

**Charakterisierung der molekularen Determinanten zur
hochaffinen Bindung der kompatiblen Soluten Glycin Betain,
Prolin Betain, Ectoin und Hydroxyectoin durch
Substratbindeproteine von bakteriellen ABC-Transportern**

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Linda Sohn-Bösser
aus Marburg

Marburg/Lahn, 2006

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von April 2001 bis November 2005 im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am:

Erstgutachter:	Prof. Dr. Erhard Bremer
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2006

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation wurden folgende Publikationen erstellt und Manuskripte vorbereitet:

Schiefner A., Breed J., Bösser L., Kneip S., Gade J., Holtmann G., Diederichs K., Welte W., Bremer E. (2004). Cation- π interactions as determinants for binding of the compatible solutes glycine betaine and proline betaine by the periplasmic ligand-binding protein ProX from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **279**: 5588-96

Jebbar M., Sohn-Bösser L., Bremer E., Bernard T., Blanco C. (2005). Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an Ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J Bacteriol*, **187**: 1293-304

Horn C., Jennewein S., Sohn-Bösser L., Bremer E., Schmitt L. (2006b). The osmotically regulated ABC-transporter OpuA for the compatible solutes glycine betaine and proline betaine from *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. Im Druck.

Horn C., Sohn-Bösser L., Breed J., Welte W., Schmitt L., Bremer E. (2006a). Molecular determinants for substrate specificity of the ligand-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis* for the compatible solutes glycine betaine and proline betaine. *J Mol Biotechnol*. Im Druck.

Hanekop N., Höing M., Sohn-Bösser L., Jebbar M., Schmitt L., Bremer E. Recognition of the compatible solutes ectoine and hydroxyectoine by the ligand-binding protein EhuB from *Sinorhizobium meliloti*. Manuskript in Vorbereitung.

Sohn-Bösser L., Holtmann G., Schiefner A., Schmitt L., Bremer E. Thermoprotection of the hyperthermophilic Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* by the compatible solutes glycine betaine and proline betaine. Manuskript in Vorbereitung

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
1. Tabellenverzeichnis.....	VI
2. Abbildungsverzeichnis.....	VII
3. Abkürzungen.....	IX
I. ZUSAMMENFASSUNG.....	S. 1
II. EINLEITUNG.....	S. 2
1. Anpassung von Mikroorganismen an variierende Umweltbedingungen.....	S. 2
1.1 Auswirkungen von hyperosmolaren Wachstumsbedingungen auf Mikroorganismen.....	S. 3
1.1.1 „Salt-in cytoplasm“ Strategie.....	S. 3
1.1.2 Adaptation durch kompatible Solute.....	S. 4
2. Kompatible Solute.....	S. 5
2.1 Glycin Betain.....	S. 7
2.2 Ectoin und Hydroxyectoin.....	S. 8
3. Akkumulation von kompatiblen Soluten unter hyperosmotischen Stressbedingungen.....	S. 9
3.1 Endogene Synthese von kompatiblen Soluten.....	S. 9
3.2 Aktiver Transport von kompatiblen Soluten unter hyperosmotischen Stressbedingungen.....	S. 10
3.3 Bakterielle Transporter für kompatible Solute ohne Substratbindeproteine.....	S. 12
3.3.1 MF- und SSS-Transporter für kompatible Solute.....	S. 12
3.3.2 BCCT-Transporter.....	S. 13
3.4 Bindeprotein-abhängige Transporter für kompatible Solute.....	S. 13
3.4.1 TRAP-Transporter.....	S. 13
3.4.2 ABC-Transporter.....	S. 14
3.4.2.1 Struktureller Aufbau von ABC-Transportern.....	S. 15
3.4.2.2 Mechanismus der Substrattranslokation durch ABC-Transporter.....	S. 19
4. Der osmotisch regulierte ABC-Transporter ProU aus <i>E. coli</i>.....	S. 22
4.1 Die Kristallstruktur des ProX Proteins aus <i>E. coli</i>	S. 23
5. Der ABC-Transporter ProU des hyperthermophilen Archaeons <i>A. fulgidus</i>.....	S. 24
5.1 Die Kristallstruktur des ProX Proteins aus <i>A. fulgidus</i>	S. 25
6. Der osmotisch regulierte ABC-Transporter OpuA aus <i>B. subtilis</i>.....	S. 27
7. Kation-π-Interaktionen.....	S. 28
8. Zielsetzung der Arbeit.....	S. 31
III. MATERIAL UND METHODEN.....	S. 32
1. Chemikalien und Reagenzien.....	S. 32

1.1	Verwendete kompatible Solute.....	S. 32
1.2	Radiochemikalien.....	S. 32
2.	Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide	S. 32
3.	Kulturmedien, Zusätze und Wachstumsbedingungen.....	S. 36
3.1	Medien.....	S. 36
3.1.1	Vollmedien.....	S. 36
3.1.2	Minimalmedien.....	S. 36
3.2	Kompatible Solute und Antibiotika.....	S. 37
3.3	Sterilisation.....	S. 37
3.4	Wachstum.....	S. 37
3.4.1	Wachstumsbedingungen für <i>E. coli</i> und <i>S. meliloti</i>	S. 37
3.4.2	Bestimmung der Zelldichte.....	S. 38
4.	Molekularbiologische und genetische Methoden.....	S. 38
4.1	Präparation von DNA.....	S. 38
4.1.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	S. 38
4.1.2	Präparation von chromosomaler DNA.....	S. 38
4.1.3	Bestimmung von DNA-Konzentration.....	S. 38
4.2	Klonierungstechniken.....	S. 39
4.2.1	Restriktion von DNA.....	S. 39
4.2.2	Agarosegelelektrophorese.....	S. 39
4.2.3	Isolieren von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	S. 39
4.2.4	Ligationen.....	S. 39
4.2.5	Transformation von <i>E.coli</i> mittels Elektroporation.....	S. 39
4.3	Polymerasekettenreaktion und Bestimmung der Nukleotidsequenz.....	S. 40
4.3.1	Polymerasekettenreaktion.....	S. 40
4.3.2	Ortsgerichtete Mutagenese.....	S. 40
4.3.2.1	Ortsgerichtete Mutagenese mittels PCR-Technik.....	S. 40
4.3.2.2	Hitzeimpuls-Transformation der mutagenisierten Plasmide.....	S. 40
4.3.3	DNA-Sequenzierung.....	S. 40
4.3.4	Computergestützte Sequenzanalysen.....	S. 40
4.4	Konstruktion von Plasmiden.....	S. 40
5.	Biochemische Methoden.....	S. 41
5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	S. 41
5.2	Bestimmung des Proteingehaltes.....	S. 42
5.3	Überexpression und Reinigung von ProX Wildtyp Protein und der mutierten ProX Proteine aus <i>E. coli</i>	S. 42
5.3.1	Homologe Überexpression von <i>E. coli</i> ProX Wildtyp und mutierten <i>E. coli</i> ProX Proteinen.....	S. 42
5.3.2	Periplasmatischer Aufschluss und Reinigung von <i>E. coli</i> ProX.....	S. 43
5.3.3	Bestimmung der Affinitätskonstante (K_D) mit radioaktiv markiertem Glycin Betain.....	S. 43
5.3.4	Kompetitionstest des <i>E. coli</i> ProX Wildtyp Proteins mit Homobetain.....	S. 45
5.4	Überexpression und Reinigung von EhuB aus <i>S. meliloti</i>	S. 45
5.4.1	Heterologe Überexpression von EhuB.....	S. 45
5.4.2	Metabolisches Labeling von EhuB mit Selenomethionin.....	S. 45
5.4.3	Periplasmatischer Aufschluss und Reinigung von EhuB.....	S. 45
5.4.4	Herstellung eines Antiserums gegen das heterolog exprimierte EhuB.....	S. 46
5.4.5	Bestimmung der Affinitätskonstante (K_D) von EhuB mit radioaktiv markiertem Ectoin mittels Diffusionsbindetest.....	S. 46
5.5	Herstellung von Rohextrakten aus <i>S. meliloti</i>	S. 47
5.6	Immudotektion von Proteinen (Western blot Analyse).....	S. 47

5.6.1 Transfer von Proteinen auf Membranen.....	S. 47
5.6.2 Detektion von EhuB mit einem spezifischen Antiserum.....	S. 48
5.7 Überexpression und Reinigung von ProX aus <i>A. fulgidus</i>	S. 48
5.7.1 Heterologe Überexpression von ProX <i>A. fulgidus</i>	S. 48
5.7.2 Periplasmatischer Aufschluss und Reinigung von ProX <i>A. fulgidus</i>	S. 48
5.7.3 Bestimmung der Affinitätskonstante des <i>A. fulgidus</i> Wildtyp ProX Proteins und der mutierten ProX Proteine mittels Fluoreszenzspektroskopie.....	S. 49
6. Computergestützte Proteinsequenz-Analyse	S. 50
IV. ERGEBNISSE.....	S. 51
1. Das Substratbindeprotein ProX des Glycin Betain und Prolin Betain importierenden ABC-Transporters ProU aus <i>Escherichia coli</i>.....	S. 51
1.2 Überexpression und Reinigung des ProX Wildtyp Proteins und der mutierten ProX Proteine.....	S. 53
1.3 Bestimmung der Bindekonstante (K_D) für das ProX Protein und seinen mutagenisierten Derivaten durch den Ammoniumsulfat-Präzipitationstest mit ^{14}C -markiertem Glycin Betain.....	S. 54
1.4 Konkurrenz von Homobetain und Glycin Betain um die Substratbindung durch das <i>E. coli</i> ProX Protein.....	S. 59
1.5 Aminosäuresequenz-Analysen von <i>E. coli</i> ProX in Proteindatenbanken.....	S. 60
1.5.1 Analyse zur Verbreitung <i>E. coli</i> ProX-ähnlicher Proteine und die Konservierung der Bindemotive des <i>E. coli</i> ProX Proteins.....	S. 60
1.5.2 Die Struktur der putativen Glycin Betain Transporter.....	S. 63
1.5.3 Phylogenetische Analyse der zu <i>E. coli</i> ProX Sequenz homologen putativen Substratbindeproteine.....	S. 64
2. Das Substratbindeprotein ProX des Transporters ProU aus dem hyperthermophilen Archaeon <i>Archaeoglobus fulgidus</i>.....	S. 66
2.1 Ortsgerichtete Mutagenese der Aminosäuren des aktiven Zentrums von ProX aus <i>A. fulgidus</i>	S. 66
2.2 Heterologe Überexpression und Reinigung des <i>A. fulgidus</i> ProX Wildtyp Proteins und seinen mutierten Derivaten.....	S. 68
2.3 Bestimmung der Affinitätskonstanten von Wildtyp- und mutierten <i>A. fulgidus</i> ProX Proteinen für Glycin Betain und Prolin Betain mittels Fluoreszenzspektroskopie.....	S. 69
2.4 Temperaturabhängigkeit der Bindung von ^{14}C -markiertem Glycin Betain durch das <i>A. fulgidus</i> Wildtyp ProX Protein.....	S. 73
2.4.1 Einfluss der Temperatur auf die Bindekonstante K_D	S. 74
2.5 Vergleichende Aminosäuresequenz-Analyse des ProX Proteins aus <i>A. fulgidus</i> mit Proteinen aus Proteindatenbanken.....	S. 76
3. Datenbankanalyse zur Verbreitung des hochaffinen Glycin Betain Substratbindeproteins OpuAC aus <i>Bacillus subtilis</i>	S. 80
4. Biochemische und physiologische Charakterisierung des Bindeprotein- abhängigen ABC-Transporters Ehu aus <i>Sinorhizobium meliloti</i>.....	S. 86
4.1 Analyse und Charakterisierung des Transporters Ehu aus <i>Sinorhizobium meliloti</i>	S. 86
4.1.1 Analyse der Strukturgene <i>ehuABCD</i> und deren Proteine.....	S. 86

4.1.2 Heterologe Überexpression und Reinigung von EhuB aus <i>S. meliloti</i>	S. 89
4.1.3 Bestimmung der Affinitätskonstante K_D von EhuB für Ectoin.....	S. 91
4.1.4 Substratspezifität von EhuB.....	S. 92
4.2 Kristallisation von EhuB.....	S. 92
4.3 Datenbankanalysen mit der Aminosäuresequenz des EhuB Proteins.....	S. 95
4.3.1 Mikroorganismen mit ehuABCD- und eutABCDE-ähnlichen Gen- Clustern (Gruppe I).....	S. 97
4.3.2 Mikroorganismen mit Strukturgenen für einen EhuABCD-ähnlichen Transporter (Gruppe II).....	S. 99
4.3.3 Mikroorganismen mit EutABCDE-ähnlichen Proteinen (Gruppe III).....	S. 100
4.3.4 Mikroorganismen, die EhuB-ähnliche Proteine besitzen (Gruppe IV).....	S. 101
4.3.5 Phylogenetischer Vergleich.....	S. 104
4.4 Physiologische Charakterisierung des ABC-Transporters Ehu von <i>S. meliloti</i>	S. 107
4.4.1 Wachstum des <i>S. meliloti</i> Wildtyps und der Mutanten.....	S. 107
4.4.2 Induktion der EhuB Expression durch Ectoin und Hydroxyectoin.....	S. 109
4.4.2.1 Nachweis der Ectoin und Hydroxyectoin-induzierten EhuB Synthese in <i>S. meliloti</i>	S. 109
4.4.2.2 Zeitlicher Verlauf der Induktion der EhuB-Synthese durch Ectoin Hydroxyectoin und	S. 110
4.4.2.3 Induktion der Synthese von EhuB in <i>S. meliloti</i> Wildtyp und Mutanten.....	S. 111
4.4.3 Einfluss des ABC-Transporters Ehu auf das Wachstum von <i>S.</i> <i>meliloti</i> unter osmotischen Stressbedingungen.....	S. 112
4.4.4 Einfluss von hyperosmotischem Stress auf die Synthese des Ehu- Transporters in <i>S. meliloti</i>	S. 113
V. DISKUSSION.....	S. 115
1. Kation-pi-Interaktionen sind eine Hauptdeterminante in der hochaffinen Bindung von Glycin Betain und Prolin Betain durch die Substratbinde- proteine ProX aus <i>E. coli</i> und ProX aus <i>A. fulgidus</i>	S. 117
1.1 Die Tryptophan-Box des periplasmatischen Substratbindeproteins ProX aus <i>E. coli</i>	S. 117
1.2 Der hitzeinduzierte ProU Transporter des hyperthermophilen Archaeons <i>A. fulgidus</i> transportiert die kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain mit hoher Affinität.....	S. 120
1.2.1 Die Kation-pi-Interaktionen durch den Tyrosin-Gürtel und die Stabilisierung der Carboxylgruppe durch Salzbrücken und Wasserstoffbrücken sind wichtig für die Bindung von Glycin Betain und Prolin Betain mit einer nanomolaren Affinitätskonstante.....	S. 121
1.2.2 Vergleich der Resultate der Mutagenesestudie des <i>A. fulgidus</i> ProX Proteins mit strukturellen Daten aus der Ligand-freien und Ligand-gebundenen Kristallstruktur.....	S. 123
1.2.3 Abhängigkeit der Substratbindung von der Temperatur.....	S. 127
1.3 Kation-pi-Interaktionen sind weit verbreitet in der Bindung von Substraten mit quartären Aminen.....	S. 129

2. Die hochaffine Bindung des quartären Amins von Glycin Betain durch Kation-pi-Interaktionen ist vermutlich weit verbreitet in den Prokaryoten.....	S. 132
2.1 Die Verbreitung von <i>EcProX</i> -ähnlichen Proteinen mit einer putativen „Trp-box“ beschränkt sich hauptsächlich auf den Stamm der Proteobakterien.....	S. 133
2.2 Verbreitung von <i>AfProX</i> -ähnlichen Proteinen und Konservierung des „Tyr-Gürtels“.....	S. 135
2.3 Datenbankanalysen mit der <i>BsOpuAC</i> Aminosäuresequenz zeigen eine weite Verbreitung von <i>OpuAC</i> -ähnlichen Proteinen in Prokaryoten und einen Domänentausch des <i>BsOpuAC</i> Proteins.....	S. 136
3. Das Substratbindeprotein EhuB des ABC-Transporters Ehu aus <i>S. meliloti</i>.....	S. 139
3.1 EhuB ist ein hochaffines Substratbindeprotein für Ectoin und bindet auch Hydroxyectoin.....	S. 139
3.2 Die Kristallstruktur des EhuB Proteins aus <i>S. meliloti</i>	S. 140
4. Gemeinsamkeiten in der hochaffinen Bindung der zwitterionischen kompatiblen Solute Glycin Betain, Prolin Betain, Ectoin und Hydroxyectoin durch ihre Substratbindeproteine.....	S. 142
5. Physiologische Charakterisierung des Ehu-Transporters aus <i>S. meliloti</i>.....	S. 143
5.1 <i>S. meliloti</i> Mutanten mit polaren Mutationen in <i>ehuA</i> und <i>eutA</i> zeigen einen Wachstumsdefekt mit Ectoin oder Hydroxyectoin als C-Quelle.....	S. 144
5.2 Die Synthese von EhuB ist nicht osmoreguliert.....	S. 144
5.3 Datenbankanalysen zur Verbreitung und Konservierung der Ehu- und Eut-Proteine.....	S. 145
VI. LITERATUR.....	S. 147
VII. ANHANG.....	S. 168

Tabellenverzeichnis:

Material und Methoden:

Tab. 1: <i>Escherichia coli</i> – Stämme.....	S. 32
Tab. 2: <i>Sinorhizobium meliloti</i> Stämme.....	S. 33
Tab. 3: Plasmide.....	S. 33
Tab. 4: Oligonukleotide.....	S. 34
Tab. 5: MSY- und Minimalmedium für <i>S. meliloti</i>	S. 36
Tab. 6: Kompatible Solute und Antibiotika.....	S. 37
Tab. 7: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.....	S. 42

Ergebnisse:

Tab. 8: Mutagenesestudie der Tryptophan-Box des ProX Proteins aus <i>E. coli</i>	S. 58
Tab. 9: Mikroorganismen mit <i>EcProX</i> -ähnlichen Proteinen.....	S. 60
Tab. 10: Affinitätskonstanten für Wildtyp und mutierte ProX Proteine für ihre Substrate Glycin Betain und Prolin Betain.....	S. 72
Tab. 11: Affinitätskonstanten des <i>AfProX</i> Wildtyp Proteins für seine Substrate bei 25°C, 50°C und 80°C.....	S. 76
Tab. 12: Aminosäuresequenz-Vergleich der <i>AfProX</i> ähnlichen Proteine.....	S. 77
Tab. 13: Alignment der <i>OpuAC</i> -ähnlichen Proteine der Gruppe 1.....	S. 82
Tab. 14: Alignment einer Auswahl von <i>OpuAC</i> -ähnlichen Proteine der Gruppe 2 („domain swap“).	S. 83
Tab. 15: Konservierung der Aminosäuresequenz der EutABCDE Proteine.....	S. 99
Tab. 16: Aminosäuresequenz-Vergleich der Ehu-ähnlichen Transporterbestandteile.....	S. 100
Tab. 17: Sequenzvergleich der EutABCDE-ähnlichen Proteine zu EutABCDE aus <i>S. meliloti</i>	S. 101
Tab. 18: Aminosäuresequenz-Analyse von EhuB.....	S. 102

Diskussion:

Tab. 19: Vergleich der Bindeaffinität der mutierten ProX Proteine mit den van der Waals Kontakten des jeweiligen Substrates zu den durch Mutation entfernten Tyrosinen.....	S. 124
Tab. 20: Kation-pi-Interaktionen in Proteinen mit unterschiedlichen Funktion.....	S. 132

Anhang:

Tab. 21: Zugriffsnummern der <i>EcProX</i> -ähnlichen Proteine und die taxonomische Einordnung der Mikroorganismen.....	S. 174
Tab. 22: Zugriffsnummern der <i>AfProX</i> -ähnlichen Proteine mit mindestens 36% Sequenzidentität und die taxonomische Einordnung der Mikroorganismen.....	S. 186
Tab. 23: Zugriffsnummern der <i>AfProX</i> -ähnlichen Proteine mit einer Sequenzidentität von mindestens 33% und die taxonomische Einordnung der Mikroorganismen.....	S. 188
Tab. 24: Zugriffsnummern von <i>BsOpuAC</i> -ähnlichen Proteinen der Gruppe 1 und die taxonomische Einordnung der Mikroorganismen.....	S. 190
Tab. 25: <i>BsOpuAC</i> -ähnliche Proteine der Gruppe 2 („domain dislocation“) aus Alignment (Abb.76) mit deren Zugriffsnummern und taxonomischer Einordnung der Mikroorganismen	S. 193
Tab. 26: Weitere <i>BsOpuAC</i> -ähnliche Proteine der Gruppe 2 („domain-dislocation“).	S. 197
Tab. 27: EhuB-ähnliche Proteine.....	S. 199

Abbildungsverzeichnis:

Einleitung:

Abb. 1: Strukturen ausgewählter kompatibler Solute aus <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> und <i>Eucarya</i>	S. 5
Abb. 2: Modell zur Proteinstabilisierung durch kompatible Solute.....	S. 6
Abb. 3: <i>Ab initio</i> Kalkulation von Glycin Betain.....	S. 8
Abb. 4: <i>Ab initio</i> Kalkulationen der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin.....	S. 9
Abb. 5: Synthese und Transport von kompatiblen Soluten im Modellorganismus <i>B. subtilis</i>	S. 11
Abb. 6: Struktureller Aufbau eines ABC-Transporters.....	S. 16

Abb. 7: Die Kristallstruktur des bindeproteinabhängigen ABC-Transporters BtuCDF.....	S. 20
Abb. 8: Modelle des Transportmechanismus von Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportern.....	S. 21
Abb. 9: Der ProU Transporter und das <i>proU</i> Operon aus <i>E. coli</i>	S. 23
Abb. 10: Die Kristallstruktur des Substratbindeproteins ProX aus <i>E. coli</i> mit gebundenem Glycin Betain und die Ausschnittsvergrößerung der Substratbindestelle.....	S. 24
Abb. 11: Der ProU-Transporter und das <i>proU</i> Operon aus <i>A. fulgidus</i>	S. 25
Abb. 12: Kristallstruktur des ProX Proteins aus <i>A. fulgidus</i> mit gebundenem Glycin Betain.....	S. 26
Abb. 13: Konformationsänderung des ProX-Proteins aus <i>A. fulgidus</i> durch die Bindung von Glycin Betain.....	S. 27
Abb. 14: Die Gesamtstruktur des Substratbindeprotein OpuAC aus <i>B. subtilis</i> mit gebundenem Glycin Betain und die Ausschnittsvergrößerung der Substratbindetasche.....	S. 28
Abb. 15: Ladungsteilung eines Benzolringes und <i>ab initio</i> Kalkulationen der aromatischen Ringe der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan.....	S. 30
<u>Ergebnisse:</u>	
Abb. 16: Die Tryptophanbox von ProX aus <i>Escherichia coli</i>	S. 53
Abb. 17: Überexpression und Reinigung von ProX Trp-140/Glu.....	S. 54
Abb. 18: Sättigungskurve und Scatchard plot der Bindeaffinitätsbestimmungen von ProX Trp-188/Tyr.....	S. 56
Abb. 19: Überprüfung von <i>EcProX</i> Mutanten auf deren Fähigkeit zur Bindung von ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 57
Abb. 20: Konkurrenz von unmarkiertem Glycin Betain und Homobetain mit markiertem Glycin Betain um die Bindung durch das Wildtyp ProX Protein.....	S. 59
Abb. 21: Die konservierten Bindemotive aus ProX <i>E. coli</i> und anderen putativen Substratbindeproteinen.....	S. 62
Abb. 22: Ausschnittsvergrößerung der Bindetasche des ProX Proteins aus <i>A. fulgidus</i>	S. 67
Abb. 23: Überexpression und Reinigung von <i>AfProX</i> Arg-149/Ala.....	S. 68
Abb. 24: Emissionsspektren des ProX Proteins aus <i>A. fulgidus</i> ohne Substrat und unter Substratsättigung.....	S. 70
Abb. 25: Bestimmung der Affinitätskonstante (K_D) des <i>AfProX</i> Wildtyp Proteins für Glycin Betain und Prolin Betain.....	S. 70
Abb. 26: Ammoniumsulfat-Präzipitationstest der <i>AfProX</i> Doppelmутanten mit ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain zur Kontrolle der Fähigkeit zur Glycin Betain Bindung.....	S. 73
Abb. 27: Einfluss der Temperatur auf die Bindekapazität des <i>AfProX</i> Wildtyp Proteins zu Glycin Betain.....	S. 74
Abb. 28: Einfluss der Temperatur auf die Affinitätskonstanten von <i>AfProX</i> zu seinen Substraten.....	S. 75
Abb. 29: Konservierung der Aminosäuren, die in <i>AfProX</i> in der Ligandenbindung involviert sind.....	S. 78
Abb. 30: <i>AfProX</i> -ähnliche Proteine in den <i>Bacteria</i> und <i>Archaea</i>	S. 79
Abb. 31: OpuAC-ähnliche Proteine weisen zum Teil einen Domänentausch („domain swap“) auf.....	S. 81
Abb. 32: Taxonomische Zugehörigkeit der Mikroorganismen mit OpuAC-ähnlichen Proteinen der Gruppe 2.....	S. 86
Abb. 33: Der Ehu-Transporter von <i>Sinorhizobium meliloti</i>	S. 87
Abb. 33B: Topologie der putativen Permeasen EhuC und EhuD.....	S. 88
Abb. 34: Überexpression und Reinigung von EhuB.....	S. 90
Abb. 35: Diffusionsbindetest von EhuB mit ¹⁴ C-markiertem Ectoin.....	S. 91
Abb. 36: Substratspezifität von EhuB.....	S. 92
Abb. 37: Die Kristallstruktur des Ectoin- und Hydroxyectoin- bindenden Substratbindeproteins EhuB.....	S. 93
Abb. 38: Die Bindung von Ectoin und Hydroxyectoin durch EhuB.....	S. 94
Abb. 39: Analyse des Oberflächenpotentials des EhuB Proteins.....	S. 95
Abb. 40: Konservierung und Struktur der <i>ehu</i> - und <i>eut</i> -Gencluster-Analoga.....	S. 98
Abb. 41: Konservierte Motive in EhuB und Analoga.....	S. 104
Abb. 42: Phylogenetische Einordnung der Mikroorganismen mit EhuABCD- und EutABCDE-ähnlichen Proteinen.....	S. 106
Abb. 43: <i>S. meliloti</i> Stämme mit Insertionen in <i>ehuA</i> und <i>eutA</i>	S. 107

Abb. 44A: Wachstum von <i>S. meliloti</i> Wildtyp und R3-76 mit den C-Quellen Laktat, Ectoin, Hydroxyectoin oder Glycin Betain	S. 108
Abb. 44 B: Wachstum von <i>S. meliloti</i> Wildtyp und R3-74 mit den C-Quellen Laktat, Ectoin, Hydroxyectoin oder Glycin Betain	S. 109
Abb. 45: Induktion der Synthese des Ehu-Transporters durch exogen supplimentiertes Ectoin oder Hydroxyectoin.....	S. 110
Abb. 46: Induktion der Synthese von EhuB durch Zugabe von Ectoin oder Hydroxyectoin.....	S. 111
Abb. 47: Western blot Analyse des <i>S. meliloti</i> Wildtyp, R3-76, R3-74 und R4-25 zur Induktion der EhuB-Synthese.....	S. 112
Abb. 48: Wachstum des <i>S. meliloti</i> Wildtyp-Stammes unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen.....	S. 113
Abb. 49: Western blot Analyse: Einfluss der Osmolarität des Mediums auf die Induktion der Synthese von EhuB.....	S. 114
<u>Diskussion:</u>	
Abb. 50: Überlagerung der Ausschnittsvergrößerungen der Substratbindetasche von <i>EcProX</i> mit Glycin Betain und ProX mit Prolin Betain.....	S. 120
Abb. 51: Kristallstrukturen der ligand-freien und Ligand-gebundenen Form des <i>AfProX</i> Proteins.....	S. 126
Abb. 52: Beispiele anderer aromatischer Bindetaschen.....	S. 131
Abb. 53: Hypothese zur Entstehung und Verbreitung der bekannten Glycin Betain bindenden Substratbindeproteine.....	S. 138
<u>Anhang</u>	
Abb. 54: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des ProX Wildtyp Proteins zu ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 168
Abb. 55: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-188/Phe zu ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 168
Abb. 56: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-188/Tyr zu ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 169
Abb. 57: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-140/Ala zu ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 169
Abb. 58: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-140/Leu zu ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 170
Abb. 59: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-140/Phe zu ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 170
Abb. 60: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-140/Tyr zu ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 171
Abb. 61: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-140/Asp zu ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 171
Abb. 62: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-140/Glu zu ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 172
Abb. 63: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-65/Ala zu ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 172
Abb. 64: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-65/Phe zu ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 173
Abb. 65: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-65/Tyr zu ¹⁴ C-markiertem Glycin Betain.....	S. 173
Abb. 66: Aminosäuresequenzvergleich der <i>EcProX</i> -ähnlichen Proteine.....	S. 176
Abb. 67: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten <i>AfProX</i> Proteins Tyr-214/Ala durch die Titration mit Glycin Betain oder Prolin Betain.....	S. 178
Abb. 68: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten <i>AfProX</i> Proteins Tyr-190/Ala durch die Titration mit Glycin Betain oder Prolin Betain.....	S. 179
Abb. 69: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten <i>AfProX</i> Proteins Tyr-111/Ala durch die Titration mit Glycin Betain oder Prolin Betain.....	S. 180
Abb. 70: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten <i>AfProX</i> Proteins Tyr-63/Ala durch die Titration mit Glycin Betain oder Prolin Betain.....	S. 181
Abb. 71: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten <i>AfProX</i> Proteins Lys/Ala durch die Titration mit Glycin Betain oder Prolin Betain.....	S. 182

Abb. 72: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten AfProX Proteins Thr-66/Ala durch die Titration mit Glycin Betain oder Prolin Betain.....	S. 183
Abb. 73: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten AfProX Proteins Arg-149/Ala durch die Titration mit Glycin Betain.....	S. 184
Abb. 74: Aminosäuresequenzvergleich der AfProX ähnlichen Proteine.....	S. 187
Abb. 75: Aminosäuresequenzvergleich der BsOpuAC-ähnlichen Proteine der Gruppe 1.....	S. 192
Abb. 76: Sequenzvergleich von ausgewählten BsOpuAC-ähnlichen Proteinen der Gruppe 2 („domain dislocation“).....	S. 195
Abb.77: Aminosäuresequenzvergleich EhuB-ähnlicher Proteine Abb.77: Aminosäuresequenzvergleich EhuB-ähnlicher Proteine	S. 201

Abkürzungsverzeichnis:

A ₅₆₂	Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm
Abb.	Abbildung
AfProX	ProX Protein aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i>
Amp ^r	resistent gegen Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Cml ^r	resistent gegen Chloramphenicol
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
Dpm	Zerfälle pro Minute (decays per minute)
EcProX	ProX Protein aus <i>Escherichia coli</i>
Ect	Ectoin
Ect-OH	Hydroxyectoin
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
GB	Glycin Betain
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
IRD800	Infrared dye (Fluoreszenzfarbstoff für Oligonukleotide)
kDA	Kilo Dalton
OD ₅₇₈	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
PB	Prolin Betain
Str ^r	resistent gegen Streptomycin
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethyldiamin
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)

I. Zusammenfassung

Die Akkumulation von kompatiblen Soluten ist ein weit verbreiteter Schutzmechanismus gegen variierende Umweltbedingungen und wird in vielen Spezies der *Bacteria* und *Archaea* verwendet. Das einige kompatible Solute nicht nur osmoprotektive Wirkung haben, sondern generell Protein-stabilisierende Substanzen sind, ist durch *in vitro* Experimente belegt. Der Protein-stabilisierende Effekt wird in dem „preferential exclusion model“ beschrieben und beruht auf dem thermodynamisch begründeten, bevorzugten Ausschluß der Solute von der Oberfläche der Proteine.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Substratbindeproteine zweier hochaffiner ABC-Transporter für die kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain auf molekularer Ebene untersucht, um die Grundlagen zur Bindung von „bevorzugt ausgeschlossenen Soluten“ zu beschreiben. Dazu wurden die beiden hochaufgelösten Kristallstrukturen der Substratbindeproteine aus dem ProU-System von *E. coli* (*EcProX*, 1,6 Å) und dem ProU-System von *A. fulgidus* (*AfProX* 1,9 Å) verwendet. In *EcProX* wird das quartäre Amin des gebundenen Glycin Betains durch eine Box von drei Tryptophanen koordiniert (Trp-65, Trp-140 und Trp-188), die Carboxylgruppe des Glycin Betains wird durch H-Brücken stabilisiert. In einer Mutagenestudie konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Kation- π -Interaktionen eine Haupt-Determinante in der Bindung von Glycin Betain sind. Es konnte gezeigt werden, dass neben Tryptophan auch Phenylalanin und Tyrosin zu starken Interaktionen mit dem Substrat fähig sind. Die Mutagenesestudie demonstrierte eine unterschiedlich starke Beteiligung der Tryptophane an der Substratbindung. Trp-188 ist dabei essentiell für die Bindung von Glycin Betain, Trp-140 zeigte die geringste Beteiligung. Trp-188 benötigt die Tryptophane Trp-140 und Trp-65 aber zur Stabilisierung des quartären Amins von Glycin Betain in der Bindetasche.

Das *AfProX* Protein zeigt in Affinitätsmessungen eine besonders hohe Affinität zu Glycin Betain und Prolin Betain. Verglichen mit dem *EcProX* Protein ist die K_D von *AfProX* zu Glycin Betain bei 50°C (0,01 μ M) um den Faktor 100 niedriger als die des *EcProX* Proteins bei Raumtemperatur ($K_D=1\mu$ M) und um den Faktor 1000 niedriger verglichen zum *OpuAC* Protein ($K_D=17\mu$ M), einem Glycin Betain und Prolin Betain bindenden Protein aus *B. subtilis*. In der Kristallstruktur von *AfProX* zeigte sich eine weitere Konstellation einer aromatischen Bindetasche. Das quartäre Amin wird dort von den vier Tyrosinen Tyr-63, Tyr-111, Tyr-190 und Tyr-214 (Tyrosin-Gürtel) und einem Aspartat koordiniert, die Carboxylgruppe wird durch Salz- und H-Brücken stabilisiert. Eine Mutagenesestudie zeigte auch hier die wichtige Beteiligung von Kation- π -Interaktionen an der hochaffinen Bindung dieser kompatiblen Solute. Dabei ist die besondere Architektur des Tyrosin-Gürtels, zusammen mit den Carboxylgruppen-stabilisierenden Aminosäuren, essentiell für die hohe Bindeaffinität. Je nach Position des Tyrosins kann der Austausch eines Tyrosins gegen ein Alanin das Absinken der Bindekonstante auf einen Wert, vergleichbar zu dem des *EcProX*- oder des *BsOpuAC*-Proteins, oder niedriger bewirken. Ein Austausch von zwei Tyrosinen gegen Alanin bedeutet immer einen kompletten Verlust der Bindeaffinität. Datenbankanalysen der Aminosäuresequenzen von *EcProX*, *AfProX* und *BsOpuAC* zeigten eine weite Verbreitung der konservierten Bindemotive der Proteine und im Falle von *BsOpuAC* eine besonders starke Konservierung der bindungsrelevanten Tryptophane („Trp-Prisma“) sowie einen Domänentausch im Vergleich zu anderen Glycin Betain Bindeproteinen.

Die Entdeckung eines Substratbindeprotein-abhängigen ABC-Transporters (Ehu) für Ectoin und Hydroxyectoin in *S. meliloti* erlaubte die Analyse der Ectoin-Bindung durch ein Substratbindeprotein. Nach der Überproduktion, Reinigung und Charakterisierung des hochaffinen Ectoin-Bindeproteins (EhuB) und dessen Kristallisation mit gebundenem Ectoin (und Hydroxyectoin) zeigte die Struktur (Auflösung 2,1 Å) in der Substratbindestelle eine aromatische Box aus zwei Phenylalaninen und einem Tyrosin, welche die delokalisierte positive Ladung des Moleküls binden. Der Pyrimidinring und die Carboxylgruppe des Ectoins werden durch Salz- und H-Brücken stabilisiert.

Kation- π -Interaktionen sind eine Hauptdeterminante in der hochaffinen Bindung von Glycin Betain und Prolin Betain, aber auch von Ectoin und Hydroxyectoin und finden eine weite Verbreitung in den *Bacteria* und *Archaea*.

II. Einleitung

1. Anpassung von Mikroorganismen an variierende Umweltbedingungen

In ihren natürlichen Habitaten sind Mikroorganismen ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt. Besonders bodenlebende Mikroorganismen müssen auf Variationen in Temperatur, pH-Wert, Verfügbarkeit von Nährstoffen und Osmolalität reagieren können (Galinski und Trüper, 1994, Ingraham und Marr, 1996; Ventosa *et al.*, 1998; Wood, 1999; Booth, 2002; Brown, 1976). Daher haben Mikroorganismen Mechanismen zur Erkennung und zur Anpassung an diese variierenden Wachstumsbedingungen entwickelt (Kempf und Bremer, 1998; Wood, 1999, Bremer und Krämer, 2000; van der Heide *et al.*, 2001; Poolman *et al.*, 2004). Die hohe Anpassungsfähigkeit von Bakterien befähigt einige Spezies auch zur Besiedelung von verschiedensten ökologischen Nischen, darunter extreme Habitate wie Salzseen und Salinen (permanente hohe Osmolalität; Galinski und Trüper, 1994; Kempf und Bremer, 2000), den hydrothermalen Quellen (hohe Temperatur; Santos und da Costa, 2002; Santos und da Costa, 2001) oder der Tiefsee (hoher Druck, niedrige Temperatur; Horikoshi, 1998; Kato und Bartlett, 1997). Für Boden-Mikroorganismen spielt dagegen die häufig wechselnde Osmolalität ihrer Umgebung eine wichtige Rolle; durch Überflutungen des Bodens oder durch dessen Austrocknung müssen Mikroorganismen drastische Schwankungen in der Verfügbarkeit von Wasser ausgleichen (Galinski und Trüper, 1994; Kempf und Bremer, 1998; Bremer und Krämer, 2000).

Im Gegensatz zu tierischen Zellen, sind die Zellen der Mikroorganismen und auch die der Pflanzen von einer elastischen Zellwand umgeben (Ingraham und Marr, 1996). Diese Zellwände sind für viele Ionen und niedermolekulare Verbindungen permeabel, ebenso wie für Wasser. Die Zytoplasmamembran stellt jedoch eine Barriere für die meisten Ionen und niedermolekularen Verbindungen dar; für Wasser und andere amphipatische Lösungsmittel ist sie jedoch durchlässig, sie wird daher als semipermeabel bezeichnet (Bovell *et al.*, 1963). Da die Konzentration von osmotisch aktiven Soluten im Zytoplasma der Mikroorganismen höher ist als vergleichsweise in dem umgebenden Medium der Mikroorganismen, fließt Wasser dem osmotischen Gradienten folgend in die Zelle hinein. Es entsteht ein gegen die Zellwand gerichteter, hydrostatischer Druck im Inneren der Zelle, der Turgor (Wood, 1999). Der Turgor einer bakteriellen Zelle ist essentiell für deren Überleben, da er vermutlich die mechanische Kraft zum Wachstum der Zelle liefert und daher wichtig ist für die

Zellproliferation (Csonka und Epstein, 1996; Höltje, 1998). In Gram-positiven Mikroorganismen wie *Bacillus subtilis* erreicht der Turgordruck ungefähr $2 \cdot 10^6$ Pa (Whatmore und Read, 1990), in Gram-negativen Mikroorganismen wie *Escherichia coli* zwischen 3 bis $10 \cdot 10^5$ Pa (Koch, 1984; Csonka, 1989; Ingraham und Marr, 1996).

1.1 Auswirkung von hyperosmolaren Wachstumsbedingungen auf Mikroorganismen

Da Mikroorganismen Wasser nicht aktiv transportieren können, wird der Wassergehalt der Zellen allein durch die intrazelluläre Konzentration von osmotisch aktiven Soluten kontrolliert, die Osmolalität der Umgebung besitzt daher einen starken Einfluss auf den Turgor (Kempf und Bremer, 1998; Booth und Louis, 1999). Die Diffusion des Wassers durch die Lipiddoppelschicht ist in der Regel ausreichend, um leichte Veränderungen in der Solut-Konzentration auszubalancieren. Ein deutlich beschleunigter Wasserdurchfluss durch die Zytoplasmamembran kann durch wasserselektive Kanäle, die Aquaporine, erfolgen. Aquaporine sind in Pflanzen und Tieren sowie niederen Eukaryoten weit verbreitet (Agre *et al.*; 1995, Maurel, 1997; Bremer und Krämer, 2000). Auch in einigen Bakterien, wie zum Beispiel *E. coli* (AqpZ), sind Aquaporine experimentell nachgewiesen worden (Calamita *et al.*, 1995; Calamita *et al.*, 1997). Im Falle einer Erhöhung der Osmolalität in der Umgebung der Mikroorganismen, also eine hyperosmolare Wachstumsbedingung, fließt zytoplasmatisches Wasser aus der Zelle hinaus und bewirkt eine Abnahme des Turgordruckes, bis hin zur Dehydrierung und Plasmolyse (Kempf und Bremer, 1998; Csonka und Epstein, 1996; Galinski und Trüper, 1994; Miller und Wood, 1996). Daher ist es für das Überleben von Bakterien wichtig, auf Veränderungen in der Osmolarität der Umgebung schnell und effizient reagieren zu können (Bremer und Krämer, 2000). In Mikroorganismen sind zwei Strategien zur Adaptation an hyperosmotische Bedingungen bekannt, die erste Strategie ist die Akkumulation von Ionen im Zytoplasma der Zellen und wird als „salt-in cytoplasm“ Strategie bezeichnet, die zweite Strategie ermöglicht die Anpassung durch Akkumulation von kompatiblen Soluten („salt-out cytoplasm“).

1.1.1 „Salt-in cytoplasm“ Strategie

Die „salt-in cytoplasm“ Strategie wird ausschließlich von halophilen Mikroorganismen verwendet und erfordert eine Umgebung mit permanenter, hoher Osmolalität. In dieser Strategie sind die Proteine der Mikroorganismen durch eine veränderte Aminosäurezusammensetzung an die hohen Ionenkonzentrationen angepasst. Sie besteht hauptsächlich in einer erhöhten Anzahl von Aspartat-, Glutamat- und schwach hydrophoben

Aminosäureresten (Lanyi, 1974; Dennis und Shimmin, 1997; Sleator und Hill, 2001), die für ein negatives Oberflächenpotential des Proteins verantwortlich sind. Die akkumulierten Kationen werden dabei durch die negativen Ladungen angezogen und bilden eine Art Schutzschild um das Protein. Der stabilisierende Effekt besteht also in der Festigung der Proteinfaltung und Stärkung der hydrophoben Interaktionen, indem abstoßende Kräfte durch das negative Oberflächenpotential der Proteinoberfläche mit Kationen verhindert werden (Sleator und Hill, 2001; Zaccai *et al.*, 1989).

1.1.2 Adaptation durch kompatible Solute

Die Anpassungsstrategie der Akkumulation von kompatiblen Soluten ist flexibler als die „salt-in cytoplasm“ Strategie und erlaubt das Überleben in Umgebungen, in denen sich die Osmolalität schnell und drastisch verändern kann. Diese Strategie wird sowohl von einigen halophilen Mikroorganismen, als auch von halotoleranten Mikroorganismen angewandt und findet eine weite Verbreitung in den *Bacteria*, *Archaea* und auch in höheren Eukaryoten (Bohnert (*Dersch, Fsihi et al. 1994*) *et al.*, 1995; Bremer und Krämer, 2000; Welsh, 2000; Sleator und Hill, 2001; Roessler und Müller, 2001; Wood, 2001; Müller *et al.*, 2005). Die Adaptation an hyperosmolare Bedingungen erfolgt über zwei Schritte. Der erste Schritt beinhaltet eine schnelle Akkumulation von Kalium-Ionen und gleichzeitiger Synthese des Gegenions Glutamat, ausgelöst durch ein Absinken des Turgordruckes (Csonka und Hanson, 1991; McLaggan *et al.*, 1994; Wood, 1999). In *E. coli* wird exogenes Kalium durch drei verschiedene osmotisch induzierte Transporter in die Zelle importiert (Trk, Kdp und Kup). Durch die Akkumulation von K^+ wird die Osmolalität im Zytoplasma erhöht und ein Ausstrom von Wasser verhindert, der Turgor wird stabilisiert (Epstein, 1986, Csonka und Hanson, 1991, McLaggan *et al.*, 1994, Csonka und Epstein, 1996; Holtmann *et al.*, 2003). Da die Proteine der Mikroorganismen mit dieser Adaptationsstrategie nicht an hohe Ionenkonzentrationen im Zytoplasma angepasst sind, wird deren Zellphysiologie negativ beeinflusst und die Funktion von Schlüsselenzymen inhibiert (Yancey *et al.*, 1982). Im zweiten Schritt werden daher die K^+ -Ionen und das Glutamat durch kompatible Solute ersetzt, die auch osmotisch aktiv, aber mit der Zellphysiologie kompatibel sind (Dinnbier *et al.*, 1988). Daher wird in dem zweiten Schritt dieser Osmoadaptation das intrazellulär akkumulierte K^+ durch kompatible Solute ersetzt (Lucht und Bremer, 1994; Dinnbier *et al.*, 1988; Bremer und Krämer, 2000). Die intrazelluläre Konzentration von K^+ -Ionen wird durch spezifische K^+ -Efflux-Kanäle und einiger unspezifischer Systeme verringert (Csonka und Epstein, 1996; Record *et al.*, 1998).

2. Kompatible Solute

Kompatible Solute sind kleine, organische Moleküle, die im Zytoplasma bis zu molaren Konzentrationen akkumuliert werden können, ohne essentielle physiologische Prozesse in der Zelle zu stören (Brown, 1976). Das Spektrum der kompatiblen Soluten erstreckt sich über Aminosäuren und deren Derivate (Prolin, Glutamat, Ectoin), Methylamine (Glycin Betain, Prolin Betain) und deren Sulfat-Analoga (Dimethylsulfonioacetat), kleine Peptide (N-Acetylglutaminylglutaminamid), Polyole (Glycerol, Glycosylglycerol) und Zucker (Trehalose, Saccharose) (Bremer und Krämer, 2000); siehe Abbildung 1. Viele dieser kompatiblen Solute sind Osmolyte und können aufgrund ihrer osmotischen Aktivität zur Turgorerhaltung unter hyperosmolaren Bedingungen verwendet werden (Galinski und Trüper, 1994; da Costa *et al.*, 1998; Kempf und Bremer, 1998). Einige Solute zeigten kry- und hitzeprotektive Eigenschaften (Holtmann und Bremer, 2004; Brigulla *et al.* 2003; Caldas *et al.*, 1999). Neben ihren etablierten Funktionen als Osmo-, Kry- und Hitzeprotektiva erweisen sich kompatible Solute als generelle Makromolekül- und Proteinstabilisatoren (Arakawa und Timasheff, 1985; Lippert und Galinski, 1992; Bolen und Basakow, 2001; Bolen, 2001).

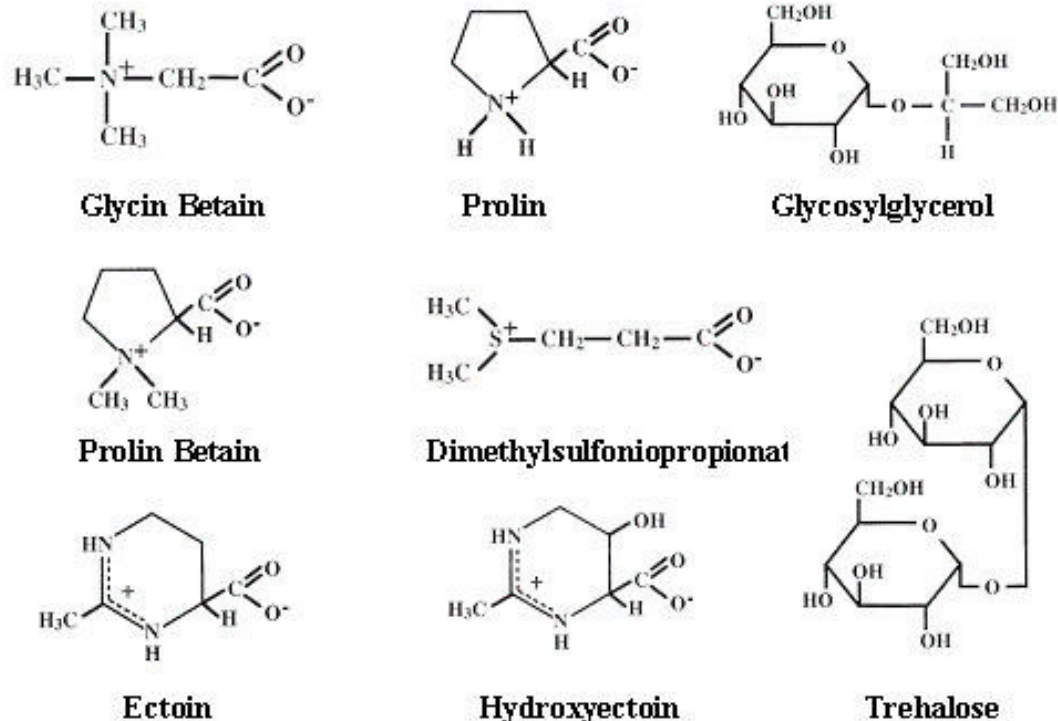


Abb. 1: Strukturen ausgewählter kompatibler Solute aus *Bacteria*, *Archaea* und *Eucarya*. Gezeigt sind die Strukturformeln einiger repräsentativer Osmolyte. Während Glycin Betain (Trimethylamin) ein weit verbreitetes hocheffizientes Osmoprotektivum ist, stellt Trehalose (Zucker) ein Osmolyt dar, das nur zu einer vergleichsweise niedrigen intrazellulären Konzentration in Bakterien akkumuliert wird. Ausser Trehalose und Glycosylglycerol sind alle Moleküle bei physiologischem pH zwitterionisch.

Kompatible Solute der *Bacteria* und *Eukarya* sind meist polare, wasserlösliche Moleküle, die bei physiologischem pH ungeladen oder zwitterionisch sind, wie zum Beispiel Glycin Betain, Prolin oder Ectoin (Kempf und Bremer, 2000). *Archaea* dagegen akkumulieren meist negativ geladene Solute, die als Gegenion zu hohen intrazellulären Konzentrationen von K^+ -Ionen dienen (Martin *et al.*, 1999, Roberts 2000). Die proteinstabilisierende, chaperon-ähnliche Funktion von kompatiblen Soluten wird durch das „preferential exclusion model“ von Arakawa und Timasheff (1985) beschrieben, wengleich der exakte biochemische Mechanismus nicht vollständig geklärt ist. Nach diesem Modell (Abb. 2) werden kompatible Solute aufgrund von thermodynamisch ungünstigen Wechselwirkungen mit dem Peptidrückgrat von der Oberfläche von Proteinen ausgeschlossen. Durch den Ausschluss aus der Hydrathülle und der direkten Umgebung der Proteine ergibt sich eine ungleiche Verteilung der kompatiblen Solute im Zytoplasma, welches eine erhebliche Abnahme der Entropie bedeutet. Um die Entropieabnahme möglichst gering zu halten, nehmen die Proteine ein möglichst geringes Volumen ein, dadurch finden verstärkte Interaktionen zwischen den Domänen der Proteine statt. Die native Konformation der Proteine wird dadurch stabilisiert (Arakawa und Timasheff, 1982; Arakawa und Timasheff, 1985; Timasheff, 1998; Bolen und Basakow, 2001; Winzor *et al.*, 1992). Daher werden kompatible Solute auch als chemische Chaperone bezeichnet (Tatzelt *et al.*, 1996). Dieser Effekt kann durch einen niedrigen pH gestört werden, denn unter diesen Bedingungen wird der ionische Charakter von Proteinen verstärkt, so dass die Solute mit den Proteinoberflächen interagieren (Knapp *et al.*, 1999).

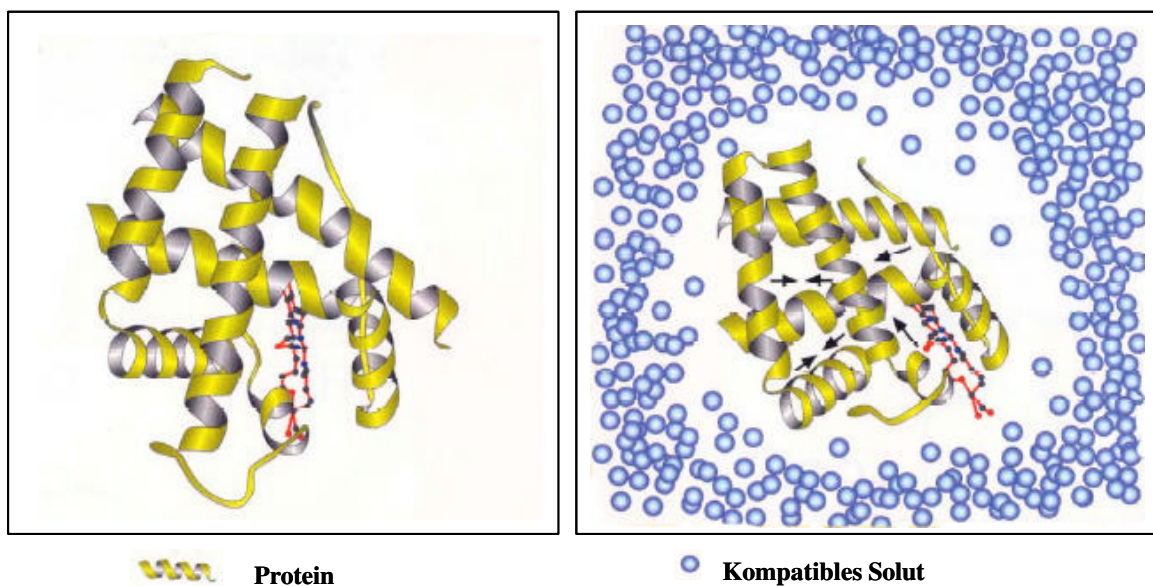


Abb. 2: Modell zur Proteinstabilisierung durch kompatible Solute.

Die Abbildung des „preferential exclusion model“ wurden von der Internetseite der Firma bitop (Witten, <http://www.bitop.de>) übernommen. Abbildung A zeigt ein Protein in nativer Konformation, Abbildung B zeigt die Stabilisierung der Proteinstruktur durch den bevorzugten Ausschluss von kompatiblen Soluten aus der Hydrathülle des Proteins.

2.1 Glycin Betain

Das kompatible Solut Glycin Betain findet eine weit verbreitete Anwendung als Osmolyt, nicht nur in Bakterien, sondern auch in *Archaea*, Pilzen, Pflanzen, Tieren und auch in Menschen (Rhodes und Hanson, 1993; Cayley *et al.*; 1992, Csonka und Epstein, 1996; Bremer und Krämer, 2002; Galinski und Trüper, 1994; Bohnert *et al.*, 1995; Hagemann *et al.*, 1997; Roberts, 2000; Garcia-Perez und Burg, 1990; Yancey, 2004; Chen und Murata, 2004; Trichant *et al.*, 2004; Yancey und Burg, 1989). Die Trimethylammonium-Verbindung (N,N,N-Trimethylamin) ist seither in einer Vielzahl von Mikroorganismen als Schutzsubstanz identifiziert worden. Glycin Betain zeigt neben einem starken osmoprotektiven Effekt auch kryoprotektive Eigenschaften in *Listeria monocytogenes* und *Bacillus subtilis* (Ko *et al.*, 1994; Brigulla *et al.*, 2003; Hoffmann und Bremer, in Vorbereitung) und thermoprotektive Eigenschaften in *B. subtilis*, *E. coli* und *Archaeoglobus fulgidus* (Caldas *et al.*, 1999; Holtmann, 2002; Holtmann und Bremer, 2004). Die zur Hitze- oder Kryoprotektion benötigte extrazelluläre und intrazelluläre Konzentration von Glycin Betain ist im Vergleich zur Osmoprotektion deutlich niedriger. Bei einer Wachstumstemperatur von 52°C konnte eine maximale Hitze- oder Kryoprotektion für *B. subtilis* schon mit 100 µM exogenem Glycin Betain erreicht werden, wobei ein hitze- oder kryoprotektiver Effekt schon ab 20 µM sichtbar ist. Die intrazelluläre Konzentration von Glycin Betain wurde bei 52°C mit 110 mM eine ähnlich hohe Konzentration wie ungestresste Zellen bei Raumtemperatur (Holtmann, 2002). Auch in Pflanzen erhöht Glycin Betain die Stresstoleranz gegenüber erhöhten Temperaturen (Caldas *et al.*, 1999; Alia *et al.*, 1998). Glycin Betain ist in der Natur weit verbreitet, vor allem durch die Synthese von Bakterien; es wurde auch in Wurzelexudaten und verrottenden Pflanzen, im Extrakt von Hefezellen und auch im Urin von Tieren und dem Menschen nachgewiesen (Lucht und Bremer, 1994, Dulaney *et al.*, 1968). Die Struktur des Glycin Betains (Abb.1) zeigt ein zwitterionisches Molekül, das unter physiologischem pH neben einer negativ geladenen Carboxylgruppe ein positiv geladenes quartäres Amin enthält. *Ab initio* Kalkulationen des Glycin Betains (M. Lever, University of Queensland, persönliche Mitteilung) zeigen eine delokalisierte positive Ladung, die über den Methylgruppen des quartären Amines verteilt ist (Abb.3).

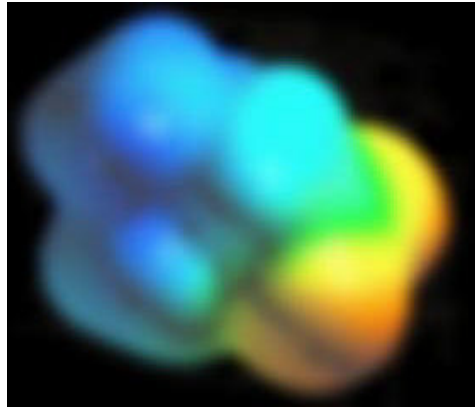


Abb. 3: *Ab initio* Kalkulation von Glycin Betain

Die Abbildung der *ab initio* Kalkulation von Glycin Betain wurde von M. Lever (University of Queensland) zur Verfügung gestellt. Die positive Ladung ist in blau, die negative Ladung in rot/gelb dargestellt.

2.2 Ectoin und Hydroxyectoin

Die Tetrahydropyrimidine Ectoin (2-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylat) und Hydroxyectoin (2-Methyl-5-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylat) werden hauptsächlich von aeroben chemotrophen Mikroorganismen unter hyperosmolarem Stress synthetisiert (Galinski, 1995). Das Vorkommen von Ectoinen in der Umwelt wird vermutlich nur über die bakterielle Synthese gewährleistet (Jebbar *et al.*, 2005). Ectoin wurde erstmals in dem Gram-negativen phototrophen Schwefelbakterium *Ectothiorhodospira halochloris* entdeckt (Galinski *et al.*, 1985). Ectoin ist ein weit verbreitetes Osmolyt, das wie Hydroxyectoin starke protektive Eigenschaften gegenüber hyperosmotischem Stress zeigt und *in vitro* enzymstabilisierende Eigenschaften bei Hitze, Kälte, Gefriertrocknen und in Anwesenheit von chaotropen Stoffe wie Harnstoff zeigt (Lippert und Galinski, 1992; Ramos *et al.*, 1997; Knapp *et al.*, 1999; Jebbar *et al.*, 1992). Ectoin und Hydroxyectoin sind beide unter physiologischem pH zwitterionisch und besitzen neben einer Carboxylgruppe eine delokalisierte positive Ladung zwischen den Stickstoffatomen des Pyrimidinringes, welches auch durch *ab initio* Kalkulationen der beiden Moleküle demonstriert wird (Suenobu *et al.*, 1998; Inbar *et al.*, 1993) (Abb.4).

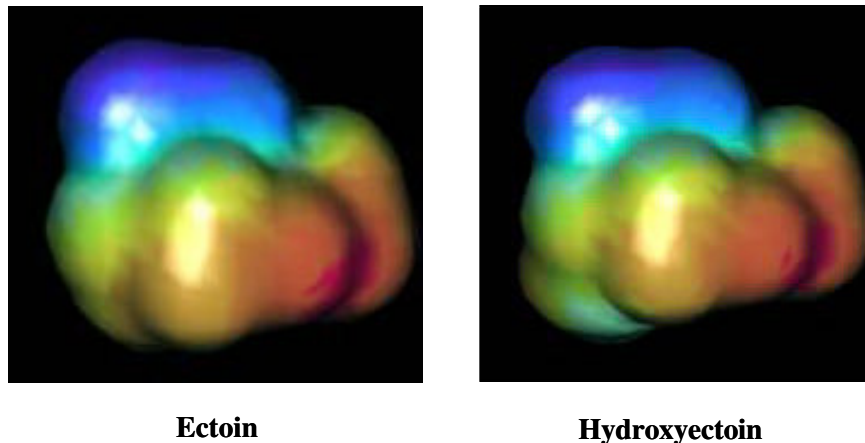


Abb. 4: *Ab initio* Kalkulationen der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin.

Die Abbildungen der *ab initio* Kalkulationen von Ectoin und Hydroxyectoin wurden von der Internetseite der Firma bitop (Witten, <http://www.bitop.de>) übernommen. Die positive Ladung ist in rot, die negative Ladung in blau gezeigt.

3. Akkumulation von kompatiblen Soluten unter hyperosmotischen Stressbedingungen

Die Akkumulation von kompatiblen Soluten unter hyperosmotischen Bedingungen kann auf zwei Wegen erfolgen. Eine Möglichkeit ist die Akkumulation durch Synthese, wobei die Synthese *de novo* oder aber basierend auf Stoffwechselintermediaten oder anderen Vorläufermolekülen erfolgt. Eine zweite Möglichkeit zur Akkumulation bietet der Import exogener Solute durch die Zytoplasmamembran mittels spezifischer Transportproteine. In beiden Fällen werden die benötigten Strukturgene meist durch hohe Osmolalität induziert, wobei die Induktion eng an die Osmolalität der Umgebung gekoppelt ist (Poolman und Glaasker, 1998; Kempf und Bremer, 1998; Bremer und Krämer, 2000; Sleator und Hill, 2001). Osmotisch induzierte Synthese von Transportproteinen wird häufig durch eine osmotische Aktivierung der Transporter auf Proteinebene begleitet, welches die Reaktionszeit auf hyperosmotischen Stress erheblich verkürzt (Lucht und Bremer, 1994; Bremer und Krämer, 2000).

3.1 Endogene Synthese von kompatiblen Soluten

Bisher sind bereits in einigen Mikroorganismen die Synthese-Enzyme für verschiedene kompatible Solute identifiziert worden, als Beispiele sind hier die Synthesewege von Glycin Betain und Ectoin aufgeführt:

Die Enzyme für die Biosynthese des kompatiblen Solutes Glycin Betain kann zum Beispiel durch eine schrittweise Methylierung der Aminosäure Glycin über die Intermediate

Sarkosin und Dimethylglycin hergestellt werden (Galinski und Trüper, 1994), die Biosynthese-Enzyme dafür wurden auch in *Apanothece halophytica* und in höheren Pflanzen (*Arabidopsis*) entdeckt (Waditee *et al.*, 2005). Ein zweiter Biosyntheseweg von Glycin Betain führt über die enzymatische Oxidation von Cholin zu Glycin Betain, die benötigten Enzyme konnten sowohl in *E. coli*, *Sinorhizobium meliloti* und *B. subtilis*, als auch in Pflanzen und Tieren nachgewiesen werden (Lamark *et al.*, 1991; Boch *et al.*, 1994; Boch *et al.*, 1996; Boch *et al.*, 1997; Waditee *et al.*, 2003; Mandon (May, Faatz *et al.* 1986)*et al.*, 2003; Landfald und Strom, 1986).

Die Tetrahydropyrimidine Ectoin und Hydroxyectoin werden in einigen halotoleranten und halophilen Spezies, darunter viele Bacilli und Streptomyceten, unter hyperosmolarem Stress synthetisiert (Kuhlmann und Bremer, 2002; Bursy, 2005). Der Syntheseweg von Ectoin wurde in *Halomonas elongata* entdeckt (Peters *et al.*, 1990), später konnten die beteiligten Enzyme aus *H. elongata* gereinigt und charakterisiert werden (Min-Yu *et al.*, 1993; Ono *et al.*, 1999). Ausgehend von dem Aminosäurestoffwechselprodukt Aspartat- β -Semialdehyd wird Ectoin unter der Beteiligung von drei Enzymen gebildet, einer Acetyltransferase, einer Aminotransferase und einer Ectoin-Synthase (Ono *et al.*, 1999). Die Synthese von Ectoin ist sehr effizient und verbraucht relativ wenig Energie (Maskow und Babel, 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Hydroxyectoin in *Str. chrysomallus* und auch in *S. salexigens* mittels einer Hydroxylase aus Ectoin gebildet wird (Prabhu *et al.*, 2004; Bursy, 2005), welches aufgrund einer *H. elongata* – Mutante bereits vermutet wurde. Diese *H. elongata* *ectA*-Mutante war weder in der Lage, Ectoin noch Hydroxyectoin zu synthetisieren, was eine Synthese von Hydroxyectoin aus Ectoin nahelegt (Göller *et al.*, 1998).

3.2 Aktiver Transport von kompatiblen Soluten unter hyperosmotischen Stressbedingungen

Besonders für die bodenlebenden Mikroorganismen ist eine Vielzahl von vorgeformten kompatiblen Soluten leicht zugänglich. Generell ist der aktive Transport von Molekülen energetisch günstiger als eine *de novo* Synthese im Zytoplasma der Zelle (Higgins, 1992). Da die kompatiblen Solute unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen schnell und in hohen Konzentrationen (je nach Stärke des osmotischen Druckes in der Umgebung der Mikroorganismen) benötigt werden, ist ein hochaffiner Transport von Vorteil. Dieser Transport erfolgt gegen ein immenses Konzentrationsgefälle (Kempf und Bremer, 1998; Boos und Lucht, 1996). Aktiver Transport von kompatiblen Soluten kann über verschiedene Transportertypen erfolgen. Die Transportproteine aus den Familien TRAP („Tripartite-

ATP-independent“) und ABC („ATP-binding-cassette“) nutzen dabei hochaffine Substratbindeproteine, während die Transporter der MF-Familie („Major facilitator“), der SSS-Familie (Sodium/Solute Symporter) und der BCCT-Familie (Betaine-Choline-Carnitine-Transporter) ohne Substratbindeproteine funktionieren (Saier, 1999; Saier, 2000). Mikroorganismen akkumulieren meistens eine Mischung aus verschiedenen kompatiblen Soluten. Nimmt man das Gram-positive Bodenbakterium *B. subtilis* als Beispiel, so kann dieser Mikroorganismus unter hyperosmotischem Stress die kompatiblen Solute Prolin *de novo* oder Glycin Betain aus Cholin synthetisieren (Boch *et al.*, 1994; Boch *et al.*, 1996; Belitzky *et al.*, 2002), aber auch eine Vielzahl von exogen vorhandenen Soluten durch verschiedene Transportertypen (ABC-Transporter, BCCT-Transporter, SSS-Transporter) importieren.

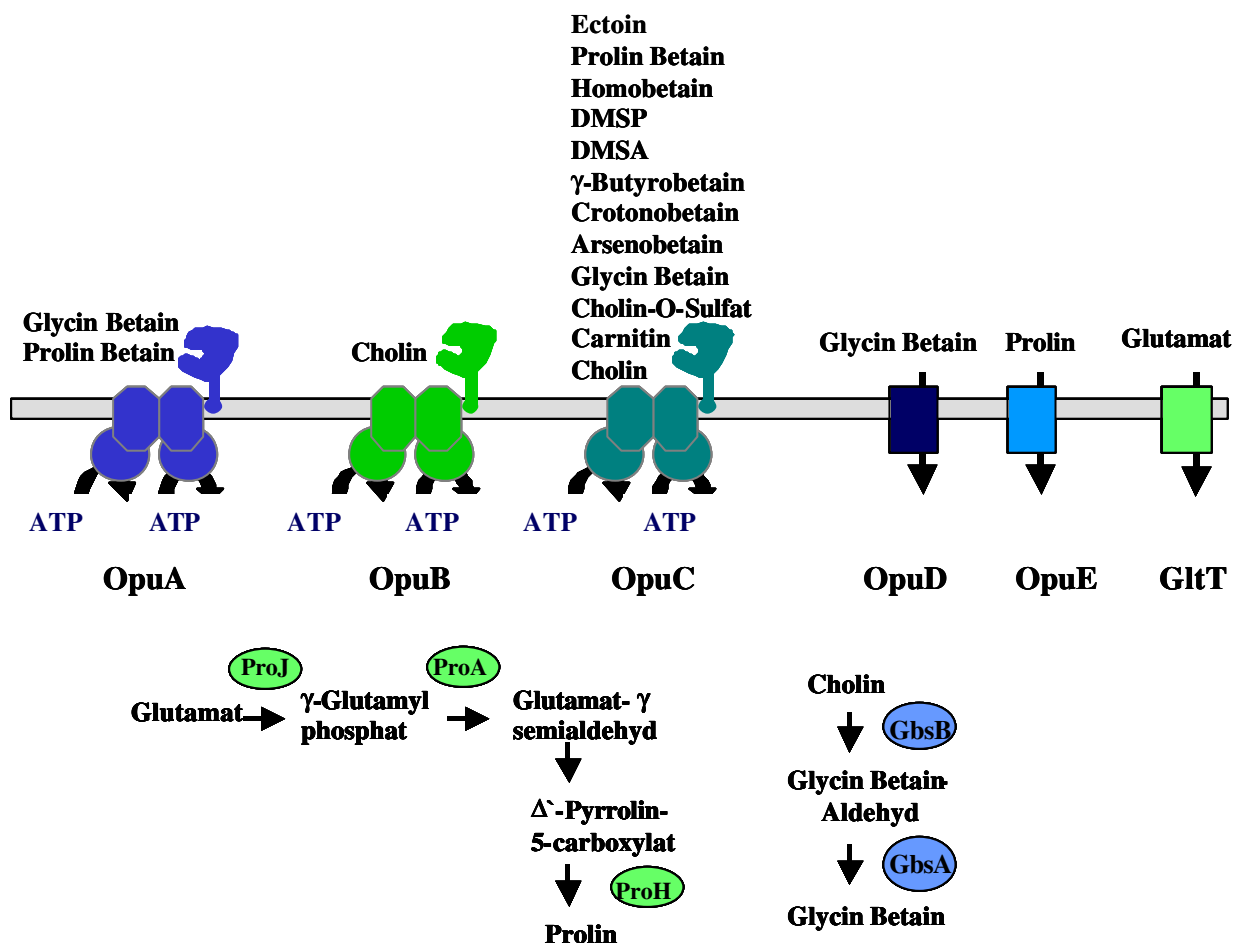


Abb. 5: Synthese und Transport von kompatiblen Soluten im Modellorganismus *B. subtilis*. Die Abbildung wurde modifiziert nach Bremer, 2002.

Eine breite Substratspezifität und hohe Substrataffinität von Transportproteinen ist ein Vorteil für Mikroorganismen, da kompatible Solute meist nur in geringen Konzentrationen in der Umgebung vorliegen. Eine breite Substratspezifität erlaubt die Nutzung des breiten

Spektrums von existierenden Soluten, eine hohe Bindeaffinität erlaubt die effektive Nutzung eines bestimmten Solutes (Bremer und Krämer, 2000) (Abb.5; Bremer, 2002).

3.3 Bakterielle Transporter für kompatible Solute ohne Substratbindeproteine

3.3.1 MF- und SSS-Transporter für kompatible Solute

Die Transporter der MF- und SSS-Familien sind Einzelkomponententransporter und energetisieren den Import ihrer Solute über den Symport von Na⁺-Ionen (SSS) oder den Symport von Protonen oder Na⁺-Ionen (MF) (Saier, 2000).

ProP aus *E. coli* ist ein osmotisch regulierter Transporter der MF-Familie und importiert ein weites Spektrum an zwitterionischen kompatiblen Soluten, darunter Glycin Betain, Prolin Betain und Ectoin, wobei die Affinitäten relativ gering sind (z.B. Prolin $K_M=0,3$ mM) (Culham *et al.*, 1993; Lucht und Bremer, 1994; MacMillan *et al.*, 1999; Poolman *et al.*, 2004). Trotz seiner geringen Affinität ist das ProP System für die Adaptation von *E. coli* an hyperosmotischen Stress aufgrund seiner schnellen Antwort auf die Erhöhung der Mediumosmolalität wichtig (Lucht und Bremer, 1994). Sowohl die ProP-Synthese als auch die Aktivität des Proteins werden durch hyperosmotische Bedingungen induziert (Racher *et al.*, 1999; Bremer und Krämer, 2000). Die Transportenergie wird durch den Symport von Protonen gewährleistet, basierend auf der protonenmotorischen Kraft (Protonengradient und Membranpotential; MacMillan *et al.*, 1999; Poolmann *et al.*, 2004). Ein weiterer Importer für kompatible Solute aus der MF-Familie ist der ProP Transporter aus *Corynebacterium glutamicum* (Peter *et al.*, 1998) und der OusA Transporter aus *Erwinia crysanthemii* (Gouesbet *et al.*, 1996).

Das OpuE-System aus *B. subtilis* ist ein Vertreter für die Importer von kompatiblen Soluten aus der SSS-Familie. OpuE transportiert Prolin mit hoher Affinität ($K_M=4$ μ M); die Synthese von OpuE ist osmotisch reguliert, die Aktivität des Proteins ist aber unabhängig von der Osmolalität der Umgebung. OpuE dient aber nicht nur der Aufnahme von Prolin aus der Umgebung, sondern ist auch wichtig für den Rücktransport von endogen synthetisiertem Prolin, welches die Zelle an die Umgebung verliert (von Blohn *et al.*, 1997). Weitere Transporter dieser Familie mit signifikanter Sequenzhomologie sind die PutP-Transporter aus *E. coli*, *S. typhimurium* und *St. aureus*, die ebenfalls Prolin importieren, aber nicht osmotisch reguliert sind (von Blohn *et al.*, 1997).

3.3.2 BCCT-Transporter

Die Familie der BCCT-Transporter beinhaltet die größte Anzahl an bisher charakterisierten bakteriellen Transporter für kompatible Solute. Die BCCT-Transporter sind sekundäre Aufnahmesysteme und sind spezifisch für methylierte Ammoniumverbindungen wie Betaine, Cholin oder Carnitin; aber wie bereits in einigen Transportern belegt auch für das Tetrahydropyrimidin Ectoin. Die Substrataufnahme wird durch den Symport mit Na^+ -Ionen energetisiert. Bisher sind eine Reihe von Transportern in verschiedenen Mikroorganismen charakterisiert worden wie zum Beispiel BetL (Glycin Betain) aus *L. monocytogenes* (Gerhardt *et al.*, 1996; Sleator *et al.*, 1999); BetP und EctP aus *Corynebacterium glutamicum* (Peter *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 1998); BetM und EctM aus *Marinococcus halophilus* (Vermeulen und Kunte, 2004); BetH aus *Halobacillus trueperi* (Lu *et al.*, 2004); CaiT und BetT aus *E. coli* (Lamark *et al.*, 1991; Eichler *et al.*, 1994), OpuD aus *B. subtilis* (Kappes *et al.*, 1996), EctT aus *Virgibacillus pantothenicus* (Kuhlmann, 2002) und ButA aus *Tetragenococcus halophila* (Baliarda *et al.*, 2003). CaiT ist der einzige bisher charakterisierte BCCT-Transporter, der nicht osmotisch reguliert ist und nachweislich für metabolische Zwecke genutzt wird (Eichler *et al.*, 1994). BCCT-Transporter bestehen in der Regel aus 12 membrandurchspannenden Helices und zeigen eine relativ enge Substratspezifität von maximal zwei verschiedenen Substraten pro Transporter. Eine strukturelle Untersuchung ergab die Konservierung einer großen Anzahl von aromatischen Aminosäuren in den Transmembranhelices acht und neun der Transporter EctT, OpuD, BetL und EctP, die vermutlich in die Substratbindung involviert sein könnten (Kuhlmann, 2002). BCCT-Transporter sind in der Lage, ihre Substrate teilweise mit Transportaffinitäten im niedrigen mikromolaren Bereich zu importieren, BetP aus *C. glutamicum* besitzt beispielsweise eine $K_M^{\text{Glycin Betain}} = 8\mu\text{M}$ (Krämer und Morbach, 2004).

3.4 Bindeprotein-abhängige Transporter für kompatible Solute

3.4.1 TRAP-Transporter

Die Familie der TRAP-Transporter ist ein weit verbreiteter Transportertyp für die verschiedensten Arten von Soluten und vermutlich ein evolutionär altes System, das aus der Addition eines Hilfsproteins (Substratbindeprotein) zu einem einzelnen sekundären Transporter (Permease) entstanden ist. Wie für die sekundären Einzelkomponenten-transporter typisch wird der Transport der Solute durch die Membran mittels eines elektrochemischen Gradienten energetisiert, durch den Symport von H^+ oder Na^+ Ionen

(Kelly und Thomas, 2001). Mit dem TRAP-Transporter TeaABC aus dem halophilen Bakterium *H. elongata* wurde der erste osmotisch induzierte TRAP-Transporter für ein kompatibles Solut identifiziert und mit TeaA das erste Substratbindeprotein, das eine Spezifität für Ectoin und Hydroxyectoin zeigt (Gramman *et al.*, 2002; Tetsch und Kunte, 2002). TeaABC importiert Ectoin ($K_S=27,2 \mu\text{M}$) und Hydroxyectoin ($K_S=21,7 \mu\text{M}$) mit hoher Affinität (Gramman *et al.*, 2002).

3.4.2 ABC-Transporter

ABC-Transporter sind in den *Bacteria*, *Archaea*, Pflanzen, Tieren und auch dem Menschen weit verbreitet (Pfluger und Müller, 2004; Schneider, 2000; Higgins, 2001; Dassa und Bouige, 2001) und importieren verschiedenster Solute in die Zellen hinein. Sie sind in die Aufnahme von Nährstoffen wie zum Beispiel Aminosäuren (HisQMPJ *E. coli*), Zucker (Rsb, Mal, *E. coli*), Polysaccharide, Vitamine (BtuCDF, *E. coli*), Anorganische Ionen (Nik *E. coli*, humaner CFTR), Peptide und sogar Proteine involviert (Higgins, 1992; Higgins, 2001; Heddle *et al.*, 2003; Schmitt und Tampé, 2002; Locher *et al.*, 2002; Davidson und Chen, 2004; Dassa *et al.*, 1999). Neben einer Vielzahl von Importern gibt es aber auch ABC-Transporter, die als Efflux-Systeme fungieren; bisher ist aber noch kein Transporter beschrieben worden, der in beide Richtungen arbeiten kann. ABC-Exporter exkretieren Abfälle, Toxine, Proteasen oder andere Syntheseprodukte (MsbA, Lipid A-Flippase aus *E. coli*); sie befähigen Zellen zur Exkretion von Wirkstoffen wie Antibiotika oder andere Therapeutika (Chemotherapeutika) durch MDR-ABC-Transporter („multidrug resistance“, in Menschen und Prokaryoten) und ermöglichen damit die Ausbildung von Resistenzen (Higgins, 1992; Davidson und Chen, 2004). Eingehende Studien über den Import von kompatiblen Soluten unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen in verschiedenen Mikroorganismen führten zu einer Reihe von ABC-Transportern mit hoher Affinität zu kompatiblen Soluten, die meistens eine enge Substratspezifität auszeichnet. Diese Transporter gehören alle zu der OTCN-Familie („osmoprotectants, taurine, alkyl phosphonates, phosphites, hypophosphites, cyanate and nitrate“) der ABC-Transporter (Dassa und Bouige, 2001). In dem Gram-positiven Bodenmikroorganismus *B. subtilis* sind drei ABC-Transporter bekannt, deren Synthese (und vermutlich auch deren Proteinaktivität) osmotisch kontrolliert wird. Dabei handelt es sich um den hochaffinen Glycin Betain und Prolin Betain Transporter OpuA (Kempf und Bremer, 1995), den Cholin-Transporter OpuB und OpuC, einen Transporter mit einer Affinität zu 12 verschiedenen Osmolyten, darunter Glycin Betain, Prolin und Ectoin (Kappes *et al.*, 1999) (Abb.5). In dem Gram-positiven

Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis* ist ein ABC-Transporter mit Ähnlichkeiten zu OpuA aus *B. subtilis* beschrieben worden, OpuABC, mit einer hohen Affinität für Glycin Betain ($K_M=1,7 \mu\text{M}$) (van der Heide und Poolman, 2000a, b). Das Substratbindeprotein ist in diesem Transporter an den C-Terminus der Permease des Transporters anfusioniert und bildet einen sogenannten „chimären“ ABC-Transporter (Obis *et al.*, 1999, van der Heide und Poolmann, 2002). Eine Datenbankanalyse zeigte, dass eine Reihe von putativen ABC-Transportern unbekannter Funktion vermutlich ähnlich dem OpuABC-Transporter ein Bindepotein-Permease Fusionsprotein besitzen (van der Heide und Poolmann, 2002). Das Gram-negative Enterobakterium *E. coli* besitzt einen osmotisch regulierten, hochaffinen ABC-Transporter für die kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain, den ProU Transporter (Abb.8). Auch in den *Archaea* sind ABC-Transporter für die kompatible Solute Glycin Betain und Prolin Betain beschrieben worden, wie zum Beispiel der ProU-ähnlichen ABC-Transporter in dem hyperthermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* (Holtmann, 2002) und der Ota-Transporter aus *Methanosarcina mazei* (Rössler *et al.*, 2002).

Allen ABC-Transportern gemeinsam ist der ähnliche strukturelle Aufbau. Sie bestehen aus zwei ABC-Domänen, die auch als ATPasen oder Nukleotidbindedomänen bezeichnet werden und zwei membrandurchspannende Translokationsproteinen, den Permeasen. Prokaryotische Importer besitzen eine dritte charakteristische Komponente, die Substratbindepoteine (Higgins, 1992; Dwyer und Hellinga, 2004; Davidson und Chen, 2004).

3.4.2.1 Struktureller Aufbau von ABC-Transportern

Die charakteristischen Domänen aller ABC-Transporter sind die ATPasen; sie sind hydrophile Proteine, die an der Innenseite der Zytoplasmamembran assoziiert und für die Energetisierung des Transportprozesses durch Spaltung von ATP zuständig sind. Trotz der weiten Verbreitung von ABC-Transportern und ihrer verschiedenen Substrate zeigen die Aminosäuresequenzen der ATPasen in der gesamten Familie eine beachtliche Konservierung (25-30% Sequenzidentität), (Davidson und Chen, 2004). ATPasen enthalten die typischen konservierten Sequenzen zur Bindung und Hydrolyse von Nukleotiden, die Walker Motive A und B sowie das LSGGQ-Motiv, welche essentiell sind für die Funktion der ATPasen (Walker *et al.*, 1982; Hung *et al.*, 1998). Die Kristallstrukturen einiger ATPasen aus verschiedenen prokaryotischen und eukaryotischen Transportern zeigen ebenfalls eine vergleichbare dreidimensionale Struktur, die keine Unterschiede zwischen

Importer und Exporter erkennen ließen (Davidson und Chen, 2004). Strukturelle Daten der ATPase HisP, die in unterschiedlichen Konformationen (im Komplex mit ATP oder mit ADP) vorliegen, zeigte dass diese ATPase während der ATP-Hydrolyse ihre Konformation ändert (Karpowich *et al.*, 2001; Linton *et al.*, 2003). Die beiden ATPasen eines funktionellen ABC-Transporters interagieren auch miteinander. Aufgrund von dimerisierten ATPasen während der Kristallisation existieren vier verschiedene Modelle für die Assoziation von ATPasen (HisP, MalK, ArsA und Rad50, ein DNA-Reparaturenzym mit Nukleotidbindestelle), wobei momentan das Modell von Rad50 favorisiert wird (Linton *et al.*, 2003; Schmitt und Tampé, 2002; Kerr, 2002).

Die Permeasen sind integrale Membranproteine, die aus mindestens fünf und bis zu zehn membrandurchspannenden Helices bestehen, wobei zwei gleiche Permeasen (Homodimer) oder zwei unterschiedliche Permeasen (Heterodimer) den Translokationsweg für das Substrat durch die Zytoplasmamembran bilden (Higgins, 2001; Davidson und Chen, 2004; Linton *et al.*, 1998). Der Translokationsweg eines Transporterkomplexes ist vermutlich je nach Substrat des entsprechenden Transporters konzipiert. Das Volumen des Translokationsweges und die Aminosäurereste, die den Translokationsweg auskleiden sind auf die Substrate abgestimmt (Higgins, 1992; Ehrmann *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu Kanalproteinen ist der Translokationsweg von ABC-Transportern nicht komplett durchgehend, sondern vermutlich entweder auf zytoplasmatischer oder periplasmatischer Seite durch eine Art „Tor“ verschlossen (Davidson, 2002; Locher, 2004). Experimente mit mutierten Transportern, die keine funktionellen Bindeproteine mehr besitzen zeigen, dass Permeasen eine interne Substratbindestelle mit niedriger Affinität enthalten (Speiser *et al.*, 1991; Shuman, 1982).

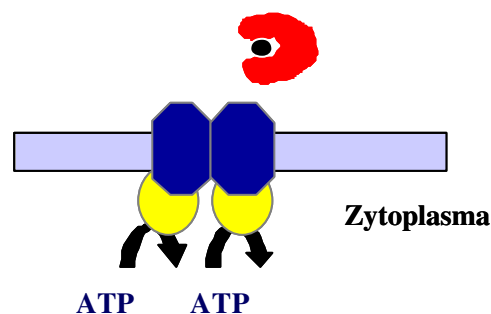


Abb. 6: Struktureller Aufbau eines ABC-Transporters.

Prokaryotische ABC-Importer bestehen aus einem Substratbindeprotein (rot), aus zwei Membrandurchspannenden Permeasen (blau) und aus zwei ATPasen (gelb). Permeasen und ATPasen liegen vermutlich immer als Dimer vor und bilden einen Translokationskomplex.

In einer *E. coli* Mutante, in dem das Maltosebindeprotein MalE nicht vorhanden ist, konnte ein Maltose-Transport festgestellt werden, wenngleich die Transportrate um den Faktor 1000 niedriger war als die Transportrate des Wildtyp Maltosetransporters. Diese Permease-interne Substratbindestelle konnte in MalF und MalG durch Mutagenesestudien nachgewiesen werden, sie ist wichtig für den Translokationsprozess des Substrates (Higgins, 1992;; Shuman, 1986; Treptow und Shuman, 1985; Shuman, 1982; Ehrmann *et al.*, 1998). ABC-Transporter haben einen gemeinsamen evolutionären Ursprung, dennoch ist die Konservierung von Aminosäureresten in den Transmembrandomänen eher gering. Vermutlich sind die strukturellen Anforderungen an die Transmembrandomänen für ihre Funktionalität durch eine Vielzahl verschiedener, alternativer Aminosäurekombinationen zu erfüllen (Higgins, 1992). Lediglich die Interaktionsstelle mit der ATPase, das EAA-Motiv, weist eine Konservierung in den Permeasen der ABC-Transporter auf (Dassa und Hofnung, 1985, Pearce *et al.*, 1992; Mourez *et al.*, 1997). In Eukaryoten sind die vier funktionellen Domänen (2 ATPasen, 2 Permeasen) zu einem Polypeptid fusioniert, in Prokaryoten können die vier Domänen als separate Polypeptide vorliegen, oder teilweise miteinander fusioniert sein (Permease-Permease; ATPase-ATPase, Permease-ATPase), (Higgins 1992).

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Transportern ist, dass bakterielle ABC-Importer immer ein Substratbindeprotein besitzen, wogegen eukaryotische ABC-Transporter mit Bindeproteinen bisher nicht gefunden worden sind (Higgins, 1992). Die externen Substratbindeproteine haben eine Art Rezeptorfunktion, sie erhöhen die Spezifität und Affinität des Transporters, sie können aber auch als Chemorezeptoren fungieren oder in Signaltransduktionen involviert sein (Tam und Saier, 1993). Die Substratspezifität des Bindeproteins ist in den meisten Fällen sehr eng und ist auf die Größe, die Form und die Ladung des jeweiligen Moleküls abgestimmt. Ein Beispiel für die mögliche Präzision in der Ligandenbindung sind die Substratbindeproteine für die Oxyanionen Sulfat und Phosphat. Beide Moleküle sind identisch in der Größe, der Form (Tetraeder) und der Gesamtladung, trotzdem werden sie in bakteriellen Zellen durch zwei verschiedene Transporter importiert. Der einzige Unterschied ist der pK_a , bei pH7 liegt Sulfat als SO_4^{2-} und Phosphat als HPO_4^{2-} vor. Dieser Unterschied in der Protonierung wird von den Substratbindeproteinen zur Unterscheidung ausgenutzt (Wang *et al.*, 1997; Pflugrath und Quioco 1988; Wilkinson und Verschueren, 2003).

Die Substratbindeproteine können im Falle von Gram-negativen Organismen frei im Periplasma diffundieren (Boos und Lucht, 1996), in Gram-positiven Organismen und den *Archaea* sind sie über einen Lipidanker in der Zytoplasmamembran verankert (Kempf und

Bremer, 1997; Braun und Wu, 1994; Fekkes und Driessen, 1999; Sutcliffe und Russel, 1995). Eine dritte Möglichkeit ist die Fusion des Substratbindeproteins an den N- oder C-Terminus der Permease, wie zum Beispiel im Falle des Glycin Betain Transporters OpuABC aus *La. lactis* (Obis *et al.*, 1999). Die Substratbindeproteine der ABC-Transporter unterscheiden sich in ihrer Primärsequenz erheblich voneinander, besonders wenn sie unterschiedliche Substrate binden (Higgins, 1992; Dwyer und Hellinga, 2004). Trotzdem besitzen alle bisher kristallisierten Substratbindeproteine einige strukturelle Gemeinsamkeiten. (I) Alle Substratbindeproteine bestehen aus zwei globulären Domänen von ähnlicher Topologie. (II) Die beiden globulären Domänen werden miteinander durch ein bis drei flexible Polypeptidketten des Proteins („hinge region“) verbunden. (III) Die Substratbindestelle des Proteins befindet sich in einer tiefen Spalte zwischen den beiden globulären Domänen. Die Substratbindung induziert eine großen Konformationsänderung („hinge bending motion“), in der sich die beiden Domänen aufeinander zubewegen und das gebundene Molekül in der vorgeformten Bindetasche einschließen (Quioco und Ledvina, 1996; Fukami-Kobayashi *et al.*, 1999; Sharff *et al.*, 1992; Dwyer und Hellinga, 2004). Der Entropiegewinn, der aus der Desolvatation des Liganden in der Ligandenbindetasche entsteht, liefert dabei die nötige Kraft, um die Domänen zu schließen. Der Mechanismus der Konformationsänderung wird verglichen mit dem Schließmechanismus einer Venusfliegenfalle (Mao *et al.*, 1982). Substratbindeproteine sind wichtig für den hochaffinen und hochspezifischen Transport von ABC-Transportern. Oft sind die Transportraten (K_M) der Transporter den Bindeaffinitäten der Substratbindeproteine (K_D) sehr ähnlich (Merino *et al.*, 1995; Davidson und Chen, 2004). Aufgrund der internen Substratbindestelle sind Substratbindeproteine nicht unbedingt essentiell für den Transportprozeß selbst. Die zweite wichtige Funktion von Substratbindeproteinen ist die Induktion der ATP-Hydrolyse durch die Bindung des Liganden-gebundenen Proteins an die Permease (Davidson *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 1999).

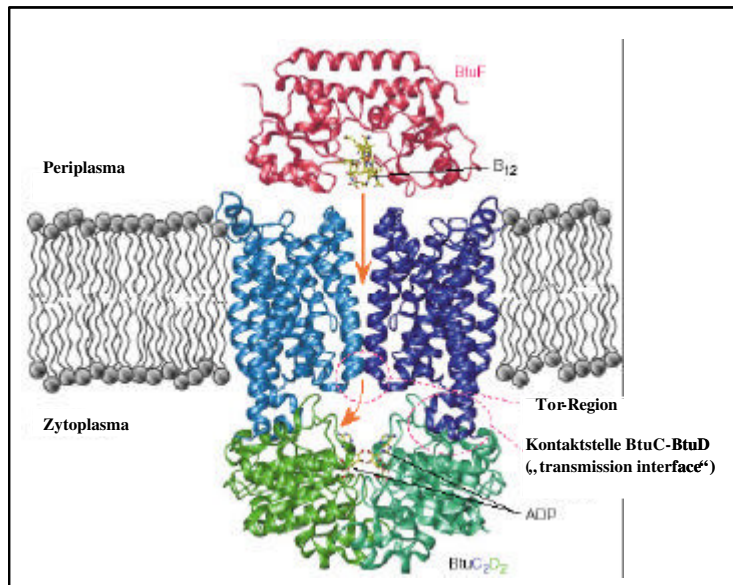
Eine phylogenetische Studie mit Substratbindeproteinen bekannter Kristallstruktur zeigte, dass die Substratbindeproteine vermutlich von einem gemeinsamen Vorläuferprotein abstammen, welches aus zwei CheY-ähnlichen Monomeren zunächst ein Dimer gebildet hat, das dann fusioniert sein könnte. Im Laufe der Evolution hat sich die Struktur der Substratbindeproteine dann in zwei Arten aufgeteilt. Der zweite Typ Substratbindeprotein unterscheidet sich darin, dass das $\beta 5$ -Faltblatt von der einen in die andere Domäne verlagert wurde, diese Umstrukturierung wurde benannt als „Domänen Dislokation“ (Fukami-

Kobayashi *et al.*, 1999). Eine phylogenetische Studie basierend auf den Sequenzähnlichkeiten der ATPasen und der anderen Transporterkomponenten, sowie der Bestimmung der Konservierung des Operons führten zu der Schlußfolgerung, das die ABC-Transporter sich vermutlich zu einem frühen Zeitpunkt in der Evolution entwickelt haben, möglicherweise bevor die Spezifikation in *Archaea* und *Bakteria* erfolgte. Da das Prinzip des Transportes durch ABC-Transporter und die Operonstruktur der Gene während der Evolution stark konserviert sind, verglichen mit der ausgedehnten Umstrukturierung von Genorten in den Bakterien, handelt es sich dabei um ein erfolgreiches Prinzip der Substrattranslokation (Tomii und Kanehisa, 1998).

3.4.2.2 Mechanismus der Substrattranslokation durch ABC-Transporter

Der Mechanismus der Substrattranslokation durch bindeproteinabhängige ABC-Transporter beginnt mit der spezifischen Bindung des Substrates. Für einige Substratbindeproteine, wie zum Beispiel dem Ribosebindeprotein Rbp (Björkmann und Mowbray, 1998), dem Bindeprotein für Leucin/Isoleucin/Valin LivJ aus *E. coli* (Trakhanov *et al.*, 2005) und auch dem Glycin Betain-Bindeprotein ProX aus *A. fulgidus* (Schiefner *et al.*, 2004b; Abb.13) konnten ligandenfreie und ligandengebundene Kristallstrukturen mit einer hohen Auflösung gezeigt werden. Der Vergleich der ligandenfreien und ligandengebundenen Strukturen legt nahe, dass der Öffnungs- und Schließungsmechanismus von Substratbindeproteinen auf eine Veränderung in den Torsionswinkeln der Hauptkette einiger weniger Aminosäurereste in den Verbindungssegmenten („hinges“) zurückzuführen ist (Wilkinson und Verschueren, 2003). Das gebundene Substrat wird durch das Substratbindeprotein an den Translokationskomplex in der Zytoplasmamembran überführt. Zu diesem Zweck muss das Substratbindeprotein mit den Permeasen in Kontakt treten, wobei die Permeasen die ligandenfreien und ligandengebundenen Formen unterscheiden können müssen (Wilkinson und Verschueren, 2003). Studien mit mutierten Histidin-, Maltose- und Ribosebindeproteinen ergaben, dass die Aminosäurereste, die für den Transportprozess wichtig sind, alle an der Oberfläche in der Nähe der Bindetasche, also gegenüber den flexiblen Segmenten liegen und auf beiden Domänen verteilt sind. Die Substratbindung induziert in den Proteinen eine große Konformationsänderung, so dass diese Aminosäuren nur in der geschlossenen Form in der Position liegen, die eine Interaktion mit der Permease erlauben. In der ligandenfreien Form ist die Interaktionsoberfläche für die Permeasen getrennt, dies legt nahe, dass jede der

beiden Domänen mit einer Permease interagiert (Hor und Shuman, 1993, Zhang *et al.*, 1992, Wilkinson und Verschueren, 2003).



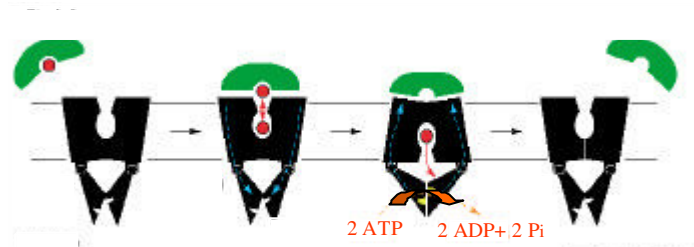
Aus: K. Locher, 2004; Current Opinion in Structural Biology

Abb. 7: Die Kristallstruktur des Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporters BtuCDF.

Die Kristallstruktur eines kompletten ABC-Transporters, des Vitamin B₁₂ Importers BtuC₂D₂F aus *E. coli*, belegt diese Interaktion zwischen Substratbindeprotein und Permeasen (Abb.7). In BtuF interagieren konservierte Glutamate auf der Oberfläche des Substratbindeproteins BtuF mit konservierten Argininresten auf den beiden Exemplaren der Permease BtuC (Borths *et al.*, 2002). Anhand der Kristallstruktur von BtuC₂D₂F und den bisher bekannten Daten (unter anderem aus der Lipidflippase MsbA (Chang und Roth, 2001) und Vanadat-Inhibitionsexperimenten mit MalEFGK (Chen *et al.*, 2001) mit dem Maltose Transporter aus *E. coli*) wurden zwei Mechanismen zur Substrattranslokation vorgeschlagen, die im Prinzip für eine Vielzahl anderer bakterieller ABC-Transporter gelten könnten (Abb. 8 A, B): Die Interaktion des beladenen BtuF Proteins mit den Permeasen erzeugt vermutlich ein Signal, das durch die Kontaktstelle zwischen BtuD und BtuC („BtuD-BtuC transmission interface“ Abb.7) zur ATPase BtuD übertragen wird. Das Substrat diffundiert in die Permease hinein; das BtuF Protein verbleibt an seiner Bindestelle und verhindert eine Rückdiffusion in das Periplasma. Das Signal, ausgelöst durch die Bindung von BtuF, fördert oder initiiert vermutlich auch die ATP-Hydrolyse. Durch die ATP-Hydrolyse verändern die ATPasen ihre Position zueinander und übertragen diese Bewegung auf die Permeasen, diese Konformationsänderung verschließt die Permease zur periplasmatischen Seite, das BtuF-Protein beendet seine Interaktion mit den Permeasen und diffundiert in das Periplasma. Gleichzeitig öffnet sich das Tor der Permeasen zum

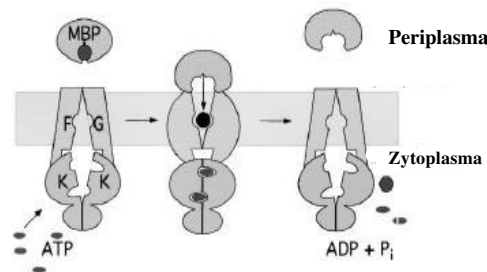
Zytoplasma und das Substrat kann aus dem Translokationsweg der Permeasen hinaus in das Zytoplasma diffundieren (Abb.8A) (Locher, 2004; Locher *et al.*, 2002; Borths *et al.*, 2002; Karpowich *et al.*, 2003; Locher und Borths, 2004).

A. BtuCD-Modell



Aus: Locher, 2004; Current Opinion in Structural Biology

B. MalFGK-Modell



Aus: Chen *et al.*, 2003; Molecular Cell

Abb. 8: Modelle des Transportmechanismus von Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportern.

Abbildung A zeigt das BtuCDF-Modell von Locher, 2004. Gezeigt ist der BtuCDF Transporter aus *E. coli*, in grün ist das Vitamin B₁₂ Bindeprotein BtuF gezeigt, in rot das Substrat Vitamin B₁₂. Der Transportzyklus läuft in vier Schritten ab. Der Translokationsweg ist im Grundzustand zur Periplasma-Seite geöffnet, nach der Bindung des beladenen BtuF-Proteins diffundiert das Substrat zur internen Bindestelle, unter ATP-Spaltung wird dann das Zytoplasma-Tor geöffnet und das Substrat gelangt in das Zytoplasma. In Abbildung B ist das MalFGK-Modell von Chen *et al.* gezeigt. In diesem Modell ist der Maltose Transporter aus *E. coli* gezeigt, im wesentlichen unterscheidet es sich von dem vorherigen Modell davon, das Tor zum Periplasma hin verschlossen und durch ATP-Spaltung geöffnet wird. Ein weiterer Unterschied ist die Konformationsänderungen der ATPasen. Die Abbildungen wurden aus Locher, 2004 und Chen *et al.*, 2003 entnommen

In dem Maltosetransporter wird ein weiteres Modell vorgeschlagen, das sich in Bezug auf die Konformationsänderung der ATPasen und der Lokalisation des Tores, welches den zentralen Translokationsweg verschließt, unterscheidet. Das Maltosetransporter-Modell postuliert ein zum Periplasma gerichtetes Tor und einen Translokationsweg, der offen zum Zytoplasma ist. Die ATP-Bindung in den ATPasen induziert das Schließen der ATPasen und damit eine Konformationsänderung, welche das Tor auf der Zytoplasmaseite schließt und das Tor auf der Periplasmaseite öffnet. Das Maltosebindeprotein bindet an die Permeasen und das Maltose-Molekül bindet mit der internen Bindestelle der Permeasen. ATP wird hydrolysiert und die Maltose gelangt in das Zytoplasma, während der

Translokationskomplex seine Ausgangstellung wieder einnimmt (Abb. 8B) (Davidson und Chen, 2004; Davidson, 2002; Chen *et al.*, 2003).

Die beiden Modelle verdeutlichen, dass sowohl das Signal durch die Bindung des beladenen Substratbindeproteins an die Permeasen, als auch die Konformationsänderungen der ATPasen von zentraler Bedeutung für den Translokationsprozess sind. Beide ATPasen müssen mit ATP beladen sein, ob für die Translokation ein ATP oder zwei ATP hydrolysiert werden muss ist noch nicht abschließend geklärt; vermutlich sind es aber zwei Moleküle ATP, die für ein Molekül transportierten Substrates verbraucht werden (Chen und Davidson, 2004). Neueste Untersuchungen mit dem BtuCDF-Transporter, zeigten, dass BtuF vermutlich an den Permeasen assoziiert bleibt, also nicht wie im obigen Modell nach der Abgabe des Substrates dissoziiert. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass BtuF eine vergleichsweise unflexible Architektur besitzt, die keine große Konformationsänderung („hinge bending motion“) unter der Substratbindung zulässt. Daher ist diese Beobachtung vermutlich nur für wenige Substratbindeproteine zutreffend (Borths *et al.*, 2005).

4. Der osmotisch regulierte ABC-Transporter ProU aus *E. coli*

Der bindeproteinabhängige ABC-Transporter ProU aus *E. coli* und sein Homolog in *S. enterica serovar typhimurium* (früher *S. typhimurium*) wurden zunächst als osmotisch induzierbare Prolin-Permeasen identifiziert (Gowrishankar, 1989). Spätere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei diesem Transporter um den Haupt-Importer für Glycin Betain und Prolin Betain handelt (Haardt *et al.*, 1995), der Prolin, sowie einige andere Solute, nur mit niedriger Affinität transportiert (Lucht und Bremer, 1994). In ProU bilden die ATPase ProV und die Permease ProW den Translokationskomplex vermutlich als Homodimere aus (Dattananda und Gowrishankar, 1989) (Abb.9). Das periplasmatische Substratbindeprotein ProX bindet die Substrate Glycin Betain ($K_D=1 \mu\text{M}$; Barron *et al.*, 1986; May *et al.* 1986) und Prolin Betain ($K_D=5 \mu\text{M}$; Haardt *et al.*, 1995) mit hoher Affinität, die den Transportraten des gesamten ProU-Transportern sehr ähnlich sind ($K_M \text{ Glycin Betain}=1,3 \mu\text{M}$). Unter hyperosmotischen Bedingungen wird die Synthese des Porins OmpC induziert, dieses in der äußere Membran lokalisierte Porin erlaubt die passive Diffusion von Glycin Betain und Prolin Betain in das Periplasma. ProX liefert die gebundenen Solute dem Translokationskomplex ProW₂-ProV₂ (Faatz *et al.*, 1988; Higgins *et al.*, 1990; May *et al.*, 1986; Cairney *et al.*, 1985). ProU zeigt eine deutlich geringere Transportrate für eine Reihe weiterer kompatibler Solute, darunter Prolin, Taurin, Ectoin, Cholin und andere Strukturanaloga zu Glycin Betain. Die niederaffinen Substrate scheinen dabei nicht durch

das ProX Protein gebunden zu werden, obwohl deren Transport ohne das Vorhandensein von ProX nicht funktioniert (Haardt *et al.*, 1995; Breed *et al.*, 2001).

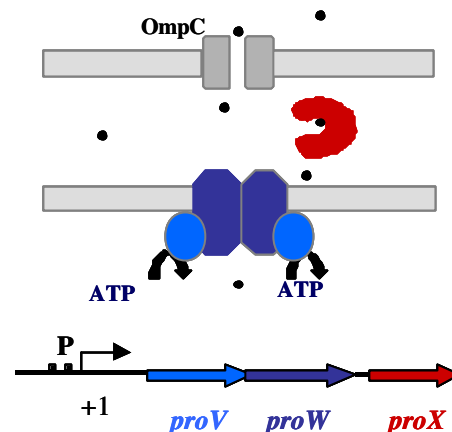


Abb. 9: Der ProU Transporter und das *proU* Operon aus *E. coli*

Die Abbildung zeigt die einzelnen Komponenten des ProU Transporters und seine Strukturgene, die in einem osmotisch regulierten Operon codiert sind. Der ProU Transporter besteht aus dem periplasmatischen Substratbindeprotein ProX (rot) und einem homodimeren Translokationskomplex aus der Permease ProW (dunkelblau) und der ATPase ProV (hellblau). Durch das Porin OmpC in der äußeren Membran von *E. coli* gelangt Glycin Betain unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen in das Periplasma und somit in den Bindungsbereich des ProX Proteins.

Die Strukturgene des ProU-Transporters sind in einem Operon codiert (Abb.9) und dessen Transkription wird durch eine deutliche Erhöhung der Osmolalität der Umgebung induziert (May *et al.*, 1986; Gowrishankar, 1989; Stirling *et al.*, 1989; Cairney *et al.*, 1985). Wird ein Schwellenwert überschritten, wird die Transkription induziert und der Transkriptionslevel des *proU*-Operons ist dabei direkt an die Medium-Osmolalität gekoppelt (Cairney *et al.*, 1985, May *et al.*, 1986; Lucht und Bremer, 1994; Gowrishankar *et al.*, 1986; Gowrishankar, 1989). Die Anzahl der ProU- Transporter wird also in einer sehr feinen Regulation durch die Stärke des osmotischen Stresses bestimmt. Die exakten Mechanismen dieser Feinregulation sind nicht komplett entschlüsselt.

4.1 Die Kristallstruktur des ProX Proteins aus *E. coli*

Das Substratbindeprotein ProX ($M_w=33,8$ kDa) bindet die Substrate Glycin Betain ($K_D=1\mu M$) und Prolin Betain ($K_D=5\mu M$) mit einer Bindekonstante im niedrigen mikromolaren Bereich. Die Kristallisation des ProX-Proteins mit Glycin Betain und Prolin Betain führte zu Kristallstrukturen, die bis $1,6 \text{ \AA}$ (Glycin Betain) und $2,1 \text{ \AA}$ (Prolin Betain) gelöst werden konnten (Breed *et al.*, 2001; Schiefner *et al.*, 2004a). Die ProX Struktur zeigt die klassischen Eigenschaften eines Substratbindeproteines; eine Struktur, die aus zwei globulären Domänen besteht, die mit zwei flexiblen Polypepidketten („hinges“) miteinander

verbunden sind (Abb.10 A). Zwischen den beiden globulären Domänen befindet sich die Substratbindestelle des ProX Proteins, die aus drei Tryptophanen (Trp-65, Trp-140 und Trp-188), sowie den Aminosäuren His-69, Gly-141 und Cys-142 gebildet wird (Abb. 10B). Die Tryptophane bilden dabei eine Art Box („Trp-box“) um das quartäre Amin des Glycin Betains. Die Bindung von Prolin Betain wird durch die gleichen Aminosäuren bewirkt wie im Falle des Glycin Betain Moleküls (Abb. 50, Diskussion).

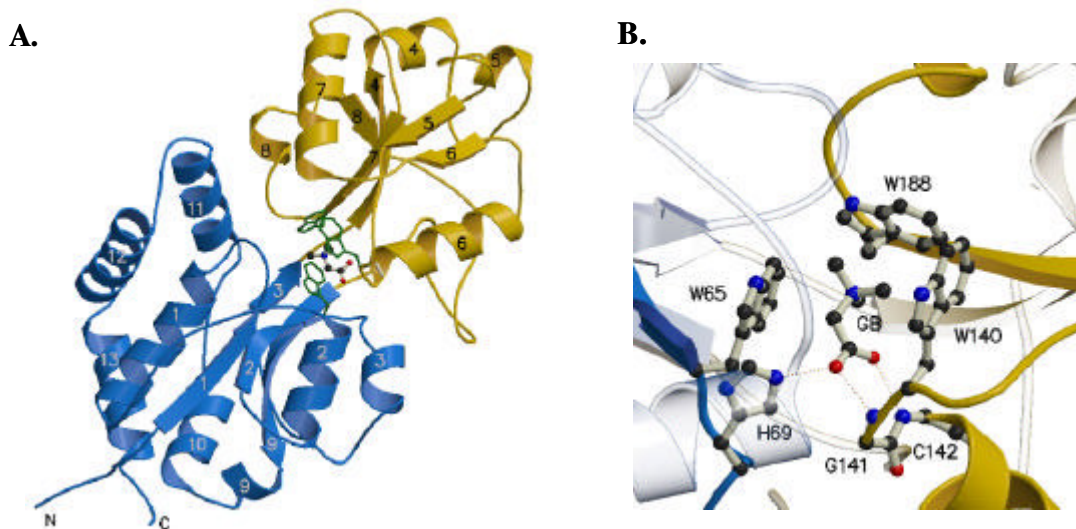


Abb. 10: Die Kristallstruktur des Substratbindeproteins ProX aus *E. coli* mit gebundenem Glycin Betain und die Ausschnittsvergrößerung der Substratbindestelle. Abbildung A zeigt die Gesamtstruktur von ProX mit gebundenem Glycin Betain. Abbildung B zeigt eine Ausschnittsvergrößerung der Bindetasche mit den bindungsrelevanten Aminosäuren; der Trp-Box aus Trp-65, Trp-140 und Trp-188 sowie den Aminosäuren His-69, Gly-141 und Cys-142. Die Abbildungen wurden von A. Schiefner (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt.

5. Der ABC-Transporter ProU des hyperthermophilen Archaeons *A. fulgidus*

Das hyperthermophile Archaeon *A. fulgidus* wurde aus der Nähe hydrothermalen Quellen isoliert und besitzt ein Wachstumsoptimum von 83°C. Als mariner Mikroorganismus ist *A. fulgidus* permanent erhöhter Salinität ausgesetzt und muss auf Schwankungen in Salzgehalt und auch in der Umgebungstemperatur reagieren können (Stetter *et al.*, 1987, Achenbach-Richter *et al.*, 1987). Die dominanten kompatiblen Solute in diesen Archaeen sind Di-myoinositolphosphat (DIP), welches hauptsächlich bei supraoptimalen Temperaturen akkumuliert wird und Diglycerolphosphat (DGP), welches osmoprotektiv wirkt und proportional zur Osmolalität akkumuliert wird (Martins, *et al.*, 1997; Lamosa *et al.*, 1998; da Costa und Santos, 2002). Durch Analysen der Genomsequenz wurde bei gezielten Suchen nach Transportproteinen der *proU*-Genlokus entdeckt (Klenk *et al.*, 1997), der als ABC-Transporter für die kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain identifiziert wurde (Holtmann, 2002). Der ProU-Transporter besteht aus der ATPase ProV, die vermutlich als

Homodimer vorliegt und mit dem Heterodimer der Permeasen ProW1 und ProW2 den Translokationskomplex bildet (Abb.11). Das Substratbindeprotein ProX ($M_w=31$ kDa) ist vermutlich über eine Lipidmodifikation in der Zytoplasmamembran verankert (Holtmann, 2002) (Abb.10). In Wachstumsexperimenten und Western blot-Analysen wurde demonstriert, dass der ProU-Transporter die kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain nicht zur Osmoprotektion, sondern zur Thermoprotektion importiert. Infolge dessen ist die transkriptionelle Regulation dieses *proU*-Operons durch Hitzestress, und nicht durch osmotischen Stress gesteuert (Holtmann, 2002). In *E. coli* führte eine durch Salzstress verursachte Akkumulation von Glycin Betain zu einer deutlichen Verringerung der durch Hitzestress verursachten Proteinaggregation. Es wird vermutet, dass kompatible Solute mit dem unter Hitzestress massiv synthetisierten Chaperonen zusammenwirken (Diamant *et al.*, 2001). *In vitro* Experimente mit dem Enzym Malat-Dehydrogenase zeigte einen positiven Effekt von kompatiblen Soluten (zum Beispiel Glycin Betain) auf die Faltungsaktivität von Chaperonen; durch die Anwesenheit der kompatiblen Solute wurde die Rückfaltungsrate hitzedenaturierter Malat-Dehydrogenase deutlich erhöht (Diamant *et al.*, 2001).

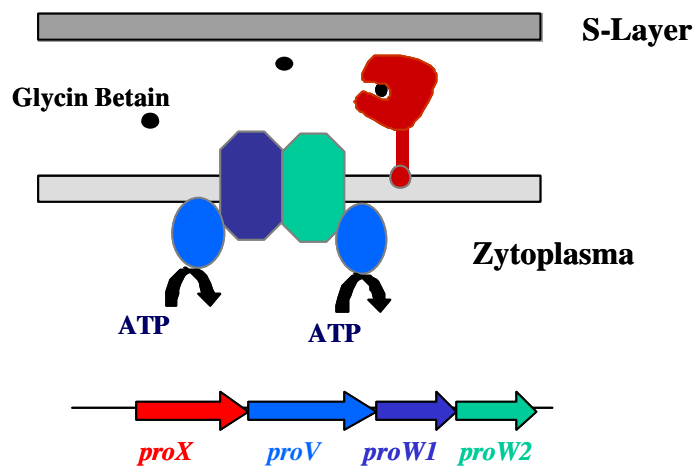


Abb. 11: Der ProU-Transporter und das *proU* Operon aus *A. fulgidus*.

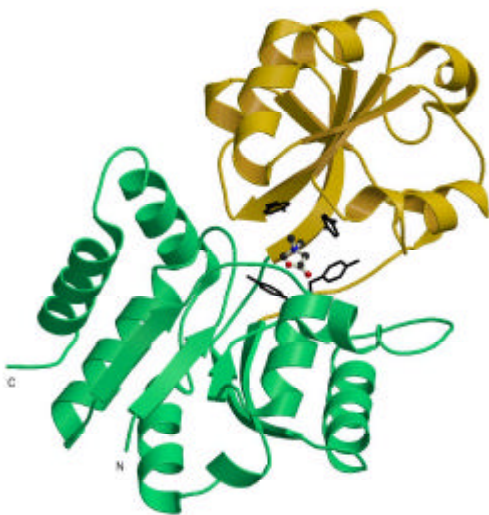
Der ProU Transporter besteht aus dem Substratbindeprotein ProX (rot), das durch einen Lipidanker an die Zytoplasmamembran gebunden ist, den Permeasen ProW1 (dunkelblau) und ProW2 (türkis) die zusammen ein Heterodimer bilden und dem Homodimer der ATPase ProV (hellblau). Die Strukturgene des Transporters sind in einem hitzedinduzierbaren Operon codiert.

5.1 Die Kristallstruktur des ProX Proteins aus *A. fulgidus*

Die heterologe Expression des *A. fulgidus* ProX Proteins und dessen Reinigung zu apparenter Homogenität ermöglichten die Charakterisierung des ProX Proteins als hochaffines Glycin Betain ($K_D=60$ nM) und Prolin Betain ($K_D= 50$ nM) Bindeprotein (Holtmann, 2002). Kristallisationsexperimente ermöglichten neben einer hochauflösenden

Struktur des Proteins mit gebundenem Glycin Betain (2,1 Å) (Abb. 12A, B), Prolin Betain (1,9 Å) und Ammoniumions (1,9 Å), auch die ligandenfreie Kristallisation (1,8 Å) (Abb.13). Die Gesamtstruktur des Proteins mit gebundenem Liganden (Glycin Betain) zeigt signifikante strukturelle Übereinstimmungen mit dem *E. coli* ProX Protein, obwohl die Aminosäuresequenzübereinstimmung nur 21% beträgt (Schiefner *et al.*, 2004b). Die beiden globulären Domänen des Bindeproteins sind wie auch in *E. coli* ProX durch zwei flexible Polypeptidketten miteinander verbunden (Abb.12A). Die Substratbindestelle zwischen den beiden Domänen besteht aus vier Tyrosinen (Tyr-63, Tyr-111, Tyr-190 und Tyr-214) sowie den Aminosäuren Asp-109, Lys-13, Thr-66 und Arg-149 (Abb. 12B).

A.



B.

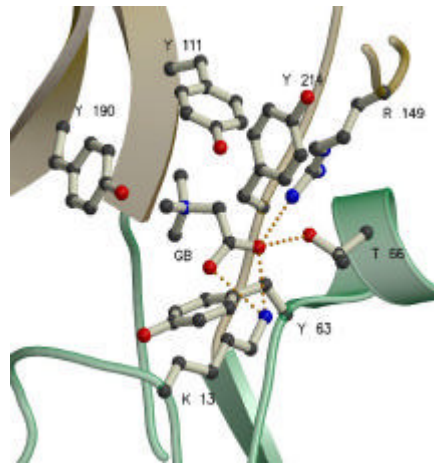


Abb. 12: Kristallstruktur des ProX Proteins aus *A. fulgidus* mit gebundenem Glycin Betain.

Abbildung A zeigt die Gesamtstruktur des ProX Proteins mit gebundenem Glycin Betain, das erhebliche strukturelle Ähnlichkeit zu dem ProX Protein aus *E. coli* besitzt. Abbildung B ist eine Ausschnittsvergrößerung der Substratbindestelle und zeigt die an der Bindung beteiligten Aminosäuren: Die Tyr-3, Tyr-111, Tyr-190 und Tyr-214, die den Tyr-Gürtel bilden sowie die Aminosäuren Asp-109, Lys-13, Thr-66 und Arg-149. Die Abbildungen wurden von A. Schiefner (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt.

Die Tyrosine bilden eine Art Gürtel („Tyr-Gürtel“) um das quartäre Amin des Glycin Betains (Schiefner *et al.*, 2004b). Diese Aminosäuren sind in der Bindung von Glycin Betain und auch von Prolin Betain beteiligt. Ein Vergleich der offenen, ligandenfreien Kristallstruktur des ProX Proteins mit der Struktur des Proteins mit gebundenem Glycin Betain demonstriert die Konformationsänderung, die das Protein nach der Substratbindung durchläuft (Abb.13). In ProX aus *A. fulgidus* ist dabei ersichtlich, dass sich das Protein nicht nur nach dem Venusfliegenfallen-Modell (Mao *et al.*, 1982) schließt, sondern dass die Domäne B zuvor noch eine rotierende Bewegung durchführen muss, um die Bindestelle

schließen zu können. Eine Überlagerung der bindungsrelevanten Aminosäuren aus ligandenfreier und ligandengebundener Kristallstruktur zeigen, dass sich lediglich die Domäne B auf Domäne A zubewegt (Schiefner *et al.*, 2004b).

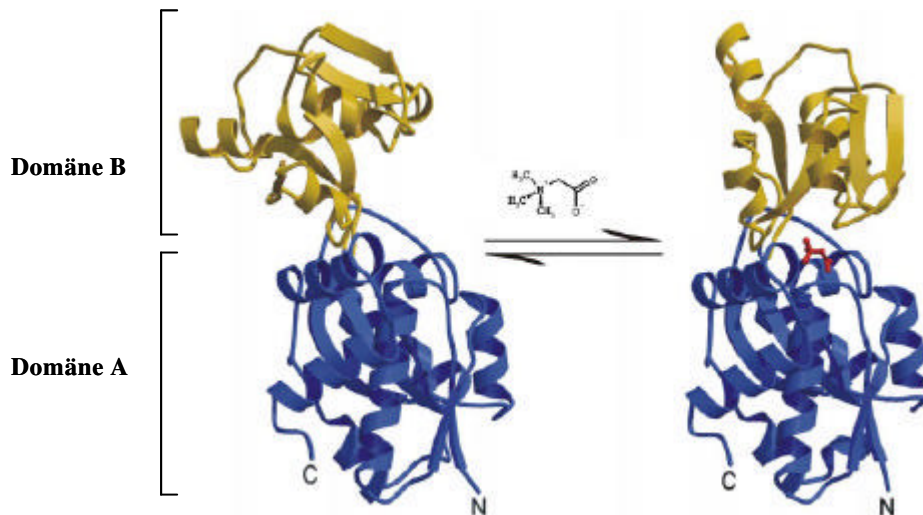


Abb. 13: Konformationsänderung des ProX-Proteins aus *A. fulgidus* durch die Bindung von Glycin Betain. Die Abbildung zeigt die Kristallstrukturen des ligandengebundenen und des ligandenfreien ProX Proteins aus *A. fulgidus* und deutet die Bewegung der Domäne B an, die während der Substratbindung vollzogen wird. Die Abbildung wurde aus Schiefner *et al.*, 2004b entnommen.

6. Der osmotisch regulierte ABC-Transporter OpuA aus *B. subtilis*

OpuA ist in *B. subtilis* unter hyperosmotischem Stress, aber auch unter Hitze- und Kältestress der Haupttransporter für die kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain (Kempf und Bremer, 1995; Holtmann und Bremer, 2004; Brigulla *et al.*, 2003). Damit ist OpuA ein physiologisch wichtiger Transporter für *B. subtilis*, obwohl dieser Mikroorganismus noch vier weitere Transporter für kompatible Solute besitzt. Der Translokationskomplex von OpuA besteht aus den beiden Homodimeren der ATPasen OpuAA (Horn *et al.*, 2003) und den Permeasen OpuAB (Horn *et al.*, 2005). Das Substratbindeprotein OpuAC ist über einen Lipidanker in der Zytoplasmamembran verankert (Kempf *et al.*, 1997). OpuAC ist ein weiteres Substratbindeprotein mit hoher Affinität zu Glycin Betain ($K_D=17 \mu\text{M}$) und nur geringer Affinität zu Prolin Betain ($K_D=295 \mu\text{M}$) (Horn *et al.*, 2005; Horn *et al.*, 2006a im Druck). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von OpuAC aus *B. subtilis* mit dem Substratbindeprotein des OpuABC Transporters aus *La. lactis* zeigte eine Inversion in der Aminosäuresequenz (Obis *et al.*, 1999). Die kürzlich gelöste Kristallstruktur von OpuAC ($1,95 \text{ \AA}$ mit gebundenem Glycin Betain) zeigte eine Gesamtstruktur, die vergleichbar ist zu der Gesamtstruktur der Glycin Betain Bindeproteine ProX aus *A. fulgidus* und ProX aus *E. coli* (Abb.14A). Die

Substratbindetasche des OpuAC Proteins besteht aus drei Tryptophanen (Trp-72, Trp-178 und Trp-225) die mit den Aminosäuren Gly-26, Ile-27 und His-230 das Substrat Glycin Betain binden (Abb.14B). Die Tryptophane sind in einer Prisma-artigen Form angeordnet und unterscheiden sich damit in der Anordnung von der Trp-Box des ProX -Proteins aus *E. coli* (Schiefner *et al.*, 2004a; Horn *et al.*, 2006a, im Druck).

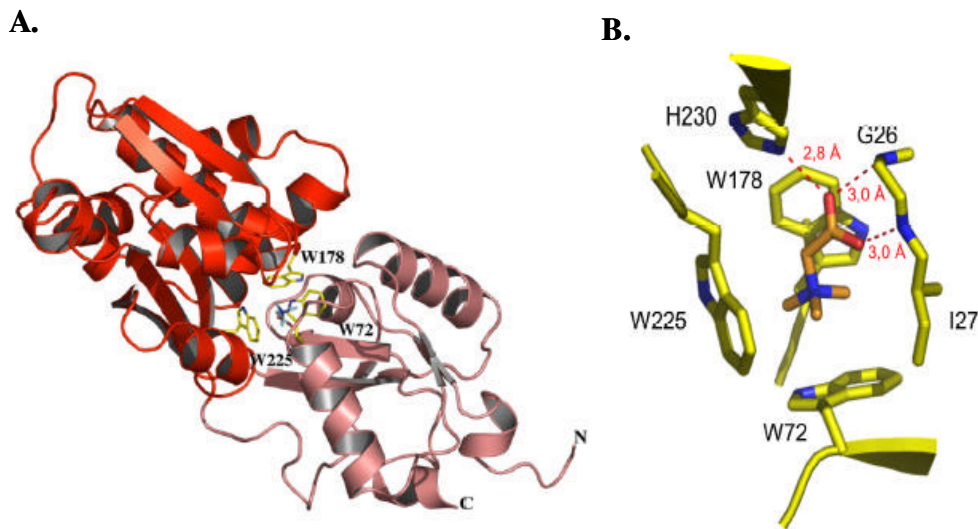


Abb. 14: Die Gesamtstruktur des Substratbindepotein OpuAC aus *B. subtilis* mit gebundenem Glycin Betain und die Ausschnittsvergrößerung der Substratbindetasche. Abbildung A zeigt die Gesamtstruktur des Substratbindepoteins, Abbildung B die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren: Trp-72, Trp-178 und Trp-225 die zusammen ein Trp-Prisma bilden sowie die Aminosäuren Gly-26, Ile-27 und His-230. Die Abbildungen wurden von L. Schmitt (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

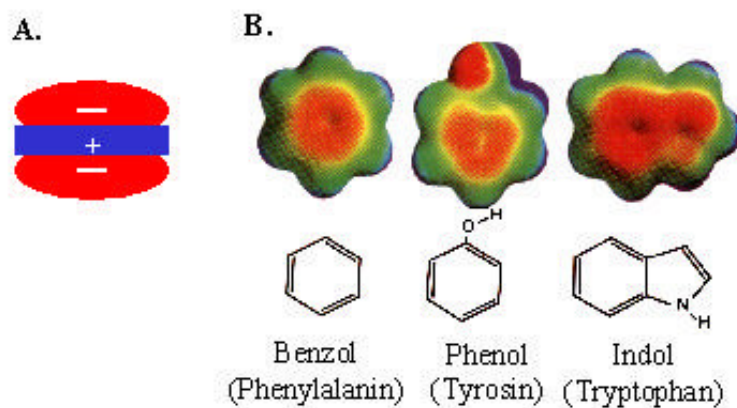
7. Kation-pi-Interaktionen

Die Kristallstrukturen der hochaffinen Substratbindepoteine für Glycin Betain und Prolin Betain, ProX aus *E. coli*, ProX aus *A. fulgidus* und OpuAC aus *B. subtilis* erlauben einen Einblick auf die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren (Schiefner *et al.*, 2004a; Schiefner *et al.*, 2004b, Horn *et al.*, 2006a im Druck). In diesen drei Substratbindepoteinen wurde beobachtet, dass die quartären Amine der Substrate von aromatischen Aminosäuren umgeben werden und diese das Substrat vermutlich über Kation-pi-Interaktionen binden.

Kation-pi Interaktionen beschreiben eine nichtkovalente Bindungskraft zwischen den pi-Elektronen, zum Beispiel eines aromatischen Systems, und Kationen oder partiell positiv geladene Moleküle (Ma und Dougherty, 1997; Dougherty, 1996). Die Interaktion kann beschrieben werden, als eine elektrostatische Anziehung zwischen einer positiven Ladung und dem Quadrupolmoment eines Aromaten (Dougherty, 1996). In Proteinen sind die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Benzol), Tyrosin (Phenol) und Tryptophan

(Indol) die Partner für Kation- π Interaktionen. Diese aromatischen Ringsysteme besitzen ein sogenanntes Quadrupolmoment, welches im Prinzip aus zwei Dipolen besteht, die so zusammengelagert sind, dass keine Nettoladung entsteht. Topologisch gesehen ist ein Quadrupol äquivalent zu d-Orbitalen, der Quadrupol im Benzen ist äquivalent zu einem d_{z^2} Orbital. Daraus entsteht eine permanente Ladungsteilung mit Regionen von relativer positiver und negativer Ladung (Abb.15A). *Ab initio* Kalkulationen von Molekülen mit aromatischen Resten zeigen das elektrostatische Potential des aromatischen Ringes, dies ist eine gute Möglichkeit, einen Quadrupol zu visualisieren (Ma und Dougherty, 1997). In einer Studie wurden die elektrostatischen Potentiale von verschiedenen biologisch relevanten Molekülen durch *ab initio* Kalkulationen bestimmt, darunter auch die aromatischen Komponenten der aromatischen Aminosäuren (Dougherty, 1996; Mecozzi *et al.*, 1996), (Abb.15B). Die Stärke der elektrostatischen Potentiale (bestimmt wurde die Bindungsenergie zu Na^+) ist unterschiedlich in den drei aromatischen Aminosäuren, wobei der Indolring des Tryptophanes mit $32.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ das stärkste Potential besitzt und die des Benzolringes ($27,1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) und des Phenolringes ($26,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) ungefähr gleich stark sind. Je nach Interaktionspartner kann die Hydroxylgruppe des Phenols auch eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden, dann erhöht sich die Bindungsenergie und liegt ungefähr im Bereich der Bindungsenergie eines Indolringes (Mecozzi *et al.*, 1996). Kation- π -Interaktionen finden nur innerhalb einer sehr kurzen Distanz statt, der Abstand zwischen dem Kation und dem Aromaten in einer Kation- π -Interaktion ist auch eine typische Distanz für van der Waals-Kontakte. Die Distanz in einem Na^+ -Benzol Komplex, vom Zentrum des Benzolringes zum Zentrum des Kations, beträgt zum Beispiel 2.4 \AA (Ma und Dougherty, 1997). Bestimmt man die van der Waals Radien von Kohlenstoffatomen der beiden Kation- π -Interaktionspartner (zum Beispiel die eines Phenolringes und die Kohlenstoffatome des quartären Amins von Glycin Betain, siehe Abb.11) und vergleicht diese mit einer veröffentlichten Liste von van der Waals Radien (Li und Nussinov, 1998) kann man eine van der Waals Interaktion postulieren (Schiefner *et al.*, 2004a). Eine erhöhte Anzahl von van der Waals Kontakten zwischen den Trimethylammoniumgruppen eines Glycin Betains und der Ringstruktur der Aromaten ist ein guter Hinweis für Kation- π -Interaktionen. In Proteinen spielen Kation- π Interaktionen eine wichtige Rolle, die π -Elektronen der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan interagieren mit den positiv geladenen Aminosäuren Arginin oder Lysin und spielen eine wichtige Rolle in der Faltung und Stabilisierung der Proteinstruktur (Burley und Petsko, 1986, Gallivan und Dougherty, 1999). Eine weit verbreitete Anwendung von Kation- π -Interaktionen in

Proteinen aus Prokaryoten und Eukaryoten ist die Bindung von Kationen oder partiell positiv geladenen Molekülen, wie zum Beispiel das Ni^+ Bindeprotein des Nik Transporters aus *E. coli* (Hedde *et al.*, 2003) oder die Bindung von Cholin-Derivaten in Enzymen oder aber auch in Neurorezeptoren (z.B. Acetylcholin durch die Acetylcholinesterase, Ordentlich *et al.*, 1993; Scrutton und Raine, 1996; Phosphatidylcholin durch die Phospholipase C aus *B. cereus*; Martin *et al.*, 2000, Bindung von GABA durch den GABA-Rezeptor, Lummis *et al.*, 2005).



Aus: D. A. Dougherty, 1996, Science 271, 163-168

Abb. 15: Ladungsteilung eines Benzolringes und *ab initio* Kalkulationen der aromatischen Ringe der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Abbildung A zeigt die Ladungsteilung des Quadrupolmoments von Benzen, Abbildung B zeigt die *ab initio* Kalkulationen und damit das elektrostatische Potential von den aromatischen Ringe der Aminosäuren Phe, Tyr und Trp. Positive Ladung ist in blau, negative Ladung in rot dargestellt. Die Abbildungen wurden aus Dougherty, 1996 entnommen.

8. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, wie Substratbindeproteine kompatible Solute mit hoher Affinität und Spezifität binden können, wo diese doch präferentiell von Proteinoberflächen ausgeschlossen werden. Dazu wurden die hochaufgelösten Kristallstrukturen der ProX-Proteine der beiden hochaffinen ProU Transporter für die kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain aus *E. coli* und *A. fulgidus* genutzt. Die Strukturen der Bindeproteine zeigten, dass ihre Substratbindestellen unter anderem aus einer Reihe aromatischer Aminosäuren bestehen, in *EcProX* wird Glycin Betain von drei Tryptophanen („Trp-Box“), in *AfProX* von vier Tyrosinen („Tyr-Gürtel“) koordiniert. Dies führte zu der Vermutung, dass Kation- π -Interaktionen maßgeblich an der Bindung beteiligt sind. Durch ortsgerichtete Mutagenese in den Substratbindestellen, die Reinigung und Vermessung der mutierten Proteine sollte die Beteiligung von Kation- π -Interaktionen an der Substratbindung bewiesen werden, und die Beteiligung der einzelnen Aromaten an der Bindung charakterisiert werden. Des Weiteren wurde in *AfProX* die Beteiligung der Aminosäuren ermittelt, welche die Carboxylgruppen der Substrate fixieren.

Ectoin ist bekanntermaßen eine weit verbreitete Schutzsubstanz. Die Entdeckung eines Ectoin-induzierten putativen Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporters in *S. meliloti* (Jebbar *et al.*, 2005) ermöglicht erstmals die Untersuchung der Bindung von Ectoinen an ein Bindeprotein eines ABC-Transporters. Daher sollte das putative Ectoin-Bindeprotein überproduziert und charakterisiert werden. Zur Ermittlung der an der Bindung beteiligten Aminosäuren sollte das Protein in einer Kooperation mit L. Schmitt kristallisiert und seine Struktur zu einer hohen Auflösung gelöst werden.

Durch Datenbankanalysen der Aminosäuresequenzen sollte die Verbreitung des Bindungsprinzips untersucht werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien und Reagenzien

Sofern im Text nicht gesondert darauf hingewiesen wird, stammen die verwendeten Chemikalien von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen). Die Bestandteile der Komplexmedien Luria Bertani stammten von Becton Dickinson (Augsburg). Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Polymerasen wurden von Amersham Biosciences (Freiburg), NEB (Schwalbach), Eppendorf (Hamburg), Promega (Mannheim), MBI Fermentas (Heidelberg) oder Stratagene (Heidelberg) bezogen.

1.1 Verwendete kompatible Solute

Glycin Betain wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Prolin Betain (Stachydrinhydrochlorid) stammte von Extrasynthèse (Frankreich). Ectoin und Hydroxyectoin stammten von BIOMOL (Hamburg) oder Bitop (Witten). Homobetain wurde von G. Nau-Wagner (Universität Marburg) synthetisiert (Bellenger *et al.*, 1968).

1.2 Radiochemikalien

[1-¹⁴C]-Glycin Betain (55 mCi*mmol⁻¹) stammte von American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, Mo; USA), ¹⁴C-markiertes Ectoin (0,161 mmol*mCi⁻¹) wurde freundlicherweise von M. Jebbar (Universität Rennes, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

2. Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide

Die verwendeten *Escherichia coli*-Stämme sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Der verwendete Stamm *Sinorhizobium meliloti* 102F34 wurde von M. Jebbar (Rennes, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die Mutanten Stämme von *Sinorhizobium meliloti* 102F34; R3-76, R3-74 und R4-25, wurden im Labor von M. Jebbar hergestellt (Jebbar *et al.*, 2005) und bereitgestellt; die Stämme sind beschrieben in Tabelle 2. Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet oder hergestellt wurden, sind in Tabelle 3 aufgelistet, Oligonukleotide in Tabelle 4.

Tab. 1: *Escherichia coli* – Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
MC4100	<i>F Δ(argF-lac)U169 araD139 rpsL150 ptsF25flbB5301 rbsR deoC1 relA1</i>	(Casabadan, 1976)
MKH13	<i>MC4100 Δ(betTIBA)^a U169 Δ(putPA)101 Δ(proP)2 Δ(proU)608 [Spc^r]</i>	(Haardt, 1993)
Epicurian coli® XL1 blue superkompetente Zellen	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F⁺proAB lac^qZΔM15 Tn10 (tet^r)]</i>	Stratagene, Heidelberg
BL21	<i>F gal met r^m hsdS(λDE3)</i>	(Stratagene, Heidelberg)
LinE2	<i>PD141 Δ(proU ::spcr)608 [λDE3]</i>	(Bösser, 2001; Schiefner <i>et al.</i> , 2004)
PD141	<i>MC4100 [λDE3]</i>	Dersch, 1995 Dersch <i>et al.</i> , 1994

a: *betTIBA* Gencluster wird durch *Δ(argF-lac)U169* aus dem Genom von MC4100 entfernt

Tab. 2: *Sinorhizobium meliloti* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 102F34	<i>S. meliloti</i> Wildtyp Derivat [Str ^r]	M. Jebbar <i>et al.</i> , 2005
R3-76	102F34 (<i>ehuA::pSUP102</i>) [Tc ^r] [Str ^r]	M. Jebbar <i>et al.</i> , 2005
R3-74	102F34 (<i>eutA::pSUP102</i>) [Tc ^r] [Str ^r]	M. Jebbar <i>et al.</i> , 2005
R4-25	102F34 (<i>smb20436::pSUP102</i>) [Tc ^r] [Str ^r]	M. Jebbar <i>et al.</i> , 2005

Tab. 3 : Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pSK7	pPD101-Derivat mit <i>proW</i> und <i>proX</i> (<i>Sall-EcoRI</i>), Cml ^r , T7Ø10-Promotor	(Breed <i>et al.</i> , 2001)
Codon ⁺ RIL	Codiert für in <i>E.coli</i> seltene tRNAs für Arginin, Isoleucin und Leucin	Stratagene, Heidelberg
pASK- IBA6	Überexpressionsvektor mit Strep-Tag und <i>ompA</i> -Signalsequenz	IBA, Göttingen
pLB2	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-188 gegen Ala (TGG → GCC)	(Bösser, 2001)
pLB3	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-188 gegen Leu (TGG → CTG)	(Bösser, 2001)
pLB4	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-188 gegen Phe (TGG → TTC)	(Bösser, 2001)
pLB5	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-188 gegen Tyr (TGG → TAC)	diese Arbeit, (Bösser, 2001)
pLB6	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-140 gegen Ala (TGG → GCC)	(Bösser, 2001)
pLB7	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-140 gegen Leu (TGG → CTG)	(Bösser, 2001)
pLB8	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-140 gegen Phe (TGG → TTC)	(Bösser, 2001)
pLB9	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-140 gegen Tyr (TGG → TAC)	(Bösser, 2001)
pLB10	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-65 gegen Ala (TGG → GCC)	(Bösser, 2001)
pLB11	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-65 gegen Leu (TGG → CTG)	diese Arbeit, (Bösser, 2001)
pLB12	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-65 gegen Phe (TGG → TTC)	diese Arbeit, (Bösser, 2001)
pLB13	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-65 gegen Tyr (TGG → TAC)	(Bösser, 2001)
pLB14	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-188 gegen Asp (TGG → GAT)	(Bösser, 2001)
pLB15	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-188 gegen Glu (TGG → GAA)	(Bösser, 2001)
pLB16	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-140 gegen Asp (TGG → GAT)	(Bösser, 2001)
pLB17	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-140 gegen Glu (TGG → GAA)	(Bösser, 2001)

Fortsetzung Tab. 3:

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pLB18	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-65 gegen Asp (TGG → GAT)	(Bösser, 2001), diese Arbeit
pLB19	pSK7-Derivat; Cml ^r :Mutation in <i>proX</i> : Austausch von Trp-65 gegen Glu (TGG → GAA)	(Bösser, 2001), diese Arbeit
pLB20	pLB10-Derivat; Cml ^r : Doppelmutante mit Austausch von Trp-65 gegen Ala (pLB10) und Trp-140 gegen Ala (TGG → GCC)	diese Arbeit
pLB22	pASK-IBA6-Derivat, trägt <i>ehuB</i> aus <i>S. meliloti</i>	diese Arbeit
pGH26	pASK-IBA6-Derivat, trägt <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i>	(Holtmann, 2002)
pLB25	pGH26 – Derivat; Cml ^r : Austausch von Tyr-214 gegen Ala	diese Arbeit
pLB26	pGH26 – Derivat; Cml ^r : Austausch von Tyr-190 gegen Ala	diese Arbeit
pLB28	pGH26 – Derivat; Cml ^r : Austausch von Tyr-111 gegen Ala	diese Arbeit
pLB29	pGH26 – Derivat; Cml ^r : Austausch von Tyr-63 gegen Ala	diese Arbeit
pLB30	pGH26 – Derivat; Cml ^r : Austausch von Lys-13 gegen Ala	diese Arbeit
pLB31	pGH26 – Derivat; Cml ^r : Austausch von Thr-66 gegen Ala	diese Arbeit
pLB32	pGH26 – Derivat; Cml ^r : Austausch von Arg-149 gegen Ala	diese Arbeit
pLB35	pLB29 - Derivat; Cml ^r : Doppelmutante mit Austausch von Tyr-63 gegen Ala und Tyr-111 gegen Ala	diese Arbeit
pLB36	pLB29 - Derivat; Cml ^r : Doppelmutante mit Austausch von Tyr-63 gegen Ala und Tyr-190 gegen Ala	diese Arbeit
pLB37	pLB29 - Derivat; Cml ^r : Doppelmutante mit Austausch von Tyr-63 gegen Ala und Tyr-214 gegen Ala	diese Arbeit
pLB38	pLB26 - Derivat; Cml ^r : Doppelmutante mit Austausch von Tyr-190 gegen Ala und Tyr-111 gegen Ala	diese Arbeit
pLB39	pLB26 - Derivat; Cml ^r : Doppelmutante mit Austausch von Tyr-190 gegen Ala und Tyr-214 gegen Ala	diese Arbeit
pLB40	pLB28 - Derivat; Cml ^r : Doppelmutante mit Austausch von Tyr-111 gegen Ala und Tyr-214 gegen Ala	diese Arbeit

Tab. 4: Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz	Lage, Bemerkung
Y63A fwd	CGACATTCAGCTTTATGTTGAGGCAACGG GCACCGCCTACAACG	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Tyr 63 gegen Ala aus
Y63A rev	CGTTGTAGGCGGTGCCCGTTGCCTCAACA TAAAGCTGAATGTTCG	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Tyr 63 gegen Ala aus
Y111A fwd	GGATTCAGGGATGACGCAGCCCTCGCCG TTAGAGCGGG	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Tyr 111 gegen Ala aus
Y111A rev	GGAATTCAGGGATGACGCAGCCCTCGCC GTTAGAGCGG	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Tyr 111 gegen Ala aus

Fortsetzung Tab.4:

Oligonukleotid	Sequenz	Lage, Bemerkung
Y190A fwd	CAGGTTGACGTAATACCGGCAGCAACAA CCGATTCGAGAGTTGACC	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Tyr 190 gegen Ala aus
Y190A rev	GGTCAACTCTCGAATCGGTTGT <u>TGCTG</u> CC GGTATTACGTCAACCTG	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Tyr 190 gegen Ala aus
Y214A fwd	GGAGCTTTACCTCCTGCAGATGCGATAAT AATCGTCAATGGC	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Tyr 214 gegen Ala aus
Y214A fwd	GCCATTGACGATTATTATCGCATCT <u>TGCAG</u> GAGGTAAAGCTC	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Tyr 214 gegen Ala aus
K13A fwd	GGTTATAGGTTTCAGCACCCCTTCAACGAGC AGTACATTCTTGCG	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Lys 13 gegen Ala aus
K13A rev	CGCAAGAATGTACTGCTCGTTGAAGGGT <u>GCTGAACCTATAACC</u>	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Lys 13 gegen Ala aus
T66A fwd	GAGTATACGGGC <u>GCAGC</u> CTACAACGTAA TCCTGAGAAAGC	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Thr 66 gegen Ala aus
T66A rev	GCTTTCTCAGGATTACGTTGTAGGCT <u>TGCG</u> CCCGTATACTC	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Thr 66 gegen Ala aus
R149A fwd	CCCGAATTTGCCAGCGCACCTGACGGCTT GCCGC	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Arg 149 gegen Ala aus
R149A rev	GCGGCAAGCCGTCAGGT <u>TGC</u> GCTGGCAAA TTCGGG	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Arg 149 gegen Ala aus
D109A fwd	GCCAAGCTCGGATTCAGGG <u>CAG</u> ACTACG CCCTCGCC	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Asp 109 gegen Ala aus
D109A rev	GCGGAGGGCGTAGTCT <u>TGCC</u> CCTGAATCCG AGCTTGCC	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>A. fulgidus</i> , tauscht Asp 109 gegen Ala aus
BsmFI-y20428 fwd	(A) ₅ GGGAC(A) ₁₀ GCGCGACGAGAACAAGC TCGAGGAG	Klonierungsprimer, für <i>ehuB</i> aus <i>S. meliloti</i> über BsmFI-Schnittstelle in pASK-IBA 6
BsmFI-y20428 rev	(A) ₅ GGGAC(A) ₁₀ TATCTTATTTTCGCGGCGC AGAGCTTTTC	Klonierungsprimer, für <i>ehuB</i> aus <i>S. meliloti</i> über BsmFI-Schnittstelle in pASK-IBA 6
W140A fwd	CCGGTTGTAACCCTGGC <u>GCC</u> GGCTGCGA AGGTGCG	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>E. coli</i> , tauscht Trp-140 gegen Ala aus
W140A rev	CGCACCTTCGCAGCC <u>GCG</u> CCCAGGGTTA CAACCGG	Mutageneseprimer für <i>proX</i> aus <i>E. coli</i> , tauscht Trp-140 gegen Ala aus
pASK-IBA forward ^a	GTGAAATGAATAGTTCGAC	Sequenzierprimer für pASK-IBA-Vektoren
pASK-IBA reverse ^a	CGCAGTAGCGGTAAACGG	Sequenzierprimer für pASK-IBA-Vektoren
Int W140 fwd ^a	AAAGATCCGAAGATCGCC	Sequenzierprimer für <i>proX</i> aus <i>E. coli</i> , stromaufwärts von Trp140
<i>proX</i> intern rev ^a	GGGAAGCCATAATTCGCACC	Sequenzierprimer für <i>proX</i> aus <i>E. coli</i> , stromabwärts von Trp188

Fortsetzung Tab.4:

Oligonukleotid	Sequenz	Lage, Bemerkung
<i>proX</i> intseq rev ^a	TCGGCCATCATCGCTGCG	Sequenzierprimer für <i>proX</i> aus <i>E. coli</i> , stromaufwärts von
<i>proX</i> rev	GGCATTGTGCACAGAACGG	Sequenzierprimer für <i>proX</i> aus <i>E. coli</i> , stromaufwärts von <i>proX</i>

a: Oligonukleotide, die für Sequenzreaktionen verwendet wurden, sind am 5'-Ende mit dem fluoreszierenden Farbstoff IRD800 (Infrared dye 800) markiert. Diese Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt.

3. Kulturmedien, Zusätze und Wachstumsbedingungen

3.1 Medien

3.1.1 Vollmedien

Das Vollmedium Luria-Bertani-Broth (LB) wurde wie beschrieben hergestellt (Miller, 1992, Sambrook *et al.*, 1989). Das MSY-Medium (Mannitol-Salz-Hefe) für *S. meliloti* wurde nach der Vorschrift bereitgestellt von M. Jebbar (Universität Rennes) hergestellt, die Komponenten des Mediums sind in Tabelle 5 aufgeführt. Festmedien enthielten zusätzlich 16 g/l Agar.

3.1.2 Minimalmedien

Für die Überexpressionen von ProX *E. coli*, ProX *A. fulgidus*, EhuB, ChoX und OpuAC wurde das Minimalmedium A (MMA) verwendet, (Miller, 1992), dem 0,5% Glukose und 0,5 % Casamino-säuren und 1 mg*I¹ Thiamin hinzugefügt wurden. Nach dem Autoklavieren wurde 1% Glukose als Kohlenstoffquelle, 1 mM MgSO₄, 1 mg*I¹ Thiamin und 4,2 mg *I¹ FeH₂SO₄ zugegeben. Als Minimalmedium für die Wachstumsexperimente mit den *S. meliloti*-Stämmen wurde das Minimalmedium LAS (Laktat Aspartat Salz) verwendet (Jebbar *et al.*, 2005), (Tab.5).

Tab. 5: MSY- und Minimalmedium für *S. meliloti*

Komponente	Stammlösung (L)	MSY-Medium (L)	LAS -Medium (L)
Macro I (pH7) (10 x)	3 g KH ₂ PO ₄ 3 g Na ₂ HPO ₄ 1 g MgSO ₄	100 ml	100 ml
MacroII (10x)	0,5 g CaCl ₂	100 ml	100 ml
MicroI (81000x)	1 g H ₃ BO ₃ 0,1 g ZnSO ₄ 0,05 g CuSO ₄ 0,05 g MnCl ₂ 0,01 g Na ₂ MoO ₄	1 ml	1 ml
MicroII (1000x)	0,1 g FeCl ₃	1 ml	1 ml
MicroIII (1000x)	10 mg Biotin/50 ml dH ₂ O	1 ml	1 ml
Laktat	1 M Na-Laktat	-	10 ml
Aspartat	1 M Na-Aspartat	-	10 ml
Mannitol	-	1 g Mannitol	-
Hefextrakt	-	1 g Hefextrakt	-

Die Stammlösungen 1 M Laktat und 1 M Aspartat wurden in den LAS-Medium ohne Laktat und Aspartat gelöst. Festmedien enthielten zusätzlich 16 g/l aufgereinigter Agar. Für die Überproduktionen, die zum Markieren von EhuB (und ChoX) mit Selenomethionin diente, wurde modifiziertes M9 Medium (Pro Liter Medium: 6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0,5 g NaCl; nach dem Autoklavieren wurden 1 % Glukose, 1 mM MgSO₄, 1 mg/ml Thiamin, 4,2 mg FeH₂SO₄ zugegeben) verwendet.

3.2 Kompatible Solute und Antibiotika

Den Medien wurde bei Bedarf die in Tabelle 6 aufgelisteten kompatiblen Solute und Antibiotika zu den angegebenen Endkonzentrationen aus sterilen Stammlösungen zugesetzt. Chloramphenicol wurde in Ethanol gelöst, Ampicillin wurde in Wasser gelöst. Stammlösungen von kompatiblen Soluten, die in Wachstumsexperimenten der *S. meliloti* Stämmen verwendet wurden, sind in Medium gelöst worden.

Tab. 6: Kompatible Solute und Antibiotika

Substanz	Endkonzentration	
	<i>E.coli</i>	<i>S. meliloti</i>
Glycin Betain ^a	-	1 mM/ 10 mM
Prolin Betain ^b	-	-
Ectoin ^c	-	1 mM/ 10 mM
Hydroxyectoin ^d	-	1 mM/ 10 mM
Ampicillin	150 µg/ml	-
Chloramphenicol	30 µg/ml	-
Streptomycin	-	100 µg/ml

^a: N,N,N-trimethylglycin; ^b: Stachydrinhydrochlorid, ^c: 2-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylat, ^d: 2-Methyl-5-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylat

3.3 Sterilisation

Die Medien MSY und LAS für *S. meliloti* wurden bei 110°C für 30 min bei 0,5 bar Überdruck dampfsterilisiert. Alle anderen Medien und Puffer wurden für 20 Minuten bei 121°C und einem bar Überdruck autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert und Glaswaren für 3 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert.

3.4 Wachstum

3.4.1 Wachstumsbedingungen für *E. coli* und *S. meliloti*

E.coli

Kulturen von 5 ml wurden in Kulturröhrchen auf einem Roller inkubiert. Kulturvolumina von 20 – 500 ml wurden in Erlenmeyerkolben in Wasserbädern oder Luftinkubatoren mit 220 rpm geschüttelt. Überexpressionskulturen von 2-5 L wurden in 5 L- Erlenmeyerkolben, bzw. 10 L – Fermenterflaschen mit einem Rührfisch versehen und auf einem Magnetrührer durch Rühren belüftet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in allen Fällen bei 37°C.

S. meliloti

Kulturen von 5 ml, verwendet für die Präparation chromosomaler DNA, wurden in Kulturröhrchen auf einem Roller bei 37°C inkubiert. Kulturvolumina von 50 ml – 100 ml wurden in Erlenmeyerkolben in Wasserinkubatoren bei 30°C kultiviert. In Wachstumsexperimenten werden die *S. meliloti* - Stämme zunächst ca 40 Stunden in 50 ml

MSY-Medium kultiviert, da diese Stämme bei direktem Inokulieren in LAS-Medium nicht wachsen. Zur Inokulation des LAS-Mediums wird die MSY-Vorkultur abzentrifugiert und das Zellpellet mit LAS-Medium resuspendiert auf eine optische Dichte von $OD_{578}=10$. Dieses Vorgehen verhindert, dass MSY-Medium und Stoffwechselprodukte aus der Vorkultur mit in die Wachstumskulturen im LAS Medium gelangen.

3.4.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur von *E. coli* und *S. meliloti* wurden photometrisch durch die Messung der optischen Dichte in einem Spektralphotometer (Ultrospec III, Amersham Biosciences, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD_{578}) bestimmt.

4. Molekularbiologische und genetische Methoden

4.1 Präparation von DNA

4.1.1 Präparation von Plasmid – DNA

Für die Isolierung von Plasmid – DNA wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet (Birnboim & Doly, 1979). Plasmid-Präparationen die zur Mutagenese oder Sequenzierung verwendet werden sollten, wurden mit dem QIAGEN Plasmid Midi-Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Plasmide, die das *proX* – Gen von *E. coli*, oder dessen Derivate tragen, wurden mit einer leicht modifizierten Methode (L. Bösser, 2001) des QIAGEN Plasmid Midi-Kits präpariert.

4.1.2 Präparation chromosomaler DNA

Chromosomale DNA aus *S. meliloti* wurde aus 5 ml LB-Kultur präpariert, die bis zum Ende der exponentialen Phase gewachsen ist. Die Kultur wurde abzentrifugiert und in 500 μ l TES-RNase ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) resuspendiert. Nach einer kurzen Inkubation bei Raumtemperatur wurde 50 μ l 10% SDS hinzugefügt und weitere 5 min inkubiert. Die Extraktion der chromosomalen DNA erfolgte durch Zugabe von 500 μ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (v/v) (25:24:1) die kräftig gemischt wird mittels eines Vortex (Bender und Hobein AG, Zürich). Zur Trennung der Phasen wird 10 Minuten bei 8500 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wird von der Lösungsmittelphase vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze getrennt. Die wässrige Phase wird ein zweites mal mit der obigen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung auf gleiche Weise behandelt. Es folgt eine Chloroform-Isoamylalkohol-Behandlung (v/v)(24:1) der wässrigen Phase, die nur noch sehr vorsichtig durch invertieren gemischt werden darf. Die Phasentrennung erfolgt abermals durch Zentrifugation bei 8500 g für 10 Minuten. Die wässrige Phase wird überführt und die DNA mit einem 2-3 fachen Volumen eiskalten unvergällten Ethanol gefällt, hierbei das Gemisch durch invertieren durchmischen, bis sich ein Knäuel chromosomaler DNA gebildet hat. Dies kann mit einer Pasteurpipette entnommen werden.

Die chromosomale DNA wird für 30 min mit einer 70%igen Ethanol-Lösung inkubiert und anschließend abzentrifugiert (8500 g 10 Minuten bei Raumtemperatur). Das Pellet wird getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

4.1.3 Bestimmung von DNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit von DNA-Präparationen wurde photometrisch (Ultrospec III, Amersham Biosciences, Freiburg) durch die Messung der Absorption bei 260nm und 280 nm bestimmt. Eine A_{260} von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) gibt über die Reinheit der DNA Aufschluß (Sambrook *et al.*, 1989).

4.2 Klonierungstechniken

4.2.1 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden Ansätze von 20-100 µl Gesamtvolumen verwendet. Für jedes eingesetzte µg DNA wurde mindestens eine Enzymeinheit (U) Restriktionsenzym eingesetzt und im entsprechenden Puffer für 1-4 Stunden inkubiert bei der Temperatur, die vom Hersteller empfohlen wurde. Bei Angabe des Herstellers wurde in das Reaktionsgemisch BSA hinzugegeben.

4.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in 0,7-2%-igen Agarosegelen in TAE-Puffer durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Als Größenstandard wurde mit BstEII verdaute λ-DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Die DNA wurde in einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml) 20 Minuten lang gefärbt und dann durch UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und mit einer Kamera und einem Videoprinter (INTAS, Göttingen) dokumentiert.

4.2.3 Isolieren von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch Gelelektrophorese in „low-melting Agarose“ (peqlab, Erlangen) aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA-haltigen Agarosefragmente wurden bei 70°C in einem Eppendorf Reaktionsgefäß geschmolzen und mit 1ml Resin (66,84 g Guanidin-Hydrochlorid in 33,3 ml Merlin III Puffer (61,35 g Kaliumacetat, 35,7 ml Essigsäure ad 500 ml H₂O)) mit 2 g Diatomeenerde (ICN, Ohio, USA) versetzt und 15 Minuten unter gelegentlichem Invertieren bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde auf ein Filtersäulchen (Promega, Mannheim) aufgetragen, wobei die Diatomeenerde mit gebundener DNA auf der Filtersäule verblieb. Die DNA wurde abschließend mit 2 ml 80% Isopropanol gewaschen und mit 30µl-60 µl Wasser eluiert, je nach Konzentration des Fragmentes im Gel.

4.2.4 Ligationen

Die verdauten Fragmente und Vektoren wurden in einem Verhältnis von ca 100 ng Vektor und 5-facher, beziehungsweise 10-facher Überschuß des zu ligierenden Fragments mit 1 Enzymeinheit Ligase (Roche, Mannheim) gemischt und 4-16 Stunden bei 4°C inkubiert.

4.2.5 Transformation von *E. coli* mittels Elektroportation

Die Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurde nach der Methode von Ausubel *et al.*, 1994 durchgeführt. Für die Transformation von Ligationsansätzen wurde zuvor eine Dialyse gegen destilliertes Wasser durchgeführt, um die Salze aus dem Ligationsansatz zu entfernen. Zu diesem Zweck wurden 2-5 µl des Ligationsansatzes auf ein Membranfilterplättchen mit einer Porengröße von 0,02 µm (Typ VS, Millipore, Schwalbach) pipettiert und dann 20 Minuten auf destilliertem Wasser schwimmend bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elektroporation von Ligationsansätzen und präparierten Plasmiden erfolgte mit dem „BioRad-Gene-Pulser“ (BioRad, München). Bei der Durchführung wurden die Angaben des Herstellers („Bacterial electrotransformation and pulse controler instruction manual. Version 1.0“) befolgt.

4.3 Polymerasekettenreaktion und Bestimmung der Nukleotidsequenz

4.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von *ehuB* aus der chromosomalen DNA von *S. meliloti* erfolgte nach dem Standardprotokoll von White (1993). Als Polymerase wurde die Pfu-Turbo® DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde in einem Trio-Thermoblock-Cycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

4.3.2 Ortsgerichtete Mutagenese

4.3.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese mittels PCR-Technik

Die ortsgerichtete Mutagenese in den Genen von *proX* aus *E. coli* und *proX* aus *A. fulgidus* wurde mit dem „QuikChange™ site-directed mutagenesis kit“ (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Für diese PCR-Mutagenese wurden Oligonukleotide benötigt, in deren Sequenz das jeweils gewünschte Codon ausgetauscht wurde, also eine Aminosäure gegen eine andere ersetzt wurde. Diese Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben erstellt und sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Die Komponenten der PCR-Reaktionen wurden streng nach Angaben des Herstellers zusammengestellt und inkubiert (Trio-Thermoblock-Cycler, Biometra, Göttingen). Die Reaktion wurde abschließend noch 1 Stunde mit DpnI bei 37°C verdaut, um die parentalen Plasmide, die für das Enzym durch eine Methylierung erkennbar ist, zu zerschneiden

4.3.2.2 Hitzeimpuls-Transformation der mutagenisierten Plasmide

Die mutagenisierten Plasmide wurden nach einem Verdau durch DpnI durch Hitzeimpuls – Transformation nach Herstellerangaben in den dafür empfohlenen Stamm (Epicurian coli® XL-1 blue) eingebracht. Die Notwendigkeit des Stammes Epicurian coli® XL-1 blue liegt darin, dass er die Plasmide, die nach einer PCR-Mutagenese linear sind, wieder zu einem geschlossenen Plasmid ligieren kann.

4.3.3 DNA-Sequenzierung

Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe der Dideoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) bestimmt. Dazu wurde entweder das „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit mit 7-deaza-GTP (GE Healthcare), oder (MBI Fermentas) verwendet. In die Sequenzreaktionen wurden jeweils 2 pmol Sequenzier-Oligonukleotide (TabX4) und 1-2 µg DNA eingesetzt. Die am 5'-Ende mit dem Fluoreszenz-Farbstoff IRD800 markierten Oligonukleotide wurden von MWG bezogen. Die Sequenzierreaktionen wurden in einem Trioblock (Biometra) nach Herstellerangaben inkubiert. Für die Auftrennung der Produkte und deren Detektion wurde ein Li-Cor DNA-Sequencer Modell 4000 (MWG) verwendet. Die Sequenzgele wurden aus „Sequagel XR ultrapure“ und „Sequagel complete ultra pure“ (Biozym) nach Angaben des Herstellers gegossen. Die Sequenzierung wurde mit der Software ImageIR von MWG durchgeführt.

4.3.4 Computergestützte Sequenzanalysen

Die Sequenzen wurden mittels halbautomatischer ImageIR-Software von MWG ausgelesen. Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe der Lasergene Programme von DNASTar Ltd. oder Vektor NTI (Invitrogen).

4.4 Konstruktion von Plasmiden

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Plasmide sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die dazu verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgeführt. Alle konstruierten Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft.

pLB5, pLB11, pLB12, pLB18, pLB19 pLB20: Diese Plasmide sind Derivate des pSK7 und tragen das *E. coli proW*-Gen und ein durch ortsgerichtete Mutagenese verändertes *proX* – Gen hinter einem T7-Polymerase-induzierbaren Promoter. Die Plasmide wurden zur homologen Überexpression der mutagenisierten ProX-Proteine verwendet. Die Herstellung der Plasmide wurden in meiner Diplomarbeit begonnen und sind dort ebenfalls beschrieben (Bösser, 2001). Die Aminosäuren, die jeweils in den Plasmiden ausgetauscht wurden sind der Plasmidtable 3 zu entnehmen.

pLB22: Das Plasmid pLB22 dient zur Überexpression des Substratbindeproteins EhuB aus *Sinorhizobium meliloti*. Die Aminosäuresequenz von EhuB enthält eine für *S. meliloti* gebräuchliche Signalsequenz, die für die Exkretion des Proteins in das Periplasma sorgt. Diese Signalsequenz wurde mit dem Programm SignalIP auf der Internetseite <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> bestimmt. Für die heterologe Expression in *E. coli* wurde *ehuB* so amplifiziert, dass das Protein nach seiner Überexpression ohne diese Signalsequenz vorlag, also um 27 Aminosäuren am N-terminus verkürzt. Das *ehuB* Gen wurde mit den Oligonukleotiden BsmFI-y20428 fwd und BsmFI-y20428 rev aus dem Genom von *S. meliloti* amplifiziert. Diese Oligonukleotide führen jeweils eine BsmFI-Schnittstelle ein. Das PCR-Produkt und der Vektor pASK-IBA6 wurden mit BsmFI verdaut, über ein präparatives Agarosegel gereinigt und anschließend ligiert. Das *ehuB*-Gen liegt somit hinter einem Anhydrotetrazyklin-induzierbaren Promoter (Skerra, 1994) und enthält nach seiner Überexpression N-terminal zusätzlich eine OmpA- Signalsequenz zur Exkretion in das Periplasma von *E. coli*, einem Strep-TagII Affinitätstag und einer Faktor Xa-Schnittstelle.

pLB25, pLB26, pLB29-pLB32, pLB35-pLB40: Unter Verwendung des Parental-Plasmids pGH26 (Holtmann, 2003), welches das *proX*-Gen aus *A. fulgidus* hinter einem Anhydrotetrazyklin-induzierbaren Promoter enthält, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese einzelne Aminosäuren (pLB25, pLB26, pLB28-pLB33) ausgetauscht, oder zwei Aminosäuren ausgetauscht (pLB35-pLB40). Die Aminosäuren, die jeweils in den Plasmiden ausgetauscht wurden sind der Plasmidtable 3 zu entnehmen.

5. Biochemische Methoden

5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Kontrolle der Überexpression von Proteinen und Reinheitskontrolle der Proteine in aufeinanderfolgenden Reinigungsschritten wurde das Prinzip der denaturierenden Gelelektrophorese eingesetzt (Laemmli, 1970). Diese Methode wurde ebenfalls verwendet zur Auftrennung der gesamten Proteine eines Zellextraktes. Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Elektrophorese-Kammern der Firma Biorad (München) verwendet. Die Zusammensetzung der Mini-Gele (8,0 * 6,0 * 0,1 cm³) ist in Tabelle 7 aufgeführt. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer (62,5 mm Tris/HCl pH 6,8; 4% (w/v) SDS; 4 % (w/v) 2-Mercaptoethanol 10 mM DTT, 17,4 / (w/v) Glycerin und 0,002% (w/v) Bromphenolblau auf einen Gehalt von ca. 2,5 mg/ml eingestellt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von 35 mA in Laufpuffer (50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1% SDS (w/v)). Als Größenstandard diente der Dalton Marker VII (Sigma, Deisenhofen). Zur Färbung der Proteinbanden wurden die Gele in der Färbelösung (0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250 in Wasser/Isopropanol/Eisessig (65:25:10,(v/v/v)) auf ca. 80°C erhitzt und anschließend 15 Minuten lang inkubiert. Das Entfernen von nicht gebundenem Farbstoff erfolgte anschließend in einer Mischung aus Wasser/Isopropanol/Eisessig (81:12:7, (v/v/v)).

Tab. 7: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele:

Lösungen	Zusammensetzung
Acrylamid/Bisacrylamid Sammelgel	30% Stammlösung, Verhältnis (37,5:1) 15 %-ig: 5 ml Acrylamidlösung; 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) mit 0,1% SDS; 2,5 ml H ₂ O; 20 µl Temed ^a (Roth); 50 µl 10 % APS ^b
Trenngel	3 %-ig: 1 ml Acrylamidlösung; 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) mit 0,1% SDS; 6,5 ml H ₂ O; 20 µl Temed ^a (Roth); 50 µl 10 % APS ^b

^a: Ammoniumperoxidisulfat. ^b: N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

5.2 Bestimmung des Proteingehalts

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden mit dem „BCA Protein Assay Kits“ (Pierce, Rockford) durchgeführt. In diesem Test beruht die Detektion von Proteinen auf der Biuret-Reaktion, einer Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch ein Protein in alkalischem Medium. Das reduzierte Cu¹⁺ wird mit einer sensitiven kolorimetrischen Detektion von durch ein Bichinonsäure-haltiges Reagenz quantifiziert. Der Test wurde mit Proben in geeigneter Verdünnung nach Herstellerangaben durchgeführt und bei 562 nm vermessen.

Alternativ wurde der Proteingehalt mit dem „Roti-Nanoquant-Mikroassay“ von Roth (Karlsruhe) bestimmt. In diesem Test beruht der Proteinnachweis auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue R250 von 465 nm auf 595 nm in saurer Lösung. Diese Verschiebung resultiert aus der Bindung des Farbstoffes an das Protein (Bradford, 1976). Die Proben wurden in geeigneten Verdünnungen mit Rotiquant-Reagenz (Roth) 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 595 nm vermessen. Zur Kontrolle der Proteinbestimmung wurde gelegentlich eine photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt. Dabei wurde die Absorption verschiedener Verdünnungen des Proteins bei 280 nm in zwei Ansätzen bestimmt und ein Mittelwert gebildet (M_{Abs}). Die Berechnung erfolgte über die Formel:

$$A_{(280)} = \epsilon_{(Protein)} / M_{W(Protein)}$$

$$\text{mg/ml} = (M_{Abs}) / A_{(280)}$$

5.3 Überexpression und Reinigung von ProX Wildtyp Protein und der mutierten ProX Proteine aus *E. coli*

5.3.1 Homologe Überexpression von *E. coli* ProX Wildtyp und mutierten *E. coli* ProX Proteinen

Zur Überproduktion des Wildtyp ProX wurde pSK7 in den *proU* Deletionsstamm LinE2 (Bösser, 2001) mittels Elektroporation transformiert; für die mutierten ProX das entsprechende Plasmid (pLB2-pLB20). Der Parentalstamm von LinE2, PD141 besitzt in seinem Genom integriert eine IPTG-induzierbares Gen für die T7-Polymerase. Für die Überproduktion von Wildtyp – und mutierten ProX wurden 2 x 2L MMA mit 30 µg·ml⁻¹ Chloramphenicol mit einer Übernachtskultur auf OD₅₇₈=0,1 inokuliert und bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₅₇₈= 1,0-1,5 wurde die T7Ø10-vermittelte Expression induziert durch die Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration). Die Kulturen wurden 1 Stunde nach der Induktion durch Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde mit einem 30 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,3 gewaschen und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

5.3.2 Periplasmatischer Aufschluss und Reinigung von *E. coli* ProX

Das ProX Protein von *E. coli* ist ein periplasmatisches Protein und besitzt eine Signalsequenz, die den Transport des produzierten Proteins in das Periplasma steuern. Die produzierten ProX-Proteine konnten durch eine Extraktion des Periplasma von den Protoplasten getrennt werden. Dies wurde nach der Methode des kalten osmotischen Schocks nach Neu und Heppel (1965) durchgeführt. Ein Zellpellet aus 2 L Kultur wurde zunächst in 30 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,3 resuspendiert, in einen Zentrifugenbecher geeigneter Größe überführt und mit einem Rührfisch versehen, und bei 5700 g 25 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde unter stetigem Rühren vorsichtig gelöst mit 120 ml 30 mM Tris/HCl pH7,3 40% Saccharose. Die Zellsuspension wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die Zellen bei 12.000 g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich entfernt und die Zellen mit 40 ml eiskalter 0,5 mM MgCl₂-Lösung versetzt und 1 Stunde auf Eis gerührt. Die löslichen periplasmatischen Proteine werden nun durch Zentrifugation von den Protoplasten getrennt, dies erfolgt bei 12.000 g in 15 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde für die FPLC-Reinigung durch einen Filter (Porengröße 4-7 µm, Ø 150 mm; Schleicher & Schüll, Dassel) vorgereinigt und anschließend durch Ultrazentrifugation (1 Stunde bei 120000 g) von feineren Partikeln getrennt. Als ersten FPLC-Reinigungsschritt wurde das Periplasmaextrakt mit einem schwachen Anionenaustauscher, der DEAE-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) gereinigt. Dazu wurden 100 ml Chromatographiematerial in eine XK 26/40 Säule (GE Healthcare) gepackt, eine Flußrate von 2 ml*min⁻¹ eingestellt und mit 2 Säulenvolumen 16 mM Tris/HCl pH8,3 preequilibriert. Nach der Auftragung des Periplasmaextraktes wurde das gebundene Protein mit 2 Säulenvolumen 16 mM Tris/HCl pH 8,3 gewaschen. Die Elution von ProX wurde mittels eines steigenden Tris/HCl – Gradienten von 16 mM bis 400 mM bewirkt (Barron *et al.*, 1987), das Gradientenvolumen betrug 350 ml. ProX eluierte zwischen 150-200 mM Tris/HCl-Konzentration, dies wurde durch eine SDS-PAGE festgestellt. Das weitere Reinigungsprotokoll von Barron *et al.* (1987) wurde modifiziert von Breed *et al.* (2001), um den Reinheitsgrad der ProX-Präparation zu erhöhen. Die vereinigten ProX-haltigen Fraktionen wurden mit Ammoniumsulfat versetzt auf eine Konzentration von 1,5 M. Die zweite FPLC-Reinigung wurde mit der Methode der Hydrophoben Interaktionschromatographie durchgeführt. Als Säulenmaterial wurde Phenylsepharose (GE Healthcare) verwendet. Für die Reinigung wurden 70 ml Chromatographiematerial in eine XK 26/20 Säule gepackt und die Flußrate auf 4 ml*min⁻¹ eingestellt. Die Säule wurde mit 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,3 preequilibriert. Auf die equilibrierte Säule wurde die mit Ammoniumsulfat versetzte ProX-Lösung aufgetragen und mit einem Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl pH 8,3 1,5 M Ammoniumsulfat gewaschen. Die Elution wurde mit einem linear sinkenden Ammoniumsulfat-Gradienten von 1,5 M bis 0 M erreicht, das Elutionsvolumen betrug 300 ml. ProX eluierte bei 0% Ammoniumsulfat. Die nach dem Elutionsprofil ausgewählten Fraktionen wurden mit Hilfe des „Roti-Nanoquant-Mikroassay“ (Roth, Karlsruhe) überprüft (Bradford, 1976). Damit das verbliebene Ammoniumsulfat aus der Reinigung entfernt werden kann, wurden die ProX-haltigen Fraktionen vereinigt und gegen 5 L 10 mM Tris/HCl pH 7,3 bei 4 °C über Nacht dialysiert. Die Reinheit der ProX-Proben wurde mit einer SDS-PAGE überprüft und die Konzentration der ProX-Probe bestimmt mit dem „Pierce BCA Protein Assay Kit“ (Pierce, Rockford).

5.3.3 Bestimmung der Affinitätskonstante (K_D) mit radioaktiv markiertem Glycin Betain

Die gereinigten ProX Proteine wurden auf ihre Fähigkeit, Glycin Betain zu binden, getestet. Dafür wurde eine modifizierte Form des Bindetestes nach Richarme und Kepes (1983)

verwendet, in der ^{14}C -markiertes Glycin Betain ($55 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$) eingesetzt wurde. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) wurden eine $5 \mu\text{M}$ ProX-Lösung mit verschiedenen Konzentrationen Glycin Betain bei Raumtemperatur inkubiert. Die Glycin Betain Konzentrationen einer Messreihe betragen $1 \mu\text{M}$ - $110 \mu\text{M}$ Endkonzentration, wobei ein konstanter Anteil des Glycin Betains die genannte radioaktive Markierung trug. Für die Messpunkte $1 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$ bestanden $1 \mu\text{M}$ des Glycin Betains aus der markierten Lösung, bei den Messpunkten $5 \mu\text{M}$, $7 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $60 \mu\text{M}$, $80 \mu\text{M}$, $110 \mu\text{M}$ und $210 \mu\text{M}$ waren jeweils $5 \mu\text{M}$ aus der markierten Glycin Betain-Lösung. Mit steigender Glycin Betain Konzentration verringert sich also der Anteil an markiertem Glycin Betain. Die Messpunkte variierten je nach Affinität des mutierten ProX und betragen für Mutanten niedriger Affinität bis zu $210 \mu\text{M}$ Glycin Betain, bei Mutanten höherer Affinität bis zu $110 \mu\text{M}$ Glycin Betain, bis zur Sättigung des Proteins durch sein Substrat. Zur Durchführung des Bindetestes wurde das Substrat in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert, und unmarkiertes Glycin Betain mit markiertem Glycin Betain gemischt. Der Test wurde durch Zugabe des gereinigten ProX Proteins gestartet, mit einer Testkonzentration von $5 \mu\text{M}$ und einem Reaktionsvolumen von $100 \mu\text{l}$. Protein und Substrat wurden für 5 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurden die ProX Proteine mit gebundenem Substrat durch Zugabe von $900 \mu\text{l}$ eiskalter, gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung gefällt und für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die gesamte Suspension wurde durch einen Nitrocellulosefilter (Porengröße $0,45 \mu\text{m}$, Schleicher & Schuell, Dassel) gesaugt und mit 10 ml eiskalter $3,03 \text{ M}$ Ammoniumsulfat-Lösung gewaschen. Diese Lösung ist so konzentriert, dass sie unmittelbar vor der Sättigung steht, aber noch keine ungelösten Ammoniumsulfat-Kristalle enthält. Somit werden durch die Fällung möglicherweise vorhandene Ammoniumsulfat-Kristalle ebenfalls gewaschen, dies ist für die Messung mit dem Scintillationszähler von großer Wichtigkeit, da Ammoniumsulfat-Kristalle die Messung erheblich beeinflussen. Die Filter wurden in Scintillationsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit (Zinsser Analytic, Frankfurt) versehen und gründlich gemischt. Die auf dem Filter verbliebene Radioaktivität in Form von ProX-gebundenem, markiertem Glycin Betain wurde mit dem Scintillationszähler (Packard, Liquid Scintillation Analyser 1900Ca) bestimmt. Um die eingesetzten counts zu bestimmen wurden radioaktiv markierte Glycin Betain-Lösungen mit $1 \mu\text{M}$, beziehungsweise $5 \mu\text{M}$ markierten Anteils in ein Scintillationsgefäß gegeben und mit Scintillationsflüssigkeit vermischt und vermessen. Als Blindwert diente eine Probe aus Puffer mit markiertem Glycin Betain einer Endkonzentration von $1 \mu\text{M}$, beziehungsweise $5 \mu\text{M}$. Diese wurde ebenfalls abgefiltert, gewaschen und im Scintillationszähler vermessen. Die Messreihe wurde in einer Dreifachbestimmung durchgeführt und die gemessenen dpm-Werte wurden umgerechnet in μM gebundenes Glycin Betain mit Hilfe der Formel:

$$\text{GB}_{\text{gebunden}} = \text{dpm} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} / P_0$$

$$P_0 = \text{Konzentration von ProX } [\mu\text{M}]$$

Der Verdünnungsfaktor berechnet sich aus dem Verhältnis markierten zu unmarkierten Glycin Betains. Mutierte ProX-Proteine, die keine deutliche Bindung von markiertem Substrat zeigten, wurden $5 \mu\text{M}$ ProX und $10 \mu\text{M}$ ProX im Test mit $5 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$ und $60 \mu\text{M}$ Glycin Betain vermessen und die Messwerte verglichen. Zeigten die Messwerte keine Verdoppelung oder deutliche Erhöhung wurde dies als keine Bindung von Glycin Betain definiert.

5.3.4 Konkurrenztest des *E. coli* ProX Wildtyp Proteins mit Homobetain

Die Konkurrenz von Homobetain mit radioaktiv markiertem Glycin Betain wurde durchgeführt mit 5 μM Wildtyp ProX und 5 μM markierter Glycin Betain-Lösung und einem deutlichen Überschuss an unmarkiertem Homobetain, das in einer Endkonzentration von 210 μM vorlag. Die Proben wurden wiederum nach fünf Minuten Inkubationszeit mit eiskalter Ammoniumsulfat-Lösung gefällt und abfiltriert, wie oben beschrieben.

5.4 Überexpression und Reinigung von EhuB aus *S. meliloti*

5.4.1 Heterologe Überexpression von EhuB

Das Plasmid pLB22 wurde in den Stamm BL21 transformiert. Dieser Stamm ist besonders geeignet für Protein-Überexpressionen, da die Gene für einige Proteasen in seinem Genom deletiert sind und somit weniger Abbau des überproduzierten Proteins stattfindet. Für die Überproduktion von EhuB wurden 5 L MMA mit 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Ampicillin aus einer Übernachtskultur auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert und bei 37°C unter Belüftung durch kräftiges Rühren auf einem Variomag Magnetrühren kultiviert. Die Überexpression von EhuB wurde bei einer OD_{578} von 0,5 - 0,7 durch Zugabe von 0,2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Anhydrotetracyclin induziert (Skerra, 1994). Nach 1,5 - 2 Stunden wurden die Zellen geerntet und zu weiterer Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Produktion von EhuB wurde durch auftragen von nichtinduzierten und induzierten Kulturproben mittels SDS-PAGE kontrolliert.

5.4.2 Metabolisches Labeling von EhuB mit Selenomethionin

Um das Phasenproblem bei der Bestimmung der Kristallstruktur von EhuB lösen zu können, wurde das Protein mit Selenomethionin markiert. Dabei wurde die Methode der metabolischen Inhibition angewendet (Doublie, 1997; Van Duyne *et al.*, 1993). Diese Methode beruht darauf, dass die Methioninsynthese in *E. coli* reprimiert wird, wenn den Zellen extern große Mengen von L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Threonin, L-Isoleucin; L-Leucin und L-Valin zur Verfügung stehen. Unter diesen Bedingungen nutzen die Zellen extern zugegebenes Selenomethionin, um es in neu zu synthetisierende Proteine einzubauen. Als Überexpressionswirt dienten auch hier BL21 -Zellen, die mit dem Plasmid pLB22 transformiert worden waren. Die Zellen wurden in LB-Medium mit Ampicillin kultiviert und anschließend wurden 20 ml dieser Kultur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in M9-Medium resuspendiert und zum Animpfen von 5 L M9 Medium mit Ampicillin verwendet. Die Zellen wurden über Nacht bis zu einer OD_{578} von 0,3 bei 37°C aerob inkubiert (die Wachstumsrate ist ca. 3-5 mal geringer als in MMA-Medium). Zu diesem Zeitpunkt wurden pro Liter 100 mg L-Lysin, 100 mg L-Phenylalanin, 100 mg L-Threonin, 50 mg L-Isoleucin, 50 mg L-Leucin, 50 mg L-Valin und 50 mg L-Selenomethionin (Acros Organics, bezogen über Fisher Scientific, Schwerte) als Pulver zugegeben. 15 Minuten nach der Zugabe der Aminosäuren wurde die Überproduktion von EhuB durch die Zugabe von 0,2 mg l^{-1} Anhydrotetracyclin induziert und die Zellen wurden 6 Stunden später geerntet. Das Pellet wurde bis zur weiteren Aufreinigung bei -20°C aufbewahrt.

5.4.3 Periplasmatischer Aufschluss und Reinigung von EhuB

Um einen periplasmatischen Extrakt zu erhalten, wurde ein 5 L BL21 pLB22-Zellpellet in 50 ml eiskalten Puffer P (100 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 500 mM Saccharose) resuspendiert und für 30 Minuten und gelegentlich gemischt. Durch die hohe Osmolarität der Lösung und des vorhandenen EDTA's wird die äußere Membran der *E. coli* - Zellen instabil und permeabilisiert. Die Proteine im Periplasma treten aus, wobei die

Sphaeroblasten intakt bleiben. Durch Grobzentrifugation (20 Minuten bei 13.000 rpm, 4 °C) wurden zunächst die Sphäroblasten, und anschließend durch Ultrazentrifugation (60 Minuten bei 26500 g, 4°C) kleinere Partikel und Membranfragmenten von den löslichen Proteinen des Periplasmas getrennt. Das Periplasma-Extrakt wurde auf eine Strep-Tactin Affinitätssäule (Ø1 cm, Höhe 10 cm) (IBA, Göttingen) aufgetragen, die zuvor mit Puffer W (100 mM Tris/HCl pH8) equilibriert wurde. Nach Beladung der Strep-Tactin Säule wurde diese mit 5 Säulenvolumen Puffer W gewaschen und damit alle anderen Proteine des Periplasmas entfernt. Die Elution erfolgte mit 30 ml Puffer E (100 mM Tris/HCl pH 8 2,5 mM Desthiobiotin). Die Fraktionen wurden auf ihren EhuB-Gehalt mittels SDS-PAGE untersucht und die EhuB-haltigen Fraktionen wurden vereinigt. Das gereinigte EhuB wurde mit einer Gelsäulen-Chromatographie auf Multimer-Bildung untersucht. Dazu wurden die EhuB-haltigen Fraktionen auf eine HiLoad Superdex 75 pg-Säule (Amersham), die mit 10 mM Tris/HCl pH7 150 mM NaCl equilibriert wurde, aufgetragen. EhuB eluierte in einem symmetrischen „Peak“, der zudem die Größe von EhuB mit 29 kDa bestätigte. In den weiteren Reinigungen wurde auf diesen Schritt verzichtet, da EhuB bereits nach der Streptactin-Säule rein genug für die Kristallisation war. Abschließend wurde EhuB gegen 10 mM Tris/HCl pH 7 dialysiert, dazu wurde ein Dialyseschlauch mit der molekularen Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet (Roth, Karlsruhe). Im Durchschnitt wurden aus 1L Kultur eine Proteinmenge von 10 mg gewonnen. EhuB wurde mit Vivaspin 20 Konzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa für die Kristallisation (Vivascience, Hannover) auf 10-20 mg*ml⁻¹ ankonzentriert.

5.4.4 Herstellung eines Antiserums gegen das heterolog exprimierte EhuB

Zur Herstellung eines Antiserums wurde EhuB zu apparenter Homogenität gereinigt und ein mal über Nacht gegen 4 l physiologischen Phosphat-Puffer dialysiert, anschließend noch zwei mal für 3 Stunden gegen 1,5 l physiologischen PBS-Puffer. Anschließend wurde EhuB mit einem Vivaspin 20 Konzentratoren (Ausschlussgröße von 10 kDa; Vivascience, Hannover) mittels Zentrifugation auf eine Konzentration von 720 µg* ml⁻¹ ankonzentriert. Es wurden 2 ml EhuB (720 µg ml⁻¹) mit 2 ml AdjuPrime Suspension (Pierce, Rockford, IL, USA) gemischt und in 10 Aliquots mit 200 µl Volumen aufgeteilt und eingefroren. Zunächst wurden Präimmunseren verschiedener Hasen auf unspezifische Kreuzreaktionen mit Zellextrakten von *Sinorhizobium meliloti* und gereinigtem EhuB getestet, der Hase mit den geringsten Kreuzreaktionen wurde ausgewählt. Diesem Hasen wurde in einem Zeitraum von drei Monaten zehn mal das EhuB-Adjuvans injiziert und sieben Tage nach der letzten Injektion geschlachtet. Das Serum wurde vom Blutkuchen getrennt und konnte in einer 1:8000 Verdünnung in Western Blot Experimenten eingesetzt werden.

5.4.5 Bestimmung der Affinitätskonstante (K_D) von EhuB mit radioaktiv markiertem Ectoin mittels Diffusionsbindetest

Zur Bestimmung der Affinitätskonstante von EhuB für sein Substrat Ectoin wurde ein Diffusionsbindetest verwendet, in dem radioaktiv markiertes Ectoin in einem Dialyseschlauch mit und ohne EhuB gegen 1 L Reaktionspuffer dialysiert wurde. Die Bestimmung der Bindekonstante beruht auf der Verzögerung der Diffusionsgeschwindigkeit des radioaktiv markierten Substrates durch das EhuB-Protein im Vergleich zu der Diffusionsgeschwindigkeit des Substrates ohne Protein. Für das Experiment zwei gleich große Stücke Dialyseschlauch mit der Ausschlussgröße 10 kDa (Visking size 1, Inf Dia 8/32`-6.3 mm, MWCO 12-14 kDa, Medicell Ltd, London, UK) mit 10 mM Tris/HCl pH 7, 1 mM EDTA aufgekocht und anschließend 2 mal gründlich mit 10 mM Tris/HCl pH 7 gewaschen, um das EDTA gründlich zu entfernen. Die Dialyseschläuche wurden auf einer Seite mit einer Klemme verschlossen, auf der anderen Seite mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze verstärkt und an einem Schwimmer befestigt. Die Konstrukte wurden jeweils in ein Becherglas mit 1 L 10 mM Tris/HCl pH 7 gegeben. In die Dialyseschläuche

wurde einmal Puffer mit 10 μM EhuB als Endkonzentration und einmal Puffer ohne EhuB gegeben und für 15 Minuten equilibriert. Das Experiment wurde gestartet durch die Zugabe des markierten Ektoins zu einer Endkonzentration von 13 μM . Unter gleichmäßigem Rühren wurden vom Zeitpunkt t_0 alle 10 Minuten eine Probe von 10 μl entnommen, bis zum Zeitpunkt t_{100} . Danach wurden die Proben in einem Abstand von 20 Minuten entnommen, bis zum Endpunkt des Experimentes nach 240 Minuten. Die Proben wurden in Vials (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben und mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit (QuicksafeA, Zinsser Analytic) vermischt. Die Radioaktivität wurde in einem Scintillationszähler (Packard, Liquid Szintillation Analyser 190CA) bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Diffusions-geschwindigkeiten des radioaktiv markierten Ektoins wurde für den Versuchsansatz ohne und mit 10 μM EhuB in einer Doppelbestimmung errechnet. Die Affinitätskonstante K_D wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$K_D = 1 + [P_0] \cdot v_2 / v_1$$

- K_D = Affinitätskonstante (μM)
- P_0 = Proteinkonzentration (μM)
- v_1 = Diffusionsgeschwindigkeit des ^{14}C -markierten Ektoins ohne EhuB
- v_2 = Diffusionsgeschwindigkeit des ^{14}C -markierten Ektoins mit 10 μM EhuB

5.5 Herstellung von Rohextrakten aus *S. meliloti*

Für einen Ganzzell-Aufschluss der *S. meliloti*-Zellen wurden die Zellpellets in 100 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA resuspendiert. Dabei wurde ein Pellet, entstanden aus 1 ml Kultur mit einer $\text{OD}_{578}=1$ mit 50 μl Puffer resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurde eine Spatelspitze feinste Glasperlen hinzugegeben und in einem mit Eiswasser gefüllten Ultraschallbad drei mal 15 Minuten inkubiert. Eine mikroskopische Kontrolle zeigte, dass die Zellen größtenteils aufgeschlossen waren. Die Glasperlen wurden durch Zentrifugation in 15 Minuten bei 16.500 g und 4°C abgetrennt. Der Proteingehalt wurde mittels des Pierce BCA Testes (Pierce, Rockford) bestimmt.

Für kleinere Kulturproben wurde der Zellaufschluss wie für die SDS-PAGE mittels Zugabe von definierten Mengen an SDS-Probenpuffer hinzugegeben, dabei wurde auch die Formel berücksichtigt, für 1 ml Kultur von OD_{578} wurden 50 μl SDS-Probenpuffer hinzugegeben, dies entsprach einer Konzentration von 25 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

5.6 Immunodetektion von Proteinen (Western blot Analyse)

5.6.1 Transfer von Proteinen auf Membranen

Für die Immunodetektion von EhuB in *S. meliloti* Zellextrakten wurde in einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel pro Spur zwischen 20 μg bis 40 μg Ganzzellextrakt von Zellen, die unter den jeweils angegebenen Bedingungen gezogen wurden, aufgetrennt. Da das Präimmenserum des Kaninchens eine unspezifische Kreuzreaktion mit einem anderen zellulären Protein aufzeigt, konnte dieses als interner Standard verwendet werden, der anzeigt, ob die gleichen Mengen Ganzzellextrakt aufgetragen wurden. Als Größenstandard diente der „Prestained Protein Marker Broad Range“ von NEB (Schwalbach). Die Proteine wurden anschließend in einer Mini Blot Apparatur (BioRad, München) in einem Blot-Puffer (100 mM Tris-Glycerin (pH 7,5), 100 mM NaCl, 20 % Methanol) bei 100 V für eine Stunde auf eine PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) übertragen (Towbin *et al.*, 1979).

5.6.2 Detektion von EhuB mit einem spezifischen Antiserum

Die mit Proteinen beladene PVDF – Membran wurde zunächst über Nacht in TBST-Lösung (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween (v/v)) mit 5% Milchpulver inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem EhuB-spezifischen Antikörper aus dem Hasen in einer Verdünnung von 1:10000 mit TBST mit 5 % Milchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Membran drei mal für 10 Minuten mit 100 ml TBST gewaschen. Als zweiter Antikörper diente ein alkalische Phosphatase-konjugierter „goat anti rabbit“ –Antikörper (Sigma, Deisenhofen), dieser wurde in einer 1:8000 Verdünnung in TBST mit 5% Milchpulver eingesetzt. Nach einer eineinhalbstündigen Inkubationszeit mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran zwei mal für 10 Minuten mit 100 ml TBST gewaschen und anschließend in AP-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit ECF-Vistra (GE Healthcare, Freiburg) als Substrat mit einem Storm 860 Phospo-Imager (GE Healthcare, Freiburg).

5.7 Überexpression und Reinigung von ProX aus *A. fulgidus*

5.7.1 Heterologe Überexpression von ProX *A. fulgidus*

Zur Überexpression von ProX wurde das Plasmide pGH26 in MC4100 transformiert, die auch das codon Plus® RIL – Plasmide beinhalten. Auf dem codon Plus RIL® Plasmid sind die Gene für die seltenen Transfer-RNAs von Arginin, Isoleucin und Leucin codiert. Diese werden für eine effektive Überexpression von Genen aus AT-reichen Mikroorganismen benötigt. Für die Gene für die Überproduktion von ProX wurden 5 L MMA mit 150 µg l⁻¹ Ampicillin und 30 µg l⁻¹ Chloramphenicol versetzt und mit einer Übernachtskultur auf eine OD₅₇₈ von 0,1 inokuliert. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 bis 0,8 auf einem Magnetrührer inkubiert. Die Überexpression von ProX wurde induziert durch die Zugabe von 0,2 mg l⁻¹ Anhydrotetrazyklin. Nach zwei Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und bei -20 °C eingefroren. Für die mutagenisierten ProX-Proteine wurde das entsprechende Plasmid mit der gewünschten Mutation (siehe Tabelle 3) in MC4100 codon Plus® RIL transformiert und dann so verfahren, wie oben beschrieben.

5.7.2 Periplasmatischer Aufschluss und Reinigung von ProX *A. fulgidus*

Zur Gewinnung des periplasmatischen Extraktes wurde ein Zellpellet, gewonnen aus 5 Liter Kultur von MC4100 codon Plus RIL® mit pGH26, oder eines seiner Derivate, in 50 ml eiskaltem Puffer P (100 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 500 mM Saccharose) resuspendiert und unter gelegentlichem mischen 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Reinigung von ProX folgte dem Protokoll von G. Holtmann (2002), (Schiefner *et al.* 2004b): Das ProX-haltige Periplasma-Extrakt wurde über eine Strep-Tactin-Säule aufgereinigt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihren ProX Gehalt untersucht, Fraktionen mit ProX wurden vereinigt und über Nacht bei Raumtemperatur mit Faktor Xa (NEB; Schwalbach) verdaut. Dazu wurden der Lösung 100 mM NaCl und 1 mM CaCl₂ hinzugefügt. Zur Entfernung des Faktor Xa und anderer kontaminierender Proteine wurde die Probe anschließend mit einer Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Dazu wurde eine UnoQ6 Säule (Biorad, München) verwendet, einem starken Anionenaustauscher. Das mit Faktor Xa behandelte ProX wurde durch die Zugabe des gleichen Volumens an deionisiertem Wasser 1:2 verdünnt und auf die mit 50 mM Tris/HCl pH8 (Puffer A) preequilibrierten UnoQ6-Säule gegeben. Das Protein wurde durch einen aufsteigenden NaCl-Gradienten eluiert. Bei diesem wurde als Puffer B 50 mM Tris/HCl pH8 1 M NaCl verwendet; die Elution erfolgte nach dem Protokoll beschrieben in Holtmann (2002): 20 ml 0% Puffer B, 80 ml linearer Gradient bis 40 % PufferB, 20 ml 100% Puffer B. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihren ProX-Gehalt überprüft

und die ProX-haltigen Fraktionen wurden über Nacht gegen 5 L 10 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert. Am folgenden Tag wurde der Dialysepuffer ausgetauscht und die Proben für weitere 4 Stunden dialysiert. Bei geringer Ausbeute und starker Verdünnung wurde die ProX-Lösung ankonzentriert mittels Vivaspin4 Konzentratoren (MWCO 10 kDa, Volumen: 4 ml).

5.7.3 Bestimmung der Affinitätskonstante des *A. fulgidus* Wildtyp ProX Proteins und der mutierten ProX Proteine mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die intrinsische Fluoreszenz eines Proteins ist abhängig von der Anzahl, der Orientierung und der Umgebung der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm hat Tryptophan den größten Anteil der entstehenden Fluoreszenz, Tyrosin dagegen einen weitaus geringeren. So wird die Intensität der Fluoreszenz maßgeblich von den im Protein vorhandenen Tryptophanen geprägt. Wird die Form eines Proteins verändert, wie zum Beispiel bei der durch die Substratbindung ausgelösten Konformationsänderung eines Substratbindepoteins, so verändert sich auch die Fluoreszenzintensität. In manchen Fällen verschiebt sich auch das Emissionsmaximum des Proteins um einige Nanometer. Die Bindung von Glycin Betain oder Prolin Betain durch das ProX Protein führt bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm zu einer Intensitätszunahme der intrinsischen Fluoreszenz (Holtmann, 2002). Diese Eigenschaften wurden genutzt, um die Affinitätskonstanten des Wildtyp Proteins und der mutierten ProX Proteine für Glycin Betain und Prolin Betain zu bestimmen. Alle Spektren wurden mit einem Cary Eclipse Spektralphotometer (VARIAN, Darmstadt) bei 50°C aufgenommen, das Wildtyp Protein wurde zusätzlich bei seinem Temperaturoptimum von 83°C und bei Raumtemperatur (25°C) mit Glycin Betain vermessen. Es wurden Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm von 310 bis 390 nm aufgenommen. Die Messung erfolgte in 1 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5.

Wildtyp ProX Protein: Das Wildtyp ProX Protein aus *A. fulgidus* erwies sich als sehr bindungsstark, es wurde die kleinstmögliche Konzentration ermittelt, bei der das Protein noch zu vermessen war, diese betrug 50 nM. Da bei solch geringen Konzentrationen die Adhäsion der Proteine an die Küvettenwand einen deutlichen Effekt auf die Messgenauigkeit zeigte, wurden alle Proben mit und ohne Substrat separat in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt. Das Protein wurde zunächst vorgelegt und dazu auf 50°C vorgewärmter Puffer auf ein Endvolumen von 1 ml hinzugegeben. Die Substratkonzentration wurde jeweils mit einer konzentrierten Stammlösung eingestellt, so dass das zugegebene Volumen nicht größer war als 3% des Gesamtvolumens. Die Protein-Substrat-Mischung wurde gründlich durch vortexen gemischt, bei 50 °C inkubiert und dann in die Quarzküvette (104F-QS Suprasil, Hellma, bezogen über MAGV, Londorf) überführt und vermessen. Die Substratkonzentrationen, bei denen die Fluoreszenzänderung des Proteins gemessen wurden betragen 10 nM, 20 nM, 40 nM, 60 nM, 80 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM und 250 nM. Diese Messung wurde drei mal, unabhängig voneinander angesetzt, wiederholt.

Die Vermessung des Wildtyp Proteins bei 83°C wurde nicht mit der Aufnahme eines gesamten Emissionsspektrums durchgeführt, sondern aufgrund von zu starker Verdampfung des Puffers bei 83°C auf eine Punktmessung bei 350 nm reduziert. Dazu wurde die Probe ebenfalls bei 280 nm angeregt und für eine Messdauer von 30 Sekunden bei 350 nm ausgewertet. Voraussetzung für dieses Verfahren ist, dass sich bei maximaler Fluoreszenzänderung, also der Vergleich von Emissionsspektren eines Proteins ohne Substratzugabe mit der eines Proteins mit Substratsättigung, keine Verschiebung des Emissionsmaximums zeigt. Bei dem ProX Wildtyp Protein konnte keine Verschiebung des Emissionsmaximums beobachtet werden.

Mutierte ProX Proteine:

Die mutierten ProX Proteine zeigten eine deutlich geringere Affinität zu den Substraten als das Wildtyp Protein und war nach den oben beschriebenen Parametern nicht zu vermessen. Die Proteinkonzentration betrug daher in allen Messungen 250 nM, in diesen Messungen wurden Protein und Puffer zusammen in einem Eppendorf Reaktionsgefäß auf 50 °C erwärmt, in die Küvette gegeben und dann vermessen. Die Substrate wurden schrittweise in die Küvette hinzupipettiert, gemischt, für eine Minute bei 50°C in Photometer inkubiert und dann vermessen. Auch hier erhöhte sich das Volumen in der Küvette mit steigender Substratkonzentration, jedoch nicht über 3% des Gesamtvolumens. Die Konzentration der Substrate wurde im Vergleich zum Wildtyp Protein höher gesetzt. Da sich auch hier starke Unterschiede im Sättigungsbereich der Mutanten zeigten, wurden diese je nach Bindungsverhalten variiert. Das Ziel war, mindestens drei Messpunkte im Sättigungsbereich der jeweiligen Mutante aufzunehmen. Die Substratkonzentrationen bewegten sich von 1 µM bis hin zu 1000 µM bei der schwächsten Mutante (ProX Tyr-63/Ala) und von 1 µM bis 150 µM bei der stärksten Mutante (ProX Tyr-214/Ala). Bei allen mutierten ProX Proteinen wurden die Messungen für jedes Substrat drei mal, unabhängig voneinander angesetzt, wiederholt.

Zur Auswertung wurden die einzelnen Emissionsspektren von jeder Substratkonzentration zwischen 325 nm und 280 nm integriert, da dort die größte Änderung zu beobachten war, und diese Werte unter Berücksichtigung des durch die Substratzugabe veränderten Volumens normalisiert. Die normalisierte Fluoreszenz wurde gegen die Substratkonzentration aufgetragen und. Die K_D wurde ermittelt durch fitten der Daten auf die folgende Gleichung:

$$F = F_0 + (\Delta F / 2 * P_0) * [(K_D + P_0 + L_0) - ((K_D + P_0 + L_0)^2 - 4 * L_0 * P_0)^{1/2}]$$

F= gemessene Fluoreszenz

F_0 = Fluoreszenz des freien Proteins

ΔF = Änderung der Fluoreszenz bei Sättigung

L_0 = Substratkonzentration

P_0 = Proteinkonzentration

K_D = Affinitätskonstante

Die Auswertung der Messung des Wildtyp Proteins bei 83°C wurde ebenfalls mit dieser Formel durchgeführt. Der gemessene Fluoreszenzwert liegt durch die Punktmessung bei 350 nm deutlich niedriger als der einer integrierten Fläche, konnte aber ebenfalls als F in der Gleichung behandelt werden.

6. Computergestützte Proteinsequenz-Analyse

Proteinsequenzanalysen wurden unter der Verwendung des Programmpaketes Lasergene (Vergleiche von Proteinsequenzen erfolgten mit Hilfe des Clustal Algorithmus „MegAlign“ DNA-Star Ltd., London, G.B.) oder von Vektor NTI (Invitrogen). Datenbankvergleiche mit veröffentlichten Sequenzen anderer Organismen wurden mit dem BLAST-Programm (Altschul *et al.*, 1990; 1997) am NCBI (National center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt. Topologie-Berechnungen von Proteinen wurden mit Hilfe des Programms (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0) erstellt. Die Voraussage von Schnittstellen für Signalpeptidasen wurden mittels des Programms www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ erstellt. Die taxonomische Zugehörigkeit von Mikroorganismen wurde mittels des NCBI taxonomy browsers www.ncbi.nlm.nih.gov) ermittelt.

IV. Ergebnisse

In Bakterien stellt die Familie der ABC-Transporter einen großen Anteil der gesamten, zellulären Translokationsbewegung (Higgins, 1992; Tomii und Kanehisa, 1998; Saier, 2000; Dassa und Bouige, 2001). Eine Untergruppe bilden die Substratbindeprotein-abhängigen ABC-Transporter die für den Import einer Vielzahl an verschiedensten Substraten in die Zelle benötigt werden, wie zum Beispiel die kompatiblen Solute (Higgins, 1992; Boos und Lucht, 1996). Diese Transporter zeichnet meistens eine enge Substratspezifität und eine hohe Affinität zu ihren Liganden aus, welches durch die Eigenschaften ihrer Substratbindeproteine bedingt ist (Tam und Saier, 1993). Die Substratbindeproteine besitzen am Ende einer tiefen Bindetasche ein aktives Zentrum aus einer verschiedenen Zahl von Aminosäuren, die mit dem Substrat in charakteristischer Weise interagieren und damit binden (Quioco und Ledvina, 1996; Fukami-Kobayashi *et al.*, 1999). Die Fragestellung in dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem spezifischen und hochaffinen Mechanismus der Bindung der kompatiblen Solute Glycin Betain, Prolin Betain, Ectoin und Hydroxyectoin. Diese molekularen Schutzsubstanzen werden aufgrund von thermodynamisch ungünstigen Interaktionen mit der Proteinoberfläche von der Hydrathülle der Proteine ausgeschlossen, sie meiden also Proteinoberflächen (Arakawa und Timasheff 1984; Arakawa und Timasheff 1985, Bolen und Basakov, 2001). Da dies im Widerspruch zu einer hochaffinen, spezifischen Bindung durch ein Protein steht, sind die molekularen Grundlagen zur Substratbindung dieser Moleküle von besonderem Interesse. Eine Studie der Verbreitung solcher Substratbindeproteine auf Aminosäuresequenz-Ebene wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

1. Das Substratbindeprotein ProX des Glycin Betain und Prolin Betain importierenden ABC-Transporters ProU aus *Escherichia coli*

Der ProU-Transporter in *E. coli* ist ein osmotisch induzierter ABC-Transporter für die kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain. Er gehört der Familie der Substratbindeprotein-abhängigen ABC-Transporter an und besteht aus der membran-assoziierten ATPase ProV, der integralen Membrankomponente ProW und dem

periplasmatischen Substratbindeprotein ProX (Lucht und Bremer 1994). Das Substratbindeprotein ProX bindet Glycin Betain ($K_D = 1,4 \mu\text{M}$; May *et al.*, 1986; Barron *et al.*, 1987) und Prolin Betain ($K_D = 5,2 \mu\text{M}$, Haardt *et al.*, 1995) mit hoher Affinität.

Die Kristallstruktur des ProX Proteins mit einer Auflösung von $1,6 \text{ \AA}$ zeigte, dass im aktiven Zentrum des Bindeproteins drei Tryptophane (Trp-188, Trp-140 und Trp-65) das quartäre Amin des Glycin Betains und des Prolin Betains vermutlich durch Kation- π -Interaktionen koordinieren (Abb.16). Dabei interagieren die π -Elektronen der Indolreste aus den Tryptophanen mit der delokalisierten positiven Ladung über den Methylgruppen des quartären Amins (Nyrönen *et al.*, 1999) (Abb.3). Die Tryptophane wurden in einer Mutagenesestudien in jeder Position jeweils durch die aliphatischen Aminosäuren Alanin und Leucin, den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin, sowie den negativ geladenen Aminosäuren Aspartat und Glutamat durch ortsgerichtete Mutagenese ausgetauscht. Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden durch Sequenzierung überprüft (Bösser, 2001). Die durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellten ProX-Derivate sind in Abbildung 16 zusammengefasst. Von jedem dieser ProX-Mutanten sollten die Affinitätskonstante (K_D) für Glycin Betain bestimmt werden.

Für die Überexpression der mutierten ProX Proteine wurde ein *E. coli proU*-Deletionsstamm hergestellt (Bösser, 2001), damit während der Überexpression kein Wildtyp ProX Protein mehr synthetisiert werden kann, was in *E. coli* Wildtypstämmen durch die Transkription des chromosomalen *proX* Operons auf Basalniveau stattfinden würde. Die produzierten ProX Proteine wurden gereinigt und für Bindetests zur Bestimmung der Affinitätskonstante verwendet. Erste Experimente mit gereinigtem ProX Wildtyp Protein, ProX Trp-188/Ala, ProX Trp-140/Ala und ProX Trp-140/Tyr zeigten, dass bei der Bindung von Glycin Betain Kation- π -Interaktionen zwischen dem quartären Amin und den Tryptophanen 188 und 140 eine wichtige Rolle spielen. In den Bindestudien mit ^{14}C -markiertem Glycin Betain konnten vorläufige Affinitätskonstanten (K_D) ermittelt werden, diese betragen für das Wildtyp ProX $5,6 \mu\text{M}$, für ProX Trp-140/Ala $38,6 \mu\text{M}$ und für ProX Trp-140/Tyr $4,8 \mu\text{M}$, die Mutante ProX Trp-188/Ala ist nicht in der Lage, Glycin Betain zu binden (Bösser, 2001). Da die Resultate des Bindetestes zum Teil große Standardabweichungen zeigten, wurde dieser in den folgenden Experimenten modifiziert und das Wildtyp ProX Protein sowie die genannten mutierten ProX-Proteine wurden erneut vermessen. Zusätzlich wurde noch eine Doppelmutante konstruiert, in welcher die Tryptophane 140 und 65 jeweils gegen ein Alanin ausgetauscht wurden.

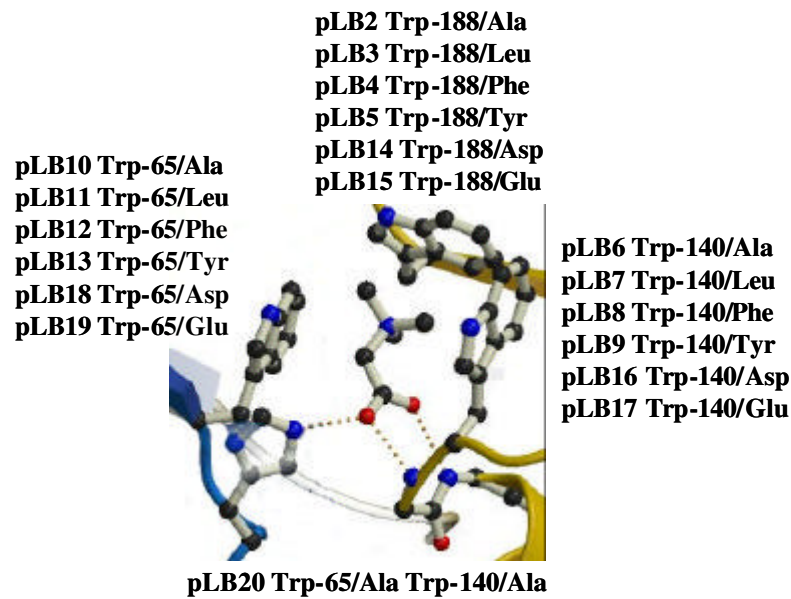


Abb. 16: Die Tryptophanbox von ProX aus *Escherichia coli*. Gezeigt sind die Tryptophanreste Trp-188, Trp-140 und Trp-65, die mit Kation-pi-Interaktionen das Substrat Glycyl Betain binden. Die Abbildung fasst zusammen, gegen welche Aminosäuren die Tryptophane im Einzelnen ausgetauscht wurden und der Name des jeweiligen Plasmids, das das veränderte *proX*-Gen trägt. Es wurde ebenfalls eine Doppelmutante hergestellt, in der Trp-65/Ala und Trp-140/Ala gleichzeitig ausgetauscht wurden.

1.2 Überexpression und Reinigung des ProX Wildtyp Proteins und der mutierten ProX Proteine

Zur Überexpression des ProX Wildtyp Proteins und seinen mutagenisierten Derivate wurde das jeweilige Plasmid in den *E. coli proU*-Deletionsstamm LinE2 transformiert und in MMA kultiviert. Die Überexpression wurde durch die Zugabe von IPTG bei einer OD_{578} von 1 gestartet und zwei Stunden später wurde die Kultur durch Zentrifugation geerntet. Zum Zeitpunkt der Induktion und der Ernte wurden Proben für eine SDS-PAGE entnommen. Da das ProX Protein mittels einer Signalsequenz in das Periplasma exkretiert, wurde aus dem Zellpellet ein Periplasmaextrakt durch einen kalten, osmotischen Schock hergestellt (Neu und Heppel, 1965). Der ProX-haltige Periplasmaextrakt wurde nach Ultrazentrifugation über eine DEAE-Sephrose, einen schwachen Anionenaustauscher, mit einem aufsteigenden NaCl-Gradienten gereinigt. Die ProX-haltigen Fraktionen wurden mit einer Phenylsepharose-Säule über hydrophobe Interaktionschromatographie weiter aufgereinigt. Die Fraktionen, die ProX enthielten wurden vereinigt und durch eine Dialyse

gegen 10 mM Tris HCl, pH 7,3 in den gewünschten Puffer überführt, sowie von dem verbliebenen Ammoniumsulfat und NaCl der Reinigung getrennt (Barron *et al.*, 1987; Breed *et al.*, 2001; Schiefner *et al.*, 2004a). In Abbildung 17 ist die Überproduktion und Reinigung des ProX-Derivates Trp-140/Glu durch Probenentnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten der Reinigung exemplarisch dokumentiert. Die Affinitätskonstanten (K_D) der gereinigten ProX Proteine wurden in einem Ammoniumsulfat-Präzipitationstest mit ^{14}C -markiertem Glycin Betain bestimmt.

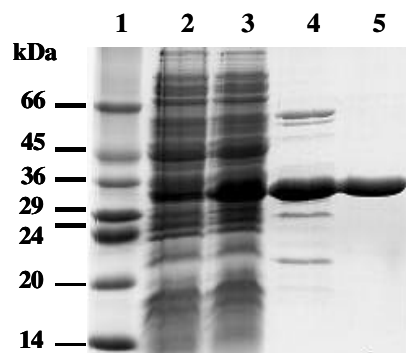


Abb. 17: Überexpression und Reinigung von ProX Trp-140/Glu.

In Spur 1 ist der Low dalton marker aufgetragen, in Spur 2: LinE2 pLB17 nicht induziert, in Spur 3: LinE2 pLB17 nach 2 Stunden IPTG Induktion, in Spur 4: Fraktion nach der DEAE-Reinigung und in Spur 5: 10 µg ProX nach der Phenylsepharose-Reinigung und anschließender Dialyse.

1.3 Bestimmung der Bindekonstante (K_D) für das ProX Protein und seinen mutagenisierten Derivaten durch den Ammoniumsulfat-Präzipitationstest mit ^{14}C -markiertem Glycin Betain

Das Wildtyp ProX Protein ist in der Lage, mit Hilfe der „Trp-Box“ den Liganden Glycin Betain mit hoher Affinität und Spezifität zu binden (May *et al.*, 1986). Die Affinitätskonstanten der mutierten ProX Proteine mit einem Austausch gegen eine aliphatische Aminosäure sollten die Kation-pi-Interaktion an der jeweiligen Stelle unterbinden und Auskunft über die Beteiligung der einzelnen Tryptophane der „Trp-Box“ an der Bindung von Glycin Betain geben. Durch den Austausch der Tryptophane gegen die anderen aromatischen Aminosäuren sollte geklärt werden, ob sie einen gleichwertigen Ersatz für ein Tryptophan sind und ausserdem die Kation-pi-Interaktionen an sich beweisen. Die ProX Mutanten mit negativ geladenen Aminosäuren anstelle der Tryptophane in der

„Trp-Box“ sollten zeigen, ob eine ionische Wechselwirkung eine Kation- π -Interaktion ersetzen kann. Mit der Doppelmutante ProX Trp-140/Ala Trp-65/Ala sollte untersucht werden, ob Trp-188 alleine in der Lage ist, das quartäre Amin von Glycin Betain zu binden. Zur Bestimmung der Bindekonstanten (K_D) wurden die zu apparater Homogenität gereinigten ProX Proteine mit [$1\text{-}^{14}\text{C}$] markiertem Glycin Betain inkubiert und mit der Ammoniumsulfat-Präzipitations Methode nach Richarme und Kepes vermessen (Richarme und Kepes, 1983). Zu diesem Zweck wurde das Protein mit verschiedenen Konzentrationen von Glycin Betain zwischen 1 und 210 μM (bis zur Sättigung des jeweiligen ProX Proteins durch sein Substrat) inkubiert, wobei bis zu 5 μM des Glycin Betains aus der ^{14}C -markierten Glycin Betain Lösung stammten. Im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Bindestudien (Bösser, 2001) wurde die Menge an markiertem Substrat deutlich erhöht. Die Proben wurden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nach 5 Minuten mit eiskalter gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt. Die Proben wurden weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert, um eine möglichst effektive Fällung zu garantieren. Anschließend wurden die Proben über einen Nitrozellulosefilter abgesaugt und mit 3,03 M Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Die Filter wurden in einem Scintillationszähler ausgewertet. Als Blindwert wurde eine Probe ohne Protein mit ^{14}C -markiertem Glycin Betain inkubiert und gefiltert. Die Messpunkte wurden für jedes Protein jeweils in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt und die Standardabweichung bestimmt. Aus den gemessenen Zerfällen pro Minute (dpm) wurde die Menge gebundenen Glycin Betains pro μg ProX Protein berechnet und in einer Sättigungskurve aufgetragen. Die Auswertung der Messung erfolgte mittels einer Auftragung nach Scatchard (1949), in dem das gebundene Substrat in Beziehung gesetzt wird zu der eingesetzten Substratkonzentration und der Proteinkonzentration. In Abbildung 18 ist die Auswertung der Mutante ProX Trp-188/Tyr exemplarisch gezeigt. Aus der negativen, reziproken Steigung der Geraden wurde die Affinitätskonstante K_D berechnet. Die Messkurven der übrigen ProX-Proteine sind Anhang A zu entnehmen.

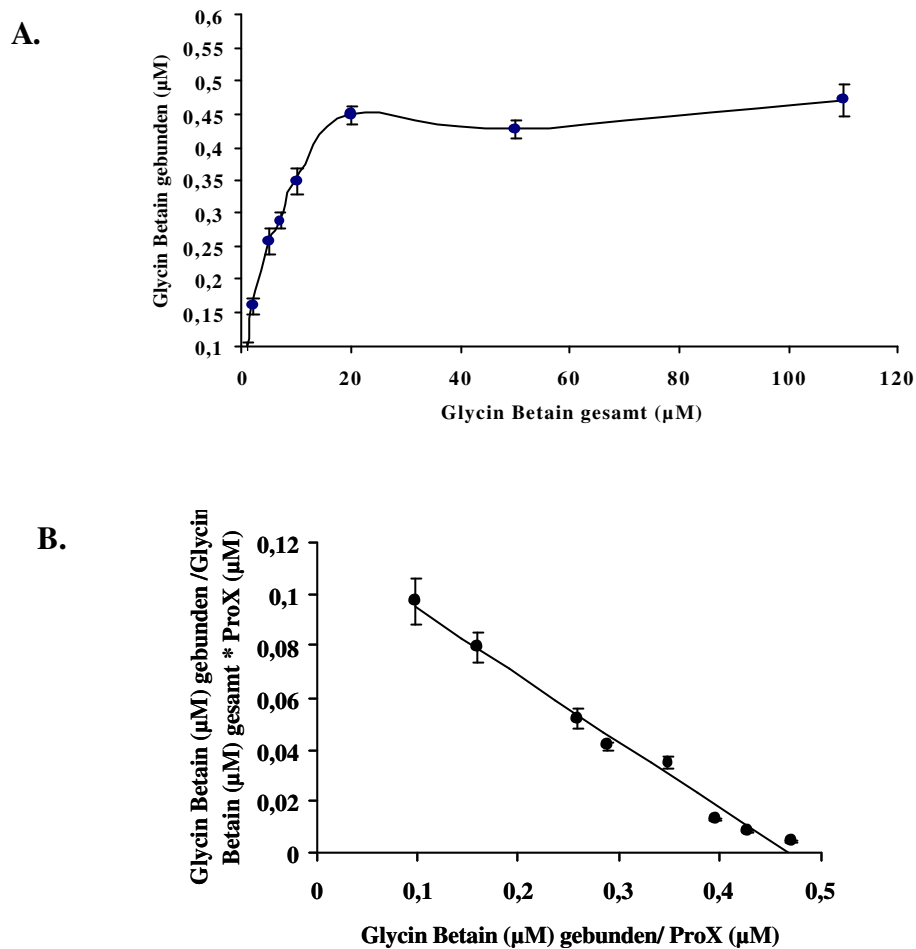


Abb. 18: Sättigungskurve und Scatchard plot der Bindeaffinitätsbestimmungen von ProX Trp-188/Tyr. Die beiden Graphiken zeigen die Bindung von ^{14}C -markiertem Glycin Betain durch das mutierte ProX Trp-188/Phe Protein, ermittelt durch einen Ammoniumsulfat-Präzipitationstest. In Abbildung A ist die Sättigung des Proteins durch Glycin Betain gezeigt, die maximal eingesetzte Glycin Betain Konzentration beträgt 110 μM . In Abbildung B ist die Auswertung des Bindetestes durch die Auftragung nach Scatchard gezeigt. Die Affinitätskonstante ergibt sich durch die negative reziproke Steigung der Ausgleichsgeraden. ProX Trp-188/Tyr zeigte dabei eine Bindekonstante von $5 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Für das ProX Wildtyp Protein wurde eine Bindekonstante von $4 \mu\text{M}$ bestimmt.

Für mutagenisierte ProX-Proteine, die keine eindeutige Bindeaffinität zu ^{14}C -markiertem Glycin Betain zeigten, wurde eine zusätzliche Messung durchgeführt, in der die Proteinkonzentrationen von $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ mit $5 \mu\text{M}$ radioaktiv markiertem Glycin Betain inkubiert wurden. Eine Mutante wurde als bindungsunfähig bezeichnet, wenn zwischen den Messungen mit $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ Proteinkonzentration keine Verdopplung der gemessenen Radioaktivität detektiert werden konnte (Abb. 19).

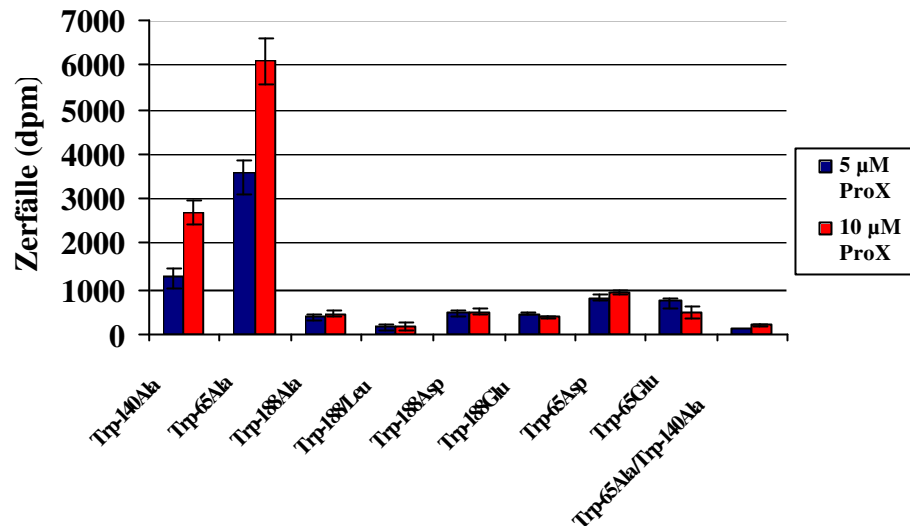


Abb. 19: Überprüfung von *EcProX* Mutanten auf deren Fähigkeit zur Bindung von ^{14}C -markiertem Glycin Betain

Die Abbildung zeigt Ammoniumsulfat-Präzipitationstests von ProX-Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, ^{14}C -markiertes Glycin Betain zu binden, oder deutlich schlechter als der Wildtyp binden. Die Messungen wurden mit 5 μM und 10 μM Protein im Test durchgeführt und dienen als Nachweis der Bindungsfähigkeit der Mutanten. Es wurden 5 μM ^{14}C -markiertes Glycin Betain als Substrat eingesetzt. Die Bindetests wurden bei Raumtemperatur inkubiert, mit Ammoniumsulfat gefällt und über Nitrocellulosefilter abgesaugt. Die auf den Filtern zurückgebliebene Radioaktivität wurde bestimmt. Das Experiment wurde mindestens zwei mal wiederholt. Die Mutante Trp-140/Ala ist ein Beispiel für eine Mutante, die noch in der Lage ist, Glycin Betain zu binden. Die Mutante Trp-188/Ala dagegen kann kein Glycin Betain mehr binden.

Zunächst wurde die Bindekonstante K_D für das Wildtyp ProX Protein bestimmt, daraus folgte ein Wert von 4 \pm 0,1 μM . Die folgenden Bindekonstanten der mutagenisierten ProX Proteine wurden mit diesem Wert verglichen. Die ProX Proteine mit einem Austausch von Trp-188 gegen eine aliphatische Aminosäure oder eine negativ geladene Aminosäure verlieren ihre Fähigkeit, markiertes Glycin Betain zu binden (Abb.19). Einen Austausch gegen eine andere aromatische Aminosäure führt zu einer Bindeaffinität die im Bereich des Wildtyp ProX Proteins liegt, für Phe (4 \pm 0,4 μM) und für Tyr (5 \pm 0,2 μM). Die ProX Mutanten mit Veränderungen in Trp-140 dagegen sind alle in der Lage, Glycin Betain zu binden. Die Bindekonstanten unterscheiden sich nur geringfügig, sie liegen zwischen 3 μM für die Phe-Mutante und 21 μM für die Glu-Mutante. Eine Ausnahme bildet die Trp-140/Ala Mutante, mit einer Affinitätskonstante von 56 μM bindet sie ihr Substrat deutlich schlechter. Die Mutante Trp-65/Ala zeigt ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Bindekonstante auf 50 μM , ist also vergleichbar mit der Affinitätskonstante von Trp-140/Ala. Die Mutanten mit negativ geladenen Aminosäuren in Position 65 sind aber im Gegensatz zu den Mutanten in Position 140 nicht mehr in der Lage, Glycin Betain zu

binden. In allen Fällen zeigen die Mutanten mit einem Austausch gegen die anderen aromatische Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin eine vergleichbare Bindeaffinität zu Glycin Betain wie das Wildtyp ProX Protein. Die Doppelmutante, in welcher die Tryptophane 140 und 65 beide gegen ein Alanin ausgetauscht wurden, ist nicht mehr in der Lage, Glycin Betain zu binden. Die Resultate sind mit Standardabweichung in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Mutagenesestudie der Tryptophan-Box des ProX Proteins aus *E. coli*. Die Tabelle beinhaltet die durch eine Dreifach-Bestimmung mit dem Ammoniumsulfat-Präzipitationstest mit ^{14}C -markiertem Glycin Betain erhaltenen Bindekonstanten (K_D) für die mutierten ProX Proteine aus der Mutagenesestudie.

ProX Mutanten	Bindekonstante (K_D) für ^{14}C -markiertes Glycin Betain (μM)	Standardabweichung (μM)
ProX Wildtyp	4 μM	+/- 0,1 μM
ProX Trp-188/Ala	keine Bindung	-
ProX Trp-188/Leu	keine Bindung	-
ProX Trp-188/Phe	4 μM	+/- 0,4 μM
ProX Trp-188/Tyr	5 μM	+/- 0,2 μM
ProX Trp-188/Asp	keine Bindung	-
ProX Trp-188/Glu	keine Bindung	-
ProX Trp-140/Ala	56 μM	+/- 10 μM
ProX Trp-140/Leu	14 μM	+/- 1,4 μM
ProX Trp-140/Phe	3 μM	+/- 0,3 μM
ProX Trp-140/Tyr	4 μM	+/- 0,6 μM
ProX Trp-140/Asp	8 μM	+/- 0,7 μM
ProX Trp-140/Glu	21 μM	+/- 3 μM
ProX Trp-65/Ala	50 μM	+/-3 μM
ProX Trp-65/Leu	-	-
ProX Trp-65/Phe	4 μM	+/- 0,2 μM
ProX Trp-65/Tyr	13 μM	+/- 0,7 μM
ProX Trp-65/Asp	keine Bindung	-
ProX Trp-65/Glu	keine Bindung	-
ProX Trp-65/Ala Trp-140/Ala	keine Bindung	-

1.4 Konkurrenz von Homobetain und Glycin Betain um die Substratbindung durch das *E. coli* ProX Protein

Da die Bindetaschen von Substratbindeproteinen strukturell häufig sehr gut an seine Substrate angepasst sind, sollte überprüft werden, ob ProX auch Homobetain binden kann. Homobetain ist ein Substrat, das sich von Glycin Betain nur durch eine zusätzliche CH₂-Gruppe unterscheidet (Abb. 20A). Zu diesem Zweck wurde eine Konkurrenz von Homobetain mit dem [1-¹⁴C] markierten Glycin Betain in einem Ammoniumsulfat-Präzipitationstest durchgeführt, wobei 5 µM Wildtyp ProX Protein mit 5 µM markierter Glycin Betain Lösung inkubiert wurde. In zwei weiteren Ansätzen wurde zu dem markierten Glycin Betain ein 40-facher Überschuss an unmarkiertem Glycin Betain oder Homobetain hinzugegeben. Die Messung zeigte deutlich, daß das Wildtyp ProX Protein Glycin Betain mit hoher Affinität bindet, und durch einen Überschuss an unmarkiertem Glycin Betain verdrängt werden kann. Homobetain hingegen kann das markierte Glycin Betain nicht verdrängen und somit nicht durch das ProX Protein gebunden werden (Abb.20B).

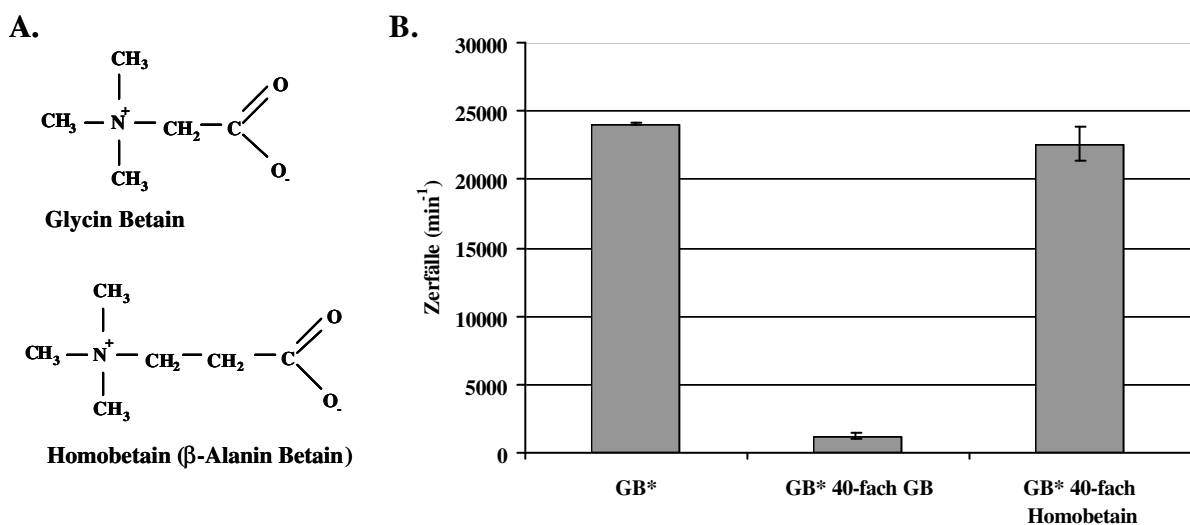


Abb. 20: Konkurrenz von unmarkiertem Glycin Betain und Homobetain mit markiertem Glycin Betain um die Bindung durch das Wildtyp ProX Protein. Die Abbildung A zeigt die Strukturformeln von Glycin Betain und Homobetain. Abbildung B zeigt die Resultate zweier kompetitiver Bindetests. In einem Ammoniumsulfat-Präzipitationstest wurden 5 µM ProX Wildtyp Protein mit 5 µM ¹⁴C-markiertem Glycin Betain alleine (GB*), 5 µM ¹⁴C-markiertem Glycin Betain und einem 40-fachen Überschuss an unmarkiertem Glycin Betain (GB* 40-fach GB) sowie 5 µM ¹⁴C-markiertem Glycin Betain und einem 40-fachen Überschuss an Homobetain (GB* 40-fach Homobetain) hinzugegeben. Die Bindetests wurden bei Raumtemperatur inkubiert, mit Ammoniumsulfat gefällt und über Nitrocellulosefilter abgesaugt. Die auf den Filtern zurückgebliebene Radioaktivität wurde bestimmt. Das Experiment wurde zwei mal wiederholt.

1.5 Aminosäuresequenz-Analysen von *E. coli* ProX in Proteindatenbanken

1.5.1 Analyse der Verbreitung *E. coli* ProX-ähnlicher Proteine und die Konservierung der Bindemotive des *E. coli* ProX Proteins

Mit der Aminosäuresequenz des ProX Proteins wurde unter Verwendung des BLAST-Programmes (Altschul *et al.*, 1990; 1997) eine Datenbanksuche am National center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) in der non-redundant Datenbank durchgeführt. Dabei wurden eine Reihe von Proteinsequenzen gefunden, welche eine Konservierung der Aminosäuren aufweisen, die in *EcProX* in die Substratbindung involviert sind. In Tabelle 9 sind eine Auswahl an Mikroorganismen aufgelistet, die Proteine mit vergleichbarer Sequenz zu *EcProX* besitzen. Eine Sequenz wurde in den Aminosäuresequenzvergleich aufgenommen, wenn sie außer der Konservierung von aromatischen Aminosäuren in der Position der „Trp-Box“ des *E. coli* Proteins eine gesamte Sequenzidentität von mindestens 25% besitzen und das Strukturgen welches das ProX-ähnliche Substratbindeprotein codiert in direkter Nachbarschaft Strukturgene besitzt, die für einen ProW-ProV-ähnlichen Translationalen Komplex codieren. Dies wurde überprüft durch eine Datenbanksuche mit den Aminosäuresequenzen der *E. coli* ProX-, ProW- und ProV-Proteine.

Tab. 9: Mikroorganismen mit *EcProX*-ähnlichen Proteinen. Die Tabelle zeigt Mikroorganismen mit *EcProX* ähnlichen Sequenzen. Literaturangaben zu charakterisierten Proteinen sind durch Buchstaben (^a, ^b) gekennzeichnet, die zugehörigen Referenzen sind unter der Tabelle aufgeführt. Des Weiteren sind die % Sequenzidentität der Aminosäuresequenzen der *EcProX*-ähnlichen Proteine zu der des *EcProX* Proteins sowie das Gram-verhalten der Mikroorganismen aufgeführt, Cyanobakterien sind insbesondere gekennzeichnet (Cy.). Transporter, in denen das putative Substratbindeprotein an die Permease fusioniert ist, werden mit * gekennzeichnet. Weiterhin wird die Konservierung der Aminosäuren beschrieben, die in dem *EcProX* Protein an der Substratbindung beteiligt sind

Mikroorganismus	Gram	% Sequenz-identität zu ProX	Konservierte Aminosäuren, die direkt in Ligandenbindung involviert sind
ProX <i>E. coli</i>	-	100	W-65, W-140, W-188 H-69, G-141, C-142
<i>Shigella flexneri</i>	-	99	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Salmonella enterica</i>	-	83	Wie ProX <i>E. coli</i>
ProX <i>Salmonella typhimurium</i> ^a	-	83	Wie ProX <i>E. coli</i>
OusBX <i>Erwinia chrysanthemi</i> ^b	-	75	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Erwinia carotovora</i>	-	75	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Photobacterium luminescens</i>	-	71	Wie ProX <i>E. coli</i>

Fortsetzung Tabelle 9:

Mikroorganismus	Gram	% Sequenz-identität zu ProX	Konservierte Aminosäuren, die direkt in Ligandenbindung involviert sind
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	71	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Yersinia pestis</i>	-	71	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	66	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	-	63	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Hahella chejuensis</i>	-	59	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Mannheimia succiniproducens</i>	-	57	Wie ProX <i>E. coli</i> , ausser H-69/Q, C-142/S
<i>Pseudomonas putida</i>	-	51	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	-	50	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Pseudomonas syringae</i>	-	48	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Crocospaera watsonii</i>	Cy	42	Wie ProX <i>E. coli</i> , ausser W65/Y, G-141/A, W188/Y
<i>Shewanella frigidimarina</i>	-	42	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Shewanella baltica</i>	-	42	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Trichodesmium erythraeum*</i>	Cy	41	Wie ProX <i>E. coli</i> ausser G-141/S
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	-	41	Wie ProX <i>E. coli</i>
<i>Desulfotalea psychrophila</i>	-	38	Wie ProX <i>E. coli</i> , ausser G-141/A
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	34	Wie ProX <i>E. coli</i> , ausser W65/F, H-69/Q, G-141/S
<i>Burkholderia ambifaria</i>	-	34	Wie ProX <i>E. coli</i> , ausser W65/F, H-69/R, G-141/S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	28	Wie ProX <i>E. coli</i> , ausser H-69/S, G-141/T
<i>Psychrobacter cryohalolentis*</i>	-	25	Wie ProX <i>E. coli</i> , ausser H-69/S, G-141/T
HisX <i>Sinorhizobium meliloti</i>	-	25	Wie ProX <i>E. coli</i> , ausser H-69/S, G-141/T
<i>Silicibacter pomeroyi</i>	-	25	Wie ProX <i>E. coli</i> , ausser H-69/Q, G-141/A, C-142/S

Referenzen aus der Tabelle:

^a: Cairney *et al.*, 1985b^b: Choquet, G. *et al.*, 2005^c: Boncompagni, E. *et al.*, 2000

Die Aminosäuresequenzvergleiche einiger ausgewählter *EcProX*-ähnlicher Proteine zeigen drei gut konservierte Aminosäuresequenz-Motive, die in der Bindung von Glycin Betain durch das *E. coli* ProX Protein eine Rolle spielen (Abb. 21). Das erste Motiv **W/Y-x-P-x-H** beinhaltet Trp-65 und His-69, zwei Aminosäuren die in der Bindung von Glycin Betain

beteiligt sind. Das Motiv **G-C-x-P-W-G-C**, das die Aminosäure Trp-140 enthält, zeigt auch eine gute Konservierung. Das dritte konservierte Motiv **W/Y-x-P** beinhaltet die für die Bindung von Glycin Betain essentielle Aminosäure Trp-188. In *EcProX* existieren zwei cis-Proline (Pro-67 und Pro-190) in unmittelbarer Nähe zu Trp-65 und Trp-188, die einen entscheidenden Einfluss auf die korrekte Orientierung dieser Tryptophane haben (Schiefner *et al*, 2004a). In den meisten Sequenzen sind diese Proline ebenfalls vorhanden und sind sogar Teil der konservierten Motive, ebenso wie die Cysteine Cys-136 und Cys-142. Die beiden Cysteine bilden zusammen eine Schwefelbrücke aus und stabilisieren damit die *EcProX*-Struktur (Schiefner *et al*, 2004a). Gly-141 und Cys-142 bilden H-Brücken zur Carboxylgruppe von Glycin Betain und Prolin Betain aus, ebenso wie His-69 (Abb10B, Einleitung).

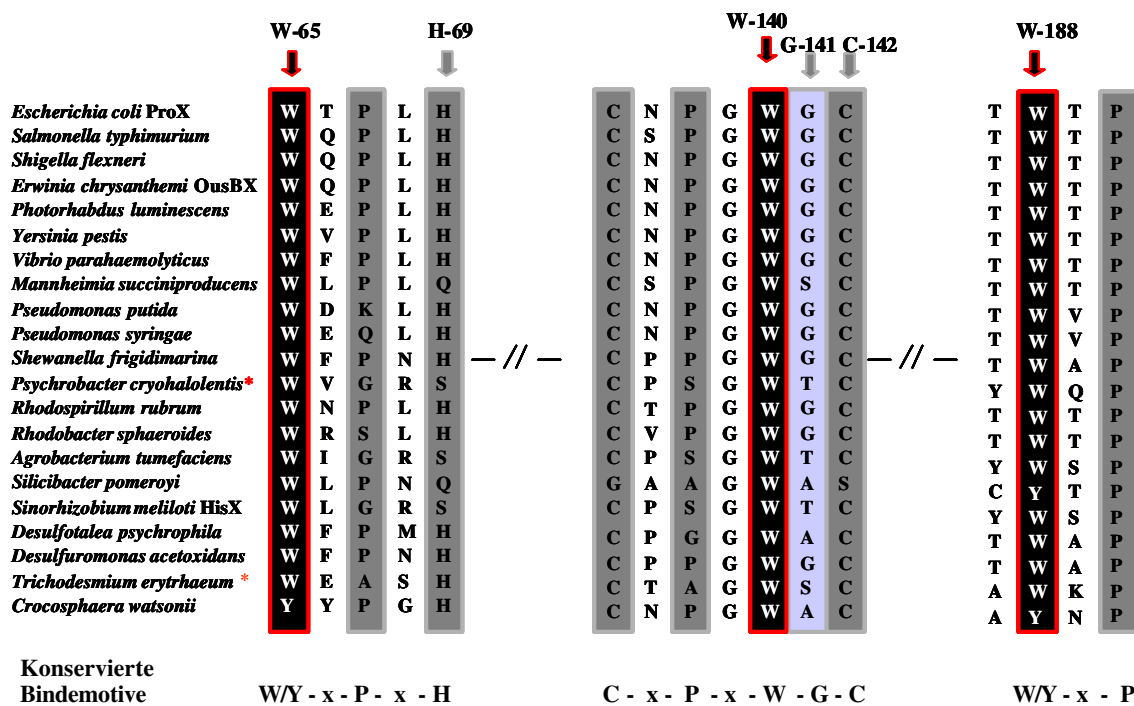


Abb. 21: Die konservierten Bindemotive aus ProX *E. coli* und anderen putativen Substratbindeproteinen

Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines Alignments einer Auswahl von verschiedenen ProX-ähnlichen Substratbindeproteinen aus den genannten Mikroorganismen mit dem Programm Vector NTI. Die Vergleiche der Sequenzen zeigte eine Konservierung der Aminosäuren, die in *E. coli* ProX Protein an der Substratbindung maßgeblich beteiligt sind. So sind in allen Sequenzen die Aminosäuren der Trp-Box zumindest als aromatische Aminosäuren konserviert. Die übrigen beteiligten Aminosäuren, etwa zur Carboxylgruppenstabilisierung (His-69, Gly-141 und Cys-142) sind gut konserviert, ebenso wie die für die Ausbildung der Struktur wichtigen Aminosäuren Pro-67, Pro-190 und Cys-136. * kennzeichnet ein Fusionsprotein aus Permease und Substratbindeprotein.

1.5.2 Die Struktur der putativen Glycin Betain Transporter

Proteine, die eine deutliche Sequenzidentität zu dem *EcProX* Protein zeigen und ebenfalls die konservierten Bindemotive enthalten, wurden auf das Vorhandensein der Proteine des Translokationskomplexes untersucht.

Alle Mikroorganismen, die in Tabelle 9 aufgeführt sind besitzen einen potentiellen Translokationskomplex zugehörig zum *EcProX*-ähnliche Protein. Die Strukturgene sind vermutlich zusammen in einem Genkluster codiert und weisen signifikante Sequenzidentität zu den *E. coli* Proteinen ProW und ProV auf. Die Struktur der Genkluster sind dem des *proU* Transporters sehr ähnlich, in fast allen ist zuerst die ATPase, dann die Permease und zuletzt das periplasmatische Substratbindeprotein (SBP) codiert. Einzige Ausnahmen sind *Silicibacter pomeroyi* (SBP, ATPase, Permease) und *Shewanella frigidimarina* (ATPase, Permease SBP-1, SBP-2). Die beiden Substratbindeproteine in *Shew. frigidimarina* zeigen hohe Sequenzübereinstimmung zueinander, sie sind vermutlich das Ergebnis einer Genduplikation.

In *Psychrobacter cryohalolentis* und *Trichodesmium erythraeum* gibt es eine weitere Ausnahme in der Transporterstruktur, hier sind die Strukturgene der Permease und des Substratbindeproteins aneinander fusioniert. Das resultierende Fusionsprotein besitzt C-terminal 5 Transmembranhelices (ermittelt durch das Programm TMHMM, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), welche eine Sequenzidentität von 45% zu der *E. coli* ProW Permease zeigen und am N-Terminus eine Aminosäuren-Ausdehnung die in das Periplasma ragt. Am N-terminalen Ende des Proteins befindet sich möglicherweise eine weitere Transmembrandomäne, so dass es sich bei dem „Bindeprotein“ möglicherweise auch um einen ausgedehnten Bereich zwischen zwei Transmembranhelices handeln könnte. Die Ausdehnung enthält die konservierten Bindemotive des *EcProX* Proteins. In dieser Ausdehnung befinden sich auch die konservierten Aminosäuren, die mit der *E. coli* ProX Sequenz verglichen werden. Das Fusionsprotein in *T. erythraeum* besteht aus 6 Transmembranhelices am N-Terminus des Proteins, der C-Terminus ragt aus der Zytoplasmamembran heraus. Die C-terminale Ausdehnung enthält die konservierten Bindemotive des *EcProX* Proteins. Eine Datenbankanalyse ergab, dass die Aminosäuresequenz des *EcProX*-ähnlichen Proteins 51% Sequenzidentität zu der Aminosäuresequenz des ProW Proteins aus *E. coli* besitzt.

1.5.3 Phylogenetische Analyse der zur *E. coli* ProX Sequenz homologen putativen Substratbindeproteine

Die meisten Mikroorganismen mit *EcProX*-ähnlichen Proteinen stammen aus der Gruppe der Gammaproteobakterien, zu denen auch die Familie der *Enterobacteriaceae* gehören, aber auch die Ordnungen *Pseudomonadales* (*Psychrobacter*, *Pseudomonas*), *Vibrionales* (*Vibrio*), *Alteromonadales* (*Shewanella*) und der *Pasteurellales* (*Mannheimia*). Die weiteren Untergruppen der Proteobakterien, Alpha-, Beta- und Delta- Proteobakterien sind, wenn auch mit deutlich weniger Spezies ebenfalls vertreten. Lediglich in der Gruppe der Epsilonproteobakterien waren keine verwandten Sequenzen zu finden.

Die größte Anzahl an hochkonservierten Proteinsequenzen stammen aus Mikroorganismen, die phylogenetisch eng verwandt sind und wie *E. coli* ebenfalls zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Die Proteinsequenzen dieser Mikroorganismen weisen die höchsten Sequenzidentitäten zu dem *EcProX* Protein auf (*Salmonella typhimurium* 83%, *Shigella flexneri* 99% und *Yersinia pestis* 71%, *Photobacterium luminescens* 71%, *Erwinia chrysanthemi* OusBX 75%).

Die Sequenzidentität der übrigen Proteine aus der Gruppe der zu den Gammaproteobakterien gehörenden Mikroorganismen liegen zwischen 25%-66%.

Neben den Proteinsequenzen phylogenetisch eng verwandter Mikroorganismen wurden auch eine Reihe von Proteinsequenzen gefunden, die in keiner engeren Verwandtschaft zu *E. coli* stehen, wie zum Beispiel den Alphaproteobakterien zugehörigen *Rhodospirillales* (*Rhodospirillum rubrum*), den *Rhodobacterales* (*Rhodobacter*, *Silicibacter*) und den *Rhizobiaceae* (*Agrobacterium tumefaciens* und *Sinorhizobium meliloti*, HisX 26% Sequenzidentität).

Ein Vertreter der Klasse der Betaproteobakterien, *Burkholderia ambifaria* (34% Sequenzidentität) zeigt nur geringe Sequenzidentität. Es wurden auch einige andere *Burkholderia* Spezies und auch *Bordetella* Spezies in dem Aminosäuresequenzvergleich gefunden, in denen die „Trp-box“ konserviert war, die gesamte Sequenzidentität lag jedoch unter 25% und wurden deshalb vom Alignment (siehe auch Anhang B) ausgeschlossen. In allen diesen Fällen waren jedoch auch Strukturgene für einen ProW-ProV ähnlichen Translokationskomplex in direkter Nachbarschaft zum Strukturgen des Substratbindeproteins codiert.

In die Klasse der Deltaproteobakterien gehören die Mikroorganismen *Desulfotalea psychrophila* (38% Sequenzidentität) und *Desulfuromonas acetoxidans* (41% Sequenzidentität). Es wurden auch Sequenzen von Proteinen aus zwei Cyanobakterien-Spezies gefunden, die eine signifikante Sequenzidentität zu dem *EcProX* besitzen (*T. erythraeum*, 42% Sequenzidentität und *Crocospaera watsonii*, 42% Sequenzidentität).

Es ist deutlich zu sehen, dass die Mikroorganismen, die *EcProX*-ähnliche Proteine enthalten, mit Ausnahme der beiden Cyanobakterien ausschließlich Gram-negative Mikroorganismen sind. Diese Mikroorganismen exkretieren das Protein vermutlich in löslicher Form in das Periplasma. Es wurden lediglich zwei Aminosäuresequenzen von Gram-positiven Mikroorganismen gefunden, welche die Tryptophane der „Trp-box“ in ihrer Sequenz enthielten, deren gesamte Sequenzidentität zu dem *E. coli* ProX liegt aber unter 25% (*Streptomyces avermitilis*, 20%, *Oceanobacillus iheyensis*, 20%). Auch hier gab es *EcProW*-*EcProV* ähnliche Translokationskomplexe direkt angrenzend an das Substratbindeprotein. In allen Sequenzen, mit Ausnahme der von *P. cryohalolentis* und *T. erythraeum* (Fusionsprotein) wurden Signalsequenzen für die Translokation durch die Zytoplasmamembran und eine Schnittstelle für eine Signalpeptidase gefunden, dies geschah mittels des Programmes SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Eine direkter Aminosäuresequenzvergleich der vollständigen Sequenzen sowie eine Auflistung der Zugriffsnummern der Proteine und einer phylogenetische Einordnung der Mikroorganismen sind dem Anhang B zu entnehmen.

2. Das Substratbindeprotein ProX des Transporters ProU aus dem hyperthermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*

Frühere Studien zeigten, dass auch das hyperthermophile Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* einen ProU Transporter besitzt, der ebenfalls eine hohe Substratspezifität und Affinität zu Glycin Betain und Prolin Betain zeigt (Holtmann, 2002). Kristallographische Untersuchungen des ProX Proteins von *A. fulgidus* zeigten, dass die Gesamtstruktur des Proteins und die Gesamtstruktur des *E. coli* ProX Proteins trotz unterschiedlicher Aminosäuresequenzen (21% Sequenzidentität) sehr ähnlich sind. Die quartären Amine der Substrate Glycin Betain und Prolin Betain werden in dem ProX Protein aus *A. fulgidus* über Kation- π -Interaktionen durch einen Gürtel von vier Tyrosinen gebunden. Die Carboxylgruppen der Substrate werden wie bei dem *E. coli* ProX Protein durch Wasserstoffbrücken-Bindungen und Salzbrücken mit drei Aminosäureresten stabilisiert (Holtmann, 2002; Schiefner *et al.*, 2004b). Anders als bei dem mesophilen *E. coli* ProX Protein, in dem drei Tryptophane für die Bindung von Glycin Betain und Prolin Betain verantwortlich sind, handelt es sich hier um vier aromatische Aminosäuren, die Glycin Betain über Kation- π -Interaktionen binden. Durch eine Mutagenesestudie sollten in der vorliegenden Arbeit die Besonderheiten dieses Tyrosingürtels untersucht werden.

2.1 Ortsgerichtete Mutagenese der Aminosäuren des aktiven Zentrums von ProX aus *A. fulgidus*

Das aktive Zentrum von ProX aus *A. fulgidus* besteht aus den vier Tyrosinen Tyr-63, Tyr-111, Tyr-190 und Tyr-214. Die Carboxylgruppe des Glycin Betains und auch des Prolin Betains werden durch Wasserstoffbrücken Bindung mit der Aminosäure Thr-66 und ionischen Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Lys-13 (2 Salzbrücken) und Arg-149 (1 Salzbrücke) gebunden. Das quartäre Amin von Glycin Betain und Prolin Betain wird zusätzlich durch die Interaktion mit der Hauptkettenkomponente der Aminosäure Asp-109 stabilisiert (Abb. 22).

Zur Analyse der Funktionen der einzelnen Aminosäuren in der Bindetasche von AfProX wurde systematisch jede einzelne beteiligte Aminosäure gegen ein Alanin ausgetauscht. Dies geschah durch ortsgerichtete PCR-Mutagenese mit dem Plasmid pGH25 als Vorlage, in welchem das *proX*-Gen aus *A. fulgidus* unter Kontrolle eines *tet*-Promotors vorliegt. Die erhaltenen Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft. Durch den Austausch der

funktionellen Aminosäuren durch Alanin sollten sowohl Kation-pi-Interaktionen mit dem quartären Amin als auch ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken-Bindungen verhindert werden. Durch den Austausch eines Tyrosins durch ein Alanin verbleiben noch drei weitere Tyrosine in der Substratbindetasche, je nach deren Orientierung in der Bindetasche könnte eine ähnliche Konstellation wie in der Tryptophan-Box im *EcProX* Protein entstehen. Daher wurden auch Doppelmutanten konstruiert, in denen zwei verschiedene Tyrosine gegen Alanine ausgetauscht wurden. Dabei wurde jede Kombinationsmöglichkeit berücksichtigt. Die mutierten *AfProX* Proteine mit ihren Aminosäuren-Austauschen sind im Einzelnen in Abbildung 22 gezeigt.

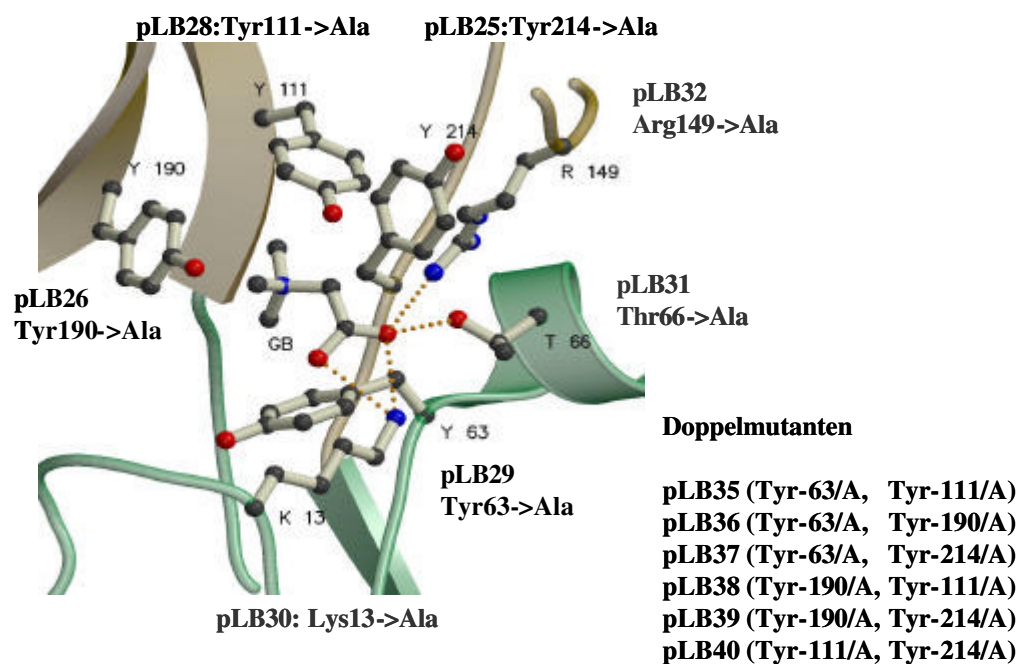


Abb. 22: Ausschnittsvergrößerung der Bindetasche des ProX Proteins aus *A. fulgidus*. In dieser Abbildung ist die Substratbindetasche des *AfProX* bei einer Auflösung von 1,9 Å zu sehen. Das quartäre Amin des Glycin Betains wird über Kation-pi-Interaktionen mit den vier Tyrosinen Tyr-63, Tyr-111, Tyr-190 und Tyr-214 gebunden. Die Carboxylgruppe des Glycin Betains wird durch Interaktionen mit den Aminosäuren Lys-13, Thr-66 und Arg-149 fixiert. Die Abbildung zeigt ebenfalls die durch ortsgerichtete Mutagenese erzeugten Alanin-Mutanten des Tyr-Gürtels und der Carboxylgruppen-Interaktionspartner.

2.2 Heterologe Überexpression und Reinigung des *A. fulgidus* ProX Wildtyp Proteins und seinen mutierten Derivaten

Zur Überexpression von *AfProX* wurde pGH25 oder eines seiner mutierten Derivate (pLB25-40) in den *E. coli* Wildtyp-Stamm MC4100 transformiert, welcher ebenfalls das Plasmid codon plus RIL® enthält. Auf diesem Plasmid sind in *E. coli* seltene tRNAs für Arginin, Isoleucin und Leucin codiert, die von *A. fulgidus* häufig genutzt werden. Das Plasmid pGH25 ist ein pASK-IBA6 Derivat und trägt das *A. fulgidus proX*-Gen hinter einem Anhydrotetrazyklin-induzierbaren *tet*-Promotor. Das produzierte *AfProX* Protein erhält durch diesen Vektor N-terminal eine OmpA Signalsequenz und einen Strep Tag II, die durch Faktor Xa abtrennbar sind. Da es sich bei *AfProX* um ein Protein handelt, welches vermutlich über einen acyliertes Cystein an die Membran fusioniert wird, ist es um seine putative Signalsequenz verkürzt und der Cysteinrest durch ein Glycin ersetzt worden (Holtmann, 2002; Schiefner *et al*, 2004b). Die *AfProX* Proteine wurden in Minimalmedium ohne Substrate überproduziert, aus dem periplasmatischen Extrakt über Strep Tactin Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend wurden Strep Tag II und OmpA mittels Faktor Xa abgetrennt. Die Trennung von ProX, Faktor Xa und dem Spaltprodukt wurde mit dem Anionenaustauscher UnoQ bewirkt (Holtmann, 2002). In Abb.23 ist die Reinigung des *AfProX* Derivates Arg-149/Ala zu sehen.

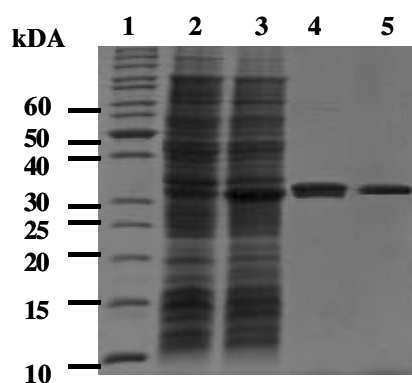


Abb. 23: Überexpression und Reinigung von *AfProX* Arg-149/Ala. In Spur 1 wurde der Größenstandard (Fermentas) aufgetragen, Spur2 : MC4100 codon plus® pLB32 uninduziert, Spur3: MC4100 codon plus® pLB32 induziert, Spur4: ProX Arg-149/Ala nach Strep-Tactin Affinitätschromatographie, Spur5: *AfProX* Arg-149/Ala nach Faktor Xa Verdau, UnoQ-Reinigung und Dialyse.

2.3 Bestimmung der Affinitätskonstanten von Wildtyp- und mutierten *A. fulgidus* ProX Proteinen für Glycin Betain und Prolin Betain mittels Fluoreszenzspektroskopie

Zur Bestimmung der Affinitätskonstante (K_D) des Wildtyp *AfProX* Proteins und der mutagenisierten *AfProX* Proteine wurde die intrinsische Fluoreszenz des Proteins unter ansteigenden Substratkonzentrationen gemessen; die Bindung der Substrate verändert die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften des *AfProX* Proteins. Die schrittweise Erhöhung der Substratkonzentration bewirkt eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm (Holtmann, 2002).

Die Bindekonstanten für Glycin Betain (60 nM) und Prolin Betain (50 nM) wurden bereits zuvor mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt (Holtmann, 2002). Diese Bindekonstanten wurden bei einer Proteinkonzentration von 1,6 μM durchgeführt. Für eine Neubestimmung der Affinitätskonstanten des *AfProX* Proteins zu seinen Substraten wurde die niedrigste ProX Konzentration ermittelt, bei der noch eine zuverlässige Messung unter den gegebenen Parametern im Fluoreszenzphotometer möglich ist. Die Testkonzentration wurde auf 0,05 μM festgelegt. Die Bindekonstanten wurden wie zuvor beschrieben durch eine schrittweise Erhöhung der Glycin Betain oder Prolin Betain-Konzentration bestimmt, die höchste Substratkonzentration im Test betrug 250 nM. Nach jeder Zugabe von Substrat wurde nach Anregung der Probe bei 280 nm ein Emissionsspektrum von 310 nm bis 390 nm aufgenommen. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 50° C durchgeführt. In Abbildung 24 sind die Emissionsspektren für 0,05 μM Wildtyp *AfProX* Protein ohne Substrat und mit Substratsättigung bei 250 μM Glycin Betain gezeigt. Die Emissionsspektren wurden im Bereich 325 nm bis 380 nm integriert, die Fluoreszenzänderung wurde bestimmt und gegen die Substratkonzentration aufgetragen (Abb.25). Eine Auswertung der Messpunkte wurde durch eine Abgleichung der Daten mit folgender Gleichung durchgeführt:

$$F = F_0 + (\Delta F / 2 * P_0) * [(K_D + P_0 + L_0) - ((K_D + P_0 + L_0)^2 - 4 * L_0 * P_0)^{1/2}],$$

wobei F die gemessene Fluoreszenz, F_0 die Fluoreszenz des freien Proteins, ΔF die Änderung der Fluoreszenz bei Sättigung, L_0 die Substratkonzentration, P_0 die Proteinkonzentration und K_D die Affinitätskonstante bedeuten. Die Auswertung der

erhaltenen Messdaten ergab für Glycin Betain eine K_D von $0,010 \mu\text{M} \pm 0,005 \mu\text{M}$ und für Prolin Betain eine K_D von $0,008 \pm 0,004 \mu\text{M}$.

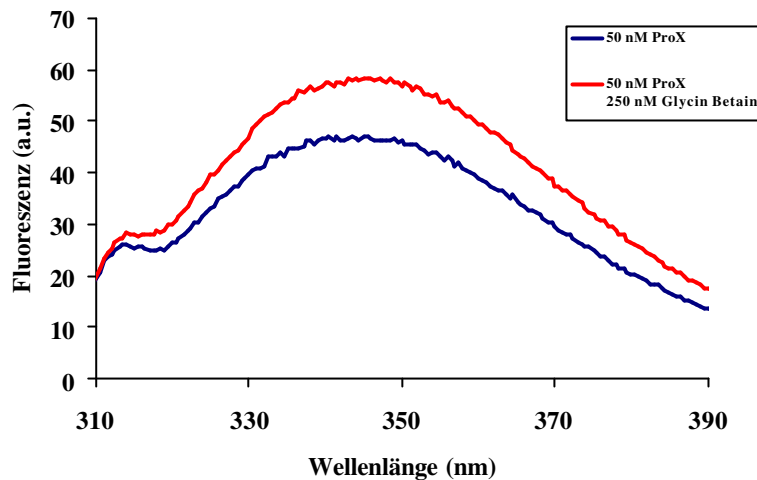


Abb. 24: Emissionsspektren des ProX Proteins aus *A. fulgidus* ohne Substrat und unter Substratsättigung. Die Messungen wurden mit einer *A/ProX*-Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$ und einer Substratkonzentration von $0 \mu\text{M}$ oder $0,25 \mu\text{M}$ Glycin Betain bei 50°C durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm .

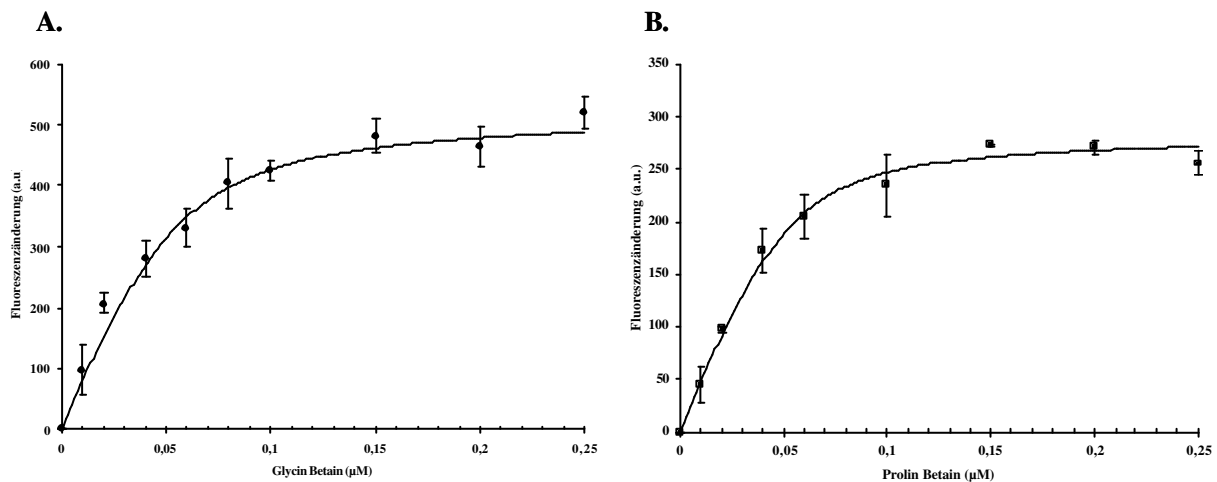


Abb. 25: Bestimmung der Affinitätskonstante (K_D) des *A/ProX* Wildtyp Proteins für Glycin Betain und Prolin Betain. Für die Bestimmung der Affinitätskonstanten wurden zu $0,05 \mu\text{M}$ *A/ProX* Protein steigende Konzentrationen an Substrat hinzutitriert und nach einer Inkubationszeit von 1 Minute bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm Emissionsspektren von 310 bis 390 nm aufgenommen. Die Emissionsspektren wurden normalisiert, integriert ($325 \text{ nm} - 380 \text{ nm}$) und die Fluoreszenzänderung bestimmt. In Abbildung A ist die Fluoreszenzänderung von ProX durch Zugabe von Glycin Betain gezeigt, in Abbildung B zeigt die Fluoreszenzänderung, die durch Zugabe von Prolin Betain erzeugt wird.

Die zu apparenter Homogenität gereinigten, mutagenisierten *A/ProX* Proteine wurden ähnlich dem *A/ProX* Wildtyp Protein fluoreszenzspektroskopisch auf ihre Affinität zu den Substraten Glycin Betain und Prolin Betain untersucht. Die Messungen wurden bei 50°C und einer Proteinkonzentration von 250 nM mutiertem ProX Protein durchgeführt. Es

wurde schrittweise Substrat hinzutitriert, inkubiert und bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm ein Emissionsspektrum von 310 nm bis zu 390 nm aufgenommen. Die Spektren wurden wie zuvor die des Wildtyp Proteins ausgewertet und gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Berechnung der Affinitätskonstanten (K_D) erfolgte nach der oben beschriebenen Formel.

Die AfProX Proteine mit einem Austausch eines einzigen Tyrosins gegen ein Alanin zeigen alle eine Bindeaffinität im mikromolaren Bereich. Der Austausch des Tyr-214 gegen ein Alanin zeigt dabei den geringsten Affinitätsverlust (jeweils 3,5 μM für Glycin Betain und Prolin Betain). Die Mutante Tyr-63/Ala zeigt den stärksten Affinitätsverlust (K_D Glycin Betain = 149 μM und K_D Prolin Betain = 288 μM). Die Mutanten Tyr-111/Ala und Tyr-190/Ala zeigen beide eine niedrigere Affinität zu Glycin Betain (67 μM für Tyr-111/Ala; 75 μM für Tyr-190/Ala). Die Affinitätskonstanten zu Prolin Betain unterscheiden sich deutlich mit nur 148 μM bei Tyr-111/Ala und 19 μM für Tyr-190/Ala. Die Doppelmutanten, in denen jeweils zwei verschiedene Tyrosine des Gürtels gegen Alanine ausgetauscht wurden, sind alle nicht mehr in der Lage, Glycin Betain oder Prolin Betain zu binden; dies wurde für Glycin Betain auch in einem Bindetest mit ^{14}C -markiertem Glycin Betain bestätigt (Abb.26, Tab. 10). Die Mutanten mit einem Alanin-Austausch eines Carboxylgruppen-Bindungspartners, Lys-13/Ala, Thr-66/Ala und Arg-149/Ala, weisen alle eine deutliche Beeinträchtigung der Bindeaffinität auf. Für Thr-66/Ala ist der Affinitätsverlust mit 1,8 μM (Glycin Betain) und 18 μM (Prolin Betain) vergleichsweise niedrig, die Mutation Arg-149/Ala dagegen weist den stärksten Affinitätsverlust auf und liegt mit 320 μM (Glycin Betain) an der Nachweisgrenze. Die Bindung zu Prolin Betain ist nicht mehr nachweisbar. Ein Austausch von Lys-13 gegen Alanin bewirkt für das AfProX Protein einen deutlichen Verlust an Affinität zu Glycin Betain ($K_D=107 \mu\text{M}$) und Prolin Betain ($K_D=101 \mu\text{M}$). In Tabelle 10 sind die Affinitätskonstanten der verschiedenen Alanin-Mutanten des Tyrosingürtels und der Aminosäuren, die in der Stabilisierung der Carboxylgruppe beteiligt sind, für Glycin Betain und Prolin Betain aufgelistet. Die Standardabweichung aus den drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen sind dort ebenfalls vermerkt.

Tab. 10: Affinitätskonstanten für Wildtyp und mutierte A/ProX Proteine für ihre Substrate Glycin Betain und Prolin Betain.

Mutante	K_D Glycin Betain (μM)	Standard-abweichung +/- (μM)	K_D Prolin Betain (μM)	Standard-abweichung +/- (μM)
Wildtyp	0,010	0,005	0,008	0,004
ProX Y-63 /A	149	17	288	26
ProX Y-111/A	78	4	148	28
ProX Y-190/A	67	9	19	5
ProX Y-214/A	3,5	0,7	3,5	0,7
ProX Y-63/A Y-111/A	keine Bindung	-	keine Bindung	-
ProX Y-63/A Y-190/A	keine Bindung	-	keine Bindung	-
ProX Y-63/A Y-214/A	keine Bindung	-	keine Bindung	-
ProX Y-111/A Y-190/A	keine Bindung	-	keine Bindung	-
ProX Y-190/A Y-214/A	keine Bindung	-	keine Bindung	-
ProX Y-111/A Y-214/A	keine Bindung	-	keine Bindung	-
ProX K-13/A	107	20	101	12
ProX T-66/A	1,8	0,2	18	1
ProX R-149/A	320	59	keine Bindung	-

Die mutierten A/ProX Proteine mit einem Austausch von zwei Tyrosinen des Tyr-Gürtels wurden zusätzlich mit ¹⁴C-markiertem Glycin Betain auf ihre Fähigkeit zur Glycin Betain Bindung getestet. Die Proteine wurden in einem Ammoniumsulfat-Präzipitationstest mit 5 μM ¹⁴C-markiertem Glycin Betain bei 50° C inkubiert, wobei die Proteinkonzentration einmal 5 μM und einmal 10μM betrug. Die Messungen wurde drei mal unabhängig voneinander wiederholt. Eine Mutante wurde als bindungsunfähig bezeichnet, wenn zwischen den Messungen mit 5 μM und 10 μM Proteinkonzentration keine Verdopplung der gemessenen Radioaktivität detektiert werden konnte (Abb.26). Die Messkurven der mutierten A/ProX-Proteine sind dem Anhang C zu entnehmen.

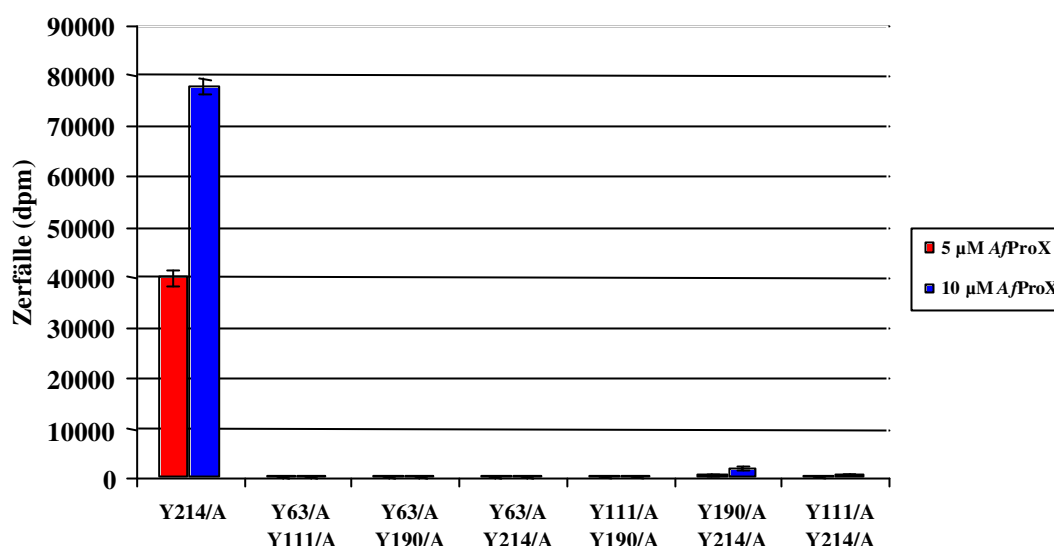


Abb. 26: Ammoniumsulfat-Präzipitationstest der *AfProX* Doppelmutanten mit ^{14}C -markiertem Glycin Betain zur Kontrolle der Fähigkeit zur Glycin Betain Bindung. Die Abbildung zeigt die Resultate eines Ammoniumsulfat Präzipitationstestes der *AfProX* Proteine mit einem Austausch von zwei Tyrosinen des Tyr-Gürtels durch Alanin mit ^{14}C -markiertem Glycin Betain. Dazu wurden $5\ \mu\text{M}$ ^{14}C -markiertes Glycin Betain mit $5\ \mu\text{M}$ und $10\ \mu\text{M}$ des jeweiligen *AfProX* Proteins inkubiert, gefällt und über einen Nitrozellulosefilter abgesaugt. Die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität wurde detektiert und aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle diente das Protein ProX Tyr-214/A, welches eine K_D von $3,5\ \mu\text{M}$ für Glycin Betain besitzt. Eine Mutante wurde als bindungsunfähig bezeichnet, wenn zwischen $5\ \mu\text{M}$ und $10\ \mu\text{M}$ Protein keine Verdoppelung der gemessenen Radioaktivität zu sehen war. Die Messungen wurden drei mal unabhängig voneinander durchgeführt

2.4 Temperaturabhängigkeit der Bindung von ^{14}C -markiertem Glycin Betain durch das *A. fulgidus* Wildtyp ProX Protein

Die optimale Wachstumstemperatur des hyperthermophilen Archaeons *A. fulgidus* liegt bei 83°C . Frühere Studien zeigten, dass bei absoluter Substratsättigung das *AfProX* Protein bei Raumtemperatur ebenso in der Lage ist, markiertes Glycin Betain zu binden wie bei 83°C . In dieser Studie wurde in einer Temperaturspanne von 25°C bis 100°C keine signifikante Veränderung der Bindungskapazität von $5\ \mu\text{M}$ *AfProX*, inkubiert mit $5\ \mu\text{M}$ ^{14}C markiertem Glycin Betain, beobachtet. (Holtmann, 2002). Um sicher zu stellen, dass der beobachtete Effekt nicht nur auf einer Substrat-Übersättigung beruht, wurde der Test mit einer deutlich reduzierten Glycin Betain Konzentration wiederholt. Anstelle von $5\ \mu\text{M}$ ^{14}C markiertem Glycin Betain wurden nur $0,5\ \mu\text{M}$ markiertes Substrat pro $5\ \mu\text{M}$ Protein eingesetzt. *AfProX* wurde mit Glycin Betain für 5 Minuten bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und dann nach der Ammoniumsulfat-Präzipitations-Methode verfahren. Die Werte wurden in einer vierfach-Bestimmung ermittelt. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, kann bei dieser deutlich geringeren Substratkonzentration gegenüber der *AfProX* Konzentration zwischen

Raumtemperatur und 90°C kein signifikanter Unterschied in der Bindungskapazität des A/ProX Proteins detektiert werden. Die Differenz des durch 1 nmol A/ProX gebundenen ^{14}C -markierten Glycin Betains bei 25°C und 90°C beträgt 0,01243 nmol, dies entspricht 15,6% weniger gebundenes Glycin Betain. A/ProX ist also in der Lage, bei verschiedensten Temperaturen mit großer Effizienz ^{14}C -markiertes Glycin Betain zu binden.

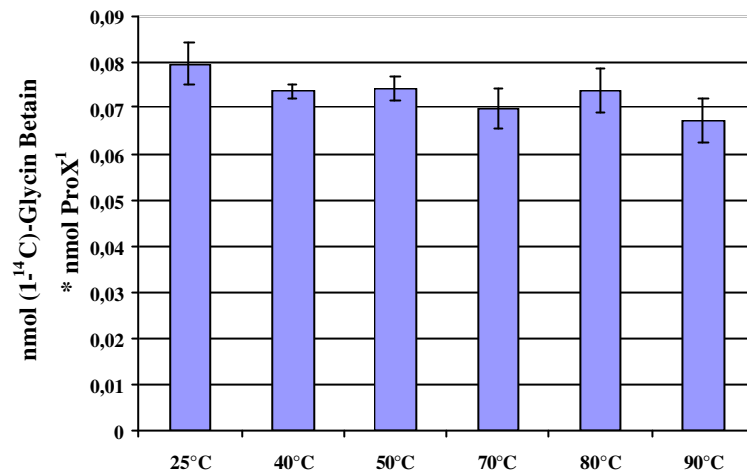


Abb. 27: Einfluss der Temperatur auf die Bindekapazität des A/ProX Wildtyp Proteins zu Glycin Betain. Die Abbildung zeigt die Resultate eines Ammoniumsulfat-Präzipitationstestes von 5 μM *A. fulgidus* Wildtyp ProX Protein mit 0,5 μM ^{14}C - markiertem Glycin Betain. Der Präzipitationstest wurde bei Temperaturen von 25°C, 40°C, 50°C, 70°C, 80°C und 90°C durchgeführt. Jede Messung wurde vier mal wiederholt.

2.4.1 Einfluss der Temperatur auf die Bindekonstante K_D

In Bindestudien mit radioaktiv markiertem Glycin Betain konnte gezeigt werden, dass ein kleiner Unterschied zwischen Raumtemperatur und 83°C, der optimalen Wachstumstemperatur von *A. fulgidus*, in der Bindungskapazität besteht. Da die Affinitätskonstante K_D auch durch die Temperatur beeinflusst wird, sollte dies in einer fluoreszenzspektroskopischen Analyse mit den Substraten Glycin Betain und Prolin Betain bei 25°C, 50°C und 80°C vermessen werden. Die Bestimmung der Bindekonstanten erfolgte durch die Titration des jeweiligen Substrates zu 0,05 μM Wildtyp A/ProX Protein, der Anregung der Probe mit einer Wellenlänge von 280 nm und anschließender Emissionspunktmessung bei 350 nm. Da von vorherigen Emissionsspektren bekannt ist, dass dies der Punkt der größten Fluoreszenzintensitätsänderung ist und es unter Substratabsättigung keine Verschiebung des Emissionsmaximums gibt (Abb.24). Durch die Punktmessung sollte eine zu starke Verdampfung von Puffer verhindert werden, welches die Messung verfälschen

würde. Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten werden normalisiert und gegen die Substratkonzentration aufgetragen (Abb.28). Die Affinitätskonstanten wurden wie zuvor durch abgleichen der Daten mit der oben angegebenen Formel bestimmt. Die Bindekonstanten für das AfProX Wildtyp Protein für Glycin Betain und Prolin Betain bei den unterschiedlichen Temperaturen sind in Tabelle 11 gezeigt.

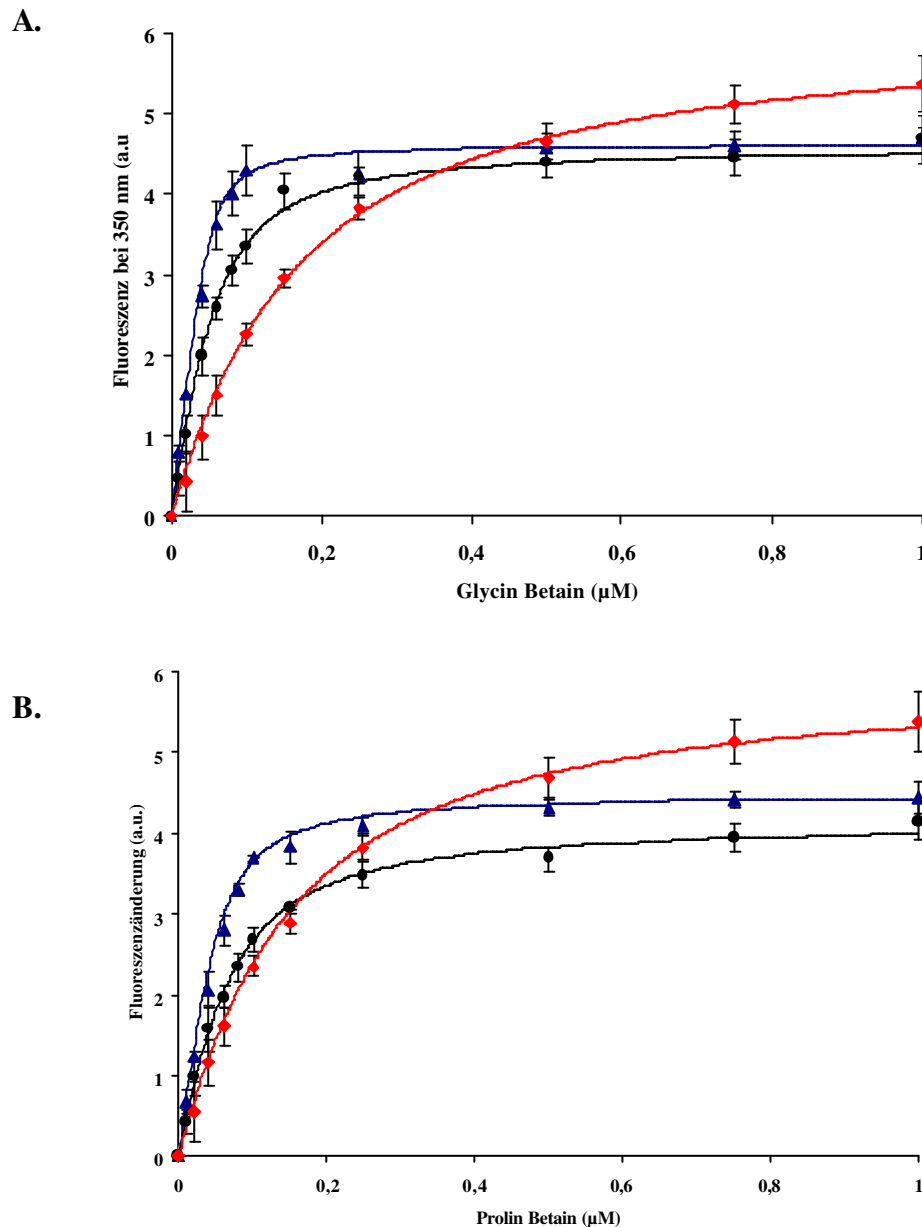


Abb. 28: Einfluss der Temperatur auf die Affinitätskonstanten von AfProX zu seinen Substraten

Die Messungen des AfProX Proteins mit Glycin Betain (A) oder Prolin Betain (B) bei 25°C (▲), 50°C (●) und bei 80°C (◆) wurden durchgeführt, indem 0,05 µM AfProX Protein bei den entsprechenden Temperaturen mit ansteigenden Substratkonzentrationen versetzt wurden und bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm die Fluoreszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge bei 350 nm bestimmt wurden. Die gemessenen Werte wurden normalisiert und gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Bestimmung der Affinitätskonstante wurde wie zuvor durch Abgleichung der Daten mit der Formel $F = F_0 + (\Delta F / 2 * P_0) * [(K_D + P_0 + L_0) - ((K_D + P_0 + L_0)^2 - 4 * L_0 * P_0)^{1/2}]$ durchgeführt.

Tab. 11: Affinitätskonstanten des AfProX Wildtyp Proteins für seine Substrate bei 25°C, 50°C und 80°C. Die Affinitätskonstanten wurden durch Fluoreszenzspektroskopie mit dem Wildtyp ProX Protein erhalten. Dabei wurde zu dem Protein bei verschiedenen Temperaturen Substrat hinzutitriert, bei 280 nm angeregt und bei 350 nm die Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Bestimmung der Affinitätskonstanten wurde mit der oben beschriebenen Formel durchgeführt.

0,05 µM ProX aus <i>A. fulgidus</i> bei Temperatur	Glycin Betain K _D (Standard- abweichung n)	Prolin Betain K _D (Standard- abweichung)
25 °C	5 nM (+/- 3 nM)	14 nM (+/- 5 nM)
50 °C	23 nM (+/- 3 nM)	38 nM (+/- 4 nM)
83 °C	137 nM (+/- 34 nM)	122 nM (+/- 22 nM)

2.5 Vergleichende Aminosäuresequenz-Analyse des ProX Proteins aus *A. fulgidus* mit Proteinen aus Proteindatenbanken

Eine Datenbankanalyse ausgehend von der Aminosäuresequenz von AfProX mit dem BLAST-Algorithmus nach Altschul (Altschul *et al.*, 1990; 1997) ergab eine Vielzahl von Aminosäuresequenzen, welche die Tyrosine des Tyr-Gürtels aus AfProX besitzen. Allerdings ist die Übereinstimmung der gesamten Sequenz meistens eher niedrig und liegt zwischen 30%-35% Sequenzidentität, nur 19 Aminosäuresequenzen besitzen eine Sequenzidentität höher als 35%. Ein direkter Sequenzvergleich wurde mit den Proteinen durchgeführt, deren Sequenzidentität über 35% beträgt und auf die Konservierung der Tyrosine (oder andere aromatischen Aminosäuren) des Tyr-Gürtels untersucht. Einige dieser Sequenzen, die zu Gram-positiven Mikroorganismen gehören, wurden als Lipoproteine identifiziert. Die übrigen Proteinsequenzen ohne Lipidanker wurden als Teil eines Fusionsproteins aus Substratbindeprotein und Permease identifiziert. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um eine Fusion eines Substratproteins an den N-Terminus der Permease, also einer N-terminalen Ausdehnung der Permease. In nur einem Fall konnte diese Ausdehnung am C-Terminus der Permease beobachtet werden. Die bindungsrelevanten Aminosäuren sind alle innerhalb dieser extrazellulären Ausdehnung lokalisiert. Die Fusionsproteine wurden mit dem Programm TMHMM auf Transmembranhelices untersucht und die Anzahl der Helices bestimmt. In Tabelle 12 sind die Mikroorganismen mit AfProX-ähnlichen Sequenzen aufgelistet und näher charakterisiert. Dabei wurden die Sequenzidentität, der Konservierung der an der Bindung beteiligten Aminosäuren aus AfProX sowie eine Unterteilung in Gram-Verhalten (alternativ *Archaea* oder *Cyanobacteria*) und Art des Substratbindeproteins aufgelistet. Ein Alignment

dieser neunzehn Aminosäuresequenzen wurde durchgeführt. In Abbildung 29 sind Ausschnitte des Alignments gezeigt, welche die Konservierung der bindungsrelevanten Aminosäuren dokumentiert. Der direkte Vergleich einer Auswahl von A/ProX-ähnlichen Proteinsequenzen zeigte eine hohe Konservierung der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren (Abb.29, Abb.76).

Tab.12: Aminosäuresequenz-Vergleich der A/ProX ähnlichen Proteine. Die Datenbanksuche wurde am NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) nach Altschul in der non-redundant Datenbank durchgeführt. Die Sequenzidentität wurde im Rahmen des BLAST Algorithmus am NCBI in paarweise Alignment zu der A/ProX Sequenz bestimmt. In der Tabelle sind die Mikroorganismen mit A/ProX-ähnlichen Proteinen aufgelistet, deren % Sequenzidentität zu A/ProX, das Gram-Verhalten der Mikroorganismen (+, -, Cy= Cyanobakterien, Arch.= Archaea), Art des Substratbindepoteins (SBP= Substratbindepotein; per. = periplasmatisch, Lip. = Lipidanker, TMH (x) =Transmembranhelices (Anzahl), bezeichnet eine Fusion des Substratbindepoteins an die zugehörige Permease), sowie die Konservierung der in A/ProX an der Bindung beteiligten Aminosäuren, aufgelistet.

Mikroorganismus	% Sequenz-identität zu ProX A. fulgidus	Gram	Transmembranhelices (Anzahl), Fusion des SBP (N-oder C-Term) Signalsequenz (Sig.) oder Lipidanker (Lip.)	Konservierung der Aminosäuren, die in A/ProX direkt in der Ligandenbindung involviert sind
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> ProX	100	Arch.	Lip.	Y-63, Y-111, Y-190, Y-214 K-13, T-66, R-149
<i>Methanococcoides burtonii</i>	57	Arch.	Lip.	Wie ProX A. fulgidus
<i>Methanosarcina mazei</i>	55	Arch.	Lip.	Wie ProX A. fulgidus
<i>Moorella thermoacetica</i>	44	+	Lip.	Wie ProX A. fulgidus, ausser Y-190/F
<i>Streptococcus suis</i>	42	+	TMH (5), SBP N-terminal fusioniert	Wie ProX A. fulgidus
<i>Erythrobacter litoralis</i>	40	-	TMH (5), SBP N-terminal fusioniert	Wie ProX A. fulgidus
<i>Geobacillus kaustrophilus</i>	39	+	Lip.	Wie ProX A. fulgidus
<i>Oceanicaulis alexandrii</i>	39	-	TMH (6) SBP N-terminal fusioniert	Wie ProX A. fulgidus
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	38	-	TMH (6), SBP N-terminal fusioniert	Wie ProX A. fulgidus
<i>Costridium acetobutylicum</i>	38	+	TMH (6), SBP N-terminal fusioniert	Wie ProX A. fulgidus, ausser Y-190/F
<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	37	+	Lip.	Wie ProX A. fulgidus
<i>Polaromonas sp.</i>	37	-	per.	Wie ProX A. fulgidus
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	37	-	per.	Wie ProX A. fulgidus
<i>Exiguobacterium sp.</i>	37	+	TMH (6), SBP N-terminal fusioniert	Wie ProX A. fulgidus, ausser Y-190/F
<i>Gloeobacter violaceus</i>	36	(Cy.)	TMH (5), SBP C-terminal fusioniert	Wie ProX A. fulgidus
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	36	+	TMH (6), SBP N-terminal fusioniert	Wie ProX A. fulgidus, ausser Y-63/F
<i>Lactobacillus delbrückii</i>	36	+	TMH (5), SBP N-terminal fusioniert	Wie ProX A. fulgidus, ausser Y-63/F
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	36	-	TMH (5), SBP N-terminal fusioniert	Wie ProX A. fulgidus
<i>Clostridium tetani</i>	36	+	TMH (6), SBP N-terminal fusioniert	Wie ProX A. fulgidus, ausser Y-190/F, T66/V
<i>Paracoccus denitrificans</i>	36	-	per.	Wie ProX A. fulgidus, ausser Y-190/F
<i>Bacillus subtilis</i> OpuCC	32	+	Lip.	Wie ProX A. fulgidus, ausser K-13/Q
<i>Bacillus subtilis</i> OpuBC	29	+	Lip.	Wie ProX A. fulgidus, ausser K-13/Q, T-66/D, R-149K

Unter den AfProX-ähnlichen Proteinen wurden zwei Substratbindeproteine von ABC-Transportern aus *Bacillus subtilis* entdeckt, mit einer Sequenzidentität von 32% OpuCC das Substratbindeprotein des ABC-Transporters OpuC und mit 29% Sequenzidentität OpuBC, das Substratbindeprotein des ABC-Transporter OpuB. Für OpuC ist bekannt, dass der Transporter Glycin Betain und Prolin Betain in die Zelle importieren kann, sowie noch zehn weitere kompatible Solute, darunter Cholin und Homobetain, OpuB dagegen importiert nur Cholin (Kappes *et al.*, 1999, Abb.5, Einleitung). Da OpuBC und OpuCC die einzigen charakterisierten Substratbindeproteine sind, wurden sie ebenfalls im Alignment berücksichtigt (Tab.12; Abb.29 (nur OpuCC) und Anhang D, Abb.76).

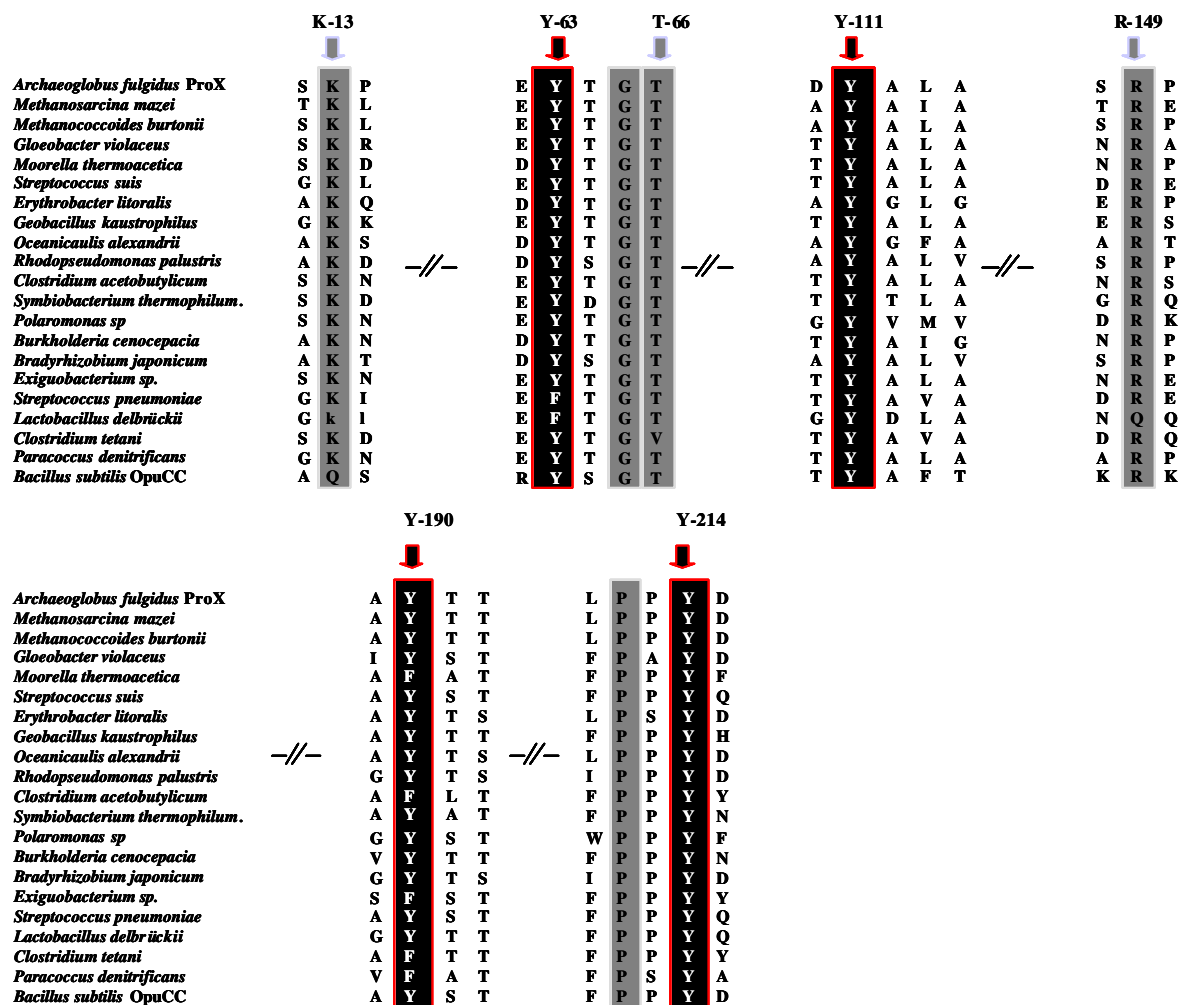


Abb. 29: Konservierung der Aminosäuren, die in AfProX in der Ligandenbindung involviert sind. Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit Hilfe des Vector NTI Programmes durchgeführt.

Ein direkter Aminosäuresequenzvergleich der vollständigen Aminosäuresequenzen sowie eine Auflistung der Zugriffsnummern der Proteine und eine phylogenetische Einordnung der Mikroorganismen sind dem Anhang D zu entnehmen.

Betrachten man die Mikroorganismen, die AfProX-ähnliche Proteine enthalten im Hinblick auf deren taxonomische Einordnung (basierend auf 16S rRNA Sequenzanalyse, NCBI Taxonomy browser), so ist eine weite Verbreitung der AfProX-ähnlichen Proteine zu beobachten. Neben zwei weiteren Proteinen aus den *Archaea* *Methanosarcina mazei* (55%) und *Methanococcoides burtonii* (57%) sind die Proteinsequenz aus einem Cyanobakterium (*Gloeobacter violaceum*, 36%), einem Actinobakterium (*Symbiobacterium thermophilum*, 37%), und einer Reihe von Gram-positiven (*Firmicutes*) und Proteobakterien gefunden worden. In den Proteobakterien sind die Stämme der Alphaproteobakterien (zum Beispiel *Erythrobacter litoralis*, 40%) und Betaproteobakterien (zum Beispiel *Polaromonas sp.*, 37%) vertreten. In dem Stamm der *Firmicutes* sind neben *Lactobacillales* (*Lactobacillus delbrückii*, 36%) auch *Clostridia* (*Clostridium acetobutylicum*, 36%; *Moorella thermoacetica*, 44%) und *Bacillales* (*Exiguobacterium sp.*, 36%) vertreten. Senkt man die Grenze der Mindest-Sequenzidentität von 36% auf 33%, so findet man auch noch Spezies aus den Epsilonproteobakterien (*Helicobacter pylori*, 33%) und Gammaproteobakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, 35%), sowie von den *Fusobacteria* die Spezies *F. nucleatum* (33%) hinzu. Alle diese AfProX-ähnlichen Proteine enthalten Tyrosine oder andere aromatische Aminosäuren in den Positionen des AfProX „Tyr-Gürtel“s. In Abbildung 30 sind die Anzahl und die Einordnung der AfProX-ähnlichen Sequenzen bis einschließlich 33% Sequenzidentität veranschaulicht. In Anhang D sind die Spezies im Einzelnen aufgelistet, ebenso die Sequenzidentität, Konservierung der Tyrosine und die Zugriffsnummern der Proteinsequenzen am NCBI.

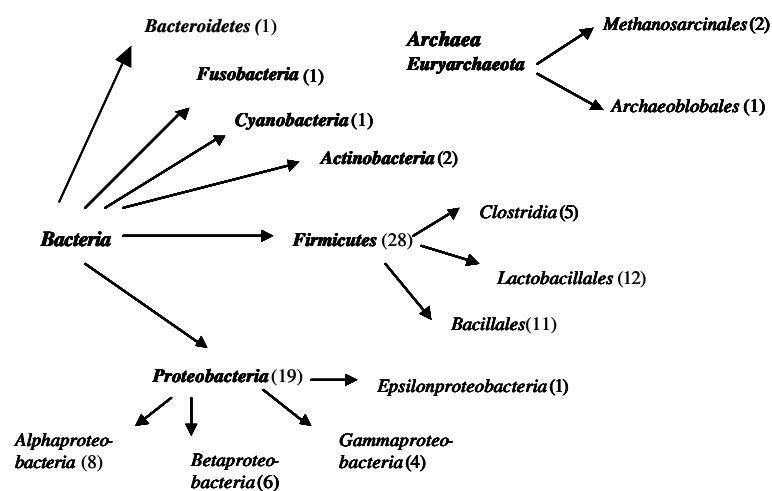


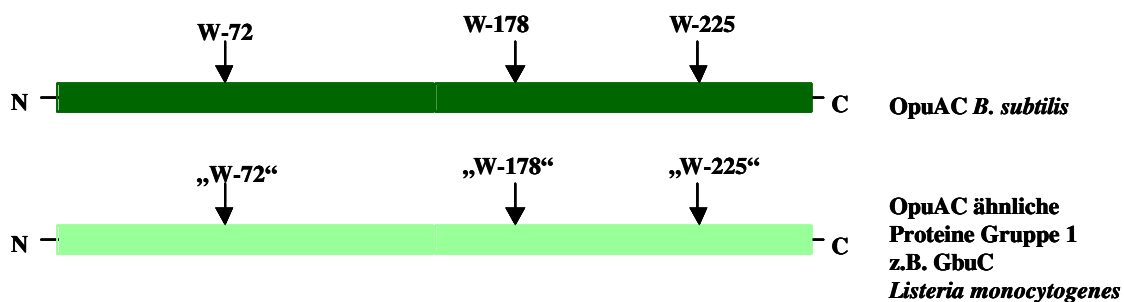
Abb. 30: AfProX-ähnliche Proteine in den *Bacteria* und *Archaea*. Die taxonomische Einordnung der Mikroorganismen wurde mit Hilfe des Taxonomy browsers am NCBI ermittelt. In den Klammern sind die Anzahl an Mikroorganismen vermerkt, die in dieser taxonomischen Einheit zusammen gehören und ein AfProX-ähnliches Protein mit einer Sequenzidentität von mindestens 33% und konservierte aromatische Aminosäuren in den Positionen des „Tyr-Gürtels“ von AfProX besitzen.

3. Datenbankanalyse zur Verbreitung des hochaffinen Glycin Betain Substratbindeproteins OpuAC aus *Bacillus subtilis*

Die Kristallstrukturen der hochaffinen Glycin Betain und Prolin Betain Substratbindeproteine ProX aus dem Proteobakterium *Escherichia coli* und ProX aus dem Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* zeigten beide eine Substratbindetasche, welche die quartären Amine der Substrate über Kation- π -Interaktionen binden. In *EcProX* wird dies durch eine Tryptophan-Box bewirkt, in *AfProX* über einen Tyrosin-Gürtel. Die Carboxylgruppen der Substrate werden jeweils über Wasserstoffbrücken-Bindungen und Salzbrücken stabilisiert. Im Falle von *AfProX* werden die quartären Amine der Substrate zusätzlich durch eine Wasserstoffbrücke zu Asp-109 stabilisiert. Die hochaufgelöste Kristallstruktur (1,95 Å) eines Substratbindeproteins aus dem Gram-positiven Mikroorganismus *Bacillus subtilis*, OpuAC, lieferte einen weiteren Einblick in die Bindetasche eines hochaffinen Glycin Betain-Bindeproteins ($K_D=17\mu\text{M}$), das auch Prolin Betain ($K_D=295\mu\text{M}$) binden kann (Horn *et al.*, 2006a, im Druck). OpuAC ist ein Lipoprotein und gehört zu dem hochaffinen ABC-Transporter OpuA (Kempf *et al.*, 1997). Eine Ausschnittsvergrößerung der Substratbindetasche zeigte ein Tryptophan-Prisma, das eine ähnliche Konfiguration aufweist wie die „Trp-Box“ im *EcProX* Protein. In die Substratbindung sind die Tryptophane Trp-72, Trp-178 und Trp-225 involviert, die Carboxylgruppen werden durch die Aminosäuren Gly-26, Ile-27 (Wasserstoff-Brücken mit dem Hauptketten-Amid) und His-230 stabilisiert (Abb. 14B) (Horn *et al.*, 2006a, im Druck). Eine Datenbankanalyse mit der OpuAC-Aminosäuresequenz sollte Aufschluss über die Verbreitung dieser Art von hochaffinem Glycin Betain Bindeprotein geben, welches nun eine dritte Variante zu den bereits bekannten Glycin Betain Bindeproteinen darstellt. Die Datenbankanalyse wurde wie bei den vorher beschriebenen Substratbindeproteinen am NCBI in der non-redundant Datenbank mit dem BLAST-Algorithmus nach Altschul (Altschul *et al.*, 1990, 1997) durchgeführt. Das Resultat dieser Datenbankanalyse führte zu OpuAC-ähnlichen Proteinen, die zwei unterschiedlich strukturierte Aminosäuresequenzen aufwiesen. Einige wenige Sequenzen können direkt mit der Aminosäuresequenz von OpuAC verglichen werden, darunter GbuC aus *Listeria monocytogenes* (51% Sequenzidentität) (Ko und Smith, 1999; Mendum und Smith, 2002), sowie Sequenzen aus *Bacillus licheniformis* (71% Sequenzidentität) und aus *Halobacillus trueperi* (39% Sequenzidentität); diese Proteinsequenzen werden in Gruppe 1 zusammengefasst. Die zweite Gruppe, die eine deutlich größere Anzahl von Proteinen beinhaltet, wies einen

Domänen-Tausch („domain swap“) im Vergleich zu dem *B. subtilis* OpuAC Protein auf. Diese Aminosäuresequenzen konnten nur mit der OpuAC-Aminosäuresequenz verglichen werden, wenn in OpuAC „C-Domäne“ und „N-Domäne“ vertauscht wurden (Abb. 31). Diese Invertierung der Aminosäuresequenz wurde erstmals bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen von OpuA aus *Lactococcus lactis* mit der Sequenz des *Bs*OpuAC Proteins beobachtet (Obis *et al.*, 1999).

OpuAC-ähnliche Proteine Gruppe 1



OpuAC-ähnliche Proteine Gruppe 2 mit Domänentausch („Domain-swap“)

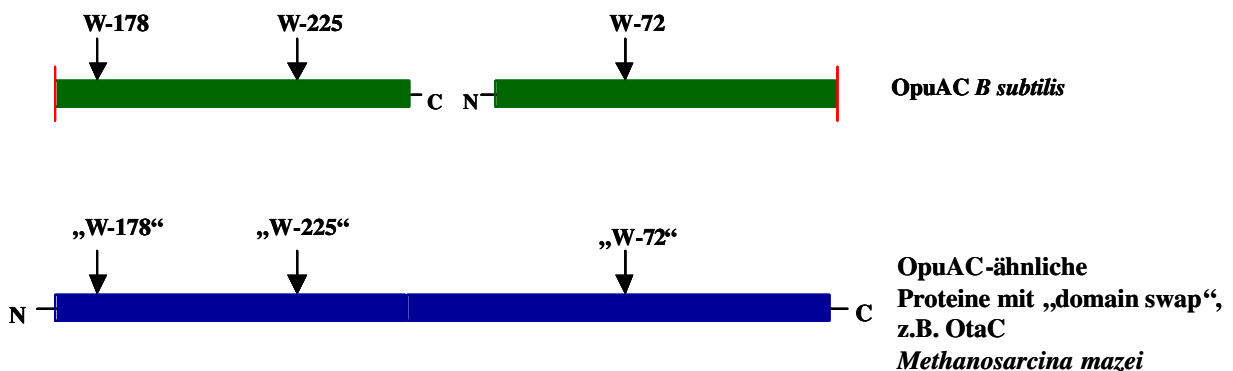


Abb. 31: OpuAC-ähnliche Proteine weisen zum Teil einen Domänentausch („domain swap“) auf. In Gruppe 1 sind die Aminosäuresequenzen der Proteine zusammengefasst, die direkt mit der Aminosäuresequenz von OpuAC verglichen werden können. In Gruppe 2 dagegen wurde die OpuAC-Aminosäuresequenz hinter Asp-190 durchtrennt (dies wird durch den roten Strich gekennzeichnet) und die beiden „Domänen“ wurden miteinander vertauscht. In dieser veränderten Aminosäuresequenz-Abfolge konnte ein Aminosäuresequenzvergleich der OpuAC-ähnlichen Proteine mit einem „Domain swap“ und des OpuAC Proteins mit Vector NTI durchgeführt werden.

Beide Gruppen von OpuAC-ähnlichen Proteinen wurden mit der Sequenz von *Bs*OpuAC in einem „Alignment“ verglichen und auf die Konservierung der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren untersucht. Dabei zeigte sich in beiden Gruppen der OpuAC-

ähnlichen Proteine eine vollständige Konservierung der Tryptophane (Trp-72, Trp-178 und Trp-225), die direkt in die Substratbindung involviert sind. In diesen Aminosäuresequenzen wurde keine einzige Substitution durch eine andere aromatische Aminosäure entdeckt. Die Carboxylgruppen-Interaktionspartner zeigten dagegen für His-230 und Ile-27 nur eine geringe Konservierung (His-230 in 18 von 30 Sequenzen, Ile-27 konserviert in nur 7 von 30 Sequenzen), Gly-26 dagegen ist sehr gut konserviert (konserviert in allen 30 Sequenzen), (Tabellen 13 und 14 und „Alignment“ in Anhang E). Da im Falle von Gly-26 und Ile-27 die Interaktion mit Glycin Betain über die Amidgruppen des Peptidrückgrates stattfindet, spielen die Aminosäuren-Seitenketten in der Substratbindung aber keine Rolle. Auffällig ist auch die hohe Konservierung der Proline Pro-74 und Pro-227, die in unmittelbarer Nähe zu den an der Bindung beteiligten Tryptophanen liegen. In Tabelle 13 (Gruppe 1) und Tabelle 14 (Gruppe 2) sind eine Auswahl an Mikroorganismen zusammengestellt, deren OpuAC-ähnliche Proteine in den „Alignments“ mit OpuAC verglichen wurden und verschiedene phylogenetische Gruppen repräsentieren. Die Sequenzidentität, Art des Substratbindepoteins sowie die Konservierung der in *BsOpuAC* an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren sind dort ebenfalls vermerkt. Die vollständigen Aminosäuresequenzvergleiche (Abb.75 und Abb.76) sowie die Zugriffsnummern der Proteinsequenzen am NCBI und eine genauere phylogenetische Einordnung der Mikroorganismen sind Anhang E zu entnehmen.

Tab.13 „Alignment“ der OpuAC-ähnlichen Proteine der Gruppe 1. Diese Tabelle zeigt Mikroorganismen, die *BsOpuAC*-ähnliche Proteine besitzen, die % Sequenzidentität dieser *BsOpuAC*-ähnlichen Proteine zu *BsOpuAC* und das Gram-Verhalten der Mikroorganismen. Ausserdem wird die Art des Substratbindepoteins (Lip.=Lipidanker) und die Konservierung der Aminosäuren, die in *BsOpuAC* an der Ligandenbindung beteiligt sind, aufgeführt.

Mikroorganismus	% Sequenz-identität zu OpuAC <i>B. subtilis</i>	Gram	Transmembranhelices (Anzahl), Fusion des SBP, Periplasma (Per), Lipoprotein (Lip)	Konservierung der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren in OpuAC
<i>Bacillus subtilis</i> OpuAC	100	+	Lip	W-72, W-178, W-225 G-26, I-27, H-230
<i>Bacillus licheniformis</i>	71	+	Lip	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i> GbuC	51	+	Lip	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H230/S
<i>Listeria innocua</i>	51	+	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H230/S
<i>Lactobacillus casei</i>	49	+	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/V, H-230/S
<i>Lactobacillus sakei</i>	48	+	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i>
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	43	+	Lip	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i>
<i>Bacillus clausii</i>	41	+	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/V
<i>Halobacillus trueperi</i>	39	+	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/V

Die Gruppe 1 umfasst deutlich weniger Aminosäuresequenzen von OpuAC-ähnlichen Proteinen. Die Verbreitung dieser Struktur ist also begrenzt, auch bezüglich der phylogenetischen Zugehörigkeit der Mikroorganismen, die dieses Protein enthalten. Alle Mikroorganismen, die ein OpuAC-Protein der Gruppe 1 enthalten gehören zu den Gram-positiven Mikroorganismen (*Firmicutes*) und mit Ausnahme von *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus sakei* in die Ordnung der *Bacillales*.

Tab. 14: „Alignment“ einer Auswahl von OpuAC-ähnlichen Proteine der Gruppe 2 („domain swap“). Für den Aminosäuresequenzvergleich wurde die *Bs*OpuAC-Sequenz wie in Abbildung 31 angedeutet zwischen den Aminosäuren Asp-190 und Lys-191 getrennt und die Domänen vertauscht. Die Tabelle zeigt eine Auswahl von Mikroorganismen, die *Bs*OpuAC-ähnliche Proteine der Gruppe 2 enthalten, deren % Sequenzidentität zu der modifizierten *Bs*OpuAC-Sequenz, des Gram-Verhaltens (+, -; alternativ Cy=Cyanobakterien, Arch.=Archaea) der Art des Substratbindepoteins (SBP= Substratbindepotein; Lip.= Lipidanker, Per.= Periplasmatisch; TMH=Transmembranhelices und deren Anzahl) und die Konservierung der Aminosäuren, die in *Bs*OpuAC an der Substratbindung beteiligt sind. Das „Alignment“ und die Bestimmung der Sequenzidentität zu OpuAC wurde mit dem Programm Vector NTI (Invitrogen) durchgeführt.

Mikroorganismus	%Sequenz-identität zu OpuAC <i>B. subtilis</i>	Gram	Transmembranhelices (Anzahl), Fusion des SBP, Periplasma (Per), Lipoprotein (Lip)	Konservierung der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren in <i>Bs</i> OpuAC
<i>Bacillus subtilis</i> OpuAC	100	+	Lip.	W-72, W-178, W-225 G-26, I-27, H-230
<i>Streptococcus mutans</i>	58	+	TMH (7)	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> ,
<i>Chromohalobacter salexigens</i>	56		Per.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	56	+	TMH (8)	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/V
<i>Lactococcus lactis</i> OpuA	55	+	TMH (7)	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/V
<i>Bacillus clausii</i>	55	+	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/V
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	55	+	TMH (7)	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/E
<i>Alkalilimnicola ehrlichei</i>	54	-	Per.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i>
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	53	+	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/V
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	52	-	Per	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/L
<i>Pseudomonas putida</i>	51	-	Per.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/V
<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i>	50	+	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i>
<i>Methanococoides burtonii</i>	49	Arch.	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H-230/Q
<i>Methanosarcina mazei</i> OtaC	48	Arch.	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H-230/Q, I-27/V

Fortsetzung Tab. 14: „Alignment“ einer Auswahl von OpuAC-ähnlichen Proteine der Gruppe 2 („domain swap“).

Mikroorganismus	%Sequenz-identität zu OpuAC <i>B. subtilis</i>	Gram	Transmembranhelices (Anzahl), Fusion des SBP, Periplasma (Per), Lipoprotein (Lip)	Konservierung der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren in <i>BsOpuAC</i>
<i>Clostridium tetani</i>	47	+	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	47	+	Lip	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H-230/D, G-26/S I-27/L
<i>Brucella melitensis</i>	47	-	Per.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H-230/E, G-26/S I-27/A
<i>Ralstonia solanacearum</i>	46	-	Per.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H-230/Q, I-27/V
<i>Bacteroides fragilis</i>	46	-	Per.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H-230/M
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	42	+	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H-230/N, G-26/S I-27/F
<i>Methanococcus maripaludis</i>	42	Arch.	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i>
<i>Thermobifida fusca</i>	40	+	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/L
<i>Borrelia burgdorferi</i>	40	-	-	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H-230/D, I-27/T
<i>Leifsonia xyli</i>	40	+	TMH (6)	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/L
<i>Prochlorococcus marinus</i>	39	Cy.	-	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/L
<i>Mesorhizobium loti</i>	37	-	Per	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H-230/T, G-26/D I-27/G
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	37	-	Per.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H-230/E, G-26/E I-27/G
<i>Photobacterium profundum</i>	36	-	Per.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H-230/E, G-26/D I-27/G
<i>Vibro vulnificus</i>	36	-	Per.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser H-230/E, G-26/D I-27/G
<i>Burkholderia fungorum</i>	36	-	Per.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/L
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34	-	Per.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/L, H-230/V
<i>Propionibacterium acnes</i>	30	+	Lip.	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/L
<i>Synechococcus sp.</i>	30	Cy.	-	Wie OpuAC <i>B. subtilis</i> , ausser I-27/L

Die Verbreitung der OpuAC-ähnlichen Proteine der Gruppe 2 dagegen ist sehr groß und umfasst auch Archaea (*Methanosarcina mazei*, OtaC (Roessler *et. al.*, 2002); *Methanococcus maripaludis*), Cyanobakterien (*Synechococcus sp.*), Actinobakterien (*Thermobifida fusca*), Spirochaeten (*Borrelia burgdorferi*), Bacteroide (*Bacteroides fragilis*), Gram-positive (*Lactococcus lactis* OpuABC, van der Heide und Poolman, 2000a, b) und Proteobakterien (*Ralstonia solanacearum*). Ebenfalls auffällig ist die Tatsache, dass in Gruppe 2 auch Fusionsproteine existieren, in denen das Substratbindeprotein an die

Permease anfusioniert ist, sowie Lipoproteine und in das Periplasma exkretierte Proteine (Gram-negative Bakterien). In Gruppe 1 existiert nur noch die Form der Lipoproteine, aber keine Fusionsproteine mehr. Im folgenden wurden alle Mikroorganismen, die OpuAC-ähnliche Proteine mit signifikanter Sequenzidentität besitzen auf ihre 16S rRNA-Sequenz basierende, taxonomische Zugehörigkeit betrachtet. Dabei zeigte sich eine weite Verbreitung dieses OpuAC-Typ Bindeproteins (Gruppe 2), die in Abbildung 32 dargestellt wird. Hinter den Klassen der *Bacteria* sind die Anzahl der Mikroorganismen mit OpuAC-ähnlichem Protein angegeben. In Anhang E (Tab. 25 und 26) sind die Details zur phylogenetischen Zugehörigkeit aufgelistet sowie die Konservierung der Tryptophane und die Zugriffsnummern am NCBI.

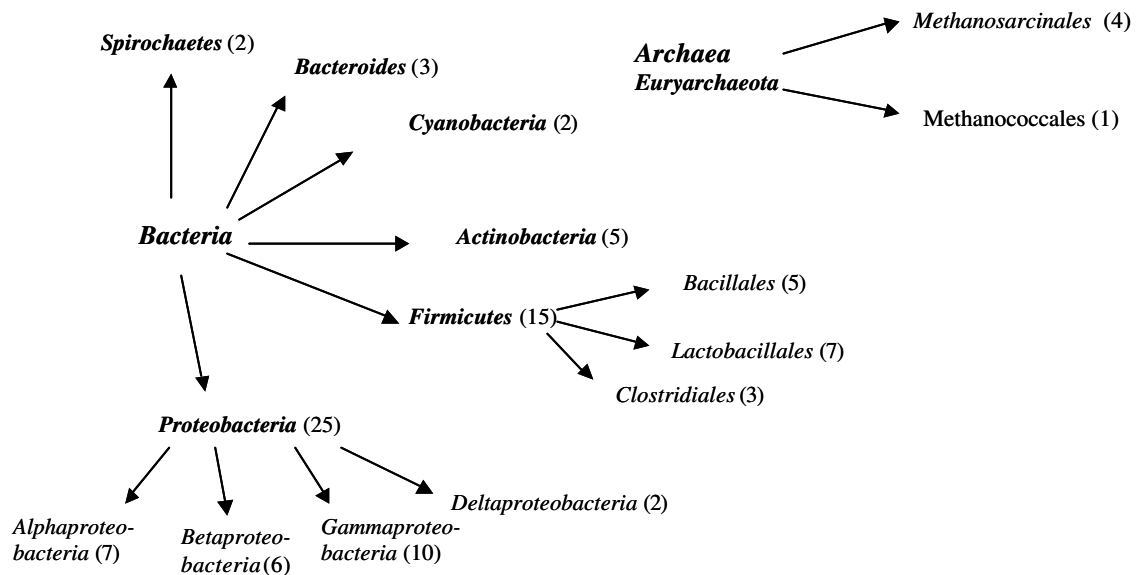


Abb. 32: Taxonomische Zugehörigkeit der Mikroorganismen mit OpuAC-ähnlichen Proteinen der Gruppe 2. Die taxonomische Einordnung der Mikroorganismen wurde mit Hilfe des Taxonomy browsers am NCBI ermittelt. In den Klammern sind die Anzahl an Mikroorganismen vermerkt, die in dieser taxonomischen Einheit zusammen gehören und ein OpuAC-ähnliches Protein mit konserviertem „Trp-Prisma“ besitzen. Die Mikroorganismen und die Zugriffsnummern der Proteine sind in Anhang E in den Tabellen 25 und 26 aufgeführt.

4. Biochemische und physiologische Charakterisierung des Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporters Ehu aus *Sinorhizobium meliloti*

Mit den Kristallstrukturen der Substratbindeproteine ProX aus *E. coli*, ProX aus *A. fulgidus* und OpuAC aus *B. subtilis* sind drei hochaffine bakterielle Substratbindeproteine von ABC-Transportern für die kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain in hoher Auflösung bekannt (Schiefner *et al.*, 2004a, Schiefner *et al.*, 2004b). Die molekularen Grundlagen zur hochaffinen Bindung von diesen kompatiblen Soluten sind durch die Kristallstrukturen mit hoher Auflösung und die in dieser Arbeit vorgestellten Mutagenesestudien gut untersucht. In vielen halophilen und halotoleranten Mikroorganismen werden die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin als hochpotente Osmolyte synthetisiert, *in vitro* wirken sie stabilisierend auf Enzyme bei hyperosmotischem Stress, Hitze- sowie Kältestress oder denaturierenden Bedingungen (Galinski, 1995; Lippert und Galinski, 1992). Mittlerweile sind einige osmotisch regulierte Transportproteine identifiziert, die Ectoin mit hoher Affinität transportieren (EktT, *V. pantothenicus*; EctP *C. glutamicum*, TeaABC, *H. elongata*).

Bisher sind aber noch keine strukturellen Daten zur Bindung von kompatiblen Soluten wie Ectoin und Hydroxyectoin durch ein Substratbindeprotein bekannt. Die Entdeckung eines Ectoin-induzierten Genclusters in *Sinorhizobium meliloti*, der für einen ABC-Transporter codiert (Jebbar *et al.*, 2005), ermöglichte nun Untersuchungen der spezifischen Substratbindung des kompatiblen Solutes Ectoin.

4.1 Analyse und Charakterisierung des Transporters Ehu aus *Sinorhizobium meliloti*

4.1.1 Analyse der Strukturgene *ehuABCD* und deren Proteine

Durch 2-D-Gelelektrophoresen mit Zellextrakten aus *S. meliloti* Zellen, die mit und ohne 1 mM Ectoin in Laktat-Aspartat-Salz-Medium (LAS) kultiviert wurden, sind unter anderem das Protein Smb20428 mit MALDI-TOF Analyse und „Peptid mass finger print“ identifiziert worden (Jebbar *et al.*, 2005). Das zugehörige Strukturgen *smb20428* ist im sequenzierten Genom von *Sinorhizobium meliloti* auf dem Megaplasmid B (1,7 Mb) lokalisiert und ist annotiert als Strukturgen für ein putatives Aminosäure-Bindeprotein. In

dessen direkter Umgebung sind die Strukturgene für eine putative ATPase und 2 Transmembranproteine codiert. Diese Gene wurden später mit *ehuABCD* (ectoine-hydroxyectoine uptake) bezeichnet, (Jebbar *et al.*, 2005). Das Strukturgen *ehuA* codiert für eine putative ATPase, *ehuB* für das putative periplasmatische Aminosäuren-Bindeprotein, *ehuC* und *ehuD* für die putativen Transmembranproteine (Abb.33). EhuB ist ein hydrophiles Protein mit 283 Aminosäuren Länge und einer kalkulierten molekularen Masse von 30 kDA. EhuB wird vermutlich über den Sec-abhängigen Sekretionsweg in das Periplasma geschleust und die Signalpeptidase I entfernt abschließend die N-terminale Signalsequenz.

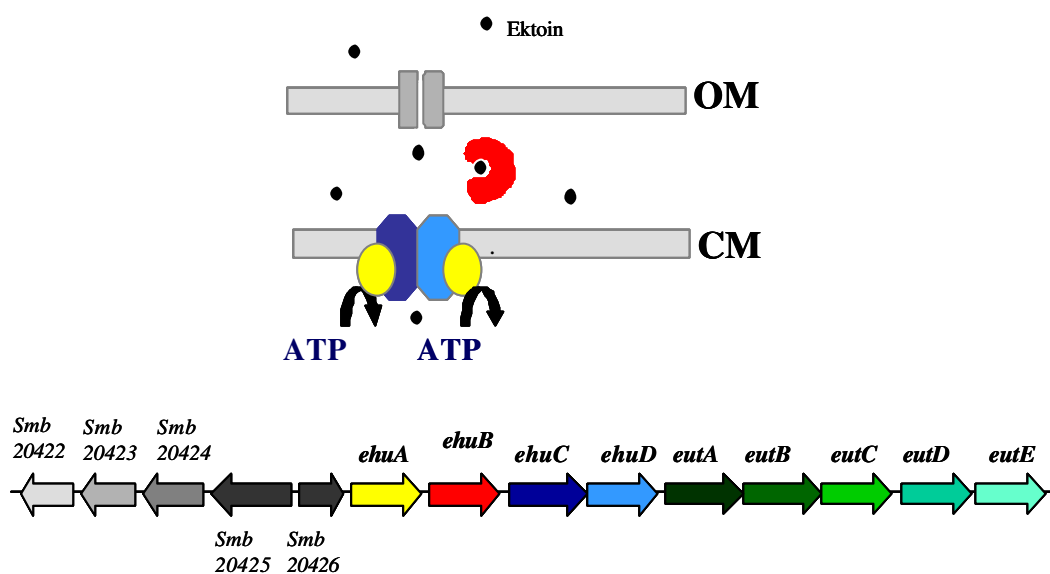


Abb. 33: Der Ehu-Transporter von *Sinorhizobium meliloti*. Der Ehu Transporter ist aus den klassischen Komponenten eines ABC-Transporters aufgebaut; einem Substratbindeprotein EhuB, den zwei membrandurchspannenden Permeasen EhuC und EhuD, sowie den zwei assoziierten ATPasen, EhuA. Die Strukturgene des Transporters sind in einem Operon organisiert, in dem zunächst die ATPase EhuA codiert ist, gefolgt von den Strukturgenen des periplasmatischen Bindepotein EhuB sowie den Permeasen EhuC und EhuD. Hinter dem *ehu*-Gencluster liegen die *eut*-Gene, die vermutlich im katabolen Abbau von Ectoin eine Rolle spielen. *Smb20425* und *smb20426* codieren beide für Transkriptionsregulatoren, von denen nicht bekannt ist, ob sie in der Induktion der *ehu* und *eut*-Gene eine Rolle spielen. Das stromaufwärts liegende Gen *smb20423* ist ebenfalls ein Ectoin-inuziertes Gen, das von *smb20422* und *smb20424* flankiert wird. Diese spielen möglicherweise ebenfalls eine Rolle im Ectoin-Abbau.

Die putative ATPase EhuA zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu konservierten Regionen anderer ABC-Typ ATPasen. EhuA enthält die für nukleotidbindende Proteine charakteristische Walker-Sequenzen (Walker *et al.*, 1982a; Walker *et al.*, 1982b) und ist damit wahrscheinlich ein ATP-bindendes Protein. Die abgeleitete molekulare Masse dieses hydrophilen Proteins beträgt 29,2 kDA bei einer Länge von 260 Aminosäuren.

Die putativen Transmembranproteine EhuC und EhuD zeigen in Datenbankanalysen deutliche Sequenzhomologien zu anderen putativen Permeasen von als Aminosäuretransportierende ABC-Transporter annotierten Proteinen, von denen aber bisher noch keine charakterisiert wurde. Eine Hydrophobizitätsanalyse der Aminosäuresequenzen von EhuC und EhuD mit dem Programm TMHMM (Transmembrane Protein Topology prediction with a hidden Markov Model) sagte das Vorhandensein von 3 Transmembransegmenten für EhuC und 4 Transmembransegmente für EhuD voraus (Abb.33B). Damit weichen EhuC und EhuD stark von dem bekannten Modell für Permeasen von ABC-Transportern ab, laut dem ein Minimum an 5 Transmembranhelices pro Permease für die Funktion des Transporters benötigt wird (Higgins 1992). Ein Aminosäuresequenz-Vergleich von EhuC und EhuD zeigte, dass die beiden Sequenzen nur eine limitierte Sequenzidentität von 30 % zueinander besitzen. Eine für ABC-Transporter Permeasen typische konservierte Sequenz, die mit den ATPasen interagierenden Aminosäuren EAA, ist lediglich in EhuD auf der zytoplasmatischen Seite vorhanden. In EhuC ist das EAA-Motiv nicht vorhanden.

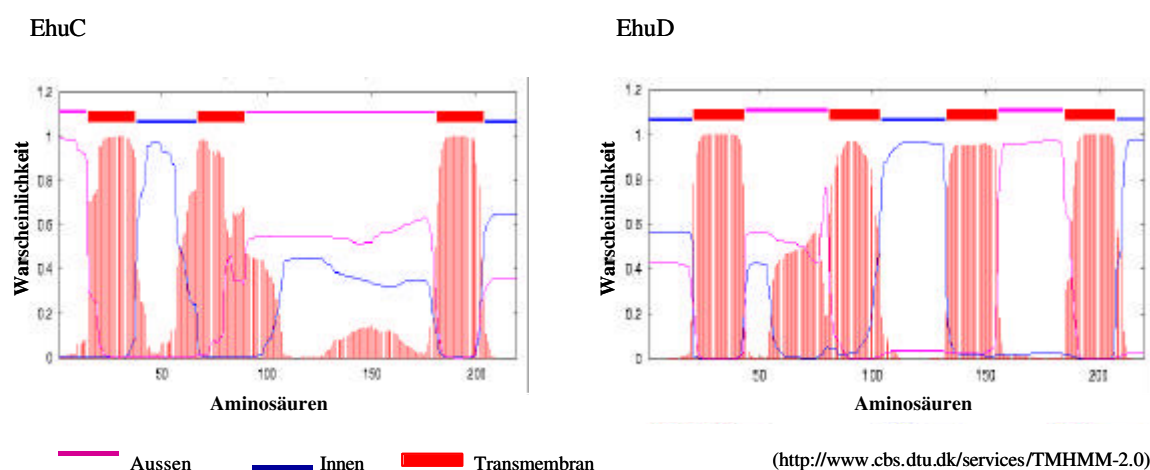


Abb. 33B: Topologie der putativen Permeasen EhuC und EhuD. Die Abbildungen zeigen Hydropathie-Plots der beiden Aminosäuresequenzen der putativen Transmembrandomänen EhuC und EhuD, welche die Wahrscheinlichkeit und Anzahl von Transmembranhelices vorhersagen. Die Analyse wurde mit dem Programm TMHMM (Transmembrane Protein Topology prediction with a hidden Markov Model, <http://www.cbs.dtu.dk>) durchgeführt.

Da die ATPasen und Permeasen eines ABC-Transporters vermutlich immer als Dimer existieren (Higgins 1992), besteht der funktionelle Ehu-Transporter vermutlich aus einem Heterodimer der Permeasen EhuC und EhuD und einem Homodimer der ATPasen EhuA. *S. meliloti* ist ein Mikroorganismus, der verschiedene kompatible Solute katabolisieren kann und diese als Kohlenstoff und Stickstoffquelle verwendet (Talibart *et al.*, 1994). Die Genprodukte der flankierenden offenen Leseramen *smb20423*, *smb20431*, *smb20433*,

smb20434 und *smb20435* wurden bei der 2-D Gelelektrophorese ebenfalls als Ectoin-induzierte Proteine identifiziert (Jebbar *et al.*, 2005). Durch Datenbankanalysen wurden die Aminosäuresequenzen beschrieben und die codierten Enzyme als mögliche katabole Enzyme für den Ectoinabbau eingestuft. Die 5 offenen Leserahmen, die direkt hinter dem 3`Ende der *ehuABCD* Transportergene liegen, wurden mit *eutABCDE* (ectoine ut^ulization) benannt. Die EutABCDE-Proteine sind in Datenbankanalysen als putative Arylmalonat-Decarboxylase (EutA), putative Threonin-Dehydratase (EutB), putative Ornithin-Cyclodeaminase (EutC), putative Dipeptidase (EutD) und ein Protein mit unbekannter Funktion (EutE) charakterisiert worden. Der Ehu-Transporter, sowie die *ehu*- und *eut*-Strukturgene sind in Abbildung 32 gezeigt. Die Gene *Smb20425* und *smb20426* sind Strukturgene für Transkriptionsregulatoren von denen nicht bekannt ist, ob sie in der Induktion der *ehu* und *eut*-Gene eine Rolle spielen. Das stromaufwärts liegende Gen *smb20423* ist ebenfalls ein Ectoin-inuziertes Gen, *smb20423* codiert für eine putative Aminotransferase. Die flankierenden Gene *smb20422* und *smb20424* codieren für eine putative Oxidoreductase und für eine putative Succinat-Semialdehyd Dehydrogenase, deren Induktion durch Ectoin ist nicht gezeigt. Diese Enzyme spielen möglicherweise ebenfalls eine Rolle im Ectoin-Abbau (Abb.33).

4.1.2 Heterologe Überexpression und Reinigung von EhuB aus *S.meliloti*

Um die Vermutung zu beweisen, dass EhuB ein Ectoin-, und möglicherweise auch Hydroxyectoin-bindendes Substratbindeprotein ist, wurde das EhuB Protein heterolog überproduziert und zu apparenter Homogenität gereinigt. Weiterhin sollte gereinigtes EhuB Protein im Komplex mit seinen Substraten kristallisiert werden, um so Aufschluss über die molekularen Grundlagen der Bindung von kompatiblen Soluten wie Ectoin und Hydroxyectoin zu bekommen. Zu diesem Zweck wurde das *ehuB* Gen aus dem Megaplasmid B aus *S. meliloti* via PCR amplifiziert, wobei die ersten 27 Codons am 5`Ende ausgeschlossen wurden. Dieses verkürzte *ehuB*-Gen wurde in den Überexpressionsvektor pASK-IBA6 ligiert, daraus resultierte das Überexpressionsplasmid pLB22 (*ehuB*⁺) mit *ehuB* unter Kontrolle eines *tet*-Promotors. Die Überexpression von EhuB ist somit durch die Zugabe von Anhydrotetrazyklin induzierbar. Das resultierende EhuB Protein ist N-terminal um seine putative Signalsequenz von 27 Aminosäuren verkürzt, besitzt stattdessen aber eine durch den pASK-IBA6 Vektor vermittelte N-terminale OmpA-Signalsequenz und einen

Strep-Tag II, die beide durch Abspaltung mit dem Faktor Xa vom EhuB Protein wieder abgetrennt werden können. Die OmpA Signalsequenz ermöglicht die Sekretion des produzierten EhuB in das Periplasma durch den Sec-Translokationsweg. Das Plasmid pLB22 wurde zur Überexpression in den Stamm BL21 (DE3) transformiert und in Minimalmedium A kultiviert. EhuB konnte aus dem periplasmatischen Extrakt, der durch einen kalten osmotischen Schock gewonnen wurde, über eine anschließende Strep-Tactin Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die EhuB Proteine, die noch nicht von ihrer OmpA Signalsequenz abgetrennt wurden, sind durch Ultrazentrifugation vor der Beladung der Strep-Tactin Säule mit entfernt worden. Daher konnte auf einen anschließenden Faktor Xa Verdau verzichtet werden. In einer anschließenden Größenausschluß-Chromatographie wurde gezeigt, dass EhuB als Monomer vorliegt.

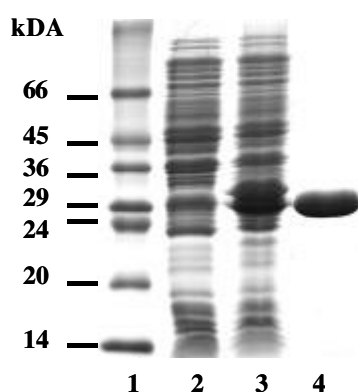


Abb. 34 : Überexpression und Reinigung von EhuB. In Spur 1 ist der Low dalton marker gezeigt, in Spur 2 ist BL21 pLB22 uninduziert, in Spur 3 ist BL21 pLB22 AHT-induziert, und in Spur 4 EhuB nach Strep-Tactin Reinigung und Dialyse aufgetragen. Im Ganzzellextrakt von Spur 3 ist deutlich zu sehen, das sich EhuB mit und ohne OmpA Signalsequenz im Mikroorganismus befinden, nach der Strep-Tactin Reinigung befindet sich nur noch das EhuB Protein ohne OmpA in der Aufreinigung. EhuB hat eine molekulare Größe von ungefähr 30 kDa.

Die Größenbestimmung von EhuB mittels einer zuvor standardisierten Superdex 75 pg - Säule ergab für eine Reinigung von EhuB ohne das Substrat Ectoin eine Größe von 40 kDa, für eine Gelsäulenchromatographie von EhuB mit Ectoin eine Größe von ca. 30 kDa. Die berechnete molekulare Masse für EhuB ohne Signalsequenz und mit Strep Tag II beträgt 29 kDa. Da EhuB bereits nach der Strep-Tactin Reinigung in apparenter Homogenität vorlag (Abb.34), wurde in den weiteren Reinigungen auf die Gelsäulenchromatographie verzichtet. Aus einem Liter Kultur konnten durchschnittlich 2,4 mg EhuB gereinigt werden.

4.1.3 Bestimmung der Affinitätskonstante K_D von EhuB für Ectoin

Zur Bestimmung der Affinitätskonstante (K_D) wurde ein Diffusionsbindetest nach Argast und Boos (1980) durchgeführt, in dem die zeitliche Verzögerung der Diffusion des radioaktiv markierten Substrates aus einem Dialyseschlauch durch das Bindeprotein ermittelt wird. Zu diesem Zweck wurden in einem Dialyseschlauch $10 \mu\text{M}$ gereinigtes EhuB mit $13 \mu\text{M}$ radioaktiv markiertem Ectoin gegen 1 Liter Puffer dialysiert. In einem zweiten Dialyseschlauch wurde als Gegenprobe Puffer mit $13 \mu\text{M}$ markiertem Ectoin ohne EhuB inkubiert. In definierten Abständen wurden Proben entnommen und in einem Szintillationszähler ausgewertet, welches die Diffusion des markierten Ectoins dokumentiert. Die Diffusionsgeschwindigkeiten des markierten Ectoins aus den Dialyseschläuchen mit und ohne EhuB wurden durch die Auftragung der radioaktiven Zerfälle jeder einzelnen Probe gegen die Zeit ermittelt. Es zeichnete sich eine deutliche Verzögerung der Diffusion des Ectoins bei Anwesenheit von EhuB ab. Ohne die Anwesenheit von EhuB diffundieren 9 dpm/min ($t_{30\text{min}}$ bis $t_{160\text{min}}$) aus dem Dialyseschlauch, in Anwesenheit von EhuB dagegen nur $3,5 \text{ dpm/min}$ ($t_{30\text{min}}$ bis $t_{160\text{min}}$), wobei 1 dpm ungefähr $7,3 \text{ pmol}$ markierter Ectoin-Lösung entspricht. Die Messpunkte wurden in einer Doppelbestimmung ermittelt (Abb.35). Die Bindekonstante von EhuB zu dem ^{14}C -markierten Ectoin wurde aus den Retentionszeiten der Diffusion des Substrates mit und ohne EhuB sowie der Proteinkonzentration berechnet. Nach diesen Berechnungen beträgt die Bindekonstante (K_D) von EhuB für Ectoin $0,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

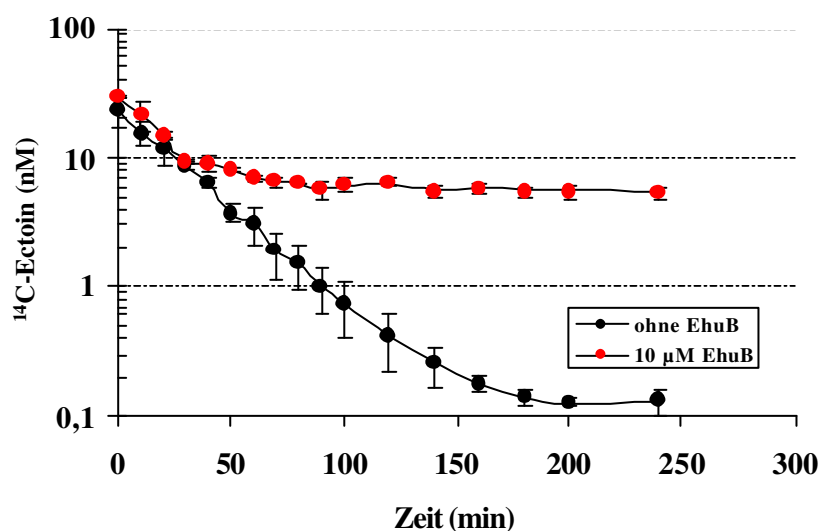


Abb. 35: Diffusionsbindetest von EhuB mit ^{14}C -markiertem Ectoin. Die Abbildung zeigt die zeitliche Verzögerung der Diffusion des radioaktiv markierten Ectoins aufgrund der Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ EhuB im Vergleich zur Diffusion des Substrates ohne EhuB. Die Bindekonstante (K_D) wurde aus den Retentionszeiten berechnet, sie beträgt $0,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

4.1.4 Substratspezifität von EhuB

Zur Bestimmung weiterer Substrate von EhuB wurde ein Experiment durchgeführt, in dem ^{14}C -markiertes Ectoin mit einem 10-, 100- oder 1000-fachem Überschuss an unmarkiertem Ectoin, Hydroxyectoin oder Glycin Betain miteinander um die Bindung mit EhuB konkurrieren. Dabei wurde die Methode der Ammoniumsulfat-Präzipitation nach Kepes und Richarme (1983) verwendet (Abb.36). Die Resultate dieses Competitionstestes zeigen, dass unmarkiertes Ectoin und Hydroxyectoin beide in der Lage sind, das markierte Ectoin zu verdrängen. Glycin Betain dagegen kann das markierte Ectoin nicht verdrängen. EhuB ist also ein Substratbindeprotein für Ectoin und Hydroxyectoin.

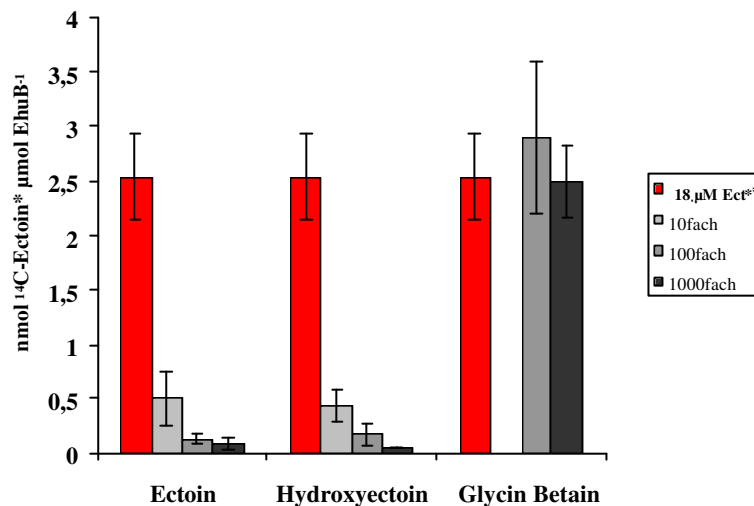


Abb. 36: Substratspezifität von EhuB. In einem Competitionstest von $5 \mu\text{M}$ EhuB mit $18 \mu\text{M}$ ^{14}C -markiertem Ectoin konnte dieses Substrat durch die Zugabe von unmarkiertem Ectoin und Hydroxyectoin in 10-, 100- oder 1000-fachem Überschuss verdrängt werden. Glycin Betain dagegen war nicht in der Lage, das markierte Ectoin zu verdrängen.

4.2 Kristallisation von EhuB

Zur Bestimmung der molekularen Grundlagen der Bindung von Ectoin und Hydroxyectoin durch das periplasmatische Substratbindeprotein EhuB sollte das Protein mit gebundenen Substraten kristallisiert werden. Durch eine Röntgenstrukturanalyse sollte ein detaillierter Einblick in die Substratbindetasche ermöglicht werden und die an der Bindung des Ectoins und Hydroxyectoins beteiligten Aminosäuren identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde das EhuB Protein wie bereits beschrieben überproduziert und gereinigt. Das zu apparenter Homogenität gereinigte EhuB wurde auf eine Konzentration von $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ankonzentriert. Die Kristallisation wurde von Nils Hanekop (AG Schmitt, Universität Frankfurt/ Universität

Düsseldorf) durchgeführt. Zur Kristallisation von EhuB wurde mit der „hanging drop“-Methode gearbeitet, dabei wurden die Kristallisationsbedingungen von EhuB durch die Anwendung der Reagenzien des Crystall screen I und II (Hampton research) mit EhuB in einer Konzentration von $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ermittelt. Nach der Bildung von ersten Kristallen wurden die Bedingungen optimiert bis die Kristalle vermessen werden konnten (Abb.37 B). Zur Lösung des Phasenproblems wurde Selenomethionin markiertes EhuB benötigt, welches ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurde und Nils Hanekop für die Kristallisation zur Verfügung gestellt wurde. (Hanekop *et al.*, in Vorbereitung). Die Kristalle von EhuB mit und ohne Selenomethionin wurden am Synchrotron in Hamburg vermessen, die erhaltenen Datensätze konnten bis zu einer Auflösung von $2,1 \text{ \AA}$ verfeinert werden. Die Struktur von EhuB wurde von Nils Hanekop gelöst und ist in Abbildung 37A gezeigt.

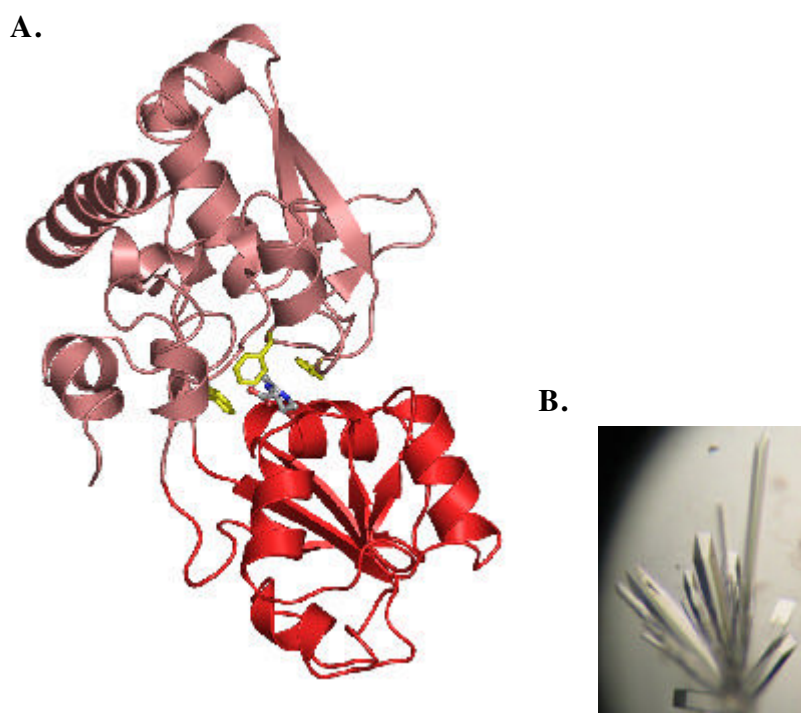


Abb. 37: Die Kristallstruktur des Ecto- und Hydroxyecto- bindenden Substratbindeproteins EhuB. Abbildung A zeigt eine Übersicht über das gesamte EhuB Protein, dessen Bindetasche zwischen zwei globulären Domänen des Proteins lokalisiert ist. Die Substratbindestelle befindet sich am Ende einer tiefen Höhle. Die Abbildung wurde von Prof. Lutz Schmitt zur Verfügung gestellt. Abbildung B zeigt Kristalle des EhuB Proteins, die Abbildung wurde von Nils Hanekop zur Verfügung gestellt.

Die Struktur des Substratbindeproteins EhuB zeigt ein Protein, das aus zwei globulären Domänen besteht, welche durch zwei „hinge“ Regionen flexibel miteinander verbunden sind. Die Bindung der Substrate Ecto- und Hydroxyecto- werden durch die Interaktion mit den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin-38 (Phe-38), Phenylalanin-94 (Phe-94) und Tyrosin-74 (Tyr-74) sowie durch Salzbrücken zu Arginin-99 (Arg-99) und Wasserstoff-

Brücken zu Threonin-147 (Thr-147), Glutamat-35 (Glu-35) und Phe-94 bewirkt (Abb.38). Die Benzol- und Phenolreste der aromatischen Aminosäuren gruppieren sich ähnlich wie die Seiten einer Box um die Ringstruktur des Ectoins oder Hydroxyectoins, die eine delokalisierte positive Ladung enthalten (Abb. 4, Einleitung). Die Zentren der aromatischen Ringstrukturen, an denen das elektrostatische Potential am Stärksten ist, sind der delokalisierten positiven Ladung zugewandt. Die Aminosäure Glu-35 interagiert mit seinem Carboxylrest mit dem N₄-Atom des Ectoin-Ringes und auch des Hydroxyectoin-Ringes. Die Carboxylgruppe der Substrate bilden Wasserstoffbrücken mit der Aminosäure und Thr-147 und Salzbrücken mit Arg-99 (Abb.38). Dabei ist zu beachten, dass Arg-99 gleich zwei Salzbrücken zu dem Carboxylrest der Substrate ausbildet. Bei Thr-147 wird die Wasserstoff-Brücke mit dem Stickstoff der Hauptkette gebildet. Eine weitere, zusätzliche Wasserstoffbrücken-Bindung entsteht zwischen dem Hauptketten-Stickstoff des Phe-94 und der Carboxylgruppe der Substrate. Bei der Substratbindung von Hydroxyectoin durch EhuB sind die gleichen Aminosäuren beteiligt, wie in der Bindung von Ectoin. Lediglich die Hydroxylgruppe des Hydroxyectoins wird durch eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zu der Aminosäure Glu-148 stabilisiert. Die Gruppierung der Aminosäurereste in der Bindetasche von EhuB um seine Substrate legt die Vermutung nahe, dass EhuB Ectoin und Hydroxyectoin ebenfalls mit Kation-pi-Interaktionen und van der Waals Kontakten bindet, wie es bereits für die beiden Glycin Betain und Prolin Betain bindenden ProX-Proteine aus *E. coli* und *A. fulgidus* gezeigt werden konnte.

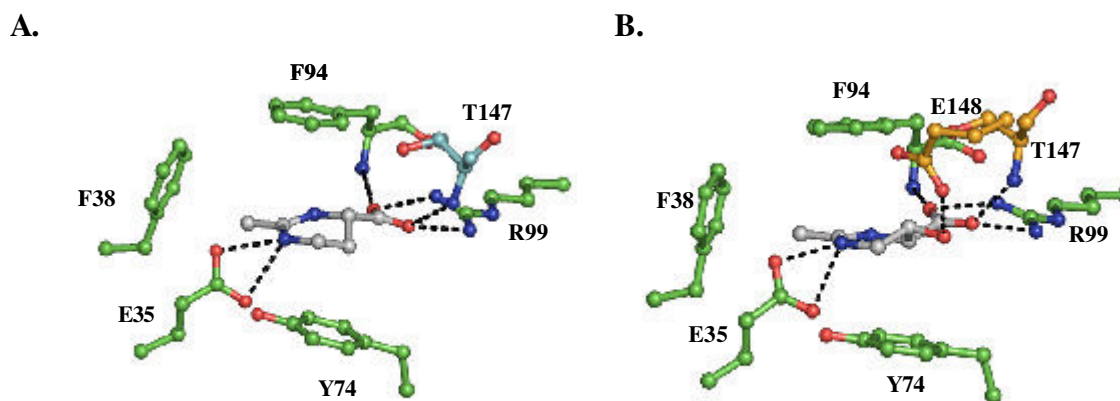


Abb. 38: Die Bindung von Ectoin und Hydroxyectoin durch EhuB. Die Abbildungen zeigen die Aminosäuren der Bindetasche von EhuB, die an der Bindung von Ectoin und Hydroxyectoin beteiligt sind. In (A) ist die Bindung von Ectoin dargestellt, in (B) die Bindung von Hydroxyectoin. Die Ringgruppe der Substrate, die eine delokalisierte positive Ladung enthalten, werden von den drei aromatischen Aminosäuren Phe-38, Phe-94 und Tyr-74 durch die pi-Elektronen über Kation-pi-Interaktionen gebunden. Die zusätzliche Bindung der beiden Substrate durch Wasserstoffbrückenbindungen werden gewährleistet durch die Aminosäuren Glu-35, Phe-94, Arg-99, Thr-147. Hydroxyectoin wird zusätzlich durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit Glu-148 stabilisiert. Die Abbildungen wurden von Lutz Schmitt zur Verfügung gestellt.

In Abbildung 39 ist eine Untersuchung der Oberfläche des EhuB Proteins bezüglich seiner Ladung gezeigt. EhuB ist auf seiner Oberfläche größtenteils negativ geladen, was für die Substratbindeproteine von kompatiblen Soluten ungewöhnlich ist (E. Bremer, persönliche Mitteilung). In anderen bekannten Fällen ist die Oberflächenladung von Substratbindeproteinen (z.B. ProX *E. coli*) eher neutral. Es ist ebenfalls deutlich zu erkennen, dass das Substrat (in diesem Fall Ectoin) vollständig von EhuB umschlossen wird und keinen Kontakt mehr zur umgebenden Lösung besitzt (Lutz Schmitt, persönliche Mitteilung).

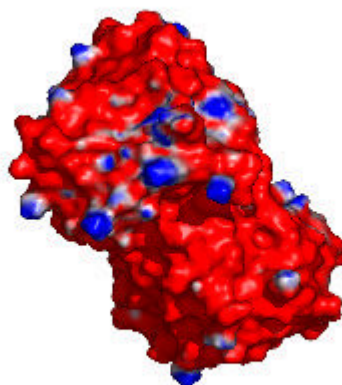


Abb. 39: Analyse des Oberflächenpotentials des EhuB Proteins. Eine Kalkulation des elektrischen Potentials der Oberfläche von EhuB zeigte eine überraschend negative Ladung des EhuB Proteins. Gezeigt ist ein EhuB Protein mit gebundenem Ectoin; das Substrat ist also komplett von EhuB umschlossen und hat keinen Kontakt mehr zur Umgebung. Die Abbildung wurde von Lutz Schmitt zur Verfügung gestellt.

4.3 Datenbankanalysen mit der Aminosäuresequenz des EhuB Proteins

Der hochaffine Transport von Ectoin und Hydroxyectoin durch einen ABC-Transporter ist mit dem EhuABCD-Aufnahmesystem erstmals beschrieben worden. Bekannte Beispiele für andere hochaffine Ectoin-Transporter gehören den Familien der BCCT-Transporter (EctT, *V. panthotenticus*, (Kuhlmann, 2002); EctP, *C. glutamicum*, (Peter *et al.*, 1998)) oder der TRAP-Transporterfamilie (TeaABC, *H. elongata* (Gramman *et al.*, 2002) an. Durch Datenbankanalysen sollte festgestellt werden, ob in anderen Mikroorganismen weitere ABC-Transporter mit Substratbindeproteinen existieren, die ebenfalls die zur Ectoin und Hydroxyectoin-Bindung benötigten Aminosäuren enthalten. Daraufhin wurde eine Datenbanksuche am NCBI in der non-redundant Datenbank mit der Aminosäuresequenz von EhuB durchgeführt. Die erhaltenen Proteinsequenzen wurden auf die Konservierung der aromatischen Aminosäuren F-38, Y74, F-94 und aller anderen Aminosäureresten, die an der Substratbindung beteiligt sind, überprüft. Die Datenbankanalysen ergaben, dass es eine

Reihe von Proteinen gibt, die an der Stelle der Aromaten-Box ebenfalls aromatische Aminosäuren besitzen, wobei die Konstellation der aromatischen Aminosäuren aus EhuB, also Phe, Tyr, Phe, nicht unbedingt konserviert ist. Die gefundenen Sequenzen (Tab.18) sind alle als putative Aminosäuren-Transportsysteme annotiert, deren Funktion nicht charakterisiert ist. Die Aminosäuresequenzen der Proteine, die signifikante Übereinstimmung mit der EhuB Bindetasche zeigten, wurden in einem zweiten Schritt auf das Vorhandensein der übrigen Komponenten eines ABC-Transporter Translokationskomplexes hin überprüft (Permeasen und ATPase) und deren Sequenzidentität zu den Ehu-Proteinen bestimmt. Von *S. meliloti* ist bekannt, dass es Ectoin vorzugsweise als Kohlenstoff und Stickstoffquelle benutzt (Talibart *et al.*, 1994). Die Strukturgene der Proteine, die für den enzymatischen Abbau von Ectoin benötigt werden, liegen vermutlich hinter dem *ehuABCD*-Gencluster und werden durch das *eutABCDE* Gencluster codiert. Aus diesem Grund wurden die Mikroorganismen, die einen vollständigen EhuABCD-ähnlichen Transporter besitzen, auf das Vorhandensein der EutABCDE-Proteine und deren genetische Organisation überprüft. Eine gute Konservierung beider Gencluster wäre ein guter Hinweis auf die mögliche Fähigkeit des Mikroorganismus zum Import und Abbau von Ectoin.

Die Datenbankrecherchen ergaben 21 verschiedene Mikroorganismen, die EhuB-ähnliche Proteine besitzen (Tab.18); diese Mikroorganismen können in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Gruppe I beinhaltet die Mikroorganismen, die in ihrem Genom ein *ehuABCD*-ähnliches und ein *eutABCDE*-ähnliches Gencluster besitzen. Gruppe II umfasst die Mikroorganismen, die einen vollständigen, in einem Gencluster codierten Ehu-ähnlichen Transporter besitzen, aber kein *eut*-Gencluster. In Gruppe III sind die Mikroorganismen aufgeführt, die nur das *eut*-Gencluster besitzen, aber keine Strukturgene, die für einen zu EhuABCD vergleichbaren Transporter codieren. Gruppe IV umfasst schließlich alle Mikroorganismen, die lediglich ein Strukturgen besitzen, das für ein EhuB-ähnliches Protein codiert, aber keinen vollständigen Ehu-ähnlichen Transporter und keine Strukturgene für EutABCDE-ähnliche Proteine besitzen.

4.3.1 Mikroorganismen mit *ehuABCD*- und *eutABCDE*-ähnlichen Gen-Clustern (Gruppe I)

Die Proteine, die durch den *eutABCDE* Gencluster codiert werden, sind bereits als putative Abbauenzyme für den Ectoin- und Hydroxyectoin-Katabolismus beschrieben worden (Jebbar *et al.*, 2005). Die EutABCDE-Proteine sind in Datenbankanalysen als putative Arylmalonat-Decarboxylase (EutA), putative Threonin-Dehydratase (EutB), putative Ornithin-Cyclodeaminase (EutC), putative Dipeptidase (EutD) und ein Protein mit unbekannter Funktion (EutE) charakterisiert worden. Das Strukturgen eines weiteren Proteins, dessen Expression durch die Anwesenheit von Ectoin induziert wurde, liegt direkt vor dem *ehuABCD*-Gencluster, es codiert das Protein Smb20423 (putative Aminotransferase). Auch dieses Enzym spielt möglicherweise eine Rolle im katabolen Abbau von Ectoin und Hydroxyectoin (Jebbar *et al.*, 2005).

Es wurden sechs Mikroorganismen gefunden die beide Gencluster, einen *ehuABCD*-ähnlichen Gencluster, und einen *eutABCDE*-ähnlichen Gencluster enthalten (Abb.40).

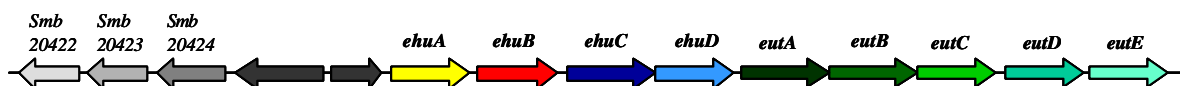
Dabei handelt es sich um die Alphaproteobakterien *Mesorhizobium loti* (83% Sequenzidentität zu EhuB), *Agrobacterium tumefaciens* (34% Sequenzidentität zu EhuB) und *Paracoccus denitrificans* (76% Sequenzidentität zu EhuB), *Rhodobacter sphaeroides* (83% Sequenzidentität zu EhuB), das den Betaproteobakterien zugehörige Bakterium *Burkholderia fungorum* (73 % Sequenzidentität zu EhuB) sowie *Pseudomonas putida* (38% Identität zu EhuB), welches der Klasse der Gammaproteobakterien angehört. *A. tumefaciens* ist dabei phylogenetisch am engsten verwandt mit *S. meliloti*. Die größte Sequenzübereinstimmung in allen Proteinkomponenten zeigt sich aber bei *Mes. loti* (Abb.40 und Tab. 15) und *Rho. sphaeroides* (Tab. 15). Die Anordnung der Strukturgene in diesen sechs Mikroorganismen unterscheiden sich jedoch zum Teil erheblich.

Die Anordnung der *ehu*- und *eut*-Strukturgene in *Mes. loti* und *Rho. sphaeroides* sind identisch zu der in *S. meliloti*, wogegen in *Bu. fungorum* die Strukturgene für den Ehu-ähnlichen Transporter ebenfalls vollständig konserviert, allerdings in umgekehrter Reihenfolge angeordnet sind. Die Strukturgene des *eut*-Genclusters sind in *Bu. fungorum* vollständig vorhanden, wenngleich sie zwei mal unterbrochen und in anderer Reihenfolge angeordnet sind (Abb.40B).

In *Pa. denitrificans*, *Ps. putida* und *A. tumefaciens* sind Strukturgene für Ehu-ähnliche Transporter ebenfalls vollständig konserviert, die *eut*-Gene sind allerdings nicht vollständig in einem Gencluster codiert. In *Pa. denitrificans* ist ein *eutC*-vergleichbares Gen weit vom

Gencluster der *ehuABCD* - und *eutABDE* - ähnlichen Gene entfernt im Genom lokalisiert. Die Reihenfolge der Strukturgene ist fast identisch mit der Reihenfolge in *S. meliloti*, mit dem Unterschied, dass *eutC* fehlt. In *Ps. putida* ist eine deutliche Umstrukturierung der Gene zu sehen, *ehuA* ist vom Beginn des Genclusters an das Ende des *ehu*-Genclusters verlegt. Das *eut*-Gencluster ist auseinander gerissen während *eutBCD* noch zusammen hinter dem *ehu*-Gencluster liegen, ist *eutE* stromaufwärts des *ehu*-Genclusters lokalisiert; das *eutA*-ähnliche Gen liegt weit entfernt von der gezeigten Genregion, ähnlich dem *eutC*-Gen in *Pa. denitrificans* (Abb. 40C). Die Strukturgene sind vollständig, wenn auch nicht alle in einem Cluster codiert. In *A. tumefaciens* dagegen (Abb. 40D) fehlt ein zu *eutA* vergleichbares Strukturgen völlig, die übrigen *eut*-ähnlichen Strukturgene sind aber vorhanden. Der *ehu*-Gencluster ist im Vergleich zu *S. meliloti* umstrukturiert und die in der Substratbindung involvierten Aminosäuren von EhuB sind im abgeleiteten *A. tumefaciens*-Protein nicht vollständig konserviert (Abb. 40A und D; Abb. 41).

A.

Sinorhizobium meliloti

B.

Mesorhizobium loti*Burkholderia fungorum*

C.

Paracoccus denitrificans*Pseudomonas putida*

D.

Agrobacterium tumefaciens

Abb. 40: Konservierung und Struktur der *ehu*- und *eut*-Gencluster-Analoga. A.: Gencluster *ehuABCD* und *eutABCDE* aus *S. meliloti*, die Strukturgene *Smb20422-24* liegen vor dem *ehu*-Gencluster, getrennt von zwei Transkriptionsregulatoren unbekannter Funktion. B.: *ehu*- und *eut*-Gencluster-Analoga aus *Mes. loti* und *Bu. fungorum*, alle Strukturgene sind vollständig in diesem Genlocus konserviert. C.: Gencluster-Analoga aus *Pa. denitrificans* und *Ps. putida*. Sie unterscheiden sich von *Bu. fungorum* darin, dass sie zwar vollständig sind, aber eines der Strukturgene ausserhalb dieser Genloci lokalisiert ist und somit nicht räumlich assoziiert ist. D.: Gencluster-Analoga von *A. tumefaciens*, das *eutA* Gen fehlt vollständig, sowie *Smb20422*.

In den EhuB-ähnlichen Proteinen aus den übrigen Mikroorganismen sind die in der Bindung beteiligten Aminosäuren hochkonserviert (Abb.41). Die Sequenzidentitäten der einzelnen Ehu und Eut-ähnlichen Proteine in *Mes. loti*, *Rho. sphaeroides*, *Bu. fungorum*, *Pa. denitrificans*, *Ps. putida* und *A. tumefaciens* zu den EhuABDC und EutABCDE Proteinen von *S. meliloti* wurden in einer Aminosäuresequenzanalyse verglichen und ergaben signifikante Sequenzidentitäten: *Mes. loti* (89%-64%), *Rho. sphaeroides* (83%-58%), *Bu. fungorum* (82%-55%), *Pa. denitrificans* (82%-33%), *Ps. putida* (69%-24%), *A. tumefaciens* (81%-34%). Alle Einzelwerte sind in Tabelle 15 aufgeführt. Diese Mikroorganismen sind vermutlich in der Lage, Ectoin und Hydroxyectoin aufzunehmen und auch katabolisch zu verwerten. Die hohe Übereinstimmung der einzelnen Proteinkomponenten untermauert diese Vermutung. Von *Ps. putida* ist die Fähigkeit, Hydroxyectoin zu metabolisieren bereits bekannt (Manzanera *et al.*, 2002).

Tab. 15: Konservierung der Aminosäuresequenz der EutABCDE-ähnlichen Proteine. In Tabelle 15 sind die % Sequenzidentität der einzelnen Ehu- und Eut-ähnlichen Proteine zu den *S. meliloti* Ehu- und Eut-Proteinen gezeigt. Die Proteine, deren Strukturgenen nicht direkt im Gencluster codiert sind, sind in grün abgebildet.

	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>Burkholderia fungorum</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
EhuA	85%	78%	82%	78%	59%	57%
EhuB	78%	83%	68%	74%	37%	34%
EhuC	76%	79%	80%	80%	50%	42%
EhuD	76%	76%	71%	77%	48%	50%
EutA	64%	58%	74%	61%	24%	-
EutB	69%	62%	55%	62%	55%	61%
EutC	74%	71%	58%	33%	55%	70%
EutD	89%	83%	71%	82%	69%	81%
EutE	72%	74%	62%	74%	62%	70%
Smb20422	81%	-	70%	49%	30%	31%
Smb20423	84%	79%	60%	69%	52%	53%
Smb20424	77%	70%	50%	65%	54%	55%

4.3.2 Mikroorganismen mit Strukturgenen für einen EhuABCD - ähnlichen Transporter (Gruppe II)

In den Datenbankanalysen wurden in verschiedenen Mikroorganismen EhuABCDE-ähnliche Proteine gefunden, die eine signifikante Sequenzähnlichkeit zu den EhuABCD-Proteinen aus *S. meliloti* zeigen. Allerdings ist keine Konservierung der Eut-Proteine festzustellen. Die zu den *Actinobacteria* zugehörigen Mikroorganismen *Streptomyces*

coelicolor, *Streptomyces avermitilis*, *Arthrobacter sp.* und *Thermobifida fusca* sowie die Betaproteobakterien *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* und *Pseudomonas syringae pv. phaesicola* sowie dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus clausii* besitzen in ihrem Genom jeweils ein vollständiges *ehuABCD*-ähnliches Gencluster. Die Sequenzidentitäten der daraus resultierenden Proteine im Vergleich zu den Ehu-Proteinen aus *S. meliloti* sind in Tabelle 16 aufgeführt. Lediglich ein Substratbindeprotein von *B. clausii* zeigt keine vollständige Konservierung der Aromatenbox, dort ist das Phe-94-Äquivalent gegen ein Aspartat ausgetauscht. In allen anderen sind sowohl die Aromatenbox, als auch die relevanten Aminosäuren zur Bindung der Substrate Ectoin und Hydroxyectoin konserviert (siehe Abb.41, Tab. 18). Einzig die Aminosäure Thr-147 ist nicht konserviert, diese ist jedoch austauschbar, da hier der Kontakt zum Substrat über die Hauptkette des Proteins erfolgt und nicht mit dem Aminosäurerest (Abb. 38).

Tab. 16: Aminosäuresequenz-Vergleich der Ehu-ähnlichen Transporterkomponenten. In dieser Tabelle werden die Komponenten verschiedener Ehu-ähnlicher Transporter aus unterschiedlichen Mikroorganismen mit denen des Ehu-Transporters aus *S. meliloti* verglichen und in % Sequenzidentität beschrieben.

Mikroorganismus	% Sequenz-identität zu EhuA	% Sequenz-identität zu EhuB	% Sequenz-identität zu EhuC	% Sequenz-identität zu EhuD
<i>Arthrobacter sp.</i>	56	45	52	49
<i>Streptomyces coelicolor</i>	55	40	49	49
<i>Streptomyces avermitilis</i>	58	36	50	47
<i>Thermobifida fusca</i>	60	36	49	54
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	53	39	53	55
<i>Bordetella pertussis</i>	53	39	53	55
<i>Bordetella parapertussis</i>	51	36	44	46
<i>Bacillus clausii</i>	56	28	45	49

4.3.3 Mikroorganismen mit EutABCDE-ähnlichen Proteinen (Gruppe III)

Für die Bestimmung der Sequenzidentitäten der Eut-Proteine aus *S. meliloti* zu den in Tabelle 15 genannten Eut-ähnlichen Proteinen wurde eine Datenbanksuche jedes einzelnen Eut-Proteins von *S. meliloti* mit dem Blast-Algorithmus nach Altschul (1990; 1997) durchgeführt. Dabei traten in jeder Datenbanksuche mehrere Mikroorganismen auf, welche Proteine besitzen, die hohe Sequenzidentität zu den Eut-Proteinen haben, aber keinen zu

EhuABCD vergleichbaren Transporter besitzen. Es handelt sich dabei um den zu den Alphaproteobakterien gehörenden *Silicibacter pomeroyi*, der die beste Konservierung zeigt. Neben den putativen Ectoin-Abbaugen in *Sil. pomeroyi* liegen Strukturgene, die für einen TRAP-Transporter codieren. Die Komponenten dieses Transporters zeigen signifikante Sequenzidentität zu dem TRAP-Transporter für Ectoin und Hydroxyectoin aus *Halomonas elongata*, TeaABC, zeigen (Bursy und Bremer, unveröffentlichte Daten). In einigen anderen Mikroorganismen, wie zum Beispiel in *Chromohalobacter salexigens* und einigen *Burkholderia* spezie wurden die *eut*-Cluster Komponenten fast vollständig gefunden, aber die Strukturgene sind zum Teil über das Genom verstreut (Tab.17). Im Falle von *Sil. pomeroyi* ist eine signifikante Konservierung des Genclusters zum Abbau von Ectoin und Hydroxyectoin zu sehen. Für die anderen Mikroorganismen kann man die Fähigkeit zum katabolen Abbau von Ectoin und Hydroxyectoin mit der zusätzlichen Bedingung, dass auch die verstreut liegenden Strukturgene gleichzeitig exprimiert werden müssten, postulieren. Diese Hypothese wird gestützt durch auffällig hohe Sequenzübereinstimmungen zu den Eut-Proteinen aus *S. meliloti*.

Tab.17: Sequenzvergleich der EutABCDE-ähnlichen Proteine zu EutABCDE aus *S. meliloti*. Gezeigt sind die % Sequenzidentitäten der einzelnen Eut-Proteine zu den *S. meliloti* Ehu- und Eut-Proteinen. Für die Proteine, deren Strukturgene nicht direkt im Gencluster codiert sind, sondern verteilt über das Genom, sind die % Sequenzidentität grün eingefärbt. Sie können nicht direkt mit der Funktion des Haupt-Genclusters korreliert werden.

	<i>Silicibacter pomeroyi</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<i>Burkholderia ambifaria</i>	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	<i>Burkholderia vietamiensis</i>
EutA	50%	43%	44%	-	-
EutB	58%	57%	55%	47%	57%
EutC	61%	59%	59%	50%	59%
EutD	73%	71%	71%	58%	71%
EutE	65%	62%	63%	61%	61%
Smb20422	47%	30%	30%	45%	27%
Smb20423	70%	59%	39%	61%	59%
Smb20424	64%	50%	51%	52%	51%

4.3.4 Mikroorganismen, die EhuB-ähnliche Proteine besitzen (Gruppe IV)

Für einige der EhuB-ähnlichen Proteine aus der Datenbankanalyse konnten zu deren Strukturgenen keine Strukturgene für einen zugehörigen Translokationskomplex gefunden werden, so dass deren Funktion offen bleibt. Dies gilt für die EhuB-ähnlichen Proteine aus dem Deltaproteobakterium *Desulfotribacterium vulgare* (28% Sequenzidentität zu EhuB), dem zu den Clostridien zählenden *Desulfotribacterium dehalogenans* (43% Sequenzidentität zu

EhuB) und dem Betaproteobakterium *Burkholderia cepacia* (29% Sequenzidentität zu EhuB), in denen die Aromatenbox und auch die E-35, R-99 und E-148 konserviert sind. Die Konservierung von T-147 wurde nicht ermittelt, da es sich hierbei wie bereits erwähnt bei EhuB um einen Kontakt aus der Hauptkette des Proteins handelt. Tabelle 18 gibt einen Überblick über die Mikroorganismen, die eine mehr oder weniger ausgeprägte Konservierung der EhuABCD- und der EutABCDE-Proteine zeigen, sowie die Sequenzidentität der EhuB-ähnlichen Proteine zu EhuB und die Konservierung der an der Bindung beteiligten Aminosäuren aus EhuB.

Tab.18: Aminosäuresequenz-Analyse von EhuB

Mikroorganismus Zugriffsnummer NCBI	% Sequenz- identität zu EhuB	Konservierung der Aminosäuren, die in EhuB <i>S. meliloti</i> in der Substratbindung involviert sind	Konservierung von EhuABCD / EutABCDE
<i>Sinorhizobium meliloti</i> EhuB	-	F-38; Y-74, F-94 E-35, R-99, T-147, E-148	EhuABCD / EutABCDE
<i>Mesorhizobium loti</i>	83	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y	EhuABCD / EutABCDE
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	83	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i>	EhuABCD/ EutABCDE
<i>Paracoccus denitrificans</i>	76	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y	EhuABCD / EutABCDE
<i>Burkholderia fungorum</i>	73	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser	EhuABCD / EutABCDE
<i>Arthrobacter sp.</i>	45	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y	EhuABCD
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	43	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y	EhuB
<i>Streptomyces coelicolor</i>	40	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser Y-74/F	EhuABCD
<i>Streptomyces avermitilis</i>	36	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y, Y-74/F, F-94/Y	EhuABCD
<i>Bordetella pertussis</i>	39	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y, Y-74/F, F-94/Y	EhuABCD
<i>Bordetella parapertussis</i>	39	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y, Y-74/F, F-94/Y	EhuABCD

Fortsetzung Tab. 18.

Mikroorganismus Zugriffsnummer NCBI	% Sequenz-identität zu EhuB	Konservierung der Aminosäuren, die in EhuB <i>S. meliloti</i> in der Substratbindung involviert sind	Konservierung von EhuABCD / EutABCDE
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	39	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y, Y-74/F, F-94/Y	EhuABCD
<i>Pseudomonas putida</i>	38	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y, Y-74/W, F-94/Y	EhuABCD / EutABCDE
<i>Pseudomonas syringae</i>	36	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y, „Y-74/F,	EhuABCD
<i>Thermobifida fusca</i>	36	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y, „Y-74/W, F-94/Y	EhuABCD
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-94/N, E-148/N	EhuABCD EutBCDE
<i>Burkholderia ambifaria</i>	31	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y, Y-74/F,	EhuB EutABCDE
<i>Burkholderia cepacia</i>	29	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y, Y-74/F	EhuB
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	30	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser Y-74/F	EhuB EutABCDE
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	28	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y	EhuB
<i>Bacillus clausii</i>	28	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser F-38/Y, Y-74/F, F-94/D	EhuABCD
<i>Silicibacter pomeroyi</i>	-	-	EutABCDE
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	28	Wie EhuB in <i>S. meliloti</i> , ausser Y-74/W, F-94/T, E-35/T, E- 148/D	EhuB EutBCDE

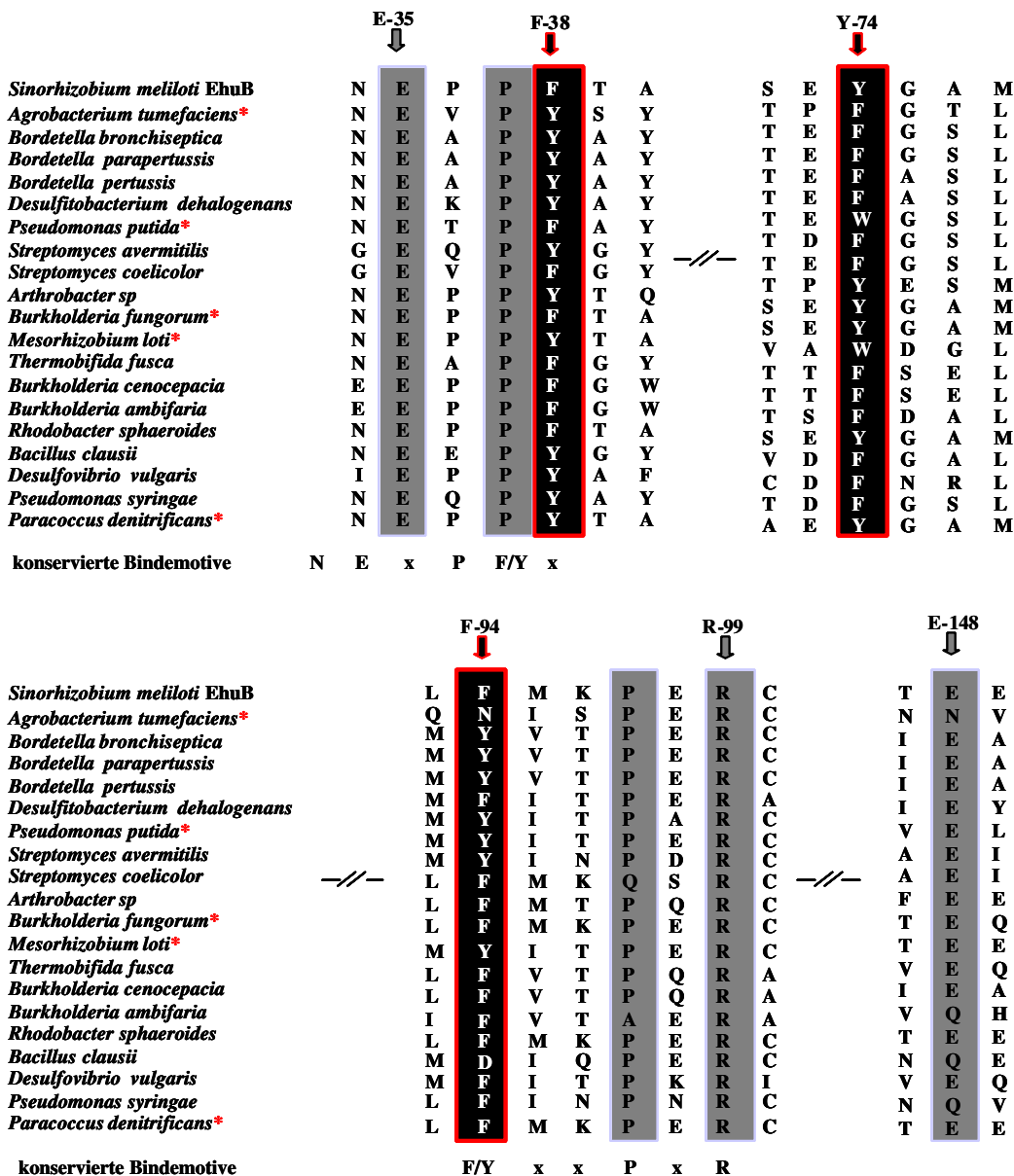


Abb. 41: Konservierte Motive in EhuB und Analoga. In dieser Abbildung sind die an der Ectoin-Bindung beteiligten Aminosäurereste von EhuB aus *S. meliloti* und deren Konservierung in den EhuB-ähnlichen Proteinen gezeigt. Die Mikroorganismen, welche sowohl den EhuABCD-Transporter, als auch die EutABC DE-Proteine besitzen, sind mit einem roten Stern gekennzeichnet (*).

Die Datenbankanalyse ergab 21 Mikroorganismen, die EhuB-ähnliche Proteine besitzen und in 19 dieser EhuB-ähnlichen Proteine sind alle Aminosäurereste konserviert, die in EhuB aus *S. meliloti* an der Bindung von Ectoin beteiligt sind. Dabei zeigte sich eine deutliche Konservierung der aromatischen Box, obwohl deren Zusammensetzung stark variiert. Im direkten Vergleich werden zwei konservierte Bindemotive sichtbar, zum einen N-E-x-P-F/Y-x, welches E-35 und F-38 enthält und F/Y-x-x-P-x-R, welches die Aminosäuren F-94 und R-99 umfasst. Die Substratbindung von Hydroxyectoin durch EhuB wird neben der Interaktion mit den Aminosäuren der Ectoin-Bindung zusätzlich durch eine Wasserstoffbrückenbindung der Hydroxylgruppe zu E-148 stabilisiert (Abb.38B),

Mutagenesestudien zeigten, dass diese Wasserstoffbrückenbindung essentiell ist für die Bindung von Hydroxyectoin (Höing, 2005). In den EhuB-ähnlichen Proteinen ist E-148 ebenfalls konserviert.

4.3.5 Phylogenetischer Vergleich

Die Entstehung der ABC-Transporter erfolgte schon sehr früh in der Evolution, denn auch in den *Archaea* sind eine Reihe von ABC-Transportern unterschiedlichster Funktionen bekannt (Tam und Saier, 1993). Die Verbreitung der ABC-Transporter erstreckt sich auf alle bekannten Bereiche des Lebens, also auch in den *Bacteria*, *Archaea*, Tieren, Pflanzen und auch Säugetieren (Rhodes und Hanson, 1993; Galinski und Trüper, 1994; Bohnert *et al.*, 1995; Hagemann *et al.*, 1997; Roberts, 2000; Garcia-Perez und Burg, 1990, Yancey, 2004; Chen und Murata, 2004). Im Laufe der Evolution entwickelten sich immer mehr dieser ABC-Transporter und sie erfuhren einige Umwandlungen, um so das Substratspektrum zu erweitern.

Eine phylogenetische Einordnung der Mikroorganismen mit EhuABCD- und EutABCDE-ähnlichen Proteinen sollte ein Bild vermitteln über die Verbreitung des Transportertypes und möglicherweise eine Abschätzung, wo ein gemeinsamer Vorfahre aller entdeckter EhuABCD-ähnlicher Transporter liegt, aber auch der Abbauenzyme EutABCDE. Die Entwicklung eines EhuABCD-ähnlichen Transporters könnte nach der Abspaltung der *Archaea* stattgefunden haben, denn alle Mikroorganismen mit einem Ehu-ähnlichen Transporter gehören zu den *Bacteria*. Unter den *Bacteria* ist aber nur eine sehr begrenzte Verbreitung zu beobachten, es wurden hochkonservierte EhuABCD Transporter in dem Phylum *Proteobacteria*, aber auch dem Phylum *Actinobacteria* gefunden. Das Vorkommen von EutABCDE-Proteinen ist sogar nur auf die Alpha-, Beta- und Gammaproteobakterien begrenzt. In den übrigen Stämmen der *Bacteria* konnten keine Mikroorganismen gefunden werden, die Proteine mit signifikanter Sequenzähnlichkeit zu den EhuABCD Proteinen oder den putativen Enzymen des Ectoinabbaus, EutABCDE, besitzen.

Das Auftreten von Eut-Proteinen mit hoher Übereinstimmung zu der jeweiligen Sequenz in *S. meliloti* ist nur in Proteobakterien zu beobachten. In einigen dieser Spezies ist allerdings auffällig, dass das EutA Protein fehlt. Eine nähere Betrachtung zeigt, dass es unter den Alpha-, Beta- und Gammaproteobakterien Spezies gibt, die den Transporter und die Eut Proteine besitzen, aber auch solche, die den ganzen Transporter oder die Abbauenzyme

verloren haben. Weitere Spezies haben nur einzelne Proteine des Transporters oder der Abbauenzyme verloren, die anderen Komponenten sind aber immer noch mit hoher Sequenzähnlichkeit zu denen in *S. meliloti* vorhanden (Abb.42).

Transporter-Proteine mit deutlicher Sequenzidentität zu den EhuABCD Proteinen aus *S. meliloti* sind sowohl in den Proteobakterien, aber auch in den Actinobakterien zu finden (Abb.42). In den meisten EhuB-ähnlichen Substratbindeproteinen sind die zur Ecto-in-Bindung benötigten Aminosäurereste aus EhuB ebenfalls konserviert. In den Spezies *A. tumefaciens*, *Chr. salexigens*, *Bu. vietnamiensis* und *B. clausii* sind diese aber nicht mehr komplett vorhanden (Abb. 41 und Tab18).

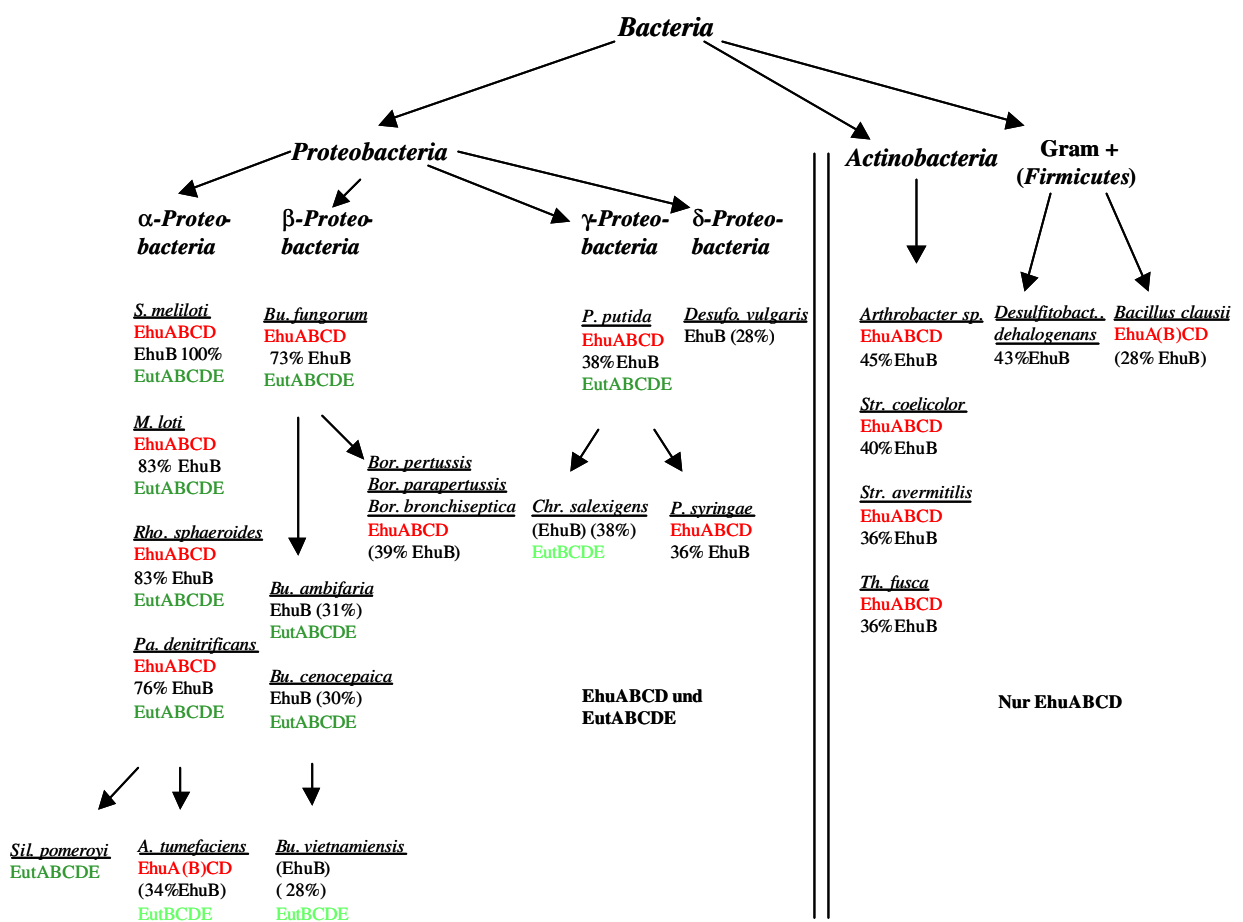


Abb. 42: Phylogenetische Einordnung der Mikroorganismen mit EhuABCD- und EutABCDE-ähnlichen Proteinen. Die Mikroorganismen sind geordnet nach deren Zugehörigkeit auf der Ebene der Stämme (die phylogenetische Aufteilung in Ordnung und Familie wurde nicht berücksichtigt). Innerhalb der Stämme wurden die Mikroorganismen nach der Konservierung der EhuABCD- und der EutABCDE-Proteine betrachtet. Mikroorganismen mit einem vollständigen Ehu-Transporter sind mit rot gekennzeichnet (EhuABCD). In manchen Spezies sind in den EhuB-ähnlichen Proteinen die an der Bindung beteiligten Aminosäurereste nicht vollständig konserviert, diese sind dadurch gekennzeichnet, dass EhuB in Klammern eingefasst ist. Zum Vergleich der Transporter untereinander wurde die Sequenzidentität der EhuB-ähnlichen Proteine vermerkt. Mikroorganismen, welche die EutABCDE Proteine vollständig synthetisieren können und deren Strukturgene eng zusammen in einem Cluster kodiert sind, sind mit dunkelgrün gekennzeichnet (EutABCDE), Mikroorganismen, denen EutA fehlt in hellgrün (EutBCDE).

4.4 Physiologische Charakterisierung des ABC-Transporters Ehu von *Sinorhizobium meliloti*

Von *S. meliloti* ist bekannt, dass es Ectoin nicht wie ein klassisches kompatibles Solut unter osmotischen Stressbedingungen akkumuliert wird (Talibart *et al.*, 1994), sondern dass es in erster Linie als Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle dient. Im Anschluß an die Strukturgene des Ehu-Transporters liegen weitere offene Leserahmen, die ebenfalls Ectoin-induziert sind und zeitgleich mit *ehuB* entdeckt wurden. Diese Gene wurden mittels Datenbankanalysen untersucht und deren Proteine als mögliche Abbauenzyme von Ectoin identifiziert (Jebbar *et al.*, 2005).

4.4.1 Wachstum des *S. meliloti* Wildtyps und der Mutanten

Zur näheren Untersuchungen wurden von Mohamed Jebbar (Universität Rennes, Frankreich) eine Reihe von mutierten *S. meliloti* Stämmen hergestellt, die eine Insertion in *ehuA* (*S. meliloti* R3-76) und eine Insertion in *eutA* (*S. meliloti* R3-74) besitzen. Ein dritter mutierter *S. meliloti*-Stamm, R4-25 (Insertion in *smb20436*), diente als Positivkontrolle für die Western blots und in Wachstumsexperimenten (Abb.43).

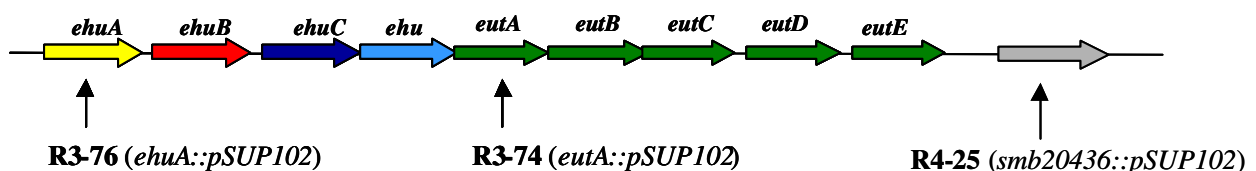


Abb43: *S. meliloti* Stämme mit Insertionen in *ehuA* und *eutA*. Die Gencluster *ehuABCD* und *eutABCDE* codieren für den Ectoin/Hydroxyectoin Transporter und die Enzyme für den Abbau von Ectoin und Hydroxyectoin. Die mutierten *S. meliloti*-Stämme R3-76, R3-74 und R4-25 tragen das mobilisierbare Plasmid *pSUP102* inseriert in *ehuA* (R3-76) bzw. *eutA* (R3-74). R4-25 dient als Positiv-Kontrolle, dort ist *pSUP102* in *Smb20436* inseriert, ein Gen das hinter dem *eut*-Gencluster liegt. Die Mutanten Stämme R3-76, R3-74 und R4-25 wurden von Mohamed Jebbar, Universität Rennes, erzeugt und zur Verfügung gestellt.

Der Wildtyp und die mutierten *S. meliloti* Stämme wurden in Laktat-Aspartat-Salz (LAS)-Minimalmedium kultiviert. In weiteren Ansätzen wurde die Kohlenstoffquelle Laktat im LAS-Medium durch 10 mM Ectoin, Hydroxyectoin oder Glycin Betain ersetzt, um festzustellen, ob die mutierten *S. meliloti*-Stämme noch in der Lage sind, die Kohlenstoffquellen zu importieren. Als weitere Kontrolle wurde in einer Kultur auch die Stickstoffquelle Aspartat als Stickstoffquelle gegen Ectoin ausgetauscht, um Wachstum auf

Aspartat zu vermeiden. In dieser Kultur wurde die Konzentration von Ectoin auf 20 mM verdoppelt. Die Kultur mit Glycin Betain als Kohlenstoffquelle diente als weitere Positivkontrolle. Das Wachstumsverhalten der Kulturen des Wildtyp *S. meliloti* auf Laktat (+ Asp), Ectoin (+ Asp), Hydroxyectoin (+ Asp) und Glycin Betain (+ Asp) ist vergleichbar. Die Mutante R3-76 mit der Insertion des pSUP102-Plasmids in *ehuA* ist nicht mehr in der Lage auf Ectoin (+ Asp), Hydroxyectoin (+ Asp) oder nur auf Ectoin (20 mM Ekt, ohne Asp) zu wachsen, auf Laktat (+ Asp) und Glycin Betain (+ Asp) dagegen wächst sie ebenso gut wie der Wildtyp-Stamm (Abb.44A).

Das Ehu-Transportsystem ist also der Haupt-Transporter für Ectoin und Hydroxyectoin, der unter den getesteten Bedingungen die Substrate in die Zelle importieren kann. In Transportexperimenten mit R3-76 mit ^{14}C -markiertem Ectoin wurde gezeigt, dass trotz der Unterbrechung der *ehu*-Gene ^{14}C -Ectoin aufgenommen werden kann. Es muss daher noch mindestens einen weiteren, wenn auch deutlich schwächeren Transporter für Ectoin geben (Jebbar *et al.*, 2005).

Auch die Mutante R3-74 mit der Insertion in *eutA* zeigt einen deutlichen Wachstums-Defekt auf Ectoin und Hydroxyectoin, wie zuvor die R3-76-Mutante (Abb.44B). Die Enzyme, die in dem *eut*-Gencluster codiert sind, werden für das Wachstum auf Ectoin und Hydroxyectoin benötigt.

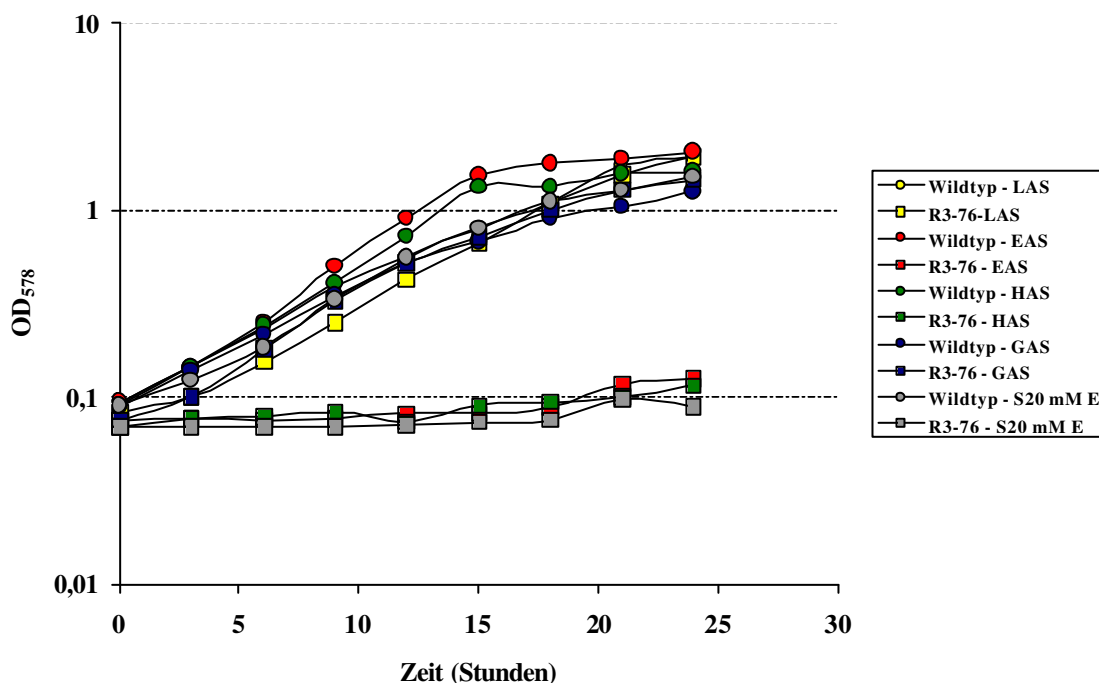


Abb. 44A: Wachstum von *S. meliloti* Wildtyp und R3-76 mit den C-Quellen Laktat, Ectoin, Hydroxyectoin oder Glycin Betain. In dieser Abbildung ist die Wachstumskurve des Wildtyps und der Mutante R3-76 mit der Insertion in *ehuA* zu sehen. Die jeweilige Medienzusammensetzung ist durch die Abkürzungen LAS (Laktat-Aspartat-Salz), EAS (Ectoin-Aspartat-Salz), HAS (Hydroxyectoin-Aspartat-Salz), GAS (Glycin Betain-Aspartat-Salz), S20 mM E (Salz-20 mM Ectoin) beschrieben.

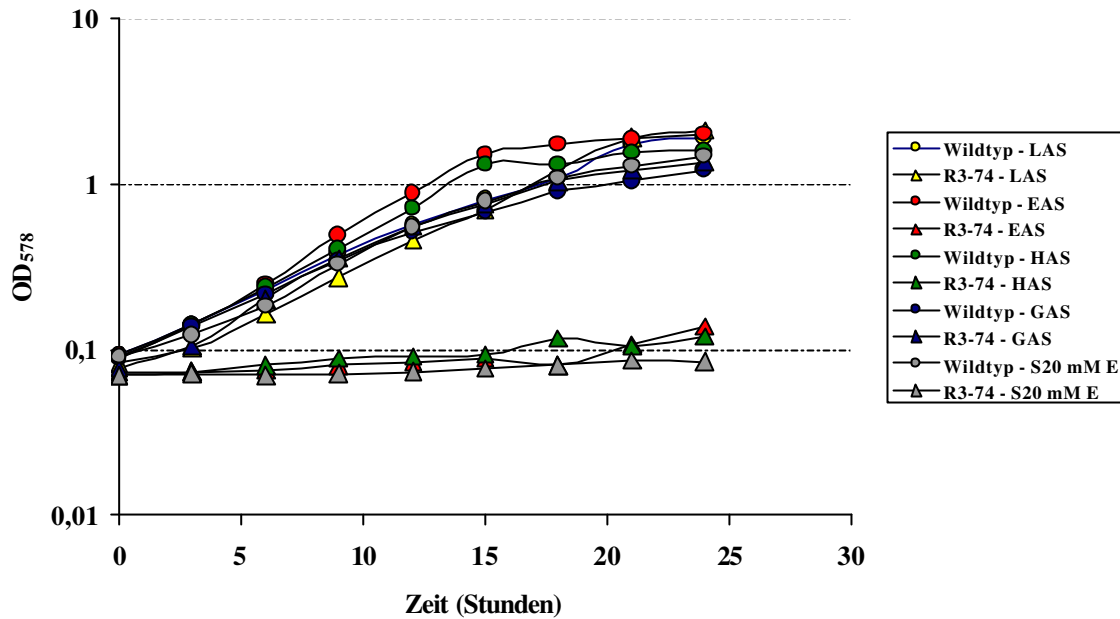


Abb. 44B: Wachstum von *S. meliloti* Wildtyp und R3-74 mit den C-Quellen Laktat, Ectoin, Hydroxyectoin oder Glycin Betain. In dieser Abbildung ist das Wachstum des Wildtyp-Stammes mit dem der Mutante R3-74 (Insertion in *eutA*) verglichen. Die jeweilige Medienzusammensetzung ist durch die Abkürzungen LAS (Laktat-Aspartat-Salz), EAS (Ectoin-Aspartat-Salz), HAS (Hydroxyectoin-Aspartat-Salz), GAS (Glycin Betain-Aspartat-Salz), S20 mM E (Salz-20 mM Ectoin) beschrieben. Die Mutante R3-74 zeigt ein identisches Wachstumsverhalten wie zuvor die Mutante R3-76.

Die Positivkontrolle R4-25, deren Insertion ausserhalb der *ehu-* und *eut-*Gencluster liegt, zeigte den gleichen Wachstumsphänotyp wie der *S. meliloti* Wildtyp-Stamm (Daten nicht gezeigt).

4.4.2 Induktion der EhuB Expression durch Ectoin und Hydroxyectoin

4.4.2.1 Nachweis der Ectoin und Hydroxyectoin-induzierten EhuB-Synthese in *S. meliloti*

Um die Transporterkomponente EhuB in *S. meliloti* Zellen nachweisen zu können, wurde mit dem gereinigten EhuB Protein die Immunisierung eines Kaninchens durchgeführt und auf diesem Wege ein Antikörper gegen das EhuB Protein hergestellt. Dieser Antikörper wurde in Western blot-Analysen verwendet, um die Induktion der Synthese des Ehu-Transporters durch Ectoin und Hydroxyectoin zu belegen, wie zuvor schon von Jebbar *et al.* (2005) in 2 D Gelelektrophoresen gezeigt wurde .

Zu diesem Zweck wurden aus den oben beschriebenen Kulturen des *S. meliloti* Wildtyps Zellproben bei einer optischen Dichte (OD_{578}) von 0,6 entnommen und in einem Western blot mit dem EhuB-Antikörper inkubiert. Der Western blot zeigte eine starke Induktion der

Expression von EhuB und damit des Ehu-Transporters durch Ectoin und Hydroxyectoin, wogegen in den Proben der Zellen, die auf Laktat oder Glycin Betain wuchsen nur ein niedriger Basallevel an EhuB zu detektieren war (Abb.45).

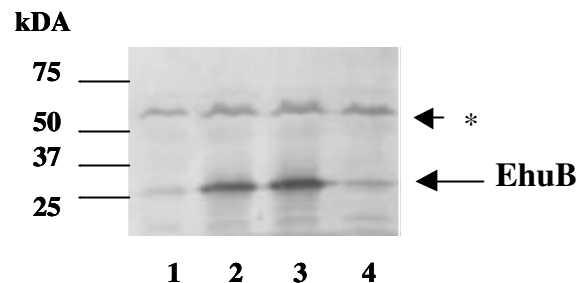


Abb. 45: Induktion der Synthese des Ehu-Transporters durch exogen supplimentiertes Ectoin oder Hydroxyectoin. In der Abbildung ist eine Western blot Analyse mit *S. meliloti* Wildtyp-Zellen gezeigt, die auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen kultiviert wurden. Spur 1: Laktat, Spur 2 Ectoin, Spur 3: Hydroxyectoin, Spur 4: Glycin Betain. * markiert eine unspezifische Reaktion des EhuB Antikörpers mit einem unbekanntem Protein aus *S. meliloti*.

4.4.2.2 Zeitlicher Verlauf der Induktion der EhuB-Synthese durch Ectoin und Hydroxyectoin

Zur Bestimmung der Induktionsgeschwindigkeit von Ehu durch Zugabe von Ectoin wurde eine *S. meliloti* Wildtyp Kultur bis zu einer optischen Dichte (OD_{578}) von 0,6 inkubiert und anschließend 10 mM Ectoin dem Medium zugesetzt. Der Kultur wurden Zellproben nach 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60 Minuten entnommen und in einer Western blot Analyse mit EhuB-Antikörper inkubiert. Die Induktion der Ehu-Synthese durch Ectoin erfolgte sehr schnell. Bereits nach 10 Minuten ist eine große Menge EhuB nachweisbar (Abb. 46 A). Die Induktion der Ehu-Synthese durch Hydroxyectoin findet ebenfalls sehr schnell statt und ist vergleichbar zu der Induktionsgeschwindigkeit der Synthese durch Zugabe von Ectoin (Abb.46B)

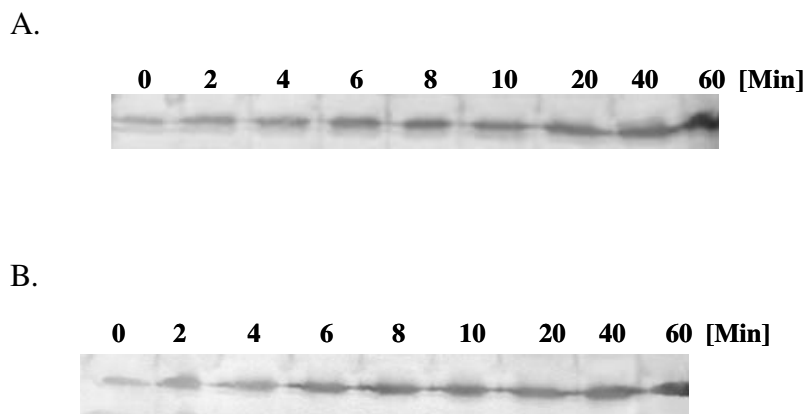


Abb. 46: Induktion der Synthese von EhuB durch Zugabe von Ectoin oder Hydroxyectoin. Einer bis zu $OD_{578} = 0,6$ gewachsenen *S. meliloti* Wildtyp-Kultur wurden 10 mM Ectoin (A) oder 10 mM Hydroxyectoin (B) zugegeben und in den Zeitabständen 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 und 60 Minuten Proben für Western blot Analysen entnommen.

4.4.2.3 Induktion der Synthese von EhuB in *S. meliloti* Wildtyp und Mutanten

Die mutierten *S. meliloti*-Stämme R3-76 (*ehuA*) und R3-74 (*eutA*) zeigen kein Wachstum mehr auf Ectoin und Hydroxyectoin (Abb.47). Die Mutante R3-74 sollte aber noch in der Lage sein, das Ectoin- und Hydroxyectoin-Aufnahmesystem zu synthetisieren. Um dies mittels Western blot Analyse nachweisen zu können, wurden der *S. meliloti* Wildtyp, R3-76 (*ehuA*), R3-74 (*eutA*) und R4-25 (*smb20436*) in LAS-Medium kultiviert und bei einer OD_{578} von 0,6 wurden Proben entnommen. Anschließend wurde jeweils 10 mM Ectoin hinzugegeben und für weitere 10 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und in einer Western blot Analyse mit dem EhuB Antikörper inkubiert (Abb.47). Der Western blot zeigte eine deutliche EhuB-Induktion in den Wildtyp-Zellextrakten (Spur 2) und den Extrakten der Positiv-Kontrolle R4-25 (Spur 4), in der das inserierte Plasmid ausserhalb der *eut*-Gene liegt. In der Probe der Mutante R3-76 (*ehuA*) konnte keine Induktion festgestellt werden (Spur 6). Die Zellproben der Mutante R3-74 (Spur 8) zeigen eine Induktion, die allerdings etwas schwächer ist verglichen mit der Induktion in den Wildtyp-Zellen. Dies belegt, dass die *eut*-Mutante R3-74 Ectoin aufnehmen kann, aber sie nicht mehr katabolisieren kann und daher auch nicht mehr auf Ectoin wachsen kann. Zusammen mit den Experimenten mit ^{14}C -markiertem Ectoin, dessen Abbau in dem Wildtyp *S. meliloti*-Stamm gezeigt und in der *eutA*-Mutante inhibiert war (Jebbar *et al.*, 2005), wurden hier erstmals experimentell Enzyme beschrieben, die für die Degradation von Ectoin verantwortlich sein könnten.

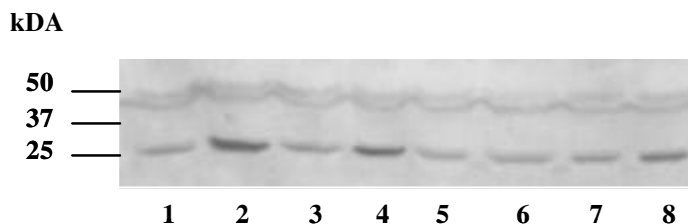


Abb. 47: Western blot Analyse des *S. meliloti* Wildtyp, R3-76, R3-74 und R4-25 zur Induktion der EhuB-Synthese. Die Stämme wurden in LAS-Minimalmedium kultiviert und bei einer $OD_{578}=0,6$ mit Ectoin induziert. Vor und 10 Minuten nach der Ectoin Zugabe wurden die Zellproben entnommen. Spur 1: Wildtyp uninduziert, Spur 2: Wildtyp induziert, Spur 3: R4-25 (*smb20436*) uninduziert, Spur 4: R4-25 induziert, Spur 5: R3-76 (*ehuA*) uninduziert, Spur 6: R3-76 induziert, Spur 7: R3-74 (*eutA*) uninduziert, Spur 8: R3-74 induziert.

4.4.3 Einfluss des ABC-Transporters Ehu auf das Wachstum von *S. meliloti* unter osmotischen Stressbedingungen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Substratbindeprotein EhuB hohe Affinität zu Ectoin besitzt ($K_D=0,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$) und auch in der Lage ist, Hydroxyectoin zu binden. Ectoin wird unter osmotischen Stressbedingungen nicht akkumuliert, es scheint aber unter Stressbedingungen die endogene Synthese von Glutamat zu fördern (Talibart *et al.*, 1994). Daher besteht die Möglichkeit, dass die Synthese des Ehu-Transporters in *S. meliloti* auch durch osmotischen Stress induziert werden könnte (Talibart *et al.*, 1994; Jebbar *et al.*, 2005) In einem Wachstumsexperiment wurde *S. meliloti* in einem Laktat-Aspartat-Salz-Minimalmedium (LAS) unter isoosmotischen Bedingungen und unter hyperosmotischen Bedingungen (0,5 mM NaCl) kultiviert (Abb.48). Eine Konzentration von 0,5 M NaCl bedeutet einen starken osmotischen Stress für *S. meliloti* (Talibart *et al.*, 1994). Neben einer Referenzkultur für hyper- und isoosmotische Wachstumsbedingung ohne weiteren Zusatz wurden unter beiden Bedingungen den Medien zusätzlich das kompatible Solut Ectoin, Hydroxyectoin oder Glycin Betain zu einer Konzentration von 10 mM zugesetzt. Die Wachstumskurven von *S. meliloti* unter isoosmotischen Bedingungen zeigen ein gutes Wachstum auf Laktat, die stationäre Phase wird bei einer optischen Dichte (OD_{578}) von 1,8 nach 17 Stunden erreicht. Die Kulturen mit den zugesetzten kompatiblen Soluten zeigen eine kleine Wachstumsverzögerung, die stationäre Phase wird nach 25 Stunden erreicht mit einer optischen Dichte von jeweils 1,8 (Ectoin und Hydroxyectoin), beziehungsweise einer optischen Dichte von 1,7 nach 33 Stunden (Glycin Betain), (Abb.48). Die *S. meliloti*-Kulturen, die unter hyperosmotischen Bedingungen gezogen wurden zeigen zunächst alle eine deutliche Wachstumsverzögerung. Ein möglicher Grund

für die lag-Phase der hyperosmotischen Kulturen könnte die Adaptation der Zellen an die höhere Osmolalität sein, da die Vorkultur von *S. meliloti*, mit der alle Kulturen dieses Experimentes angeimpft wurden, ohne Salz kultiviert wurden. Die Kultur, die Glycin Betain enthielt, beendete als Erste die lag-Phase nach 10 Stunden. Die Kulturen mit Ectoin und Hydroxyectoin dagegen gingen nach 15,5 Stunden in die exponentielle Wachstumsphase über. Enthielt das Minimalmedium nur Laktat und Aspartat, so dauert es 18 Stunden bis zum Erreichen der exponentiellen Phase. Hier ist die Wachstumsgeschwindigkeit jedoch deutlich niedriger als bei den Kulturen mit Glycin Betain, Ectoin und Hydroxyectoin. Es ist deutlich zu erkennen, das Ectoin und auch Hydroxyectoin das Wachstum unter osmotischem Stress verbessern, wenngleich Glycin Betain einen größeren osmoprotektiven Effekt für *S. meliloti* zeigt.

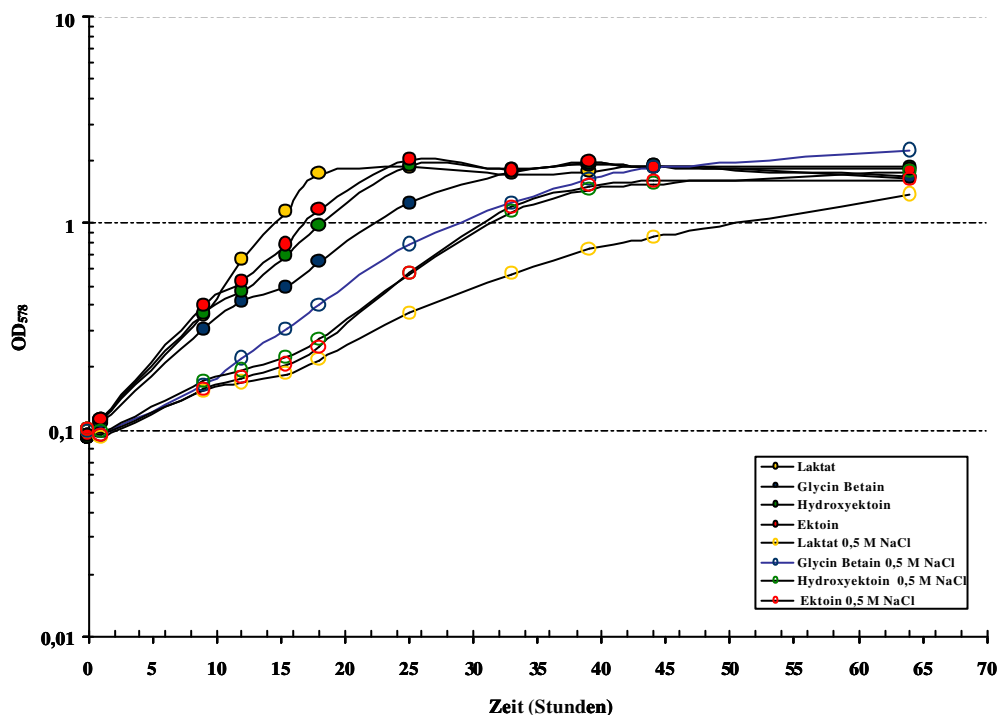


Abb. 48: Wachstum des *S. meliloti* Wildtyp-Stammes unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen. In dieser Abbildung ist das Wachstumsverhalten des *S. meliloti* Wildtypstammes 102F34 in Minimalmedium (LAS) unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen in Medien mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten gezeigt. Die Konzentration der Solute im Medium beträgt 10 mM.

4.4.4 Einfluss von hyperosmotischem Stress auf die Synthese des Ehu-Transporters in *S. meliloti*

In dem Wachstumsexperiment konnte deutlich gezeigt werden, dass Ectoin und Hydroxyectoin das Wachstum unter hyperosmotischem Stress positiv beeinflussen. Um die

Frage zu klären, ob die Synthese des Ehu-Transporters nicht nur von der Anwesenheit von Ectoin, sondern auch durch hohen osmotischen Stress induziert werden kann, wurden bei einem Wachstumsexperiment unter gleichen Bedingungen wie in dem zuvor beschriebenen Experiment Kulturproben in der mittleren exponentiellen Phase für eine Western blot Analyse entnommen. Die *S. meliloti*-Zellen wurden also bei 0 und 0,5 M NaCl in LAS-Minimalmedium ohne kompatible Solute, mit Ectoin, Hydroxyectoin oder Glycin Betain kultiviert. Die Western blot Analyse zeigte deutlich die Synthese von EhuB bei Anwesenheit von Ectoin und Hydroxyectoin, sowohl in den Kulturen mit und ohne 0,5 M NaCl (Abb.49). Die Zellen, die in Minimalmedium unter hohem osmotischen Stress und ohne Anwesenheit von Ectoin oder Hydroxyectoin gezogen wurden, zeigten keine Induktion der Synthese von EhuB. Die Osmolarität des Mediums hat also keinen Einfluss auf die Expression des Ehu-Transporters. Lediglich die Anwesenheit von Ectoin und Hydroxyectoin ist in der Lage, die Synthese des Ehu-Transporters zu induzieren.

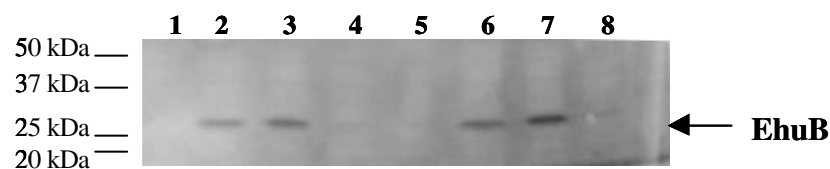


Abb. 49: Western blot Analyse: Einfluss der Osmolarität des Mediums auf die Induktion der Synthese von EhuB. Spur 1: 0 M NaCl, LAS; Spur 2: 0 M NaCl, LAS-10 mM Ectoin, Spur 3: 0 M NaCl, LAS-10 mM Hydroxyectoin, Spur 4: 0 M NaCl, LAS-10 mM Glycin Betain, Spur 5: 0,5 M NaCl, LAS; Spur 6: 0,5 M NaCl, LAS-10 mM Ectoin, Spur 7: 0,5 M NaCl, LAS-10 mM Hydroxyectoin, Spur 8: 0,5 M NaCl, LAS-10 mM Glycin Betain. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen EhuB und einem alkalische Phosphatase konjugierten Antikörper gegen Kaninchen.

V. Diskussion

Mikroorganismen sind aufgrund ihrer hohen Flexibilität in der Lage, auch in für menschliche Begriffe unwirtlichen Habitaten wie der Tiefsee (bis zu 100 Mpa Druck, anaerobe Bedingungen, 4°C Wassertemperatur), an hydrothermalen Quellen (*Archaeoglobus fulgidus*, Wachstum bei hyperthermophilen Bedingungen und Nährstofflimitation) oder Salzseen (*Ectothiorhodospira halochloris*, hohe Osmolalität) zu leben. Aber auch in Habitaten wie dem Boden (*Bacillus subtilis*, *Sinorhizobium meliloti*, variierende Osmolalität und Temperatur, Nährstofflimitation) ist Flexibilität von Vorteil, da die biotischen und abiotischen Wachstumsparameter häufig sehr stark schwanken können. Mikroorganismen haben daher eine Reihe von Mechanismen entwickelt, die eine Adaptation an wechselnde Umweltbedingungen erlauben. Ein wichtiger physikalischer Faktor für das Überleben der Zelle ist zum Beispiel die mit der Osmolalität der Umgebung verbundenen Verfügbarkeit von Wasser und damit die Erhaltung des intrazellulären Turgordruckes unter wechselnden osmotischen Bedingungen. Ein weit verbreiteter Schutzmechanismus von Mikroorganismen ist die Akkumulation von kompatiblen Soluten im Zytoplasma. Kompatible Solute sind osmotisch aktive, aber physiologisch kompatible Substanzen und besitzen zusätzlich die Eigenschaft, native Strukturen von Proteinen zu stabilisieren und gegen denaturierende Effekte ausgelöst von hohen Salzkonzentrationen oder von Hitze zu schützen. Eine allgemein gültige Hypothese zur stabilisierenden Wirkung von kompatiblen Soluten auf Proteine ist das sogenannte „preferential exclusion model“ von Arakawa und Timasheff (1985). Es beschreibt die protektiven Eigenschaften mit einem „osmophoben Effekt“, der auf energetisch ungünstigen Interaktionen der Solute mit dem Peptidrückgrat beruht und die Solute von der direkten Hydrathülle der Proteinoberfläche ausschließt und damit letztendlich stabilisiert (Arakawa und Timasheff, 1985; Bolen und Basakov, 2001). Eine energetisch günstige Möglichkeit zur Akkumulation dieser Solute bietet die aktive Aufnahme aus der Umwelt durch spezifische Transportproteine, da eine intrazelluläre Synthese wesentlich mehr ATP verbraucht als ein Transportprozess (Tam und Saier, 1993). Der Transport von kompatiblen Soluten muss jedoch sehr schnell und effektiv sein, da die in der primären Antwort auf hyperosmotischen Stress angesammelten Kalium-Ionen (Yancey *et al.*, 1982) die Makromoleküle der Zellen schädigen und möglichst schnell durch Osmolyte ersetzt werden müssen. Dies erfordert einen hochaffinen und spezifischen Transport von kompatiblen Soluten durch die semipermeable Zytoplasmamembran. Dieser

Transportprozess arbeitet gegen ein immenses Konzentrationsgefälle, da die kompatiblen Solute in der Umwelt in deutlich geringeren Konzentrationen vorliegen, als sie in der Zelle benötigt werden. Dieser hochaffine Import von kompatiblen Soluten kann über primäre Transporter (ABC-Typ) oder sekundäre Transporter (BCCT und andere) erfolgen. Für die primären ABC-Transporter sind substratspezifische Bindeproteine wichtig, denn sie erhöhen die Effizienz und die Kapazität von Transportern erheblich (Tam und Saier, 1993). Substratbindeproteine mit hoher Affinität zu kompatiblen Soluten sind jedoch ein Widerspruch zu dem postulierten Wirkungsmechanismus von kompatiblen Soluten, die eigentlich von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden. Mittlerweile sind Bindeprotein-abhängige ABC-Transporter für kompatible Solute in verschiedenen Spezies, darunter bodenlebenden Mikroorganismen wie *Bacillus subtilis*, *Sinorhizobium meliloti*, *Erwinia chrysanthemi* aber auch in *Escherichia coli*, einer Reihe von humanpathogenen Mikroorganismen wie *Listeria monocytogenes* und sogar in einigen *Archaea* entdeckt und charakterisiert worden (Bremer und Krämer, 2000; Morbach und Krämer, 2002; Pflüger und Müller, 2004; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2004). Daher stellt sich die Frage, wie Moleküle mit hoher Affinität und Spezifität von Proteinen gebunden werden können, wo sie doch von deren Oberfläche ausgeschlossen werden. Diese Frage sollte in der vorliegenden Arbeit auf molekularer Ebene für die kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain anhand des spezifischen Transporters ProU mit seinem Substratbindeprotein ProX aus *Escherichia coli* (*EcProX*) geklärt werden. Als weiteres Untersuchungsobjekt diente das ProX-Protein aus dem ProU-Transporter des hyperthermophilen Archaeons *Archaeoglobus fulgidus* (*AfProX*), ein Substratbindeprotein mit hoher Affinität zu Glycin Betain und Prolin Betain. Datenbankanalysen mit den Aminosäuresequenzen der bekannten Glycin Betain Bindeproteine deuten auf eine weite Verbreitung dieser Substratbindeproteine und ihres Bindungsmechanismus hin.

1. Kation-pi-Interaktionen sind eine Hauptdeterminante in der hochaffinen Bindung von Glycin Betain und Prolin Betain durch die Substratbindeproteine ProX aus *E. coli* und ProX aus *A. fulgidus*

1.1 Die Tryptophan-Box des periplasmatischen Substratbindeproteins ProX aus *E. coli*

Der Bindeprotein-abhängige ABC-Transporter ProU aus *E. coli* wird unter hyperosmotischen Bedingungen auf Proteinebene aktiviert und durch die hohe Affinität seines periplasmatischen Substratbindeproteins ProX zu Glycin Betain (1 μM) und Prolin Betain (5 μM) trägt er zu einer schnellen Akkumulation dieser Schutzsubstanzen im Zytoplasma der Zelle bei (May *et al.*, 1986; Haardt *et al.*, 1995). Mit den Kristallstrukturen des *EcProX* Proteins mit gebundenem Glycin Betain (1,6 Å) oder Prolin Betain (2,1 Å) konnte erstmals ein hochaffines Substratbindeprotein für kompatible Solute auf molekularer Ebene untersucht werden (Schiefner, *et al.* 2004a, Breed *et al.*, 2001). Die Kristallstruktur zeigte eine Substratbindestelle zwischen den beiden globulären Domänen des Proteins, in dem die quartären Amine der Substrate Glycin Betain und Prolin Betain durch drei Tryptophane (Trp-65, Trp-140 und Trp-188) koordiniert werden (Abb.10B, Einleitung). Die Beteiligung von Trp-188 und Trp-140 an der Substratbindung konnte durch erste Mutagenesestudien bereits belegt werden (Bösser, 2001). Die Carboxylgruppe des Glycin Betains wird stabilisiert durch die Aminosäuren His-69, Gly-141 und Cys-142. Die in dieser Arbeit beschriebene Mutagenesestudie in der Substratbindetasche des *EcProX*-Proteins charakterisiert die Rolle der einzelnen Tryptophane an der Substratbindung und liefert den experimentellen Nachweis, dass Kation-pi-Interaktionen an der Bindung maßgeblich beteiligt sind. Die Resultate der Mutagenesestudie zeigten, dass Trp-188 essentiell für die Bindung von ^{14}C -markiertem Glycin Betain ist, und dass dieses Tryptophan nur durch eine der anderen aromatischen Aminosäuren, Phenylalanin oder Tyrosin ersetzt werden kann. Ein Austausch des Trp-188 gegen die aliphatischen Aminosäuren Alanin und Leucin, sowie ein Austausch gegen die negativ geladenen Aminosäuren Aspartat und Glutamat bewirken einen vollständigen Affinitätsverlust des Proteins zu Glycin Betain. Eine Substitution mit Aminosäuren, die keine Kation-pi Interaktion zulassen führt also zum Verlust der Bindungsfähigkeit. Wird das Trp-140 durch die aliphatischen Aminosäuren oder die negativ geladenen Aminosäuren ersetzt, so zeigt sich keine drastische Veränderung der Bindeaffinität zu Glycin Betain. Einzig der Austausch gegen Alanin bewirkt eine Erhöhung des K_D zu Glycin Betain um den Faktor 10. Trp-140 spielt also eine untergeordnete Rolle in

der Bindung von Glycin Betain und kann gegen jede der getesteten Aminosäuren ausgetauscht werden, ohne dass ProX seine Bindungsfähigkeit verliert. Da in dieser Position auch der Einsatz von Aminosäuren mit größeren räumlichen Ausmaßen (wie z.B. Leucin) die Bindung des Glycin Betains nicht behindert, ist ein etwas größerer Abstand zwischen quartärem Amin und diesem Indolring wahrscheinlich. Die Mutationen in Trp-65 zeigten, dass der Austausch gegen ein Alanin abermals zu einer Erhöhung der K_D um den Faktor 10 führte, jedoch können Mutanten mit einem Leucin, Aspartat oder Glutamat in dieser Position das markierte Substrat nicht mehr binden. Trp-65 toleriert also einen Austausch gegen Phenylalanin, Tyrosin und zu einem gewissen Grad auch Alanin, es toleriert jedoch keinen Austausch gegen Aspartat, Glutamat oder Leucin. Aus diesen Resultaten kann man vermuten, dass der Abstand zwischen dem quartären Amin des Substrates und den jeweiligen Indolringen unterschiedlich groß ist. Es könnte aber auch auf eine stärkere Beteiligung von Trp-65 an der Bindung von Glycin Betain hindeuten, verglichen mit Trp-140. Alle drei Tryptophane können durch ein Phenylalanin oder Tyrosin ausgetauscht werden ohne dass es einen deutlichen Affinitätsverlust des resultierenden ProX-Proteins zu Glycin Betain gibt. Die π -Elektronen der Phenol- und Benzolreste dieser Aminosäuren sind also ebenfalls in der Lage, der delokalisierten positiven Ladung des quartärenamins als gleichwertige Interaktionspartner zu dienen. Eine Doppelmutante mit Austausch der beiden Tryptophane 140 und 65 gegen Alanin zeigte, dass Trp-188 zwar essentiell ist für die Bindung von Glycin Betain, aber die beiden anderen Tryptophane zur Stabilisierung des Substrates in der Bindetasche benötigt werden. Diese Ergebnisse belegen, dass Kation- π -Interaktionen eine wichtige Determinante in der Bindung von Glycin Betain durch das *E. coli* ProX Protein sind. Dabei hat das Trp-188 den größten Einfluss in der Substratbindung und Trp-140 den geringsten Einfluss. Mit dieser Mutagenesestudie wurden die Beteiligung von Kation- π -Interaktionen an der hochaffinen Bindung des kompatiblen Solutes Glycin Betain durch ein Protein erstmals experimentell belegt.

Kation- π -Interaktionen finden in einer sehr kurzen Distanz zwischen den π -Elektronen des Aromaten und dem kationischen Partner statt; diese Distanz ist vergleichbar mit der einer Distanz zwischen zwei C-Atomen die durch van der Waals Interaktionen verbunden sind (Ma und Dougherty, 1997). Ein Molekül, das durch Kation- π -Interaktionen gebunden wird, sollte daher auch mehrere van der Waals Kontakte mit den aromatischen Interaktionspartnern eingehen können, da die ideale Positionierung des Kations für Kation- π -Interaktionen über dem Zentrum des aromatischen Ringes ist (Mecozzi *et al.*, 1996). Mittels der strukturellen Daten des *EcProX* Proteins wurden von A. Schiefner die Abstände

zwischen den Tryptophanen und dem quartären Ammonium des Glycin Betains bestimmt, und van der Waals Kontakte vorhergesagt. Aus der *EcProX* Struktur ließen sich 9 Kontakte des Glycin Betains zum Indolring des Trp-188, 5 Kontakte von Glycin Betain zu Trp-65 und 4 Kontakte des Glycin Betains zu Trp-140 ableiten (Schiefner et al, 2004a). Diese Daten weisen also ebenfalls auf eine besondere Rolle des Trp-188 in der Substratbindung, denn ein Indolring mit 9 van der Waals Kontakten zur Trimethylammoniumgruppe ergibt eine enge Positionierung und somit eine ideale Konfiguration von Kation-pi-Interaktionen. In der Mutagenesestudie wurde dies durch die Trp-188 Mutanten experimentell belegt. Trp-140 und Trp-65 dagegen weisen eine ähnliche Anzahl von van der Waals Kontakten auf. Die strukturellen Daten zur Substratbindung korrelieren also mit den Resultaten der Mutagenesestudie.

Die Mutagenesestudie deutet aber einen Unterschied in der Relevanz zwischen Trp-140 und Trp-65 für die Substratbindung an, der allerdings auch auf sterischen Gründen basieren könnte. Die Tatsache das *EcProX* Homobetain (ein Molekül, das in der Hauptkette um eine Methylgruppe länger ist als Glycin Betain) nicht mehr gebunden werden kann deutet darauf hin, dass die Bindetasche des *EcProX* Proteins sehr eng ist und gut angepasst an die Strukturen der Moleküle Glycin Betain und Prolin Betain. Dies wird untermauert durch die enge Substratspezifität des Proteins, denn dies sind die einzigen kompatiblen Solute, von denen eine Bindung durch das *EcProX* Protein nachgewiesen werden konnte, obwohl der Translokationskomplex auch mit niedriger Transportrate die Solute Ectoin, Prolin und Taurin transportieren kann. Dies konnte zumindest für Ectoin gezeigt werden (Jebbar *et al.*, 1992). Die niederaffine Bindung dieser Substrate wird vermutlich nur durch eine interne Bindestelle in den integralen Membranproteinen ProW ermöglicht, dies würde die geringe Transportrate dieser Substrate erklären. Da das Substratbindeprotein *EcProX* trotzdem für den Transport benötigt wird, könnte seine Rolle möglicherweise das Verschließen des Translokationsweges zum Periplasma und die Förderung der ATP-Hydrolyse, die für den Transportprozess des Moleküls nötig ist, sein.

Die Kristallstruktur des ProX Proteins mit gebundenem Prolin Betain (2.1 Å) ermöglicht die Identifizierung der Aminosäuren, die an der Bindung von Prolin Betain beteiligt sind. Dabei wurde eine fast identische Konstellation an bindungsrelevanten Aminosäuren wie bei der Bindung von Glycin Betain festgestellt (Abb. 50). Der einzige Unterschied ist die zusätzliche Stabilisierung des Prolin-Ringes durch van der Waals Kontakte mit der Aminosäure Leu-68, die in der Bindung von Glycin Betain keine Rolle spielt (Schiefner *et*

al., 2004a). Daraus kann man schließen, dass die für Glycin Betain getroffenen Aussagen der Mutagenesestudie mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für Prolin Betain gelten.

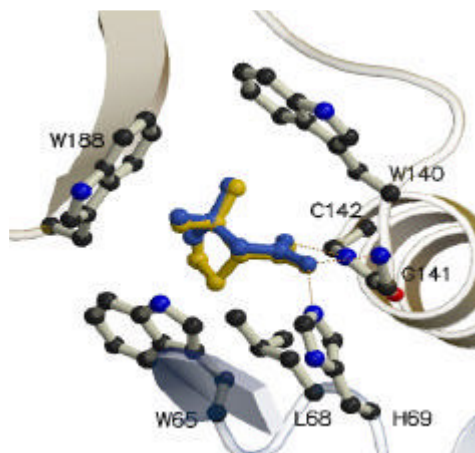


Abb. 50: Überlagerung der Ausschnittsvergrößerungen der Substratbindetasche von *EcProX* mit Glycin Betain und *EcProX* mit Prolin Betain. Die Abbildung zeigt die an der Bindung von Glycin Betain und Prolin Betain beteiligten Aminosäuren. Die „Trp-box“ ist verantwortlich für die Koordination beider quartärer Amine, des Trimethylammoniums von Glycin Betain und des Dimethylammoniums von Prolin Betain. Mit Ausnahme von Leu-68 sind die gleichen Aminosäurereste in der Bindung beider Substrate beteiligt. Die Abbildung wurde von André Schiefner zur Verfügung gestellt.

1.2 Der hitzeinduzierte ProU Transporter des hyperthermophilen Archaeons *A. fulgidus* transportiert die kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain mit hoher Affinität

Der hyperthermophile Archaeon *A. fulgidus* wurde aus der Umgebung von marinen hydrothermalen Quellen isoliert und besitzt ein Wachstumsoptimum von 83°C (Stetter *et al.*, 1987). Die physiologische Rolle des ABC-Transporters ProU von *A. fulgidus* ist die Akkumulation von Glycin Betain und Prolin Betain zu thermoprotektiven Zwecken (Holtmann, 2002). Die Gesamtstruktur zeigt große Ähnlichkeit zum *EcProX* Protein, obwohl die Aminosäuresequenz-Übereinstimmung zwischen den Proteinen nur 21% beträgt (Holtmann, 2002, Schiefner *et al.*, 2004b). Die Substrataffinität und Substratspezifität der beiden ProX Proteine ist eine weitere Gemeinsamkeit, so zeigen beide Proteine ausschließlich eine hohe Affinität zu Glycin Betain und Prolin Betain (Holtmann, 2002). Die Kristallstruktur des *AfProX* Proteins (2,1 Å) zeigte, dass die quartären Amine des Glycin Betains und Prolin Betains vermutlich ebenfalls über Kation-pi-Interaktionen koordiniert und zusätzlich durch Asp-109 stabilisiert werden. Die Carboxylgruppen der beiden Substrate werden in *AfProX* durch Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen stabilisiert (Abb.12B, Einleitung). In *AfProX* findet das in *EcProX* entdeckte Bindungsprinzip zur hochaffinen Bindung des bevorzugt ausgeschlossenen

Solutes Glycin Betain also ein weiteres mal Anwendung, wenngleich die Architektur der Bindetaschen wesentliche Unterschiede aufweist. Die quartären Amine der Substrate Glycin Betain und Prolin Betain werden in *AfProX* über vier Tyrosinreste gebunden, die wie ein Gürtel um das Substrat herum gruppiert sind („Tyr-Gürtel“), (Abb. 12B, Einleitung; Schiefner *et al.*, 2004b). Diese Tatsache bestätigt eine Schlußfolgerung aus der Mutagenesestudie des *EcProX* Proteins; für die hochaffine Bindung von Molekülen mit einem quartären Amin können die Tryptophane durch andere aromatische Aminosäuren ersetzt werden. Die Bindekonstante des Wildtyp *AfProX* Proteins für Glycin Betain liegen aber mit 10 +/- 5 nM, und für Prolin Betain 8 +/- 4 nM beide im niedrigen nanomolaren Bereich, wogegen *EcProX* eine Bindeaffinität von 1 µM für Glycin Betain und 5 µM für Prolin Betain besitzt (May *et al.*, 1986; Haardt *et al.* 1995). Die Bedeutung der strukturellen Unterschiede der „Trp-Box“ und des „Tyr-Gürtels“ wurden in dieser Arbeit mit einer Mutagenesestudie des „Tyr-Gürtels“ untersucht. Systematisch wurde jedes der Tyrosine Einzeln und in Doppel-Kombination gegen Alanin ausgetauscht und damit selektiv Kation- π -Interaktionen ausgeschaltet. Die Bestimmung der Affinitätskonstanten der mutierten *AfProX* Proteine für Glycin Betain und Prolin Betain wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie bei 50°C durchgeführt. Die Rolle der Stabilisierung durch Asp-109 kann durch die Mutagenesestudie nicht ermittelt werden, da es sich um einen Kontakt mit dem Carbonyl des Peptidrückgrates des Proteins handelt; dieser sollte auch mit allen anderen Aminosäuren möglich sein.

1.2.1 Die Kation- π -Interaktionen durch den „Tyrosin-Gürtel“ und die Stabilisierung der Carboxylgruppe durch Salzbrücken und Wasserstoffbrücken sind wichtig für die Bindung von Glycin Betain und Prolin Betain mit einer nanomolaren Affinitätskonstante

Die Mutagenesestudie des Tyr-Gürtels zeigte, das sich bei einem Austausch von nur einem Tyrosin gegen ein Alanin die Bindeaffinität aus dem nanomolaren Bereich in den mikromolaren Bereich verringert. Allerdings sind alle Alanin-Einzelmutanten des Tyr-Gürtels noch in der Lage, Glycin Betain und Prolin Betain zu binden. Aufgrund der strukturellen Daten wurde von Schiefner *et al.* postuliert, dass alle vier Tyrosine einen vergleichbaren Beitrag zur Bindung des Glycin Betains leisten (Schiefner *et al.*, 2004b). Die Mutagenesestudie zeigte jedoch unterschiedliche Bindekonstanten für die vier Alanin-Einzelmutanten, wobei die Mutante Tyr-214/Ala den geringsten Affinitätsverlust aufweist

und mit der Substrataffinität des *EcProX* Wildtyp Proteins zu Glycin Betain und Prolin Betain vergleichbar ist, also der Bindungskapazität einer aromatischen „Box“. Die Mutante Tyr-111/Ala zeigte eine größere Beeinträchtigung der Bindekonstante, für Glycin Betain beträgt sie 75 μM , für Prolin Betain 148 μM . Eine ähnlich deutliche Abnahme der Bindeaffinität für Glycin Betain ist bei der Mutante Tyr-190/Ala (67 μM) zu beobachten, nur die Bindung von Prolin Betain (19 μM) ist durch diese Mutation weniger beeinträchtigt. Diese Unterschiede in der Bindeaffinität der Alanin-Einzelmutanten sind vermutlich auf unterschiedliche Abstände der Tyrosine zu den quartären Aminen des jeweiligen Substrates zurückzuführen. Die Tyrosine 190 und 111 haben möglicherweise aufgrund ihrer Positionierung im Protein einen engeren Kontakt zu den quartären Aminen der gebundenen Liganden (als vergleichsweise Tyr-214) und haben somit einen größeren Anteil an der Bindung. Der Ausfall dieser Phenolringe bewirkt keine räumlichen Struktur die zu einer „Trp-Box“ vergleichbar sein könnte, wie möglicherweise bei der Tyr-214/Ala Mutante. Dies gilt allerdings nicht für die Bindung von der Tyr-190/Ala Mutante zu Prolin Betain (19 μM). Für die Einzelmutante Tyr-63/Ala ist eine sehr drastische Verringerung der Bindeaffinität zu Glycin Betain und Prolin Betain zu beobachten. Eine Substitution dieses Tyrosins beeinflusst die Architektur der Bindetasche immens, so das eine besondere Rolle in der Substratbindung vermutet wird. In den *AfProX* Doppelmutanten, in denen jeweils zwei der Tyrosine gegen Alanin in allen möglichen Kombinationen innerhalb des Tyr-Gürtels ausgetauscht sind, sind alle sechs Doppelmutanten nicht mehr fähig, Glycin Betain oder Prolin Betain zu binden.

In der Mutagenesestudie des *EcProX* Proteins waren 2 Tryptophane in der Lage, Glycin Betain zu binden, wenn nicht der Haupt-Interaktionspartner Trp-188 betroffen war. Dies ist ein wichtiger Unterschied in der Architektur der beiden hochaffinen Substratbindeproteine und zeichnete sich bereits bei den hohen Affinitätsverlusten der Einzelmutanten in *AfProX* ab. In dem *EcProX* Protein sind die Positionen der drei Tryptophane der „Trp-Box“ für eine hochaffine Bindung optimal zueinander abgestimmt, dies gilt in *ProX A. fulgidus* für den „Tyr-Gürtel“. Fehlt eines dieser Tyrosine, so kann dies drastische Affinitätsverluste zu den Substraten bedeuten, je nach Position der verbleibenden drei Tyrosine und deren Abstand zum quartären Amin. Im Falle des Tyr-63 ist dabei der größte Affinitätsverlust zu beobachten, bei Tyr-214 der geringste Affinitätsverlust. Der Austausch der Aminosäure Thr-66, die eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carboxylgruppe der Substrate bildet, zeigt ebenfalls eine Abnahme der Bindeaffinität in den mikromolaren Bereich von 1,8 μM für Glycin Betain und 18 μM für Prolin Betain. Eine Mutation, welche die Aminosäure Lys-

13 gegen ein Alanin austauscht, bewirkt eine deutlich drastischere Affinitätsabnahme in den Bereich von 100 μM für beide Substrate. Lys-13 bildet zwei Salzbrücken zur Carboxylgruppe aus, diese leisten einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung der Substrate für deren hochaffine Bindung. Ein Fehlen der Salzbrücke von Arg-149 führt sogar zur Bindungsunfähigkeit von Prolin Betain, und eine Bindeaffinität zu Glycin Betain von 320 μM .

Die Resultate der Mutagenesestudie zeigen, dass auch in AfProX Kation-pi-Interaktionen eine wichtige Determinante für die Bindung von Glycin Betain und Prolin Betain sind, der Tyr-Gürtel scheint dabei eine Substratbindung im nanomolaren Bereich zu ermöglichen. Die Bindung des quartären Amins durch Kation-pi-Interaktionen ist aber nur ein Teil der Architektur eines hochaffinen Substratbindeproteins für die kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain. Die Stabilisierung der Carboxylgruppe der Liganden durch die Salzbrücken und Wasserstoffbrücken-bildenden Aminosäuren ist ebenfalls von großer Bedeutung.

1.2.2 Vergleich der Resultate der Mutagenesestudie des *A. fulgidus* ProX Proteins mit strukturellen Daten aus der Ligand-freien und Ligand-gebundenen Kristallstruktur

Wie zuvor bei dem Substratbindeprotein ProX aus *E. coli* wurden auch für das AfProX Protein die van der Waals Radien der Phenolringe des „Tyr-Gürtels“, des Glycin Betains und Prolin Betains ermittelt und van der Waals Kontakte zu den Substraten bestimmt (Schiefner *et al.*, 2004b). In Tabelle 19 werden diese van der Waals Kontakte mit den Affinitätskonstanten für Glycin Betain und Prolin Betain der Alanin-Einzelmutanten des Tyr-Gürtels verglichen.

Mit Ausnahme der Mutante Tyr-63/Ala korrelieren die Bindeaffinitäten der mutierten AfProX Proteine mit der Anzahl der van der Waals Kontakte zwischen Substrat und dem durch Mutation entfernten Tyrosin. Tyr-214 bildet nur 3 van der Waals Kontakte zur Trimethylammoniumgruppe von Glycin Betain aus, Tyr-111 dagegen bildet 6 van der Waals Kontakte. Der Phenolring von Tyr-111 ist somit enger an dem quartären Amin koordiniert und hat vermutlich eine günstigere Position zur Ausbildung von Kation-pi-Interaktionen. So zeigte auch eine Substitution von Tyr-111 durch Alanin in der Mutagenesestudie einen größeren Affinitätsverlust als eine Substitution von Tyr-214.

Tab. 19: Vergleich der Bindeaffinität der mutierten AfProX Proteine mit den van der Waals Kontakten des jeweiligen Substrates zu den durch Mutation entfernten Tyrosinen. Die van der Waals-Kontakte wurden von A. Schiefner bestimmt (Schiefner *et al.*, 2004b).

ProX Mutante	Van der Waals Kontakte zwischen mutierten Tyr-Rest und Glycin Betain	K _D Glycin Betain (Standardabweichung)	Van der Waals Kontakte zwischen mutierten Tyr-Rest und Prolin Betain	K _D Prolin Betain (Standardabweichung)
ProX Tyr-63/Ala	5	149 µM (+/- 17 µM)	6	288µM (+/- 26 µM)
ProX Tyr-111/Ala	6	75 µM (+/- 4 µM)	8	148 µM (+/- 28 µM)
ProX Tyr-190/Ala	6	67 µM (+/- 9 µM)	Kein Kontakt mit quart. Amin, nur mit Prolinring	19 µM (+/- 5 µM)
ProX Tyr-214/Ala	3	3,5 µM (+/- 0,7 µM)	3	3,5 µM (+/- 0,7 µM)

Es gilt aber zu beachten, dass van der Waals Kontakte zwischen Substrat und Tyrosinen im gebundenen, geschlossenen Zustand bestimmt werden. Kristallstrukturen von Substratbindeproteinen mit gebundenem Liganden stellen eine Momentaufnahme im gebundenem Zustand dar und können keine direkte Aussage über die Dynamik der Substratbindung während der Konformationsänderung machen. Wenn eine Aminosäure in der Konformationsänderung des Proteins beteiligt ist oder einen Einfluss auf die Koordinierung des Liganden zu den Aminosäuren der Bindetasche (also der Substraterkennung) hat so ist dies an solchen Daten nicht zu erkennen. Der Beitrag des Tyr-63 ist also vermutlich nicht nur in der Bindung der Liganden im geschlossenen Zustand der Bindetasche zu suchen. Tyr-63 könnte aufgrund seiner Position die korrekte Ausrichtung und Koordinierung der Carboxylgruppe zu den anderen, an der Bindung beteiligten Aminosäuren (Lys-13, Thr-66, Asp-109) beeinflussen (A. Schiefner, persönliche Mitteilung). In dieser Mutante ist also die Bindungsfähigkeit möglicherweise geringer aufgrund von Störungen in der Koordination des Liganden in die Substratbindetasche und daher ist Tyr-63 von besonderer Relevanz in der Substratbindung, welches aber nicht in der Anzahl der van der Waals Kontakte erkennbar ist, sondern nur in der Mutagenesestudie demonstriert werden kann.

Die quartären Amine der Substrate werden in AfProX zusätzlich durch die Interaktion mit dem permanenten Dipol der Carbonylgruppe des Peptidrückgrates von Asp-109 stabilisiert (Kation-Dipol-Interaktion). In der Struktur konnten von André Schiefner 3 van der Waals

Kontakte zu Glycin Betain und 3 Kontakte zu Prolin Betain ermittelt werden. Die Bindung der quartären Amine der Substrate erfolgt also nicht nur über Kation- π -Interaktionen und van der Waals Interaktionen, es sind zusätzlich Kation-Dipol-Interaktionen beteiligt (Schiefner *et al.*, 2004b). Das Zusammenspiel der Kation- π -Interaktionen, der van der Waals Interaktionen, der Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und der Kation-Dipol-Interaktion ermöglicht vermutlich die besonders hohe Affinität des *AfProX* Proteins zu seinen Substraten (0,01 μ M), verglichen mit der Affinität des *EcProX* Proteins (1 μ M).

Mit dem *AfProX* Protein ist es erstmals gelungen, ein Substratbindeprotein für kompatible Solute ohne gebundenen Ligand zu kristallisieren (Schiefner *et al.*, 2004b). In der Ligand-freien Kristallstruktur von *AfProX* sind die bindungsrelevanten Tyrosine weit nach aussen hin in das umgebende Lösungsmittel exponiert und somit gut von aussen für die Solute kontaktierbar. In Abb.51 sind die Ligand-freie („offene“) und die Glycin Betain bindende („geschlossene“) Struktur des *AfProX* Proteins mit der jeweiligen Positionierung der Tyrosine des Tyr-Gürtels gezeigt. Die beiden Konformationen des Proteins demonstrieren die für Substratbindeproteine typische, große Konformationsänderung der beiden Domänen induziert durch die Substratbindung und zeigen die Bewegung der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren während der Konformationsänderung (Schiefner *et al.*, 2004b). Dabei wurde ersichtlich, dass die Tyrosine der Domäne B, Tyr-111 und Tyr-190 („gelbe“ Domäne) einen deutlichen Ortswechsel durchlaufen, während die Tyrosine der Domäne A, Tyr-63 und Tyr-214 („grüne“ Domäne), im Zuge der Konformationsänderung ihre Position kaum verändern (Schiefner *et al.*, 2004b, Abb. 51A,B). Aufgrund der Anzahl der Kontakte und der Konformation der Aminosäurereste gehen Schiefner *et al.* (2004b) davon aus, dass die Liganden zunächst an den Tyr-63 und Tyr-214 Resten der Domäne A binden und ihre Zielposition einnehmen, also die Carboxylgruppen-Interaktion mit den Domäne A-zugehörigen Aminosäuren Lys-13 und Thr-66. Tyr-63 spielt dabei wie oben beschrieben aufgrund seiner Position eine wichtigere Rolle als Tyr-214, was durch die Resultate der in dieser Arbeit präsentierten Mutagenesestudie aufgezeigt wurde. Die Bindung des Liganden reduziert dann das negative Oberflächenpotential und die Domäne B, mit Tyr-111 und Tyr-190, schließt das Substratbindeprotein in einer großen Bewegung ein („hinge bending motion“), wobei sich ausschließlich Domäne B auf Domäne A zubewegt (Schiefner *et al.*, 2004b). Aus den Resultaten der in dieser Arbeit vorgelegten Mutagenesestudie und den *EcProX*-Daten geht hervor, dass eine hochaffine Bindung des Liganden prinzipiell auch mit drei Aromaten (*AfProX* Tyr-214/Ala mit 3,5 μ M) möglich ist.

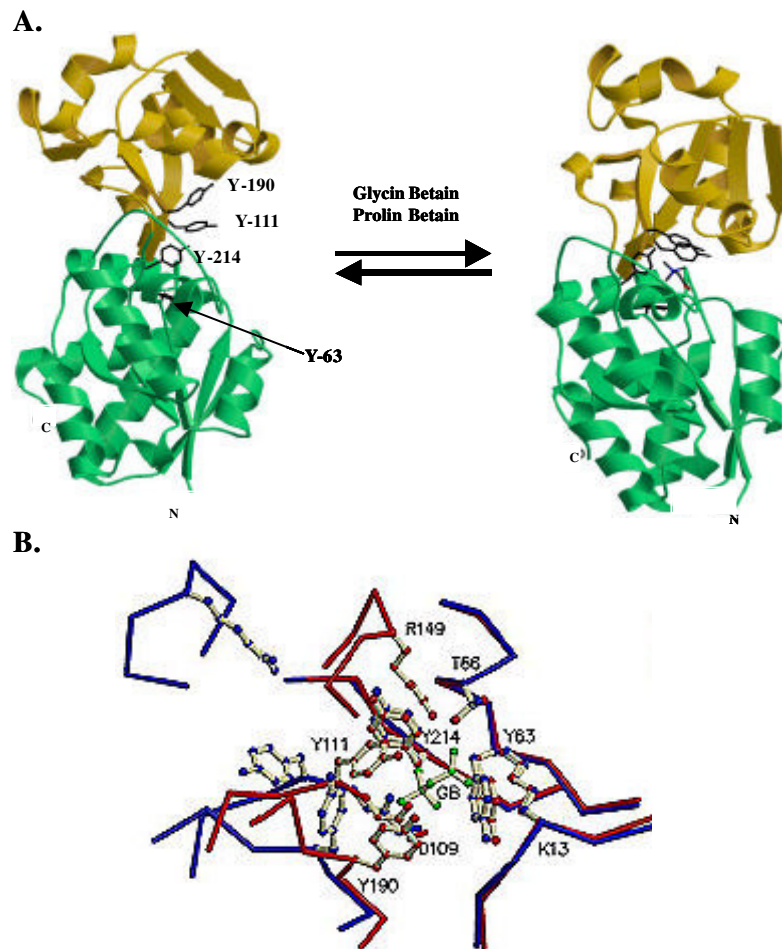


Abb. 51: Kristallstrukturen der Ligand-freien und Ligand-gebundenen Form des AfProX Proteins. Abbildung A zeigt die offene und Glycin Betain-gebundene Form von AfProX und die Tyrosine des „Tyr-Gürtels“. Die Bilder wurden von A. Schiefner zur Verfügung gestellt. Abbildung B zeigt eine Überlagerung der Substratbindetasche in offener Form (blau) und in Glycin Betain gebundener Form (rot) und dokumentiert die Bewegung der Tyrosine. Die Abbildung wurde aus Schiefner *et al.* (2004b) entnommen.

Wie bereits erläutert verursacht ein Austausch des Tyr-63 der Domäne A vermutlich aufgrund einer Störung des Bindungsablaufes den stärksten Verlust an Affinität. Der Austausch des zweiten „Domäne A Tyrosins“, Tyr-214, zeigte den geringsten Einfluss. Der Austausch eines der Tyrosine der Domäne B, welche durch eine Konformationsänderung die Bindetasche des Substratbindeproteins schließt, zeigten nahezu identische Effekte auf die Bindung von Glycin Betain. In jedem Falle ist AfProX bei dem Austausch von nur einem Tyr-Rest in der Lage, die Bindung durchzuführen und die Substratbindetasche zu schließen, wenngleich die Bindeaffinität auch hier deutlich in den mikromolaren Bereich absinkt (je nach Distanz des Phenolrings zum quartären Amin). Nur der Austausch von 2 Tyrosinen gleichzeitig verhindert eine Substratbindung. Dies ist ein Unterschied zu der Bindung von Glycin Betain durch das EcProX Protein, denn dort waren auch zwei Tryptophane in der Lage, Glycin Betain zu binden. Für das gleichzeitige Entfernen der

beiden Domäne A- oder Domäne B-Reste kann keine Schließung der Bindetasche (Substitution von Tyr-111 und Tyr-190) oder Initiierung der Konformationsänderung (Substitution von Tyr-214 und Tyr-63) stattfinden.

1.2.3 Abhängigkeit der Substratbindung von der Temperatur

In ersten radioaktiven Bindetests von Gudrun Holtmann wurde demonstriert, das AfProX in der Lage ist, bei Temperaturen zwischen 25°C bis 100°C und Substratsättigung den Liganden Glycin Betain mit gleicher Effektivität zu binden. Dieses Experiment wurde in dieser Arbeit mit deutlich reduzierter Ligandenkonzentration (0,5 µM Glycin Betain auf 5 µM AfProX) wiederholt und es wurde sichtbar, dass mit steigender Temperatur die Kapazität der Bindung nur sehr geringfügig nachlässt. Das Maltosebindeprotein TMBP aus *Thermococcus litoralis*, einem hyperthermophilen Archaeon, ist in der Lage, Maltose bei mesophilen Bedingungen zu binden, die Dissoziation des Substrates ist bei dieser Temperatur jedoch deutlich langsamer als bei thermophilen Bedingungen (Diez *et al.*, 2001). Eine von G. Holtmann durchgeführte Bindestudien mit dem AfProX Protein zeigte, das ProX unter mesophilen und unter hyperthermophilen Bedingungen eine vergleichbare Bindung und Dissoziation von Glycin Betain aufweist (Holtmann, 2002). Das AfProX Protein arbeitet also unter mesophilen und hyperthermophilen Bedingungen. Die Affinitätsbestimmung (K_D) der mutierten AfProX Proteine durch Fluoreszenzspektroskopie erfolgte bei einer Temperatur von 50°C, da eine Messung bei 83°C experimentell problematisch ist. Es ist jedoch bekannt, dass die Bindekonstante K_D von der Temperatur abhängig ist. In einer abgewandelten, fluoreszenzspektroskopischen Messung wurde das Wildtyp AfProX Protein auf seine Bindeaffinität (K_D) bei 25°C, 50°C und 80°C hin untersucht. Die Resultate zeigten, das ProX in der Lage ist, bei allen Temperaturen Glycin Betain und Prolin Betain mit einer Bindekonstante im nanomolaren Bereich zu binden. Bei Raumtemperatur ist die Affinität für Glycin Betain mit 5 nM und Prolin Betain mit 14 nM erwartungsgemäß am Höchsten, bei 50 °C sinkt die Affinität auf 23 nM für Glycin Betain und 38 nM für Prolin Betain und bei 80 °C sind immer noch Bindekonstanten von 137 nM (Glycin Betain) und 122 nM (Prolin Betain) zu messen, die Bindekonstanten bei 50°C liegen also um einen Faktor 6 (Glycin Betain) oder Faktor 3 (Prolin Betain) niedriger als die Bindekonstanten bei 80°C. Die mutierten AfProX Proteine, deren Affinitätskonstanten bei 50°C bestimmt wurden, binden daher unter den physiologischen Bedingungen von *A. fulgidus* (83°C) vermutlich auch mit geringerer Affinität als bei 50°C.

Vergleicht man die Bindeaffinitäten einiger bekannter Glycin Betain Bindeproteine, wie *EcProX* (1 μM) und die Bindeaffinität des hochaffinen Substratbindeproteins *OpuAC* aus dem bodenlebenden, mesophilen Mikroorganismus *B. subtilis* (*BsOpuAC* $K_D=17 \mu\text{M}$) mit der Bindeaffinität von *AfProX* bei Raumtemperatur ($< 5 \text{ nM}$) so sind deutliche Affinitätsunterschiede zwischen den mesophilen Proteinen und dem hyperthermophilen Protein zu sehen (May *et al.*, 1986, ; Horn *et al.*, im Druck). Die Erklärung für die vergleichsweise hohe Substrataffinität des *AfProX* Proteins zu seinen Substraten Glycin Betain und Prolin Betain ist möglicherweise auch in den unterschiedlichen Temperaturen der Habitate und Verfügbarkeit der Solute in den jeweiligen Habitaten der Mikroorganismen zu suchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Substrataffinität bei 80°C nur noch im Bereich von 100 nM anzusiedeln ist und damit näher an den Bindeaffinitäten der mesophilen Glycin Betain Bindeproteine. In den Habitaten von *B. subtilis* und *E. coli* ist die Verfügbarkeit von Glycin Betain deutlich besser und in höheren Konzentrationen gewährleistet. So sind im Boden als Glycin Betain-Quellen Wurzelexudate, verrottende Pflanzen und Bakterien, aber auch tierische Exkrememente zu nennen. In dem Habitat von *A. fulgidus*, den hydrothermalen Quellen, ist eine deutlich geringere Konzentration von Glycin Betain zu erwarten. Die höhere Substrataffinität von *AfProX* ist vermutlich eine Anpassung an die Bedingungen im natürlichen Habitat von *A. fulgidus*.

Die Bindung des „bevorzugt ausgeschlossenen“ kompatiblen Solutes Glycin Betain wird in allen bekannten Beispielen in einer tief im Protein liegenden, engen Bindetasche umgesetzt, die sich durch ein gleichmäßiges negatives elektrostatisches Potential (erzeugt durch die $\text{p}i$ -Elektronensysteme der Aromaten) auszeichnet (Schiefner *et al.*, 2004a). Die offene Struktur des *AfProX* Proteins verdeutlicht dabei, dass die Aminosäuren, die mit Glycin Betain interagieren vermutlich sehr exponiert sind und eine Interaktion ermöglichen. Die Bindung des Glycin Betains durch die $\text{P}i$ -Elektronen und die Schließung der Bindetasche gehen vermutlich mit der Entfernung der Hydrathülle des Glycin Betains einher. Dieses Prinzip der Bindung von Glycin Betain findet möglicherweise eine weit verbreitete Anwendung in den Prokaryoten.

1.3 Kation-pi-Interaktionen sind weit verbreitet in der Bindung von Substraten mit quartären Aminen

Kation-pi-Interaktionen sind eine nichtkovalente Bindungskraft zwischen einem Kation oder partiell positiv geladene Moleküle und den pi-Elektronen eines aromatischen Systems (Ma und Dougherty, 1997). Diese Bindungskraft findet unterschiedlichste Anwendung in Proteinen. Zum Beispiel beeinflussen sie als amino-aromatische Interaktion zwischen den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan mit Arginin oder Lysinresten innerhalb von Proteinen unter anderem die Proteinfaltung und auch die Proteinstabilität (Gallivan und Dougherty, 1999). Eine erhöhte Anzahl Kation-pi Interaktionen zwischen positiv geladenen Aminosäuren und aromatischen Aminosäuren könnten ein wichtiger Faktor für die thermale Stabilität von thermophilen Proteinen sein (Chakravarty und Varadarajan, 2002). Kation-pi-Interaktionen finden aber auch funktionelle Anwendungen in Proteinen wie zum Beispiel bei der Substraterkennung und Substratbindung von positiv geladenen Molekülen (zum Beispiel quartäre Amine), (Zacharias und Dougherty, 2002). Eine Übersicht von Proteinen, die Kation-pi-Interaktionen in ihrer Funktion verwenden sind in Tabelle 20 aufgeführt. Die Bindung von Molekülen mit quartären Aminen durch Kation-pi-Interaktionen wurde zuerst belegt in der Bindung des Neurotransmitters Acetylcholin durch die Acetylcholinesterase (Dougherty und Stauffer, 1990, Dougherty, 1996; Sussmann *et al.*, 1993; Harel *et al.*, 1993). Seit dieser Entdeckung sind in vielen unterschiedlichen Kristallstrukturen, darunter einige Neurotransmitter-Rezeptoren wie der Nicotin Acetylcholin Rezeptor, 5 HT-Rezeptor und GABA-Rezeptor zu finden, die alle ihre Substrate über Kation-pi-Interaktionen binden (Beene *et al.*, 2002; Lummis *et al.*, 2005). Eine weitere Gruppe von Molekülen, die häufig über Kation-pi-Interaktionen gebunden werden sind die Cholin-Derivate Phosphorylcholin, Phosphatidylcholin und Phosphocholin (Dougherty und Stauffer, 1990; Roderick *et al.*, 2002). Ein Beispiel ist das humane Phosphatidylcholin Transferprotein, es bindet Phosphatidylcholine und ist für den Transport dieser unlöslichen Moleküle innerhalb der Zelle verantwortlich. Die Bindetasche des Proteins enthält neben einem Lipid-Bindetunnel und einigen anderen Kontaktstellen eine Bindetasche aus drei Tryptophanen, Trp-101, Trp-114 und Trp-155 (Abb. 52A), welche das quartäre Amin des Phosphatidylcholins stabilisieren (Roderick *et al.*, 2002). In vielen Proteinen unterschiedlichster Funktion werden die quartären Amine der Cholingruppe über aromatische Aminosäuren gebunden, die übrigen Reste des Liganden werden stabilisiert durch Wasserstoffbrückenbindungen,

hydrophoben Interaktionen oder Salzbrücken, je nach Zusammensetzung des Liganden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, sind in dieser Gruppe auch die Glycin Betain bindenden Proteine anzusiedeln, da in diesem Falle auch das quartäre Amin des Glycin Betains über Kation-pi-Interaktionen gebunden wird, die Carboxylgruppe über Wasserstoffbrücken und Salzbrücken. Die hochaffine Bindung von Molekülen durch Kation-pi-Interaktionen (oder zumindest ihre Beteiligung an der Bindung) ist nicht nur auf Cholin-Derivate zu reduzieren. Mit NikA, einem periplasmatischen Substratbindeprotein für Nickel aus *E. coli*, konnte sogar ein Substratbindeprotein kristallisiert werden, welches ein Schwermetall-Kation über Kation-pi-Interaktionen binden kann. Der Transporter Nik ist vermutlich wichtig für den Import von Ni^+ , welches unter anderem für die Enzyme des anaeroben Metabolismus benötigt wird, verantwortlich. NikA besitzt in seiner Bindetasche unter anderem die beiden aromatischen Aminosäuren Trp-100 und Trp-398 (Abb. 52B), die in der Bindung involviert sein könnten. Die Bindungsenergie der beiden Tryptophane wurde auf $1-4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ geschätzt, wonach die beiden Tryptophane alleine die Bindungsenergie liefern könnten (Hedde *et al.*, 2003).

Eine weitere Gruppe von Proteinen, in denen Kation-pi-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen sind DNA-bindende Proteine. Das DNA-reparierende Enzym 3-Methyladenin DNA-Glycosylase II aus *E. coli* bindet methyliertes Adenin defekter DNS über Kation-pi Interaktionen und schneidet diese durch Hydrolyse der Glycosylbindung aus. In der Bindetasche des Enzyms wurden fünf aromatische Aminosäuren gefunden, welche das methylierte Adenin binden (Yamagata *et al.*, 1996). Die Kristallstruktur der humanen Alkyladenin DNS Glycosylase zeigt im Vergleich mit der Struktur des *E. coli* Enzyms eine vergleichbare Bindetasche (Labhan *et al.*, 1996). Ein weiteres Beispiel für Kation-pi-Interaktionen zwischen Protein und DNS ist die Untereinheit eIF4E des eukaryotischen Translationsinitiations-Faktors. Diese Proteinuntereinheit erkennt und bindet das 7N-methylierte Guanosin der 5' Cap Struktur eukaryotischer mRNA (Quioco *et al.*, 2000). Die Anwendung von Kation-pi-Interaktionen ist auf viele Funktionen von Proteinen umgesetzt, so auch in der Blutgerinnung (Faktor Xa, Lin und Johnson 1995), aber auch in der Steuerung von Protonenkanälen (M2 Kanal in Influenza A, Okada *et al.*, 2001) und in der Steuerung von Genaktivität (HP1 Chromodomain und Histon H3 in *D. melanogaster*, Jacobs und Khorasanizadeh, 2000).

Es ist seit langer Zeit bekannt, dass die Methylierung von Lysin-Resten in bestimmten Regionen von Histonen in der Genregulation von Eukaryoten eine wichtige Rolle spielt.

Das heterochromatin-assoziierte Protein 1 (HP1) aus *Drosophila melanogaster* interagiert mit dem methylierten Lys-9 des Histon H3, wobei die Interaktion abhängig ist von der Methylierung des Lysins. Eine Kristallstruktur dieses Komplexes zeigte, dass hauptsächlich drei Aromaten (Tyr-24, Tyr-48 und Trp45) in einer „Box“-ähnlichen Konfiguration für die Bindung der Methylammoniumgruppe verantwortlich sind (Abb. 52C) (Jacobs und Khorasanizadeh, 2000).

Kation-pi-Interaktionen sind eine generelle und weit verbreitete Kraft für die Erkennung und Bindung bestimmter Molekülgruppen in Proteinbindestellen

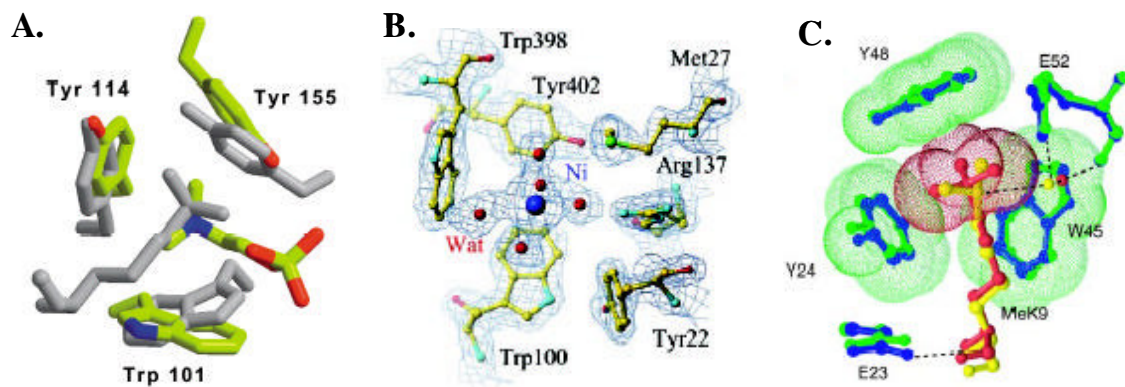


Abb. 52: Beispiele anderer aromatischer Bindetaschen.

Abb.A zeigt die Bindestelle für die Cholin-Kopfgruppe des Phosphatidylcholines in dem humanen Phosphatidylcholin Transferprotein. Das Protein wird benötigt für den Transport des unlöslichen Moleküls innerhalb der Zelle. (Abbildung aus: Roderick *et al.*, 2002). Abbildung B zeigt die Bindung von Ni⁺ in dem Substratbindeprotein NikA des Ni-Transporters aus *E. coli*. NikA wird für den Import von Nickel benötigt, dient aber vermutlich auch als Chemorezeptor. (Abbildung aus: Heddle *et al.*, 2003). Abbildung C zeigt die Bindung von methyliertem Lysin eines Histon H3 Schwanzes mit der HP1 Chromodomäne aus *D. melanogaster*. Die Interaktion ist ein wichtiger Schritt in der Genregulation zum „epigenetischen Silencing“. (Abbildung aus: Jacobs und Khorasanizadeh, 2000).

Tab. 20: Kation-pi-Interaktionen in Proteinen mit unterschiedlichen Funktion.

Protein	Kationischer Ligand / Interaktionspartner	Aromat (en)	Funktion	Referenz
Nikotin Acetylcholin Rezeptor (nAChR) GABA _A Rezeptor	Acetylcholin (Interaktion mit Cholin-Kopfgruppe) GABA	Trp-149 Y-198	Bindung von Acetylcholin (oder Nikotin) induziert öffnen des Ionenkanals Bindung des haupt-inhibitorischen Neurotransmitters des Zentralen Nervensystems; GABA	Zhong <i>et al.</i> , 1998 Lummis <i>et al.</i> , 2005
Acetylcholinesterase (<i>Torpedo californica</i>)	Acetylcholin (Interaktion mit Cholin-Kopfgruppe)	Trp-84, Phe-330 Tyr-121, Tyr -70, Trp-279	Bindung und Hydrolyse von Acetylcholin	Dougherty und Stauffer, 1990
Humane Acetylcholinesterase	Acetylcholin (Interaktion mit Cholin-Kopfgruppe)	Trp-286 Trp-86, Phe295 und Tyr-341	Bindung und Hydrolyse von Acetylcholin	Ordentlich <i>et al.</i> , 1993
Phospholipase C (<i>Bacillus cereus</i>)	Phosphatidylcholin (Interaktion mit Cholin-Kopfgruppe)	Tyr-56, Phe-66 (Glu-4)	Bindung von Phosphatidylcholin (Enzym: Spaltung der Phosphodiesterbindung in Diacylglycerin und phosphorylierter Kopfgruppe)	Martin <i>et al.</i> , 2000
Faktor Xa	Prothrombin (oder synthetische Inhibitoren)	Phe-174, Tyr-99, Trp-215	Hypothese: Prothrombin oder synthetische Inhibitoren werden durch Aromaten erkannt und gebunden	Lin und Johnson, 1995
PDC-109-Phosphorylcholin Komplex	Phosphorylcholin (Interaktion mit Cholin-Kopfgruppe)	Trp-47/Trp-106	Involviert in „Sperm-coating“	Wah <i>et al.</i> , 2002
Humanes Phosphatidylcholin Transfer Protein	Phosphatidylcholin (Interaktion mit Cholin-Kopfgruppe)	Trp-101, Tyr-114, Tyr-155	Transfer von den unlöslichen phospholipiden zu Membranen	Roderick <i>et al.</i> , 2002
Trimethylamin Dehydrogenase (<i>Methylophilus methylotrophus</i> W3A1)	Trimethylamin	Trp-264, Trp-355, Tyr-60, Tyr-169, Tyr-174,	Bindung des Trimethylamins (Enzym: Oxidative N-Demethylierung)	Bellamy <i>et al.</i> , 1989
McPC603	Phosphocholine (Interaktion mit Cholin-Kopfgruppe)	Trp-107, Trp-100	Antikörper	Glockshuber <i>et al.</i> , 1991
HP1 Chromodomäne (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Histon H –Extension mit methyliertem Lys-9	Tyr-24, Trp-45 ,Tyr-48	Bindung der Methylgruppe des Lys-9 durch Heterochromatin-assoziiertes Protein 1 (HP1) löst Epigenetisches Silencing aus	Jacobs und Khorasanizadeh 2002
Serum Paraoxonase	organischen Phosphate und Arylester	Trp-280	HDL assoziiertes Enzym, das organische Phosphate hydrolysieren kann, genaue Funktion ist unbekannt	Josse <i>et al.</i> , 1999
3-Methyladenin DNA-Glycosylase (<i>E. coli</i>)	Alkylierte Basen in defekter DNA	Phe18, Trp-218, Tyr-22, Tyr-272, Tyr-273	Erkennt beschädigte DNA und initiiert die Excision durch Hydrolyse der glycosidischen Bindung	Matsuo <i>et al.</i> , 1997
Translationsinitiationsfaktor eIF4E	N7-methyliertes Guanosin der eukaryotischen mRNA	Trp-56, Trp-102	Erkennung und Bindung der 5'Cap Struktur, überbringt diese an eIF4F (Translationsinitiation-Faktor)	Quioco, 2000
Pf3 Virus - Kapsiduntereinheit	Intra-Untereinheiten-Interaktion von Arg-37 mit Trp-38	Trp-38	Stabilisierung der Untereinheit, die während des Virion Zusammenbaus das Einzelstrang DNA-Genom bindet	Tsuboi <i>et al.</i> , 2003; Zacharias und Dougherty, 2002
M2 Protonenkanal Influenza A	His-37, wenn in Medium saurer pH herrscht wird His-37 protoniert und interagiert mit Trp-41, der Kanal öffnet sich	Trp-41	Öffnen des Kanals bei saurem pH	Okada <i>et al.</i> , 2001
NikA	Ni ⁺	Trp-100, Trp-398	Bindung von Ni ⁺ durch das Substratbindeprotein und Import durch den Nik Transporter	Heddle <i>et al.</i> , 2003

2. Die hochaffine Bindung des quartären Amins von Glycin Betain durch Kation-pi-Interaktionen ist vermutlich weit verbreitet in den Prokaryoten

Glycin Betain ist ein kompatibles Solut das weit verbreitet Anwendung zum Schutz gegen osmotischen Stress, aber auch Hitze- und Kältestress findet. Mittlerweile ist bekannt, das dieses Solut nicht nur in den verschiedenen Stämmen von *Bacteria* und *Archaea* verwendet wird, sondern auch in Pflanzen und Säugetieren (Bremer und Krämer, 2000). Da die

Synthese von Glycin Betain energetisch aufwändiger ist als der Import von exogenem Glycin Betain und die Enzyme der Glycin Betain Synthese bisher in nur wenigen Mikroorganismen identifiziert wurden, stellt sich die Frage der Verbreitung von diesem Prinzip der hochaffinen Glycin Betain Bindung durch Substratbindeproteine von Transportern. In den *Bacteria* und auch *Archaea* sind eine Vielzahl von Glycin Betain Importer identifiziert und charakterisiert worden, einige davon gehören in die Familie der Bindeproteinabhängigen ABC-Transporter. Dazu gehört auch das Substratbindeprotein des hochaffinen Glycin Betain Transporters OpuA aus *B. subtilis*. Die Kristallstruktur des OpuAC-Substratbindeproteins aus *Bacillus subtilis* stellt eine dritte Struktur mit hoher Auflösung eines hochaffinen Substratbindeproteins für Glycin Betain (Horn *et al.*, im Druck). In diesem Substratbindeprotein wird das quartäre Amin des Substrates ebenfalls über drei Tryptophane gebunden (Trp-72, Trp-178 und Trp-225; siehe Einleitung Abb.10B), die sich von der Tryptophanbox des *EcProX* Proteins nur geringfügig durch seine Prisma-Form unterscheiden. Die Fixierung der Carboxylgruppe erfolgt in diesem Protein ebenfalls durch Wasserstoffbrückenbindungen zu den drei Aminosäuren Gly-26, Ile-27 und His-230 (Horn *et al.*, im Druck). Datenbankanalysen mit den Aminosäuresequenzen der drei kristallisierten Glycin Betain Bindeproteine deuten eine weite Verbreitung des beschriebenen Bindungsprinzipes, der Bindung der quartären Amingruppe durch Kation- π -Interaktionen, an.

2.1 Die Verbreitung von *EcProX*-ähnlichen Proteinen mit einer putativen „Trp-box“ beschränkt sich hauptsächlich auf den Stamm der Proteobakterien

Eine Datenbankanalyse mit der Aminosäuresequenz des *EcProX* Proteins führte zu einer Reihe von Protein-Sequenzen mit relativ hoher Sequenzidentität zu der des *EcProX* Proteins, die ebenfalls einen ProWV-ähnlichen Translokationskomplex besitzen. Die Strukturgene sind in allen Fällen in einem Genlocus codiert. In einem direkten Aminosäuresequenzvergleich der *EcProX*-ähnlichen Proteine konnte gezeigt werden, dass es konservierte Bindemotive gibt, in denen die Tryptophane der „Trp-Box“ sowie einige strukturell wichtigen Aminosäuren aus dem *Ec ProX*-Protein liegen. Dies ist also ein Hinweis darauf, das dieses Bindungsprinzip „Trp-box“ auch in anderen Mikroorganismen zur hochaffinen Bindung von Glycin Betain verwendet wird.

In dem Aminosäuresequenzvergleich wurden die Sequenzen von drei Proteinen gefunden, deren Funktionen bereits charakterisiert sind. Das Substratbindeprotein ProX aus

Salmonella enterica serovar typhimurium ist ein bekanntes Sequenz-Homolog (83%) zu dem *EcProX* Protein und zeigt ebenfalls hohe Affinität zu Glycin Betain und Prolin Betain (Stirling *et al.*, 1989). Das periplasmatische Substratbindeprotein OusBX aus *Erwinia chrysanthemi* gehört zu dem ProU-verwandten osmotisch regulierten ABC-Transporter OusB und zeigt eine deutliche Sequenzkonservierung (75%) zu dem *EcProX* Protein. OusB transportiert Glycin Betain und Cholin mit hoher Affinität in die Zelle ($K_M = 1,6 \mu\text{M}$ für Glycin Betain und $K_M = 2 \mu\text{M}$ für Cholin) und zeigt deutlich geringere Affinität zu weiteren Substraten (Choquet *et al.*, 2005). Die Bindemotive des *EcProX* Proteins sind in diesen beiden Proteinen ebenfalls hochkonserviert (WxPxH, CxPGWGC, und WxP). Deutlich geringere Sequenzidentität zeigt das Protein HisX aus *Sinorhizobium meliloti*, welches als Substratbindeprotein des ProU-ähnlichen Transporters HisVWX fungiert. Der HisVWX Transporter ist ein Histidin-induzierter Transporter, der neben seinem Hauptsubstrat Histidin noch mit hoher Affinität Prolin Betain und Prolin sowie mit niedriger Affinität Glycin Betain transportiert (Boncompagni *et al.*, 2000). HisVWX ist nicht osmotisch reguliert. Die Sequenzidentität der einzelnen Komponenten des HisVWX-Transporters sind höher zu denen des *E. coli* ProU-Transporters als zu dem Histidin-Transporter HisJQMP in *E. coli* (Boncompagni *et al.*, 2000). Diese *EcProX*-ähnlichen Proteine, die nachweislich auch als Glycin Betain (Prolin Betain) Bindeproteine identifiziert worden sind, unterstützen die Vermutung, dass es sich bei den anderen uncharakterisierten Proteinen mit einer hohen Sequenzidentität zu *EcProX* und den konservierten Bindemotiven ebenfalls um Glycin Betain Bindeproteine handeln könnte.

Aus dem Aminosäuresequenzvergleich wird deutlich sichtbar, dass die *EcProX*-verwandten Proteine fast ausschließlich aus Gram-negativen Mikroorganismen stammen, und hauptsächlich in die Klasse der Gammaproteobakterien gehören. Die anderen Klassen der *Proteobacteria* sind ebenfalls vertreten, außer den Epsilonproteobakterien. Die Verbreitung dieser Art Substratbindeprotein beschränkt sich im Ganzen also auf die *Proteobacteria*, die Ausnahmen bilden die Sequenzen der beiden Cyanobakterien *Trichodesmium erythraeum* und *Crocospaera watsonii* mit einer Sequenzidentität von jeweils 42% zu *EcProX*. Zwei dieser Proteinsequenzen haben eine strukturelle Veränderung vollzogen, in *T. erythraeum* und *P. psychrohalolentis* sind die Bindeproteine an den Translokationskomplex fusioniert, wobei diese Veränderung auf genetischer Ebene erfolgte.

2.2 Verbreitung von AfProX-ähnlichen Proteinen und Konservierung des Tyr-Gürtels

Die Datenbankanalyse mit der Aminosäuresequenz des AfProX Proteins führte zu einer Reihe von Proteinen, die eine moderate Konservierung der gesamten Aminosäuresequenz zeigten, aber eine hohe Konservierung der bindungsrelevanten Aminosäuren Tyr-63, Tyr-111, Tyr-190, Tyr-214, Lys-13, Thr-66 und Arg-149. Die höchste Sequenzkonservierung zeigten die *Archaea Methanosarcina mazei* (55%) und *Methanococcoides burtonii* (57%). Betrachtet man die Aminosäuresequenzen von AfProX ähnlichen Proteinen mit Sequenzidentitäten von mindestens 33%, so zeigt sich eine weite Verbreitung innerhalb der Domäne der *Bacteria*, wobei die größte Anzahl (28 AfProX ähnliche Proteine) in den Gram-positiven Bakterien (*Firmicutes*) und in den Proteobakterien (19 AfProX ähnliche Proteine) gefunden wurden. Die übrigen Mikroorganismen mit AfProX-ähnlichen Proteine gehören den *Fusobacteria* (33% Sequenzidentität), *Cyanobacteria* (36% Identität) und den *Actinobacteria* (37% Identität und 33% Identität) an.

Einige der AfProX ähnlichen Proteine treten als putative periplasmatische Proteine auf (z.B. *Polaromonas sp.*, 37% Identität), ein Großteil der Proteine sind jedoch putative Lipoproteine (z.B. *Moorella thermoacetica*, 44% Identität; *M. mazei*, 55% Identität) oder Fusionsproteine, die N-terminal an der putativen Permease anfusioniert sind (z.B. *Erythrobacter litoralis*, 40% Identität). Eine Ausnahme bildet das Fusionsprotein aus dem Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus* (36% Identität), in dem die Ausdehnung mit den konservierten Tyr-Resten C-terminal an die Permease anfusioniert ist. Diese Fusionsproteine sind vermutlich durch Genfusion entstanden und könnten eine weitere evolutionäre Entwicklungsstufe bedeuten. Das Vorläuferprotein diesen Types Substratbindeprotein war vermutlich, wie in den *Archaea* noch vorhanden, ein Lipoprotein. Die einzigen charakterisierten Transporter, deren Substratbindeproteine eine Sequenzähnlichkeit zu AfProX aufweisen, sind die Substratbindeproteine OpuCC (31% Identität) und OpuBC (29% Identität) aus *B. subtilis* zu nennen. OpuB ist als Cholin-Transporter charakterisiert worden, OpuC zeigt eine weite Substratpalette von 12 verschiedenen kompatiblen Soluten, darunter auch Glycin Betain, Prolin Betain, Ectoin, Carnitin, DMSA, DMSP und Cholin (Kappes *et al.*, 1999). Jedes dieser Substrate ist zwitterionisch (Abb.1, Einleitung).

2.3 Datenbankanalysen mit der *BsOpuAC* Aminosäuresequenz zeigen eine weite Verbreitung von OpuAC-ähnlichen Proteinen in Prokaryoten und einen Domänentausch des *BsOpuAC* Proteins

Eine Datenbanksuche basierend auf der Aminosäuresequenz des *BsOpuAC* Proteins ergab eine große Anzahl an Proteinen mit signifikanter Sequenzidentität, die sich in zwei verschiedene Gruppen aufteilen. Gruppe 1 beinhaltet die OpuAC-ähnlichen Proteine, deren Sequenz direkt mit OpuAC vergleichbar sind. Die Mikroorganismen, die diese OpuAC-ähnlichen Proteine besitzen gehören alle zu den *Firmicutes* und sind mit einer Ausnahme in die Ordnung der *Bacillales* gruppiert. Die Aminosäuresequenzen der Proteine in Gruppe 2 beinhalten im Vergleich zu OpuAC einen Domänentausch („domain swap“). Die Beobachtung einer Invertierung der Substratbindedomänen wurde erstmals durch Obis *et al.* (1999) in einem Sequenzvergleich von OpuAC mit der Substratbindedomäne des OpuAC-Transporters aus *La. lactis* gemacht. Die Anzahl der OpuAC-ähnlichen Proteine mit einem Domänentausch ist deutlich größer als die Anzahl der Sequenzen mit einer Strukturierung des OpuAC-Proteins. Das Vorkommen der Art von Gruppe 2 OpuAC-ähnlichen Proteinen ist weit gestreut; von den *Archaea* über verschiedenste Stämme in den *Bacteria*. In Gruppe 2 der OpuAC-ähnlichen Proteine befindet sich das OtaC Protein von *Methanosarcina mazei* (48% zu OpuAC), in Gruppe 1 das Glycin Betain Bindeprotein GbuC aus *Listeria monocytogenes* (51% zu OpuAC); beides sind bekannte und charakterisierte Glycin Betain Bindeproteine und wie bereits erwähnt ist in Gruppe 2 auch OpuA aus *La. lactis* zu finden (Roessler *et al.*, 2002; Mendum und Smith, 2002; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002; Ko und Smith, 1999; van der Heide und Poolman, 2000; Bouvier *et al.*, 2000; Biemans-Oldehinkel und Poolman, 2003).

Anhand der unterschiedlichen Verbreitung und Häufigkeit der unterschiedlichen Sequenzen kann man vermuten, dass das *BsOpuAC* Protein im Laufe der Evolution einen Domänentausch durchgeführt hat, also die Gruppe1-OpuAC Proteine aus der Gruppe 2 hervor gegangen sind (Abb.53). Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, das auch in fünf verschiedenen *Archaea* Spezies Proteine mit einer OpuAC-ähnlichen Sequenz der Gruppe 2 gefunden wurden, darunter OtaC. Da die *Archaea* in der Evolution vermutlich vor den *Bacteria* entstanden sind, muss ein OpuAC-ähnliches Protein bereits dort existiert haben. Nimmt man das OtaC Protein des Archaeons *M. mazei* als Ausgangspunkt für einen Sequenzvergleich, so zeigt sich deutlich, das die Möglichkeit besteht, das sowohl die OpuAC Gruppe 1 Proteine (OpuAC *B. subtilis* mit 55% Sequenzidentität zu OtaC, GbuC *L.*

monocytogenes mit 49 % Sequenzidentität zu OtaC) und auch die Gruppe 2 Proteine (OpuAC von *La. lactis* 41 % Sequenzidentität zu OtaC) aus dieser Linie entstanden sein könnten (Abb53). Im Laufe der Evolution hat sich dieses Vorläuferprotein vermutlich weiter entwickelt zu den Bindeproteinen aus *La. lactis* OpuAC, welches mit seiner Permease fusioniert ist, einer Abspaltung der Gruppe 1 der OpuAC-ähnlichen Bindeproteine mit „domain-swap“ in den *Firmicutes* bis hin zu dem Substratbindeprotein-Typ *EcProX*, welches sich hauptsächlich auf die *Proteobacteria* beschränkt (Abb.53). *BsOpuAC* und *EcProX* haben nur noch eine geringe Sequenzidentität von 23%, das Bindemotiv W188-x-P190 aus dem *EcProX* liegt im Alignment aber zusammen mit W225-x-P227 aus *BsOpuAC* und W65-x-P67 aus *EcProX* mit W72-x-P74 aus *BsOpuAC*. Die Permeasen der beiden Substratbindeproteine, ProW und OpuAB, besitzen eine Sequenzidentität von 47% zueinander.

Zu OtaC zeigt das *EcProX* Protein nur noch eine geringe Sequenzidentität (23%), wobei W-65 aus dem *EcProX* Protein mit „W225“ von OtaC und W-188 von *EcProX* und „W72“ von OtaC im direkten Aminosäuresequenzvergleich zusammen liegen. In den Proteobakterien gibt es ProX-ähnliche Proteine und OpuAC-ähnliche Proteine Gruppe 2 mit jeweils signifikanten Sequenzidentitäten. Die OpuAC-ähnlichen Sequenzen zeigen zum Teil keine bis geringe Sequenzidentität zu *EcProX*-ähnlichen Proteinen und umgekehrt. In diesen Fällen könnte eine weitere Aufspaltung der Entwicklung von Glycin Betain bindenden Substratbindeproteinen vorliegen.

Ein Sequenzvergleich der Permeasen der charakterisierten Glycin Betain Transporter zeigt dagegen bei allen Transportern eine deutliche Konservierung. Nimmt man abermals den Ota-Transporter (OtaB-Permease) als Ausgangspunkt für den Vergleich mit den anderen Permeasen, so zeigt sich eine Sequenzidentität von 47% zu *BsOpuAB*, 51% für *LmoGbuB*, 49% für *LlaOpuAC*, 44% für *EcProW* und *SeProW*, sowie 46% für *OusBW* aus *E. chrysanthemi*. Eine Datenbankanalyse mit den OtaC und OtaB-Sequenzen ergab keine Übereinstimmung mit Proteinen aus *A. fulgidus*, sie haben also entweder keinen gemeinsamen Ursprung, oder dieser liegt weit zurück in der evolutionären Entwicklung. Die *AfProX*-ähnlichen Proteine, wovon lediglich OpuCC und OpuBC beschrieben sind, haben sich also vermutlich getrennt von den OtaC-ähnlichen Proteinen (OpuAC-ähnliche Proteine) entwickelt, *AfProX* Proteine gibt es in einer ebenso weiten Verbreitung wie OpuAC-ähnliche Proteine und in vielen Mikroorganismen sind beide Formen zu finden.

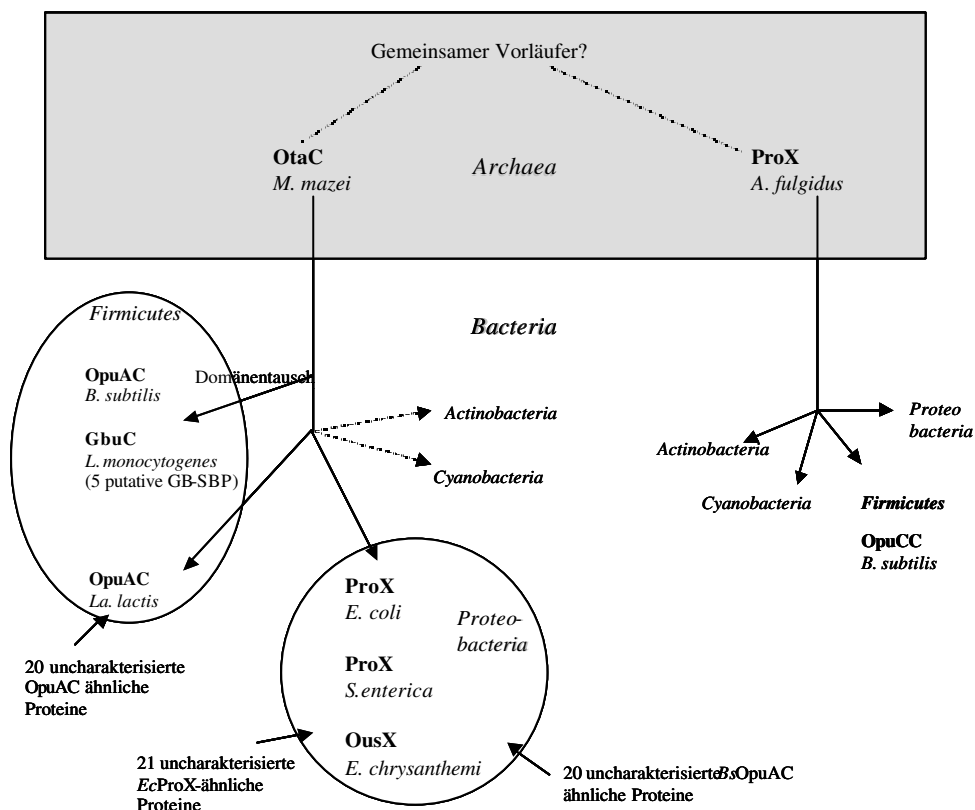


Abb. 53: Hypothese zur Entstehung und Verbreitung der bekannten Glycin Betain bindenden Substratbindeproteine. Die Einordnung der Proteinsequenzen beruht zum Einen auf den strukturellen Daten der *BsOpuAC*-, *EcProX*- und *AjProX* Proteine und der Aminosäuresequenzvergleiche und Alignments, die am NCBI und mit Vector NTI durchgeführt wurden. Die Pfeile in der Abbildung repräsentieren keine phylogenetischen Abstände sondern weisen die Proteine nur den unterschiedlichen Stämmen zu.

Die Verbreitung der bindungsrelevanten aromatischen Aminosäuren in den verschiedenen Glycin Betain bindenden Substratbindeproteinen legt nahe, dass eine Hauptdeterminante zur hochaffinen Substratbindung des kompatiblen Solutes Glycin Betain Kation- π -Interaktionen sind. Dabei ist die Art der aromatischen Aminosäure unwichtig, die π -Elektronensysteme des Benzol (Phe), Phenol (Tyr) und Indorlringes (Tpr) sind alle in der Lage, die Interaktion mit dem quartären Amin des Glycin Betains durchzuführen, dies kann man aus der *EcProX* Mutagenesestudie schließen. In allen bisher bekannten Fällen wird die Carboxylgruppe durch Wasserstoffbrücken, oder auch durch Salzbrücken stabilisiert. Diese zusätzliche Stabilisierung ist ein wichtiger Beitrag für die hochaffine Bindung, die beteiligten Aminosäuren können aber variieren.

3. Das Substratbindeprotein EhuB des ABC-Transporters Ehu aus *S.meliloti*

Die hochaffine Substratbindung der kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain ist durch die ProX-Strukturen aus *E. coli* und *A. fulgidus*, sowie die OpuAC-Struktur aus *B. subtilis* gut beschrieben. In den vorherigen Kapiteln dieser Arbeit wurde demonstriert, dass in allen Strukturen Kation-pi-Interaktionen eine wichtige Bindungskraft für die Bindung der Trimethylammoniumgruppe des Glycin Betains und der Dimethylammoniumgruppe des Prolin Betains sind.

Eine weitere Gruppe von wichtigen kompatiblen Soluten stellen die Ectoine (Tetrahydropyrimidine) dar. Ectoin und auch Hydroxyectoin finden eine weit verbreitete Anwendung gegen osmotischen Stress, aber auch Kältestress (Lippert und Galinski, 1992; Kuhlmann, 2002). Der Import der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin aus der Umwelt ist bisher nur für Transporter der BCCT Familie eingehender beschrieben worden (EctM, *Marinococcus halophilus*, Vermeulen und Kunte, 2004; ButA aus *Tetragenococcus halophila*, Baliarda et al, 2003; EctT aus *V. panthotenticus*, Kuhlmann, 2002; EctP aus *C. glutamicum*, Peter et al, 1996) diese Importer besitzen keine Substratbindeproteine für ihre Liganden. In dem halophilen Mikroorganismus *Halomonas elongata* wurde der erste Bindeproteinabhängige Transporter für Ectoin, der TRAP-Transporter TeaABC, gefunden (Gramman et al., 2002; Tetsch und Kunte, 2002). Bisher gibt es aber noch keine strukturellen Daten für die molekularen Determinanten zur Bindung von Ectoin und Hydroxyectoin. Ectoine besitzen in ihrer Pyrimidin-Ringstruktur eine delokalisierte positive Ladung, siehe Abbildung 4; Einleitung (Suenobu et al., 1998). Die Charakterisierung des putativen Ectoin-Transporters Ehu aus *S. meliloti* und eine Untersuchung dessen Substratbindeproteins EhuB auf molekularer Ebene sollte klären, ob die Bindung dieser kompatiblen Solute trotz ihrer strukturellen Unterschiede den gleichen Prinzipien folgt wie in der Bindung von Glycin Betain und Prolin Betain.

3.1 EhuB ist ein hochaffines Substratbindeprotein für Ectoin und bindet auch Hydroxyectoin

EhuB wurde heterolog in *E. coli* überproduziert und über Affinitätschromatographie zu apparenter Homogenität gereinigt (Abb.34). Bindestudien mit ¹⁴C-markiertem Ectoin zeigten, dass es eine Affinität von 0,5 µM zu seinem Liganden Ectoin besitzt und damit eine

vergleichbare hohe Affinität besitzt wie die Glycin Betain bindenden Substratbindeproteine der ABC-Transporter *EcProU* und *BsOpuA*. Da Substratbindeproteine die Transportrate eines ABC-Transporters deutlich erhöhen und prägen (Higgins *et al*, 1992, Tam und Saier, 1993) ermöglicht das hochaffine Substratbindeprotein EhuB dem Ehu-Transporter ebenfalls eine hohe Transportrate mit einer $K_M = 48 \mu\text{M}$ und $V_{\text{max}} = 182 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg EhuB}^{-1}$ (Jebbar *et al*, 2005). In Konkurrenztests mit ^{14}C -markiertem Ectoin und unmarkiertem Hydroxyectoin wurde die Fähigkeit zur Bindung von Hydroxyectoin nachgewiesen. Mit EhuB wurde also das erste Ectoin- und Hydroxyectoin-bindende Substratbindeprotein eines ABC-Transporters gereinigt und charakterisiert.

3.2 Die Kristallstruktur des EhuB Proteins aus *S. meliloti*

Mit dem zu apparativer Homogenität gereinigten EhuB Protein wurden in einer Kooperation mit dem Labor von L.Schmitt von N. Hanekop Kristallisationsansätzen nach der „hanging drop“-Methode mit Ectoin und mit Hydroxyectoin durchgeführt. Es wuchsen Kristalle, deren Vermessung im Synchrotron (Hamburg) eine Auflösung von $2,1 \text{ \AA}$ erlaubten und zu der ersten Kristallstruktur eines Ectoin und Hydroxyectoin bindenden Substratbindeproteins führten. Die Kristallstruktur des EhuB Proteins weist die drei typischen Eigenschaften von periplasmatischen Substratbindeproteinen (Fukami-Kobayashi *et al.*, 1999; Quioco und Ledvina, 1996) auf: (I) die Unterteilung des Proteins in zwei globuläre Domänen, (II) eine Ligandenbindestelle, die in einem tiefen Spalt zwischen den beiden Domänen liegt und (III) eine flexible „hinge“ Region die eine große Konformationsänderung unter der Substratbindung erlaubt. Die Gesamtstruktur des EhuB Proteins zeigt also deutliche Ähnlichkeit zu den Glycin Betain Bindeproteinen *EcProX*, *AjProX* und *BsOpuAC*. Ein Unterschied zu den anderen Substratbindeproteinen ist die auffällig negative Oberflächenladung von EhuB, der eine Analyse des Oberflächenpotentials zeigte (Abb.39 L. Schmitt, persönliche Mitteilung). Die Funktion des negativen Oberflächenpotentials ist unbekannt. Eine Ausschnittsvergrößerung der Substratbindetasche des EhuB Proteins zeigt eine aromatische Box, in der die delokalisierte positive Ladung des Pyrimidinringes von Ectoin und auch Hydroxyectoin koordiniert wird (Abb.38A, B). Die Architektur der bindungsrelevanten Aminosäuren erinnert an die Konstellation in *EcProX* und *BsOpuAC*. Ein interessanter Unterschied zwischen *SmEhuB* und den beiden Glycin Betain Bindeproteinen ist die Verteilung der bindungsrelevanten Aminosäuren. In den beiden Glycin Betain Bindeproteinen sind die bindungsrelevanten Aminosäuren auf die beiden

Domänen verteilt, in EhuB dagegen sind mit Ausnahme der Aminosäuren Thr-147 und Glu-148 alle in der gleichen Domäne lokalisiert (L. Schmitt, persönliche Mitteilung). Die aromatische Box besteht in EhuB aus den beiden Phenylalaninen Phe-38, Phe-94 und dem Tyrosin Tyr-74. In diesen Fall ist also keine aromatische Bindetasche vorzufinden, die nur aus einer Art von aromatischen Aminosäuren konstruiert ist, wie bei den bekannten Glycin Betain Bindeproteinen. Die EhuB Bindetasche ist die erste Substratbindetasche, in der ein kompatibles Solut hauptsächlich durch Phenylalanine gebunden wird. Somit sind in den charakterisierten Substratbindeproteinen für kompatible Solute nun Bindetaschen mit allen drei aromatischen Aminosäuren als Bindungspartner beschrieben. Diese Beobachtung untermauert die Ergebnisse der Mutagenesestudie des *EcProX* Proteins, dass alle aromatischen Aminosäuren in der Lage sind, eine hochaffine Bindung eines Moleküls mit delokalisierte positiver Ladung zu gewährleisten.

In fluoreszenzspektroskopischen Affinitätsmessungen wurde die Bindeaffinität des EhuB Wildtyp Proteins für Ectoin mit 1,6 μM und für Hydroxyectoin mit 0,45 μM bestimmt. In der Bindung der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin sind Kation- π -Interaktionen ebenfalls eine wichtige Determinante, welches auch durch eine Mutagenesestudie experimentell belegt wurde (Höing, 2005). Die Mutagenesestudie in der aromatischen Box des EhuB Proteins zeigte ebenfalls eine unterschiedliche Relevanz der Aromaten in der Substratbindung, was zuvor auch in den Mutagenesestudien der Glycin Betain-Bindeproteine beobachtet werden konnte. Phe-94 spielt dabei ähnlich dem Trp-188 des *EcProX* eine zentrale Rolle in der Bindung, wobei ein Austausch gegen negativ geladene Aminosäuren die Bindekonstanten der mutierten EhuB Proteine für Ectoin und Hydroxyectoin nur verringert und nicht wie in *EcProX* die Bindung des Substrates verhindert. Die beiden Aromaten Phe-38 und Tyr-74 spielen in der Substratbindung eine dem Phe-94 untergeordnete Rolle. Einen Austausch von Phe-38 gegen Alanin oder von Tyr-74 gegen Alanin führt in beiden Fällen, sowohl bei Ectoin als auch bei Hydroxyectoin, zu keiner drastischen Veränderung der Bindeaffinität. Ein Austausch gegen Aspartat oder Glutamat führt nur bei Tyr-74 zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit für Ectoin und Hydroxyectoin, im Falle von Phe-38 zeigen beide Substrate dem Wildtyp EhuB Protein ähnliche Bindeaffinitäten. Phe-38 korreliert also in seiner Funktion in gewissen Maße mit Trp-140 aus *EcProX* und Tyr-74 mit Trp-65 aus *EcProX*. Es ist jedoch zu beachten, dass die kinetischen Parameter der Proteine mit sehr unterschiedlichen Methoden bestimmt wurden. Die Stabilisierung des Pyrimidinringes von Ectoin und Hydroxyectoin durch zwei Wasserstoffbrücken-Bindungen zu Glu-35 scheint bei der Bindung von Ectoin und

Hydroxyectoin von Bedeutung zu sein, ein Austausch gegen Alanin führt in beiden Fällen zu einer deutlichen Abnahme der Bindeaffinität (im Bereich von 50 μM). Die Ausbildung der Salzbrücken zu der Carboxylgruppe beider Substrate durch Arg-99 ist essentiell, ein Austausch von Arg-99 in EhuB gegen Alanin führt zum kompletten Verlust der Bindeaffinität zu beiden Substraten. Die Hydroxylgruppe des Hydroxyectoins wird zusätzlich stabilisiert durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit Glu-148, deren Verlust in einer EhuB Glu-148/Ala Mutante führt zu einem Verlust der Bindeaffinität zu Hydroxyectoin, während die Bindekonstante zu Ectoin vergleichbar ist zu der des Wildtyp EhuB Proteins (Höing, 2005). Die Mutagenesestudie des EhuB Proteins deutlich die Beteiligung von Kation- π -Interaktionen bei der Bindung der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin, jedoch ist die Stabilisierung der Ringstrukturen der Solute durch Arg-99 ebenso essentiell wie die Interaktion zwischen Phe-94 und der positiven Ladung. Dies ist in den bisherigen Mutagenesestudien von *EcProX* und *AfProX* für Glycin Betain und Prolin Betain nicht beobachtet worden. Möglicherweise besitzt die Prolinring-stabilisierende Aminosäure Leu-68 in *EcProX* (Abb.50) in der Bindung von Prolin Betain eine ähnlich wichtige Rolle, dort entsteht der Kontakt zwischen den beiden Interaktionspartnern durch van der Waals Kräfte (Schiefner *et al.*, 2004a). Die Stabilisierung der Carboxylgruppe erwies sich wie zuvor in *AfProX* gezeigt auch in EhuB als essentiell wichtig. Sowohl in EhuB als auch in *AfProX* sind die Bindungsaffinitäten zu ihren Substraten stark beeinträchtigt, wenn mehr als eine Bindung verloren geht (*AfProX*: K13/A, Verlust von 2 Salzbrücken führt zu einer Bindekonstante größer 100 μM , EhuB: R-99/A, Verlust von 2 Salzbrücken führt zur Bindungsunfähigkeit von beiden Substraten).

4. Gemeinsamkeiten in der hochaffinen Bindung der zwitterionischen kompatiblen Solute Glycin Betain, Prolin Betain, Ectoin und Hydroxyectoin durch ihre Substratbindeproteine

Die hochaffine Bindung der zwitterionischen kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain, sowie Ectoin und Hydroxyectoin wird durch 2 „Interaktionsschwerpunkte“ bewirkt:

1. Kation- π -Interaktionen und van der Waals Interaktionen binden die delokalisierte positive Ladung in den Soluten. Liegt diese delokalisierte positive Ladung in einer Ringstruktur, ist häufig eine zusätzliche Stabilisierung zu beobachten.

2. Die Carboxylgruppen der Substrate werden entweder nur durch Wasserstoffbrückenbindungen (*EcProX*, *BsOpuAC*) oder durch Salzbrücken und Wasserstoffbrücken (*AfProX*, *SmEhuB*) stabilisiert.

Beide Interaktionsschwerpunkte sind essentiell für die hochaffine Bindung der Substrate. Die Verbreitung der Kation-pi-Interaktionen in Proteinen, die Moleküle mit quartären Aminen oder delokalisierte positive Ladungen (Glycin Betain und Ectoin oder auch Cholin-Derivate, siehe Tab.20) binden zeigen, dass diese Art der Bindung weite Verbreitung in Prokaryoten (Bindeproteine für Glycin Betain, Ectoin; Phosphatidylcholin, Kationen) und Eukaryoten (Acetylcholinesterase, Neurorezeptoren) findet.

5. Physiologische Charakterisierung des Ehu-Transporters aus *S. meliloti*

Sinorhizobium meliloti ist ein im Boden lebendes stickstofffixierendes Rhizobium, das in Wurzelnodulen von Alfalfa in Symbiose leben kann (Talibart *et al.*, 1994). Wie fast alle stickstofffixierenden Rhizobien ist *S. meliloti* sehr sensitiv gegen hyperosmotischen Stress. Die Osmoadaptation in *S. meliloti* ist intensiv untersucht worden und ergab, dass die endogene Synthese von Glutamat, Trehalose und die des Dipeptides NAGGN eine wichtige Rolle spielen. *S. meliloti* kann über den spezifischen Transporter BetS auch Glycin Betain und Prolin Betain akkumulieren, dieser spielt eine wichtige Rolle bei der frühen Adaptation an osmotischen Stress (Boscari *et al.*, 2002). Bei Absinken des osmotischen Stresses kann *S. meliloti* das akkumulierte Glycin Betain und Prolin Betain über metabolische Enzyme abbauen (Talibart *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1988). *S. meliloti* ist auch in der Lage, Ectoin zu importieren, welches ebenfalls einen osmoprotektiven Effekt zeigt. Allerdings ist bekannt, dass Ectoin in *S. meliloti* unter osmotischem Stress nicht akkumuliert, sondern nach der Aufnahme sofort abgebaut wird. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Ectoin als „sekundäres Osmolyt“ die endogene Synthese von Glutamat fördert (Talibart *et al.*, 1994). Die Entdeckung des Haupttransporters für Ectoin und Hydroxyectoin (Ehu), dessen Substratbindeprotein in dieser Arbeit charakterisiert wurde, und der putativen Abbauenzyme für Ectoin und Hydroxyectoin (EutABCDE), (Jebbar *et al.*, 2005) erlauben eine Reihe von physiologischen Untersuchungen mit einem EhuB-spezifischen Antikörper, der ebenfalls der vorliegenden Arbeit hergestellt wurde.

5.1 *S. meliloti* Mutanten mit polaren Mutationen in *ehuA* und *eutA* zeigen einen Wachstumsdefekt mit Ectoin oder Hydroxyectoin als C-Quelle

Wie in der Literatur bereits beschrieben wurde, kann *S. meliloti* Ectoin als Kohlenstoff- und auch als Stickstoffquelle nutzen. In einem Wachstumsversuch in Minimalmedium mit Ectoin oder Hydroxyectoin als Kohlenstoffquelle, wurde der Wildtyp Stamm mit den Mutantenstämmen R3-76 (Insertion in *ehuA*) und R3-76 (Insertion in *eutA*) im Vergleich unter gleichen Bedingungen kultiviert. Die Insertion in den *ehuA* und *eutA* Genen in den beiden Mutanten-Stämmen von *S. meliloti* verhindert ein Wachstum auf Ectoin oder Hydroxyectoin. In einem Transporttest mit ^{14}C -markiertem Ectoin wurde in der EhuA-Mutante allerdings ein minimaler Transport von Ectoin ($K_M = 200 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 10 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$) detektiert (Jebbar *et al*, 2005). EhuABCD ist also der Haupttransporter für Ectoin und Hydroxyectoin, ein weiterer Transporter mit niedriger Affinität und Transportrate wird postuliert.

5.2 Die Synthese von EhuB ist nicht osmoreguliert

In der Literatur wird Ectoin in *S. meliloti* als osmoprotektive Substanz beschrieben, auch wenn es in *S. meliloti* nicht wie für kompatible Solute sonst üblich, im Zytoplasma akkumuliert wird (Talibart *et al*, 1994). Daher stellte sich die Frage, ob die Synthese von Ehu auch durch hyperosmotischen Stress induziert werden kann.

In Wachstumsexperimenten wurde dem *S. meliloti* Wildtypstamm auf LAS-Medium unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen verschiedene kompatiblen Solute zugesetzt. Es wurde ein verbessertes Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen mit den Zusätzen von Ectoin und Hydroxyectoin sowie Glycin Betain beobachtet, verglichen mit einer Kultur ohne kompatible Solute. Eine Western blot Analyse dieser Kulturen zeigte jedoch, dass die Anschaltung der EhuB-Synthese unter beiden Wachstumsbedingungen nur in den Kulturen mit Ectoin und Hydroxyectoin zu beobachten war. Wäre die Induktion auch osmotisch reguliert, so würde man auch eine Induktion der Synthese in der Kultur mit hyperosmotischen Wachstumsbedingung ohne den Zusatz von Ectoin oder Hydroxyectoin erwarten. Diese Resultate weisen darauf hin, dass der osmoprotektive Effekt eine Nebenfunktion des Ectoins und Hydroxyectoins ist. Der primäre Nutzen der Ectoine scheint in *S. meliloti* die Verwendung als C- und N-Quelle zu sein. Der zweite niederaffine

Transporter für Ectoin scheint bei hyperosmotischen Bedingungen sogar reprimiert zu werden (Jebbar *et al.*, 2005).

5.3 Datenbankanalysen zur Verbreitung und Konservierung der Ehu- und Eut-Proteine

Die Datenbankanalysen mit den Proteinsequenzen der Ehu- und Eut-Proteine ergaben vier verschiedene Gruppen von Mikroorganismen, die entweder (I.) die Ehu- und Eut-ähnliche Proteine besaßen, (II.) nur Ehu-ähnliche Proteine, (III.) nur Eut-ähnliche Proteine oder (IV.) lediglich ein EhuB-ähnliches Protein. Sechs Mikroorganismen zeigten eine signifikante Konservierung der Ehu- und Eut-Proteine (I.), alle gehören zu den Proteobakterien (α , β , γ). Die Strukturgene der Ehu und Eut-Proteine haben dabei in den Mikroorganismen zum Teil erhebliche Umstrukturierungen erfahren (*P. putida*, *B. fungorum*, Abb.40 Ergebnisse). Für *P. putida* konnte in Wachstumsexperimenten gezeigt werden, dass es dem Medium zugesetztes Hydroxyectoin aufnehmen und als C-Quelle nutzen kann; *P. putida* besitzt also experimentell nachgewiesene Degradationsenzyme für Hydroxyectoin (Manzanera *et al.*, 2002). Es besteht also die Möglichkeit, dass in *P. putida* der EhuB-ähnliche Transporter mit den Eut-ähnlichen Proteinen die Fähigkeit zum katabolen Abbau von Hydroxyectoin ermöglichen.

Neun weitere Mikroorganismen (II.) besitzen einen vollständigen Ehu-ähnlichen Transporter ohne die Strukturgene für die Eut-Proteine im Genom (β -, γ -Proteobakterien, Actinobakterien, *Bacillus clausii*). In diesen Mikroorganismen ist bisher nichts über deren Fähigkeit zur Aufnahme von Ectoin oder Hydroxyectoin in der Literatur beschrieben.

Die Strukturgene für die Eut-Proteine sind in fünf Mikroorganismen konserviert (III.), in denen kein Ehu-ähnlicher Transporter zu finden ist. Einer dieser Mikroorganismen ist *S. pomeroyi*. In diesem Mikroorganismus sind direkt neben dem *eut*-ähnlichen Gencluster die Strukturgene für einen TRAP-Transporter entdeckt worden, dessen Proteinkomponenten weisen hohe Sequenzidentität zu dem Ectoin-Transporter TeaABC auf (J. Bursy und E. Bremer, persönliche Mitteilung). TeaABC ist ein hochaffiner Ectoin und Hydroxyectoin Transporter aus *H. elongata* (Tetsch und Kunte, 2002; Gramman *et al.*, 2002); es besteht also die Möglichkeit, dass *S. pomeroyi* nicht nur zur Aufnahme, sondern auch zum Abbau von Ectoin und Hydroxyectoin fähig ist. Dies wurde kürzlich experimentell nachgewiesen (J. Bursy und E. Bremer, persönliche Mitteilung)

In drei weiteren Mikroorganismen wurden EhuB-ähnliche Proteine entdeckt, deren Strukturgene im Genom der jeweiligen Mikroorganismen keine Strukturgene für einen Translokationskomplex besitzten (IV.).

Die Verbreitung der Ehu- und Eut-ähnlichen Proteine auf phylogenetischer Ebene zeigt, dass die Eut-Protein bisher nur in den Proteobakterien gefunden werden konnten. Die Strukturgene für Ehu-ähnliche Transporter konnten dagegen auch in vier Actinobakterien und einem Gram-positiven identifiziert werden, die Sequenzidentität des EhuB-ähnlichen Proteins aus dem Gram-positiven *B. clausii* ist mit nur 28% allerdings sehr niedrig. Die Fähigkeit zum Abbau von Ectoin hat sich also möglicherweise später entwickelt. Die insgesamt gefundene Zahl an vollständigen Ehu-ähnlichen Transportern ist verglichen zu der Verbreitung von Glycin Betain importierenden Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportern sehr gering. Daher ist zu vermuten, dass die Aufnahme von Ectoin und Hydroxyectoin aus der Umwelt vermutlich hauptsächlich durch Transporter der BCCT-Familie erfolgt; von diesen sind mittlerweile einige Exemplare charakterisiert (EctM, *Marinococcus halophilus*, Vermeulen und Kunte, 2004; ButA aus *Tetragenococcus halophila*, Baliarda *et al.*, 2003; EctT aus *V. panthotenticus*, Kuhlmann, 2002; EctP aus *C. glutamicum*, Peter *et al.*, 1996).

Die Resultate der Datenbankanalysen zeigen, dass die Verbreitung des Ectoinabbaues nur sehr begrenzt ist. Ob der Abbau der Ectoine in den beschriebenen Mikroorganismen auch unter hyperosmotischen Bedingungen stattfindet ist fraglich. Die Synthese der Degradationsenzyme für kompatible Solute unterliegen in den anderen bekannten Fällen (Glycin Betain-Abbau in *S. meliloti*) unter hyperosmotischen Bedingungen einer Repression (Talibart *et al.*, 1994). Mit dem Ehu-Transporter wurde erstmals ein hochaffiner Transport von einem effektiven Osmolyt beschrieben, das seine Funktion als solches aber nicht primär ausführt sondern als Katabolit verwendet wird. Die Bindung von Ectoin und Hydroxyectoin durch das hochspezifische Bindeprotein EhuB erfolgt nach den Parametern, die in dieser Arbeit für die Bindung zwitterionischer kompatibler Solute beschrieben wurden.

VI. Literatur

- Achenbach-Richter L., Stetter K.O., Woese C.R.** (1987). A possible biochemical missing link among archaeobacteria. *Nature*, **327**: 348-9.
- Agre P., Brown D., Nielsen S.** (1995). Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr Opin Cell Biol*, **7**: 472-83.
- Alia, Hayashi H., Sakamoto A., Murata N.** (1998). Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *Plant J*, **16**: 155-61.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**: 403-10.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**: 3389-402.
- Arakawa T., Timasheff S.N.** (1982). Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*, **21**: 6536-44.
- Arakawa T., Timasheff S.N.** (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J*, **47**: 411-4.
- Argast M., Boos W.** (1980). Co-regulation in *Escherichia coli* of a novel transport system for sn-glycerol-3-phosphate and outer membrane protein Ic (e, E) with alkaline phosphatase and phosphate-binding protein. *J Bacteriol*, **143**: 142-50.
- Baliarda A., Robert H., Jebbar M., Blanco C., Le Marrec C.** (2003). Isolation and characterization of ButA, a secondary glycine betaine transport system operating in *Tetragenococcus halophila*. *Curr Microbiol*, **47**: 347-51.
- Barron A., Jung J.U., Villarejo M.** (1987). Purification and characterization of a glycine betaine binding protein from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **262**: 11841-6.
- Beene D.L., Brandt G.S., Zhong W., Zacharias N.M., Lester H.A., Dougherty D.A.** (2002). Cation- π interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT_{3A}) and nicotinic acetylcholine receptors: the anomalous binding properties of nicotine. *Biochemistry*, **41**: 10262-9.
- Belitsky B.R., Brill J., Bremer E., Sonenshein A.L.** (2001). Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **183**: 4389-92.
- Bellamy H.D., Lim L.W., Mathews F.S., Dunham W.R.** (1989). Studies of crystalline trimethylamine dehydrogenase in three oxidation states and in the presence of substrate and inhibitor. *J Biol Chem*, **264**: 11887-92.
- Biemans-Oldehinkel E., Poolman B.** (2003). On the role of the two extracytoplasmic substrate-binding domains in the ABC transporter OpuA. *EMBO J*, **22**: 5983-93.

- Birnboim H.C., Doly J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**: 1513-23.
- Björkman A.J., Mowbray S.L.** (1998). Multiple open forms of ribose-binding protein trace the path of its conformational change. *J Mol Biol*, **279**: 651-64.
- Boch J., Kempf B., Bremer E.** (1994). Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol*, **176**: 5364-71.
- Boch J., Kempf B., Schmid R., Bremer E.** (1996). Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J Bacteriol*, **178**: 5121-9.
- Boch J., Nau-Wagner G., Kneip S., Bremer E.** (1997). Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch Microbiol*, **168**: 282-9.
- Bösser, L.** (2001). Das Substratbindeprotein (ProX) des ABC-Transporters ProU aus *Escherichia coli*: Gerichtete Mutagenese. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Bohnert H.J., Nelson D.E., Jensen R.G.** (1995). Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell*, **7**: 1099-111.
- Bolen D.W.** (2001). Protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Methods Mol Biol*, **168**: 17-36.
- Bolen D.W., Baskakov I.V.** (2001). The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol*, **310**: 955-63.
- Boncompagni E., Dupont L., Mignot T., Osteras M., Lambert A., Poggi M.C., Le Rudulier D.** (2000). Characterization of a *Sinorhizobium meliloti* ATP-binding cassette histidine transporter also involved in betaine and proline uptake. *J Bacteriol*, **182**: 3717-25.
- Boos W., Lucht J.M.** (1996). Periplasmic binding protein dependent ABC-transporters. In: F.C Neidhard, R.Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schächter, H.E Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, S. 1175-1209. ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Booth I.R.** (2002). Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J Food Microbiol*, **78**: 19-30.
- Booth I.R., Louis P.** (1999). Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol*, **2**: 166-9.
- Borths E.L., Locher K.P., Lee A.T., Rees D.C.** (2002). The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 16642-7.

- Borths E.L., Poolman B., Hvorup R.N., Locher K.P., Rees D.C.** (2005). In Vitro Functional Characterization of BtuCD-F, the *Escherichia coli* ABC Transporter for Vitamin B(12) Uptake. *Biochemistry*, **44**: 16301-9.
- Boscari A., Mandon K., Dupont L., Poggi M.C., Le Rudulier D.** (2002). BetS is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, **184**: 2654-63.
- Bovell C.R., Packer L., Helgerson R.** (1963). Permeability of *Escherichia coli* to Organic Compounds and Inorganic Salts Measured by Light-Scattering. *Biochim Biophys Acta*, **75**: 257-66.
- Bradford M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248-54.
- Braun V., Wu H.C.** (1994). Lipoproteins, structure, function, biosynthesis and model for protein export. In: *Bacterial cell wall*. Edited by J.-M. Ghuyssen, R. Hakenbeck. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier.
- Breed J., Kneip S., Gade J., Welte W., Bremer E.** (2001). Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the periplasmic binding protein ProX from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**: 448-50.
- Bremer E., Krämer R.** (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: G. Storz und R. Hengge-Aronis (Herausg.), *Bacterial stress responses*, S. 79-97, ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Bremer E.** (2002). Adaption to changing osmolality. In: *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Edited by Hoch JA, Sonnenshein AL, Losick R. ASM Press, Washington D.C., USA: 385-391.
- Brigulla M., Hoffmann T., Krisp A., Völker A., Bremer E., Völker U.** (2003). Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J Bacteriol*, **185**: 4305-14.
- Brown A.D.** (1976). Microbial water stress. *Bacteriol Rev*, **40**: 803-46.
- Burley S.K., Petsko G.A.** (1986). Amino-aromatic interactions in proteins. *FEBS Lett*, **203**: 139-43.
- Bursy J.** (2005). Osmotisch regulierte Biosynthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin in *Salibacillus salaxigens*: Biochemische Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase EctD und Identifizierung ihres Strukturgenes. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Cairney J., Booth I.R., Higgins C.F.** (1985). Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium*: *proU* encodes an osmotically induced betaine transport system. *J Bacteriol*, **164**: 1224-32.

- Cairney J., Booth I.R., Higgins C.F.** (1985). *Salmonella typhimurium proP* gene encodes a transport system for the osmoprotectant betaine. *J Bacteriol*, **164**: 1218-23.
- Calamita G., Bishai W.R., Preston G.M., Guggino W.B., Agre P.** (1995). Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **270**: 29063-6.
- Calamita G., Kempf B., Rudd K.E., Bonhivers M., Kneip S., Bishai W.R., Bremer E., Agre P.** (1997). The aquaporin-Z water channel gene of *Escherichia coli*: structure, organization and phylogeny. *Biol Cell*, **89**: 321-9.
- Caldas T., Demont-Caulet N., Ghazi A., Richarme G.** (1999). Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiology*, **145 (Pt 9)**: 2543-8.
- Casabadan, M.J.** (1976). Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *Journal of Molecular Biology* **104**:541-555.
- Cayley S., Lewis B.A., Record M.T. Jr.** (1992). Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **174**: 1586-95.
- Chakravarty S., Varadarajan R.** (2002). Elucidation of factors responsible for enhanced thermal stability of proteins: a structural genomics based study. *Biochemistry*, **41**: 8152-61.
- Chen J., Lu G., Lin J., Davidson A.L., Quioco F.A.** (2003). A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell*, **12**: 651-61.
- Chen J., Sharma S., Quioco F.A., Davidson A.L.** (2001). Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 1525-30.
- Chen T.H., Murata N.** (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol*, **5**: 250-7.
- Choquet G., Jehan N., Pissavin C., Blanco C., Jebbar M.** (2005). OusB, a broad-specificity ABC-type transporter from *Erwinia chrysanthemi*, mediates uptake of glycine betaine and choline with a high affinity. *Appl Environ Microbiol*, **71**: 3389-98.
- Csonka L.N.** (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev*, **53**: 121-47.
- Csonka, L.N., Epstein, W.** (1996). Osmoregulation. In: F.C Neidhard, R.Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schächter, H.E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, S. 1210-1223. ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Csonka L.N., Hanson A.D.** (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol*, **45**: 569-606.

- Culham D.E., Lasby B., Marangoni A.G., Milner J.L., Steer B.A., van Nues R.W., Wood J.M.** (1993). Isolation and sequencing of *Escherichia coli* gene *proP* reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter, ProP. *J Mol Biol*, **229**: 268-76.
- da Costa M.S., Santos H., Galinski E.A.** (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **61**: 117-53.
- Dassa E., Bouige P.** (2001). The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol*, **152**: 211-29.
- Dassa E., Hofnung M.** (1985). Sequence of gene *malG* in *E. coli* K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. *Embo J*, **4**: 2287-93.
- Dassa E., Hofnung M., Paulsen I.T., Saier M.H., Jr.** (1999). The *Escherichia coli* ABC transporters: an update. *Mol Microbiol*, **32**: 887-9.
- Dattananda C.S., Gowrishankar J.** (1989). Osmoregulation in *Escherichia coli*: complementation analysis and gene-protein relationships in the *proU* locus. *J Bacteriol*, **171**: 1915-22.
- Davidson A.L.** (2002). Mechanism of coupling of transport to hydrolysis in bacterial ATP-binding cassette transporters. *J Bacteriol*, **184**: 1225-33.
- Davidson A.L., Chen J.** (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem*, **73**: 241-68.
- Dennis P.P., Shimmin L.C.** (1997). Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**: 90-104.
- Dersch P., Fsihi H., Bremer E.** (1994). Low-copy-number T7 vectors for selective gene expression and efficient protein overproduction in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, **123**: 19-26.
- Dersch P.** (1995). Molekularbiologische Charakterisierung des Nukleoid-assoziierten DNA-Bindeproteins HN-S aus *Escherichia coli* K12. Dissertation.
- Diamant S., Eliahu N., Rosenthal D., Goloubinoff P.** (2001). Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem*, **276**: 39586-91.
- Diez J., Diederichs K., Greller G., Horlacher R., Boos W., Welte W.** (2001). The crystal structure of a liganded trehalose/maltose-binding protein from the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis* at 1.85 Å. *J Mol Biol*, **305**: 905-15.

- Dinnbier U., Limpinsel E., Schmid R., Bakker E.P.** (1988). Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol*, **150**: 348-57.
- Double S.** (1997). Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods Enzymol*, **276**: 523-30.
- Dougherty D.A.** (1996). Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science*, **271**: 163-8.
- Dougherty D.A., Stauffer D.A.** (1990). Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition. *Science*, **250**: 1558-60.
- Dulaney, E.L., Dulaney, D.D. und Rickes, E.L.** (1968). Factors in yeast extract which relieve growth inhibition of bacteria in defined medium of high osmolarity. *Dev Ind Microbiol* **9**:260-269.
- Dwyer M.A., Hellenga H.W.** (2004). Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering. *Curr Opin Struct Biol*, **14**: 495-504.
- Ehrmann M., Ehrle R., Hofmann E., Boos W., Schlosser A.** (1998). The ABC maltose transporter. *Mol Microbiol*, **29**: 685-94.
- Eichler K., Bourgis F., Buchet A., Kleber H.P., Mandrand-Berthelot M.A.** (1994). Molecular characterization of the *cai* operon necessary for carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **13**: 775-86.
- Epstein W.** (1986). Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews* **39**:73-78 .
- Faatz E., Middendorf A., Bremer E.** (1988). Cloned structural genes for the osmotically regulated binding-protein-dependent glycine betaine transport system (ProU) of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*, **2**: 265-79.
- Fekkes P., Driessen A.J.** (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**: 161-73.
- Fukami-Kobayashi K., Tateno Y., Nishikawa K.** (1999). Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history. *J Mol Biol*, **286**: 279-90.
- Galinski E.A.** (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol*, **37**: 272-328.
- Galinski E.A., Pfeiffer H.P., Trüper H.G.** (1985). 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem*, **149**: 135-9.
- Galinski, E.A., Trüper H.G.** (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**:95-108.

- Gallivan J.P., Dougherty D.A.** (1999). Cation- π interactions in structural biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 9459-64.
- Garcia-Perez A., Burg M.B.** (1990). Importance of organic osmolytes for osmoregulation by renal medullary cells. *Hypertension*, **16**: 595-602.
- Gerhardt PN, Smith LT, Smith GM.** (1996). Sodium-driven, osmotically activated glycine betaine transport in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *J Bacteriol*, **178**: 6105-9.
- Glockshuber R., Stadlmuller J., Pluckthun A.** (1991). Mapping and modification of an antibody hapten binding site: a site-directed mutagenesis study of McPC603. *Biochemistry*, **30**: 3049-54.
- Göller K., Ofer A., Galinski E.A.** (1998). Construction and characterization of a NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett*, **161**: 293-300.
- Gouesbet G., Trautwetter A., Bonnassie S., Wu L.F., Blanco C.** (1996). Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* osmoprotectant transporter gene *ousA*. *J Bacteriol*, **178**: 447-55.
- Gowrishankar J.** (1989). Nucleotide sequence of the osmoregulatory *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **171**: 1923-31.
- Gowrishankar J., Jayashree P., Rajkumari K.** (1986). Molecular cloning of an osmoregulatory locus in *Escherichia coli*: increased *proU* gene dosage results in enhanced osmotolerance. *J Bacteriol*, **168**: 1197-204.
- Grammann K., Volke A., Kunte H.J.** (2002). New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581(T). *J Bacteriol*, **184**: 3078-85.
- Haardt M., Kempf B., Faatz E., Bremer E.** (1995). The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet*, **246**: 783-6.
- Hagemann M., Richter S., Mikkat S.** (1997). The *ggtA* gene encodes a subunit of the transport system for the osmoprotective compound glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol*, **179**: 714-20.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**: 557-80.
- Harel M., Schalk I., Ehret-Sabatier L., Bouet F., Goeldner M., Hirth C., Axelsen P.H., Silman I., Sussman J.L.** (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 9031-5.

- Hedde J., Scott D.J., Unzai S., Park S.Y., Tame J.R.** (2003). Crystal structures of the liganded and unliganded nickel-binding protein NikA from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **278**: 50322-9.
- Higgins C.F.** (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, **8**: 67-113.
- Higgins C.F.** (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview. *Res Microbiol*, **152**: 205-10.
- Higgins C.F., Gallagher M.P., Hyde S.C., Mimmack M.L., Pearce S.R.** (1990). Periplasmic binding protein-dependent transport systems: the membrane-associated components. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **326**: 353-64; discussion 64-5.
- Höing, M.** (2005). Gerichtete Mutagenese der Substratbindetasche des Ektoin/Hydroxyektoin-Bindeproteins EhuB aus *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Höltje J.V.** (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**: 181-203.
- Hoffmann T., Bremer E.** (in Vorbereitung). *Bacillus subtilis* at low temperature.
- Holtmann G.** (2002). Charakterisierung eines ABC-Transporters für kompatible Solute in dem hyperthermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* und Untersuchungen zur thermoprotektiven Wirkung kompatibler Solute in *Bacillus subtilis*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Holtmann G., Bakker E.P., Uozumi N., Bremer E.** (2003). KtrAB and KtrCD: two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J Bacteriol*, **185**: 1289-98.
- Holtmann G., Bremer E.** (2004). Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J Bacteriol*, **186**: 1683-93.
- Hor L.I., Shuman H.A.** (1993). Genetic analysis of periplasmic binding protein dependent transport in *Escherichia coli*. Each lobe of maltose-binding protein interacts with a different subunit of the MalFGK2 membrane transport complex. *J Mol Biol*, **233**: 659-70.
- Horikoshi K.** (1998). Barophiles: deep-sea microorganisms adapted to an extreme environment. *Curr Opin Microbiol*, **1**: 291-5.
- Horn C., Bremer E., Schmitt L.** (2003). Nucleotide dependent monomer/dimer equilibrium of OpuAA, the nucleotide-binding protein of the osmotically regulated ABC transporter OpuA from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, **334**: 403-19.
- Horn C., Bremer E., Schmitt L.** (2005). Functional overexpression and in vitro re-association of OpuA, an osmotically regulated ABC-transport complex from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett*.

- Horn C., Jennewein S., Sohn-Bösser L., Bremer E., Schmitt L.** (2006b, im Druck). The osmotically regulated ABC-transporter OpuA for the compatible solutes glycine betaine and proline betaine from *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol*.
- Horn C., Sohn-Bösser L., Breed J., Welte W. Schmitt L., Bremer E.** (2006a, im Druck). Molecular determinants for substrate specificity of the ligand-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis* for the compatible solutes glycine betaine and proline betaine. *J Mol Biotechnol*.
- Hung L.W., Wang I.X., Nikaido K., Liu P.Q., Ames G.F., Kim S.H.** (1998). Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, **396**: 703-7.
- Inbar L., Frolow F., Lapidot A.** (1993). The conformation of new tetrahydropyrimidine derivatives in solution and in the crystal. *Eur J Biochem*, **214**: 897-906.
- Ingraham J., Marr A.G.** (1996). Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth. In: F.C Neidhard, R.Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schächter, H.E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, S. 1570-1578. ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Jacobs S.A., Khorasanizadeh S.** (2002). Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science*, **295**: 2080-3.
- Jebbar M., Sohn-Bösser L., Bremer E., Bernard T., Blanco C.** (2005). Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an Ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J Bacteriol*, **187**: 1293-304.
- Jebbar M., Talibart R., Gloux K., Bernard T., Blanco C.** (1992). Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J Bacteriol*, **174**: 5027-35.
- Josse D., Xie W., Masson P., Schopfer L.M., Lockridge O.** (1999). Tryptophan residue(s) as major components of the human serum paraoxonase active site. *Chem Biol Interact*, **119-120**: 79-84.
- Kappes R.M., Kempf B., Bremer E.** (1996). Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol*, **178**: 5071-9.
- Kappes R.M., Kempf B., Kneip S., Boch J., Gade J., Meier-Wagner J., Bremer E.** (1999). Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **32**: 203-16.
- Karpowich N., Martsinkevich O., Millen L., Yuan Y.R., Dai P.L., MacVey K., Thomas P.J., Hunt J.F.** (2001). Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure*, **9**: 571-86.

- Karpowich N.K., Huang H.H., Smith P.C., Hunt J.F.** (2003). Crystal structures of the BtuF periplasmic-binding protein for vitamin B12 suggest a functionally important reduction in protein mobility upon ligand binding. *J Biol Chem*, **278**: 8429-34.
- Kato C., Bartlett D.H.** (1997). The molecular biology of barophilic bacteria. *Extremophiles*, **1**: 111-6.
- Kelly D.J., Thomas G.H.** (2001). The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev*, **25**: 405-24.
- Kempf B., Bremer E.** (1995). OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, **270**: 16701-13.
- Kempf B., Bremer E.** (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol*, **170**: 319-30.
- Kempf B., Bremer E.** (2000). Water-deficient environments. In: Encyclopedia of Microbiology, Volume 4, S.884-897, Academic Press.
- Kempf B., Gade J., Bremer E.** (1997). Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *J Bacteriol*, **179**: 6213-20.
- Kerr I.D.** (2002). Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains. *Biochim Biophys Acta*, **1561**: 47-64.
- Klenk H.P., Clayton R.A., Tomb J.F., White O., Nelson K.E., Ketchum K.A., Dodson R.J., Gwinn M., Hickey E.K., Peterson J.D., Richardson D.L., Kerlavage A.R., Graham D.E., Kyrpides N.C., Fleischmann R.D., Quackenbush J., Lee N.H., Sutton G.G., Gill S., Kirkness E.F., Dougherty B.A., McKenney K., Adams M.D., Loftus B., Peterson S., Reich C.I., McNeil L.K., Badger J.H., Glodek A., Zhou L., Overbeek R., Gocayne J.D., Weidman J.F., McDonald L., Utterback T., Cotton M.D., Spriggs T., Artiach P., Kaine B.P., Sykes S.M., Sadow P.W., D'Andrea K.P., Bowman C., Fujii C., Garland S.A., Mason T.M., Olsen G.J., Fraser C.M., Smith H.O., Woese C.R., Venter J.C.** (1997). The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*, **390**: 364-70.
- Knapp S., Ladenstein R., Galinski E.A.** (1999). Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles*, **3**: 191-8.
- Ko R., Smith L.T.** (1999). Identification of an ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 4040-8.
- Ko R., Smith L.T., Smith G.M.** (1994). Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, **176**: 426-31.
- Koch, J.** (1984). Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic stress. *J. Bacteriol* **159**:919-924.

- Krämer R., Morbach S.** (2004). BetP of *Corynebacterium glutamicum*, a transporter with three different functions: betaine transport, osmosensing, and osmoregulation. *Biochim Biophys Acta*, **1658**: 31-6.
- Kuhlmann A.U.** (2002). Biosynthese und Transport des kompatiblen Soluts Ectoin in *Bacillus* spp. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Kuhlmann A.U., Bremer E.** (2002). Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, **68**: 772-83.
- Labahn J., Scharer O.D., Long A., Ezaz-Nikpay K., Verdine G.L., Ellenberger T.E.** (1996). Structural basis for the excision repair of alkylation-damaged DNA. *Cell*, **86**: 321-9.
- Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-5.
- Lamark T., Kaasen I., Eshoo M.W., Falkenberg P., McDougall J., Strom A.R.** (1991). DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **5**: 1049-64.
- Lamosa P., Martins L.O., Da Costa M.S., Santos H.** (1998). Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl Environ Microbiol*, **64**: 3591-8.
- Landfald B., Strom A.R.** (1986). Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **165**: 849-55.
- Lanyi J.K.** (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev*, **38**: 272-90.
- Li A.J., Nussinov R.** (1998). A set of van der Waals and coulombic radii of protein atoms for molecular and solvent-accessible surface calculation, packing evaluation, and docking. *Proteins*, **32**: 111-27.
- Lin Z., Johnson M.E.** (1995). Proposed cation- π mediated binding by factor Xa: a novel enzymatic mechanism for molecular recognition. *FEBS Lett*, **370**: 1-5.
- Linton K.J., Higgins C.F.** (1998). The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol*, **28**: 5-13.
- Linton K.L., Rosenberg M.F., Kerr I.D., Higgins C.F.** (2003). Structure of ABC-Transporters. In: ABC-Proteins: From bacteria to man. Holland, I.B., Cole, S.P.C., Kuchler, K. und Higgins, C.F., Academic Press.
- Lippert K. und Galinski E. A.** (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**:61-65.

- Liu C.E., Liu P.Q., Wolf A., Lin E., Ames G.F.** (1999). Both lobes of the soluble receptor of the periplasmic histidine permease, an ABC transporter (traffic ATPase), interact with the membrane-bound complex. Effect of different ligands and consequences for the mechanism of action. *J Biol Chem*, **274**: 739-47.
- Locher K.P.** (2004). Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol*, **14**: 426-31.
- Locher K.P., Borths E.** (2004). ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF. *FEBS Lett*, **564**: 264-8.
- Locher K.P., Lee A.T., Rees D.C.** (2002). The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**: 1091-8.
- Lu W., Zhao B., Feng D., Yang S.** (2004). Cloning and characterization of the *Halobacillus trueperi betH* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *FEMS Microbiol Lett*, **235**: 393-9.
- Lucht J.M., Bremer E.** (1994). Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system proU. *FEMS Microbiol Rev*, **14**: 3-20.
- Lummis S.C., L. Beene D., Harrison N.J., Lester H.A., Dougherty D.A.** (2005). A cation- π binding interaction with a tyrosine in the binding site of the GABA_C receptor. *Chem Biol*, **12**: 993-7.
- Ma J.C., Dougherty D.A.** (1997). The Cation- π Interaction. *Chem Rev*, **97**: 1303-24.
- MacMillan S.V., Alexander D.A., Culham D.E., Kunte H.J., Marshall E.V., Rochon D., Wood J.M.** (1999). The ion coupling and organic substrate specificities of osmoregulatory transporter ProP in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **1420**: 30-44.
- Mandon K., Osteras M., Boncompagni E., Trinchant J.C., Spennato G., Poggi M.C., Le Rudulier D.** (2003). The *Sinorhizobium meliloti* glycine betaine biosynthetic genes (*betCBA*) are induced by choline and highly expressed in bacteroids. *Mol Plant Microbe Interact*, **16**: 709-19.
- Manzanera M., Garcia de Castro A., Tondervik A., Rayner-Brandes M., Strom A.R., Tunnacliffe A.** (2002). Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol*, **68**: 4328-33.
- Mao B., Pear M.R., McCammon J.A., Quioco F.A.** (1982). Hinge-bending in L-arabinose-binding protein. The "Venus's-flytrap" model. *J Biol Chem*, **257**: 1131-3.
- Martin D.D., Ciulla R.A., Roberts M.F.** (1999). Osmoadaptation in archaea. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 1815-25.
- Martin S.F., Follows B.C., Hergenrother P.J., Trotter B.K.** (2000). The choline binding site of phospholipase C (*Bacillus cereus*): insights into substrate specificity. *Biochemistry*, **39**: 3410-5.

- Martins, L.O., Huber, R., Huber, H., Stetter, K.O., da Costa, M.S., und Santos, H.** (1997). Organic solutes in hyperthermophilic *Archaea*. *Appl Environ Microbiol* **63**:896-902.
- Maskow T., Babel W.** (2001). Calorimetrically obtained information about the efficiency of ectoine synthesis from glucose in *Halomonas elongata*. *Biochim Biophys Acta*, **1527**: 4-10.
- Matsuo H., Li H., McGuire A.M., Fletcher C.M., Gingras A.C., Sonenberg N., Wagner G.** (1997). Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat Struct Biol*, **4**: 717-24.
- Maurel C.** (1997). Aquaporins and Water Permeability of Plant Membranes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **48**: 399-429.
- May G., Faatz E., Lucht J.M., Haardt M., Bolliger M., Bremer E.** (1989). Characterization of the osmoregulated *Escherichia coli proU* promoter and identification of ProV as a membrane-associated protein. *Mol Microbiol*, **3**: 1521-31.
- May G., Faatz E., Villarejo M., Bremer E.** (1986). Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet*, **205**: 225-33.
- McLaggan D., Naprstek J., Buurman E.T., Epstein W.** (1994). Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **269**: 1911-7.
- Mecozzi S., West A.P., Jr., Dougherty D.A.** (1996). Cation- π interactions in aromatics of biological and medicinal interest: electrostatic potential surfaces as a useful qualitative guide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 10566-71.
- Mendum M.L., Smith L.T.** (2002). Gbu glycine betaine porter and carnitine uptake in osmotically stressed *Listeria monocytogenes* cells. *Appl Environ Microbiol*, **68**: 5647-55.
- Mendum M.L., Smith L.T.** (2002). Characterization of glycine betaine porter I from *Listeria monocytogenes* and its roles in salt and chill tolerance. *Appl Environ Microbiol*, **68**: 813-9.
- Merino G., Boos W., Shuman H.A., Bohl E.** (1995). The inhibition of maltose transport by the unliganded form of the maltose-binding protein of *Escherichia coli*: experimental findings and mathematical treatment. *J Theor Biol*, **177**: 171-9.
- Miller, J.H.** (1992). A short course in bacterial genetics – A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller K.J., Wood J.M.** (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **50**: 101-36.

- Min-Yu L., Ono H., Takano M.** (1993). Gene cloning of ectoine synthase from *Halomonas* sp. *Ann Rep Intern Center Coop Res Biotechnol* **16**:193-200.
- Morbach S., Kramer R.** (2002). Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *Chembiochem*, **3**: 384-97.
- Mourez M., Hofnung M., Dassa E.** (1997). Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *Embo J*, **16**: 3066-77.
- Müller V., Spanheimer R., Santos H.** (2005). Stress response by solute accumulation in archaea. *Curr Opin Microbiol*, **8**: 729-36.
- Neu H.C., Heppel L.A.** (1965). The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J Biol Chem*, **240**: 3685-92.
- Nyrönen T.H., Suontamo R., Pitkänen I.** (1999). Why betaine crystallizes in high local Cs symmetry . An ab initio MO and DFT study of anhydrous betaine and betaine monohydrate. *Theor Chem Acc*, 101:209-214.
- Obis D., Guillot A., Gripon J.C., Renault P., Bolotin A., Mistou M.Y.** (1999). Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J Bacteriol*, **181**: 6238-46.
- Okada A., Miura T., Takeuchi H.** (2001). Protonation of histidine and histidine-tryptophan interaction in the activation of the M2 ion channel from influenza A virus. *Biochemistry*, **40**: 6053-60.
- Ono H., Sawada K., Khunajakr N., Tao T., Yamamoto M., Hiramoto M., Shinmyo A., Takano M., Murooka Y.** (1999). Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *J Bacteriol*, **181**: 91-9.
- Ordentlich A., Barak D., Kronman C., Flashner Y., Leitner M., Segall Y., Ariel N., Cohen S., Velan B., Shafferman A.** (1993). Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *J Biol Chem*, **268**: 17083-95.
- Pearce S.R., Mimmack M.L., Gallagher M.P., Gileadi U., Hyde S.C., Higgins C.F.** (1992). Membrane topology of the integral membrane components, OppB and OppC, of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, **6**: 47-57.
- Peter H., Burkovski A., Krämer R.** (1996). Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J Bacteriol*, **178**: 5229-34.
- Peter H., Weil B., Burkovski A., Krämer R., Morbach S.** (1998). *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes:

- identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J Bacteriol*, **180**: 6005-12.
- Peters P., Galinski E.A., Trüper H.G.** (1990). The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* **71**:157-162.
- Pfluger K., Müller V.** (2004). Transport of compatible solutes in extremophiles. *J Bioenerg Biomembr*, **36**: 17-24.
- Pflugrath J.W., Quioco F.A.** (1988). The 2 Å resolution structure of the sulfate-binding protein involved in active transport in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol*, **200**: 163-80.
- Poolman B., Glaasker E.** (1998). Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol*, **29**: 397-407.
- Poolman B., Spitzer J.J., Wood J.M.** (2004). Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta*, **1666**: 88-104.
- Prabhu J., Schauwecker F., Grammel N., Keller U., Bernhard M.** (2004). Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (*thpD*) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 3130-2.
- Quioco F.A., Hu G., Gershon P.D.** (2000). Structural basis of mRNA cap recognition by proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **10**: 78-86.
- Quioco F.A., Ledvina P.S.** (1996). Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol Microbiol*, **20**: 17-25.
- Racher K.I., Voegelé R.T., Marshall E.V., Culham D.E., Wood J.M., Jung H., Bacon M., Cairns M.T., Ferguson S.M., Liang W.J., Henderson P.J., White G., Hallett F.R.** (1999). Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. *Biochemistry*, **38**: 1676-84.
- Ramos A., Raven N.D.H., Sharp R.J., Bartolucci S., Rossi M., Cannio R., Lebbink J., Vanderroost J., Devos W.M., Santos H.** (1997). Stabilization of enzymes against thermal stress and freeze-drying by mannosylglycerate. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4020-4025.
- Record M.T., Jr., Courtenay E.S., Cayley S., Guttman H.J.** (1998). Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments. *Trends Biochem Sci*, **23**: 190-4.
- Rhodes D., Hanson A.D.** (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**:357-384.
- Richarme G., Kepes A.** (1983). Study of binding protein-ligand interaction by ammonium sulfate-assisted adsorption on cellulose esters filters. *Biochim Biophys Acta*, **742**: 16-24.

- Roberts M.F.** (2000). Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Front Biosci*, **5**: D796-812.
- Roderick S.L., Chan W.W., Agate D.S., Olsen L.R., Vetting M.W., Rajashankar K.R., Cohen D.E.** (2002). Structure of human phosphatidylcholine transfer protein in complex with its ligand. *Nat Struct Biol*, **9**: 507-11.
- Roessler M., Müller V.** (2001). Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environmental Microbiology* **3**, 743-754.
- Roessler M., Pfluger K., Flach H., Lienard T., Gottschalk G., Muller V.** (2002). Identification of a salt-induced primary transporter for glycine betaine in the methanogen *Methanosarcina mazei* Go1. *Appl Environ Microbiol*, **68**: 2133-9.
- Saier M.H., Jr.** (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**: 354-411.
- Saier M. H., Jr., Eng B. H., Fard S., Garg J., Haggerty D. A., Hutchinson W. J., Jack D. L., Lai, E. C., Liu H. J., Nusinew D. P., Omar A. M., Pao S. S., Paulsen I. T., Quan J. A., Sliwinski M., Tseng T. T., Wachi S., Young G. B.** (1999). Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta*: **1422**:1-56.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989). Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**: 5463-7.
- Santos H., da Costa M.S.** (2001). Organic solutes from thermophiles and hyperthermophiles. *Methods Enzymol*, **334**: 302-15.
- Santos H., da Costa M.S.** (2002). Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ Microbiol*, **4**: 501-9.
- Scatchard G.** (1949). *New York Acad Sci*. **51**: 660.
- Schiefner A., Breed J., Bösser L., Kneip S., Gade J., Holtmann G., Diederichs K., Welte W., Bremer E.** (2004a). Cation- π interactions as determinants for binding of the compatible solutes glycine betaine and proline betaine by the periplasmic ligand-binding protein ProX from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **279**: 5588-96.
- Schiefner A., Holtmann G., Diederichs K., Welte W., Bremer E.** (2004b). Structural basis for the binding of compatible solutes by ProX from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem*, **279**: 48270-81.
- Schmitt L., Tampe R.** (2002). Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol*, **12**: 754-60.

- Schneider, E.** (2000). ABC-Transporter: Eine Proteinfamilie für den Transport chemischer Verbindungen über biologische Membranen. *Chemie in unserer Zeit* **2**, 90-98.
- Scrutton N.S., Raine A.R.** (1996). Cation-pi bonding and amino-aromatic interactions in the biomolecular recognition of substituted ammonium ligands. *Biochem J*, **319 (Pt 1)**: 1-8.
- Sharff A.J., Rodseth L.E., Spurlino J.C., Quijcho F.A.** (1992). Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry*, **31**: 10657-63.
- Shuman H.A.** (1982). Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. Role of the periplasmic maltose-binding protein and evidence for a substrate recognition site in the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem*, **257**: 5455-61.
- Shuman H.A.** (1986). Use of *lac* gene fusions to study transport proteins. *Methods Enzymol*, **125**: 150-6.
- Skerra A.** (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene*, **151**: 131-5.
- Sleator R.D., Gahan C.G., Abee T., Hill C.** (1999). Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 2078-83.
- Sleator R.D., Hill C.** (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev*, **26**: 49-71.
- Smith L.T., Pocard J.A., Bernard T., Le Rudulier D.** (1988). Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, **170**: 3142-9.
- Speiser D.M., Ames G.F.** (1991). *Salmonella typhimurium* histidine periplasmic permease mutations that allow transport in the absence of histidine-binding proteins. *J Bacteriol*, **173**: 1444-51.
- Stetter K.O., Lauerer G., Thomm M, Neuner A.** (1987). Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers for a novel branch of archaeobacteria. *Science*, **236**: 822-824.
- Stetter K.O.** (1988). *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol*, **10**, 172-173.
- Stirling D.A., Hulton C.S., Waddell L., Park S.F., Stewart G.S., Booth I.R., Higgins C.F.** (1989). Molecular characterization of the *proU* loci of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* encoding osmoregulated glycine betaine transport systems. *Mol Microbiol*, **3**: 1025-38.
- Suenobu K., Nagooka M., Yamabe T., Nagata S.** (1998). *Ab initio* orbital study on molecular and hydration structures of ectoine. *J Phys Chem* **102**:7505-7511.

- Sussman J.L., Harel M., Silman I.** (1993). Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs. *Chem Biol Interact*, **87**: 187-97.
- Suttcliff I.C., Russel R.R.B.** (1995). Lipoproteins of Gram-positive Bacteria. *J Bacteriol*, **177**: 1123-1128
- Talibart R., Jebbar M., Gouesbet G., Hindi-Kabbab S., Wroblewski H., Blanco C., Bernard T.** (1994). Osmoadaptation in rhizobia: ectoine-induced salt tolerance. *J Bacteriol*, **176**: 5210-7.
- Tam R., Saier M.H., Jr.** (1993). Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev*, **57**: 320-46.
- Tatzelt J., Prusiner S.B., Welch W.J.** (1996). Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *Embo J*, **15**: 6363-73.
- Tetsch L., Kunte H.J.** (2002). The substrate-binding protein TeaA of the osmoregulated ectoine transporter TeaABC from *Halomonas elongata*: purification and characterization of recombinant TeaA. *FEMS Microbiol Lett*, **211**: 213-8.
- Timasheff S.N.** (1998). Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Adv Protein Chem*, **51**: 355-432.
- Tomii K., Kanehisa M.** (1998). A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Res*, **8**: 1048-59.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**: 4350-4354
- Trakhanov S., Vyas N.K., Luecke H., Kristensen D.M., Ma J., Quijcho F.A.** (2005). Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the *Escherichia coli* ABC leucine/isoleucine/valine transport system: trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity. *Biochemistry*, **44**: 6597-608.
- Treptow N.A., Shuman H.A.** (1985). Genetic evidence for substrate and periplasmic-binding-protein recognition by the MalF and MalG proteins, cytoplasmic membrane components of the *Escherichia coli* maltose transport system. *J Bacteriol*, **163**: 654-60.
- Trinchant J.C., Boscari A., Spennato G., Van De Sype G., Le Rudulier D.** (2004). Proline Betaine Accumulation and Metabolism in Alfalfa Plants under Sodium Chloride Stress. Exploring Its Compartmentalization in Nodules. *Plant Physiol*, **135**: 1583-94.
- Tsuboi M., Overman S.A., Nakamura K., Rodriguez-Casado A., Thomas G.J., Jr.** (2003). Orientation and interactions of an essential tryptophan (Trp-38) in the capsid subunit of Pf3 filamentous virus. *Biophys J*, **84**: 1969-76.

- van der Heide T., Poolman B.** (2000a). Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 7102-6.
- van der Heide T., Poolman B.** (2000b). Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. *J Bacteriol*, **182**: 203-6.
- van der Heide T., Poolman B.** (2002). ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep*, **3**: 938-43.
- van der Heide T., Stuart M.C., Poolman B.** (2001). On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *Embo J*, **20**: 7022-32.
- Van Duyne G.D., Standaert R.F., Karplus P.A., Schreiber S.L., Clardy J.** (1993). Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J Mol Biol*, **229**: 105-24.
- Ventosa A., Marquez M.C., Garabito M.J., Arahall D.R.** (1998). Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles*, **2**: 297-304.
- Vermeulen V., Kunte H.J.** (2004). *Marinococcus halophilus* DSM 20408T encodes two transporters for compatible solutes belonging to the betaine-carnitine-choline transporter family: identification and characterization of ectoine transporter EctM and glycine betaine transporter BetM. *Extremophiles*, **8**: 175-84.
- von Blohn C., Kempf B., Kappes R.M., Bremer E.** (1997). Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol Microbiol*, **25**: 175-87.
- Waditee R., Bhuiyan M.N., Rai V., Aoki K., Tanaka Y., Hibino T., Suzuki S., Takano J., Jagendorf A.T., Takabe T.** (2005). Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 1318-23.
- Waditee R., Tanaka Y., Aoki K., Hibino T., Jikuya H., Takano J., Takabe T.** (2003). Isolation and functional characterization of N-methyltransferases that catalyze betaine synthesis from glycine in a halotolerant photosynthetic organism *Aphanothece halophytica*. *J Biol Chem*, **278**: 4932-42.
- Wah D.A., Fernandez-Tornero C., Sanz L., Romero A., Calvete J.J.** (2002). Sperm coating mechanism from the 1.8 Å crystal structure of PDC-109-phosphorylcholine complex. *Structure (Camb)*, **10**: 505-14.
- Walker J.E., Eberle A., Gay N.J., Runswick M.J., Saraste M.** (1982). Conservation of structure in proton-translocating ATPases of *Escherichia coli* and mitochondria. *Biochem Soc Trans*, **10**: 203-6.

- Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J.** (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J*, **1**: 945-51.
- Wang Z., Luecke H., Yao N., Quioco F.A.** (1997). A low energy short hydrogen bond in very high resolution structures of protein receptor-phosphate complexes. *Nat Struct Biol*, **4**: 519-22.
- Welsh D.T.** (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev*, **24**: 263-90.
- Wemekamp-Kamphuis H.H., Sleator R.D., Wouters J.A., Hill C., Abee T.** (2004). Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 2912-8.
- Wemekamp-Kamphuis H.H., Wouters J.A., Sleator R.D., Gahan C.G., Hill C., Abee T.** (2002). Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. *Appl Environ Microbiol*, **68**: 4710-6.
- Whatmore A.M., Chudek J.A., Reed R.H.** (1990). The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol*, **136**: 2527-35.
- Whatmore A.M., Reed R.H.** (1990). Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J Gen Microbiol*, **136**: 2521-6.
- White B.A.** (1993). PCR-protocols. In *Methods in Microbiology*. Edited by J.M. Walker, Totawa, N.J: Humana Press.
- Wilkinson A.J., Verschuere, K.H.G.** (2003). Crystal structures of periplasmic solute-binding proteins in ABC-transport complexes illuminate their function. In: *ABC-Proteins: From bacteria to man*. Holland, I.B., Cole, S.P.C., Kuchler, K. und Higgins, C.F., Academic Press.
- Winzor C.L., Winzor D.J., Paleg L.G., Jones G.P., Naidu B.P.** (1992). Rationalization of the effects of compatible solutes on protein stability in terms of thermodynamic nonideality. *Arch Biochem Biophys*, **296**: 102-7.
- Wood J.M.** (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**: 230-62.
- Wood J.M., Bremer E., Csonka L.N., Kraemer R., Poolman B., van der Heide T., Smith L.T.** (2001). Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **130**: 437-60.
- Yamagata Y., Kato M., Odawara K., Tokuno Y., Nakashima Y., Matsushima N., Yasumura K., Tomita K., Ihara K., Fujii Y., Nakabeppu Y., Sekiguchi M., Fujii S.** (1996). Three-dimensional structure of a DNA repair enzyme, 3-methyladenine DNA glycosylase II, from *Escherichia coli*. *Cell*, **86**: 311-9.

- Yancey P.H., Burg M.B.** (1989). Distribution of major organic osmolytes in rabbit kidneys in diuresis and antidiuresis. *Am J Physiol*, **257**: F602-7.
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., Somero G.N.** (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, **217**: 1214-22.
- Zaccai G., Cendrin F., Haik Y., Borochoy N., Eisenberg H.** (1989). Stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *J Mol Biol*, **208**: 491-500.
- Zacharias N., Dougherty D.A.** (2002). Cation-pi interactions in ligand recognition and catalysis. *Trends Pharmacol Sci*, **23**: 281-7.
- Zhang Y., Conway C., Rosato M., Suh Y., Manson M.D.** (1992). Maltose chemotaxis involves residues in the N-terminal and C-terminal domains on the same face of maltose-binding protein. *J Biol Chem*, **267**: 22813-20.
- Zhong W., Gallivan J.P., Zhang Y., Li L., Lester H.A., Dougherty D.A.** (1998). *From ab initio* quantum mechanics to molecular neurobiology: a cation-pi binding site in the nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 12088-93.

Anhang A:

Bestimmung der Bindeaffinität (K_D) der *E. coli* ProX Wildtyp und Mutanten zu ^{14}C -markiertem Glycin Betain mittels des Ammoniumsulfat-Präzipitationstests und der Erstellung von Scatchard plots. Die K_D wird aus der negativen reziproken Steigung der Geraden ermittelt.

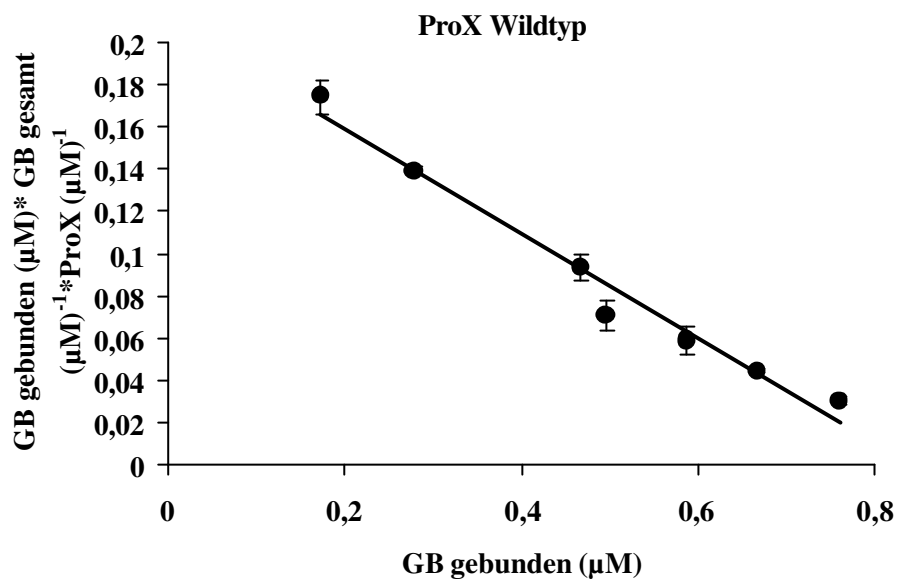


Abb.54: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des ProX Wildtyp Proteins zu ^{14}C -markiertem Glycin Betain. Die Auftragung ergibt eine Steigung von $-0,2494$ und ergibt eine K_D von $4 \pm 0,1 \mu\text{M}$.

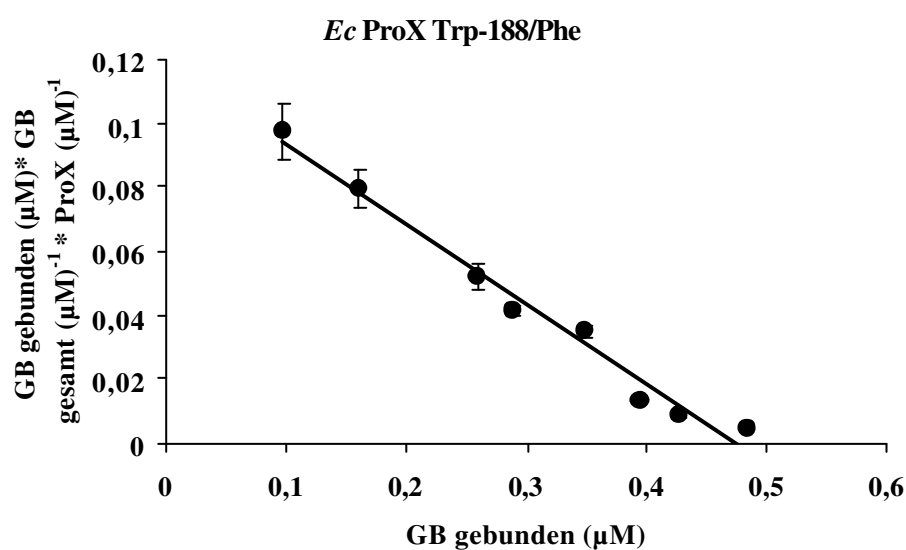


Abb.55: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-188/Phe zu ^{14}C -markiertem Glycin Betain. Die Auftragung ergibt eine Steigung von $-0,2514$ und ergibt eine K_D von $4 \pm 0,4 \mu\text{M}$.

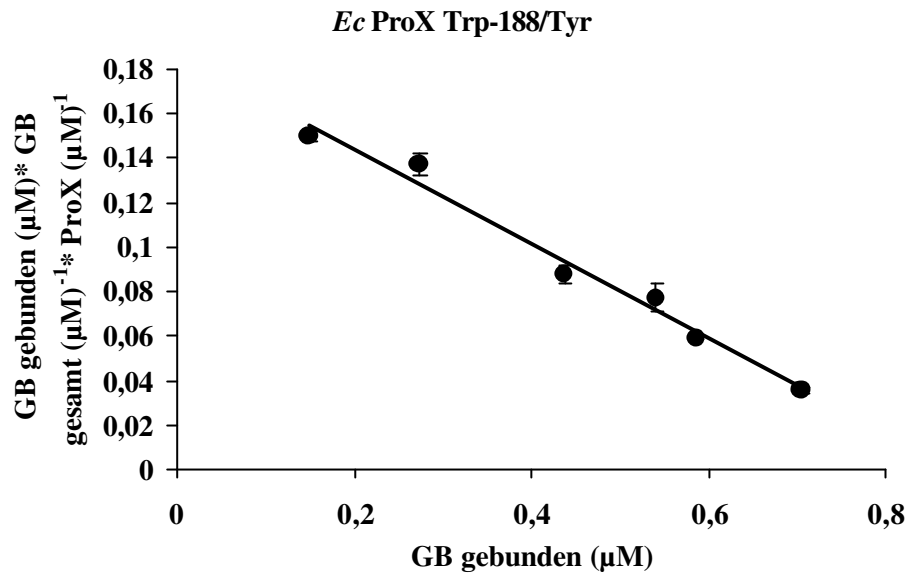


Abb.56: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-188/Tyr zu ¹⁴C-markiertem Glycin Betain. Die Auftragung ergibt eine Steigung von $-0,2134$ und ergibt eine K_D von $5 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

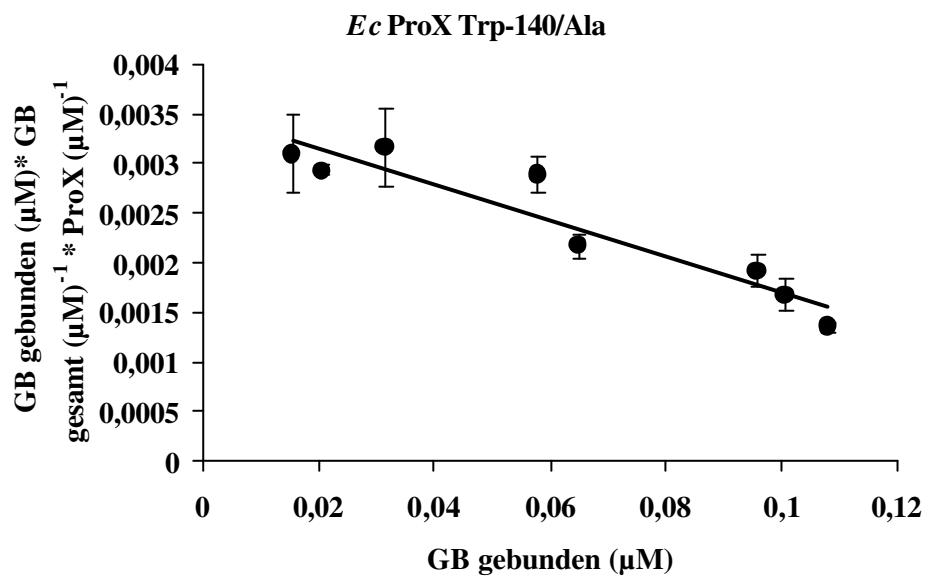


Abb.57: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-140/Ala zu ¹⁴C-markiertem Glycin Betain. Die Auftragung ergibt eine Steigung von $-0,0179$ und ergibt eine K_D von $56 \pm 10 \mu\text{M}$.

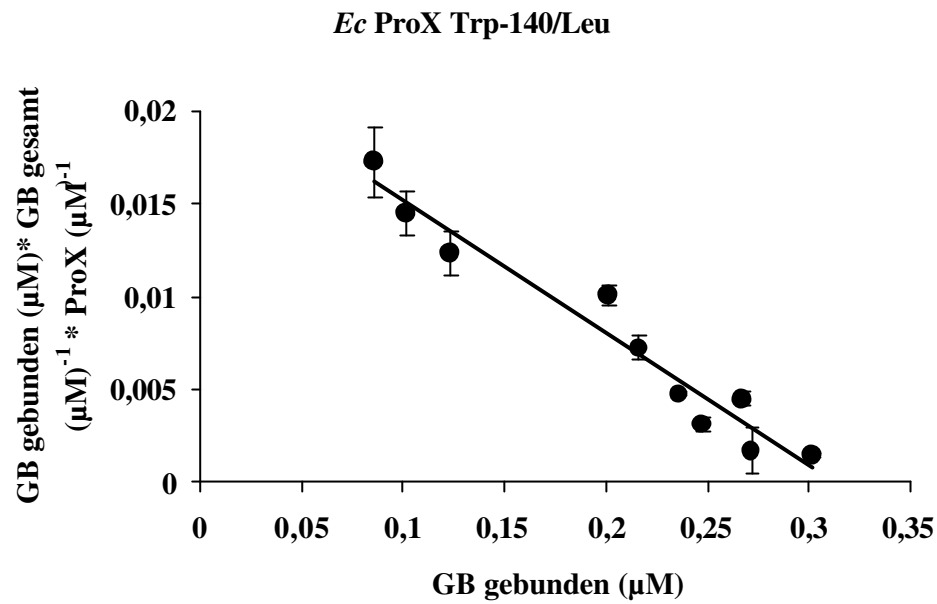


Abb.58: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-140/Leu zu ¹⁴C-markiertem Glycin Betain. Die Auftragung ergibt eine Steigung von $-0,0712$ und ergibt eine K_D von $14 \pm 1,4 \mu\text{M}$.

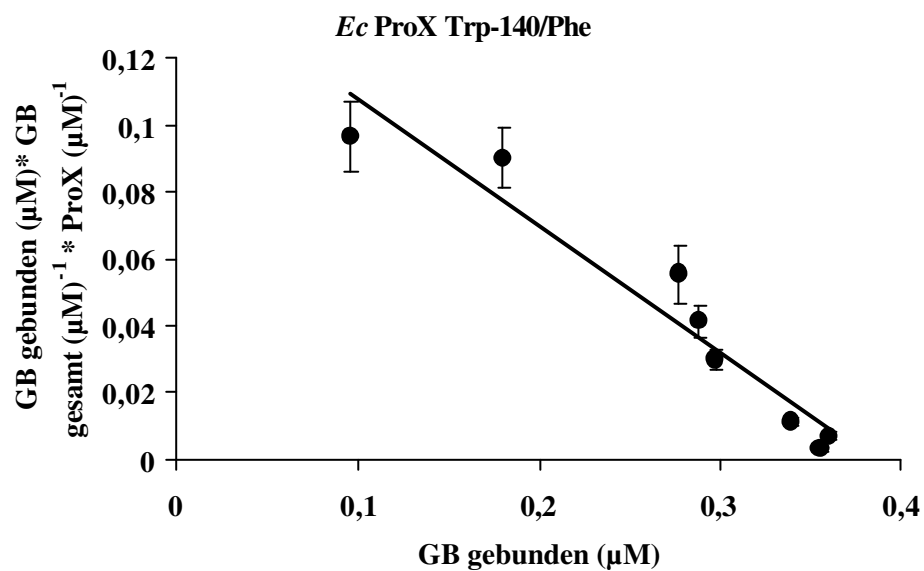


Abb.59: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-140/Phe zu ¹⁴C-markiertem Glycin Betain. Die Auftragung ergibt eine Steigung von $-0,3808$ und ergibt eine K_D von $3 \pm 0,3 \mu\text{M}$.

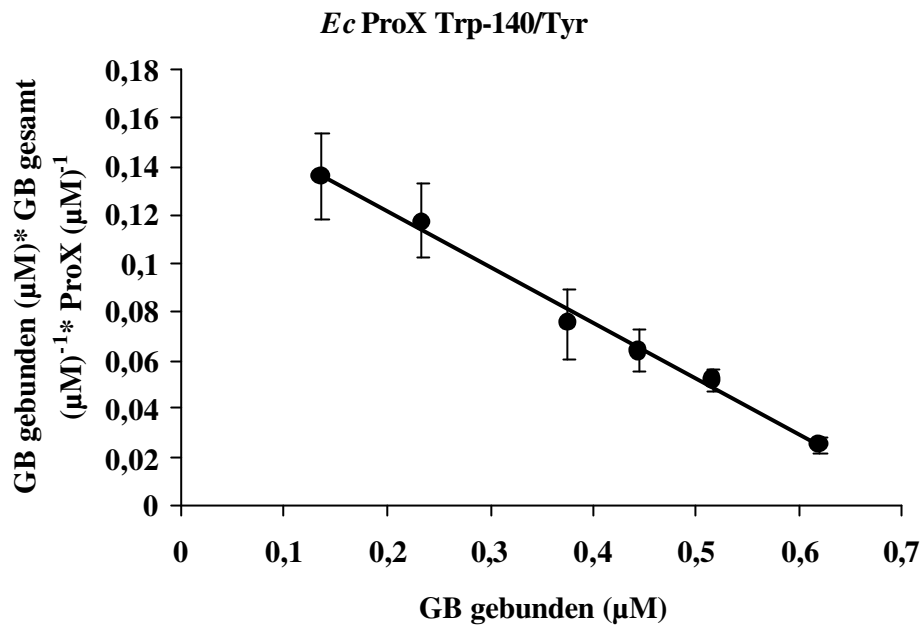


Abb.60: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-140/Tyr zu ¹⁴C-markiertem Glycyl Betain. Die Auftragung ergibt eine Steigung von $-0,2337$ und ergibt eine K_D von $4 \pm 0,6 \mu\text{M}$.

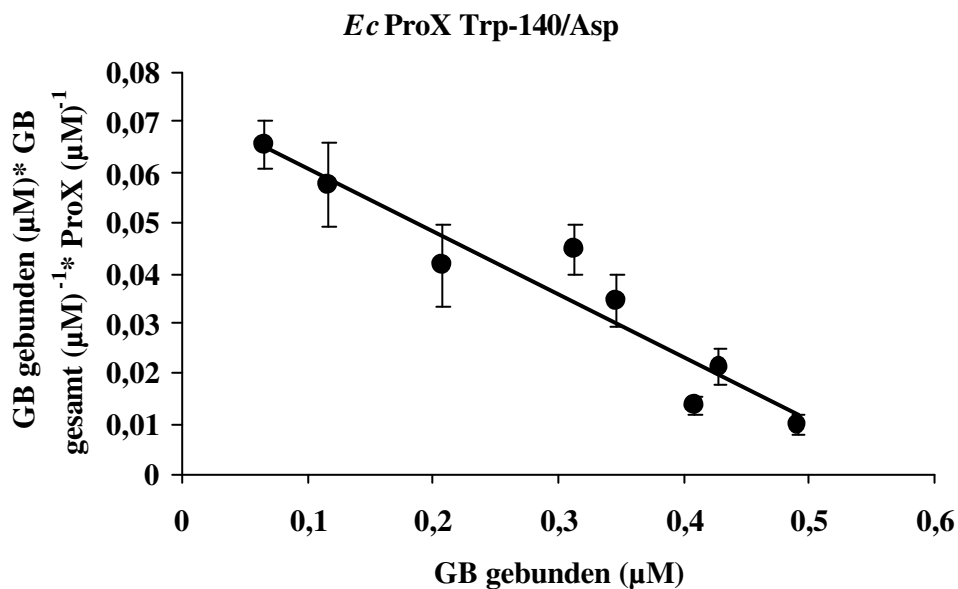


Abb.61: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-140/Asp zu ¹⁴C-markiertem Glycyl Betain. Die Auftragung ergibt eine Steigung von $-0,1258$ und ergibt eine K_D von $8 \pm 0,7 \mu\text{M}$.

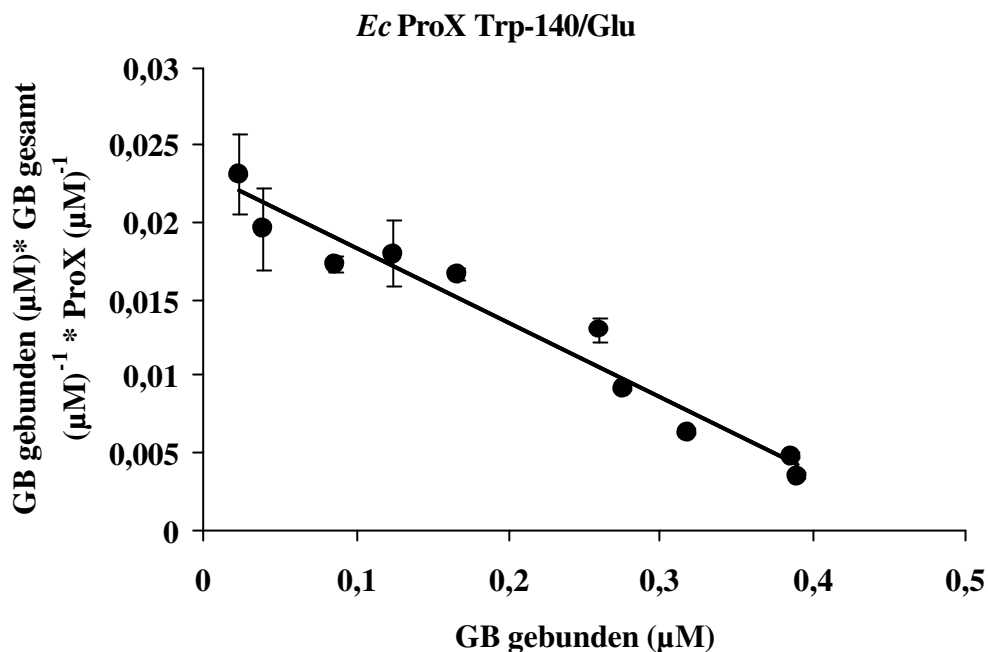


Abb.62: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-140/Glu zu ^{14}C -markiertem Glycin Betain. Die Auftragung ergibt eine Steigung von $-0,0483$ und ergibt eine K_D von $21 \pm 3 \mu\text{M}$.

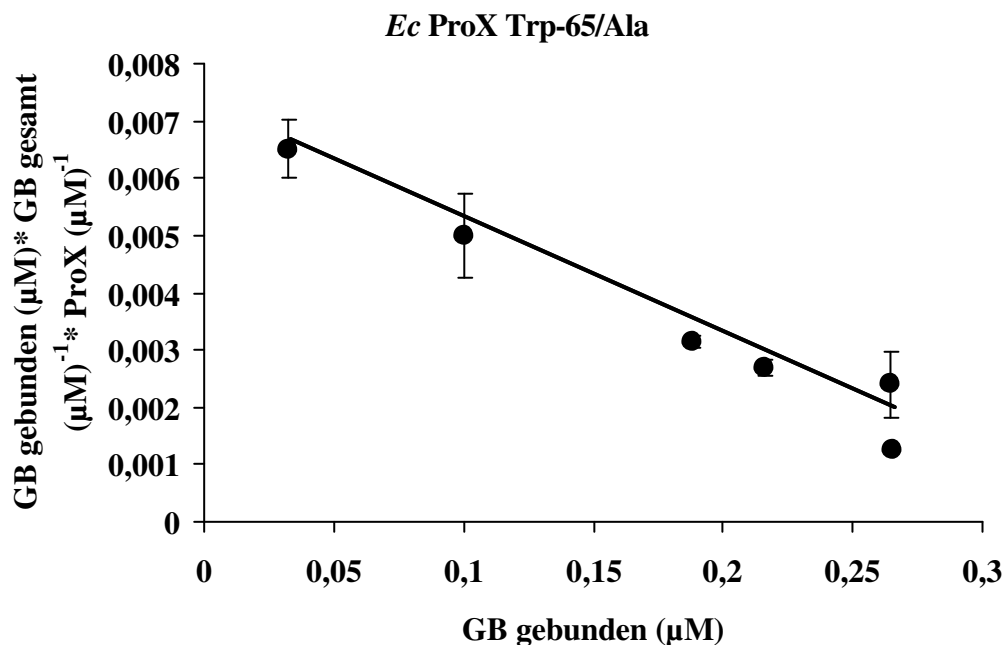


Abb.63: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-65/Ala zu ^{14}C -markiertem Glycin Betain. Die Auftragung ergibt eine Steigung von $-0,2193$ und ergibt eine K_D von $50 \pm 3 \mu\text{M}$.

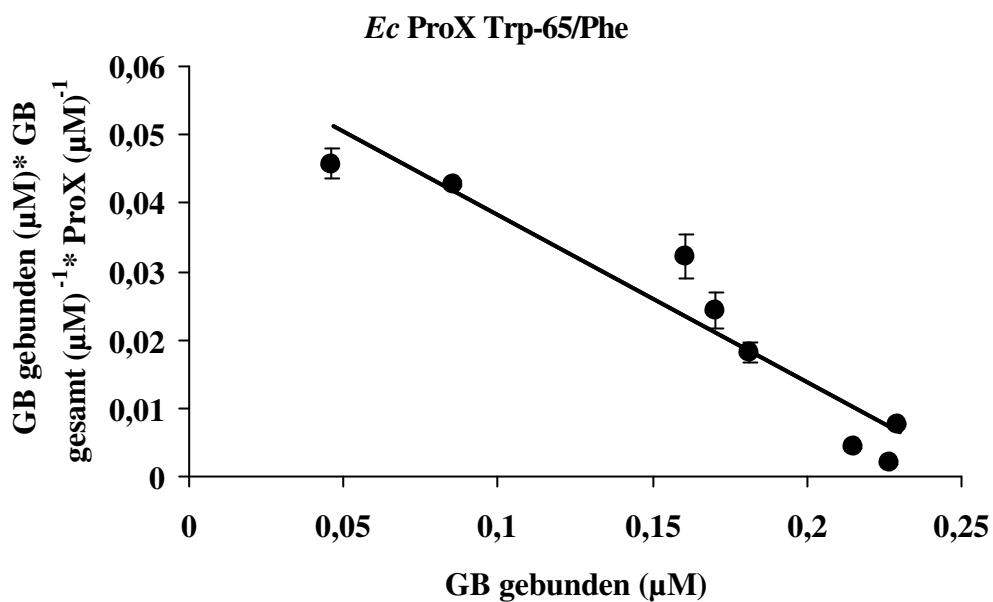


Abb.64: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-65/Phe zu ¹⁴C-markiertem Glycin Betain. Die Auftragung ergibt eine Steigung von $-0,2435$ und ergibt eine K_D von $4 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

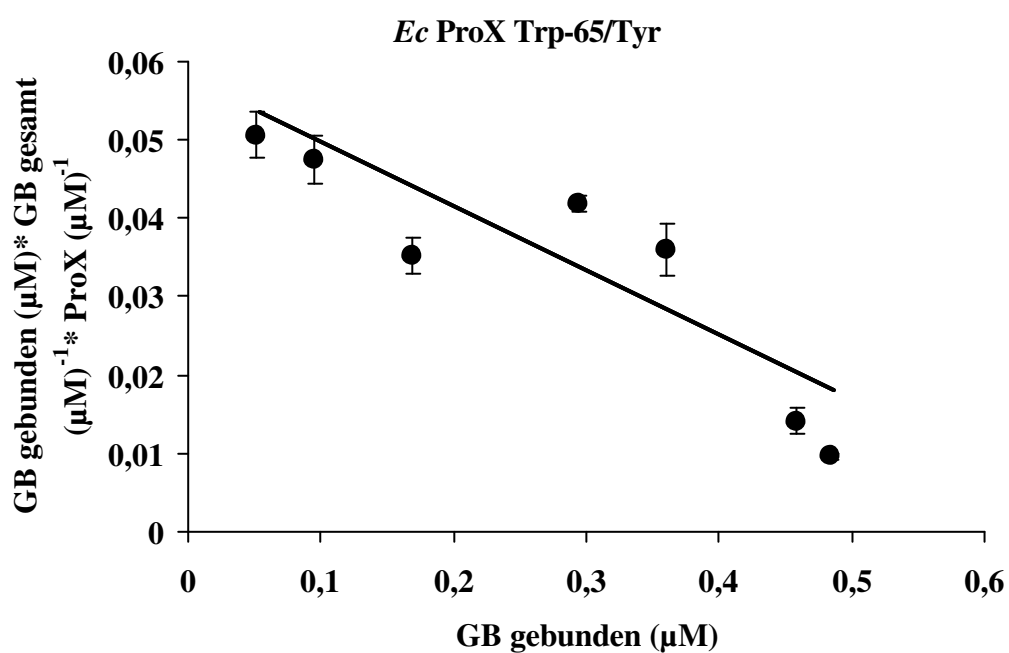


Abb.65: Scatchard plot der Affinitätsbestimmung des mutierten ProX Proteins Trp-65/Tyr zu ¹⁴C-markiertem Glycin Betain. Die Auftragung ergibt eine Steigung von $-0,81$ und ergibt eine K_D von $13 \pm 3 \mu\text{M}$.

Anhang B:

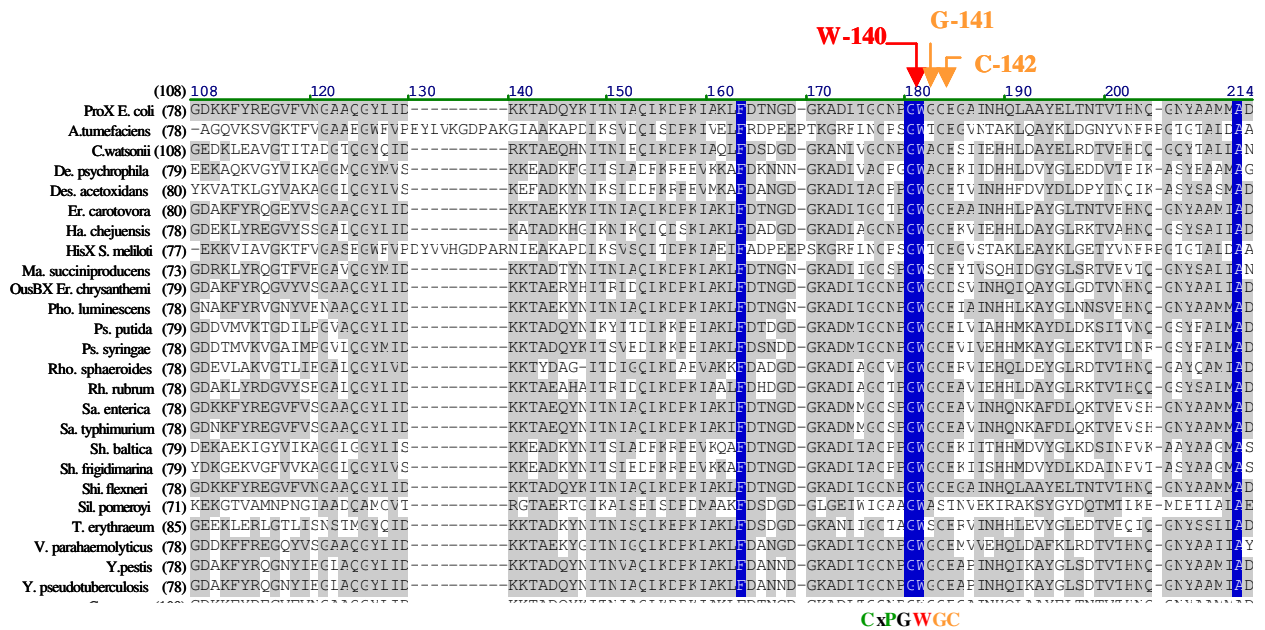
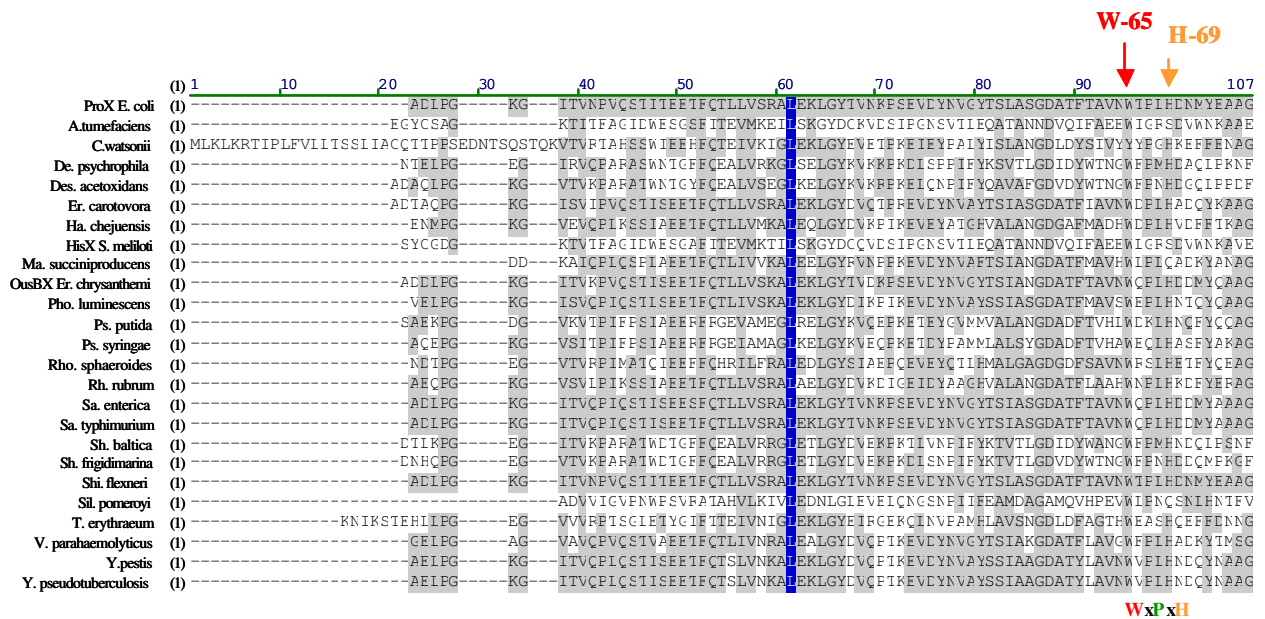
Datenbankanalyse und Aminosäuresequenzvergleich des *E. coli* ProX Proteins. In Tabelle 21 sind die Zugriffsnummern der *EcProX*-ähnlichen Proteine und die Taxonomie der Mikroorganismen aufgelistet. Abbildung 68 zeigt das Sequenzalignment.

Tab. 21: Zugriffsnummern der *EcProX*-ähnlichen Proteine und die taxonomische Einordnung der Mikroorganismen

Mikroorganismus	Zugriffsnummer	Taxonomie
<i>Escherichia coli</i> K12	NP_417165	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia</i>
<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	NP_708493	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Shigella</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi Ty2	NP_806414	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Salmonella</i>
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	NP_461737	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Salmonella.</i>
<i>Erwinia chrysanthemi</i> OusBX (<i>Pectobacterium chrysanthemi</i> = <i>Dickeya chrysanthemi</i>)	AAQ06632	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Dickeya</i>
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> SCRI1043	YP_051592	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Pectobacterium.</i>
<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> TTO1	NP_928592	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Photorhabdus</i>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953	YP_071467	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Yersinia.</i>
<i>Yersinia pestis</i> KIM	NP_668544	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Yersinia</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	NP_798107	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; Vibrio.</i>
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	ZP_00270088	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae; Rhodospirillum</i>
<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	YP_432652	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Hahellaceae; Hahella.</i>
<i>Mannheimia succiniciproducens</i> MBEL55E	YP_087743	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pasteurellales; Pasteurellaceae; Mannheimia.</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	AAF63445	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>

Fortsetzung Tab. 21

Mikroorganismen	Zugriffsnummer	Taxonomie
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	YP_345207	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria;</i> <i>Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Rhodobacter</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000	NP_792852	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;</i> <i>Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>
<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501 (<i>Synechocystis</i> sp. WH 8501)	ZP_00516539	<i>Bacteria; Cyanobacteria; Chroococcales; Crocospaera</i>
<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	ZP_00637021	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;</i> <i>Alteromonadales; Shewanellaceae; Shewanella</i>
<i>Shewanella baltica</i> OS155	ZP_00582008	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;</i> <i>Alteromonadales; Shewanellaceae; Shewanella</i>
<i>Trichodesmium</i> <i>erythraeum</i> IMS101	ZP_00671385	<i>Bacteria; Cyanobacteria; Oscillatoriales; Trichodesmium</i>
<i>Desulfuromonas</i> <i>acetoxidans</i> DSM 684	ZP_00550088	<i>Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria;</i> <i>Desulfuromonadales; Desulfuromonadaceae; Desulfuromonas</i>
<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54	YP_063944	<i>Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria;</i> <i>Desulfobacterales; Desulfobulbaceae; Desulfotalea</i>
<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> str. C58	NP_535593	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales;</i> <i>Rhizobiaceae; Agrobacterium</i>
<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	EAO44353	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;</i> <i>Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NP_253783	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;</i> <i>Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (<i>Rhizobium meliloti</i>)	NP_386806	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales;</i> <i>Rhizobiaceae; Sinorhizobium</i>
<i>Psychrobacter</i> <i>cryohalolentis</i> K5	ZP_00653415	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;</i> <i>Pseudomonadales; Moraxellaceae; Psychrobacter</i>
<i>Silicibacter pomeroyi</i>	YP_165060	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria;</i> <i>Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Silicibacter</i>



Fortsetzung auf nachfolgender Seite

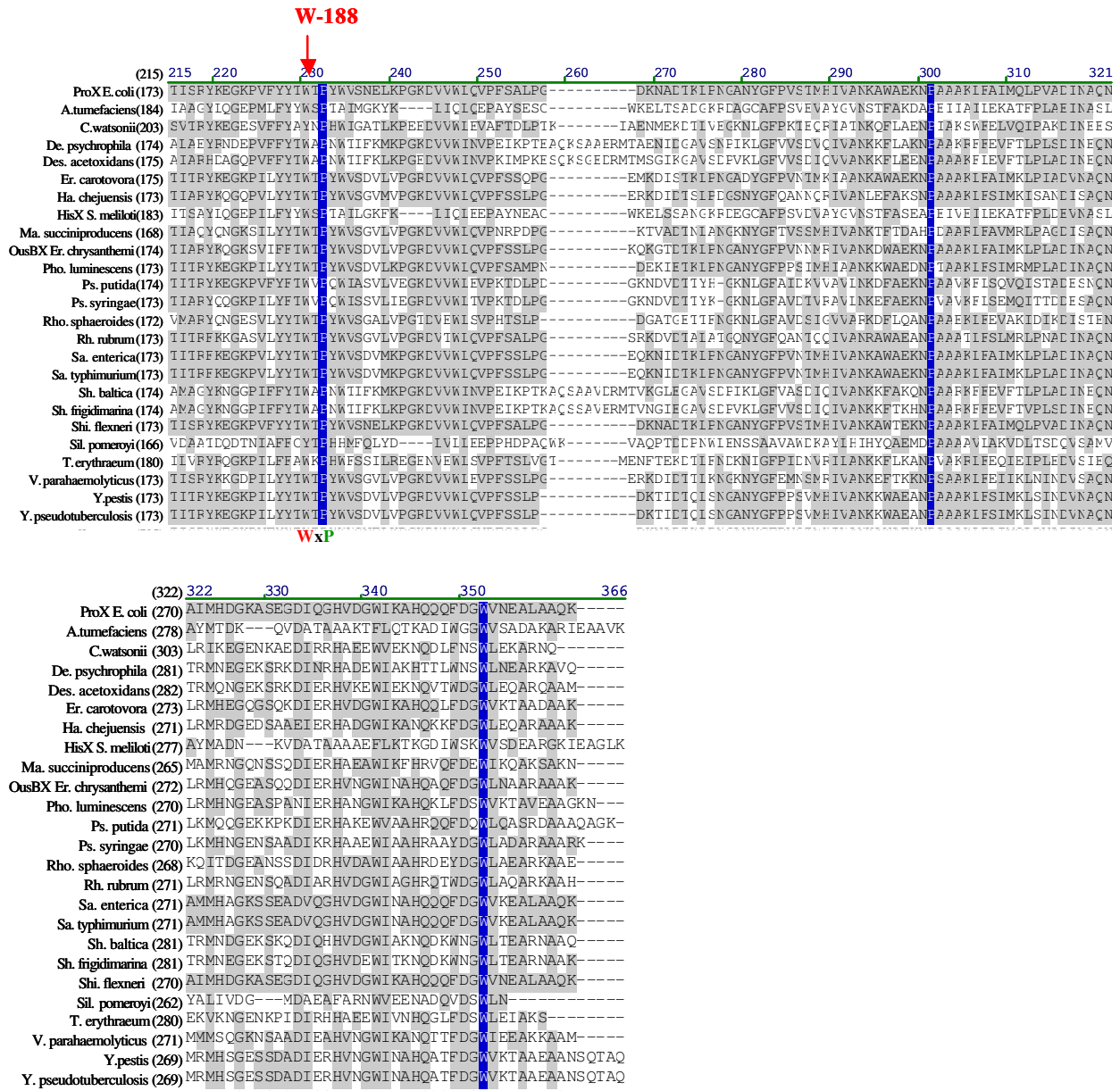


Abb.66: Aminosäuresequenzvergleich der EcProX-ähnlichen Proteine. Die Aminosäuren, die in EcProX an der Substratbindung beteiligt sind (W-65, W-140, W-188; H-69, G-141 und G142) sind im Alignment gekennzeichnet. Informationen über Taxonomie, Zugriffsnummern der Proteine oder Sequenzidentität sind Tabellen 9 und 21 zu entnehmen.

Anhang C:

Bestimmung der Bindeaffinität (K_D) der *A. fulgidus* ProX Wildtyp und Mutanten zu seinen Substraten Glycin Betain und Prolin Betain mittels Fluoreszenzspektroskopie durch die Auswertung der Fluoreszenzänderung während der Titration von Substrat. Die K_D wird aus der Formel

$$F = F_0 + (\Delta F / 2 * P_0) * [(K_D + P_0 + L_0) - ((K_D + P_0 + L_0)^2 - 4 * L_0 * P_0)^{1/2}] \text{ berechnet,}$$

wobei F die gemessene Fluoreszenz, F_0 die Fluoreszenz des freien Proteins, ΔF die Änderung der Fluoreszenz bei Sättigung, L_0 die Substratkonzentration, P_0 die Proteinkonzentration und K_D die Affinitätskonstante bedeuten.

AfProX Tyr-214/Ala mit Glycin Betain und Prolin Betain

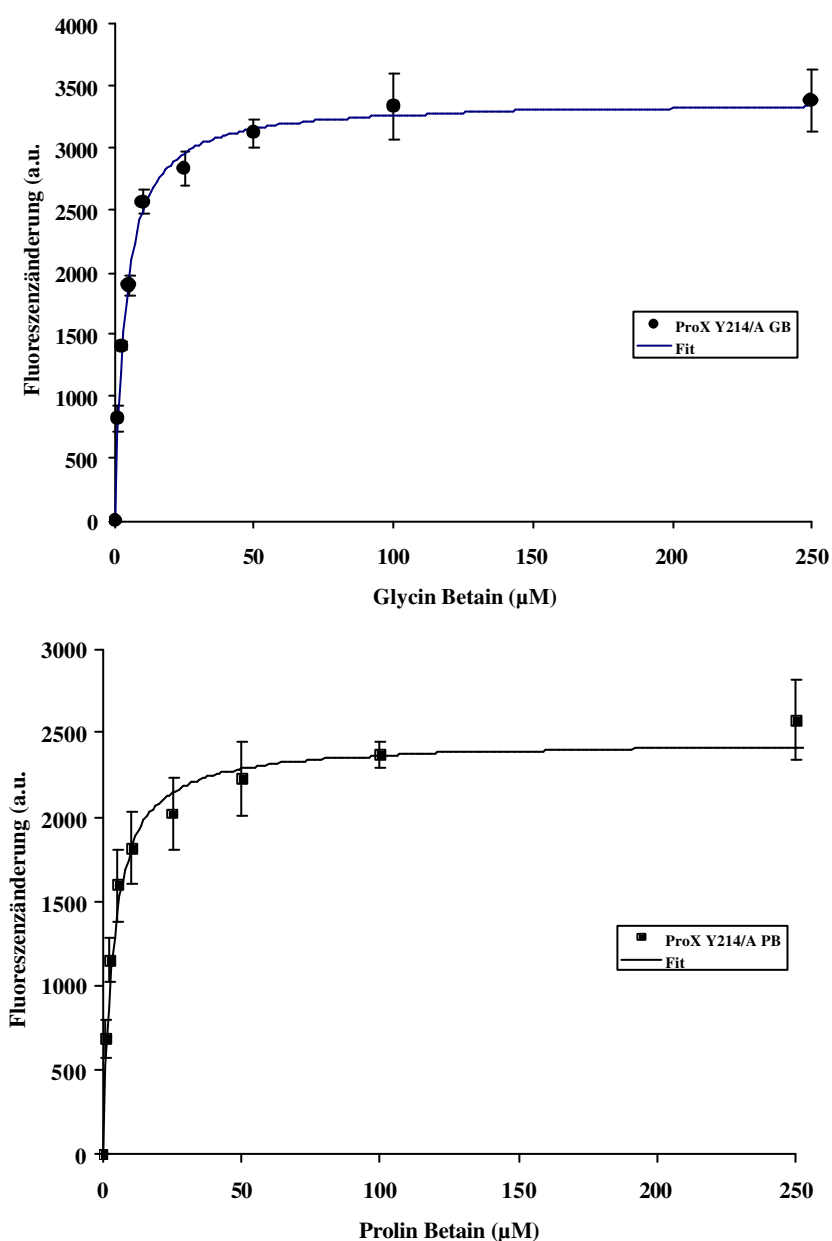


Abb.67: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten AfProX Proteins Tyr-214/Ala durch die Titration mit Glycin Betain oder Prolin Betain. Die Auswertung der Messdaten ergab die Bindekonstanten K_D Glycin Betain = 3,5 +/- 0,7 µM und K_D Prolin Betain = 3,5 +/- 0,7 µM.

A/ProX Tyr-190/Ala mit Glycin Betain und Prolin Betain

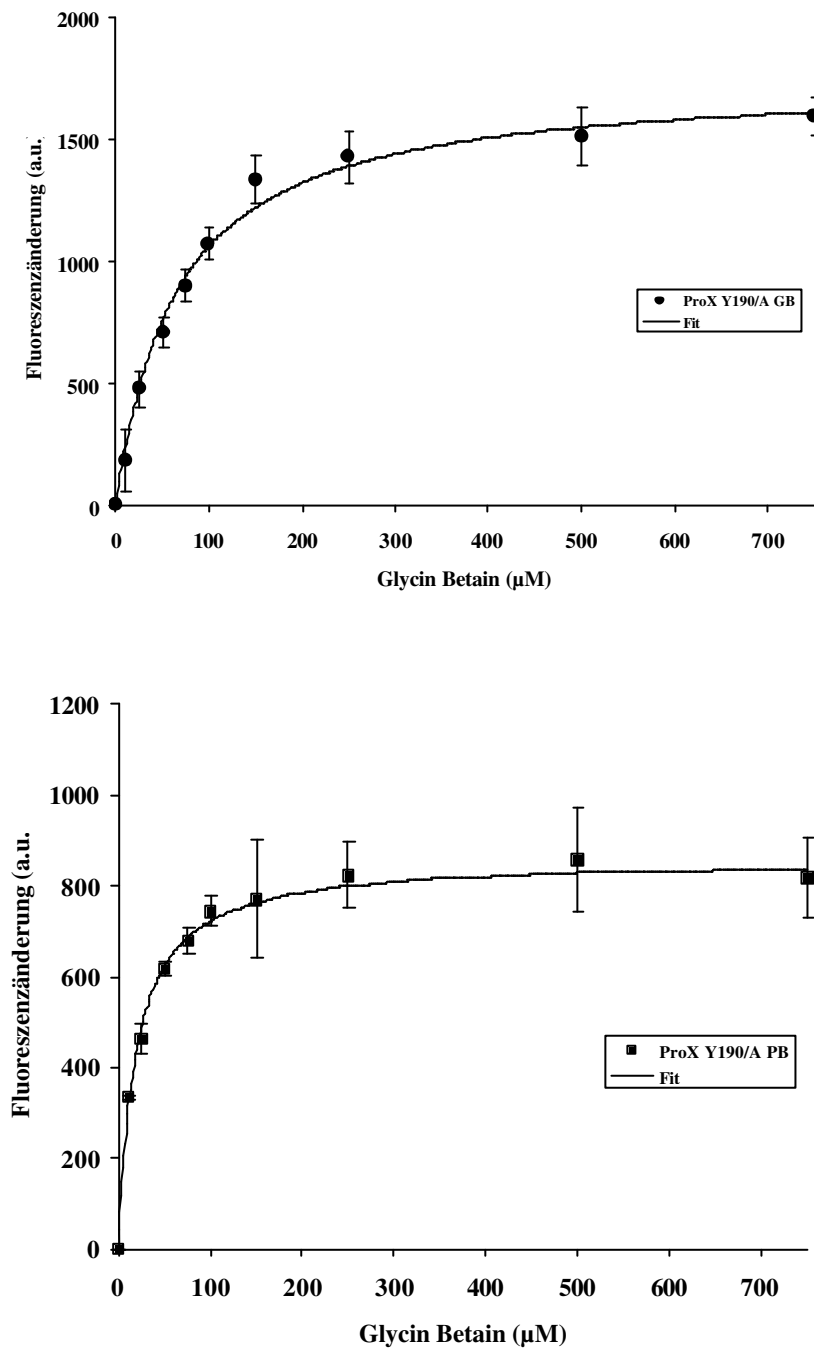


Abb.68: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten AfProX Proteins Tyr-190/Ala durch die Titration mit Glycin Betain oder Prolin Betain. Die Auswertung der Messdaten ergaben die Bindekonstanten K_D Glycin Betain = $67 \pm 9 \mu\text{M}$ und K_D Prolin Betain = $19 \pm 5 \mu\text{M}$.

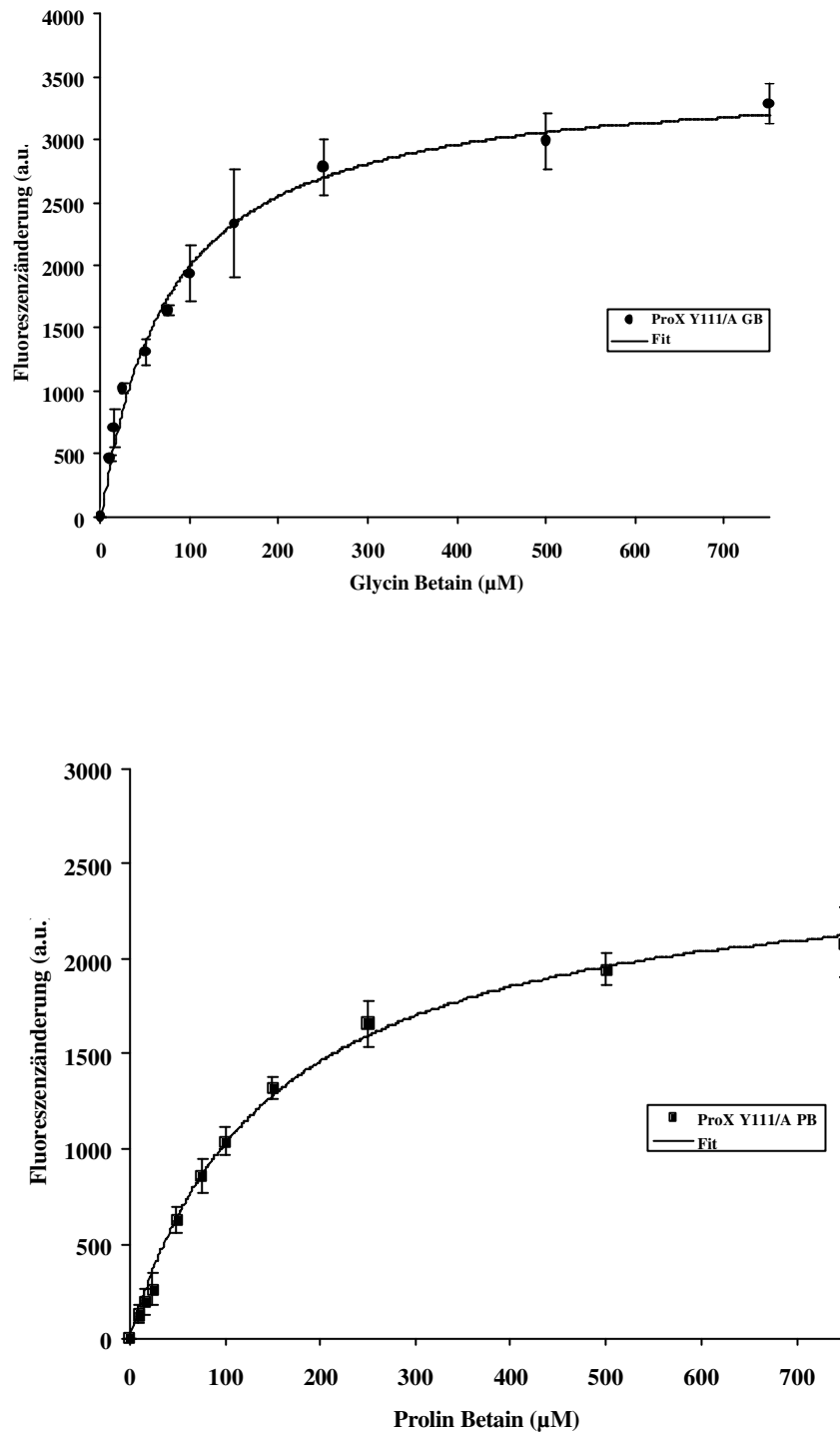
AfProX Tyr-111/Ala mit Glycin Betain und Prolin Betain

Abb.69: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten AfProX Proteins Tyr-111/Ala durch die Titration mit Glycin Betain oder Prolin Betain. Die Auswertung der Messdaten ergaben die Bindekonstanten K_D Glycin Betain = $76 \pm 4 \mu\text{M}$ und K_D Prolin Betain = $148 \pm 28 \mu\text{M}$.

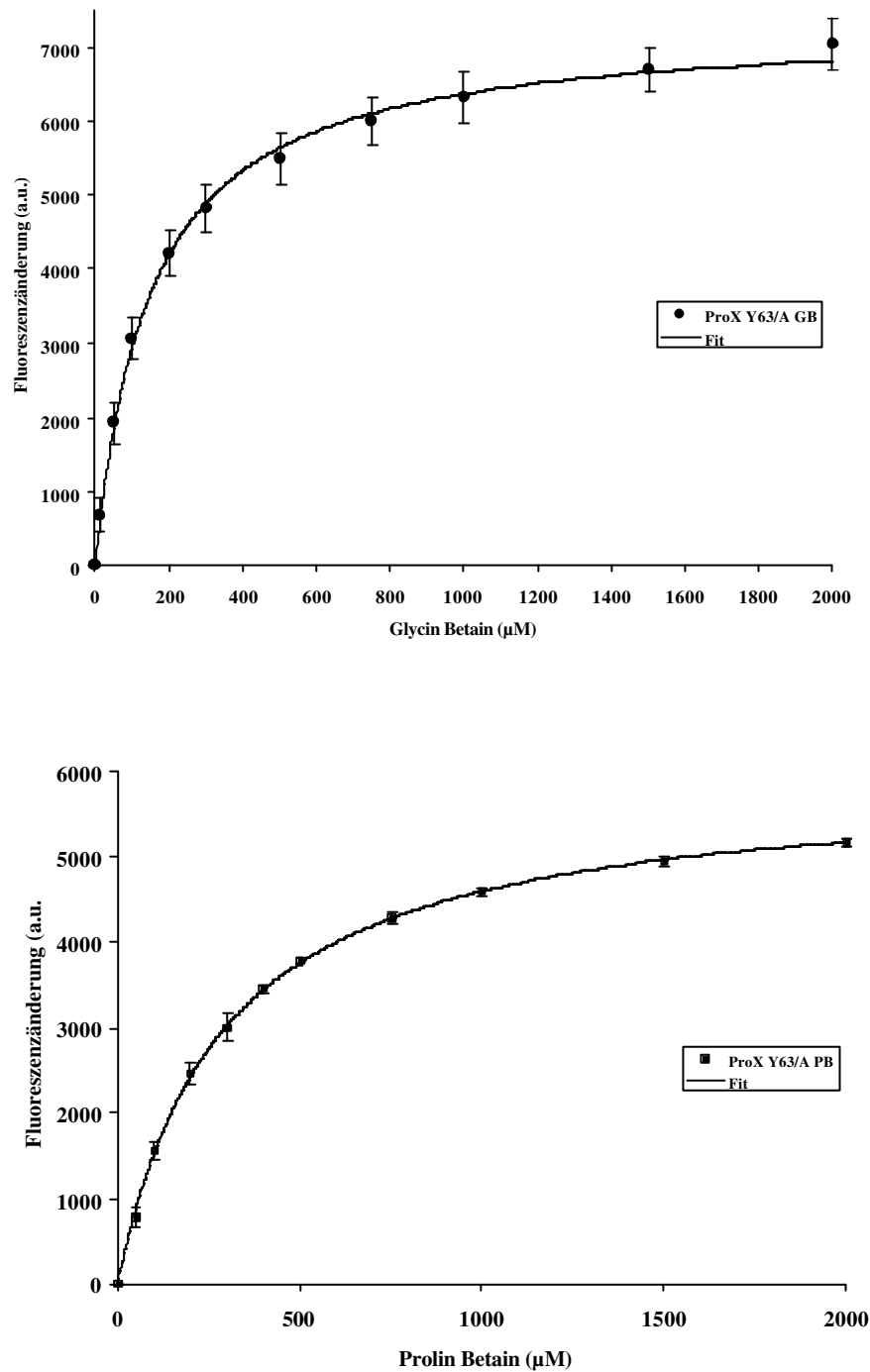
AfProX Tyr-63/Ala mit Glycin Betain und Prolin Betain

Abb.70: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten AfProX Proteins Tyr-63/Ala durch die Titration mit Glycin Betain oder Prolin Betain. Die Auswertung der Messdaten ergab die Bindekonstanten K_D Glycin Betain = $149 \pm 17 \mu\text{M}$ und K_D Prolin Betain = $288 \pm 26 \mu\text{M}$

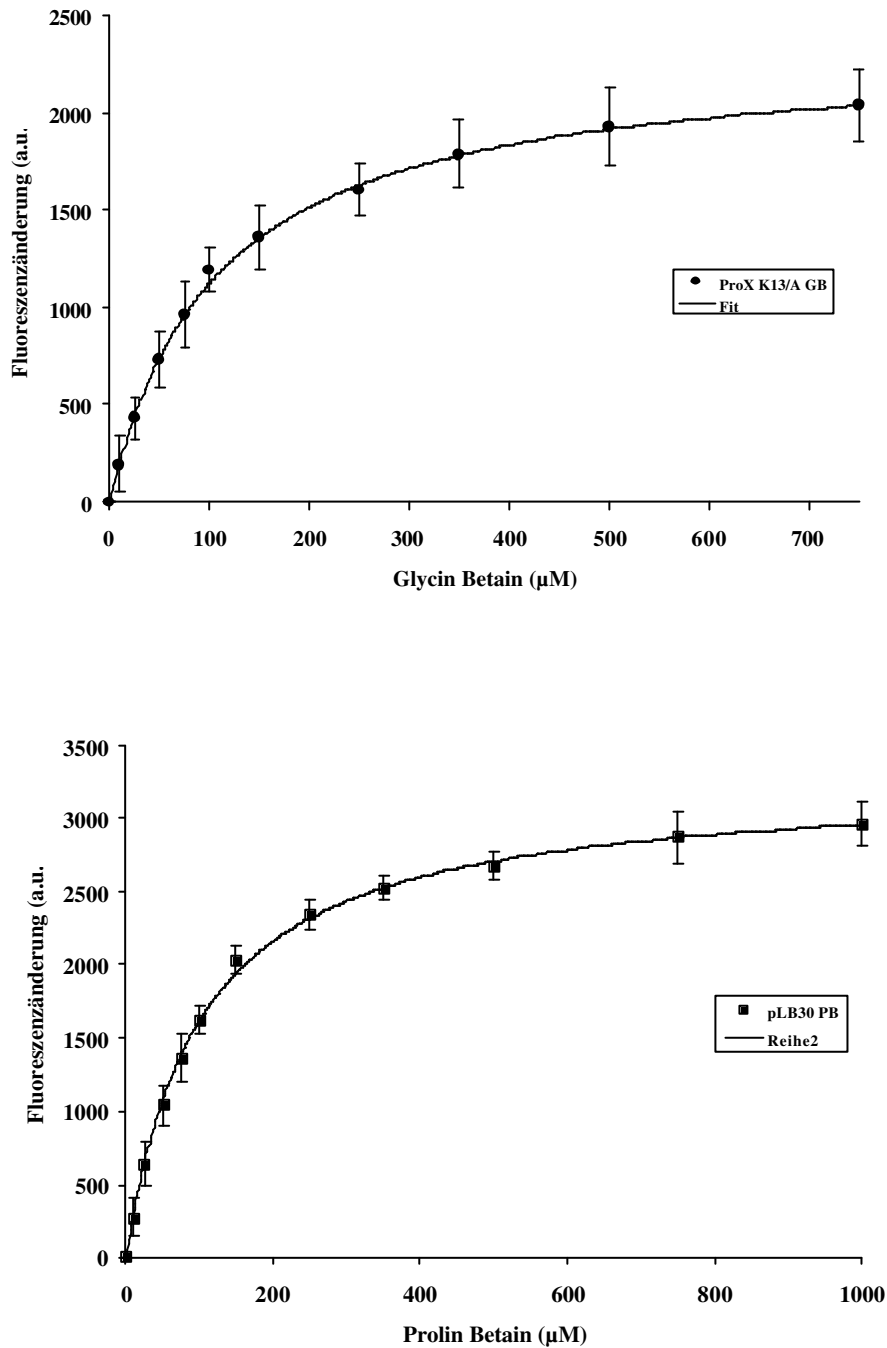
AfProX Lys-13/Ala mit Glycin Betain und Prolin Betain

Abb.71: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten AfProX Proteins Lys/Ala durch die Titration mit Glycin Betain oder Prolin Betain. Die Auswertung der Messdaten ergab die Bindekonstanten K_D Glycin Betain = 107 +/- 20 μM und K_D Prolin Betain = 101 +/- 12 μM.

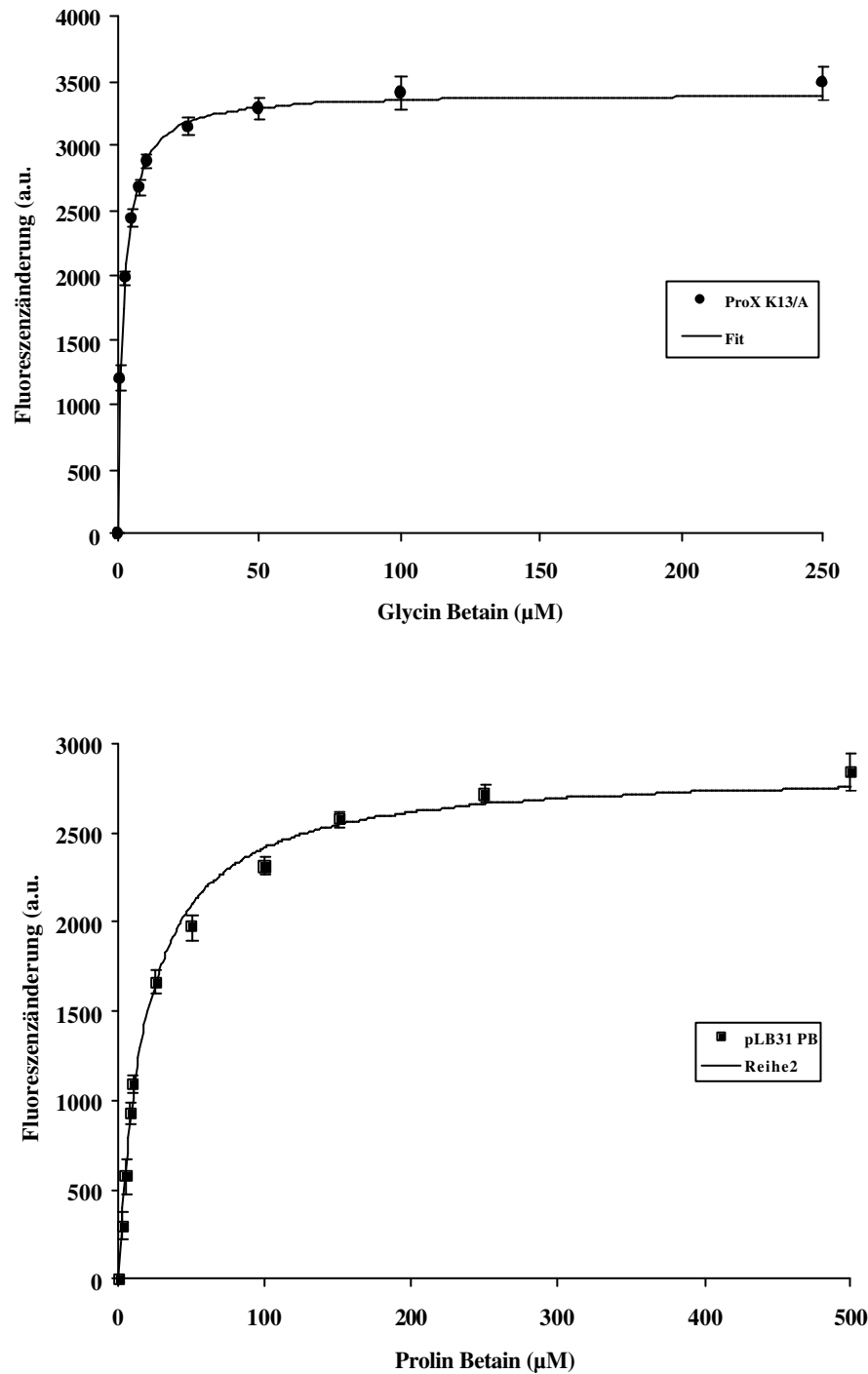
AfProX Thr-66/Ala mit Glycin Betain und Prolin Betain

Abb.72: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten AfProX Proteins Thr-66/Ala durch die Titration mit Glycin Betain oder Prolin Betain. Die Auswertung der Messdaten ergab die Bindekonstanten K_D Glycin Betain = $1,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ und K_D Prolin Betain = $18 \pm 1,4 \mu\text{M}$.

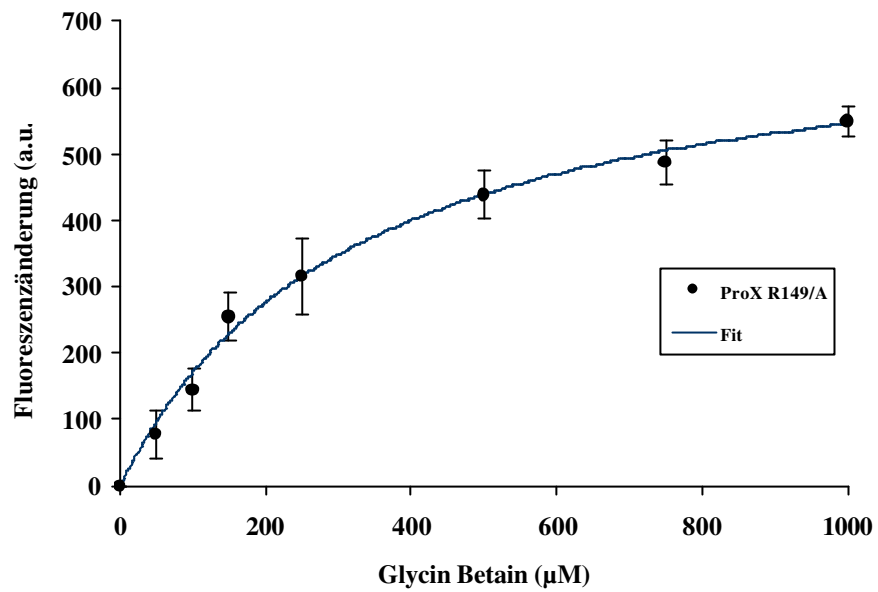
AfProX Arg-149/Ala mit Glycin Betain

Abb.73: Auftragung der Fluoreszenzänderung des mutierten AfProX Proteins Arg-149/Ala durch die Titration mit Glycin Betain. Die Auswertung der Messdaten ergab die Bindekonstante K_D Glycin Betain = 320 ± 60 μM, für Prolin Betain war keine eindeutige Bindung zu beobachten.

Anhang D:

Datenbankanalysen und Aminosäuresequenzvergleiche des AfProX Proteins Datenbank. In Tabelle 22 sind die Zugriffsnummern der AfProX-ähnlichen Proteine und die Taxonomie der Mikroorganismen aufgelistet, die eine Sequenzidentität von mindestens 36% aufweisen, eine Ausnahme bildet das OpuCC Protein von *B. subtilis*. Abbildung 76 zeigt das Sequenzalignment dieser AfProX-ähnlichen Proteine. In Tabelle 23 sind die Proteine mit einer Sequenzidentität von mindestens 33% gezeigt.

Tab.22: Zugriffsnummern der AfProX-ähnlichen Proteine mit mindestens 36% Sequenzidentität und die taxonomische Einordnung der Mikroorganismen

Mikroorganismus	Zugriffsnummer	Taxonomie
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304	NP_069815	Archaea; Euryarchaeota; Archaeoglobi; Archaeoglobales; Archaeoglobaceae; Archaeoglobus
<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	NP_632322	Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae; Methanosarcina
<i>Methanococcoides burtonii</i> DSM 6242	ZP_00562555	Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae; Methanococcoides
<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	YP_430530	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Thermoanaerobacteriales; Thermoanaerobacteriaceae; Moorella group; Moorella
<i>Streptococcus suis</i> 89/1591	ZP_00875663	Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Streptococcaceae; Streptococcus
<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	YP_146168	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	NP_349452	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales
<i>Polaromonas</i> sp. JS666	ZP_00503352	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Polaromonas
<i>Erythrobacter litoralis</i> HTCC2594	ZP_00375417	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Erythrobacter
<i>Clostridium tetani</i> E88	NP_781073	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium
<i>Oceanicaulis alexandrii</i> HTCC2633	ZP_00957995	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Hyphomonadaceae; Oceanicaulis
<i>Symbiobacterium thermophilum</i> IAM 14863	YP_076456	Bacteria; Actinobacteria; Symbiobacterium
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5	ZP_00802898	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Rhodopseudomonas
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	ZP_00403852	Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Streptococcaceae; Streptococcus
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	ZP_00461141	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	AAN40984	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium
<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	ZP_00629733	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Paracoccus
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	NP_923836	Bacteria; Cyanobacteria; Gloeobacteria; Gloeobacterales; Gloeobacter
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC BAA-365	ZP_00387120	Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus
<i>Bacillus subtilis</i> OpuCC	O32243	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
<i>Bacillus subtilis</i> OpuBC	Q45462	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.

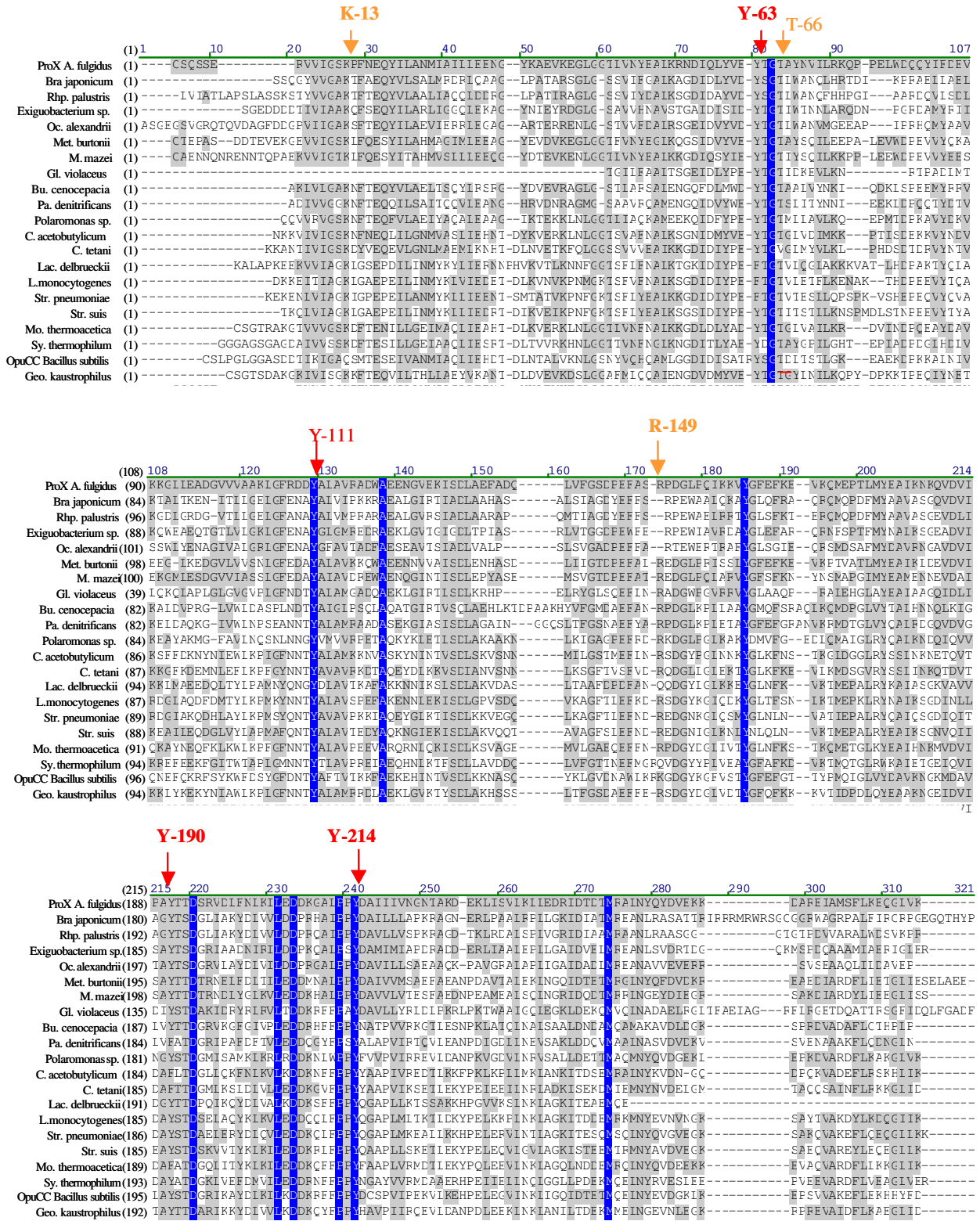


Abb.74: Aminosäuresequenzvergleich der A/ProX ähnlichen Proteine. Die Aminosäuren, die in A/ProX an der Substratbindung beteiligt sind (Y-63, Y-111, Y-190; Y214, K-13, T-66 und R-149) sind im Alignment gekennzeichnet. Informationen über Taxonomie, Zugriffsnummern der Proteine oder Sequenzidentität sind Tabellen 12 und 22 zu entnehmen.

Tab.23: Zugriffsnummern der AfProX-ähnlichen Proteine mit einer Sequenzidentität von mindestens 33% und die taxonomische Einordnung der Mikroorganismen

Mikroorganismus Zugriffsnummer	Sequenzidentität zu AfProX (Gram)	Konservierung der bindungsrelevanten Aminosäuren	Taxonomie
<i>Listeria monocytogenes</i> str. 1/2a F6854ZP_00232983	35% (+)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales;</i> <i>Listeriaceae; Listeria</i>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	34% (+)	Y-63/F	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales;</i> <i>Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus</i> <i>group</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>serovar konkukian</i> str. 97- 27 YP_036392	34% (+)	Y-63/F	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales;</i> <i>Bacillaceae; Bacillus; Bacillus</i> <i>cereus group</i>
<i>Streptococcus mutans</i> UA159 NP_721486	35 (+)	Y-63/F	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales;</i> <i>Streptococcaceae; Streptococcus</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>subsp. vincentii</i> ATCC 49256 ZP_00143727	34%	Y-190/F	<i>Bacteria; Fusobacteria; Fusobacteria</i> <i>(class); Fusobacteriales; Fusobacteriaceae;</i> <i>Fusobacterium</i>
<i>Bacillus anthracis</i> str. A2012 ZP_00392545	34% (+)	Y-63/F	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales;</i> <i>Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus</i> <i>group</i>
<i>Clostridium beijerincki</i> NCIMB 8052 ZP_00911749	34% (+)	Y-190/F	<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia;</i> <i>Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium</i>
<i>Enterococcus faecium</i> DO ZP_00605071	34% (+)	Y-63/F	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales;</i> <i>Enterococcaceae; Enterococcus</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i> SSI-1 NP_802253	34% (+)	Y-63/F	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales;</i> <i>Streptococcaceae; Streptococcus</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS315 NP_664596	34% (+)	Y-63/F	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales;</i> <i>Streptococcaceae; Streptococcus</i>
<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp.</i> <i>cremoris</i> SK11 ZP_00383471	34% (+)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales;</i> <i>Streptococcaceae; Lactococcus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> V583 NP_814426	35% (+)	Y-63/F	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales;</i> <i>Enterococcaceae; Enterococcus</i>
<i>Desulfotobacterium</i> <i>hafniense</i> DCB-2 ZP_00558634	35% (+)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia;</i> <i>Clostridiales; Peptococcaceae;</i> <i>Desulfotobacterium</i>
<i>Helicobacter pylori</i> J99 NP_223475	33% (+)	Y-190/F	<i>Bacteria; Proteobacteria;</i> <i>Epsilonproteobacteria; Campylobacteriales;</i> <i>Helicobacteraceae; Helicobacter</i>
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16 BAD64526	34% (+)	Y-63/F Y-190/F	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales;</i> <i>Bacillaceae; Bacillus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i> 2603V/R NP_689115	34% (+)	Y-63/F	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales;</i> <i>Streptococcaceae; Streptococcus</i>
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Nb-255 YP_318946	34% (-)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Proteobacteria;</i> <i>Alphaproteobacteria;</i> <i>Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Nitrobacter</i>
<i>Burkholderia fungorum</i> LB400 ZP_00279139	36% (-)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Proteobacteria;</i> <i>Betaproteobacteria; Burkholderiales;</i> <i>Burkholderiaceae; Burkholderia</i>

Fortsetzung Tab.23

Mikroorganismus Zugriffsnummer	Sequenzidentität zu AfProX (Gram)	Konservierung der bindungsrelevanten Aminosäuren	Taxonomie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 NP_252578	35% (-)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K YP_396480	33% (+)	Y-63/F R-149/Q	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus</i>
<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1 ZP_00611958	33% (-)	Y-190/F	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Phyllobacteriaceae; Mesorhizobium</i>
<i>Rubrobacter xylophilus</i> DSM 9941 ZP_00602398	34% (+)	Y-190/F	<i>Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae; Rubrobacterales; Rubrobacterineae; Rubrobacteraceae; Rubrobacter</i>
<i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855 YP_446572	34% (+)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Crenotrichaceae; Salinibacter</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCSC1435 YP_252523	33% (+)	K-13/T	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Staphylococcus</i>
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14 ZP_00624209	33% (-)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Nitrobacter</i>
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 (DSM 13) OpuCC YP_093163	33% (+)	K-13/Q	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus</i>
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 YP_296700	35% (-)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Cupriavidus</i>
<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831 NP_692612	33% (+)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Oceanobacillus.</i>
<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043 ZP_00473538	33% (-)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Halomonadaceae; Chromohalobacter</i>
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34 ZP_00594830	34% (-)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Cupriavidus</i>
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 ZP_00385978	33% (+)	K-13/Q	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus</i>
<i>Pseudomonas putida</i> F1 ZP_00902688	33% (-)	K-13/R T-66/V	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i> UW551 ZP_00946070	33% (-)	Wie AfProX	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Ralstonia</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1 YP_346537	33% (-)	K-13/R	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>

Anhang E:

Datenbankanalysen und Aminosäuresequenzvergleiche des *BsOpuAC* Proteins. In Tabelle 24 sind die Zugriffsnummern der *BsOpuAC*-ähnlichen Proteine der Gruppe 1 und die Taxonomie der Mikroorganismen aufgelistet, Abbildung 77 zeigt das zugehörige Sequenzalignment. In Tabelle 25 ist eine Auswahl an *BsOpuAC*-ähnlichen Proteinen der Gruppe 2 mit deren Zugriffsnummern und taxonomischer Einordnung der Mikroorganismen gezeigt und in Abbildung zeigt das zugehörige Sequenzalignment. In Tabelle 26 sind schließlich *OpuAC*-ähnliche Proteine der Gruppe 2 aufgelistet, die mit denen in Tabelle 25 zusammen die Grundlage für Abbildung 32 (Ergebnisse, Seite 84) bilden.

Tab. 24: Zugriffsnummern von *BsOpuAC*-ähnlichen Proteinen der Gruppe 1 und die taxonomische Einordnung der Mikroorganismen

Mikroorganismus	Zugriffsnummer	Taxonomie
<i>Bacillus subtilis</i>	P46922	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus</i>
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 (DSM 13)	YP_092193	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	AAD29106	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Listeriaceae; Listeria</i>
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	ZP_00384663	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus</i>
<i>Halobacillus trueperi</i>	AAV48567	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Halobacillus</i>
<i>Oceanobacillus theyensis</i> HTE831	NP_690948	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Oceanobacillus</i>
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	YP_174573	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus</i>
<i>Lactobacillus sakei subsp. sakei</i> 23K	YP_396307	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus</i>
<i>Listeria innocua</i> Clip11262	NP_470352	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Listeriaceae; Listeria</i>

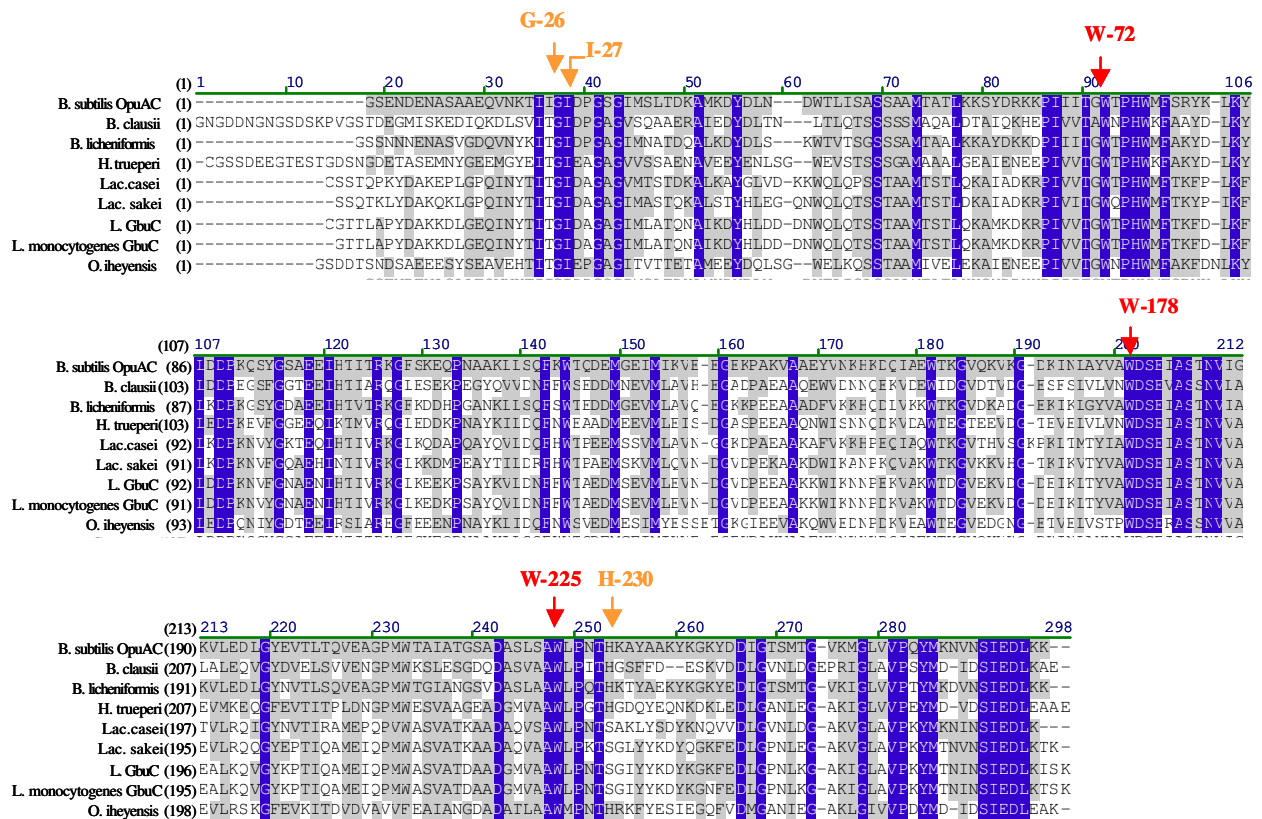


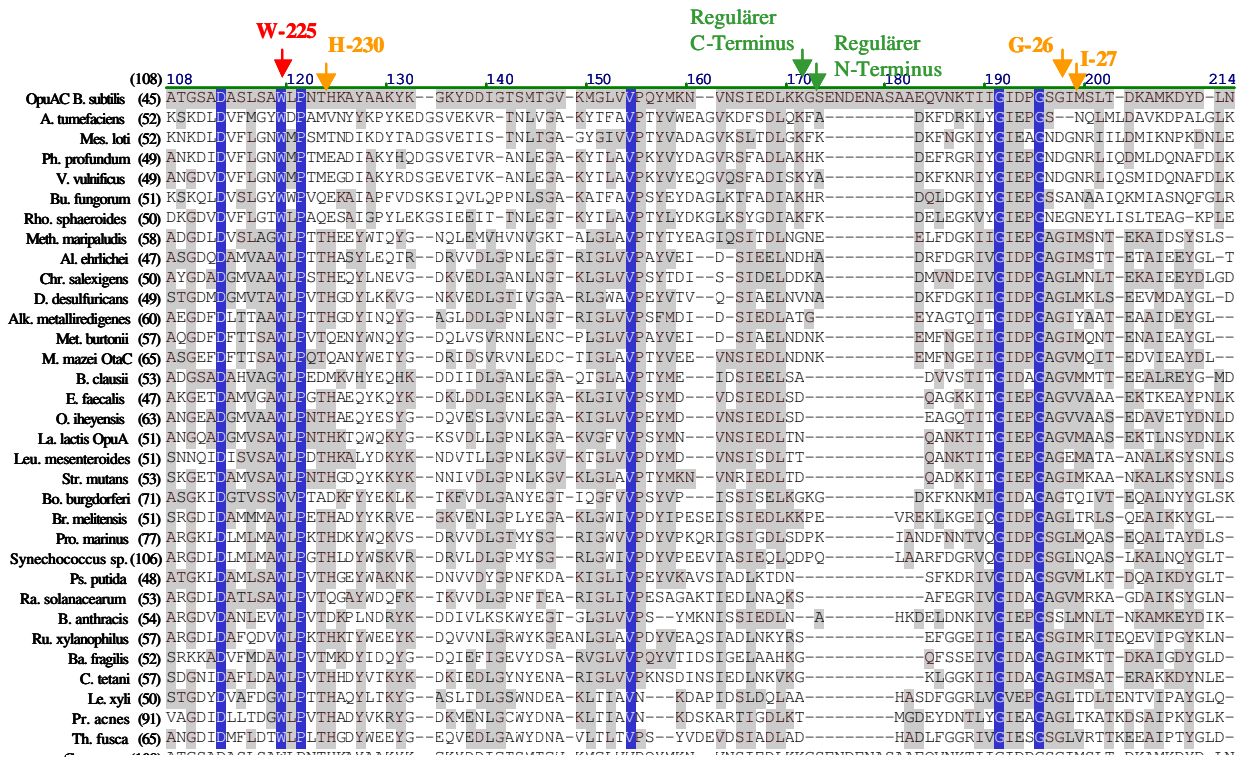
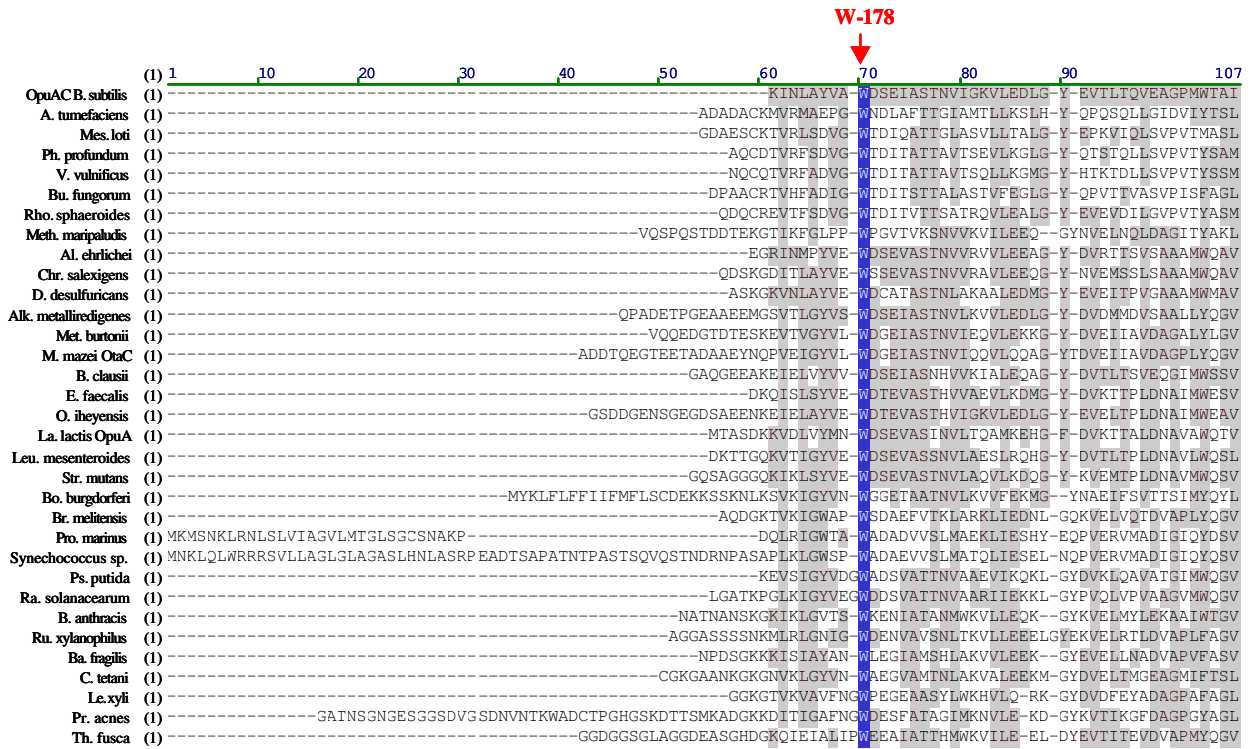
Abb.75: Aminosäuresequenzvergleich der BsOpuAC-ähnlichen Proteine der Gruppe 1. In diesem „Alignment“ werden die Aminosäuresequenzen der Proteine mit verglichen, welche die gleiche Domänen-Orientierung wie *BsOpuAC* besitzen. Die Aminosäuren, die in *BsOpuAC* an der Substratbindung beteiligt sind (W-72, W-178, W-225; G-26, I-27 und H-230) sind im Alignment gekennzeichnet. Informationen über Taxonomie, Zugriffsnummern der Proteine oder Sequenzidentität sind Tabellen 13 und 24 zu entnehmen.

Tab.25: BsOpuAC-ähnliche Proteine der Gruppe 2 („domain dislocation“) aus Alignment (Abb.76) mit deren Zugriffsnummern und taxonomischer Einordnung der Mikroorganismen.

<i>Mikroorganismus</i>	<i>Zugriffsnummer</i>	<i>Taxonomie</i>
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	NP_721454	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales;</i> <i>Streptococcaceae; Streptococcus</i>
<i>Chromohalobacter</i> <i>salexigens</i> DSM 3043	ZP_00473190	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;</i> <i>Oceanospirillales; Halomonadaceae;</i> <i>Chromohalobacter</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	NP_816280	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales;</i> <i>Enterococcaceae; Enterococcus</i>
<i>Lactococcus lactis</i> OpuA	AAF40474	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales;</i> <i>Streptococcaceae; Lactococcus</i>
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	NP_743897	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;</i> <i>Pseudomonadales; Pseudomonadaceae;</i> <i>Pseudomonas</i>
<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	ZP_00063413	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Leuconostoc</i>
<i>Methanosarcina mazei</i> OtaC	AAL86440	<i>Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia;</i> <i>Methanosarcinales; Methanosarcinaceae;</i> <i>Methanosarcina</i>
<i>Bacillus clausii</i> KSM- K16	YP_174482	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae;</i> <i>Bacillus</i>
<i>Alkalilimnicola</i> <i>ehrlichei</i> MLHE-1	ZP_00865303	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;</i> <i>Chromatiales; Ectothiorhodospiraceae;</i> <i>Alkalilimnicola</i>
<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames	NP_845136	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae;</i> <i>Bacillus; Bacillus cereus group</i>
<i>Clostridium tetani</i> E88	NP_782879	<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales;</i> <i>Clostridiaceae; Clostridium</i>
<i>Oceanobacillus</i> <i>ihyensensis</i> HTE831	NP_694376	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae;</i> <i>Oceanobacillus</i>
<i>Burkholderia</i> <i>fungorum</i> LB400	ZP_00282371	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria;</i> <i>Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia</i>
<i>Methanococcoides</i> <i>burtonii</i> DSM 6242	ZP_00562543	<i>Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia;</i> <i>Methanosarcinales; Methanosarcinaceae;</i> <i>Methanococcoides</i>
<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	YP_100612	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidetes (class);</i> <i>Bacteroidales; Bacteroidaceae; Bacteroides</i>
<i>Prochlorococcus</i> <i>marinus</i> str. MIT 9313	NP_894388	<i>Bacteria; Cyanobacteria; Prochlorales;</i> <i>Prochlorococcaceae;</i> <i>Prochlorococcus</i>
<i>Alkaliphilus</i> <i>metalliredigenes</i> QYMF	ZP_00801315	<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales;</i> <i>Clostridiaceae; Alkaliphilus</i>
<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i> GMI1000	NP_521625	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria;</i> <i>Burkholderiales; Burkholderiaceae; Ralstonia</i>

Fortsetzung Tab.25:

Mikroorganismen	Zugriffsnummer	Taxonomie
<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102	NP_898008	Bacteria; Cyanobacteria; Chroococcales; <i>Synechococcus</i>
<i>Brucella melitensis</i> 16M	NP_541528	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae; <i>Brucella</i>
<i>Desulfovibrio</i> <i>desulfuricans</i> G20	YP_387171	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae; <i>Desulfovibrio</i>
<i>Rubrobacter</i> <i>xylanophilus</i> DSM 9941	ZP_00601123	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae; Rubrobacterales; Rubrobacterineae; Rubrobacteraceae; <i>Rubrobacter</i>
<i>Methanococcus</i> <i>maripaludis</i> S2	NP_987986	Archaea; Euryarchaeota; Methanococci; Methanococcales; Methanococcaceae; <i>Methanococcus</i>
<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> str. C58	NP_356684	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; <i>Agrobacterium</i>
<i>Thermobifida fusca</i> YX	YP_290984	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Streptosporangineae; Nocardiopsaceae; <i>Thermobifida</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i> B31	NP_212278	Bacteria; Spirochaetes; Spirochaetales; Spirochaetaceae; <i>Borrelia</i> ; <i>Borrelia burgdorferi</i> group
<i>Rhodobacter</i> <i>sphaeroides</i> ATCC 17025	ZP_00915391	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; <i>Rhodobacter</i>
<i>Propionibacterium</i> <i>acnes</i> KPA171202	YP_056180	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Propionibacterineae; Propionibacteriaceae; <i>Propionibacterium</i>
<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	NP_763555	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; <i>Vibrio</i>
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> str. CTCB07	YP_061936	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae; <i>Leifsonia</i>
<i>Photobacterium</i> <i>profundum</i> SS9	YP_133404	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; <i>Photobacterium</i>



Fortsetzung auf nach folgender Seite

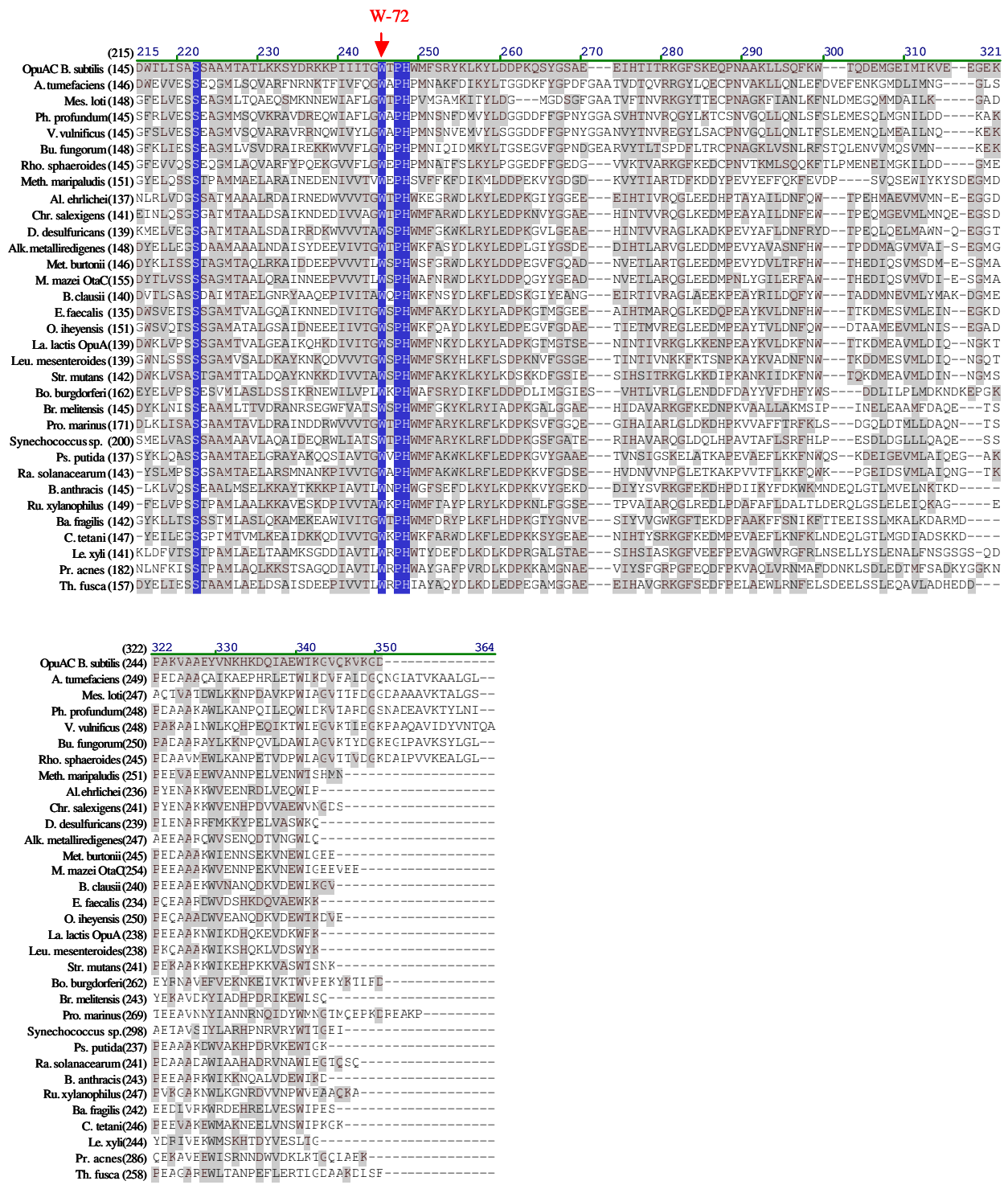


Abb. 76: Sequenzvergleich von ausgewählten *BsOpuAC*-ähnlichen Proteinen der Gruppe 2 („domain dislocation“). In diesem „Alignment“ werden die Aminosäuresequenzen der Proteine mit verglichen, in welchen die Domänen-Orientierung verglichen zu *BsOpuAC* vertauscht sind. Die Aminosäuren, die in *BsOpuAC* an der Substratbindung beteiligt sind (W-72, W-178, W-225; G-26, I-27 und H-230) sind im Alignment gekennzeichnet. Informationen über Taxonomie, Zugriffsnummern der Roteine oder Sequenzidentität sind Tabellen 14 und 25 zu entnehmen.

Tab. 26: Weitere *BsOpuAC*-ähnliche Proteine der Gruppe 2 („domain-dislocation“).

Mikroorganismus Zugriffsnummer	Konservierung der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren in <i>BsOpuAC</i>	% Sequenz- identität zu <i>BsOpuAC</i>	Taxonomie
<i>Streptococcus agalactiae</i> 515 NP_688786	Wie <i>BsOpuAC</i>	54	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Streptococcaceae; Streptococcus</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS8232 NP_606484	Wie <i>BsOpuAC</i>	53	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Streptococcaceae; Streptococcus</i>
<i>Enterococcus faecium</i> DO ZP_00603731	I-27/V	51	<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Enterococcaceae; Enterococcus</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a YP_236827	I-27/V	50	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1 YP_347338	I-27/V	49	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424 ZP_00460896	I-27/V	48	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex</i>
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4 ZP_00421206	I-27/V	48	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex</i>
<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD ZP_00689006	I-27/V	48	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex</i>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 NP_832544	H-230/D G-26/S I-27/L	47	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus group</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>serovar konkukian</i> str. 97- 27 YP_036876	H-230/D G-26/S I-27/L	47	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus group</i>
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> <i>subsp. vulgaris</i> str. Hildenborough YP_011510	I-27/L	46	<i>Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae; Desulfovibrio</i>
<i>Methanosarcina</i> <i>acetivorans</i> C2A NP_617065	Wie <i>BsOpuAC</i>	45	<i>Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae; Methanosarcina</i>
<i>Methanosarcina barkeri</i> <i>str. fusaro</i> YP_305879	Wie <i>BsOpuAC</i>	45	<i>Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae; Methanosarcina</i>

Fortsetzung Tab.26

Mikroorganismus Zugriffsnummer	Konservierung der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren in BsOpuAC	% Sequenz- identität zu BsOpuAC	Taxonomie
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI- 5482 NP_810662	H-230/M	45	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidetes (class); Bacteroidales; Bacteroidaceae; Bacteroides</i>
<i>Brucella suis</i> 1330 NP_699915	I-27/L	44	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae; Brucella</i>
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 YP_299005	H-230/Q I-27/V	44	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Cupriavidus</i>
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2 ZP_00557894	Wie BsOpuAC	43	<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae; Desulfitobacterium</i>
<i>Borrelia garinii</i> PBi YP_072594	H-230/D I-27/T	35	<i>Bacteria; Spirochaetes; Spirochaetales; Spirochaetaceae; Borrelia; Borrelia burgdorferi group</i>
<i>Brevibacterium linens</i> BL2 ZP_00380688	I-27/L	35	<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Brevibacteriaceae; Brevibacterium</i>
<i>Sulfitobacter sp.</i> NAS-14.1 ZP_00962850	H-230/E I-27/N	34	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Sulfitobacter</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633 NP_800621	H-230/E I-27/N	32	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; Vibrio</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 NP_436936	H-230/E I-27/N	32	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Sinorhizobium</i>
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099 NP_104015	H-230/T I-27/N	33	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Phyllobacteriaceae; Mesorhizobium</i>
<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396 YP_432170	H-230/E I-27/N	31	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Hahellaceae; Hahella</i>
<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8 ZP_00819467	H-230/A I-27/N	29	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae; Marinobacter</i>
<i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855 YP_444579	G-26/T I-27/T	25	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Crenotrichaceae; Salinibacter</i>

Anhang F:**Tab.27: EhuB -ähnliche Proteine.** In dieser Tabelle sind die EhuB-ähnlichen Proteine, ihre Zugriffsnummern am NCBI und eine taxonomische Einordnung der Mikroorganismen aufgelistet.

Mikroorganismus	Zugriffsnummer	Taxonomie
<i>Sinorhizobium meliloti</i> EhuB	NP_436954	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Sinorhizobium</i>
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	<u>NP_107510</u>	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Phyllobacteriaceae; Mesorhizobium</i>
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	ZP_00913767	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Rhodobacter</i>
<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	<u>ZP_00629206</u>	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Paracoccus</i>
<i>Burkholderia fungorum</i> LB400	<u>ZP_00281678</u>	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia</i>
<i>Arthrobacter</i> sp. FB24	<u>ZP_00414893</u>	<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Micrococcaceae; Arthrobacter</i>
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	<u>AAK11558</u>	<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae; Desulfitobacterium</i>
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	<u>NP_627057</u>	<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Streptomycineae; Streptomyetaceae; Streptomyces</i>
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	<u>NP_826407</u>	<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Streptomycineae; Streptomyetaceae; Streptomyces</i>
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama I	<u>NP_880242</u>	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Bordetella</i>
<i>Bordetella parapertussis</i> 12822	<u>NP_884233</u>	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Bordetella</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	<u>NP_888703</u>	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Bordetella</i>
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	<u>NP_746541</u>	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	YP_274487	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.</i>
<i>Thermobifida fusca</i> YX	<u>YP_288364</u>	<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Streptosporangineae; Nocardiodiaceae; Thermobifida</i>

Fortsetzung Tab.27.

Mikroorganismus	Zugriffsnummer	Taxonomie
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	NP_535233	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Agrobacterium</i>
<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	<u>ZP_00686199</u>	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<u>ZP_00216978</u>	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex</i>
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	<u>ZP_00460011</u>	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex</i>
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> str. Hildenborough	<u>YP_011827</u>	<i>Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae; Desulfovibrio</i>
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	YP_174410	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus</i>
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	ZP_00423624	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex</i>

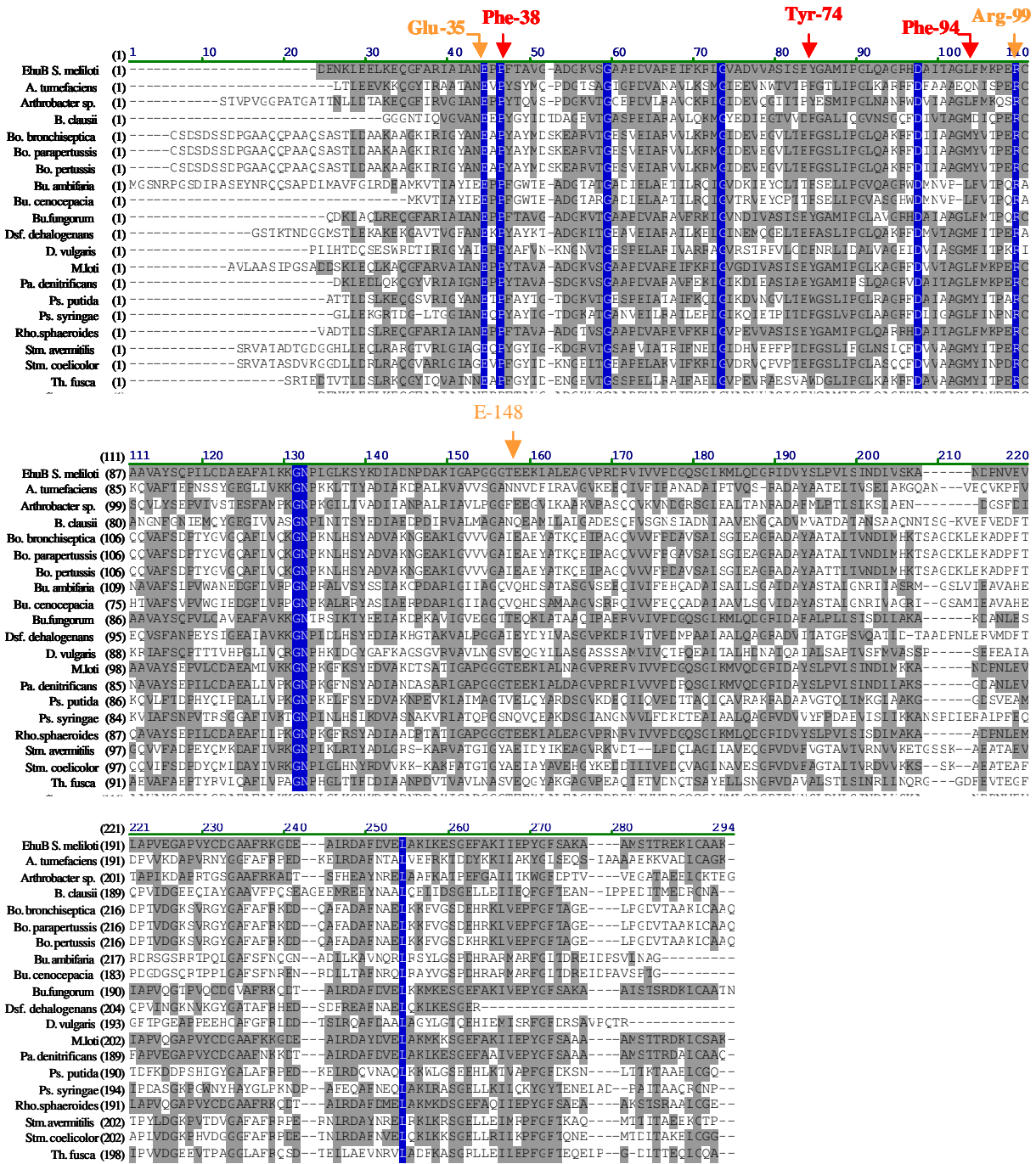


Abb.77: Aminosäuresequenzvergleich EhuB-ähnlicher Proteine. Die Aminosäuren, die in EhuB an der Substratbindung beteiligt sind (F-38, Y-74, F-94; E35, R-99 und E-148) sind im Alignment gekennzeichnet. Informationen über Taxonomie, Zugriffsnummern der Proteine oder Sequenzidentität sind Tabellen 18 und 27 zu entnehmen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

Charakterisierung der molekularen Determinanten zur hochaffinen Bindung
der kompatiblen Soluten Glycin Betain, Prolin Betain, Ectoin und
Hydroxyectoin durch Substratbindeproteine von bakteriellen ABC-
Transportern

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die vorliegende Dissertation wurde in der jetzigen Form oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Linda Sohn-Bösser)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Erhard Bremer bedanken für die Überlassung des interessanten Themas und für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, welche für meine Arbeit sehr wertvoll und motivierend waren. Ein herzliches Dankeschön für die Unterstützung und die Möglichkeit zur Fertigstellung meiner Dissertation.

Prof. Dr. Wolfgang Buckel möchte ich danken für die freundliche Bereitschaft diese Arbeit als zweiter Gutachter zu betreuen.

Prof. Dr. Lutz Schmitt und Dr. Antonio Pierik danke ich für Diskussionsbereitschaft und die äusserst hilfreichen Tips zur fluoreszenzspektroskopischen Vermessung des *A. fulgidus* ProX Proteins. Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Lutz Schmitt für die Bereitstellung der Abbildungen der Kristallstrukturen von OpuAC *B. subtilis* und EhuB *S. meliloti* sowie Dr. André Schiefner für die Abbildungen der Kristallstrukturen von *E. coli* ProX und *A. fulgidus* ProX. Prof. Dr. Mohamed Jebbar danke ich für die Bereitstellung des radioaktiv markierten Ectoins und für die *S. meliloti*-Stämme.

Dr. Tamara Hoffmann und Dr. Ina Budde danke ich für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit, für die konstruktiven Diskussionen und für die hilfreichen Tips im Laboralltag.

Jochen Sohn danke ich für die technische Unterstützung, insbesondere bei der Überproduktion und Reinigung der vielen *A. fulgidus* ProX Proteine und der Bewältigung der technischen Herausforderungen im Umgang mit diversen Computern und Programmen, Maritha Lippman danke ich für die Sequenzierung der Doppelmutanten in der *A. fulgidus* Mutagenesestudie.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Bremer und Buckel möchte ich für die gute Zusammenarbeit, Ratschläge und die schöne Zeit im Labor danken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinem Mann Jochen, sie haben mich immer wieder motiviert und unterstützt.
Ihnen widme ich diese Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Sohn-Bösser, Linda, geb. Bösser
Geburtsdatum, Geburtsort: 24.06.1976 in Marburg
Familienstand: verheiratet (2003), ein Kind (2004)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

1982-1986: Mittelpunktschule Buchenau
1986-1988: Förderstufe Buchenau
1988-1995: Lahntalschule Biedenkopf
Abschluss: Abitur

Studium:

WS 1995 – WS 2000 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
Vordiplom: 17.10.1997
Diplom: 12.02.2001
Schwerpunkte:
Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Virologie

Titel der Diplomarbeit:
Das Substratbindeprotein (ProX) des ABC-Transporters ProU aus Escherichia coli: Gerichtete Mutagenese

Seit 04.2001: Promotion an der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Prof. Dr. E. Bremer

Titel der Dissertation:
Charakterisierung der molekularen Determinanten zur hochaffinen Bindung der kompatiblen Soluten Glycin Betain, Prolin Betain, Ectoin und Hydroxyectoin durch Substratbindeproteine von bakteriellen ABC-Transportern

01.2004- 06.2004: Mutterschutz und Elternzeit

2001-2004: Mitglied des Graduiertenkollegs „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“ an der Philipps-Universität Marburg

Praktikum: Molekulargenetisches Praktikum bei Prof. Dr. E. Bremer, Philipps-Universität Marburg

Marburg, Januar 2006