

**Das Molybdän-Speicherprotein
von *Azotobacter vinelandii*:
Grundlegende Untersuchungen
an einem neuartigen Metalloprotein**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

von Diplom-Chemiker Dirk Fenske



"We're in our lab coats. Now what?"

Gutachter dieser Dissertation:

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Achim Müller
(Fakultät für Chemie)

Prof. Elfriede K. Pistorius, Ph.D.
(Fakultät für Biologie)

Öffentliche Disputation am 14. Dezember 2004

Vorsitz: Prof. Dr. Gisela Lück
(Dekanin der Fakultät für Chemie)

Gedruckt auf alterungsbeständigem,
holz- und säurefreiem Papier nach DIN-ISO 9706.

Printed on ISO-9706-compliant wood- and acid-free paper.

Die in dieser Arbeit enthaltenen Proteinsequenzdaten sind in den Datenbanken Swiss-Prot und TrEMBL abrufbar unter den Zugangsnummern P84308 und P84253.

The protein sequence data reported in this work appear in the Swiss-Prot and TrEMBL knowledgebase under the accession numbers P84308 and P84253.

Hinweis zu den Literaturangaben

Fußnoten mit abgekürzter Literaturangabe (Autorenname und Jahreszahl sowie ggf. Seitenzahl) verweisen auf das Literaturverzeichnis. Damit sich die Literaturangaben möglichst nah an den bezogenen Textstellen befinden, wurden Literaturstellen, auf die in der ganzen Arbeit nur ein Mal Bezug genommen wurde, in der Regel nicht in das Literaturverzeichnis aufgenommen, sondern in der entsprechenden Fußnote vollständig zitiert.

Zusammenfassung

Azotobacter vinelandii ist ein den Luftstickstoff bindendes Bodenbakterium, das sich von anderen Stickstofffixierern dadurch unterscheidet, dass es Molybdän in einem speziellen Protein speichert und dadurch seine Fähigkeit zur Mo-abhängigen Stickstoffbindung auch bei extremem Mo-Mangel aufrechterhalten kann. Mit einem auf früher veröffentlichten Methoden beruhenden, verbesserten Anreicherungsverfahren wurde dieses Mo-Speicherprotein isoliert als $\alpha_4\beta_4$ -Oktamer mit Untereinheiten von 28,2 bzw. 29,2 kg/mol und einer Gesamtmolmasse von 230 kg/mol. Die Gene für die Untereinheiten konnten identifiziert werden, die daraus übersetzte Aminosäuresequenz zeigt, dass einerseits das Mo-Speicherprotein mit keinem anderen bekannten Mo-Protein verwandt ist, andererseits jedoch in *Rhodopseudomonas palustris* vermutlich ebenfalls ein bisher unerkanntes, gleichartiges Mo-Speicherprotein vorliegt. Anhand der Aminosäuresequenz wurden mutmaßliche Merkmale der dreidimensionalen Struktur abgeleitet. Mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung wurde die äußere Form des Proteinmoleküls bestimmt.

Die Speicherkapazität beträgt mindestens 90 Mo-Atome je Proteinmolekül. Röntgenabsorptions-Feinstruktur-Spektroskopie (EXAFS) zeigte, dass im Protein ein mit Heptamolybdat strukturell verwandter Molybdän-Sauerstoff-Cluster vorliegt. Sowohl von seiner Aminosäuresequenz als auch von der Struktur der Mo-Komponente her stellt das Mo-Speicherprotein einen völlig neuen Typ von Molybdoprotein dar.

Die Arbeit wird ergänzt durch einen theoretischen Teil, in dem ein Überblick über die mit dem Thema am engsten verknüpften Wissenschaftsbereiche gegeben wird. Im Vordergrund stehen dabei die biologische Speicherung von Metallen, die Eigenschaften von Molybdat(VI) bindenden Proteinen, sowie die Chemie von Molybdat(VI) in wässrigen Lösungen.

Abstract

Azotobacter vinelandii is a diazotrophic soil-dwelling bacterium distinguished from other diazotrophs by its capability of storing Mo in a special storage protein which ensures Mo-dependent nitrogen fixation even under conditions of extreme Mo scarcity. By an improved purification protocol based on methods from earlier publications, this storage protein was isolated as an $\alpha_4\beta_4$ -octamer with subunit masses of 28.2 and 29.2 kg/mol and a total molecular mass of 230 kg/mol. The genes of the α and β subunits were identified, their amino acid sequences reveal that the Mo storage protein is not related to any other known molybdoprotein. On the other hand it is likely that a similar hitherto unrecognised storage protein occurs in *Rhodospseudomonas palustris*. Putative features of the three-dimensional structure were deduced from the amino acid sequence. The protein shape was determined by small-angle X-ray scattering.

Each protein molecule can store at least 90 Mo atoms. Extended X-ray absorption fine structure spectroscopy identified a heptamolybdate-related molybdenum-oxygen cluster bound to the Mo storage protein. According to its amino acid sequence as well as to the structure of its Mo component the Mo storage protein represents a novel type of molybdoprotein.

The experimental results are put into context by a brief review of the most closely related fields of science, focussed on biological metal storage, characteristics of molybdate(VI)-binding proteins, and the chemistry of molybdate(VI) in aqueous solutions.

Inhaltsübersicht

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	7
1.1 Stickstoff und Molybdän.....	7
1.1.1 Das Molybdän-Speicherprotein: bisheriger Forschungsstand.....	8
1.2 Ziele dieser Arbeit.....	11
2 Grundlageninformation zum Thema	13
2.1 Azotobacter vinelandii.....	13
2.2 Speicherung von Metallen durch Proteine.....	15
2.2.1 Ferritin: das allgegenwärtige Eisen-Speicherprotein.....	16
2.2.2 Andere Eisenspeicherproteine	23
2.2.3 Speicherung weiterer biologisch relevanter Metalle	24
2.2.4 Zusammenfassung	30
2.3 Molybdoproteine	31
2.3.1 Systematik der Molybdän-Proteine	31
2.3.2 Molybdät-bindende Proteine: Mop-Proteine	33
2.4 Polyanionen des Molybdäns und Wolframs	38
2.4.1 Isopolymolybdate.....	38
2.4.2 Isopolywolframate.....	43
3 Ergebnisse und Diskussion	47
3.1 Vorversuche.....	47
3.1.1 Wachstumsversuche mit <i>A. vinelandii</i>	47
3.1.2 Prüfung und Optimierung der Molybdän- und Wolfram-Bestimmungsverfahren.....	50
3.2 Isolierung des Molybdän-Speicherproteins.....	55
3.2.1 In der Literatur beschriebene Anreicherungsverfahren	55
3.2.2 Optimierung der Anreicherungsart.....	58
3.2.3 Bilanz der Optimierungsversuche und weitere Verbesserungsmöglichkeiten	62

3.3	Struktur der Protein-Komponente	63
3.3.1	Untereinheitenstruktur und Molekülmassen	63
3.3.2	Aminosäuresequenz	66
3.3.3	Höhere Strukturen	67
3.4	Struktur der anorganischen Komponente.....	75
3.4.1	Molybdäengehalt des Proteins.....	75
3.4.2	UV-Vis-Spektrum von MoSto	76
3.4.3	Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS)	77
3.4.4	Zusammenfassung und Diskussion: Struktur des Mo-Zentrums	86
3.5	Das Wolfram-Analoge des Mo-Speicherproteins	89
3.6	Exkurs: Wolframat-resistente Mutanten von <i>A. vinelandii</i>.....	90
3.6.1	Gewinnung der Mutanten, Wachstumsversuche	90
3.6.2	Prüfung auf Speicherprotein- und Nitrogenaseexpression.....	93
3.6.3	Zusammenfassung	95
4	Fazit	97
4.1	Ziele für weitere Arbeiten.....	98
5	Materialien und Methoden	101
5.1	Zellanzucht.....	101
5.1.1	Nährmedium für <i>Azotobacter-vinelandii</i> -Kulturen.....	101
5.1.2	Stammhaltung von <i>Azotobacter vinelandii</i>	102
5.1.3	Vorkulturen.....	102
5.1.4	Wachstumsversuche	102
5.1.5	Anzucht für Speicherprotein-Anreicherungen.....	104
5.2	Analytische Verfahren	105
5.2.1	Metallanalytik	105
5.2.2	Proteinbestimmung.....	108
5.2.3	Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	109
5.2.4	Immunologische Methoden	113
5.2.5	Proteinsequenzanalyse.....	114
5.2.6	Molmassenbestimmung durch Massenspektrometrie.....	115

5.3	<i>Proteingewinnung und -reinigung</i>	115
5.3.1	Pufferlösungen	115
5.3.2	Zellaufschluss	117
5.3.3	Standard-Anreicherungsprozedur	118
5.3.4	Molmassenbestimmung durch Gelfiltration	120
5.3.5	Gefriertrocknung des Mo-Speicherproteins	123
5.4	<i>Bioinformatische Methoden</i>	124
5.4.1	Aminosäuresequenzvergleiche und -alignments	124
5.4.2	Sekundärstrukturvorhersage	125
5.4.3	3D-Strukturabbildung	125
5.5	<i>Untersuchungen mit Synchrotronstrahlung</i>	126
5.5.1	Röntgenkleinwinkelstreuexperimente (SAXS)	126
5.5.2	Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS)	129
5.6	<i>Allgemeine Materialien</i>	132
5.6.1	Geräte	132
5.6.2	Chemikalien	133
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	135
7	<i>Anhang</i>	141
7.1	<i>Daten ausgewählter MoSto-Anreicherungen</i>	142
7.2	<i>Strukturdaten von MoSto</i>	144
7.3	<i>EXAFS-Parameter für MoSto und die Modellverbindungen</i>	149
7.4	<i>Abkürzungs- und Trivialnamenverzeichnis</i>	151
7.5	<i>Lebenslauf</i>	153

1 Einleitung

1.1 Stickstoff und Molybdän

Stickstoff ist vermutlich der größte Faulpelz unter den chemischen Elementen. Am liebsten lümmelt er sich als Gas in elementarer Form herum, je zwei Atome durch eine Dreifachbindung innig aneinander gebunden und für nahezu alle äußeren Einflüsse unzugänglich, eine Form, in der er vollkommen nutzlos ist. Wann immer er auf andere Weise, chemisch an andere Elemente gebunden und dadurch für allerlei Aufgaben aktiviert vorliegt, fühlt er sich unwohl und nutzt die erste bei einer chemischen Reaktion sich bietende Gelegenheit, um sich seiner lästigen Pflichten zu entledigen und als elementares Gas zu entfleuchen.

Das würde nicht weiter stören, wenn er, wie die Edelgase, zu keiner nützlichen Arbeit fähig wäre. Das Gegenteil ist aber der Fall, der Drückeberger ist hoch begabt und in Lebewesen ebenso wie in Labor und Technik werden seine besonderen chemischen Fähigkeiten andauernd benötigt. Daher das Paradox, dass die Chemie auf unserem Planeten von ständigem Mangel an Stickstoff geprägt ist, obwohl doch seine Atmosphäre zu vier Fünfteln aus eben diesem besteht. Um die Menschheit wäre es heute etwas anders bestellt, wenn sie nicht Anfang des 20. Jahrhunderts eine Methode entwickelt hätte, das schlafmützige Element mit gewaltigem technischen Aufwand zur Arbeit zu treiben. Das Leben auf der Erde sähe dürrig aus, hätten nicht einige Bakterien die Fähigkeit entwickelt, auf in ihrer Art kaum weniger aufwändige Weise den Stickstoff in ihren Dienst und damit letztendlich in den Dienst allen Lebens zu zwingen.

Es ist hier nicht der Ort, ausführlich über biologische noch über technische Stickstofffixierung zu referieren¹. Es geht in dieser Arbeit um das Metall Molybdän, mit dem jedoch der natürliche Kreislauf des Stickstoffs im Ökosystem Erde eng verbunden ist. Im Jahre 1930 wurde erstmals belegt, dass die bakterielle Stickstofffixierung auf Mo angewiesen ist². Die Verbindung reicht jedoch noch weiter: in jedem der Hauptwege des biologischen Stickstoffkreislaufes ist an irgendeiner Stelle ein Mo-abhängiges Enzym beteiligt (Abbildung 1.1). Dies ist vermutlich kein Zufall: als die Photosynthese freien Sauerstoff in der Atmosphäre erscheinen ließ, ermöglichte dies erst den heutigen Stickstoffkreislauf mit seinen Redoxreaktionen, gleichzeitig wurde das zuvor als Molybdänsulfid praktisch wasserunlösliche Mo als leicht lösliches Molybdat MoO_4^{2-} biologisch verfügbar. Aus dem selben Grund ist Mo im natürlichen Kreislauf des Schwefels in ähnlicher Weise beteiligt.

Die vorangegangenen Absätze sollten verdeutlichen, wie bedeutend Mo in der belebten Natur ist. Einige Chemiker und Biologen bezeichnen Mo als "nicht unverzichtbares" Bio-Metall, weil unter

¹ Es liegt reichlich Literatur zu diesem Thema vor. Eine knappe, leider nicht mehr ganz aktuelle Übersicht über den biologischen Prozess geben z.B.: Erfkamp/Müller 1990. Ausführlicher: Stacey 1992.

² Bortels 1930. Interessanterweise kam Bortels auf die Idee, es mit Mo zu versuchen, weil Mo bei der technischen Stickstofffixierung nach Haber/Bosch als Katalysator geeignet ist.

"optimalen Wachstumsbedingungen" die von ihnen untersuchten Organismen keines der Mo-haltigen Enzyme benötigen. Dies ist eine Sichtweise, die meines Erachtens doch all zu sehr auf das Labor bezogen ist, in dem Chemikalien von Merck und Strom aus der Steckdose auf Wunsch jederzeit "optimale Wachstumsbedingungen" gewährleisten. Allerdings ergeben sich in der Tat eher selten Schwierigkeiten für einen Organismus aufgrund fehlenden Molybdäns. Verglichen mit z.B. Eisen werden von Mo nur winzige Mengen benötigt. Zu Knappheit kann es in Erdböden besonderer Zusammensetzung kommen, sowie bei starkem Wachstum und damit Konkurrenz von Mo-aufnehmenden Pflanzen und/oder Mikroorganismen³.

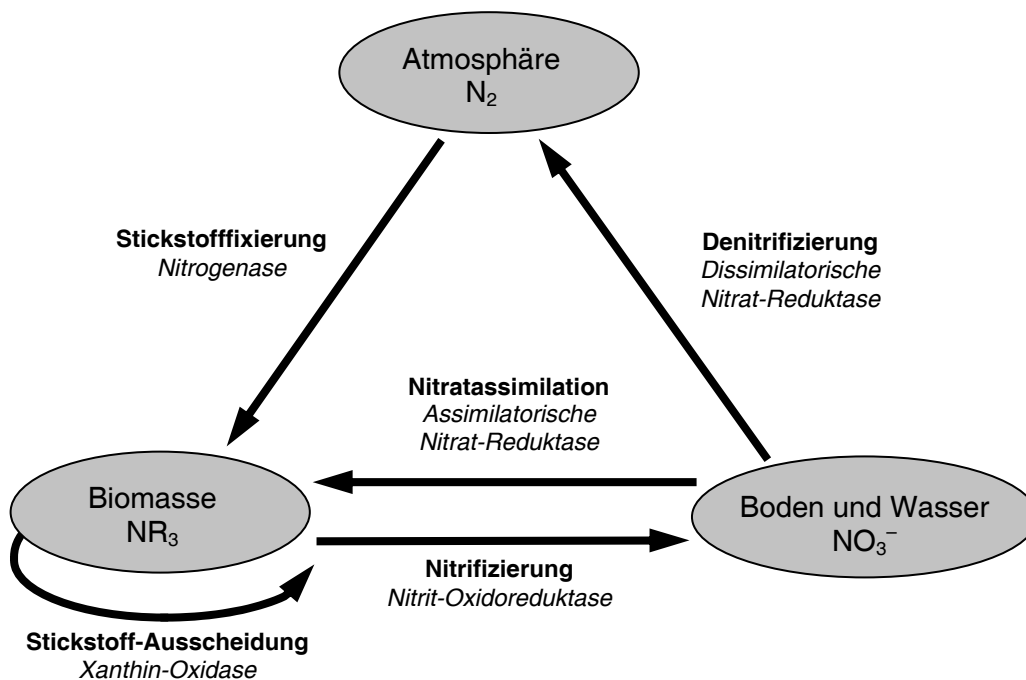


Abbildung 1.1: Molybdänhaltige Enzyme im natürlichen Stickstoffkreislauf.⁴

1.1.1 Das Molybdän-Speicherprotein: bisheriger Forschungsstand

Zahlreiche Proteine in *Azotobacter*-Zellen binden Molybdän und sind in irgendeiner Weise an Aufnahme, Transport oder Verarbeitung von Mo, oder Regulation der entsprechenden Gene beteiligt (Kapitel 2.3). Bei den umfangreichen, von der Erforschung der N₂-Fixierung angeregten Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung dieser Proteine geriet eines irgendwie in Vergessenheit, nämlich das Molybdän-Speicherprotein, kurz auch als MoSto bezeichnet⁵. Dies ist um so erstaunlicher, als es sich um ein ungewöhnliches Protein handelt, nach bisherigem Wissensstand verfügt außer *Azotobacter* kein anderer Mikroorganismus über eine analoge Möglichkeit zur Speicherung von Mo-

³ Pau/Klipp/Leimkühler 1997, 1.

⁴ nach: Stiefel 2002, 8, modifiziert und ergänzt.

⁵ Die Kurzbezeichnung wurde eingeführt in: Allen & al. 1999.

lybdän⁶. Zwar wird MoSto in vielen Veröffentlichungen erwähnt, jedoch stets nur am Rande. Entsprechende Zitate beziehen sich nahezu ausschließlich auf einen Aufsatz, der bereits 1981 erschien und als bisher einzige Arbeit die Isolierung und ansatzweise biochemische Charakterisierung des Speicherproteins beschreibt.⁷

Jene Arbeit ist eine vergleichende Untersuchung zum Molybdän-Stoffwechsel der beiden stickstofffixierenden Bakterien *Klebsiella pneumoniae* und *Azotobacter vinelandii*. Während *Klebsiella pneumoniae* Molybdän nur dann in größeren Mengen aufnimmt, wenn es für die Stickstofffixierung benötigt wird, ist die Aufnahme bei *Azotobacter vinelandii* vollkommen unabhängig davon, ob als Stickstoffquelle die Luft oder gelöste Ammoniumsalze dienen. Wurden ohne Mo angezüchtete Zellen in ein Nährmedium mit Mo gebracht, so nahmen die Zellen unabhängig vom Angebot an gebundenem Stickstoff binnen einer Stunde das gesamte vorhandene Molybdän auf, während das stickstoffbindende Enzymsystem seine maximale Aktivität erst nach 2-3 Stunden erreichte (selbstredend nur bei Abwesenheit von Ammoniumsalzen)⁸. Offensichtlich wurde also ein Großteil des Molybdäns (bei den "NH₄⁺-Zellen" alles) nicht verbraucht, sondern mit einem speziellen Mechanismus gespeichert. *A. vinelandii* reicherte unter den beschriebenen Bedingungen selbst dann Mo aus dem Nährmedium an, wenn durch Chloramphenicol die Proteinsynthese in den Zellen blockiert wurde. Die Autoren schlossen daraus, dass die an Transport und Speicherung beteiligten Enzyme konstitutiv gebildet werden, ihre Produktion also nicht durch das Angebot an Mo oder gebundenem Stickstoff reguliert werde.

Das Speicherprotein wurde aus "NH₄⁺-Zellen" und "N₂-Zellen" extrahiert und jeweils in drei Schritten angereichert, mit einer Anionenaustauschchromatographie, einer Ammoniumsulfatfraktionierung und einer Gelfiltration. In einer SDS- und einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese erwiesen sich beide Präparate als identisch. Im SDS-Gel bildete das Protein zwei gleich starke Banden, aus deren Positionen molare Massen von 21 bzw. 24 kg/mol ermittelt wurden. Die Masse des nativen Proteins ließ sich anhand des Elutionsprofils der Gelfiltration grob zu etwa 100 kg/mol abschätzen⁹. Die Analyse des gereinigten Proteins ergab einen Molybdängehalt von 161 μmol je g Protein. Aufgrund dieser Befunde sahen die Autoren das Speicherprotein als Tetramer vom Typ α₂β₂ an, mit einer Masse von 90 kg/mol und 15 gebundenen Mo-Atomen je Proteinmolekül. Allerdings beobachteten sie auch, dass im Verlauf der Aufarbeitung das Protein Mo in einer niedermolekularen Form freisetzte, vermutlich als Molybdat. Demnach dürfte das natürliche Protein in der Zelle mehr als jene 15 Atome Mo enthalten. Durch einfache Inkubation mit 1 mM Molybdat ließ sich der Mo-Gehalt des isolierten Proteins jedoch nicht erhöhen¹⁰. Insgesamt speichert das Bakterium auf diese Weise mehr als das

⁶ Es gibt allerdings Vermutungen, dass andere Organismen ebenfalls über Mo-Speichersysteme verfügen, siehe Grunden/Shanmugam 1997, 350; und Thiel/Pratte/Zahalak 2002, 53f.

⁷ Pienkos/Brill 1981.

⁸ Pienkos/Brill 1981, 745.

⁹ In einigen vorhergegangenen Veröffentlichungen gaben dieselben Autoren die Molmasse allerdings als "on the order of 200,000 daltons" an. Pienkos/Shah/Brill 1980, 393.

¹⁰ Pienkos/Brill 1981, 748f.

25-fache der Molybdänmenge, die es für maximale Nitrogenaseaktivität benötigt¹¹, d.h. *A. vinelandii* kann bei voll beladenem Speicher bis zu fünf Generationen ohne weitere Mo-Aufnahme mit der konventionellen Nitrogenase Stickstoff fixierend wachsen.

Bereits in der Arbeit von 1981 sind Ergebnisse erwähnt, die belegen, dass *A. vinelandii* ein Wolfram-Analoges des MoSto bildet, wenn das Nährmedium Wolframat an Stelle von Molybdat enthält. Einige spätere Arbeiten bestätigten diesen Befund¹², isoliert oder gar genau untersucht wurde dieses "WSto" aber niemals. Hingegen bildet sich kein Vanadium-Analoges beim Wachstum von *A.v.* in Molybdat-freiem, Vanadat-haltigen Medium¹³.

Bei einer viel später durchgeführten Untersuchung zur Biosynthese des Nitrogenase-Cofactors ("Fe-MoCo") wurden auch Informationen über den Einbau von Mo in MoSto erhalten¹⁴. Zellfreie, durch G25-Gelfiltration von niedermolekularen Substanzen befreiten Extrakte von *A. vinelandii* wurden mit ⁹⁹Mo-markiertem Molybdat und verschiedenen Zusatzstoffen inkubiert und nach nicht-denaturierender Elektrophorese die markierten Proteine im Gel autoradiografisch detektiert. Es zeigte sich, dass der Zusatz von ADP oder ATP für den Einbau von radioaktivem Mo in das Speicherprotein erforderlich war, allerdings konnte nicht festgestellt werden, ob das Nukleotid für den Einbau selbst erforderlich ist, oder den Ausbau von bereits gebundenem Mo bzw. W ermöglicht und damit Plätze zur Bindung von Molybdän aus der Lösung schafft. Aus derselben Arbeitsgruppe stammt der paradox anmutende Befund, dass die Menge des in MoSto eingebauten Molybdäns beim Übergang zu stickstofffixierendem Wachstum ansteigt¹⁵.

Auch in unserem Arbeitskreis wurde dem Speicherprotein bisher nur im Rahmen vergleichender Untersuchungen an mehreren Organismen und verschiedenen Molybdoproteinen Aufmerksamkeit geschenkt¹⁶. Dabei wurde die Verteilung des Molybdäns innerhalb der Zellen auf verschiedene Proteine mit ⁹⁹Mo-TDPAC-Messungen¹⁷ untersucht. Die TDPAC-Spektren von ganzen *A.-vinelandii*-Zellen, die unter Nitrogenase-reprimierenden Bedingungen angezogen worden waren, sowie von zellfreien Extrakten, aus denen man niedermolekulare Verbindungen mit einer G-25-Gelfiltration entfernt hatte, wiesen Ähnlichkeit mit dem Spektrum von Heptamolybdat auf, was die Vermutung nahelegte, dass das Molybdän im MoSto in Form eines Polyoxomolybdat-Clusters vorliegt. Der Versuch, das Ergebnis mit über eine DEAE-Anionenaustauschersäule angereichertem MoSto zu reproduzieren, scheiterte. An den Mo-haltigen Fraktionen ließ sich nur das Spektrum freien Molybdats messen (siehe auch 3.2.1.2).

¹¹ Pienkos/Shah/Brill 1980, 393; Shah &al. 1984, 242.

¹² Z.B. Hales/ Case 1987.

¹³ Blanchard/Hales 1996, 476.

¹⁴ Allen &al. 1999, 15870f.

¹⁵ Rubio/Ludden 2002, 127.

¹⁶ Müller &al. 1997.

¹⁷ Bei diesem Verfahren wird zeitaufgelöst die Winkelkorrelation von zwei γ -Quanten erfasst, die beim β -Zerfall von ⁹⁹Mo zu ⁹⁹Tc nacheinander abgestrahlt werden. Durch Wechselwirkungen mit der Elektronenhülle in der Zeit zwischen den beiden Emissionen wird diese Winkelkorrelation beeinflusst, was vergleichende Aussagen über die chemische Umgebung der Mo-Atome zulässt. Detaillierte Strukturinformationen, wie Bindungslängen und -winkel, erhält man dabei aber nicht.

1.2 Ziele dieser Arbeit

Meine Aufgabe war zunächst, die früheren Anreicherungen bzw. Anreicherungsversuche zu reproduzieren und nach Möglichkeit zu verbessern, um damit möglichst einfach größere Mengen intakten Mo-Speicherproteins zu gewinnen.

Parallel zur Isolierung bzw. an dem isolierten Protein sollten dann möglichst weitgehend die biochemischen Charakteristika des Proteins bestimmt werden: Elutionsverhalten in chromatographischen Verfahren, elektrophoretische Mobilität, Molmasse und Untereinheitenstruktur, und nach Möglichkeit die Aminosäuresequenz. Im Laufe der Arbeiten ergab sich zudem die Möglichkeit, das Speicherprotein mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung zu untersuchen, mit welcher grob die dreidimensionale Struktur (der Molekülumriss) bestimmt werden kann.

Von höchstem Interesse war aber vor allem der anorganische Bestandteil des Komplexes. Dabei ging es zunächst ganz einfach um die Anzahl der gespeicherten Mo-Atome. Letztlich war aber das Ziel, die im Protein enthaltene Mo-Verbindung strukturell zu charakterisieren. Dazu wurde die Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) angewandt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen werden im Teil 2 ("Ergebnisse und Diskussion") dieser Arbeit ausführlich beschrieben. Als erstes jedoch möchte ich im theoretischen Teil der Arbeit ("Grundlagen") einige Themenbereiche der Chemie und Biologie in Form kurzer Übersichten (ohne Anspruch auf Vollständigkeit) des derzeitigen Wissensstandes darstellen:

1. die wesentlichen Merkmale des untersuchten Organismus' *Azotobacter vinelandii*,
2. die bekannten Eigenschaften anderer biologischer Metall-Speichersysteme, in erster Linie natürlich des Eisenspeicherproteins Ferritin,
3. die Eigenschaften anderer Molybdän-Proteine
4. und schließlich die anorganische Chemie der Molybdat-Polyanionen in wässriger Lösung, weil ein solches Polymolybdat als Kern des Speicherproteins vermutet wird. Da es anscheinend ein Wolfram-Analoges zum MoSto gibt, soll die Chemie der Polywolframate ebenfalls beschrieben werden.

Es handelt sich um diejenigen vier Bereiche, denen das Thema dieser Arbeit am ehesten angehört. Da sie aber ansonsten kaum jemals gemeinsam behandelt werden dürften, erscheint mir eine solche Darstellung als sinnvolle Ergänzung, um die Einordnung und Bewertung der experimentellen Ergebnisse zu erleichtern.

2 Grundlageninformation zum Thema

2.1 *Azotobacter vinelandii*¹⁸

In dem Handbuch "The Prokaryotes" findet man die Familie *Azotobacteraceae* in der Kategorie "Gram-negative nicht-sporenbildende aerobe Stäbchen und Kokken"¹⁹. Sie besteht aus den Gattungen *Azotobacter* und *Azomonas*, die sich vor allem darin unterscheiden, dass nur *Azotobacter* dickwandige Mikrozysten als Dauerform zum Überleben bei Trockenheit oder Nahrungsmangel bilden kann. Es handelt sich um relativ große (> 2 µm Durchmesser) Bakterien mit entsprechend umfangreicher genetischer und enzymatischer Ausstattung, die keine besonderen organischen Wachstumsfaktoren benötigen, sondern sich mit einem Mineralmedium plus einer Kohlenstoff- und Energiequelle zufriedengeben.

Zur Gattung *Azotobacter* zählt man derzeit 6 Arten, teils peritrich begeißelt, teils unbeweglich²⁰, die sich weltweit verbreitet im Boden, in Gewässern oder auch auf Pflanzenblättern finden. Alle *Azotobacteraceae* sind in der Lage, den Luftstickstoff chemisch zu binden, sie sind oft eng vergesellschaftet mit Pflanzen, die höchstwahrscheinlich eine lockere symbiontische Beziehung mit den Stickstofffixierern eingehen. Anscheinend ist aber nur *A. paspali* mit dem Gras *Paspalum notatum* auf einen bestimmten Partner spezialisiert.

Unter den zur Stickstoffbindung befähigten Bakterien nimmt *Azotobacter* insofern eine Sonderstellung ein, als es sich um obligat aerobe Organismen handelt. Das Stickstoff-bindende Enzymsystem, die Nitrogenase, wird durch Sauerstoff irreversibel inaktiviert. Bei den meisten Organismen kann daher nur bei Abwesenheit von Sauerstoff N₂ gebunden werden, so dass die Zellen währenddessen ihre Energie anaerob gewinnen müssen. *Azotobacter* ist dazu nicht in der Lage, kann aber durch besonders wirksame Enzyme der Zellatmung den unentbehrlichen Sauerstoff effektiv verbrauchen, so dass die jeweils in der Zelle vorliegende Konzentration an freiem O₂ die Dinitrogenase nicht gefährdet²¹. Zudem

¹⁸ soweit nicht anders angegeben, nach Becking 1992.

¹⁹ Diese Einordnung findet sich bereits in [Bergey's Manual 1974, 253.]. Daneben steht ein zweite, neuere Schule der systematischen Bakteriologie, die *Azotobacter* mit über einem Dutzend weiterer Gattungen zur Familie *Pseudomonadaceae* rechnet, welche wiederum in die "Gamma-Gruppe" der *Proteobacteria* eingeordnet ist. [Brands, Sheila J. (comp.) 1989-2004. Systema Naturae 2000. Amsterdam, The Netherlands. (<http://sn2000.taxonomy.nl>)], siehe auch [Garrity, G.M.; Winters, M.; Searles, D.B.: Taxonomic outline of the prokaryotic genera. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Second Edition. Release 1.0, April 2001].

²⁰ Begeißelt: *A. chroococcum* (die häufigste Art), *A. vinelandii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*. Ohne Geißeln sind *A. beijerinckii* und *A. nigricans*. Die Zahl der Arten wird verschieden angegeben, eine in [Becking 1992] nicht enthaltene Art ist z.B. *Azotobacter salinestrus* [Page, W. J.; Shivprasad, S.: *Azotobacter salinestrus* sp. nov., a sodium-dependent, microaerophilic, and aeroadaptive nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (1991) 369-376.]. Die DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) führt zusätzlich noch eine Art namens *A. macrocytogenes*, sowie zwei Unterarten von *A. nigricans*, also insgesamt neun Spezies. Das Mikrobiologie-Lehrbuch von Madigan gibt die Zahl der *Azotobacter*-Arten ebenfalls mit 9 an [Madigan, Michael T.: Mikrobiologie. Berlin 2001. S. 529.]. Systema Naturae 2000 weist hingegen bisher nur vier Arten aus [Brands 1989-2004 (wie in Fußnote 19). (<http://sn2000.taxonomy.nl/Main/Classification/429.htm>)].

²¹ Ein Nebeneffekt ist, dass *Azotobacter* dadurch auch bei niedrigem Sauerstoffdruck noch wachsen kann.

verfügen *Azotobacter*-Spezies über ein Schutzprotein, das bei hohem Sauerstoff-Druck an die Nitrogenase bindet, das aktive Zentrum abschirmt und so vor Schädigung bewahrt.

Eine weitere Besonderheit ist, dass zu der erwähnten umfangreichen enzymatischen Ausstattung zwei Mo-unabhängige alternative Nitrogenasen gehören. Andere N₂-fixierende Organismen verfügen, wenn überhaupt, neben der Mo-abhängigen Nitrogenase nur über entweder eine Vanadium- oder eine Eisen-Nitrogenase, *Azotobacter* hat alle drei Systeme zur Verfügung²². In dem vor kurzem vollständig sequenzierten Genom von *Rhodospseudomonas palustris* finden sich allerdings ebenfalls Gene für beide alternativen Nitrogenasen²³, so dass *Azotobacter* in dieser Hinsicht nicht mehr wie früher als einzigartig gelten darf.

Azotobacter vinelandii gehört zu den begeißelten Arten. Unter dem Mikroskop zeigen sich die Zellen von einheitlicher Gestalt, meist paarweise, aber nicht in größeren Gruppen zusammenhängend²⁴. Es sind relativ wenige aus der Natur isolierte Stämme beschrieben, und es scheint, dass A.v. seltener vorkommt als andere *Azotobacter*-Arten. Der in Laboratorien als Wildtyp (auch von mir) verwendete Stamm OP stammt vermutlich direkt von den ersten 1903 in Vineland (New Jersey) isolierten Zellen ab.

Die Kolonien auf Agarplatten sind im Aussehen recht unspezifisch, leicht erhaben und in wechselnden Ockertönen gefärbt. A.v. weist sich bei der Anzucht am augenfälligsten in Flüssigkulturen durch einen gelben, im UV-Licht grün fluoreszierenden löslichen Farbstoff unbekannter Natur aus, den es ausscheidet. Die Verfärbung des Mediums bei einer gut gewachsenen A.v.-Kultur ist nach Abzentrifugieren der Zellen unübersehbar. Bei diazotrophen Wachstum und Mo-Mangel soll der Farbstoff nicht entstehen, sondern statt dessen eine rote Färbung auftreten²⁵.

Tabelle 2.1: Einige Charakteristika von *Azotobacter vinelandii*²⁶.

Lebensraum	Erdboden, Flachwasserzonen in Süß- und Brackwasser
Temperaturbereich	Optimum 20-30°C, mit geringen Einbußen bis 40°C
pH-Bereich	Optimum 7,0-7,5; Toleranz 5,5-8,5
G+C-Gehalt	66 mol-% der DNA
charakteristische Unterschiede zu anderen <i>Azotobacter</i> -Arten	toleriert beim Wachstum 0,1 % Phenol im Medium wächst mit L-Rhamnose als einziger C-Quelle

Als erste *Azotobacter*-Art wurde 1901 *A. chroococcum* entdeckt und fand bald das Interesse der Wissenschaft aufgrund der Fähigkeit zur Stickstoffbindung und der daraus resultierenden Bedeutung für die Landwirtschaft. Zeitweilig wurde die *Azotobacter*-Anzahl im Boden regelrecht als Maß

²² Masepohl &al. 2002, 192.

²³ Larimer &al. 2004, 57.

²⁴ Bergey's Manual 1974, 254f.

²⁵ Bortels 1930, 339.

²⁶ Becking 1992, 3151-3153.

für dessen Fruchtbarkeit angesehen²⁷. An *A. chroococcum* und *A. vinelandii* erfolgte der erste Nachweis der Molybdän-Abhängigkeit der N₂-Fixierung²⁸. Die Möglichkeit, stickstofffixierende Zellen einfach an Luft heranzuzüchten, das Vorhandensein beider alternativer Nitrogenasen, sowie rasches Wachstum und allgemein unkomplizierte Handhabung haben *Azotobacter* auch für die Erforschung der Nitrogenase zu einem bevorzugten Untersuchungsobjekt gemacht. Untersuchungen an den alternativen Nitrogenasesystemen sind allerdings bei *A.v.* etwas mühselig, da diese erst gebildet werden, wenn die Zellen völlig an Mo verarmt sind. Gegen eine Mo-Verarmung ist *A.v.* aber durch das Mo-Speicherprotein und das effizienteste bekannte Mo-Transportsystem wirksam geschützt, so dass erst nach mehrmaligem Anziehen und Überimpfen auf sorgfältigst von Mo-Spuren gereinigten Medien die Zellen alternative Nitrogenasen in ausreichender Menge und Reinheit exprimieren.

2.2 Speicherung von Metallen durch Proteine

Ein Metall-Speicherprotein lässt sich definieren als:

- ein Metalloprotein, in dem das Metall offensichtlich keine strukturgebende, katalytische, ladungsübertragende oder andere Funktion besitzt und
- dessen Aufgabe nicht die Katalyse einer Reaktion ist, an der das Metall beteiligt ist (Reduktion/Oxidation des Metalls, Einbau in einen Cofaktor etc.).

Mit dieser Definition sind alle Speicherungen erfasst, egal ob lang- oder kurzfristig, gleichgültig ob das Metall ans Protein locker oder fest gebunden wird²⁹. Zur genaueren Festlegung würde ich noch folgende Fälle unterscheiden:

1. Das Metall wird einfach bei in der Umgebung ansteigender Konzentration eingebaut und bei sinkender Konzentration wieder abgegeben, oder
2. das gespeicherte Metall ist dem normalen Zellstoffwechsel entzogen, es kann nur durch Benutzung eines besonderen "Schlüssels", d.h. durch Einstellung bestimmter Bedingungen verfügbar gemacht werden.

Ersteres würde ich als Puffern der Metallkonzentration, letzteres als Speicherung im engeren Sinne bezeichnen ("Puffer-" und "Speicherprotein"). Das "Einschließen" des Metalls kann mechanisch durch Umhüllung der Metallatome mit dem Protein, oder chemisch durch extrem stabile Komplexbildung oder Umwandlung in eine unlösliche Verbindung erfolgen. Ebenso kann der "Schlüssel" alles mögliche sein. Z.B. könnte ein allosterisch wirkendes Botenmolekül einen Kanal zur Freisetzung des Metalls öffnen

²⁷ Bortels 1936, 193.

²⁸ Bortels 1930. *A. vinelandii* ist dort versehentlich als *Azotobacter agile* bezeichnet (Bortels 1936, darin Fußnote 1).

²⁹ Sie schließt auch Proteine ein, deren Hauptaufgabe der Transport eines Metalls durch einen vielzelligen Organismus ist. Ein solcher Transport erfordert eine kurzfristige Speicherung, so dass auch ein Metall-Transport-Protein Auskunft über mögliche Funktionsweisen eines Speicherproteins geben kann. Reine Transportproteine wie Transferrin oder Transcuprein werde ich jedoch in diesem Abschnitt nicht diskutieren.

oder die Affinität des Proteins zum Metall senken, ein spezieller Chelatligand könnte in das Protein eindringen und das Metall herausholen, eine Redoxreaktion könnte zur Freisetzung erforderlich sein, oder es könnte gar eine Protease als "Büchsenöffner" das Protein einfach aufschneiden.

2.2.1 Ferritin: das allgegenwärtige Eisen-Speicherprotein

Eisen ist sicherlich in der Biochemie eines der bedeutendsten Metalle, auf jeden Fall das vielseitigste. Obwohl es alles andere als selten ist (vierthäufigstes Element der Erdkruste), ist es nur wenig bioverfügbar, da es unter einer oxidierenden Atmosphäre bei neutralem pH als praktisch unlösliches Fe^{III}-Hydroxid vorliegt. Die Schwierigkeiten der Versorgung mit Eisen und seine immense Wichtigkeit bedingen die Notwendigkeit eines Speichersystems.

Darüber hinaus ist ein Fe-Speicher noch aus einem weiteren Grund unentbehrlich: freies Fe stellt in Gegenwart von Sauerstoff ein Zellgift dar. Insbesondere Fe²⁺, welches aber in der Zelle jederzeit aus Fe³⁺ durch Reaktion mit Stoffen wie z.B. Ascorbat entstehen kann, katalysiert Reaktionen, bei denen letztlich elementarer Sauerstoff zu Hydroxylradikalen umgesetzt wird (sog. Fenton-Chemie). Hydroxylradikale greifen alle Biomoleküle an, können insbesondere auch DNA-Strangbrüche verursachen. Daher muss ein aerob lebender Organismus die intrazelluläre Konzentration an freiem Fe unbedingt so niedrig wie möglich halten.

Tabelle 2.2: Überblick über die bisher beschriebenen Ferritine³⁰

	nachgewiesen	sequenziert	Röntgenstruktur bestimmt für: ³¹
Säugetiere	X	X	Mensch, Wanderratte, Hausmaus, Pferd
Vögel	X	X	
Amphibien	X	X	Ochsenfrosch (<i>Rana catesbeiana</i>)
Fische	X	X	
Insekten	X	X	
Weichtiere	X	X	
Würmer	X	X	Bilharzia-Wurm (<i>Schistosoma mansoni</i>)
Pflanzen	X	X	
Pilze	X		
Prokaryoten	X	X	<i>E. coli</i> (Bacterioferritin und Häm-freies Ferritin), <i>Rhodobacter capsulatus</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , <i>Listeria innocua</i>

³⁰ soweit nicht anders angegeben, nach Harrison/Arosio 1996, 164-167.

³¹ Harrison/Arosio 1996, und Eintragungen in der Brookhaven Protein Database, Stand 22.10.2003.

Angesichts der elementaren Bedeutung eines Eisenspeichersystems nimmt es nicht Wunder, dass nicht nur praktisch alle Organismen über ein solches System verfügen, sondern dass es obendrein immer das gleiche System ist. Es dürfte auf der Erde nur wenige Lebewesen ohne Ferritin geben.

2.2.1.1 Struktur von Protein und anorganischem Kern

Die räumliche Struktur ist bei allen Ferritinen nahezu dieselbe:

Sekundärstruktur: Helix A — Helix B — lange Schleife — Helix C — Helix D — Helix E

Tertiärstruktur: Die Helices A-D sind etwa gleich lang und lagern sich mit der langen Schleife zu einem fünffachen "Rutenbündel" zusammen, an dessen Ende sich schräg die kürzere Helix E anheftet. Es entsteht eine "Wurst" etwa von 2,5 nm Durchmesser und 5 nm Länge.

Quartärstruktur: Je zwei Untereinheiten bilden antiparallel verbunden ein Dimer. Zwölf dieser Dimere lagern sich nach Art eines Rhombendodekaeders zusammen. Das Gesamtmolekül hat Oktaeder-Symmetrie³², sofern alle Untereinheiten identisch sind. Es stellt annähernd eine Hohlkugel dar, mit 12,5 nm Außendurchmesser, 8 nm Innendurchmesser und einer Molmasse um 500 kg/mol. Der zentrale Hohlraum bietet Platz für einen Fe^{III}OOH-Kern mit bis zu 4500 Fe-Atomen. Zwei unterschiedliche Arten von Kanälen, die auf den 3-zähligen bzw. 4-zähligen Drehsymmetrieachsen liegen, verbinden den Innenraum mit der Umgebung. Als kleine Besonderheit enthalten Bacterioferritine noch zusätzlich Häm-Gruppen³³ jeweils auf der Kontaktfläche in der Mitte der erwähnten Dimere.

Diese Struktur wird durch zahlreiche Wasserstoff- und Salzbrücken zusammengehalten und ist dadurch ungewöhnlich beständig gegen Hitze (5-10-minütiges Erwärmen auf 70°C ist ein üblicher Schritt bei einer Ferritin-Anreicherung), pH-Änderung (im Bereich 5,4-9,2 keine Stabilitätsprobleme) und denaturierende Agenzien wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid.³⁴

Die einzige bekannte Ausnahme von dieser Struktur stellt das Ferritin aus *Listeria innocua* dar, dessen Untereinheiten die C-terminale kleine Helix E fehlt, und das statt aus 24 nur aus 12 Untereinheiten besteht. Dementsprechend ist der zentrale Hohlraum kleiner und bietet nur Platz für (theoretisch) 500 Fe-Atome. Da der Verlauf der Peptidkette in den Untereinheiten (Sekundär- und Tertiärstruktur) weitgehend deckungsgleich mit anderen Ferritinen ist, sieht man dieses kleinere Protein trotz der Unterschiede als eines von jenen an. Nach Angabe der Entdecker ist *L. innocua* das einzige bekannte Gram-positive Bakterium, das über ein Ferritin verfügt.³⁵

³² Punktgruppe *O* bzw. 432.

³³ Genauer: Eisen-Protoporphyrin IX. Bacterioferritine kommen nur bei Bakterien vor, aber nicht alle bakteriellen Ferritine sind Bacterioferritine. Die Entdeckung, dass Ferritin aus der Pferdemilz Protoporphyrin IX binden kann, an exakt der gleichen Stelle wie im Bacterioferritin von *E. coli*, hat die frühere Überzeugung ins Wanken gebracht, dass es irgendeinen fundamentalen Unterschied zwischen Häm-freien und Bacterioferritinen gebe. Allerdings ist noch völlig unklar, ob die Bindungsmöglichkeit *in vivo* genutzt wird. Siehe Harrison/Arosio 1996, 169.

³⁴ Harrison/Arosio 1996, 164-168.

³⁵ Ilari & al. 2000. Das *L. innocua*-Ferritin ist außerdem nach Sequenz und auch Struktur verwandt mit der Dps-Familie (DNA-binding proteins from starved cells).

Trotz der fast immer gleichen räumlichen Struktur ist die Aminosäuresequenz äußerst variabel. Die beiden unterschiedlichsten von allen bisher bestimmten Sequenzen gehören paradoxerweise zu ein und demselben Organismus: das Bacterioferritin und das "normale" Häm-freie Ferritin aus *Escherichia coli* haben nur 14% identische Aminosäuren. Während diese beiden, wie alle bakteriellen und pflanzlichen Ferritine, nur als Homopolymere auftreten, stellen Ferritine bei Tieren oft Heteropolymere aus Untereinheiten mit verschiedenen Aminosäuresequenzen dar, wobei je nach dem Gewebe, aus dem das Ferritin stammt, die Zusammensetzung unterschiedlich sein kann. Die in Wirbeltierferritinen vorkommenden verschiedenen Untereinheiten (z.B. zwei bei Säugetieren, H- und L-Typ, und drei bei Amphibien, H-, M- und L-Typ) erfüllen offenbar unterschiedliche Aufgaben beim Einbau von Fe in das Protein (siehe unten).

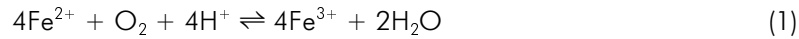
Ebenso wie die Aminosäuresequenz sind Größe, Struktur und Zusammensetzung des anorganischen Kerns variabel. Zwar handelt es sich im wesentlichen stets um ein Eisen(III)-oxid-hydroxid-phosphat, jedoch sind die Anteile der Anionen variabel. Das Eisen/Phosphor-Verhältnis in nativen Ferritin-Kernen kann je nach Organismus bis zu 44 betragen (Patellaschnecke) oder auch kaum über 1 liegen, wie bei *A. vinelandii*, bei dem man den Kern eher als hydratisiertes Phosphat denn als Oxid ansehen muss. Der Kern kann eine mehr oder weniger geordnete Struktur aufweisen, wobei phosphatreiche Kerne i.d.R. amorph sind, phosphatarme hingegen nicht zwangsläufig kristalline Struktur haben. Wenn der Kern kristallin ist, entspricht seine Struktur dem Mineral Ferrihydrit, das die ungefähre Zusammensetzung $5 \text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ aufweist. Der Wassergehalt von Ferrihydrit ist allerdings variabel, die Struktur nur annähernd bekannt und das Mineral ohnehin nur metastabil, es wandelt sich unter Wasserabgabe in stabile Fe^{III} -Oxide um. Im Ferritin ist es hingegen offensichtlich stabil, und seine Entstehung wird durch die Proteinhülle erst ermöglicht: Unter *in-vitro*-Bedingungen, bei denen sich in Gegenwart von Apoferritin Ferritin mit Ferrihydrit-Kern bildet, fallen ohne Apoferritin die Mineralien Lepidokrit und Goethit (γ - und α - $\text{FeO}(\text{OH})$) aus einer Lösung aus. Die Struktur des Kerns wird jedoch nicht allein durch die Proteinhülle gesteuert: Das Bacterioferritin aus *A. vinelandii* enthält nach Entfernung des amorphen phosphatreichen nativen Kerns und *in-vitro*-Rekonstituierung einen kristallinen Ferrihydrit-Kern. Gerade der Phosphatgehalt hängt von der Zusammensetzung des Mediums ab, in dem der Kern entsteht: wenn reichlich Phosphat vorhanden ist, wird es auch eingebaut.³⁶

2.2.1.2 Funktion und Regulation

Die Funktionsprinzipien von Ferritin sind mühselig zu untersuchen und die experimentellen Befunde schwer zu interpretieren wegen der Vielzahl von Ferritin-Untertypen mit unterschiedlicher Sequenz, und weil bei jedem Typ eine Unzahl möglicher Metallbindungsstellen intra- und intermolekular um Fe konkurrieren können.

³⁶ Chasteen/Harrison 1999, 184f.; Harrison/Arosio 1996, 171.

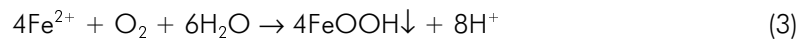
Obwohl der Kern Fe der Oxidationsstufe +3 enthält, werden Fe^{3+} -Ionen nur in geringem Maße von Apoferritin aus einer Lösung aufgenommen. Mit Fe^{II} -Salzen in Gegenwart von O_2 erfolgt hingegen glatt die Rekonstitution zum Holo ferritin. Die Oxidation von Fe^{2+}



ist eigentlich in neutraler Lösung kein thermodynamisch begünstigter Prozess, das Gleichgewicht wird aber durch Ausfallen der praktisch unlöslichen Eisen(III)-oxid-hydroxide gestört,



so dass für die Gesamtreaktion (3) das Gleichgewicht klar auf der rechten Seite liegt.



Reaktion (3) läuft unter oxidierenden Bedingungen in jeder Lösung von Fe^{2+} -Ionen ab, die Bildung von Ferritin-Kernen ist jedoch wesentlich schneller als die einfache Ausfällung von "anorganischem" FeOOH in Abwesenheit von Apoferritin. Das Protein katalysiert zum einen die Oxidation des Fe^{2+} , zum anderen wird höchstwahrscheinlich die Kristallkeimbildung erleichtert durch Fe-bindende anionische Aminosäureseitenketten auf der Innenwand der Proteinhohlkugel.³⁷

Als Ort der Fe^{2+} -Bindung und -Oxidation wurden zunächst die 3-zähligen Kanäle angesehen, die i.d.R. mit hydrophilen Gruppen ausgekleidet sind. Diese Hypothese zerschlug sich, als entdeckt wurde, dass bei den Säugetierferritinen nur die H-Typ-Untereinheiten die Fe^{2+} -Oxidation katalysieren, denn gerade im Bereich der 3-zähligen Kanäle ist die Sequenz von H- und L-Untereinheiten größtenteils konserviert. Bei genauerer Untersuchung der H-Untereinheit wurde ein zentraler hydrophiler Bereich entdeckt, in dem als erste Zwischenstufe bei der Rekonstitution zwei Fe^{3+} -Ionen als μ -Oxo-verbrücktes Dimer gebunden werden. Die Bindung der beiden Eisenatome erfolgt durch ein oder zwei Histidine und mehrere Glutamate, wobei ein Glutamatrest verbrückend bindet. Ähnliche Zwei-Eisen-Zentren finden sich als aktive Zentren in gewissen Oxidoreduktasen, im Ferritin ist der Zweck jedoch nicht die Oxidation irgendeines Substrates, sondern des Eisens selbst (Ferroxidase-Aktivität). Daher ist hier das Fe^{3+} -Dimer weniger stabil als in jenen Oxidoreduktasen, die Fe-Atome dissoziieren relativ leicht ab und machen den Platz für eine erneute Oxidation frei. Höchstwahrscheinlich werden zwei Fe^{2+} in einem Zweielektronenprozess oxidiert, anschließend müssen beide Eisenatome das Ferroxidase-Zentrum verlassen, damit die Reaktion erneut stattfinden kann. Das Oxidationsmittel O_2 wird vermutlich als H_2O_2 abgegeben, in Versuchen mit $^{18}\text{O}_2$ wurde bewiesen, dass es nicht in den neu entstehenden Kern eingebaut wird.³⁸

Die L-Untereinheiten der Wirbeltierferritine sind die einzigen bekannten Ferritinuntereinheiten ohne Ferroxidase-Aktivität, und L-Typ-Homopolymere nehmen *in vitro* praktisch kein Fe^{2+} auf.³⁹

³⁷ Harrison/Arosio 1996, 172.

³⁸ Harrison/Arosio 1996, 174-177. Chasteen/Harrison 1999, 190.

³⁹ Die Kerne von L-Typ-Homopolymere entstehen nur durch die langsame Aufnahme von Fe^{3+} . Menschliches Serum-Ferritin ist ein Beispiel für ein natürliches L-Homopolymer.

Die Aufgabe der L-Untereinheiten in Heteropolymeren ist vermutlich vor allem, die FeOOH-Cluster-Keimbildung und -Kristallisation zu erleichtern. Dazu verfügen sie über eine verglichen mit dem H-Typ größere Anzahl saurer Aminosäureseitenketten auf der ins Innere der Ferritin-Hohlkugel gerichteten Seite. Empirisch findet man bei L-reichen Heteropolymeren größere und regelmäßiger aufgebaute Kerne als bei H-Typ-Homopolymeren.⁴⁰

Ist erst einmal ein kleiner FeOOH-Cluster entstanden, kann Reaktion (3) auch oberflächenkatalysiert an diesem ablaufen. Dieses Clusterwachstum ist schneller als die Katalyse durch das Protein, so dass bei *in-vitro*-Rekonstitutionsexperimenten mit Apoferritin Eisen bevorzugt von Molekülen aufgenommen wird, die schon einen Cluster-Keim gebildet haben, was zu einer alles-oder-nichts-Verteilung des Eisens führt: neben voll beladenem Ferritin findet man übriggebliebenes Apoferritin. Solche Experimente werden jedoch meist mit relativ hohen Fe²⁺-Konzentrationen in Abwesenheit von komplexierenden Agenzien durchgeführt, also unter ziemlich unphysiologischen Bedingungen. In der Zelle liegt die Konzentration an Fe²⁺ bei nur 10⁻⁸ M, und es wimmelt von potentiellen Liganden. Es ist zu vermuten, dass unter diesen Bedingungen, bei denen nur wenig Fe²⁺ das Ferritinmolekül erreicht, auch bei Vorhandensein eines Clusters Fe über den langsameren Weg der Oxidation an einem Ferroxidase-Zentrum eingebaut wird.⁴¹

Ungewiss ist, auf welchem Weg Eisen ins Ferritin und hinaus gelangt. Der kürzeste Weg führt bei H-Untereinheiten durch einen kleinen Kanal im Zentrum der Untereinheit, direkt am Ferroxidase-Zentrum entlang. Die erwähnten dreizähligen Kanäle an den Berührungspunkten der Untereinheiten dienen vielleicht zur Freisetzung, oder als Zugang für die direkte Oxidation an der Kernoberfläche. Ebenso ist nicht klar, ob der Phosphatgehalt des Kerns mit der Funktion des Proteins zu tun hat, es ist allerdings wahrscheinlich, dass dies nicht der Fall ist und der Einbau von Phosphat nur als Nebeneffekt beim Aufbau des Kerns eintritt.⁴²

Völlig ungeklärt ist der Mechanismus der Fe-Freisetzung. *In vitro* löst sich der Kern zwar problemlos unter denselben Bedingungen, unter denen sich auch "anorganisches" FeOOH auflöst, nämlich durch Einwirkung eines Reduktionsmittels in Kombination mit einem Chelatliganden. Unbekannt ist aber, ob die beiden Agenzien dabei in den zentralen Hohlraum des Proteins eindringen, und welche Verbindung *in vivo* das Reduktionsmittel sein könnte. Erwiesen ist, dass Leberzellen Eisen aus dem Ferritin abgestorbener roter Blutzellen durch Abbau der Proteinhülle freimachen, aber der normale Weg der Mobilisierung von Ferritin-gebundenem Fe dürfte das nicht sein.⁴³ Die Reduktion zum Fe²⁺ ist für die Freisetzung nicht unbedingt erforderlich, Fe³⁺ kann von Ferritin sowohl auf andere Ferritinmoleküle als auch auf das Carrier-Protein Transferrin übergehen.⁴⁴

⁴⁰ Harrison/Arosio 1996, 178f.

⁴¹ Harrison/Arosio 1996, 173.

⁴² Harrison/Arosio 1996, 179-181.

⁴³ Harrison/Arosio 1996, 183-185.

⁴⁴ Chasteen/Harrison 1999, 191.

So einheitlich wie der Mechanismus des Fe-Einbaus in Ferritin bei allen Lebewesen ist, so verschieden sind die Regulation der Ferritin-Biosynthese und die Verteilung des Proteins im Organismus.

Die Regulation der bakteriellen Ferritine ist wenig untersucht, die bisherigen Ergebnisse sind uneinheitlich. Wie zu erwarten, findet man Regulation durch das Eisenangebot. Vereinzelt gibt es aber auch Arten, bei denen hohe Fe-Konzentrationen anscheinend überhaupt keinen Einfluss auf die Ferritin-Biosynthese haben. Unterschiedliche Ferritingehalte in Abhängigkeit von der Wachstumsphase einer Kultur weisen darauf hin, dass weitere Regulationsmechanismen existieren.

Bei Pflanzen findet sich Ferritin in den Chloroplasten und Plastiden der Zellen. Regulation erfolgt in Anpassung an das Entwicklungsstadium der Pflanze und an das Eisenangebot, nur letztere ist näher untersucht. Sie findet ausschließlich auf der Ebene der DNA-Transskription statt. Bei niedrigen Fe-Konzentrationen kann die Bildung der Ferritin-mRNA auch durch H_2O_2 stimuliert werden, offenbar reagieren Pflanzen auch auf oxidativen Stress durch vermehrte Ferritinsynthese.

In tierischen Zellen findet sich Ferritin frei im Cytoplasma sowie abgesondert in Lysosomen⁴⁵. Die Körperflüssigkeiten außerhalb von Zellen enthalten bei Säugern nur Spuren von Ferritin, bei vielen Wirbellosen jedoch erhebliche Mengen. Bei der Süßwasserschnecke *Lymnea stagnalis* konnte eine ähnliche Doppel-Regulation wie bei Pflanzen gezeigt werden: das extrazelluläre Ferritin ist gemäß dem Entwicklungsstadium reguliert, das intrazelluläre Ferritin nach der Fe-Konzentration.

Die Regulation durch Eisen gibt es offenbar bei allen Tieren, sie verläuft auf der Ebene der Translation und immer nach dem gleichen Mechanismus. Darüber hinaus wechselt die Biosynthese von Ferritin in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium, Zelldifferenzierung und besonderen Belastungen des Stoffwechsels (z.B. Entzündungen). Die Ergebnisse zu diesen Bereichen ergeben jedoch noch kein einheitliches Bild.⁴⁶

2.2.1.3 In-vitro-Beladung von Ferritin mit künstlichen Clustern

Insbesondere die Arbeitsgruppe von Stephen Mann an der University of Bath ist der Frage nachgegangen, wie spezifisch Ferritin arbeitet und ob sich nicht Nanopartikel von anderen Metallverbindungen in seinen zentralen Hohlraum einbauen lassen⁴⁷. Drei mögliche Wege zu solchen "Heteroferritinen" wurden erprobt:

⁴⁵ Lysosomen: von einer Doppelmembran umgebene Vesikel, die dem intrazellulären Abbau von zellfremden Substanzen oder verbrauchtem/überflüssigem zelleigenen Material dienen.

⁴⁶ Harrison/Arosio 1996, 185-192.

⁴⁷ Dies ist insofern im Zusammenhang dieser Arbeit interessant, als auch für MoSto bereits die Möglichkeit angedacht wurde, *in vitro* oder *in vivo* das Protein mit anderen Metallen als Mo zu beladen, was mit Wolfram *in vivo* bereits gelungen ist.

- a) *In-situ*-Umsetzung des vorhandenen Ferrihydrit-Kerns zu einer neuen Verbindung durch eine Austausch-Reaktion (modifizierter nativer Cluster). Die verwendeten Reagenzien müssen insbesondere in der Lage sein, in den zentralen Hohlraum einzudringen.
- b) Umsetzung von Apoferritin mit leicht oxidierbaren Metallionen, die im Inneren des Moleküls oxidativ gefällt werden, ebenso wie es bei der Rekonstituierung von Apoferritin zu Holoferitin durch Zugabe von Fe^{II}-Salzen geschieht.
- c) Bindung von Metallionen an Apoferritin und anschließende Fällung im zentralen Hohlraum durch Hydrolyse ohne Redoxreaktion.

Alle drei Wege erwiesen sich als gangbar, am effizientesten war Weg a). Bei der Umsetzung von Apoferritin, insbesondere bei der Variante c) ohne Redoxreaktion, ergab sich das Problem, dass die Fällung zum Teil außerhalb des Proteinmoleküls stattfand. Als Nachweis für die Bildung von Clustern im Protein wurde die elektronenmikroskopische Beobachtung von Nanopartikeln einheitlicher Größe angesehen.

2.2.1.3.1 Veränderte native Eisen-Cluster

Die Reaktion von Ferritin mit Na₂S bei pH 8,0 ergab nur sehr unvollständigen Umsatz. Das Produkt enthielt höchstwahrscheinlich Ferrihydrit-Kerne mit einer umgebenden Eisen(II)sulfid-Schicht. Bessere Resultate wurden durch Einleiten von H₂S in eine Ferritinlösung bei pH 8,5 erhalten, aber auch hier zeigten Elektronenbeugungsversuche, dass noch Reste von Ferrihydrit vorhanden waren.⁴⁸

Durch Umsetzung mit Na₂S unter Argon-Atmosphäre bei pH 5,4 konnte der Kern vollständig in amorphes Eisen(III)sulfid umgewandelt werden. Die für Eisensulfide ungewöhnliche Oxidationsstufe wird nicht durch das Protein bewirkt, sondern durch die speziellen Reaktionsbedingungen. Kontrollversuche mit Fe^{III}-Salzen in Abwesenheit von Ferritin ergaben ebenfalls einen Niederschlag von amorphem Eisen(III)sulfid.⁴⁹

Durch vorsichtige elektrochemische Reduktion konnte Ferritin mit Fe^{II} enthaltenden Kernen gewonnen werden.⁵⁰

2.2.1.3.2 Oxidativ hergestellte Metall-Sauerstoff-Cluster

Umsetzung von Apoferritin mit Mangan(II)chlorid bei pH 8,0-9,2 ergab rekonstituiertes Ferritin mit amorphen Mn-haltigen Kernen von der Größe der ursprünglichen Ferrihydrit-Kerne. Die amorphe Natur der Cluster wurde auf die Mitwirkung des Proteins zurückgeführt, da der gleichzeitig anfallende nicht-proteingebundene Niederschlag als eine Mischung kristalliner Mangan(III)oxide identifiziert

⁴⁸ Meldrum & al. 1991.

⁴⁹ Douglas, Trevor; Dickson, Dominic P.E.; Betteridge, Steven; Charnock, John; Garner, C. David; Mann, Stephen: Synthesis and Structure of an Iron(III)Sulfide-Ferritin Bioinorganic Nanocomposite. *Science* 269 (1995) 54-57.

⁵⁰ Chasteen/Harrison 1999, 185.

werden konnte. Abwechselnde Umsetzung mit Mn^{II} -Salzen bei pH 8,5 und Fe^{II} -Salzen bei pH 6,5 ergab aus kristallinem Ferrihydrit und einem amorphen Material gemischte Eisen-Mangan-Oxid-Kerne. Mit anderen oxidierbaren Metallionen waren die Ergebnisse weniger überzeugend. Lediglich Titan(III)- und Chrom(II)-Salze führten zu sehr kleinen, schlecht charakterisierbaren Kernen.⁵¹

2.2.1.3.3 Durch Fällung hergestellte Metall-Sauerstoff-Cluster

Diese Variante konnte nur mit Uranylacetat ($UO_2(CH_3COO)_2$; bei pH 8) erfolgreich durchgeführt werden. Die amorphen Kerne hatten wieder eine mit nativen Ferrihydrit-Kernen vergleichbare Größe, jedoch kam es auch zur Bindung von erheblichen Mengen Uranyl-oxid-hydroxid auf der Außenseite der Proteinmoleküle.⁵²

2.2.2 Andere Eisenspeicherproteine

2.2.2.1 Hämosiderin

Dieses unlösliche Material, das man eigentlich schon nicht mehr als Protein bezeichnen kann, findet sich in Form ungeordneter Haufen aus Fe-haltigen Nanopartikeln und Proteinbruchstücken in tierischen Zellen, insbesondere von Zellen aus Fe-reichen Geweben wie Herz, Leber, Knochenmark etc. Diese Haufen sind meist von Membranen umschlossen, man nimmt daher an, dass es sich um Lysosomen⁵³ handelt, in denen beschädigte Ferritinmoleküle abgebaut wurden, wobei das Eisen nur teilweise wieder mobilisiert wurde und daher Überreste der Ferrihydrit-Kerne zurückblieben. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass Hämosiderin eine schwache Immunreaktion mit Anti-Ferritin-Antikörpern ergibt und dass das Eisen im Hämosiderin ebenfalls Ferrihydrit-Struktur aufweist.⁵⁴

2.2.2.2 Frataxin

Seinen Namen hat dieses Protein dadurch erhalten, dass es zuerst als Produkt eines Gens entdeckt wurde, dessen Defekt die erbliche Friedreich'sche Ataxie verursacht, eine Krankheit, bei der insbesondere die Gewebe von Herz und zentralem Nervensystem irreversibel zerstört werden. Es handelt sich um ein mitochondriales Protein, das aber nicht auf mitochondrialer DNA, sondern im Zellkern-Genom codiert ist. Frataxin besteht aus 48 identischen Untereinheiten, nimmt bis zu 2400 Fe-Atome je Molekül auf und hat eine Gesamtmasse von 840 kg/mol. Zwar existiert auch ein mitochondriales Ferritin, dieses ist jedoch nicht in allen Geweben nachweisbar.

Frataxin wird insbesondere in Geweben mit hohem Sauerstoffumsatz exprimiert, von daher dient die Speicherung vermutlich weniger der Vorratshaltung von Fe als vielmehr dem Schutz vor den

⁵¹ Meldrum & al. 1991.

⁵² Meldrum & al. 1991.

⁵³ siehe Fußnote 45.

⁵⁴ Harrison/Arosio 1996, 182f.

durch Fe vermittelten oxidativen Schäden.⁵⁵ Frataxin-Homologe konnten in einigen Bakterien und den Mitochondrien von den meisten der darauf untersuchten Eukaryoten nachgewiesen werden. Der Kern hat EXAFS-Untersuchungen zufolge wie bei Ferritin eine Ferrihydrit-Struktur.⁵⁶

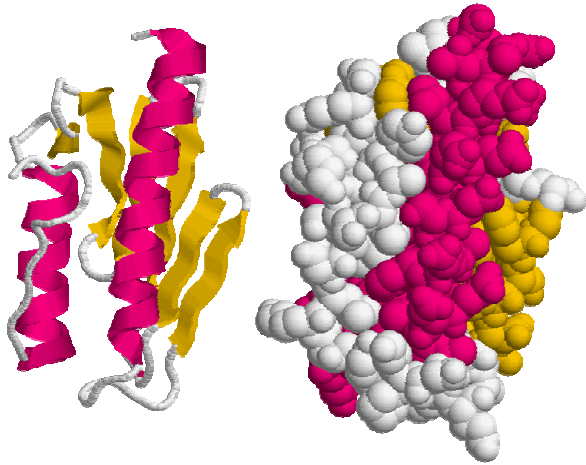


Abbildung 2.1: Untereinheit des menschlichen Frataxins. Bänderdarstellung und raumfüllendes Modell in jeweils gleicher Lage und Färbung. Die Struktur ist, wie ersichtlich, von der in Abschnitt 2.2.1.1 beschriebenen des Ferritins völlig verschieden. Die von der im Vordergrund liegenden langen Helix gebildete Oberfläche ist von anionischen Seitenketten dominiert (insgesamt 12), wie die ins Innere der Hohlkugel gewandte Fläche der Ferritinuntereinheiten.⁵⁷

Ebenso wie Ferritin vermag auch Frataxin

Fe^{2+} für die Speicherung zu Fe^{3+} zu oxidieren. Interessanterweise aggregieren die Untereinheiten erst bei Zugabe von Fe stufenweise zu immer größeren Multimeren bis hin zum 48mer. Ein Apoprotein wie beim Ferritin scheint es nicht zu geben, Fe-freies Frataxin ist bisher nur in Form einzelner Untereinheiten bekannt⁵⁸. Daher ist auch die dreidimensionale Struktur nur am Monomer bestimmt worden.

2.2.3 Speicherung weiterer biologisch relevanter Metalle

2.2.3.1 Vanadium

Die Speicherung von Vanadium gehört zu den rätselhaften ungelösten Fällen der Bioanorganischen Chemie. So sicher wie es feststeht, dass bestimmte Lebewesen V in teils extremem Ausmaß in ihrem Körper anreichern, so mysteriös sind die Gründe dafür. Zwar sind biologische Funktionen für Vanadium bekannt, nämlich in der alternativen V-Nitrogenase bei einigen N_2 -fixierenden Bakterien⁵⁹ (u.a. bei *Azotobacter*) und in den Haloperoxidasen, mit denen gewisse Meeresalgen halogenorganische Verbindungen herstellen⁶⁰. Jedoch ist von keinem dieser Vanadium-abhängigen Organismen

⁵⁵ Gakh & al. 2002.

⁵⁶ Nichol, Helen; Gakh, Oleksandr; O'Neill, Heather A.; Pickering, Ingrid J.; Isaya, Grazia; George; Graham N.: Structure of Frataxin Iron Cores: An X-ray Absorption Spectroscopic Study. *Biochemistry* 42 (2003) 5971-5976.

⁵⁷ Dhe-Paganon, Sirano; Shigeta, Ron; Chi, Young-In; Ristow, Michael; Shoelson, Steven E.: Crystal Structure of Human Frataxin. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 30753–30756. PDB-Eintrag 1EKG. Siehe auch: Musco, Giovanna; Stier, Gunter; Kolmerer, Bernhard; Adinolfi, Salvatore; Martin, Stephen; Frenkiel, Tom; Gibson, Toby; Pastore, Annalisa: Towards a Structural Understanding of Friedreich's Ataxia: The Solution Structure of Frataxin. *Structure* 8 (2000) 695-707.

⁵⁸ Gakh & al. 2002.

⁵⁹ Masepohl & al. 2002.

⁶⁰ Vilter, Hans: Vanadium-Dependent Haloperoxidasen. IN: Sigel, Helmut; Sigel, Astrid (Eds.): *Metal Ions in Biological Systems* Vol. 31: Vanadium and Its Role in Life. New York and Basel 1995. 325-362..

bekannt, dass er das Metall speichere, wobei zumindestens im Falle von *A. vinelandii* auch nach einem Vanadiumspeicher gesucht wurde. Gefunden wurden dabei neben der V-Nitrogenase lediglich zwei V-bindende Proteine, die die Forscher aber aufgrund ihres niedrigen V-Gehaltes nicht als Speicherproteine ansehen mochten⁶¹.

Hingegen ist bei den V-speichernden Organismen keine Verwendung für das Metall erkennbar. Wenn Vanadium eine biochemische Bedeutung hat, kann der Bedarf nur im Ultraspurenbereich liegen, gespeichert werden aber erhebliche Mengen, in Blutzellen von Seescheiden (Aszidien) macht V bis zu 2,7% der Trockenmasse aus. Zudem gehören die V-Speicherer völlig verschiedenen Gattungen an. Da wären zunächst der allbekannte Fliegenpilz *Amanita muscaria* und einige seiner Verwandten⁶². Die anderen V-Speicherer sind Meerestiere, die meisten finden sich unter den Aszidien⁶³ (wobei aber keineswegs alle Aszidien V speichern), daneben gehören dazu noch zwei Arten von Röhrenwürmern⁶⁴.

Gemeinsam scheint allen zu sein, dass sie das Metall als Vanadat(V) aufnehmen und dann zum V^{IV} (*Amanita*-Arten) oder sogar zum V^{III} (Meerestiere) reduzieren. Das reduzierte Metall-Ion wird durch kleine Moleküle komplexiert, bei den Aszidien durch die sogenannten Tunichrome (spezielle Polyphenole), bei *Amanita* in Form des Komplexes Amavadin, dessen extreme Stabilität es unmöglich macht, den Chelatliganden *in vitro* unzerstört abzutrennen. Die Koordination des V erfolgt hauptsächlich durch O-Atome. Eine Bindung durch Proteine konnte zumindest für die Blutzellen der Aszidien ausgeschlossen werden.

2.2.3.2 Kupfer

Obwohl Cu wie Fe ein eminent wichtiges und gleichzeitig potentiell schädliches Metall ist, existiert dafür kein so ausgeprägtes Speichersystem, wie es Ferritin ist. Zum einen stehen die vergleichsweise geringen benötigten Mengen praktisch immer und überall zur Verfügung, zum anderen existiert (jedenfalls bei Säugetieren) anders als bei Fe für Cu ein Mechanismus zur Ausscheidung überschüssigen Metalls. Daher kann die zur Verfügung stehende Menge durch Anpassung von Aufnahme und Ausscheidung geregelt werden. Das gesamte Kupfer im Körper wird mit einer Halbwertszeit von 4,4 Tagen ständig ausgetauscht, jedoch stoppt der Austauschprozess nicht nur insgesamt, sondern schon auf der Ebene der einzelnen Organe sehr schnell bei mangelnder Cu-Zufuhr, so dass es kurzfristig nicht zu größeren Cu-Verlusten kommen kann⁶⁵.

Die Protein-Familie der Thioneine, die sowohl mit der Ausscheidung als auch mit einer gewissen Speicherung von Cu verknüpft ist, ist nicht auf ein Metall spezialisiert und daher weiter unten in einem eigenen Kapitel behandelt.

⁶¹ Blanchard/Hales 1996, 476 und 478.

⁶² Bayer, Ernst: Amavadin, the Vanadium Compound of *Amanitae*. IN: Sigel/Sigel 1995 (wie Anm. 60), 407-421.

⁶³ Smith, Mitchell J.; Ryan, Daniel E.; Nakanishi, Koji; Frank, Patrick; Hodgson, Keith O.: Vanadium in Ascidians and the Chemistry of Tunichromes. IN: Sigel/Sigel 1995 (wie Anm. 60), 423-490.

⁶⁴ Kustin, Kenneth; Robinson, William E.: Vanadium Transport in Animal Systems. IN: Sigel/Sigel 1995 (wie Anm. 60), 511-542.

⁶⁵ Levenson, Cathy W.: Mechanisms of copper conservation in organs. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(suppl) (1998) 978S-981S.

Caeruloplasmin (CP) ist ein Eiweißstoff des Blutplasmas von Wirbeltieren, dem früher (neben anderen Funktionen) auch eine Rolle als Kupfer-Speicherprotein zugeschrieben wurde. Da im Serum normalerweise 90-95% des gesamten Kupfers als CP vorliegen und die Cu-Stoffwechselstörungen Wilson'sche und Menkes'sche Krankheit mit stark vermindertem CP-Spiegel im Plasma einhergehen, war eine solche Annahme plausibel⁶⁶. Nach heutigem Wissensstand spielt CP jedoch zumindestens beim Menschen keine wichtige Rolle im Kupferstoffwechsel. Bei Patienten mit genetisch bedingtem Fehlen von CP ist der Cu-Haushalt anscheinend völlig normal, schwer gestört ist jedoch der Fe-Stoffwechsel, in dem CP als Ferroxidase eine wichtige Rolle spielt⁶⁷.

2.2.3.3 Molybdän

Für das Cyanobakterium *Anabaena variabilis* wurde die Existenz eines Molybdän-Speichers postuliert aufgrund der Beobachtung, dass *A. variabilis* 2—3 Generationen lang unter Stickstofffixierungsbedingungen in Mo-freiem Medium wachsen kann, ohne dass die Vanadium-Nitrogenase exprimiert oder das hoch-affine Mo-Transportsystem aktiviert wird⁶⁸. Zum Vergleich: mit voll beladenem Mo-Speicher kann *A. vinelandii* theoretisch 5 Generationen mit Mo-Nitrogenase im Mo- und N-freien Medium wachsen⁶⁹.

Ein ebenso wie MoSto gegen Ende der 1970er Jahre erstmals beschriebenes mutmaßliches Mo-Speicherprotein aus *Clostridium pasteurianum* soll als Monomer mit einer Molmasse zwischen 47 und 67 kg/mol vorliegen und 6 Atome Mo je Molekül aufnehmen⁷⁰. Offenbar ist es, wiederum ebenso wie MoSto, seitdem nicht weiter untersucht worden⁷¹. Aus der Arbeitsgruppe der MoSto-Entdecker heraus wurde die Vermutung zurückgewiesen, dieses Protein sei ein Mo-Speicher. Wahrscheinlicher sei, dass es sich um ein Protein der FeMoco-Biosynthese handle⁷².

Die häufig als Speicher bezeichneten Proteine vom Mop/ModG-Typ sind unter 2.3.2 behandelt.

2.2.3.4 Multifunktionale Metallreservoir: Thioneine

Metallothionein (MT)⁷³ wurde in den 1950er Jahren entdeckt, als man nach der Rolle des zuvor in verschiedenen tierischen Geweben nachgewiesenen Cadmiums suchte. 1960 wurde ein aus der Nierenrinde von Pferden gewonnenes Cadmiumprotein erstmals genauer beschrieben und aufgrund

⁶⁶ Frieden, Earl: Caeruloplasmin: a multi-functional metalloprotein of vertebrate plasma. IN: (kein Hrsg.) Biological Roles of Copper. Amsterdam 1980, 93-113.

⁶⁷ Hellman, Nathan E.; Gitlin, Jonathan D.: Ceruloplasmin Metabolism and Function. *Annu. Rev. Nutr.* 22 (2002) 439-458, 442. Miyajima, Hiroaki; Takahashi, Yoshitomo; Kono, Satoshi: Aceruloplasminemia, an inherited disorder of iron metabolism. *BioMetals* 16 (2003) 205-213.

⁶⁸ Thiel/Pratte/Zahalak 2002.

⁶⁹ Errechnet nach den Angaben in Pienkos/Brill 1981, 744.

⁷⁰ Elliott/Mortenson 1977. Mortenson/Thorneley 1979. Die einzelnen Veröffentlichungen enthalten wechselnde Angaben über die Molmasse.

⁷¹ Grunden/Shanmugam 1997, 350, erwähnen immer noch nur die Publikation von 1979. Meine eigenen Recherchen ergaben keine späteren Veröffentlichungen zu jenem Protein.

⁷² Shah & al. 1984, 243. Die Zurückweisung fußt auf logischen Argumenten, nicht auf einem experimentellen Gegenbeweis.

⁷³ MT ist der Metall-Protein-Komplex, Thioneine sind die zugehörigen Apoproteine.

seines hohen Metall- und Schwefelgehaltes Metallothionein getauft⁷⁴. Mittlerweile ist eine Vielzahl von ähnlichen, aus den verschiedensten Klassen von Organismen stammenden Proteinen bekannt, die folgende Gemeinsamkeiten haben⁷⁵:

- geringes Molekülmasse: 6-7 kg/mol
- hoher Cysteingehalt, etwa 30% der Aminosäuren, aber keine Disulfidbrücken; keine aromatischen Aminosäuren, kein Histidin
- hohe Konservierung der Cystein-Reste, wiederkehrende CXC- und CXXC-Sequenzmotive
- keine Sekundärstruktur-Elemente; Thionein liegt als random coil vor, die Struktur der Metallothioneine wird vom gebundenen Metall bestimmt.
- hoher Metallgehalt: 7 zweiwertige Metallionen je Proteinmolekül

Nach ihrer Primärstruktur werden Thioneine grob in drei Klassen eingeteilt⁷⁶:

Zur Klasse 1 gehören die "klassischen" Thioneine. Diese sind tierische, vor allem von Wirbeltieren und Krebsen bekannte Proteine mit hoch konservierter Sequenz, 61 AS lang mit 20 Cysteinen.

Klasse 2 enthält alle nur entfernt mit Klasse 1 verwandten Proteine. Diese stammen zum großen Teil von Pflanzen und Prokaryoten.

Klasse 3 enthält völlig untypische pflanzliche und pilzliche Thioneine, die auch Phytochelatine⁷⁷ genannt werden. Sie bestehen im wesentlichen aus 2 bis 11 aufeinanderfolgenden γ -Glutamylcysteinyl-Einheiten, ähneln also dem Glutathion. Wegen der Peptidbindung über die γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure können es keine "echten" ribosomal erzeugten Proteine sein.

Aufgrund ihrer Relevanz für die Humanmedizin sind die Thioneine der Klasse 1 mit Abstand am besten erforscht. Die allgemein formulierten Aussagen in diesem Abschnitt beziehen sich daher nur auf jene.

Im Gegensatz zu anderen Metalloproteinen, die hoch selektiv nur ein ganz bestimmtes Element binden, zeichnen sich die Thioneine gerade durch ihre Flexibilität aus. Sie gelten als Scavenger, die die Aufgabe haben, die verschiedensten Schwermetalle aus dem Cytoplasma abzufangen. In der Natur findet man Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^+ und Hg^{2+} in MT gebunden, wobei in dieser Reihenfolge auch die Affinität zunimmt. Je nach enthaltenem Metall ist jedoch der Umgang des Organismus mit MT völlig unterschiedlich:

Zink-MT verbleibt in der Zelle und dient als Speicherform für das Metall. Der Zn-Thionein-Komplex ist zwar thermodynamisch stabil, aber kinetisch labil. Zn kann von MT direkt über die Bildung intermolekularer Komplexe auf andere Proteine übertragen werden, selbst auf solche, die eine geringere Affinität zu Zn^{2+} haben als Thionein⁷⁸. Die Funktion von Zn-MT ist jedoch noch wesentlich komplexer.

⁷⁴ Nordberg 1998, 244.

⁷⁵ Schmidt 1999, 7.

⁷⁶ Ebenda. Es gibt inzwischen eine neue, wesentlich detailliertere Klassifikation, vorgestellt in: Klaassen, C.D. (Hg.): Metallothionein IV. Basel 1999.

⁷⁷ Zenk, Meinhard H.: Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* 179 (1996) 21-30.

⁷⁸ Afonso, Carlos; Hathout, Yatrib; Fenselau, Catherine: Evidence for zinc ion sharing in metallothionein dimers provided by collision-induced dissociation. *Int. J. Mass Spectrom.* 231 (2004) 207-211, sowie dort zitierte Literatur.

Es kann genauso gut auch Zn aus einem Protein herauslösen und dieses dadurch deaktivieren. Der Prozess kann von der Zelle möglicherweise durch Glutathion (GSH) gesteuert werden. MT besitzt eine Bindestelle für GSH. Bindung von reduziertem GSH erhöht die Affinität für Zn, Bindung der oxidierten Form (GSSG) verringert sie. Obendrein wird die Bindung von GSSG an Metallothionein durch ATP begünstigt. Über diesen komplexen, noch keineswegs verstandenen Mechanismus wirkt Thionein an der Regulation von Zellteilung und –differenzierung mit, bei der Zn-haltige Proteine bekanntermaßen eine bedeutende Rolle spielen⁷⁹.

Kupfer-MT wird so schnell wie möglich aus der Zelle herausgeschleust, zumeist durch Transport in Vakuolen (vorübergehende Speicherung) und spätere Exocytose. Auf diese Weise erfolgen der Rücktransport von überschüssigem Cu zur Leber und letztendlich seine Ausscheidung mit der Galle. Freies Cu ist zu gefährlich, um intrazellulär geduldet zu werden, durch Thionein wird die Konzentration stets $< 10^{-15}$ M gehalten⁸⁰.

Cadmium und Quecksilber, die giftigen Verwandten von Zink, werden sozusagen auf die Sondermülldeponie geschafft: man findet sie als Cd/Hg-MT in der Nierenrinde eingelagert. Von Ausscheidung kann man nicht wirklich sprechen, da z.B. für Cd die Halbwertszeit im menschlichen Körper 10 bis 15 Jahre beträgt. Obwohl gerade das Thionein die Ausscheidung des Schwermetalls behindert, hat diese Situation wohl Vorteile, jedenfalls weisen alle experimentellen Befunde darauf hin, dass der MT-gebundene Anteil des Cd unbedenklich ist und nur freies Cd seine spezifische Giftwirkung entfalten kann. Da Cd gleichzeitig der stärkste Induktor für die Biosynthese von Thionein ist, hat eine ständige Zufuhr kleiner Dosen Cd den paradoxen Effekt, dass die Belastung des Körpers mit Cd zurückgeht. Das ständig auf hohem Niveau exprimierte Thionein säubert die Organe von dem schädlichen Schwermetall und transportiert es zur Niere⁸¹. Aber auch dort steigt die Belastung nicht an. Bei leichten bis mäßig starken Rauchern (< 20 Zigaretten/d) ist der Gesamt-Cd-Gehalt der Nierenrinde zwar deutlich erhöht, der relative und auch absolute Gehalt an freiem, nicht MT-gebundenem Cd aber niedriger als bei Nichtrauchern⁸².

Die unterschiedliche Behandlung der verschiedenen Metallothioneine wird vermutlich durch die strukturelle Flexibilität der Proteinkomponente ermöglicht. Da das Peptid sich vollkommen dem Metall anpasst, ergibt sich von Fall zu Fall eine leicht veränderte Struktur, die eine Unterscheidung der Metallothioneine ermöglicht. Für eine solche Strukturmodifikation durch das gebundene Metall gibt es einen experimentellen Beleg bei einem Cu-MT der Klasse 2 aus gewöhnlicher Hefe und dessen Ag-Analog⁸³. Die Ergebnisse zeigen einen zwar im Groben ähnlichen, aber im Detail deutlich verschiedenen Verlauf der Peptidkette.

⁷⁹ Schmidt 1999, 11f. und 81f.

⁸⁰ Fraústo da Silva /Williams 1991, 396.

⁸¹ Nordberg 1998, 249.

⁸² Heilmäier, Herbert: Untersuchungen zur Analytik, Metallspeicherung und Induktion von Metallothionein. Dissertation München 1985. 69f. und 78.

⁸³ Peterson 2001.

Für zahlreiche Cd-Metallothioneine⁸⁴ der Klasse 1 sind Strukturen ermittelt worden. In allen ist das Protein deutlich in zwei Domänen aufgeteilt. Die 7 Metallionen verteilen sich auf einen vieratomigen Cluster in der N-terminalen α -Domäne und einen dreiatomigen Cluster in der C-terminalen β -Domäne. Die Peptidkette umwindet diese Cluster jeweils auf solche Art, dass jedes Metallatom tetraedrisch von Cystein-Schwefel umgeben ist (Abbildung 2.2).

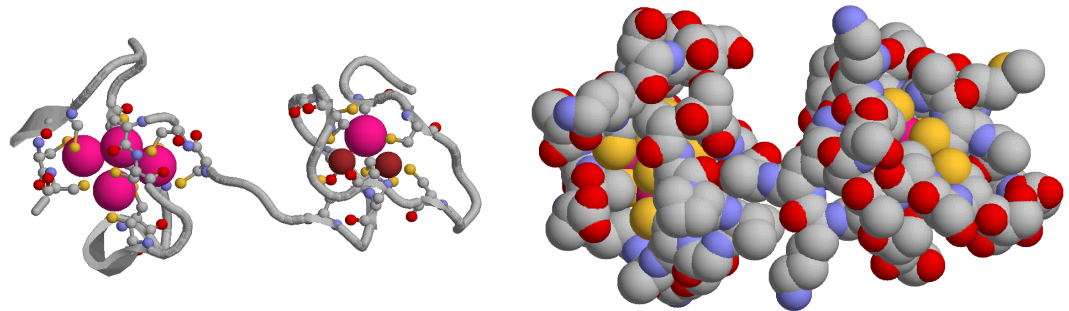


Abbildung 2.2: Metallothionein-2 aus der Leber der Hausratte, PDB-Eintrag 4MT2⁸⁵. Links Metallatome in raumfüllender Darstellung, Cystein als Kugel-Stäbchen-Modell, für den Rest des Proteins ist nur der Verlauf des Peptid-Rückgrates gezeigt. Rechts in gleicher Lage dargestellt als raumfüllendes Modell, das verdeutlicht, wie vollständig das relativ kleine Peptid die Metallionen einschließt. Farben: C grau, N blau, O rot, S gelb, Zn braun, Cd magenta, H nicht dargestellt.

Für Zn und Cu-MT liegen bei der Klasse 1 keine Strukturdaten vor. Das einzige reine Zn-Metallothionein mit bekannter Struktur gehört wie bei das oben erwähnte Cu-MT zur Klasse 2. Es handelt sich um ein MT eines Cyanobacteriums (*Synechococcus* sp.)⁸⁶. Bei Klasse 2-Metallothioneinen gibt es offenbar keine Aufteilung in zwei Domänen. Alle Metallatome gehören einem einzigen Cluster an, den die gesamte Peptidkette umschließt. Der Cluster enthält beim Zn-MT vier, beim Cu- bzw. Ag-MT sieben Metallatome. Da letztere gewisse Ähnlichkeit mit der β -Domäne der Klasse 1 aufweisen⁸⁷, ist es denkbar, dass auch bei der Klasse 1 Cu-MT wesentlich mehr Metallatome enthält als das entsprechende Cadmium-Metallothionein.

Speicherung, Homöostase und Entgiftung der Schwermetall-Ionen Zn^{2+} , Cu^+ , Cd^{2+} und Hg^{2+} dürften die wichtigsten Funktionen der Thioneine sein, was sich auch daran zeigt, dass diese Metalle die stärksten Induktoren für die Thionein-Expression sind. Vermutlich wird Thionein so reguliert, dass es immer gerade eben im Überschuss gegenüber der intrazellulären (und nicht anderweitig proteingebundenen) Menge dieser Metalle vorhanden ist⁸⁸. Jedoch kann die Expression noch durch eine Vielzahl anderer Faktoren bewirkt werden, wie Hormone, sekundäre Botenstoffe, Interferone, oxidativer Stress, ionisierende Strahlung, und nicht zuletzt gibt es auch noch eine schwache konstitutive Bildung,

⁸⁴ Anmerkung: reines Cd-MT gibt es in der Natur nicht, anscheinend enthält Cd-MT immer auch mindestens ein Zn-Atom. Nordberg 1998, 246.

⁸⁵ Braun, W.; Vařak, Milan; Robbins, A.H.; Stout, C.D.; Wagner, G.; Kägi, Jeremias H.R.; Wuthrich, K.: Comparison of the NMR solution structure and the X-ray crystal structure of rat metallothionein-2. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89 (1992) 10124.

⁸⁶ Blindauer, C.A.; Harrison, M.D.; Parkinson, J.A.; Robinson, A.K.; Cavet, J.S.; Robinson, N.J.; Sadler, P.J.: A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 98 (2001) 9593.

⁸⁷ Peterson 2001.

⁸⁸ Fraústo da Silva /Williams 1991, 396.

d.h. Thioneine gehören zu den Substanzen, die im Zellhaushalt einfach immer gebraucht werden⁸⁹. Dementsprechend breit ist auch das Aufgabenspektrum der Thioneine, das bis in die Regulation der Zelldifferenzierung hineinreicht. Über zahlreiche mögliche Funktionen kann bisher nur spekuliert werden. Thionein ist ein interessantes Beispiel dafür, wie vielfältig die Rolle eines scheinbar simplen Metallspeichers sein kann.

2.2.4 Zusammenfassung

Zum leichteren Vergleich sind unten nochmals die Merkmale der verschiedenen biologischen Metallspeichersysteme in Form von Tabellen einander gegenübergestellt. Man möge mir nachsehen, dass ich dabei im Vorgriff auf Kapitel 2.3 und den Ergebnisteil die Mop-Proteine und MoSto mit einbezogen habe.

Tabelle 2.3: Speicherformen von Metallen in Organismen

Metall als:	Bindung	Bindungspartner	System	Element
Metall-Kation	koordinativ	kleiner Chelatligand	Amavadin, Tunichrome	V
		Protein (Cys-S)	Metallothionein	Cu, Zn, Cd, Hg
Oxo-Metallat	H-Brücken	Protein	Mop-Proteine	Mo, (W)
Metall-Oxo-Cluster	elektrostatisch und mechanisch	Protein	Ferritin, Frataxin, MoSto	Fe, Mo
	mechanisch (unlösliches Präzipitat)	Proteinbruchstücke	Hämosiderin	Fe

Tabelle 2.4: Charakteristika verschiedener erwiesener oder mutmaßlicher Metall-Speicherproteine, sortiert nach spezifischer Speicherkapazität (letzte Spalte):

Protein	Enthaltenes Metall-Ion	Aminosäuren je Untereinheit	Untereinheiten je Molekül	Metallatome je Molekül	Aminosäuren je Metallatom
Ferritin (Mensch)	Fe ³⁺	182	24	4500	1
Frataxin (Hefe)	Fe ³⁺	122	48	2400	2,5
Metallothionein, Klasse 2 (Hefe)	Cu ⁺	53	1	7	7,5
MT, Klasse 1 (Hausratte)	Zn ²⁺ , Cd ²⁺	61	1	7	9
MoSto (A.v.)	[Mo _x O _y] ⁿ⁻	269 bzw. 275	8	>90	<24
Mop (<i>S. ovata</i>)	MoO ₄ ²⁻	68	6	8	52
ModG (A.v.)		142	3		

⁸⁹ Schmidt 1999, 9f.

2.3 Molybdoproteine

2.3.1 Systematik der Molybdän-Proteine

Es erscheint mir sinnvoll, zur Systematisierung der Mo enthaltenden Proteine zunächst eine grobe Einteilung nach der Funktion vorzunehmen und die Mo-Enzyme von den anderen Mo-Proteinen zu trennen. Im nächsten Schritt werden dann beide Gruppen jeweils nach der Struktur des Proteins und der Mo-Komponente weiter unterteilt.

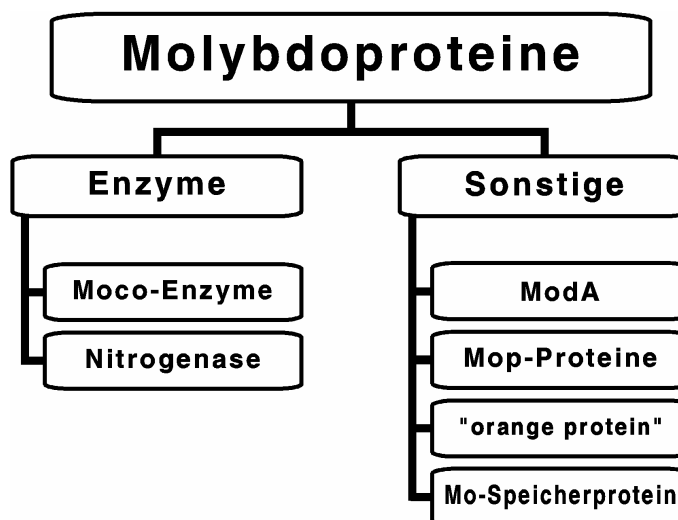
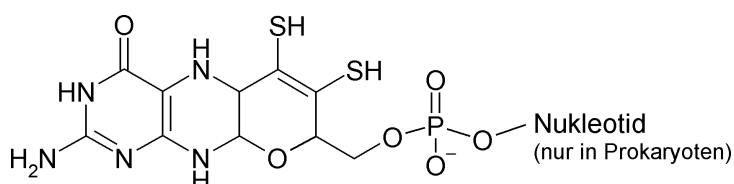


Abbildung 2.3: Übersicht über die bekannten Typen von Mo-haltigen Proteinen.

2.3.1.1 Mo-Enzyme

In allen Mo-Enzymen liegt das Metall wenigstens teilweise durch Schwefel koordiniert vor. Mit Ausnahme der konventionellen Nitrogenase ist das aktive Zentrum



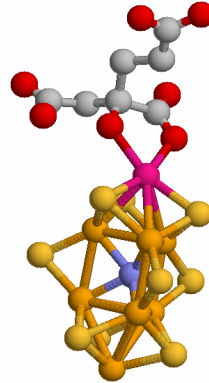
stets ein sogenannter Molybdän-Cofaktor (Moco). Die Bezeichnung ist etwas irreführend, da keineswegs in allen Moco-Enzymen ein und derselbe einheitliche Cofaktor vorliegt. Gemeinsam ist ihnen nur ein spezieller Chelatligand, der durch zwei Schwefelatome ein einzelnes Mo bindet: das Molybdopterin (Abb. nebenstehend). Ansonsten variieren die Zentren stark. Das Mo kann an ein oder auch an zwei Molybdopterin-Moleküle gebunden sein, weitere Liganden können O, OH, S, Serin-O, Cystein-S oder auch Selenocystein-Se sein⁹⁰. In einer vor kurzem charakterisierten CO-Dehydrogenase ist das Pterin-gebundene Mo über "anorganische" S-Atome mit Cu zu einem zweiker-nigen Komplex verbrückt⁹¹. Die Moco-Enzyme werden nach der genauen Struktur ihres Cofaktors in

⁹⁰ Dobbek/Huber 2002.

⁹¹ Gnida 2002, Kapitel 5.

Unterfamilien eingeteilt, die im Einzelnen vorzustellen jedoch hier zu weit führen würde. Die Oxidationsstufe des Metalls ist Mo^{VI} , das während des katalytischen Zyklus vermutlich zeitweilig bis zum Mo^{IV} reduziert wird⁹².

Die Nitrogenase enthält Mo als Bestandteil eines komplexen MoFe_7S_9 -Homocitrat-Clusters (FeMoco), der bislang weder in einem anderen Enzymsystem gefunden worden noch aus irgendeinem anderen Zusammenhang bekannt ist. Die nebenstehende Abbildung zeigt die letzte von ihm mit Röntgenbeugung bestimmte Struktur⁹³, bei der derzeit noch kontrovers diskutiert wird, ob das "leichte Atom" (N oder O) im Zentrum des Clusters tatsächlich dort hingehört oder ein Artefakt ist.



2.3.1.2 Sonstige Mo-Proteine

Nahezu alle anderen Molybdoproteine sind in irgendeiner Weise am Molybdän-Haushalt der Zelle beteiligt und enthalten ausschließlich Sauerstoff-koordiniertes Mo^{VI} . Für den ersten Schritt bei dieser Mo-Logistik ist das periplasmatische⁹⁴ Molybdat-bindende Protein ModA des Mo-spezifischen ABC-Transporters zuständig. Dieses Protein fängt sehr selektiv das Molybdat aus dem Medium heraus und gibt es an dem aus ModB und ModC bestehenden Transportkanal wieder ab. ModA ist verwandt mit seinen Homologen, den periplasmatischen Bindeproteinen anderer ABC-Transporter, z.B. für Sulfat⁹⁵, und unterscheidet sich somit von den übrigen Molybdat-bindenden Proteinen, den sog. Mop-Proteinen oder Molbindinen (s.u.). Zu Verwirrung führt oft, dass das Mo-abhängige Regulator-Protein ModE (ein Mop-Protein) aus *A. vinelandii* manchmal ebenfalls als ModA bezeichnet wird. Ursache hierfür ist die Anordnung der Gene auf dem *mod*-Operon bei *A.v.* (Abbildung 2.4). Die Reihenfolge nach Funktion der Genprodukte ist *modEABC*. Aus der Zeit, bevor die Genprodukte hinreichend charakterisiert waren, stammt die Benennung der Reihe nach (*modABCD*), die auch heute noch gelegentlich benutzt wird. Ich verwende in dieser Arbeit ausschließlich die Benennung nach der Funktion der Proteine.

Alle anderen bisher charakterisierten, Mo als Oxo-Anion bindenden Proteine gehören zur Familie der Mop-Proteine, die im Abschnitt 2.3.2 ausführlich vorgestellt wird.

Ein Sonderfall ist das "orangefarbene Protein" (ORP) aus *Desulfovibrio gigas*⁹⁶, zu dem, seiner

⁹² Hille 2002, 211-218.

⁹³ Einsle, Oliver; Tezcan, F. Akif; Andrade, Susana L.A.; Schmid, Benedikt; Yoshida, Mika; Howard, James B.; Rees, Douglas C.: The Nitrogenase MoFe-Protein at 1.16 Å Resolution: A Central Ligand In The FeMo-Cofactor. *Science* 297 (2002) 1696-1700.

Das nicht identifizierte leichte Atom ist blau dargestellt, C grau, O rot, S gelb, Fe braun, Mo magenta.

⁹⁴ Bei gram-negativen Bakterien. Das analoge Protein bei gram-positiven Organismen ist durch einen hydrophoben Oberflächenbereich an die Außenseite der Zellmembran gebunden. Pau/Lawson 2002, 42.

⁹⁵ Lawson & al. 1997, 3981.

⁹⁶ George, Graham N.; Pickering, Ingrid J.; Yu, Eileen Y.; Prince, Roger C.; Bursakov, Sergey A.; Gavel, Olga Yu.; Moura, Isabel; Moura, Jose J.G.: A Novel Protein-Bound Copper-Molybdenum Cluster. *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 8321-8322. Bursakov, Sergey A.; Gavel, Olga Yu.; Di Rocco, G.; Lampreia, J.; Calvete, J.; Pereira, A.S.; Moura, Jose J.G.; Moura, Isabel: Antagonists Mo and Cu in a heterometallic cluster present on a novel protein (orange protein) isolated from *Desulfovibrio gigas*. *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 833-840.

Aminosäuresequenz zu Folge, vermutlich mehrere Analoga in hyperthermophilen Bakterien und Archaea existieren. Aufgrund der Ergebnisse von Elementaranalysen (Mo und Cu im Verhältnis 2:1, keine weiteren Metalle, kein Phosphat), ESR- und XAS-Untersuchungen wurde postuliert, dass es einen $[S_2Mo^VI S_2Cu^I S_2Mo^VI S_2]^{3-}$ -Cluster enthält⁹⁷. Da in der AS-Sequenz kein Cystein vorkommt, müssen die S-Atome des Clusters ausschließlich "anorganischer" Schwefel sein. Über die Funktion von ORP weiß man bisher nichts. Die geringe Größe (117 AS Länge, Molmasse 11,8 kg/mol) macht es wenig wahrscheinlich, dass es sich um ein Enzym handelt.

2.3.2 Molybdat-bindende Proteine: Mop-Proteine

In der unbelebten Natur liegt in Wasser gelöstes Mo als ausschließlich Sauerstoff-koordiniertes Mo^{VI} vor, also als Molybdat. In der belebten Natur sind viele der bisher charakterisierten Proteine, die Mo in dieser Form enthalten, strukturell eng miteinander verwandt. Sie bilden die Familie der Mop-Proteine, von der bisher vier Grundtypen bekannt sind. Da die Vermutung nahe liegt, dass MoSto ebenfalls dazu gehören könnte, muss diese Protein-Familie hier etwas ausführlicher vorgestellt werden.

Als das erste Protein dieser Familie isoliert und beschrieben wurde, vermutete man aufgrund spektroskopischer Daten, dass es eine Vorstufe des Moco enthalte und folglich an dessen Biosynthese beteiligt sei⁹⁸. Dies hat sich längst als Irrtum erwiesen, aber das Protein und alle seine Verwandten tragen seitdem die Bezeichnung "Mop" als Kürzel für Molybdopterin, welches sie gar nicht enthalten.

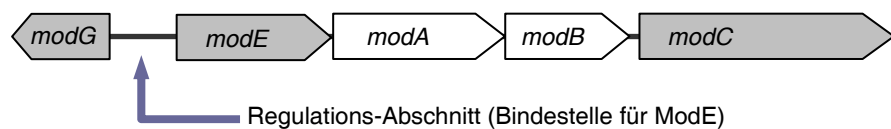


Abbildung 2.4: Aufbau und Nomenklatur des mod-Operons im Genom von *A. vinelandii*. Die Gene der Mop-Proteine sind grau eingefärbt.

2.3.2.1 Funktionen der Mop-Proteine

Mop-Proteine sind ausschließlich aus Prokaryoten bekannt. Wie schon erwähnt, sind sie für die Molybdän-Logistik in der Zelle zuständig. Darunter fallen vor allem drei Aufgaben.

2.3.2.1.1 Transport in die Zelle: ModC

Wie in der Einleitung schon beschrieben, nimmt *A. vinelandii* bei sehr niedriger Molybdat-Konzentration das MoO_4^{2-} über einen hoch-affinen Transportmechanismus des sogenannten ABC-Typs auf.

⁹⁷ Cluster dieser Art sind aus der anorganischen Chemie von Mo und W seit langem bekannt. Siehe: Müller, Achim; Diemann, Ekkehard; Jostes, Rainer; Bögge, Hartmut: Thioanionen der Übergangsmetalle: Eigenschaften und Bedeutung für Komplexchemie und Bioanorganische Chemie. *Angew. Chem.* 93 (1981) 957-977.

⁹⁸ Hinton, Stephen M.; Merritt, Brenda: Purification and Characterization of a Molybdenum-Pterin-Binding Protein (Mop) in *Clostridium pasteurianum* W5. *J. Bacteriol.* 168 (1986) 688-693.

Die Abkürzung steht für ATP-binding cassette und verdeutlicht zudem, dass der Transporter aus drei Proteinen besteht. Das oben (2.3.1.2) bereits beschriebene ModA ist von seiner Struktur her nicht mit den Mop-Proteinen verwandt, ebensowenig wie ModB, ein integrales Membranprotein, das den eigentlichen Kanal in die Zelle bildet. ModC ist ein intrazellulär membrangebundenes Mop-Protein und gleichzeitig eine ATPase, die die Energie für den aktiven Transport liefert. Anhand ihrer Genome konnten bisher über 20 Bakterien und Archaea gefunden werden, die höchstwahrscheinlich über ein analoges Mo-Transportsystem verfügen⁹⁹. Dagegen ist bei Eukaryoten noch kein Mo-spezifischer Re-sorptionsmechanismus nachgewiesen worden.

2.3.2.1.2 Regulation der intrazellulären Molybdatkonzentration: Mop und ModG

Diese Proteine haben anscheinend keine andere Funktion als die Bindung von Molybdat und werden dementsprechend auch Molbindine¹⁰⁰ genannt. Sie enthalten im nativen Zustand jeweils sechs Mop-Domänen und binden jeweils bis zu acht Molybdat-Ionen. Oft werden sie auch als Mo-Speichersysteme bezeichnet, meiner Ansicht nach (siehe 2.2) sollte hier eher von einer Pufferfunktion dieser Proteine gesprochen werden. Die Aufnahme bzw. Freisetzung des Molybdats hängt lediglich von seiner Konzentration in der Umgebung ab, die Molbindine sind also geeignet, eine bestimmte Molybdatkonzentration im Cytoplasma annähernd konstant zu halten. Unklar ist, ob die Molbindine noch weitere Funktionen erfüllen. Darauf könnte z.B. hindeuten, dass *Clostridium pasteurianum* über drei verschiedene Molbindine verfügt (Mop1-3), oder dass das entsprechende Protein in *A. vinelandii* (ModG) durch ein Gen codiert wird, das dem *modEABC*-Operon gegenüberliegt und mit diesem gemeinsam reguliert, d.h. bei sinkender intrazellulärer Molybdatkonzentration exprimiert wird¹⁰¹. Es macht offensichtlich keinen Sinn, bei ohnehin niedrigem Molybdatpegel ein Protein bereitzustellen, das ausschließlich zum Abpuffern hoher Konzentrationen dient.

Bei *Eubacterium acidaminophilum* wurde ein Mop gefunden, das eine analoge Funktion im Zusammenhang mit Wolframat erfüllt. Zwar bindet dieses "Wolbindin" *in vitro* auch Molybdat, da *E. acidaminophilum* jedoch selektiv nur Wolframat aus seinem Medium aufnimmt und nicht über Molybdoenzyme, sondern ausschließlich über deren Wolframanaloga verfügt, dürfte auch sein Mop *in vivo* nur Wolframat enthalten¹⁰².

2.3.2.1.3 Regulation Mo-relevanter Gene: ModE

Der Transkriptions-Regulator ModE ist der Sensor für die intrazelluläre Molybdatkonzentration und regelt die Biosynthese der Proteine des ModABC-Transporters ebenso wie die der Mo-abhängigen Enzyme. Überraschenderweise konnte bisher, verglichen mit dem ModABC-Transporter, ModE nur

⁹⁹ Self, William T.; Grunden, Amy M.; Hasona, Adnan; Shanmugam, Keelnatham T.: Molybdate transport. *Res. Microbiol.* 152 (2001) 311-321.

¹⁰⁰ Die Terminologie ist allerdings nicht vereinheitlicht, oft wird "Molbindin" auch synonym mit "Mop-Protein" gebraucht.

¹⁰¹ Delarbre, Laure; Stevenson, Clare E.M.; White, Daniel J.; Mitchenall, Lesley A.; Pau, Richard N.; Lawson, David 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 (2001) 1063-1079, 1064. Siehe auch Abbildung 2.4.

¹⁰² Makdessi &al. 2004.

in relativ wenigen Bakterien gefunden werden. *E. coli*, *H. influenzae* und *A. vinelandii* verfügen über ModE. *R. capsulatus* besitzt sogar zwei entsprechende Proteine leicht unterschiedlicher Funktion, traditionell als MopA und MopB, neuerdings auch der Funktion entsprechend als ModE1 und ModE2 bezeichnet.

Bei ausreichender Molybdatkonzentration unterdrückt ModE die Biosynthese des ModABC-Transporters und in *A.v.* und *R.c.* (ModE1) auch seine eigene. In *Rhodobacter* wird zudem die alternative Nitrogenase durch beide ModE reprimiert. Gleichzeitig stimuliert ModE die Expression der Gene für verschiedene Moco-Enzyme sowie für die Proteine der Moco-Biosynthese, anscheinend jedoch nicht für die Proteinkomponenten der Molybdän-Nitrogenase.¹⁰³

2.3.2.2 Struktur der Mop-Proteine

Das gemeinsame Strukturelement der Mop-Proteine ist ein knapp 70 Aminosäuren langes, etwa 7 kg/mol schweres Polypeptid mit stark konservierter Sequenz (Tabelle 2.5), die Mop-Domäne. Im einfachsten Fall, bei den Mop-Molbindinen, besteht das Genprodukt nur aus einem einzigen solchen Polypeptid. Bei ModG und bei ModE sind im Genom zwei unmittelbar aufeinander folgende Mop-Einheiten codiert, eine Dimop-Domäne. ModE und ModC enthalten an die Mop-Einheiten angesetzte Abschnitte für ihre mit der Molybdät-Bindung verknüpften zusätzlichen Funktionen (Abbildung 2.5).

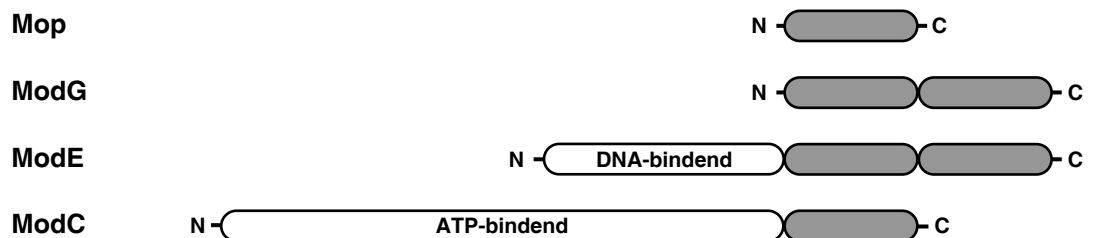


Abbildung 2.5: Aufbau der AS-Sequenzen der Molbindine. Die Mop-Domänen sind grau dargestellt.¹⁰⁴

Die räumliche Struktur ist mittlerweile durch Röntgenstrukturbestimmung am ModE aus *E. coli*, an ModG, an Mop aus *S. ovata* und an Mop2 aus *C. pasteurianum* bekannt. Das Mop-Polypeptid ergibt gefaltet ein annähernd globuläres Protein. Dabei muss zur korrekten Faltung allerdings ein kurzer Abschnitt vom C-Terminus eines zweiten Peptids einbezogen werden, so dass sich immer Mop-Dimere mit zweizähliger Symmetrie bilden. Jeweils drei Dimere lagern sich zu einem vollständigen Mop zusammen, welches also ein Hexamer darstellt, dessen Untereinheiten annähernd auf den Ecken eines trigonalen Antiprismas liegen (C_{3i} -Symmetrie, Abbildung 2.6). ModG unterscheidet sich davon nur durch die kovalente Verknüpfung von je zwei Mop-Domänen zu einer Dimop-Einheit, das fertige Protein ist ein Trimer (Symmetrieverringung auf C_3).

¹⁰³ Pau/Lawson 2002, 57-60.

¹⁰⁴ nach: Pau/Lawson 2002, 50.

Isolierte Mop-Untereinheiten binden kein Molybdat, da alle Molybdat-Bindungsstellen auf Grenzflächen zwischen Untereinheiten liegen. Dabei ergeben sich zwei Typen von Bindungsstellen. Je Molekül liegen zwei Bindestellen vom Typ 1 auf der dreizähligen Achse des Moleküls. Sechs Typ 2-Bindungsstellen liegen paarweise auf der Kontaktfläche von zwei benachbarten Untereinheiten. Insgesamt nimmt ein Molekül Mop also maximal acht Molybdat-Ionen auf.

Tabelle 2.5.: Vergleich von 23 Sequenzen aus 15 Mop-Proteinen¹⁰⁵ und die daraus ableitbare 64 Aminosäuren lange Konsenz-Sequenz der Mop-Domäne.

Großbuchstabe: Übereinstimmung in mindestens 19 der 23 Sequenzen¹⁰⁶. Kleinbuchstabe: Übereinstimmung in mindestens 15 der 23 Sequenzen. Sowohl das Auftreten identischer (schwarz unterlegt) als auch das funktionell analoger (grau unterlegt) Aminosäuren ist als Übereinstimmung gewertet. Im letzteren Fall ist die häufigste Aminosäure in der Konsenz-Sequenz angegeben, die alternativen Aminosäuren sind, nach abnehmender Häufigkeit geordnet, darunter aufgeführt.

Kürzel der Bakterien-Spezies: E.c., *Escherichia coli*; H.i., *Haemophilus influenzae*; C.p., *Clostridium pasteurianum*; S.o., *Sporomusa ovata*; Ana., *Anabaena sp.*; R.l., *Rhizobium loti*; E.a., *Eubacterium acidaminophilum*.

ModE(1)	E.c.	QTSARNQWF GT ITARDHDDV Q QHV D VLLADGKTRIKVAITTAQSGARIGTDEGKEVLILLKAPWY CH TQ
ModE(1)	H.i.	QSSARNQFFGRVAQQRIDSRVVDVNVQGLPTPLQVSIITTKSSARKIITEKEVMLMFKAPWYKISE
ModE(1)	A.v.	KTSARNQFACIVTGLRVGGVDYEVRI RD -AENEIAAVITKSAENLELAIGKEVFALVKSSSVMLTTEPS
ModE(2)		KL T ARNQ L WGEVIDIHECPV N NEVTTALP- S CRSVTCVVTAD S CKALGTA P GVAACAFKSSSVILAVYG
ModE1(1)	R.c.	RTSNRNIT R CTVTRVTLGAVNAEVEITAIT-DGHSITAVITERSATEMGTAPGVEVFALIKASFVMLAAG
ModE1(2)		RISACNRI T GI V AARTDGPV N TEIILDIG-NCKSI T AVITHTSADALGTA P GVPATALFKASHVILAMP
ModE2(1)		RTSARNWACKVWSVAADDVAAQVRMRIG-EGODITAVITARSAAEMRI A PGSEVIALVKS N FVLLAG
ModE2(2)		RLSVRNVRGRVIERIDAPLSSEVITD I G-GCKTITATITRDSAE M TDIHEGCVET T ALIKSSHVILALP
Mop1	C.p.	MSISARNQ L KCKV G LKKCVITAEV V LEIA-GGNKITSITSLDSVEELGVKECAELTAVIKSTDV M ILA
Mop2		MSISARNQ L KCKV G LKKCVITAEV V LEIA-GGNKITSITSLDSVEELGVKECAELTAVIKSTDV M ILA
Mop3		MSISARNQ L KCKV V AVKGLV T AEV V LEIA-GGDKVTSITSLDSIEDLGVKEGTELTA V IKSTDV M ILA
Mop	S.o.	MKISGRN L KEATKEIVK G TVMAKIVDMYK--GTELVAAITIDSVADL D LVPGDKVTALVKATEMEVLK
Mop	H.i.	MKISARNQ L KCKV S TE N GSVNAIVHIDIG-GGNVLSSTVSLA V KEINLEEVGKEAYALIKATSVMVGVE
Mop	Ana.	MEVSARNQ L KTTIVK V VPGT V NTEV T LEIA-PGVEIVSITTKSSADKIQ T AE G KQAYALIKSSDV I VAVD
Mop	R.l.	MKISARNV L KGTIT E IVK C ATTSHVRIDIG-GCAIVTASITNEAVADL K FEK G KQAYAVVKASDVMVGID
Mop	E.a.	MKLSARNQ L KCKV E IQE G VVSARKV I EIC-EGNRISSTISMDALRDI G IKV G DEATAV I KATSVMVMVP
ModG(1)	A.v.	MKISARNV F KGTIV S ALKEGAVNAEVDI L IG-GGDKIAAVV T LESARSLQ T AAGKEVVAVVKAPV L MLTDS
ModG(2)		RLSARN L IGTIVK T ETCAVNAEVT L ALQ-GGTEITSMV T KEVAELGLK F GASASAVIKASNV L IGVPA
ModC	E.c.	QTSIRNVLRAKV--VNSYDDNGQVEVELEVGCKT W ARTIS P WARDELAIK F GLWLYAQ L KS--VS H TA
ModC	A.v.	DSSIT N VIPATVREVV E ADTPAHV L VRTEAEGTPIIARITRRSCDQ L GIA P GRRMWAQ L KA--VALLG
ModC ¹⁰⁷	R.c.	DTTILN A PAVI-LGAEAAEGYQITV R AL*GAS L ARVSRK S FDLLGFQ F GEQV V ARLKA--MAISAPA
ModE(2)	E.c.	AQNADN O PGIISH E RCAEQCEV L MAP-DGOTICATVPVNEAT--S L QQGONV T YFNADSV I ATLC
ModE(2)	H.i.	LANQPNQ F PNVNIKSLNEE----EAITQ F FAESNIEFCATVHQP N QW--QIEQ--QVWI H IQEQIILATLG
Mehrheit		KISARNQLKGTVVAIKKGA V NAE V VLELA-GGKLT A ITLDSV A ELGLK F PGKEVTAVIKASDVMILV
Konsens		SarN-l-g-V--i--g-v---V-L-L---g--L---IT--s---L-L--G----A- I K---V-I
		T I l i I V I I VS I V I L
		v I V V V L V

¹⁰⁵ Sequenzen und Alignment nach Gourley & al. 2001, 20645, und Schüttelkopf & al. 2002, 15015. Für *R. capsulatus* Sequenz nach Wang/Angermüller/Klipp 1993, 3037; ModE1 und E2 sind dort als MopA und B bezeichnet. Für *E. acidaminophilum* Sequenz nach Makdessi & al. 2004. Aufgrund der jeweils zwei Mop-Domänen (mit (1) und (2) gekennzeichnet) in ModE und ModG ist die Zahl der Sequenzen größer als die der Proteine.

¹⁰⁶ Dies kann ggf. als 100 %-ige Übereinstimmung gelten, weil die zweite Mop-Domäne des ModE keine Molybdat-bindende Funktion ausübt. Zwei stark abweichende Sequenzen solcher "nichtbindender" Domänen sind daher nicht unmittelbar nach der jeweils ersten Domäne angegeben, sondern in der Tabelle unten angefügt.

¹⁰⁷ In dieser Sequenz sind an der durch * markierten Stelle fünf Aminosäuren (GASGE) ausgelassen.

Alle Röntgenstrukturbestimmungen und EXAFS-Untersuchungen an Mop-Proteinen besagen übereinstimmend, dass in diesen Proteinen tetraedrische Molybdat-Anionen vorliegen, wie in neutralen Lösungen oder einfachen Salzen. Die Bindung und deren teils erstaunliche Spezifität erfordern also keine Änderung der Geometrie oder der Koordinationszahl des Mo. Die Bindung des Anions erfolgt über Wasserstoffbrücken, ausgebildet vor allem von den NH-Gruppen des Peptid-Rückgrates¹⁰⁸.

ModE liegt im Gegensatz zu Mop und ModG als Dimer vor, der Molybdat-bindende Teil des Moleküls entspricht einem ModG, in dem eine der Dimop-Untereinheiten fehlt. Dadurch enthält ModE keine Typ 1-Bindungsstelle und nur noch zwei vom Typ 2. Eine der beiden Mop-Domänen im Dimop wird dadurch zur Molybdat-Bindung nicht mehr gebraucht, die Aminosäuresequenz dieser Domäne 2 weicht daher oft stark von der einer funktionierenden Mop-Domäne ab (Tabelle 2.5). Um überhaupt eine Molybdat-Bindung möglich zu machen, ist die Anordnung der Dimop-Untereinheiten gegenüber dem ModG umgedreht, so dass die beiden aktiven Domänen 1 zusammenkommen (Abbildung 2.6).

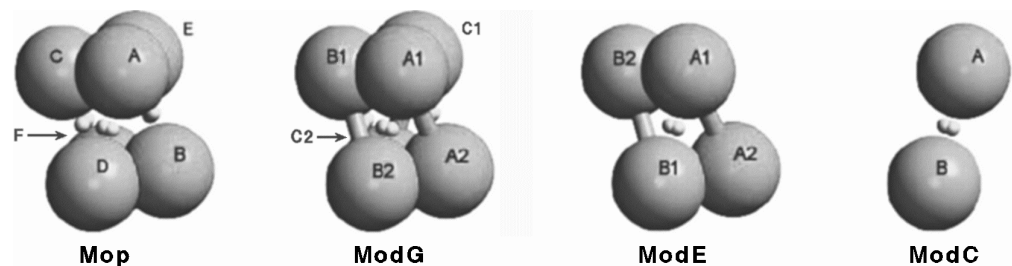


Abbildung 2.6: Räumliche Anordnung der Mop-Domänen in verschiedenen Mop-Proteinen. Mop-Domänen sind durch große, Molybdat-Ionen durch kleine Kugeln dargestellt. Buchstaben bezeichnen (jeweils identische) Untereinheiten, Zahlen (unterschiedliche) Domänen innerhalb einer Untereinheit. Die auf der dreizähligen Achse von Mop und ModG gebundenen Molybdat-Ionen sind aufgrund der Darstellungsweise nicht sichtbar, die ATP- bzw. DNA-bindenden Domänen von ModC und ModE der Übersichtlichkeit halber weggelassen.¹⁰⁹

ModC bildet ebenfalls ein Dimer und verfügt je Untereinheit nur noch über eine Mop-Domäne. Da aber, wie oben erläutert, eine Mop-Domäne nur als Dimer korrekt gefaltet werden kann und nur als Dimer von Dimeren zur Molybdat-Bindung fähig ist, muss die Struktur der Domänen im ModC irgendwie abgewandelt sein¹¹⁰, was auch die abweichende Aminosäuresequenz erklären würde. Abbildung 2.6 zeigt eine hypothetische, den anderen Mop-Proteinen analoge Anordnung. Röntgenstrukturdaten zu ModC liegen bisher nicht vor.

¹⁰⁸ Pau/Lawson 2002, 49-55.

¹⁰⁹ Abbildung modifiziert aus: Gourley & al. 2001.

¹¹⁰ Pau/Lawson 2002, 64f.

2.4 Polyanionen des Molybdäns und Wolframs ¹¹¹

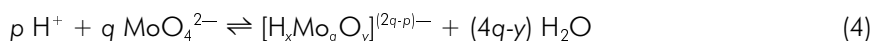
2.4.1 Isopolymolybdate

2.4.1.1 Allgemeines

Bei zahlreichen Metallen aggregieren die Ionen in wässriger Lösung pH-abhängig zu verschiedenen polymeren Kat- bzw. Anionen, ein Vorgang, der i.d.R. bei ausreichend hohem bzw. niedrigem pH mit dem Ausfallen des entsprechenden "basischen" Hydroxids bzw. "sauren" Oxids endet. Beim Molybdat wird die Bildung von Polyanionen (Mo-O-Clustern) begünstigt durch: 1. niedrigen pH; 2. hohe Molybdatkonzentration; 3. niedrige Temperatur; 4. Anwesenheit bestimmter anderer Ionen¹¹²; 5. reduzierende Bedingungen. Letzteres führt zur Bildung von gemischten Mo^V/Mo^{VI}-Polyanionen, auf die hier nicht eingegangen werden soll, da gemischte Oxidationsstufen für das Mo im MoSto ausgeschlossen werden können (siehe Abschnitt 3.4.2).

Im System Molybdat-Wasser stellen sich alle Gleichgewichte mit fast unmessbar hoher Geschwindigkeit ein. Das erschwert die Charakterisierung der in dem System auftretenden Polyanionen. Daher sind nur solche Polyanionen wirklich strukturell charakterisiert, die auch in kristalliner Form auftreten. Dies wiederum behindert auch thermodynamische Untersuchungen, die durch die schnelle Gleichgewichtseinstellung erleichtert werden würden, wenn man nur genau sagen könnte, welche Spezies in Lösung miteinander im Gleichgewicht stehen.

Es hat sich eingebürgert, in der Chemie der Polymolybdate (und analog auch anderer Iso-Polyoxometallate) die einzelnen Spezies durch ein Zahlenpaar (p, q) zu bezeichnen, das angibt, wie viele Protonen und MoO₄²⁻-Ionen bei ihrer Bildung verbraucht werden.



Wenn Formel und Ladung des Ions bekannt sind, lassen sich p und q leicht errechnen. Der Quotient $Z = p/q$ ist der sogenannte Säuregrad des Polyanions, der nicht verwechselt werden darf mit dem Molverhältnis Säure/Molybdat, das zur Herstellung des Polyanions eingesetzt wurde (dem experimentellen Säuregrad).

Während im Molybdat-Monomer (wie beim Sulfat) das Zentralatom tetraedisch von Sauerstoffatomen umgeben ist, basieren die Polymolybdate auf MoO₆-Oktaedern, die über gemeinsame Ecken bzw. Kanten verknüpft sind. Bevorzugt entstehen dabei Strukturen, in denen die nicht-verknüpfenden Sauerstoffatome einander benachbart sind (freie Oktaeder-Kanten).

¹¹¹ Eine diesem Kapitel entsprechende Darstellung für das Vanadium gibt: Rehder, Dieter: Inorganic Considerations on the Function of Vanadium in Biological Systems. IN: Sigel/Sigel 1995 (wie Fußnote 60), 1-43.

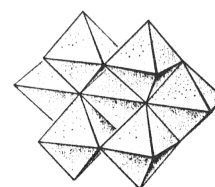
¹¹² Z.B. bilden sich in Gegenwart von ClO₄⁻ leichter Polymolybdate als in Gegenwart einer gleich hohen Konzentration von Cl⁻, siehe Abschnitt 2.4.1.3.

2.4.1.2 Strukturell charakterisierte Cluster

Pope hat die insgesamt 17 seinerzeit bekannten Isopolymolybdat(VI)-Strukturen zusammengestellt¹¹³. Diese Liste enthält jedoch zahlreiche Cluster, die nur aus nichtwässrigen Lösemitteln hergestellt werden konnten und daher für eine biochemische Fragestellung wohl ohne Belang sind, sowie hochpolymere Strukturen, die ebenfalls für einen proteingebundenen Cluster nicht in Frage kommen. Es bleiben nur fünf aus wässriger Lösung isolierbare diskrete Spezies: monomeres Molybdat und vier Isopolymolybdate, die in Tabelle 2.6 grau unterlegt sind.

2.4.1.2.1 Heptamolybdat¹¹⁴

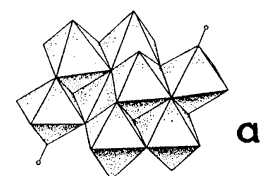
Ohne irgendeine nachweisbare Zwischenstufe entsteht beim Ansäuern von Molybdatlösungen als erstes dieses durch das Zahlenpaar¹¹⁵ (8, 7) charakterisierte Polyanion, das aus zahlreichen Salzen in fester Form bekannt ist. Da beim Molybdat-Heptamolybdat-Gleichgewicht keine parallel liegenden Gleichgewichte stören, gibt es für diesen Übergang am ehesten vertrauenswürdige thermodynamische Daten.



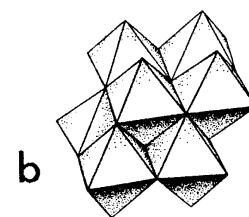
2.4.1.2.2 Oktamolybdat

Der nächste charakterisierte Cluster ist nicht viel größer, sondern vor allem kompakter als das Heptamolybdat. Vom Oktamolybdat sind aus Salzen drei Formen bekannt, von denen zwei isomer zueinander sind.

Die erste Form ist die Spezies (10, 8) ($[\text{Mo}_8\text{O}_{26}(\text{OH})_2]^{6-}$, Abbildung "a", die Lage der Hydroxogruppen ist durch die "Antennen" markiert)), deren Existenz in Lösung mit den Ergebnissen von ¹⁷O-NMR, Röntgenstreuung und elektrochemischen Messungen im Einklang ist¹¹⁶. In fester Form konnte sie als Isopropylammoniumsalz erhalten werden¹¹⁷.



Wesentlich mehr Salze kennt man vom β -Oktamolybdat (Abbildung "b"), der Spezies (12, 8). Die isomere Form α -Oktamolybdat ist nur aus nichtwässrigen Lösemitteln erhältlich und wird daher hier nicht behandelt¹¹⁸.



¹¹³ Pope 1991, 211. Diesem Review von M.T. Pope sind auch in diesem Abschnitt gezeigten Struktur-Abbildungen entnommen, nur die Abbildung von "Mo₃₆" wurde von mir erstellt. Strukturdaten von "Mo₃₆": persönliche Mitteilung von Marc Schmidtmann, Ak Anorganische Chemie 1 der Universität Bielefeld.

¹¹⁴ Pope 1991, 212f.

¹¹⁵ Siehe Tabelle 2.6 und den Text zu Gleichung (4).

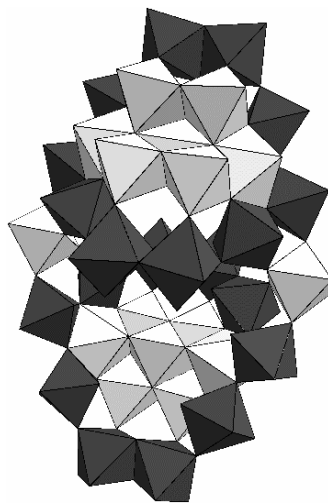
¹¹⁶ Pope 1991, 214.

¹¹⁷ Isobe &al. 1978.

¹¹⁸ Pope 1991, 211f.

2.4.1.2.3 "Mo₃₆"

Dieses Polyanion lässt sich anschaulich am besten beschreiben als Heptamolybdat (in der Abbildung hell dargestellt), das ringförmig von zehn verbundenen MoO₆-Oktaedern (dunkel) umgeben ist, zwei dieser Mo₁₇-Einheiten werden durch zwei weitere MoO₆-Oktaeder (hell) miteinander verknüpft. Es handelt sich um eine offene, etwas aufgelockerte Struktur, zwischen den beiden zentro- und rotations-symmetrisch angeordneten Mo₁₇-Hälften liegt ein kleiner Kanal, der im Kristall ein Wassermolekül enthält. Bemerkenswert ist die Aufweitung der Koordinationssphäre vom Oktaeder zur pentagonalen Bipyramide bei insgesamt vier der Mo-Zentren¹¹⁹.



Aufgrund seiner Größe und Komplexität braucht dieses Ion merkliche Zeit zu seiner Entstehung. Nach den Ergebnissen verschiedener spektroskopischer und elektrochemischer Methoden liegt die zur Gleichgewichtseinstellung nach Zugabe der entsprechenden Säuremenge erforderliche Zeit zwischen 3 und 30 Minuten¹²⁰.

2.4.1.3 In Lösung vorkommende Cluster

Bezüglich der in Lösung vorkommenden Spezies ist man auf hypothetische Modelle angewiesen. Das derzeit am besten die experimentellen Befunde beschreibende Modell¹²¹ beruht auf elektrochemischen Daten, es benutzt die in Tabelle 2.6 zusammengestellten Ionen (mit Ausnahme der in Kursive eingetragenen Spezies (10, 8)). Verschiedene Modelle mit jeweils anderen Sätzen von Polyanionen wurden jeweils durch Variation der Bildungskonstanten der einzelnen Spezies an die Messdaten angepasst. Das dargestellte Modell ergab letztlich die beste Übereinstimmung der theoretischen Vorhersagen mit den tatsächlichen potentiometrischen Daten¹²².

Alle in Tabelle 2.6 durch die rote Umrahmung in der p,q-Spalte markierten Spezies wurden von den Autoren aus früheren Modellen übernommen. Die übrigen Spezies wurden von ihnen neu postuliert, die dodekameren Ionen in Analogie zum Wolfram-System (Parawolfram B, s.u.), (13, 8) aufgrund der Basizität des Oktamolybdations und (32, 18) aufgrund der Struktur des "Mo₃₆". Nachgewiesen wurden diese Spezies bisher nicht. Angesichts der Struktur von Mo₃₆ erscheinen mir eher Mo₁₇- statt Mo₁₈-Cluster in Lösung vorstellbar. Völlig unklar bleibt, warum die bereits fast fünf Jahre früher beschriebene¹²³ Spezies (10, 8) nicht berücksichtigt wurde¹²⁴. Für das von ihnen untersuchte System

¹¹⁹ Krebs/Paulat-Bösch 1982.

¹²⁰ Gmelin 1987, 192.

¹²¹ So bewertet in: Gmelin 1987, wobei anzumerken wäre, dass der Autor des betreffenden Kapitels des Gmelin-Handbuchs mit dem Urheber des besagten Modells identisch ist.

¹²² Tytko & al. 1983.

¹²³ Isobe & al. 1978.

¹²⁴ Auch in dem von ihm verfassten Kapitel des Gmelin-Handbuchs (Gmelin 1987) erwähnt Tytko diese Spezies nicht.

(Molybdat in 3 M NaClO₄, 25°C) errechneten die Autoren die in Abbildung 2.7 dargestellten Zusammensetzungen.

Tabelle 2.6: In Lösung beim Ansäuern entstehende Molybdat-Spezies.¹²⁵ In Form fester Salze isolierbare Spezies sind grau unterlegt.

Z	p, q	Name	Formel
0	0, 1	Molybdat	MoO ₄ ²⁻
1	1, 1	Hydrogenmolybdat	HMoO ₄ ⁻
1,143	8, 7	Heptamolybdat	[Mo ₇ O ₂₄] ⁶⁻
1,167	14, 12		
1,25	10, 8		[Mo ₈ O ₂₆ (OH) ₂] ⁶⁻ (nicht bei Tytko &al.!)
1,25	15, 12		
1,286	9, 7		
1,333	16, 12		
1,429	10, 7		
1,5	12, 8	β-Oktamolybdat	β-[Mo ₈ O ₂₆] ⁴⁻
1,571	11, 7		
1,625	13, 8		
1,778	32, 18		
1,778	64, 36	"Mo ₃₆ "	[Mo ₃₆ O ₁₁₂ (H ₂ O) ₁₆] ⁸⁻
2	2, 1	Molybdänsäure	H ₂ MoO ₄
2,5	5, 2		

Pope sieht Modelle wie dieses sehr kritisch, da eine wirkliche Unterscheidung von Spezies mit gleichem oder nahe beieinander liegendem Z-Wert aufgrund elektrochemischer Messungen unsicher sei und zudem der Verlauf der Molybdat-Hydrolyse beim Ansäuern fast mit Sicherheit von der sonstigen Zusammensetzung der Lösung abhängt¹²⁶. Die Titration von Molybdatlösungen mit Säure zeigt eindeutig, dass andere Ionen einen erheblichen Einfluss auf die Hydrolyse haben: 10 mM gelöstes Molybdat liegen in Gegenwart von 3 M NaClO₄ bei pH 5,59, in Gegenwart von 3 M LiClO₄ bei pH 5,38 und in Gegenwart von 1 M NaCl erst bei pH 4,98 zu 50% als Heptamolybdat vor¹²⁷. Daher gilt ein Modell, wenn überhaupt, immer nur für eine ganz spezielle, genau festgelegte Medium. In der Literatur fanden sich schon vor 15 Jahren mehr als 150 Modelle mit unterschiedlichen Sätzen von Polymolybdat-Ionen oder einzelnen theoretisch postulierten, noch nicht definitiv charakterisierten Ionen¹²⁸.

¹²⁵ Nach: Tytko &al. 1983. Ergänzt nach: Pope 1991.

¹²⁶ Pope 1991, 213.

¹²⁷ berechnet nach den Gleichgewichtsdaten aus: Pope 1991, 212.

¹²⁸ aufgelistet in Gmelin 1987, 110-143.

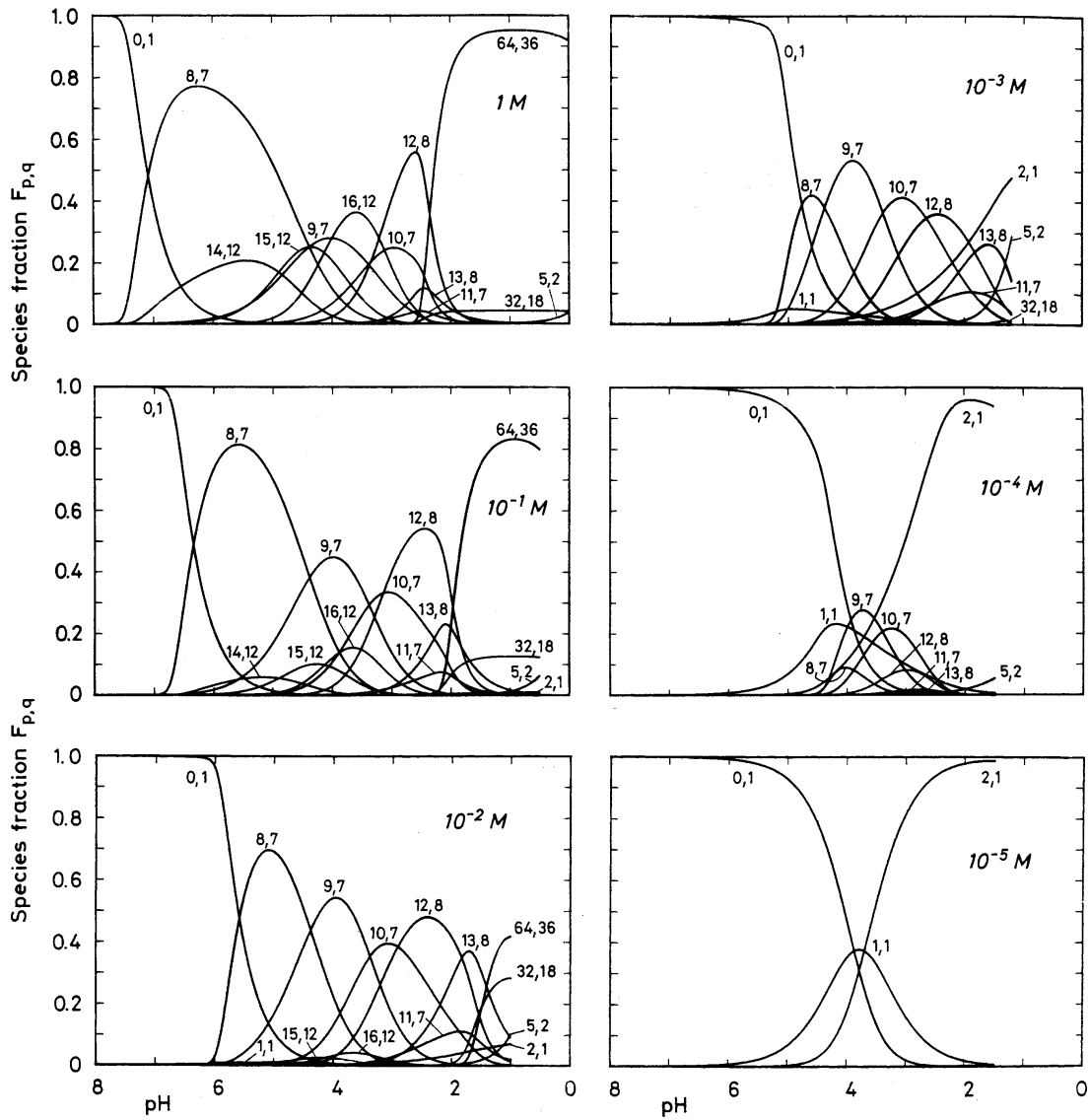


Abbildung 2.7: Zusammensetzung wässriger Molybdatlösungen in Abhängigkeit von Molybdatkonzentration und pH (in Gegenwart von 3 M NaClO_4 , bei 25°C). Aus: Tytko & al. 1983.

2.4.2 Isopolywolframate¹²⁹

2.4.2.1 Allgemeines

Aufgrund der engen Verwandtschaft von Mo und W gibt es natürlich Ähnlichkeiten zwischen Molybdaten und Wolframat. So basieren z.B. auch bei den Polywolframat die Strukturen auf dem WO_6 -Oktaeder. Die wichtigsten Unterschiede sind:

- Wolframat bevorzugt Strukturen, bei denen einzelne Oxo-Gruppen (freie Ecken des Oktaeders) vorliegen, während Polymolybdate eher cis-Dioxo-Strukturen (freie Kanten) einnehmen.
- Wolframat bildet viele metastabile Polyanionen, die extrem langsam zerfallen bzw. sich umlagern. Das erschwert u.a. die Untersuchungen der Gleichgewichte erheblich, einige stellen sich praktisch sofort ein, andere brauchen Tage dafür. Manche anscheinend stabile Cluster könnten durchaus auch labile, aber inerte Übergangsformen sein.

Tabelle 2.7: Bekannte und vermutete in wässriger Lösung vorkommende Wolframat-Spezies.¹³⁰

Z	p, q	Name analog zu den Polymolybdaten	Bezeichnung nach Pope	vermutliche Formel
0	0, 1	Wolframat	Wolframat	WO_4^{2-}
0	0, 4	Tetrawolframat	tetrameres Orthowolframat	$[\text{W}_4\text{O}_{16}]^{8-}$ (zwei Isomere)
1	1, 1	Hydrogenwolframat	—	HWO_4^-
1	2, 2	—	Diwolframat	" $\text{W}_2\text{O}_7^{2-}$ " (vermutlich polymer)
1,143	8, 7	Heptawolframat	Parawolframat A	$[\text{W}_7\text{O}_{24}]^{6-}$
1,167	14, 12	Dodekawolframat	Parawolframat B	$[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{42}]^{10-}$
~1,33	?	—	saures Parawolframat	Summenformel evtl. " $\text{W}_4\text{O}_{13}^{2-}$ "
~1,5	?	—	φ -Metawolframat (Pseudo-Metawolframat)	vermutlich Dodekamer (metastabile Übergangsform)
1,5	18, 12	Dodekawolframat	Wolframat-X	$\beta\text{-}[(\text{H}_2)\text{W}_{12}\text{O}_{42}]^{6-}$ (metastabil)
1,5	18, 12	Dodekawolframat	Metawolframat	$\alpha\text{-}[(\text{H}_2)\text{W}_{12}\text{O}_{42}]^{6-}$
1,6	16, 10	Dekawolframat	Wolframat-Y	$[\text{W}_{10}\text{O}_{32}]^{4-}$ (in H_2O metastabil)
2	2, 1	Wolframsäure	—	H_2WO_4

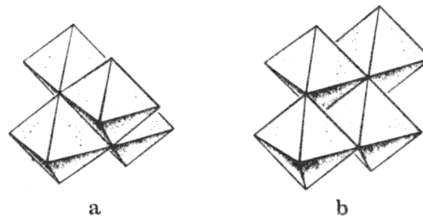
¹²⁹ nach: Pope:1983, Chapter 3, Part F: Tungstates. Dieser Veröffentlichung sind auch in diesem Abschnitt gezeigten Abbildungen entnommen.

¹³⁰ Tabelle von mir erstellt nach den Angaben in: Pope 1983.

2.4.2.2 Strukturell charakterisierte Wolframat-Spezies

In Tabelle 2.7 sind die beim Ansäuern von wässrigen Lösungen vermutlich entstehenden Wolframate nach steigendem Säuregrad Z geordnet (zur Erläuterung siehe oben den einführenden Abschnitt zu den Polymolybdaten). Wo die Formel des Polyanions nicht bekannt ist, ist Z der experimentell eingestellte Säuregrad.

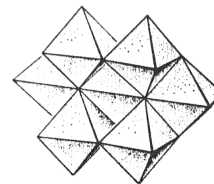
Tetrawolframat ist ein Cluster, der ein vom Molybdän her unbekanntes Phänomen darstellt: er entsteht ausschließlich durch Konzentrationserhöhung, Protonen werden nicht verbraucht. Aus Kristallstrukturuntersuchungen sind zwei isomere Formen bekannt. Es gilt als gesichert, dass er auch in Lösung existiert, in welcher Form, ist jedoch unklar.



Die Spezies (1, 1) und (2, 1) spielen, wie beim Mo, nur in stark verdünnter Lösung eine nennenswerte Rolle und sind für das Thema dieser Arbeit natürlich sowieso ohne Belang. Die Herstellung von (2, 2) wurde bisher nur ein Mal beschrieben, beim normalen Ansäuern von Lösungen entsteht es wohl nicht.

2.4.2.2.1 Heptawolframat

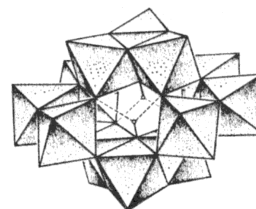
Wie beim Mo entsteht ohne irgendeine stabile oder metastabile Zwischenstufe (es gibt nur unklare Hinweise auf einen tetrameren Übergangszustand) als erstes das Polyanion (8, 7). Nicht nur die Formel, auch die Struktur stimmt exakt mit Heptamolybdat überein. Kristalle mit dem Heptawolframat-Anion sind jedoch schwer zu erhalten und nur metastabil: sie lagern sich zu Salzen mit dem nachfolgend beschriebenen Anion (14, 12) um.



2.4.2.2.2 Parawolframat B (Dodekawolframat)

Solche Dodekawolframate sind es meist, die aus schwach angesäuerten Wolframatlösungen auskristallisieren. In Lösung steht Dodekawolframat mit Heptawolframat in einem Gleichgewicht, das sich nur langsam einstellt. Frisch angesetzte Lösungen von Dodekawolframat enthalten daher kein Heptawolframat.

Im Kristall enthält das Parawolframat-B-Ion im Inneren zwei gebundene Protonen (mit Neutronenbeugung nachgewiesen, in der Abbildung als Punkte dargestellt), die im Gegensatz zu den Protonen der Metawolframate (s.u.) austauschbar sind.



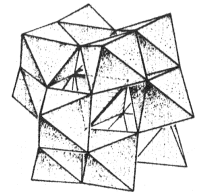
2.4.2.2.3 "Saures Parawolframat"

Diese Spezies unklarer Natur entsteht beim weiteren Ansäuern von Lösungen "geringer Ionenstärke"¹³¹. Sie wandelt sich dann offenbar langsam in eine Mischung aus Metawolframat und monomerem Wolframat um.

2.4.2.2.4 Metawolframate (Keggin-Dodekawolframate)

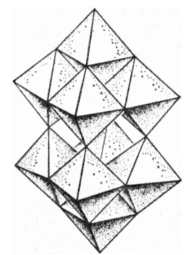
In Lösungen mit einigen mM Wolframat bildet sich beim Ansäuern auf $Z = 1,5$ das dodekamere Metawolframat. Die drei verschiedene Formen bilden eine Stufenreihe zunehmender thermodynamischer Stabilität. Die zunächst entstehende φ -Form wandelt sich in das β -Ion (Wolframat-X) und dieses in das stabile α - $[(H_2)W_{12}O_{42}]^{6-}$ um. Die vollständige Umwandlung in letzteres benötigt selbst beim Erwärmen auf $50^\circ C$ noch etwa zwei Wochen (bei einer Wolframatkonzentration von 5 mM).

α - $[(H_2)W_{12}O_{42}]^{6-}$ hat eine Keggin-Struktur, in der das tetraedrische Zentral-Ion durch zwei Protonen vertreten wird, die normalen Austauschprozessen nicht mehr zugänglich sind. Da die beiden Vorstufen ähnliche Merkmale zeigen (nicht austauschbare Protonen, vergleichbare Cluster-Masse), geht man davon aus, dass sie ebenfalls Keggin-ähnliche Dodekamere darstellen. Alle drei lassen sich reduzieren, verlieren danach leicht eines der Protonen, bei erneuter Oxidation erhält man $[HW_{12}O_{42}]^{7-}$, welches das "fehlende" Proton nicht wieder aufnehmen kann. Auf direktem Weg durch Einstellung des pH ist diese (17, 12)-Spezies nicht zugänglich.



2.4.2.2.5 Dekawolframat

Beim raschen Ansäuern von Wolframatlösungen über $Z = 1,5$ hinaus tritt eine gelbe Farbe auf ($\lambda_{max} = 320 \text{ nm}$), die durch das Ion $[W_{10}O_{32}]^{4-}$ hervorgerufen wird, das einzige farbige Isopolywolframat(VI). Dieses (16, 10)-Wolframat ist in nichtwässrigen Medien stabil, in Wasser ist es immerhin noch metastabil und zerfällt nur langsam zu Metawolframat. Es könnte insofern für die Speicherprotein-Chemie von Belang sein, wenn dies auch nicht sehr wahrscheinlich ist.



¹³¹ Die ungenaue Formulierung steht so im Originaltext. Pope 1983, 51.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Vorversuche

3.1.1 Wachstumsversuche mit *A. vinelandii*

Diese Vorversuche dienten dazu, das Wachstumsverhalten des Bakteriums kennenzulernen und die Eignung des von früheren Experimentatoren eingesetzten Kulturmediums zu überprüfen. An diesem Medium erschien mir von Anfang an fragwürdig, dass als Stickstoffquelle¹³² für die Anzucht Nitrogenase-reprimierter Zellen 20 mM Ammoniumchlorid eingesetzt wurden. Da beim Wachstum von Bakterien der pH des Mediums meist durch saure Stoffwechselendprodukte absinkt und *A. vinelandii* leicht alkalische Bedingungen bevorzugt, sollte der Zusatz eines in Lösung schwach sauren Salzes kontraproduktiv sein. Als Alternative bot sich Ammoniumacetat an.

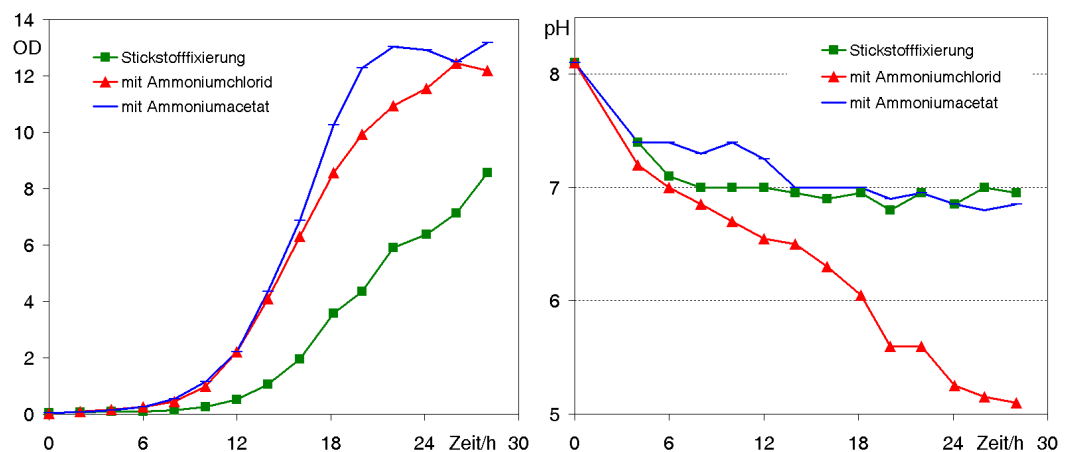


Abbildung 3.1: Wachstum und pH-Änderung in *A. vinelandii*-Flüssigkulturen. Die Kurven geben gemittelte Daten von jeweils doppelten Ansätzen wieder. Die OD versteht sich, wie in allen Fällen, in denen sie zur Bestimmung der Zelldichte dient, als bei 436 nm gemessen.

Das Resultat (Abbildung 3.1) bestätigte meine Vermutung: Mit Ammoniumchlorid sackte der pH stetig in den sauren Bereich, das Acetat hingegen pufferte die frei werdenden Säuren ab und ließ den Wert nur minimal unter 7 sinken. Das Wachstum der Zellen mit Ammoniumchlorid war nur wenig schwächer, nichtsdestoweniger verwendete ich fortan bei allen Versuchen Ammoniumacetat als Quelle für gebundenen Stickstoff. Bemerkenswert ist, dass auch bei den stickstofffixierenden Zellen das Medium konstant neutral blieb. Anscheinend bietet das diazotrophe Wachstum den Zellen die Möglichkeit, den pH ihren Bedürfnissen anzupassen (siehe auch unten in 3.1.1.2).

¹³² Da für die Gewinnung des Speicherproteins Nitrogenase-reprimierte *A.v.*-Zellen benutzt wurden, war der Zusatz von gebundenem Stickstoff zum Medium der Normalfall. Wenn ausnahmsweise Stickstofffixierungs-Bedingungen angewandt wurden, ist dies ausdrücklich erwähnt.

Allgemein bestätigte der Test, dass *Azotobacter* ein schnell wachsendes Bakterium ist. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 2, bei Stickstofffixierung etwa 3 Stunden. Das exponentielle Wachstum hält bis zu einer Trübungs-OD von etwa 2 an, die Kulturen wachsen danach linear weiter. Das Maximum lag in diesem Versuch bei einer OD ≈ 12 , es erwies sich aber bei den weiteren Arbeiten als schwankungsanfällig. Teilweise wurden Werte fast bis 20 erreicht.

3.1.1.1 Nährstoffbedarf und Molybdat-Toleranz

Als nächstes prüfte ich, ob im Medium ausreichende Überschüsse der Stickstoffquelle und des Kohlenstoff- und Energielieferanten Saccharose enthalten waren. Das Wachstum sollte nicht durch die Energiequelle begrenzt werden, und da ich mit Nitrogenase-reprimierten Zellen arbeiten wollte, durften die Bakterien auch nicht durch Mangel an Ammoniumverbindungen in die Stickstofffixierung hineinwachsen. Die letztere Sorge war insofern berechtigt, als die Versuche zeigten, dass der Übergang zu diazotrophen Stoffwechsel im Wachstumsverlauf fast nicht erkennbar ist, wenn die Zellen über genug Mo verfügen. Nur in Kulturen ohne zugesetztes Mo zeigte sich die Erschöpfung der Stickstoffquelle durch Einbruch der Wachstumsrate. 1 mM Ammoniumacetat reichten bis zu einer OD ≈ 1 , die übliche Menge sollte also bis zu OD ≈ 20 sicher sein. Mit nur 0,5 % Saccharose brach das Wachstum bei OD ≈ 12 ab, die normale Ration von 2 % (w/v) genügt also theoretisch für ein Wachstum bis OD ≈ 48 (Abbildung 3.2 links).

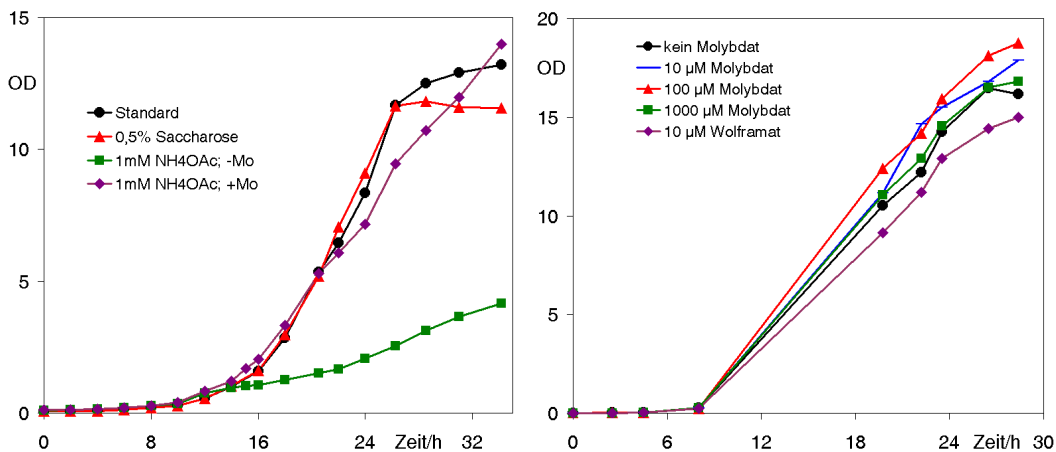


Abbildung 3.2: Wachstumsversuche zu Stickstoffverbrauch, Energiebedarf (linke Abb.) und Molybdäntoleranz (rechte Abb.) von *A.v.*. Jeweils Doppelansätze, beim "Zuckermangelversuch" (linke Abb., rote Kurve) Vierfachansatz. Das Medium "Standard" enthielt 2 % Saccharose, 20 mM Ammoniumacetat.

Da versucht werden sollte, durch reichliches Angebot an Molybdat die Ausbeute des Speicherproteins und seinen spezifischen Molybdängehalt zu steigern, sowie durch Einsatz von Wolframat das Wolfram-Analoge des Mo-Speicherproteins zu erhalten, musste auch erprobt werden, wie Nitrogenase-reprimierter¹³³ *A.v.* auf erhöhte Molybdatkonzentrationen und auf Wolframat reagierte.

¹³³ Die in N_2 -fixierenden Kulturen eingesetzte Standardkonzentration war 10 µM Natriummolybdat.

Im untersuchten Bereich von Null bis 1 mM zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Molybdatkonzentration auf das Wachstum. Wolframat wirkt jedoch anscheinend leicht wachstumshemmend, wie man es auch erwarten würde (Abbildung 3.2 rechts).

Bei diesem Versuch wurden jeweils die Zellen nach Versuchsende abgetrennt, mit Lysozym aufgeschlossen und die Extrakte mit SDS-PAGE auf Proteine untersucht, die nur in Anwesenheit von Molybdat gebildet wurden. Die Hoffnung, damit eventuell schon vor den Anreicherungsversuchen die Banden des Speicherproteins im Gel identifizieren zu können, erfüllte sich jedoch nicht, in dem von Pienkos und Brill angegebenen Molmassenbereich zeigten sich keine auffälligen Mo-abhängigen Veränderungen. Erst nachdem ich die genaue Lage der MoSto-Banden ermittelt hatte, ließen sie sich auch in den hier erhaltenen Elektrophoresegelen erkennen. Es zeigte sich, dass die Banden nur schwach ausgeprägt waren, wenn dem Medium kein Molybdat zugesetzt worden war. Anders als es die Ergebnisse der MoSto-Entdecker nahelegen¹³⁴, wird also die Biosynthese des Speicherproteins sehr wohl Mo-abhängig reguliert. Dieses vorläufige und ungenaue Ergebnis wurde später durch sorgfältige Untersuchungen bestätigt¹³⁵.

3.1.1.2 Toleranz gegenüber niedrigem pH

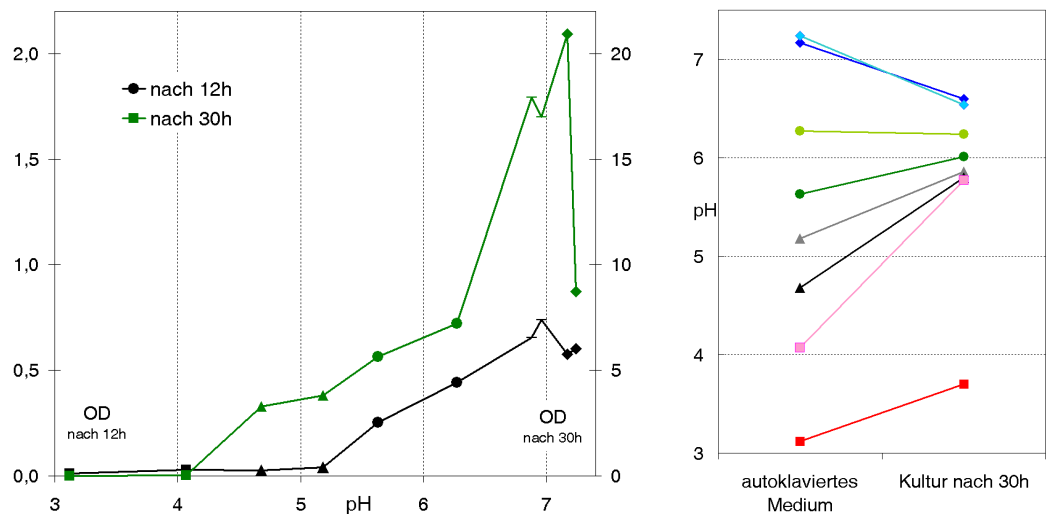


Abbildung 3.3 links: pH-Abhängigkeit des Wachstums von A.v.; rechts: Änderung des pH im Medium während des Versuchs. Jeweils Einfachansätze, Stickstofffixierungs-Bedingungen, 1,6 mM Phosphat. Zwei Kontrollansätze (pH 6,88 und 6,96) mit 16 mM Phosphat sind im rechten Diagramm weggelassen, im linken Diagramm aber enthalten, da sie sich im Wachstum den anderen Ansätzen entsprechend verhielten.

Dieser Versuch stand nicht unmittelbar im Zusammenhang mit den Arbeiten am Speicherprotein, daher rührt auch, dass er mit N₂-fixierenden Zellen durchgeführt wurde. Er bestätigte im wesentlichen die Angaben in der Literatur, wonach die untere pH-Grenze für das Wachstum von A.v. bei 5,5 liegt. 12 Stunden nach dem Beimpfen zeigte sich in den Ansätzen mit niedrigerem pH keinerlei Wachstum.

¹³⁴ Pienkos/Brill 1981, 745f.

¹³⁵ Diese genaue Untersuchung wurde durchgeführt von Jörg Schemberg, siehe: Fenske & al. 2005.

Interessant ist jedoch, dass N_2 -fixierendes A.v. anscheinend in gewissem Maße den pH seiner Umgebung erhöhen kann. 26 Stunden nach dem Start war auch in zwei bei 5,18 und 4,68 angesetzten Kulturen Wachstum festzustellen. Eine Kontrolle nach 30 h ergab, dass die pH-Werte der Ansätze über 6,2 gesunken, die darunter gestiegen waren, so dass nun alle Kulturen im Bereich 5,75-6,60 lagen, mit Ausnahme des Ansatzes bei 3,12. Der Vorgang wurde begünstigt dadurch, dass das Medium mit 1,6 statt 16 mM Phosphat nur schwach gepuffert war.

Unklar ist, warum der pH auch in Kulturen anstieg, die kein Wachstum zeigten, bzw. warum die bei pH 4,07 gestartete Kultur nicht zu wachsen begann (auch nach 49 h nicht), nachdem sie bei 30 h den geeigneten pH-Bereich erreicht hatte. Möglicherweise beruht der pH-Anstieg teils auf der Ausscheidung basischer Substanzen durch lebende Zellen, teils auf der Lyse abgestorbener Zellen, wobei mit abnehmendem pH letzteres mehr und mehr dominiert und schließlich die einzige Ursache wird. Demnach wäre der Ansatz bei pH 4,07 nur zufällig nach Absterben aller Zellen gerade eben bis in den pH-Bereich der lebenden Kulturen geraten. Dass lebende stickstofffixierende Zellen den pH des Mediums aktiv beeinflussen, zeigte bereits der zu Beginn des Kapitels 3.1 beschriebene erste Wachstumsversuch.

3.1.2 Prüfung und Optimierung der Molybdän- und Wolfram-Bestimmungsverfahren

Zur Durchführung der biochemischen Untersuchungen, insbesondere um den Verlauf der Proteinanreicherung zu kontrollieren, war unbedingt eine einigermaßen zuverlässige Methode zur quantitativen Bestimmung von Molybdän erforderlich. Da für die Routineanalysen keine Geräte für elementaranalytische Methoden wie ICP/MS, AAS o.ä. zur Verfügung standen, musste ein geeignetes Verfahren aus der klassischen Nass-Chemie gefunden und für das vorliegende Problem optimiert werden:

- große Mengen organischen Materials durften nicht stören.
- Molybdän musste zuverlässig aus MoSto herausgelöst werden.
- möglichst hohe Empfindlichkeit, um nicht allzuviel Protein bei der Analytik zu verbrauchen.
- schnelle und einfache Durchführung wegen der nach Chromatographie-Läufen zu erwartenden großen Anzahl Proben.

Aufgrund der engen Verwandtschaft der beiden Metalle sind Molybdän-Bestimmungsverfahren i.d.R. auch für Wolfram anwendbar.

3.1.2.1 Colorimetrische Methode

Die Bestimmung beruht auf der Bildung eines grün gefärbten Komplexes von Dithiol (Toluol-3,4-dithiol, 3,4-Dimercaptotoluol) mit Molybdän^{VI}, der mit einem organischen Lösemittel extrahiert und durch Messung der Absorption bei 680 nm bestimmt wird. Die Proteinmatrix stellt kein Problem dar,

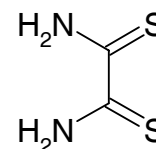
da ein oxidativer Aufschluss, der organisches Material restlos zu H_2O , CO_2 und N_2 umsetzt, ohnehin ein fester Bestandteil des Verfahrens ist.

Die Methode wurde nur unwesentlich gegenüber dem in der Literatur¹³⁶ beschriebenen Verfahren abgewandelt: insbesondere wurde als organisches Lösemittel *n*-Amylacetat an Stelle von *iso*-Amylacetat benutzt, was ohne Probleme möglich war. Für Details der Durchführung sei daher auf den Methodenteil verwiesen (5.2.1.1).

Ebenfalls mit Dithiol soll eine Identifizierung von MoSto im Gel der nicht-denaturierenden PAGE als grün gefärbte Bande möglich sein. Das Verfahren wird allerdings in der entsprechenden Veröffentlichung¹³⁷ nicht im Detail beschrieben und wurde von mir nicht erprobt.

3.1.2.2 Katalytische Methode

Dithiooxamid (Dithio-oxalsäurediamid, Rubeanwasserstoffsäure) reagiert in saurer Lösung mit Wasserstoffperoxid zu einem intensiv gelben Oxidationsprodukt unbekannter Natur. Die Reaktion wird durch Metall-Oxo-Komplexe katalysiert, insbesondere durch Molybdat und Wolfram. Bei niedrigen Konzentrationen von H_2O_2 , Säure und katalytisch aktiven Metallionen verläuft die Reaktion sehr langsam nach einem Geschwindigkeitsgesetz nullter Ordnung, d.h. die Geschwindigkeit ist zeitlich konstant und hängt allein von der Katalysatorkonzentration ab. Aufgrund der Farbe des Produkts lässt sich der Reaktionsverlauf leicht durch Messung der Absorption bei 400 nm verfolgen. Das Verfahren wurde in den 1960er Jahren in der Sowjetunion zur Untersuchung legierter Stähle entwickelt¹³⁸. In der Originalveröffentlichung wird die Durchführung in einem 25-mL-Messkolben mit folgendem Ansatz (in dieser Reihenfolge!) beschrieben:



Chemikalie (jeweils auf 25°C vortemperiert):	Menge:
vorbereitete Probe	max. 12 mL
Salzsäure p.a., 250 mM	10 mL
Dithiooxamid-Lösung, 10 mM in Ethanol p.a.	1 mL
H_2O_2 50 mM	1 mL
H_2O bidest.	ad 25 mL

Die Wasserstoffperoxidlösung ist jeweils frisch anzusetzen (0,5 mL 30%ige Lösung mit Wasser auf 100 mL auffüllen).

Für Routineuntersuchungen mit einer großen Anzahl verschiedener Proben erschien mir das Originalverfahren zu umständlich. Daher verkleinerte ich den Ansatz einfach um den Faktor 10, so dass

¹³⁶ Cardenas/Mortensen 1974.

¹³⁷ Pienkos/Shah/Brill 1980, 393.

¹³⁸ Pantaler 1963. Dieser Artikel, im Text als „Originalveröffentlichung“ bezeichnet, stammt in Wirklichkeit aus einer englischen Übersetzung der ursprünglichen russischen Fachzeitschrift. Auf diese Methode hingewiesen wurde ich durch: Müller, Helmut; Otto, Matthias; Werner, Gerhard: Katalytische Methoden in der Spurenanalyse. Leipzig 1980. (zugleich: Weinheim [u.a.] 1980), eine Fundgrube für empfindliche klassisch-chemische Analyseverfahren.

sich die Reaktion unter gleichzeitiger automatischer Messung und Aufzeichnung der Absorption in einer 3-mL-Standardküvette durchführen ließ. Da dabei das Gesamtvolumen des Ansatzes nicht mehr durch „Auffüllen bis zur Marke“ eingestellt wird und da bei der Zugabe von Wasserstoffperoxid die Reaktion beginnt, wurde auch die Reihenfolge des Ansatzes umgestellt.

Chemikalie:	Menge:
vorbereitete Probe	max. 1,3 mL
H ₂ O bidest.	ad 1,3 mL
Salzsäure p.a., 250 mM	1 mL
Dithiooxamid-Lösung, 10 mM in Ethanol p.a.	100 µL
H ₂ O ₂ 50 mM	100 µL

Alle Volumina wurden mit Luftpolsterpipetten abgemessen, von der Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Volumenmessung hängt die Genauigkeit der Messungen in erster Linie ab. Es bewährte sich, für jede der benötigten Lösungen jeweils eine eigene Pipette zu benutzen, die nicht gewechselt wurde, so dass der eventuelle Fehler innerhalb einer Messreihe für alle Messungen einschließlich der Kalibrierungsmessungen gleich blieb. Aus dem gleichen Grund wurden für alle Messungen innerhalb einer Messreihe die selbe HCl- und H₂O₂-Lösung verwendet. Einstellen der Lösungen auf eine bestimmte Temperatur erwies sich als überflüssig. Da parallel zu jeder Messreihe eine Kalibrierkurve gemessen wurde, genügte Temperieren auf RT.

Unter Verwendung selbst hergestellter 1 µM und 10 µM Molybdat-Standardlösungen wurde das Verfahren für Stoffmengen zwischen 0,02 und 10 nmol Molybdat (im angegebenen Ansatz von 2,5 mL) getestet. Dabei zeigte sich, dass unterhalb 0,1 nmol kein sicherer Nachweis von Mo möglich ist. Die Reaktion läuft auch unkatalysiert ab, und bei Stoffmengen von 0,02 und 0,05 nmol lag die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit in der gleichen Größenordnung wie die Schwankungen des Blindwertes. Nimmt man an, dass die Mindeststoffmenge von 0,1 nmol in dem maximalen Probevolumen von 1,3 mL gelöst ist, ergibt sich eine untere Grenzkonzentration von etwa 70 nM bzw. 7,5 ppb w/v.

Die Obergrenze liegt bei etwa 5 nmol. Bei höheren Mo-Gehalten wurde die Reaktion so schnell, dass sich der Verbrauch der Edukte bemerkbar machte: statt einer Geraden war der zeitliche Verlauf der OD₄₀₀ eine Kurve, die Reaktion verlief nicht mehr wie erforderlich nach einem Geschwindigkeitsgesetz nullter Ordnung. Bis zu einem gewissen Grad ließ sich dies ausgleichen, indem nur die ersten Messwerte der Kurve zur Bestimmung der Steigung herangezogen wurden, jedoch erhielt ich auch dann tendenziell zu niedrige Werte. Für genaue Bestimmungen sollten keine Stoffmengen über 2 nmol eingesetzt werden, was sich durch Verringerung der Probenmenge leicht bewerkstelligen lässt.

Die auf gleiche Art durchgeführte Prüfung mit Wolframat ergab im wesentlichen die sinngemäß gleichen Resultate. Lediglich die Konzentrations-Obergrenze liegt bei Wolframat höher (max. 20 nmol W im Ansatz). Das Verfahren kann also bei Bedarf zur Wolframat-Bestimmung auf gleiche Weise durchgeführt werden wie bei Molybdat.

Zur Probenvorbereitung, d.h. zur Zerstörung der Proteinmatrix und vollständigen Freisetzung des Molybdäns als katalytisch aktives Molybdat wurden verschiedene Verfahren getestet. Es wurden jeweils gleiche Mengen einer MoSto-Probe eingesetzt, deren Gehalt ich zuvor mit der colorimetrischen Methode (siehe 5.2.1.1) bestimmt hatte.

	Probenvorbereitung	bestimmte Mo-Konzentration [μM]
	Vergleichsbestimmung colorimetrische Methode	23,1
1	keine Probenvorbereitung	15,5
2	30 min bei RT, Zusatz von 1 mL 250 mM HCl (HCl-Zugabe beim Ansatz entfällt)	16,7
3	15 min bei 100°C, Zusatz von 1 mL 250 mM HCl (HCl-Zugabe beim Ansatz entfällt)	15,8
4	Abrauchen mit wenigen Tropfen HNO ₃ , anschließend 3maliges Abrauchen mit HCl, Aufnehmen mit 1 mL 250 mM HCl (HCl-Zugabe beim Ansatz entfällt)	7,3
5	15 min bei 100°C, mit Wasser verdünnt	20,7
6	15 min bei 100°C, Zusatz von 100 μL 10%iger SDS-Lösung	13,4
7	15 min bei 100°C, Zusatz von 500 μL 250 mM NaOH (HCl-Volumen beim Ansatz zur Neutralisation entsprechend erhöht)	21,8

Damit erwiesen sich die Probenvorbereitungen durch einfaches Kochen (Nr. 5) und alkalisches Kochen (Nr. 7) als geeignet für das Mo-Speicherprotein. Bei einem weiteren Test wurden fünf verschiedene Proben aus einer MoSto-Anreicherung auf diese Art vorbereitet und die Analyseergebnisse mit den Resultaten vorheriger colorimetrischer Bestimmungen verglichen. Die Werte nach dem katalytischen Verfahren mit Probenvorbereitung Nr. 5 entsprachen im Mittel 92% der colorimetrisch bestimmten Werte. Mit der alkalischen Probenvorbereitung waren nur geringfügig bessere Ergebnisse (94%) zu erzielen, die m.E. nicht die umständlichere Durchführung aufwogen¹³⁹. Daher wurde als Standardverfahren fortan immer die ggf. mit bidest. Wasser verdünnte Probe in einem dicht schließenden Gefäß einfach für 15 min in ein siedendes Wasserbad gestellt und nach Abkühlung die benötigte Menge in die Küvette übergeführt.

3.1.2.2.1 Einfluss von Europium und Vanadium

In der Originalveröffentlichung sind die evtl. störenden Einflüsse zahlreicher Metalle und einiger Anionen untersucht und beschrieben, der Einfluss von Europium und insbesondere Vanadium ist jedoch nicht behandelt. Einige Mo- und W-Bestimmungen, die mit den Untersuchungen am Speicherprotein nichts zu tun hatten, machten es notwendig, auch den Einfluss dieser Metalle abzuklären.

¹³⁹ Zudem hatte ich zu jenem Zeitpunkt auch keine Möglichkeit, über die Richtigkeit der mit der colorimetrischen Methode bestimmten Mo-Gehalte (d.h. der Vergleichswerte) etwas zu aussagen.

Europium (als EuCl_3) in einer Konzentration von $117 \mu\text{M}$ (293 nmol im Ansatz) zeigte keine eigene katalytische Aktivität. Auch die Geschwindigkeit der durch $0,4 \mu\text{M}$ (1 nmol) Molybdat katalysierten Reaktion änderte sich nicht signifikant bei Zusatz der o.a. Europiumkonzentration.

Vanadium (als Vanadat(V)) ist selbst katalytisch aktiv, jedoch ist die Aktivität um etwa den Faktor 50 geringer als bei Molybdat und Wolfram. Bei Abwesenheit dieser Ionen ließe sich das Verfahren ohne weiteres auch zur quantitativen Bestimmung von Vanadat einsetzen. Die VO_4^{3-} -Stoffmenge in der Probe müsste dafür im Bereich 20 bis 250 nmol liegen.

Bei Testmessungen mit jeweils 2 nmol Wolfram in der Reaktionsmischung führte ein äquimolarer Zusatz von Vanadat zu keiner signifikanten Änderung des OD-Gradienten. Ein Überschuss an Vanadat (20, 50, 200 nmol) erhöhte die Reaktionsgeschwindigkeit um etwa 75% des Wertes, der für einen ausschließlich Vanadat enthaltenden Ansatz zu erwarten war. Daraus folgt, dass einerseits Vanadat in maximal äquimolarer Konzentration bei der Wolframbestimmung nicht stört, andererseits die katalytische Aktivität von Vanadat durch kleine Mengen Wolfram vermindert wird. Die Wechselwirkung von Molybdat und Vanadat wurde nicht untersucht, vermutlich gilt dort aber das Gleiche wie bei Wolfram.¹⁴⁰

3.1.2.2.2 Einfluss von Citrat

Die Originalveröffentlichung gibt an, dass es möglich sei, Wolfram und Molybdän auch nebeneinander zu bestimmen, da sich Wolfram durch den Zusatz von 0,1 M Zitronensäure zum Reaktionsansatz maskieren lasse, während Molybdat auch unter diesen Bedingungen voll katalytisch aktiv bleibe¹⁴¹. Der Artikel enthält an dieser Stelle offensichtlich einen Flüchtigkeitsfehler. Zitronensäure in der angegebenen Konzentration blockierte die Reaktion vollständig, gleichgültig ob Molybdat oder Wolfram eingesetzt wurde. Die Konzentration an Zitronensäure wurde daraufhin stufenweise reduziert, 4 mM verringerten die Geschwindigkeit der Wolfram-katalysierten Reaktion um den Faktor 20, diejenige der Molybdat-katalysierten Reaktion immer noch um den Faktor 2. Da es bei den betreffenden Versuchen nur um eine qualitative Unterscheidung von Mo und W ging, wurde der Test mit der zuletzt genannten Zitronensäurekonzentration durchgeführt und die Wirkung von Citrat nicht noch ausführlicher untersucht¹⁴². Vermutlich wurde in der Originalveröffentlichung (oder bei der Übersetzung ins Englische) das Symbol für die Größenordnung verwechselt und die Angabe für die geeignete Citratkonzentration muss richtig $100 \mu\text{M}$ statt 100 mM sein.

¹⁴⁰ Die Messungen zum Vanadium wurden im Januar 2002 durchgeführt von Meike Baumgart, damals Praktikantin an der Universität Bielefeld und Schülerin am Gymnasium Harsewinkel.

¹⁴¹ Pantaler 1963, 521f.

¹⁴² Die Messungen zum Citrat wurden durchgeführt von Maja Henjakovic und Sabrina Laing, Praktikum Bioanorganische Chemie WS 2001/02.

3.2 Isolierung des Molybdän-Speicherproteins

3.2.1 In der Literatur beschriebene Anreicherungsverfahren

Voraussetzung für alle weiteren Untersuchungen war, zunächst ein Verfahren zur Isolierung von MoSto aus *A. vinelandii*-Zellen zu erarbeiten. Das Nächstliegende war dabei der Versuch, die wenigen bisher publizierten Ergebnisse zu reproduzieren. Anschließend sollte dann versucht werden, das erfolgversprechendere Verfahren noch zu verbessern.

3.2.1.1 Verfahren nach Philip Pienkos und Winston Brill

Die Arbeit von Pienkos und Brill¹⁴³ enthält die einzige bis heute in der Literatur beschriebene vollständige Isolierung von MoSto. Das Verfahren umfasst folgende Schritte:

1. Zellaufschluss (durch osmotischen Schock) in 25 mM Tris/HCl pH 7,4.
2. Auftragen auf eine DEAE-Cellulose-Anionenaustauschersäule. Waschen der Säule mit 25 mM Tris/HCl pH 7,4 + 50 mM NaCl. Elution von MoSto mit 50 mM Imidazol/HCl pH 6,5 + 50 mM NaCl.
3. Vereinigen der MoSto-haltigen Fraktionen. Einstellen einer 20%igen Sättigung mit Ammoniumsulfat, Zentrifugation, Verwerfen des Niederschlages. Erhöhen der Sättigung auf 50%, Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes.
4. Aufnehmen des Niederschlages in 50 mM Imidazol/HCl pH 6,5; Aufbringen der Proteinlösung auf eine Sephadex G100-Gelfiltrationssäule und Elution mit dem gleichen Puffer.

Nach Angabe der Autoren wurde damit ein Präparat erhalten, das in der nativen PAGE nur eine Bande und der SDS-PAGE eine Doppelbande zeigte, ohne dass Banden anderer Proteine zu erkennen waren.

An Stelle von Imidazol setzte ich MOPS/NaOH als Puffersystem ein. Da bei der abschließenden Gelfiltration die Molekülmasse von MoSto bestimmt werden sollte, wurde statt einer G100- eine G150-Säule verwendet, die für die nach den Angaben von Pienkos/Brill 1981 erwartete Protein-Molmasse von etwa 90-100 kg/mol besser geeignet ist.

Das Verfahren erwies sich beim ersten Versuch als nur eingeschränkt reproduzierbar, aber im Grunde brauchbar. Es wurde daher als Grundlage zur weiteren Optimierung herangezogen. Alle Ergebnisse der damit durchgeführten Anreicherungsversuche sind in Kapitel 3.2.2 (ab Seite 58) zusammengefasst, eine tabellarische und grafische Übersicht des ersten Reproduktionsversuches findet sich als Tabelle 7.1 im Anhang.

¹⁴³ Pienkos/Brill 1981.

Da vorherige Untersuchungen an zellfreien Extrakten (Seite 49) keinen Hinweis gegeben hatten, wie sich MoSto in der SDS-PAGE zeigt, konnte das Protein beim ersten Anreicherungsversuch nur mit Hilfe der Molybdänanalytik verfolgt werden. Nach jedem Anreicherungsschritt wurden jeweils die Fraktionen mit dem höchsten Mo/Protein-Verhältnis zur Weiterverarbeitung eingesetzt.

3.2.1.2 Anreicherung nach Waltraud Suer

Ein anscheinend erfolgloser Anreicherungsversuch wurde in unserer Arbeitsgruppe im Zusammenhang mit den Arbeiten, die erstmals Hinweise auf ein Polyoxomolybdat in MoSto lieferten, durchgeführt und beschrieben¹⁴⁴. Nachdem das auffällige, mit ganzen Zellen ebenso wie mit zellfreien Extrakten erhaltene TDPAC-Spektrum dem Speicherprotein zugeschrieben worden war, wurde versucht, MoSto durch eine DEAE-Sephacel-Anionenaustauschchromatographie anzureichern. Als Aufschlusspuffer diente 50 mM Tris/HCl pH 7,8, eluiert wurde mit einem achtstufigen NaCl-Gradienten (50, 100, 150, 200, 280, 350, 500, 1000 mM) in dem gleichen Puffer. In den Mo-haltigen Fraktionen war jedoch das charakteristische Spektrum verschwunden, es zeigte sich nur das TDPAC-Spektrum von monomerem Molybdat. Daher wurde angenommen, dass auf der Anionenaustauschersäule das Molybdat aus dem Protein herausgelöst werde. Der Unterschied zur ersten Anreicherungsstufe von Pienkos/Brill besteht im wesentlichen im höheren pH-Wert bei dem DEAE-Säulenlauf.

Bei meiner Wiederholung dieser Anionenaustauschchromatographie zeigte sich jedoch, dass Molybdän in dem Bereich nachweisbar war, in dem auch bei der SDS-PAGE die charakteristischen Banden von MoSto gefunden wurde (NaCl-Konz. ca. 150 mM; Abbildung 3.4). Offenbar wird das Mo in diesem Schritt nicht vom Protein getrennt, denn in einem Testlauf wurde freies Molybdat erst bei wesentlich höherer NaCl-Konzentration (>250 mM) eluiert. Auch war das Molybdän/Protein-Verhältnis nicht ungewöhnlich niedrig, eher etwas höher als in diesem Anreicherungsschritt bei pH 6,5 üblich.

Ich versuchte, die Anreicherung bei gleichbleibendem pH 7,8 fortzusetzen. Die Hauptfraktionen des MoSto-Peaks wurden vereinigt und fünf Tage bei -20°C aufbewahrt, dann aufgetaut und, an Stelle der Ammoniumsulfatfällung, durch Ultrafiltration in einer Rührzelle und anschließend einer Stehkammer von 28 auf 2 mL eingengt. Aufgrund von Problemen mit der Gelfiltrationssäule konnte die aufkonzentrierte Lösung aber nicht sofort eingesetzt werden, sondern musste abermals sechs Tage bei -20°C aufbewahrt werden. Ein derartiges Vorgehen mit wiederholten Einfrier- und Auftauvorgängen, obschon nicht gerade proteinschonend, erwies sich im Zusammenhang mit MoSto i.d.R. als unproblematisch, sofern die Lösung nicht hoch gereinigt war, sondern auch noch andere Proteine enthielt. Diesmal jedoch zeigte sich in der konzentrierten Proteinlösung nach dem abermaligen Auftauen eine erhebliche Menge ausgefallenes Protein, das vor dem Auftragen auf die Gelfiltrationssäule abzentrifugiert werden musste.

¹⁴⁴ Müller & al. 1997. Siehe auch oben unter 1.1.1.

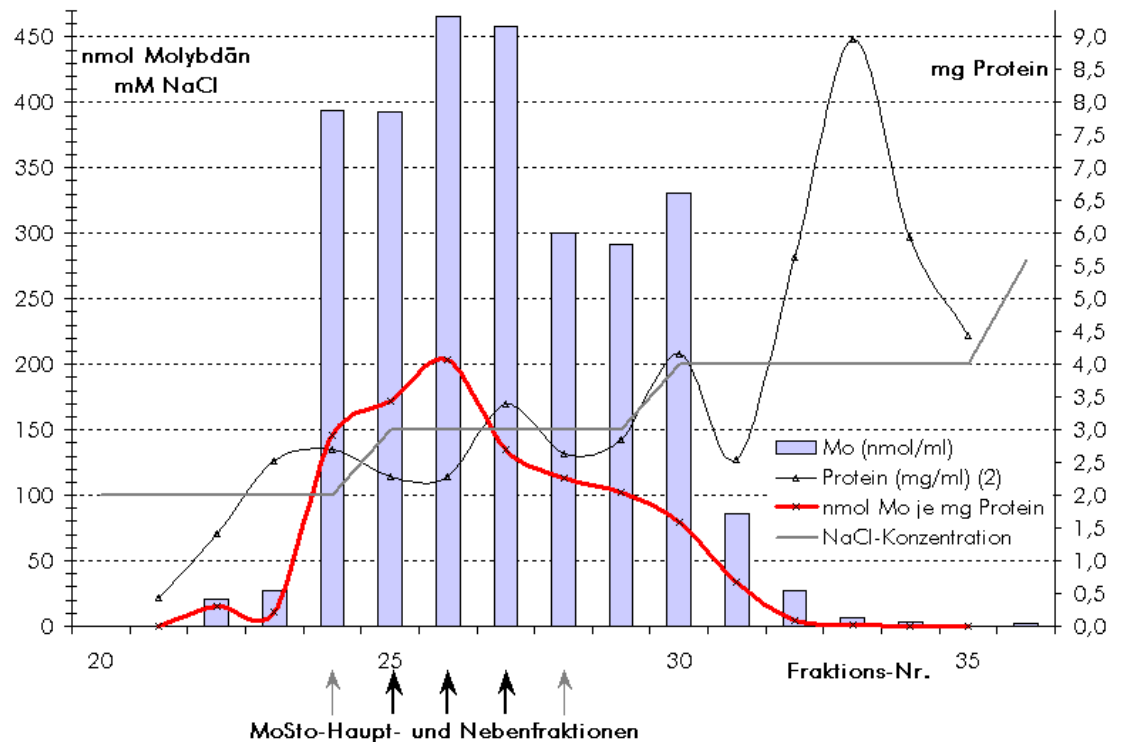


Abbildung 3.4: Ergebnis der DEAE-Anionenaustauschchromatographie bei pH 7,8.

Nach der Gelfiltration fand sich bei der Untersuchung der Fraktionen mit SDS-PAGE die MoSto-Doppelbande nur noch schwach, und zwar zum einen im erwarteten Bereich (bei einem einer Molmasse von 244 kg/mol entsprechenden Elutionsvolumen), zum anderen im Ausschlusspeak (entsprechend einer Molmasse >1000 kg/mol). Molybdän war nur in winzigen Spuren und nur als niedermolekulare Spezies nachweisbar.

In der Anreicherungsprozedur ist die Aufkonzentrierung der einzige Schritt, bei dem das Mo entfernt worden sein kann. Es ist anzunehmen, dass MoSto durch den erhöhten pH-Wert destabilisiert wurde, die Freisetzung des Mo jedoch so langsam erfolgte, dass sie sich nicht bei dem DEAE-Säulenlauf, sondern erst nach längerer Lagerung und vor allem der langwierigen Ultrafiltration bemerkbar machte. Vermutlich erfolgte auch die seinerzeit im TDPAC-Spektrum beobachtete Umwandlung in freies Molybdat erst nach dem DEAE-Säulenlauf. Eine solche Interpretation der Beobachtungen ist im Einklang mit den mittlerweile vorliegenden Ergebnissen zum Ablauf der Mo-Freisetzung aus MoSto, denen zufolge bei Kühlung auf 12°C die vollständige Freisetzung mehrere Stunden beansprucht¹⁴⁵.

Im Vergleich zum Holoprotein ist Mo-freies Apo-Speicherprotein (zumindest bei pH 7,8) offenbar weniger stabil und neigt zur Aggregation und Denaturierung. Das würde sowohl den Niederschlag als auch das Auftauchen von MoSto im Ausschlusspeak erklären. Demnach könnte die Isolierung des Apoproteins sich schwierig gestalten, wenn nicht stabilisierende Bedingungen gefunden werden.

Weitere Anreicherungsversuche in 50 mM Tris/HCl pH 7,8 wurden nach diesen wenig ermutigenden Ergebnissen nicht unternommen.

¹⁴⁵ Jörg Schemberg und Volker Henschel, persönliche Mitteilung. Siehe auch Fenske & al. 2005.

3.2.2 Optimierung der Anreicherungs-methode

3.2.2.1 Extraktgewinnung

Der Zellaufschluss wurde von Pienkos/Brill 1981 in 25 mM Tris/HCl pH 7,4 durchgeführt. Nachdem der Puffer- und pH-Wechsel während der Anionenaustauschchromatographie wegfiel (siehe unten), wurde auch beim Zellaufschluss 50 mM MOPS/NaOH pH 6,5 (im Folgenden einfach als "Standardpuffer" bezeichnet) verwendet. Dies hatte keine erkennbaren Auswirkungen auf Qualität und Menge des gereinigten Proteins, aber es vereinfacht natürlich die Anreicherung.

3.2.2.2 Anionenaustauschchromatographie

Beim ersten Versuch, das Verfahren von Pienkos/Brill 1981 zu reproduzieren, wurde in diesem Schritt folgende Abfolge von Elutions-Pufferlösungen eingesetzt:

Fractionen	Puffersubstanz	Konzentration / pH	NaCl-Zusatz (mM)	Fraktionsvolumen
1	Tris/HCl	25 mM / 7,4	-	20
2	"	"	50	40
3, 4	MOPS/NaOH	50 mM / 6,5	50	35, 60
5	"	"	250	60

Bei diesem ersten Versuch wurde, anders als im Methodenteil beschrieben, noch nicht mit einem Fraktionssammler gearbeitet, sondern die Vorlage wurde von Hand gewechselt. Fraktion 3 wurde dabei so gewählt, dass in ihr ein auffälliges lachsrotes Protein aufgefangen wurde. MoSto wurde in Fraktion 3 oder 4 erwartet, tatsächlich jedoch war Mo nur in Fraktion 5 nachweisbar. Auch der weitere Verlauf der Anreicherung zeigte, dass MoSto erst mit der 250 mM NaCl enthaltenden Lösung eluiert worden war, die ursprünglich eher zur Reinigung der Säule hatte dienen sollen. Daraufhin startete ich eine kleine Versuchsreihe¹⁴⁶, um dieses Ergebnis zu bestätigen und ggf. die Abstufung des NaCl-Gradienten den Erfordernissen anzupassen. Das Ziel war, MoSto in einem möglichst kleinen Volumen und möglichst rein, d.h. als (nach SDS-PAGE) dominierendes Protein zu erhalten.

Der pH- und Puffer-Wechsel wurde zunächst beibehalten, nachdem er jedoch mehrmals nicht, wie von Pienkos/Brill 1981 angegeben, zur Elution von MoSto geführt hatte, war ein Zufallsfehler ausgeschlossen. Der Wechsel ist folglich für die Chromatographie überflüssig und wurde hinfort weggelassen, was keinerlei Probleme mit sich brachte.

In den Versuchen erwies sich die anfangs gewählte Abstufung (100/160 mM NaCl) als prinzipiell geeignet. In zwei von drei Läufen wurde MoSto mit 100 mM NaCl gar nicht, mit 160 mM dann in einem kleinen Volumen vollständig eluiert. Es zeigte sich aber auch, dass diese Abstufung nicht "narrensicher"

¹⁴⁶ Im Praktikum Bioanorganische Chemie 2000/2001 von Studenten durchgeführt.

ist. Vermutlich durch mangelnde Sorgfalt bei der Beladung der Säule wurde in einem Lauf MoSto teilweise schon mit 100 mM NaCl eluiert und dadurch über viele Fraktionen verteilt. Das Gleiche geschah im Versuch 3 mit der feineren Abstufung bei der Konzentration 120 mM. Andererseits wurden in drei Läufen Fraktionen mit MoSto als dominierendem Protein erhalten, darunter war jedoch nur ein Lauf, bei dem es auch in einem kleinen Volumen gesammelt werden konnte.

Versuch Nr.	1	2	3	4
pH-Wechsel	+	+	+	—
Stufen der NaCl-Konzentration (jeweils in mM) (Volumen je Stufe jeweils etwa 0,8 · Säulenvolumen)	50	50	50	50
	100	100	80	100
			120	
	160	160	160	160
250	250	250	250	
Fraktionsgröße/mL	10	5	7	10

Mit einem abgestuften Gradienten sind die beiden Ziele "kleines Volumen" und "hohe Reinheit" offenbar nur schwer miteinander vereinbar. Daher wurde als nächstes ein linearer Gradient von 50 bis 250 mM NaCl (im 5-fachen Säulenvolumen) erprobt.

Dieser ergab in allen damit durchgeführten Läufen eine zufriedenstellende Anreicherung von MoSto auf $\geq 50\%$ des Gesamt-Proteins, verteilt auf etwa das 0,8-fache Säulenvolumen. Durch einen steileren Gradienten (im 3,3-fachen Säulenvolumen) konnte bei gleichbleibender Reinheit noch eine stärkere Konzentrierung erreicht werden, MoSto verteilte sich nur noch auf eine Lösungsmenge vom halben Volumen der Säule. Das oben bereits erwähnte lachsrote Protein eignete sich hervorragend als Marker. Die Elution von MoSto begann in der Regel mit dem Auslaufen des "Lachsprotein"-Peaks.

Eine bei einem typischen Lauf durchgeführte Natriumbestimmung an den Fraktionen ergab für den MoSto-Peak eine Na-Konzentration von etwa 105 mM. Da der Standardpuffer (50 mM MOPS pH 6,5) aufgrund der pH-Einstellung mit Natronlauge bereits 8 mM Na^+ enthält, ergab sich eine zur Elution erforderliche Chloridkonzentration knapp unter 100 mM. Dies ist im Einklang mit den o.a. Ergebnissen der Versuche mit einem gestuften Gradienten, wenn man die Ungenauigkeiten der Na-Bestimmung (insbesondere Verdünnungsfehler) und der Gradientenabstufung (insbesondere durch Rückvermischung im Totvolumen über der Säule) berücksichtigt.

3.2.2.3 Zwischenschritt zur Aufkonzentrierung der Proteinlösung

Pienkos/Brill 1981 benutzten, wie oben schon beschrieben, eine Ammoniumsulfat-Fraktionierung mit 20% und 50% Sättigung zum Einengen der MoSto-haltigen Lösung auf ein zum Auftragen auf eine Gelfiltrationssäule geeignetes kleines Volumen. Dabei wird MoSto gleichzeitig weiter gereinigt, wenn auch in geringem Maße.

Bereits beim ersten Versuch, dieses Verfahren zu reproduzieren, nahm ich eine Änderung vor. Da sich nach Einstellung einer 20%-igen Sättigung mit Ammoniumsulfat keinerlei Niederschlag beobachten ließ, erhöhte ich die Konzentration weiter. Bei 36% zeigte sich eine leichte, bei 40% eine starke Trübung. Die Zentrifugation ergab ein kleines braunes Pellet (Fraktion 1), das sich in 3 mL frischem Standardpuffer nicht vollständig wieder auflösen ließ, vermutlich weil auf dieser Stufe denaturierte Proteinanteile mitgefällt werden.

Der Überstand wurde auf 50%-ige Sättigung gebracht, wobei er sich stark trübte. Die Zentrifugation ergab ein großes hellbraunes Pellet, das sich in 3,5 mL frischem Standardpuffer als klare gelbbraune Lösung (Fraktion 2) wieder aufnehmen ließ. Der Überstand der zweiten Fällung bildete die Fraktion 3.

Die Molybdänbestimmung ergab, dass das vorhandene Mo sich jeweils zu gleichen Teilen in den Fraktionen 2 und 3 befand, Fraktion 1 enthielt weniger als 2% des Gesamtgehaltes. Da das Verhältnis Molybdän/Protein bei Fraktion 2 doppelt so hoch lag wie bei Fraktion 3, wurde erstere für die Weiterverarbeitung ausgewählt. Die Untersuchung mit SDS-PAGE belegte später, dass MoSto tatsächlich fast ausschließlich in Fraktion 2 enthalten war.

Spätere Versuche ergaben, dass die Fraktionierungsstufen mit 40% und 50% fast optimal gewählt waren. Absenken der zweiten Stufe führte stets zu unvollständiger Fällung. Um mit Sicherheit kein MoSto mehr im Überstand zu haben, kann hingegen die Sättigung noch geringfügig über 50% gesteigert werden. Die erste Stufe kann relativ problemlos auf 42% erhöht werden. Dadurch steigt jedoch das Risiko, MoSto zum Teil bei den früher ausfallenden Proteinen mit zu fällen, vor allem wenn man, wie ich, festes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zur Fällung einsetzt.

Ich empfehle für eine Anreicherung, bei der Schnelligkeit im Vordergrund steht, die Abstufung 38%—51%, da dabei MoSto mit Sicherheit komplett in die mittlere Fraktion gelangt. Analysen der Fraktionen sind dann überflüssig. Wird höchste Reinheit angestrebt, so kann der Reinigungseffekt der Fraktionierung mit der Abstufung 42%—50% maximiert werden. Dabei sollten allerdings sicherheitshalber die äußeren Fraktionen auf größere MoSto-Verluste geprüft werden.

Zum Wiederaufnehmen des Protein-Niederschlages nach der zweiten Fällungsstufe reichen bei dem von mir verwendeten Maßstab 0,8 μL Standardpuffer völlig aus, die vollständige Lösung des Pellets benötigt dann ein paar Minuten.

Zwischenzeitlich versuchte ich, die Fällung durch eine Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration in einer Rührkammer zu ersetzen. Hintergrund war die Überlegung, das Protein auf diese Weise eventuell schonender zu behandeln als dies bei der Fällung möglich ist.

Verwendet wurde zunächst eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von 100 kg/mol (Amicon YM100), um gleichzeitig kleinere Proteine abzutrennen und so auch bei der Ultrafiltration einen gewissen Reinigungseffekt zu erzielen. Die technischen Einschränkungen für diese Membran (Filtrationsüberdruck maximal 0,7 bar, Proteinkonzentration max. 5 g/L) führten jedoch zu einer sehr langsamen Filtration und erzwangen einen frühen Abbruch, was weder proteinschonend war noch eine

annähernd vollständige Abtrennung kleiner Proteine zuließ. Daher ging ich zu einer Amicon PM30-Membran über. Die Filtration ließ sich damit bis zu einem hinreichend kleinen Restvolumen von etwa 1 mL fortführen, einen Reinigungseffekt hat der Aufkonzentrierungsschritt auf diese Weise freilich nicht mehr. Zudem war die aufkonzentrierte Proteinlösung stets mehr oder weniger stark durch ausgefallenes Protein getrübt und musste vor der Weiterverarbeitung zentrifugiert werden. Dies ließ darauf schließen, dass die Ultrafiltration eher belastender als schonender für das Protein ist, hinzu kamen die unvermeidlichen Proteinverluste durch Anhaftung an der Membran. Daher wurde die Ultrafiltration nach einigen damit durchgeführten Anreicherungen wieder aufgegeben und durch die ursprüngliche Ammoniumsulfat-Fraktionierung ersetzt.

3.2.2.4 Gelfiltration

Das von Pienkos/Brill 1981 benutzte Säulenmaterial Sephadex G100 wurde von vornherein durch Sephadex G150 ersetzt, da G100 aufgrund seiner Ausschlussgrenze von 150 kg/mol weniger geeignet erschien für die genaue Bestimmung der Molmasse von MoSto, welche die beiden Autoren seinerzeit auf 90 bis 100 kg/mol schätzten. Bei G150 liegt die Ausschlussgrenze bei 300 kg/mol. Überraschenderweise wurde die höchste Mo-Konzentration trotz des Wechsels auf G150 in sehr früh eluierten Fraktionen gefunden: beim 1,14-fachen, statt, wie für eine Molmasse um 90 kg/mol zu erwarten gewesen wäre, beim etwa 1,6-fachen des Ausschlussvolumens. Offenbar ist die von Pienkos/Brill 1981 angegebene Molmasse nicht richtig (siehe 3.3.1). Ein weiterer Molybdänpeak zeigte sich noch beim 3-fachen des Ausschlussvolumens, wo er eindeutig nur durch freies, nicht proteingebundenes Molybdat verursacht werden konnte.

Eine Elution so nahe an der Ausschlussgrenze ist für die Reinheit des gewonnenen Proteins nachteilig, da der MoSto-Peak dann unvermeidlich mit dem Ausschlusspeak überlagert und MoSto folglich mit verschiedenen Proteinen höherer Molmasse verunreinigt ist. Auch deshalb benutzte ich für die folgenden Anreicherungen Sephadex G200 (Ausschlussgrenze 600 kg/mol) als Gelfiltrationsmaterial. Auf dieser Säule wurde MoSto etwa beim 1,4-fachen des Ausschlussvolumens eluiert.

Nachteilig wirkte sich beim G200 seine geringe mechanische Beständigkeit aus. Die Säule konnte höchstens mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 0,6 mm/min (entspricht bei der verwendeten Säule einem Volumenstrom von 0,3 mL/min) gefahren werden. Die Elution von MoSto erfolgte dadurch erst 13 Stunden nach dem Auftragen, ein kompletter Lauf (500 mL bis zur Elution aller aufgetragenen Substanzen) beanspruchte 28 Stunden. Selbst bei dieser niedrigen Flussrate aber wurden die G200-Gelpartikel durch den Pumpendruck beschädigt, was sich in nach und nach immer unschärfer werdenden Peaks zeigte. Nach etwa einem halben Dutzend Anreicherungen, was mit Testläufen und Reinigung schätzungsweise 10 L Durchfluss entspricht, begannen Bruchstücke des Gelmaterials aus der Säule auszutreten, sie war damit endgültig unbrauchbar geworden und musste erneuert werden. Aufgrund dieser Probleme wurden vollständige Aufreinigungen mit Gelfiltration nur durchgeführt, sofern unbedingt eine möglichst reine MoSto-Probe für eine bestimmte Untersuchung benötigt wurde.

Versuche zur weiteren Optimierung des letzten Anreicherungs-schrittes unterblieben. Solche Versuche wären möglich gewesen, nachdem Superdex 200 (S200) als Ersatz für das nicht mehr lieferbare Sephadex G200 beschafft wurde. S200 gestattet eine zehnmal höhere Flussrate als G200, erwies sich als lange beständiges Material und lieferte von Anfang an schärfere Peaks und damit bessere Auftrennung und geringere Verdünnung der Proteine. Diese geringere Verdünnung und die schnellere Durchführung eines Gelfiltrationslaufes bedeuten schonendere Behandlung der Proteine und wirkten sich daher auch positiv auf die Qualität des Produktes aus. Leider wurde das Superdex 200 erst kurz vor dem Abschluss meiner Arbeiten beschafft, so dass mir ausführliche Versuche damit nicht mehr möglich waren.

Deutliche Wirkung zeigte der Wechsel von Sephadex G200 zu Superdex 200 vor allem beim spezifischen Molybdängehalt des Präparates. Mit G200 ergaben sich je nach Anreicherung und Analyse-methode Werte zwischen 125 und 240 $\mu\text{mol Mo je g Protein}$ ¹⁴⁷. In den Anreicherungen mit Superdex 200 wurden hingegen für die MoSto-Peakfraktionen Werte von 299 und 569 $\mu\text{mol/g}$ ermittelt. Der in den G200-Gelfiltrationen auftretende breite Mo-Peak am Beginn des niedermolekularen Bereiches war mit Superdex 200 nicht mehr vorhanden, statt dessen zog sich hinter dem MoSto-Peak ein langer (etwa siebenfache Breite des Peaks) Bereich hin, in dem bei schwankendem und schließlich auf Null abfallendem Proteingehalt die Mo-Konzentration niedrig und fast konstant war.

Offenbar gibt isoliertes MoSto in verdünnter Lösung langsam Mo ab, bis zu einem Gehalt von etwa 150 $\mu\text{mol/g}$. Die restlichen Mo-Atome sind fester gebunden und bleiben auch unter ungünstigen Bedingungen erhalten. Bei der langen Dauer eines G200-Laufes geht das proteingebundene Mo bis auf diesen Restgehalt verloren und sammelt sich im niedermolekularen Bereich als Peak an. In der kürzeren Zeitspanne, die ein Superdex 200-Lauf dauert, geht nur ein kleiner Teil des Mo verloren, der als "Bremsspur" hinter dem Peak sichtbar wird (siehe Abbildung 7.1 im Anhang).

3.2.3 Bilanz der Optimierungsversuche und weitere Verbesserungsmöglichkeiten

Das von Pienkos/Brill 1981 beschriebene Verfahren erwies sich als grundsätzlich reproduzierbar und geeignet. Im Detail stellte ich allerdings zahlreiche Abweichungen von den Angaben dieser Autoren fest, so dass Verbesserungen gegenüber einem reinen "Nachkochen" erforderlich, aber auch möglich waren. Die Anreicherung konnte zudem durch einige Änderungen und den Wegfall eines Teilschrittes beschleunigt und vereinfacht werden. Eine drastische Verbesserung wurde aber vor allem in der letzten Anreicherungsstufe möglich durch den Einsatz eines anderen Gelfiltrationsmaterials, das Pienkos/Brill seinerzeit noch nicht zur Verfügung stand. Der Zeitaufwand für die Chromatographie verringerte sich um 90%, die Qualität des Produktes wurde erhöht, was sich an dem spezifischen Mo-Gehalt zeigt, der doppelt so hoch liegt wie von Pienkos/Brill 1981 angegeben.

¹⁴⁷ Pienkos/Brill 1981 hatten 161 $\mu\text{mol/g}$ berichtet.

Folgende Versuche erscheinen mir sinnvoll, um eventuell weitere Verbesserungen zu erreichen:

Änderung der Abfolge der einzelnen Stufen: Hoch gereinigtes MoSto scheint empfindlicher für Denaturierung zu sein als MoSto in Gegenwart anderer Proteine. Dies gilt insbesondere für verdünnte Lösungen. Daher sollte man eventuell die Superdex 200-Gelfiltration vor der DEAE-Chromatographie durchführen. MoSto wäre so auf der Gelfiltrationssäule noch mit anderen Proteinen zusammen und dadurch geschützt. Um die Gelfiltrationssäule nicht mit Protein zu überladen, wäre die Ammoniumsulfat-Fraktionierung als erster Schritt einzusetzen.

Erprobung anderer Anionenaustauschermaterialien (z.B. Q-Sepharose)

Untersuchung der Fremdproteine: Ich habe nach der DEAE-Chromatographie stets diejenigen Fraktionen zur Weiterverarbeitung ausgewählt, in denen MoSto das dominierende Protein darstellte. Es könnte aber sein, dass eventuell einige dieser Fraktionen weniger geeignet sind, da sie ein in den folgenden Stufen schwer entfernbares Fremdprotein enthalten, während andere Fraktionen mit geringem MoSto-Anteil sich vielleicht leicht weiter reinigen lassen. Um dies zu prüfen, müsste das MoSto-haltige Eluat der DEAE-Säule fraktionsweise aufgeteilt in die folgenden Anreicherungsstufen eingebracht werden. Für erste Versuche dürfte es genügen, es grob nach Vor-, Haupt- und Nachlauf-Fraktionen aufzuteilen.

Vergrößerung des Maßstabes: Mit Anlagen im Technikumsmaßstab ließen sich größere Mengen MoSto gewinnen, entsprechende Anlagen stünden im Prinzip an der Universität Bielefeld zur Verfügung. Das Protein ließe sich im Voraus für die verschiedensten Versuche gewinnen, wodurch die zeit- und arbeitsaufwändigen ständigen Zellanzuchten und Anreicherungen vor neuen Untersuchungen entfielen. Vor allem für Versuche zur Proteinkristallisation dürfte es vorteilhaft sein, auf einen größeren Vorrat eines MoSto-Präparates mit einheitlichen Eigenschaften zugreifen zu können, Schwankungen von Fremdproteinanteilen, Konzentration und spezifischem Molybdängehalt würden die Reproduzierbarkeit nicht mehr beeinflussen.

3.3 Struktur der Protein-Komponente

3.3.1 Untereinheitenstruktur und Molekülmassen

3.3.1.1 Gesamtmasse

Die in der ersten Anreicherung verwendete Sephadex G150-Gelfiltrationssäule (siehe 3.2.2.4) wurde nachträglich für die Molmassenbestimmung kalibriert und anschließend anhand des Elutionsvolumens die Molmasse von MoSto zu 239 kg/mol berechnet. Obwohl G150 nicht optimal für die Bestimmung einer Molmasse dieser Größe ist, die nahe an der Ausschlussgrenze des Materials liegt, blieb dies der zuverlässigste Wert, den ich durch Gelfiltration bestimmen konnte. Die Versuche, die Molmasse mit einer Gelfiltration auf G200 zu bestimmen, lieferten aufgrund der problematischen Handhabung

dieses Materials keine wirklich verlässlichen Ergebnisse. Aus insgesamt acht Läufen ergab sich als Mittelwert eine Molmasse von 207 kg/mol, wobei aber die einzelnen Werte von 79 bis 425 kg/mol (sic!) reichten.

Es ergab sich jedoch im Rahmen der Arbeit die Möglichkeit, eine Bestimmung der Molekülmasse mit Röntgenstreuung (SAXS) durchzuführen¹⁴⁸. Diese Messung ergab eine Masse von 247 kg/mol, was die erste Bestimmung durch G150-Gelfiltration sehr zufriedenstellend bestätigte. Allerdings ist auch dieser zweite Wert mit erheblichen Unsicherheiten behaftet. Dies liegt vor allem daran, dass für die Messung mit SAXS der Proteingehalt der Probenlösung genau bekannt sein muss, die Ergebnisse kurzfristig wiederholter Bestimmungen mit dem BCA-assay können jedoch durchaus um 20-30% voneinander abweichen.

Später konnte ich die genaue Masse der Untereinheiten aus der Aminosäuresequenz ermitteln. Da offenbar beide Untereinheiten zu gleichen Teilen vorhanden sind, waren nun nur noch bestimmte Werte für die Gesamtmasse möglich:

Proteinkomplex	Masse/g/mol
Hexamer $\alpha_3\beta_3$	172.237
Oktamer $\alpha_4\beta_4$	229.649
Dekamer $\alpha_5\beta_5$	287.062

Die Werte für die hexamere und die dekamere Struktur weichen so weit von den experimentellen Werten ab, dass sie trotz der Ungenauigkeiten bei den beiden Bestimmungsverfahren ziemlich sicher ausgeschlossen werden können. MoSto dürfte demnach als Oktamer mit einer Molmasse von 230 kg/mol vorliegen. Möglicherweise ist das Molekül durch Hohlräume zur Aufnahme des Mo vergrößert, so dass die verwendeten Bestimmungsmethoden systematisch die Molekülmasse ein wenig zu hoch schätzten, weil beide im Grunde das Molekül-Volumen ermitteln.

3.3.1.2 Untereinheiten

Die Molybdänanalyse und die erfolgreiche Anreicherung des Mo-Speicherproteins ermöglichten die Identifizierung der zugehörigen Banden in der SDS-PAGE. Die Angabe, dass MoSto aus gleichen Mengen zweier Untereinheiten mit geringfügig verschiedenen Massen bestehe, wurde bestätigt. Regelmäßig zeigten die Gele eine auffällige Doppelbande bei ungefähr gleicher Laufstrecke wie das Enzym Carboanhydrase im verwendeten Molmassen-Marker-Gemisch.

¹⁴⁸ Die Grundlagen von SAXS sind in "Materialien und Methoden", Abschnitt 5.5.1 dargestellt.

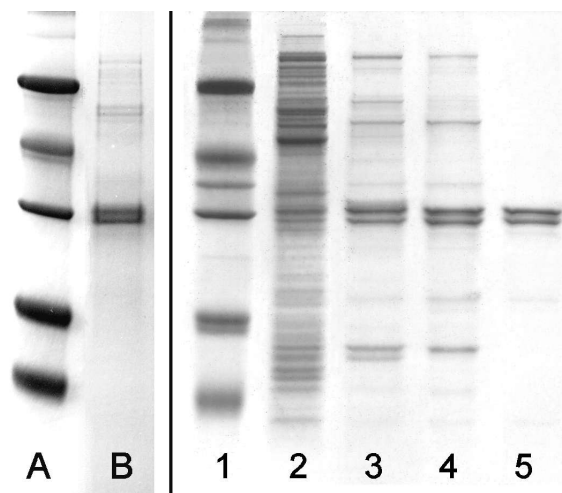


Abbildung 3.5: MoSto in der SDS-PAGE. Links das Endprodukt der ersten erfolgreichen Anreicherung. A: Molmassen-Marker mit Banden bei 66; 45; 29; 20,1 und 14,2 kg/mol (5-fach-Marker). B: Mo-Peakfraktionen der G150-Gelfiltration.

Rechts Produkte der einzelnen Anreicherungsschritte bei einer späteren Anreicherung.

1: Molmassen-Marker wie oben, zusätzliche Bande bei 36 kg/mol (6-fach-Marker).

2: Rohextrakt.

3: Proteinlösung nach DEAE-Anionenaustauscherchromatographie;

4: nach Ammoniumsulfatfraktionierung;

5: nach S200-Gelfiltration.

Die Lage der MoSto-Doppelbande auf gleicher Höhe mit Carboanhydrase ($M = 29$ kg/mol) zeigte jedoch auch, dass die bisher angenommenen Massen der Untereinheiten von 24 bzw. 21 kg/mol nicht zutreffen konnten. Mit Hilfe des 5-fach Molmassen-Markers (Abbildung 3.5) wurde eine eigene Berechnung angestellt, die zur Sicherheit mit zwei verschiedenen Puffersystemen durchgeführt wurde. Üblicherweise nimmt man für eine solche Berechnung an, dass die von einem Polypeptid in der SDS-PAGE zurückgelegte Laufstrecke d proportional zum Logarithmus seiner molaren Masse M ist. Da aber in einer Auftragung von $\log M$ über d für die Markerproteine die Werte augenscheinlich systematisch vom linearen Zusammenhang abweichen, entschied ich mich dafür, abweichend vom üblichen Verfahren mich der von den Marker-Werten gebildeten Kalibrierkurve mit Polynomen möglichst gut anzunähern.

Marker-Masse/kg/mol		Tris-Glycin-	Tris-Tricin-
		Gel 12,8%	Gel 12,5%
		Laufstrecke/cm	
66		1,8	1,9
45		2,8	3,1
29		3,6	4,4
20,1		5,2	5,9
14,2		6,2	7,3
α -MoSto	Strecke	3,6	4,5
	Masse	31,8	28,1
β -MoSto	Strecke	3,7	4,7
	Masse	30,1	26,5

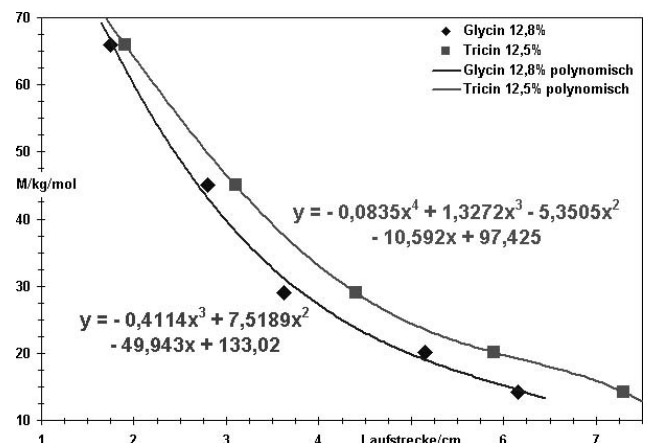


Abbildung 3.6: Ermittlung der Molmassen der MoSto-Untereinheiten aus SDS-PAGE mit zwei verschiedenen Puffersystemen.

Mit den Formeln der gefundenen Ausgleichskurven wurden die Massen der Untereinheiten zu 29,9 und 28,3 kg/mol berechnet¹⁴⁹ (Mittelwerte für die beiden unterschiedlichen Puffersysteme).

Mit einer gefriergetrockneten Probe wurden später durch MALDI-TOF- Massenspektrometrie mit die Molmassen zu 29,12 (α -Untereinheit) und 28,15 (β -Untereinheit) kg/mol bestimmt¹⁵⁰. Die Berechnung der Molmassen aus der Aminosäurezusammensetzung (siehe im folgenden Abschnitt) bestätigte diese Werte.

3.3.2 Aminosäuresequenz

Die beiden verschiedenen Untereinheiten wurden durch Tris-Tricin-SDS-PAGE voneinander getrennt und durch Edman-Abbau wurde die Sequenz der N-Enden bestimmt¹⁵¹. Bei der schwereren Untereinheit gelang die Bestimmung der ersten 27, bei der leichteren die Bestimmung der ersten 35 Aminosäuren. Nachdem Mitte des Jahres 2002 das *Azotobacter Genome Project*¹⁵² seine Arbeit abgeschlossen hatte, wurde in der dort zur Verfügung stehenden Gendatenbank nach diesen Sequenzen gesucht. Es fanden sich zwei Gene mit jeweils nahezu identischer Startsequenz. In der nachstehenden Übersicht sind die durch Edman-Abbau selbst bestimmten Sequenzen (jeweils oben stehend) den aus dem Genom übersetzten Sequenzen gegenübergestellt.

schwere (α -)Untereinheit:

(T) D T T N	S I K H ?	I S P L A	A/R Q (T) P/L Q	D ? D E T	(N) (P)
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

leichte (β -)Untereinheit:

(A) N S T A	E L E E L	L T Q R S	L T D P Q	L Q A (A) (A)	(A) (A) ? (A) D	F R I L P
M A N S T A	E L E E L	L M Q R S	L T D P Q	L Q A A A	A A A A D	F R I L P

(es bedeuten: (X) Bestimmung unsicher; X/Y zwei Möglichkeiten; ? keine Aminosäure detektierbar)

Die Übereinstimmung der Sequenzen ist eindeutig. Auch dort, wo bei der Analyse die Bestimmung unsicher war, stimmt die gefundene Aminosäure meist mit der aus dem Genom übersetzten überein. Das Entfernen des als Startsignal dienenden Methionin-1 ist eine so häufig vorkommende posttranslationale Modifikation, dass man davon ausgehen kann, dass diese Aminosäuren im funktionellen MoSto tatsächlich nicht vorhanden sind. Da die beiden Gene zudem unmittelbar hintereinander auf dem selben Operon liegen und die aus der zugehörigen vollständigen Aminosäuresequenz berechneten Molmassen mit 29.188 bzw. 28.225 g/mol sehr gut mit den massenspektrometrisch und durch SDS-PAGE bestimmten Massen der MoSto-Untereinheiten übereinstimmen, kann als sicher gelten, dass MoSto in diesen Genen codiert ist.

¹⁴⁹ Die "richtige" Methode ergab die Werte 31,9 und 30,2 kg/mol. Die späteren Resultate belegen, dass das Abweichen vom üblichen Verfahren berechtigt war.

¹⁵⁰ Durchgeführt von Dr. Mathias Letzel im Arbeitskreis Organische Chemie III der Universität Bielefeld.

¹⁵¹ Sequenzanalyse durchgeführt von Marc-Oliver Luther am Lehrstuhl Biochemie I der Universität Bielefeld.

¹⁵² www.azotobacter.org

Die aus dem Genom übersetzten Sequenzen der Untereinheiten sind auf Seite 68 in Tabelle 3.1 einander gegenübergestellt. Bei dem gewählten Alignment sind 113 der 276 bzw. 270 Aminosäuren identisch, was 42% Identität entspricht. Die beiden Untereinheiten haben sich also vermutlich aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen entwickelt.

Eine detaillierte Übersicht der quantitativen Aminosäurezusammensetzungen findet sich im Anhang (Tabelle 7.2).

3.3.2.1 Homologe von MoSto in anderen Organismen

Die automatisierte Suche nach verwandten Sequenzen in allen Einträgen in Online-Proteindatenbanken, eine BLAST-Recherche¹⁵³, förderte drei Einträge zu Tage, die extrem hohe Ähnlichkeit mit den MoSto-Untereinheiten aufweisen¹⁵⁴.

Zwei davon stammen aus dem kürzlich sequenzierten Genom von *Rhodopseudomonas palustris*¹⁵⁵. Die unmittelbar hintereinander liegenden Gene *rpa1441* und *rpa1442* codieren Polypeptide mit 273 bzw. 270 Aminosäuren, von denen das längere zu 80,7 % mit der MoSto- α -Untereinheit, das kürzere zu 84,8 % mit der MoSto- β -Untereinheit identisch ist, wobei das Alignment jeweils über die gesamte Länge reicht und fast bzw. vollständig lückenlos ist. Die Übereinstimmungen sind so frappierend, dass kaum ein Zweifel bestehen kann: *R. palustris* verfügt über ebenso ein Molybdän-Speicherprotein wie *A. vinelandii*.

Ein weiteres mit der MoSto- β -Untereinheit eng verwandtes Protein ist in dem Gen *pRhico094* auf dem sogenannten pRhico-Plasmid aus *Azospirillum brasilense*¹⁵⁶ codiert. Dieses Genprodukt ist 318 AS lang, die Überlappung mit MoSto- β umfasst jedoch nur 253 AS. Das Alignment ist jedoch ebenfalls lückenlos, die Identität der Sequenzen beträgt 85,4 %. Für ein MoSto- α entsprechendes Peptid gibt es an dieser Stelle keine Anzeichen. Natürlich wäre es auch denkbar, dass ein MoSto bei einem anderen Organismus als Homopolymer nur aus einem Typ Untereinheit aufgebaut ist. Dass hier dieser Fall vorliegt, kann jedoch aufgrund der Unterschiede der Sequenzen (d.h. der insgesamt 82 AS langen "überstehenden Enden") nur als Möglichkeit postuliert werden.

3.3.3 Höhere Strukturen

Als vor über 50 Jahren die Struktur der DNA entschlüsselt wurde, löste dieser Erfolg allgemeine Begeisterung in den Naturwissenschaften aus. Als fünf Jahre darauf die erste Struktur eines globulären Proteins (des Myoglobins) aufgeklärt wurde, waren wissenschaftliche Leistung und Erfolg wohl kaum geringer, doch herrschte jetzt allgemeine Enttäuschung, sogar bei den Entdeckern selbst, die in der

¹⁵³ BLAST-Methodik: Altschul &al. 1997.

¹⁵⁴ Das komplette Alignment mit diesen drei engst verwandten Sequenzen befindet sich im Anhang, Tabelle 7.6, Seite 148.

¹⁵⁵ Larimer &al. 2004.

¹⁵⁶ Vanbleu &al. 2004.

Veröffentlichung frustriert geschrieben, das vielleicht hervorstechendste Merkmal der Struktur sei ihre Komplexität und das Fehlen von Symmetrie und jener Art von Regelmäßigkeiten, die man instinktiv erwarte, das Molekül sei komplizierter als jede Theorie der Proteinstruktur vorhergesagt habe¹⁵⁷.

Das Problem ist geblieben: Proteinstrukturen sind komplex und unregelmäßig, und bei jeder Strukturklärung muss Sisyphos den Stein aufs Neue auf den Berg schaffen. Immerhin lassen sich aufgrund der in den seither vergangenen Jahrzehnten gesammelten Information einige Aussagen über die dreidimensionale Struktur eines Eiweißstoffes auch ohne Röntgenkristallstrukturanalyse wagen.

3.3.3.1 Sekundärstrukturvorhersage

Tabelle 3.1: Manuelles Alignment der aus dem *A. vinelandii*-Genom übersetzten Sequenzen der beiden MoSto-Untereinheiten (ohne Starter-Methionin, Nummerierung der Aminosäuren beginnt mit 2). Identische Aminosäuren sind schwarz, homologe grau unterlegt.

Unter den Sequenzen sind die Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage angegeben.

H = α -Helix; L = Schleife (loop); S = β -Faltblatt (sheet); weitere Erläuterungen im Text.

α	TDTTNSIKHVISPLARQTLQDRDLTRPVAGKRPIRLLPWLQVVKIGGR·VMDRGADAILPLVEELRKLLP	70
β	ANSTAELEELLMQRSLLTDPQLQAAAAAADFRILEDATVIKIGGQSVIDRGRAAVYPLVDEIVAAARK	68
	HHHHHHHHHH L HH SSSSS HHHHHHHHHHH	
α	EHRLLLTGAGVRARHVESVGLDLGLVPGSLAPLAASEAGONGHILAAMLASEGVSYVEHPTVADQLAH	140
β	NHRLLLCTGAGTRARHLYSIAAGLGLFACVLAQLGSSVADQNAAMLGQLLAKHGI PVVGGAGLS·AVPLS	137
	LL SSSSS HHHHHHHHHHH LLL HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH LLL	
α	LSATRAVVGSAPFPYHHHEFFGSR·IPPHRADTGAFLLA DAFGAAGLTIVENVDCITYTADENGPDRGQA	208
β	LAEVNAVVFESGMPPYKLWMPAAEGVLPFYRTDAGCFLLAEQFGCKQMIKDEDCLYTANF·KTSKDA	205
	HH LL HHHHHHHHH L SSSSS SS LLLL H	
α	REFPETSATDL·AKSEGPLPVDRALLDVMATARHLERVQVVNGLVPCRLTAALRGEHVGTLLIRTGVRPA*	276
β	TFEPRISVDEMKAAGLHDSILEFPVLDLLOSAQHVREVVQVVNGLVPCNLTALAGEHVGTLLITAS*	270
	HHHHH HHHHHH HHHHHHHHHHH LLSSSS HHHHH SSS	

Da MoSto aus zwei unterschiedlichen, aber miteinander verwandten Untereinheiten aufgebaut ist, kann man einige allgemeine Aussagen über die dreidimensionale Struktur bereits durch eine einfache Analyse der Sequenzen machen. Zunächst einmal ist naheliegend, dass beide Untereinheiten die gleiche Struktur aufweisen. Diese Vermutung lässt sich argumentativ anhand der Konservierung bestimmter Aminosäuren stützen. Das Alignment der Sequenzen (Tabelle 3.1) ist 265 Aminosäuren lang, von denen 113 paarweise identisch sind, d.h. 42,6 %. Mit diesem allgemeinen Wert kann nun der Konservierungsgrad bestimmter für die Struktur wichtiger Aminosäuren verglichen werden.

1. *Glycin und Prolin*. Die Möglichkeiten, bestimmte Konformationen einzunehmen, sind für Glycin wegen der fehlenden Seitenkette vielfältiger, bei Prolin hingegen aufgrund der Ringstruktur beschränkter als bei allen anderen Aminosäuren. Ein Austausch von Pro oder Gly kann daher an bestimmten Stellen im Protein die Sekundär- und Tertiärstruktur deutlich beeinflussen. Glycin

¹⁵⁷ Kendrew, John C.; Bodo, G.; Dintzis, H.M.; Parrish, R.G.; Wyckoff, H.; Phillips, D.C.: A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature* 181 (1958) 662-666.

ist zu 57,7/60,0 % konserviert, Prolin zu 52,4/73,3 % (Prozentangaben jeweils bezogen auf den Gehalt der α -/ der β -Untereinheit), beide sind also deutlich überdurchschnittlich konserviert.

2. *Hydrophobe Aminosäuren.* MoSto ist ein lösliches Protein, das zudem eine erhebliche Menge Metallat-Ionen bindet. Daher ist zu vermuten, dass Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten beim gefalteten Protein größtenteils im Inneren verborgen liegen und dort die Struktur durch hydrophobe Wechselwirkung stabilisieren. Der Konservierungsgrad hydrophober Reste liegt mit 49,4% wenig über dem Durchschnitt. Allerdings können sich hydrophobe Aminosäuren i.d.R. untereinander ersetzen (Leu/Ile/Val und Tyr/Phe). Rechnet man zu den 41 paarweise identischen die 18 funktionell einander entsprechenden hydrophoben Aminosäuren hinzu, ergibt sich eine Übereinstimmung von 71,1 %.

Diese beiden Befunde lassen als sicher erscheinen, dass die räumliche Struktur der beiden MoSto-Untereinheiten die gleiche ist.

Mit Hilfe der in Strukturdatenbanken gesammelten Information kann ein geeignetes Computerprogramm anhand der Aminosäuresequenz eines Proteins die Sekundärstruktur detailliert vorhersagen¹⁵⁸. Obwohl die Trefferquote einer solchen Vorhersage mit bis zu 85 % immer noch recht gering ist, kann sie wichtige Hinweise liefern. Die Zuverlässigkeit der Vorhersage kann in unserem Fall noch gesteigert werden, da zwei unterschiedliche Sequenzen vorliegen, die, wie oben dargelegt, die gleiche Struktur ergeben sollten. Das Resultat der Vorhersage ist in Tabelle 3.1 eingetragen, berücksichtigt wurden dabei nur Bereiche, in denen das Resultat für beide Untereinheiten das gleiche war, für Schleifen nur dann, wenn zusätzlich die geschätzte Zuverlässigkeit der Vorhersage für beide Untereinheiten jeweils über 82 % betrug.

3.3.3.2 Vergleich mit bekannten Protein-Sequenzen und -Strukturen

Bei einem Vergleich der MoSto-Sequenz mit bekannten Aminosäuresequenzen anderer Proteine liegt am nächsten, andere Molybdat enthaltende Eiweiße (siehe Abschnitt 2.3.2) heranzuziehen. Dazu wurde zunächst "nach Augenschein" nach Ähnlichkeiten mit der Konsenz-Sequenz der Mop-Domäne (Tabelle 2.5) gesucht, jedoch ließ sich keines der charakteristischen Muster wie z.B. das Motiv (S/T)-A-R-N entdecken.

Anschließend wurde ein Alignment-Programm benutzt¹⁵⁹. Mit dessen Hilfe wurden die Sequenzen beider Untereinheiten jeweils mit der Mehrheits-Sequenz der Mop-Domäne (Tabelle 2.5) und mit der Sequenz von A.v. ModA¹⁶⁰ verglichen. Zusätzlich wurde die β -Untereinheit mit der Mop-Domäne aus A.v.-ModC und die α -Untereinheit mit dem vollständigen *H. influenzae* ModE verglichen. In allen Fällen wurden nur kurze Abschnitte mit ähnlicher Sequenz gefunden, die nicht signifikant waren, d.h.

¹⁵⁸ siehe in "Materialien und Methoden", Abschnitt 5.4.2.

¹⁵⁹ siehe in "Materialien und Methoden", Abschnitt 5.4.1.

¹⁶⁰ Luque, F.; Mitchenall, L.A.; Chapman, M.; Christine, R.; Pau, Richard N.: Characterization of genes involved in molybdenum transport in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Microbiology* 7 (1993) 447-459.

es handelt sich höchstwahrscheinlich um zufällige Übereinstimmungen. Offenbar ist MoSto überhaupt nicht mit den Mop-Proteinen oder ModA verwandt und stellt einen völlig neuen Typ von Molybdoprotein dar.

Der nächste Schritt war eine automatisierte Suche nach verwandten Sequenzen in allen Einträgen in Online-Proteindatenbanken, eine BLAST-Recherche¹⁶¹. Diese Suche lieferte (abgesehen von den in 3.3.2.1 beschriebenen mutmaßlichen Homo- bzw. Analogen) als nächste Verwandte von MoSto eine Familie von bakteriellen Uridylatkinasen, Enzymen, die die Reaktion



katalysieren. Dieses allgemeine Resultat ergab sich bei beiden Untereinheiten, wenn auch im einzelnen die am engsten mit der jeweiligen Untereinheit verwandten Proteine jeweils andere sind. Als entferntere Verwandte finden sich auch andere Phospho-Transferasen.

Ein Problem bei der Bewertung dieses Befundes ist, dass die gefundenen verwandten Proteine nur unzureichend charakterisiert sind. Zum größten Teil handelt es sich um nur hypothetische Proteine, deren Aminosäuresequenz aus einer Nukleotidsequenz übersetzt und deren Existenz und Funktion anhand der Ähnlichkeit mit anderen Sequenzen postuliert wurde. Keines der 30 MoSto-ähnlichsten gefundenen Proteine ist strukturell charakterisiert. In der PSI-BLAST-Rangliste für die leichtere β -Untereinheit findet sich der erste (und einzige) Eintrag mit einer PDB-Kennung auf Platz 389 (von 513), bei der α -Untereinheit gibt es überhaupt keinen solchen Eintrag (unter 253 Treffern).

Das BLAST-Ergebnis passt auf jeden Fall gut zu dem Befund¹⁶², demzufolge ATP oder ADP für den Austausch von MoSto-gebundenem Wolframat durch Molybdat erforderlich sei. Ein gemeinsames Strukturmerkmal sehr vieler (keineswegs aller!) ATP-bindender Proteine ist die sogenannte P-Schleife¹⁶³, ein etwa ein Dutzend Aminosäuren kurzer, Glycin-reicher Abschnitt, der das terminale Phosphat des ATP festhält, wobei die Bindung vor allem durch H-Brücken von den NH-Gruppen des Peptid-Rückgrates erfolgt. Ein grober Vergleich der P-Schleifen aus strukturell charakterisierten Uridylatkinasen mit der MoSto-Sequenz ergab, dass im Bereich 74-79 der β -Untereinheit eventuell ein solches Motiv vorliegt. Der entsprechende Bereich der α -Untereinheit liegt bei 77-82, die Ähnlichkeit ist hier weniger ausgeprägt. Auch dieser Befund ist mit Vorsicht zu bewerten, da sich für die P-Schleifen verschiedener Proteine keine wirklich allgemein gültigen Übereinstimmungen angeben lassen. Es gibt eine Vielzahl von Varianten des Motivs, was bei der Bedeutung der Energiemünze ATP im Stoffwechsel nicht weiter verwunderlich ist. Vermutlich sind Übereinstimmungen sowohl durch divergente als auch durch konvergente Evolution entstanden, d.h. es handelt sich teils um homologe, teils um analoge Strukturen¹⁶⁴. Um eine eindeutigere Entscheidung treffen zu können, wurden für einen

¹⁶¹ BLAST-Methodik in: Altschul &al. 1997.

¹⁶² Allen &al. 1999. (Siehe auch 1.1.1),

¹⁶³ Saraste/Sibbald/Wittinghofer 1990.

¹⁶⁴ Saraste/Sibbald/Wittinghofer 1990, 430-432.

genaueren Vergleich drei unterschiedliche Gruppen von bekannten Sequenzen aus der Literatur ausgewählt und in Tabelle 3.2 zusammengestellt:

(A) drei Nucleotid-Kinasen, für die Röntgenstrukturuntersuchungen vorliegen: die beiden einzigen in der Brookhaven PDB enthaltenen Uridylatkinasen sowie eine willkürlich ausgewählte Thymidylatkinase:

- Uridylatkinase (EC 2.7.4.-) aus *Dictyostelium discoideum* (Schleimpilz) mit dem Inhibitor P1-(5'-Adenosyl) P5-(5'-uridyl)-pentaphosphat (UP5A) und Mg^{2+} ; PDB-Eintrag 1UKE
- Uridylatkinase aus *Saccharomyces cerevisiae* mit zwei ADP-Molekülen; PDB-Eintrag 1UKY
- Thymidylatkinase (ATP:dTMP-phosphotransferase, EC 2.7.4.9) aus *Mycobacterium tuberculosis* mit 5-Hydroxymethyl-desoxyuridin-monophosphat und Sulfat-Ionen; PDB-Eintrag 1MRS

Mit Hilfe der PDB-Strukturdatei wurde jeweils der Abschnitt mit der P-Schleife ausfindig gemacht und von Hand ein Alignment mit der mutmaßlichen P-Schleife des MoSto durchgeführt.

(B) Da keines der obigen drei Proteine zu denen gehört, die die PSI-BLAST-Recherche als Verwandte der MoSto-Untereinheiten liefert, sind aus diesen zusätzlich vier Beispiele ausgewählt:

- Acetylglutamatkinase (ATP:N-Acetyl-L-glutamat-5-phosphotransferase, EC 2.7.2.8) aus *E. coli* mit dem ATP-Modell Adenosin-5'-[β , γ -imido]-triphosphat (AMPPNP); PDB-Eintrag 1GS5; das einzige strukturell charakterisierte Ergebnis der PSI-BLAST-Recherche
- mutmaßliche Uridylatkinase aus *Thermoanaerobacter tengcongensis*; SwissProt-Eintrag Q8RA23|PYRH_THETN (1; 4)
- mutmaßliche Uridylatkinase aus *Fusobacterium nucleatum*; SwissProt-Eintrag Q8R6G5|PYRH_FUSNN (3; 6)
- mutmaßliche Uridylatkinase aus *Synechocystis* sp. (Stamm PCC 6803); SwissProt-Eintrag P74457|PYRH_SYNY3 (11; 1)

Bei den drei letzteren handelt es sich um jene Proteine, die im PSI-BLAST-Ergebnis im Mittel bei beiden MoSto-Untereinheiten die drei vordersten Plätze belegten, die Zahlenpaare hinter den SwissProt-Kennungen geben jeweils die "Platzierung" beim Vergleich mit der α - und der β -Untereinheit an. Alle drei Proteine sind nur durch Übersetzung der Sequenz aus dem Genom bekannt. Das in Tabelle 3.2 für die vier Proteine der Gruppe B gezeigte Alignment ist nicht ganz identisch mit dem automatisch durch BLAST erzeugten, welches jeweils einige Auslassungen in den Vergleichsequenzen enthielt. Diese Lücken wurden ausgefüllt, das Alignment der charakteristischen Glycin-Tripel als "Anker" beibehalten.

(C) Als dritten und letzten Vergleich enthält Tabelle 3.2 die von Saraste & al.¹⁶⁵ postulierten konservierten übereinstimmenden Sequenzen der P-Schleife allgemein und für den Sonderfall der Nucleotid-Kinasen.

¹⁶⁵ Saraste/Sibbald/Wittinghofer 1990.

Tabelle 3.2: Vergleich der möglichen P-Schleife in MoSto mit dem entsprechenden Abschnitt eines MoSto-ähnlichen Proteins bzw. mit P-Schleifen aus strukturell charakterisierten Proteinen. Übereinstimmungen von MoSto mit den Vergleichssequenzen sind durch schwarze (identische Aminosäuren) bzw. graue (funktionelle Ähnlichkeit) Unterlegung markiert.

	α -MoSto; 70-89	PEHRLILITGAGVRRARHVFS
	β -MoSto; 67-86	KNHKILITGAGTRARHLYA
A	<i>D. discoideum</i> Uridylatkinase 1UKE; 9-28	VFVLGGPESGKGTQCANIVR
	<i>S. cerevisiae</i> Uridylatkinase 1UKY; 18-37	IFVLGGPAGKGTQCEKLVK
	<i>M. tuberculosis</i> Thymidylatkinase 1MRS; 3-22	IAIEGVDCAGKRILVEKLSG
B	<i>E. coli</i> AGP-Transferase 1GS5; 34-53	HQRPLIVIVHGGCVVREIMK
	<i>Th. tengcongensis</i> Uridylatkinase Q8RA23; 44-63	LGVQIGLVVGGNIWRGRDA
	<i>F. nucleatum</i> Uridylatkinase Q8R6G5; 44-63	LGVEVSLIVIGGGNIFRGLSG
	<i>Synechocystis</i> Uridylatkinase P74457; 61-80	AGVQLAIVVGGNIFRGVKA
C	allgemeine P-Schleifen-Konsens-Sequenz	----GXXXXGKT-----
	Konsens-Sequenz für AMP- und UMP-Kinasen	----GXPGXGKGT-----

Es zeigt sich deutlich, dass die laut BLAST-Resultat mit MoSto verwandten Proteine der Gruppe B wenig Ähnlichkeit mit den von Saraste & al. postulierten Motiven der P-Schleife aufweisen, wohingegen sich diese sehr deutlich in den röntgenographisch charakterisierten Kinasen der Gruppe A wiederfinden. Die MoSto-Untereinheiten scheinen zwischen den beiden Gruppen zu liegen, wobei seltsamerweise der entsprechende Abschnitt der α -Untereinheit mehr der Gruppe B¹⁶⁶, derjenige der leichteren β -Untereinheit mehr der Gruppe A ähnelt. Worauf dieser Befund auch hindeuten mag, es ist jedenfalls nicht nur für A, sondern auch für eine der Sequenzen aus B eindeutig durch eine Strukturbestimmung mit gebundenem Substrat belegt, dass der gezeigte Abschnitt eine Bindestelle für das terminale Phosphat von ATP darstellt. Daher darf man davon ausgehen, dass der gezeigte Bereich auch im MoSto eine P-Schleife enthält. Diese Vermutung wird durch die Sekundärstrukturvorhersage noch gestärkt und erweitert (s.u.).

Der Unterschied zwischen den MoSto-Untereinheiten könnte darauf hindeuten, dass es im Laufe der Evolution zu einer funktionellen Differenzierung gekommen ist, ähnlich wie bei den Ferritinen der Wirbeltiere, und die ATP-Bindestelle in der α -Untereinheit möglicherweise nur noch ein funktionsloses Rudiment darstellt.

Wie Abbildung 3.7 zeigt, kann neben der Sequenz auch die räumliche Struktur einer P-Schleife durchaus verschieden sein, als "echte" Schleife oder gestreckt. Gemeinsam ist ihnen aber, dass vor der Schleife ein β -Faltblatt-Abschnitt liegt und nach ihr eine Helix folgt. Diese strukturelle Gemeinsamkeit hängt natürlich mit der gemeinsamen Funktion zusammen: auf diese Weise wird das beträchtliche Dipolmoment der Helix genutzt, um das Phosphat an den vorgesehenen Platz zu lotsen und dort über die H-Brücken hinaus zusätzlich zu binden. Die Sekundärstrukturvorhersage prognostiziert für den Bereich mit der mutmaßlichen P-Schleife im MoSto eben diese Abfolge von Sekundärstrukturen.

¹⁶⁶ Zu diesen Ähnlichkeiten zählt auch die funktionelle Entsprechung Leu/Val an Position 8 der gezeigten Abschnitte, die in der Tabelle nicht markiert ist.

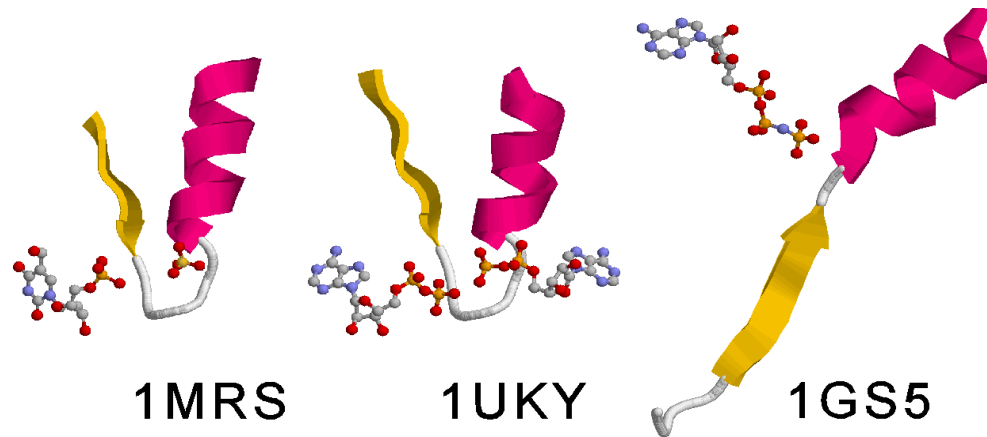


Abbildung 3.7: Struktur-Vergleich der P-Schleifen aus drei der röntgenographisch charakterisierten Phosphotransferasen der Tabelle 3.2. Dargestellt sind jeweils der in der Tabelle aufgelistete Abschnitt der Peptidkette (20 Aminosäuren) sowie das gebundene Substrat bzw. Substrat-Modell.

Bei der gestreckten P-Schleife der *E.-coli*-AGP-Transferase 1GS5 wird diese Struktur noch gedoppelt. Vor der und räumlich parallel zur eigentlichen P-Schleife liegt quasi eine zweite (Position 8-11), mit der Sequenz K-L-G-G, umgeben von der gleichen Abfolge von Sekundärstrukturen und durch Lys und Gly an der Bindung des Phosphats beteiligt. MoSto weist an der entsprechenden Stelle die in beiden Untereinheiten gleiche Sequenz K-I-G-G auf (Position 45-48 bzw. 42-45). Die Sekundärstrukturvorhersage stimmt für den gesamten Bereich¹⁶⁷ auffallend gut mit der bekannten Struktur der *E.-coli*-AGP-Transferase überein. Dieser Bereich gehört zudem zu jenen, in denen die Sequenzen der α - und β -Untereinheit besonders stark konserviert sind. Hinzu kommt, dass die geknickte Helix 12-32 und der Faltblatt-Abschnitt 38-42 der Transferase durch Wechselwirkungen hydrophober Seitenketten in einer Position gehalten werden, durch die die beiden Phosphat-bindenden Abschnitte parallel nebeneinander liegen. Eben die daran beteiligten Aminosäuren finden sich jedoch in zumindestens funktionell entsprechender Weise konserviert an den entsprechenden Stellen in den MoSto-Sequenzen wieder¹⁶⁸. Es ist daher durchaus wahrscheinlich, dass MoSto zumindest im Bereich 38-88 (α -UE) bzw. 36-86 (β -UE) die gleiche Struktur wie die AGP-Transferase (Abbildung 3.8) besitzt.

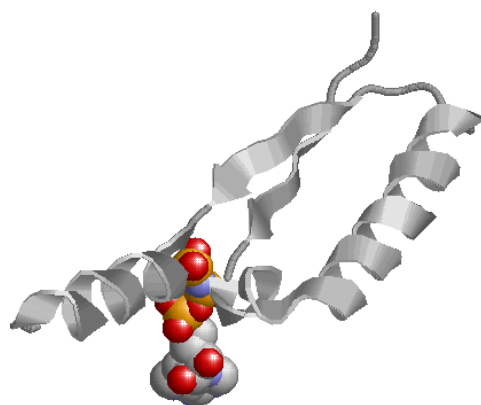


Abbildung 3.8: Ein Ausschnitt aus der Struktur von MoSto? Die Aminosäuren 1-57 der AGP-Transferase aus *E. coli* (mit dem gebundenen ATP-Analog AMPPNP), die dem BLAST-Sequenzvergleich zufolge den hoch konservierten Abschnitten 38-88 bzw. 36-86 der MoSto-Untereinheiten entsprechen könnten.

¹⁶⁷ D.h. über beide Phosphat-bindenden Abschnitte und ihre Umgebung hinweg, nicht nur in dem in Tabelle 3.2 gezeigten Teilstück.

¹⁶⁸ Siehe dazu das kommentierte Alignment der Sequenzen der MoSto-Untereinheiten und der AGP-Transferase in Tabelle 7.3 im Anhang.

Eine vollständiges Alignment der MoSto-Untereinheiten und ihrer vorhergesagten Sekundärstruktur mit der AGP-Transferase und deren ermittelter Sekundärstruktur befindet sich als Tabelle 7.3 im Anhang.

3.3.3.3 Bestimmung des Molekül-Umrisses mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung

Mit der Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS)¹⁶⁹ an Lösungsproben wird die Größe in der Lösung vorhandener Makromoleküle bestimmt. Außerdem lassen sich anhand der Streukurve Aussagen über die Form des Moleküls machen, allerdings ist dabei keine analytische Auswertung möglich. Daher muss mit Simulationsrechnungen gearbeitet werden, in denen das Molekül durch ein Ensemble von Streudichtezentren ("Debye-Kugeln") dargestellt wird. Das Resultat solch einer Simulation entspricht einer durch Röntgenbeugung erhaltenen Struktur mit niedriger Auflösung ($\approx 20 \text{ \AA}$).

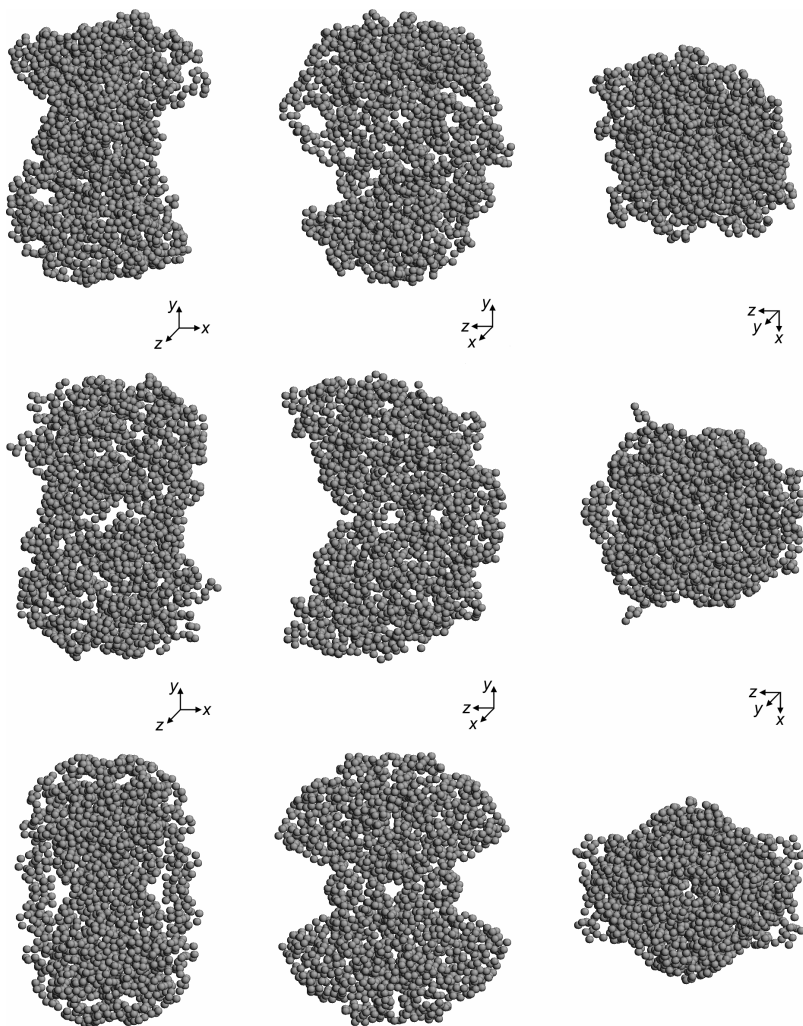


Abbildung 3.9: Ergebnisse von ab-initio-Bestimmungen der MoSto-Molekülstruktur mit SAXS in jeweils drei unterschiedliche Ansichten.

Oben: Simulationsrechnung ohne Symmetrievorgaben.

Mitte: mit vorgegebener C_2 -Symmetrie.

Unten: mit vorgegebener D_2 -Symmetrie.

Die räumliche Orientierung der Modelle ist durch die kleinen Achsenkreuze angedeutet. Die vermutete bzw. vorgegebene C_2 -Achse verläuft jeweils parallel zur z-Achse des Koordinatensystems. Jede der "Debye-Kugeln" entspricht einer Aminosäure. Die Auflösung der Modelle beträgt etwa 20 \AA .

Abbildung 3.9 zeigt das Ergebnis solcher Simulationsrechnungen für MoSto¹⁷⁰. Ohne dass der Software eine Symmetrievorgabe gemacht worden wäre, ergab sich ein Bild, das darauf hindeutet, dass in MoSto eine zweizählige Symmetrieachse vorliegt. Eine Wiederholung der Rechnung mit der

¹⁶⁹ Die Grundlagen der Methode sind unter "Materialien und Methoden" im Abschnitt 5.5.1 etwas ausführlicher dargestellt.

¹⁷⁰ Die Messungen und die Auswertung wurden durchgeführt von Manuel Gnida und Michel H.J. Koch am EMBL Hamburg.

Symmetrievorgabe C_2 führte in der Tat zu einem Modell, das mit dem ohne Vorgabe erhaltenen weitgehend übereinstimmt. Vorgabe höherer Symmetrien erbrachte Strukturen, die stärker von dem ohne Symmetrievorgabe erhaltenen Resultat abweichen und vermutlich nicht realistisch sind.

Es kam für mich etwas überraschend, darf aber als sicher gelten, dass MoSto kein annähernd kugelförmiges Gesamtmolekül bildet, sondern eine Art "flachgedrückte dicke Wurst", vermutlich mit einer Biegung oder Einschnürung in der Mitte. Es sei daran erinnert, dass Pienkos und Brill seinerzeit MoSto als $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer ansahen. Die Form und die anscheinende C_2 -Symmetrie könnten ein Hinweis sein, dass die MoSto-Quartärstruktur ein Dimer von Tetrameren ist, d.h. dass das Oktamer als $(\alpha_2\beta_2)_2$ geschrieben werden kann. Somit ist nicht auszuschließen, dass seinerzeit irgendeine von Pienkos und Brill gewählte Versuchsbedingung zur Spaltung der nativen Oktamere geführt hatte. In einer Anreicherung mit Imidazol statt MOPS als Puffer bei der Gelfiltration erhielt ich jedoch keinen Hinweis darauf, dass die Puffersubstanz die Ursache sein könnte, MoSto wurde, wie üblich, einer Molmasse von etwa 200-300 kg/mol entsprechend eluiert.

Das Proteinmolekül ist nach den Ergebnissen der Simulationsrechnungen etwa 12 nm lang und hat in seiner Mitte einen kurzen Durchmesser von 5,5 sowie einen langen Durchmesser von 7 nm. Das Molekülvolumen beträgt etwa 360 nm³ (berechnet für einen Stab mit elliptischem Querschnitt mit den o.a. Abmessungen). Daraus lässt sich anhand der Molekülmasse eine Dichte von etwa 1 g/cm³ abschätzen. Die mittlere Dichte von Proteinmolekülen ist aber normalerweise größer¹⁷¹. Daher zeigt schon diese grobe Abschätzung an, dass im Inneren des Moleküls Räume vorhanden sind, die nicht von Aminosäuren, sondern von anderem Material gefüllt werden.

3.4 Struktur der anorganischen Komponente

3.4.1 Molybdängehalt des Proteins

Die Metall- und Proteinanalysen an den mit einer G200-Gelfiltration gereinigten Proben ergaben je nach Anreicherung und Analysemethode Werte zwischen 125 und 240 $\mu\text{mol Mo je g Protein}$ (30 bzw. 58 Mo-Atome je Proteinmolekül). Pienkos/Brill hatten seinerzeit 161 $\mu\text{mol/g}$ berichtet. Irritierend war, dass oftmals bei den noch nicht vollständig gereinigten Fraktionen aus der DEAE-Anionenaustauschchromatographie höhere spezifische Molybdängehalte gefunden wurden als bei vollständig aufgereinigten MoSto-Proben, obwohl das Gegenteil zu erwarten wäre. Dies wurde zunächst auf Ungenauigkeiten bei den Analysen zurückgeführt, da es gerade bei den parallel zu den ersten Stufen der Anreicherung durchgeführten Routineanalysen mehr auf Schnelligkeit als auf Präzision ankam und meist nicht die absoluten, sondern nur die relativen Gehalte an Protein und Molybdän benötigt wurden.

¹⁷¹ Z.B. hat das MoFe-Protein der Nitrogenase bei annähernd gleicher Molekülmasse (220 kg/mol) nur ein Molekülvolumen von etwa 290 nm³.

Zur Kontrolle wurden an einigen Proben, sowohl von vollständig als auch von teilweise aufgereinigtem MoSto, Vergleichsanalysen mittels ICP-MS durchgeführt¹⁷². Die Ergebnisse bestätigten jedoch meine eigenen, mit dem katalytischen Mo-Bestimmungsverfahren erhaltenen Werte. Damit war klar, dass die "paradoxen" abnehmenden Molybdängehalte eine Tatsache waren und nur auf hohe Mo-Verluste im Laufe der Anreicherungsprozedur zurückzuführen sein konnten. Dies gab den Anstoß, zum Schluss, als Superdex 200 als Material für die Gelfiltration zur Verfügung stand, nochmals neue Anreicherungsversuche durchzuführen (siehe Abschnitt 3.2.2.4). Die bisherige mehrtägige Prozedur wurde auf nur noch 15 Stunden von Extrakterstellung bis zum Auffangen der Gelfiltrations-Fractionen zusammengedrängt.

In diesen Anreicherungen mit Superdex 200 wurden für die MoSto-Peakfraktionen Werte von 299 und 569 $\mu\text{mol/g}$ ermittelt, was 72 bzw. 136 Mo-Atomen je Proteinmolekül entspricht. Da auch bei diesen Läufen immer noch ein Verlust von etwa 20 % des Molybdäns in niedermolekularer Form beobachtet wurde, dürfte die Speicherkapazität von MoSto mindestens 90, möglicherweise sogar 150 Mo-Atome je Proteinmolekül betragen.

3.4.2 UV-Vis-Spektrum von MoSto

Der Absorptionskoeffizient des Speicherproteins bei 280 nm wurde an den G200-Peakfraktionen einer erfolgreichen Anreicherung zu $1,05 \pm 0,07 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bestimmt. Spätere stichprobenartige Kontrollen bestätigten, dass die Messung der OD_{280} bei Verwendung dieses Absorptionskoeffizienten verlässliche Werte für die Konzentration von reinem MoSto in Lösung lieferte.

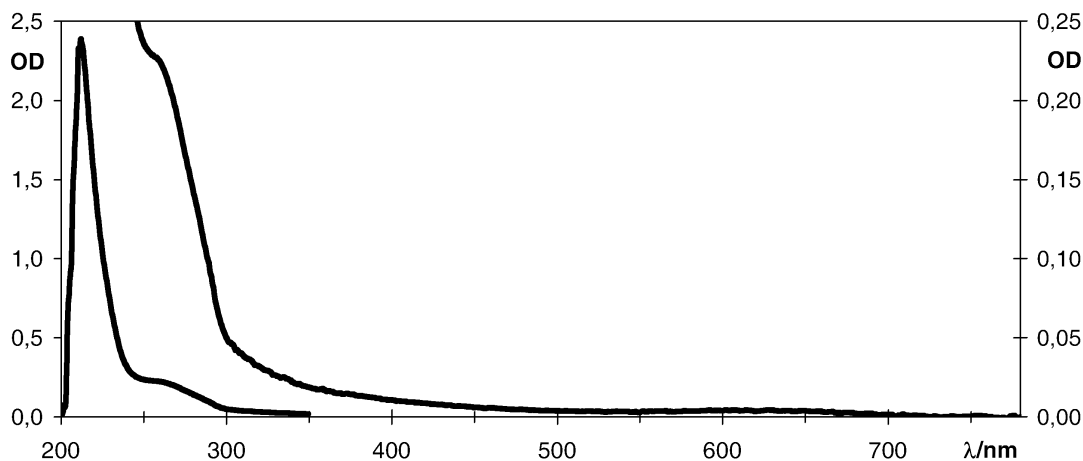


Abbildung 3.10: UV-Vis-Spektrum einer MoSto-Lösung (Peakfraktion eines Gelfiltrationslaufes, Tetra-Acetat-Puffer 50 mM, pH 6,5; Proteingehalt (OD_{280}) ca. 0,14 g/L; Molybdängehalt ca. 40 μM .), der Anschaulichkeit halber zweimal mit unterschiedlich skalierten Ordinaten dargestellt. Der UV-Bereich ist auf die linke, das übrige Spektrum auf die rechte Ordinate bezogen.

¹⁷² Durchgeführt von Dr. Anne-Katrin Meyer am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Universität Hamburg (Prof. Dr. Arndt Knöchel).

MoSto zeigt insgesamt ein völlig normales Proteinspektrum (Abbildung 3.10). Insbesondere findet im Bereich sichtbaren Lichtes keine nennenswerte Absorption statt. Damit kann ausgeschlossen werden, dass MoSto einen Kern mit gemischtvalentem Molybdän (Mo^{VI} und Mo^{V}) enthält, da derartige Verbindungen im Vis-Spektrum intensive Metall-Metall-charge-transfer-Banden und dadurch eine charakteristische blaue Farbe aufweisen.

3.4.3 Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS)

XAFS-Spektroskopie (X-ray Absorption Fine Structure) ist im Bereich der anorganischen und insbesondere der bioanorganischen Chemie eine sehr nützliche Methode, aber schon allein wegen des hohen apparativen Aufwandes (es wird Synchrotronstrahlung benötigt) keinesfalls ein Standardverfahren. Daher seien die Grundlagen hier noch einmal kurz vorgestellt.

Bei elektromagnetischer Strahlung im Wellenlängenbereich der Röntgenstrahlen (ca. 1 pm bis 1 nm) ist die Quantenenergie (> 1200 eV) ausreichend, um Atome durch Anregung von Elektronen aus den untersten (K- und L-) Schalen zu ionisieren. In einem Röntgenabsorptionsspektrum sieht man mit zunehmender Energie hin zunächst die Absorption stetig absinken, bei Erreichen der Ionisationsenergie steigt sie sprunghaft an ("K-Kante" bzw. "L-Absorptionskanten"), um dann wieder stetig abzusinken. Ein solches einfaches Spektrum enthielte wenig Information, lediglich die genaue Lage der Absorptionskante gibt Aufschluss über die vorliegende Oxidationsstufe. Dem beschriebenen einfachen Spektrum ist jedoch eine Feinstruktur überlagert, die sich nach ihrer Lage relativ zur Absorptionskante unterteilen lässt:

- Pre-edge, vor der eigentlichen Absorptionskante.
- Near-edge oder XANES-Bereich, der vom Beginn des Kantenanstiegs bis zum ersten Absorptionspeak (der "white line") reicht.
- Extended fine structure, der EXAFS-Bereich von etwa 50 bis 1000 eV oberhalb der Kante. XANES und EXAFS sind nicht exakt voneinander abgegrenzt.

Im pre-edge-Bereich finden sich Peaks aufgrund von Anregungen von Elektronen in energetisch sehr hoch liegende leere Atomorbitale. Auch im XANES-Bereich beruht die Feinstruktur zum Teil noch auf Anregung in Atomorbitale. So tritt beim Mo z.B. bei Anwesenheit terminaler Oxoliganden ein charakteristischer Peak in der Absorptionskante auf, der auf die (formell verbotene) Anregung $1s \rightarrow 4d$ zurückgeht. Darüber hinaus macht sich hier die Anregung von Elektronen des Absorberatoms in unbesetzte Molekülorbitale bemerkbar.

Im EXAFS-Bereich von etwa 50 bis 1000 eV oberhalb der Kante ist das Elektron nach der Anregung definitiv nicht mehr an das Molekül gebunden. Auch dann beeinflusst die Umgebung noch den Endzustand¹⁷³ des Elektrons. Die vom Absorberatom ausgehende Elektronenwelle wird an den

¹⁷³ Der Ausdruck "Zustand" ist bei dieser vereinfachten anschaulichen Darstellung freilich nicht im Sinne strenger quantenmechanischer Terminologie zu verstehen.

umgebenden Atomen gestreut, die Streuwellen überlagern sich mit der ursprünglichen Welle, so dass der Endzustand ein Interferenzmuster ist, dessen Gestalt natürlich von der Frequenz der Elektronenwelle abhängt und damit von der Energie, die über die Ionisationsenergie hinaus durch das Röntgenquant dem Elektron zugeführt wurde. Dadurch wird je nach Energie des Röntgenquants die Absorptionswahrscheinlichkeit beeinflusst.

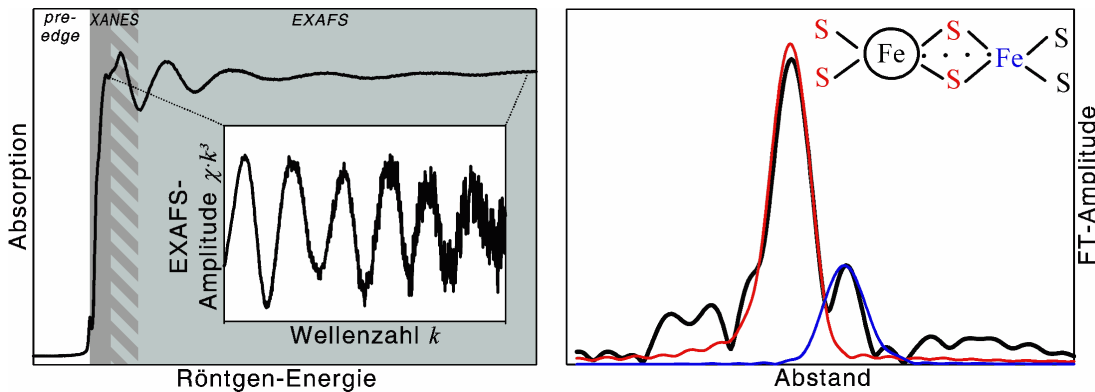


Abbildung 3.11: Aussehen und Auswertung eines Röntgenabsorptionsspektrums am Beispiel von Fe in einem Fe₂S₂-Ferredoxin. Links das vollständige Absorptionsspektrum und das herausgefilterte, mit k^3 gewichtete EXAFS. Rechts das Fourier-transformierte EXAFS mit den Kurven, die für vier benachbarte Schwefelatome (rot) bzw. für ein benachbartes Eisenatom (blau) theoretisch zu erwarten wären.¹⁷⁴

Das EXAFS-Spektrum wird aus dem Gesamtspektrum herausgefiltert, indem eine virtuelle "ungestörte" Kurve ohne Feinstruktur als Basislinie herangezogen wird. Das Ergebnis wird über der Wellenzahl k (\AA^{-1}) des Photoelektrons aufgetragen¹⁷⁵. Die Feinstruktur wird durch Multiplikation mit k^3 gewichtet, da sie mit zunehmender Wellenzahl rasch schwächer wird. Eine Fourier-Transformation (FT) dieses Spektrums nach k liefert eine Funktion, die direkt die radiale Verteilung von rückstreuenden Atomen um das Absorberatom herum angibt¹⁷⁶.

Für die genaue Analyse des erhaltenen Spektrums muss allerdings eine Modellvorstellung von der Umgebung des Absorberatoms entwickelt werden. Auf Grundlage eines solchen Modells kann ein theoretisches Spektrum errechnet werden, welches man dann durch Variation des Modells an das experimentelle Spektrum anzupassen versucht. Dabei sind vor allem vier Variablen anzupassen: Die Art der Rückstreuatome, ihr Abstand r vom Absorberatom, ihre Anzahl $N(r)$ bei einem bestimmten Abstand, und der sogenannte Debye-Waller-Parameter $2\sigma^2$, der die thermische und statische Unordnung in der Umgebung der Rückstreuatome widerspiegelt. Die Auswahl für die Art der Nachbaratome kann durch chemische Analysen eingeschränkt werden, für r ergeben sich Näherungswerte unmittelbar aus dem Spektrum und ggf. aus Modellsystemen. Kritisch ist die unabhängige Festlegung von N und $2\sigma^2$, die hoch miteinander korreliert sind und beide die Höhe der Peaks im Fourier-transformierten Spektrum beeinflussen. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurden für die Besetzungszahl N

¹⁷⁴ Abbildung (leicht abgeändert) aus: Gnida 2002, 20.

¹⁷⁵ Gemeint ist hier die Wellenzahl des emittierten Photoelektrons, nicht die des absorbierten Röntgenquants.

¹⁷⁶ Die im Fourier-transformierten Spektrum ablesbaren Abstände der Nachbaratome entsprechen allerdings nur näherungsweise den tatsächlichen Atomabständen, da die Korrektur für die Energie des Photoelektrons darin noch nicht enthalten ist.

aufgrund von Modellverbindungen Werte festgelegt und dann nur der zugehörige Debye-Waller-Parameter angepasst. Des Weiteren ist ein Energiekorrekturterm E_0 anzupassen, der dadurch erforderlich wird, dass die genaue Ionisationsenergie des Absorberatoms von dessen Bindungsverhältnissen abhängt und daher vor der Messung natürlich unbekannt ist¹⁷⁷.

Die Modellrechnung mit Einfachstreuung des Photoelektrons an jeweils einem Nachbaratom ist eine Vereinfachung, die für niedrige Wellenzahlen des Photoelektrons (Übergang zum XANES) nicht mehr anwendbar ist. Es müssen dann zusätzlich die Effekte von Vielfach-Streuungen an Ensembles von Nachbaratomen eingerechnet werden. Wenn Nachbaratome vom Absorberatom aus gesehen linear oder fast linear hintereinander liegen, kann Vielfachstreuung sich besonders deutlich auswirken.

Ein Vorzug von EXAFS ist, dass die Methode spezifisch nur jenes eine Element erfasst, dessen Absorptionskante bei der gewählten Energie liegt. Gerade dies hat EXAFS für die bioanorganische Chemie so wertvoll gemacht. Einzelne bzw. wenige in einem Protein enthaltene Metallatome lassen sich gezielt ansprechen und auf ihre Umgebung hin befragen. Das zu untersuchende Protein muss noch nicht einmal hundertprozentig aufgereinigt sein – es genügt, wenn die Probe keine andere Verbindung des gewählten Elements enthält. Hinzu kommt, dass keine Kristalle benötigt werden. Schwierig wird es, wenn mehrere unterschiedlich gebundene Atome des Absorber-Elements in einem Protein vorliegen, denn die Abstands-Verteilungsfunktion ist immer gemittelt über alle Absorberatome in der Probe¹⁷⁸.

3.4.3.1 EXAFS des Mo-Speicherproteins¹⁷⁹

Aufgrund der früheren TDPAC-Untersuchungen (siehe 1.1.1) wurde für MoSto eine Molybdänspeicherung in Form eines mehrkernigen Molybdän-Sauerstoff-Clusters erwartet. In einem solchen Cluster treten ab der zweiten Koordinationssphäre Metall-Metall-Abstände auf, die im EXAFS-Spektrum deutlich erkennbar sein sollten.

Das EXAFS-Spektrum der MoSto-Probe ist in Abbildung 3.12 oben abgebildet. Die zugehörige Fourier-Transformierte enthält in der Tat zwei ausgeprägte Rückstreupeaks zwischen 3 und 4 Å, die auf einen polynuklearen Molybdäncluster hinweisen. Die bei der EXAFS-Analyse berechneten Parameter sind in Tabelle 7.7 (MoSto) im Anhang zusammengefasst.

Die genaue Lage der K-Absorptionskante zeigt, dass im Speicherprotein Mo mit der mittleren Oxidationsstufe +VI vorliegt. Als unmittelbare Nachbarn des Molybdän-Absorberatoms ließen sich sechs Sauerstoffatome identifizieren, jeweils zwei in den Abständen 1,72 Å, 1,91 Å und 2,28 Å. Die beiden bereits erwähnten Rückstreubeiträge in größerem Abstand ließen sich tatsächlich als Molybdänbeiträge anpassen. Für die Abstände erhielten wir 3,27 Å und 3,42 Å. Die Besetzungszahlen N dieser

¹⁷⁷ Die aus dem Fourier-transformierten EXAFS-Spektrum (Abbildung 3.12; Abbildung 3.13) ablesbaren Werte für r unterscheiden sich von den in der Datenanalyse bestimmten Werten (Tabelle 7.7; Tabelle 7.8), weil das Spektrum diese Energie-Korrektur nicht enthält.

¹⁷⁸ In dem Beispiel in Abbildung 3.11 tritt dieses Problem nicht auf, da aufgrund der Symmetrie des Clusters die Umgebungen der beiden Eisenatome identisch sind.

¹⁷⁹ Die Messungen wurden durchgeführt und vor allem ausgewertet von Manuel Gnida, damals am EMBL Hamburg. Siehe daher auch: Gnida 2002.

Koordinationschalen lassen sich nur schwer durch die Anpassung direkt bestimmen (siehe Seite 78). Für sie wurden daher plausible Werte vorgegeben, die aus einem Vergleich mit Modellsubstanzen abgeleitet worden waren. Diese Modellverbindungen werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

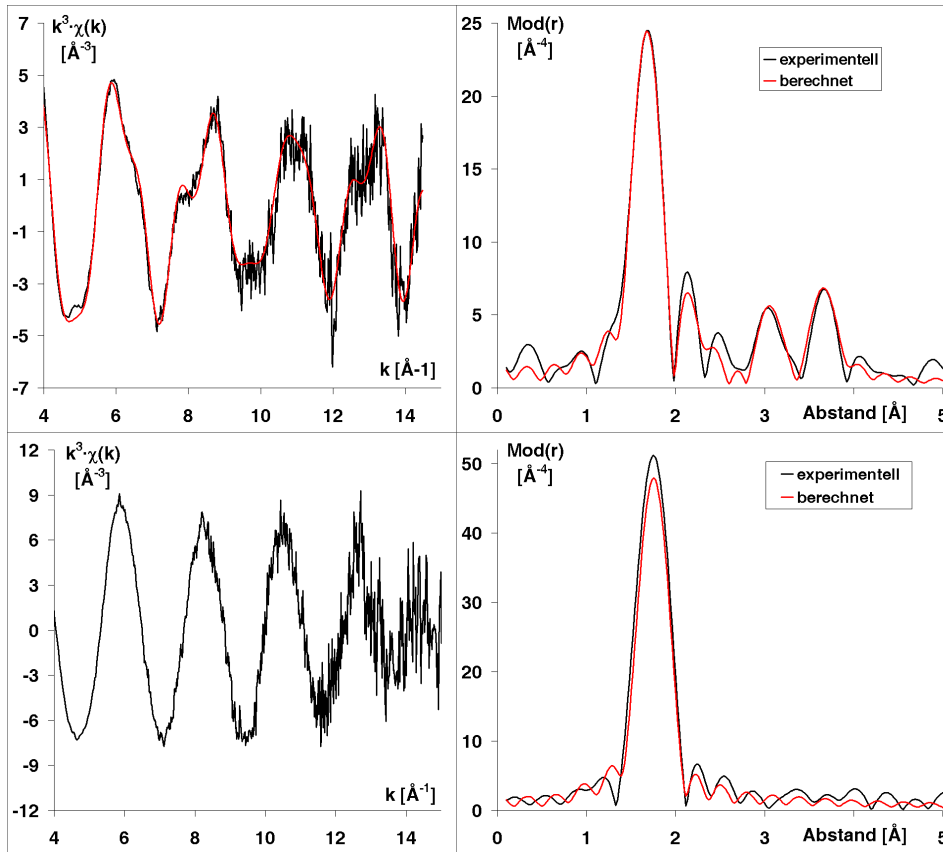


Abbildung 3.12: EXAFS und zugehöriges Fourier-transformiertes Spektrum einer MoSto-Probe (oben) und einer Molybdatlösung gleicher Mo-Konzentration (unten). Die rote Kurve gibt jeweils das Spektrum wieder, das für die im Text und in Tabelle 7.7 beschriebene mittlere Umgebung des Mo zu erwarten wäre.

Zunächst musste jedoch eine andere Frage geklärt werden: das Spektrum in Abbildung 3.12 belegt zwar eindeutig, dass die untersuchte MoSto-Probe einen polynuklearen Mo-O-Cluster enthält, aber ist dieser Cluster auch an das Protein gebunden? In Molybdat-haltigen Lösungen bilden sich, wie oben beschrieben (2.4.1), beim Ansäuern Polyanionen. Bei welchem pH dieser Prozess beginnt, hängt von einer Vielzahl anderer Faktoren ab, z.B. von der Temperatur, der Molybdatkonzentration oder der Anwesenheit und Konzentration anderer Ionen. Gemäß Abbildung 2.7 sollten bei pH 6,5 und einer Molybdatkonzentration von 2,5 mM gerade eben noch keine Cluster in Lösung vorhanden sein, aber die Hydrolyse von Molybdat ist ein so komplexes Phänomen, dass theoretische Überlegungen in diesem Fall nicht ausreichen. Nur eine experimentelle Überprüfung konnte Klarheit schaffen. Dazu wurde eine Natriummolybdatlösung hergestellt, bei der Mo-Konzentration, pH und Puffer identisch mit der MoSto-Probe waren, d.h. die Proben unterschieden sich nur durch die An- bzw. Abwesenheit des MoSto-Apoproteins. Die Ergebnisse der EXAFS-Analyse sind in Abbildung 3.12 unten und Tabelle 7.7 ($[\text{MoO}_4]^{2-}$) dargestellt. Das zugehörige FT zeigt einen einzigen Rückstreubeitrag, der sich auf vier Sauerstoff-Liganden zurückführen lässt. Der Bereich, in dem im MoSto-Spektrum die Beiträge der

Mo-Nachbarn auftreten, enthält hingegen keinerlei Signale. Damit war belegt, dass in der Kontrollprobe nur monomeres Molybdat enthalten war. Freies Molybdat würde also unter den in der Proteinprobe herrschenden Bedingungen nicht als polynukleare Spezies vorliegen, der detektierte Cluster muss an das Protein gebunden und durch das Protein hervorgebracht worden sein.

Als zusätzliche Kontrolle wurde eine MoSto-Probe vermessen, deren pH auf 7,5 eingestellt worden war. Bei diesem pH kann allein aufgrund theoretischer Kenntnis der Molybdatchemie die Anwesenheit von Clustern in Lösung ausgeschlossen werden. Das resultierende Spektrum (nicht abgebildet) war mit demjenigen der Probe vom pH 6,5 nahezu identisch. Der Peak für die nächsten Sauerstoff-Liganden war jedoch höher, die Peaks für die Mo-Mo-Abstände niedriger als bei pH 6,5. Eine Anpassung durch eine berechnete Kurve gelang mit der Annahme, dass das vorhandene Mo zu $\frac{3}{4}$ wie in Tabelle 7.7 beim "MoSto"-Modell angegeben und zu $\frac{1}{4}$ wie beim "[MoO₄]²⁻"-Modell vorlag. Obwohl die Probe am Ende der Präparation so schnell als möglich schockgefroren wurde, war vermutlich durch den erhöhten pH schon ein Teil des Molybdats aus dem Protein frei geworden¹⁸⁰. Nichtsdestoweniger belegte auch diese Messung, dass der gefundene Cluster ans Protein gebunden sein muss.

3.4.3.2 Modellverbindungen für die anorganische Komponente

Nachdem nun erwiesen war, dass MoSto eine mehrkernige Molybdän-Sauerstoff-Komponente enthält, musste geklärt werden, welche Struktur dieser Cluster genauer hat. Wie in der Einführung zu diesem Kapitel dargelegt, sind dafür Vergleiche mit Modellsubstanzen unverzichtbar. Bereits bei der bis hierhin beschriebenen Auswertung der Spektren wurde auf Modelle zurückgegriffen: die angenommenen Werte für die Besetzungszahlen der Rückstreuer-Schalen beruhen auf den bekannten Strukturdaten für Heptamolybdat. Ebenso lassen sich einige denkbare Modelle bereits aufgrund der bisherigen Daten ausschließen. So entfallen sämtliche Verbindungen mit Mo in niedrigeren Oxidationsstufen als +VI wegen der Position der Absorptionskante und der Farblosigkeit des Proteins. Anhand der im MoSto-Spektrum ermittelten kürzesten Mo-Mo-Abstände von 3,27 und 3,42 Å lassen sich mit dem Molybdän(VI)oxid α -MoO₃ verwandte Strukturen ausschließen, da darin Abstände von 3,4 und 3,7 Å auftreten¹⁸¹. Ein verlockendes Modell ist die sogenannte Keggin-Struktur des jedem Chemiker aus seinem analytischen Grundpraktikum vertrauten Molybdophosphates. Darin umgeben 12 Molybdatzentren ein zentrales Phosphat-Ion, die kürzesten Mo-Mo-Abstände betragen jedoch 3,55 Å, sind also deutlich länger als beim MoSto beobachtet.

Für den direkten experimentellen Vergleich boten sich daher vor allem die drei als Feststoffe aus wässriger Lösung isolierbaren Isopolymolybdate (Abschnitt 2.4.1.2) Heptamolybdat, β -Oktamolybdat und "Mo₃₆" an, bei denen ähnliche Mo—Mo-Abstände vorliegen, wie man sie im Speicherprotein findet. Da nicht unbedingt davon ausgegangen werden kann, dass die im Protein enthaltene Mo-Spezies

¹⁸⁰ Erhöhung des pH über 7,3 löst bei MoSto Freisetzung des Mo aus, siehe: Fenske & al. 2005.

¹⁸¹ Ressler, T.; Timpe, O.; Neisius, T.; Find, J.; Mestl, G.; Dieterle, M.; Schlögl, R.: Time-Resolved XAS Investigation of the Reduction/Oxidation of MoO_{3-x}. *J. Catalysis* 191 (2000) 75-85.

tatsächlich eine einheitliche, klar definierbare Verbindung darstellt, wurde als "Modell" für gemischte Isopolymolybdate eine 10 mM Natriummolybdatlösung mit $\text{pH} = 1$ angesetzt.

Die Ergebnisse der EXAFS-Messungen und -Analysen sind zusammenfassend in Abbildung 3.13 und Tabelle 7.8 dargestellt. Die Besetzungszahlen N sind bei den Mo-Nachbarn i.d.R. nicht-ganzzahlige Werte. Dies ergibt sich daraus, dass nicht alle Mo-Atome in den Modellverbindungen gleichwertig sind und EXAFS immer nur ein über alle vorliegenden Mo-Zentren gemitteltes Ergebnis liefern kann.

3.4.3.2.1 Heptamolybdat

Beim Vergleich der Spektren von MoSto und Heptamolybdat fällt die Ähnlichkeit der Ergebnisse sofort ins Auge. Im EXAFS-Spektrum sind die beiden Signale über den gesamten untersuchten k -Bereich "in Phase" und zeigen ähnliche Strukturdetails. Im Bereich bis etwa $k = 10 \text{ \AA}^{-1}$, in dem das EXAFS von den Rückstreubeiträgen der O-Nachbarn bestimmt wird¹⁸², liegen kleinere Maxima und Minima des Heptamolybdat-Spektrums auf gleicher Position mit klar ausgebildeten Schultern beim MoSto. Im Bereich $k > 10 \text{ \AA}^{-1}$, wo das EXAFS vor allem von den benachbarten Mo-Atomen dominiert wird¹⁸³, findet man im Heptamolybdat-Spektrum doppelte Maxima an Stellen, an denen beim MoSto ein Plateau vorliegt. Beide Spektren zeigen also analoge Strukturen, diese sind jedoch im MoSto-Spektrum weniger deutlich ausgebildet. Dies gilt noch mehr für die FT der Spektren. Beide Male findet sich die gleiche radiale Abstandsverteilung von Rückstreuatomen, doch die Amplituden der Peaks sind bei MoSto im Vergleich zu Heptamolybdat stark abgeschwächt.

Diese Tendenz spiegelt sich in den aus der Anpassung der Spektren gewonnenen Parametern wider. Vergleicht man die Werte für MoSto in Tabelle 7.7 und für Heptamolybdat in Tabelle 7.8, so findet man praktisch identische Werte für die Abstände der Nachbaratome, während die Debye-Waller-Parameter für MoSto durchgängig deutlich größer sind als für Heptamolybdat (außer für die beiden Sauerstoffatome bei $1,72 \text{ \AA}$, vermutlich terminale Oxo-Gruppen). Der oder die Cluster im MoSto weisen also eine dem Heptamolybdat eng verwandte, aber von deutlich höherer Unordnung geprägte Struktur auf.

Dieses Fazit bestätigt ein Vergleich mit einem Spektrum von Heptamolybdat, das nicht bei 20 K, sondern bei Raumtemperatur aufgenommen wurde¹⁸⁴. Auch hier beobachtet man eine Dämpfung der Amplituden im EXAFS und FT sowie Erhöhung der Debye-Waller-Parameter im Vergleich zur Tieftemperaturmessung. Interessanterweise ist das Raumtemperaturspektrum von Heptamolybdat nahezu identisch mit dem MoSto-Spektrum, d.h. die beim Protein beobachtete Unordnung entspricht in etwa der thermischen Unordnung, die in der Modellspezies durch Erhöhung der Temperatur von 20 auf 300 K hervorgerufen wird. Selbstverständlich kann die Unordnung im MoSto nicht mit thermischen Effekten erklärt werden, schließlich wurde die Proteinprobe ebenfalls bei 20 K vermessen. Die Unordnung muss hier statischer, in der Struktur angelegter Natur sein.

¹⁸² Gnida 2002, 159.

¹⁸³ Ebenda.

¹⁸⁴ Gnida 2002, 55f.

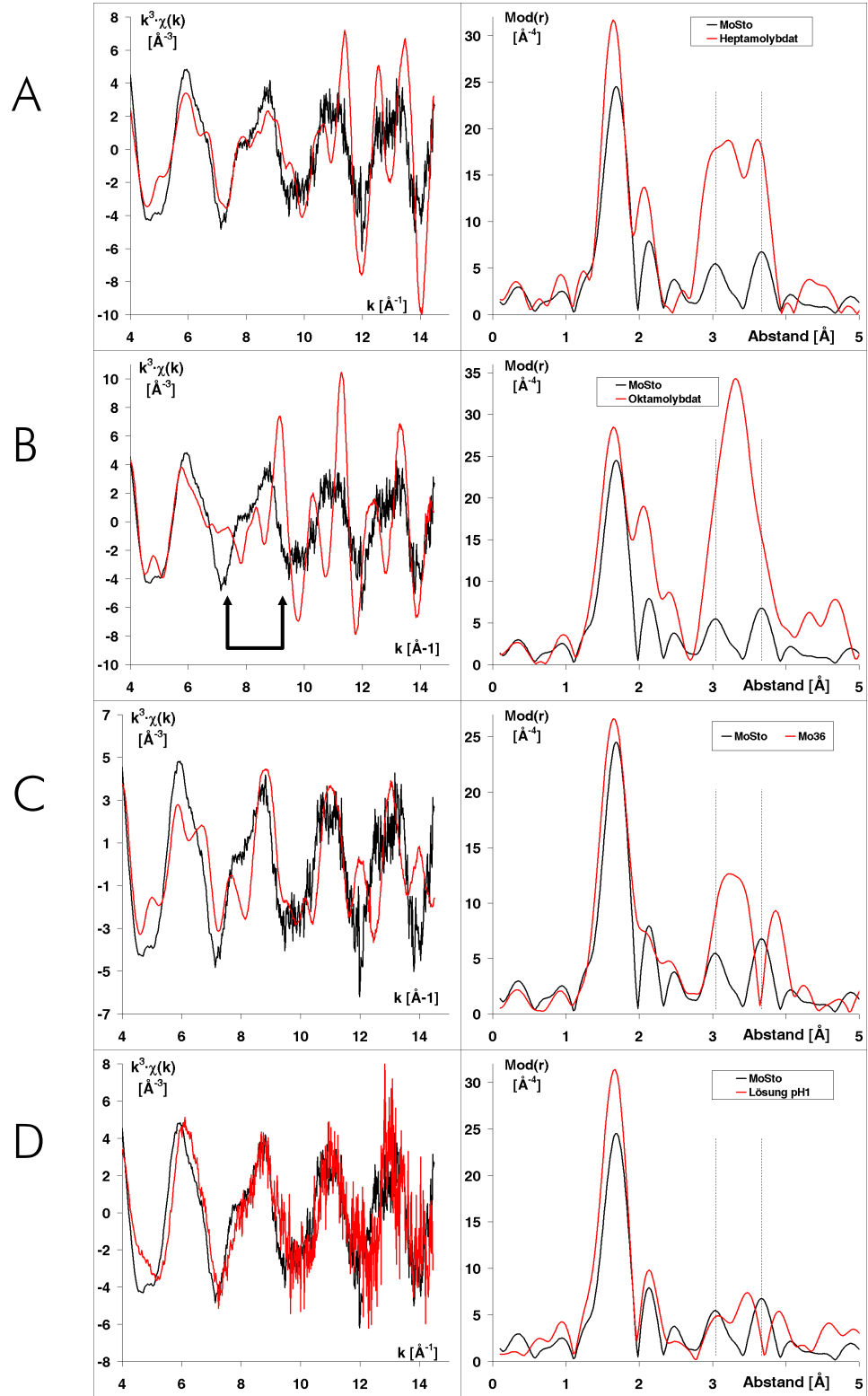


Abbildung 3.13: Vergleich von MoSto mit Heptamolybdat (A), β -Oktamolybdat (B), "Mo₃₆" (C) und einer Molybdatlösung bei pH 1 (D). Das Spektrum der Modellverbindung ist jeweils rot, das MoSto-Spektrum schwarz dargestellt. Die Lage der den Mo-Mo-Abständen zugeschriebenen Peaks im MoSto-Fourier-Transformierten ist durch die senkrechten gestrichelten Linien hervorgehoben. Man beachte, dass die Ordinaten in den Diagrammen jeweils unterschiedlich skaliert sind. Die anhand der EXAFS-Parameter (Tabelle 7.8) berechenbaren theoretischen Spektren sind nicht gezeigt. Weitere Erläuterungen im Text.

3.4.3.2.2 Oktamolybdat

Aufgrund der ähnlichen Strukturmerkmale würde man nun auch für Oktamolybdat gute Übereinstimmung mit den Spektren von MoSto und Heptamolybdat erwarten. Tatsächlich waren die Abstände der nächsten Nachbaratome, die wir bei der Anpassung der Spektren erhielten, den Werten für MoSto und Heptamolybdat sehr ähnlich, nur die Besetzungszahlen für die nächsten Molybdännachbarn mussten mit 2 und 2,25 höher gewählt werden als beim Heptamolybdat mit jeweils 1,7. Die Amplituden im FT-Spektrum sind dementsprechend höher. Darin spiegelt sich wider, dass Oktamolybdat kompakter gebaut ist als Heptamolybdat.

Dennoch lässt sich einwandfrei feststellen, dass Oktamolybdat im Gegensatz zum Heptamolybdat als Modell für die im MoSto vorliegende Spezies untauglich ist, wenn man die untransformierten EXAFS-Spektren einander direkt gegenüberstellt. Im von den Mo-Nachbarn dominierten Bereich $k > 10 \text{ \AA}^{-1}$ finden sich übereinstimmende Strukturen, wie sie schon beim Heptamolybdat beschrieben sind. Dies würde man auch für $k < 10 \text{ \AA}^{-1}$ erwarten, hier beobachtet man jedoch einige deutliche Abweichungen, vor allem im Bereich $k \approx 7-8 \text{ \AA}^{-1}$ (in Abbildung 3.13 B markiert durch den Doppelpfeil). Die Ursache sind die in der Einleitung zu diesem Kapitel kurz erwähnten Vielfachstreuungseffekte bei annähernd linearer Anordnung von Rückstreuatomen. Eine solche Anordnung findet man in Polymolybdaten dann, wenn zwei MoO_6 -Oktaeder über eine gemeinsame Ecke statt über eine Kante verknüpft sind. Im Oktamolybdat-Ion liegen vier solcher Eckenverknüpfungen vor, der mittlere Winkel der Mo-O-Mo⁺-Einheit darin beträgt nach den Röntgenstrukturdaten¹⁸⁵ ca. 165° . Heptamolybdat weist hingegen nur zwei Eckenverknüpfungen auf, die zudem mit 155° stärker von einer linearen Anordnung abweichen¹⁸⁶. Die Anpassung des theoretischen EXAFS für Oktamolybdat an die experimentellen Ergebnisse gelang, als diese Vielfachstreuungseffekte berücksichtigt wurden (Details siehe bei Tabelle 7.8)¹⁸⁷. Bei Heptamolybdat und MoSto war dies nicht erforderlich. Somit lässt sich Oktamolybdat als mögliche Modellstruktur ausschließen.

3.4.3.2.3 "Mo₃₆"

EXAFS und FT dieser Verbindung weisen deutliche Ähnlichkeit mit Heptamolybdat auf, was nicht weiter erstaunlich ist, da sich die Struktur von Heptamolybdat ausgehend beschreiben lässt (siehe 2.4.1.2.3). Die in Tabelle 7.8 angegebene mittlere Molybdänumgebung¹⁸⁸ ist für die nächsten Nachbarn mit Heptamolybdat, MoSto und auch Oktamolybdat vergleichbar. Bei größeren Entfernungen müssen die 10 miteinander verknüpften MoO_6 -Oktaeder berücksichtigt werden, die jede Heptamolybdat-Einheit umgeben. Sie sorgen für ein erhöhtes Maß statischer Unordnung, was sich insbesondere im FT

¹⁸⁵ Fuchs/Knöpnadel 1982, 169.

¹⁸⁶ Evans, Howard T., Gatehouse, Bryan M., Leverett, Peter: Crystal Structure of the Heptamolybdate(VI) (Paramolybdate) Ion, $[\text{Mo}_7\text{O}_{24}]^{6-}$, in the Ammonium and Potassium Tetrahydrate Salts. *J. Chem. Soc. Dalton* (1975), 505–514.

¹⁸⁷ Gnida 2002, 58f.

¹⁸⁸ Die Molybdänumgebung wurde auf der Basis einer "Mo₁₇"-Einheit modelliert. Die beiden Mo-Zentren, die im Mo₃₆ zwei jener Einheiten verknüpfen (siehe 2.4.1.2.3), sind für das Gesamtspektrum vernachlässigbar. Gnida 2002, 60.

in niedrigeren Mo-Rückstreupeaks widerspiegelt. In gewissem Maße kann Mo_{36} daher eine anschauliche Vorstellung vermitteln von der im MoSto vermuteten statischen/strukturellen Unordnung einer Heptamolybdat-basierten Struktur.

Mo_{36} als solches ist jedoch ein ungeeignetes Modell für den im MoSto vorliegenden Cluster. Der Molybdat-Kranz um die Heptamolybdat-Kerne macht sich nicht nur in der etwas geringeren Amplitude, sondern auch in einer deutlichen Verbreiterung des Mo-Rückstreubereichs im FT bemerkbar, sowie in einer anderen Verteilung der Abstände im Bereich 3-4 Å, die es beide beim MoSto nicht gibt. Dem entsprechend sind im EXAFS im Mo-dominierten Bereich $k > 10 \text{ \AA}^{-1}$ die Signale von MoSto und Mo_{36} teilweise nicht "in Phase". Den Minima des MoSto-EXAFS bei $k = 12 \text{ \AA}^{-1}$ und $k = 14 \text{ \AA}^{-1}$ stehen z.B. beim Mo_{36} klare Zwischen-Maxima gegenüber. Die im MoSto beobachtete statische Unordnung kann demnach vermutlich nicht durch Verknüpfung von Heptamolybdat mit weiteren Molybdänzentren anderer Geometrie modelliert werden.

3.4.3.2.4 Gelöstes Molybdat bei pH 1

Eine weitere Möglichkeit, strukturelle Unordnung zu modellieren, ist der Übergang von wohldefinierten kristallinen Feststoffen zu einer Lösungsprobe. In Lösung ist nicht nur die Struktur der einzelnen Cluster flexibler, es liegt zudem eine Mischung verschiedener Cluster-Typen vor¹⁸⁹. Die benutzte 10 mM Molybdatlösung von pH 1 sollte in etwa folgende Zusammensetzung aufweisen: 40 % als Spezies (64, 36), 25 % (32, 18), jeweils etwa 10 % (13, 8), (5, 2) und (2, 1), siehe Abbildung 2.7¹⁹⁰. Da (64, 36) dem Mo_{36} entspricht und (32, 18) einem halbierten Mo_{36} , liegt das vorhandene Mo zu 70 % in dieser Struktur vor. Das gemessene Spektrum dieser Probe sollte sich daher mit den Strukturparametern des Mo_{36} durch ein theoretisch ermitteltes anpassen lassen.

Das Resultat rechtfertigte diesen Ansatz. Tatsächlich gelang die Anpassung mit dem Mo_{36} -Parametersatz sehr zufriedenstellend. Offenbar dominiert wie vorhergesagt die zugrunde gelegte Struktureinheit in der Lösung, und die Beiträge anderer Spezies zum Spektrum sind vernachlässigbar bzw. schlagen sich in erhöhten Werten der Debye-Waller-Parameter nieder. Als Modell für den im Speicherprotein vorliegenden Cluster taugt diese Lösungsprobe damit freilich ebenso wenig wie das feste Mo_{36} , aus den dort bereits genannten Gründen, insbesondere der abweichenden Abstandsverteilung der Mo-Rückstreubeiträge im Bereich 3 bis 4 Å. Interessant jedoch ist, dass die Amplituden der Rückstreupeaks beim FT der Lösungsprobe auffällig denen im MoSto-FT gleichen. Auch die Strukturen im EXAFS ähneln dem MoSto mehr, als dies beim kristallinen Mo_{36} der Fall ist. Es scheint, dass der Übergang vom Feststoff zur Lösung ein brauchbarer Ansatz ist, die strukturelle Unordnung im MoSto zu modellieren. Sinnvoll wäre daher, bei einer weiteren Untersuchung eine Lösungsprobe bei höherem pH zu untersuchen, in der Heptamolybdat dominiert.

¹⁸⁹ Bei dieser Überlegung ist freilich vorausgesetzt, dass die Struktur der bei 77 K schockgefrorenen Lösungsprobe eine Momentaufnahme der Struktur bei RT ist.

¹⁹⁰ Tytko & al. 1983.

3.4.4 Zusammenfassung und Diskussion: Struktur des Mo-Zentrums

Anhand der EXAFS-Resultate lässt sich zweifelsfrei feststellen, dass MoSto das Molybdän in Form einer vielkernigen Molybdän-Sauerstoff-Spezies enthält. Die Speicherkapazität von MoSto beträgt nach meinen Analyseergebnissen 100-150 Mo-Atome je Molekül. Wie sieht nun dieser Mo-Kern genauer aus? Denkbar wäre in Analogie zum Ferritin, dass es sich um einen einzelnen großen Cluster handelt. Denkbar wären auch mehrere kleinere Cluster. Die Mo-Atome könnten z.B. auf zwei Cluster verteilt sein, da das Protein eventuell ein Dimer von Tetrameren darstellt.

Beide Varianten halte ich jedoch für unwahrscheinlich. Ein einzelner Riesencluster kann keine wohldefinierte molekulare Spezies sein¹⁹¹, sondern nur entweder ein amorpher Klumpen oder ein Ausschnitt aus einem der Zusammensetzung entsprechenden Kristallgitter. Im letzteren Falle würde er fast mit Sicherheit eine Struktur annehmen, die Ähnlichkeiten zu MoO_3 aufwiese. Weder darauf noch auf amorphe Natur geben jedoch die EXAFS-Resultate einen Hinweis. Dieser Einwand gilt auch noch gegen die Annahme von zwei kleineren Clustern. Bei Annahme einer noch größeren Zahl noch kleinerer Cluster wird hingegen wahrscheinlicher, dass es sich um definierte molekulare Spezies handelt. Das größte bekannte Isopolymolybdat(VI) ist das Mo_{36} -Polyanion, das jedoch ebenfalls nach den EXAFS-Daten als Modellverbindung nicht in Frage kommt. Zu alle dem ist noch zu bedenken, dass der Cluster des Ferritins eine Verbindung darstellt, die in ähnlicher Form bei physiologischem pH und Redoxpotenzial auch ohne das Protein entstehen könnte. Die diskutierten Mo-O-Riesencluster hingegen sind bzw. wären allesamt bei physiologischem pH thermodynamisch höchst instabil.

In der Biochemie lehrt die Erfahrung, dass die Natur nicht mit dem Kopf durch die Wand geht, sondern den Weg des geringsten Widerstandes bevorzugt. Im MoSto ist daher eine einfache, wohlbekannte Mo-Spezies zu vermuten, die nach allen bekannten Daten thermodynamisch (dominierende Spezies in Lösung über einen jeweils 3 Zehnerpotenzen breiten H^+ - und MoO_4^{2-} -Konzentrationsbereich) wie kinetisch (nahezu unmessbar schnelle Bildung) enorm begünstigt ist. Wenn das EXAFS-Spektrum von MoSto dem des Heptamolybdats so ähnlich sieht, ist die einfachste Erklärung die, dass es von Heptamolybdat hervorgerufen wird.

Dieses Heptamolybdat ist freilich gegenüber der aus reinen kristallinen Feststoffen bestimmten Struktur auf eine Art modifiziert, die einer verminderten Regelmäßigkeit entspricht, wobei diese Unregelmäßigkeit nicht in der mehr oder weniger geordneten Anlagerung von weiteren MoO_6 -Oktaedern an Heptamolybdat-Ionen besteht. Es dürfte eine dynamische Unordnung sein, die auf ständigem (bei der Messung natürlich als "Momentaufnahme" eingefrorenen) Ab- und Aufbau der Polyanionen sowie Fluktuationen in deren Struktur beruht.

¹⁹¹ Ansonsten wäre keine kontinuierliche Aufnahme bzw. Abgabe von Mo durch das Protein möglich, sondern nur eine Aufnahme oder Abgabe des kompletten Clusters, wie bei einem Enzym-Cofaktor. Das wäre eine von keinem sonstigen Metallspeicher bekannter und mit einer thermodynamisch so instabilen Spezies, wie dieser Cluster sein würde, auch schwer vorstellbarer Mechanismus.

Auch wenn der thermodynamische Stabilitätsbereich von Heptamolybdat nicht weit von den physiologischen Bedingungen entfernt ist, gilt doch nach wie vor: in MoSto liegt Mo in einer Form vor, die ohne das Protein unter ansonsten gleichen Bedingungen (auch kinetisch) nicht beständig ist. Wie kann das Protein diese Stabilisierung bewirken? Vier Faktoren sind allgemein bekannt, die die Bildung von Molybdat-Polyanionen begünstigen (siehe auch Abschnitt 2.4.1):

1. niedriger pH: Es ist wenig wahrscheinlich, dass im Inneren eines Proteinmoleküls der pH-Wert lokal niedriger ist als in der Umgebung. Vor allem ein lösliches, cytoplasmatisches Protein wie MoSto, das eine große Anzahl austauschbarer Protonen enthält, ist wohl kaum eine wirksame Sperre zur Aufrechterhaltung eines pH-Gradienten.
2. teilweise Reduktion des Mo^{VI} zum Mo^V: Aufgrund des UV-Vis-Spektrums kann diese für MoSto ausgeschlossen werden. Dem Protein fehlt die intensive Farbe der gemischtvalenten Polymolybdate. Die Lage der Röntgen-Absorptionskante entspricht ebenfalls der einer Mo^{VI}-Verbindung.
3. hohe Molybdat-Konzentration: Der Einbau von Molybdat in MoSto ist offenbar ein energieverbrauchender, ATP-abhängiger Prozess¹⁹². Daher ist ein Mechanismus vorstellbar, bei dem Molybdat aktiv ins Innere des Proteins transportiert wird, wo durch die lokal extrem hohe Konzentration spontan Polyanionen entstehen.
4. Anwesenheit bestimmter anderer Ionen: Es ist nicht klar, worauf dieser Effekt beruht, daher ist auch schwer vorherzusagen, ob geladene¹⁹³ Aminosäureseitenketten die Bildung von Molybdat-Polyanionen fördern oder nicht. Fest steht nur, dass es den Effekt gibt und er eine Rolle spielen könnte. Auf jeden Fall würden positiv geladene Seitenketten die Bindung von Molybdat begünstigen.

Es lassen sich noch weitere Aussagen über den Aufbau des Molybdat-Kernes wagen, wenn man die EXAFS-Daten in Beziehung setzt zu dem, was über die Speicherkapazität und die Proteinstruktur von MoSto ermittelt werden konnte.

147 Mo-Atome, in Form von 21 dicht gepackten Heptamolybdat-Einheiten¹⁹⁴ vorliegend, hätten ein Volumen von etwa 8 nm³, was einer kompakten Kugel von 2,5 nm Durchmesser oder einem Stab von 7 nm Länge und 1,2 nm Durchmesser entspräche. Das Proteinmolekül ist nach den Ergebnissen der SAXS-Untersuchungen etwa 12 nm lang bei 5,5–7 nm Durchmesser. Die "Wandstärke" der Proteinhülle um den vermuteten Mo-O-Cluster betrüge also 2 bis 4 nm. Beim Ferritin ist die Proteinhülle 4,5 nm dick. Von daher sind die experimentell gefundenen 150 Mo-Atome eine plausible Obergrenze für die Speicherkapazität von MoSto. Sie würden aber in dieser Form nur ca. 2% des Molekülvolumens einnehmen, was nicht mit der Überschlagsrechnung anhand der SAXS-Resultate in Einklang ist, derzufolge etwa 20% des Molekülvolumens aus anderem Material als Aminosäuren bestehen sollten.

¹⁹² Jörgt Schemberg und Volker Henschel, persönliche Mitteilung. Siehe auch Fenske & al. 2005.

¹⁹³ Es müssen nicht unbedingt basische Aminosäuren sein, da auch gewisse Anionen die Polymerisation begünstigen, siehe Abschnitt 2.4.1.3

¹⁹⁴ Aufgrund der gegenseitigen Abstoßung der Polyanionen ist deren dichte Packung natürlich keine realistische Vorstellung. Die Zahl 147 ist eine willkürliche Annahme (am nächsten an 150 gelegenes Vielfaches von 7).

Vermutlich wird der Molybdän-Sauerstoff-Kern durch mit in das Protein eingeschlossene Wassermoleküle vergrößert.

Enthält der Kern zusätzlich noch anorganische Kationen? 147 Molybdänatome tragen in Form von Heptamolybdaten eine Gesamtladung von $-126 \cdot e$. Die positive Überschussladung der Proteinhülle beträgt demgegenüber nur $72 \cdot e$, selbst wenn man annimmt, dass alle (ebenfalls 72) Histidinreste voll protoniert sind. Vorstellbar ist allerdings, dass die basischen Aminosäurereste vorzugsweise zum Kern hin orientiert, die Säuren hingegen nach außen gerichtet sind. Ohne eine mindestens lokale negative Überschussladung auf seiner Oberfläche würde MoSto auch von DEAE-Sephacel nicht gebunden. Andererseits ist die gegenseitige Abstoßung der Polyanionen sehr stark. Insgesamt gesehen ist es sehr wahrscheinlich, dass der Kern auch noch Kationen enthält, die einen geringen Teil (10 bis 20%) der Anionenladung des Mo-O-Clusters kompensieren. Am ehesten kommt dafür Na^+ in Frage, das außerdem noch die Bildung von Mo-Polyanionen begünstigt.

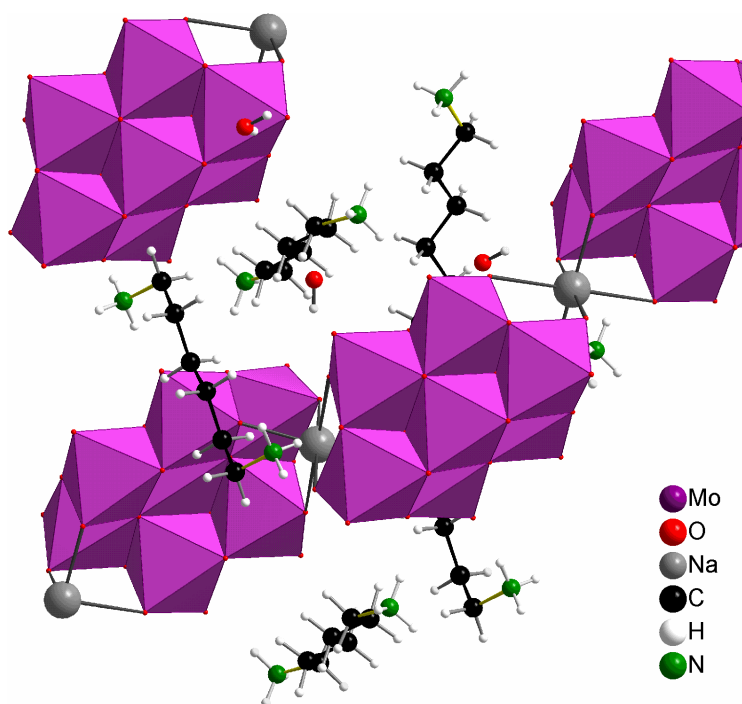


Abbildung 3.14: Eine mögliche Modellverbindung für den MoSto-Kern: das Heptamolybdat $\text{Na}_2[\text{C}_6\text{H}_{12}(\text{NH}_3)_2]_5 [\text{Mo}_7\text{O}_{24}]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Natrium-Ionen verknüpfen die Heptamolybdat-Einheiten zu Ketten, die in eine Matrix aus Kristallwasser und den organisch substituierten Ammoniumionen eingebettet sind¹⁹⁵.

Für eine Zusammensetzung dieser Art ist eine Struktur einer möglichen Modellverbindung bekannt, in der Heptamolybdat-Cluster mit Alkalimetall-Ionen und organisch substituierten Ammoniumionen ein Gitter bilden (Abbildung 3.14). Es fällt nicht schwer, sich in solch einer Struktur anstelle der organischen Ammoniumionen die Seitenketten von Lysin oder Arginin vorzustellen. Zwei parallel liegende Ketten aus der gezeigten Struktur, jede 10 Mo_7 -Einheiten umfassend (also insgesamt mit 140 Mo-Atomen), ergeben in etwa einen Quader, 10 nm lang, 2 nm breit und 1 nm hoch, mit Aussparungen, in die basische Aminosäureseitenketten eingreifen könnten. Von seinen Abmessungen her könnte dieser Quader ohne weiteres in einem MoSto-Molekül enthalten sein.

¹⁹⁵ Strukturdaten der Verbindung (bisher unveröffentlicht): persönliche Mitteilung von Dr. Yunshan Zhou und Marc Schmidtman, Ak Anorganische Chemie 1 der Universität Bielefeld.

Natürlich ist nicht davon auszugehen, dass MoSto exakt in Reih und Glied ausgerichtete Polyanionen enthält. Das Bauprinzip ist jedoch anwendbar und würde zur etwas gestreckten Form des Proteinmoleküls passen. Der kugelförmige Innenraum von Ferritin bietet zwar das optimale Oberfläche/Volumen-Verhältnis, aber er enthält einen elektrisch neutralen Partikel. Bei MoSto muss man sich vermutlich eher einen Schlauch vorstellen, dessen große innere Oberfläche, bedeckt mit kationischen AS-Seitenketten, Platz bietet für die Anlagerung der Polyanionen.

3.5 Das Wolfram-Analoge des Mo-Speicherproteins

Zum Abschluss der Versuche zur Optimierung der MoSto-Anreicherung wurde eine Anzucht durchgeführt, bei der dem Medium statt der üblichen 10 μM Molybdat 1 mM Wolframat zugegeben wurden, um die Zellen zur Produktion des Wolfram-Analogen des Speicherproteins (WSto) zu bringen. Die Proteinanreicherung wurde anschließend durchgeführt wie bereits erprobt, mit DEAE-Anionenaustauschchromatographie, Ammoniumsulfat-Fraktionierung und G200-Gelfiltration. Die relevanten Fraktionen bei den Chromatographie-Läufen wurden mit Hilfe des üblichen Molybdat-/Wolframat-Bestimmungsverfahrens ausgewählt, wobei nach der DEAE-Fraktionierung durch einen Versuch zur Maskierung mit Citrat (siehe 3.1.2.2.2) sichergestellt wurde, dass tatsächlich Wolframat und nicht (oder allenfalls in Spuren) Molybdat in den Fraktionen enthalten war.

Bei allen Anreicherungsschritten entsprach das Verhalten dem von MoSto. Die elektrophoretische Untersuchung der Fraktionen zeigte die Isolierung eines Proteins, das die bereits bekannte Doppelbande erzeugte. Offensichtlich handelte es sich tatsächlich um unverändertes MoSto, lediglich mit einem anderen Metall beladen.

Die Analyse der Fraktionen aus der Gelfiltration erbrachte jedoch ein zu jenem Zeitpunkt überraschendes Resultat: Statt der gewohnten 120 bis 150 μmol Metall je Gramm Protein wurden um 400 $\mu\text{mol/g}$ gemessen, entsprechend 90-100 Wolfram-Atomen je Proteinmolekül. Hier stieß ich zum ersten Mal bei einem vollständig aufgereinigten Präparat auf eine höhere Speicherkapazität als die bis dahin angenommenen 30-40 Atome je Molekül MoSto.

Das Ergebnis war auch deshalb bemerkenswert, weil in dieser Anreicherung die Proteinlösung höherem Stress ausgesetzt war als bei einer normal verlaufenden Präparation¹⁹⁶, d.h. es wären eher höhere Verluste und ein verringerter Metallgehalt zu erwarten gewesen. Möglicherweise führt die Neigung der Polywolframate zur Metastabilität (2.4.2.1) dazu, dass die Bindung an das Speicherprotein nicht so leicht durch Verdünnung der Proteinlösung zu lösen ist und daher die Verluste bei der langsamen G200-Gelfiltration geringer ausfallen.

¹⁹⁶ Bei einem ersten Gelfiltrationslauf über Nacht versagte der automatische Fraktionssammler, so dass das gesamte Eluat in einem einzigen Auffanggefäß landete. Die Lösung (200 mL) wurde in einer Ultrafiltrations-Rührkammer auf 1,5 mL eingeeengt und erneut auf die Säule aufgetragen.

3.6 Exkurs: Wolframat-resistente Mutanten von *A. vinelandii*

Es ist etwas irreführend, von Wolframat-Resistenz zu sprechen, weil Wolframat, wenn es auch das Zellwachstum hemmt (siehe Abbildung 3.2), keineswegs ein hochwirksames Gift für *A. vinelandii* darstellt. Nur wenn unter Stickstofffixierungs-Bedingungen kein oder fast kein Molybdat verfügbar ist, wird Wolframat zum echten Problem für die Zellen; dann und nur dann ist es sinnvoll, von Wolframat-Resistenz zu reden.

Die Ursache für die Empfindlichkeit gegenüber Wolframat ist natürlich dessen Ähnlichkeit mit Molybdat. Die Proteine des Mo-Stoffwechsels und der Mo-abhängigen Genregulation können die beiden Metalle nicht sicher unterscheiden, so dass die Mo-unabhängigen Nitrogenasesysteme nicht gebildet werden (Repression durch WO_4^{2-} wie durch MoO_4^{2-}) und in die konventionelle Nitrogenase ein "FeWco" eingebaut wird. Die Ähnlichkeit von W und Mo ist aber nicht groß genug, um dieser Wolfram-Nitrogenase Aktivität zu verleihen: N_2 -Fixierung und damit Wachstum sind blockiert¹⁹⁷.

Der Mechanismus lässt auf Anhieb zwei mögliche Wege zur Resistenz erkennen:

1. Ausfall des Mo-Transportsystems, die Zellen nehmen dann überhaupt kein Wolframat auf.
2. Ausfall des Regulationsmechanismus für die Expression der Fe-Nitrogenase, so dass sie konstitutiv, also unabhängig von der Anwesenheit von WO_4^{2-} oder MoO_4^{2-} gebildet wird.

Das heißt keineswegs, dass nur zwei Typen von Mutanten möglich wären. Zum einen kann eine Mutation ein Genprodukt völlig außer Gefecht setzen oder nur seine Aktivität reduzieren, zum anderen sind beim Mo-Transport und vermutlich auch bei der Regulation der Fe-Nitrogenase mehrere Genprodukte beteiligt. Eine Eigenschaft aber muss allen Mutanten gemeinsam sein: Sie können unabhängig von Wolframat, also auch unabhängig von Molybdat die alternative Nitrogenase herstellen. Genau darin lag das Ziel dieser Versuche: es sollten *Azotobacter*-Varianten erhalten werden, die eine leichtere Gewinnung der Fe-Nitrogenase erlauben als der Wildtyp.

3.6.1 Gewinnung der Mutanten, Wachstumsversuche

Da Methoden zur gezielten genetischen Modifikation von Bakterien in unserer Arbeitsgruppe nicht zur Verfügung standen, war die Isolierung von Spontanmutanten (Abbildung 3.15) der einzige Weg zu Wolframat-resistenten (Wr-) Stämmen. Als erstes musste dazu ermittelt werden, welche Konzentration an Wolframat im Medium erforderlich ist, um das Wachstum der Wildtyp-Zellen zu verhindern. Es wurde eine Versuchsreihe mit einer logarithmisch gestuften Abfolge verschiedener Konzentrationen von $3 \mu\text{M}$ bis 30 mM durchgeführt. Das Medium war Standardmedium, dem jedoch weder Molybdat noch Ammoniumsalz zugesetzt worden war. Beimpft wurde aus einer Vorkultur, der 20 mM Ammoniumacetat zugesetzt worden waren, um die Bildung von Nitrogenasen zu unterdrücken.

¹⁹⁷ Der beschriebene Mechanismus ist belegt für *Rhodobacter capsulatus*, dürfte bei *A.v.* aber entsprechend ablaufen. Siemann 2000, 125-135. Siemann & al. 2003, 3851.



Abbildung 3.15: Neben den modernen molekulargenetischen Methoden verfügt die Mikrobiologie auch über verschiedene traditionelle Techniken zur Gewinnung von interessanten Mutanten. Das von mir verwendete Verfahrensprinzip, einen vorhandenen Organismus speziellen Umweltbedingungen auszusetzen, ist vielen Menschen aus dem alltäglichen Leben vertraut. © Mark Parisi, www.offthemark.com

Bei allen Kulturen ließ sich zumindestens ein kleines, von der W-Konzentration unabhängiges Minimalwachstum feststellen, das vermutlich durch den im Inokulum enthaltenen gebundenen Stickstoff und die üblichen Mo-Spuren¹⁹⁸ im Medium ermöglicht wurde. Ein über dieses Minimum hinaus gehendes Wachstum war nur bei W-Konzentrationen unter $30 \mu\text{M}$ zu beobachten (Abbildung 3.16).

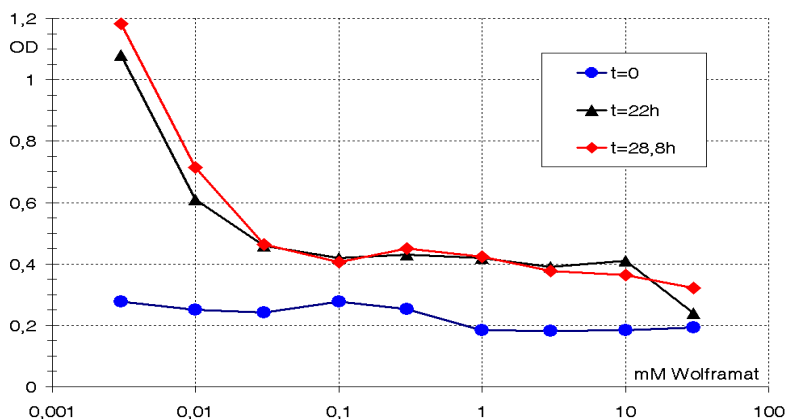


Abbildung 3.16: Ermittlung der Wolframatkonzentration, die erforderlich ist, um das Wachstum von Stickstoff-fixierendem *A. vinelandii* in Abwesenheit von Mo zu unterbinden.

Für die Isolierung von resistenten Mutanten wurden daraufhin Agarplatten mit 20, 50 und $100 \mu\text{M}$ Wolframat angefertigt, auf denen jeweils ein Tropfen einer mit Ammoniumsalz versorgten Flüssigkultur flächig ausgestrichen wurde. Die W-Konzentrationen erwiesen sich jedoch allesamt als zu niedrig. Auf allen Platten wuchs ein mehr oder weniger starker Bakterienrasen heran, in den gelegentlich kräftiger gewachsene Kolonien eingestreut waren. Letzteres wurde jedoch nur bei den beiden niedrigeren Konzentrationen beobachtet und daher nicht als sicheres Zeichen für brauchbare resistente Mutanten angesehen. Alle Platten wurden verworfen. Offenbar ist auf einer Agarplatte eine höhere Wolframatkonzentration zur Inhibierung erforderlich als in Flüssigkulturen.

¹⁹⁸ Es wurde in diesem Versuch kein speziell von Mo gereinigtes Medium verwendet.

Für die nächsten Ansätze wurde der Wolframatgehalt der Platten auf 1 mM erhöht. Zum Beimpfen wurde wieder eine mit Ammoniumacetat versorgte Flüssigkultur verwendet, jedoch war diesmal auch der Vorkultur schon 1 mM WO_4^{2-} zugesetzt worden. Insgesamt vier Agarplatten und als Kontrolle eine fünfte, die zusätzlich 20 mM Ammoniumacetat enthielt, wurden wie oben beschrieben beimpft.

Nach drei Tagen im Brutschrank bei 30°C war auf der Kontrollplatte ein dichter Bakterienrasen herangewachsen, die vier Selektions-Platten zeigten einen ganz schwachen Schleier von Hintergrundwachstum. Schneller wachsende Einzelkolonien waren noch nicht sicher auszumachen.

Im Laufe von insgesamt 16 Tagen Inkubation bildeten sich auf drei der Selektions-Agarplatten insgesamt 9 deutlich erkennbare Kolonien, die fortlaufende Nummern (Wr1 bis Wr9) erhielten. Wr6 entwickelte sich zu einem uneinheitlich wachsenden Haufen, ich entschloss mich, damit nicht weiter zu arbeiten. Die übrigen Kolonien wurden auf jeweils einer frischen Selektions-Agarplatte ausgestrichen. Nach fünftägiger Inkubation waren in allen Fällen jeweils einheitlich aussehende Kolonien herangewachsen.

Stamm Nr.	9	8	2	3	5	7	4	1
Koloniedurchmesser nach 5 d ca. [mm]	1	1	0,5	0,5	0,4	0,4	0,2	0,1

Alle acht Stämme wurden fortan sinngemäß ebenso gehalten wie der Wildtyp¹⁹⁹. Im ersten Jahr der Stammhaltung kam es bei allen Stämmen außer Wr8 und Wr9 zu einer Anpassung an das Medium durch weitere Mutationen. Dies ließ sich daran erkennen, dass auf den Agarplatten neben den ursprünglichen kleinen Kolonien plötzlich größere erschienen²⁰⁰. Einige dieser stärker wachsenden Kolonien wurden dann zur weiteren Stammhaltung ausgewählt. Nach dem zehnten Überimpfen boten dann wieder alle Platten ein jeweils homogenes Bild.

Mit Zellen von dieser zehnten Platte führte ich einen Wachstumsversuch durch. Es lag der Verdacht nahe, dass die fortlaufende Anpassung an das Medium dazu geführt hatte, dass nunmehr alle acht Stämme weitgehend identisch waren. Wie der Wachstumsversuch (Abbildung 3.17) zeigte, traf dies jedoch keineswegs zu. Anhand des Wachstumsverhaltens ließen sich die Stämme grob in drei Gruppen einteilen: Eine, die nahezu das Wachstum des Wildtyps unter sinngemäß gleichen Bedingungen²⁰¹ erreichte, eine Gruppe schwach wachsender Stämme, die 50% oder weniger des Wachstums der ersten Gruppe zeigten, und den Stamm Wr7 mit uneinheitlichem Wachstum. Da jeder Stamm mit einem dreifachen Ansatz getestet wurde und jedesmal alle drei Ansätze übereinstimmende Wachstumsverläufe zeigten, dürften zufällige Störungen weitgehend ausgeschlossen sein.

¹⁹⁹ D.h. unter Stickstofffixierungsbedingungen, aber mit 1 mM Wolframat statt 10 μM Molybdat. Siehe "Materialien und Methoden", 5.1.2.

²⁰⁰ Zuerst bei Wr5 nach dem zweiten Überimpfen, dann bei Wr4 und Wr7 nach dem vierten und bei Wr1-3 nach dem sechsten Überimpfen.

²⁰¹ D.h. Stickstofffixierungsbedingungen, kein zugesetztes Molybdat.

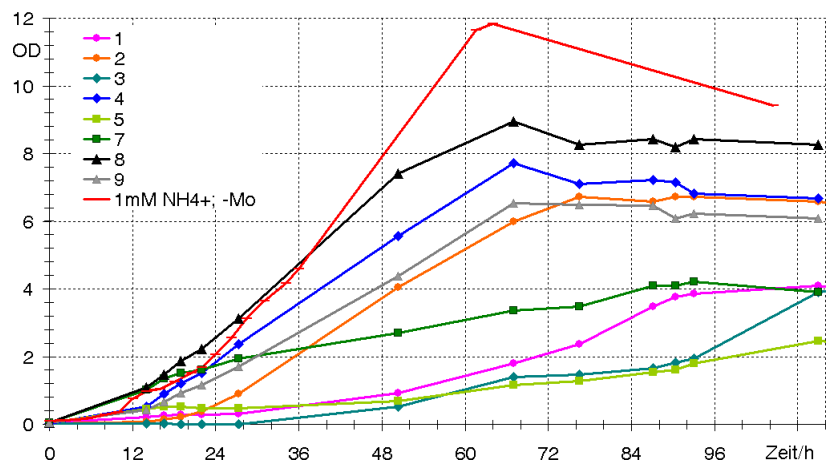


Abbildung 3.17: Wachstum der erhaltenen Wolfram-resistenten Spontanmutanten, Kurven gemittelt aus Dreifachansätzen. Die rote Vergleichskurve für den Wildtyp in Mo- und W-freiem Medium (bei reduziertem Angebot an gebundenem Stickstoff) wurde bei einem früheren Versuch aufgenommen, sie war bereits in Abbildung 3.2 zu sehen. OD umgerechnet aus Klett-Summerson-Werten.

Die Stammhaltung wurde an diesem Punkt vorerst beendet. Die Stämme wurden nur noch einmal auf neue Platten überimpft, um frische Zellen zu erhalten, die sofort nach Ende des Wachstums in ein spezielles Kryo-Medium übergeführt, eingefroren und bei 77 K aufbewahrt wurden. Drei Monate später wurde ein Teil dieser Kryo-Kulturen aufgetaut und ausplattiert, um die Lebensfähigkeit der Zellen zu erproben. Von diesen Platten wurden dann auch die Inokula für die im folgenden Abschnitt beschriebenen Untersuchungen genommen.

3.6.2 Prüfung auf Speicherprotein- und Nitrogenaseexpression

Bei der Anzucht der Zellen für diese Untersuchungen zeigte sich eine ähnliche Rangfolge wie bei dem oben beschriebenen Wachstumsversuch. Natürlich wurde bei der Anzucht nicht versucht, alle Kulturen mit der gleichen Zelldichte zu starten, sondern im Gegenteil wurde bei den langsamer wachsenden Stämmen ein größeres Inokulum eingesetzt. Dennoch war das Wachstum so unterschiedlich, dass bei der Ernte nach 47 bzw. 77 h die erreichten Werte der Trübungs-OD von 3 bis 11 reichten. Daher wurden die durch Lysozymaufschluss gewonnenen Extrakte nach Bestimmung des Protein- und Wolframgehaltes durch Verdünnen mit Wasser auf einen einheitlichen Gesamt-Proteingehalt von 0,7 g/L eingestellt.

Die vorbehandelten²⁰² Proben wurden mit Doppelimmunodiffusionstests untersucht. Bei diesem Verfahren werden die auf ein Protein (Antigen) zu testende Lösung und eine Lösung gegen das Protein gerichteter Antikörper in benachbarte Löcher in einem Agarose-Gel aufgetragen. Proteine und Antikörper diffundieren durch das Gel aufeinander zu. Wo sie aufeinander treffen, bildet sich ein unlöslicher Antigen-Antikörper-Komplex, wenn das gesuchte Protein tatsächlich in der aufgetragenen

²⁰² Siehe "Materialien und Methoden", 5.2.4.1.

Lösung enthalten ist. Nach Auswaschen der nicht gebundenen Proteine kann dieser Komplex durch eine gewöhnliche Proteinfärbungsmethode sichtbar gemacht werden. Die Lage und Stärke der Präzipitat-Bande gibt Aufschluss über die vorhandene Menge des Proteins.

Verwendet wurden mit Hilfe einer vollständig gereinigten MoSto-Probe hergestellte Antikörper gegen das Speicherprotein, sowie bereits vorhandene Antikörper gegen die Komponente 1 der konventionellen Mo-Nitrogenase bzw. der Fe-Nitrogenase. Die Wolfram-Analysen hatten bereits gezeigt, dass alle Wr-Stämme Wolfram enthielten, d.h. offenbar war kein Stamm darunter, bei dem die Resistenz auf Unfähigkeit zur Wolframat-Aufnahme beruhte. Daher war zu erwarten, dass alle Stämme das Speicherprotein enthielten, was der Immunodiffusionstest auch sehr deutlich bestätigte (Abbildung 3.18).

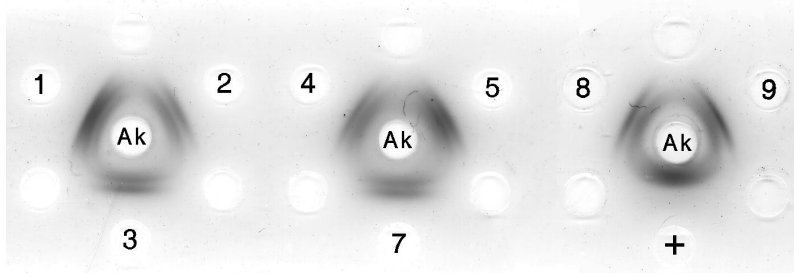


Abbildung 3.18: Prüfung der Wr-Mutanten auf das Speicherprotein. Aufgetragen wurden im Zentrum je 4 μL des Anti-MoSto-Serums (Charge 78 S₆), außen je 2 μL der zellfreien Extrakte. "+" steht für die positive Vergleichsprobe (DEAE-gereinigtes WSto).

Von besonderem Interesse war angesichts der beabsichtigten Verwendung der Mutanten der Test auf die konventionelle Nitrogenase. Diese ist, wie oben dargelegt, für die Bakterien unter den ihnen aufgezwungenen Wachstumsbedingungen nutzlos. Allerdings ist bereits seit längerem ein Wolframat-resistenter Stamm (CA6) aus der Literatur bekannt, der sowohl die konventionelle als auch die Fe-Nitrogenase exprimiert²⁰³.

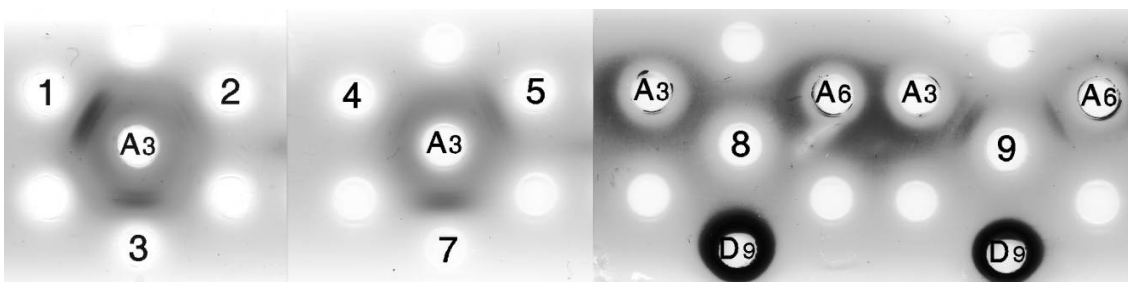


Abbildung 3.19: Prüfung der Wr-Mutanten auf die Mo-Nitrogenase. Aufgetragen je 20 μL Anti-Av1Mo-Serum (Chargen 99 A₃ und 99 A₆) und je 7 μL der zellfreien Extrakte. "D₉" steht für Anti-Rc1Fe-Serum der Charge 60 D₉, das sich als unbrauchbar erwies. Die rechte Hälfte der Abbildung wurde massiv digital bearbeitet, um die im Original verschwindend schwachen Präzipitatbanden bei der Wr9-Probe im Druck erkennbar zu machen.

²⁰³ Premakumar, R.; Jacobitz, Susanne; Ricke, Steven C.; Bishop, Paul E.: Phenotypic Characterization of a Tungsten-Tolerant Mutant of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178 (1996) 691-696.

Der Test wies nach, dass von mindestens vier Stämmen die Mo-Nitrogenase exprimiert worden war, von Wr1 sogar in erheblicher Menge. Drei weitere Stämme zeigten Spuren eines möglichen Präzipitats, nur beim Stamm Wr8 war der Test anscheinend negativ. Die Auswertung der Gele wurde allerdings erschwert durch einen diffusen Hintergrund-Niederschlag um die Auftragsstelle der Antikörper herum, vermutlich aufgrund der Alterung des zuvor schon länger gelagerten Anti-Av1Mo-Serums (Abbildung 3.19).

Auf die alternative (Fe-)Nitrogenase waren die Bakterien zum Wachstum unbedingt angewiesen. Daher wurden für den Test auf deren Komponente 1 durchgängig positive Befunde erwartet²⁰⁴. Dies war auch der Fall, allerdings fiel die Reaktion in zwei Fällen nur schwach aus (Abbildung 3.20).

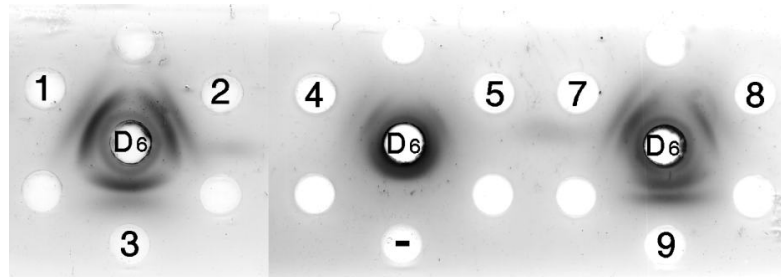


Abbildung 3.20: Prüfung der Wr-Mutanten auf die Fe-Nitrogenase. Aufgetragen je 21 μL Anti-Rc1Fe-Serum der Charge 60 D₆, außen je 7 μL der zellfreien Extrakte. "-" steht für die negative Vergleichsprobe (identisch mit der positiven Vergleichsprobe in Abbildung 3.18).

Insgesamt dürften diese Ergebnisse nur als vorläufig zu werten sein. Für die Versuche stand nur sehr begrenzt Zeit zur Verfügung, und ich war zuvor nicht mit immunologischen Methoden vertraut. Das Alter der Antikörper gegen die Nitrogenasen und die Notwendigkeit, mangels eines für die Fe-Nitrogenase von A.v. spezifischen Antikörper-Serums auf gegen das homologe Protein aus *R. capsulatus* gerichtete Antikörper zurückzugreifen, schafften zusätzliche Unsicherheiten bei der Bewertung der Resultate.

3.6.3 Zusammenfassung

Stellt man alle in den Versuchen erhaltenen Informationen über die Wr-Mutanten zusammen (Tabelle 3.3), so zeigen sich durchaus einige offensichtliche Trends. Die Reihenfolge der Wachstumsgeschwindigkeiten für die Stämme steht weitgehend fest, die Abweichungen von der Reihenfolge bei wiederholten Anzuchten sind gering, vor allem wenn man berücksichtigt, dass die Vorkulturen und die Anzucht gar nicht für die Bestimmung des Wachstumsverhaltens geplant waren. Alle Stämme können Wolframat (d.h. auch Molybdat) aufnehmen und speichern, die Resistenz beruht also in allen Fällen auf der konstitutiven Expression der Fe-Nitrogenase. Für das Wachstum unter den ihnen auferlegten Bedingungen ist die Wolfram-Akkumulation vermutlich ohne Belang.

²⁰⁴ Ein negatives Resultat hätte freilich größeres Interesse gefunden, hätte es doch bedeutet, dass der betreffende Stamm eine aktive Wolfram-Nitrogenase herzustellen vermochte.

Dass höherer W-Gehalt mit reduziertem Wachstum korreliert, dürfte vielmehr daran liegen, dass die schwächer wachsenden Stämme die für sie nutzlose konventionelle Nitrogenase herstellen, in der erhebliche Mengen W enthalten sind. Die Produktion dieses völlig überflüssigen Enzyms wirkt wachstumshemmend. Dies gilt natürlich vor allem dann, wenn gleichzeitig die benötigte Fe-Nitrogenase nur schwach exprimiert wird, wie bei Wr5, der unter den acht Stämmen das langsamste Wachstum zeigt. Als anscheinend einziger Stamm bildet Wr8 keine konventionelle Nitrogenase und erfüllt damit die ursprünglich an die Mutanten gerichtete Erwartung.

Tabelle 3.3: Merkmale der Wolframat-resistenten Stämme. Die Reihenfolge entspricht ihrem Wachstumsverhalten in dem speziell zu dessen Ermittlung durchgeführten Versuch (Abbildung 3.17). Die Größe (Fläche) der Ziffern in der dritten Zeile ist proportional zum jeweiligen Zahlenwert. Die Stärke der Reaktion in den immunologischen Tests ist grob in vier Klassen eingeteilt: ++ stark, + deutlich sichtbar, ± kaum sichtbar, – negativ.

Stamm Nr.	8	4	9	2	7	1	3	5
Wachstum	nahezu normal				?	schwach		
nmol W je mg Protein im Extrakt	4,3	6,0	3,1	4,9	8,0	24	7,6	7,6
MoSto	++	++	++	++	++	++	++	++
Mo-Nitrogenase	–	±	±	±	+	++	+	+
Fe-Nitrogenase	++	+	++	++	++	++	++	+
Wachstumsreihenfolge bei den Vorkulturen	1.	2.	5.	3.	6.	4.	7.	8.
Wachstumsreihenfolge bei der Anzucht	1.	2.	4.	3.	7.	6.	8.	5.

4 Fazit

Die vorliegende Arbeit stellt keineswegs eine auch nur annähernd vollständige Untersuchung des Mo-Speicherproteins aus *Azotobacter vinelandii* dar. Dies wäre auch ein vermessenes Ziel gewesen, vor allem wenn man bedenkt, dass die Jahrzehnte währenden, Hunderte von Veröffentlichungen umfassenden Forschungen am Eisenspeicherprotein Ferritin z.B. bisher nur grobe Informationen über den Mechanismus des Fe-Einbaus und gar keine über den der Fe-Freisetzung hervorgebracht haben. Es ist im Rahmen dieser Arbeit jedoch gelungen, die Grundlagen für eine umfassende Charakterisierung von MoSto zu legen.

Aufbauend auf der ersten Veröffentlichung zu MoSto vor über 20 Jahren, wurde eine Anreicherungsprozedur erarbeitet, mit der schnell und unkompliziert reines Protein für weitere Untersuchungen gewonnen werden kann. Die früheren Angaben über Molmasse und Untereinheitenstruktur konnten berichtigt werden. Die vollständige Sequenz beider Untereinheiten ist bekannt, zu einem kleinen Teil durch direkte Sequenzierung, zum größeren Teil durch Übersetzung aus dem andernorts vollständig sequenzierten A.v.-Genom. Die von der Bioinformatik zur Verfügung gestellten Werkzeuge ermöglichten erste vorsichtige Angaben über die mutmaßliche dreidimensionale Struktur. Vervollständigt wird die proteinbiochemische Charakterisierung durch eine Bestimmung der äußeren Gestalt des Proteinmoleküls mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung.

Es gelang nicht, die Mo-Speicherkapazität des Proteins genau zu bestimmen. Vermutlich durch präparationsbedingte und daher unvermeidliche Verdünnung der Proteinlösung kam es im Laufe der Anreicherung stets zu einer partiellen Freisetzung von Mo aus MoSto, die nicht unter Kontrolle gebracht werden konnte. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Speicherkapazität wesentlich höher ist als bisher vermutet. Bei den Untersuchungen mit Röntgenabsorptionsspektroskopie wurde die frühere Vermutung bestätigt, dass Mo im MoSto als Polyoxomolybdat(VI) vorliegt, zudem konnte die Struktur dieses Polyoxomolybdat erstmals näher beschrieben werden.

Es ist bisher kein anderes Molybdoprotein bekannt, das Mo in dieser Form enthält. Alle anderen Molybdoproteine enthalten das Metall entweder in Form einzelner, tetraedrischer Molybdat(VI)-Anionen, oder in kleineren Oxidationsstufen und zumindestens teilweise durch Schwefel-Liganden komplexiert. Auch hinsichtlich der Aminosäuresequenz weist MoSto keine Ähnlichkeit mit anderen Mo enthaltenden Proteinen auf. MoSto ist offensichtlich ein völlig neuartiger Typus von Protein, der bisher alleine da steht.

Die Ergebnisse der BLAST-Recherche in Proteindatenbanken zeigen andererseits, dass die Molybdän-Speicherung mittels MoSto wohl kein Monopol von *Azotobacter* ist, wie es bisher angenommen wurde. Es ist zu erwarten, dass die rasch fortschreitende Sequenzierung mikrobieller Genome noch weitere verwandte Sequenzen zu Tage fördern wird. Die Interpretation solcher Funde muss allerdings mit Vorsicht geschehen. Dass in den Genom-Daten sowohl bei *A. vinelandii* als auch bei *R. palustris* die Produkte der MoSto-Gene als "mutmaßliche Uridylatkinase" bezeichnet wurden, belegt, dass "altmodische" proteinbiochemische Arbeiten wie die meinige durch die Genomforschung keineswegs überflüssig werden.

4.1 Ziele für weitere Arbeiten

Eines der wichtigsten dieser Ziele dürfte die Kristallisation von MoSto sein, um mittels Röntgenbeugung die dreidimensionale Struktur des Proteins und auch der darin enthaltenen Mo-Komponente aufzuklären. Möglicherweise könnte für letzteres ein Umweg zum Ziel führen: Das Wolfram-Analoge von MoSto ist leicht durch Anzucht von Zellen in Wolframat-haltigem Medium zugänglich, und anscheinend gibt es bei diesem "WSto" weniger Probleme mit unerwünschter Freisetzung des gebundenen Metalls.

Daneben steht gleichberechtigt das Ziel, den Mechanismus von Einbau und Freisetzung des Metalls aufzuklären. Auf diese Fragen konnte ich leider in meiner Arbeit überhaupt nicht eingehen. Entsprechende Untersuchungen haben jedoch in unserer Arbeitsgruppe bereits sehr erfolgreich begonnen, und die ersten Ergebnisse zeigen, dass MoSto auch in dieser Hinsicht ein nach bisherigem Wissen einzigartiges Protein ist²⁰⁵. Die Möglichkeit, *in vitro* Molybdat in das Protein einzubauen, dürfte eine genaue Festlegung der Mo-Speicherkapazität ermöglichen. Darüber hinaus wäre es verlockend, auch den Einbau anderer Metallate zu erproben. Die nächstliegenden wären Wolframat, Vanadat und Perrhenat.

Weiter ist die Biosynthese des Proteins selbst von Interesse. Der augenscheinlich etwas komplexere Aufbau als $\alpha_4\beta_4$ -Hetero-Oktamer oder gar als $(\alpha_2\beta_2)_2$ -Homodimer von Heterotetrameren wirft die Frage auf, inwieweit das endgültige Molekül alleine durch self-assembly entstehen kann. Als erstes könnte versucht werden, in einem Trägerorganismus wie *E. coli* die MoSto-Gene zu überexprimieren und zu prüfen, ob dabei aus den synthetisierten Peptiden funktionales MoSto entsteht.

²⁰⁵ Fenske &al. 2005.

Eine anspruchsvollere und nur langfristig zu klärende Frage ist die nach der genauen Rolle von MoSto im bakteriellen Mo-Stoffwechsel. Auch wenn Mechanismen zur Einlagerung und Freisetzung von Mo *in vitro* gefunden sind, ist noch lange nicht klar, wie die Freisetzung *in vivo* reguliert wird. Zudem stellt sich angesichts von MoSto erneut die Frage nach der Funktion von Proteinen wie ModG, denen ebenfalls eine Speicher- bzw. Pufferfunktion für Mo zugeschrieben wird. In *A. vinelandii* wird die Biosynthese von ModG höchstwahrscheinlich mit dem ModABC-Transportsystem gemeinsam reguliert, d.h. es wird bei Molybdän-Mangel gebildet. Dient ModG als Scavenger, der freies Molybdat in der Zelle einsammelt und so für die Verwendung in der Moco- und FeMoco-Biosynthese mobilisiert, und bewirkt es möglicherweise indirekt eine Freisetzung von Mo aus dem Speicherprotein, indem es mit diesem um das freie Molybdat konkurriert? Dafür müssten Freisetzung und Wiedereinbau von Mo ständig ablaufende Prozesse sein, die nur durch die im MoSto gespeicherte Mo-Menge bzw. durch die Molybdatkonzentration im Cytosol reguliert werden. Auf jedem Fall bietet das Mo-Speicherprotein noch Anlass für viele interessante Untersuchungen, an denen mich nur stört, dass ich daran nicht mehr beteiligt sein werde.

5 Materialien und Methoden

5.1 Zellanzucht

5.1.1 Nährmedium für *Azotobacter-vinelandii*-Kulturen

Verwendet wurde ein für *Azotobacter* seit langem bewährtes²⁰⁶ modifiziertes Burk'sches Medium folgender Zusammensetzung:

	g/l	mmol/l
Saccharose	20	58,4
Mineralien (werden als 10fach konzentrierte Lösung zugegeben)		
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,2	0,811
Calciumchlorid-Dihydrat	0,09	0,612
NaCl	0,2	3,42
Eisen(III)-citrat	0,025	0,095
Phosphatpuffer pH 8,9 (wird als 100fach konzentrierte Lösung zugegeben)		
Kaliumdihydrogenphosphat	0,026	0,105
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,812	16,1
Variable Bestandteile (siehe Text)		
10 mM Natriummolybdatlösung	0,1 mL/L	0,01
2 M Ammoniumacetatlösung	10 mL/L	20

Für Untersuchungen unter Stickstofffixierungs-Bedingungen wurde der Mineralienlösung Natriummolybdat zugesetzt. Für Anzuchten unter Nitrogenase-Repression wurde der Mineralienlösung Ammoniumchlorid oder -acetat zugegeben. Mineralienlösung, Pufferlösung und Saccharoselösung wurden in separaten Gefäßen bei 121°C sterilisiert und danach erst zur fertigen Nährlösung kombiniert.

Das Nährmedium wurde in gleicher Zusammensetzung für alle Vor- und Hauptkulturen eingesetzt, unter Zusatz von 15 g/l Agar auch für die Stammhaltung auf Agarplatten. Für alle Arbeiten mit den Wolframat-resistenten Mutanten wurden Medien verwendet, denen weder Molybdat noch Ammoniumsalze zugesetzt waren und die mit 1 mM Natriumwolframat versetzt worden waren.

Alle sonstigen für einzelne Versuche gemachten Abwandlungen sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

²⁰⁶ Strandberg/Wilson 1968, 25.

5.1.2 Stammhaltung von *Azotobacter vinelandii*

Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten unter Stickstofffixierungs-Bedingungen (Nährboden ohne Ammoniumsalze, mit Molybdat), um das Wachstum von Fremdkeimen möglichst zu unterbinden. In Abständen von sechs Wochen wurden auf frische Platten übergeimpft. Dazu wurden Zellen von einer Einzelkolonie entnommen und als Verdünnungsausstrich auf die neue Platte ausgebracht. Nach 72 Stunden Wachstum bei 30°C wurden die Kulturen bei 4°C gekühlt aufbewahrt.

Gleichzeitig mit der Auffrischung der Stammhaltung wurden jeweils neue Platten mit "Ammonium-Nährboden" von den alten Stammhaltungs-Platten auf die nämliche Art beimpft, bebrütet und aufbewahrt. Diese lieferten dann das Impfmateriale für Versuche mit "Ammonium-Zellen".

Die Wolframat-resistenten Mutanten wurden sinngemäß ebenso gehalten, jedoch wegen ihres langsameren Wachstums jeweils nach dem Überimpfen auf neue Platten statt drei Tagen eine Woche bei 30°C bebrütet.

5.1.3 Vorkulturen

Für Vorkulturen wurden je 30 mL "Molybdat-Nährlösung" bzw. "Ammonium-Nährlösung" in 100ml-Erlenmeyerkolben oder je 100 mL der jeweiligen Nährlösung in 300ml-Erlenmeyerkolben mit Schikannen und angesetzten Klett-Küvetten mit Zellmaterial von einer entsprechenden Agarplatte beimpft.

Schüttelfrequenz	170 Upm (100 mL-Kolben) bzw. 150 Upm (300 mL-Kolben)
Temperatur	30°C
Wachstumszeit	24 h

Für die in 3.6.2 beschriebenen Untersuchungen an den Wolframat-resistenten Mutanten wurden die Vorkulturen in Horizontal-Kulturröhrchen (siehe unten, 5.1.4.2), die Hauptkulturen in 300 mL-Kolben (sinngemäß wie oben beschrieben) angezogen.

5.1.4 Wachstumsversuche

5.1.4.1 Messung von Zelldichte und pH

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

1. Direkte Messung der Absorption (OD) bei 436 nm in 1 cm-Küvetten. Die dafür aus den Kulturen unter sterilen Bedingungen entnommenen Proben wurden ggf. verdünnt, um einen Messwert im Bereich 0,1 bis 0,6 zu erhalten, in dem die OD linear von der Zelldichte abhängt. Nach Umrechnung auf die unverdünnte Suspension wurde noch der zu Beginn für die unbeimpfte Nährlösung gemessene Blindwert abgezogen, um den endgültigen Wert zu erhalten.

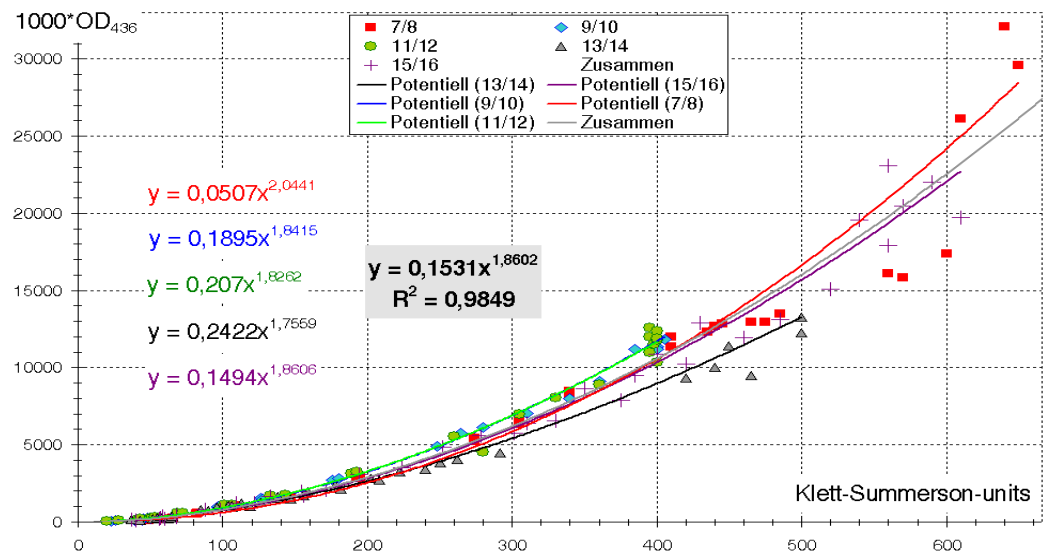


Abbildung 5.1: Kalibrierung der indirekten OD-Bestimmung aus Klett-Werten

2. Indirekte Bestimmung der OD durch Messung in einem Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter mit Filter No. 42 (blau) bestimmt, in das sich die Kulturkolben (mit ihrer angesetzten Küvette) bzw. die unten beschriebenen Zellkulturröhrchen direkt einstellen lassen. Dadurch entfällt die umständliche sterile Probenentnahme. Zur Umrechnung der Klett-Werte (KS) in OD-Werte wurde in den Wachstumsversuchen 7-16 (3.1.1.1) eine Kalibrierung durchgeführt. Es zeigte sich, dass trotz unterschiedlicher Wachstumsbedingungen der Zusammenhang bei allen Kulturen nahezu gleich war und sich am besten durch eine Potenzfunktion wiedergeben ließ. Eine über alle Kulturen gemittelte Regressionsrechnung ergab:

$$OD_{436} = 1,5 \cdot 10^{-4} \cdot KS^{1,86} \quad (6)$$

Wie man aus Abbildung 5.1 erkennen kann, muss aufgrund der Umrechnung mit einer Unsicherheit der OD-Werte von $\pm 20\%$ gerechnet werden.

Für die pH-Messungen (3.1.1, Abbildung 3.1) wurden Proben von je 1 mL entnommen und mit Merck-Spezial-Indikatorstäbchen pH 4-7 bzw. pH 6,5-10 geprüft.

5.1.4.2 Durchführung der Wachstumsversuche

Für die in 3.1.1 beschriebenen Wachstumsversuche wurden je 100 mL der jeweiligen Nährlösung in 300ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen und angesetzten Klett-Küvetten eingesetzt. Als Inokulum dienten 2 mL Zellsuspension aus einer entsprechenden Vorkultur.

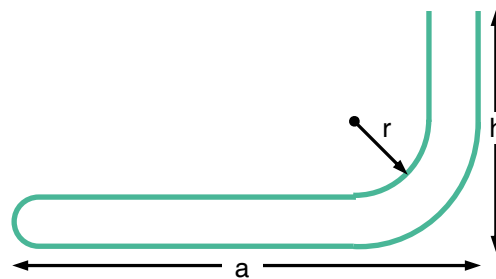
Schüttelfrequenz 150 Upm
Temperatur 30°C

Alle Versuche wurden als Doppelansätze gefahren, um nicht-reproduzierbare "Zufallsergebnisse" durch Kontamination mit Fremdkeimen, Pipettierfehler beim Ansetzen etc. möglichst sofort erkennbar zu machen. Die OD wurde durch direkte Messung bestimmt. Im Versuch zur pH-Toleranz wurde nur ein Ansatz je pH-Wert gemacht, die OD durch Umrechnung aus KS-Werten ermittelt.

Die Versuche zur Wolframat-Toleranz von stickstofffixierenden Zellen (3.6.1) wurden als Einfach-Ansätze mit 30 mL Nährlösung in 100ml-Erlenmeyerkolben durchgeführt, die OD durch die direkte Messung bestimmt.

Der Wachstumsversuch mit den Wolframat-resistenten Stämmen wurde mit Dreifachansätzen von je 4 mL Nährlösung in nach meinen Vorgaben angefertigten Horizontal-Zellkulturröhrchen aus Duran® durchgeführt, wie sie rechts im Maßstab 1:2 skizziert sind. Die genauen Abmessungen sind (in mm):

Krümmungsradius r ca.	20
Länge a	124
Höhe h	64
Außendurchmesser	14
Wandstärke	1,5
Inhalt des horizontalen Teils ca.	11 mL
geeignete Schüttelfrequenz	130 Upm



Diese Röhrchen lassen sich zur Trübungs-Messung ebenfalls in das Klett-Summerson Photometer einstellen. Für die Messung ist ein Kulturvolumen von mindestens 3,5 mL erforderlich. Im Inkubator hält eine passend gefertigter Halterung sie in genau waagerechter Position mit aufgerichtetem Hals. Ein Vergleichsexperiment ergab, dass das Wachstumsverhalten dem in den 300 mL-Kolben entspricht, wenn das Volumen der Kultur 4 bis 5 mL beträgt. Mit diesen Röhrchen wurde es möglich, mit minimalem Medienverbrauch das Wachstum einer großen Anzahl von Ansätzen parallel zu verfolgen.

5.1.5 Anzucht für Speicherprotein-Anreicherungen

Für die Hauptkulturen wurden je 600 mL Nährlösung in 2000 mL-Erlenmeyer-Schikanenkolben oder je 300 mL Nährlösung in 1000 mL-Erlenmeyer-Schikanenkolben mit 25 bzw. 12 mL einer entsprechenden Vorkultur beimpft. Die Ansätze in 1000 mL-Kolben dienten dabei nur zur Ergänzung, um eine möglichst große Menge Zellen zu erhalten. Die vorhandenen Geräte erlaubten eine Anzucht mit maximal 3 L Kulturvolumen, verteilt auf vier 2000 mL-Kolben und zwei 1000 mL-Kolben.

Schüttelfrequenz	115 Upm
Temperatur	30°C
Wachstumszeit	24 h

Sofern die Zellen nicht zu speziellen Untersuchungen dienen sollten (z.B. Gewinnung des Wolfram-Analogen von MoSto), wurden bei den Hauptkulturen Haushaltszucker statt Saccharose p.a. und VE-Leitungswasser statt bidest. H₂O verwendet.

5.2 Analytische Verfahren

5.2.1 Metallanalytik

5.2.1.1 Colorimetrische Molybdän-Bestimmung²⁰⁷

Dithiol (Toluol-3,4-dithiol; 3,4-Dimercaptotoluol) bildet mit Molybdän in stark schwefelsaurer Lösung (> 1 M H₂SO₄) bei Raumtemperatur einen grün gefärbten Komplex, der durch Extraktion mit organischen Lösemitteln abgetrennt und angereichert werden kann.

Chemikalien:

Schwefelsäure konz. p.a.

H₂O₂ 30%

Dithiol-Reagenzlösung (siehe unten)

Essigsäure-n-amylester (oder iso-amylester) p.a.

Molybdän-Standardlösung (100 μM Natriummolybdat)

1. Die Standard- bzw. Probenlösung, die zwischen 5 und 100 nmol Mo enthalten soll, wurde über einem Bunsenbrenner bis fast zur Trockene eingedampft, mit 1 mL Schwefelsäure konz. versetzt und die Mischung erhitzt, bis organisches Material völlig zersetzt war, d.h. die Farbe der Lösung konstant blieb.
2. Zur Entfärbung wurde H₂O₂ 30%ig zugegeben, die Menge richtet sich nach Tiefe der Färbung. Anschließend wurde abermals erhitzt, um überschüssiges Peroxid zu zerstören.
3. Nach Abkühlung wurde die Probe²⁰⁸ mit 2 mL Wasser verdünnt. Nach erneuter Abkühlung wurden 2 mL Dithiol-Reagenz zugegeben. Der Ansatz wurde durch kurzes Schütteln gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Die Probenlösung wurde mit 3 mL Essigsäureamylester versetzt und auf einem Vortex-Schüttler mindestens 1 min kräftig durchmischt. Danach musste sie zur Phasentrennung 20 min ruhen.
5. 1 mL der organischen Phase wurde abgehoben und die OD bei 680 nm gegen reines Amylacetat gemessen.

Nach Angabe der Autoren ist die Methode auch zur Bestimmung von Wolfram und Molybdän nebeneinander geeignet, da unter den beschriebenen Bedingungen (ca. 4 M H₂SO₄, RT) nur Mo

²⁰⁷ Nach: Cardenas/Mortenson 1974.

²⁰⁸ Unter Missachtung der alten AC I-Regel "erst das Wasser, dann die Säure".

einen farbigen Komplex mit Dithiol bilde. Nach Extraktion des Mo-Komplexes könne unter veränderten Bedingungen (0,5 M, 30 min bei 100°C) ein W-Komplex hergestellt werden, dessen Absorptionsmaximum bei 630 nm liege²⁰⁹.

Das Verfahren erwies sich als empfindlich genug, um die relativ großen im MoSto gebundenen Molybdänmengen zu bestimmen und so den Verlauf einer Speicherprotein-Isolierung zu verfolgen, allerdings ist es nur mäßig schnell, nicht sehr genau, verbraucht relativ viel Substanz und hinterlässt erhebliche Mengen problematischer Abfälle. Daher wurde es nach der ersten Proteinanreicherung zugunsten des katalytischen Verfahrens aufgegeben.

Herstellung des Dithiol-Reagenzes:

1. 100 mL einprozentige (250 mM) NaOH wurden durch 30 min Spülen mit Argon von Sauerstoff befreit und anschließend 200 mg Dithiol zugegeben.
2. Nach Auflösung des Dithiols wurde tropfenweise Thioglycolsäure (Mercaptoessigsäure) zugesetzt, bis eine ganz schwache bleibende Trübung auftrat (2-3 mL)²¹⁰.
3. Im Kühlschrank unter Argon-Atmosphäre konnte das Reagenz mehrere Monate ohne Probleme aufbewahrt werden.

5.2.1.2 Katalytische Molybdän- und Wolfram-Bestimmung²¹¹

Dithiooxamid (Dithio-oxalsäurediamid, Rubeanwasserstoffsäure) reagiert in saurer Lösung mit Wasserstoffperoxid zu einem intensiv gelben Oxidationsprodukt unbekannter Natur. Die Reaktion wird durch Metallionen katalysiert, die Oxo-Komplexe bilden (siehe auch oben unter 3.1.2.2).

Chemikalien:

Salzsäure p.a., 250 mM

Dithiooxamid-Lösung, 10 mM in Ethanol p.a.

H₂O₂, 50 mM, frisch angesetzt (0,5 mL H₂O₂ 30%ig auf 100 mL)

Molybdän-Standardlösungen (1 μM und 10 μM Natriummolybdat)

1. Zur Probenvorbereitung wurden die ggf. mit bidest. Wasser verdünnten Proben in einem dicht schließenden Gefäß für 15 min in ein siedendes Wasserbad gestellt.
2. Alle verwendeten Lösungen und Geräte wurden auf RT vortemperiert.
3. Ein Anteil der vorbereiteten Probenlösung, der schätzungsweise 0,1 bis 5 nmol Mo enthielt, wurde in eine 3 mL-Küvette gebracht und mit bidest. Wasser auf 1,3 mL aufgefüllt. Dann wurden 1 mL 250 mM HCl und 100 μL Dithiooxamidlösung zugefügt.

²⁰⁹ Cardenas/Mortenson 1974, 374-375.

²¹⁰ Wird etwas zuviel Thioglycolsäure zugegeben, kann das Reagenz trotzdem benutzt werden, der flockige Niederschlag erschwert die Phasentrennung Wasser/Amylacetat, stört aber die Bestimmung an sich nicht.

²¹¹ Nach: Pantaler 1963. Dank geht an Dr. Ekkehard Diemann, der mich auf dieses Verfahrensprinzip hinwies.

4. Nach Zugabe von 100 μL 50 mM H_2O_2 -Lösung wurde durch Kippen durchmischt, die Küvette sofort im Fotometer in einen auf 25°C vortemperierten Halter gestellt und die Änderung der optischen Dichte bei 400 nm für 10 min aufgezeichnet.
5. Die gemessene OD wurde über der Zeit aufgetragen, die maximale Steigung der Kurve ist der eigentliche Messwert.
6. Zur Kalibrierung des Verfahrens wurden parallel zu jeder Messreihe mindestens 6 Messungen mit verschiedenen bekannten Molybdat-Stoffmengen aus dem Bereich zwischen 0,05 und 5 nmol sowie zwei Blindmessungen durchgeführt.

In der Durchführung gibt es bei der Bestimmung von W und Mo keine Unterschiede, abgesehen davon, dass sich mit W das Verfahren noch mit Stoffmengen bis hinauf zu 20 nmol W durchführen lässt.

5.2.1.3 Metallanalysen durch ICP-MS

Als Gegenprobe für die Zuverlässigkeit des katalytischen Bestimmungsverfahrens und zur gleichzeitigen Bestimmung anderer Elemente wurden Multielementanalysen gereinigter MoSto-Proben mittels ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) bestimmt.²¹²

Tabelle 5.1: ICP-MS Betriebsparameter

Frequenz	40 MHz	RF-Leistung	1100 W
Kühlgasstrom	15 L/min	Hilfsgasstrom	1 L/min
Zerstäubergasstrom	0,79 L/min	Sampler/Skimmer	Ni/Ni
Messverfahren	Peak hopping	Auto Lens	On
Detektor	Dual-Modus	Dwell time	40 ms
Sweeps/Replicates	20	Replicates	4
Isotope	^{23}Na ^{43}Ca , ^{44}Ca ^{54}Fe , ^{57}Fe ^{63}Cu , ^{65}Cu ^{95}Mo , ^{97}Mo , ^{98}Mo ^{183}W	^{24}Mg ^{51}V ^{59}Co ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn ^{112}Cd , ^{113}Cd , ^{114}Cd	^{39}K ^{55}Mn ^{58}Ni , ^{60}Ni ^{88}Sr ^{138}Ba

Das dabei benutzte Perkin-Elmer/Sciex ICP-QMS Elan 6000 (Ontario, Canada) ist mit einem Cross-Flow-Zerstäuber und einer Scott Spraykammer ausgestattet. Für die externe Kalibrierung wurden ICP-MS-Multielementstandardlösungen in HNO_3 (2%) verwendet. Als interner Standard wurde allen Proben Rhodium (als RhCl_3) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/L}$ zur Kompensation der Gerätedrift und der Signaldepression durch Matrixionen zugegeben. Die Kalibrationskurven wurden durch lineare Regression berechnet. Die Geräteparameter sowie die untersuchten Isotope sind in Tabelle 5.1 zusammengestellt.

Alle Proben sind sowohl direkt nach Verdünnung als auch nach Aufschluss (Mikrowellendruckaufschluss mit HNO_3) und Verdünnung gemessen worden.

5.2.2 Proteinbestimmung

5.2.2.1 Bestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA-assay)²¹³

Chemikalien:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4%(w/v)-Lösung

"Bicinchoninic Acid Solution" (siehe unten)

Protein-Standardlösung (1 g/L Rinderserumalbumin)

1. Eine Probe von 50 μL , die zwischen 2 und 30 μg Protein enthielt (die Proteinlösung wurde dafür ggf. zuvor entsprechend dem erwarteten Proteingehalt verdünnt), wurden in ein Eppendorfgefäß gegeben.
2. Reduzierende Substanzen (Dithionit, Zucker, ...) stören, ebenso Ammoniumsalze und EDTA. Sie wurden durch Proteinfällung entfernt: die Probe wurde mit Wasser auf 200 μL aufgefüllt, mit 50 μL 3M Trichloressigsäure versetzt, auf dem Vortex durchmischt und bei 13.000 Upm 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Spritze mit Kanüle abgehoben und mit dem (i.d.R. nicht sichtbaren) Pellet weitergearbeitet.
3. 20 μL der Kupfersulfatlösung und 1 mL der "BCA-Solution" wurden zugeben, der Ansatz auf einem Schüttler durchmischt und im Wasserbad bei 50°C 30 min inkubiert.
4. Nach Abkühlung wurde die OD bei 562 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen.

Zur Kalibrierung wurden parallel zu jeder Messreihe mindestens fünf mit der Rinderserumalbumin-Lösung hergestellte Standards im Bereich von 2 bis 30 μg Protein auf gleiche Art wie die Proben behandelt und vermessen.

Zusammensetzung der "Bicinchoninic Acid Solution" (Sigma)

Na_2 -Bicinchoninat	10 g/L
$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20 g/L
NaHCO_3	9,5 g/L
NaOH	4 g/L
Na_2 -Tartrat	1,6 g/L

²¹² Die Analysen wurden von Anne-Katrin Meyer vom Institut für Anorganische und Angewandte Chemie der Universität Hamburg (im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Arndt Knöchel) durchgeführt.

²¹³ Tiemann 1996, S. 34-35. Pingoud/Urbanke 1997, S. 151f.

5.2.2.2 Messung der Absorption bei 280 nm

Über die UV-Absorption bei 280 nm lassen sich die aromatischen Seitenketten von Tyrosin und Tryptophan erfassen. Die Absorptionskoeffizienten verschiedener Proteine sind entsprechend ihrem Gehalt an diesen Aminosäuren sehr verschieden. OD_{280} -Messungen wurden daher meist nur zur qualitativen Detektion von Proteinpeaks in Säulen-Eluat verwendet, nach der Bestimmung des Absorptionskoeffizienten von MoSto auch zur Abschätzung von dessen absoluter Konzentration in vollständig aufgereinigten Proben. Für quantitative Untersuchungen (Bestimmung des Mo/Protein-Verhältnisses) wurden keine über die OD_{280} ermittelten Konzentrationen verwendet.

5.2.3 Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) zur Reinheitskontrolle und zur Molekulargewichtsbestimmung wurde unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) als vertikale Plattenelektrophorese durchgeführt. Es wurde eine Mini-Gelkammer (Biometra, Göttingen) mit den Abmessungen 105 x 85 x 1 mm verwendet. Die Gelelektrophorese wurden entweder als Tris-Glycin-SDS-PAGE oder als Tris-Tricin-SDS-PAGE durchgeführt.

5.2.3.1 Proteinmarker zur Molekulargewichtsbestimmung

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

	Molekülmasse (kg/mol) ²¹⁴	eingesetzte Menge (mg)
Rinderserumalbumin	66	1,5
Eier-Albumin	45	1,5
Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase ²¹⁵	36	1,5
Carboanhydrase	29	1,0
Sojabohnentrypsininhibitor	20,1	2,0
α -Lactalbumin	14,2	1,0

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

²¹⁴ Nach Angabe des Herstellers (Sigma).

²¹⁵ Nicht in allen Marker-Ansätzen enthalten.

In einigen Läufen wurden abweichend fertig konfektionierte vorgefärbte Molmassen-Standards "Precision Plus Protein all blue" (BioRad Laboratories, Hercules/CA, USA) mit Banden bei den Molmassen 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kg/mol eingesetzt.

5.2.3.2 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden 70 μL Proteinlösung mit 10 μL 200 mM Dithiothreitol-Lösung, 10 μL 10 % SDS-Lösung, 10 μL einer 0,25%-(w/v)-Bromphenolblaulösung²¹⁶ und einer Spatelspitze Saccharose (ca. 20% w/v) versetzt und für 10 min im Wasserbad bei 100°C denaturiert.

Nach Abkühlung wurden die Proben nochmals gründlich auf dem Vortex-Schüttler durchmischt und anschließend eingesetzt.

5.2.3.3 Tris-Glycin-SDS-PAGE

Die Tris-Glycin-SDS-PAGE wurde modifiziert nach der Methode von Laemmli²¹⁷ durchgeführt. Um eine möglichst scharfe Bandierung der Proteine zu erzielen, wurde das Trenngel (Acrylamidkonzentration 12,5 % (w/v)) mit einem Sammelgel (Acrylamidkonzentration 4,8 % (w/v)) überschichtet. Die für die Elektrophorese verwendeten Gele setzten sich wie folgt zusammen:

<u>Trenngel</u>	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

<u>Sammelgel</u>	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, damit die Oberkante des Trenngels absolut gerade wurde und nicht während der Polymerisation austrocknete. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt und anschließend das Sammelgel über das Trenngel gegossen.

²¹⁶ Teilweise wurde auch eine kombinierte SDS+Bromphenolblau-Lösung benutzt und das eingesetzte Probenvolumen auf 80 μL erhöht.

²¹⁷ Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.

Die Polymerisation des Sammelgels wurde ebenfalls durch den Zusatz von Ammoniumperoxodisulfat initiiert. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Teflonkamm eingesetzt, der 10 bzw. 20 voneinander getrennte Geltaschen formt.

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 wurden die vorbereiteten Proteinproben (max. 10 μ L pro Geltasche) auf das Gel aufgetragen und die als vertikale Plattenelektrophorese durchgeführte Elektrophorese gestartet. 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 wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Frontbande das Trenngel zu verlassen begann (Dauer ca. 45 min).

5.2.3.4 Tris-Tricin-SDS-PAGE

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen durch SDS-PAGE mit Hilfe von Tricin anstatt Glycin als Folge-Ion wurde erstmals von Schägger und Jagow²¹⁸ beschrieben. Der Einsatz von Tricin bei der Elektrophorese gewährleistet im Allgemeinen eine bessere Auflösung bei der Trennung kleinerer Proteine (1-100 kg/mol). Mit Hilfe dieser Methode können vor allem Proteine im Bereich von 5-20 kg/mol besonders effektiv aufgetrennt werden.

In dieser Arbeit wurde die Tris-Tricin-SDS-PAGE "mikro-präparativ" eingesetzt, um die Auftrennung der beiden MoSto-Untereinheiten gegenüber der konventionellen Tris-Glycin-SDS-PAGE zu verbessern und die Untereinheiten sauber getrennt für die Aminosäuresequenzanalyse zu erhalten.

Es wurde ein Trenngel (10% w/v Acrylamid) mit überschichtetem Sammelgel (4% w/v Acrylamid) wie oben bei der Tris-Glycin-SDS-PAGE beschrieben hergestellt und eingesetzt. Die verwendeten Gele setzten sich wie folgt zusammen:

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

²¹⁸ Schägger, H.; von Jagow, G.: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166 (1987) 368-379.

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 % (v/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 μ L pro Tasche) wurde die Elektrophorese gestartet. Die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel wurde bei einer Stromstärke von 15 mA durchgeführt. Zur anschließenden Trennung der Proteine im Trenngel wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht. Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde beendet, nachdem die Bromphenolblau-Frontbande das Trenngel gerade verlassen hatte. Die gesamte Elektrophorese dauerte ca. drei Stunden und wurde bei Raumtemperatur ohne zusätzliche Kühlung durchgeführt.

5.2.3.5 Färbung der Proteinbanden

Zur Anfärbung der aufgetrennten Proteinbanden wurden die Gele nach der Elektrophorese 15 min mit einer Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung (2,4 mM in Entfärberlösung) behandelt. Anschließend wurden sie so lange mit Entfärberlösung entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar angefärbt und der Gelhintergrund fast farblos war. Eine vollständige Entfärbung des Gelhintergrunds, bei gleichbleibender Schärfe der Proteinbanden, wurde durch Inkubation der Gele für ca. 16 h in Essigsäure (7,5% v/v) bei 4°C erzielt. Zur Aufbewahrung wurden die Gele in Essigsäure (7,5% v/v) in Polyethylenfolie eingeschweißt bei 4°C gelagert, sie waren auf diese Weise mehrere Jahre beständig²¹⁹.

²¹⁹ Bei der Niederschrift dieser Arbeit waren die ersten von mir angefertigten und auf die beschriebene Weise gelagerten Gele über 4 Jahre alt und zeigten keine Anzeichen von Verfall, wie z.B. verblasste oder zerlaufende Banden.

Die Entfärberlösung setzte sich wie folgt zusammen:

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

5.2.4 Immunologische Methoden

Zum immunologischen Nachweis von MoSto wurden polyklonale Kaninchenantikörper verwendet, die gegen das gereinigte Mo-Speicherprotein gebildet worden waren (anti-MoSto-IgG). Zum immunologischen Nachweis der konventionellen Dinitrogenase (MoFe-Protein) wurden polyklonale Kaninchenantikörper verwendet, die gegen das gereinigte MoFe-Protein gebildet worden waren (anti-Av1Mo-IgG).

Zur immunologischen Identifizierung der Fe-abhängigen Nitrogenase wurden Antikörper eingesetzt, die gegen das FeFe-Protein der Fe-Nitrogenase aus *Rhodobacter capsulatus* produziert worden waren (anti-Rc1Fe-IgG). Es ist jedoch bekannt, dass diese Antikörper auch mit dem entsprechenden Protein aus *A. vinelandii* spezifische Antigen-Antikörper-Präzipitate bilden, hingegen gibt es keine Kreuzreaktion von anti-Rc1Fe-IgG mit Mo-Nitrogenasen²²⁰.

Der qualitative Nachweis von MoSto, Mo-Nitrogenase und Fe-Nitrogenase in den Extrakten der "Wolfram-resistenten" Mutanten wurde mit dem Ouchterlony-Doppelimmundiffusionstest durchgeführt.

5.2.4.1 Ouchterlony-Doppelimmundiffusionstest

Zur Detektierung von MoSto, Mo- und Fe-Dinitrogenase in den Extrakten der Wolframat-resistenten *A. vinelandii*-Mutanten *capsulatus* wurden Immundiffusionstests durchgeführt nach einer erstmals von Ouchterlony beschriebenen Methode²²¹, modifiziert nach Oakley²²². 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 ₃	6,8 mM

Gelherstellung: Der Puffer wurde in einem Erlenmeyerkolben mit 1 % (w/v) Agarose versetzt und bis zur Klärung erhitzt. Jeweils 3 mL des Gelmaterials wurden 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 mit

²²⁰ Schneider & al. 1997, 795; und persönliche Mitteilung von Klaus Schneider.

²²¹ Ouchterlony 1971.

²²² Oakley 1971.

einem Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Die gestanzten Gele konnten bis zu einer Woche in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur gelagert werden.

Probenvorbereitung: Zur Vorbereitung der Extrakte für die Ouchterlony-Immundiffusionstest wurden diese mit Wasser auf eine einheitliche Gesamt-Proteinkonzentration von 0,7 g/L verdünnt, mit SDS (Endkonzentration 1% w/v) versetzt 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. 7 μ L, durch mehrmaliges Auftragen max, 21 μ L) wurden die Gele in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur 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 überschüssiges Protein zu entfernen. Die Gele wurden zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Präzipitate für 10 min mit der Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung behandelt, welche auch für die Entwicklung von SDS-Gele verwendet wurde (siehe Abschnitt 5.2.3.5). Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte mit der gleichen Entfärbelösung wie bei der SDS-PAGE. Anschließend wurden die entwickelten Gele zur Lagerung und Dokumentation auf Gel-Fix für Agarose (Serva, Heidelberg) fixiert.

5.2.5 Proteinsequenzanalyse

Nach Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der isolierten Proteinprobe (5.2.3.4) wurde das Gel 5 min in Transferpuffer gewaschen, um das SDS zu entfernen. Anschließend wurden die Protein-Banden durch ein Elektrobloiting (30 min bei 2 mA/cm², Blotting-Apparatur von Biometra, Göttingen) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P von Millipore, Beverly/USA) der Porengröße 450 nm übertragen.

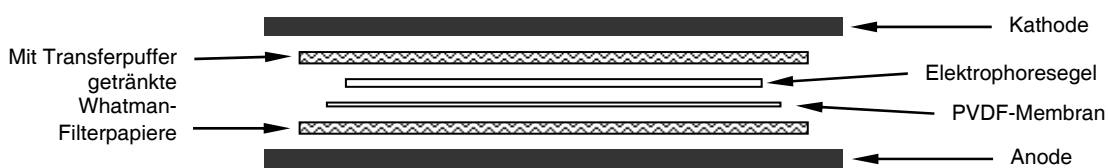


Abbildung 5.2: Aufbau des Elektroblots.

Tabelle 5.2: Zusammensetzung des Transferpuffers für den Elektroblot.

Ethanol	200	mL/L
Borsäure	50	mM
NaOH	Zugabe bis pH = 9,0	
Dithiothreitol	1	mM

Nach dem Transfer wurden die Proteinbanden in der Membran auf gleiche Weise wie bei einem Polyacrylamidgel mit Coomassie Brilliant Blue anfärbt. Aus der zwischen Filtrierpapieren getrockneten Membran wurde die relevante Proteinbande herausgeschnitten und einer Proteinsequenzanalyse nach Edman²²³ unterzogen. Die Sequenzierung mittels Flüssigphasensequencer (Knauer Kompakt Sequencer Modell 910) und hochauflösender Flüssigkeitschromatographie wurde in der Arbeitsgruppe Biochemie 1 der Universität durchgeführt.

5.2.6 Molmassenbestimmung durch Massenspektrometrie

Die Messungen wurden mit einem Voyager DE MALDI-TOF-Gerät (PE Biosystems, Weiterstadt) mit 1,2 m langer Flugbahn bei einer Beschleunigungsspannung von 25 kV durchgeführt. Zur Verdampfung und Ionisation diente ein LSI Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm, einer Pulsdauer von 3 ns und einer Wiederholfrequenz von 16,6 Hz. Die Massenkalisierung wurde mit Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure, $M = 224,22$ g/mol) als externem Standard durchgeführt. Unter Verwendung der Voyager Instrument Control Software 5.10 wurden 400 Einzelspektren aufgenommen und mit PE Data Explorer 4.0.0.0 gemittelt und ausgewertet.

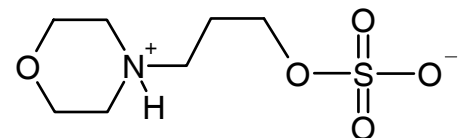
Eine ESI-Vergleichsmessung bestätigte die MALDI-TOF-Messwerte mit einer Abweichung nach oben von jeweils ≈ 80 g/mol. Da MALDI-Ergebnisse im Allgemeinen genauer sind, sind die Werte der ESI-Messung im Text nicht angegeben. Jene Vergleichsmessung wurde mit einem Esquire 3000 Ionenfallenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen), einer Standard ESI-ACPI-Ionenquelle, direkter Probeninjektion, Stickstoff aus einem Bruker NGM11 Stickstoffgenerator als Zerstäuber- und Trocknungsgas, He als Kühlgas für die Ionenfalle, sowie der Kontroll- und Analysesoftware Bruker Daltonik esquireNT5.1 esquireControl und Data Analysis 3.1 durchgeführt.

5.3 Proteingewinnung und -reinigung

5.3.1 Pufferlösungen

5.3.1.1 Standardpuffer: MOPS

MOPS (*N*-Morpholino-propan-3-sulfonsäure) ist eine der speziell für die Biochemie entwickelten Good'schen Puffersubstanzen, bei denen störende Wechselwirkungen mit den untersuchten Substanzen weitgehend ausgeschlossen sind²²⁴. Der Pufferbereich von MOPS ($pK_s = 7,20$) reicht eigentlich von 6,7 bis 8, als Extrembereich ist es von 6,2 bis 8,5 einsetzbar.

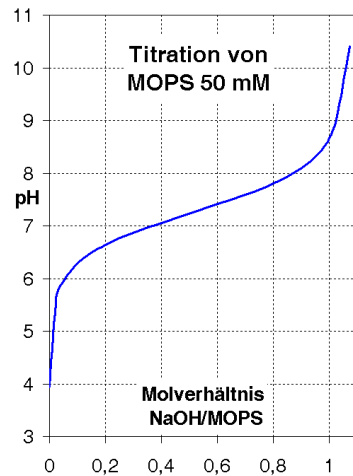


²²³ Hunkapiller, M.W.; Strickler, J.E.; Wilson, K.J.: Contemporary Methodology for Protein Structure Determination. *Science* 226 (1984) 304-311. Pingoud/Urbanke 1997, 157-159.

²²⁴ Pingoud/Urbanke 1997, 27f.

Es wurde zunächst als 1 M Stammlösung angesetzt, aus der dann durch Verdünnen Gebrauchslösungen der gewünschten Konzentration hergestellt wurden. Anschließend wurde durch Zugabe von NaOH-Lösung (p.a. in bidest. Wasser) der pH eingestellt, die Konzentration der NaOH wurde dabei möglichst hoch gewählt, um die MOPS-Konzentration möglichst wenig zu stören (Das zugegebene Volumen an NaOH lag i.d.R. unter 2 ‰ des Gesamtvolumens).

Die bei allen Proteinanreicherungen und den folgenden Untersuchungen fast ausschließlich verwendete Pufferlösung hatte eine Konzentration von 50 mM MOPS und einen pH von 6,5; diese Lösung ist im Text als "Standardpuffer" bezeichnet. Alle eventuell verwendeten Variationen in Konzentration oder pH sind im Text ausdrücklich angegeben.



5.3.1.2 Puffer für spezielle Untersuchungen

5.3.1.2.1 Tris-HCl

Tris-Puffer wurde beim Lysozymaufschluss, bei den frühen Versuchen zur MoSto-Aufreinigung, sowie im Zusammenhang mit der Kalibrierung der Gelfiltrationssäulen benutzt. Es wurde zunächst als 0,5 M Stammlösung angesetzt, aus der dann durch Verdünnen die Gebrauchslösungen hergestellt wurden. Nach Einstellung der jeweils gewünschten Konzentration wurde durch Zugabe von HCl-Lösung (p.a. in bidest. Wasser) der pH eingestellt.

5.3.1.2.2 Triethylammonium-(Teta-)Acetat

Teta-Acetat-Puffer wurde bei der MoSto-Anreicherung in Gelfiltrationsläufen verwendet, um Proben zur Gefrierdrying oder für eine ICP-MS-Analyse mit Schwefelbestimmung zu gewinnen. Es wurde eine Lösung mit 50 mM Triethylamin (6,93 mL/L) und 50 mM Essigsäure (2,86 mL/L) angesetzt (pH 5,88) und durch Zutropfen von reinem Triethylamin der pH auf 6,5 eingestellt. Lösungen mit anderer Konzentration als diese wurden nicht benutzt.

Im Gegensatz zu MOPS- und Tris-Lösungen ist Teta-Acetat-Pufferlösung nicht lange haltbar und wurde daher immer höchstens 24 h vor der Verwendung hergestellt.

5.3.2 Zellaufschluss

Nach der Anzucht wurden die Zellen durch Zentrifugation (30 min, ca. $12.000 \cdot g$) aus der Nährlösung abgetrennt. Falls nach dem Aufschluss der genaue Mo/W-Gehalt des Extraktes bestimmt werden sollte (z.B. bei der Untersuchung der Wr-Mutanten), wurden die Zellen zweimal nacheinander in 1 mM EDTA-Lösung aufgeschlämmt und erneut abzentrifugiert.

5.3.2.1 Aufschluss durch French[®]-pressing

Zum Aufschluss der Zellen wurde i.d.R. eine Aminco French[®]-Presse verwendet. In einer French[®]-Presse werden die Zellen unter Hochdruck (über 100 MPa) gesetzt. Durch eine enge Düse lässt man die Zellsuspension ausströmen, wobei die Scherkräfte in der Düse und der plötzliche Druckabfall die Bakterienzellen zerreißen.

Die abzentrifugierten Zellen wurden wieder aufgeschlämmt mit Standardpuffer von einem Volumen, das ungefähr dem Volumen des Zellpellets gleich ist. Da beim Aufschluss durch die freigesetzte DNA eine zähe und klebrige Lösung entstehen würde, die nur langsam aus der Presse läuft und schlecht zu zentrifugieren ist, wurde der Zellsuspension eine Spatelspitze des Enzyms Desoxyribonuclease I zugesetzt. Zur Inaktivierung proteolytisch wirkender Enzyme wurde außerdem unmittelbar vor dem Aufschluss ein Volumenprozent einer 0,1 M ethanolischen Phenylmethylsulfonylfluorid-(PMSF)-Lösung zugegeben.

Der erhaltene Rohextrakt wurde dann in Zentrifugenröhrchen übergeführt und 30 min bei $30.000 \cdot g$ zentrifugiert, um Zellbruchstücke und größere Membrantrümmer abzutrennen. Der lösliche Überstand wurde abgehoben und bei -20°C aufbewahrt, wenn er nicht sofort eingesetzt werden konnte.

5.3.2.2 Lysozymaufschluss

Beim French[®]-Pressing wird Wärme entwickelt, zudem können auch durch Druck Proteine denaturiert werden. Die rauen Bedingungen in der Düse der French[®]-Presse zerstäuben die Zellen teils in kleinste Teile, so dass der gewonnene Extrakt auch normalerweise unlösliche (membrangebundene) Proteine enthält und durch feine Partikel getrübt ist, die auch bei einer Zentrifugation mit $>30.000 \cdot g$ nicht sedimentieren. Zur besonders schonenden Extraktgewinnung, zur Herstellung von möglichst sauberen Extrakten ohne Beimengung unlöslicher Zellbestandteile, oder für kleine Mengen Zellen wurde ein enzymatischer Zellaufschluss mit Lysozym vorgezogen²²⁵.

²²⁵ Gollan, Ute; Schneider, Klaus; Müller, Achim; Schüddekopf, K.; Klipp, Werner: 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 (1993) 25-35.

Vor dem Aufschluß wurden die *A. vinelandii*-Zellen mindestens ein Mal eingefroren und wieder aufgetaut, um den Angriff des Lysozyms an die Zellwand zu erleichtern. Für den Aufschluß wurden die Zellen in einem Aufschlusspuffer (1-1,5 mL je mL Zellpellet) folgender Zusammensetzung aufgeschlümmt:

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

Während EDTA und das Polypeptidantibiotikum Polymyxin B die Mureinschicht für das Lysozym zugänglich machen, sollen die Verwendung des Proteaseinhibitors PMSF (Schutz vor proteolytischem Abbau) und der Zusatz von Superoxiddismutase (Schutz vor Sauerstoff) zur Gewinnung intakter Proteine beitragen²²⁶.

Die erhaltene Suspension wurde 30 min bei 35°C gerührt oder geschüttelt²²⁷ und anschließend zur Entfernung der Zelltrümmer und Membranpartikel bei 4°C und 30.000 · g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgehoben und als Rohextrakt weiterverarbeitet.

5.3.3 Standard-Anreicherungsprozedur

Die Veränderungen und Verbesserungsversuche des Anreicherungsverfahrens sind in Kapitel 3.2 dargestellt. Das hier beschriebene Vorgehen ist die in jenen anfänglichen Optimierungsversuchen erarbeitete Methode, mit der dann die gereinigten Proteinproben für die spektroskopischen Untersuchungen (XAS, SAXS, MALDI-TOF-MS, UV-Vis), die Antikörperherstellung (5.2.4) und die ICP-MS-Elementaranalysen gewonnen wurden.

5.3.3.1 DEAE-Anionenaustauschchromatographie

Der Rohextrakt aus einem etwa 25 mL großen Zellpellet wurde mittels einer Schlauchpumpe über einen Flow-Adapter auf die Geloberfläche einer auf $\approx 15^\circ\text{C}$ gekühlten DEAE-Sephacel-Säule aufgetragen (Säulenmaße: $\varnothing 26 \cdot 110$ mm; Volumenstrom beim Auftragen 1-1,5 mL/min, bei der Elution 2 mL/min). Das Gel wurde vorher mit Standardpuffer äquilibriert. Nach dem Auftragen wurden mit 50 mL einer 50 mM NaCl-Lösung in Standardpuffer nicht gebundene Proteine und feine Partikel

²²⁶ North, M.J.: Prevention of unwanted proteolysis. IN: Beynon, R.J. und Bond, J.S. (Hrsg.). Proteolytic enzymes: A practical approach: Oxford 1989, S. 105-124. Dröttboom, Melanie: Biochemische und ESR-spektroskopische Charakterisierung der Molybdän-unabhängigen Eisen-Nitrogenase von *Rhodobacter capsulatus*. Dissertation Universität Bielefeld 1998, 39-42.

²²⁷ siehe zu dieser Problematik: Fleming, Ian: Casino Royale. London 1953.

ausgewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mittels eines kontinuierlichen NaCl-Gradienten (50-250 mM NaCl in Standardpuffer, jeweils 100 mL in den Gefäßen des Gradientenmischers). Mit einem automatischen Fraktionssammler wurden Fraktionen von 8-10 mL aufgefangen.

Ein auffälliges lachsrotes Protein, das unmittelbar vor MoSto eluiert wird, diente zur Orientierung. Die 20 unmittelbar auf den "Lachs-Peak" folgenden Fraktionen wurden mit SDS-PAGE untersucht, jeweils 1 μ L einer vorbereiteten Fraktions-Probe wurde auf eine der 20 Gel-Bahnen aufgetragen. Die Fraktionen, in denen die Banden MoSto als dominierende Proteinkomponente auswiesen, wurden weiter verarbeitet.

5.3.3.2 Fraktionierende Ammoniumsulfatfällung

Die Fraktionen des MoSto-Peaks wurden in einem Messzylinder vereinigt und die für die gewünschte Sättigung erforderliche Ammoniumsulfatmenge nach der Formel von Warburg berechnet:

$$m = \frac{1,77 \cdot V \cdot (S - s)}{(3,54 - S)} \quad (\text{gültig bei } 0^{\circ}\text{C}) \quad (7)$$

m: Zuzugebende Masse Ammoniumsulfat; *V*: Volumen der Proteinlösung
S: gewünschter; und *s*: anfänglicher Sättigungsgrad der Lösung (als Dezimalzahlen!)

Unter ständigem Rühren und Kühlung im Eisbad wurde die benötigte Menge fein gepulvertes Ammoniumsulfat in nach und nach kleiner werdenden Portionen zugegeben und vor jeder neuen Zugabe die vollständige Lösung der vorherigen Portion abgewartet. Nach Erreichen der gewünschten Konzentration wurde zur sauberen Gleichgewichtseinstellung noch 10 min weiter gerührt, anschließend der Niederschlag bei 0°C und 20.000 · g in 15 min abzentrifugiert.

Je nachdem ob hohe Reinheit oder maximale MoSto-Ausbeute gewünscht waren, wurden die erste Fällungsstufe bei 38-42 % und die zweite bei 50-52 % Sättigung angesetzt. Der Niederschlag der zweiten Stufe wurde in einem möglichst kleinen Volumen (\leq 1 mL) Standardpuffer aufgenommen und weiter verarbeitet.

5.3.3.3 Gelfiltration

Für die Proteinreinigung durch Gelfiltration wurden mit Sephadex G200 gefüllte Säulen mit 80 cm Höhe und 2,6 cm Durchmesser eingesetzt. Der Volumenstrom bei der Elution betrug 0,25-0,3 mL/min. Durch einen Lauf mit Dextran Blau ($M=2.000$ kg/mol) wurde jeweils das Ausschlussvolumen der Säulen bestimmt. Alle Läufe erfolgten unter Kühlung der Säule auf 5°C.

Nach dem Auftragen der Proteinlösung wurden etwa 90% des Ausschlussvolumens in einem Messzylinder gesammelt, danach mit einem automatischen Fraktionssammler Fraktionen von 4-5 mL

aufgefangen. Durch Messung der OD₂₈₀ wurde der Proteingehalt der Fraktionen abgeschätzt, i.d.R. war MoSto leicht als höchster auftretender Peak auszumachen²²⁸. Die Peakfraktionen wurden wie bei der DEAE-Chromatographie beschrieben mit SDS-PAGE auf Reinheit kontrolliert (Auftrag 10 µL vorbereitete Probe je Bahn bei einem 20-Bahnen-Gel). Die reines MoSto enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und in einer Amicon B15 Stehkammer auf ≤ 2 mL eingengt.

5.3.4 Molmassenbestimmung durch Gelfiltration

Unter der Annahme, dass ein annähernd zu Kugelform gefaltetes Molekül vorliegt, lässt sich durch eine Gelfiltration die molare Masse des Proteins ermitteln. Dafür muss die Gelfiltrationssäule durch einen Lauf mit Proteinen bekannter Molmasse kalibriert werden. Die Bestimmung wurde mit einer Sephadex G150-Säule durchgeführt. Auf die Säule wurde folgende Markersubstanzen-Mischung aufgetragen:

Markersubstanz	Molmasse ca. [g/mol]	eingesetzte Menge	Bestimmung der Substanz
Ferritin	443.000	5 mg (100 µL 5%(w/v)-Lösung)	OD-Messung bei 425 nm
β-Amylase	200.000	7,5 mg	spezifischer Aktivitätstest
Alkohol-Dehydrogenase (ADH)	150.000	7,5 mg	spezifischer Aktivitätstest
Rinder-Serum-Albumin (RSA)	66.000	20 mg	OD-Messung bei 280 nm ("Protein-OD")
Carboanhydrase (CA)	29.000	7,5 mg	spezifischer Aktivitätstest
Cytochrom c	12.400	5 mg	OD-Messung bei 550 nm
Na ₂ -Molybdat	(pH-abhängig)	100 µL 10 mM-Lösung	colorimetrische Best., siehe "Analytik"
Bromphenolblau	670	200µL 0,25%(w/v)-Lösung	OD-Messung bei 595 nm

Feste Proteine wurden am Tag vor dem Lauf in jeweils 200µL des Elutionspuffers gelöst und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lösungen der Enzyme (Amylase, ADH, CA) wurden vor dem Lauf auf Aktivität geprüft, dafür wurde eine 1µL-Probe aus der jeweiligen Lösung bei Amylase und ADH 1:1000, bei der Carboanhydrase 1:500 verdünnt.

Unmittelbar vor dem Auftragen auf die Säule wurden die einzelnen Komponenten zusammengegeben, lediglich das Molybdat wurde kurz nach dem Proteingemisch separat aufgetragen. Nach dem Auftragen wurden 134 mL Eluens durch die Säule gepumpt, bevor mit dem Sammeln von Fraktionen begonnen wurde. Die Sammelgefäße wurden alle 6 min, ab Fraktion #47 alle 10 min gewechselt.

Die Durchführung der Enzym-Aktivitätstests ist unten in diesem Kapitel beschrieben.

²²⁸ Gelegentlich enthielt die Proteinlösung vor der Gelfiltration noch Anteile eines sehr schweren gelb gefärbten Proteins, dass durch hohe spezifische Absorption auch bei kleinen Mengen einen starken Peak im OD₂₈₀-Elutionsprofil verursacht. Dieser lag aber fast noch beim Ausschlussvolumen und war leicht vom MoSto-Peak zu unterscheiden.

Der Test für die Alkoholdehydrogenase wurde unmittelbar nach Auffangen der Fraktionen durchgeführt, da ADH in verdünnter Lösung bald an Aktivität verliert. β -Amylase und Carboanhydrase wurden am folgenden Tag bestimmt, die OD-Messungen 3-4 Tage nach dem Lauf durchgeführt.

5.3.4.1 Aktivitätstest für β -Amylase²²⁹

Reagenzien:

A. Puffer-Stärke-Lösung:

16 mM Natriumacetatpuffer: 131,2 mg NaOAc wasserfrei wurden in 100 mL Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 4,8 eingestellt.

250 mg Stärke wurden in 25 mL der Pufferlösung aufgeschlämmt, im Becherglas auf einer Heizplatte unter Rühren zum Sieden erhitzt und 15 min gekocht. Nach Abkühlen wurde das Volumen mit Wasser wieder auf 25 mL gebracht. Vor Gebrauch musste jeweils der Bodensatz (Stärke) aufgeschüttelt werden.

B. Farb-Reagenz:

Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung: 12 g K-Na-Tartrat wurden unter Erwärmen (ohne zu kochen) in 8 mL 2M NaOH gelöst.

96 mM 3,5-Dinitrosalicylsäure-(3,5-DNSS-)Lösung: 438 mg 3,5-DNSS wurden unter Erwärmen (ohne zu kochen) in 20 mL Wasser gelöst.

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

C. Die Probenlösung, mit Wasser auf ca. 1,5 μ g Enzym/mL verdünnt. Die Fraktionen vom Molmassen-Marker-Lauf der Gelfiltrationssäule mussten 1:5 verdünnt werden.

In Reagenzgläser mit Stopfen wurden einpipettiert (in Millilitern):

	Test	Blindprobe
A (Stärkelösung)	1	1
C (Enzymlösung)	1	0

Durch kurzes Schütteln auf dem Vortex wurde durchmischt und exakt 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden zugegeben (in Millilitern):

B (Farb-Reagenz)	1	1
Wasser ²³⁰	0	1

²²⁹ Sigma Quality Control Test Procedure vom Mai 2000
 (http://www.sigma-aldrich.com/saws.nsf/Pages/sg_techlib_enzymeassays2?OpenDocument)
 (<http://www.sigma-aldrich.com/sigma/enzymes/A7005enz.pdf>)
 (<http://www.sigma-aldrich.com/sigma/enzymes/A7130enz.pdf>)

²³⁰ Die laut der Originalvorschrift in diesem Schritt zur Blindprobe zuzugebende Enzymlösung konnte durch Wasser ersetzt werden, da nur relative, nicht absolute Aktivitäten bestimmt werden sollten.

Die Proben wurden sofort in ein kochendes ($>90^{\circ}\text{C}$) Wasserbad gestellt und darin 15 min entwickelt, dann im Eisbad abgekühlt, mit jeweils 9 mL Wasser verdünnt und die Absorption der Probelösungen bei 540 nm gegen die Blindprobe gemessen.

5.3.4.2 Alkoholdehydrogenase-Aktivitätstest²³¹

Reagenzien:

- A. Tris-HCl-Pufferlösung, 50 mM, pH 8,8
- B. Ethanol p.a.
- C. NAD, frisch angesetzte 15 mM-Lösung in Wasser.
- D. 10 mM Na-Phosphatpuffer zur Verdünnung der Enzymlösung: 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4^-$ oder Na_3PO_4^- -Lösung wurde mit 10 mM Phosphorsäure oder 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4^-$ -Lösung auf pH 7,5 gebracht, anschließend wurden als Enzymstabilisator 0.1%(w/v) Rinderserumalbumin zugesetzt.
- E. Die Probenlösung, mit Puffer D auf ca. 3 μg Alkoholdehydrogenase/mL verdünnt. Die Fraktionen vom Molmassen-Marker-Lauf der Gelfiltrationssäule mussten 1:10 verdünnt werden.

In 1 mL-Küvetten mit Stopfen wurden einpipettiert (in Mikrolitern):

Reagenz	Test	Blindprobe
A (Puffer)	433	433
B (EtOH)	33	33
C (NAD)	500	500
D (Verdünnungs-Puffer)		33

Der Ansatz wurde durch Kippen vermischt und die OD der Testlösung bei 345 nm gegen die Blindprobe gemessen. Sobald sich ein konstanter Wert eingestellt hatte, wurden 33 μL der passend verdünnten Enzymlösung zugegeben, die Zeitmessung gestartet, der Ansatz abermals durch Kippen durchmischt und die OD_{345} für etwa 6 min aufgezeichnet.

Die Auswertung erfolgte grafisch, die OD wurde über t aufgetragen, die Steigung der erhaltenen Geraden ist der eigentliche Messwert.

²³¹ Sigma Quality Control Test Procedure vom Mai 2000
 (http://www.sigma-aldrich.com/saws.nsf/Pages/sg_techlib_enzymeassays2?OpenDocument)
 (<http://www.sigma-aldrich.com/sigma/enzymes/A3263enz.pdf>)

5.3.4.3 Carboanhydrase-Aktivitätstest²³²

Reagenzien:

- A. Tris-Sulfat-Pufferlösung: 15 mM Tris, pH 7,6 mit Schwefelsäure eingestellt.
- B. 3 mM frisch angesetzter p-Nitrophenyl-Essigsäureester-Lösung: 13,6 mg p-NPA in 1 mL Aceton p.a. gelöst, mit Wasser auf 25 mL aufgefüllt.
- C. Die Probenlösung, mit Puffer A auf ca. 60 μ g Carboanhydrase/mL gebracht. Die Fraktionen vom Molmassen-Marker-Lauf einer Gelfiltrationssäule konnten unverdünnt eingesetzt werden.

In 1 mL-Küvetten mit Stopfen wurden einpipettiert (in Mikrolitern):

Reagenz	Test	Blindprobe
A (Puffer)	633	666
B (EtOH)	333	333

Der Ansatz wurde durch Kippen vermischt und versetzt mit:

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

Die Zeitmessung wurde gestartet, der Ansatz abermals durch Kippen durchmischt und die OD₃₄₈ gegen die Blindprobe für etwa 6 min aufzeichnen.

Die Auswertung erfolgte grafisch, die OD wurde über t aufgetragen, die Steigung der erhaltenen Geraden ist der eigentliche Messwert. Da auch die OD der Blindprobe zeitlich veränderlich ist, wurde für jede einzelne Messung jeweils eine neue Blindprobe mit angesetzt.

5.3.5 Gefriertrocknung des Mo-Speicherproteins

Die Gefriertrocknung diente vor allem dazu, ein von Puffersubstanzen freies Präparat für die massenspektrometrische Untersuchung zu erhalten. Daher wurde die Proteinlösung zunächst vom Standardpuffer durch eine Sephadex G25-Gelfiltration auf das System Triethylamin/Essigsäure (Tetraacetat, 50 mM, pH 6,5) umgepuffert. Diese flüchtigen Puffersubstanzen werden bei der Trocknung mit entfernt.

Nach der Trocknung verblieben 34 mg Substanz. Eine Probe von 8 mg wurde in 0,8 mL Standardpuffer aufgeschlämmt, zentrifugiert und der Überstand abgehoben. Das ungelöste Material wurde mit 1 mL Wasser gewaschen, getrocknet und zurückgewogen: es waren 5,5 mg vermutlich denaturiertes MoSto. Der Überstand wurde über eine G25-Gelfiltration fraktioniert und die Fraktionen auf Mo und Protein analysiert. 0,4 μ mol Mo wurden im Bereich der hochmolekularen Fraktionen,

²³² Sigma Quality Control Test Procedure. Persönliche Mitteilung von Renate Stieß (Sigma-Aldrich Technical Support) vom 1.10.1998.

also als proteingebundenes Mo, und 0,9 μmol als niedermolekulares freies Molybdat eluiert. Der Gesamt-Proteingehalt des Überstandes betrug 2,6 mg.

proteingebundenes Mo	32%	gelöstes MoSto	33%
freies Molybdat	68%	unlösliches MoSto	62-75%

Die Ergebnisse der Mo- und Proteinanalysen belegten übereinstimmend, dass MoSto zu etwa zwei Dritteln bei der Gefriertrocknung denaturiert wurde. Weitere Versuche zeigten jedoch, dass mit dem Teta-Acetat-Puffer MoSto allgemein empfindlicher ist und leichter denaturiert als im Standardpuffer. Somit bleibt unklar, ob Gefriertrocknung für MoSto generell ungeeignet ist oder ob sie mit einem anderen Puffersystem durchführbar wäre.

Das Präparat ließ sich trotz allem erfolgreich für die Massenspektrometrie einsetzen.

5.4 Bioinformatische Methoden

5.4.1 Aminosäuresequenzvergleiche und -alignments

Für die automatischen Vergleiche wurde das vom Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) auf dem ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server zur Verfügung gestellten Tool SIM²³³ jeweils mit den Austausch-Matrices BLOSUM62 und BLOSUM30 benutzt²³⁴. Die gefundenen Übereinstimmungen wurden mit dem auf dem Schweizer Server des European Molecular Biology Network EMBnet (www.ch.embnet.org) zur Verfügung gestellten Tool PRSS3²³⁵ auf Signifikanz geprüft. Für jedes Alignment wird von SIM ein Smith-Waterman-Score²³⁶ vergeben, der die Güte der Übereinstimmung angibt. PRSS bringt nun eine der beiden Sequenzen (B) 200-mal in eine jeweils neue zufällige Reihenfolge und berechnet jedesmal den Score für die Übereinstimmung der Sequenz A mit der zufällig durchmischten Sequenz B. Anhand der Ergebnisse wird die Wahrscheinlichkeit abgeschätzt, eine Übereinstimmung mit dem gleichen Score wie die beim SIM-Alignment gefundene beim Vergleich mit 200 anderen rein zufällig festgelegten Sequenzen zu erhalten, d.h. je niedriger dieser Wahrscheinlichkeits-Wert, desto höher ist die Signifikanz der Übereinstimmung.

Die Tabelle 7.5 im Anhang enthält die erhaltenen Scores und die zugehörigen Zufalls-Wahrscheinlichkeiten für die durchgeführten Vergleiche.

²³³ Huang, Xiaohu; Miller, Webb: A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm. *Adv. Appl. Mathematics* 12 (1991) 337-357.

²³⁴ BLOSUM = Blocks Substitution Matrix [Henikoff, Steven; Henikoff, Jorja G.: Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 10915-10919.]. BLOSUM62 ist für die meisten Sequenzvergleiche geeignet und die übliche Standardeinstellung der Alignment-Programme. BLOSUM-Matrices mit kleineren Nummern sind besser geeignet, um schwache, auf lange Sequenzen verteilte Ähnlichkeiten zu detektieren.

²³⁵ PRSS ist abgeleitet aus dem von Pearson und Lipman entwickelten RDF2. Pearson, William R.; Lipman, David J.: Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 2444-2448. Pearson, William R.: Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Meth. Enz.* 183 (1990) 63-98.

²³⁶ Smith, T.F.; Waterman, M.S.: Identification of Common Molecular Subsequences. *J. Mol. Biol.* 147 (1983) 195-197.

Alignments zweier Sequenzen sind so angegeben, wie sie in der Ergebnis-Datei der jeweiligen BLAST-Recherche ausgegeben wurden. Das Mehrfach-Alignment (fünf Sequenzen; Tabelle 7.6) wurde mit dem Tool "Divide and Conquer" durchgeführt²³⁷, das auf dem Bielefeld University Bioinformatics Server (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/>) zur Verfügung steht.

Die PSI-BLAST-Suche nach verwandten Sequenzen in Online-Proteindatenbanken war jene, die automatisch gemeinsam mit der Sekundärstrukturvorhersage auf dem PredictProtein-Server durchgeführt wird (siehe unten).

5.4.2 Sekundärstrukturvorhersage

Für die Vorhersage wurde das Tool PROF (Profile network prediction)²³⁸ benutzt, das auf dem PredictProtein-Server am EMBL Heidelberg²³⁹ zur Verfügung steht. PROF kennt drei Sekundärstruktur-Typen: Helix, "extended" (Faltblatt) und "other" (Schleife). Es liefert zwei Reihen von Vorhersagen für die Sekundärstruktur: die erste Reihe gibt den Strukturtyp Helix oder Faltblatt an, wenn er wahrscheinlicher ist als die beiden anderen zusammen, ansonsten erfolgt keine Vorhersage. Die absolute Zuverlässigkeit der Vorhersage spielt hierbei keine Rolle, Schleifen werden nicht vorhergesagt. Die zweite Reihe enthält nur Vorhersagen, deren geschätzte Zuverlässigkeit > 82 % ist, in ihr sind auch Schleifen angegeben. Die von mir angegebene Vorhersage enthält die Vorhersagen für Helix oder Faltblatt aus der ersten, für Schleifen aus der zweiten PROF-Vorhersage-Reihe. Dabei wurden jedoch alle Vorhersagen weggelassen, die nicht bei dem von mir gewählten Alignment an der jeweiligen Stelle für beide MoSto-Untereinheiten gleich waren.

5.4.3 3D-Strukturdarstellung

Alle perspektivischen Darstellungen der Strukturen von Proteinen, Proteinteilen, Cofaktoren etc. wurden mit dem Programm RasMol for Windows 2.6.4 erstellt, darunter auch die Abbildungen der anhand der SAXS-Ergebnisse errechneten MoSto-Strukturmodelle (Abbildung 3.9). RasMol ist vorzugsweise für die Darstellung von Biomolekülen entwickelt worden. Deshalb wurden die Kristallstrukturabbildungen von Polyoxomolybdaten in Polyederdarstellung mit dem Programm Diamond 2.1e (Crystal Impact GbR) erzeugt, das ggf. auch zur Berechnung von Bindungswinkeln aus den Strukturdaten jener Substanzen diente.

²³⁷ Stoye, Jens: Multiple sequence alignment with the divide-and-conquer method. *Gene* 211 (1998) GC45-GC56.

²³⁸ Rost, Burkhardt; Sander, Chris: Prediction of Protein Secondary Structure at Better than 70 % Accuracy. *J. Mol. Biol.* 232 (1993) 584-599. Rost, Burkhardt; Fariselli, P.; Casadio, R.: Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86 % accuracy. *Prot. Science* 5 (1996) 1704-1718.

²³⁹ Rost, Burkhardt; Yachdav, Guy; Liu, Jinfeng: The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res.* 32 (July 1, 2004) W321-W326. (Online-Veröffentlichung)
Webadressen: <http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html> ; <http://www.predictprotein.org/>

5.5 Untersuchungen mit Synchrotronstrahlung

5.5.1 Röntgenkleinwinkelstreuexperimente (SAXS)

5.5.1.1 Grundlagen

Da die Röntgenstreuung kein Standardverfahren in der Biochemie ist, möchte ich hier ihre Prinzipien kurz vorstellen.

Ebenso wie bei der Lichtstreuung wird mit der Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS) an Lösungsproben die Größe in der Lösung vorhandener Partikel bestimmt, außerdem sind gewisse Aussagen über die Abweichung der Partikel von der Kugelform möglich²⁴⁰. Bei SAXS ist es der Bereich kleinster Streuwinkel ("Guinier-Bereich"), der diese Information liefert. Die Molekülmasse eines Proteins kann im Vergleich mit einem Protein bekannter Masse unmittelbar aus der Intensität $I(\theta)$ der unter einem Winkel von 0° gestreuten Strahlung berechnet werden. Da diese freilich vom nicht gestreuten Primär-Strahl überdeckt wird, muss $I(\theta)$ durch Extrapolation ermittelt werden. Die dafür verwendete Auftragung liefert gleichzeitig sog. Gyrationradius R_G des Moleküls, der nicht mit dem äußeren Radius eines Moleküls identisch ist²⁴¹, außer für den wenig wahrscheinlichen Fall einer Hohlkugel vernachlässigbarer Wandstärke. Z.B. beträgt er bei gleichmäßiger Dichte

für eine Kugel des Radius r

$$R_G = r \cdot \sqrt{\frac{3}{5}}$$

für einen Stab der Länge l und des Radius $r \ll l$

$$R_G = \frac{l}{\sqrt{12}}$$

Aus der Molekülmasse lässt sich das Molekülvolumen abschätzen, und mit Hilfe von R_G kann dann eine grobe Aussage über die Form des Moleküls gemacht werden: kugelig oder eher gestreckt?

Die Streuintensität außerhalb des Guinier-Bereichs enthält nähere Informationen über die Form des Moleküls, allerdings ist hier keine analytische Auswertung möglich. Daher muss mit Simulationsrechnungen gearbeitet werden. Das Molekül wird durch ein Ensemble von Streudichtezentren ("Debye-Kugeln") dargestellt, deren räumliche Anordnung eine Simulations-Software so lange variiert, bis das simulierte Modell eine theoretisch berechnete Streukurve liefert, die zufriedenstellend mit dem experimentellen Resultat übereinstimmt²⁴².

²⁴⁰ Da die Wellenlänge der Strahlung der Partikelgröße etwa entsprechen sollte, haben Proteine für solche Messungen eine ungünstige Größe: sichtbares Licht ist zu lang-, Röntgenlicht zu kurzwellig. Streuung von Röntgenstrahlen findet nur unter einem Winkel von bis zu 10° , allerhöchstens 20° zur ursprünglichen Strahlrichtung statt, daher die Bezeichnung als Kleinwinkelstreuung. Pingoud/Urbanke 1997, 255-259.

²⁴¹ Definition von R_G : "Mittelwert des mit der Masse gewichteten Abstandes aller Atome im Molekül von dessen Schwerpunkt."

²⁴² Perkins 1988, 314-316.

5.5.1.2 Herstellung der Proben

Drei Ansätze MoSto wurden wie oben (Abschnitt 5.3.3) beschrieben aufgereinigt, wobei jeweils nur die beiden besten Fraktionen²⁴³ aus der Gelfiltration vereinigt, in einer B15-Stehkammer auf etwa 500 μL eingengt, anschließend in flüssigem N_2 schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt wurden. An einer kleinen Probe des Überstandes wurde mit dem BCA-Verfahren der Proteingehalt bestimmt.

Unmittelbar vor den Messungen wurden die drei Proben aufgetaut und zentrifugiert. Bei allen Proben zeigte sich ein kleines Pellet ausgefallenen Proteins. Die Probe mit dem kleinsten Pellet (Proteingehalt 17 g/L) wurde benutzt, um durch Verdünnen mit Standardpuffer jeweils 150 μL MoSto-Lösung mit Gehalten von 13 g/L, 10 g/L und 3,75 g/L herzustellen. Zum Schutz des Proteins vor Strahlungsschäden und oxidativem Abbau während der Messung wurden jeder Lösung 10 mM Dithiothreitol zugesetzt. Standardpuffer mit 10 mM Dithiothreitol wurde als Hintergrundlösung vermessen.

5.5.1.3 Messung und Auswertung

Die SAXS-Untersuchungen an den MoSto-Lösungsproben wurden an der EMBL X33 beam line am Positronen-Speicherring DORIS am DESY, Hamburg²⁴⁴, mit Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 0,15$ nm bei Raumtemperatur durchgeführt.

Mit einem mit Ar/CO_2 (70 %/30 %) gefüllten Flächen-Ionisationsdetektor mit Auslesung über lineare Verzögerungsstrecke²⁴⁵ wurde pro Minute eine Streukurve aufgenommen. Nach Addition aller Streukurven erfolgte mit dem Programm SAPOKO²⁴⁶ die Datenreduktion, bestehend aus einer Skalierung entsprechend der Intensität des Primärstrahls und der Proteinkonzentration, Korrekturen für das Ansprechverhalten des Detektors und Subtraktion der Hintergrundstreuung durch die reine Pufferlösung.

Die Streukurven $I(s)$ über s ($s = \frac{2 \cdot \sin \theta}{\lambda}$; $s_{\text{max}} = 5 \text{ \AA}^{-1}$; s , Streuvektor; 2θ , Streuwinkel) für drei

unterschiedliche Proteinkonzentrationen (3,75; 10; 13 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) wurden vor der weiteren Datenanalyse gemittelt.

Die Molekülmasse wurde aus der extrapolierten Vorwärtsstreuung $I(0)$ mit einer Unsicherheit von etwa ± 10 % errechnet. Als Referenz diente eine Lösung von Rinderserumalbumin (RSA, $M = 66 \text{ kg/mol}$):

²⁴³ Die Auswahl erfolgte in erster Linie nach Reinheit (SDS-PAGE), in zweiter nach dem Proteingehalt. Bei einer normal verlaufenden G200-Gelfiltration eigneten sich üblicherweise 20-30 mL des Eluates zur Aufkonzentrierung als reine MoSto-Lösung, in diesem Fall wurden nur die allerbesten 10 mL verwendet.

²⁴⁴ Beschrieben in: Koch, Michel H.J.; Bordas, Joan: X-ray diffraction and scattering on disordered systems using synchrotron radiation. *Nucl. Instrum. Meth.* 208 (1983) 461-469.

²⁴⁵ Gabriel, A.; Dauvergne, F.: The localisation method used at EMBL. *Nucl. Instrum. Meth.* 201 (1982) 223-224.

²⁴⁶ Konarev, P.V.; Volkov, V.V.; Sokolova, A.V.; Koch, Michel H.J.; Svergun, Dmitri I.: PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* 36 (2003) 1277-1282.

- Etwa 10 mg RSA wurden in einem Eppendorfgefäß in 1 mL 50 mM Hepes-Puffer pH 7,5 gelöst, die Lösung anschließend 15 min bei $13.000 \cdot g$ zentrifugiert, um ungelöste Reste abzutrennen.
- 10, 20 und 40 μL der Lösung wurden auf je 1 mL mit dem o.a. Hepes-Puffer aufgefüllt und die OD_{280} gemessen. Aus den Werten wurde auf die Konzentration der zuerst angesetzten Lösung zurückgerechnet, wobei eine OD von 6,14 für eine 1 % (w/v)-Lösung angenommen wurde.
- Die ursprünglich angesetzte Lösung wurde gemäß dem Resultat der Konzentrationsbestimmung mit Hepes-Puffer auf 7 g/L verdünnt und gegen reinen Hepes-Puffer als Hintergrund-Probe vermessen.

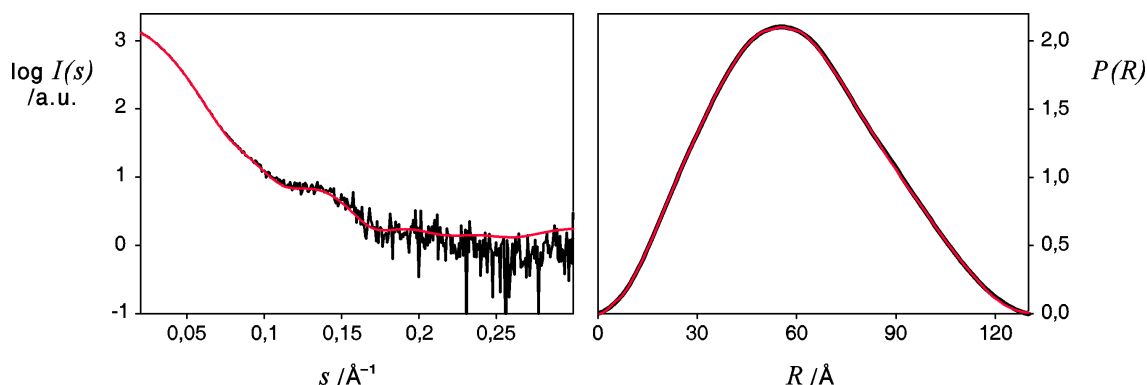


Abbildung 5.3: SAXS-Streukurve (links) und zugehörige Abstandsverteilungs-Funktion (rechts) von MoSto. Die Messwerte sind als schwarze Kurve gezeigt; die berechneten (roten) Kurven beruhen auf dem in Abbildung 3.9 oben gezeigten Modell. Symbole: $I(s)$, Streuintensität; s , Streuvektor; $P(R)$, Abstandsverteilung; R , Abstand; *a.u.*, arbitrary units.

Mit dem Programm GNOM²⁴⁷ wurde die gemittelte (s.o.) Streukurve in eine Abstands-Verteilungsfunktion umgerechnet. Die Molekülstruktur wurde *ab initio* errechnet mit einem für kettenförmige Biopolymere angepassten dummy-residue-Verfahren, das in dem Programmpaket GASBOR²⁴⁸ enthalten ist. Als Daten wurden dabei ausschließlich die Abstands-Verteilungsfunktion und die Anzahl von 2176 Aminosäuren eines MoSto- $\alpha_4\beta_4$ -Oktamers zu Grunde gelegt. Es wurden 20 unabhängige Berechnungen durchgeführt, die erhaltenen Modelle wurden anschließend jeweils paarweise hinsichtlich der Positionen der Aminosäure-Dummies verglichen. Als Maß für die Übereinstimmung zweier Modelle wurde dabei die quadratisch gemittelte (root mean square, r.m.s.) Abweichung aller Positionen errechnet. Dieser Wert betrug typischerweise um die 5 Å. Das Modell mit der geringsten durchschnittlichen r.m.s.-Abweichung von allen anderen Modellen wurde als beste Annäherung betrachtet und ist in Abbildung 3.9 gezeigt. In Abbildung 5.3 sind die zu diesem Modell gehörende Abstands-Verteilungsfunktion und die entsprechende theoretisch zu erwartende Streukurve den experimentellen Daten gegenüber gestellt.

²⁴⁷ Svergun, Dmitri I.: Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *J. Appl. Cryst.* 25 (1992) 495-503.

²⁴⁸ Svergun, Dmitri I.; Petoukhov, Maxim V.; Koch, Michel H.J.: Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering. *Biophys. J.* 80 (2001) 2946-2953. Zum Prinzip der dummy-residue-Berechnung siehe auch den begleitenden Text bei Abbildung 3.9, Seite 74.

5.5.2 Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS)²⁴⁹

5.5.2.1 Herstellung der Modellverbindungen

Heptamolybdat wurde als Ammoniumsalz p.a. von Merck/Darmstadt bezogen.

β -Oktamolybdat: 50 mL einer 0,4 M Lösung von Natriummolybdat wurden mit 26 mL 0,5 M Schwefelsäure versetzt und 80 mL einer 0,1 M Lösung von Tetramethylammoniumbromid hinzugefügt. Im Laufe von vier Tagen kristallisierten aus der Lösung farblose sechseckige Plättchen aus, die abfiltriert, nacheinander mit kaltem Wasser, Ethanol und Diethylether gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet wurden.²⁵⁰

Mo_{36} : Gleiche Volumina 0,2 M wässriger K_2MoO_4 -Lösung und 0,4 M wässriger Salpetersäure wurden gemischt und bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Gefäß aufbewahrt. Nach 3-6 Tagen hatten sich klare, farblose säulenförmige Kristalle abgeschieden, die an der Luft leicht unter Wasserabgabe zerfielen.²⁵¹

Die Identität der gewonnenen Produkte wurde jeweils durch Bestimmung der Elementarzell-Abmessungen mit Einkristall-Röntgenbeugung geprüft.

5.5.2.2 Probenvorbereitung

Um für die Untersuchungen das Protein zu schonen, also intakt und mit möglichst hohem Mo-Gehalt zu erhalten, wurden keine vollständig aufgereinigten MoSto-Präparate verwendet, sondern auf die Gelfiltration verzichtet. MoSto wurde wie beschrieben (Abschnitt 5.3.3) aufgereinigt bis zur zweiten Stufe, der Ammoniumsulfatfällung. Das in Standardpuffer wieder aufgelöste Protein wurde anschließend nur einer Sephadex G25-Gelfiltration auf einer kleinen Säule ($h \cdot \varnothing = 50 \cdot 15$ mm) unterworfen, um Ammoniumsulfat und eventuell vorhandenes freies Molybdat zu entfernen. Die bei pH 7,5 vermessene Probe wurde bei dieser Gelfiltration gleichzeitig von Standardpuffer auf MOPS 50 mM pH 7,5 umgepuffert.

Die Proben enthielten neben MoSto noch schätzungsweise 30-40 % anderer Proteine. Da EXAFS elementspezifisch arbeitet, stören irgendwelche Fremdproteine die EXAFS-Untersuchung nicht im geringsten, so lange es sich nicht ebenfalls um Mo-Proteine handelt. Bei der Analyse aller Fraktionen aus den G200- und später S200-Gelfiltrationsläufen trat aber jeweils der vom Speicherprotein stammende Mo-Peak als einziger auf²⁵², d.h. vor dem Lauf, also nach der Ammoniumsulfatfällung, waren bereits keine weiteren Mo-Proteine in der Lösung enthalten.

²⁴⁹ siehe auch in: Gnida 2002, Kapitel 3 und 4.

²⁵⁰ Syntheseverfahren: Fuchs/Knöpnadel/Brüdgam 1974. Strukturaufklärung: Fuchs/Knöpnadel 1982.

²⁵¹ Krebs/Paulat-Böschen 1982.

²⁵² Bei den G200- und G150-Läufen trat freilich noch ein weiterer Peak auf, der aber zweifelsfrei auf niedermolekulares, vom Speicherprotein verlorenes Mo zurückgeführt werden konnte.

Die proteinhaltigen Fraktionen des G25-Gelfiltrationslaufes wurden durch Messung der OD_{280} identifiziert. 75 μL der Fraktion mit dem höchsten Proteingehalt wurden sofort in eine Küvette aus 1 mm starkem HESAR-Glas mit Fenstern aus Kapton®-Folie²⁵³ eingefüllt. Die Einfüllöffnungen wurden mit Polymethylacrylat-Klebstoff verklebt, nach Aushärten des Klebstoffs (≈ 30 min) wurde die Probe in flüssigem N_2 schockgefroren und bis zur Messung bei -70°C aufbewahrt. Der Molybdängehalt der Probe wurde zu 2,5 mM bestimmt, der Proteingehalt wurde nicht untersucht, da der Wert aufgrund des nicht exakt bestimmten Reinheitsgrades ohnehin wenig aussagekräftig gewesen wäre.

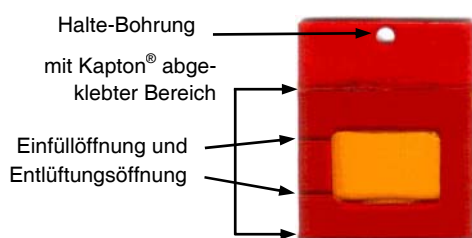


Abbildung 5.4: Küvette für EXAFS-Messungen in Originalgröße. Gezeigt ist eine Küvette mit 150 μL Inhalt, wie sie für die Messungen an den Modellsystemen verwendet wurde. Bei der für die MoSto-Probe benutzten 75 μL -Küvette ist der zentrale Probenraum nur halb so hoch.

Bei den Modellverbindungen wurde jeweils eine kleine Menge (beim Heptamolybdat 40 mg, beim Oktamolybdat 40 mg, und beim $[\text{Mo}_{36}\text{O}_{112}(\text{H}_2\text{O})_{16}]^{8-}$ 30 mg) der betreffenden Substanz mit 100 mg Bornitrid (BN, "anorganischer Graphit") im Mörser zu einer homogenen Paste vermahlen²⁵⁴. Die Mischung wurde homogen in eine nur einseitig mit einem Kapton-Folien-Fenster verschlossene Küvette aus HESAR-Glas gepresst, die danach mit einer zweiten Folie verschlossen wurde.

5.5.2.3 Durchführung der Messungen

Alle EXAFS-Messungen wurden an der EMBL EXAFS Beam Line D2 am DESY Hamburg durchgeführt. Die Strahlungsquelle war der Positronen-Speicherring DORIS III (Double Ring Store) des HASYLAB (Hamburger Synchrotronstrahlungslabor). Im Speicherring werden die umlaufenden 4,45 GeV-Positronen durch Magnetfelder auf gekrümmte Bahnen gezwungen, bei dieser beschleunigten Bewegung wird tangential zur Flugbahn Röntgenstrahlung mit einem sehr breiten Spektrum ("weißes Röntgenlicht") abgestrahlt. Für XAS-Messungen muss dieser "weiße Strahl" monochromatisiert werden, dazu wird die Reflexion der Röntgenwellen an den Gitterebenen eines Kristalls ausgenutzt. Zwei parallel angeordnete, parallel zur (311)-Gitterebene plan geschliffene Silizium-Einkristalle (Si(311)-Doppel-Monochromator) spalten den Strahl gemäß der Bragg'schen Beziehung

²⁵³ Kapton (Markenzeichen von DuPont) ist ein Film aus Polyimid, der auch bei extremen Temperaturen (-269 bis $+400^\circ\text{C}$) und unter hohen Dosen ionisierender Strahlung reißfest und dicht bleibt.

²⁵⁴ Die Fest-Substanzen müssen homogenisiert und verdünnt werden, da zu hohe Absorberkonzentration zu Störungen und zu Dämpfung des EXAFS-Signals führen kann [Stern, E.A.; Kim, K.: Thickness effects on the extended-x-ray absorption-fine-structure amplitude. *Phys. Rev. B* 23 (1981) 3781-3787.]. Bornitrid eignet sich als Beimengung, weil es sehr weich und chemisch weitgehend inert ist.

$$\lambda_n = \frac{2d \sin \theta}{n} \Leftrightarrow E_n = \frac{hcn}{2d \sin \theta} \quad (8)$$

(λ : Wellenlänge; E : Energie; d : Atomabstand in der Gitterebene; θ : Ein- und Austrittswinkel des Strahls relativ zur Gitterebene; h : Planck'sches Quantum; c : Lichtgeschwindigkeit; $n = 1, 2, 3, \dots$)

nach der Frequenz auf²⁵⁵. Durch streifenden Einfall (Einfallswinkel $0,22^\circ$) auf einen toroidalen Spiegel wird der gewünschte Strahl anschließend auf die Probe fokussiert.

Da die Mechanik des Monochromators keine absolut reproduzierbare Einstellung der Frequenz bzw. Energie zulässt, ist am Ende des Strahlenganges ein System zur absoluten Kalibrierung der Quantenenergie angebracht, das ebenfalls auf der Bragg-Reflektion beruht²⁵⁶. Auf diese Weise wird es erst möglich, die Ergebnisse wiederholter Messungen zu addieren bzw. zu vergleichen.

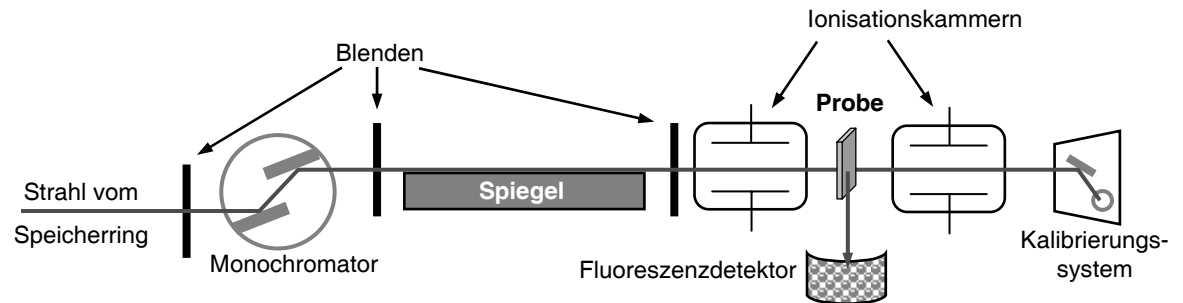


Abbildung 5.5: Schema der Messanordnung an der EMBL EXAFS Beam Line D2.

Die Messungen an der MoSto-Probe sowie an den Molybdatlösungen bei pH 1 und pH 6,5 erfolgten im Fluoreszenzmodus, das entstehende Mo- K_α Fluoreszenzanregungsspektrum wurde mit einem Germaniumdetektor mit 13 unabhängigen Detektorelementen (Canberra) registriert. Die drei Modelle Hepta-, Oktamolybdat und "Mo₃₆" wurden als Feststoffe in Absorption vermessen. Die Intensität der Röntgenstrahlung vor und nach Passieren der Probe wurde dabei mit mit Ar/CO₂ (70/30%) gefüllten Ionisationskammern bestimmt. Um Strahlenschäden an der Probe gering zu halten, waren die Proben in einem Kryostaten mit geschlossenem Heliumkreislauf (Oxford Instruments) montiert und wurden während der Messung in allen Fällen bei Kryotemperaturen von ca. 20-30 K gehalten. Die Aufnahme der Spektren erfolgte typischerweise bis 0,9 keV oberhalb der Mo- K -Kante; bei den Modellsubstanzen teilweise auch bis 1,4 keV.

²⁵⁵ Wie man aus der Gleichung sieht, werden neben der gewünschten Frequenz auch deren Oberschwingungen ($n > 1$) vom Monochromator durchgelassen. Dieser Effekt kann in einem Doppel-Monochromator reduziert werden, indem die beiden Kristalle nicht exakt parallel ausgerichtet werden, was sich auf die Oberschwingungen deutlich stärker auswirkt [Caciuffo, R.; Melone, S.; Rustichelli, F.; Boeuf, A.: Monochromators for X-ray synchrotron radiation: *Phys. Rep.* 152 (1987) 1-71.]. Für die durchgeführten Messungen wurde der Monochromator so weit verstimmt, dass die Grundschwingung um $\geq 30\%$ geschwächt wurde.

²⁵⁶ Pettifer, R.F.; Hermes, C.: Absolute energy calibration of X-ray radiation from synchrotron sources. *J. Appl. Cryst.* 18 (1985) 404-412.

5.5.2.4 Datenreduktion und -auswertung

Bei der Datenreduktion mit dem EXPROG-Programmpaket²⁵⁷ wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Erstellung von Spektren, die zunächst auf die Monochromator-Stellung als x-Achse bezogen sind.
- Umrechnung der Einzelspektren auf die Röntgenenergie als x-Achse gemäß den Daten des Kalibrierungssystems.
- Bei Fluoreszenzmessungen Addition der Daten der 13 unabhängigen Detektor-Kanäle zu einem Spektrum.
- Addition der aufeinander folgenden Einzelmessungen zu einem Spektrum.
- Extraktion der Feinstruktur aus dem Spektrum. Dazu wird der Absorptionsuntergrund durch einen "spline" simuliert, welcher von Hand durch Verschieben von bis zu sechs Knotenpunkten angelegt wird.
- Transformation des Signals von Röntgenenergie auf Photoelektron-Wellenzahl als x-Achse, dabei wurde eine Mo-*K*-Kantenposition von $E_b = 20002$ eV angenommen.

Für die EXAFS-Analyse mit EXCURV98²⁵⁸ wurde ein für alle Proben konsistenter Datenbereich von 50-800 eV oberhalb E_b (bzw. $k \approx 4-14 \text{ \AA}^{-1}$) gewählt. Das Prinzip der Analyse wurde bereits auf Seite 78f. erläutert.

5.6 Allgemeine Materialien

5.6.1 Geräte

Sofern nicht anders erwähnt, wurden für in verschiedenen Zusammenhängen wiederkehrende Arbeiten folgende Geräte benutzt:

photometrische Messungen im sichtbaren Bereich	Spektrophotometer Lambda 2 (Perkin-Elmer)
photometrische Messungen im UV-Bereich	Spektrophotometer UV-160A (Shimadzu)
Zentrifugation ... in Eppendorfgefäßen	Tischzentrifuge Biofuge A (Heraeus)
... in 50-500 mL-Spezialgefäßen, bis 12.000 Upm	Kühlzentrifuge RC 5B (Sorvall)
... in 9-75 mL-Spezialgefäßen, bis 50.000 Upm	Unltrazentrifuge Ultra Pro 80 (Sorvall)

²⁵⁷ Nolting, H.F.; Hermes, C.: EXPROG: EMBL EXAFS data analysis and evaluation program package. O.O. 1992.

²⁵⁸ <http://srs.dl.ac.uk/xrs/Computing/Programs/excurv97/excurv98guide.htm>
Zu den Grundlagen siehe auch: Binsted/Strange/Hasnain 1992.

Sterilisation von Medien und Geräten	Vertikalautoklav ELV 3870 (Tuttnauer)
Ultrafiltration	Minicon B15-Stehkammern, Diaflo-Rührzellen mit YM100- oder PM30-Membranen (Amicon, Witten)
Chromatographie	XK50/XK26/XK16-Säulen mit verstellbaren Flow-Adapttern (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

5.6.2 Chemikalien

Sofern nicht anders erwähnt, wurden Gase von der Fa. Linde (Höllriegelskreuth) und Chemikalien (Reinheitsgrad, sofern erhältlich und im Text nicht anders angegeben, "pro analysi" oder "suprapur") von der Fa. Merck (Darmstadt) bezogen. Sämtliche Molmassen-Markerproteine für SDS-PAGE sowie Gelfiltration kamen von Sigma (Deisenhofen). Außerdem lieferten:

Boehringer (Mannheim)	ATP, Desoxyribonuclease I
Fluka (Buchs, Schweiz)	Eisen(III)-citrat, MOPS, Agar-Agar
Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)	DEAE-Sephacel, Sephadex G25/G150/G200, Superdex 200
Serva (Heidelberg)	Dithiothreitol, Lysozym, Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, TE-MED, Ammoniumperoxodisulfat, SDS, EDTA, Coomassie Brilliant Blue
Sigma (Deisenhofen)	Superoxiddismutase, PMSF, Tricin

"Wasser" bedeutet im Text, sofern nicht anders angegeben, stets mehrstufig in Ionenaustauschern voll-entsalztes Wasser in bidest.-Qualität.

6 Literaturverzeichnis

Bei Texten mit mehr als drei Autoren wurde in den Fußnoten die Autorenliste nach dem ersten Namen mit "&al." abgekürzt. Zahlreiche Literaturstellen, die nur in einem sehr speziellen Zusammenhang von Belang sind und daher nur ein einziges Mal zitiert wurden, sind nicht in diesem Verzeichnis enthalten, sondern in der jeweiligen Fußnote vollständig angegeben.

Allen, Ronda M.; Roll, Jon T.; Rangaraj, Priya; Shah, Vinod K.; Roberts, Gary P.; Ludden, Paul W.: Incorporation of Molybdenum into the Iron- Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* 274/22 (1999) 15869-15874.

Altschul, Stephen F.; Madden, Thomas L.; Schaffer, Alejandro A.; Zhang, Jinghui; Zhang, Zheng; Miller, Webb; Lipman, David J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 (1997) 3389-3402.

Becking, Jan Hendrik: The Family Azotobacteriaceae. IN: *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. New York [u.a.] ²1992, 3144-3170.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan, R.E.; Gibbons, N.E.; Eds.). Baltimore ⁸1974.

Binsted, Norman; Strange, Richard W.; Hasnain, S. Samar: Constrained and Restrained Refinement in EXAFS Data Analysis with Curved Wave Theory. *Biochemistry* 31 (1992) 12117-12125.

Blanchard, Carol Z.; Hales, Brian J.: Isolation of Two Forms of the Nitrogenase VFe Protein from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry* 35 (1996) 472-478.

Bortels, H.: Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung. *Archiv der Mikrobiologie* 1 (1930) 333-342.

Bortels, H.: Weitere Untersuchungen über die Bedeutung von Molybdän, Vanadium, Wolfram und anderen Erdaschenstoffen für stickstoffbindende und andere Mikroorganismen. *Zentralblatt für Bakterienkunde* 95 (1936) 193-218.

Branden, Carl-Ivar; Tooze, John: *Introduction to Protein Structure*. New York ²1999.

Buchanan/Gibbons: siehe "Bergey's Manual".

Cardenas, Jacobo; Mortenson, Leonard E.: Determination of Molybdenum and Tungsten in Biological Materials. *Analytical Biochemistry* 60 (1974) 372-381.

Chasteen, N. Dennis; Harrison, Pauline M.: Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage. *Journal of Structural Biology* 126 (1999) 182-194.

Dobbek, Holger; Huber, Robert: The Molybdenum and Tungsten Cofactors: A Crystallographic View. IN: Sigel, Helmut; Sigel, Astrid (Eds.): *Metal Ions in Biological Systems Vol. 39: Molybdenum and Tungsten: Their Roles in Biological Processes*. New York and Basel 2002, 227-264.

- Elliott, Barbara B.; Mortenson, Leonard E.: Molybdenum Storage Component from *Clostridium Pasteurianum*.
IN: Newton, W.; Postgate, J.R.; Rodriguez-Barrueco, C. (Eds.): Recent Developments in Nitrogen Fixation. London [u.a.] 1977, 215-217.
- Erfkamp, Joachim; Müller, Achim: Die Stickstoff-Fixierung.
Chemie in unserer Zeit 24/6 (1990) 267-279.
- Fenske, Dirk; Gnida, Manuel; Schneider, Klaus; Meyer-Klaucke, Wolfram; Schemberg, Jörg; Henschel, Volker; Meyer, Anne-Katrin; Knöchel, Arndt; Müller, Achim: A new type of metalloprotein: The Mo storage protein from *Azotobacter vinelandii* contains a polynuclear molybdenum-oxide cluster.
ChemBioChem 6 (2005) 405-413.
- Fraústo da Silva, J.J.R.; Williams, Robert J.P.: The Biological Chemistry of the Elements. Oxford 1991.
- Fuchs, Joachim; Knöpnadel, Imme; Brüdgam, Irene: Über ein Tetramethylammonium(1:8)molybdat.
Zeitschrift für Naturforschung 29b (1974) 473-475.
- Fuchs, Joachim; Knöpnadel, Imme: Die Kristallstruktur des Dinatriumtetramethylammonium-octamolybdat-dihydrats, $\text{Na}_2[\text{N}(\text{CH}_3)_4]_2\text{Mo}_8\text{O}_{26} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und die Beziehung zwischen Mo—O-Abstand und Bindungsordnung in Polymolybdaten.
Zeitschrift für Kristallographie 158 (1982) 165-179.
- Gakh, Oleksandr; Adamec, Jiri; Gacy, A. Marquis; Twesten, Ray D.; Owen, Whyte G.; Isaya, Grazia: Physical Evidence that Yeast Frataxin Is an Iron Storage Protein.
Biochemistry 41 (2002) 6798-6804.
- Gmelin: Tytko, Karl-Heinz; Trobisch, Ursula: Molybdenum Oxide Hydrates. Oxomolybdenum Species in Aqueous Solutions (Gmelin Handbook of Inorganic Chemistry 8th ed., Molybdenum Supplement Vol. B 3a). Berlin 1987. 67-358.
- Gnida, Manuel: Charakterisierung neuartiger bakterieller Molybdänzentren: Röntgenabsorptionsspektroskopische Untersuchungen zu Struktur und Funktionalität.
Dissertation Medizinische Universität Lübeck 2002.
- Gourley, David G.; Schüttelkopf, Alexander W.; Anderson, Lisa A.; Price, Nicholas C.; Boxer, David H.; Hunter, William N.: Oxyanion Binding Alters Conformation and Quaternary Structure of the C-terminal Domain of the Transcriptional Regulator ModE.
The Journal of Biological Chemistry 276 (2001) 20641-20647.
- Grunden, Amy M.; Shanamugam, K.T.: Molybdate transport and regulation in bacteria.
Archives of Microbiology 168 (1997) 345-354.
- Hales, Brian J.; Case, Ellen E.: Nitrogen Fixation by *Azotobacter vinelandii* in Tungsten-containing Medium.
The Journal of Biological Chemistry 262/33 (1987) 16205-16211.
- Harrison, Pauline M.; Arosio, Paolo: The ferritins: molecular properties, iron storage and cellular regulation.
Biochimica et Biophysica Acta 1275 (1996) 161-203.
- Henschel, Volker: Untersuchungen am Molybdän-Speicherprotein von *Azotobacter vinelandii* zum Mechanismus des Einbaus und der Freisetzung von Molybdän.
Diplomarbeit Universität Bielefeld 2003.

- Hille, Russ: Molybdenum Enzymes Containing the Pyranopterin Cofactor: An Overview.
IN: Sigel, Helmut; Sigel, Astrid (Eds.): Metal Ions in Biological Systems Vol. 39: Molybdenum and Tungsten: Their Roles in Biological Processes. New York and Basel 2002, 187-226.
- Ilari, Andrea; Stefanini, Simonetta; Chiancone, Emilia; Tsernoglou, Demetrius: The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site.
Nature Structural Biology 7 (2000) 38-43.
- Isobe, M.; Marumo, F.; Yamase, T.; Ikawa, T.: The Crystal Structure of Hexakis(isopropylammonium) Dihydrogenooctamolybdate(6-) Dihydrate, $(C_3H_{10}N)_6[H_2Mo_8O_{28}] \cdot 2H_2O$.
Acta Crystallographica B34 (1978) 2728-2731.
- Krebs, Bernt; Paulat-Bösch, Irene: The Structure of the Potassium Isopolymolybdate $K_8[Mo_36O_{112}(H_2O)_{16}] \cdot nH_2O$ ($n = 36 \dots 40$)
Acta Crystallographica B 38 (1982) 1710.
- Larimer, Frank .W.; Chain, Patrick; Hauser, Loren; Lamerdin, Jane; Malfatti, Stephanie; Do, Long; Land, Miriam L.; Pelletier, Dale A.; Beatty J. Thomas, Lang, Andrew S.; Tabita, F. Robert; Gibson, Janet L.; Hanson, Thomas E.; Torres y Torres, Janelle L.; Peres, Caroline; Harrison Faith H.; Gibson, Jane; Harwood, Caroline S.: Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*.
Nature Biotechnology 22 (2004) 55-61.
- Makdessi, Kathrin; Fritsche, Kathrin; Pich, Andreas; Andreesen, Jan R.: Identification and characterization of the cytoplasmic molybdate/tungstate-binding protein of *Eubacterium acidaminophilum*.
Archives of Microbiology 181 (2004) 45-51.
- Masepohl, Bernd; Schneider, Klaus; Drepper, Thomas; Müller, Achim; Klipp, Werner: Alternative Nitrogenases.
IN: Leigh, G. Jeffery (Ed.): Nitrogen Fixation at the Millennium. Amsterdam [u.a.] 2002, 191-222.
- Meldrum, Fiona C.; Wade, Vanessa J.; Nimmo, Duncan L.; Heywood, Brigid R.; Mann, Stephen: Synthesis of inorganic nanophase materials in supramolecular protein cages.
Nature 349 (1991) 684-687.
- Mortenson, Leonard E.; Thorneley, R.N.F.: Structure and function of nitrogenase.
Annual Reviews in Biochemistry 48 (1979) 387-418.
- Müller, Achim; Suer, Waltraud; Pohlmann, Carsten; Schneider, Klaus; Thies, Wolf-Gerolf; Appel, Helmut: Comparative *in-vivo* and *in-vitro* ^{99}Mo -time-differential-perturbed-angular-correlation studies on the nitrogenase MoFe protein and on other Mo species of different N_2 -fixing bacteria.
European Journal of Biochemistry 246 (1997) 311-319.
- Nordberg, Monica: Metallothioneins: historical review and state of knowledge.
Talanta 46 (1998) 243-254, 244.
- Oakley, C.L.: Antigen-antibody reactions in microbiology.
IN: Norris, J.R.; Ribbons, D.W. (Hrsg.): Methods in Microbiology Bd. 5A, London 1971, S. 174-218.
- Ouchterlony, Ö.: Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann Arbor ⁵1971. S. 32-59.
- Pantaler, R. P.: A Kinetic Method for Determining Traces of Tungsten and Molybdenum.
Journal of Analytical Chemistry of the USSR 18 (1963) 519-524.
Originalfassung: Журнал Аналитической Химии (Žurnal Analitičeskoj Chimii) 18 (1963) 603-609.

Pau, Richard N.; Klipp, Werner; Leimkühler, S.: Molybdenum transport; processing and gene regulation.

IN: Winkelmann, Günther; Carrano, Carl J.: Iron and Related Transition Metals in Microbial Metabolism. Amsterdam [u.a.] 1997, 1-13.

Pau, Richard N.; Lawson, David M.: Transport, Homeostasis, Regulation, and Binding of Molybdate and Tungstate to Proteins.

IN: Sigel, Helmut; Sigel, Astrid (Eds.): Metal Ions in Biological Systems Vol. 39: Molybdenum and Tungsten: Their Roles in Biological Processes. New York and Basel 2002, 31-74.

Perkins, Stephen J.: Structural studies of proteins by high-flux X-ray and neutron solution scattering. *Biochemical Journal* 254 (1988) 313-327.

Peterson, Cynthia W.: Yeast copper metallothionein.

IN: Messerschmidt, Albrecht; Huber, Robert; Poulos, Thomas; Wieghardt, Karl (Hgg.): Handbook of Metalloproteins. Chichester [u.a.] 2001. 1405-1413.

Pienkos, Philip T.; Brill, Winston J.: Molybdenum Accumulation and Storage in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*.

Journal of Bacteriology 145/2 (1981) 743-751.

Pienkos, Philip T.; Shah, Vinod K.; Brill, Winston J.: Molybdenum in Nitrogenase.

IN: Coughlin, M.P. (Ed.): Molybdenum and Molybdenum Containing Enzymes. Oxford 1980, 387-401.

Pingoud, Alfred; Urbanke, Claus: Arbeitsmethoden der Biochemie. Berlin, New York 1997.

Pope, Michael Thor: Heteropoly and Isopoly Oxometalates. Berlin [u.a.] 1983.

Pope, Michael Thor: Molybdenum Oxygen Chemistry: Oxides, Oxo Complexes, and Polyoxoanions. *Progress in Inorganic Chemistry* 39 (1991) 181-257.

Rubio, Luis M.; Ludden, Paul W.: The Gene Products of the *nif* Regulon.

IN: Leigh, G. Jeffery (Ed.): Nitrogen Fixation at the Millennium. Amsterdam [u.a.] 2002, 101-136.

Saraste, Matti; Sibbald, Peter R.; Wittinghofer, Alfred: The P-loop – a common motif in ATP- and GTP-binding proteins.

Trends in Biochemical Sciences 15 (1990) 430-434.

Schmidt, Carsten: Funktionen von Zink und Metallothionein im Zellzyklus. Herdecke 1999 (zugl. Dissertation Bremen 1998).

Schneider, Klaus; Müller, Achim; Johannes, Kay-Uwe; Diemann, Ekkehard; Kottmann, Jürgen: Selective Removal of Molybdenum Traces from Growth Media of N₂-Fixing Bacteria.

Analytical Biochemistry 193 (1991) 292-298.

Schneider, Klaus, Gollan, Ute, Dröttboom, Melanie, Selsemeier-Voigt, Sabine, Müller, Achim: Comparative biochemical characterization of the iron-only nitrogenase and the molybdenum nitrogenase from *Rhodobacter capsulatus*,

Eur. J. Biochem. 244 (1997) S. 789-800.

Shah, Vinod K.; Ugalde, Rodolfo A.; Imperial, Juan; Brill, Winston J.: Molybdenum in Nitrogenase.

Annual Reviews in Biochemistry 53 (1984) 231-.

- Siemann, Stefan: Untersuchungen zur Bildung Wolfram- und Rhenium-haltiger Nitrogenasen in *Rhodobacter capsulatus* und zur Biosynthese des FeMo-Cofaktors in einer *nifE*⁻-Mutante. Dissertation Universität Bielefeld 2000.
- Siemann, Stefan; Schneider, Klaus; Oley, Mareke; Müller, Achim: Characterization of a Tungsten-Substituted Nitrogenase Isolated from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry* 42 (2003) 3846-3857.
- Stiefel, Edward I.: The Biogeochemistry of Molybdenum and Tungsten. IN: Sigel, Helmut; Sigel, Astrid (Eds.): *Metal Ions in Biological Systems Vol. 39: Molybdenum and Tungsten: Their Roles in Biological Processes*. New York and Basel 2002, 1-29.
- Stacey, Gary (Ed.): *Biological nitrogen fixation*. New York [u.a.] 1992.
- Strandberg, G.W.; Wilson, P.W.: Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.* 14 (1968) 25-31.
- Thiel, Teresa; Pratte, Brenda; Zahalak, Marta: Transport of molybdate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Archives of Microbiology* 179 (2002) 50-56.
- Tiemann, Dirk: Aufnahme und Prozessierung von Molybdän beim Stickstoff-fixierenden Bakterium *Rhodobacter capsulatus*. Diplomarbeit Universität Bielefeld 1996.
- Tytko, Karl-Heinz; Baethe, Gerhard; Hirschfeld, Elisabeth-Regina; Mehmke, Karin; Stellhorn, Dagmar: Über die Gleichgewichte in wäßrigen Polymolybdatlösungen. Neuauswertung der potentiometrischen Meßdaten von SASAKI und SILLÉN. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* 503 (1983) 43-66.
- Tytko/Trobisch 1989: siehe "Gmelin".
- Vanbleu, E.; Marchal, K.; Lambrecht, M.; Mathys, J.; Vanderleyden, J.: Annotation of the pRhico plasmid of *Azospirillum brasilense* reveals its role in determining the outer surface composition. *FEMS Microbiol. Lett.* 232 (2004) 165-172.
- Wang, Ge; Angermüller, Sieglinde; Klipp, Werner: Characterization of *Rhodobacter capsulatus* Genes Encoding a Molybdenum Transport System and Putative Molybdenum-Pterin-Binding Proteins. *Journal of Bacteriology* 175 (1993) 3031-3042.

7 Anhang

Abbildung 7.1: Protein- und Molybdänelution in der Gelfiltration über Superdex 200 (S200).	143
Abbildung 7.2: Ausschnitt aus dem MALDI-TOF-Massenspektrum einer MoSto-Probe.....	144
Tabelle 7.1: Übersicht über den Verlauf des ersten Anreicherungsversuches.....	142
Tabelle 7.2: Übersicht über Aminosäurezusammensetzung und andere summarische Eigenschaften der MoSto-Primärstruktur.....	145
Tabelle 7.3 Die MoSto-Untereinheiten im Alignment mit der AGP-Transferase aus E. coli, zusammen mit der vorhergesagten bzw. ermittelten Sekundärstruktur.	146
Tabelle 7.4: Aufstellung der in den Sequenz-Alignments als funktionell vergleichbar angesehenen Aminosäuren.....	146
Tabelle 7.5: Similarity Scores der Sequenzvergleiche der MoSto-Untereinheiten untereinander und mit anderen Proteinen.	147
Tabelle 7.6: Sequenz-Alignment von MoSto mit seinen mutmaßlichen Homologen.....	148
Tabelle 7.7: EXAFS-Parameter für MoSto und $[\text{MoO}_4]^{2-}$	149
Tabelle 7.8: EXAFS-Parameter für die Modellverbindungen.	150

7.1 Daten ausgewählter MoSto-Anreicherungen

Tabelle 7.1: Übersicht über den Verlauf des ersten Anreicherungsversuches
(Versuch der Reproduktion des Verfahrens nach Pienkos/Brill 1981)

Fraktion	Volumen ml	Protein mg/ml	Ges.-Prot. mg	Molybdän nmol/ml	Gesamt-Mo nmol	nmol Mo je mg Protein	
Rohextrakt	15	26	390	295	4425	11	
DEAE							
1	20	0,48	10	0	0	0	
2	40	0,63	25	0	0	0	
3	35	0,30	11	0	0	0	
4	60	0,10	6	0	0	0	
5	65	3,5	226	70	4550	20	
6	45	2,0	91	3,3	149,4	1,7	
Summe			368		4699		
Ammonium sulfat							
1	3	7,1	21	17	50,4	2,4	
2	3,5	16	55	426	1489	27	
40%/50%	3	70	1,6	109	22	1519	14
Summe			185		3059		
G150- Gelfiltration							
4	5	0,69	3,5	9,0	45	13	
5							
6	4	0,24	0,9	24	95,26	101	
7	5	0,17	0,8	25	123,5	148	
8	5	0,31	1,5	38	189,4	123	
9	5	0,31	1,5	27	132,5	86	
10	5	0,32	1,6	23	115,5	72	
11							
12	5	0,18	0,9				
Summe			11		701		

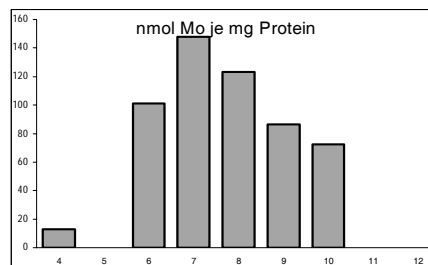
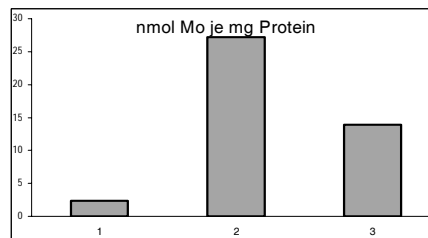
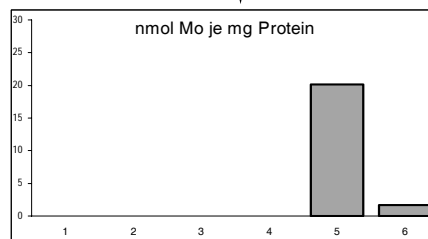
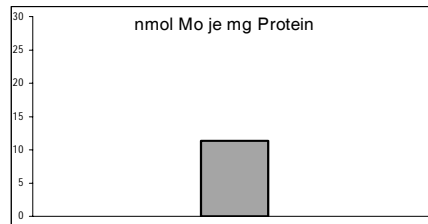
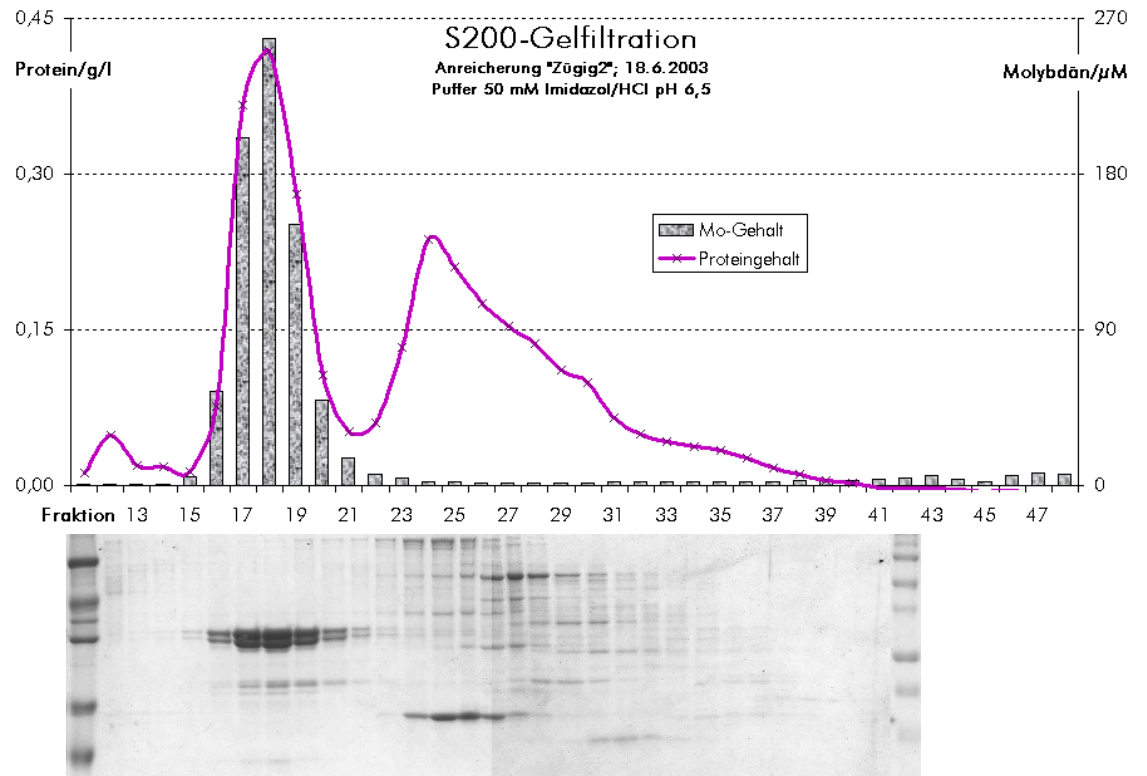
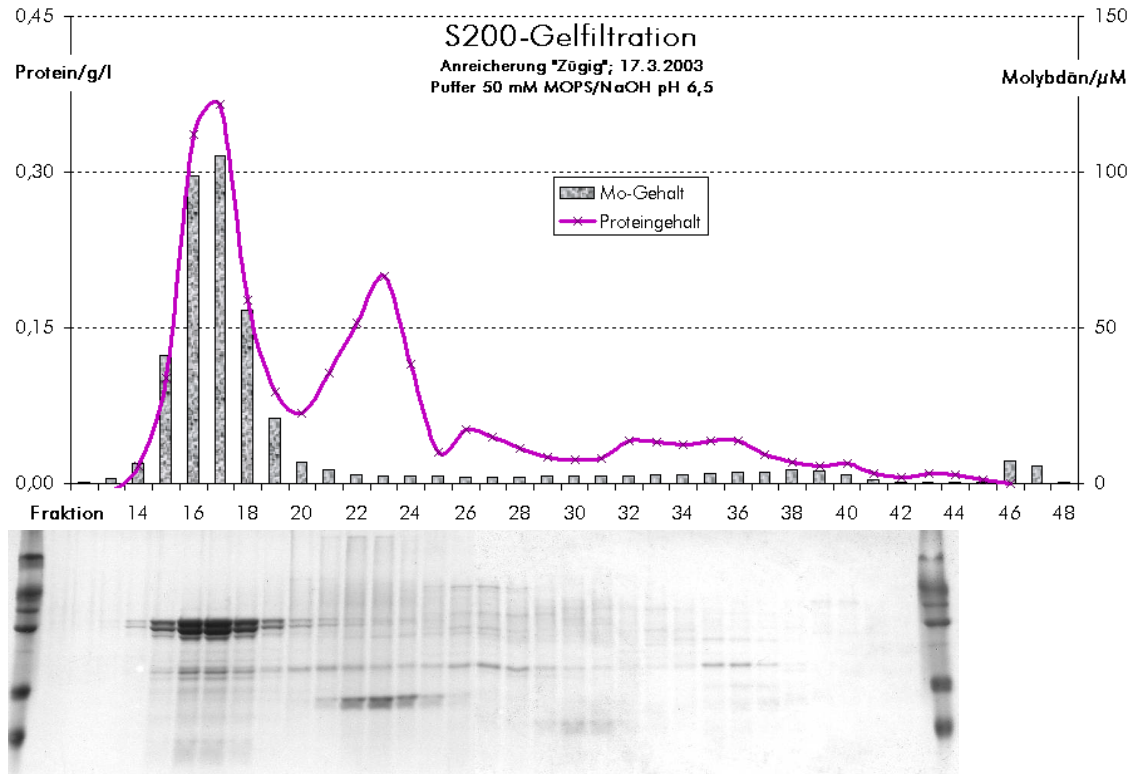


Abbildung 7.1: Protein- und Molybdänelution in der Gelfiltration über Superdex 200 (S200).



7.2 Strukturdaten von MoSto

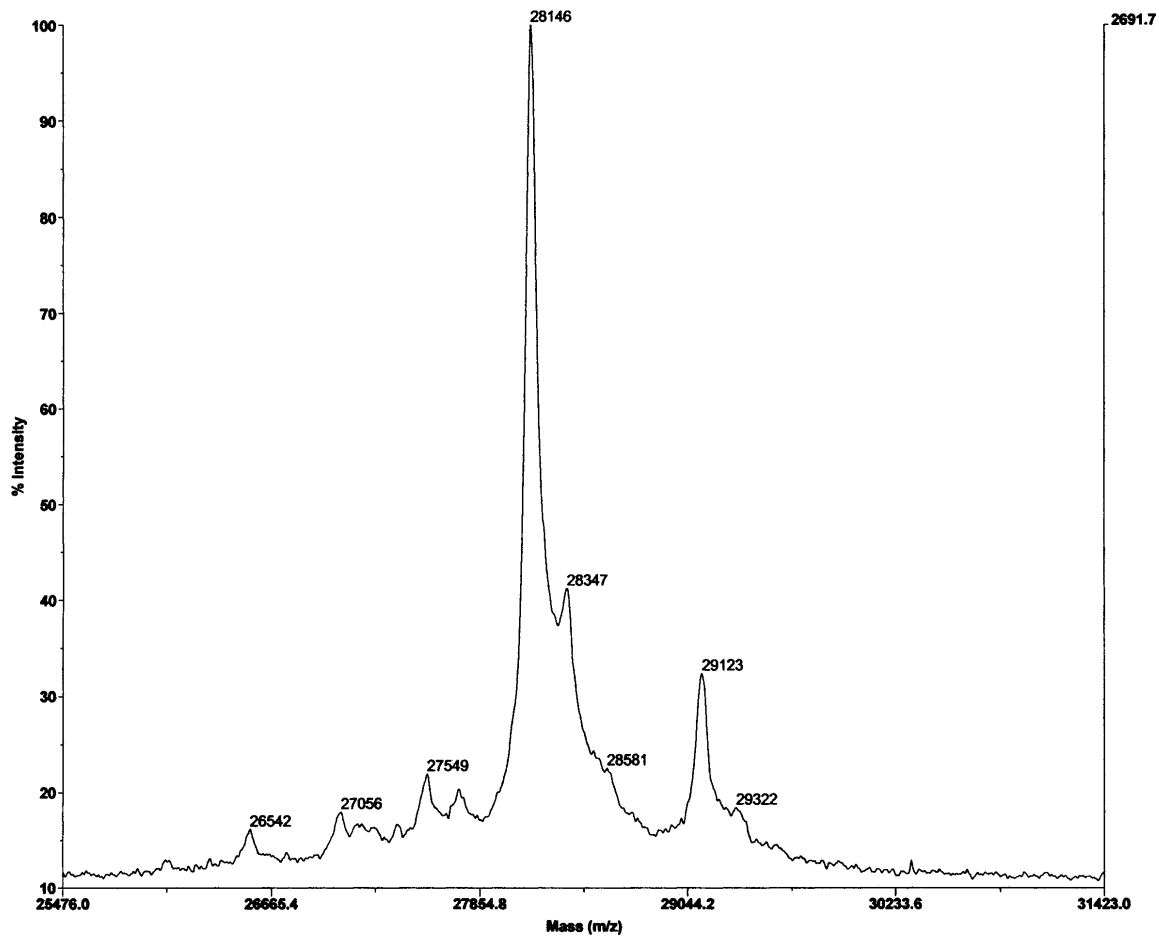


Abbildung 7.2: Ausschnitt aus dem MALDI-TOF-Massenspektrum einer MoSto-Probe, der die Molekül-Ionen-Peaks der beiden Untereinheiten enthält ($m/z = 28146$ und 29123).

Tabelle 7.2: Übersicht über Aminosäurezusammensetzung und andere summarische Eigenschaften der MoSto-Primärstruktur. Die mittlere Spalte zwischen den Zahlen für die β - und die α -Untereinheit enthält die Anzahl der jeweils konservierten Aminosäuren.

	leichte (β -)Untereinheit		schwere (α -)Untereinheit	gesamtes $\alpha_4\beta_4$ -Oktamer
aus Sequenz berechnete Molekülmasse (ohne Methionin-1)	28.225		29.188	229.649
Glycin	25	15	26	
Alanin	39	14	34	
hydrophobe Reste (ohne Pro)	83	41	83	
Valin	23	12	25	
Leucin	32	20	35	
Isoleucin	15	4	13	
Phenylalanin	7	3	6	
Tyrosin	5	2	3	
Tryptophan	1	—	1	
Prolin	15	11	21	
schwefelhaltige Reste	9	—	4	ohne Met-1: 44 S-Atome (191,6 μ mol S je g Protein)
Methionin (mit Met-1)	7	—	4	
Cystein	2	—	—	
Alkohole	26	9	29	
Serin	14	5	12	
Threonin	12	4	17	
Basen	29	11	40	284 incl. N-Enden
Histidin	6	4	12	
Lysin	11	2	5	
Arginin	12	5	23	
Säuren	25	7	27	216 incl. C-Enden
Asparaginsäure	13	5	15	
Glutaminsäure	12	2	12	
Amide	19	5	12	
Asparagin	7	3	5	
Glutamin	12	2	7	
Gesamt (ohne Met-1)	269	113	275	2176 Aminos'n

Tabelle 7.3 Die MoSto-Untereinheiten im Alignment mit der AGP-Transferase aus *E. coli*, zusammen mit der vorhergesagten bzw. ermittelten Sekundärstruktur. Übereinstimmungen der MoSto-Sequenzen mit der Transferase sind durch schwarze (identische AS) bzw. graue Unterlegung (funktionell vergleichbare AS) hervorgehoben. Eingeschobene Lücken aufgrund des manuellen Alignments der beiden MoSto-Untereinheiten untereinander sind durch Punkte, aufgrund des automatischen Alignments der β -Untereinheit mit der Transferase durch Striche markiert. Ein \blacktriangle kennzeichnet Aminosäuren der Transferase, die mit dem Liganden in Kontakt sind, ein \blacksquare jene, die an der im Text (Abschnitt 3.3.3.2) beschriebenen hydrophoben Wechselwirkung von Helix und Faltblatt beteiligt sind, durch welche die beiden Phosphat-bindenden Abschnitte in der richtigen Position zueinander gehalten werden (Arg31 ist durch die beiden CH_2 -Gruppen am Anfang seiner Seitenkette beteiligt).

α	MTDTTNSIKHVISPLARQTLQDRDLTRPVAGKRPRI \blacksquare LLPWLOVVKI \blacksquare GCR·VMDRGAD \blacksquare ALLPVEET \blacksquare RKLLPE \blacksquare HR-- \blacksquare LL	75
β	MANSTAELEELLMQRS \blacksquare LTD \blacksquare FPQLQAAAAAADFRIL \blacksquare PDAT \blacksquare VIKI \blacksquare GGOSV \blacksquare DRGRA \blacksquare VYPT \blacksquare VDEI \blacksquare VAA \blacksquare RKN \blacksquare HK-- \blacksquare LL	73
1GS5	<p>HHHHHHHHHH L HH SSSSS HHHHHHHHHHH LL --SS</p> <p>MMNPLTIKLGCVLIDSEEALERTFSALVNYRES\blacksquareQORP\blacksquareV</p> <p>SSSS HHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLL SS</p> <p>$\blacktriangle$$\blacktriangle$$\blacksquare$ \blacksquare \blacksquare \blacksquare \blacksquare \blacksquare \blacksquare</p>	39
α	IITGAC---VRARH \blacksquare VSVGLDLGLPVGSLA \blacksquare PLAASEA \blacksquare CGONG---HT \blacksquare AAMLASEG \blacksquare VS \blacksquare YVEHPTVADQLA \blacksquare IHL \blacksquare SATR	145
β	IITGAC---TRARH \blacksquare YSIAAGLGLPAGVLA \blacksquare QLGSSVADQNA---AM \blacksquare GQLLAK \blacksquare HG \blacksquare IPVVGAGLS·AVPLS \blacksquare LAEVN	142
1GS5	<p>SSS ---HHHHHHHHHH LLL HHHHHHHHHHHHH---HHHHHHHH LL HH</p> <p>IIVHCGECVVDEL\blacksquareMKGL\blacksquareNLPVKKK\blacksquareNGLRV\blacksquareTPADQIDII\blacksquareTGALAGTANKT\blacksquareLAWAKK\blacksquareHO\blacksquareIAAVGLFLGD·GDSV\blacksquareKVTOLD</p> <p>SSS HHHHHHHHHHH SSSLSS HHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHH SSSS HH·HH SSSSS H</p> <p>\blacksquare $\blacktriangle$$\blacktriangle$$\blacktriangle$</p>	116
α	AVVCSA \blacksquare FP---YHHHE \blacksquare FPGSR· \blacksquare IP \blacksquare PHRA-----DTG \blacksquare FL \blacksquare ADAFCAAG \blacksquare TI \blacksquare VENV \blacksquare DCH \blacksquare YTAD \blacksquare PNGPD	204
β	AVVFSG \blacksquare MPP---YK \blacksquare WMPRAE \blacksquare CVI \blacksquare PPYRT-----DAG \blacksquare CF \blacksquare LAEQ \blacksquare FGCKOM \blacksquare IFV \blacksquare KDED \blacksquare GLYTANP· \blacksquare KT	201
1GS5	<p>--- LL HHHHHHHHH L SSSSS SS LLLL</p> <p>EELCHVGLAQP\blacksquareSPK\blacksquareINS\blacksquareLEN\blacksquareCYL\blacksquareEVVSSIGV\blacksquareTDEQLMNVNAD\blacksquareQA\blacksquareTALA\blacksquareATL\blacksquareCAD-L\blacksquareLL\blacksquareSDV\blacksquareSCH\blacksquareLDGK\blacksquare·\blacksquareQR</p> <p>HHH SSSSS HHHHHHHHH SSSS SSSLLLLSSS HHHHHHHHHHH SSSSSSLLLLLLLLLL·LL</p> <p>\blacktriangle \blacktriangle</p>	192
α	RGOAR \blacksquare FLPETS \blacksquare ATD \blacksquare ·AKSE \blacksquare GPLVDRAL \blacksquare LDV \blacksquare MATAR-HIER \blacksquare VQV \blacksquare NGLV \blacksquare PGRI \blacksquare TAAL \blacksquare RCEHV \blacksquare CT \blacksquare IL \blacksquare RTG \blacksquare VRPA*	276
β	SKDAT \blacksquare FI \blacksquare PRIS \blacksquare VDEM \blacksquare KAK \blacksquare GL \blacksquare HDS \blacksquare SILE \blacksquare FFV \blacksquare LDL \blacksquare OS \blacksquare AQ-HV \blacksquare RE \blacksquare VQV \blacksquare NGLV \blacksquare PGNI \blacksquare TRAL \blacksquare ACEHV \blacksquare CT \blacksquare IT \blacksquare AS*	270
1GS5	<p>HHHHH HHHHHH HHHHHHHHHH-LLSSSS HHHH SSS</p> <p>IAE---MTAAK\blacksquareTEO\blacksquareIEQ\blacksquareCI\blacksquareITDGM\blacksquareIVK\blacksquareVNAAD\blacksquareDA\blacksquareRTLGR\blacksquarePVD\blacksquareIAS\blacksquareWRHAE\blacksquareQ\blacksquarePAL\blacksquareFN\blacksquareCMP\blacksquareMCT\blacksquareRI\blacksquareLA*</p> <p>LLS---S HHHHHHHHHLLLLLHHHHHHHHHHHHHH SSSSS HHHHHHHHHLLLLLSSS</p> <p>$\blacktriangle$$\blacktriangle$ \blacktriangle \blacktriangle</p>	258

Tabelle 7.4: Aufstellung der in den Sequenz-Alignments als funktionell vergleichbar angesehenen Aminosäuren.

Säuren	Asp—Glu	D—E
Amide	Asn—Gln	N—Q
offenkettige Basen	Lys—Arg	K—R
hydrophobe Aliphaten	Val—Leu—Ile—Met	V—L—I—M
hydrophobe Aromaten	Phe—Tyr	F—Y
Alkohole	Ser—Thr	S—T

Tabelle 7.5: Similarity Scores der Sequenzvergleiche der MoSto-Untereinheiten untereinander und mit anderen Proteinen, jeweils für die Austauschmatrizes BLOSUM62 und BLOSUM30. Scores < 50 bedeuten i.d.R., dass nur kurze Abschnitte bis maximal 20 Aminosäuren zur Deckung gebracht werden konnten. Zu jedem Vergleich ist die Wahrscheinlichkeit eines Treffers mit gleichem oder höheren Score beim Vergleich mit 200 Zufallssequenzen gleicher quantitativer Zusammensetzung angegeben (PRSS probability).

beim Vergleich mit:	SIM score		PRSS probability /200 Versuche	
	α -MoSto	β -MoSto	α -MoSto	β -MoSto
β-MoSto				
BLOSUM62	448		$2,10 \cdot 10^{-18}$	
BLOSUM30	661		$2,32 \cdot 10^{-7}$	
Molbindine				
A.v. ModG				
BLOSUM62	28	26	134	182,3
BLOSUM30	59	68	135,8	106
A.v. ModC				
BLOSUM62	27	40	199,4	10,07
BLOSUM30	96	93	129,5	66,16
A.v. ModE				
BLOSUM62	29	33	137,8	64,77
BLOSUM30	80	104	48,33	9,832
Mehrheitssequenz der Mop-Domäne				
BLOSUM62	27	26	85,5	119,3
BLOSUM30	48	48	70,58	112,5
A.v. ModA				
BLOSUM62	33	40	60,21	11,83
BLOSUM30	84	82	71,85	104,3
Phosphotransferasen				
<i>Th. tengcongensis</i> Uridylatkinase (Swiss-Prot: Q8RA23)				
BLOSUM62	59	72	0,004762	0,0002489
BLOSUM30	142	191	0,4623	0,0005992
<i>E. coli</i> AGP-Transferase (PDB: 1GS5)				
BLOSUM62	36	40	29,56	20,87
BLOSUM30	111	104	22,44	9,809
<i>E. coli</i> AGP-Transferase (nur Phosphat bindender Abschnitt 1-57)				
BLOSUM62	31	26	19,26	90,66
BLOSUM30	64	54	5,188	25,1
Diverse				
A.v. NifQ				
BLOSUM62	33	40	60,21	11,83
BLOSUM30	84	82	71,85	104,3

Tabelle 7.6: Sequenz-Alignment von MoSto mit seinen mutmaßlichen Homologen. In allen Sequenzen übereinstimmende Aminosäuren sind schwarz, Übereinstimmungen in vier der fünf Sequenzen sowie Übereinstimmungen nur einer MoSto-Untereinheit mit ihrem bzw. ihren beiden jeweiligen Homologen grau unterlegt. Funktionelle Übereinstimmungen von Aminosäuren bleiben unberücksichtigt. Man beachte, dass die hier verwendete Alignment-Software²⁵⁹ ein etwas anderes Alignment der beiden MoSto-Untereinheiten untereinander erzeugt, als es in den anderen Sequenz-Tabellen in dieser Arbeit angegeben ist. Auf nachträgliche Korrekturen von Hand wurde der Reproduzierbarkeit halber verzichtet.

3	MTWKREGI	
	TVPSTLNTKVRLLPYAVPRDPRSGIAPACRRFRMP IFLDRKDTAPYTRLRTEREQPL	65
1a	MTDITNSIKHVISPLARQTLQDRDILTRPVAGKRP IRLLEPWLQVVKIGGR-VMDRGAD	56
2a	MADTN-HIKHVASPIARQTLTDSNITRPVAGKKP IRILEPWLQVVKIGGRSMDRGAE	56
1b	MANST---AELEELLMQRSLTDPQLQAAAAAADFRILPDATVIKIGGQSVDRGRA	54
2b	MAHTP---AELEALLMQRSMSPPELLAATEAATDYRILPDATVIKIGGQSMIDRGRA	54
3	MTSTT---AELEALLMQRSLTDVQLLAADAADFRILPNATVILKIGGQSVDRGRA	119
1a	AIIPLVVEELRKLLEPEHRLILITGAGVRRARHVFSVGLDILGELVGSIAPIAAASEACQNG	113
2a	AIIPIVDEL RALLPEHRLILITGAGVRRARHLYSVALDILGELVGSIAPIAAASEACQNG	113
1b	AVYPLVDEIIVAARKNHKLLIGTGAGTRARHLYSIAAGLGLPAGVLAQLGSSVADQNA	111
2b	AVYPLVEEIVSARKDHKLLIGTGAGTRARHLYSIAAGLNL PAVLSQLGASVASQNA	111
3	AVYPLVDEIIVAARKEHKLLIGTGAGTRARHIYSIAAGLNL PAVLSQLGASVASQNA	176
1a	HILAAMLAASEGVSIVVEHPTVADQLAIHLSATR AVVGSFAFPPYH--HHEFPGRIPPH	168
2a	HILATMLAPEGVSIVVEKPTVANQLAIHLSAARAVVASAFPPYH--NHEFPGARLPPH	168
1b	AMLGQLLAKHGIPVVGAGLS-AVPLSLAEVNAVVFSGMPPYKLWMPAAEGVIPPY	167
2b	EMLGQLLAKHGISSVDGAGLS-AVPLYLKEVNAVVFSGMPPYGLWMPSPDGVIPPY	167
3	AMLGQLLAKHGISAVDGAGLS-SVPLFLAEVNAVVFSGMPPYKLWMPAAEGVIPPY	232
1a	RADTGAFLLADAFGAAGLTI VENV DGIYTADENGPDRGQARELPETSATDLAKSEG-	224
2a	RCDVGAFLLDALGAAGLTI VEDVDGVYSADENGPGGDKAKLIAETSYADLAKHNG-	224
1b	RTDAGCFLLAEQFGCKQMI FVKDEDGLYTANP--KTSKDATFI PRISV-DEMKAKGL	221
2b	RTDAGCYLMAEQFGCKAMIYVKDENGLYTENP--KTSKNATFI PKISV-DEMKAKGL	221
3	RTDAGCFLVAEQFGCRAMIYVKDENGLYTENP--KTSKNATFI PRISV-DEMKAKGL	286
1a	-----PLPVD RALLDVMATARHI ERVQVVNGLVPGRLTAALRGEHVGT LIRTGVRPA	276
2a	-----TLPLDRALFDV MANARHI ERVQVVNGLKSGKLTAAALRGQHVGT LIKTGA	273
1b	HDSILEFPV-----LDLLQSAQH VREVQVVNGLVPGNLTRALAGEHVGT IITAS	270
2b	HDSILEFPV-----LDLLK SARHVREVQVVNGLVPGNLTRALAGEHVGT IITAN	270
3	QDSILEFPV-----LDLLK NARHVREVQVV TASSPAT	318

Nr.	Protein	Uniprot-Identifizier
1a	α -MoSto (<i>Azotobacter vinelandii</i>)	
2a	rpa1441-Genprodukt (<i>Rhodopseudomonas palustris</i>)	CAE26884
1b	β -MoSto	
2b	rpa1442-Genprodukt	CAE26885
3	pRhico094-Genprodukt (<i>Azospirillum brasilense</i> pRhico-Plasmid)	AAS83034

²⁵⁹ "Divide and Conquer", siehe "Materialien und Methoden", Abschnitt 5.4.1.

7.3 EXAFS-Parameter für MoSto und die Modellverbindungen

Tabelle 7.7: EXAFS-Parameter für MoSto und $[\text{MoO}_4]^{2-}$. Die zugehörigen Spektren sind in Abbildung 3.12 dargestellt.²⁶⁰

Probe	Atomtyp	N	$r / \text{Å}$	$2\sigma^2 / \text{Å}^2$	E_0 / eV	$R / \%$
MoSto	O	2	1,72	0,003(1)	-9,7(12)	27,4
	O	2	1,91	0,021(4)		
	O	2	2,28	0,030(8)		
	Mo	1,7	3,27	0,009(1)		
	Mo	1,7	3,42	0,007(1)		
$[\text{MoO}_4]^{2-}$	O	4	1,77	0,004(1)	-10,8(10)	27,9

N , Zahl der Rückstreuer; r , Abstand vom Zentralatom; $2\sigma^2$, Debye-Waller-Parameter; E_0 , Energiekorrektur; R , R -Faktor (ein Maß für die Güte der Anpassung). Werte in Klammern geben die numerischen Unsicherheiten (zweifache Standardabweichungen) in der letzten Dezimalstelle an. Für Abstandsbestimmungen wird gemeinhin eine experimentell bedingte Ungenauigkeit von 0,01 - 0,02 Å angenommen, die größer ist als die Standardabweichung. Bei r sind daher nur zwei Nachkommastellen und keine numerische Ungenauigkeit angegeben.

²⁶⁰ Gnida 2002, 48.

Tabelle 7.8: EXAFS-Parameter^a für die Modellverbindungen.²⁶¹

Probe	Atom	<i>N</i>	<i>r</i> / Å	$2\sigma^2$ / Å ²	<i>E</i> ₀ / eV	<i>R</i> / %
<i>[Mo₇O₂₄]⁶⁻ Heptamolybdat</i>	O	2	1,72	0,003(1)	-11,3(6)	12,9
	O	2	1,93	0,006(1)		
	O	2	2,20	0,019(2)		
	Mo	1,7	3,23	0,005(1)		
	Mo	1,7	3,40	0,003(1)		
	Mo	0,6	4,30	0,010(2)		
	Mo	0,6	5,41	0,006(3)		
	Mo	0,6	5,68	0,009(3)		
<i>β-[Mo₈O₂₆]⁴⁻ Oktamolybdat</i>	O	2	1,71	0,005(1)	-8,7(7)	15,9
	O	2	1,95	0,007(1)		
	O	2	2,33	0,017(2)		
	Mo	2	3,23	0,007(1)		
	Mo	2,25	3,48	0,010(1)		
	Mo	1	4,52 ^b	0,002(1)		
	Mo	1,5	5,67 ^c	0,010(2)		
<i>[Mo₃₆O₁₁₂(H₂O)₁₆]⁸⁻</i>	O	2	1,70	0,006(1)	-7,7(7)	14,4
	O	2	1,97	0,015(1)		
	O	2	2,34	0,038(6)		
	Mo	1,8	3,31	0,009(1)		
	Mo	0,6	3,44	0,008(3)		
	Mo	0,9	3,80	0,007(2)		
	Mo	1,2	3,96	0,023(6)		
	Mo	0,5	4,59	0,017(5)		
	Mo	0,7	5,10 ^c	0,009(2)		
	Mo	0,7	5,71 ^c	0,008(2)		
	Mo	2,1	6,31 ^c	0,017(3)		
	Molybdat-Lösung bei pH 1	O	2	1,71		
O		2	1,94	0,025(8)		
O		2	2,22	0,013(4)		
Mo		1,8	3,34	0,017(4)		
Mo		0,6	3,53	0,016(15)		
Mo		0,9	3,87	0,014(10)		
Mo		1,2	4,07	0,013(7)		

a) Erläuterung der Symbole siehe Tabelle 7.7. **b)** Die Oktamolybdatstruktur ist in drei Cluster unterschiedlicher Molybdänumgebungen zerlegt worden. Für jeden der Cluster wurden die Mo–O–Mo'–Vielfachstrepfade berücksichtigt. Hierbei ist nicht der Mo–Mo'-Abstand direkt bestimmt worden, sondern es wurden die Rückstreuatome zu einer rigiden Vielfachstreueinheit (O–Mo') zusammengefasst und der Abstand dieser Einheit vom Absorberatom (Mo–O) sowie der Winkel $\angle(\text{Mo–O–Mo}')$ ermittelt („constrained refinement“²⁶²). Der ermittelte Winkel $\angle(\text{Mo–O–Mo}')$ beträgt $155(\pm 1)^\circ$, ist also kleiner als der in der Literatur²⁶³ zu findende Wert. Mit diesem Winkel errechnet sich der in der Tabelle aufgeführte mittlere Mo–Mo'-Abstand (gemittelt über die drei Cluster). **c)** Abstände über 5 Å sind in den FT-Spektren nicht dargestellt, aber bei den Berechnungen berücksichtigt.

²⁶¹ Gnida 2002.²⁶² Binsted/Strange/Hasnain 1992.²⁶³ Fuchs/Knöpnadel 1982.

7.4 Abkürzungs- und Trivialnamenverzeichnis

ABC	ATP-binding cassette (Familie von Enzymsystemen für den aktiven Transport von Stoffen in eine Zelle)
AS	Aminosäure
a.u.	arbitrary units
BCA	Bicinchoninsäure (4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin) bzw. Bicinchoninsäure-Assay
EXAFS	extending X-ray absorption fine structure
FT	Fourier-transformiertes (... EXAFS-Spektrum)
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
Molbindin	Molybdat bindendes bakterielles Protein
Mop	einfachstes Molbindin
MOPS	N-Morpholino-propan-3-sulfonsäure
MoSto	Molybdän-Speicherprotein aus <i>A. vinelandii</i>
OAc	(in Molekül-Formeln) Acetat
OD	Optische Dichte (synonym mit: Lichtabsorption)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PVDF	Polyvinyliden-difluorid
PDB	Brookhaven protein structure data bank
RT	Raumtemperatur
SAXS	small angle X-ray scattering (Röntgen-Kleinwinkelstreuung)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethyl-ethylendiamin
Teta	Triethylamin bzw. -ammonium
Tricin	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UE	Untereinheit
WSto	Wolfram enthaltendes Analog von MoSto
XANES	X-ray absorption near-edge spectroscopy
XAS	X-ray absorption spectroscopy

7.5 Lebenslauf

Dirk Wilhelm Fenske; geboren am 27. 5. 1966 in Bochum

Eltern: Ilse Fenske geb. Berges aus Wilbringhausen/Westfalen, Hausfrau
Gerhard Fenske aus Altendorf/Posen, Fabrikarbeiter

1972-1976:	Katholische Grundschule, Drolshagen
1976-1983:	Städtisches Wüllenweber-Gymnasium, Bergneustadt
1983-1986:	Evangelisches Bodelschwingh-Gymnasium, Windeck-Herchen
1. 7. 1986 bis 10. 5. 1987	Wehrdienst
30. 3. 1987	Anerkennung als Kriegsdienstverweigerer
11. 5. 1987 bis 29. 2. 1988	Zivildienst in der Altenpflege
WS 1988/89 — SS 1999	Diplomstudium Chemie, Universität Dortmund
Juli 1997	mündliches Diplom-Hauptexamen
1. 2. bis 2. 8. 1999	Diplomarbeit "Herstellung elektrochemisch aktiver Cerdioxid-Dünnschichten mittels Sol-Gel-Verfahren"
SS 1991 — WS 1999/2000	Magisterstudium Geschichte, Ruhr-Universität Bochum (nicht abgeschlossen)
14. 2. 2000 — 31. 8. 2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Bielefeld