6-Clusters in cyan (oben) und dunkelrot (unten), die Stickstoffatome blau, die Sauerstoffatome rot und die Kohlenstoffatome braun (oben) und grün (unten) zu unterscheiden. Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMol (DeLano, 2002) erstellt.

Aufgrund der unterschiedlichen helikalen Faltungen erhalten wir unterschiedliche Größen für den Kontaktbereich des Typ I ( $\varnothing \sim 5.92 \text{ \AA}$ ) und Typ II ( $\varnothing \sim 3.89 \text{ \AA}$ ). Im Gegensatz zum Typ  $\alpha$  sind die hydrophoben (Leu138, Val134) und polaren (Glu140) Aminosäurereste des Typ  $\beta$  ins Innere der Pore gerichtet. Dadurch resultieren für den  $W_x$ -Cluster nur 3 H-Brücken mit dem Aminosäureseitenketten (Ser 131), wohingegen der W3-Cluster im Kontaktbereich vom Typ  $\alpha$  durch die drei Histidine N-substituiert ist und zusätzlich durch drei H-Brücken (Glu1136) eine sehr polare Umgebung besitzt. Die Histidine (His1140) und Glutamine (Gln1136) sorgen in diesem Fall für die Stabilität des Clusters.

Diese strukturellen Merkmale bestätigten Stabilitätsstudien, die im Vorfeld der Reinigungsoptimierung vorgenommen wurden. Die Ergebnisse mit Hilfe der hydrophoben Wechselwirkungs-Chromatographie zeigten einen deutlichen Einfluss der hydrophoben Bereiche auf die Stabilität des Holo-proteins und der Cluster (siehe

Abschnitt 3.2). Auch ein Vergleich der Sekundärstruktur im Sequenzabschnitt zwischen den Aminosäuren 127 und 138 zeigten erhebliche Unterschiede in beiden Untereinheiten des Speicherproteins bezüglich des polaren bzw. unpolaren Anteils und des sehr flexiblen Glycin-reichen Abschnitts ( $^{127}\text{GGAGL}^{131}$ ) in der  $\beta$ -Untereinheit, der in der  $\alpha$ -Untereinheit fehlt. Noch nicht geklärt ist der Einfluss der Kontaktbereiche auf die Stabilität der Cluster. Eine wichtige Bedeutung besitzen diese Regionen aufgrund ihres hohen helikalen Anteils und der Lokalisation innerhalb des Hexamers sicherlich. Der W3- und der W6-Cluster befindet sich in unmittelbarer Umgebung des N-terminalen Endes der  $\alpha 5$ -Helix und steht somit unter dem Einfluss der positiv polarisierten Dipolwirkung, die für eine Ladungskompensation des negativ geladenen Clusters sorgt.

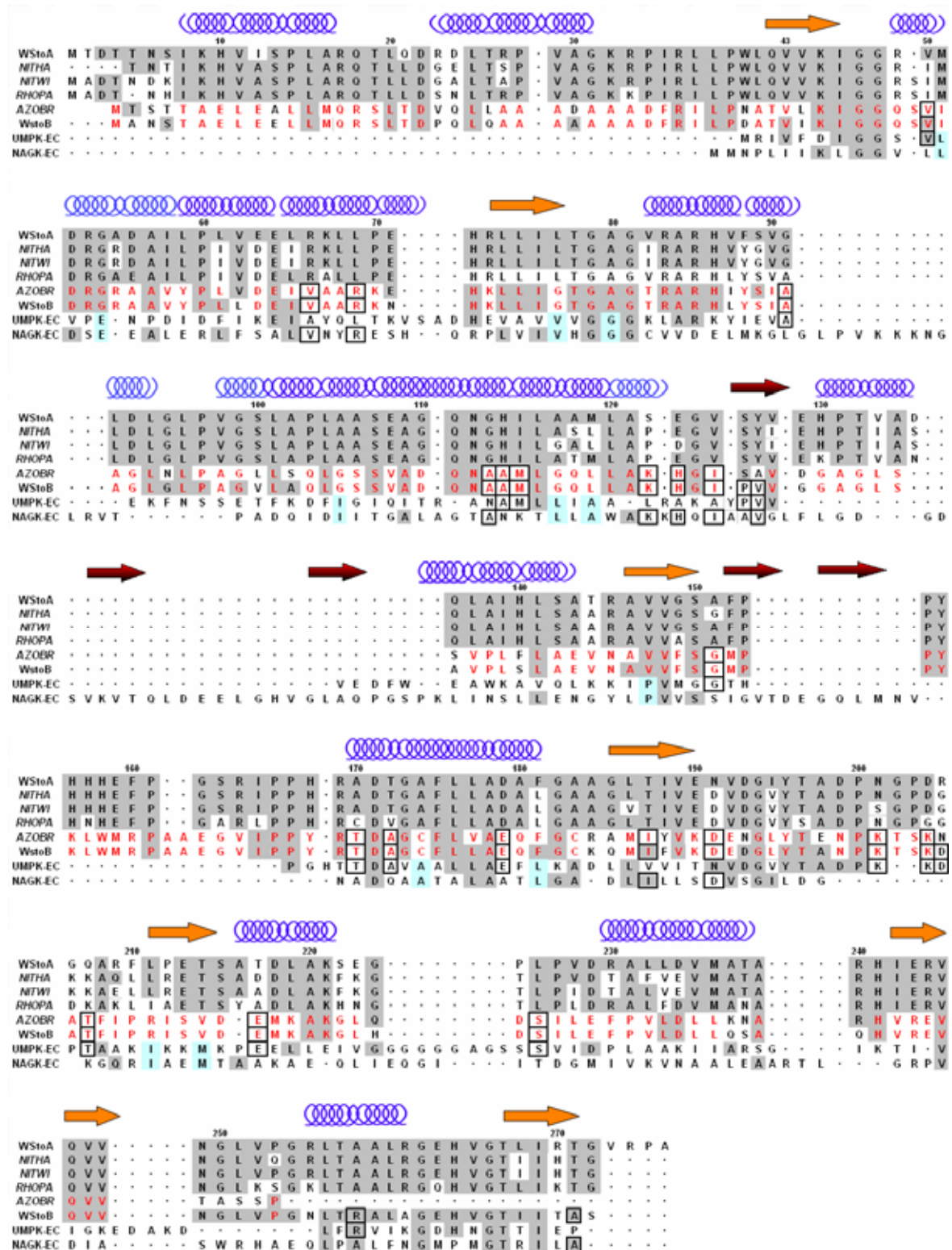
### 4.3.4 Vergleich des Speicherproteins mit ähnlichen Proteinen

Der strukturelle Abgleich der beiden Untereinheiten des Speicherproteins mit dem Programm DALI (Holm & Sander, 1996) aus der Protein-Datenbank ergab für zwei Proteine aus der Aminosäure-Kinase-Familie sequentielle (22-20%) und damit strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Speicherprotein. Niedrige rms-Abweichungen von 2,3 und 2,9 Å zwischen der  $\alpha$ -Untereinheit des Speicherproteins und der *E. coli*-Uridylatmonophosphat (UMP)-Kinase (UMP-K-EC) bzw. der *E. coli*-N-Acetylglutamat-Kinase (NAGK-EC) bestätigen dies.

Bei genauer Betrachtung eines strukturbasierten Sequenzalignments (siehe Abbildung 4.5) zwischen den Untereinheiten des Speicherproteins (WStoA und WStoB) und den beiden Kinasen konnten mehrere strukturell relevante Regionen mit hoher Übereinstimmung gefunden werden. Die drei Proteine wurden durch zwei weitere Proteinsequenzen aus den Organismen *Nitrobacter hamburgensis* (NITHA), *Nitrobacter winogradsky* (NITWI) und *Rhodopseudomonas palustris* (RHOPA) ergänzt, die nur durch die Übersetzung aus dem Genom bekannt sind (Copeland et al., 2005; Larimer et al., 2003). Die Sequenzidentitäten gegenüber der  $\alpha$ -Untereinheit des Speicherproteins von 84% für NITHA, 83% für NITWI und 80% für RHOPA lassen mit hoher Sicherheit auf ein Speicherprotein schließen. Interessant ist die Tatsache, dass der Sequenzvergleich zwischen dem hypothetischen Protein des Organismus *Azospirillum brasilense* (Vanbleu et al., 2004) und den beiden Speicherprotein-Untereinheiten eine wesentlich höhere Sequenzidentität für die  $\beta$ -Untereinheit des Speicherproteins als für das entsprechende  $\alpha$ -Monomer (37%)

zeigt. Dies lässt Schlüsse über den evolutiven Bildungsverlauf beider Untereinheiten zu.

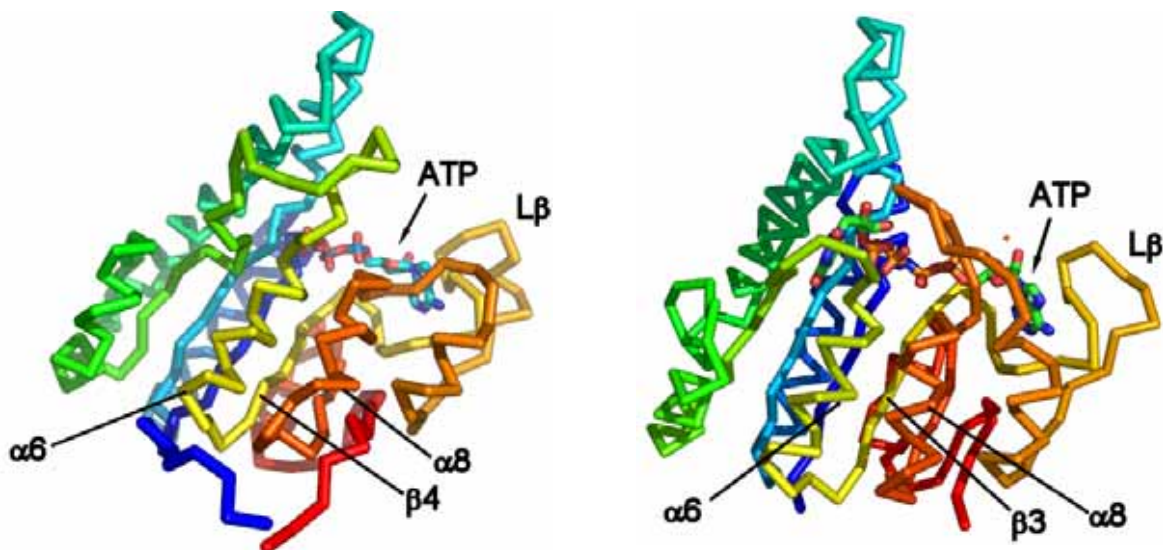
Wichtig für den sequentiellen Vergleich ist eine Sequenzverschiebung zwischen den Untereinheiten des Speicherproteins und den beiden Kinasen von ~40 Aminosäureeinheiten. Die konservierten Glycin-reichen Regionen (G-Region) sind in allen drei Proteinen bei der ATP-Bindung beteiligt. In NAGK und dem Speicherprotein kompensiert das basische Lys durch H-Brückenbindungen zu Sauerstoffatomen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphate des ATP deren negative Ladung. Beide Lysine (Lys8 im NAGK und Lys45 im Wsto) sind am  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ 1) des N-terminus lokalisiert. Der ATP- und UMP-Bindungsbereich, der dem Walkermotiv sehr ähnelt, befindet sich in der UMP-Kinase in der zweiten glycinreichen Region, die gegenüber der ersten G-Region um etwa 40 Aminosäuren in C-terminaler Richtung verschoben ist. Im Gegensatz zum NAGK und dem Speicherprotein bildet hier ein Arginin (Arg49) die wichtige Funktion der Kompensation der negativ geladenen Sauerstoff-Phosphate. Es bildet eine NH-Brücke mit dem Sauerstoffatom des UMP-Phosphats. Im Gegensatz zum NAGK besitzt das Speicherprotein im Glycin-reichen Bereich zwischen den Sekundärstrukturen  $\beta$ 2 und  $\alpha$ 2 ein Arginin (Arg1085), dessen Funktion der des Arg49 der UMPK ähnelt (Gil-Ortiz et al., 2003; Briozzo et al., 2005). Allerdings bildet hier ein O-Atom des  $\alpha$ -Phosphats mit der Guanidinogruppe eine H-Brücke (siehe Abbildung 3.33). Neben dieser Loop-Region der drei Proteine, die den Abschluss der Substratbindungstasche bildet, gibt es vor allem zwischen UMPK und dem Speicherprotein gut konservierte Bereiche, die sich vom helikalen Bereich  $\alpha$ 6 über ein Faltblatt bis hin zu dem Loop zweier benachbarter Faltblätter (Ala1170-Pro1200 Speicherprotein bzw. Thr120-Pro150 UMPK) erstrecken. Die Abbildung 4.6, die eine „Rossmann Fold“ entsprechende Domäne wiedergibt, zeigt eine gute Übereinstimmung der drei Proteine. Die große Loop-Region ( $L\beta$ ) allerdings unterscheidet strukturell deutlich in allen Proteinen, obgleich der sequentielle Vergleich zwischen dem Speicherprotein und UMPK eine gute Übereinstimmung zeigt.

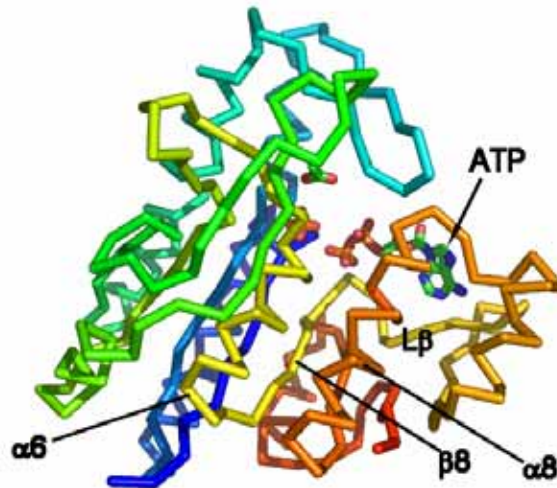


**Abb. 4.5:** Ein auf der Struktur basierendes Sequenzalignment der beiden Untereinheiten des Speicherproteins (WStoA und WStoB), der Proteine des *NITHA*, *NITWI*, *RHODA*, *UMPK* und *NAGK*. Die Faltblatt-Bereiche sind mit roten Pfeilen, die helikalen Bereiche mit blauen Spiralen gekennzeichnet. Die dunkler gefärbten Pfeile zeigen zusätzliche Faltblattregionen des *NAGK* an. Die grau unterlegten

Felder zeigen Sequenzidentitäten zwischen der  $\alpha$ -Untereinheit des Speicherproteins und den übrigen Proteinen, eingerahmte Felder nur Sequenzidentitäten zwischen der  $\beta$ -Untereinheit und UMPK oder NAGK, die hellblauen Felder zeigen nur Identitäten zwischen UMPK und NAGK. Das rot markierte Alignment zeigt die Sequenzidentität zwischen dem hypothetischen Protein des Organismus *Azospirillum brasilense* und der  $\beta$ -Untereinheit des Speicherproteins. Das Alignment wurde mit Hilfe des Programms FASTA der WU2-BLAST-Databank durchgeführt (Pearson, 1990).

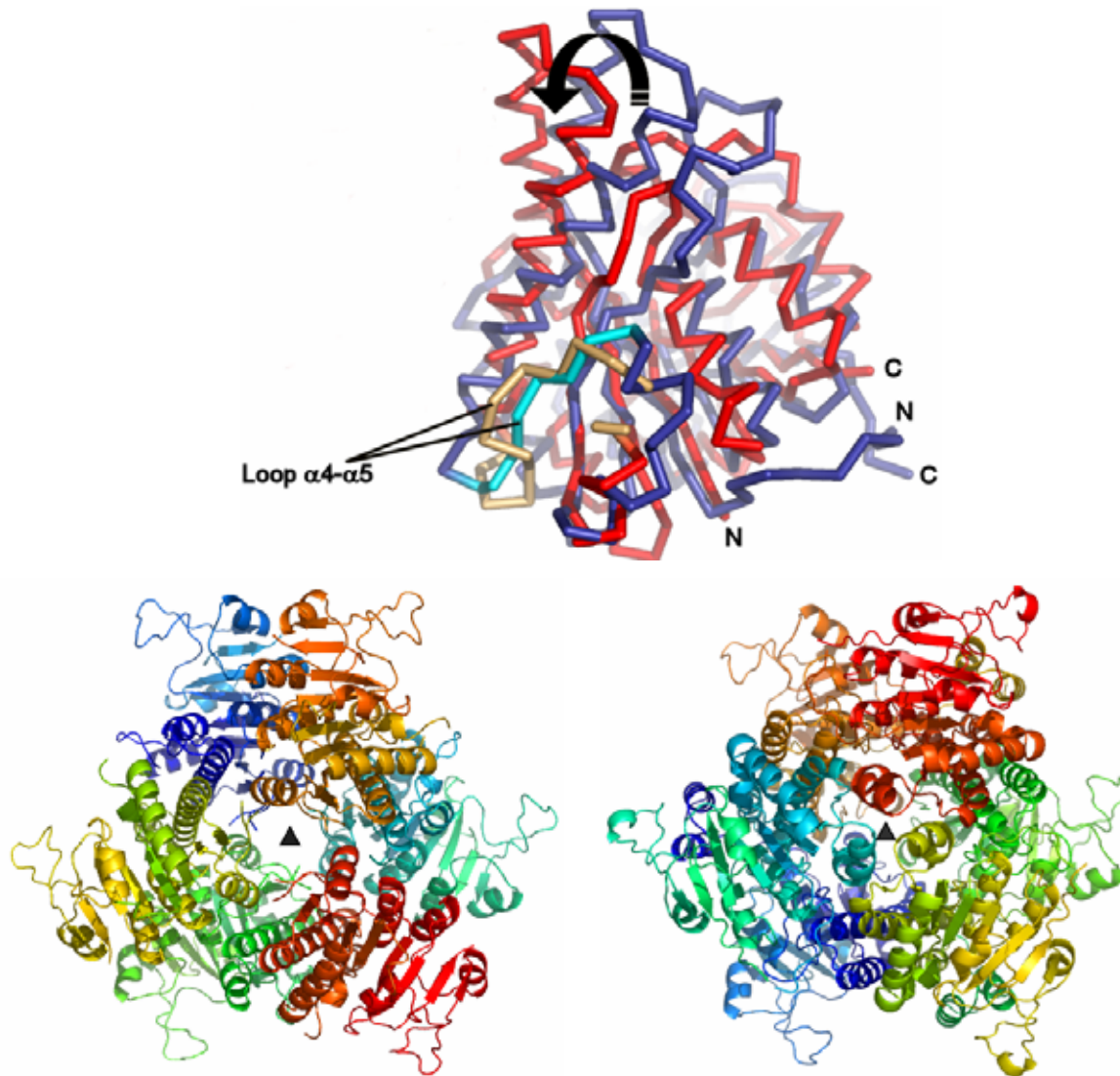
Neben der homodimeren Tertiärstruktur des NAGK ist vor allem die trimere Anordnung des UMPK-Homodimers von entscheidendem Interesse für die Veranschaulichung der Strukturmerkmale des Speicherproteins (Gil-Ortiz et al., 2003; Briozzo et al., 2005). Wie schon im Speicherprotein setzt sich die Untereinheit aus einer offenen  $\alpha/\beta$ -Faltung zusammen, dessen Faltblätter verdreht sind. Allerdings haben die sieben  $\beta$ -Stränge eine parallele Ausrichtung und liegen eingebettet zwischen zwei Schichten von drei bzw. vier  $\alpha$ -Helices. Obwohl die Untereinheiten beider Proteine um  $30^\circ$  zu einander verdreht sind und sich veränderte Wechselwirkungsverhältnisse untereinander ergeben, wird die Berührungsfläche der Dimere in beiden Hexameren im Wesentlichen durch dieselben Polypeptid-Segmente aufgebaut.





**Abb. 4.6:** Struktureller Vergleich der Proteinmonomere UMPK (links oben),  $\alpha$ -Untereinheit des Speicherproteins (rechts oben) und NAGK (unten). Die einzelnen Sequenz-abschnitte der  $C\alpha$ -Gerüste sind farblich voneinander abgehoben. Der N-terminale Bereich ist blau, die C-terminale Region rot markiert.

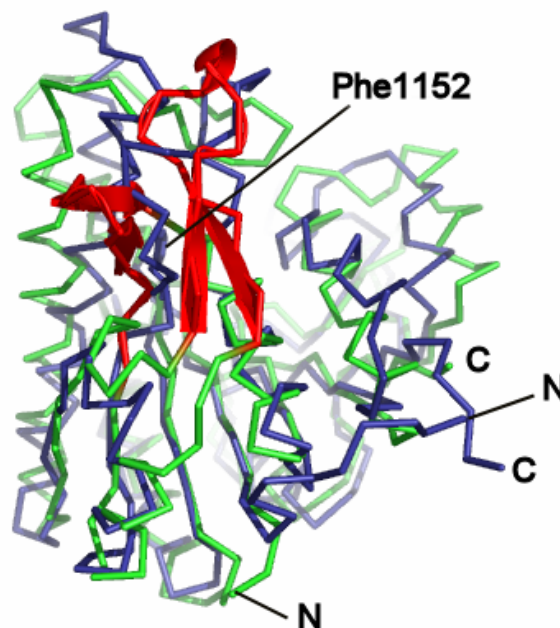
Diese veränderte Gerüststruktur zwischen dem Speicherprotein und der UMP-Kinase verringert nur in geringem Umfang das Volumen des Hohlraums, entfernt aber  $\alpha$ 4-Helices von ihrem Kontaktbereich an der 3-zähligen Achse und öffnet sich zu einem hydrophoben Kanal des UMPK-Hexamers. Der Hohlraum der UMP-Kinase wird hauptsächlich verkleinert durch den zusätzlichen Einbau von 10 Aminosäuren gegenüber dem Speicherprotein in den  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5-Loop (siehe Abbildung 4.7). Durch den heterodimeren Aufbau innerhalb des Speicherproteins unterscheidet sich allerdings die Größe der Kontaktbereiche durch die unterschiedlichen Helices (siehe Abbildung 4.4) und zeigt im Vergleich zu UMPK eine geschlossene Form.



**Abb. 4.7:** Die Überlagerung der  $\alpha$ -Untereinheit des Speicherproteins (blau) und des UMPK (rot) in der oberen Darstellung wird die veränderte  $C\alpha$ -Gerüststruktur durch den geschwungenen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die unterschiedliche Faltung der entsprechenden Loops wurde in orange (UMPK) und cyan (WSto) hervorgehoben. Die unteren Abbildungen zeigen den hexameren Aufbau des UMPK (links) und dem Speicherprotein (rechts). Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMol (DeLano, 2002) erstellt.

Ausgeprägte Unterschiede zwischen dem Speicherprotein und dem homodimeren Aufbau des NAGK sind um den Substratbindungsbereich zu beobachten. Der doppelt so hohe Faltblatt-Gehalt zeigt sich in drei zusätzlichen  $\beta$ -Haarnadelschleifen, die die Substratbindungsspalte umgeben. Im Gegensatz dazu ist diese Spalte im Speicherprotein durch Phe1152 und Met149 der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit besetzt.

Die Lage des ATP, die wir bereits im Speicherprotein erläutert haben (siehe Abschnitt 3.12.4) ist in allen drei Proteinen sehr ähnlich. Neben der stark polaren Umgebung der Phosphatgruppen ist im Gegensatz zum NAGK der Nukleotidanteil in planarer Anordnung als Sandwich zwischen den Loops  $L\beta$ - und  $L\gamma$ - (großer Loop-Bereich zwischen den C-terminalen Helices  $\alpha 8$  und  $\alpha 9$ ) des Speicherproteins und UMPK von einer hydrophoben Tasche umschlossen.



**Abb. 4.8:** Superposition der  $\alpha$ -Untereinheit des Speicherproteins (blau) und des NAGK-Monomers (grün) in Form Ihrer  $C\alpha$ -Grundgerüste. Der rot dargestellte Bereich zeigt die zusätzlichen  $\beta$ - Haarnadelschleifen als Pfeile, die die Substratbindungsspalte umgeben. Im Speicherprotein ist diese Spalte durch ein hydrophobes Phe1152 in der  $\alpha$ - Untereinheit besetzt.

Trotzdem sind signifikante Unterschiede vor allem durch Konformationsänderung der Triphosphate des ATP in den verschiedenen Proteinen zu beobachten. Im Gegensatz zum Speicherprotein ermöglicht die bereits beschriebene Substratbindungsspalte des NAGK einen direkten Zugang zur Phosphatbindungsstelle. Die Wechselwirkungsregion um die Phosphate wird zusätzlich durch weitere Faktoren verändert. Das  $Mg^{2+}$  bindet im NAGK an alle drei Phosphate, während im Speicherprotein nur zwei Phosphate und eine Glutaminsäure (Glu1190) zur

oktaedrischen Umgebung beitragen. Die in der NAGK charakterisierten ATP-, AMPPNP+NAM-, und ADP+SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Komplexe lassen vor allem in den glycinreichen Loop-Regionen auf strukturelle Änderungen in den Größenordnungen von 2-3 Å schliessen.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so zeichnen die hohe strukturelle Ähnlichkeit und bedeutsame Sequenzhomologie zwischen WSto und UMP-Kinase beide Proteine als Produkt einer divergenten Evolution aus. Die dadurch verwendete und nahe liegende Vermutung das Speicherprotein als mögliche UTP-Kinase zu beschreiben ist allerdings falsch. Die Ergebnisse zeigen, dass die  $\beta$ -Untereinheit des WSto-Dimers keine strukturelle Voraussetzung zur Bindung eines ATP erfüllt und somit die Zuordnung zur Aminosäure-Kinase-Familie als ATP-Bindungsprotein nicht möglich ist. Der Sequenzvergleich zwischen dem hypothetischen Protein des Organismus *Azospirillum brasilense* und den beiden WSto-Untereinheiten zeigt eine wesentlich höhere Sequenzidentität für die  $\beta$ -Untereinheit als für das entsprechende  $\alpha$ -Monomer (37%). Aufgrund der zum Teil großen sequentiellen und strukturellen Unterschiede beider Untereinheiten ist anzunehmen, dass vermutlich ein Monomer zuerst aus einem so genannten „Urprotein“ gebildet wurde, welches als Matrize oder Templat für das andere Monomer diente, um einen neuen Proteinkomplex aus beiden Monomeren zu synthetisieren. Welche Untereinheit allerdings ursprünglich gebildet wurde, lässt sich nur vermuten.

#### **4.4 Polyoxometallatcluster in wässriger und in Protein gebundener Form<sup>9</sup>**

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit beschäftigte sich mit den noch ungeklärten Fragen der Wolfram- bzw. Molybdän-Bindung und des Transports sowie der Synthese der Polyoxometallatcluster. Die Grundlagen des Clusterwachstums wurden in der anorganischen Wolframat- und Molybdatchemie im Detail untersucht. So haben z. B. die Ausgangskonzentration des MO<sub>4</sub><sup>2-</sup> bzw. WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> und der pH-Wert der Reaktionslösung sowohl in löslichem, wie auch im proteingebundenem Medium einen wichtigen Einfluss auf die Bildung der in Größe und Geometrie voneinander abweichenden W bzw. Mo-Cluster. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Möglichkeit eines kontrollierten Strukturbildungsprozesses durch so genannte „Template“, die vor allem in der Polyoxovanadat-Chemie bekannt geworden sind (Müller et al., 1991 &

---

<sup>10</sup> Vertiefende Aspekte, die sich u.a. mit den Voraussetzungen und dem möglichen Ablauf der Clusterbildungsprozesse im Speicherprotein beschäftigen werden in der Veröffentlichung der Speicherproteinstruktur (siehe Anhang A1) beschrieben.

1993). Ein Problem stellt die allgemeine Interpretation eines strukturbasierten Transportmechanismus für Metalloxydcluster im Speicherprotein dar. Trotz der ähnlichen chemischen Eigenschaften von W/Mo-oxiden ist es bisher nicht gelungen, den W-Clustern strukturäquivalente Mo-Cluster im Speicherprotein zu finden. Metallaustauschstudien lieferten den Grund für diese Probleme. Offensichtlich ist der Wolframoxid-Cluster stärker an das Protein gebunden als die analoge Molybdän-Komponente. Dies bestätigt die in der Polyoxometallat-Chemie gemachten Beobachtungen, dass Polyoxomolybdate durchweg kinetisch labil und Polyoxowolframate hingegen oft metastabil sind. Daher sind nur durch Freisetzungs- und Einbauuntersuchungen des MoSto, des WSto und durch Strukturdaten des W-enthaltenden Speicherproteins indirekte Schlussfolgerungen möglich.

### **4.5 Mutmaßliche Funktion des ATP im Speicherprotein**

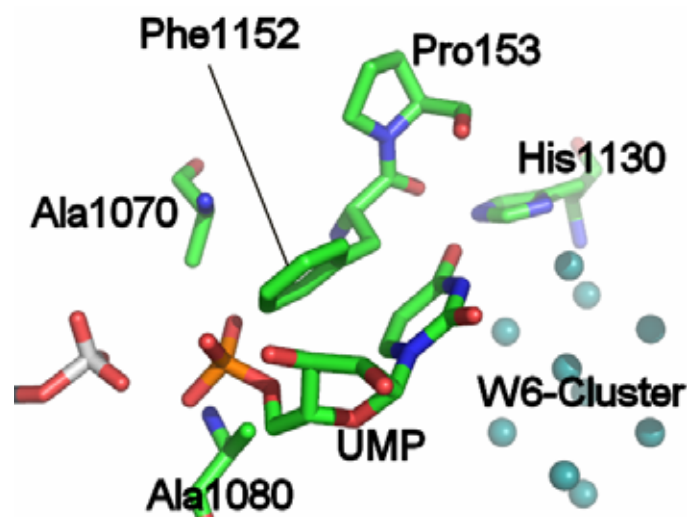
Die Untersuchungen des Speicherproteins im oligomeren und kristallinen Zustand ergaben, dass ATP sowohl beim Transport als auch bei der Synthese der Cluster eine sehr wichtige Rolle spielt. Durch den Vergleich mit ATP-bindenden Systemen, deren strukturelle Ähnlichkeit zum Speicherprotein wir bereits im letzten Abschnitt diskutiert haben, soll versucht werden mögliche funktionelle Aufgaben des ATP aufzuzeigen.

Hinweise auf eine Konformationsänderung der Proteinstruktur durch die Anwesenheit von ATP erbrachten die Einbauversuche. Diese Konformationsänderung könnte einhergehen mit einem veränderten Bindungsverhalten vor allem der Bereiche, die eine Clusterbindung verhindern. Austauschstudien zwischen ADP und ATP zeigten, dass der stabilisierende Effekt des Nucleotids die Clusterbindung induziert und nicht eine durch die ATP-Hydrolyse getriebene Konformationsänderung. Dies zeigt sich auch unter physiologischen Bedingungen zum Einen in den H-Brückenbindungen zwischen dem Carbonyl-O-Atom des Tyr1196 und der Aminogruppe des Purinrings des Adenosyl-rests, zum Anderen der Carboxyl-Gruppe des Asp1201 mit dem Sauerstoffatom der 2'-OH-Gruppe des Riboserings. Zusätzlich sorgt ein Arg (Arg1085) durch seine Brückenbindung mit einem Sauerstoffatom des ATP- $\beta$ -Phosphats und einem Carbonyl-O-Atom eines Leucins (Leu12) für die Stabilität des  $\alpha\beta$ -Dimer-ATP-Komplexes. Das  $\gamma$ -Phosphat spielt als Auslöser der Mechanismen, die zur *in vitro*-Clusterbindung führen, eine wichtige, aber vermutlich keine entscheidende Rolle. Ein mit der ATP-getriebenen Bindung von  $(\text{Mo/W})\text{O}_4^{2-}$  einhergehender kooperativer Prozess lässt sich einerseits mit der ineinander

greifenden Struktur der Untereinheiten im Hexamer und andererseits durch die intermolekulare Wechselwirkung von ATP und Wolfram, die die benachbarten Bindungsstellen (z.B. Loop-Bereiche) unflexibler macht, vereinbaren.

Einblicke in die Struktur der Substratbindungsstellen des allosterisch regulierten bakteriellen UMPK, des NAGK und des Speicherproteins sollen klären, ob ein Phosphattransfer für das Speicherprotein überhaupt denkbar ist.

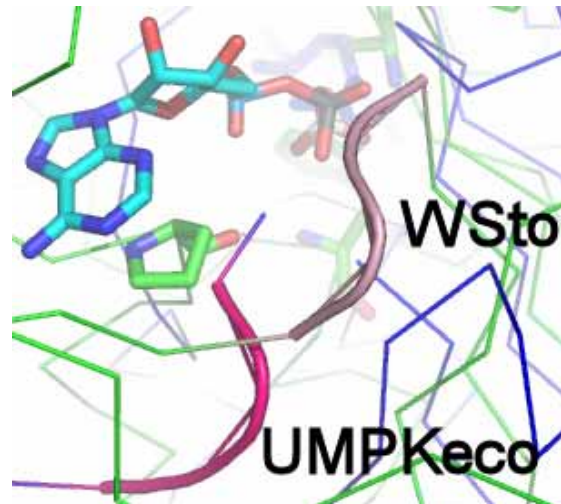
Eine Strukturüberlagerung der Monomere (siehe Abbildung 4.6) zeigt, dass UMP (UMPK), sowie das ATP-analoge ADPPNP (NAGK) und ATP (WSto) sehr dicht beieinander liegen. Bei genauerer Betrachtung des Kosubstratbereichs im Speicherprotein fällt auf, dass neben dem Pro1153 vor allem das Phe1152, das einen Teil des hydrophoben Abschnitts der Sekundärstrukturelemente  $\beta_3$  und  $\alpha_6$  der  $\alpha$ -Untereinheit bildet, die Position des UMP der UMPK im Speicherprotein einnehmen und ein wenig der strukturellen Gestalt des Kosubstrat ähneln, obgleich sie keinerlei Phosphatgruppentransfer-Funktion besitzen. Außerdem bildet das Phe1152 eine Verbindung zwischen dem ATP und dem Cluster durch eine H-Brücke zwischen Carbonyl-O-Atom des Phenylalanins und dem N3 des Imidazolrings vom His1130, das in direktem Kontakt mit einem W6-Cluster steht (siehe Abbildung 4.13). Im Gegensatz zum Speicherprotein ist die hydrophobe Tasche, die das UMP in der UMPK umgibt, kleiner. Ein möglicher Phosphattransfer wird aber durch das Phe1152 und die enge Öffnung der Tasche durch Ala1080 und Ala1170 verhindert.



**Abb. 4.9:** Überlagerung der UMPK und WSto-Struktur im Nucleotidbereich. Die Kohlenstoffatome sind grün, die Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome blau, die Phosphatgruppen hellgrau und die Wolframatome hellblau gefärbt.

Das Walker-Sequenzmotiv der glycinreichen Region zwischen  $\beta 3$  und  $\alpha 6$  im Speicherprotein ist auch in den beiden anderen Kinasen sehr gut definiert. Dieser katalytische Bereich stabilisiert die negative Ladung der Phosphate und schützt das vom Donor ATP zu übertragende Phosphat vor der Hydrolyse mit Wasser. Eine weitere Region, die den Phosphattransport beeinflusst, liegt im N-terminalen Bereich der drei Proteine. Im UMPK von *E.coli* (UMPKeco), das UDP als Kosubstrat bindet, liegen drei Aminosäuren (Lys15, Ser17, Gly18) sehr eng beieinander und sind beteiligt an der Bindung des  $\beta$ -Phosphats. Die Sequenzhomologe des NAGK sind Lys8 und Gly11, die des Speicherproteins Lys45 und Gly47. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die untersuchte Stabilisierung des Übergangszustandes durch Lys8 im NAGK (Gil-Ortiz, et al., 2003). Da die Positionen der Seitenketten der Lysine in den beiden anderen Proteinen sehr ähnlich sind, dürften sie die gleiche Funktion wie im NAGK erfüllen. Vermutlich liefern die drei Aminosäuren des UMPKeco die gleiche Hilfestellung für den Phosphattransfer wie die Aminosäuren des NAGK und des Speicherproteins im Phosphat bindenden Loop, obgleich sie direkt am N-Terminus ( $\beta 1$  und  $\eta 1$ ) des UMPKeco lokalisiert sind. Ein möglicher Bereich befindet sich im Speicherprotein in den Loop-Regionen, die mit den Phosphatgruppen des ATP wechselwirken (siehe Abschnitt 3.12.4).

Kinetische und Fluoreszenzstudien der UMPKeco zeigten eine hohe Affinität des UTP zur allosterischen Region in  $Mg^{2+}$ - freier Form (Serina et al., 1995). Weitere biochemische Untersuchungen aus dem gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* (Gagyí et al, 2003) und *S. pneumoniae* (Fassy et al., 2003) lieferten Hinweise darauf, dass dieses Nucleosidtriphosphat als allosterischer Inhibitor für den Phosphattransfer wirkt. Die ungewöhnliche Selektivität des UTP unter  $Mg^{2+}$  freien Bedingungen durch entsprechende strukturelle Untersuchungen deuten an, dass die UTP-Bindungsstelle der allosterischen Region entspricht (Briozzo et al., 2005). Durch ortsspezifische Mutagenese des Asn140 konnte der allosterische Bereich lokalisiert werden. Der Sequenzbereich ( $^{140}NVDG^{143}$ ) des UMPK, der sich in der Nähe der Nucleotidbindungsstelle befindet, ähnelt sequentiell und strukturell sehr dem des Speicherproteins, so dass auch hier ein allosterische Region zu vermuten ist (siehe Abbildung 4.14).



**Abb.4.10:** Superposition der vermuteten allosterischen UMPKeco- (in magenta) und WSto-Region (violett).

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der Kinasen und des Speicherproteins vor allem in den Bereichen, die für einen Phosphattransfer in den Kinasen verantwortlich sind, ist letztendlich doch sehr fraglich, ob ein Phosphattransfer mit entsprechender ATP-Hydrolyse im Speicherprotein überhaupt stattfindet. Bisher gibt es keinerlei Beweise, die diese These bestätigen. Vielmehr könnte das ATP ein Schalter oder eine Art Relais sein, der die Eingänge der Proteinhohlräume öffnet oder schließt. Dies hängt davon ab, ob ATP im Protein vorliegt oder nicht. Die Frage wie hoch die ATP-Konzentration sein muss, um Konformationsänderungen im Speicherprotein zu bewirken, ist genauso ungeklärt wie die Frage welche Strukturveränderungen sich bei ATP-Anwesenheit abspielen. Klar ist vielmehr nur, das ATP und Clustersynthese in direktem Zusammenhang stehen zueinander stehen.

#### 4.6 Biologische Relevanz des Speicherproteins

Die funktionell enge Verknüpfung mit der Stickstofffixierung wurde bereits angedeutet (siehe Abschnitt 1.4), sie verdeutlicht das wichtige Bindeglied des Speicherproteins mit dem Nitrogenase-System und den „high-affinity“ ABC-Transportproteinen.

Durch den fehlenden regulativen Einfluß auf die Mo-Anreicherung in *Azotobacter vinelandii* (A.v.) wird eine hohe Menge an Mo bzw. W in der Zelle angereichert und im Cytoplasma vom Speicherprotein aufgenommen. Es dient u.a. als Mo-Lieferant für die Synthese der Komponente I der Nitrogenase, dessen Eisen-Molybdän-Kofaktor als katalytisches Zentrum für die Reduktion des elementaren Stickstoffs notwendig ist (Kim & Rees, 1994). Dadurch kontrolliert das Speicherprotein auch indirekt die

Nitrogenase-Synthese. Da sich Molybdat und Wolframat-Anionen in Gestalt, Größe, Ladung und Bindungsfähigkeit sehr ähneln, unterscheidet die Zelle nicht zwischen den beiden Anionen. Dadurch können im Fall der Mo-Nitrogenase beide Anionen eingebaut werden. Leider ist bisher noch nichts über den Übertragungsweg des Mo bzw. des W vom Speicherprotein zum Ort der Synthese (aktive Komponente I der Nitrogenase) bekannt. Es ergaben sich aber wichtige Erkenntnisse zur Regulation der Biosynthese des Speicherproteins.

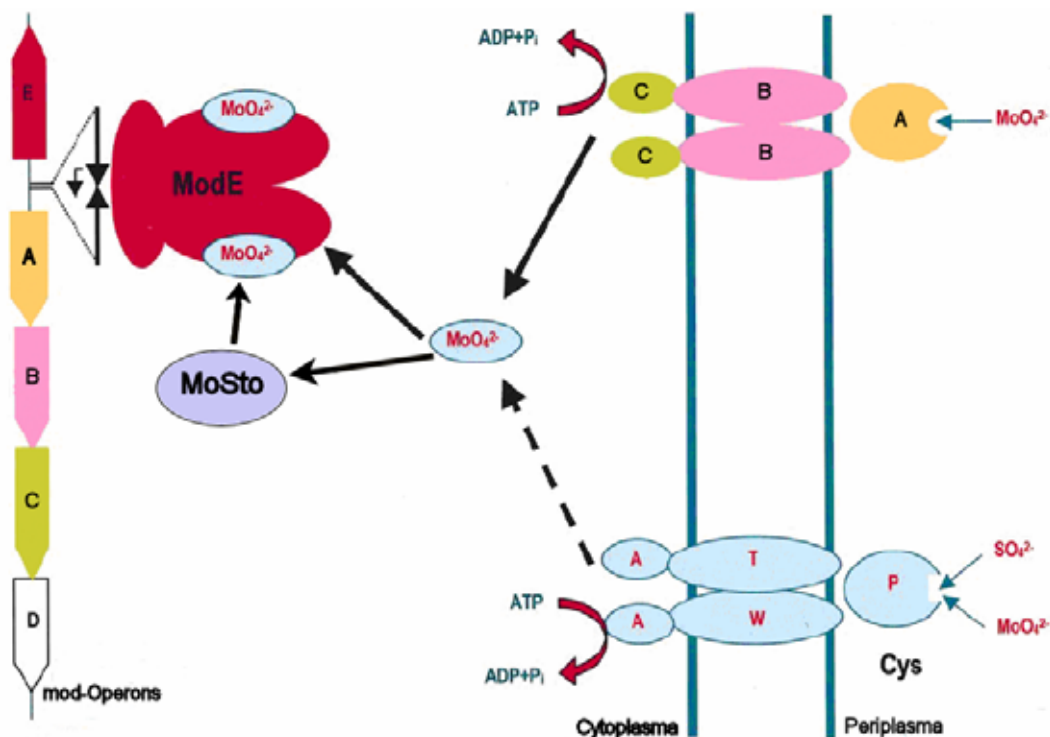
### **4.6.1 Regulation der MoSto Biosynthese**

Die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen zeigen deutlich eine Abhängigkeit zwischen der Mo-Konzentration und der Biosynthese von MoSto und widersprechen somit der Aussage von Pienkos und Brill, die die Fähigkeit zur Mo-Speicherung bei *Azotobacter* als konstitutiv ansahen. Dabei erfolgt schon ab 1 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  die MoSto-Biosynthese, die bei 50 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  bereits Ihr Maximum erreicht. Aufgrund der Aufgabenstellung des Speicherproteins als Baustein zur Deckung des Mo-Bedarfs in der Zelle, vor allem bei Mo-defizienten Bedingungen im extrazellulären Bereich, überrascht dieses Ergebnis nicht. Wenn überhaupt kein Mo vorhanden ist, wird auch kein Speicherprotein benötigt. Wenn jedoch Mo vorhanden ist, dann ist auch bei geringem Angebot der Speicher von Nöten, um alles verfügbare Mo einlagern zu können.

### **4.6.2 Aspekte des Mo-/W-Transports und deren Speicherung in der Zelle**

Einen wichtigen Baustein im „high-affinity“-Transportsystem übernimmt wahrscheinlich das Speicherprotein. Dies setzt eine Wechselwirkung mit einer der drei Proteinkomponenten des so genannten ABC-Transporters voraus. Die aus den entsprechenden Genloci codierten Proteine ModA, ModB und ModC übernehmen dabei sehr unterschiedliche Aufgaben (Grunden & Shanmugam, 1997). Der erste Schritt des Transfers ins Cytoplasma erfolgt durch das periplasmatische Bindungsprotein ModA, das vor allem Molybdat und Wolframat mit einer hohen Affinität bindet. Den Transport durch die Zellmembran ins Zellinnere ermöglichen das in die Zellmembran integrierte ModB und das periphere ModC. In Übereinstimmung mit anderen Membranproteinen wechselwirkt die Oberfläche des ModB-Homodimers (24 kDa) mit ModA und bildet einen Kanal durch die Membran. Das ATP-bindende Homodimer des ModC ist seinerseits eng verbunden mit der cytoplasmatischen Seite des transmembranalen ModB. Mit Hilfe einer an das ModC gekoppelten ATP-

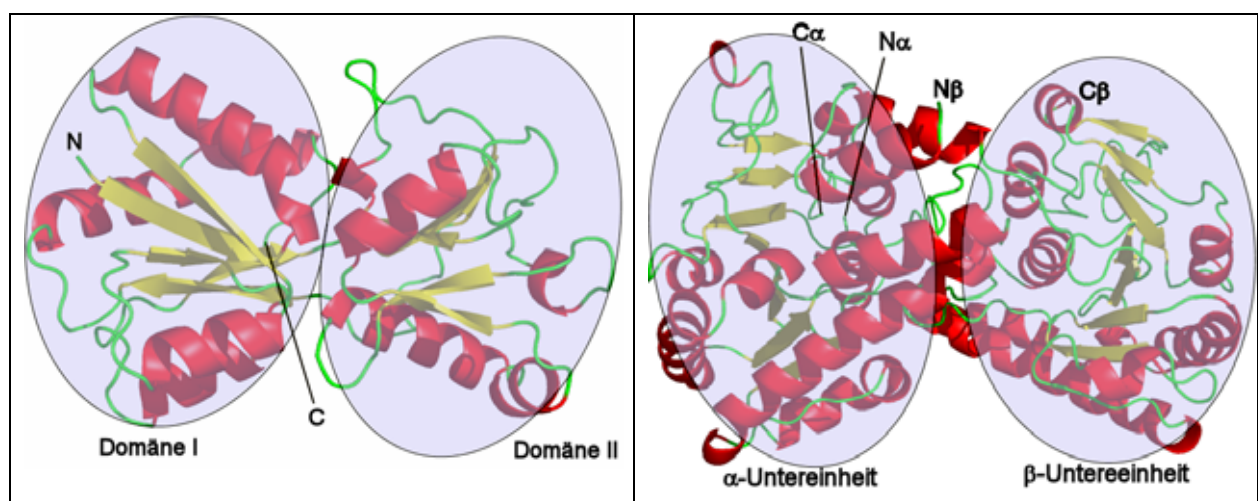
Hydrolyse wird die Translokation des Molybdats bzw. Wolframats ins Cytoplasma ermöglicht. Im Gegensatz zum wenig effizienten „low-affinity“-System reicht zum Aktivieren des „high-affinity“-Systems eine niedrige  $\text{MoO}_4^{2-}$ - bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentration von  $\sim 10\text{nM}$  bereits aus. Weitere wichtige Aufgaben im Cytoplasma erfüllen die Proteine ModG als Regler der intrazellulären Molybdat-Konzentration, sowie das dimere ModE, das die Steuerung der Molybdat-Konzentration und die Regulierung der Transkription des Operons gewährleistet. Die Abbildung 4.15 soll verdeutlichen, dass auch das Speicherprotein gewisse Steuerungsmechanismen übernehmen könnte. Auch wenn die primäre Funktion des Speicherproteins sicher die Versorgung des Nitrogenasesystems mit Mo ist, ist dieses Protein vermutlich auch ein wichtiger Mo- oder W-Lieferant für ModE, um in entsprechend verarmter Umgebung den intrazellulären Mo-Gehalt aufrechtzuerhalten.



**Abb. 4.11:** Allgemeines Schema der Molybdat-abhängigen Gen Regulation in Prokaryoten. Je nach Molybdat-Konzentration wird das „High Affinity“-Transport-System, das aus den Proteinen ModA (orange), B (magenta) und C (grün) besteht, oder der weniger effiziente Sulfat-Transporter, der aus CysP, T, W und A (blau) zusammengesetzt ist, aktiviert. Sobald die Anionen sich im Cytoplasma befinden, binden sie entweder direkt oder mit Hilfe des Speicherproteins (WSto) am dimeren Molybdat-bindenden Transkriptions-

regulatorprotein (ModE), welches abwechselnd an das ModABC Operon bindet oder verdrängt wird. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Pau et al., 1998).

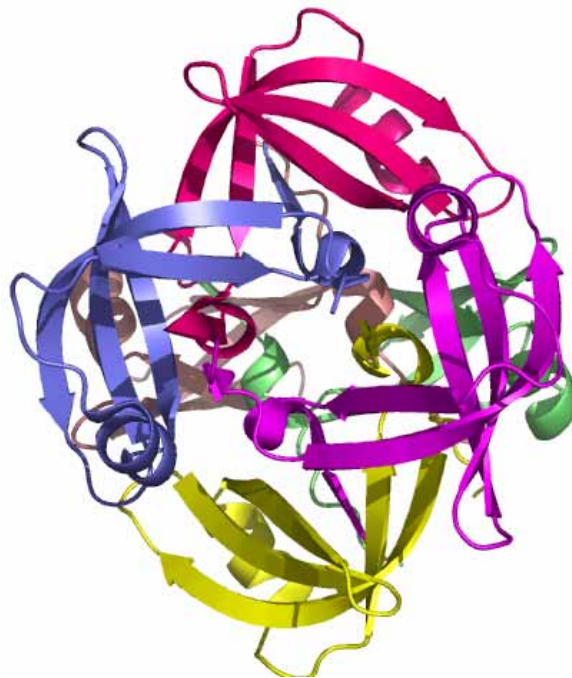
Frühere Untersuchungen in Zellen von *Clostridium pasteurianum* zeigten die Anwesenheit eines so genannten Mop-Proteins im Cytoplasma nach der Anreicherung mit Molybdän (Hinton & Mortenson, 1985). Das aus 67 Aminosäuren aufgebaute Peptid ist Grundbaustein der Mod-Proteine, die prinzipiell nur einzelne  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Moleküle binden (vgl. Schema in der Einleitung) und allgemein als Molbindine bezeichnet werden. Aufgrund der unbekanntenen Funktion in *Azotobacter vinelandii* (A.v.) und *Haemophilus influenzae*, vermutete man sogar eine Beteiligung bei Regulierung und Speicherung des Molybdäns. Bemerkenswert ist, dass dieses 7 kDa große Protein hexamere Kristalle mit einer 32-Symmetrie in der nicht kristallographischen Achse bildet (Wagner, Stupperich & Kratky, 2000). Ein Sequenz-Abgleich zwischen der Mop-Einheit und den entsprechenden Mod-Proteinen mit dem Speicherprotein ergab eine sehr geringe Sequenzidentität ( $\leq 10\%$ ). Der strukturelle Vergleich ergab nur gewisse Ähnlichkeiten zwischen dem ModA-Monomer und dem Dimer des Speicherproteins (siehe Abbildung 4.16). Die beiden globulären Domänen des ModA, die vergleichbar mit den Untereinheiten des Speicherproteins sind, bestehen aus einem zentralen und leicht verdrehtem 5-strängigen  $\beta$ -Faltblatt, das den Boden der tiefen Bindungstasche zwischen beiden Domänen bildet. Ähnlich wie beim Speicherprotein sind die  $\beta$ -Faltblätter auch hier durch zwei Schichten von  $\alpha$ -Helices umgeben.



**Abb. 4.12:** Gegenüberstellung der beiden Proteine ModA (links) und Speicherprotein (rechts). Man erkennt, dass die helikalen Bereiche (rot) im Fall des ModA eine x-förmige, und die des Speicherproteins eher eine spitz zulaufende Anordnung haben. Vervollständigt wird das Bändermodell beider Proteine durch die Loops (grün) und die Faltblattstränge (gelb). Die blau markierten Regionen beschreiben die unterschiedlichen Regionen der Proteine.

Ob die strukturellen Ähnlichkeiten für eine evolutive Verwandtschaft sprechen, ist schwer zu sagen. Beide Proteine besitzen zwar die Fähigkeit der Aufnahme von  $\text{MoO}_4^{2-}$  bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ , binden aber signifikant weniger Metallatome und nicht in Form größerer Cluster und sie erfüllen dementsprechend ganz verschiedene Aufgaben und sind in der Zelle auch völlig anders positioniert.

Deutliche Unterschiede zeigen sich auch zwischen der hexameren Struktur des Mop-Proteins in *Sporomusa ovata*, *C. pasteurianum* und des Speicherproteins (Wagner et al., 2000; Hinton et al., 1985).



**Abb. 4.13:** Hexamere Anordnung des Mop-Protein aus *S.ovata*. Die farbig voneinander abgehobenen Regionen zeigen Mop-Einheiten, von denen sechs diese globuläre Gestalt bilden (Wagner et al., 2000).

Außerdem ist die geringe Kapazität von insgesamt acht gebundenen Molybdaten im Vergleich zum Speicherprotein mit einem Gehalt von bis zu 110 Mo- bzw. W-Atomen

ein deutliches Indiz für zwei unterschiedliche Speichersysteme, sofern Mop-Proteine überhaupt als Speicherproteine einzustufen sind. Im Gegensatz zum A.v.-Speicherprotein ist eine Clusterbildung aufgrund der geringen Größe des Protein-Hohlraums des Mop-Proteins nicht möglich und damit eine hohe Verfügbarkeit von Molybdät auch bei extrem ungünstigen Bedingungen nicht gewährleistet. Möglicherweise stellt das Mop-System eine evolutive Vorstufe da, die aufgrund der sich veränderten äußeren Bedingungen durch ein leistungsfähigeres System ersetzt wurde und einigen Organismen wie z.B. A.v. einen evolutiven Vorsprung brachten. Trotzdem scheint die Verknüpfung zu hexameren oder gar höheren Struktureinheiten (24-mer bei Ferritin) neben der globulären Gestalt eine wichtige Voraussetzung für effiziente Speichereigenschaften zu sein.

### **4.6.3 Mögliche Relevanz für den Cu-Mo-Antagonismus**

Ein weiterer wichtiger Aspekt könnte der Einsatz des Speicherproteins (A.v.) zur Bekämpfung von Mangelerkrankungen (Anämie, Diarrhoe, verzögertes Wachstum) bei Rindern sein. Vor allem auf Weideflächen mit einem hohen Molybdän-Gehalt wird  $\text{MoS}_4^{2-}$ , das als stärkster Cu-Antagonist angesehen wird, gebildet. In-vitro Untersuchungen im Panseninhalt zeigten, dass sich das Thiomolybdät unter physiologischen Bedingungen (18h, 39°C) aus Ammoniummolybdät und –sulfat oder entsprechenden organischen Schwefelverbindungen bildet (Mills, 1977). Messungen mit radioaktiv markiertem Kupfer(II)-chlorid ( $^{64}\text{CuCl}_2$ ) oder Ammoniumthiomolybdät ( $(\text{NH}_4)_2^{99}\text{MoS}_4$ ) in der Nahrung bewiesen die antagonistische Wechselwirkung zwischen  $\text{Cu}^{n+}$  und  $\text{MoS}_4^{2-}$ . Dabei beeinflusst das Molybdän den Cu-Metabolismus sowohl vor als auch nach der Resorption. Die Folge ist die Bildung eines so genannten „[Cu]TM-Protein-Komplexes“ (TM=Thiomolybdät), der dem Metabolismus Cu entzieht (Müller et al., 1981). Bei geeigneten Bedingungen (Düngung der Weiden mit A.v.) wäre das A. v. aufgrund seiner schnellen und effektiven Mo-Aufnahme und das Speicherprotein aufgrund seiner hohen Mo-Bindungskapazität in der Lage, einen großen Teil des Molybdäts aufzunehmen und so der Umgebung zu entziehen. Damit wäre der notwendige Gehalt an Cu im Boden gewährleistet.

## 5 Fazit und Ausblick

### 5.1 Fazit

Die proteinchemische Charakterisierung des Mo/W-Speicherproteins lieferte neue Einblicke in die komplexe Wirkungsweise des Speicherproteins. Die aus früheren Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse (Fenske et al., 2005) mussten zum Teil korrigiert und ergänzt werden, dienten aber als wichtige Grundlagen für die weiteren Untersuchungen des Freisetzungs- und Einbaumechanismus der Oxometallate ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{WO}_4^{2-}$ ), aber vor allem zur Aufklärung der ersten Strukturinformationen dieses neuartigen Speicherproteins.

Neben den immunologischen Ergebnissen, die die früher angenommene konstitutive Mo-Speicherung (Pienkos & Brill, 1981) widerlegte, zeigten detaillierte Untersuchungen, dass die Mo-Freisetzung nicht nur vom pH-Wert sondern auch durch die Temperatur und Proteinkonzentration beeinflusst wird. Der stufenweisen Molybdätfreisetzung in leicht alkalischen Bereich des pH-Werts liegt wahrscheinlich eine Deprotonierung von Histidinresten zugrunde, die einhergeht mit der Hydrolyse der Molybdätkluster. Strukturuntersuchungen des Speicherproteins bestätigten, dass mehrere Histidine mit dem Cluster kovalent verknüpft sind oder durch Wasserstoffbrücken wechselwirken und damit einen großen Anteil an der Stabilität der Cluster im Protein haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ATP nicht nur verantwortlich ist für den vom pH-Wert unabhängigen Mo-Einbau, sondern auch die Mo-Freisetzung durch seine Anwesenheit/Bindung an das Speicherprotein entscheidend beeinflusst. Je nach ATP-Konzentration/Gehalt wird die Mo-Freisetzung vermindert oder sogar ganz verhindert. Diese ATP-bedingte stabilisierende Wirkung wird vermutlich durch eine Konformationsänderung oder durch "Einfrieren" bestimmter Konformationen des Proteins während der Bindung des ATP ausgelöst.

Um nähere Informationen über die Speicherkapazität des Proteins zu erhalten, wurde der maximale Gehalt an Mo-Atomen pro MoSto Molekül bestimmt. Mit 110-115 Atomen überstieg die Anzahl bei weitem die in früheren Untersuchungen (Fenske et al., 2005) ermittelte Menge an Atomen. Durch die *in vivo* und *in vitro*

Synthese des W-haltigen Speicherproteins (WSto) und anschließender Analyse des W-Gehalts konnte die Zahl von 110 Atomen pro Molekül bestätigt werden.

Metallaustauschstudien mit Wolframat zeigte, dass das Speicherprotein auch als Wolframatdepot dienen kann. Es wurde sogar beobachtet, dass Wolframate eine wesentlich stabilere Natur im Speicherprotein aufweisen als Molybdate.

Wegweisend für nachfolgende Untersuchungen war die Aufklärung der Röntgenstruktur des W-haltigen Speicherproteins. Ansätze zur Bestimmung des MoSto scheiterten zunächst an der geringen Streufähigkeit der Proteinkristalle. Im Gegensatz zum vorher favorisierten heterooktameren Aufbau besteht die *de novo* gelöste Struktur aus einem  $\alpha_3\beta_3$  Heterohexamer. Zusätzliche Molmassenbestimmungen von MoSto und WSto bestätigten dieses Modell und identifizierten darüber hinaus ein Dodekamer, in geringen Mengen sogar ein Tetracosamer. Die Annahme, dass sich im Proteininneren mehrere Oxometallat-Cluster verschiedener Größe befinden, konnte bestätigt werden. Nach den bisherigen Beobachtungen handelt es sich um ungefähr 60 W-Atome, die auf sechs W2-, ein W3-, drei W6, drei W7 und einen Wx-Cluster verteilt sind. Unklar ist hingegen noch die genaue Bedeutung des in der Struktur identifizierten ATP, das durch ein Netzwerk von Aminosäuren und Wassermolekülen im Protein stabilisiert wird. Strukturelle und sequentielle Vergleiche mit anderen Proteinen erbrachten Ähnlichkeiten mit zwei Kinasen (UMPK, NAGK). Da dem Speicherprotein aber die enzymatische Funktion gänzlich fehlt, dient dieser Vergleich nur zur strukturellen Orientierung und nicht zur Bestimmung des Mechanismus. Sequenzvergleichstudien ergaben, dass es eine Speicherprotein-Familie gibt, der neben *Azotobacter* auch noch einige Organismen angehören.

Trotz der gewaltigen Fortschritte, die in der vorliegenden Arbeit dokumentiert sind steht die Erforschung dieses neuartigen biologischen Speichermediums erst am Anfang.

## 5.2 Ausblick

Das jetzige Stadium der Charakterisierung des Speicherproteins wirft noch viele Fragen auf. So wäre die Isolierung und Identifizierung der Apoproteinstruktur des Mo-/WSto von großem Interesse hinsichtlich der Funktion des ATP, dessen Fehlen gewisse Auswirkungen auf die Konformation und Stabilität des Proteins haben dürfte. Außerdem ist nur sehr wenig über die Struktur des eigentlichen Ursprungsproteins, des Mo-haltigen Speicherproteins, bekannt, da die bisherigen Kristallisationsversuche im sauren Bereich auf pH-Werte bis 6.5 begrenzt wurden, die Kristalle dieser Ansätze sich jedoch im Hinblick auf die Mo-Clusterstruktur als unzureichend röntgentauglich erwiesen haben. Ein niedrigerer pH könnte eine bessere Stabilität der Mo-Cluster und damit ein wesentlich besseres Streuverhalten bewirken. Um einen möglichen Phosphortransfer des ATP gänzlich auszuschließen, müsste das Speicherprotein mit AMPPNP und  $\text{AlF}_4^-$  kristallisiert werden, um Aussagen über einen möglichen stabilen Zwischenzustand zu treffen. Auch sind viele Fragen, die die Lage und Umgebung der Cluster betreffen, noch nicht erschöpfend erklärt und bedürfen weiterer Strukturuntersuchungen von Proteinkristallen anderer Symmetrie.

Neben diesen strukturellen Aussagen sind auch zielgerichtete Mutagenese der funktionellen Aminosäuren wie Histidin von großem Interesse, da sie ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Clustersynthese und des Clustertransports innerhalb des Proteinbereichs sein könnten. Auch die genauen Mechanismen der Freisetzung und des Einbaus sind noch nicht geklärt und führen vermutlich auch über die Untersuchung der Biosynthese des Speicherproteins zum Ziel. Der Versuch einer Überexprimierung der MoSto-Gene in einem Trägerorganismus wie *E.coli* könnte zeigen, ob aus den synthetisierten Peptiden funktionales MoSto entstehen kann und klärt womöglich die Frage, inwieweit sich das Molekül alleine durch einen „self-assembly“-Effekt bilden kann.

Außerdem sollte die mögliche allosterische Affinität durch das Cosubstrat ATP weiter untersucht werden. Ob sich allerdings wie im UMPK allosterische Bindungsstellen befinden, bleibt nach der Strukturuntersuchung doch sehr fraglich.

Einige wichtige Fragen, die die Rolle des Speicherproteins im bakteriellen Stoffwechsel betreffen, sind weiterhin unklar. Neben der ungeklärten Freisetzung des

Molybdäns *in vivo* stellt sich die Frage, welche Rolle das MoSto zwischen ModABC-Transportsystem und dem FeMoCo spielt. Konkurriert MoSto mit ModG, das freies Mo sammelt und so für die Moco und FeMoco-Biosynthese zur Verfügung stellt, oder wird  $\text{MoO}_4^{2-}$  nach Bedarf freigesetzt und vom ModG als Zwischenträger wieder aufgenommen. Ein wichtiger Aspekt ist der enorme Verbrauch an ATP bei der Stickstofffixierung durch die Nitrogenase (16 MgATP für ein  $\text{N}_2$ -Molekül). Dadurch wird das unter diazotrophen Wachstumsbedingungen, durch die Atmungskette gebildete ATP dem System entzogen und die Freisetzungseigenschaft des Speicherproteins erhöht.

Dies sind nur einige Beispiele für Untersuchungen, die in Zukunft zu klären sind. Dies lässt hoffen, dass dem Speicherprotein somit bald die Aufmerksamkeit zukommt, die es verdient.

## 6 Literaturverzeichnis

Atkinson M.R., Murray A.W. (1967) Regulation of adenylat desaminase from Ehrlich ascites-tumour cells by a phosphonate analogue of adenosine triphosphate.

*Biochem. J.*, **104**, 10C-12C.

Abrahams J.P., Leslie A.G. (1996) Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **52**, 30-42.

Allen R.M., Roll J.T., Rangaraj P., Shah V.K., Roberts G.P., Ludden P.W. (1999) Incorporation of Molybdenum into the Iron-Molybdenum Cofaktor of Nitrogenase. *J. Biol. Chem.*, **274(22)**, 15869-15874.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389-3402.

Andersson K.M., Hovmoller S. (2000) The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **56**, 789-790.

Bagg A., Neilands J. B. (1987) Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol.Rev.*, **51**, 509-518.

Balbo A., Minor K.H., Velikovsky C.A., Mariuzza R.A., Peterson C.B., Schuck P. (2005) Studying multiprotein complexes by multisignal sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 81-86.

Bradford M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgramm Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Briozzo P., Evrin C., Meyer P., Assairi L., Joly N., Bárzu O., Gilles A.-M. (2005) Structure of Escherichia coli UMP Kinase Differs from That of Other Nucleoside

Monophosphate Kinases and Sheds New Light on Enzyme Regulation. *J. Mol. Biol.*, **280**, 25533-25540.

Brunger A.T., Adams P.D., Clore G.M., DeLano W.L., Gros P., 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 Cryst. D.*, **54**, 905-921.

Buchanan R.E., Gibbons N.E. (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Baltimore, 77.

Bursakov S.A., Gavel O.Y., Rocco G.D., Lampreia J., Calvete J., Pereira A.S., Moura J.J.G., Moura I. (2004) Antagonists Mo and Cu in a heterometallic cluster present on a novel protein (orange protein) isolated from *Desulfovibrio gigas*. *Inorg.Biochem.*, **98**, 833-840.

CCP4 (1997) The CCP4 suite: programmes for protein crystallography. *Acta Cryst. D*, **50**, 760-763.

Copeland A., Lucas S., Lapidus A., Barry K., Detter J.C. (2005) Complete sequence of *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. EMBL/GenBank/DDBJ databases.

Copeland A., Lucas S., Lapidus A., Barry K., Detter C. (2005) Sequencing of the draft genome and assembly of *Nitrobacter hamburgensis* X14. EMBL/GenBank/DDBJ databases.

Cudney R., Patel S., Weisgraber K., Newhouse Y., McPherson A. (1994) Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta. Cryst.*, **D50**, 414-423.

Cypionka H. (1999) *Grundlagen der Mikrobiologie*, Springer Verlag.

Damerval J. E., Guillioux M., Blaisomeau J., Vienne D. (1987) Simplification of Heukeshoven and Derrick's silver stain of proteins. *Electrophoresis*, **8**, 158-159.

De Blas A.L., Cherwinski H.M. (1983) Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.*, **133**, 214-219.

De la Fortelle E., Bricogne G. (1997) Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement in MIR and MAD methods. *Methods in Enzymology*, **276**, 472-494.

DeLano W.L. (2002) Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Current Opinion in Structural Biology*, **12**, 14-20.

Dobbek H., Huber R. (2002) The Molybdenum and Tungsten Cofactors: A Crystallographic View in *Metal Ions in Biological Systems*, (Eds. H. Sigel, A. Sigel), New and Basel, **39**, 227-264.

Duhme A.K., Meyer-Klauke W., White D.J., Delarbre L., Mitchenall L.A., Pau R.N. (1999) Extended X-ray absorption fine structure studies on periplasmic and intracellular molybdenum-binding proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4(5)**, 588-592.

Doublet S. (1997) Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Meth. Enzymol.*, **276**, 523-530.

Fassy F., Krebs O., Lowinski M., Ferrari P., Winter J., Collard-Dutilleul V., Hocini S (2004) UMP kinase from *Streptococcus pneumoniae*: evidence for co-operative ATP binding and allosteric regulation. *Biochem. J.*, **384**, 619-627.

Fenske D. (2004) Das Molybdän-Speicherprotein von *Azotobacter vinelandii*. Grundlegende Untersuchungen an einem neuartigen Metalloprotein. Dissertation Universität Bielefeld.

Fenske D., Gnida M., Schneider K., Meyer-Klauke 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.

Gagyi C., Bucurenci N., Sirbu O., Labesse G., Ionescu M., Ofiteru A., Assairi L., Landais S., Danchin A., Bárzu O., Gilles A.M. (2003) UMP kinase from the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* is strongly dependent on GTP for optimal activity. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3196-3204.

Gangeswaran R., Lowe D. J., Eady R. R. (1993) Purification and characterization of the assimilatory nitrate reductase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.*, **289**, 335-342.

Gil-Ortiz F., Ramón-Maiques S., Fita I., Rubio V. (2003) The Course of Phosphorus in the Reaction of N-Acetyl-L-glutamate Kinase, Determined from the Structures of Crystalline Complexes, Including a Complex with an AlF<sub>4</sub>- Transition State Mimic. *J. Mol. Biol.*, **331**, 231-244.

Görg A., Westermeier R. (1998) Elektrophoretische Verfahren, in Lottspeich, F., Zorbas, H. (Hrsg.), Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 217-252.

Gollan U., Schneider K., Müller A., Schüddekopf K., Klipp W. (1993) Detection of the in vivo incorporation of a metal cluster into a protein. The FeMo cofactor is inserted into the FeFe protein of the alternative Nitrogenase of *Rhodobacter capsulatus*. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 25-35.

Grunden A. M., Sahn mugam K. T. (1997) Molybdate transport and regulation in bacteria. *Arch. Microbiol.*, **168**, 345-354.

Haberland, H. (1994) Clusters of Atoms and Molecules. Springer, 52.

Hagen W. R., Arendson A. F. (1989) *Structure and Bonding*, **90**, 161.

Harrison, P. M.; Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1275**, 161-203.

Hausinger, R.P. (1996) Mechanism of Metallocenter Assembly (Hausinger R.P., Eichhorn G.L., Marzili, L.G., eds.), VCH New York, 1-18.

Hawkes R. (1982) Identifikation of Concanavalin A-Binding Proteins after Sodium Dodecyl Sulfate-Gel Electrophoresis and Protein Blotting. *Anal. Biochem.*, **123**, 143-146.

Hendrick B.J. (1992) The Family Azotobacteriaceae in The Prokaryotes: The Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifications, Applications, New York, 3144-3180.

Hendrickson W.A., Ogata C.M. (1997) Phase determination from multiwavelength anomalous diffraction measurements. *Meth. Enzymol.*, **276**, 494-523.

Hendrickson W.A., Pähler A., Smith J.L., Satow Y., Merritt E.A., Phizackerley R.P. (1989) Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2190-2194.

Hinton S.M., Mortenson L.E. (1985) Identification of molybdoproteins in *Clostridium pasteurianum*. *J. Bacteriol.*, **162**, 477-484.

Hochheimer A., Schmitz R. A., Thauer R. K., Hedderich R. (1995) The Tungsten Formylmethanofuran Dehydrogenase from *Methanobacterium Thermoautotrophicum* Contains Sequence Motifs Characteristic for Enzymes Containing Molybdopterin Dinucleotide. *Eur. J. Biochem.*, **234**, 910-920.

Holm L., Sander C. (1996) The FSSP database: fold classification based on structure-structure alignment of proteins. *Nucleic Acids Res.*, **24(1)**, 206-209.

Howlin B., Moss D.S., Harris G.W. (1989) Segmented anisotropic refinement of bovine ribonuclease A by the application of the rigid-body TLS model. *Acta Cryst.*, **A45**, 851-861.

Hubbard S.J., Thornton J.M. (1993) NACCESS. *Computer Program, Department of Biochemistry and Molecular Biology*. University College, London.

Jancarik J., Kim S. H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411.

Johnson M. K., Rees D. C., Adams M. W. W. (1996) Tungstoenzymes, *Chem. Rev.*, **96**, 2817-2839.

Jones T. A., Zou J. Y., Cowan S. W. und Kjeldgaard (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A*, **47**, 110-119.

Kabsch W.J. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Appl. Cryst.*, **26**, 795.

Kaim W., Schwederski V. (1991) *Bioanorganische Chemie*, Teubner Verlag Stuttgart.

Karas M., Hillenkamp F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, **60**, 2299-2301.

Keeler R. F., Varner J. E. (1958) The metabolism of molybdate and tungstate in *Azotobacter* In C.A. Lamb, O. G. Bentley and J. M. Beattie (ed.), Trace elements. Academic Press, Inc., New York, 297-309.

Kletzin A., Mukund S., Kelley-Crouse T. L., Chan M. K., Rees D. C., Adams M. W. W. (1995) Molecular characterization of the genes encoding the tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus* and formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from *Thermococcus litoralis*. *J. Bacteriol.*, **177**, 4817-4819.

Kim J., D.C. Rees (1994) Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*, **33(2)**, 389-397.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Larimer F. W., Chain P., Hauser L., Lamerdin J., Malfatti S., Do L., Land M. L., Pelletier D. A., Beatty T., Lang A. S., Tabita F. R., Gibson J. L., Hanson T. E., Bobst C., Torres y Torres J. L., Peres C., Harrison F. H., Gibson J., Harwood C. S. (2003) Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology*, **22**, 55-61.

Laskowski M., MacArthur M. W., Moss D. S., Thornton J. M. (1985) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.

Laskowski R.A., Moss D.S., Thornton J.M. (1993) Main-chain Bond Lengths and Bond Angles in Protein Structures. *J. Mol. Biol.*, **231**, 1049-1067.

Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982) Propagation and Maintenance of Bacterial Strains and Viruses. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 56-73.

Matthews B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J.Mol.Biol.*, **33**, 491-497.

Maupin-Furlow J. A., Rosentel J. K., Lee J. H., Deppenmeier U., Gunsalus R. P., Shanmugam J. (1995) Genetic analysis of the modABCD (molybdate transport) operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **177**, 4851-4856.

McPherson A. (1990) Current approaches to macromolecular crystallisation. *Eur. J. Biochem.*, **189**, 1-23.

Melander W., Horvath C. (1977) Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series, *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 200-215.

Mills C.F., Dalgarno A.C., Bremner I., El-Gallad T.T. (1977) Influence of the dietary content of molybdenum and sulphur upon hepatic retention of copper in young cattle. *Proc. Nutr. Soc.*, **36(3)**, 105A.

Michalopoulos I., Torrance G.M., Gilbert D.R., Westhead D.R. (2004) TOPS: An enhanced database of protein structural topology. *Nucleic Acid Res.*, **32**, D251-D254.

Mouncey N. J., Mitchenall L. A., Pau R. N. (1995) Mutational Analysis of Genes of the mod Locus Involved in Molybdenum Transport, Homeostasis and Processing in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **177**, 5295-5302.

Müller A., Diemann E., Jostes R., Bögge H. (1981) Transition Metal Thiometalates: Properties and Significance in Complex and Bioinorganic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 934-955.

Müller A., Krickemeyer E., Penk M., Rohlfing R., Armatage A., Bögge H. (1991) Templatgesteuerte Bildung von Clusterschalen oder eine Art molekulare Erkennung: Synthese von  $[\text{HV}_{22}\text{O}_{54}(\text{ClO}_4)]^{6-}$  und  $[\text{H}_2\text{V}_{18}\text{O}_{44}(\text{N}_3)]^{5-}$ . *Angew. Chem.*, **103**, 1720-1722.

Müller A., Rohlfing R., Krickemeyer E., Bögge H. (1993) Control of the Linkage of Inorganic Fragments of V-O Compounds: From Cluster Shells as Carcerands via Cluster Aggregates to Solid-State Structures. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 909-912.

Müller A., Suer W., Pohlmann C., Schneider K., Thies ., W.-G., Appel H. (1997) Comparative in-vivo and in-vitro  $^{99}\text{Mo}$ -time-differential-perturbed-angular-correlation studies on the nitrogenase MoFe protein and other Mo species of different  $\text{N}_2$ -fixing bacteria. *Eur. J. Biochem.*, **246**, 311-319.

Müller A., Meyer J., Krickemeyer E., Beugholt C., Bögge H., Peters F., Schmidtman M., Kögerler P., Koop M. J. (1998) Unusual Stepwise Assembly and Molecular Growth:  $[\text{H}_{14}\text{Mo}_3\text{7O}_{112}]^{14-}$  and  $[\text{H}_3\text{Mo}_5\text{7V}_6(\text{NO})_6\text{O}_{189}(\text{H}_2\text{O})_{12}(\text{MoO})_6]^{21-}$ . *Chem. Eur. J.*, **4**, 1000-1006.

Murshudov G. N., Vagin A. A., Dodson E. J. (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method, *Acta Cryst. D*, **53**, 240-255.

Oakley C. L. (1971) Antigen-antibody reactions in microbiology in Noris, J. R., Ribbons, D. W. (Hrsg.): *Methods in Microbiology Bd. 5A*, London, 174-218.

Otwinowski Z., Minor W. (1997) Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzymol.*, **276**, 407-427.

Ouchterlony Ö. (1971) Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Ann. Arbor*. **1971**, 32-59.

Pantaler R. P. (1963) A Kinetic Method for Determining Traces of Tungsten and Molybdenum, *J. Anal. Chem. USSR*, **18**, 519-524.

Pateman J. A., Cove D. J., Rever B. M., Roberts D. B. (1964) A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature*, **201**, 58-60.

Pau R. N., Klipp W., Leimkühler S. (1998) Molybdenum Transport, processing and gene regulation. In Winkelmann, G., Carrano, C. J. (eds) *Transition metals in Microbial Metabolism*. Harwood Academic Publishers, UK, 217-234.

Paulsen D. M., Paerl H. W., Bishop P. E. (1991) Evidence that molybdenum-dependent nitrogen fixation is not limited by high sulphate concentrations in marine environments. *Limnol. Oceanog.*, **36**, 1325-1334.

Pearl F., Todd A., Sillitoe I., Dibley M., Redfern O., Lewis T., Bennett C., Marsden R., Grant A., Lee D., Akpor A., Maibaum M., Harrison A., Dallman T., Reeves G., Diboun I., Addou S., Lise S., Johnston C., Sillero A., Thornton J., Orengo C. (2005) The CATH Domain Structure Database and related resources Gene3D and DHS provide comprehensive domain family information for genome analysis. *Nucleic Acids Research.*, **33**, D247-D251.

Pearson W. R. (1990) Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Meth. Enzymol.*, **183**, 63 - 98.

Pienkos P. T., Brill W. J. (1981) Molybdenum Accumulation and Storage in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriology*, **145(2)**, 743-751.

Pingoud A., Urbanke C. (1997) Arbeitsmethoden der Biochemie, Springer Verlag.

Pope M.T. (1983) Heteropoly-and Isopolyoxometalats, Springer Verlag Berlin.

Pope M.T., Müller A. (1991) Chemie der Polyoxometallate: Aktuelle Variationen über ein altes Thema mit interdisziplinären Bezügen, *Angew. Chem.*, **103**, pp. 56-70.

Saraste M., Sibbald R. P., Wittinghofer A. (1990) The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 430-434.

Schägger H., Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379.

Schneider K., Müller A., Johannes K.-U., Diemann E., Kottmann J. (1991) Selective removal of molybdenum traces from growth media of N<sub>2</sub>-fixing bacteria. *Anal. Biochem.*, **193**, 292-298.

Schneider T.R., Sheldrick G.M. (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr. D Bio. Crystallogr.*, **58**, 1772-1779.

Schomaker V., Trueblood K. N. (1968) On the rigid-body motion of molecules in crystals. *Acta Cryst.*, **B24**, 63-76.

Schomaker V., Trueblood K. N. (1998) Correlation of Internal Torsional Motion with Overall Molecular Motion in Crystals. *Acta Cryst.*, **B54**, 507-514.

Serina L, Blondin C, Krin E., Sismeiro O., Danchin A., Sakamoto H., Gilles A.M., Bárzu O. (1995) Escherichia coli UMP kinase, a Member of the Aspartokinase Family, Is a Hexamer Regulated by Guanine Nucleotides and UTP. *Biochemistry*, **34**, 5066-5074.

Siemann S. (2000) Untersuchungen zur Bildung Wolfram- und Rhenium-haltiger Nitrogenasen in *Rhodobacter capsulatus* und zur Biosynthese des Fe- Mo- Kofaktors in einer nif E<sup>-</sup> - Mutante. Dissertation Universität Bielefeld.

Stefan S., Schneider K., Oley M., Müller A. (2003) Characterization of a Tungsten-substituted Nitrogenase Isolated from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry*, **42**, 3846-3857.

Strandberg G. W., Wilson P. W. (1968) Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.*, **14**, 25-31.

Terwilliger T.C. (2001) Maximum-likelihood density modification using pattern recognition of structural motifs. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **57**, 1755-1762.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.

Vaguine A.A., Richelle J., Wodak S.J. (1999) SFCHECK: a unified set of procedure for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with atomic model. *Acta Cryst.*, **D55**, 191-205

Vanbleu E., Marchal K., Lambrecht M., Mathys J., Vanderleyden J. (2004) Annotation of the pRhico of *Azospirillum brasilense* reveals its role in determining the outer surface composition. *FEMS microbiology Letters*, **232**, 165-172.

Von der Haar F. (1976) Fractionation of proteins by fractional interfacial salting out on unsubstituted agarose gels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **70**, 1009-1013.

Walsh M.A., Evans G., Sanishvili R., Dementieva I., Joachimiak A. (1999) MAD data collection – current trends. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **55**, 1726-1732.

Wagner U.G., Stupperich E., Kratky C. (2000) Structure of the Molybdate/Tungstate Binding Protein Mop from *Sporomusa ovata*. *Structure*, **8**, 1127-1136.

Wang G., Angermüller S., Klipp J. (1993) Characterization of *Rhodobacter capsulatus* genes encoding a molybdenum transport system and putative molybdenum-pterin-binding proteins. *J. Bacteriol.*, **175**, 3031-3042.

Yamamoto I., Saiki T., Liu S.-M., Ljungdahl G. (1983) Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein. *J. Biol. Chem.*, **258**, 1826-1832.



## A Anhang

### A.1 Veröffentlichung der Röntgenstruktur des Speicherproteins und dessen W-Clustereinheiten im Metall-Protein-Komplex.

#### Metal-oxide based nucleations in nanoscale molybdenum/tungsten storage protein environments

Jörg Schemberg<sup>1</sup>, Klaus Schneider<sup>1</sup>, Ulrike Demmer<sup>2</sup>, Eberhard Warkentin<sup>2</sup>, Achim Müller<sup>1</sup> & Ulrich Ermler<sup>2</sup>

The understanding of assembly/nucleation processes based on simple  $XY_n$  type nuclei/polyhedra was considered to be of tremendous interest since the time of Linus Pauling's related statements made in his most famous book "The Nature of the Chemical Bond". The topic is especially relevant for polyoxometalate (POM) chemistry with its high interdisciplinary character including aspects of materials science where  $MoO_n$  type polyhedra appear finally linked preferably via edges and corners. The first steps of the related assembly can be best studied if they can be observed under confined conditions. To investigate this type of phenomenon we structurally characterized at 1.6 Å resolution the Mo/W storage protein (Mo/Wsto) from *Azotobacter vinelandii* for which the storage of molybdenum-/tungsten-oxide-based cluster parts with a maximum number of ca. 100 metal atoms but with unknown structure was already determined. Now excitingly, the fascinating variety of tungsten-oxide structures were found:  $W_2$  (six),  $W_7$  (three),  $W_6$  (three),  $W_3$  (one) as well as a (putative)  $W_{16}$  (one) those not lying off the  $C_3$  axis appearing several times. It could be shown that the clusters, especially those not observed under bulk conditions (but possibly occurring there as precursors), can be embedded into/protected by specific protein pockets in the interior of the cage-like heterohexameric  $(\alpha\beta)_3$  protein complex whereby the pocket functionalities play a major role as templates to direct the cluster formations. Whereas the formation of the POM clusters in bulk medium can be addressed as self-assembly, we can here refer to directed-assembly and to a stepwise cascade-type growth process. Investigations with the Mo/Wsto protein opens perspectives for a deeper understanding of basic types of assembly processes of importance for bottom up processes/procedures in materials science as well as for an unprecedented protein-assisted materials science research.

<sup>1</sup>Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld, Universitätsstraße 25, D-33615 Bielefeld, Germany; <sup>2</sup>Max-Planck-Institut für Biophysik, Max-von-Laue-Str. 3, D-60438 Frankfurt am Main, Germany

Metal-oxide based nanochemistry/science, especially of molybdenum (Mo) and tungsten (W) chemistry is a most fascinating subject of current research. In a review published in 1991 it was claimed that “polyoxometalates form a class of inorganic compounds that is unmatched in terms of molecular and electronic structural versatility, reactivity, and relevance to analytical chemistry, catalysis, biology, medicine, geochemistry, materials science, and topology”<sup>1,2</sup>. Even a protein sized cluster could be synthesized, which contains 368 Mo atoms, and encapsulates a cavity with a volume of  $25 \times 25 \times 40 \text{ \AA}^3$  and new phenomena could be studied, e.g. on the basis of porous spherical capsules with tunable internal functionalities<sup>3</sup>. Parallely, tremendous progresses were achieved during the last decennium in the understanding of the role of Mo in biology where it becomes functional in a protein-associated form. Vital biochemical oxygen transfer and nitrogen fixation reactions require Mo-dependent enzymes and cells have developed sophisticated machineries (Mo-uptake, Mo-transport, Mo-storage, Mo-homeostasis, gene regulation, Mo cofactor biosynthesis) to keep these enzymes productive<sup>4</sup>. In some hyperthermophilic organisms Mo can also be replaced by W as its chemical behaviour at least in the highest oxidation state is fairly related<sup>5</sup>. A rather special situation refers to the Mo storage protein which is the only protein known that binds Mo/W oxide clusters and therefore (named Mo/Wsto) combines for the first time the worlds of bio and inorganic macromolecules. The multi-subunit protein is capable of storing up to 90 Mo or 110 W atoms as polynuclear metal-oxygen clusters<sup>6</sup> with the metal atoms always present in the oxidation state VI. A related strategy of metal storage is, so far, only described for iron-storage proteins<sup>7,8</sup>. The high-capacity Mo/W storage system was discovered in the aerobic nitrogen fixing bacterium *Azotobacter vinelandii* and has the function to supply the

molybdenum-dependent nitrogenase system with Mo, in particular, in a Mo-deficient surrounding. The release of Mo strongly depends on ATP, pH, and temperature<sup>6,9</sup>.

To elucidate the structure of the bound polynuclear metal-oxides, their binding to the protein and the protein-based nucleation processes the crystal structure of Mo/Wsto of *A. vinelandii* loaded with “tungstate” was solved as the structure determination of the protein loaded with “molybdate” failed – due to the poor quality and low reproducibility of the crystals perhaps as a consequence of the rather fast release of “molybdate” during the crystallization process. The Mo/Wsto in a complex with the functional ATP is organized as an  $\alpha_3\beta_3$  heterohexamer consisting of a trimer of  $\alpha\beta$  dimers (Figure 1). The two structurally similar subunits  $\alpha$  and  $\beta$  represent an open  $\alpha,\beta$  structure whose architecture is similar to that of the amino acid kinase family<sup>10</sup> the most related member being the hexameric UMP kinase<sup>11</sup>. The subunits are composed of an  $\alpha,\beta$  core and two lobes attached above the edges of the central  $\beta$ -sheet of the  $\alpha,\beta$  core. The thereby constituted groove serves as ATP binding site in the  $\alpha$ -subunit. Details of ATP binding and its participation in the release and binding process of polynuclear W oxide clusters are described elsewhere.

Most important, the heterohexamer contains in its center a large cavity with a size of about  $7250 \text{ \AA}^3$  which is filled with bulk solvent and metal oxide clusters (Figure 2). The internal surface of the cavity provides pockets with different geometric and electrostatic properties that serve as binding sites for 14 polynuclear tungsten oxide clusters. They can be divided into five different types: one W3, three W6, three W7, three W2 (I), three W2 (II), and one putative W16 clusters (Figure 2). Due to the molecular symmetry of Mo/Wsto each cluster occurs threefold except for the two located at the  $C_3$  axis. The 60 - 70 W atom sites (Figure 3) were identified on the basis of an anomalous Difference Fourier electron density map that was calculated from data collected at the selenium and at the W absorption edges. A complete description including the O atoms was possible only for the W3 cluster, the

description of the other POM clusters was hampered by their fractional occupation. This is due to the fact that during the crystallization process or generally in solution<sup>9</sup> “tungstate” is released.

The W3-cluster is composed of three edge-sharing octahedra that are related by a crystallographic three-fold axis (Figures 2+3). The W atoms are coordinated to five O atoms and to the imidazole Nε2 atom of Hisα139 (cluster composition  $W_3O_{10}H_xN_3^{6-x}$ ). The  $W_3O_{10}$  fragment of the cluster is found as constituent of the well-known  $[(H_2)W_{12}O_{40}]^{6-}$  species<sup>1</sup> in which it might be considered as a possible precursor. As in the W3-cluster the O atoms can be clearly identified an accurate description of hydrogen bond and van der Waals interactions between them and the protein matrix is feasible (Figure 3B).

The other cluster on the  $C_3$  axis is the putative W16 species (therefore, and in spite of its preliminary disorder discussed before the other more complete cluster types). It is built up of four arrays composed of one, six, six and three W-atoms and shows a topological relationship with the  $[NaMo_{16}O_{40}(OH)_{12}]^{7-}$  cluster<sup>12</sup>. The mononuclear unit at the vertex sits exactly on the threefold axis and points to the protein pocket bottom (Figure 2). The peak height of the anomalous difference electron density of the W16 cluster decreases stepwise from the single W atom at the vertex (0.3 W) mentioned above via the first (0.1 W) and the second W hexagon ( $< 0.1$  W) to the trinuclear unit ( $< 0.1$  W) implicating its presence as a partially decomposed species. The very low occupation of the third and fourth arrays can be correlated with the absence of any interaction/protection with/by the protein surface. Their very low peak heights also refer to the nomenclature putative W16 cluster. (Neglecting the two weakest “arrays” the pattern of the W peaks is also compatible with a disordered W3 cluster with one W on the  $C_3$  axis.)

The W6 clusters (Figure 2) can be described as strongly distorted pentagonal pyramidal arrangement of six W atoms which can be related to the essential building unit  $(M)M_5O_{21}$  of the important spherical porous  $\{(Mo)Mo_5\}_{12}\{linker\}_{30}$  cluster type family mentioned above<sup>13</sup>. This pentagonal type of building units is also present in the above mentioned hedgehog shaped  $\{Mo_{368}\}^3$  and wheel-shaped  $\{Mo_{154}\}^{14}$  cluster types. As two W atoms have a peak height of ca. 0.5 W and the others of ca. 0.14 W the electron density might be compatible with a W6 and a W2 cluster superimposed, i.e. disordered. Interestingly, weak anomalous electron density peaks beyond the W6 cluster even point to a larger aggregate.

The W7 clusters are – assuming appropriate positions with O atoms – similar to the well known heptametallate  $W_7O_{24}^{6-}$  (Figure 2) that occurs preferably formed in aqueous solution

but also as building block type in the larger  $[\text{Mo}_{36}\text{O}_{112}]^{8-}$ . The W7 cluster is homogeneously occupied to ca. 30% (a hint for its existence in solution) which is also reflected in the large temperature factors of the contacting side chains and in a largely disordered glycin-rich loop close to the  $\beta$ -interface. It should be mentioned that its two-fold symmetry axis does not coincide with the pseudo twofold axis between subunits  $\alpha$  and  $\beta$ .

The W2 clusters I and II are located in the vicinity of the W7 clusters and correspond to two edge-sharing  $\text{WO}_6$  octahedra forming a  $\text{W}_2\text{O}_{10}$  structure (Figure 2). For the metal-metal distances in all cluster species see legend to figure 1.

A comparison between the hexameric Mo/Wsto and UMP kinase<sup>11</sup> suggest that the former can form two pores across the protein shell along the threefold axis that are sufficiently wide to be crossed by small tungstate ions like  $\text{WO}_4\text{H}^-$  and  $\text{WO}_4^{2-}$ . Based on this assumption the POM synthesis proceeds only inside the cavity acting as “nanoreactor”. According to the knowledge of bulk POM chemistry the W2 and especially the W7 clusters might be synthesized spontaneously within a self-assembly process and further conserved by binding to the protein surface. (Both processes can also be considered as nucleation and growth/condensation processes.) In contrast, there is evidence from the structure of the protein’s pocket/template parts that the W3, the W16 and W6 clusters are formed within a template-induced assembly<sup>14,15</sup> or cascade-directed process<sup>16</sup>.

The nucleation step via positioning/recognition of the (first) small tungstate ions might be driven, e.g. in case of the putative W16 cluster by multiple contacts to the protein scaffold, for the W6 cluster by positive charged histidines and for the W3 cluster by covalent bonds to His $\alpha$ 139 (Figure 3a). The specific formation/growth step is governed for the W3 and W16 clusters, in particular, by the threefold molecular symmetry finally being present in the clusters themselves. Specificity between the W3 and W16 clusters is realized by modifying a helical segment adjacent to the clusters that consists of 15/10 residues, 3/1 of them (in cluster contact) being polar, resulting in a smaller/larger and more hydrophilic/hydrophobic pocket, respectively. In contrast, formation of the W6 cluster appears to be mainly directed by specifically placed hydrogen atoms whereby three pronounced histidines appear to play a key role. Notably, the pocket for template-assisted synthesis of the W6 cluster is designed from asymmetrically positioned polypeptide segments.

The growth mechanism of a  $\text{Mo}_{37}$  cluster defined as an induced cascade process<sup>17</sup> can be directly transferred to the protein-POM system. Accordingly, the formation of the first hexanuclear layer of the putative W16 cluster is directed by the (first) mononuclear “part” at the vertex and the protein pocket template. The further “growth” which is essentially protein-

independent and therefore correlates with a dramatic decrease of the anomalous peak height of the W atoms should occur in form of a directed cascade. As the older part has directed the formation of the next fragment it reacts with those. (Note: The growth starts always at the protein pocket but the degradation in the reverse direction, which leads to the POM release.) Whereas the cascade process for the W3 and W16 clusters is predominantly driven by geometrical restraints that of the W6 clusters appears to be more based on electrostatic principles: the electrophilic surface generated by the mentioned histidines attract nucleophilic small tungstate ions and therefore supports the assembly process. (Important: On the surface the repulsion of the negatively charged ions is decreased with the consequence that they can be brought near to each other.) The postulated mechanism of cluster growth is in some cases the opposite to that proposed for giant cluster formations where a growing nucleophilic species attracts electrophilic groups<sup>14</sup>.

The Mo/WSto with its polynuclear W oxide system combines in a unique manner macromolecular biochemistry with a novel type of inorganic chemistry under confined conditions. Both the protein and POMs are formed by condensation processes and both create a tremendous structural variety. The presented work provides insights into these two nanoworlds. Though the found inorganic aggregates essentially exhibit well-known structural details of topologies in POM chemistry<sup>1</sup>, most of them were not found in bulk media and should be instable under those conditions. On the other hand they could serve as precursors for “bulk” species while protected in the protein environment. Nature has developed Mo/Wsto for storing comparably large amounts of “molybdenum” in form of compact polynuclear Mo oxides. The scientist can learn from it regarding the option to design clusters based on tailor made templates and based on precursors found here to understand more about the details of relevant nucleation processes which are not yet known. The progress in POM chemistry in the last decade opens the door for a new type of nanochemistry/nanotechnology which do not only allow well-defined reactions to be performed at well-defined sites of well-defined nanoobject species and the option to synthesize unprecedented materials<sup>18</sup> but allow to construct nanoion-chromatographs and to model ion transport through nanoporous capsules acting as artificial cells<sup>18</sup>. The option to use the Mo/Wsto protein as a suitable nanosystem/lab has now to be explored. The modification of relevant boundary conditions by site-directed exchanges of amino acids creates new recognition patterns and increase the chance to generate novel clusters. The challenging task for the future would be to develop a new sort of protein-assisted material science, in any case to learn more about assembly processes under confined conditions and template influence.

## METHODS

**Protein purification and crystallization.** *A. vinelandii* was grown with a tungstate-containing medium as tungstates binds to Mo/Wsto with higher affinity than molybdates<sup>9</sup> and the Mo/Wsto was purified from *A. vinelandii* as described<sup>6</sup>. Se-methionine labelled protein was produced with the method of metabolic inhibition<sup>19</sup>, while most suitable crystals were obtained with the hanging-drop method at 18°C with a drop volume of 1 µl protein solution (15mg/ml Mo/Wsto, 50 mM Mops, pH 6.5 and 50 mM NaCl).

**Structure determination and refinement.** Data of native and Se-methionine labelled Mo/Wsto crystals were collected at the PX I and PX II beamline at the Swiss Light Source (SLS) and processed with the HKL<sup>20</sup> and or XDS<sup>21</sup> program suites. The positions of the selenium and many W atoms were determined with SHELXD<sup>22</sup> using the peak data of the MAD experiment performed at the selenium absorption edge. The found sites were refined in SHARP<sup>23</sup> and the subsequently calculated phases were improved by solvent flattening<sup>24</sup>. The resulting electron density at 2.5 Å was of excellent quality. 80% of the polypeptide chain was automatically incorporated using RESOLVE<sup>25</sup>, the residual segments, ATP, ions, solvents and polynuclear W oxide clusters manually with O<sup>26</sup>. Refinement was started with CNS<sup>27</sup> and brought to convergence with REFMAC<sup>28</sup>. (Site occupation factor were refined within ShelxH.) The found R and R<sub>free</sub> value was 18.9 % and 20.6 %, respectively, the rms for bond length and bond angles 0.011 Å and 1.4°. The model includes residues 31-276 of subunit α, residues 3-270 of subunit β, the most flexible segment being a glycin-rich loop close to the interface β, one ATP and fourteen polynuclear W oxide molecules of different type. Because of the rather low occupation of the latter their O atom positions could not be found except for the W3 cluster.

1. Pope, M. T. & Müller, A. Polyoxometalate chemistry: An old field with new dimensions in several disciplines. *Angew. Chemie. Int. Ed. Engl.* **30**, 34-48 (1991).
2. Hall, N. Bringing inorganic chemistry to life. *Chem. Commun.* (Focus Article), 803-806 (2003).
3. Müller, A., Beckmann, E., Bögge, H., Schmidtman, M. & Dress, A. Inorganic chemistry goes protein size: A Mo<sub>368</sub> nano-hedgehog initiating nanochemistry by symmetry breaking. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 1162-1167 (2002).

4. Pau, R.N. & Lawson, D. M. in *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 39: Molybdenum and Tungsten: Their role in Biological Processes* (eds Sigel, A. & Sigel, H.) 31-74 (Dekker, New York, 2002).
5. Kletzin, A. & Adams, M.W.W. Tungsten in biological systems. *FEMS Microbiology Reviews* **18**, 5-63 (1996).
6. Fenske, D., Gnida, M., Schneider, K., Meyer-Klaucke, W., Schemberg, J., Henschel, V., Meyer, A.-K., Knöchel, A. & Müller, A. A new type of metalloprotein from *Azotobacter vinelandii* contains a polynuclear molybdenum-oxide cluster. *ChemBioChem.* **6**, 405-413 (2005).
7. Lewis, A., Moore, G. R. & Le Brun, N.E. Formation of protein-coated iron minerals. *Dalton Trans.* **439**, 3597-3610 (2005).
8. Alexeev, D., Zhu, H., Guo, M., Zhong, W., Hunter, D. J. B., Yang, W., Campopiano, D. J. & Sadler, P. J. A novel protein-mineral interface. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 297-301 (2003).
9. Schemberg, J., Schneider, K. & Müller, A. The Mo storage protein of *Azotobacter vinelandii*: Studies on the unique mechanism of molybdenum (tungsten)-binding and release. *ChemBioChem.*, submitted.
10. Ramón-Maiques, S., Marina, A., Gil-Ortiz, F., Fita, I. & Rubio, V. Structure of Acetylglutamate kinase, a key enzyme for arginine biosynthesis and a prototype for the amino acid kinase enzyme family, during catalysis. *Structure* **10**, 329-342 (2002).
11. Briozzo, P., Evrin, C., Meyer, P., Assairi, L., Joly, N., Bärzu, O. & Gilles, A.-M. Structure of *Escherichia coli* UMP kinase differs from that of other nucleoside monophosphate kinases and sheds new light on enzyme regulation. *J. Biol. Chem.* **280**, 25533-25540 (2005).
12. Khan, M. I., Müller, A., Dillinger, S., Bögge, H., Chen, Q. & Zubieta, J. Cation inclusion within the mixed-valence polyanion cluster  $[(\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_3)_4\text{Mo}^{\text{V}}_{12}\text{O}_{28}(\text{OH})^{12}]^{8-}$ : Syntheses and structures of  $(\text{NH}_4)_7[\text{NaMo}_{16}(\text{OH})_{12}\text{O}_{40}] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Me}_2\text{NH}_2)_6[\text{H}_2\text{Mo}_{16}(\text{OH})_{12}\text{O}_{40}]$ . *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 1780-1782 (1993).
13. Müller, A., Kögerler, P. & Kuhlman, C. A variety of combinatorially linkable units as disposition: from a giant icosahedral Keplerate to multi-functional metal-oxide based network structures. *Chem. Commun.* 1347-1358 (1999).
14. Müller, A., Shah, S. Q. N., Bögge, H. & Schmidtman, M. Molecular growth from a  $\text{Mo}_{176}$  to a  $\text{Mo}_{248}$  cluster. *Nature* **397**, 48-50 (1999).
15. Müller, A. *Nature* **352**, 115 (1991).

16. Müller, A., Meyer, J., Krickemeyer, E., Beugholt, C., Bögge, H., Peters, F., Schmidtman, M., Kögerler, P. & Koop, M. J. Unusual stepwise assembly and molecular growth:  $[\text{H}_{14}\text{Mo}_{37}\text{O}_{112}]^{14-}$  and  $[\text{H}_3\text{Mo}_{57}\text{V}_6(\text{NO})_6\text{O}_{189}(\text{H}_2\text{O})_{12}(\text{MoO})_6]^{21-}$ . *Chem. Eur. J.* **4**, 1000-1006 (1998).
17. Müller, A., Reuter, H. & Dillinger, S. Supramolecular inorganic chemistry: Small guests in small and large hosts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**, 2328-2361 (1995).
18. Müller, A. & Roy, S. Multifunctional metal-oxide based nanoobjects: spherical porous capsules/artificial cells and wheel-shaped species with unprecedented materials properties. *J. Mater. Chem.* **15**, 4673-4677 (2005); highlighted in: Artificial cells allow ion entry: Porous inorganic capsules serve as models for biological ion-transport processes. *Chem. Eng. News*, **83**, 10 (2005).
19. Doublet, S. Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods Enzymol.* **276**, 523-530 (1997).
20. Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326 (1996).
21. Kabsch, H. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* **26**, 795-800 (1993).
22. Schneider, T. R. & Sheldrick, G. M. Substructure solution with SHELXD. *Acta Cryst. D* **58**, 1772-1779 (2002).
23. De la Fortelle, E. & Bricogne, G. Maximum likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.* **276**, 472-494 (1997).
24. Abrahams, J. P. & Leslie, A. G. W. Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F-1 ATPase. *Acta Crystallog. sect. D* **52**, 30-42 (1996).
25. Terwilliger, T. C. Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension. *Acta Cryst. D* **59**, 38-44 (2003).
26. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst. A* **47**, 110-119 (1991).
27. Brünger, A., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determinations. *Acta Cryst.* **D54**, 905-921 (1998).

28. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst.* **D53**, 240-255 (1997).
29. Delarbre, L, Stevenson, C. E. M., White, D. J., Mitchenall, L.A., Pau, R.N. & Lawson, D.M. 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**, 1063-1079 (2001).

**Supplementary information** is linked to the online version of the paper at [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature).

**Acknowledgements** We thank Hartmut Michel for continuous support and the staff (in particular Ehmke Pohl und Clemens Schulze-Briese) of the PXI and PXII beamlines at the Swiss-Light-Source in Villigen for assistance. A.M. gratefully acknowledges the support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, the European Union, the German-Israeli Foundation for Scientific Research & Development (GIF), the Volkswagenstiftung, and the Fonds der Chemischen Industrie.

**Author information** Structure coordinates for the Mo/Wsto protein have been deposited in the Protein Data Bank under the accession number.... Reprints and permissions information is available at [npg.nature.com/reprintsandpermissions](http://npg.nature.com/reprintsandpermissions). The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for material should be addressed to A.M. ([a.mueller@uni-bielefeld.de](mailto:a.mueller@uni-bielefeld.de)) and U.E. ([ulrich.ermiler@mpibp-frankfurt.mpg.de](mailto:ulrich.ermiler@mpibp-frankfurt.mpg.de)).

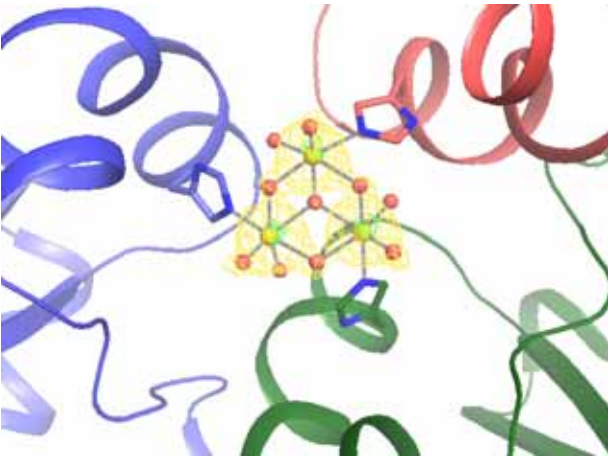
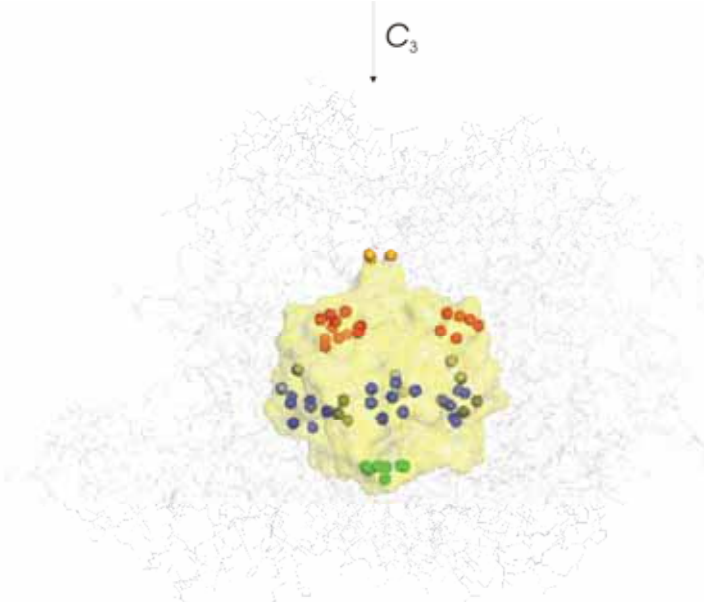
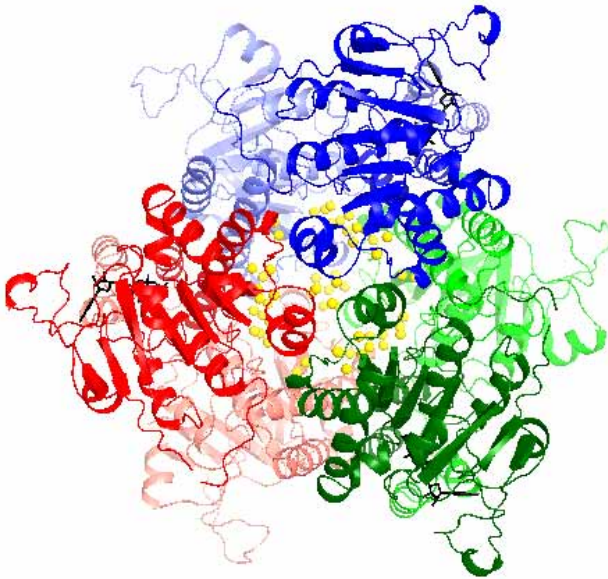
Figure legends

**Figure 1 | Structure of the Mo/W storage protein of *A. vinelandii*.** The heterohexameric ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> protein complex has a size of about 100 x 100 x 70 Å<sup>3</sup> and adopts a 32 pseudo symmetry. The approximate two-fold symmetry between subunits  $\alpha$  and  $\beta$  is due to their high structural relationship reflected in a sequence identity of 45%. The monomers  $\alpha_1$ , (red)  $\alpha_2$  (blue) +  $\alpha_3$  (green) and  $\beta_1$ , (light-red)  $\beta_2$  (light-blue) +  $\beta_3$  (light-green) assemble as trimer on each side (called interface  $\alpha$  and  $\beta$ ) of the heterohexamer related by the crystallographic threefold axis (indicated as ▲). UMP kinase contains a similar hexameric quaternary

structure where two pores with a diameter of 7 Å are formed along the threefold axis. ATP is shown in black and the W atoms of the polynuclear W oxide clusters as gold spheres.

**Figure 2 | Surface representation of the cavity of the (Mo)Wsto protein.** The (roughly) elliptical protein shell shown in grey and the nanocavity (shown as surface in yellow) have a diameter of 20 - 30 Å. The protein surface of the cavity forms several, well distributed pockets which harbour the polynuclear W oxide clusters. The W3 and W16 clusters (gold and green) are positioned on the threefold axis in front of the interfaces  $\alpha$  and  $\beta$ , embedded in a small hydrophilic and a larger hydrophobic pocket, respectively. The binding sites of the three W6 clusters (red) are essentially built up by segments of the  $\alpha$ -subunit forming a flat and hydrophilic pit. The three W7 clusters (blue) lie between subunits  $\alpha$  and  $\beta$  in a deep pocket while the W2 clusters I and II (grey) are located in the vicinity of the W7 cluster. The clusters have been tentatively illustrated in polyhedral representation with the oxygen atoms modelled (except for the W3 cluster) according to the rules of POM chemistry.

**Figure 3 | The structure of the W3 cluster and its protein surrounding.** **a**, The three triangularly arranged atoms have a distances from each other of 3.4 Å (typical for all polyoxotungstates without metal-metal bonds), while each W atom is covalently linked besides to the five oxygens with the His $\alpha$ 139-N $\epsilon$ 2 atom. The molecular symmetry of Mo/Wsto seems to be exploited for the W3 cluster synthesis. (Interestingly, MOP proteins harbouring monotungstates also use the interface between three symmetry-related subunits as binding sites<sup>29</sup>). The W3 cluster is occupied to ca. 50% and the oxygen atoms are visible in the  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  electron density map (contour level  $\sigma = 1.0$ ) at 1.6 Å resolution. **b**, Scheme of the interactions between the protein matrix and the W3 cluster. Hydrogens bonds are formed between the first terminal tungstate oxygen and Gln $\alpha$ 135 and via a water molecule to Gln $\alpha$ 135, Thr $\alpha$ 131 and Glu $\alpha$ 128. The second terminal oxygen points towards the side chain of Ile $\alpha$ 138 and is probably protonated which could lead to the formulation  $W_3O_{10}H_3N_3^{3-}$ . The three bridging oxygen atoms also interact via a water molecule to Gln $\alpha$ 135 and Thr $\alpha$ 131. The apical oxygen coordinated to all W sits exactly on the threefold axis and points to the bottom of the cavity.



## A.2 Zusammenfassung

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Mo-Speicherprotein und das entsprechende W-enthaltende Analogon sind nach bisherigen Erkenntnissen die einzigen Proteine, die Polyoxomolybdat- oder Polyoxowolframat-Cluster enthalten. Dieses System stellt somit eine Verknüpfung zwischen der Welt der Biomakromoleküle und der anorganischen Supramoleküle her. Das Mo-Speicherprotein ist Teil des Stickstofffixierungsprozesses, in dem es große Mengen an Molybdän innerhalb der Zelle speichert und bei Bedarf dem Nitrogenasesystem zur Verfügung stellt. Das große Fassungsvermögen des Mo-Speicherproteins in Kombination mit den hoch affinen Mo-Transportproteinen stellt ein System dar, das dem Organismus selbst bei zeitweisem Mangel an Mo ausreichende Mengen bereitstellt und ihm in der Natur damit einen Wettbewerbsvorteil gegenüber anderen diazotrophen Bakterien verschafft.

Biochemische Untersuchungen zeigten, dass die Freisetzung des Molybdäns (als Molybdat) aus dem Speicherprotein am stärksten durch die Temperatur und den pH-Wert aber auch von anderen Faktoren wie der Inkubationszeit, Proteinkonzentration und des Reinheitsgrads beeinflusst wird. Titrations des pH-Werts (vom leicht sauren in den alkalischen Bereich) offenbarten, dass der Freisetzungsprozess in drei unterschiedliche Stufen erfolgt, wobei jeder dieser Schritte vermutlich mit einer Deprotonierung einer Aminosäure (Histidin) und/oder dem Zerfall der bei hohen  $\text{OH}^-$ -Konzentrationen labilen Polymolybdat-Cluster einhergeht. Dieser Prozess benötigt zwar kein ATP, allerdings verhindert das Kosubstrat die Mo-Freisetzung und reduziert dadurch den Grad des Freisetzungsprozesses. Somit kommt dem ATP eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Kontrolle der Mo-Freisetzung zu. Die notwendige Voraussetzung zur Bindung von Molybdat bzw. Wolframat an das Speicherprotein ist die Anwesenheit von ATP und  $\text{MgCl}_2$ . Rekonstitutionsprozesse mit dem Apoprotein zeigten eine mögliche allosterische Kosubstratabhängigkeit. Das entsprechende W-haltige Speicherprotein (WSto) konnte sowohl *in vivo* sowie *in vitro* durch eine Metallaustausch-Methode, die auf Experimenten mit isoliertem MoSto basiert, synthetisiert werden. Der hohe W-Gehalt von WSto, und die geringe Freisetzungsrates von Wolfram macht deutlich, dass die W-oxid-Cluster stärker am Protein gebunden sind als im Polyoxomolybdat-System.

Entgegen der früheren Publikation zeigte die Röntgenstrukturanalyse des WSto ein Heterohexamer ( $\alpha_3\beta_3$ ) mit einer Größe von  $100 \times 100 \times 70 \text{ \AA}^3$ , das aus einem Trimer von  $\alpha\beta$ -Dimeren besteht und eine 3-zählige pseudosymmetrische Anordnung einnimmt. Zusätzliche Untersuchungen durch analytische Ultrazentrifugation und Elektrophoresestudien lassen auf gleichzeitig in den Präparaten anwesende höhere oligomere Zustände schließen. Darüber hinaus konnten 5 verschiedene W(VI)-O-Cluster, die in Taschen der Oberfläche des Proteins eingebettet waren, nachgewiesen und ihre Struktur charakterisiert werden. Eine genaue Beschreibung der Cluster wurde durch die meistens nicht vollständige Besetzung und Teilsynthesen verhindert, so dass das stark streuende Wolfram die Sauerstoffatome in der Elektronendichte maskierte.

### A.3 Abstract

According to the current knowledge, the Mo storage protein and its tungstate containing analogue, both intensively studied in the present work, are the only proteins in nature binding polyoxomolybdate or polyoxotungstate clusters, respectively. Therefore this storage system combines the fields of biomacromolecules and inorganic supramolecules. The Mo storage protein is a part of the nitrogen fixation process in *A. vinelandii* accumulating large amounts of Mo inside the cell and providing, if required, Mo for the nitrogenase-system. The high-capacity of Mo storage protein in combination with the high-affinity Mo transport proteins (Mo uptake into the cell) represent a system that supply Mo to the organism in sufficient amounts even at temporarily lack of Mo which thus guarantee *A. vinelandii* a significant competitive advantage towards other diazotrophic bacteria.

Biochemical studies indicated that the release of Mo (as molybdate) from the Mo storage protein (MoSto) is strongly influenced by temperature and pH value and other factors like incubation time, protein concentration and degree of purity. A detailed pH titration (from slightly acidic to alkaline region) revealed that for the Mo release process three different Mo release steps can be distinguished. Each release step appears to be accompanied by a deprotonation of a amino acid (histidine) and/or the decomposition of polymolybdate clusters which become distinctly unstable upon increasing the high OH<sup>-</sup>-concentration. The Mo release process does not require ATP but the cosubstrate prevents the Mo release or at least reduces the degree of the Mo release, respectively. Consequently, in addition to the pH value ATP plays an important role in intracellular control of Mo release. The presence of both ATP and MgCl<sub>2</sub> is the essential prerequisite for the binding of molybdate and tungstate to the Mo storage protein respectively. The reconstitution of the holoprotein indicates a possible allosteric dependence on ATP. A corresponding tungsten-containing storage protein ("WSto") could be synthesized in-vivo as well as constructed in-vitro by a metal-ion exchange procedure based on experiments with the isolated MoSto protein. The high W content of WSto and the low yield of tungstate release strongly suggests that the W-oxide-based clusters are tighter bound to the protein than the polyoxomolybdate compounds.

On the contrary to the octameric subunit composition described in an earlier publication, x-ray structure analysis of WSto revealed a heterohexamer ( $\alpha_3\beta_3$ ) with a size of about  $100 \times 100 \times 70 \text{ \AA}^3$  which can be subdivided into a trimer of  $\alpha\beta$ -dimers adopting a threefold pseudosymmetry. Additional research by analytical ultracentrifugation and electrophoretic trials imply also higher oligomeric states in the soluble state of the protein. Furthermore, five different W(VI)-cluster types which are embedded into pockets at the surface of the protein, were identified and structurally characterized. An accurate description of these clusters is hampered by the fact that the cluster formation mostly not completely occupied and only partially synthesized so that the strong scattering of tungsten partly mask the oxygen in the electron density map.

#### A.4 Lebenslauf

5. November 1967	geboren in Karlsruhe
Staatsangehörigkeit	deutsch
1974-1978	Grundschule Karlsruhe/Mainz-Marienborn
1978-1984	Realschule Mainz-Lerchenberg/Eisenberg (Pfalz)
1984-1985	Technisches Gymnasium Mainz
1985-1989	Ausbildung zum Chemielaborant (BASF)
1989-1990	Fachoberschule Ludwigshafen
1990-1991	Wehrdienst
1991-1999	Diplomstudium Uni-GH-Siegen/Universität zu Köln
August 2000	Examen als Diplom Chemiker
Oktober 2000-März 2001	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Schomburg, Institut für Biochemie, Universität zu Köln. „Struktur - Funktionsbedingungen auf der Basis hochaufgelöster Röntgenstrukturen der katalytischen Untereinheit von Proteinkinase CK2 aus <i>Zea mays</i> im Komplex mit verschiedenen Kosubstraten und zweiwertigen Metallionen.“
September 2001-März 2006	Doktorarbeit bei Prof. Dr. hc. mult. A. Müller, Anorganisches Institut I. „Biochemische Charakterisierung und Röntgenstrukturuntersuchungen am Molybdänspeicherprotein (MoSto) aus <i>Azotobacter vinelandii</i> “.
Juli 2004-März 2006	Zusammenarbeit mit dem Max-Planck Institut für Biophysik in Frankfurt am Main zur Untersuchung der Röntgenstruktur des Molybdänspeicherproteins im Arbeitskreis von Dr. Ermler.